

Aus der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
Klinik der Universität München
Direktor: Prof. Dr. Sven Mahner

**Mögliche Interaktion des G-Protein-gekoppelten
Östrogenrezeptors mit dem Tumor-spezifischen MUC1 Epitop
TA-MUC1 im Ovarialkarzinom**

DISSERTATION
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Sabina Katharina Page
aus
Offenbach am Main
2023

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. Udo Jeschke
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. Doris Mayr Prof. Dr. Dr. Wolfgang Müller-Holve
Mitbetreuung durch die promovierte Mitarbeiterin:	PD Dr. Dr. Sabine Heublein
Dekan:	Prof. Dr. med. Thomas Gudermann
Tag der mündlichen Prüfung:	02.03.2023

Teile der vorliegenden Arbeit basieren auf folgender Publikation:

Sabine Heublein, Sabina K. Page, Doris Mayr, Elisa Schmoeckel, Fabian Trillsch, Frederik Marmé, Sven Mahner, Udo Jeschke, Aurelia Vattai: *Potential Interplay of the Gatipotuzumab Epitope TA-MUC1 and Estrogen Receptors in Ovarian Cancer*, International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(2): 295.

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	7
1.1. Das Ovarialkarzinom.....	7
1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese.....	7
1.1.2. Diagnostik.....	8
1.1.3. Operative Therapie.....	9
1.1.4. Medikamentöse Therapie.....	10
1.2. Tamoxifen als selektiver Östrogenrezeptor-Modulator in der Behandlung von Tumoren...	13
1.2.1. Tamoxifen Therapie.....	13
1.2.2. Endokrine Therapien in der Behandlung des Ovarialkarzinoms.....	14
1.2.3. GPER und ER's.....	16
1.3. Transmembranprotein Mucin1.....	16
1.3.1. Vorkommen und Struktur von MUC1.....	16
1.3.2. Tumorgenese und Veränderung der Glykosylierung.....	17
1.3.3. Tumorselektivität von TA-MUC1.....	18
1.3.4. Gatipotuzumab Therapie.....	19
1.4. MAP-Kinase-Signalweg.....	20
1.4.1. Zelluläre Signaltransduktion.....	20
1.4.2. Rolle des MAPK/ERK-Signalwegs bei der Tumorentstehung.....	20
1.5. Interaktionen zwischen Östrogenrezeptoren und MUC1.....	21
1.6. Zielsetzung.....	22
2. Material.....	23
2.1. Reagenzien und Lösungen.....	23
2.2. Zelllinien.....	26
2.3. Gewebe.....	26
2.4. Verwendete Geräte.....	27
2.5. Verbrauchsmaterialien.....	28
2.6. Software.....	29
3. Methoden.....	30
3.1. Immunzytochemische Färbung von GPER und TA-MUC1.....	30

3.2. Zellkultur	32
3.2.1. Allgemeine Voraussetzungen	32
3.2.2. Zellkulturtechnik.....	33
3.2.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen	34
3.3. Nachweis von GPER auf mRNA-Ebene	35
3.3.1. Gewinnung der RNA	35
3.3.2. Reverse Transkription.....	36
3.3.3. Quantitative Real-Time PCR.....	37
3.4. Western Blot.....	39
3.4.1. Nachweis von GPER auf Proteinebene	39
3.4.2. Nachweis von p-CREB und p-ERK auf Proteinebene nach Stimulation von GPER	42
3.5. Apoptoseinduktion durch Gatipotuzumab, Tamoxifen (4-Hydroxytamoxifen, 4-OHT) und die Kombination beider mit nachfolgender Zellviabilitätsmessung	43
3.6. Detektion von GPER und E-Cadherin sowie GPER und TA-MUC1 mittels Doppelimmunfluoreszenz	44
3.7. Statistische Auswertung	47
4. Ergebnisse	48
4.1. Validierung des in vitro Modells.....	48
4.1.1. Nachweis von GPER mittels Immunzytochemischer Färbung.....	48
4.1.2. Nachweis von GPER mittels quantitativer PCR und Western Blot.....	50
4.2. Subzelluläre Lokalisation von GPER in Ovarialkarzinomzellen	51
4.2.1. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von GPER und E-Cadherin.....	51
4.2.2. Subzelluläre Lokalisation von GPER im Tumorgewebe	52
4.3. GPER vermittelte Regulation des MAPK-Signalwegs	55
4.3.2. GPER vermittelte Aktivierung von CREB und ERK	56
4.4. Untersuchungen zu einer potenziellen Interaktion von GPER und TA-MUC1	58
4.4.1. Vergleich der subzellulären Lokalisation im Zellkulturmodell	58
4.4.2. Nachweis einer partiellen Kolokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz.....	58
4.4.3. Auswirkung der GPER und TA-MUC1 Einzel- und Kostimulation auf die Viabilität von Ovarialkarzinomzelllinien	60
5. Diskussion.....	63
6. Zusammenfassung.....	71
7. Abkürzungen und Akronyme.....	73

8. Literaturverzeichnis	75
9. Abbildungsverzeichnis.....	82
10. Tabellenverzeichnis	83
11. Ergänzende Abbildungen und Tabellen	84
12. Veröffentlichungen und Kongressbeitrag	86
13. Lebenslauf.....	87
14. Danksagung.....	90
15. Eidesstattliche Versicherung.....	91

1. Einleitung

1.1. Das Ovarialkarzinom

1.1.1. Epidemiologie und Pathogenese

Jährlich erkranken 8 bis 10 von 100.000 Frauen neu an einem Ovarialkarzinom (1). Unter den häufigsten Malignomen der Frau ist das Ovarialkarzinom auf Platz sechs (1). Es hat die höchste Mortalität von allen gynäkologischen Malignomen und trotz der aktuellen Therapiemethoden liegt die 5-Jahres Gesamtüberlebensrate für Ovarialkarzinompatientinnen bei nur 40 bis 45 % (1). Das Lebenszeitrisiko an diesem Karzinom zu erkranken liegt bei 1 % (1) und am häufigsten sind Frauen zwischen 50 und 70 Jahren betroffen (1). Zu den Symptomen des Ovarialkarzinoms gehören Völlegefühl, Blähungen, unklare abdominelle Beschwerden, erhöhte Miktionsfrequenz (2), Bauchumfangszunahme, sowie Obstipation (1). Aufgrund der uncharakteristischen Symptome kommt es oft zu einer verzögerten Diagnosestellung (1). Bei etwa 75 % der Patientinnen wird das Ovarialkarzinom erst in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert (1).

Aktuell gibt es noch kein effektives Screening für das Ovarialkarzinom (3). Die Mortalität kann weder durch die vaginale Tastuntersuchung noch durch den vaginalen Ultraschall oder der Tumormarker CA125 Bestimmung gesenkt werden (1). Ein fortgeschrittenes Ovarialkarzinom kann auch bereits Monate nach einem unauffälligen gynäkologischen Untersuchungsbefundes auftreten (1). Zu den Faktoren, die das Risiko der Entwicklung eines Ovarialkarzinoms erhöhen, gehören hohes Alter, ununterbrochene Ovulationen, Nulliparität, Infertilität und Hormonersatztherapien mit Östrogenen (1). Bei 27-29 % der Ovarialkarzinome liegen BRCA Mutationen vor (4). Die Einnahme von Ovulationshemmern wirkt protektiv gegen die Entwicklung eines Ovarialkarzinoms (1).

Circa 90 % der malignen Ovarialtumoren sind epitheliale Tumoren (5). Diese werden in folgende fünf häufige histologische Subtypen kategorisiert: high-grade serös (HGSOC), low-grade serös (LGSOC), muzinös, endometrioid und klarzellig (6). Weitere Subtypen des Ovarialkarzinoms sind das seromuzinöse Karzinom, das undifferenzierte Karzinom und der maligne Brenntumor (6). Das high-grade seröse Karzinom ist bei weitem das am häufigsten auftretende Ovarialkarzinom

(1). Die Hauptmetastasierungswege des Ovarialkarzinoms sind sowohl über die Exfoliation der Tumorzellen in die Peritonealhöhle als auch über den Lymphabfluss in die pelvinen und paraaortalen Lymphknoten (1).

1.1.2. Diagnostik

Gemäß der S3-Leitlinie zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren ist die konsensbasierte Empfehlung, dass bei Verdacht auf eine Raumforderung des Ovars, eine gynäkologische Spiegeluntersuchung, sowie eine Tastuntersuchung erfolgen sollte (7). Als erste apparative Maßnahme sollte eine vaginale Sonographie durchgeführt werden (7). Malignitätsverdächtige Ultraschallbefunde sind solid-zystische, schlecht abgrenzbare Raumforderungen, Raumforderungen mit Zysten mit unregelmäßiger, verdickter Septierung, sowie Aszites (1). Ein Ultraschallbefund eines Ovarialkarzinoms ist in Abbildung 1 beispielhaft dargestellt (8). Für die weitere Diagnostik kann auch eine abdominelle Sonographie durchgeführt werden, sowie eine Bestimmung des Serumtumormarkers CA125, der bei mehr als 80 % der Patientinnen mit einem Ovarialkarzinom erhöht ist (1). Eine Computertomographie wird verwendet um das Ausmaß der Ausbreitung des Karzinoms zu beurteilen (1). Weitere präoperative diagnostische Maßnahmen um das Ausmaß der Erkrankung zu beurteilen umfassen die MRT, die Kolonosigmoidoskopie und die Gastroskopie (1). Der Verdacht auf ein Ovarialkarzinom kann allerdings nur durch eine Operation mit histologischer Diagnosesicherung bestätigt werden (1).



Abbildung 1: Ultraschallbefund eines Ovarialkarzinoms

Hier wird ein unregelmäßig begrenzter, inhomogener Tumor mit liquiden Anteilen dargestellt (8)

Das Ovarialkarzinom wird gemäß der TNM- und der FIGO-Klassifikation in Stadien eingeteilt (1). Darüber hinaus wird basierend auf die nukleäre Atypie der histologische Differenzierungsgrad von G1 (hoch differenziert) bis G4 (undifferenziert) bewertet (1).

1.1.3. Operative Therapie

Bei Operationen bei Verdacht auf ein Ovarialkarzinom wird ein intraoperativer Schnellschnitt zur Beurteilung der Dignität entnommen (1). Sollte sich der Verdacht auf ein Ovarialkarzinom bestätigen, erfolgt zunächst ein operatives Staging (1). Für das Staging wird zuerst - falls noch nicht erfolgt - eine abdominale Längslaparotomie durchgeführt (1). Auf diese Weise kann die Ausbreitung des Tumors, sowie die Operabilität, eingeschätzt werden (1). Anschließend wird die operative Resektion durchgeführt (1). Das Ziel der Operation des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms ist die postoperative makroskopische Tumorfreiheit, da die Abwesenheit eines makroskopischen Resttumors ein wichtiger Prognosefaktor beim Ovarialkarzinom ist (6, 9). Das Zurückbleiben eines makroskopischen Tumorherds führt bereits ab 1 cm Durchmesser zu einer deutlich verschlechterten Prognose der Patientinnen (1).

Laut der S3-Leitlinie umfasst die operative Therapie bei fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen die totale Hysterektomie mit beidseitiger Adnexektomie, Omentektomie (mindestens infrakolisch),

Peritonealbiopsien, und die Entfernung aller weiteren makroskopisch auffälligen Areale (6). Bei dem muzinösem Subtyp sollte außerdem stets eine Appendektomie erfolgen (6). Bei makroskopischer Tumorfreiheit und unauffälligen Lymphknoten wird eine systematische Lymphonodektomie nicht mehr empfohlen, da diese keinen signifikanten Vorteil bzgl. des Gesamt- und progressionsfreien Überlebens gezeigt hat (10).

1.1.4. Medikamentöse Therapie

Primärerkrankung

Zusätzlich zu einer operativen Therapie erfolgt beim fortgeschrittenen Ovarialkarzinom eine adjuvante oder neoadjuvante Chemotherapie (1). Bei fortgeschrittenen Stadien (FIGO II – IV) ist die Standardtherapie der Primärerkrankung die kombinierte Chemotherapie mit Carboplatin und Paclitaxel (1, 6). Bei FIGO III-IV sollte laut der S3-Leitlinie im Anschluss an die Chemotherapie eine Erhaltungstherapie erfolgen (6). Bevacizumab, PARP-Inhibitoren (Olaparib, Niraparib) und die Kombination aus Bevacizumab + Olaparib können als Erhaltungstherapie eingesetzt werden (6). Bei Karzinomen mit einer homologen Rekombinationsdefizienz (HRD) oder Karzinomen mit BRCA-Mutationen wird gemäß Daten aus der PAOLA-1 Studie eine Erhaltungstherapie mit Olaparib in Kombination mit Bevacizumab empfohlen (6). Alternativ zu einer Bevacizumab Erhaltungstherapie besteht gemäß Daten aus der PRIMA Studie auch die Möglichkeit einer Erhaltungstherapie mit Niraparib (6). In der PRIMA Studie zeigte sich auch ein besonders guter Effekt der Niraparib Erhaltungstherapie bei Karzinomen, die eine HRD aufweisen (6). Eine weitere - in Deutschland bislang jedoch nicht zugelassene - Therapieoption ist der PARP-Inhibitor Veliparib (11). Daten aus der VELIA/GOG-3005 Studie zeigten, dass das Hinzufügen von Veliparib zur Carboplatin/Paclitaxel Primärtherapie und die Fortführung des Veliparibs als anschließende Erhaltungstherapie das progressionsfreie Überleben bei Patienten mit HGSOc im Stadium III und IV erhöhen kann, unabhängig vom BRCA Mutations- und HRD-Status (11).

Eine neoadjuvante Chemotherapie über 3 Zyklen mit Carboplatin/Paclitaxel kann Patientinnen, bei denen eine operative makroskopische Tumorfreiheit zum Zeitpunkt der Diagnose unwahrscheinlich ist, vor einer operativen Therapie verabreicht werden (1). Somit kann die

Tumormasse reduziert werden um bei einer folgenden Operation die Komplikationsrate zu senken, sowie die Wahrscheinlichkeit einer makroskopischen Tumorfreiheit zu erhöhen (1).

Rezidiverkrankung

Obwohl die Platin-Taxan Primärtherapie bei den Patientinnen eine hohe Ansprechrate zeigt, erleiden circa 85 % der Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom ein Rezidiv (12). In Deutschland wird inzwischen zwischen platin-geeignete und nicht-platingeeignete Rezidive unterschieden (6). International wird weiterhin die gebräuchliche Einteilung in platinsensitive und platinresistente Ovarialkarzinome je nach Dauer des platinfreien Intervalls verwendet (6). Platinsensitive Ovarialkarzinome sind die, die frühestens 6 Monate nach Ende der platinhaltigen Chemotherapie ein Rezidiv zeigen, während platinresistente Ovarialkarzinome bereits innerhalb der ersten 6 Monate nach Abschluss der platinhaltigen Chemotherapie ein Rezidiv zeigen (6). Platinrefraktäre Ovarialkarzinome, eine Subgruppe der platinresistenten Ovarialkarzinomen, zeigen entweder kein Ansprechen auf die platinhaltige Chemotherapie oder eine Progression der Erkrankung innerhalb von 4 Wochen nach Ende der Chemotherapie (6). Abhängig davon, ob das Karzinom platinsensitiv oder platinresistent ist, sowie auch von weiteren Faktoren wie unter anderem Alter, Belastbarkeit, genetische Faktoren, und zurückliegende Therapien mit antiangiogenetischen Substanzen oder PARP-Inhibitoren, wird eine Entscheidung über die weitere Therapie des Rezidivs getroffen (6).

Bei platinsensitiven Rezidiven wird zunächst anhand des AGO Scores evaluiert, ob durch eine Rezidivoperation eine erneute makroskopische Komplettresektion möglich erscheint und somit die Patientin für eine Rezidivoperation vor der systemischen Rezidivtherapie geeignet ist (6, 13, 14). Wenn alle drei Komponenten des AGO Scores (ein guter Allgemeinzustand, Tumorfreiheit nach der Primäroperation und kein Nachweis von Aszites beim Rezidiv) erfüllt werden, ist die Wahrscheinlichkeit für eine makroskopische Komplettresektion laut Daten aus der DESKTOP III Studie ausreichend hoch, um eine operative Therapie im Rezidiv zu indizieren (13, 14). Anschließend wird eine platinhaltige Kombinationstherapie mit Carboplatin und möglichst pegyliertem liposomalem Doxorubicin, empfohlen (CALYPSO) (6). Beim ersten Rezidiv kann Bevacizumab zusammen mit der Carboplatin/Gemcitabin und Carboplatin/Paclitaxel Kombinationstherapie verabreicht und als Erhaltungstherapie fortgesetzt werden, vorausgesetzt es

hat keine vorherige anti-VEGF Therapie stattgefunden (6). Eine Erhaltungstherapie mit einem PARP-Inhibitor kann im Anschluss der systemischen Rezidiv Therapie ebenfalls verabreicht werden (6). Hierfür sind die PARP-Inhibitoren Niraparib, Olaparib und Rucaparib zugelassen, wobei Rucaparib zusätzlich als Rezidiv-Monotherapie bei Patientinnen mit BRCA Mutation eingesetzt werden kann (6, 15).

Bei den platinrefraktären und platinresistenten Karzinomen wird eine palliative Therapie mit Fokus auf Symptomkontrolle und den Erhalt der Lebensqualität der Patientinnen erzielt (1, 6). Gemäß der S3-Leitlinie wird zur Behandlung dieser Rezidive eine Monochemotherapie mit pegyliertes liposomales Doxorubicin, Topotecan, Gemcitabin oder Paclitaxel empfohlen (6). Eine Monotherapie mit Treosulfan ist in diesen Fällen ebenfalls zugelassen (16, 17). Bevacizumab kann zusammen mit pegyliertem liposomalen Doxorubicin, Topotecan, sowie Paclitaxel, verabreicht werden, vorausgesetzt es hat keine vorherige anti-VEGF Therapie stattgefunden (6). Insgesamt zeigen alle wirksamen Zytostatika Ansprechraten von circa 20 % und auch dieselben progressionsfreien Remissionsdauern, die oft weniger als 10 Wochen betragen (18). Außerdem können sie das Gesamtüberleben, das bei platinresistenten Patientinnen üblicherweise weniger als 40 Wochen beträgt, nicht verbessern (18). Das schlechte Ansprechen auf diese Therapien hat zur Folge, dass viele dieser Ovarialkarzinompatientinnen mit verschiedenen Therapien sukzessiv behandelt werden (19, 20).

Chemotherapien sind jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen wie z. B. Übelkeit, Erbrechen, zunehmender Fatigue, sowie kumulativer und irreversibler Toxizität behaftet und verhindern häufig dennoch nicht das Voranschreiten der Erkrankung (19, 20). Gerade da eine Heilung nicht mehr erzielt werden kann und die Ansprechraten auf die verfügbaren Therapien niedrig sind, steht der Erhalt der Lebensqualität im Fokus der Behandlung (6, 20, 21). Es besteht ein hoher klinischer Bedarf an nebenwirkungsarmen Therapiemöglichkeiten, die zumindest zu einer mittelfristigen Stabilisierung dieser fortgeschrittenen Karzinomen führen (21).

1.2. Tamoxifen als selektiver Östrogenrezeptor-Modulator in der Behandlung von Tumoren

1.2.1. Tamoxifen Therapie

1.2.1.1. Indikation, Wirkung und Nebenwirkungsprofil

Tamoxifen ist ein gut verträgliches Medikament, das zur Gruppe der selektiven Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) gehört (22-24). SERMs können abhängig von den Zellen sowohl agonistisch, als auch antagonistisch auf Östrogenrezeptoren wirken (22). Tamoxifen zeigt z.B. eine Östrogen-agonistische Wirkung auf Endometrium und eine Östrogen-antagonistische Wirkung auf Mammagewebe (22). Da es somit östrogenhemmend beim Mammakarzinom wirkt, ist Tamoxifen zur adjuvanten und palliativen Therapie des hormonempfindlichen Mammakarzinoms zugelassen (22). Bei Frauen mit Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom senkt adjuvantes Tamoxifen die jährliche Rezidiv Wahrscheinlichkeit um ca. 40% und das jährliche Sterberisiko um ca. 30% (25, 26). Es wird in Tablettenform täglich über mehrere Jahre verabreicht (27, 28). Zu den häufigsten Nebenwirkungen einer Tamoxifen Therapie gehören Hitzewallungen, Übelkeit, Exantheme, Knochenschmerzen und teilreversible Sehstörungen (durch Kataraktbildung, Korneatrübung oder Retinopathie) (22). Im Vergleich zur Chemotherapie hat Tamoxifen dennoch ein günstigeres Nebenwirkungsprofil mit geringerer Toxizität und besserer Lebensqualität der Patientinnen (24).

1.2.1.2. Tamoxifen als Therapie des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms

Östrogenrezeptoren sind bereits in Ovarialkarzinomen nachgewiesen worden (29, 30). Die Wirkung von Tamoxifen bei Frauen mit rezidiertem Ovarialkarzinom, welches nicht auf die konventionelle Chemotherapie angesprochen hat, wurde bereits in mehreren Studien untersucht (21). Studien suggerieren, dass der Einsatz von Tamoxifen eine wirksame Behandlung für Frauen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom sein könnte (21, 31). Zum Beispiel zeigte eine retrospektive Analyse von Chan et. al. einen klinischen Nutzen von Tamoxifen in 56% der untersuchten Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom, die Tamoxifen für mindestens 2 Monate erhalten hatten (knapp 10% hatten ein vollständiges oder ein partielles Ansprechen,

während 46% der Patientinnen eine Stabilisierung der Erkrankung hatten) (31). In einer Studie von Karagol et. al. mit 29 Patientinnen mit platinresistentem Ovarialkarzinom zeigte eine zweimal tägliche Tamoxifen Behandlung mit 20mg Tamoxifen eine vollständige Remission, zwei partielle Remissionen und bei sechs Patientinnen eine Stabilisierung der Erkrankung (32).

Leider gibt es jedoch zum Einsatz von Tamoxifen beim Ovarialkarzinom oft keine aussagekräftigen Studien (21, 31). Dies liegt unter anderem an den wenigen prospektiven randomisierten Studien, an der Heterogenität der Studienpopulationen und den jeweiligen Vorbehandlungen, an der geringen Patientenzahl in den jeweiligen Studien, und an der fehlenden Information über den ER-Status der meisten Patientinnen aus vergangenen Studien (21, 31). Zudem zeigen sowohl in Studien als auch in der Klinik nur eine kleine Anzahl an Patientinnen diese positiven Reaktionen auf Tamoxifen (1, 21, 24, 32). Dennoch hat Tamoxifen im Vergleich zur Chemotherapie eine geringere Toxizität und sorgt für eine bessere Lebensqualität, ohne einen Unterschied in der Effektivität der Symptomkontrolle und im Gesamtüberleben (24). Da das Ziel der Behandlung von Patientinnen mit fortgeschrittenem Ovarialkarzinom darin besteht, den Fortschritt der Erkrankung zu kontrollieren und dabei gleichzeitig die Lebensqualität zu erhalten, ist Tamoxifen weiterhin ein guter Kandidat für die Behandlung dieser Patientinnen (24, 31, 32).

1.2.2. Endokrine Therapien in der Behandlung des Ovarialkarzinoms

Endokrine Therapien gewinnen in der Therapie des Ovarialkarzinoms wieder an Bedeutung (33, 34). Im Rahmen einer palliativen Therapie kann bei circa 10 % der Ovarialkarzinompatientinnen eine vorübergehende klinische Stabilisierung mit wenig bis keine Toxizität durch Gabe von Tamoxifen, Aromataseinhibitoren oder Gonadotropin-Releasing-Hormon-(GnRH) Analoga *subcutan* erreicht werden (1). In der laufenden MITO32 Studie wird die Wirksamkeit und Sicherheit von Letrozol bei stark vorbehandelten Patientinnen mit rezidivierendem Ovarialkarzinom im Vergleich zur Chemotherapie untersucht (33). Zudem wird momentan in der MATAO Studie untersucht, ob die zusätzliche Gabe von Letrozol zur Standard Erhaltungstherapie des Östrogenrezeptor-positiven Ovarialkarzinoms das progressionsfreie Überleben der Patientinnen verlängern kann (34).

In diesem Zusammenhang hat sich in weiteren gynäkologischen Tumoren gezeigt, dass insbesondere Kombinationstherapien mit endokrinen Therapien die Wirksamkeit der alleinigen endokrinen Therapien verbessern kann (35-37). Es wurde zum Beispiel Alpelisib in Kombination mit Fulvestrant zur Behandlung postmenopausaler Frauen und Männern mit Hormonrezeptor-positivem, HER2-negativem, lokal fortgeschrittenem oder metastasiertem Mammakarzinom mit PIK3CA-Mutation im Juli 2020 zugelassen (35, 36). Zudem zeigte die NSGO-PALEO / ENGOT-EN3 Studie, die vor kurzer Zeit veröffentlicht wurde, in Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positivem fortgeschrittenem Endometriumkarzinom ein signifikant verbessertes progressionsfreies Überleben bei den Patientinnen, die mit Letrozol und Palbociclib behandelt wurden (8.3 Monate), im Vergleich zu den Patientinnen die Letrozol und Placebo erhielten (3 Monate) (37).

Weitere Studien unterstützen das Bestehen eines möglichen Zusammenspiels zwischen Östrogenrezeptor-Signalwege bzw. Tamoxifen und MUC1 in Karzinomzellen (siehe Kapitel 1.5) (38, 39). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirkung der kombinierten Therapie bestehend aus Tamoxifen und dem monoklonalen anti-TA-MUC1 Antikörper Gatipotuzumab auf Ovarialkarzinomzellen getestet, um zu untersuchen, ob MUC1 ein für Tamoxifen geeignetes Co-Target sein könnte (40).

Zielgerichtete Therapien, wie Gatipotuzumab, sind auch als „Targeted Therapies“ bekannt (41). „Targeted Therapies“ gewinnen in der Krebstherapie aufgrund ihrer Spezifität gegen gezielten Krebszellen und aufgrund ihrer schonenden Wirkung bzgl. der Toxizität gegen die restlichen Zellen im menschlichen Körper an Bedeutung (41). Zielgerichtete Krebstherapien bestehen hauptsächlich aus monoklonalen Antikörpern oder sogenannte „small molecule inhibitors“, die gezielt gegen spezifische Moleküle auf bestimmten Krebszellen gerichtet sind (41, 42). Diese Therapien werden häufig in Verbindung mit anderen Krebstherapien, z.B. Chemotherapien, eingesetzt (41-43). Eine Kombinationstherapie aus Tamoxifen und Gatipotuzumab könnte potenziell die Effektivität der Tamoxifen Therapie bei Erhalt eines guten Nebenwirkungsprofils erhöhen (41).

1.2.3. GPER und ER's

Der Östrogenrezeptor α (ER α), der Östrogenrezeptor β (ER β) und der G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor (GPER) gehören zur Östrogenrezeptorfamilie (44, 45). ER α und ER β sind Kernrezeptoren und befinden sich hauptsächlich im Zellkern (45). Sie sind Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren, die an DNA binden und die Genexpression beeinflussen (44, 45). Diese Reaktionen treten in einem Zeitraum von Stunden bis Tagen auf (45). Andererseits ist GPER ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der schnelle nicht-genomische Signale innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Zellstimulation aktivieren kann (45). Da GPER ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor ist, erfolgt die Signalübertragung über heterotrimere G-Proteine, die wiederum zelluläre Effektormoleküle aktivieren (45). GPER befindet sich sowohl intrazellulär als auch auf der Plasmamembran und hat sieben Transmembranhelices (44-46).

1.3. Transmembranprotein Mucin1

1.3.1. Vorkommen und Struktur von MUC1

Mucin1, auch als MUC1 bekannt, gehört zur Gruppe der Mucine (47). Mucine sind stark glykosylierte Glykoproteine mit hohem Molekulargewicht (47). Sie tragen zum Schutz von luminalen Epitheloberflächen bei und befinden sich auf den luminalen Epitheloberflächen des Respirationstrakts, Gastrointestinaltrakts und der Fortpflanzungsorgane (47, 48). Die Mucine werden in zwei Gruppen unterteilt: Die sezernierten Mucine und die membran-assoziierten Mucine (47). Zusätzlich zu den zuvor genannten Funktionen beteiligen sich die membran-assoziierten Mucine auch an der intrazellulären Signalübertragung (47). MUC1 gehört zur Gruppe der membran-assoziierten Mucine (47) und ist das am meist untersuchteste Transmembran-Mucin (49). MUC1 befindet sich an der apikalen Oberfläche von gesunden Epithelzellen und besteht aus einer N-terminalen (MUC1-N) und einer C-terminalen (MUC1-C) Untereinheit, die extrazellulär durch Wasserstoffbrückenbindungen miteinander verbunden sind (50). Die extrazelluläre MUC1-N Untereinheit enthält eine „variable number tandem repeat“ (VNTR) Region, die aus wiederholten Sequenzen von 20 Aminosäuren besteht, wobei die Serin- und Threoninreste weitgehend O-glycosyliert sind (50, 51). Eine Tandem Repeat Sequenz des MUC1, bestehend aus 20 Aminosäuren, ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt (52). In der nordeuropäischen

Bevölkerung enthält die VNTR Region zwischen 20 und 120 von diesen Wiederholungen (53). Die MUC1-C Untereinheit besteht aus dem Rest der extrazellulären Domäne, der Transmembrandomäne und der zytoplasmatischen Domäne (Cytoplasmic Tail, CT) (50).

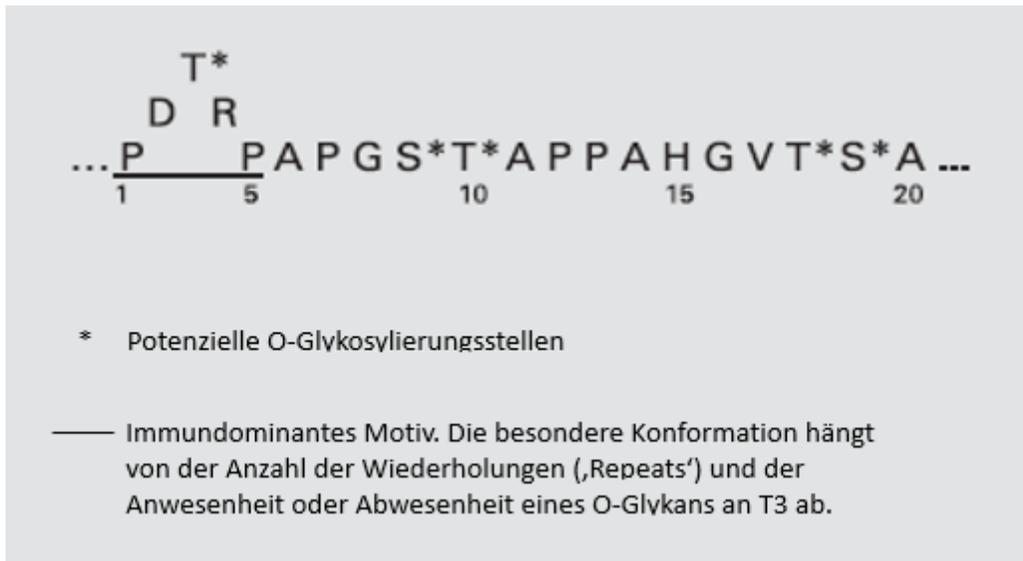


Abbildung 2: Die „PDTRP“ enthaltende Tandem Repeat Sequenz von MUC1 (52)

1.3.2. Tumorgenese und Veränderung der Glykosylierung

Interessanterweise sind transmembrane Mucine wie MUC1 in vielen verschiedenen Adenokarzinomen, unter anderem das Kolonkarzinom, Mammakarzinom, Pankreaskarzinom und Ovarialkarzinom, überexprimiert oder aberrant exprimiert (49). Die Glykosylierung von MUC1 ist ein komplexer Prozess, der bei der Karzinogenese modifiziert ist und zur Exposition von Tumor-spezifischen Epitopen auf MUC1 führt (54). In Abbildung 3 sind MUC1 und Tumor-assoziiertes MUC1 (in dieser Abbildung als „TA-MUC1“ bezeichnet) beispielhaft dargestellt (55). Auf diesem Tumor-assoziierten MUC1 befindet sich das tumor-spezifische TA-MUC1 Epitop, welches das immundominante „PDTRP Motif“ enthält (52, 56).

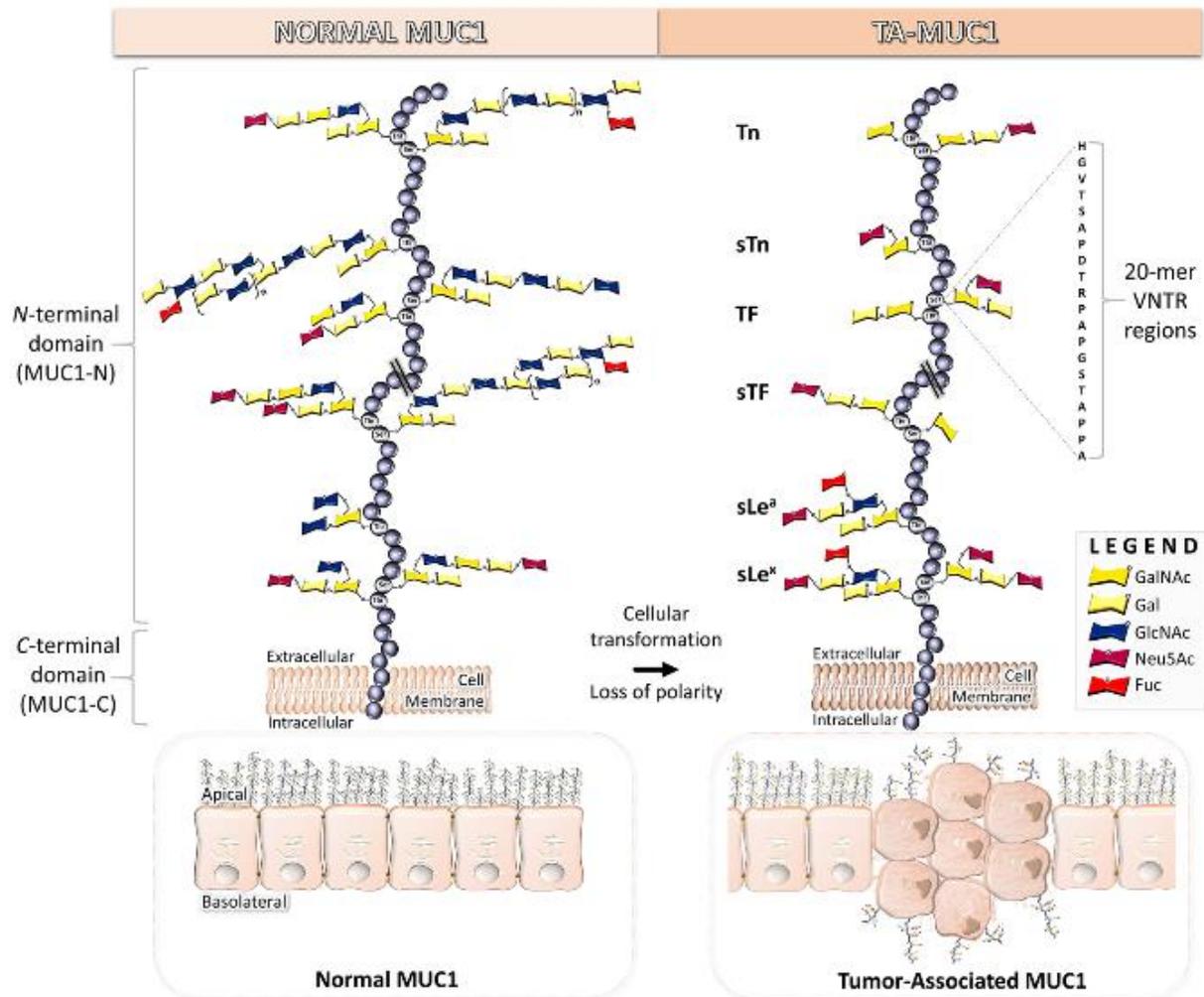


Abbildung 3: Unterschiede in der Struktur und Polarität zwischen normalem und tumorassoziiertem MUC1 (55)

1.3.3. Tumorselektivität von TA-MUC1

TA-MUC1 ist ein Konformationsepitop, das aus der Aminosäuresequenz von „...PDTRP...“ besteht, wo das „T“ (Threonin) mit einem kurzen, nicht-sialierten Glykan O-glykosyliert ist, z.B. mit GalNAc α 1- oder Gal β 1-3GalNAc α 1- (56, 57). Das „PDTRP Motif“ ist exemplarisch in Abbildung 2 dargestellt (52). Die Konformation des TA-MUC1 Konformationsepitops wird durch die O-Glykosylierung von Threonin mit den erwähnten Kohlenhydratantigenen oder verwandten kurzen Glykanen induziert (56, 58). In einer Studie von Fan et al. wurde die Reaktivität eines humanisierten Antikörpers, der spezifisch gegen das TA-MUC1 Epitop gerichtet ist (Pankomab, heute unter dem Namen Gatipotuzumab bekannt), in verschiedenen Karzinomen untersucht (59).

Die Ergebnisse zeigten, dass TA-MUC1 in einer Vielzahl von Karzinomen, z.B. im nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC), im Mammakarzinom, im Zervixkarzinom und im Magenkarzinom, mit Hilfe von Gatipotuzumab nachgewiesen werden konnte (59). In einer weiteren Studie konnte TA-MUC1 mit Hilfe von Gatipotuzumab auch in Ovarialkarzinomgewebe nachgewiesen werden und es zeigte sich zugleich keine TA-MUC1 Färbung in gesundem Ovarialgewebe (58). Gatipotuzumab reagierte insgesamt stark mit Karzinomen aus Drüsen- und Plattenepithelialen, schwach mit hepatozellulären Karzinomen und überhaupt nicht mit Sarkomen (59). Die Bindungsstellen dieses Anti-TA-MUC1 Antikörpers waren in den Karzinomen nicht nur apikal, sondern über die gesamten Zelloberflächen und in der Mehrheit der Zellen auch im Zytoplasma zu finden (59).

1.3.4. Gatipotuzumab Therapie

Gatipotuzumab, früher als Pankomab-GEX® bekannt, ist ein hochspezifischer Antikörper der gegen das tumor-assoziierte Epitop TA-MUC1 gerichtet ist (40). Die Verwendung von Gatipotuzumab als zielgerichtete Krebstherapie wurde in klinischen Studien untersucht (60, 61). In einer Phase I Studie mit Patienten mit verschiedenen TA-MUC1 positiven Karzinomen wurde gezeigt, dass Gatipotuzumab gut verträglich ist und bei 28 von 60 Patienten einen klinischen Nutzen zeigte (60). Diese Patienten hatten alle eine fortgeschrittene metastatische Erkrankung, bei der vorhandene Standardbehandlungsverfahren schon ausgeschöpft waren (60). Bei den Patientinnen dieser Studie, die ein Ovarialkarzinom (oder NSCLC) hatten, wurde häufiger eine Tumorkontrollaktivität von Gatipotuzumab beobachtet (60). Diese wurde in acht von fünfzehn Ovarialkarzinompatientinnen und in drei von sieben NSCLC Patienten beobachtet (60). Eine besonders gute Anti-Tumor Aktivität wurde bei einer Patientin mit einem mehrfachbehandeltem Ovarialkarzinom beobachtet (60). In einer Phase II Studie zeigte Gatipotuzumab jedoch keine signifikante Wirkung, als es als Erhaltungstherapie bei TA-MUC1 positiven Ovarialkarzinompatienten angewendet wurde (61).

Gatipotuzumab wirkt als therapeutischer Antikörper über eine Reihe von Antitumor-Wirkmechanismen. Diese Mechanismen umfassen u. a. antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität (antibody-dependent cell cytotoxicity, ADCC), antikörperabhängige zellvermittelte Phagozytose (ADCP) und die Induktion von Apoptose (40, 60, 62). In Bezug auf die ADCC und

ADCP Mechanismen wurde die Glykosylierung von Gatipotuzumab mithilfe von glyco-engineerten Produktionszelllinien auf der GlycoExpressTM-Plattform optimiert, um ein menschliches Glykosylierungsmuster zu erhalten (40, 60). Dieses humane Glykosylierungsmuster von Gatipotuzumab löst eine stärkere ADCC- und ADCP-Reaktion aus und verbessert die Apoptose von TA-MUC1-exprimierenden Tumorzellen (40, 60). Außerdem ermöglicht die schnelle Internalisierung von Gatipotuzumab ein spezifisches Abtöten von TA-MUC1-positiven Tumorzellen bei Kopplung mit einem Toxin i.R. eines Antikörper-Wirkstoff-Konjugats (ADC) (62, 63). Im Vergleich zu anderen anti-MUC1-Antikörpern weist Gatipotuzumab eine hohe Spezifität und Affinität auf, und wird von abgestoßenem („shed“) MUC1 weniger gebunden (62). Diese Eigenschaften, zusätzlich zu den wirksamen Antitumor-Mechanismen, machen Gatipotuzumab zu einem vielversprechenden Antikörper für den zukünftigen therapeutischen Einsatz (62).

1.4. MAP-Kinase-Signalweg

1.4.1. Zelluläre Signaltransduktion

Der Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) Signalweg wird durch verschiedene extrazelluläre Signale, z.B. von der Zelloberfläche oder der Zellumgebung, aktiviert (64, 65). In den MAPK-Signalwegen werden zahlreiche Proteine phosphoryliert, einschließlich Transkriptionsfaktoren, Zytoskelettproteine, Kinasen und Enzyme (64-66). Somit regulieren diese Signalwege die Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose (64-66). Diese MAPK-Signalwege bestehen alle aus einem Kern von 3 Proteinkinasen (MAPKKK, MAPKK und MAPK), die nacheinander durch Phosphorylierung aktiviert werden (65, 66).

1.4.2. Rolle des MAPK/ERK-Signalwegs bei der Tumorentstehung

Eine Dysregulation des MAPK-Signalweges spielt eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung in einer Vielzahl von Krebsarten (67, 68). Eine abnormale MAPK-Signalübertragung kann z.B. zu einer unkontrollierten Zellproliferation und Apoptoseresistenz führen (67). Daher sind diese Signalwege ein potenzielles therapeutisches Ziel für die Krebsbehandlung (68). Von den MAPK-

Signalwegen ist der MAPK/ERK der am häufigsten fehlregulierte Signalweg bei menschlichen Krebserkrankungen (68). Dieser Signalweg kann auf verschiedene Weisen aktiviert werden, unter anderem über die Rezeptor Tyrosinkinase und G-Protein-gekoppelte Rezeptor (GPCR) Aktivierung (66, 69). EGFR (epidermal growth factor receptor) ist ein Beispiel für eine Rezeptor Tyrosinkinase, die den MAPK/ERK-Signalweg aktiviert (70). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Stimulation des Östrogenrezeptors GPER in high-grade serösen Ovarialkarzinomzellen den MAPK-Signalweg in diesen Zellen aktiviert.

1.5. Interaktionen zwischen Östrogenrezeptoren und MUC1

Es wurde bereits gezeigt, dass anti-MUC1 Antikörper auch MUC1 intrazelluläre Signalwege aktivieren können (71). Studien unterstützen das Bestehen eines möglichen Zusammenspiels zwischen MUC1- und Östrogenrezeptor-Signalwege in Karzinomzellen (38, 39). Es wurde z.B. bei Patienten mit östrogenrezeptor-positivem, metastasierten Mammakarzinom festgestellt, dass ein therapeutischer Krebsimpfstoff, welcher u.a. auf das MUC1 zielt, das Ansprechen auf eine endokrine Therapie verbesserte (38). Des Weiteren wurde auch gezeigt, dass MUC1 eine Tamoxifen-Resistenz beim Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinom induzieren kann (39). Zudem wurde bereits eine positive Korrelation von TA-MUC1 Expression mit der Expression der Östrogenrezeptoren ER α und GPER im Ovarialkarzinomgewebe festgestellt (72). In der vorliegenden Arbeit wurde unter anderem der Effekt der Kostimulation von GPER und TA-MUC1 auf die Viabilität von Ovarialkarzinomzelllinien untersucht und ob das gegen TA-MUC1 gerichtete Gatipotuzumab die Wirksamkeit von Tamoxifen in Ovarialkarzinomzellen beeinflusst (oder umgekehrt). Für die Untersuchungen mit Tamoxifen wurde der aktive Metabolit 4-Hydroxytamoxifen verwendet.

1.6. Zielsetzung

Die derzeitigen Chemotherapien sind nicht ausreichend effektiv in der Behandlung von Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen und viele dieser Patientinnen werden daher mit verschiedenen Therapien sukzessiv behandelt (19, 20). Diese Therapien sind mit kumulativen und irreversiblen Nebenwirkungen bei trotzdem voranschreitender Erkrankung behaftet (19, 20). Aus diesem Grund besteht ein großer Bedarf an neuen, nebenwirkungsarmen Medikamenten, die zumindest zu einer Stabilisierung von fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen, die nicht auf herkömmliche Therapien ansprechen, führen (21).

Obwohl nur eine kleine Anzahl an Ovarialkarzinompatientinnen auf eine Tamoxifen Therapie ansprechen, hat Tamoxifen im Vergleich zur Chemotherapie eine geringere Toxizität und sorgt für eine bessere Lebensqualität, ohne in der Effektivität der Symptomkontrolle und im Gesamtüberleben unterlegen zu sein (1, 21, 24, 32). In dieser Arbeit wird untersucht, ob eine Kombinationstherapie mit Tamoxifen das Ansprechen auf die Therapie erhöhen kann. Im Mammakarzinom wurde bereits gezeigt, dass Kombinationspartner das Ansprechen auf eine endokrine Therapie verbessern konnte (38). Da MUC1- und Östrogenrezeptor-Signalwege in Karzinomzellen möglicherweise interagieren, wird untersucht, ob durch die Kostimulation von Ovarialkarzinomzellen mit Tamoxifen und Gatipotuzumab eine Interaktion in Form einer gegenseitigen Wirkungsverstärkung entsteht und, ob diese Therapien potenziell als Kombinationstherapie in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms eingesetzt werden könnten (38, 39, 73, 74).

2. Material

2.1. Reagenzien und Lösungen

Bezeichnung	Quelle
AB Serum	Biorad medical diagnostics GmbH, Hercules, CA, USA
Aceton	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Antikörper β -actin, Mouse IgG, monoklonal	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Antikörper Gatipotuzumab, Mouse IgG1, Kappa, monoklonal, humanisiert	Glycotope, Berlin, DE
Antikörper Goat-Anti-Human IgG + IgM biotinyliert	Dianova, Hamburg, DE
Antikörper Goat-Anti-Mouse IgM biotinyliert	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Dossenheim, DE
Antikörper Goat-anti-Maus IgG, Cy3	Dianova, Hamburg, DE
Antikörper Goat-anti-Rabbit IgG, Cy2	Dianova, Hamburg, DE
Antikörper Goat-anti-Rabbit IgG, Cy3	Dianova, Hamburg, DE
Antikörper GPER, Rabbit IgG, polyklonal	Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA
Antikörper normal Rabbit Ig	Biogenex, Fremont, CA, USA
Antikörper CREB, Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Antikörper E-Cadherin, Mouse IgG1	Calbiochem, San Diego, CA, USA
Antikörper MAPK (ERK 1/2), Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Antikörper Phospho-CREB, Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Antikörper Phospho-MAPK (ERK 1/2), Rabbit mAb	Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, DE
Aquatex ® Eindeckmedium	Merck, Darmstadt, DE
BCIP/NBT-Chromogen-Substrat Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
Blotpuffer (Tris/Glycine Puffer)	Bio-Rad, München, DE

Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, DE
Bradford Standard, Protein Assay Standard II	Bio-Rad, München, DE
Cell Culture Freezing Medium	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA
Cell Culture Freezing Medium	Roche, Mannheim, DE
Citronensäure, 0,1M (Merck #244)	Merck, Darmstadt, DE
DMSO	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
25x dNTP Mix (100mM)	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Dulbeccos MEM (DMEM) (3.7g/L NaHCO ₃ , w 4.5g/L D-Glucose, w stable glutamine, Napyruvate, low endotoxin)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Ethanol	Apotheke Großhadern, LMU, München, DE
Fetales Kälberserum (FBS Superior, FCS)	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Forskolin	Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA
G1	Tocris Bioscience, Bristol, EN
Gatipotuzumab	Glycotope, Berlin, DE
G-Protein Coupled Estrogen Receptor 1 (Hs00173506_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) (Hs99999905_m1)	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS)	Biochrom, Berlin, DE
High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Laufpuffer (Tris/Glycine/SDS Puffer)	Bio-Rad, München, DE
Membrane De-salting Buffer (MDB)	Macherey-Nagel, Düren, DE
Methanol	Apotheke Großhadern, LMU, München, DE
Methanol for Analysis	Merck, Darmstadt, DE
Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Multiscribe™ Reverse Transkriptase	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Mycoplasmen Test Kit II	AppliChem GmbH, Darmstadt, DE
Nuklease-freies Wasser	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
NucleoSpin® RNA II Kit	Macherey-Nagel, Düren, DE
Oligo dT Primer	Applied Biosystems, Darmstadt, DE

PBS Dulbecco w/o Ca ²⁺ w/o Mg ²⁺ , low endotoxin	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Precast Gel Mini-Protean TGX	Bio-Rad, München, DE
Protein Standard (Page Ruler Pre-stained Protein Ladder)	Fermentas, Waltham, MA, USA
RA1, RA2, RA3 Puffer	Macherey-Nagel, Düren, DE
Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA Puffer)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
rDNase	Macherey-Nagel, Düren, DE
Reaction Buffer für rDNase	Macherey-Nagel, Düren, DE
RNasefreies Wasser	Macherey-Nagel, Düren, DE
RNase Inhibitor	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Roti-Load 1 4x Konzentrat Probenpuffer	Roth, Karlsruhe, DE
10x RT Puffer	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Saures Hämalaun nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, DE
Streptavidin, Cy 2 konjugiert	Dianova, Hamburg, DE
Substrat Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC)	Dako, Glostrup, Dänemark
Tamoxifen, 4-Hydroxy-, (Z)-	Calbiochem, San Diego, CA, USA
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix 2x	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
TBS	Apotheke Großhadern, LMU, München, DE
Trypan Blue Solution (0,4 %)	Sigma Life Sciences, St. Louis, MO, USA
Trypsin/EDTA Lösung, 0,05 %/0,02 %	Biochrom GmbH, Berlin, DE
Tween 20	Sigma Life Sciences, St. Louis, MO, USA
Ultra V Block	LabVision, Fremont, CA, USA
Vectashield Eindeckmedium mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI)	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain ABC-AmP Rabbit IgG-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite Mouse IgG Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite Rabbit IgG Kit	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Verdünnungsmedium	Dako, Glostrup, DK
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂), 30 %	VWR International, Radnor, PA, USA

2.2. Zelllinien

Bezeichnung	Quelle
COV318	European Collection of Authenticated Cell Cultures (ECACC), Salisbury, UK
OV-90	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
OVCAR-3	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
SKOV-3	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
FUOV-1	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ), Braunschweig, Germany
TOV112D	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
SW626	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
UWB1289	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA
ES-2	American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA

2.3. Gewebe

Formalin-fixiertes, in Paraffin eingebettetes (FFPE) Ovarialkarzinomgewebe vom histopathologischen Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Ludwig-Maximilians-Universität München (LMU München) wurde bereits in der Vergangenheit auf GPER gefärbt und einem IRS Score zugeordnet (75). Die Daten hierzu wurden bereits in der Publikation “The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) is a Gonadotropin Receptor Dependent Positive Prognosticator in Ovarian Carcinoma Patients“ von S. Heublein et al. (2013) veröffentlicht (75). Daraufhin wurde von Frau PD Dr. Dr. S. Heublein die subzelluläre Lokalisation des GPERs bei allen Schnitten mit einem IRS > 1 beurteilt.

Die Daten zu den histologischen Subtypen, FIGO Stadien und pTNM Klassifikationen wurden retrospektiv aus pathologischen Berichten, sowie aus dem Tumorregister München erhalten. Das Gewebe stammte von Patientinnen, die aufgrund eines Ovarialkarzinoms zwischen 1990 – 2002 operiert wurden. Frauen mit benignen Tumoren und Borderline-Tumoren wurden von diesem Kollektiv ausgeschlossen. Die oben genannten Daten wurden zur Auswertung der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe in Bezug auf die histologischen Subtypen, Gesamtüberleben, sowie FIGO und pTNM Klassifikation verwendet.

2.4. Verwendete Geräte

Bezeichnung	Quelle
Brutschrank, 37°C, 5 % CO ₂	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Color Video camera, JVC	JVC, Yokohama, Japan
7500 Fast Real-Time PCR Gerät	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Fluoreszenzmikroskop Axioskop	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE
Gefrierschrank, -20°C	Siemens, München, DE
Gefrierschrank, -80°C	Thermo Scientific, Waltham, MA, USA
Kühlschrank, 4°C	Siemens, München, DE
Lichtmikroskop Diaplan	Leica Microsystems, Wetzlar, DE
Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg, DE
Mini Protean 3 System Bestandteile	Bio-Rad, München, DE
MRX Microplate Reader	DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA
Nanophotometer™ (RNA Extraktion)	Implen, München, DE
Rüttler	Edmund Bühler, Hechingen, DE
Spektralphotometer Ultrospec 3100 pro	GE Healthcare, Buckinghamshire, E
Sterile Sicherheitswerkbank	Kendro Laboratory Products GmbH, Sorvall heraeus, Hanau, DE

Tischzentrifuge Minispin	Eppendorf, Hamburg, DE
Vortex, Genie 2	Bender und Hobein, Zürich, CH
Wärmeschrank	Binder, Tuttlingen, DE
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik (GFL), Burgwedel, DE
Zentrifuge	Hermle Labortechnik, Wehingen, DE

2.5. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Quelle
Adhesive Cover	Applied Biosystems, Darmstadt, DE
Dako Pen	Dako, Glostrup, DK
Deckgläser	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE
Easypet Pipettierhilfe	Eppendorf, Hamburg, DE
Eppendorf Reaktionsgefäße, 1,5 mL und 2 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
Falcon Röhrchen, 15 mL	Corning Inc., Corning, NY, USA
Falcons, 50 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
KIMTECH Brand Absorbent Towels	Kimberly Clark Professional, United Kingdom
Kryoröhrchen	Biozym Scientific GmbH, Hessisch, Oldendorf, DE
Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Mini Trans-Blot Filterpapier	Bio-Rad, München, DE
Neubauer Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen, DE
NucleoSpin-Filter für RNA- Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
NucleoSpin® RNAII Säule für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Objektträger Superfrost ®	Menzel-Gläser, Braunschweig, DE

PCR Eppendorf Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipetten	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen epT.I.P.S.® 0,1 – 5 mL	Eppendorf, Hamburg, DE
Pipettenspitzen 100 µL und 1250 µL	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Pipettenspitzen, SurPhob Spitzen, 10 µL	Biozym Scientific GmbH, Hessisch, Oldendorf, DE
Polyvinylidene Fluoride Membran (PVDF- Membran)	Roth, Karlsruhe, DE
QuadriPERM, 4-Well Platten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Sammelgefäß für RNA-Extraktion	Macherey-Nagel, Düren, DE
Serologische Pipetten für Easypet 2 mL, 5 mL, 10 mL, 25 mL	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Well Platten, 24-Well-Platten	Sarstedt, Nümbrecht, DE
Well Platten, 96-Well-Platten	Becton Dickinson (BD), Franklin Lakes, NJ, USA
Zellkulturflasche, T175 cm ² und T75 cm ²	Corning Inc., Corning, NY, USA
Zellscraper	Sarstedt, Nümbrecht, DE

2.6. Software

Bezeichnung	Quelle
Revelation Software Version 4.25	DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA
Microsoft Excel	Redmond, WA, USA
IBM Statistikprogramm SPSS Version 22 und 25	IBM, Armonk, NY, USA
Zeiss Axio Vision Rel. 4.8	Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE

3. Methoden

3.1. Immunzytochemische Färbung von GPER und TA-MUC1

Die Immunzytochemie Methode wurde angewendet, um die Expression von GPER und TA-MUC1 in Ovarialkarzinomzellen nachzuweisen. Diese Methode beruht auf der Detektion der beiden Proteine anhand der ABC-Methode ((Strept-)Avidin-Biotin-Komplex). Avidin ist ein Glykoprotein, das eine Affinität, sowie auch vier Bindungsstellen für Biotin hat (76). Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin (76). In dieser Methode wird jedoch anstatt Avidin, das reinere Produkt Streptavidin verwendet, da Avidin zu unspezifischen Reaktionen führen kann (76). Zu Beginn der ABC-Methode wird ein biotinylierter Sekundärantikörper (ein Brückenantikörper) auf das Gewebe gegeben, der an die Antigen-markierenden Primärantikörper bindet (76). Das Streptavidin vom vorbereiteten ABC-Komplex bindet daraufhin mit der freien Bindungsstelle an das Biotin am Sekundärantikörper (76). Das ABC-Komplex besteht aus Streptavidin, das an den Bindungsstellen mit einem biotinyliertem Enzym, Peroxidase, gekoppelt ist (76). Die Peroxidase im ABC-Komplex spielt in den weiteren Detektionsschritten eine Rolle, indem es ein Chromogen, wie 3-Amino-9-ethylcarbazol (AEC), in ein farbiges Endprodukt umsetzt (76).

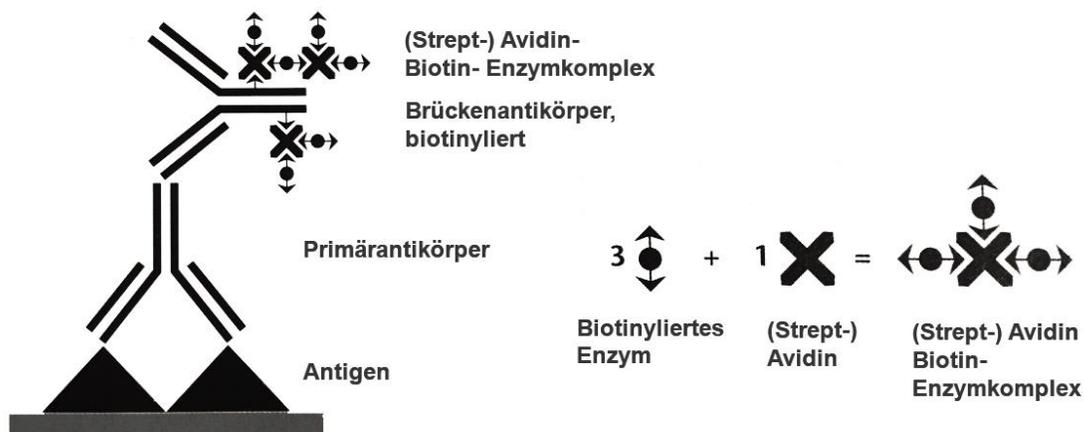


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) mit Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex (58).

Für den Nachweis von GPER i.R. der Validierung des in-vitro Modells, sowie für den Nachweis und Vergleich der subzellulären Lokalisationen von GPER und TA-MUC1, wurden sowohl Zellen

in Kultur als auch bereits auf Objektträger eingefrorene Zellen verwendet. Pro Ovarialkarzinomzelllinie wurden eine Million Zellen auf Objektträger in einer 4-Well-Platte ausgesät und über 48h im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Die Objektträger wurden mit PBS gewaschen und für 15 Minuten bei Raumtemperatur in 50 % Methanol – 50 % Ethanol (GPER Färbung) bzw. 5 Minuten in Aceton (TA-MUC1 Färbung) fixiert. Nachdem die Zellen in Raumluft getrocknet waren, wurde mit einem Dako-Pen ein Kreis um ein Areal mit Zellen des Objektträgers gezogen. Dieser eingekreiste Bereich wurde daraufhin für die weiteren Färbungsschritte verwendet. Die Objektträger mit Zellen wurden mit PBS ein weiteres Mal gewaschen und mit folgendem Blockierungsserum inkubiert (siehe Tabelle 1).

Färbung	Blockierungsserum	Inkubationszeit
GPER	Ziegen Blockierungsserum aus dem Vectastain Elite rabbit-IgG-Kit	20 Minuten
TA-MUC1	Pferd Blockierungsserum aus dem Vectastain Elite mouse IgG-Kit	3 Minuten

Tabelle 1: Blockierungsserum für die Immunzytochemie

Das Blockierungsserum wurde danach abgeklopft. Anschließend wurden die Zellen mit den entsprechenden Primärantikörpern in einer Feuchtkammer inkubiert (siehe Tabelle 2). Alle Inkubationsschritte fanden in einer Feuchtkammer statt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Primärantikörper	Verdünnung	Inkubation
GPER Rabbit IgG. polyclonal Lifespan Biosciences	1:300 in Dako Verdünnungsmedium	16h bei 4°C
hPankomab (Mouse IgG1 kappa monoklonal;humanisiert), Glycotope	1:200 in PBS	1h bei Raumtemperatur

Tabelle 2: Primärantikörper für die Immunzytochemie

Die Objektträger wurden für die GPER Färbung mit PBS und für die TA-MUC1 Färbung mit PBS/Brij gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die Zellen mit folgenden Sekundärantikörpern inkubiert (siehe Tabelle 3).

Sekundärantikörper	Verdünnung	Inkubation
Biotinylierter Sekundärantikörper des Vectastain-ABC-Elite Kits (Ziegen Normalserum, Anti-rabbit-IgG, 10 mL PBS)	-	30 Minuten bei Raumtemperatur
Goat-Anti-Human IgG + IgM biotinyliert (Dianova, Hamburg, DE)	1:250	30 Minuten bei Raumtemperatur

Tabelle 3: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie

Daraufhin wurden die Objektträger mit Zellen mit PBS gewaschen, für 30 Minuten mit dem ABC-Komplex vom Vectastain-Elite-Kit inkubiert, und anschließend erneut mit PBS gewaschen. Als nächstes wurden die Zellen, auf die das GPER Rabbit IgG Primärantikörper aufgetragen wurde, 3-5 Min mit 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen, auf die das hPankomab Primärantikörper aufgetragen wurde, wurden 10 Min mit AEC inkubiert. Während der Inkubation mit AEC wurde der Farbumschlag bei den Zellen unter dem Lichtmikroskop beobachtet. Sobald eine ausreichende rot-braune Färbung der Zellen beobachtet wurde, wurden die Zellen in Aqua dest. gespült, um die rot-braune Farbreaktion zu stoppen. Danach wurden die Zellkerne 30 Sekunden mit saurem Hämalaun nach Meyer gegengefärbt. Hämalaun nach Mayer ist ein positiv geladener, basischer Farbstoff. In saurem Milieu lagert sich dieser Farbstoff an negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA im Zellkern. Die Objektträger wurden anschließend 3 Minuten mit Leitungswasser gespült, was zu einer Blaufärbung der Zellkerne führte. Nachdem die Objektträger mit Aqua dest. gespült wurden, wurden diese mit Aquatex eingedeckt.

Die Expression von GPER und TA-MUC1 in den Ovarialkarzinomzellen wurde durch ein Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) beurteilt. Mit Hilfe einer digitalen Kamera (JVC, Yokohama, Japan) wurden Aufnahmen gemacht.

3.2. Zellkultur

3.2.1. Allgemeine Voraussetzungen

Die Zellen wurden im Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), das mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) ergänzt wurde, kultiviert und in T75 (oder T175) Flaschen aufbewahrt. Das DMEM wurde im Kühlschrank bei 4°C gelagert. Die Zellkulturflaschen wurden in einer feuchten

Umgebung im Brutschrank bei 37°C und 5 % CO₂ aufbewahrt. Sie wurden stets unter sterilen Bedingungen versorgt und regelmäßig auf Mycoplasmen Kontamination geprüft.

3.2.2. Zellkulturtechnik

Die Zellkultivierung wurde an einer sterilen Werkbank (Kendro Laboratory Products GmbH, Sorvall heraeus, Hanau, DE) durchgeführt. Regelmäßig wurde das Medium ausgewechselt, indem 12 mL (24 mL bei T175 Flaschen) verbrauchtes Medium abpipettiert wurde und mit 12 mL bzw. 24 mL neuem, im Wärmeschrank bei 37°C aufgewärmtem Medium, ausgetauscht wurde. Die Zellpassagierung erfolgte ein Mal pro Woche bzw. abhängig vom Zellwachstum, sobald sich auf dem Boden der Flasche ein unter einem Lichtmikroskop (Leica Microsystems, Wetzlar, DE) sichtbares Monolayer von Zellen gebildet hatte. Durch das Passagieren wurde das Absterben der Zellen verhindert.

Zu Beginn der Passagierung wurde das verbrauchte Medium abpipettiert. Die Zellen wurden mit 6 mL (8 mL bei den T175 Flaschen) Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gespült, um das restliche FCS auszuwaschen, da sonst die Wirkung von Trypsin im nächsten Schritt gehemmt wird. Das PBS wurde nach dem Spülen verworfen. Es wurden anschließend 2 mL (3 mL bei den T175 Flaschen) Trypsinlösung in die Flaschen mit den Zellen gegeben. Diese Flaschen wurden anschließend für 8 bis 15 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. Mit dem Trypsin konnte das aus Zellen bestehende Monolayer vom Boden der Flaschen gelöst werden. Danach wurden die Flaschen vom Inkubator entnommen und, falls die Zellen noch nicht vollständig vom Flaschenboden gelöst worden waren, einen Zellscraper verwendet, um diese zu lösen. Es wurden daraufhin 8 mL (12 mL bei den T175 Flaschen) DMEM/FCS zu den Trypsinlösungen in die Flaschen gegeben, um mit Hilfe des FCS die Wirkung von Trypsin anzuhalten. Die Zellsuspensionen in den Flaschen wurden gemischt und anschließend in 50 mL Falkons pipettiert. Zwischendurch wurden circa 100 µL der Zellsuspensionen in 1,5 mL Eppendorf Reaktionsgefäße für die Zellzählung pipettiert. Die Falkons wurden daraufhin in einer Zentrifuge platziert und bei 1.000 UpM, Raumtemperatur und Bremse 2 für 5 Minuten zentrifugiert.

Während die Zentrifugation lief, wurde die Zellzählung durchgeführt. Zum Zählen wurden für jede Zelllinie 25 µL Zellsuspension aus den Reaktionsgefäßen mit jeweils 50 µL PBS und 25 µL Trypanblau gemischt. Diese Lösungen wurden nacheinander auf eine Zählkammer pipettiert, die

anschließend unter dem Lichtmikroskop platziert wurde. Daraufhin wurden die Zellen in allen vier Quadranten gezählt. Die Summe der Zellen aus allen Quadranten wurde mit 10 mL Zellsuspension (15 mL, bei den Zellsuspensionen von den T175 Flaschen) und dem Faktor 10^4 (dieser Faktor ergibt sich aus den Maßen der Zählkammer) multipliziert, um die Gesamtzahl der Zellen in der 10 mL (bzw. 15 mL) Zellsuspension im Falcon zu berechnen.

Der Überstand aus den fertig zentrifugierten Falkons wurde abpipettiert und das Pellet in DMEM/FCS erneut zu einer Konzentration von 1 Million Zellen/ mL suspendiert. Von jedem Falcon wurde abhängig vom Zellwachstum eine bestimmte Menge an Zellsuspension in die zuständigen Flaschen wieder gefüllt. Daraufhin wurde ausreichend Medium dazugegeben, sodass die Flaschen wieder insgesamt 12 mL (15 mL bei T175 Flaschen) beinhalteten. Die Flaschen wurden daraufhin geschwenkt und schließlich zurück im Brutschrank platziert.

3.2.3. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurde das Einfriermedium mit DMSO zuerst im Kühlschrank bei 4°C zum Auftauen gelagert. Trypsin, PBS Dulbecco und DMEM/FCS wurden im Wärmeschrank auf 37°C aufgewärmt. Nach diesen Schritten erfolgte die Trypsinierung und Zellzählung analog der Beschreibung im vorherigen Abschnitt „Zellkulturtechnik“. Nachdem das Falcon mit den Zellen für 5 Minuten bei 1.000 UpM zentrifugiert und der DMEM/FCS Überstand abpipettiert wurde, wurden 10 mL PBS auf das Zellpellet gegeben und die Zentrifugation wiederholt.

Das im Einfriermedium enthaltende kryoprotektive DMSO reduziert das Risiko einer Eiskristallbildung während des Einfriervorgangs, die die Zellen beschädigen und zum Zelltod führen könnte (77). Allerdings wirkt das DMSO bei Wärme zellschädigend (78). Aus diesem Grund wurden die folgenden Schritte rapide und stets auf Eis durchgeführt. Das PBS wurde abpipettiert und daraufhin wurde ausreichend Einfriermedium auf das Zellpellet im Falcon dazugegeben um eine Konzentration von 5 Millionen Zellen/mL zu erreichen. Nach Mischen wurde jeweils 1 mL Zellsuspension in jedes Kryoröhrchen (auf Eis) gefüllt. Die Kryoröhrchen wurden anschließend in einer Einfrierbox platziert und übernacht in einem -80°C Gefrierschrank gelagert. Auf diese Weise wurden die Zellen vorab unterkühlt, bevor diese am folgenden Tag in einem Stickstofftank gelagert wurden.

Vor dem Auftauen der Zellen wurde das Wasserbad auf 37°C geheizt und eine Flasche DMEM/FCS im Wärmeschrank bei 37°C aufgewärmt. Nach dem Aufwärmen des DMEM/FCS Mediums, wurden jeweils 10 mL davon in die Falkons pipettiert. Die Kryoröhrchen mit Zellen wurden anschließend aus dem Stickstofftank entnommen und mit 70 % Ethanol abgewischt. Direkt im Anschluss wurden die Zellen kurz im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Die aufgetauten Zellen wurden daraufhin sofort in die vorbereiteten Falkons mit 10 mL DMEM/FCS übertragen. Dieser Schritt musste schnell durchgeführt werden, da das Einfriermedium mit DMSO bei Wärme die Zellen beschädigt. Bei zügiger Übertragung der aufgetauten Zellen in das DMEM/FCS konnte die Wirkung vom DMSO durch das Medium neutralisiert werden. Die Falkons wurden anschließend bei 1.000 UpM für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden daraufhin abpipettiert und die Zellpellets jeweils in 12 mL DMEM/FCS erneut suspendiert. Zuletzt wurde die Suspension in T75 Flaschen überführt und diese Flaschen in den Brutschrank getan.

3.3. Nachweis von GPER auf mRNA-Ebene

Die Untersuchung zum Nachweis von GPER auf mRNA-Ebene bestand aus drei Hauptschritten. Mit Hilfe des NucleoSpin® RNAII Kits (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) wurde zuerst das RNA von den Ovarialkarzinomzellen gewonnen. Mithilfe des High Capacity cDNA Reverse Transcription Kits (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) wurde das instabile RNA durch reverse Transkription in eine stabilere cDNA umgewandelt. Als dritter Schritt wurde die quantitative Real-time PCR (TaqMan®-PCR) durchgeführt, um die relative Quantifizierung der Genexpression zu ermöglichen.

3.3.1. Gewinnung der RNA

In dieser Untersuchung wurde RNA von OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zellen gewonnen. Jeweils eine Million Zellen wurden in einem Eppendorf Reaktionsgefäß fünf Minuten bei 1.000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Danach wurden 350 µL RA1 Lysis Puffer auf die Zellen pipettiert um die Zellen zu lysieren. Das Zelllysate wurde in einem Sammelgefäß mit NucleoSpin-Filter überführt, welcher dann eine Minute bei 1.280 UpM zentrifugiert wurde, um das Zelllysate zu filtern. Nachdem der NucleoSpin-Filter verworfen wurde, wurden

350 μ L 70 % Ethanol auf das Lysat gegeben und vermischt, dieses Lysat auf die NucleoSpin RNA II Säule im Reaktionsgefäß pipettiert, und 30 Sekunden bei 11.000g zentrifugiert. In diesem Schritt wurde die RNA an die Membran gebunden. Als nächster Schritt wurde die Silica Membran entsalzt, um die Effektivität des rDNAse Verdau im nächsten Schritt zu steigern. Hierbei wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß eingesetzt, 350 μ L Membrane Desalting Buffer (MDB) auf die Säule pipettiert, und das Sammelgefäß mit Säule für eine Minute bei 11000g zentrifugiert, um die Membran zu trocknen. Anschließend wurden für den DNA-Verdau 95 μ L eines DNAse Mixes auf die Silica Membran der Säule gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Für jede Isolation wurden 10 μ L rekonstituierte rDNAse mit 90 μ L Reaktionspuffer vermischt, um den DNAse Mix herzurichten. Danach wurden drei Waschschrte durchgeführt. Im ersten Waschschrte wurden 200 μ L RA2 Puffer auf die NucleoSpin RNA II Säule gegeben, die dann für 30 Sekunden bei 11.000g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die Säule in ein neues Sammelgefäß getan. Im zweiten Waschschrte wurden 600 μ L RA3 Puffer auf die NucleoSpin RNA II Säule gegeben und 30 Sekunden bei 11.000g zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen und die Säule zurück in das Sammelgefäß gesteckt. Im dritten Waschschrte wurde die Silica Membran gewaschen und getrocknet. Hierbei wurden 250 μ L RA3 Puffer auf die NucleoSpin Säule gegeben, die zwei Minuten bei 11.000g zentrifugiert wurde, um die Membran zu trocknen. Die Säule wurde anschließend in ein Nuklease-freies 1,5 mL Mikrozentrifugenröhrchen gesteckt. Im letzten Schritt der RNA Extraktion, wurden 40 μ L RNase-freies Wasser auf die Säule pipettiert und eine Minute bei 11.000g zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Die Mikrozentrifugenröhrchen wurden bei -80°C eingefroren. Die relative Quantifizierung der gewonnenen RNA wurde mithilfe eines NanoPhotometers anhand einer photometrischen Messung gemessen.

3.3.2. Reverse Transkription

Nachdem die RNA aus den Zellen gewonnen wurde, wurde diese mit Hilfe der Reverse Transkription in eine stabilere cDNA umgewandelt. Hierfür wurde das High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, DE) verwendet.

Bis auf die Reverse Transkriptase wurden alle Kitkomponenten aufgetaut, zehn Sekunden zentrifugiert, und in einem Eisblock kühl gestellt. Zunächst wurde der 2xRT-Mastermix

hergestellt, der aus den folgenden Komponenten bestand:

Komponente	Volumen in μL (für eine Probe)
10x RT Puffer	2,0
25x dNTP Mix (100mM)	0,8
Oligo dT Primer	2,0
RNAse Inhibitor	1,0
Nuklease-freies Wasser	3,2
Multiscribe™ reverse Transkriptase	1,0
Insgesamt pro Reaktion	10

Tabelle 4: Komponenten des 2xRT Mastermixes

Das erforderliche 2xRT Mastermix Gesamtvolumen wurde anhand der Anzahl der mRNA-Proben bestimmt. Für jede Reaktion wurden jeweils 10 μL der mRNA und 10 μL 2xRT Mastermix in ein PCR Eppendorf Reaktionsgefäß pipettiert und für 10 Sekunden bei 11.000g zentrifugiert. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße in den Eppendorf Mastercycler® Gradienten (Eppendorf, Hamburg, DE) eingestellt und das Programm gestartet. Die fertige cDNA wurde bei -20°C eingefroren.

3.3.3. Quantitative Real-Time PCR

Bei der quantitativen Real-time PCR (TaqMan®-PCR) wurde anhand der Vervielfältigung eines cDNA Abschnitts die Menge eines Gens in einer Probe quantifiziert. Die fertige cDNA von der reversen Transkription wurde denaturiert und es entstanden aus dem doppelsträngigen DNA folglich DNA-Einzelstränge. Aus den zugegebenen Nukleotidbausteinen wurde eine zu den Einzelsträngen komplementäre DNA-Sequenz gebildet. Diese doppelsträngigen DNA wurde dann wieder denaturiert und der Vorgang wiederholt. Der Vorgang wurde 40-mal wiederholt und die relative Genexpression während der PCR-Amplifikation wurde mit Hilfe einer Fluoreszenzmessung bestimmt.

Der TaqMan®-PCR wurde in einer 96-Well-Platte durchgeführt. Pro Well wurden 19 µL des in Tabelle 5 beschriebenen Mastermixes und 1 µL cDNA pipettiert und gemischt. Für die Kontrolle wurde anstatt 1 µL cDNA, 1 µL Nuklease-freies Wasser in die Welle pipettiert.

Komponente	Volumen in µL (pro Probe)
TaqMan® Gene Expression Assay; 20x Konz.	1,0
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix; 2x Konz	10,0
Nuklease-freies Wasser	8,0
Gesamtvolumen	19,0

Tabelle 5: Mastermix für die TaqMan®-PCR

Anschließend, um Kontamination zu verhindern, wurde die Platte mit einem Adhesive Cover (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) abgedeckt und zur Auswertung in das Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Gerät gelegt. Das Gerät wurde gestartet und der Vorgang dauerte ca. 40 Minuten: Die Temperatur wurde für 20 Sekunden auf 95°C erhöht und danach fanden 40 Amplifikationszyklen mit jeweils 3 Sekunden bei 95°C (Denaturierung) und 30 Sekunden bei 60°C statt (Elongation bzw. Amplifikation). Als TaqMan® Gene Expression Assay wurden als Primer G Protein-Coupled Estrogen Receptor 1 (Hs00173506_m1) und GAPDH (Hs99999905_m1) verwendet. Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) diente als Housekeeping-Gen (Referenz-Gen) um die relative Quantifizierung der Ziel mRNA zu ermöglichen. Die relative Expression von GPER wurde mittels der ddCT Methode quantifiziert (79).

3.4. Western Blot

3.4.1. Nachweis von GPER auf Proteinebene

3.4.1.1. Gewinnung von Protein Lysat

Als erster Schritt dieser Untersuchung wurde ein Protein Lysat angefertigt. Hierfür wurde pro Zelllinie (OVCAR-3 und TOV112D bzw. OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1) eine Zellsuspension von 2 Millionen Zellen/1 mL in ein Eppendorf Reaktionsgefäß vorbereitet. Diese wurde 5 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert und der Überstand abgezogen. Danach wurde 1 mL PBS zugegeben, das Eppendorf Reaktionsgefäß gemischt, und nochmal 5 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert. Der Überstand wurde nochmal abgezogen und 200 µL Radioimmunoprecipitation Assay Buffer (RIPA-Puffer) auf die Zellen im Eppendorf Reaktionsgefäß gegeben, um die Zellen zu lysieren. Die Zellen wurden auf Eis für 30 Minuten mit dem RIPA-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß mit den Zellen und RIPA Puffer 20 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert, der Überstand (das Protein Lysat) in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt und dieses Gefäß bei -80°C eingefroren.

3.4.1.2. Protein Assay nach Bradford

Als nächster Schritt wurde anhand eines Spektralphotometers die Proteinkonzentrationen in den vorbereiteten Protein Lysaten nach Bradford bestimmt. Zuerst wurde das Bradford Reagenz 1:5 mit Aqua dest. verdünnt und filtriert. Das Protein Lysat wurde ebenfalls 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Zur Erstellung einer Standardkurve wurde das Bradford Standard (1,41 mg/mL) wie folgt verdünnt:

- 1000 µg/mL = 709 µL Standard (unverdünnt) + 291 µL Aqua dest.
- 800 µg/mL = 400 µL Standardlösung (1000 µg/mL Verdünnung) + 100 µL Aqua dest.
- 400 µg/mL = 200 µL Standardlösung (800 µg/mL Verdünnung) + 200 µL Aqua dest.
- 200 µg/mL = 200 µL Standardlösung (400 µg/mL Verdünnung) + 200 µL Aqua dest.
- 100 µg/mL = 200 µL Standardlösung (200 µg/mL Verdünnung) + 200 µL Aqua dest.
- 50 µg/mL = 200 µL Standardlösung (100 µg/mL Verdünnung) + 100 µL Aqua dest.

Die Messungen wurden mit Hilfe eines Spektralphotometers durchgeführt, das die Messung bei einer Wellenlänge von 595 nm und bei linearer Regression durchführte. Zuerst wurde ein Nullwert, gefolgt von den o.g. Standards, gemessen. Danach wurde der Nullwert erneut gemessen, und dann die Proteinkonzentration in den vorgefertigten Protein Lysaten. Für die Messungen wurden der Nullwert, die Standards, und die Protein Lysate wie folgt angesetzt und jeweils 1 mL in eine Küvette überführt:

Nullwert: 1 mL Bradfordreagenz + 20 μ L Aqua dest.

Standards: 1 mL Bradfordreagenz + 20 μ L vom entsprechenden Standard

Protein Lysat Proben: 1 mL Bradfordreagenz + 20 μ L von den entsprechenden Proben

3.4.1.3. Gelelektrophorese

Anhand der Gelelektrophorese wurden die Proteine nach Ladung und Größe in Proteinbanden getrennt. Für jede Gel Well wurden 20 μ L Probe vorbereitet. 5 μ L von diesen 20 μ L bestanden aus Probenpuffer, welche der Denaturierung von Proteinen diente. Bevor die angesetzten Proben in die Wells rein pipettiert wurden, wurden diese für 5 Minuten bei 95°C im Thermoblock denaturiert und anschließend bei 4°C abgekühlt und zentrifugiert. Anschließend wurden die Puffer für die Gelelektrophorese vorbereitet und das gefertigte Blotpuffer auf Eis gestellt:

- **Laufpuffer** (Tris/Glycine/SDS Puffer) = 100 mL 10x Laufpuffer + 900 mL Aqua dest.
- **Blotpuffer** (Tris/Glycine Puffer) = 100 mL Blotpuffer + 200 mL Methanol + 700 mL Aqua dest.

Die Gele wurden in das Electrode-Assembly eingesetzt. Anschließend wurde die Electrode-Assembly mit den Gelen in einen Tank gesetzt, der mit Laufpuffer gefüllt wurde. Danach wurden die Wells mit Proben und dem Standard bestückt. Vom Standard wurden 5 μ L in das vorgesehene Well und von den Proben 18 μ L pro Well pipettiert. Diese Blotkammer wurde dann an die Spannungsquelle angeschlossen (für 30 Minuten bei 80 W und danach für 60 Minuten bei 100W). Sobald die Lauffront (eine blaue Linie) unten am Gel angekommen war, wurde die Gelelektrophorese von der Spannungsquelle genommen und beendet.

3.4.1.4. Western Blot

Nach der Gelelektrophorese wurden die aufgetrennten Proteinbanden auf eine Polyvinylidene Fluoride Membran (PVDF-Membran) transferiert. Filterpapier und Fiberpads wurden jeweils in Blotpuffer und die PVDF-Membran in Methanol eingeweicht. Die Mini-Trans-Blot Cassette und Blotkammer wurden gemäß der Anleitung vorbereitet und für 1h bei 100 W an die Stromquelle angeschlossen. Nach Ablauf des Blot-Vorgangs war der farbige Standard auf der Membran sichtbar, was bedeutete, dass der Blot der Proteine erfolgreich gewesen war.

3.4.1.5. Nachweis von GPER

Zum Nachweis von GPER auf der PVDF Membran wurde der Vectastain ABC-AmP Rabbit IgG-Kit verwendet. Die PVDF-Membran wurde 5 Minuten in TBS gewaschen, 1h in 5 % Milchpulver/1xTBST bei Raumtemperatur blockiert, und daraufhin drei Mal mit TBST gewaschen. Anschließend wurde die Membran mit dem in 2 % Milchpulver / TBST 1:500 verdünntem Primärantikörper (GPER/GP30) 16h über Nacht bei 4°C inkubiert. Nachdem die Membran 3 x 5 Minuten in TBST gewaschen wurde, wurde diese mit biotinyliertem Anti-Rabbit-IgG-Sekundärantikörper (Verdünnung: 10 µL Antikörper auf 10 mL TBST) für 45 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde nochmal 3 x 5 Minuten in TBST gewaschen und mit dem Vectastain ABC-AmP Reagenz (20µl Lösung A + 20µl Lösung B auf 10ml TBST) 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Membran wurde daraufhin wieder 2 x 5 Minuten in TBST und für 5 Minuten in 0,1M TRIS Puffer pH 9,5 gewaschen. Die Blotbanden auf der Membran wurden dann 5 Minuten mit BCIP/NBT-Chromogen-Substrat-Lösung (10ml 0,1M TRIS Puffer pH 9,5 + 4 ggt. BCIP Lösung + 4 ggt. NBT Lösung und 4 ggt. Magnesium Chlorid Lösung) bei Raumtemperatur gefärbt. Die Färbereaktion wurde anschließend in Aqua dest. gestoppt und die Membran getrocknet. β -actin diente als Ladekontrolle.

3.4.2. Nachweis von p-CREB und p-ERK auf Proteinebene nach Stimulation von GPER

3.4.2.1. Stimulation von OVCAR-3 Zellen

Für die Stimulation mit G1 und 4-OHT wurden pro Well 150.000 OVCAR-3 Zellen in 500 μ L DMEM/FCS ausgesät. Hierfür wurden jeweils 4 Wells von zwei 24-Wellplatten verwendet und anschließend im Brutschrank bei 37°C über Nacht (16h) inkubiert. Am nächsten Tag wurde das DMEM/FCS von allen 8 Wells abgezogen, jede Well einmal mit HBSS gewaschen, und anschließend mit 400 μ L HBSS 4h inkubiert. Nach 4h wurde das HBSS abgezogen und die Zellen 5 Minuten (bzw. 10 Minuten) mit Stimulanzen im Brutschrank bei 37°C inkubiert. G1 wurde in einer Konzentration von 1 μ M und 4-OHT in einer Konzentration von 5 μ M auf die Zellen gegeben. DMSO als Trägersubstanz diente als Kontrolle ohne Stimulanzen, Forskolin als Positivkontrolle. Anschließend wurden die Stimulanzen abgezogen und die Zellen 20 Minuten mit

80 μ L RIPA-Puffer auf Eis inkubiert. Die Zellen in den Wells wurden in Eppendorf Reaktionsgefäße überführt, 20 Minuten bei 12.000 UpM zentrifugiert, der Überstand in ein neues Eppendorf Reaktionsgefäß überführt, und dieses Gefäß bei -80°C eingefroren.

Als nächster Schritt wurde ein Protein Assay nach Bradford durchgeführt, um die Proteinkonzentrationen in den Eppendorf Reaktionsgefäße zu bestimmen (siehe Kapitel 3.4.1.2.), und eine Gelelektrophorese durchgeführt (siehe Kapitel 3.4.1.3. und 3.4.1.4.).

Zum Nachweis der Proteine (pan-CREB, pan-ERK, phospho-CREB, phospho-ERK) auf der PVDF Membran wurde der Vectastain ABC-AmP Rabbit IgG-Kit verwendet. Das weitere Vorgehen war analog zum bereits in Kapitel 3.4.1.5. beschrieben Vorgang. In dieser Untersuchung wurden die in Tabelle 6 gelisteten Primärantikörper verwendet. β -actin diente als Ladekontrolle.

Primärantikörper	Verdünnung
Phospho-CREB	1:1000 in 5 % BSA/TBST
Phospho-ERK 1/2	1:1000 in 5 % BSA/1xTBS/0,1 % Tween-20
Pan-CREB	1:1000 in 5 % BSA/1xTBS/0,1 % Tween-20
Pan-MAPK	1:1000 in 5 % BSA/1xTBS/0,1 % Tween-20

Tabelle 6: Primärantikörper für den Western Blot nach Stimulation von GPER

3.5. Apoptoseinduktion durch Gatipotuzumab, Tamoxifen (4-Hydroxytamoxifen, 4-OHT) und die Kombination beider mit nachfolgender Zellviabilitätsmessung

In diesem Versuch wurde der Effekt von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) (Calbiochem, San Diego, CA, USA) und Gatipotuzumab (Glycotope, Berlin, DE), sowie die Kombination von beiden auf die Zellviabilität von Ovarialkarzinomzellen untersucht. 4-OHT ist das aktive Metabolit von Tamoxifen (80). Der Versuch wurde an den OVCAR-3, COV318, OV-90 und SKOV-3 Zelllinien durchgeführt. In den Versuchen wurden zuerst 3.000 Zellen (in 100 μ L Medium) pro Well in einer 96-Wellplatte ausgesät. Die Zellen hafteten am Boden der Wells. Nach 4h wurde das Medium (DMEM/FCS) aus den Wells abgezogen und 90 μ L der jeweiligen Stimulanzen auf die Zellen gegeben. Die Stimulanzen bestanden entweder aus reiner Trägerlösung ohne Stimulanzen, Gatipotuzumab, 4-OHT, oder die Kombination aus Gatipotuzumab und 4-OHT. Das Gatipotuzumab wurde stets in einer Konzentration von 60 μ L/ mL und das 4-OHT in einer Konzentration von 5 μ M für die Stimulationen verwendet. Da 4-OHT ein weißer Puder ist, wurde es zur Vorbereitung der Stimulationen zuerst in Methanol gelöst. Gatipotuzumab wurde ebenfalls vorher gelöst, aber in PBS mit 0,07 % Tween. Die Zellen wurden daraufhin mit diesen Stimulanzen für 48h bzw. 72h bei 37°C inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit mit den Stimulanzen wurden jeweils 10 μ L WST-1 Lösung (Roche, Mannheim, DE) in die Wells hinzugegeben. Die Wellplatten wurden anschließend 30 Minuten lang bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte die Auswertung mit Hilfe eines Mikroplatten-Readers (DYNEX Technologies, Chantilly, VA, USA) bei 580nm und der Revelation Software Version 4.25.

Das Prinzip des WST-1 Assays basiert auf die Spaltung eines leicht roten Tetrazoliumsalzes (WST-1) zu einem dunkelroten Formazan Farbstoff (in Abbildung 5 dargestellt) (81). Die Spaltung

wird durch Enzyme der Atmungskette der Mitochondrien in lebenden Zellen verursacht (81). Als Folge ist die Menge an produzierten Farbstoff nach einer bestimmten Inkubationszeit direkt proportional zu der Anzahl an lebenden, metabolisch aktiven Zellen (81). Diese Menge an Formazanfärbung wird durch das Messen der Absorption der Farbstofflösung über einen Mikroplatten Reader quantifiziert und anschließend ausgewertet (81). Für jede Zelllinie wurde die Untersuchung drei Mal mit unterschiedlichen Zellpassagen durchgeführt und führte jeweils zu ähnlichen Ergebnissen.

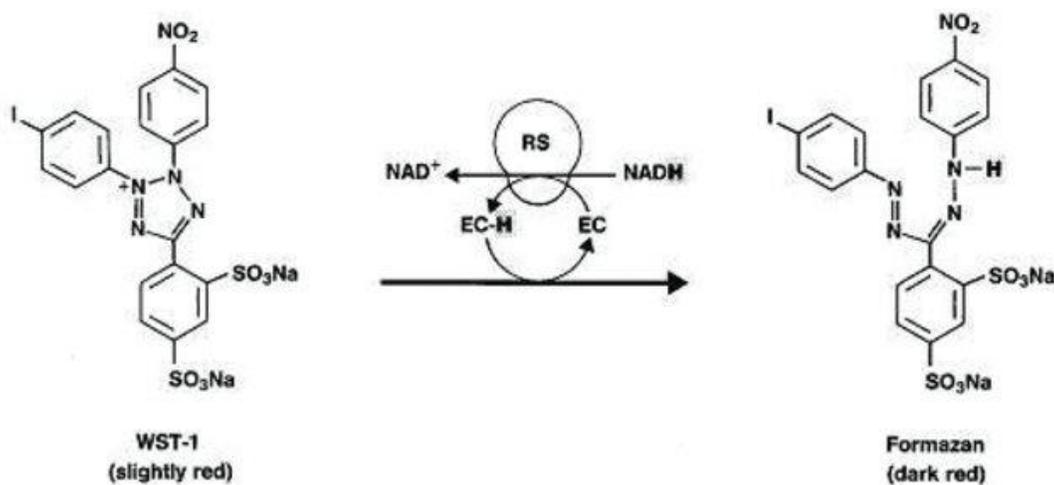


Abbildung 5: Die Spaltung des WST-1 Tetrazoliumsals zum dunkelroten Formazan (84)

3.6. Detektion von GPER und E-Cadherin sowie GPER und TA-MUC1 mittels Doppelimmunfluoreszenz

Mittels der Doppelimmunfluoreszenz wurde anhand einer Doppelfärbung die subzelluläre Lokalisation zuerst von GPER und E-Cadherin, und dann von TA-MUC1 und GPER, untersucht. Im Gegensatz zu der Immunzytochemie konnten auf diese Weise beide Proteine gleichzeitig auf derselben Zellprobe dargestellt werden. Für die Doppelimmunfluoreszenz wurden mit fluoreszierendem Farbstoff (Cy2 und Cy3) markierte Sekundärantikörper verwendet. Diese Sekundärantikörper wurden an Antigen-gebundene Primärantikörper gebunden, um letztendlich die Zielantigene in den Zellen darzustellen.

Als erstes wurden für jede Zelllinie 1 Million Zellen in 4 mL DMEM/FCS auf Glas Objektträger in einer 4-Well-Platte ausgesät. Nach 24 - 36h Inkubationszeit bei 37°C wurden die auf den Objektträgern gewachsenen Zellen 5 Minuten lang in PBS gewaschen und danach für 5 Minuten in Aceton fixiert. Nachdem die Zellen in Raumluft getrocknet waren, wurde mit einem Dako-Pen ein Kreis um ein Areal mit Zellen des Objektträgers gezogen. Dieser eingekreiste Bereich wurde daraufhin für die weiteren Färbungsschritte verwendet.

Die Objektträger mit den eingekreisten Zellen wurden anschließend in PBS gewaschen und mit Ultra V-Block für 15 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um unspezifische Anfärbungen zu vermeiden. Die Primärantikörper wurden zusammen mit Dako Verdünnungsmedium in einer Lösung mit folgenden Konzentrationen (siehe Tabelle 7) auf die Zellen aufgetragen. Die Zellen wurden daraufhin mit den Primärantikörpern über Nacht bei 4°C in einer Feuchtkammer inkubiert. Alle Inkubationsschritte fanden in einer Feuchtkammer statt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Primärantikörper	Konzentration
Mouse anti-E-Cadherin (Calbiochem, San Diego, CA, USA)	1:800
Rabbit anti-GPER (Lifespan Biosciences, Seattle, WA, USA)	1:400
Gatipotuzumab (Glycotope, Berlin, DE)	1:400

Tabelle 7: Konzentration der Primärantikörper im Dako Verdünnungsmedium

Die Objektträger wurden als nächstes mit PBS gewaschen und im Dunkeln bei Raumtemperatur (30 Min) mit den Sekundärantikörpern mit folgenden Konzentrationen inkubiert (siehe Tabelle 8).

Sekundärantikörper	Konzentration
Goat-Anti-Rabbit IgG Cy 3 markiert (Dianova, Hamburg, DE)	1:500
Goat-Anti-Human IgG + IgM biotinyliert (Dianova, Hamburg, DE)	1:250
Goat-Anti-Mouse Cy 3 markiert (Dianova, Hamburg, DE)	1:500
Goat-Anti-Rabbit Cy 2 markiert (Dianova, Hamburg, DE)	1:100

Tabelle 8: Konzentration der Sekundärantikörper im Dako Verdünnungsmedium

Diese Sekundärantikörper wurden zusammen (für das jeweilige Experiment) im Dako Verdünnungsmedium verdünnt. Nach 30 Minuten Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen und mit in Dako Verdünnungsmedium 1:100 verdünntem Streptavidin-Cy2 für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert (ausschließlich für die GPER/TA-MUC1 Doppelimmunfluoreszenz). Die Präparate wurden danach nochmal mit PBS gewaschen und im Dunkeln luftgetrocknet. Anschließend wurde Vectashield Eindeckmedium mit 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) appliziert. Das DAPI ist eine blau-fluoreszierende DNA-Färbung. Es wurde ein Deckglas auf die Objektträger gelegt und dieses mit Nagellack fixiert. Die mit Fluoreszenz markierten GPER und E-Cadherin, bzw. GPER und TA-MUC, wurden mit einem Zeiss Fluoreszenz Mikroskop (Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE) visualisiert und die Bilder mit Hilfe des Zeiss Axio Vision Rel. 4,8 (Carl Zeiss Microscopy, Jena, DE) verarbeitet. Das Fluoreszenz Mikroskop funktioniert so, dass eine Lichtquelle mit hoher Intensität die fluoreszierenden Farbstoffe (Cy 2 und Cy 3) an den Antigenen mit bestimmten Wellenlängen anregt. Diese Farbstoffe emittieren infolgedessen ein Licht mit einer längeren Wellenlänge (mit niedrigerer Energie), was wiederum den visuellen Effekt erzeugt (82). Unter dem Mikroskop zeigte sich bei der E-Cadherin/GPER Doppelfärbung das GPER grün und das E-Cadherin rot, und bei der TA-MUC1/GPER Doppelfärbung das GPER rot, das Gatipotuzumab (TA-MUC1) grün. Die Kolokalisation von beiden Antigenen zeigte sich orange. Für beide Untersuchungen wurden Negativkontrollen durchgeführt.

3.7. Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung und Analyse der Daten wurden das IBM Statistikprogrammpaket SPSS (Version 22 und 25), sowie Microsoft Excel verwendet. Die Daten wurden im Fall von $p < 0,05$ als statistisch signifikant angenommen.

4. Ergebnisse

4.1. Validierung des *in vitro* Modells

4.1.1. Nachweis von GPER mittels Immunzytochemischer Färbung

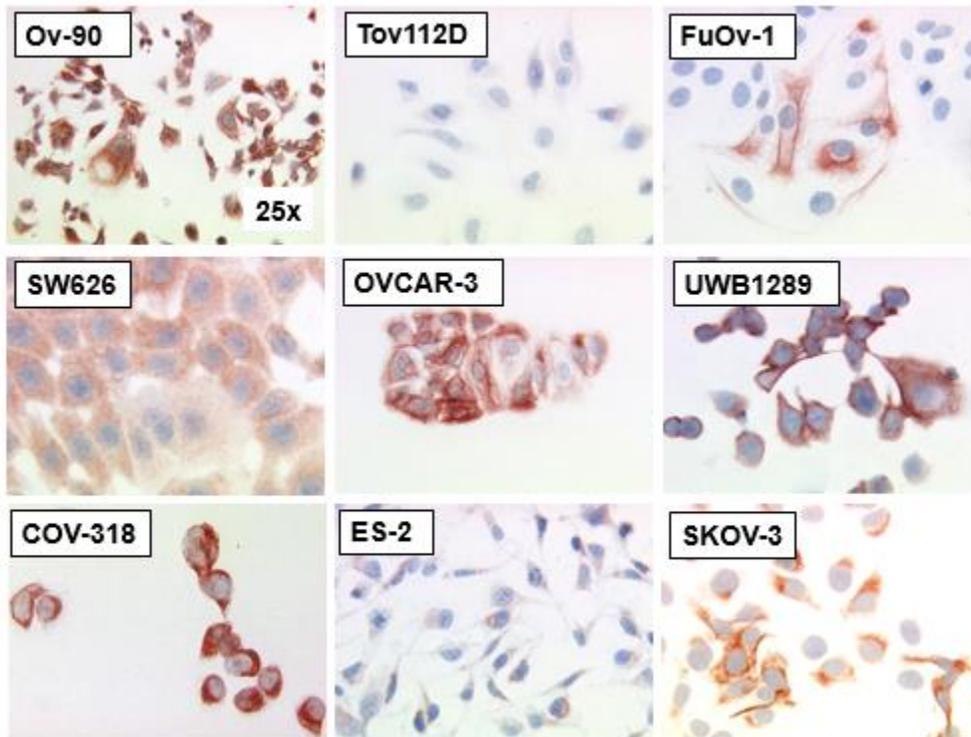


Abbildung 6: Nachweis von GPER in Ovarialkarzinomzellen mittels Immunzytochemie

Zur Etablierung des *in vitro* Zellkulturmodells wurde GPER zunächst in neun verschiedenen Ovarialkarzinom Zelllinien untersucht. Ov-90, TOV112D, FuOv-1, SW626, OVCAR-3, UWB1289, COV-318, ES-2 und SKOV-3 wurden mittels Immunzytochemie auf die Expression des GPER Proteins getestet. Bis auf TOV112D konnte GPER in allen analysierten Zelllinien nachgewiesen werden. Dargestellt sind repräsentative Mikroskopaufnahmen (25-fach Linse).

GPER war bereits in OVCAR-3 und SKOV-3 nachgewiesen worden (75). Diese zwei Zelllinien dienten als Positivkontrolle. Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte der GPER Nachweis in weiteren sieben Zelllinien weiter etabliert und validiert werden. In Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Dr. S. Heublein wurden neben OVCAR-3 und SKOV-3, sieben weitere Zelllinien mittels Immunzytochemie auf das Vorhandensein des GPER Proteins getestet. Repräsentative Bilder

hierzu sind in Abbildung 6 dargestellt. GPER war in allen Ovarialkarzinom Zelllinien, ausgenommen von TOV112D, nachweisbar. Subzellulär fand sich eine überwiegend zytoplasmatische Verteilung des Proteins. Vor allem in FuOv-1 und OVCAR-3 war das intrazytoplasmatische Färbesignal von GPER netzartig angeordnet.

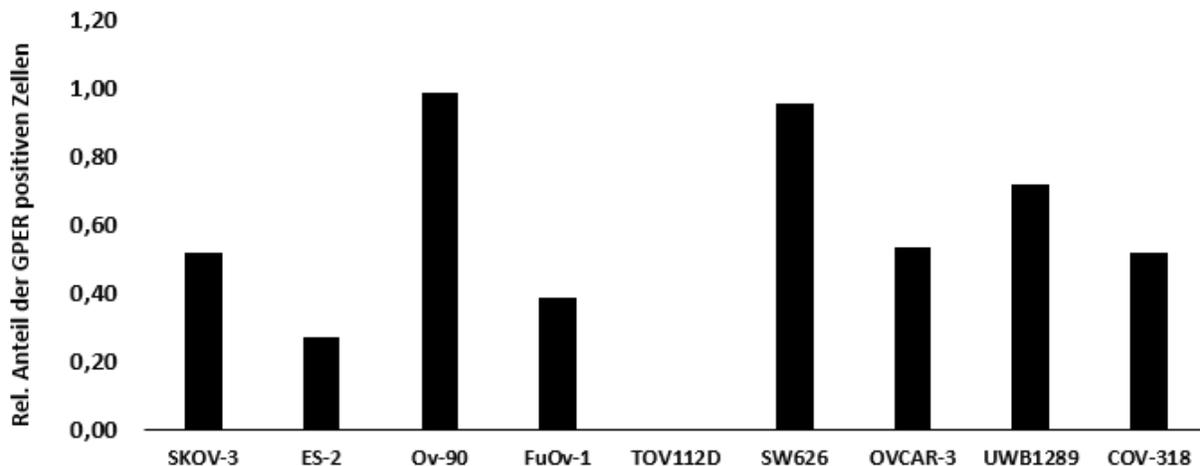


Abbildung 7: Relative Quantifizierung der GPER Positivität

GPER war in allen Zelllinien, ausgenommen TOV112D nachweisbar. Bei den Ov-90 und SW626 Zelllinien waren jeweils durchschnittlich 98 % und 95 % der ausgezählten Zellen GPER positiv. Der relative Anteil der GPER positiven Zellen für jede der neun Zelllinien ist als Balkendiagramm dargestellt.

Eine Quantifizierung der GPER Positivität ist in Abbildung 7 graphisch dargestellt. Hierbei wurden für jede Zelllinie 50 Zellen aus jeweils drei Objektträgern gezählt, der Anteil an GPER-positiven Zellen ermittelt und ein Mittelwert daraus berechnet. In Ov-90 und SW626 Zellen war GPER durchschnittlich in jeweils 98 % und 95 % der ausgewerteten Zellen positiv. In der *BRCA1* mutierten Zelllinie UWB1289 konnte GPER in 72 % der Zellen nachgewiesen werden. Bei SKOV-3, OVCAR-3 und COV-318 Zelllinien waren circa die Hälfte der Zellen (SKOV: 52 %, OVCAR-3: 53 %, COV-318: 52 %) GPER-positiv. Die restlichen Zelllinien zeigten eine GPER Expression von weniger als 50 % auf (ES-2: 27 %, FuOv-1: 38 %). Einzig in TOV112D Zellen war GPER nicht nachweisbar. Letzteres konnte auch durch eine Western Blot Untersuchung bestätigt werden (Ergänzende Abbildung 1).

4.1.2. Nachweis von GPER mittels quantitativer PCR und Western Blot

Neben dem immunzytochemischen Nachweis von GPER, wurde die Expression des Rezeptors auch mittels quantitativer PCR und Western Blot validiert. Hierfür wurden OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zellen eingesetzt. In allen drei Zelllinien war GPER auf mRNA Ebene nachweisbar. Die GPER Expression ist in Abbildung 8A, relativ zum Housekeeping Gen und relativ zur Expression in OVCAR-3 dargestellt. Relativ zu OVCAR-3 lag der GPER mRNA Gehalt in SKOV-3 bei 83,0%, in FuOv-1 bei 33,8%.

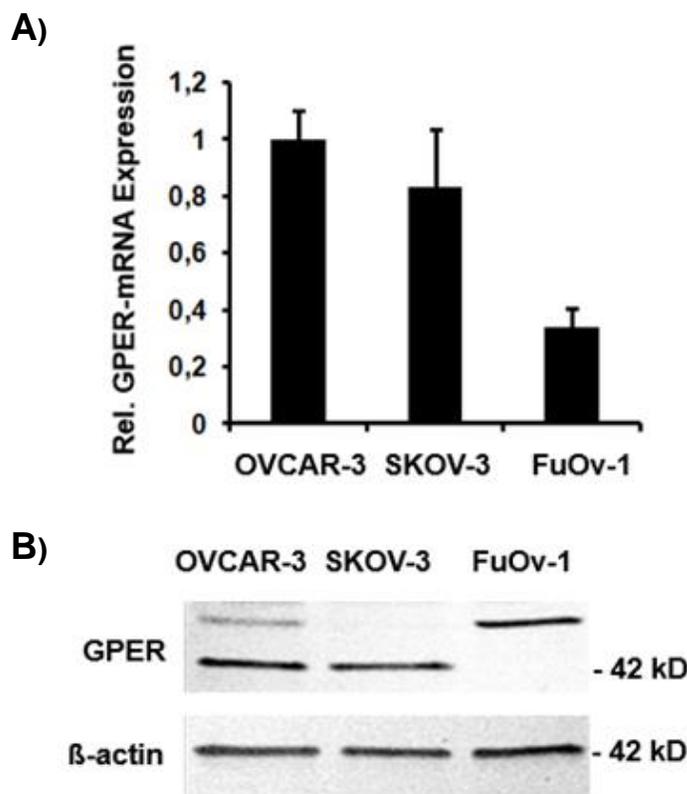


Abbildung 8: Nachweis von GPER mittels quantitativer PCR und Western Blot

Die GPER mRNA Expression in OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zellen wurde mittels rtPCR bestimmt. GAPDH diente als Housekeeping Gen. Als Balkendiagramm dargestellt ist die mittels ddCT Methode quantifizierte Genexpression von GPER. Relativ zu OVCAR-3 lag der GPER mRNA Gehalt in SKOV-3 bei 83,0%, in FuOv-1 bei 33,8%. B) zeigt eine repräsentative Darstellung eines Western Blots zum Nachweis von GPER in OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zellen.

GPER wurde in allen drei Zelllinien nachgewiesen.

Das GPER Protein umfasst 375 Aminosäuren und hat eine errechnete Masse von 42,2 kDa (83, 84). Das 42 kDa Protein konnte in OVCAR-3 und SKOV-3, nicht jedoch in FuOv-1 nachgewiesen werden (Abbildung 8B). In FuOv-1 fand sich dahingegen ein wenige kDa größeres Protein knapp unter der 50 kDa Marke. Angedeutet war dieses Transkript auch in OVCAR-3 nachweisbar. Beta-actin diene als Ladekontrolle.

4.2. Subzelluläre Lokalisation von GPER in Ovarialkarzinomzellen

4.2.1. Doppelimmunfluoreszenzfärbung von GPER und E-Cadherin

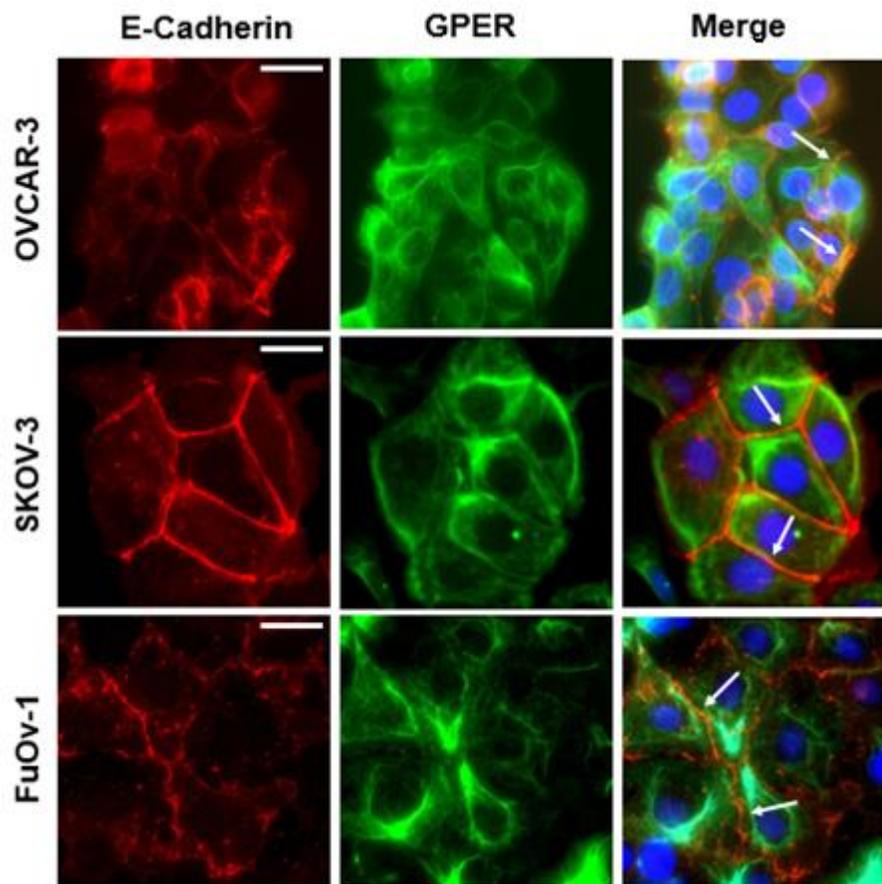


Abbildung 9: Doppelfärbung von GPER und E-Cadherin

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung in OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zelllinien zeigte eine zytoplasmatische Färbung von GPER, sowie eine partielle Kolokalisation an der Membran mit Transmembranprotein E-Cadherin. Die Pfeile zeigen auf die Kolokalisation dieser beiden Proteine auf der Zellmembran. Die Maßstäbe in der Bilderreihe links entsprechen jeweils 50 μm , und können auf die entsprechenden weiteren Bilder angewendet werden.

In Abbildung 9 sind repräsentative Bilder der Doppelimmunfluoreszenzfärbung von GPER und E-Cadherin in OVCAR-3, SKOV-3 und FuOv-1 Zelllinien dargestellt. E-Cadherin ist ein transmembranes Adhäsionsmolekül und wurde zur Markierung der Zellmembran verwendet (85). Die Lokalisation von E-Cadherin zu der Zellmembran ist in der ersten Spalte von Abbildung 9 zu sehen. Die 2. und 3. (Merge) Spalte der Abbildung 9 zeigen eine zytoplasmatische Färbung von GPER, sowie eine partielle Kolo-kalisation an der Membran mit Transmembranprotein E-Cadherin. Die Pfeile zeigen auf die membranäre Kolo-kalisation von GPER und E-Cadherin in allen drei Zelllinien.

4.2.2. Subzelluläre Lokalisation von GPER im Tumorgewebe

Zusätzlich zur subzellulären Lokalisation im Zellmodell, wurde diese auch im humanen Tumorgewebe untersucht. Hierzu wurden die in der Publikation „The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) is a Gonadotropin Receptor Dependent Positive Prognosticator in Ovarian Carcinoma Patients“ von S. Heublein, et al. (2013) veröffentlichten GPER Daten zur Färbung erneut hinsichtlich der subzellulären Lokalisation ausgewertet. Die subzelluläre Lokalisation des GPERs wurde bei Schnitten mit einem IRS > 1 ermittelt.

Für die Auswertung der immunhistochemisch-gefärbten Schnitte bzw. Patientenfälle waren insgesamt 149 Gewebeproben von Ovarialkarzinomen vorhanden. Die Gewebeproben bestanden aus den folgenden histologischen Subtypen: HGSOC, LGSOC, klarzellig, endometrioid und muzinös.

In Tabelle 9 ist die Lokalisation von GPER an der Membran, im Zytoplasma und in beiden in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp des Ovarialtumorgewebes dargestellt. Von den 149 Ovarialkarzinomfällen waren 75 der Fälle high-grade serös (HGSOC) und 30 der Fälle low-grade serös (LGSOC). Unter den HGSOCs zeigten nur 7 % eine alleinige Membranfärbung, 55 % eine Verteilung von GPER im Zytoplasma, und 39 % eine Lokalisation von GPER sowohl im Zytoplasma als auch an der Membran. 23 % der LGSOC zeigten ausschließlich eine GPER Färbung an der Membran und 63 % ausschließlich eine GPER Färbung im Zytoplasma. Bei 13 % war eine Verteilung von GPER sowohl im Zytoplasma als auch eine Lokalisation auf der Zellmembran zu sehen.

Es waren insgesamt 12 muzinöse, 20 endometrioiden, und 12 klarzellige Fälle in diesem Kollektiv vorhanden. Keiner der muzinösen und endometrioiden Tumore zeigten eine alleinige Membranlokalisierung von GPER, jedoch hatten 25 % der muzinösen und 85 % der endometrioiden Fälle eine zytoplasmatische Verteilung. 75 % der muzinösen Tumore hatten eine Membran und zytoplasmatische Lokalisation des GPERs, während nur 15 % der endometrioiden Fälle diese Lokalisation von GPER in beiden Kompartimenten zeigte. Von den 12 klarzelligen Tumoren war GPER bei 83 % der Fälle auf der Membran lokalisiert und keine der Tumoren hatten eine alleinige zytoplasmatische Färbung des GPERs. Bei 17 % der klarzelligen Tumoren war GPER sowohl auf der Membran als auch im Zytoplasma lokalisiert.

Histologie	Membran (n)	Zytoplasma (n)	Membran und Zytoplasma (n)	Gesamt
Klarzellig	10 (83,3 %)	0 (0,0 %)	2 (16,7 %)	12 (100,0 %)
Endometrioid	0 (0,0 %)	17 (85,0 %)	3 (15,0 %)	20 (100,0 %)
Muzinös	0 (0,0 %)	3 (25,0 %)	9 (75,0 %)	12 (100,0 %)
LGSOC	7 (23,3 %)	19 (63,3 %)	4 (13,3 %)	30 (100,0 %)
HGSOC	5 (6,7 %)	41 (54,7 %)	29 (38,7 %)	75 (100,0 %)
Gesamt (n)	22	80	47	149

Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe verschiedener Subtypen des Ovarialkarzinoms

Hier wurden insgesamt 149 bereits auf GPER gefärbte Ovarialkarzinomfälle/-gewebe von klarzelligem, endometrioidem, muzinösem, low-grade serösem (LGSOC) und high-grade serösem (HGSOC) histologischen Subtyp untersucht.

Die subzelluläre Lokalisation von GPER in der Untergruppe von 75 HGSOC-Fällen wurde in Bezug auf das FIGO-Stadium und die pTNM-Klassifizierung weiter untersucht. Die meisten dieser Fälle hatten ein FIGO Stadium von III oder IV (siehe Ergänzende Tabelle 1) und es waren keine Daten zum makroskopischen Tumorrest vorhanden. Es wurden jedoch keine signifikanten Korrelationen von FIGO Grad und pTNM Klassifikation der Karzinome zur subzellulären Lokalisation von GPER festgestellt (Ergänzende Tabelle 1).

Anschließend wurde das Gesamtüberleben in Abhängigkeit von der subzellulären Lokalisation von GPER in den 75 oben genannten HGSOC Ovarialkarzinomfällen untersucht. In Abbildung 10 sind entsprechende Überlebenskurven grafisch dargestellt. Zum 5-Jahres Zeitpunkt lag das Gesamtüberleben des Patientinnenkollektivs zwischen 20 – 30 %. Die Patientinnen mit Tumoren mit einer Membran GPER Färbung hatten eine mittlere Überlebenszeit von $2,8 \pm 1,2$ Jahren, während die Patientinnen Gruppe mit einer zytoplasmatischen GPER Färbung eine mittlere Überlebenszeit von $4.2 \pm 0,8$ Jahren hatten. Die Patientinnen mit Tumoren mit einer GPER Färbung in beide dieser Lokalisationen hatten eine mittlere Überlebenszeit von $3,0 \pm 0,5$ Jahren. Zwischen den Überlebenszeiten der drei HGSOC Ovarialkarzinompatientinnen Gruppen wurde kein signifikanter Unterschied festgestellt.

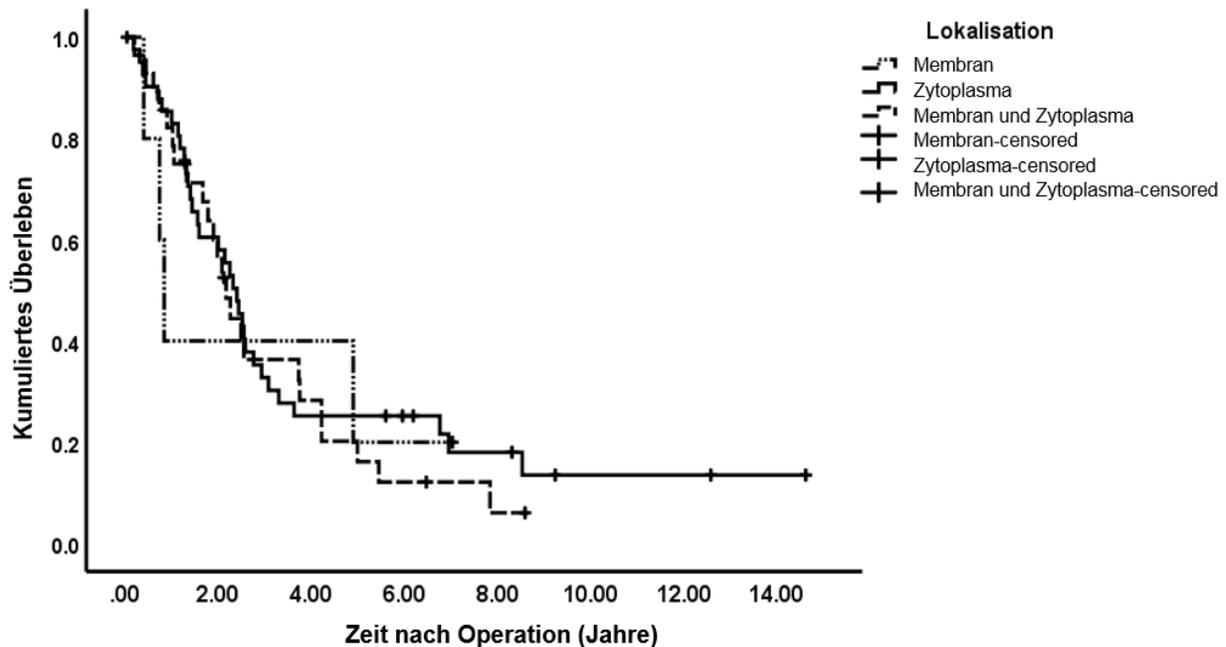


Abbildung 10: Gesamtüberleben von Patientinnen mit einem HGSOC Subtyp des Ovarialkarzinoms, abhängig von der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe

In Abbildung 11 sind immunhistochemische Färbungen des GPER Proteins im Ovarialkarzinomgewebe beispielhaft dargestellt. In A) ist eine deutliche Membranfärbung, in B) eine zytoplasmatische Färbung, und in C) eine Färbung beider Kompartimente zu sehen.

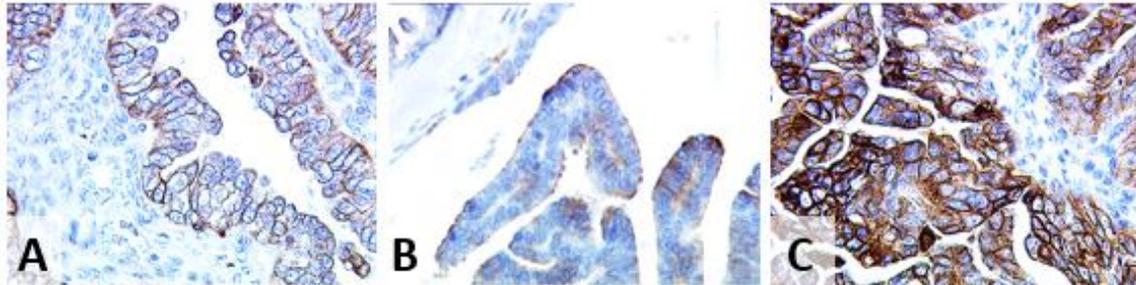


Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von GPER im Ovarialkarzinomgewebe

In 47 von 149 Patientenfällen zeigte sich eine Verteilung von GPER im Zytoplasma sowie eine Lokalisation auf der Zellmembran. Hier sind dargestellt: A) Membranfärbung, B) zytoplasmatische Färbung, C) Membran und zytoplasmatische Färbung von GPER. Dargestellt sind repräsentative Mikroskopaufnahmen in 25-fache Vergrößerung.

4.3. GPER vermittelte Regulation des MAPK-Signalwegs

4.3.1. Kinetik des Signals

Im Mammakarzinom konnte bereits gezeigt werden, dass GPER den MAPK-Signalweg stimuliert (86). Hierzu lagen zum Zeitpunkt der in der vorliegenden Arbeit geschilderten Experimente keine Daten aus dem Ovarialkarzinom vor. Daher wurde in dieser Arbeit untersucht, ob die Stimulation von Ovarialkarzinomzellen mit GPER Agonisten G1 und 4-OHT ebenfalls den MAPK-Signalweg aktivieren kann, und mit welcher Kinetik dies erfolgt (87, 88). G1 ist ein selektiver GPER Agonist (87). Tamoxifen ist sowohl ein GPER Agonist als auch ein selektiver Östrogenrezeptor-Modulator (88).

Die OVCAR-3 Zellen wurden zunächst 5 Minuten und 10 Minuten mit G1 (in einer Konzentration von 1 μM) oder 4-OHT (in einer Konzentration von 5 μM) behandelt. In diesem Vorgang sollte die Aktivierung vom MAPK-Signalweg abgebildet werden. Die Aktivierung des MAPK-Signalweges führt zur Phosphorylierung zahlreicher Proteine, die dadurch von inaktiv zu aktiv versetzt werden (66). Aus diesem Grund wurde nach der Stimulation mit G1 und 4-OHT die Phosphorylierung von CREB mit Hilfe eines Western Blots gemessen, um so einen Rückschluss auf seine Aktivierung zu ziehen. CREB ist ein Transkriptionsfaktor, der durch die Aktivierung des MAPK-Signalwegs phosphoryliert und somit aktiviert werden kann (89). Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten nach einer 5 Minuten Stimulation mit G1 und 4-OHT eine vermehrte

Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Bei der 10 Minuten Stimulation war die Wirkung der Stimulanzien im Vergleich zur Kontrolle nicht mehr deutlich (siehe Abbildung 12). β -Aktin wurde als Ladekontrolle verwendet. Forskolin diente als Positivkontrolle.

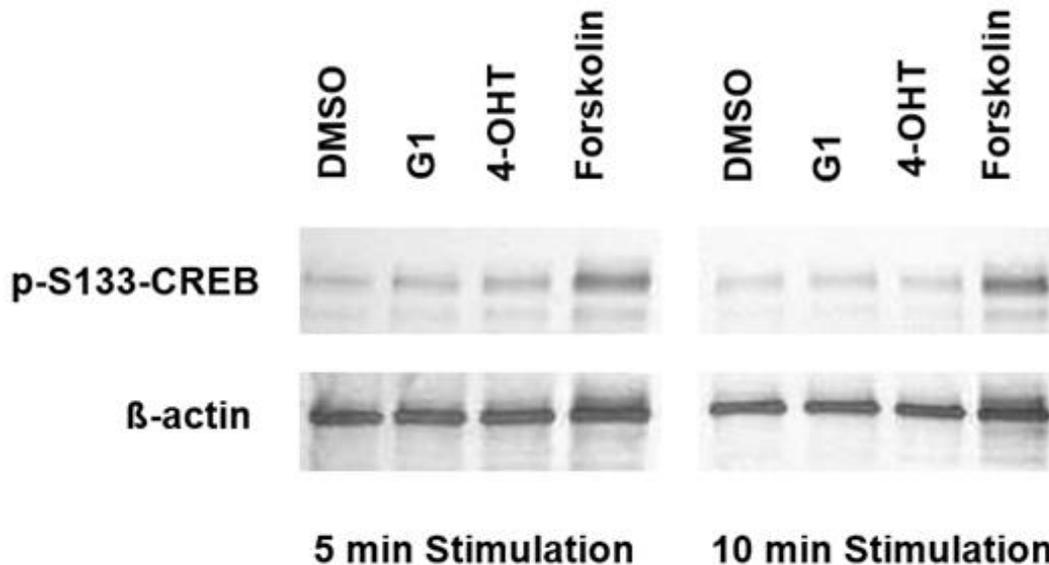


Abbildung 12: Stimulation von GPER durch G1 und 4-OHT in OVCAR-3 Zellen

Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse eines Western Blots nach 5 Minuten und 10 Minuten Stimulation von GPER mit G1 und 4-OHT. Bei der 5 Minuten Stimulation zeigte sich eine vermehrte Phosphorylierung von CREB im Vergleich zur Kontrolle (DMSO). Bei der 10 Minuten Stimulation war die Wirkung der Stimulanzien im Vergleich zur Kontrolle nicht deutlich. β -actin wurde als Ladekontrolle verwendet. Forskolin diente als Positivkontrolle.

4.3.2. GPER vermittelte Aktivierung von CREB und ERK

Nach 5 Minuten Stimulation mit G1 und mit 4-OHT wurde die Aktivierung von phospho-CREB und phospho-ERK 1/2 (p-T202/Y204-MAPK) in OVCAR-3 Zellen gemessen. Phospho-CREB und phospho-ERK 1/2 (p-T202/Y204-MAPK) sind beides Proteine, die im Rahmen des kanonischen MAPK-Signalweges aktiviert werden (66, 89). Da CREB auch durch andere Signalwege aktiviert werden kann, wurde zusätzlich die Aktivierung von ERK gemessen, was im Rahmen des MAPK-Signalwegs zur Aktivierung von CREB führen kann (89). Durch das gleichzeitige Untersuchen von aktiviertem CREB und ERK werden unterschiedliche Ebenen des MAPK-Signalwegs betrachtet, und dadurch kann eine Aktivierung und Funktionalität des MAPK-Signalweges genauer beurteilt werden. Die Ergebnisse dieser Untersuchung zeigten nach der

Stimulation mit G1 und mit 4-OHT im Vergleich zu der mit Trägerlösung behandelten Ansätzen eine vermehrte Phosphorylierung des ERK Proteins und des CREB Proteins (siehe Abbildung 13). Pan-CREB und Pan-MAPK dienten zur Normierung des Phosphorylierungssignals.

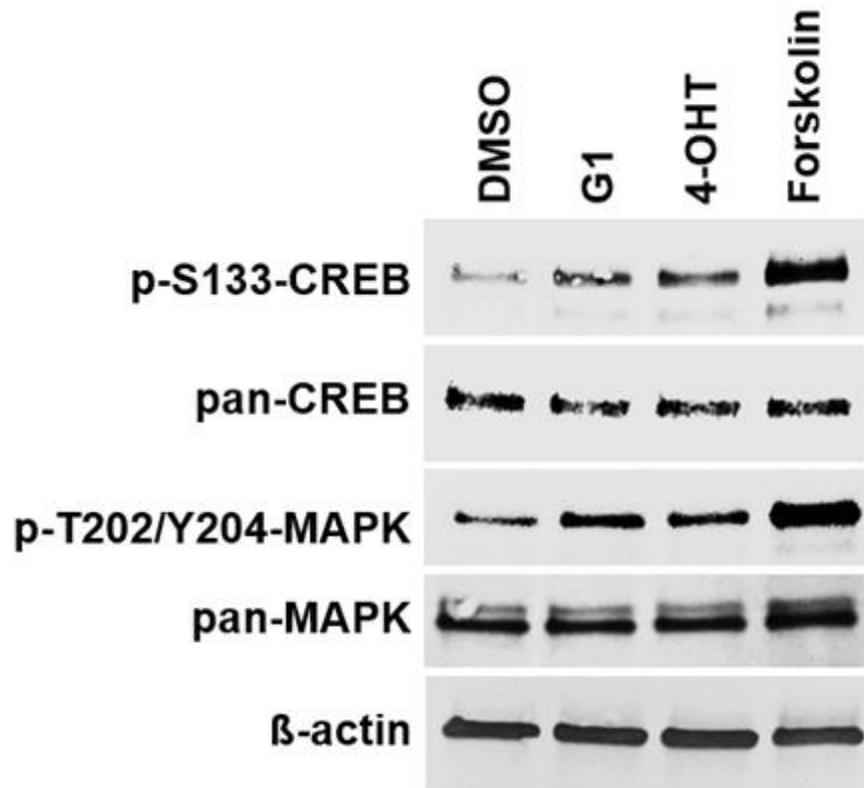


Abbildung 13: Behandlung von OVCAR-3 Zellen mit G1 und 4-OHT, und Untersuchung des MAPK-Signalwegs
 Zellen wurden 5 Minuten mit G1 und 4-OHT behandelt. DMSO als Trägersubstanz diente als Negativkontrolle, Forskolin als Positivkontrolle. Gemessen wurde die Aktivierung von phospho-CREB und phospho-ERK 1/2 (p-T202/Y204-MAPK). Das unphosphorylierte Protein (pan) diente zur Normierung des Phosphorylierungssignals. Im Vergleich zu der mit Trägerlösung behandelten Ansätzen zeigte sich eine verstärkte Expression des phosphorylierten ERK Proteins, sowie des phosphorylierten Transkriptionsfaktors CREB. β-actin diente als Ladekontrolle bei den Stimulationsversuchen.

4.4. Untersuchungen zu einer potenziellen Interaktion von GPER und TA-MUC1

4.4.1. Vergleich der subzellulären Lokalisation im Zellkulturmodell

Mit Hilfe der Immunzytochemie wurde TA-MUC1 in COV-318, Ov-90, OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen nachgewiesen und mit der Immunzytochemische Färbung von GPER (siehe Abbildung 6) in den entsprechenden 4 Zelllinien verglichen. Die Immunzytochemie und Bilder wurden in Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Dr. S. Heublein durchgeführt. Repräsentative Mikroskopaufnahmen der gefärbten Zellen sind in Abbildung 14 dargestellt. Wie bei GPER war TA-MUC1 ebenfalls in allen 4 Zelllinien exprimiert. TA-MUC1 und GPER zeigten beide eine deutliche zytoplasmatische, sowie auch eine Membran Färbung in alle 4 Zelllinien. Zusammenfassend waren GPER und TA-MUC1 in allen 4 Zelllinien nachweisbar.

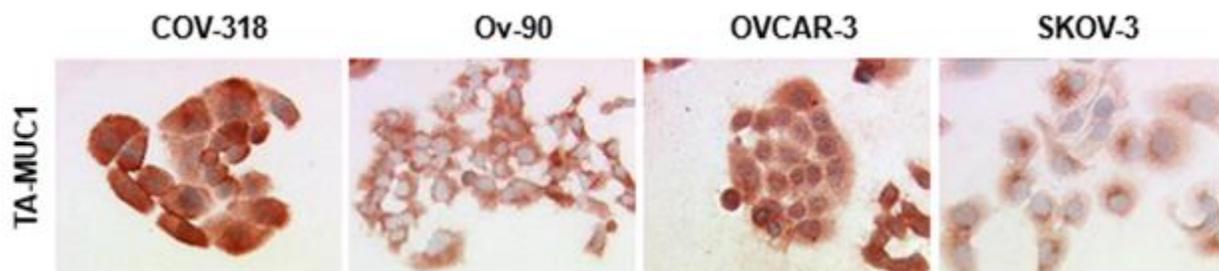


Abbildung 14: Nachweis von TA-MUC1 in Ovarialkarzinomzellen mittels Immunzytochemie

TA-MUC1 war in allen 4 Ovarialkarzinom Zelllinien koexprimiert. TA-MUC1 zeigte eine starke zytoplasmatische und Membran Immunreaktivität. Dargestellt sind repräsentative Mikroskopaufnahmen (25-fach Linse).

4.4.2. Nachweis einer partiellen Kolokalisation mittels Doppelimmunfluoreszenz

Anhand einer Doppelfärbung wurde auf der subzellulären Ebene untersucht, wo die Proteine TA-MUC1 und GPER lokalisiert sind. Die Bilder aus der Doppelimmunfluoreszenz sind in Abbildung 15 zu sehen. TA-MUC1 und GPER waren in der Mehrheit der Zellen koexprimiert. Beide Proteine zeigten eine zytoplasmatische Färbung, sowie eine partielle Membranfärbung. In den OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen wurde eine subzelluläre Kolokalisation von TA-MUC1 und GPER in fokalen Kondensationen an der Zellmembran beobachtet.

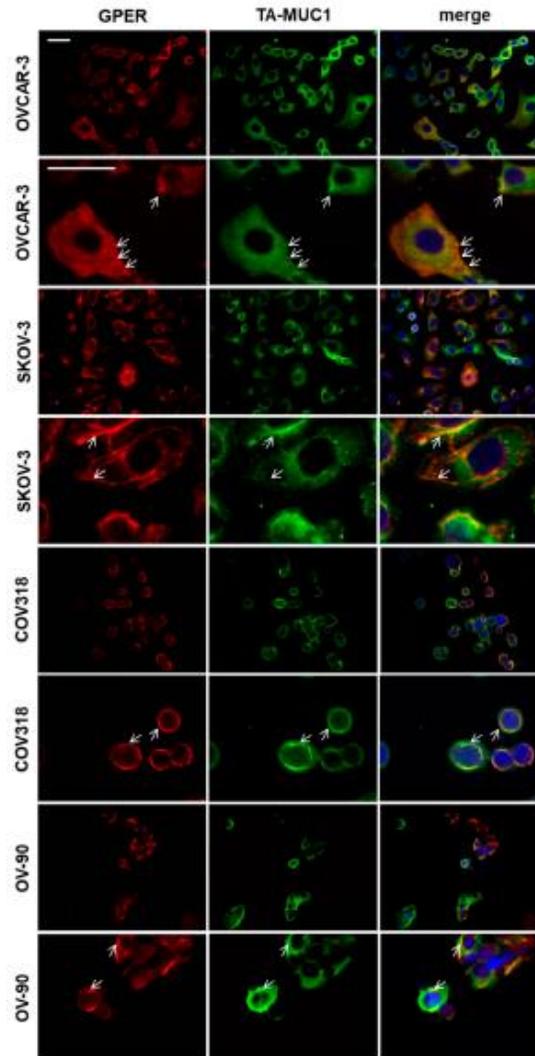


Abbildung 15: Doppelfärbung von TA-MUC1 und GPER in vier Ovarialkarzinom Zelllinien (77)

Die Doppelimmunfluoreszenzfärbung in OVCAR-3, SKOV-3, COV318 und OV-90 Zelllinien zeigte eine Koexpression von TA-MUC1 und GPER. Pfeile zeigen auf fokale Kolokalisationen dieser beiden Proteine. Die Maßstäbe in den oberen zwei Bilderreihen entsprechen jeweils 50 µm, und können auf die entsprechenden weiteren Bilder angewendet werden (72).

Die Untersuchungen der Kreuz- und Negativkontrollen wurden mit den SKOV-3 Zellen durchgeführt (siehe Abbildung 16). Bei den Negativkontrollen mit AB Serum (Biorad medical diagnostics GmbH, Hercules, CA, USA) und normal Rabbit Ig Antikörpern (Biogenex, Fremont, CA, USA) zeigten sich keine unspezifischen Bindungen dieser Primärantikörper. Die Untersuchungen zu den Kreuzkontrollen zeigten ebenfalls keine Kreuzreaktion der Sekundärantikörper.

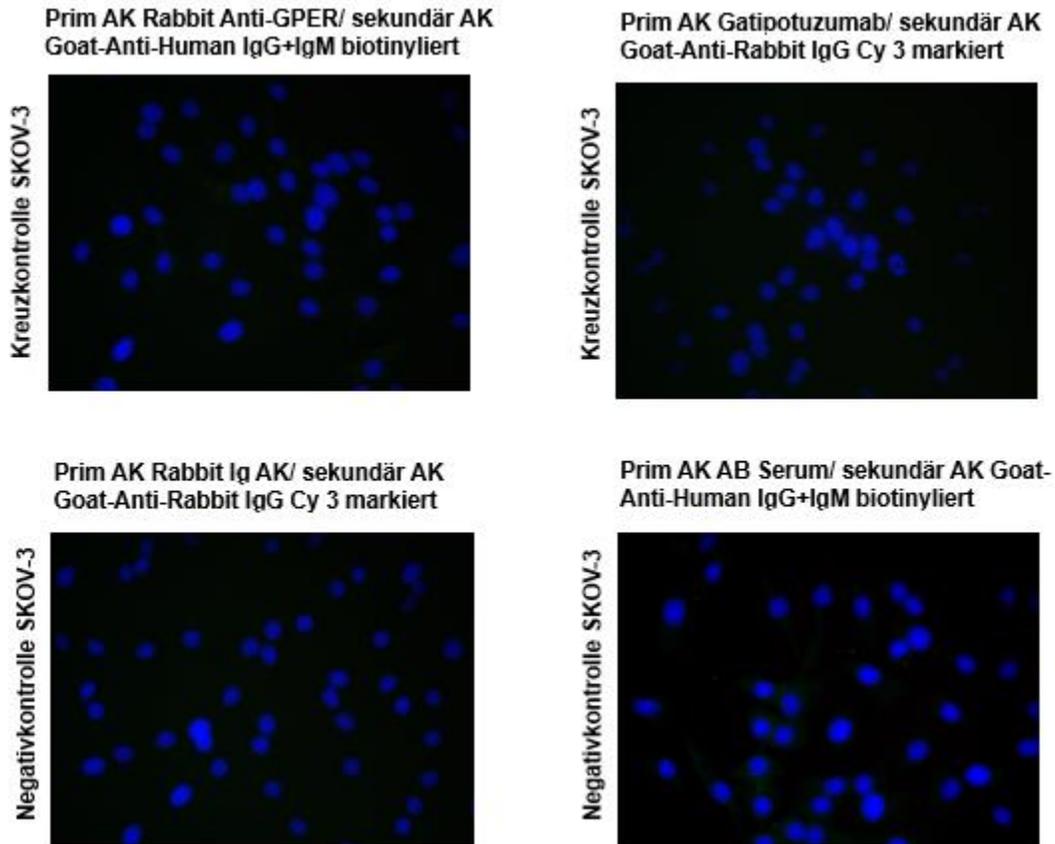


Abbildung 16: Die Spezifität der Doppelimmunfluoreszenzmethode wurde mit Kreuz- und Negativkontrollen bestätigt

4.4.3. Auswirkung der GPER und TA-MUC1 Einzel- und Kostimulation auf die Viabilität von Ovarialkarzinomzelllinien

Die Zelllinien OVCAR-3, SKOV-3, OV90 und COV318 wurden verwendet, um den Effekt von 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) und Gatipotuzumab, sowie die Kombination von beiden auf die Ovarialkarzinom-Zellviabilität zu untersuchen. Wie bereits beschrieben, ist 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) das aktive Metabolit von Tamoxifen (80). Gatipotuzumab ist ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch gegen das TA-MUC1 Epitop gerichtet ist (40). Die Substanzen wurden jeweils für 48h und 72h auf die Zellen gegeben, bevor die Viabilitätsmessung durchgeführt wurde. TA-MUC1 und GPER sind schon in allen 4 Zelllinien nachgewiesen worden (90-92). Die Ergebnisse der Viabilitätsmessung sind in Abbildung 17 zu sehen.

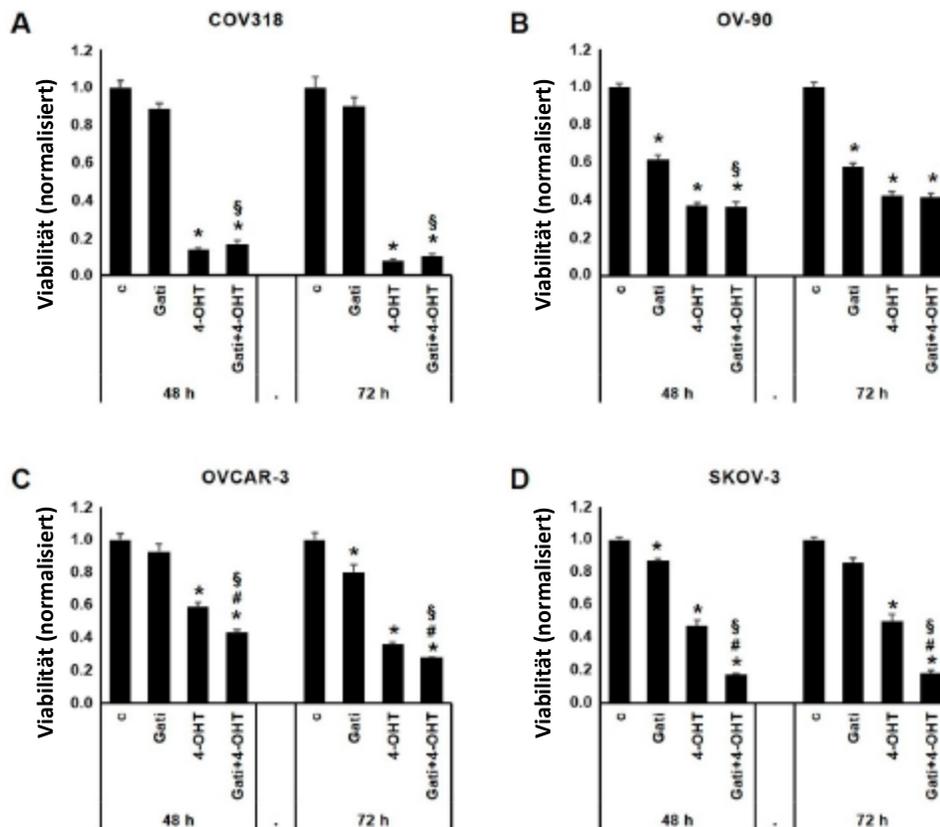


Abbildung 17: Die Wirkung von Gatipotuzumab, 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) und die Kombination von Beiden auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinom Zelllinien COV318, OV-90, OVCAR-3 und SKOV-3

Die Stimulationen mit Gatipotuzumab, 4-OHT und die Kombination von Beiden wurde an den A) COV318, B) OV-90, C) OVCAR-3, und D) SKOV-3 Zelllinien für jeweils 48h und 72h durchgeführt. Erläuterung der in der Abbildung verwendeten Symbole: „*“ bedeutet eine signifikante Reduktion im Vergleich zur Kontrolle, „\$“ bedeutet eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Zellen, die ausschließlich mit Gatipotuzumab behandelt wurden, und „#“ bedeutet eine signifikante Reduktion im Vergleich zu den Zellen, die ausschließlich mit 4-OHT behandelt wurden (72).

Gatipotuzumab hatte den größten Effekt auf die OV90 Zellen, bei denen es die Zellviabilität nach 48h um das 0,62-fache ($p = 0,006$) und nach 72h um das 0,58-fache ($p = 0,006$) reduziert hat. Bei den anderen Zelllinien hatte Gatipotuzumab nur eine geringe Wirkung. Andererseits hatte 4-OHT eine Wirkung auf die Zellviabilität in allen Zelllinien zu beiden Zeitpunkten (48h und 72h) und den größten Effekt auf die COV318 Zellen zum 72h Zeitpunkt. In diesem Zeitpunkt war die Zellviabilität auf das 0,08-fache reduziert worden ($p < 0,001$).

Im Vergleich zur Kontrolle hatte die Kostimulation mit Gatipotuzumab und 4-OHT einen Effekt auf die Zellviabilität in allen Zelllinien und ebenfalls den größten Effekt auf die COV318 Zellen nach 72h. Hier war die Viabilität auf das 0,1-fache reduziert worden ($p < 0,001$).

Die Viabilität der Zellen nach der Kostimulation wurde mit der Viabilität der Zellen nach der Stimulation mit den einzelnen Substanzen verglichen. Im Vergleich zu der Stimulation mit nur Gatipotuzumab, hatte die Kostimulation die Viabilität bei allen Zelllinien zu beiden Zeitpunkten, ausgenommen der 72h Stimulation der OV-90 Zellen, reduziert. Im Vergleich zu der alleinigen Stimulation mit 4-OHT, hatte die Kostimulation die Zellviabilität in den SKOV-3 und OVCAR-3 Zelllinien reduziert (SKOV-3, 48h: $p = 0,021$, OVCAR-3, 48h: $p = 0,001$, SKOV-3, 72h: $p = 0,014$, OVCAR-3, 72h: $p = 0,048$). Diese Erkenntnisse deuteten auf einen additiven Effekt beider Therapien hin. Bei den OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen war der Effekt der Kombination aus 4-OHT und Gatipotuzumab auf die Zellviabilität numerisch größer als die Summe der Effekte beider Substanzen in den alleinigen Stimulationen. Dies war in OVCAR-3 bei 48h Stimulation, sowie zu beiden Zeitpunkten bei den SKOV-3 Zellen zu sehen (OVCAR-3, 48h: 9,9 %, SKOV-3, 48h: 19,5 %, SKOV-3, 72h: 17,9 %). Dieses Ergebnis war jedoch nicht statistisch signifikant und könnte somit auch durch Zufall bedingt sein.

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass GPER in mehreren Ovarialkarzinomzelllinien vorhanden war und, dass GPER sowohl auf der Zellmembran als auch im Zytoplasma lokalisiert war. Eine Stimulation von Ovarialkarzinomzellen mit G1 und 4-OHT deutete auf eine Aktivierung des MAPK-Signalweges hin, was wiederum zeigte, dass der MAPK-Signalweg im Ovarialkarzinom sehr wahrscheinlich östrogenabhängig ist. Es ist bereits bekannt, dass MUC1 ebenfalls den MAPK-Signalweg stimulieren kann (72, 73, 93). Interessanterweise konnte in dieser Arbeit eine Koexpression von GPER und TA-MUC1 in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden, sowie ein additiver Effekt der Kostimulation dieser beiden Rezeptoren (mit 4-OHT und Gatipotuzumab) auf die Ovarialkarzinom-Zellviabilität. Da 4-OHT und Gatipotuzumab relativ gut verträglich sind und die Kostimulation mit diesen beiden Medikamenten einen additiven Effekt auf die Ovarialkarzinom-Zellviabilität zeigte, könnte eine 4-OHT/Gatipotuzumab Kombinationstherapie eine nebenwirkungsarme Therapiemöglichkeit zur Bekämpfung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms sein (23, 24, 41).

GPER hat eine hohe Prävalenz in Ovarialkarzinomen

Mit Hilfe der Immunzytochemie wurden GPER positive Zellen bei acht von den neun untersuchten Zelllinien nachgewiesen, was auf eine hohe Prävalenz des Rezeptors im Ovarialkarzinom hindeuten könnte. Die einzige Zelllinie, die keine GPER-positiv gefärbten Zellen zeigte, war TOV112D. Dieser Befund wurde durch ein Western Blot bestätigt (mit OVCAR-3 als Positivkontrolle).

Die Expression von GPER in drei dieser Zelllinien wurde anschließend mit PCR und Western Blot bestätigt. Mit Hilfe des Western Blots wurde das 42 kD GPER Protein in OVCAR-3 und SKOV-3 nachgewiesen, jedoch nicht bei den FuOv-1 Zellen. Bei den FuOv-1 Zellen wurde lediglich ein minimal größeres GPER Protein nachgewiesen. Dies könnte eine Spleißvariante des GPERs gewesen sein (z.B. eine Intron-Retention aufgrund der höheren Masse der Spleißvariante) (94).

Weitere Studien zeigen ebenfalls eine GPER Expression in einigen der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Zelllinien, z.B. in OVCAR-3 und SKOV-3, aber auch in noch weiteren

Ovarialkarzinomzelllinien wie CaOv3, CaOv4, OVCAR-5 und OAW-42 (75, 95-97). Darüber hinaus wurde die GPER Expression bereits in mehreren Studien auf der Ebene des Ovarialkarzinomgewebes untersucht (75, 98, 99). Diese Studien zeigten, dass GPER in serösen, muzinösen, klarzelligen und endometrioiden Ovarialkarzinomgewebe zu finden war, wobei im endometrioiden Gewebe nur eine schwache Expression nachgewiesen werden konnte (75). Eine weitere Studie über Granulosazelltumoren zeigte, dass GPER in 14 von 26 der untersuchten Fällen exprimiert war (98). Außerdem wurde GPER im Endometriosegewebe des Ovars sowie im Pelvic Inflammatory Disease Gewebe des Ovars nachgewiesen, und im Vergleich zum gesunden Ovarialgewebe, in dem GPER ebenfalls exprimiert war, war GPER in diesen beiden Geweben hochreguliert (99).

Die hohe Prävalenz von GPER in den Zelllinien der vorliegenden Arbeit und der Literatur spiegelt die hohe Prävalenz von GPER in Ovarialkarzinom-Gewebe wider (75, 95-99). Somit sind Zelllinien ein geeignetes Modellsystem für die Untersuchungen, die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurden. Da GPER in verschiedenen Ovarialkarzinomsubtypen und -tumoren exprimiert wird, und zudem im Endometriosegewebe des Ovars und im entzündlichem Ovarialgewebe im Vergleich zu gesundem Gewebe überexprimiert ist, könnte GPER für die Pathophysiologie der Ovarien von Bedeutung sein (75, 98, 99). Die hohe Prävalenz von GPER in den hier untersuchten Ovarialkarzinom Zelllinien, sowie die Daten aus den o.g. Studien zeigen, dass die Untergruppe der Ovarialkarzinompatientinnen, die GPER positiv sind und somit für eine Tamoxifen-Therapie in Frage kommen, entsprechend groß ist (75, 98, 99).

Die subzelluläre Lokalisation des GPERs könnte einen potenziellen Einfluss auf die Pathogenese des Ovarialkarzinoms haben

Studien zur prognostischen Bedeutung von GPER beim Ovarialkarzinom zeigen widersprüchliche Ergebnisse (75, 100, 101). Beispielsweise wurde in einer Studie von H. Smith et. al. eine beim Ovarialkarzinom höhere GPER Expression mit einer signifikant schlechteren 2-Jahres-, 5-Jahres- und Gesamtüberlebensrate assoziiert (100). Andere Studien zeigen hingegen, dass GPER mit einer verlängerten Gesamtüberlebenszeit und einem längeren krankheitsfreiem Überleben assoziiert ist (75, 101). In diesen Studien wurde jedoch nicht die Lokalisation von GPER im Zusammenhang mit der prognostischen Bedeutung berücksichtigt (75, 100, 101).

Studien mit anderen gynäkologischen Karzinomen liefern Hinweise darauf, dass die subzelluläre Lokalisation von GPER einen Einfluss auf die Pathogenese von Karzinomen haben könnte (102, 103). In einer Studie mit Zervixkarzinomgewebe wurde gezeigt, dass GPER sowohl auf der Plasmamembran als auch im Zytoplasma der Karzinomzellen zu finden war (102). Interessanterweise wurde beim Zervixkarzinom eine positive Korrelation zwischen zytoplasmatischer GPER Expression und Tumorsuppressor Proteinen nachgewiesen (102). Zudem war die zytoplasmatische Expression von GPER mit einer günstigen Prognose im frühen Stadium (FIGO I) des Zervixkarzinoms verbunden (102). Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen von GPER bestimmte biologische Merkmale von Mammakarzinomen widerspiegeln könnte (103). Hierbei wurde eine zytoplasmatische GPER Expression mit einem nicht-duktalem histologischen Subtyp, niedrigem Tumorstadium und einer besseren histologischen Differenzierung assoziiert, wohingegen eine nukleäre Expression mit dem tripel-negativem Subtyp und schlecht differenzierten Karzinomen assoziiert war (103). Beim Ovarialkarzinom bleibt es jedoch noch unklar, welche genaue Wirkung die subzelluläre Lokalisation von GPER auf das Karzinom hat, und mit welchen klinisch-pathologischen Charakteristika die zytoplasmatische- bzw. Plasmamembranlokalisation von GPER assoziiert ist (46, 104).

Die Lokalisation von GPER sowohl auf der Zellmembran als auch im Zytoplasma von Zellen wurde in bisherigen Studien bereits beschrieben (46, 75, 84). In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe der Immunzytochemie ebenfalls gezeigt werden, dass GPER auf der Zellmembran und im Zytoplasma von Ovarialkarzinomzellen vorhanden war (mit einer überwiegend zytoplasmatischen Verteilung des GPERs). Um das Vorhandensein des GPERs auf der Zellmembran der Ovarialkarzinomzellen zu bestätigen, wurde auf drei Zelllinien eine Doppelimmunfluoreszenz mit GPER und E-Cadherin (zweites um die Zellmembran zu markieren) durchgeführt. Anhand der partiellen Kolokalisation von GPER mit E-Cadherin auf der Zellmembran, konnte nachgewiesen werden, dass GPER ebenfalls auf der Membran lokalisiert ist.

Zusätzlich zur Untersuchung im Zellmodell wurde die subzelluläre Lokalisation auch im humanen Tumorgewebe des Ovarialkarzinoms untersucht. Hierzu wurden die in der Publikation „The G-Protein Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) is a Gonadotropin Receptor Dependent Positive Prognosticator in Ovarian Carcinoma Patients“ von Heublein et al. (2013) veröffentlichten Daten zur GPER Immunohistochemie hinsichtlich der subzellulären Lokalisation

ausgewertet (75). Die Lokalisation von GPER im Zytoplasma und auf der Zellmembran konnte, wie bereits bei den Ovarialkarzinom Zelllinien, ebenfalls im Ovarialkarzinomgewebe gezeigt werden.

Es bleibt noch zu untersuchen, ob intrazelluläres und membran-gebundenes GPER Signalwege aktiviert, die unterschiedliche zelluläre Signale produzieren (46, 105). In diesem Kontext wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die subzelluläre Lokalisation des GPERs einen potenziellen Einfluss auf die Pathogenese des HGSOCS haben könnte. Hierbei wurde die subzelluläre Lokalisation (Zytoplasma, Membran, beide) von GPER mit dem Gesamtüberleben und den klinisch-pathologischen Merkmalen des HGSOCS korreliert. Es zeigte sich jedoch keine signifikante Assoziation zwischen der subzellulären Lokalisation des GPERs und dem FIGO Stadium, dem TNM Stadium und dem Gesamtüberleben. Es wäre interessant, diese Untersuchungen bei einer größeren Stichprobe von Patientinnen zu wiederholen und somit zu prüfen, ob dann eine Assoziation zwischen diesen Variablen in HGSOCS besteht. Anhand der Überlebenskurven ist zu sehen, dass die 5-Jahres Gesamtüberlebensraten im untersuchten Kollektiv schlechter als die in der Literatur genannten 5-Jahres Gesamtüberlebensrate von 40 – 45 % waren (1). Dies könnte daran liegen, dass das für die Überlebensanalyse untersuchte Kollektiv aus HGSOCS Patientinnen bestand, wohingegen sich die 40 - 45 % auf Ovarialkarzinompatientinnen im allgemeinen bezieht (1).

GPER vermittelte Regulation des MAPK-Signalwegs

In dieser Arbeit wurden OVCAR-3 Zellen für 5 und 10 Minuten mit 4-OHT und mit dem selektivem GPER Agonist G1 stimuliert (87). Interessanterweise zeigte sich bei beiden Stimulanzien bereits nach 5 Minuten eine vermehrte Phosphorylierung von CREB im Vergleich zu den nicht-stimulierten Zellen. Dieses Ergebnis deutet auf eine mögliche Stimulation von GPER durch beide Substanzen (G1 und 4-OHT) in Ovarialkarzinomzellen hin. Unterstützt wird dies durch den derzeitigen Kenntnisstand, dass GPER schnelle nicht-genomische Signale innerhalb von Sekunden bis Minuten nach Zellstimulation aktivieren kann, wie bereits in den oben genannten Ergebnissen dargestellt (45).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten zudem, dass in Ovarialkarzinomzellen durch eine 5-minütige G1 oder 4-OHT Stimulation, CREB und ERK 1/2 (Komponenten des MAPK-Signalweges)

vermehrt phosphoryliert bzw. aktiviert werden konnten. Dies weist auf eine mögliche Regulation des MAPK-Signalwegs durch die Aktivierung von GPER hin, da bekannt ist, dass sowohl G1 als auch 4-OHT GPER stimulieren. Die Aktivierung des Signalwegs durch Tamoxifen könnte jedoch auch durch die Stimulation weiterer Rezeptoren verursacht worden sein, da Tamoxifen, anders als G1, nicht ausschließlich GPER stimuliert. Weitere Studien haben bereits gezeigt, dass GPER den MAPK-Signalweg in anderen Zellen aktivieren bzw. modulieren kann - z.B. in Neuronen, Nierenzellkarzinomzellen, östrogenrezeptor-negativen Mammakarzinomzellen, und in Endometriumkarzinomzellen (84, 106-108). Dies unterstützt die Hypothese, dass GPER den MAPK-Signalweg in Ovarialkarzinomzellen aktivieren kann. Ein genauer Mechanismus der Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch GPER Stimulation kann von den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit nicht hergeleitet werden, jedoch belegen andere Studien, dass der MAPK-Signalweg von GPER durch die Transaktivierung von EGFR aktiviert wird (109). Da EGFR bereits in der untersuchten Zelllinie OVCAR-3 nachgewiesen wurde, sind die Ergebnisse der Untersuchung dieser Arbeit in Übereinstimmung mit der oben erwähnten Information bzgl. dieses Mechanismus (110).

Wie bereits in Kapitel 1 beschrieben, spielt die Dysregulation des MAPK-Signalwegs eine wichtige Rolle bei der Tumorentstehung in vielen Krebsarten, inklusive Ovarialkarzinomen (67, 68). Eine abnormale MAPK-Signalübertragung kann zu einer unkontrollierten Zellproliferation, Apoptoseresistenz, und Resistenz gegen Chemotherapie führen (67). Der MAPK-Signalweg ist daher ein attraktives therapeutisches Ziel in der Krebstherapie und aktuell wird der Entwicklung von Therapien, die auf diesen Signalweg zielen, eine große Aufmerksamkeit gewidmet (68). Interessanterweise wurde in Studien bereits gezeigt, dass MUC1 ebenfalls den MAPK-Signalweg aktivieren kann (73, 74). Das gezielte „Targeting“ von MUC1 mit Gatipotuzumab könnte daher auch den MAPK-Signalweg modulieren (111).

Tamoxifen und Gatipotuzumab könnten ihre Wirkung im Rahmen einer kombinierten Therapie gegenseitig verstärken

In Vorarbeiten wurde bereits gezeigt, dass im Ovarialkarzinomgewebe GPER (und ER alpha) Expression mit der Membranexpression von TA-MUC1 korreliert (72). In Übereinstimmung damit wurde in dieser Arbeit mit Hilfe der Immunzytochemie gezeigt, dass GPER und TA-MUC1

in allen vier auf TA-MUC1 gefärbten Zelllinien (COV-318, Ov-90, OVCAR-3 und SKOV-3) vorhanden waren. Interessanterweise hatten beide Proteine (GPER und TA-MUC1) auch ähnliche subzelluläre Lokalisationen, was auf eine mögliche physische Interaktion zwischen den beiden deuten könnte. Unterstützt wird dies durch die Ergebnisse der durchgeführten Doppelimmunfluoreszenz, die eine Kolokalisation von TA-MUC1 und GPER in Form von fokalen Kondensationen an der Zellmembran bei zwei der vier Ziellinien gezeigt hat. Obwohl diese Kolokalisation Hinweise auf ein potenzielles Zusammenspiel zwischen TA-MUC1 und GPER in Ovarialkarzinomzellen liefert, müssten noch weitere unterstützende Untersuchungen durchgeführt werden, z.B. ein Proximity Ligation Assay, um diese potenzielle Interaktion im Ovarialkarzinom zu bestätigen (72).

Um zu untersuchen, ob Tamoxifen und Gatipotuzumab als potenzielle Kombinationstherapie fungieren könnten, wurden Ovarialkarzinomzellen mit 4-OHT und Gatipotuzumab jeweils als Monotherapie, sowie mit 4-OHT und Gatipotuzumab zusammen in Form einer Kombinationstherapie behandelt. In der Zellviabilitäts-Untersuchung wurde bei allen vier Zelllinien ein 42 kD GPER Protein (siehe Abbildung 8B und Ergänzende Abbildung 2), sowie eine Koexpression von GPER und TA-MUC1 nachgewiesen (siehe Abbildung 15). 4-OHT und Gatipotuzumab zeigten beide als Monotherapie antiproliferative Effekte auf Ovarialkarzinomzellen. Tamoxifen hat eine aktivierende Wirkung auf GPER und eine selektivmodulierende Wirkung auf ER α (112). 4-OHT, der aktive Metabolit des Tamoxifens, hat die Zellviabilität in allen vier Zelllinien signifikant reduziert (80). Dies ist in Übereinstimmung mit einer weiteren Studie, die ebenfalls gezeigt hat, dass Tamoxifen in östrogenrezeptorpositiven Ovarialkarzinomzellen eine antiproliferative Wirkung hat (75). Gatipotuzumab hat die Zellviabilität in der OV-90 Zelllinie signifikant reduziert, zeigte aber keine signifikante Reduktion in den restlichen Zelllinien. Dies ist in Übereinstimmung mit dem im Kapitel 1.3.4. erwähnten heterogenen Effekt der Gatipotuzumab Monotherapie (60, 61).

Im Vergleich zu den beiden Einzeltherapien (mit Gatipotuzumab und 4-OHT) hat die kombinierte Therapie einen signifikanten antiproliferativen Effekt auf die Ovarialkarzinomzellen gezeigt. In den SKOV-3 und OVCAR-3 Zelllinien war der antiproliferative Effekt der kombinierten Therapie numerisch größer als die Summe der individuellen Effekte der jeweiligen Monotherapien. Dieses Ergebnis war jedoch nicht signifikant. Diese Ergebnisse liefern dennoch Hinweise darauf, dass das zum Tamoxifen zusätzlich gegebene Gatipotuzumab die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen

additiv unterstützen kann, und somit ein guter Kombinationspartner zu Tamoxifen in der Behandlung vom Ovarialkarzinom sein könnte.

Da Ergebnisse aus bisherigen Studien das Bestehen eines möglichen Zusammenspiels zwischen MUC1- und Östrogenrezeptor-Signalwege in Karzinomzellen zeigten, ist es nicht unwahrscheinlich, dass der Effekt zwischen Tamoxifen und Gatipotuzumab nicht nur additiv ist, wie in den vorliegenden Ergebnissen gezeigt, sondern auch eine komplexere Interaktion aufweist - was zu einer verstärkten Wirkung führen könnte (38, 39). Es wurde z.B. nachgewiesen, dass MUC1 mit EGFR interagiert (beispielsweise durch die Stimulierung von EGFR Expression und EGFR Signalwege im Endometriumkarzinom) (113). In diesem Kontext wurde in einer vorherigen Studie bereits gezeigt, dass Anti-MUC1-Antikörper Signalwege des EGFRs in Krebszellen inhibieren konnten (71). Interessanterweise wurde festgestellt, dass GPER sogar physisch mit EGFR auf Krebszellen interagiert (114). Studien zeigten zudem, dass aktiviertes GPER mit der EGFR/ERK 1/2 Signalkaskade interagieren kann und somit die Zellproliferation in Karzinomen beeinflusst (115, 116). Darüber hinaus gibt es Hinweise darauf, dass MUC1-C an ER α binden und die Auswirkungen vom Tamoxifen auf die ER α vermittelte Transkription abschwächen kann (93). Interessanterweise stützten die Ergebnisse dieser genannten Studie, dass die gezielte Inhibition von MUC1-C die MUC1-C-induzierte Tamoxifen-Resistenz umkehren könnte (93).

Dennoch liefern die Ergebnisse der Zellviabilitäts Untersuchung in der vorliegenden Arbeit keinen statistisch signifikanten Hinweis auf eine synergistische Wirkung von Gatipotuzumab und Tamoxifen in Ovarialkarzinomzellen, und somit auch kein Anzeichen dafür, dass diese Medikamente die Wirkung des jeweils anderen verstärken. Die fehlende Signifikanz der synergistischen Wirkung in den oben genannten Zelllinien könnte durch eine Reihe von Faktoren beeinflusst sein. Wie bereits erwähnt, könnte die Wirkung des kombinierten „targeting“ des MUC1s und GPERs von der Aktivierung des EGFR-Signalweges bzw. MAPK-Signalwegs abhängig sein (71, 113-116). Die oben erwähnte fehlende Signifikanz könnte daher durch die Wirkungen von EGFR verursacht sein, dessen Expression auf den Zellen in dieser Arbeit nicht nachgewiesen wurde. Um einen synergistischen Effekt der Kombinationstherapie genauer zu untersuchen, könnte diese Untersuchung mit Ovarialkarzinomzellen von mehreren Zelllinien wiederholt werden und alle verwendeten Zelllinien zusätzlich i.R. des Experiments auf EGFR Expression gefärbt werden, um die Präsenz von EGFR zu beurteilen.

Eine weitere Erklärung der o.g. fehlenden Signifikanz könnte auf eine unterschiedliche Menge an GPER auf den untersuchten Zellen zurückzuführen sein. Obwohl GPER in allen Zelllinien vorhanden war, war zunächst die relative Menge an GPER, die in den Zellen der vier Zelllinien vorhanden war, unbekannt. Eine unterschiedliche Menge an GPER könnte eventuell einen Einfluss auf das Ansprechen der Zellen auf die Tamoxifen Therapie gehabt haben.

Zusätzlich ist zu erwähnen, dass der *in vitro* Effekt der Gatipotuzumab Therapie auf die Zellviabilität der untersuchten Zelllinie nicht den *in vivo* Effekt widerspiegelt. Das liegt daran, dass Immuneffektor-Zellen, die auch eine Rolle im Gatipotuzumab anti-Tumor Wirkmechanismus spielen, fehlen. Als nächster Schritt könnten *in vivo* Experimente oder *in vitro* Experimente mit Immuneffektor-Zellen durchgeführt werden.

Insgesamt zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine numerisch additive Wirkung von Gatipotuzumab und Tamoxifen auf die Zellviabilität (*in vitro*), wenn sie in Kombination zur Bekämpfung von Ovarialkarzinomzellen eingesetzt wurden. Somit könnte eine Kombinationstherapie mit diesen beiden Medikamenten möglicherweise eine geeignete und schonende Therapieoption für Patienten mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen sein.

6. Zusammenfassung

Hintergrund

Das Ovarialkarzinom hat die höchste Mortalität von allen gynäkologischen Malignomen. Da die derzeitigen Chemotherapien nicht ausreichend effektiv in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms sind, werden viele dieser Patientinnen mit verschiedenen Therapien sukzessiv behandelt. Diese Therapien sind mit kumulativen und irreversiblen Nebenwirkungen bei trotzdem voranschreitender Erkrankung behaftet. Da bei diesen Patientinnen eine Heilung nicht mehr erzielt werden kann und die Ansprechraten auf die verfügbaren Therapien niedrig sind, steht der Erhalt der Lebensqualität im Fokus der Behandlung. Es besteht ein hoher klinischer Bedarf an nebenwirkungsarmen Therapiemöglichkeiten, die zumindest zu einer mittelfristigen Stabilisierung dieser fortgeschrittenen Karzinome führen. Tamoxifen ist ein gut verträgliches Medikament, das einen großen Erfolg in der Behandlung des hormonempfindlichen Mammakarzinoms zeigt. Obwohl in Studien nur eine kleine Anzahl an Ovarialkarzinompatientinnen auf eine Tamoxifen Therapie ansprechen, hat Tamoxifen im Vergleich zur Chemotherapie eine geringere Toxizität und sorgt für eine bessere Lebensqualität, ohne einen Unterschied in der Effektivität der Symptomkontrolle und im Gesamtüberleben. Da MUC1- und Östrogenrezeptor-Signalwege in Karzinomzellen möglicherweise interagieren, wurde untersucht, ob eine Kombinationstherapie mit Gatipotuzumab das Ansprechen auf eine Tamoxifen Therapie erhöhen kann (und umgekehrt) und, ob dies eine effektive Kombinationstherapie in der Behandlung des fortgeschrittenen Ovarialkarzinoms sein könnte.

Methoden

Zunächst wurde GPER mit Hilfe der Immunzytochemie in Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen und seine subzelluläre Lokalisation untersucht. Die subzelluläre Lokalisation von GPER wurde auch in bereits gefärbtem Ovarialkarzinomgewebe analysiert und es wurde geprüft, ob diese Lokalisation mit klinisch pathologischen Parametern assoziiert ist. Anschließend wurde untersucht, ob eine Stimulation mit Tamoxifen den MAPK-Signalweg in Ovarialkarzinomzellen aktivieren kann. Da MUC1 ebenfalls den MAPK-Signalweg aktivieren kann, wurden weitere *in-*

in vitro Experimente durchgeführt, um die subzelluläre Lokalisation von TA-MUC1 in Bezug auf GPER, und die Auswirkungen der Kostimulation von GPER und TA-MUC1 auf die Viabilität von Ovarialkarzinomzellen, zu untersuchen.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der Immunzytochemie zeigten eine hohe Prävalenz von GPER in Ovarialkarzinomzelllinien. Zudem konnte GPER sowohl im Zytoplasma als auch auf der Zellmembran von Ovarialkarzinomzellen nachgewiesen werden. Diese subzelluläre Verteilung konnte auch im Ovarialkarzinomgewebe bestätigt werden. Es wurde im Ovarialkarzinomgewebe jedoch keine Assoziation zwischen der subzellulären Lokalisation von GPER und klinisch-pathologischen Merkmalen festgestellt. Die Ergebnisse der *in-vitro* Stimulationen von Ovarialkarzinomzellen mit Tamoxifen zeigten Hinweise auf eine östrogenrezeptor-abhängige Aktivierung des MAPK-Signalwegs, möglicherweise durch eine GPER Stimulation. Interessanterweise war GPER mit TA-MUC1 koexprimiert und in zwei der vier untersuchten Zelllinien auch kolokalisiert. Eine kombinierte Behandlung von Ovarialkarzinomzellen mit Tamoxifen und Gatipotuzumab zeigte eine additive Wirkung der beiden Medikamente auf die Zellviabilität, jedoch keinen Hinweis auf eine Interaktion, z.B. in Form von Synergismus, zwischen der GPER und MUC1 Stimulation.

Schlussfolgerung

Insgesamt deuten die Koexpression und Kolokalisation von GPER und TA-MUC1 in den Ovarialkarzinomzellen auf ein mögliches Zusammenspiel hin. Als diese Zellen mit einer Kombinationstherapie mit Tamoxifen und Gatipotuzumab behandelt wurden, wurde jedoch kein Synergismus festgestellt. Dennoch zeigten die Ergebnisse dieser Arbeit eine additive Wirkung von Gatipotuzumab und Tamoxifen auf die Zellviabilität (*in vitro*), wenn sie in Kombination eingesetzt wurden. Somit könnte eine Kombinationstherapie mit diesen beiden Medikamenten möglicherweise eine geeignete und schonende Therapieoption für Patientinnen mit fortgeschrittenen Ovarialkarzinomen sein. *In-vivo* Versuche sind jedoch notwendig, um die Effektivität dieser Kombinationstherapie beim fortgeschrittenem Ovarialkarzinom zu bestätigen.

7. Abkürzungen und Akronyme

4-OHT	4-Hydroxytamoxifen
ABC-Methode.....	Avidin-Biotin-Komplex Methode
ADCC	Antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität
ADCP	Antikörperabhängige zelluläre Phagozytose
AEC.....	3-Amino-9-ethylcarbazol
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3'-Indolyphosphate p-Toluidine Salz
CA-125.....	Cancer-Antigen 125
cDNA	Komplementäre DNA
CREB	cAMP response element-binding protein
DAPI.....	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle Nährmedium
DMSO	Dimethyl Sulfoxid
ER	Östrogenrezeptor
ERK	Extrazelluläre signalregulierte Kinase, extracellular-signal regulated kinases
FCS.....	Fetales Kalbserum
FIGO	Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique
G	Histologischer Differenzierungsgrad
GalNAc α 1	Tn Antigen
Gal β 1-3GalNAc α 1-	Thomsen-Friedenreich Epitop
GAPDH.....	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GPCR.....	G-Protein-gekoppelter Rezeptor
GPER.....	G-Protein-gekoppelte Östrogenrezeptor
HBSS.....	Hanks' Balanced Salt Solution
HGSOC.....	High-grade seröses Ovarialkarzinom
HRD	Homologous recombination deficiency
in vivo.....	im lebenden Organismus
IRS Score.....	Immunreaktiver Score
JNK.....	Jun amino-terminale Kinase
LGSOC.....	Low-grade seröses Ovarialkarzinom
MAPK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK.....	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase Kinase Kinase
MDB	Membrane Desalting Buffer
mRNA	Messenger RNA
MRT.....	Magnetresonanztomographie
MUC1	Mucin 1
MUC1-C.....	MUC1 transmembrane C-terminal
NBT.....	Nitro-Blue Tetrazolium Chlorid
NSCLC.....	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR.....	Polymerase-Kettenreaktion

PDTRP.....	Pro-Asp-Thr-Arg-Pro Aminosäuresequenz
pTNM Klassifikation	Pathologische TNM Klassifikation
PVDF-Membran.....	Polyvinylidene Fluoride Membran
RIPA-Puffer.....	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
SAPK.....	Stress-aktivierte Proteinkinase
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
SPSS.....	Statistical Product and Service Solutions
subcutan.....	"unter die Haut"
TA-MUC1.....	tumor-assoziiertes Mucin 1 Epitop
TBS	Tris-buffered Saline
TBST.....	Tris-buffered saline with Tween20
TNM.....	T) Ausdehnung des Primärtumors, N) Lymphknotenbefalls, M) Metastasen
VNTR	variable number tandem repeat

8. Literaturverzeichnis

1. Petru E, Moinfar F, Winter R, Tamussino K, Sehouli J. Maligne epitheliale Tumoren des Ovars. In: Petru E, Fink D, Köchli OR, Loibl S, editors. Praxisbuch Gynäkologische Onkologie. 5 ed. Berlin: Springer-Verlag GmbH; 2019. p. 101-29.
2. Wagner U, Harter P, Hilpert F, Mahner S, Reuß A, du Bois A, et al. S3-Guideline on Diagnostics, Therapy and Follow-up of Malignant Ovarian Tumours. GebFra - DGGG-Gesellschaftsausgaben. 2013(03):874-89.
3. Rosenthal AN, Fraser LSM, Philpott S, Manchanda R, Burnell M, Badman P, et al. Evidence of Stage Shift in Women Diagnosed With Ovarian Cancer During Phase II of the United Kingdom Familial Ovarian Cancer Screening Study. J Clin Oncol. 2017;35(13):1411-20.
4. AstraZeneca. HRD und BRCA1/2-Mutationen beim Ovarialkarzinom 2020 [Available from: <https://www.az-diagnostik.de/hrd-brca-mutationen-ovarialkarzinom>].
5. Rein D, Arnold N, Niederacher D. Ovarialkarzinom. Der Gynäkologe. 2006;39(6):420-7.
6. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft Deutsche Krebshilfe A. S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Version 5.0 - September 2021. 2021. Report No.: AWMF-Registernummer: 032/035OL.
7. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK, AWMF). S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren, Langversion 3.0. 2019. Report No.: AWMF-Registernummer: 032/035OL.
8. Banholzer J, Banholzer P. Sonographie BASICS. 2 ed. Munich: Urban & Fischer Verlag, Elsevier GmbH; 2015.
9. du Bois A, Reuss A, Pujade-Lauraine E, Harter P, Ray-Coquard I, Pfisterer J. Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials. Cancer. 2009;115(6):1234-44.
10. de Gregorio N, du Bois A, Sehouli J, Reuss A, Burges A, Kimmig R, et al. Die Lion Studie: Lymphadenektomie beim fortgeschrittenen primären Ovarialkarzinom—Eine multinationale randomisiert-prospektive Studie der AGO. Geburtshilfe und Frauenheilkunde. 2018;78(10):FV51.
11. Coleman R, Fleming G, Brady M, Swisher E, Steffensen K, Friedlander M, et al. VELIA/GOG-3005: Integration of veliparib (V) with front-line chemotherapy and maintenance in women with high-grade serous carcinoma of ovarian, fallopian tube, or primary peritoneal origin (HGSC). Annals of Oncology. 2019;30:v895-v6.
12. König R. Niraparib bei Ovarialkrebs. Deutsches Ärzteblatt 2020. 2020;117 (48).
13. Harter P, du Bois A, Hahmann M, Hasenburg A, Burges A, Loibl S, et al. Surgery in recurrent ovarian cancer: the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie (AGO) DESKTOP OVAR trial. Ann Surg Oncol. 2006;13(12):1702-10.
14. Harter P, Sehouli J, Reuss A, Hasenburg A, Scambia G, Cibula D, et al. Prospective validation study of a predictive score for operability of recurrent ovarian cancer: the Multicenter Intergroup Study DESKTOP II. A project of the AGO Kommission OVAR, AGO Study Group, NOGGO, AGO-Austria, and MITO. Int J Gynecol Cancer. 2011;21(2):289-95.
15. Oncology C. Rubraca Filmtabletten Fachinformation 2021 [Available from: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/022530>].
16. Sehouli J, Tomè O, Dimitrova D, Camara O, Runnebaum IB, Tessen HW, et al. A phase III, open label, randomized multicenter controlled trial of oral versus intravenous treosulfan in heavily pretreated recurrent ovarian cancer: a study of the North-Eastern German Society of Gynecological Oncology (NOGGO). Journal of cancer research and clinical oncology. 2017;143(3):541-50.

17. medac. Ovastat® 1000/5000 mg Fachinformation 2021 [Available from: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/006670>].
18. Lutz L, Aivazova-Fuchs V, Kern C, Petrides PE, Seck K, Sommer H, et al. **Systemische Therapie bei Progression oder Rezidiv**. In: München T, Schmalfeldt B, editors. *Maligne Ovarialtumoren: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge*. 10 ed. München: W. Zuckschwerdt Verlag; 2014.
19. Sun CC, Ramirez PT, Bodurka DC. Quality of life for patients with epithelial ovarian cancer. *Nature Clinical Practice Oncology*. 2007;4(1):18-29.
20. Dunton CJ. Management of treatment-related toxicity in advanced ovarian cancer. *The oncologist*. 2002;7:11-9.
21. Williams C, Simera I, Bryant A, Platt J. Tamoxifen for relapse of ovarian cancer. *Cochrane Database of Systematic Reviews*. 2018(3).
22. Karow T, Lang-Roth R. *Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. 23 ed. Pulheim: Karow; 2014.
23. Nayfield SG, Karp JE, Ford LG, Dorr FA, Kramer BS. Potential Role of Tamoxifen in Prevention of Breast Cancer. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 1991;83(20):1450-9.
24. Lindemann K, Gibbs E, Åvall-Lundqvist E, Christensen RD, Woie K, Kalling M, et al. Chemotherapy vs tamoxifen in platinum-resistant ovarian cancer: a phase III, randomised, multicentre trial (Ovaresist). *British journal of cancer*. 2017;116(4):455-63.
25. Committee NCE. *Diagnosis, staging and treatment of patients with breast cancer*. National Clinical Guideline no 7. 2015.
26. (EBCTCG) EBCTCG. 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):1687-717.
27. Ruß A, Endres S. *Arzneimittel pocket plus*. 14 ed. Grünwald: Börm Bruckmeier Verlag GmbH; 2017.
28. Leitlinienprogramm Onkologie (Deutsche Krebsgesellschaft DK A. *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms*. 2018. Report No.: AWMF-Registernummer: 032-045OL.
29. Pujol P, Rey J-M, Nirde P, Roger P, Gastaldi M, Laffargue F, et al. Differential expression of estrogen receptor- α and- β messenger RNAs as a potential marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer research*. 1998;58(23):5367-73.
30. Chan KK, Siu MK, Jiang Y-x, Wang J-j, Wang Y, Leung TH, et al. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC cancer*. 2017;17(1):1-11.
31. Chan KKL, Ngu SF, Chu MMY, Tse KY, Ngan HYS. Tamoxifen use in recurrent ovarian cancer in a Chinese population: A 15-year clinical experience in a tertiary referral center. *Asia-Pacific Journal of Clinical Oncology*. 2020.
32. Karagol H, Saip P, Uygun K, Caloglu M, Eralp Y, Tas F, et al. The efficacy of tamoxifen in patients with advanced epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology*. 2007;24(1):39-43.
33. Claudia Marchetti FPUAGI. *Efficacy of Letrozole in Recurrent Ovarian Cancer (MITO32)*. 2020.
34. Group SGT. *MAintenance Therapy With Aromatase Inhibitor in Epithelial Ovarian Cancer (MATAO) (MATAO)*. 2022.
35. Pharma N. Piqray® Fachinformation 2021 [Available from: <https://www.fachinfo.de/suche/fi/023069>].
36. André F, Ciruelos E, Rubovszky G, Campone M, Loibl S, Rugo HS, et al. Alpelisib for PIK3CA-mutated, hormone receptor-positive advanced breast cancer. *New England Journal of Medicine*. 2019;380(20):1929-40.

37. Mirza M, Børge L, Marmé F, Christensen RD, Gil-Martin M, Auranen A, et al. LBA28 A randomised double-blind placebo-controlled phase II trial of palbociclib combined with letrozole (L) in patients (pts) with oestrogen receptor-positive (ER+) advanced/recurrent endometrial cancer (EC): NSGO-PALEO/ENGOT-EN3 trial. *Annals of Oncology*. 2020;31:S1160.
38. Ibrahim NK, Murray JL, Zhou D, Mittendorf EA, Sample D, Tautchin M, et al. Survival advantage in patients with metastatic breast cancer receiving endocrine therapy plus Sialyl Tn-KLH vaccine: post hoc analysis of a large randomized trial. *Journal of Cancer*. 2013;4(7):577.
39. Ojo D, Lin X, Wu Y, Cockburn J, Bane A, Tang D. Polycomb complex protein BMI1 confers resistance to tamoxifen in estrogen receptor positive breast cancer. *Cancer Letters*. 2018;426:4-13.
40. Glycotope G. Gatipotuzumab, previously known as PankoMab-GEX® 2019 [Available from: <https://www.glycotope.com/products/pankomab-gex/>].
41. Padma VV. An overview of targeted cancer therapy. *Biomedicine (Taipei)*. 2015;5(4):19-.
42. Gerber DE. Targeted therapies: a new generation of cancer treatments. *American family physician*. 2008;77(3).
43. National Cancer Institute NIH. Targeted Cancer Therapies 2019 [updated 02.12.19. Available from: <https://www.cancer.gov/about-cancer/treatment/types/targeted-therapies/targeted-therapies-fact-sheet#what-are-targeted-cancer-therapies>].
44. Zimmerman MA, Budish RA, Kashyap S, Lindsey SH. GPER-novel membrane estrogen receptor. *Clinical science (London, England: 1979)*. 2016;130(12):1005.
45. Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the Transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol*. 2008;70:165-90.
46. Luo J, Liu D. Does GPER really function as a G protein-coupled estrogen receptor in vivo? *Frontiers in endocrinology*. 2020;11:148.
47. Singh PK, Hollingsworth MA. Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology*. 2006;16(9):467-76.
48. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nature Reviews Cancer*. 2004;4.
49. van Putten JPM, Strijbis K. Transmembrane Mucins: Signaling Receptors at the Intersection of Inflammation and Cancer. *Journal of Innate Immunity*. 2017;9(3):281-99.
50. Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends Mol Med*. 2014;20(6):332-42.
51. Gendler S, Taylor-Papadimitriou J, Duhig T, Rothbard J, Burchell J. A highly immunogenic region of a human polymorphic epithelial mucin expressed by carcinomas is made up of tandem repeats. *Journal of Biological Chemistry*. 1988;263(26):12820-3.
52. Karsten U, von Mensdorff-Pouilly S, Goletz S. What makes MUC1 a tumor antigen? *Tumor Biology*. 2005;26(4):217-20.
53. Hanisch F-G, Müller S. MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology*. 2000;10(5):439-49.
54. Cao Y, Blohm D, Ghadimi BM, Stosiek P, Xing P-X, Karsten U. Mucins (MUC1 and MUC3) of gastrointestinal and breast epithelia reveal different and heterogeneous tumor-associated aberrations in glycosylation. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*. 1997;45(11):1547-57.
55. Beckwith DM, Cudic M. Tumor-associated O-glycans of MUC1: Carriers of the glyco-code and targets for cancer vaccine design. *Seminars in Immunology*. 2020;47:101389.
56. Karsten U, Serttas N, Paulsen H, Danielczyk A, Goletz S. Binding patterns of DTR-specific antibodies reveal a glycosylation-conditioned tumor-specific epitope of the epithelial mucin (MUC1). *Glycobiology*. 2004;14(8):681-92.
57. (JCBN) I-IJCoBN. Nomenclature and Symbolism for Amino Acids and Peptides, Recommendations 1983. *European Journal of Biochemistry*. 1984;138(1):9-37.

58. Dian D, Lenhard M, Mayr D, Heublein S, Karsten U, Goletz S, et al. Staining of MUC1 in ovarian cancer tissues with PankoMab-GEX™ detecting the tumour-associated epitope, TA-MUC1, as compared to antibodies HMFG-1 and 115D8. *Histology and Histopathology*. 2013.
59. Fan X-N, Karsten U, Goletz S, Cao Y. Reactivity of a humanized antibody (hPankoMab) towards a tumor-related MUC1 epitope (TA-MUC1) with various human carcinomas. *Pathology - Research and Practice*. 2010;206(8):585-9.
60. Fiedler W, DeDosso S, Cresta S, Weidmann J, Tessari A, Salzberg M, et al. A phase I study of PankoMab-GEX, a humanised glyco-optimised monoclonal antibody to a novel tumour-specific MUC1 glycopeptide epitope in patients with advanced carcinomas. *European Journal of Cancer*. 2016;63:55-63.
61. Ledermann J, Sehouli J, Zurawski B, Raspagliesi F, De Giorgi U, Banerjee S, et al. LBA41A double-blind, placebo-controlled, randomized, phase 2 study to evaluate the efficacy and safety of switch maintenance therapy with the anti-TA-MUC1 antibody PankoMab-GEX after chemotherapy in patients with recurrent epithelial ovarian carcinoma. *Annals of Oncology*. 2017;28(suppl_5).
62. Danielczyk A, Stahn R, Faulstich D, Löffler A, Märten A, Karsten U, et al. PankoMab: a potent new generation anti-tumour MUC1 antibody. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 2006;55(11):1337-47.
63. National Cancer Institute at NCI. ADC 2021 [Available from: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/adc>].
64. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene*. 2007;26(22):3100-12.
65. Qi M, Elion EA. MAP kinase pathways. *Journal of cell science*. 2005;118(16):3569-72.
66. Morrison DK. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(11):a011254.
67. USA G. Explore MAPK 2021 [Available from: <https://www.genentechoncology.com/pathways/cancer-tumor-targets/mapk.html>].
68. Santarpia L, Lippman SM, El-Naggar AK. Targeting the MAPK-RAS-RAF signaling pathway in cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2012;16(1):103-19.
69. Guo YJ, Pan WW, Liu SB, Shen ZF, Xu Y, Hu LL. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp Ther Med*. 2020;19(3):1997-2007.
70. Roberts PJ, Der CJ. Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene*. 2007;26(22):3291-310.
71. Hisatsune A, Nakayama H, Kawasaki M, Horie I, Miyata T, Isohama Y, et al. Anti-MUC1 antibody inhibits EGF receptor signaling in cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2011;405(3):377-81.
72. Heublein S, Page S, Mayr D, Schmoeckel E, Trillsch F, Marmé F, et al. Potential interplay of the gatipotuzumab epitope TA-MUC1 and estrogen receptors in ovarian cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(2):295.
73. Meerzaman D, Shapiro PS, Kim KC. Involvement of the MAP kinase ERK2 in MUC1 mucin signaling. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*. 2001;281(1):L86-L91.
74. Hattrup CL, Gendler SJ. MUC1 alters oncogenic events and transcription in human breast cancer cells. *Breast Cancer Research*. 2006;8(4):R37.
75. Heublein S, Mayr D, Vrekoussis T, Friese K, Hofmann SS, Jeschke U, et al. The G-protein coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) is a gonadotropin receptor dependent positive prognosticator in ovarian carcinoma patients. *PLoS One*. 2013;8(8).
76. Noll S, Schaub-Kuhnen S. *Praxis der Immunhistochemie*. München [u.a.]: Urban und Fischer; 2000.
77. ThermoFisher. Freezing Cells [Available from: <https://www.thermofisher.com/de/de/home/references/gibco-cell-culture-basics/cell-culture-protocols/freezing-cells.html>].

78. Edition ELHt. Cell Culture Protocol 2: Thawing of Frozen Cell Lines: Sigma Aldrich GmbH; 2020 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/protocols/biology/resuscitation-of-frozen.html>].
79. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *methods*. 2001;25(4):402-8.
80. NCBI. 4-Hydroxytamoxifen [PubChem Database]. Available from: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/449459>.
81. SigmaAldrich. Cell Proliferation Reagent WST-1: Sigma Aldrich GmbH; 2020 [Available from: <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/roche/cellproro?lang=de®ion=DE>].
82. Rice G. Fluorescent Microscopy: Microbial Life Educational Resources; 2019 [updated 16.01.19]. Available from: https://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluomic.html.
83. PhosphoSite cbCST. G-protein coupled estrogen receptor 1 2019 [Available from: <https://www.phosphosite.org/proteinAction?id=2321300&showAllSites=true>].
84. Xu S, Yu S, Dong D, Lee LTO. G Protein-Coupled Estrogen Receptor: A Potential Therapeutic Target in Cancer. *Frontiers in Endocrinology*. 2019;10(725).
85. Stemmler M. Die Funktion der Cadherine bei der Musterbildung des Säugetierembryos Max-Planck-Institut für Immunbiologie und Epigenetik, Freiburg2008 [Available from: <https://www.mpg.de/321793/forschungsSchwerpunkt>].
86. Qian H, Xuan J, Liu Y, Shi G. Function of G-protein-coupled estrogen receptor-1 in reproductive system tumors. *Journal of immunology research*. 2016;2016.
87. Bioscience T. G-1 [Available from: https://www.tocris.com/products/g-1_3577].
88. Hsu L-H, Chu N-M, Lin Y-F, Kao S-H. G-Protein Coupled Estrogen Receptor in Breast Cancer. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(2):306.
89. Koga Y, Tsurumaki H, Aoki-Saito H, Sato M, Yatomi M, Takehara K, et al. Roles of Cyclic AMP Response Element Binding Activation in the ERK1/2 and p38 MAPK Signalling Pathway in Central Nervous System, Cardiovascular System, Osteoclast Differentiation and Mucin and Cytokine Production. *International journal of molecular sciences*. 2019;20(6):1346.
90. Ince TA, Sousa AD, Jones MA, Harrell JC, Agoston ES, Krohn M, et al. Characterization of twenty-five ovarian tumour cell lines that phenocopy primary tumours. *Nature Communications*. 2015;6(1):7419.
91. Peterson VM, Castro CM, Chung J, Miller NC, Ullal AV, Castano MD, et al. Ascites analysis by a microfluidic chip allows tumor-cell profiling. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2013;110(51):E4978-E86.
92. Klijn C, Durinck S, Stawiski EW, Haverty PM, Jiang Z, Liu H, et al. A comprehensive transcriptional portrait of human cancer cell lines. *Nature biotechnology*. 2015;33(3):306.
93. Kharbanda A, Rajabi H, Jin C, Raina D, Kufe D. Oncogenic MUC1-C promotes tamoxifen resistance in human breast cancer. *Molecular Cancer Research*. 2013;11(7):714-23.
94. Zheng J-T, Lin C-X, Fang Z-Y, Li H-D. Intron retention as a mode for RNA-seq data analysis. *Frontiers in Genetics*. 2020;11:586.
95. Han N, Heublein S, Jeschke U, Kuhn C, Hester A, Czogalla B, et al. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER) Regulates Trimethylation of Histone H3 at Lysine 4 and Represses Migration and Proliferation of Ovarian Cancer Cells In Vitro. *Cells*. 2021;10(3):619.
96. Liu H, Yan Y, Wen H, Jiang X, Cao X, Zhang G, et al. A novel estrogen receptor GPER mediates proliferation induced by 17 β -estradiol and selective GPER agonist G-1 in estrogen receptor α (ER α)-negative ovarian cancer cells. *Cell Biology International*. 2014;38(5):631-8.
97. Schüler-Toprak S, Skrzypczak M, Ignatov T, Ignatov A, Ortmann O, Treeck O. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER-1) and agonist G-1 inhibit growth of ovarian cancer cells by activation of anti-

tumoral transcriptome responses: impact of GPER-1 mRNA on survival. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 2020;146(12):3175-88.

98. Heublein S, Mayr D, Friese K, Jarrin-Franco MC, Lenhard M, Mayerhofer A, et al. The G-Protein-Coupled Estrogen Receptor (GPER/GPR30) in Ovarian Granulosa Cell Tumors. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014;15(9):15161-72.

99. Heublein S, Lenhard M, Vrekoussis T, Schoepfer J, Kuhn C, Friese K, et al. The G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in normal human ovaries and is upregulated in ovarian endometriosis and pelvic inflammatory disease involving the ovary. *Reproductive Sciences*. 2012;19(11):1197-204.

100. Smith HO, Arias-Pulido H, Kuo DY, Howard T, Qualls CR, Lee S-J, et al. GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecologic oncology*. 2009;114(3):465-71.

101. Ignatov T, Modl S, Thulig M, Weißenborn C, Treeck O, Ortmann O, et al. GPER-1 acts as a tumor suppressor in ovarian cancer. *Journal of Ovarian Research*. 2013;6(1):51.

102. Friese K, Kost B, Vattai A, Marmé F, Kuhn C, Mahner S, et al. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER/GPR30) may serve as a prognostic marker in early-stage cervical cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2018;144(1):13-9.

103. Samartzis EP, Noske A, Meisel A, Varga Z, Fink D, Imesch P. The G protein-coupled estrogen receptor (GPER) is expressed in two different subcellular localizations reflecting distinct tumor properties in breast cancer. *PloS one*. 2014;9(1):e83296.

104. Irannejad R, von Zastrow M. GPCR signaling along the endocytic pathway. *Curr Opin Cell Biol*. 2014;27:109-16.

105. Revankar CM, Mitchell HD, Field AS, Burai R, Corona C, Ramesh C, et al. Synthetic estrogen derivatives demonstrate the functionality of intracellular GPR30. *ACS Chemical Biology*. 2007;2(8):536-44.

106. Roque C, Baltazar G. G protein-coupled estrogen receptor 1 (GPER) activation triggers different signaling pathways on neurons and astrocytes. *Neural Regen Res*. 2019;14(12):2069-70.

107. Guan B-Z, Yan R-L, Huang J-W, Li F-L, Zhong Y-X, Chen Y, et al. Activation of G protein coupled estrogen receptor (GPER) promotes the migration of renal cell carcinoma via the PI3K/AKT/MMP-9 signals. *Cell Adh Migr*. 2018;12(2):109-17.

108. Wei W, Chen ZJ, Zhang KS, Yang XL, Wu YM, Chen XH, et al. The activation of G protein-coupled receptor 30 (GPR30) inhibits proliferation of estrogen receptor-negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Cell Death & Disease*. 2014;5(10):e1428-e.

109. Hernández-Silva CD, Villegas-Pineda JC, Pereira-Suárez AL. Expression and role of the G protein-coupled estrogen receptor (GPR30/GPER) in the development and immune response in female reproductive cancers. *Frontiers in Endocrinology*. 2020;11.

110. Gottschalk N, Kimmig R, Lang S, Singh M, Brandau S. Anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibodies overcome resistance of ovarian cancer cells to targeted therapy and natural cytotoxicity. *International journal of molecular sciences*. 2012;13(9):12000-16.

111. Genemedi. Pre-made Gatipotuzumab benchmark antibody (Whole mAb, anti-MUC1 therapeutic antibody) for drug discovery and mechanism of action (MOA) research 2019 [Available from: <https://www.genemedi.net/i/biologics-biosimilar-GMP-Bios-ab-236>].

112. Vivacqua A, Bonofiglio D, Recchia AG, Musti AM, Picard D, Andò S, et al. The G protein-coupled receptor GPR30 mediates the proliferative effects induced by 17 β -estradiol and hydroxytamoxifen in endometrial cancer cells. *Molecular endocrinology*. 2006;20(3):631-46.

113. Engel BJ, Bowser JL, Broaddus RR, Carson DD. MUC1 stimulates EGFR expression and function in endometrial cancer. *Oncotarget*. 2016;7(22):32796.

114. Vivacqua A, Lappano R, De Marco P, Sisci D, Aquila S, De Amicis F, et al. G Protein-Coupled Receptor 30 Expression Is Up-Regulated by EGF and TGF α in Estrogen Receptor α -Positive Cancer Cells. *Molecular Endocrinology*. 2009;23(11):1815-26.
115. Zhang Q, Wu YZ, Zhang YM, Ji XH, Hao Q. Activation of G-protein coupled estrogen receptor inhibits the proliferation of cervical cancer cells via sustained activation of ERK1/2. *Cell biochemistry and function*. 2015;33(3):134-42.
116. Chandra V, Fatima I, Saxena R, Hussain M, Hajela K, Sankhwar P, et al. Anti-tumorigenic action of 2-[piperidinoethoxyphenyl]-3-[4-hydroxyphenyl]-2H-benzo (b) pyran: Evidence for involvement of GPR30/EGFR signaling pathway. *Gynecologic oncology*. 2013;129(2):433-42.

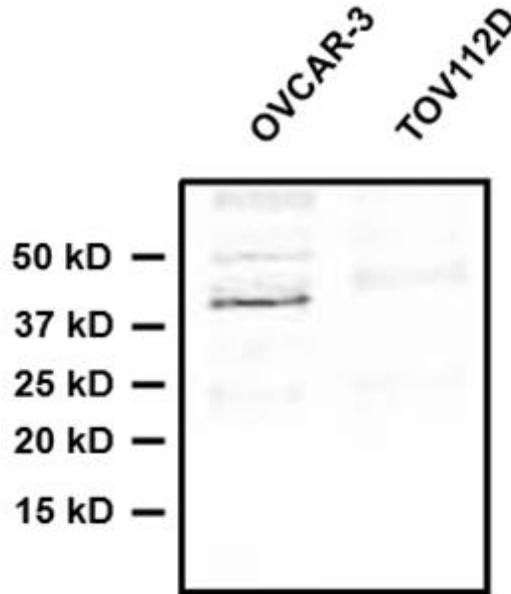
9. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Ultraschallbefund eines Ovarialkarzinoms Hier wird ein unregelmäßig begrenzter, inhomogener Tumor mit liquiden Anteilen dargestellt (8).....	9
Abbildung 2: Die „PDTRP“ enthaltende Tandem Repeat Sequenz von MUC1 (52).....	17
Abbildung 3: Unterschiede in der Struktur und Polarität zwischen normalem und tumorassoziiertem MUC1 (55).....	18
Abbildung 4: Schematische Darstellung der Avidin-Biotin-Methode (ABC-Methode) mit Primärantikörper, biotinyliertem Brückenantikörper und ABC-Komplex (58).	30
Abbildung 5: Die Spaltung des WST-1 Tetrazoliumsalses zum dunkelroten Formazan (84)	44
Abbildung 6: Nachweis von GPER in Ovarialkarzinomzellen mittels Immunzytochemie	48
Abbildung 7: Relative Quantifizierung der GPER Positivität	49
Abbildung 8: Nachweis von GPER mittels quantitativer PCR und Western Blot	50
Abbildung 9: Doppelfärbung von GPER und E-Cadherin	51
Abbildung 10: Gesamtüberleben von Patientinnen mit einem HGSOc Subtyp des Ovarialkarzinoms, abhängig von der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe	54
Abbildung 11: Subzelluläre Lokalisation von GPER im Ovarialkarzinomgewebe.....	55
Abbildung 12: Stimulation von GPER durch G1 und 4-OHT in OVCAR-3 Zellen.....	56
Abbildung 13: Behandlung von OVCAR-3 Zellen mit G1 und 4-OHT, und Untersuchung des MAPK-Signalwegs.....	57
Abbildung 14: Nachweis von TA-MUC1 in Ovarialkarzinomzellen mittels Immunzytochemie	58
Abbildung 15: Doppelfärbung von TA-MUC1 und GPER in vier Ovarialkarzinom Zelllinien (77)	59
Abbildung 16: Die Spezifität der Doppelimmunfluoreszenzmethode wurde mit Kreuz- und Negativkontrollen bestätigt.....	60
Abbildung 17: Die Wirkung von Gatipotuzumab, 4-Hydroxy-Tamoxifen (4-OHT) und die Kombination von Beiden auf die Zellviabilität der Ovarialkarzinom Zelllinien COV318, OV-90, OVCAR-3 und SKOV-3.....	61

10. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Blockierungsserum für die Immunzytochemie	31
Tabelle 2: Primärantikörper für die Immunzytochemie	31
Tabelle 3: Sekundärantikörper für die Immunzytochemie	32
Tabelle 4: Komponenten des 2xRT Mastermixes.....	37
Tabelle 5: Mastermix für die TaqMan®-PCR.....	38
Tabelle 6: Primärantikörper für den Western Blot nach Stimulation von GPER	43
Tabelle 7: Konzentration der Primärantikörper im Dako Verdünnungsmedium.....	45
Tabelle 8: Konzentration der Sekundärantikörper im Dako Verdünnungsmedium	46
Tabelle 9: Tabellarische Darstellung der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe verschiedener Subtypen des Ovarialkarzinoms.....	53
Ergänzende Tabelle 1: Korrelation von FIGO Stadium und pTNM Klassifikation mit der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe.	84

11. Ergänzende Abbildungen und Tabellen



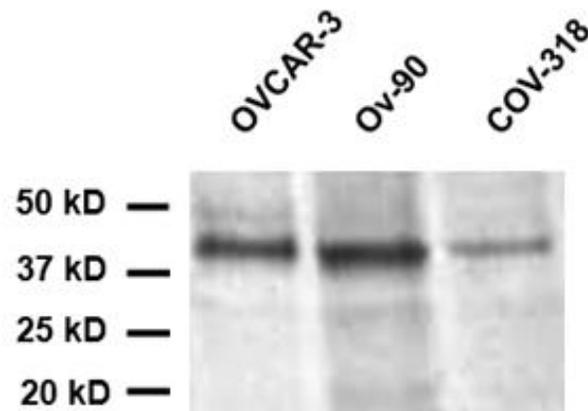
Ergänzende Abbildung 1: Nachweis von GPER mittels Western Blot

Wie im Western Blot abgebildet, wurde GPER bei 42 kD in OVCAR-3 Zellen nachgewiesen. In den TOV112D Zellen konnte GPER jedoch nicht nachgewiesen werden, was die Ergebnisse der immunzytochemischen Untersuchung in Kapitel 4.1.1. bestätigte.

Fälle mit verfügbaren Daten	Charakteristika	Kategorie	Membran (n)	Zytoplasma (n)	Membran und Zytoplasma (n)	P
75	FIGO	FIGO I/II	1	3	3	n.s.
		FIGO III/IV	4	38	26	
75	pT	pT 1/2	2	6	3	n.s.
		pT 3/4	3	35	26	
75	pN	N0/X	4	25	18	n.s.
		N1	1	16	11	
75	pM	M0/X	5	39	28	n.s.
		M1	0	2	1	

Ergänzende Tabelle 10: Korrelation von FIGO Stadium und pTNM Klassifikation mit der subzellulären Lokalisation von GPER im Tumorgewebe.

Es wurde keine signifikante Korrelation von FIGO Stadium und pTNM Klassifikation zur subzellulären Lokalisation des GPERs im Tumorgewebe festgestellt.



Ergänzende Abbildung 2: Nachweis von GPER in OVCAR-3, Ov-90 und COV-318 mittels Western Blot.

Wie im Western Blot abgebildet, wurde GPER bei 42 kD in OVCAR-3, Ov-90 und COV-318 Zellen nachgewiesen.

12. Veröffentlichungen und Kongressbeitrag

Veröffentlichungen:

1. Sabine Heublein, Sabina Page, Doris Mayr, Elisa Schmoeckel, Fabian Trillsch, Frederik Marmé, Sven Mahner, Udo Jeschke, Aurelia Vattai: *Potential Interplay of the Gaipotuzumab Epitope TA-MUC1 and Estrogen Receptors in Ovarian Cancer*, International Journal of Molecular Sciences. 2019; 20(2): 295.

2. Sabine Heublein, Sabina K. Page, Doris Mayr, Nina Ditsch, Udo Jeschke: *p53 determines prognostic significance of the carbohydrate stem cell marker TF1 (CD 176) in ovarian cancer*, Journal of Cancer Research and Clinical Oncology, 2016;142(6):1163-1170.

Posterpräsentation:

Juli 2015: Poster-Präsentation in der Gemeinsamen Tagung BGGF und OEGGG, Klinikum rechts der Isar, München:

„Potentielle prognostische Relevanz des Kohlenhydrat-Tumorstammzell-Antigens TF1 (CD176) in Ovarialkarzinomen“

14. Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. Mahner möchte ich mich sehr herzlich dafür bedanken, dass ich meine wissenschaftliche Arbeit an seiner Klinik durchführen durfte.

Einen besonderen Dank möchte ich Herrn Prof. Dr. Jeschke ausdrücken, der mich über die gesamte Dauer meine Forschungsarbeit mit seinem umfangreichen fachlichen Wissen betreut und unterstützt hat. Bei Fragen stand er jederzeit bereitwillig zur Verfügung, was ich immer sehr geschätzt habe und mich zudem stets motiviert hat.

Meiner Betreuerin Frau Dr. Dr. Heublein möchte ich ganz herzlich für ihre hervorragende Supervision und wissenschaftliche Unterstützung über meiner gesamten Dissertation danken. Die Zusammenarbeit mit ihr war stets sehr angenehm. Dank ihres Engagements und ihrer Hilfsbereitschaft konnte ich nicht nur meine Fragen klären, sondern bei jeder Diskussion mein fachliches Wissen erweitern.

Bedanken möchte ich mich ebenfalls bei Frau Christina Kuhn, Frau Simone Hofmann, Frau Sandra Schulze und Frau Irmgard Wiest für ihre fachliche Unterstützung, der wunderbaren Atmosphäre und der exzellenten Zusammenarbeit, sowie bei den Doktoranden der Arbeitsgruppe für die kollegiale Zusammenarbeit im Labor.

Bei meinen Eltern und meiner Schwester möchte ich mich vielmals bedanken für ihre bedingungslose Unterstützung über all diese Jahre. Ohne sie hätte ich es nicht so weit geschafft.

Ein liebevolles Dankeschön möchte ich insbesondere an meinen Lebenspartner ausdrücken, der immer für mich da war und mich unzählige Male mit viel Geduld und Liebe unterstützt hat.

15. Eidesstattliche Versicherung

Page, Sabina Katharina

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

Mögliche Interaktion des G-Protein-gekoppelten Östrogenrezeptors mit dem Tumor-spezifischen
MUC1 Epitop TA-MUC1 im Ovarialkarzinom

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.

München, den 27.05.2023

Sabina Page
.....

Sabina Katharina Page