

---

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

**Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung des Rezeptors TAAR1  
und zum Proliferationsverhalten von TAAR1 Liganden in  
Mammakarzinomen *in vitro***

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

vorgelegt von  
Elif Rödel, geb. Akyol  
aus  
Braunschweig

Jahr  
2024

---

Mit Genehmigung der Medizinischen  
Fakultät der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Udo Jeschke

Mitberichterstatter: PD Dr. Dr. Ulrich Andergassen  
Prof. Dr. Christine Sers

Mitbetreuung durch die  
promovierte Mitarbeiterin: Prof. Dr. Nina Ditsch

Dekan: Prof. Dr. med. Thomas Gudermann

Tag der mündlichen Prüfung: 25.07.2024

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis.....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VI</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Mammakarzinom .....	1
1.1.1 Epidemiologie .....	1
1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren .....	1
1.1.3 Stadieneinteilung.....	1
1.1.4 Pathologie.....	2
1.1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren .....	2
1.1.6 Therapie des Mammakarzinoms .....	3
1.2 Epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptoren.....	3
1.3 Mechanismen der Signaltransduktion .....	5
1.3.1 G – Protein – gekoppelte Rezeptoren.....	5
1.4 TAA -Rezeptoren (Trace amine-associated receptors) .....	7
1.4.1 Expression und Verteilung des TAAR1 im Menschen .....	8
1.4.2 Bedeutung des TAAR1 im ZNS und an neurophysiologischen Vorgängen ...	9
1.4.3 Bedeutung des TAAR1 im peripheren System .....	9
1.4.4 Expression und Funktion des TAAR1 in Krebszellen .....	10
1.5 Biologisch aktive Amine (engl. trace amines) .....	11
1.6 Rolle von Schilddrüsendysfunktion bei Mammakarzinomen .....	14
<b>2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit.....</b>	<b>17</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1 Materialien .....	18
3.2 Patientenkollektiv.....	23
3.3 Immunhistochemie.....	24
3.3.1 Gewebevorbereitung .....	24

---

3.3.2	Immunhistochemische Färbung .....	24
3.3.3	Färbeprotokoll für TAAR 1.....	26
3.4	Western Blot .....	29
3.4.1	Zellkultivierung.....	29
3.4.2	Zellstimulierung .....	29
3.4.3	Herstellung von Zelllysaten .....	30
3.4.4	Proteinbestimmung/Proteinassay nach Bradford .....	30
3.4.5	Western Blot Methode .....	31
3.4.6	TAAR 1- Detektion der Blot-Membran .....	32
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>34</b>
4.1	Ergebnisse der Immunhistochemie .....	34
4.1.1	TAAR1-Expression und Differenzierungsgrad der Tumore .....	39
4.1.2	TAAR1 – Expression und TumorgroÙe .....	39
4.1.3	TAAR1 – Expression und Lymphknotenstatus.....	40
4.1.4	TAAR1 – Expression und histologischer Subtyp.....	41
4.1.5	Korrelation TAAR1 – Expression mit Vorliegen von HER2 – und HER4- Rezeptoren.....	42
4.1.6	Korrelation der TAAR1 – Expression mit der 10 – Jahres-Überlebensrate und dem Gesamtüberleben.....	45
4.1.7	Korrelationsanalyse.....	49
4.2	Ergebnisse der Proliferationsversuche mit TAAR1-Agonisten auf Proteinebene anhand der Zelllinien MCF7 und HCC3153 .....	50
4.2.1	Zelllinie .....	50
4.2.2	Stimulation mit Tetrac (= 3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid= Tetraiodothyroessigsäure).....	50
4.2.3	Stimulation mit Tyramin .....	52
4.2.4	Stimulation mit T3 (= 3, 3', 5 – Triiodo- L – thyronine) sowie Stimulation mit T3 + Tetrac .....	55
<b>5</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>57</b>
5.1	Expressionsverhalten des TAAR1 in Mammakarzinomen .....	58
5.2	Korrelation der TAAR1-Expression mit dem HER4- und HER2 -Status.....	61
5.3	Untersuchungen zur TAAR1- Expression an den Zelllinien MCF7 und HCC3153 nach Liganden-Stimulation.....	63

---

<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>68</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>70</b>
<b>8</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>82</b>
<b>9</b>	<b>Veröffentlichungen</b> .....	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Eidesstaatliche Versicherung</b> .....	<b>84</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AADC	Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
BET	Brusterhaltende Therapie
cAMP	Cyclic adenosine monophosphate = Cyclisches Adenosinmonophosphat
CREB	cAMP response element-binding protein
DAG	Diacylglycerin
DDC	DOPA-Decarboxylase
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor
ER	Östrogenrezeptor
FCS = FKS	Fetales Kälberserum
GPCR	G-Protein-gekoppelte Rezeptoren
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HER4	Human epidermal growth factor receptor 4
IP3	Inositol -1,4,5 – Triphosphat
MAO-A	Monoaminoxidase A
MAO-B	Monoaminoxidase B
MDMA	4-Methylendioxy-N-methylamphetamin
NFAT	nuclear factor of activated T-cells
NK – Zelle	Natürliche Killerzelle
PEA	$\beta$ -Phenylethylamin = Phenethylamin
PHA	Phytohemagglutinin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3-Kinase)

---

PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PR	Progesteronrezeptor
PVDF	Polyvinylidene Fluoride
SLNB	Sentinellymphknoten-Entfernung
SPP1	Osteopontin
T1AM	3-Iodothyronamin
TAAR1	Trace amine-associated receptor 1
Tetrac	Tetraiodothyroessigsäure
TRAK	Thyreotropin-Rezeptor-Autoantikörper

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden.....	4
Abbildung 2: Enzymatischer Syntheseweg der „trace amines“ .....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung des ABC – Komplexes .....	25
Abbildung 4: Ermittlung des IRS - Score nach Remmele und Stegner .....	28
Abbildung 5: Mammakarzinom mit schwacher TAAR1- Expression im Zellkern .....	37
Abbildung 6: Mammakarzinom mit mäßiger TAAR1- Expression im Zytoplasma.....	38
Abbildung 7: Mammakarzinom mit starker TAAR1-Expression im Zytoplasma .....	38
Abbildung 8: Mammakarzinom mit mäßiger TAAR1-Expression im Zellkern .....	38
Abbildung 9: Boxplot: TAAR1 – Expression und Tumorgrading. ....	39
Abbildung 10: Boxplot: TAAR1 – Expression und die TumorgroÙe. ....	40
Abbildung 11: Boxplot: TAAR1-Expression und Lymphknotenmetastasen. ....	41
Abbildung 12: Boxplot: TAAR 1 - Expression in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp. ...	42
Abbildung 13: Boxplot: Die zytoplasmatische Expression von TAAR1 (IRS-Score) bei HER2- positiven und negativen Mammakarzinomen. ....	43
Abbildung 14: Boxplot: Übersicht über die Verteilung der HER4 - Expression und der zytoplasmatischen TAAR1 - Expression (IRS) .....	44
Abbildung 15: Boxplot: TAAR1 - Expression (IRS-Score) im Zytoplasma in HER4 - positiven Tumoren.....	44
Abbildung 16: Boxplot: Nukleare TAAR1 – Expression in Abhängigkeit vom HER4-Status ...	45
Abbildung 17: Darstellung der 10-Jahres-Überlebenskurve beider Gruppen. ....	46
Abbildung 18: Boxplot: TAAR1 und die mittlere Überlebensdauer. ....	47
Abbildung 19: Korrelation der TAAR1 – Expression mit dem Gesamtüberleben: .....	48
Abbildung 20: Boxplot: TAAR1 – Expression und die Überlebensdauer. ....	49
Abbildung 21: WB HCC3153 – Zellen nach Stimulation mit 0,1 µM Tetrac über 48 Stunden. .	51
Abbildung 22: TAAR1-Expression in HCC3153-Zelllysaten nach Stimulierung mit 0,1 µM Tetrac. ....	51
Abbildung 23: Western Blot der TAAR1 Expression in MCF7- und HCC3153-Zellen .....	52
Abbildung 24: HCC3153-Zellen nach Stimulation mit Tyramin.....	53
Abbildung 25: TAAR1-Expression in HCC3153-Zellen nach Stimulation mit 0,01 nM.....	53



---

Abbildung 26: Proteinexpression in HCC-3153 Zellen nach Stimulation mit 0,1 nM Tyramin über 48 Stunden. ....	54
Abbildung 27: TAAR1 – Expression in MCF7 -Zellen nach Stimulation mit 0,01 nM Tyramin sowie 0,1 nM Tyramin über 48 Stunden. ....	54
Abbildung 28: TAAR1 Proteinexpression in MCF7 – Zellen (a) und in HCC3153-Zellen (b) nach Stimulation mit 0,01 nM T3 und 0,1 nM T3. ....	55
Abbildung 29: TAAR Expression in MCF 7 (a) und HCC 3153 -Zellen (b) nach Stimulation mit T3 + Tetrac. ....	56

---

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Merkmale des Patientenkollektivs .....	36
Tabelle 2: TAAR 1 - Expression im Zytoplasma.....	36
Tabelle 3: TAAR 1 - Expression im Zellkern.....	36
Tabelle 4: Verteilung des IRS-Scores im Zytoplasma.....	37
Tabelle 5: Verteilung IRS-Score größer gleich 6.....	37
Tabelle 6: TAAR1 – Expression in Abhängigkeit von der TumorgroÙe .....	40

# 1 Einleitung

## 1.1 Mammakarzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Mit etwa 30,5 % aller Krebserkrankungen bei Frauen stellt das Mammakarzinom in den Industriestaaten die häufigste Krebserkrankung der Frau dar (Deutsche Krebsgesellschaft 2018, Lampert et al., 2015). Jährlich werden etwa 69 000 Neuerkrankungen diagnostiziert. Im Jahr 2016 starben 18.570 Frauen an Brustkrebs (Robert Koch Institut 2017). Trotz steigender Anzahl an Neuerkrankungen ist die Letalität seit den 90er Jahren durch Früherkennungsmaßnahmen wie das Mammographie-Screening sowie Fortschritte in der Therapie gesunken (Lampert et al., 2015).

### 1.1.2 Ätiologie und Risikofaktoren

Auch wenn die genaue Ätiologie des Mammakarzinoms unbekannt ist, konnten bereits eine Reihe von Risikofaktoren, welche die Entstehung von Brustkrebs beeinflussen, identifiziert werden. Insbesondere Hormone können das Erkrankungsrisiko begünstigen (Kiechle, 2011). Neben einer frühen Menarche und einem späten Eintritt des Klimakteriums, erhöhen Bewegungsmangel, eine Hormonersatztherapie in der Peri- und Postmenopause, Alkoholkonsum, Nullipara sowie Adipositas das Krebsrisiko (Bauerfeind et al., 2021; Stauber et al., 2005). Die langjährige Einnahme von Ovulationshemmern erhöht hingegen das Risiko nur geringfügig (Robert Koch Institut 2017). Über 90 % der Mammakarzinome treten sporadisch auf. Eine genetische Prädisposition spielt eine wesentliche Rolle bei der Erkrankungswahrscheinlichkeit. In etwa 5 - 10 % der Fälle ist die Erkrankung genetisch bedingt (Eeles, 2000). Anfang der 90er Jahre konnten die Tumorsuppressorgene BRCA1 und BRCA2 isoliert werden, welche an DNA – Reparaturmechanismen beteiligt sind (Miki et al., 1994; Wooster et al., 1995). Mutationen dieser Gene gehen mit einem deutlich erhöhten Erkrankungsrisiko einher (Antoniou et al., 2003; Heublein et al., 2015). Die hereditären Karzinome sind im Vergleich zu den sporadischen Fällen oft durch ein früheres Krankheitsalter der Patientinnen gekennzeichnet. Zudem sind diese häufiger mit anderen Tumorerkrankungen assoziiert, neigen häufiger zu bilateralem Befall und sind meist durch bestimmte histologische Subtypen gekennzeichnet (Bauerfeind et al., 2021; Kiechle, 2011).

### 1.1.3 Stadieneinteilung

**TNM – Klassifikation:** Die Stadieneinteilung umfasst die Tumorgröße (T), den Lymphknotenbefall (N) sowie das Vorliegen einer Fernmetastasierung (M). Die TNM - Klassifikationsangaben werden zusammengefasst in der aktuellen **UICC/AJCC-Klassifikation** (Brierley & Gospodarowicz, 2016).

## 1.1.4 Pathologie

**1.1.4.1 Histologische Einteilung:** In den meisten Fällen liegt ein Adenokarzinom vor, welches von den Milchdrüsengängen ausgeht und keine spezifischen Merkmale aufweist. Dieses wird nach der neuen Nomenklatur als nicht-spezifischer Typ (NST), früher invasiv-duktales Karzinom nicht anders spezifiziert (NOS), bezeichnet. Diese umfasst eine heterogene Gruppe von Karzinomen, welche Merkmale aufweisen können, die nicht eine Einteilung in die spezifischen Subtypen erlauben. In etwa 5- 15 % liegt ein invasiv lobuläres Karzinom vor, welches von den Drüsenläppchen ausgeht. Nach der WHO – Klassifikation gibt es noch eine Reihe weiterer Subtypen, welche seltener vorkommen, und spezifische Merkmale aufweisen (z.B. medullär, muzinös, papillär, tubulär, inflammatorisch, neuroendokrin) (Bauerfeind, 2013; Böcker, 2002; Sinn & Kreipe, 2013).

**1.1.4.2 Malignitätsgrad bzw. Grading:** Invasive Karzinome werden nach Elston und Ellis nach ihren strukturellen und zellulären Eigenschaften in drei Differenzierungsgrade eingeteilt. Hierbei werden die Mitoserate, die tubuläre Formation sowie die Kernpolymorphie beurteilt. Nach ermitteltem Score erfolgt die Einteilung in drei Differenzierungsgrade (G1 - G3). Eine höhere Differenzierung geht meistens mit einer schlechteren Prognose einher (Elston & Ellis, 1991).

**1.1.4.3** Weitere immunhistochemische Parameter wie der Hormonrezeptor – und der HER2 – Status sowie der Proliferationsmarker K67 werden bei der Einteilung in die **molekularen bzw. intrinsische Subtypen** berücksichtigt, die sich im klinischen Verlauf und Therapieansprechen unterscheiden und daher entscheidend für die Prognoseabschätzung beim ausgewählten Therapiekonzept sind (Coates et al., 2015).

## 1.1.5 Prognostische und prädiktive Faktoren

Für eine individualisierte Therapieplanung und Prognoseabschätzung sind sowohl die prädiktiven als auch die prognostischen Faktoren entscheidend (Ditsch et al., 2021; Harbeck et al., 2002). Prognostische Parameter wie die Tumorgröße, der axilläre Lymphknotenbefall, das Alter der Patientin, der histologische Typ, das Grading, der Resektionsstatus, der Hormonrezeptorstatus, der HER2- Status und die peritumorale Gefäßinvasion geben eine Auskunft über die Korrelation mit dem Gesamtüberleben und dem Krankheitsverlauf (Balic et al., 2019; Coates et al., 2015; Febbo et al., 2011; Harbeck et al., 2002; Wöckel, 2018). Prädiktive Faktoren hingegen sind die Parameter, die das Therapieansprechen beeinflussen und bei der Therapieerstellung berücksichtigt werden (Febbo et al., 2011; Harbeck et al., 2002). Der Hormonrezeptorstatus (ER und PR) kann sowohl als prognostischer als auch als prädiktiver Faktor gewertet werden, wobei die Bedeutung als prädiktiver Faktor für das Ansprechen einer endokrinen Therapie größer ist (Harbeck et al., 2002). Ein positiver Rezeptorstatus deutet insbesondere zu Beginn einer Erkrankung auf eine bessere Prognose hin. Für die Beurteilung der Gesamtüberlebenszeit ist er jedoch weniger geeignet. Als prädiktiver Parameter bestimmt der Hormonrezeptorstatus jedoch das Ansprechen auf eine endokrine Therapie (Harbeck et al., 2002). Eine hohe

Rezeptorexpression geht mit einem erhöhten Therapieansprechen einher. Auch der HER2/neu-Status wird als prognostischer und prädiktiver Parameter eingesetzt (Harbeck et al., 2002). Weitere prognostische und prädiktive Faktoren werden evaluiert, um eine bessere Einteilung der Patienten in eine Hoch- und Niedrigrisiko- Gruppe zu gewährleisten und somit die individuelle Therapieplanung zu erleichtern (Ditsch et al., 2021; Harbeck et al., 2002; Wöckel, 2018).

### **1.1.6 Therapie des Mammakarzinoms**

Die folgenden Therapieempfehlungen orientieren sich an der interdisziplinären S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Wöckel, 2018) sowie den St. Gallen-Empfehlungen (Balic et al., 2019; Coates et al., 2015). Sofern möglich, ist die Basis aller nicht fortgeschrittenen Mammakarzinome eine Tumorexstirpation in sano (R0-Status). Hierbei sollte, wenn möglich, die brusterhaltende Therapie (BET) mit postoperativer Radiatio einer radikalen Mastektomie vorgezogen werden, da erstere bezüglich des Überlebens letzterer gleichgestellt ist. Bei invasiven Karzinomen ist das intraoperative axilläre Staging Bestandteil des operativen Vorgehens. Dieses erfolgt mit Hilfe der Sentinellymphknotenentfernung (SLNB). Bei der Erstellung des adjuvanten Therapiekonzeptes sollten folgende Parameter berücksichtigt werden: Tumorgöße, Grading, Hormonrezeptorstatus, HER2-Status, Lymphknotenstatus, Menopausenstatus und Alter. Im Hinblick auf eine Indikationsstellung zur Systemtherapie spielen die molekularen Subtypen eine entscheidende Rolle. Diese unterscheiden sich durch immunhistochemische Eigenschaften. Die Einteilung berücksichtigt den Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus, den HER2- Status sowie die Beurteilung der Ki67-Proliferationsrate. Die Subtypen sind Luminal A (Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ, Ki67-Proliferationsrate niedrig), Luminal B HER2-negativ (Hormonrezeptor-positiv, HER2-negativ, Ki67-Proliferationsrate hoch), Luminal B HER2-positiv (Hormonrezeptor-positiv, HER2-positiv, Ki67-Proliferationsrate hoch oder niedrig), HER2-positiv (Hormonrezeptor-negativ, HER2-positiv, Ki67-Proliferationsrate hoch oder niedrig) und triple-negativ (Hormonrezeptor-negativ, HER2-negativ, Ki67-Proliferationsrate hoch oder niedrig). Während bei den Luminal -A Tumoren eine endokrine Therapie ausreichend sein kann, wird bei Vorliegen der anderen Subtypen meist eine systemische Chemotherapie empfohlen. Weitere Indikationen für eine adjuvante Chemotherapie, unabhängig vom molekularen Subtyp, sind ein junges Erkrankungsalter (< 35 Jahren), ein positiver Lymphknotenstatus und ein hoher Differenzierungsgrad des Tumors (G3), da diese Eigenschaften mit einem hohen Rezidivrisiko einhergehen. Bei einem positiven HER2-Status wird eine Kombination der Chemotherapie mit einer Anti- HER2 -Therapie empfohlen.

## **1.2 Epidermale Wachstumsfaktor- Rezeptoren**

Zielrezeptoren der epidermalen Wachstumsfaktoren sind transmembranöse Glykoproteine, die als Wachstumsfaktor- Rezeptoren bezeichnet werden (Koutras & Evans, 2008). Die Familie umfasst die Rezeptoren EGFR1/HER1 (ErbB-1), HER2/neu (ErbB-2), HER3 (ErbB-3) und HER4 (ErbB-4) (Koutras et al., 2010). Abbildung 1 demonstriert die Rezeptoren und ihre unterschiedlichen Liganden. Der HER2- Rezeptor bindet im Vergleich zu den anderen Rezeptoren keinen spezifischen Liganden (Karamouzis et al., 2007). Trotz ihrer unterschiedlichen Ligandenspezifität

weisen die Rezeptoren Gemeinsamkeiten in der allgemeinen Struktur auf. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Komponente sowie der intrazellulären Komponente mit intrinsischer Tyrosinkinase – Aktivität (Böcker, 2002). Die Bindung eines Liganden an den Rezeptor führt zu einer strukturellen Veränderung mit Übergang in die aktive Form. Es kommt zu einer homogenen oder heterogenen Dimerbildung, welche in Folge die Autophosphorylierung einleitet. Daraufhin kommt es zur Aktivierung der Tyrosinkinase. Die Signalkaskade ins Zellinnere wird eingeleitet und die Zellproliferation herbeigeführt (Koutras et al., 2010; Koutras & Evans, 2008). Die Rezeptoren und ihre Liganden spielen bei der Krebsentstehung eine wesentliche Rolle, da oft eine Mutation der kodierenden Gene vorliegt, welche eine Hochregulation der Rezeptoren herbeiführt (Dawood et al., 2008; Slamon et al., 1987). Die Rezeptoren sind daher Angriffspunkte in der Krebstherapie. Insbesondere der HER2–Rezeptor ist zu einem relevanten Biomarker geworden und stellt einen wesentlichen Ansatzpunkt für die Immuntherapie in der Brustkrebstherapie dar (Mitri et al., 2012). Eine Überexpression des HER2–Rezeptors kann in 20 -30 % der Mammakarzinome nachgewiesen werden. Sie geht mit einer schlechteren Prognose einher, da sie mit einer höheren Rezidiv- und Sterberate verbunden ist (Dawood et al., 2008; Hudis, 2007; Meric-Bernstam & Hung, 2006; Mitri et al., 2012; Slamon et al., 1987; Slamon et al., 1989). Sie ist zudem oft assoziiert mit einem negativen Hormonrezeptorstatus, einem höheren Differenzierungsgrad und einem Lymphknotenbefall (Gusterson et al., 1992; Lebeau et al., 2003; Rilke et al., 1991). Trastuzumab als monoklonaler Antikörper in Kombination mit einer systemischen Chemotherapie ist der Standard in der Behandlung des Mammakarzinoms mit positivem HER2-Status. Eine Behandlung wird zu Beginn einer adjuvanten Chemotherapie für ein Jahr empfohlen (Mates et al., 2015). Im Jahre 2012 wurde durch die US- Amerikanische 'Food and Drug administration (FDA)' als weiterer Antikörper Pertuzumab in Kombination mit Trastuzumab zur Therapie des HER2-positiven Mammakarzinoms zugelassen. Pertuzumab inhibiert die Dimerbildung zwischen dem HER2 und HER3 – Rezeptor (Richard et al., 2016). In einer randomisierten Studie zeigten Minckwitz et al. (2017), dass eine Kombinationstherapie von Pertuzumab und Trastuzumab zusätzlich zur adjuvanten Chemotherapie die Rate des krankheitsfreien Intervalls erhöhte.

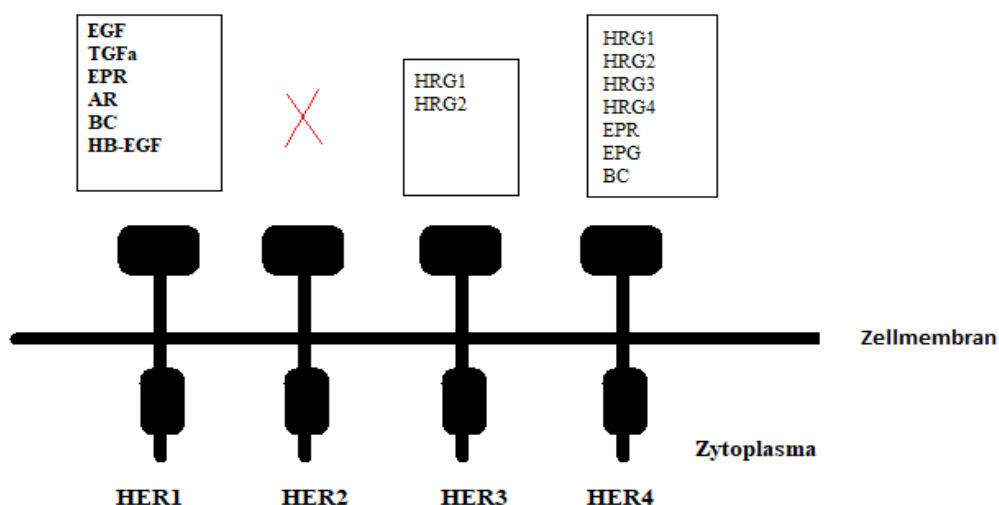


Abbildung 1: Die epidermalen Wachstumsfaktorrezeptoren und ihre Liganden

## 1.3 Mechanismen der Signaltransduktion

Zellen besitzen spezifische Rezeptoren, die durch Bindung von Hormonen oder Zytokinen eine Reihe von Signalkaskaden in Gang setzen und somit die Signalweiterleitung gewährleisten. Man unterscheidet zwei Arten von Rezeptoren, welche extrazelluläre Signale vermitteln (Rassow et al., 2016).

Rezeptoren in der Zellmembran: Der Großteil der Hormone kann die Zellmembran nicht durchdringen und bindet an Rezeptoren in der Zellmembran, welche nach Bindung ihre intrazelluläre Domäne aktivieren und die Informationen so ins Zellinnere weiterleiten. Die Rezeptoren in der Zellmembran werden in drei Grundtypen eingeteilt (Rassow et al., 2016).

- **G – Protein – gekoppelte Rezeptoren:** siehe Abschnitt unten

- **Enzymgekoppelte Rezeptoren:** Diese Rezeptoren enthalten im Gegensatz zu den G – Protein – gekoppelten Rezeptoren in ihrer intrazellulären Komponente eine aktivierbare Enzymaktivität (Serin/Threonin/Tyrosinkinase) oder sind direkt mit dieser gekoppelt (rezeptorassoziierte Tyrosinkinase) (Rassow et al., 2016).

- **Ligandenaktivierte Ionenkanäle:** Aktivierung erfolgt meist durch Neurotransmitter (Rassow et al., 2016).

Intrazelluläre Rezeptoren: Bestimmte Hormone (z.B. Schilddrüsenhormone) sind in der Lage durch ihre lipophilen Eigenschaften die Zellmembran zu durchdringen und an sogenannte intrazelluläre Rezeptoren zu binden. In der Zelle angekommen, bilden sie Komplexe mit den Rezeptoren und fungieren oft als direkte Transkriptionsfaktoren (Rassow et al., 2016).

### 1.3.1 G – Protein – gekoppelte Rezeptoren

Mit über 900 Mitgliedern bilden die G- Protein – gekoppelten Rezeptoren die größte Gruppe von Proteinen, welche eine Signaltransduktion über die Zellmembran regulieren und Bindungsziel verschiedener Hormone und Neurotransmitter darstellen (Audet & Bouvier, 2012; Palczewski, 2006). Eine Unterteilung der Rezeptoren ist in 6 Klassen möglich, welche sich an Ähnlichkeiten in Struktur und Aminosäure – Sequenzen orientiert (Foord et al., 2005). Die meisten Rezeptoren werden der Klasse A (Rhodopsin-ähnliche Rezeptoren), Klasse B (Sekretin - Rezeptoren) und Klasse C (metabotrope Glutamaterezeptoren) zugeordnet (Audet & Bouvier, 2012). Gemeinsam ist den Rezeptoren, dass sie aus sieben transmembranösen alpha- Helices bestehen, die in die Zellmembran integriert sind. Aufgabe dieser Rezeptoren ist es, extrazelluläre Signale an gekoppelte G – Proteine weiterzuleiten, welche dann intrazellulär das Signal weiterleiten, indem sie verschiedene Effektorproteine aktivieren (Tuteja, 2009). Der N – Terminus der Helices liegt auf der extrazellulären Seite und der C – Terminus auf der intrazellulären Seite (Rasmussen et al., 2007). Die Helices sind durch Schleifen miteinander verbunden, die unterschiedlich groß sind. Die Bindung eines Liganden auf der extrazellulären Seite führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Es entsteht eine Bindungsstelle für das heterotrimere G – Protein, welches sich aus 3 Untereinheiten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) zusammensetzt. Das heterotrimere G – Protein ist mit einem

Guanin – Nukleotid beladen, das je nach Aktivität als GDP oder GTP vorliegt. In der inaktiven Form bilden die drei Untereinheiten einen stabilen Komplex und sind GDP – beladen. Nach Konformationsänderung des Rezeptors entsteht eine hochaffine Bindungsstelle für die  $\alpha$  - Untereinheit. Diese spaltet sich von den beiden Untereinheiten ab und gibt GDP frei. Die frei gewordene Stelle wird sofort mit einem GTP – Molekül beladen. In dieser neuen Konformation bildet die  $\alpha$  - Untereinheit neue Peptidschleifen und interagiert nun mit Effektormolekülen. Die  $\beta$ - und  $\gamma$  - Untereinheit bilden stets einen gemeinsamen Komplex. Sowohl die  $\alpha$  - Untereinheit als auch der  $\beta/\gamma$  - Komplex sind über einen Lipidanker in der Membran verankert und können sich nicht von dieser dissoziieren. Die Aktivierung der Effektormoleküle erfolgt über die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit und/oder die aktivierte  $\beta/\gamma$  – Untereinheit (Rassow et al., 2016; Tuteja, 2009). Diese sind in der aktivierten Form nun fähig eine intrazelluläre Reaktion auszulösen. Je nach Untereinheit werden weitere Proteine aktiviert oder inhibiert.

Eine Vielzahl von Signaltransduktionen wird über diesen Weg eingeleitet. Die Entscheidung, welche Signalkaskade aktiviert wird, resultiert aus den verschiedenen Untereinheiten mit unterschiedlicher Affinität zu den Effektorproteinen (Rassow et al., 2016). So lösen Rezeptoren der Gs – Familie eine stimulierende Kaskade aus, indem die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit Enzyme wie die Adenylatzyklase aktiviert, welche in Folge den sekundären Botenstoff (Second Messenger) cAMP synthetisiert (Alexander et al., 2011; Rassow et al., 2016). Rezeptoren der Gi – Familie führen nach Konformationsänderung durch Ligandenbindung ebenfalls zu einer Aktivierung des heterotrimeren G – Proteins. Dessen aktivierte  $\alpha$  – Untereinheit erzielt jedoch eine inhibitorische Wirkung, indem das Zielenzym in der inaktiven Form gebunden wird (Alexander et al., 2011). Gq- gekoppelte Rezeptoren führen zur Aktivierung der Phospholipase C $\beta$  über die  $\alpha$  – Untereinheit. Diese führt zur Freisetzung des Second Messengers Inositol-1,4,5 – Triphosphat (IP3) und Diacylglycerin (DAG) (Alexander et al., 2011; Mochly-Rosen et al., 2012). IP3 führt über die zugehörigen IP3 – Rezeptoren am endoplasmatischen Retikulum zu einer vermehrten intrazellulären Kalziumfreisetzung (Alexander et al., 2011). Über diese Kaskade wird auch die Proteinkinase C aktiviert. Hierbei führt die Bindung des DAG an die C1-Domäne der Proteinkinase C und der intrazelluläre Kalziumanstieg zur Aktivierung der Proteinkinase (Alexander et al., 2011; Mochly-Rosen et al., 2012). Die Proteinkinase C spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und es wird angenommen, dass eine Fehlregulation dieses Enzyms bei der Krebsentstehung von Bedeutung ist (Mochly-Rosen et al., 2012). Eine Bindung des Liganden an den Rezeptor führt also über dessen Konformationsänderung zu einer Aktivierung des G – Proteins, welches sich in die aktivierte  $\alpha$  - und  $\beta/\gamma$  - Untereinheit spaltet. Diese führen nun die Signalkaskade fort, indem sie verschiedene Effektorproteine stimulieren oder inhibieren und so zur Bildung der sog. Second Messenger führen, welche weitere intrazelluläre Reaktionen auslösen, bis hin zur Regulierung von Transkriptionsfaktoren (Alexander et al., 2011; Tuteja, 2009). Nach Komplettierung der Signaltransduktion führt die intrinsische GTPase der  $\alpha$  - Untereinheit zur Hydrolyse des GTP – Moleküls, sodass wieder GDP entsteht. Die Untereinheiten bilden GDP - gebunden in der inaktiven Form erneut einen gemeinsamen Komplex (Tuteja, 2009). Im letzten Jahrzehnt konnte gezeigt werden, dass Rezeptoren eine Signaltransduktion auch ohne die Interaktion mit dem G – Protein einleiten können, indem sie direkt die Effektorproteine aktivieren (Audet & Bouvier, 2012; Galandrin et al., 2007).



Aufgrund ihrer Vielzahl und der essenziellen Beteiligung an physiologischen Prozessen, stellen G – Protein gekoppelte Rezeptoren einen wesentlichen Angriffspunkt in der pharmakologischen Forschung dar (Foord et al., 2005).

#### **1.4 TAA -Rezeptoren (Trace amine-associated receptors)**

Im Jahre 2001 wurde mit den TAA – Rezeptoren eine neue Subfamilie von rhodopsinähnlichen G-Protein-gekoppelten Rezeptoren entdeckt, die durch direkte Bindung von sogenannten „trace amines“ aktiviert werden können (Borowsky et al., 2001). Hierbei gelang zunächst der Nachweis von 15 ähnlichen Rezeptoren, einschließlich sogenannter Orphan Rezeptoren (Mensch, Ratte, Maus, Schimpanse) (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Pei et al., 2016). Da jedoch einige Jahre später bekannt wurde, dass nicht alle dieser Rezeptoren eine Sensitivität gegenüber den „trace amines“ aufweisen, wurde 2005 eine neue Nomenklatur etabliert und die Umbenennung in TAA – Rezeptoren (engl. Trace amine-associated receptors) veranlasst (Lindemann et al., 2005; Lindemann & Hoener, 2005; Pei et al., 2016). Hierbei gelang Lindemann et al. (2005) die Identifizierung dieser Rezeptoren in den folgenden Spezies: Mensch, Ratte, Maus, Schimpanse. Der Anteil an Pseudogenen sowie die Anzahl der rezeptorkodierenden Gene zeigte unter den verschiedenen Spezies eine wesentlich unterschiedliche Ausprägung. Im menschlichen Genom konnten beispielweise neun verschiedene TAAR – Gene, einschließlich drei Pseudogene, identifiziert werden (Lindemann et al., 2005; Lindemann & Hoener, 2005; Pei et al., 2016). Letztlich erfolgte die Einteilung dieser Rezeptoren in 3 Subfamilien anhand von ähnlichen Eigenschaften (Lindemann et al., 2005). Diese werden durch mindestens ein funktionelles Gen im menschlichen Genom präsentiert (Pei et al., 2016). Zudem ist anzunehmen, dass diese Subfamilien bestimmte pharmakologische Eigenschaften teilen, welche es zu erforschen gilt (Lindemann et al., 2005). Diese drei Subfamilien werden gebildet durch TAAR1-TAAR4, TAAR5 und TAAR 6-9 (Lindemann et al., 2005).

Zudem ist zu erwähnen, dass bekannterweise nur TAAR1 und TAAR 4 (früher als TA1 und TA2 bezeichnet) durch „trace amines“ aktiviert werden (Borowsky et al., 2001). Von diesen beiden Rezeptoren konnte TAAR1 in allen untersuchten Spezies nachgewiesen werden und wurde bislang in der Forschung präferiert (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Lam et al., 2015; Lindemann et al., 2005). Bei TAAR4 hingegen handelt es sich um ein Pseudogen (Mensch und Ratte) ohne Expression eines Proteinkorrelats. Dieser kann p-PEA und Tyramin binden jedoch mit einer deutlich geringeren Sensitivität als TAAR1 (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Lam et al., 2015; Lindemann et al., 2005). Die anderen Rezeptoren zeigten keine Sensitivität gegenüber den bekannten „trace amines“. Ursache hierfür können eine ungeklärte Signaltransduktion oder die Bindung bislang unentdeckter biogener Amine sein (Borowsky et al., 2001). TAAR1 ist unter diesen Rezeptoren der am meisten erforschte. Er zeigt eine Sensitivität gegenüber allen „trace amines“ der verschiedenen Spezies, jedoch mit unterschiedlicher Affinität, während TAAR4 nur durch  $\beta$ -PEA und Tyramin stimuliert werden kann mit jedoch geringerer Affinität als TAAR1 (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Lindemann et al., 2005; Lindemann & Hoener, 2005; Pei et al., 2016). Der TAAR1 – Rezeptor zeigt eine hohe Affinität zu Tyramin und Phenethylamin (PEA) und eine geringere Affinität zu Tryptamin, Octopamin und

Dopamin (Borowsky et al., 2001). In den Untersuchungen von Borowsky et al. (2001) konnte gezeigt werden, dass die TAA – Rezeptoren eine hohe Homologie der Aminosäure-Sequenzen aufweisen, sowie auf dem Chromosom 6q23.2 kodiert werden. Ein Chromosomabschnitt, der bei der Ätiologie der Schizophrenie oft mit Veränderungen assoziiert ist (M. D. Berry, 2007; F. G. Revel et al., 2013). Als ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor führt eine Ligandenbindung an den TAAR1 – Rezeptor über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP – Konzentration (Barak et al., 2008; Borowsky et al., 2001; Espinoza et al., 2018). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine Bindung an TAAR1 durch Amphetamine zu erhöhten Konzentrationen der Transkriptionsfaktoren CREB und NFAT führt, hierbei spielt der Aktivierungsgrad der Proteinkinase A und C eine entscheidende Rolle (Panas et al., 2012). Diesen Transkriptionsfaktoren wird eine Bedeutung bei der Immunaktivierung in Lymphozyten zugeschrieben (Panas et al., 2012). Zudem konnte eine Signaltransduktion über den  $\beta$  – Arrestin2 – Signalweg gezeigt werden (Espinoza et al., 2018; Harmeier et al., 2015).

TAAR1 besitzt eine Vielzahl von potenziellen Liganden. Neben den „trace amines“  $\beta$ -Phenylethylamin, p-Tyramin, Octopamin, Tryptamin gehören hierzu auch synthetisch hergestellte Amphetamine, MDMA, Metamphetamine und biogene Amine wie Dopamin, Epinephrin und Norepinephrin, wobei vorzugsweise eine Bindung über ihre inaktiven Vorstufen wie 3-Methoxytyramine (3-MT), Normetanephine, and Metanephrin erfolgt (Bunzow et al., 2001). Die typischen biogenen Amine binden jedoch in einer deutlich geringeren Affinität an TAAR1 als ihre inaktiven Vorstufen und die „trace amines“ (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Lam et al., 2015). Scanlan et al. zeigten (2004), dass 3-Iodothyronamin (T1AM), ein Schilddrüsenhormon – Derivat, eine agonistische Wirkung am TAAR1 besitzt. T1AM entsteht durch Decarboxylierung der Thyroidhormone und kann im Vergleich zu diesen entgegengesetzte Mechanismen auslösen. Ihre Bindung an TAAR1 kann innerhalb von Minuten eine Bradykardie und Hypothermie herbeiführen (engl. rapid actions) (Brix et al., 2011; Scanlan et al., 2004).

#### **1.4.1 Expression und Verteilung des TAAR1 im Menschen**

Eine Expression des TAAR1 konnte im Menschen in diversen Gewebeproben detektiert werden. Neben dem Vorkommen im Zentralnervensystem konnte eine Expression auch im peripheren Gewebe wie in der Lunge, Niere, Pankreas, Dünndarm, Magen und Leber gezeigt werden (Borowsky et al., 2001; Nelson et al., 2007). Im Zentralnervensystem konnte eine Expression des TAAR1 in der Amygdala, im präfrontalen Kortex, in den serotonergen Neuronen der dorsalen Raphe – Kerne, in Teilen der Basalganglien, in den dopaminergen Neuronen der Area tegmentalis ventralis sowie im Cerebellum, Hippocampus, Spinalganglion und der Medulla oblongata nachgewiesen werden (Borowsky et al., 2001; Espinoza et al., 2018). Zudem erfolgte der Nachweis von TAAR1-mRNA in menschlichen Leukozyten (Babusyte et al., 2013; Nelson et al., 2007; Panas et al., 2012), sodass auch eine immunregulierende Funktion des TAAR1 angenommen wird (Panas et al., 2012).

Eine Expression in geringen Mengen konnte auch für die anderen TAA-Rezeptoren gezeigt werden. So werden TAAR9 (TA3), TAAR6 (TA4) und TAAR8 (TA5) in der Niere exprimiert,

TAAR6 (TA4) und TAAR8 (TA5) zusätzlich auch in der Amygdala und TAAR6 (TA4) im Hippocampus (Borowsky et al., 2001).

#### **1.4.2 Bedeutung des TAAR1 im ZNS und an neurophysiologischen Vorgängen**

An diversen Tiermodellen konnte die Expression von TAAR1 im Nervensystem untersucht werden (Borowsky et al., 2001; Buzow et al., 2001; Lindemann et al., 2008; Xie et al., 2007; Xie & Miller, 2009). Hierbei konnte anhand von RT – PCR das Vorkommen von TAAR1 in der Amygdala, Hippocampus, Cerebellum, Hypothalamus, den Spinalganglien, Medulla oblongata, und in der pontinen Formatio reticularis beobachtet werden (Borowsky et al., 2001; Xie & Miller, 2009). 2009 beschrieben Xie & Miller den Nachweis von TAAR1 mRNA via RT-PCR im Gehirn von Rhesus-Affen. Unter anderem zeigte sich hier die Expression in Zellen des monoaminergen Systems, einschließlich der Substantia nigra, Locus coeruleus, Raphe – Kernen, Area tegmentalis ventralis, Putamen, Ncl. Accumbens, Amygdala, Nucleus Caudatus (Xie et al., 2007; Xie & Miller, 2009). Weitere Studien ergaben anhand von elektrophysiologischen Untersuchungen eine funktionelle Aktivität des TAAR1 in der ventralen Area tegmentalis und den dorsalen Raphe – Kernen, nicht jedoch im Locus caeruleus (Florent G. Revel et al., 2011). Die bislang erfolgten Studien lassen vermuten, dass TAAR1 eine modulierende Funktion in der Regulation der dopaminergen und serotonergen Signalübertragung sowie vermutlich auch im glutamatergen System besitzt (Espinoza et al., 2018; Lam et al., 2015; Leo et al., 2014; Lindemann & Hoener, 2005; Florent G. Revel et al., 2011; F. G. Revel et al., 2013). Hierbei wird vorwiegend eine inhibierende Wirkung auf das dopaminerge System über den TAAR1 angenommen (Espinoza et al., 2018; Lam et al., 2015; Florent G. Revel et al., 2011). Aufgrund ihrer Expression in der Amygdala wird ihnen zudem eine Beteiligung bei der Entstehung von Depressionskrankheiten und Angststörungen zugeschrieben (Borowsky et al., 2001). Revel et al. (2013) zeigten an Tiermodellen, dass über eine TAAR1- Aktivierung durch Agonisten antipsychotische und antidepressive Wirkungen erzielt werden können. Untersuchungen von Espinoza et al. (2018) bestätigten die bisherigen Erkenntnisse und zeigen zudem neue Signalmechanismen des TAAR1. Des Weiteren konnte ein Zusammenspiel mit dem monoaminergen System, insbesondere über eine Interaktion mit den Dopamin- und AMPA-Rezeptoren beobachtet werden (Espinoza et al., 2018).

#### **1.4.3 Bedeutung des TAAR1 im peripheren System**

Neben ihrer Bedeutung im zentralen Nervensystem wird gegenwärtig zunehmend auch die Expression und Funktion der TAA-Rezeptoren in peripheren Organen untersucht. So gelang 2007 der Nachweis von TAAR1-mRNA in NK – Zellen und B – Zellen (Nelson et al., 2007). 2012 zeigten Panas et al. anhand der Untersuchung verschiedener Signalwege eine hohe Expression der TAAR1-Proteine in B – Zelllinien von Affen (Panas et al., 2012). Hierbei wurden die verschiedenen Signalwege der Immunaktivierung durch Metamphetamine in An- und Abwesenheit der TAAR1 – Proteine untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass eine PHA Aktivierung zu einer verstärkten Expression des TAAR1 in Lymphozyten führt. Im Rahmen der Untersuchungen verschiedener TAAR1 – assoziierter Signalwege nach Stimulierung mit dem TAAR1 – Agonisten Metamphetamin stieß man auf die zwei Transkriptionsfaktoren CRAB und

NFAT, welche eine Rolle bei der Immunaktivierung spielen (Panas et al., 2012). Weiter zeigt Panas et. al (2012), dass eine Stimulierung mit Methamphetaminen an TAAR1 zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PKA und PKC führt und somit zu einer Aktivierung dieser Signalkaskade. Es ist somit anzunehmen, dass der TAAR1 eine bedeutende Rolle bei der Immunabwehr spielt und Medikamente, welche über diesen Rezeptor wirken, ebenso die Immunabwehr beeinflussen könnten. Ein Problem in der Untersuchung des Rezeptors stellt jedoch seine vorwiegende Lokalisierung intrazellulär dar.

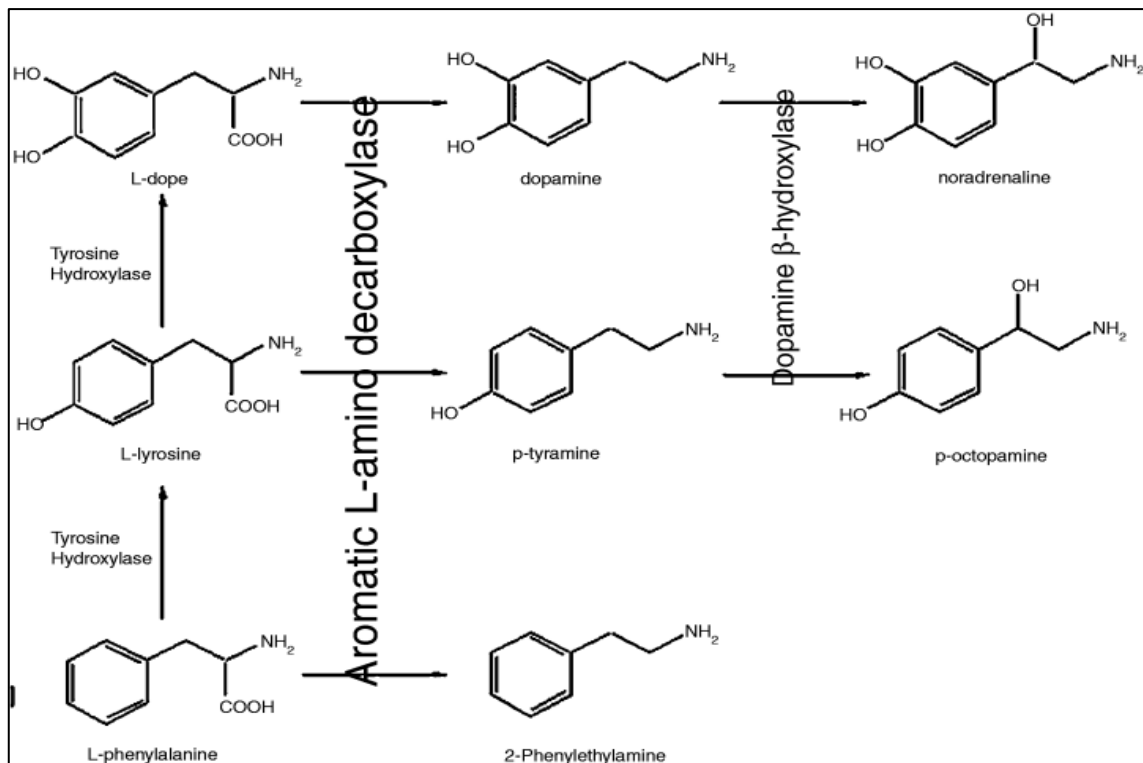
#### **1.4.4 Expression und Funktion des TAAR1 in Krebszellen**

Untersuchungen zur Verteilung und Funktion des TAAR1 sind Gegenstand aktueller Forschungen. Es wurden bereits einige Untersuchungen zur Expression von TAAR1 in Krebszellen veröffentlicht. Eine Aktivierung des TAAR1 spielt vermutlich nicht nur bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle, sondern beeinflusst auch die Tumorzellfunktion und die Malignität (Fleischer et al., 2018). 2012 wurde die Expression des TAAR1 in gesunden und malignen B- Zellen untersucht (Wasik et al., 2012). In vitro Untersuchungen zeigten in Zellen des Burkitt-Lymphoms eine gesteigerte Apoptose nach Behandlung mit TAAR1- Agonisten während gesunde B – Zellen eine geringere Sensitivität gegenüber den TAAR1 – Agonisten zeigten (Wasik et al., 2012). Dies führte zur Annahme, dass der TAAR1 -Rezeptor eine Rolle bei der Entstehung von Leukämien und Lymphomen spielen könnte (Wasik et al., 2012). Eine erhöhte Konzentration von TAAR1-mRNA konnte zudem in Lungenkarzinom-, Magenkarzinom- und Ösophaguskarzinomzellen nachgewiesen werden. Geringere Konzentrationen zeigten sich hingegen in Zervix-, Endometrium-, Nieren-, Leber-, Pankreas- und Harnblasenkarzinomen sowie in Sarkomen (Dorsam & Gutkind, 2007; Fleischer et al., 2018). Fleischer et. al (2018) veröffentlichten die Ergebnisse ihrer Metaanalyse. Hierfür wurden die Datenbanken PrognScan (Mizuno et al., 2009) and PROGgene (Goswami & Nakshatri, 2013) herangezogen. Die Hazard Ratio in Anhängigkeit von der TAAR1-Expression wurde untersucht (Fleischer et al., 2018; Goswami & Nakshatri, 2013; Mizuno et al., 2009; Wan et al., 2015). Eine stärkere TAAR1-Expression war mit einem längeren medianen Überleben bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom, Magen-, Ovar-, Blasen sowie Knochentumoren assoziiert während eine Korrelation zwischen einer niedrigen TAAR1-Expression und einem längeren medianen Überleben bei Patienten mit Kopf- und Hals -Tumoren sowie Hirn- und Hauttumoren beobachtet werden konnte (Fleischer et al., 2018). Für Brustkrebstumore konnten keine signifikanten Unterschiede der Hazard Ratio gesehen werden (Fleischer et al., 2018). Welche Rolle die Aktivierung des TAAR1 bei der Tumorgenese spielt, ist nicht geklärt. Jedoch zeigen bislang veröffentlichte Studien, dass die Rolle der Liganden wesentlich ist. Amphetamine als synthetische hergestellte Amine stellen einen potenziellen Liganden des TAAR1 dar. 2009 wurde eine Studie veröffentlicht zum Gebrauch von Amphetaminen und der Entstehung von Non-Hodgin- Lymphomen bei HIV-infizierten Männern. Hierbei wurde gezeigt, dass eine regelmäßige Abusus von Amphetaminen ab 1 x /Woche zu einem erhöhten Entstehungsrisiko von Non – Hodgin- Lymphomen beiträgt (Chao et al., 2009). Ein weiterer TAAR1-Ligand ist 3 – Iodthyronamin (T1AM), welcher ebenfalls an den TAAR1-Rezeptor bindet, jedoch hinsichtlich der Wirkung auf das Tumorstadium eine gegenteilige Wirkung als die Amphetamine herbeiführt (Rogowski et al.,

2017). 3-Iodthyronamin ist ein hormonell aktiver Metabolit der Schilddrüsenhormone, welcher die Tumorzellproliferation verhindert. In einer Reihe von In-vitro-Untersuchungen wurde der Einfluss von T1AM auf die Proliferation von Tumorzellen untersucht. Hierfür wurden die Zellen HepG2 (Hepatozelluläres Karzinom) und MCF7 (Adenokarzinom der Brustdrüse) mit T1AM inkubiert. Eine Reduktion der Tumorzellproliferation und eine reduzierte Funktionsfähigkeit konnte beobachtet werden (Rogowski et al., 2017). In T-Zellen konnte eine Downregulation des Tumorpromotorgenes SPP1 nach TAAR1 – Aktivierung gezeigt werden (Babusyte et al., 2013). SPP1 kodiert das Phosphoprotein Osteopontin, welches an der Regulation der Knochensubstanzerhaltung beteiligt ist (Wai & Kuo, 2008). Eine Überexpression des Proteins kann in vielen Tumoren nachgewiesen werden. Des Weiteren scheint es die Metastasenbildung und das Tumorwachstum zu begünstigen (Wai & Kuo, 2008). Paradoxe Weise erfolgt die Hochregulation des Rezeptors unter anderem auch über die Aktivierung der Proteinkinase C (PKC). Dieser Signalweg ist auch ein potenzieller Signalmechanismus der TAAR1-Liganden (Fleischer et al., 2018). Darüber hinaus wird angenommen, dass eine TAAR1-Bindung über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Bildung des Transkriptionsfaktors NF $\kappa$ B beiträgt. Der Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B spielt eine wesentliche Rolle bei Zellproliferation, Apoptose und der Immunabwehr. Eine gesteigerte Aktivierung des NF $\kappa$ B kann in vielen soliden Tumoren beobachtet werden (Karin, 2009). Bislang wird angenommen, dass die gesteigerte NF $\kappa$ B-Aktivierung in vielen Tumoren die Antwort einer inflammatorischen Reaktion bei der Tumorentstehung ist und die Tumorentstehung selbst sowie den Tumorprogress und die Malignität wesentlich beeinflusst (Fleischer et al., 2018; Hoesel & Schmid, 2013; Karin, 2009). Welche genaue Rolle die Aktivierung des NF $\kappa$ B bei der Krebsentstehung einnimmt, ist Bestandteil gegenwärtiger Forschungen.

## 1.5 Biologisch aktive Amine (engl. trace amines)

Bei den „trace amines“ handelt es sich um biogene Amine. Die bekanntesten „trace amines“ sind Tyramin, Octopamin, Tryptamin und  $\beta$ -Phenylethylamin (PEA). Der Nachweis und die Bedeutung von „trace amines“ sind vor allem im Nervensystem von Säugetieren (Barak et al., 2008; Grandy, 2007; Lindemann & Hoener, 2005) und bei Menschen im Gehirn untersucht (Mark D. Berry, 2004; Lam et al., 2015; Premont et al., 2001). Sowohl strukturell als auch metabolisch weisen sie Ähnlichkeiten mit den klassischen Aminen Adrenalin, Noradrenalin, Serotonin und Dopamin auf (Mark D. Berry, 2004; Ledonne et al., 2010). Sie sind in deutlich geringeren Konzentrationen als die klassischen Neurotransmitter nachweisbar. Mögliche Erklärungen hierfür sind zum einen ihre kürzere Halbwertszeit sowie ihr schneller Um- und Abbau (Mark D. Berry, 2004; Pei et al., 2016). Ihre Verteilung im ZNS ist sehr heterogen und die Syntheserate ähnlich der der klassischen Neurotransmitter Dopamin und Serotonin (Mark D. Berry, 2004; Paterson et al., 1990).



**Abbildung 2: Enzymatischer Syntheseweg der „trace amines“ (Mark D. Berry, 2004)**

In Abbildung 2 ist der enzymatische Entstehungsweg der „trace amines“ aufgezeichnet. Biogene Amine entstehen immer durch eine Decarboxylierung von Aminosäuren (Babusyte et al., 2013). Tyramin und PEA entstehen infolge einer Decarboxylierung durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (AADC), auch DOPA-Decarboxylase (DDC) genannt, aus den Aminosäuren L – Tyrosin und L – Phenylalanin. Die Hydroxylierung des Tyramins durch das Enzym Dopamin –  $\beta$ - Hydroxylase führt zur Synthese von Octopamin (Mark D. Berry, 2004). Der Abbau erfolgt überwiegend über spezifische Monoaminoxidasen (MAO) (Mark D. Berry, 2004; Yang & Neff, 1973). PEA wird hierbei über eine selektive MAO – B katalysiert während die anderen „trace amines“ weniger Selektivität zeigen und durch MAO -A und MAO – B abgebaut werden (Mark D. Berry, 2004; Philips & Boulton, 1979; Yang & Neff, 1973). Neben dem menschlichen Körper kommen „trace amines“ auch in Lebensmitteln wie z.B. der Kakaobohne vor (Grandy, 2007). Studien führten zur Annahme, dass während Octopamin in noradrenergen Neuronen synthetisiert wird, die anderen „trace amines“ einschließlich PEA, Tryptamin und p-Tyramin in nigrostriatalen dopaminergen Neuronen gebildet werden (Mark D. Berry, 2004; Pei et al., 2016). Im Gastrointestinaltrakt können sie durch den enzymatischen Abbau von Proteinen durch bakterielle Decarboxylasen entstehen (Grandy, 2007; Jansen et al., 2003). Weiter zeigten Granvogel et al. (2006), dass thermische Prozesse zu einer erhöhten Konzentration von Aminen führen können (Granvogel et al., 2006). Die klassischen biogenen Amine sind bei der Regulation von neurophysiologischen und kognitiven Abläufen sowie bei der Entstehung von Verhaltensmustern beteiligt (Pei et al., 2016). „Trace amines“ wurde lange Zeit keine wesentliche Bedeutung zugesagt, da man sie als Nebenprodukte beim Stoffwechselabbau wertete (Mark D. Berry, 2004). Im Jahre 2001 wurden jedoch zwei Publikationen veröffentlicht,

die den Nachweis von Rezeptoren zeigten, die spezifisch durch „trace amines“ aktiviert werden, die sogenannten TAA – Rezeptoren (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001). Welche Rolle die „trace amines“ bei Tieren und im menschlichen Organismus spielen, ist noch nicht vollständig geklärt. Man nimmt an, dass Octopamin eine ähnliche Funktion wie Noradrenalin im vegetativen Nervensystem von wirbellosen Tieren besitzt (Borowsky et al., 2001; Pei et al., 2016; Roeder, 1999). Bereits vor dem Nachweis von TAA – Rezeptoren wurde den „trace amines“ eine indirekte neuromodulatorische Wirkung durch Interaktion mit den Neurotransmittern zugeschrieben und eine Beteiligung bei der Entstehung von Migräne sowie psychologischen Störungen vermutet (Borowsky et al., 2001; Branchek & Blackburn, 2003). In den letzten beiden Jahrzehnten konnte gezeigt werden, dass die „trace amines“ eine endogene neuromodulatorische Wirkung besitzen und sowohl bei der Modulation und Regulation der Neurotransmission beteiligt sind als auch selbst in ihrer Funktion einer Modulation durch die Neurotransmitter unterliegen (Mark D. Berry, 2004; Branchek & Blackburn, 2003; Pei et al., 2016). Insbesondere konnte hierbei eine Interaktion zwischen den „trace amines“ und dem Neurotransmitter Dopamin beobachtet werden. Eine Inhibierung der dopaminergen Signaltransduktion führt zu einer Akkumulation von  $\beta$ -PEA im Striatum, während verminderte Konzentrationen von p-Tyramin und  $\beta$ -PEA im Striatum mit einer verminderten Freisetzung des Dopamins einhergehen. Ursache hierfür sind elektrische Stimulationsvorgänge in der Substantia nigra (Jansen et al., 2003; Pei et al., 2016). Zudem konnte eine Assoziation mit neuropathologischen Krankheiten wie Schizophrenie, Parkinson, Suchterkrankungen, ADHS und Depressionen gezeigt werden (Grandy, 2007; F. G. Revel et al., 2013; Sotnikova et al., 2009). Monoaminoxidase B – Inhibitoren, welche in der Therapie von schweren depressiven Störungen Anwendung finden, führen zu einer erhöhten Konzentration von PEA, was wiederum indirekt die neuronale Empfindlichkeit für Dopamin und Dopaminagonisten erhöht (M. D. Berry et al., 1994; Paterson et al., 1990; Pei et al., 2016). Weiter zeigten sich im Urin von Patienten mit Schizophrenie erhöhte Konzentrationen des „trace amines“ PEA (Potkin et al., 1979; F. G. Revel et al., 2013; Sotnikova et al., 2009). PEA weist Gemeinsamkeiten in der Struktur und im Metabolismus mit Amphetaminen auf (O'Reilly & Davis, 1994; Potkin et al., 1979). Der Konsum von Amphetaminen führt bekannterweise zu Psychosen ähnlich dem klinischen Bild der paranoiden Schizophrenie. Zudem zeigten Baker et al. (1991) in einer klinischen Studie, eine reduzierte Konzentration von PEA im Urin von Kindern mit ADHS im Vergleich zur Kontrollgruppe ohne Symptome einer ADHS - Erkrankung (Baker et al., 1991). Eine reduzierte PEA – Ausscheidung im Urin konnte auch bei Patienten mit depressiven Störungen beobachtet werden (Wolf & Mosnaim, 1983). Eine weitere Studie zeigte eine erhöhte Ausscheidung von PEA im Urin in einer Gruppe von Frauen, die alle an einer bipolaren Störung litten. Eine Behandlung mit Monoaminoxidasen, welche am Abbau von PEA beteiligt sind, führte bei diesen zu einer Zunahme der Urin - Exkretion von PEA und klinisch zu einer Exazerbation der Symptomatik (Karoum et al., 1982). Erhöhte PEA -Konzentrationen steigern wiederum die Empfindlichkeit der nigrostriatalen Neurone gegenüber Dopamin und Dopaminagonisten (M. D. Berry et al., 1994). Sie haben somit eine neuromodulierende Wirkung. Zudem konnte an experimentellen Modellen gezeigt werden, dass eine modulierende Wirkung der „trace amines“ auch im noradrenergen System anzunehmen ist (Paterson & Boulton, 1988). Die bislang erfolgten Untersuchungen führen somit zur Annahme, dass „trace amines“ und ihre

zugehörigen Rezeptoren nicht nur eine Rolle bei der Entstehung von neuropsychiatrischen Erkrankungen spielen, sondern auch bei der Entwicklung einer Substanzabhängigkeit beteiligt sind und die Wirkung von Psychostimulanzien beeinflussen (Pei et al., 2016).

Einige „trace amines“ haben zudem eine modulierende Wirkung in der Regulation der Herzfunktion und des Blutdrucks. Zu diesen gehören Phenylethylamin und Tyramin sowie 3-Iodothyronamin (Barger & Dale, 1910; Jones et al., 1983). Tyramin wirkt peripher über die Freisetzung von Noradrenalin indirekt auf das vegetative Nervensystem (Juorio et al., 1991; Pei et al., 2016). Erhöhte Tyramin – Konzentrationen, die z.B. bei der Einnahme von MAO – Hemmern entstehen können, führen über die vermehrte Freisetzung von Noradrenalin zu Bluthochdruck, Kopfschmerzen sowie einem zunehmenden Atemminutenvolumen (Andersen et al., 2019).

## **1.6 Rolle von Schilddrüsendysfunktion bei Mammakarzinomen**

Eine Korrelation zwischen der Entstehung von Brustkrebs und Schilddrüsendysfunktionen wird angenommen. Bislang erfolgte Studien deuten darauf hin, dass Schilddrüsendysfunktionen häufig mit dem Auftreten von Mammakarzinomen korrelieren. Turken et al. (2003) untersuchten die Expression von Schilddrüsenantikörpern bei Patientinnen mit Brustkrebs und verglichen diese mit Kontrollgruppen ohne Nachweis einer malignen Grunderkrankung. Hierbei konnte gezeigt werden, dass Patientinnen mit Brustkrebs signifikant höhere Konzentrationen von TPO – Autoantikörpern im Serum zeigten sowie häufiger an einer autoimmunen oder nicht autoimmunen Form einer Schilddrüsenerkrankung litten (Turken et al., 2003). Eine klinische Untersuchung zeigte zudem erhöhte Konzentrationen der Schilddrüsenhormone fT3 und fT4 bei Patientinnen mit Brustkrebs im Vergleich zu Patienten mit gutartigen Brusttumoren und zu gesunden Probanden. Der höchste Anteil von Autoantikörpern (TRAK) gegen den Thyreotropinrezeptor (TSH – Rezeptor) konnte in der Gruppe der Patientinnen mit Mammakarzinomen beobachtet werden (Ditsch et al., 2010). Zudem konnte anhand von klinischen und sonographischen Untersuchungen ein häufigeres Vorkommen von nodulärem Struma („Struma nodosa“) bei Patientinnen mit Mammakarzinomen gesehen werden (Turken et al., 2003). Schilddrüsenhormone gehören, genau wie die Steroidhormonrezeptoren (ER/PR), zu den sogenannten nukleären Rezeptoren. Steroidhormonrezeptoren werden als prädiktive Faktoren bei Mammakarzinomen herangezogen (Heublein et al., 2015). Patientinnen mit einer BRCA1 – Mutation sind häufig mit einem negativen Hormonstatus gekennzeichnet, d.h. es fehlt der Nachweis von Progesteron-Rezeptoren (PR) und Östrogen-Rezeptoren (ER). Bei zusätzlich negativem Nachweis des Wachstumsfaktorrezeptors HER2 spricht man von einem sogenannten triple-negativen Tumor (Heublein et al., 2015; Stevens et al., 2013). Der fehlende Therapieansatz für eine Hormontherapie schränkt die endokrine Therapie bei diesen Patientinnen ein (Heublein et al., 2015; Stevens et al., 2013). Experimentelle Studien untersuchten die Expression verschiedener Isoformen der Thyroidhormonrezeptoren bei Brustkrebspatientinnen mit BRCA1-Mutation im Vergleich zu Patientinnen mit sporadischen Mammakarzinomen (Heublein et al., 2015). Resultierend aus diesen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass bei Mammakarzinomen mit BRCA1 – Mutation eine Expression von THR $\beta$ - Rezeptoren als positiver



prognostischer Marker für die 5-Jahres-Überlebensrate und das Gesamtüberleben herangezogen werden kann und ein positiver THR $\alpha$  – Status mit einer reduzierten 5 – Jahres-Überlebensrate assoziiert ist (Heublein et al., 2015). Als nukleäre Rezeptoren könnten die Thyroidhormonrezeptoren in Zukunft insbesondere bei triple- negativen Formen des Brustkrebses neue therapeutische Ansätze liefern (Heublein et al., 2015; Vattai et al., 2017). Bereits zuvor erfolgte durch Ditsch et. al. (2013) die immunhistochemische Untersuchung der Expression von Thyroidhormonrezeptoren im Brustkrebsgewebe bei Patientinnen mit sporadischem Mammakarzinom (Ditsch et al., 2013). Hierbei konnte eine Expression von THR $\alpha$  und THR $\beta$  zellulär nachgewiesen werden. Retrospektive Analysen zeigten, dass die Expression von Thyroidhormonrezeptoren, insbesondere die Isoform THR  $\alpha$ 2, mit prognostischen Eigenschaften wie dem axillären Lymphknotenstatus, der Tumorgroße, dem Tumograding und dem Hormonrezeptorstatus signifikant positiv korrelierten (Ditsch et al., 2013). Eine gesteigerte Expression dieser Isoform wird zudem als unabhängiger prädiktiver Faktor für das Gesamtüberleben und ein krankheitsfreies Überleben gewertet (Ditsch et al., 2013). Eine Kohortenstudie in Dänemark untersuchte die Korrelation zwischen Hypo- und Hyperthyreodismus mit dem Risiko an Brustkrebs zu erkranken (Sogaard et al., 2016). Hierbei konnte eine Korrelation zwischen Hyperthyreodismus und erhöhtem Risiko sowie Hypothyreodismus und verringertem Risiko für die Entstehung von Brustkrebs festgestellt werden (Sogaard et al., 2016). Auch wenn bislang die genaue Verbindung zwischen Schilddrüsenerkrankungen und Mammakarzinomen nicht geklärt ist, zeigen die bislang erfolgten Studien, dass eine gewisse Korrelation besteht. Der Großteil der Schilddrüsenhormone im menschlichen Organismus liegt als inaktives Prohormon vor (Scanlan, 2009; Yen, 2001). Im Schilddrüsengewebe wird T4 gebildet (Scanlan, 2009). Eine Deiodierung des äußeren Rings führt zur Bildung des T3, welcher mit hoher Affinität an die Schilddrüsenhormonrezeptoren bindet, wohingegen eine Deiodierung des inneren T4- Ringes zur Bildung des rT3 führt, ein Hormon dessen Funktion im Organismus noch nicht sicher geklärt ist (Kohrle, 2002; Scanlan, 2009; Yen, 2001). Chemisch gesehen handelt es sich bei den Schilddrüsenhormonen um Aminosäuren (Scanlan, 2009). Durch eine Decarboxylierung entstehen Thyronamine (Scanlan, 2009). Die Decarboxylierung erfolgt durch das Enzym L-DOPA–Decarboxylase /L-Aminosäure–Decarboxylase (AADC) (Scanlan et al., 2004; Sumi-Ichinose et al., 1992). Dieses ist ebenso an der Bildung der Neurotransmitter beteiligt (Sumi-Ichinose et al., 1992). Hierbei wird eine Decarboxylierung der Phenylalanin – (OH) $_2$  – Gruppe und des Hydroxytryptophans (L-3,4-dihydroxyphenylalanine and L-5-hydroxytryptophan) katalysiert (Scanlan et al., 2004; Sumi-Ichinose et al., 1992; Zhu & Juorio, 1995). Scanlan et al.(2004) gelang die Synthese von neun Thyronaminen, unter anderem von 3 – Iodthyronamin (T $_1$ AM), welches bislang noch nicht untersucht und beschrieben wurde. Als ein Abbauprodukt des T4 fungiert T1AM wie ein endogenes Amin und führt über die Bindung an den G-Protein-gekoppelten Rezeptor TAAR1 zu einer Signalaktivierung mit Anstieg der intrazellulären cAMP – Konzentration (Borowsky et al., 2001; Bunzow et al., 2001; Scanlan et al., 2004). Im Rahmen der Untersuchungen von Scanlan et. al. (2004) konnte gezeigt werden, dass T1AM innerhalb weniger Minuten zu einer Bradykardie und Hypothermie in vivo führt sowie zu einer beschleunigten Verringerung des Herzschlagvolumens. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass T1AM über Signalkaskaden

---

arbeitet, die eine gegenteilige Wirkung zu den herkömmlichen Schilddrüsenhormonrezeptoren aufweisen (M. D. Berry et al., 1994; Brix et al., 2011; Scanlan et al., 2004).

## 2 Fragestellung und Zielsetzung der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, die Expression des TAAR1 in Brustkrebszellen zu untersuchen. Im ersten Abschnitt dieser Arbeit erfolgt daher die Färbung und Beurteilung der TAAR1 – Expression an Mammakarzinomen. Die Ergebnisse des Expressionsverhalten werden anschließend mit histopathologischen und klinischen Merkmalen wie dem Tumorgrading, der Tumorgröße, dem Lymphknotenstatus und dem Hormonstatus verglichen. Da es sich bei den Gewebsschnitten um Präparate handelte, die in den Jahren 1998 bis 2000 intraoperativ entfernt wurden, erfolgt zudem eine Analyse des Expressionsverhalten mit dem Outcome der Patientinnen. Im zweiten Abschnitt der Arbeit widmen wir uns der Frage, ob das Proliferationsverhalten von Mammakarzinomzellen *in vitro* über den Rezeptor auf Proteinebene durch Agonisten beeinflussbar ist und ob sich die Ergebnisse in sporadischen und BRCA1-mutierten Zelllinien unterscheiden. Zudem soll untersucht werden ob Schilddrüsenhormone einen Einfluss auf das Proliferationsverhalten des TAAR1 besitzen, da ihre Abbauprodukte Liganden des Rezeptors darstellen und für die Schilddrüsenhormone bislang Korrelationen mit Brustkrebszellen beschrieben wurden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### Geräte

Geräte	Hersteller
Pipetten	Eppendorf AG; Hamburg, Deutschland
Brutschrank	Heraeus, Hanau, Deutschland
Dampf – Kochtopf	vitaFit®, Fissler GmbH, Idar – Oberstein, Deutschland
Kochplatte	THL 2597, Rommelsbacher Elektrohausgeräte GmbH, Dinkelsbühl, Deutschland
Mikroskop	Leitz Diaplan, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland
Küvetten	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda, Königshofen, Deutschland
Kamera	3 CCD KY-F55B, JVC, JVCKENWOOD Deutschland GmbH, Bad Vilbel, Deutschland
Objektträger	Menzel GmbH & Co KG; Saarbrücken, Deutschland
Superfrost Deckgläser	Menzel GmbH & Co KG; Saarbrücken, Deutschland
Schlittenmikrotom	Hn40, Reichert- Jung; Leica, Wetzlar, Deutschland
Bio-Rad Universal Hood II	Segrate, Italien
Aquatex® Eindeckmedium	Merck, Darmstadt, Deutschland

**Immunhistochemie**

<b>Lösungen Immunhistochemie</b>	<b>Hersteller</b>
Xylol	Firma Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Firma VWR International S.A.S, Briare, Frankreich
Ethanol	Apothekenbedarf der LMU, München, Deutschland
Methanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Aqua dest.	Firma Noll Karl W. Wasserdestillation, München, Deutschland
Saurer Hämalaun nach Mayer	Waldeck GmbH & Co. KG, Münster, Deutschland/Apothekenbedarf der LMU
PBS	Dulbecco Phosphate Buffered Saline: Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Eukitt®	O. Kindler GmbH, Freiburg, Deutschland
Tween 20	Merck, Darmstadt, DE/Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland
Na – Citratpuffer (pH 6,0)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lsg A. 21,01g 0,1 M Citronensäure (Firma Merck KGaA) + 1 l Aqua dest.</li> <li>• Lsg B. 29,41g 0,1 M Na- Citrat (Firma Merck KGaA) + 1 l Aqua dest.</li> <li>• Gebrauchslösung: 18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B + 900 ml Aqua dest.</li> </ul>

## Präparate

Paraffinschnitte von Mammakarzinom

Archiv der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum der Ludwig – Maximilians – Universität, Campus Innenstadt

## Zellkultur

Lösungen Zellkultivierung	Hersteller
Dulbeccos Medium (DMEM)	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
DMSO (Cell Culture Freezing Medium)	Gibco®, Life Technologies, Carlsbad, USA
FCS (Fetales Kälberserum)	PAA, Pasching, A
Trypsin/EDTA Solution	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland
Tryptanblaulösung 0,4 %	Sigma – Aldrich, St.Louis, USA
Tryptan/EDTA – Lösung	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

## Zellen

Zelllinie	Hersteller
HCC 3153	American Type Culture Collection (ATCC)
MCF 7	European Collection of Cell Cultures (ECACC)

## Erstellen von Zelllysaten

Lösungen	Hersteller
PBS Dulbecco	Biochrom GmbH, Berlin, Deutschland

RIPA – Puffer	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Protease – Inhibitor – Cocktail	Sigma – Aldrich, St. Louis, USA
Roti – Load	Firma Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zellysepuffer	SurveyorTMIC - Human Total $\beta$ Catenin Immonoassay R&D Systems, Minneapolis, USA
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma Aldrich, ST. Louis, USA

### Software

Software	Hersteller
Bio-Rad Quantity One® Software	Bio – Rad Laboratories, Hercules, USA
SPSS für Windows, Social Sciences	SPSS, Chicago, USA

### Bradford

Material Bradford	Hersteller
Bradford-Reagenz, Protein Assay Farbstoff-Konzentrat	Bio-Rad, München, DE
Bradford-Standard, Protein Assay Standard II	Bio – Rad, München, DE
Küvette (Halb-Mikro-Küvette 10x4 mm)	Sarstedt, Nümbrecht, DE

### Western Blot

Material und Lösungen Western Blot	Hersteller
------------------------------------	------------

Milchpulver	Carl Roth, Karlsruhe, DE
Laufpuffer (Tris/Glycerine Puffer)	Bio – Rad, München, DE
Blotpuffer (Tris, Glycerine/SDS Puffer)	Bio – Rad, München, Deutschland
Precast Gel Mini – Protean TGX 12 -well comb.	Bio – Rad, München, Deutschland
Protein Standard	Fermentas
Roti Load 4 x Konzentrat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
PVDF Membran	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Mini Trans-Blot Filterpapier	Bio – Rad, München, Deutschland
Mini Protean 3 System	Bio – Rad, München, Deutschland
BCIP/NBT Chromogen-Substrat-Lösung	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
Casein Lösung	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Lysepuffer (Protease Inhibitor Cocktail + Radioimmunoprecipitation Assay Puffer)	Life Technologies GmbH, Darmstadt, DE
Nitrocellulose Membran	Bio-Rad, München, DE

### Detektionssysteme

Detektionssystem	Hersteller
VECTASTAIN Elite ABC Kit Rabbit IgG	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
Vectastain Elite ABC Kit mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
Vectastain-ABC-AmP Maus-IgG-Kit	Vector Laboratories, Burlingame, USA



Substrat Chromogen 3-Amino-9-Ethylcarbazol (AEC) plus	Dako, Glostrup, Dänemark
Substrat-Chromogen-System: Dako Liquid DAB+Substrate Chromogen System	Dako North America, Carpinteria, CA, US
Vectastain Elite ABC-Kit mouse IgG	Vector Laboratories, Burlingame, USA
ZytoChem-Plus HRP Polymer- Kit	Zytomed Systems GmbH, Berlin, Deutschland

### Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti – alpha Tubulin antibody ab15246	Abcam, Cambridge, UK
Anti – TA1 antibody ab65633	Abcam, Cambridge, UK
Trace amine associate receptor 1 antibody	Thermo Scientific, Massachusetts, USA

### Stimulanzen

Stimulanzen	Hersteller
3, 3',5,5'- Tetraiodothyroacetic acid (Tetrac)	Sigma Aldrich, St. Louis, USA
3,3',5 – Triiodo-L-thyronine (T3)	Sigma Adrich, St. Louis, USA
Tyramine	Fluka, New Jersey, USA

## 3.2 Patientenkollektiv

Zur Immunhistochemischen Untersuchung wurden Paraffingewebschnitte von Mammakarzinomen aus dem Archiv der Klinik für Frauenheilkunde von insgesamt 227 Frauen

herangezogen. Es handelt sich hierbei um Präparate von Patientinnen, die in den Jahren zwischen 1998 und 2000 an der Frauenklinik operiert wurden. Gutartige Tumore wurden hierbei ausgeschlossen. Bei allen Patientinnen bestand zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme keine Metastasierung (M0). Nach der intraoperativen Entnahme der Gewebeproben erfolgte die histologische Verarbeitung. Eine Einteilung der Gewebsschnitte erfolgte histopathologisch nach Subtypen gemäß der WHO - Klassifizierung, das Tumorigradung nach Elston und Ellis fand statt durch einen Pathologen der Klinik.

### **3.3 Immunhistochemie**

#### **3.3.1 Gewebevorbereitung**

Sobald das Gewebe entnommen wurde, erfolgte die Fixation, um eine Autolyse der Enzyme zu verhindern. Hierfür wurde das Gewebe in 4 % wässrigem Formaldehyd (= Formalin) eingelegt. Die Formaldehydmoleküle verbinden sich mit den Eiweißmolekülen im Gewebe, was zur Bildung eines starren Gitternetzes führt. Dieser Vorgang ist wichtig, da er später den Nachweis der Antigene ermöglichte, da hierdurch wiederum eine Proteindenaturierung verhindert wird. Je nach Gewebsgröße kann die Dauer der Fixation variieren. Bei kleinen Gewebsschnitten dauert sie ca. 24 Stunden. Größere Gewebsschnitte werden über 24 Stunden fixiert. Anschließend erfolgte das Zuschneiden in die relevanten Gewebsschnitten, welche dann eingekapselt um weitere 24 Stunden fixiert wurden.

Nach der Fixierung muss das Gewebe in einem Block eingebettet werden. Der Einbettvorgang erfolgte in einem Automaten. Bei unseren Gewebsschnitten wurde hierfür flüssiges Paraffin verwendet. Zuvor wurde aus den Gewebsschnitten das Wasser entfernt, indem das Gewebe eine aufsteigende Alkoholreihe passierte. Danach wurde das Gewebe in Xylol getränkt, welches als Intermedium sowohl alkohol- als auch paraffinlöslich ist. Nachdem so die letzten Reste des Alkohols ausgewaschen wurden, erfolgte die Zugabe des auf 60 °C erhitzten Paraffins. Das Paraffin lagert sich im Gewebe überall dort an, wo zuvor Wasser war. Sobald der Paraffinblock abgekühlt war, wurde dieser aus der Form gelöst und im Eisfach gekühlt. Mit einem Schlittenmikrotom wurden dann 2 -3 µm dünne Gewebsschnitte angefertigt und auf beschichteten Objektträgern („Superfrost Plus“) aufgebracht.

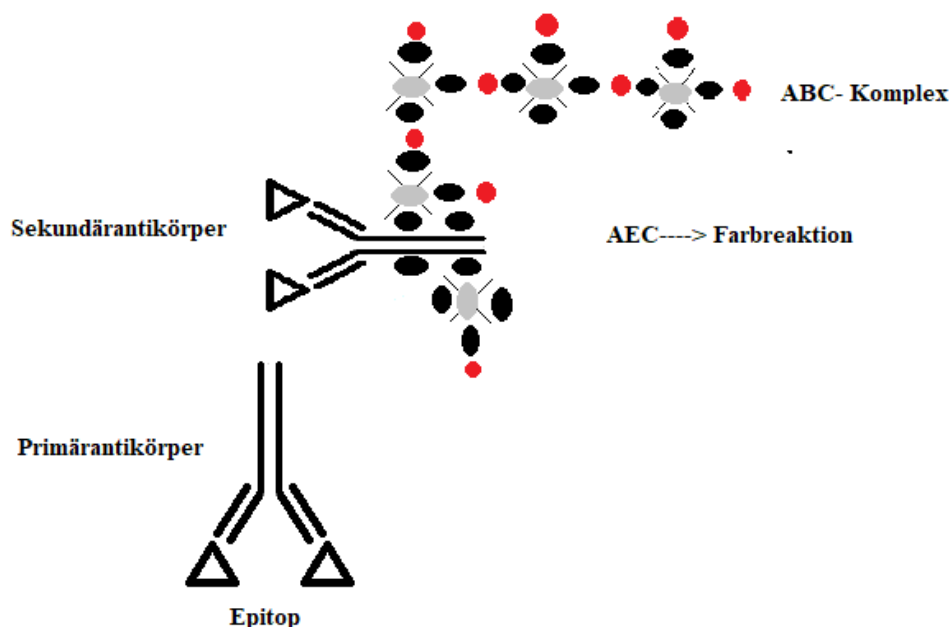
#### **3.3.2 Immunhistochemische Färbung**

Um vor Beginn des Färbeprozesses das Paraffin zu entfernen, mussten die Gewebsschnitte in Xylol getränkt werden. Die Xylol-Reste wurden anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (Ethanol) entfernt. Um die endogenen Peroxidasen zu inaktivieren, wurde zwischen den Alkoholen, die Gewebsschnitte in 3 %-igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol getränkt. Dieser Schritt ist wichtig, um später eine unspezifische Färbung und somit falsch-positive Ergebnisse zu vermeiden. Zuletzt wurden die letzten Ethanolreste mit Schwenken in Aqua dest. herausgelöst. Um die Antigene später in der Färbung nachweisen zu können, ist es wichtig die Proteinnetze, welche durch Formalin gebildet wurden, zu lösen. Hierzu wurden die Gewebsschnitte im Citratpuffer erhitzt.

Gleiche Wirkung erzielt man durch Hinzugabe von proteolytischen Enzymen, wie z.B. Protease oder Neuraminidase.

Im nächsten Schritt wurde auf die einzelnen Gewebsschnitte der Primärantikörper hinzugegeben. Um ein Austrocknen der Schnitte zu verhindern, wurden die folgenden Schritte in einer feuchten Kammer durchgeführt. Je nach Antikörper erfolgt die Inkubationszeit im Brutschrank. In unsere Studie erfolgte sie über 16 Stunden bei 4 °C im Kühlschrank. Um eine unspezifische Bindung des Primärantikörpers zu vermeiden, wurde ein Blockiermedium aus dem jeweiligen Detektionskit (z.B. Powerblock) hinzugegeben. Dieses sättigt die elektrostatischen Ladungen im Gewebe ab.

Zur Detektion des gebundenen Primärantikörpers gibt es nun zwei Verfahren, die eine Darstellung ermöglichen. Eine Möglichkeit der Darstellung ist die ABC – Methode (Avidin – Biotin – Komplex). Diese beruht auf der Affinität von Avidin zu Biotin. Da unter Avidin unspezifische Reaktionen auftreten können, wird häufig Streptavidin verwendet, welches aus dem Bakterium „Streptomyces avidinii“ gewonnen wird. Bei der ABC-Methode werden biotinylierte Brückenantikörper hinzugefügt. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, während Streptavidin ein Glykoprotein mit 4 Bindungsstellen für Biotin ist. Der biotinylierte Brückenantikörper bindet nun den ABC-Komplex. Hierbei wird an 3 von 4 Bindungsstellen des Streptavidins ein Biotinmolekül gebunden. An den Komplex ist das Enzym Peroxidase gekoppelt. Durch Hinzugabe einer Substrat/Chromogenlösung wird eine Reaktion der Peroxidase katalysiert. Infolgedessen kommt es im Bereich des Komplexes zum Farbniederschlag, dieser wiederum ist im Lichtmikroskop sichtbar (Noll et al., 2000).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung des ABC – Komplexes**

Eine weitere Möglichkeit zur Darstellung des gebundenen Primärantikörpers ist die ZytoChem – Plus HRP (=Horse Radish Peroxidase) Polymer – Methode. Diese wurde in unserer Studie

verwendet. Es handelt sich hierbei um ein Enzympolymer, welches mehrere Moleküle eines Sekundärantikörpers enthält, die an die Peroxidase – Moleküle gekoppelt sind. Die Peroxidase ist ein Enzym, welches aus der Meerrettichwurzel gewonnen wird. Die Schnitte wurden zunächst entparaffiniert und rehydratisiert. Nach Inaktivierung der endogenen Peroxidase durch 3 %-ige H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Lösung („Peroxid Block“) erfolgte die Inkubation mit einer Blockierungslösung („Blocking solution“ Reagent 1). Hierdurch konnte später eine unspezifische Bindung der Antikörper (sowohl des Primärantikörpers als auch des Sekundärantikörpers im HRP Polymer) reduziert werden. Danach erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper. Nach der Inkubation wurden die Schnitte gewaschen und ein Verstärkungsreagenz („Post Block“ = Reagent 2) zugesetzt. Im Anschluss daran wurden die Schnitte erneut gewaschen und das HRP – Polymer (Reagent 3) aufgetragen. Nach einem weiteren Waschschrift erfolgte die Zugabe von Substrat/Chromogenlösung, wodurch die enzymatische Reaktion katalysiert werden konnte. Es kommt zum Farbniederschlag im Bereich des Antikörpers (Noll et al., 2000).

Das farbige Endprodukt (hier rotbraun) entstand durch die Farbreaktion des Enzyms Peroxidase mit dem jeweiligen Chromogen (AEC oder DAB). Als Katalysator fungierte der Substratpuffer H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Das Gegenfärben erfolgte mit saurem Hämalaun nach Mayer. Diese ist eine basische Farbe in saurer Lösung. Bei niedrigem pH-Wert kommt es zur negativen Ladung der Kerne (Phosphatgruppe der DNS), an welche die basischen Farbstoffe, welche positiv geladen sind, binden. Folglich kommt es bei diesem pH-Wert am stärksten zu einer Kernfärbung. Die Säurereste wurden anschließend mit Leitungswasser ausgewaschen.

Zum Entwässern der Schnitte (Färbung mit DAB) durchliefen diese eine aufsteigende Alkoholreihe. Zuletzt wurden sie in Xylol getränkt (zum Aufhellen) und danach mit Einschlussmitteln (hier Eukitt) luftdicht verklebt. Wurden die Schnitte mit AEC gefärbt, entfällt der Waschvorgang mit der aufsteigenden Alkoholreihe. Die Schnitte wurden direkt nach Schwenken mit Aqua dest. mit hydrophilem Eindeckmedium (Aquatex) luftdicht eingeschlossen.

Zur Kontrolle des Färbeproganges wurde eine Positivkontrolle sowie Negativkontrolle mitgefärbt. Bei der Positivkontrolle handelt es sich um ein Gewebe, das sicher mitgefärbt wird, da es das Antigen enthält. Die Negativkontrolle hingegen weist das jeweilige Antigen nicht auf und zeigt somit keinen Farbniederschlag. Hiermit konnte eine unspezifische Reaktion der Antikörper (Primär – und Sekundärantikörper) ausgeschlossen werden.

### 3.3.3 Färbeprotokoll für TAAR 1

Für die immunzytochemische Färbung der Mammakarzinom- Paraffinschnitte wurde verwendet:  
**Primärantikörper:** TA1 (polyclonal, Rabbit IgG) der Firma Abcam. Verdünnung AK -> 1:800 in PBS.

**Detektionssystem:** Zytochem Plus HRP Polymer System (Rabbit/Mouse) (Zytomed)

**Chromogen – Substrat- Lösung:** Liquid DAB + Substrate Chromogen System (Dako)

Als Grundlage des Färbeprotokolls wurden ältere erfolgreiche Protokolle des Labors herangezogen.

1. Zunächst erfolgte das Entparaffinieren, indem die Schnitte für 20 Minuten in Xylol getränkt wurden.
2. Danach wurden die Schnitte in 100 %-igem Ethanol geschwenkt.
3. Im nächsten Schritt wurden die endogenen Peroxidasen inaktiviert. Hierfür wurden die Schnitte für 20 Minuten in 3 %- igem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in Methanol (=3 ml 30 %H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 97 ml Methanol) gelegt.
4. Die Schnitte werden erneut in 100% Ethanol und danach in Küvetten mit einer absteigende Alkoholreihe geschwenkt.
5. Nach der Alkoholreihe wurden die Schnitte in Aqua dest. geschwenkt, um die Ethanolreste zu entfernen.
6. Es erfolgte die Denaturierung, indem die Schnitte in einem Schnellkochtopf mit Natrium- Citratpuffer (ph =6,0) erhitzt wurden.

Zur Herstellung der Lösung:

*Lsg A. 21,01g 0,1 M Citronensäure (Firma Merck KGaA) + 1 l Aqua dest.*

*Lsg B. 29,41g 0,1 M Na- Citrat (Firma Merck KGaA) + 1 l Aqua dest.*

*Gebrauchslösung: 18 ml Lsg. A + 82 ml Lsg. B + 900 ml Aqua dest.*

7. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte in Aqua dest. gespült.
8. Die Schnitte wurden 2 x 2 Minuten in PBS mit 0,05% Tween gewaschen (= 500 ml PBS + 250 ug Tween). Tween ist ein Tensid. Durch Zugabe dieses konnte eine un spez. Hintergrundfärbung minimiert werden.
9. Die Gewebsschnitte wurden für 15 Minuten mit der „Blocking Solution“ (Reagent 1) benetzt. Dieser Schritt dient dazu, dass die Antikörper nicht unspezifisch an Membranen und Fettgewebe binden, indem die elektrostatischen Ladungen abgesättigt werden.
10. Der Primärantikörper wurde auf die Gewebsschnitte aufgetragen und über 16 Stunden bei 4°C im Kühlschrank inkubiert.
11. Gewebsschnitte wurden erneut 2x 2 Minuten in PBS/0,05% Tween gewaschen
12. Der Post Block (Reagent 2) wurde auf die Schnitte aufgetragen und für 20 Minuten eingewirkt.
13. Die Gewebsschnitte wurden 2 x 2 Minuten in PBS/0,05% Tween gewaschen
14. HRP – Polymer (Reagent 3) wurde aufgetragen und für 30 Minuten belassen.
15. Anschließend erfolgte erneut ein Waschvorgang über 2x 2 Minuten in PBS/0,05% Tween.
16. Die Substratfärbung mit DAB – Lösung = 1 ml Substratpuffer + 1 Trpf. DAB – Chromogen wurde auf die Schnitte aufgetragen und für 40 Sekunden eingewirkt.
17. Schnitte wurden erneut für 2 x 2 Minuten in Aqua dest. gewaschen, um die Farbreaktion zu stoppen

18. Es erfolgte das Gegenfärben, indem die Gewebsschnitte für 2 Minuten in saurem Hämalun nach Mayer getränkt wurden
19. 5 Minuten in Leitungswasser bläuen
20. Zum Entwässern der Schnitte durchliefen die Schnitte eine aufsteigende Alkoholreihe bis Xylol
21. Zuletzt erfolgte das Eindecken mit Eukitt, um die Schnitte haltbar zu machen

### Auswertung

Die Auswertung der Schnitte erfolgte an einem Zeiss – Mikroskop. Zur Beurteilung der Färbung wurde die Beurteilungsskala nach Remmele und Stegner, der Immunreaktive Score (IRS-Score), herangezogen. Der Score wird ermittelt, indem die Farbintensität mit dem Anteil der positiven Zellen multipliziert wird (Elston & Ellis, 1991; Kaemmerer et al., 2012).

Percentage of positive cells	X Intensity of Staining	= IRS (0 - 12)
0 = no positive cells	0 = no colour reaction	0 - 1 = negative
1 = < 10% of positive cells	1 = mild reaction	2 - 3 = mild
2 = 10-50% positive cells	2 = moderate reaction	4 - 8 = moderate
3 = 51-80% positive cells	3 = intense reaction	9 - 12 = strongly positive
4 = > 80% positive cells		
IRS - points		IRS - classification
0 - 1		0 = negative
2 - 3		1 = positive, weak expression
4 - 8		2 = positive, mild expression
9 - 12		3 = positive, strong expression

**Abbildung 4: Ermittlung des IRS - Score nach Remmele und Stegner (Kaemmerer et al., 2012)**

### Statistische Analyse

Zur Analyse wurde das Programm SPSS Statistics 22 verwendet. Alle Ergebnisse  $< 0,05$  wurden als statistisch signifikant gewertet. Die Analyse der Überlebenszeit erfolgte nach dem Kaplan – Meier – Verfahren. Zur Beurteilung der Unterschiede im Gesamtüberleben wurde ein Log-Rank-Test –durchgeführt. Die Gruppenunterschiede verschiedener Variablen wurden durch die nicht - parametrischen Tests Wilcoxon-Mann-Whitney und dem Kruskal- Wallis-Test beurteilt. Korrelationsüberprüfungen erfolgten anhand von der Spearman – Korrelation. Zur Beurteilung der Todesfälle mit und ohne TAAR-Expression wurde eine COX-Regressionsanalyse durchgeführt.

## 3.4 Western Blot

### 3.4.1 Zellkultivierung

Für die Untersuchungen wurden die Mammakarzinom- Zelllinien MCF7 und HCC3153 verwendet. Die Zelllinie HCC3153 charakterisiert sich durch eine Mutation in der BRCA1-Region. Die Zelllinie HCC3153 wurde von der American Type Culture Collection (ATCC) und die Zelllinie MCF7 von der European Collection of Cell Cultures (ECACC) bezogen. Die Zelllinien MCF7 und HCC3153 wurden bis zum Zeitpunkt des Aussäens in Kryoröhrchen in Stickstofftanks aufbewahrt. Zu Beginn unserer Versuchsreihe wurden diese ausgesät und in T75 – Zellkulturflaschen angelegt. Die Zelllinien wurden bei 37 °C und einem CO<sub>2</sub>- Gehalt von 5 % bebrütet. Je nach Wachstumsverhalten wurde für die verschiedenen Zelllinien die optimale Zellzahl zum Aussäen ermittelt. Jede Woche wurden die Zellen neu ausgesät. Zusätzlich erfolgte ein Mediumwechsel 1 x pro Woche. Ziel war es, ein so großes Zellwachstum zu erreichen, dass nach einer Woche ein Monolayer gebildet wird, d.h. die adhärennten Zellen eine Schicht auf dem Boden bilden. Zum Mediumwechsel wurde die alte Mediumlösung mit einer Pipette abgezogen und verworfen sowie neues Medium (Dulbeccos DMEM + 10 %FCS) angewärmt hinzugegeben. Beim Vorgang des Aussäens wurde nach Abziehen des Mediums die Zellkulturflasche mit PBS gewaschen. Dieser Vorgang ist wichtig, um die FCS-Reste auszuwaschen. Das FCS kann sonst im nächsten Schritt die Wirkung des Trypsins hindern. Anschließend wurde Trypsin in die Flasche pipettiert und für 8 Minuten bei 37 °C inkubiert. Trypsin führt zur Lösung der Zellverbindungen. Hierdurch kann eine bessere Lösung der Zellen vom Flaschenboden erreicht werden. Im nächsten Schritt wurden 8 ml DMEM/FCS Medium in die Flasche hinzugegeben. Es erfolgt ein vorsichtiges Mischen. Mit der Pipette wurden nun die 10 ml Zellsuspension aufgezogen und in ein Falcon Tube überführt. Zuvor wurden 2 Tropfen der Suspension in ein Eppendorfgefäß pipettiert. Diese wird zur Zellzählung herangezogen. 25 µl aus dem Eppigefäß wurden entnommen und in ein Eppendorf – Gefäß mit Trypanblau/PBS hinzugegeben. Die Lösung wurde gemischt und anschließend auf eine Neubauer- Zählkammer gegeben. Trypanblau wird zur Beurteilung der Zellvitalität herangezogen. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, erscheinen daher hell/weiß, während abgestorbene Zellen den blauen Farbstoff aufnehmen. Mikroskopisch wird die Anzahl der vitalen Tumorzellen ermittelt (anhand von 4 Quadranten). Die Falconflasche mit der Zellsuspension wurde in der Zwischenzeit zentrifugiert. Im nächsten Schritt wurde der Überstand entnommen und verworfen. Je nachdem welche Zellzahl ermittelt wurde, wurde dem Zellpellet entsprechend Medium hinzugefügt, sodass die gewünschte Zellzahl (hier 1 Mio.) erreicht wurde. Die Zellkulturflasche mit 12 ml Medium wurde bis zum nächsten Mediumswechsel in den Brutschrank gestellt. Für die Stimulationsexperimente wurden die Zellen auf 16-Well-Platten ausgesät.

### 3.4.2 Zellstimulierung

Allen Zelllinien wurden folgende Stimulanzen hinzugefügt: Tetrac, T3, Tyramin, T3 + Tetrac. Die Zelllinien wurden gesplittet. 400 000 Zellen jeder Zelllinie wurden in einer 16 – Well – Platte mit jeweils 1 ml DMEM mit 10% FCS Lösung angelegt und über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurde nach Kontrolle eines soliden Zellwachstums die DMEM – Lösung abgezogen. Nun wurde

Tetrac (in Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$ ), T3 + Tetrac (T3 in Konzentration mit 0,01 und 0,1 nM und Tetrac in Konzentration von 0,01 und 0,1  $\mu\text{M}$ ), Tyramin (in Konzentration von 0,01 und 0,1 nM) und T3 (in Konzentration von 0,01 und 0,1  $\mu\text{M}$ ) hinzugefügt und für 48 Stunden bei 37 °C inkubiert. Nicht-stimulierte Zellen wurden als Kontrolle mitgeführt. Es erfolgte ein Mediumwechsel nach gleicher Vorverdünnung mit dem Lösungsmittel. Nach der 48h – Inkubationszeit wurden die Zellen mit einem Zellscraper vom Boden gelöst. Die Lösung mit den Zellen wurde abgezogen und in Falcon Tubes gegeben. Diese wurden bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde abgezogen und durch PBS ersetzt. Es erfolgte eine weitere Zentrifugation für 5 Minuten (siehe Protokoll unten).

### 3.4.3 Herstellung von Zellysaten

Die Zellen wurden kultiviert. Zur Proteingewinnung wurden bei der Zellkultivierung von allen Zelllinien 5 Mio. Zellen gesplittet und in ein Eppendorfgefäß überführt. Es erfolgte die Zentrifugation bei 2000 rpm für 5 Minuten. Der Überstand wurde abgezogen und verworfen. Es wurde mit 1 ml kaltem PBS gespült, anschließend wurde die PBS Lösung wieder abgezogen. Die Eppendorfgefäße wurden erneut in die Zentrifuge gestellt und bei 2000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgezogen und verworfen. Nun wurde der kalte Ripa – Puffer mit dem Protease-Inhibitor-Cocktail hinzugegeben (PIC =Protease – Inhibitor- Cocktail).

Ansatz: Protease – Inhibitor – Cocktail 1:100 verdünnt mit Ripa - Buffer

Pro Eppendorfgefäß wurden 250  $\mu\text{l}$  der angesetzten Lösung hinzugegeben. Anschließend erfolgte die Inkubation für 30 Minuten auf Eis auf einem Rüttler im Kühlraum. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 4°C mit 12000 rpm. Die Proteine befinden sich im Überstand der Eppendorfgefäße. Diese wurden abgezogen und in neue Eppendorfgefäße überführt. Für die quantitative Proteinbestimmung nach Bradford wurden 20  $\mu\text{l}$  des Zellysatüberstandes entnommen. Die verbleibenden Zellysate wurden eigenfrozen und zum späteren Zeitpunkt zum Erstellen von Western Blot Proben verwendet.

Zur Beurteilung des Expressionsverhalten wurden die Zelllinien mit Tetrac, Tyramin, T3 sowie Tetrac + T3 stimuliert.

### 3.4.4 Proteinbestimmung/Proteinassay nach Bradford

Zunächst wurde die Bradfordreagenz verdünnt. In unserem Protokoll erfolgte die Verdünnung der Bradfordreagenz im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. Die verdünnte Lösung ist bei Raumtemperatur circa 14 Tage haltbar. Die angesetzte Lösung wurde anschließend mit einem Filterpapier gefiltert. Die Zellysate wurden im Verhältnis 1:5 mit Aqua dest. verdünnt. Zwischen den Schritten wurden die Lysate mehrfach mittels Vortex geschüttelt, um ein Absetzen zu verhindern.

Zur Kalibrierung erfolgt die Ermittlung einer Standardkurve. Hierfür erfolgte die Verdünnung des Bradford – Standards (Konzentration 1,41 mg/ml) mit Aqua dest. nach folgendem Protokoll:



1000 µg/ml	= 709 µl Standard (unverdünnt) + 291 µl Aqua dest.
800 µg/ml	= 400 µl Standardlösung (1000 µg/ml) + 100 µl Aqua dest.
400 µg/ml	= 200 µl Standardlösung (800 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.
200 µg/ml	= 200 µl Standardlösung (400 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.
100 µg/ml	= 200 µl Standardlösung (200 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.
50 µg/ml	= 200 µl Standardlösung (100 µg/ml) + 200 µl Aqua dest.

Die Proben wurden angesetzt. Für den Nullwert wurde ein Gemisch mit 1 ml Bradford – Reagenz und 20 µl Aqua dest. angesetzt. Die Küvetten zur Ermittlung der Standard-Kurve wurden mit 1 ml Bradford- Reagenz und 20 µl der entsprechenden Bradford – Standard Verdünnung zugesetzt. Von den stimulierten und nicht-stimulierten Zellysaten wurden 20 µl abgezogen und mit 1 ml Bradford – Reagenz gemischt. Von den angesetzten Proben wurden 1 ml Lösung in Küvetten überführt. Mit diesen wurde dann am Photometer die Proteinkonzentration ermittelt. Nach Ansatz der Lösungen sollte innerhalb von 5 bis spätestens 60 Minuten die Messung am Photometer erfolgen. Durch Zugabe der Bradford Reagenz kommt es zur Bindung von Coomasie-Blau an die Proteine der Probe. Hierdurch kommt es zu einer Farbveränderung mit der Folge, dass sich das Absorptionsmaximum verschiebt.

Am Photometer erfolgte die Proteinbestimmung, nachdem zuvor die Standard-Kurve angelegt wurde. Die ermittelte Proteinkonzentration wurde je nach Proteinverdünnung multipliziert (in unserem Protokoll x 5). Ausgehend von dem Lysat mit der niedrigsten Proteinkonzentration, wurde die Proteinmenge für 15 µl ermittelt. Die Lysate mit höherer Proteinkonzentration wurden entsprechend der ermittelten Proteinmenge verdünnt. Zudem wurde jeder Probe 5 µl Probenpuffer (= Roti – Load) hinzugefügt. Pro WB - Ansatz wurde eine Zellysatlösung mit 20 µl erstellt. Der Probenpuffer denaturiert die Proteine und sorgt für eine negative Ladung der Proteine. Dadurch wird die Migration der Proteine besser sichtbar.

### 3.4.5 Western Blot Methode

Die Proteine werden während der Elektrophorese entsprechend ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Das Blotting selbst bezeichnet den Vorgang der Proteinübertragung auf eine Membran. Anschließend erfolgt die Farbdarstellung des jeweiligen Antikörpers.

#### Gelelektrophorese

Vorbereiten der Puffer: Zur Herstellung des Laufpuffers (Tris/Glycerine/SDS Puffer) wurden 100 ml des Laufpuffers mit 900 ml Aqua dest. angesetzt. Der Blotpuffer (Tris/Glycerin Puffer) setzte sich aus 100 ml Blotpuffer, 200 ml Methanol und 700 ml Aqua dest. zusammen. Die Blotpuffer wurden auf Eis gestellt.

Probenvorbereitung: Der Thermoblock wurde auf 95 °C angeheizt. Nachdem die Proteinkonzentration der stimulierten und nicht stimulierten Zelllysate über ein Proteinassay nach Bradford ermittelt wurden, wurde die gewünschte Proteinmenge (hier 14,4 µg) mit 5 µl des Probenpuffers (= Roti Load) angesetzt und mit Aqua dest. auf 20 µl in Eppendorfgefäße gefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Proben im Thermoblock bei 95 °C für 5 Minuten erhitzt. Dieser Vorgang dient dazu, die Proteine zu denaturieren. Anschließend wurden die Proben auf Eis gestellt. Bevor sie in die Geltaschen eingesetzt werden, erfolgte kurz die Zentrifugation, um ein Absetzen der Proteine zu vermeiden.

Vorbereiten des Elektrophorese-Tanks: Zwei Gele mit 10 bis 12 Taschen wurden vorsichtig in das Elektroden-Assembly angebracht, welches anschließend in den Tank gesetzt wurde. Die innere und äußere Kammer des Tanks wurden mit dem Laufpuffer gefüllt. Im nächsten Schritt wurden die Geltaschen mit einer Pipette vorsichtig mit dem Laufpuffer gespült. Im darauffolgenden Vorgang wurden zuerst der Protein -Standard in die äußeren Taschen und dann die zu untersuchenden Proben in die weiteren Taschen eingebracht (18 µl). Der Protein- Standard als Marker dient zur optischen Beurteilbarkeit der Elektrophorese und dem Molekulargewicht.

Gelelektrophorese: Anschließend wurde der Tank mit dem Deckel verschlossen und das Gerät ans Stromnetzwerk angeschlossen. Die Elektrophorese lief zunächst für 30 Minuten bei 80 V. Danach wurde die Spannung auf 100 Volt erhöht und die Elektrophorese für weitere 50-60 Minuten fortgesetzt. Zur Orientierung wurde die Lauffront (=blaue Linie) des Proteinstandards herangezogen. Sobald diese ganz unten ist, ist die Elektrophorese durchgelaufen.

Blotting: Nach Durchlaufen der Elektrophorese wurden die Gelkassetten aus dem Tank entnommen. Die Gelplatte wurde im nächsten Schritt vorsichtig von der Plastikkassette gelöst und anschließend in einen Behälter mit eiskaltem Blotpuffer gelegt und für 10 Minuten eingeweicht. Während die Gelelektrophorese läuft, wurden Filterpapier und Fiberpads in altem Blotpuffer und die Polyvinylidene Fluoride Membran (=PVDF) in Methanol eingeweicht. Zur Hilfe des Blottings auf die Membran wurde eine Mini-Trans-Blot Kassette verwendet. Fiberpad, Filterpapier und das Gel wurden hintereinander auf die schwarze Seite der Kassette angebracht. Im nächsten Schritt wurde die PVDF-Membran luftblasenfrei auf die Gelmembran gelegt. Anschließend wurde auf diese ein weiteres Filterpapier und Fiberpad angebracht, die Kassette vorsichtig geschlossen und in das Transfermodul eingesteckt. Diese wurde dann in den Transfertank eingehängt und für 75 Minuten bei 100 V an den Strom geschlossen. Zuvor wurde der Tank mit eiskaltem Blotpuffer gefüllt und ergänzend mit Kühlelementen umgeben. Nach dem Blotting wurde die Membran von der Kassette gelöst. War das Blotting auf die Membran erfolgreich, konnte diese anhand des farbigen Standards festgestellt werden.

### 3.4.6 TAAR 1- Detektion der Blot-Membran

	Trace amine associated receptor 1 antibody (Thermo Scientific, polyclonal Rabbit/ IgG)
--	--

Primärantikörper	Konzentration: 0,5 mg/ml
Proteinmenge/15 µl	14,4 µg
Verdünnung	1:500 (34 bzw. 39 kDa)
Endogene Kontrolle	Anti -alpha - Tubulin antibody (polyclonal Rabbit/IgG) Verdünnung 1: 1000 (Abcam)

Nachdem die Membran entsprechend zurechtgeschnitten wurde, werden sie bei Raumtemperatur auf einem Rüttler für 2 Stunden geblockt. Als Blockingpuffer wurde 5 % Milchpulver verwendet.

- Blockingpuffer = 2,5 g (5 %) Milchpulver + 50 ml PBS +50 µl (0,1%) Tween

Der Blockingpuffer wurde dann abgekippt. Der Primärantikörper wurde im Blockingpuffer 1:500 verdünnt. Die Verdünnungslösung wurde mit folgenden Konzentrationen hergestellt: 1 g (2 %) Milchpulver + 50 ml PBS +50 µl (0,1 %) Tween. Der verdünnte Primärantikörper wurde in die Wanne mit der PVDF – Membran hinzugeben, so dass die Membran vollständig bedeckt war. Die Wanne wurde dann im Kühlschrank bei 4 °C über 16 Stunde auf einem Rüttler inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran 5 Minuten in PBS, dann 2 x für 5 Minuten in Casein gewaschen. Als Detektionskit wird ähnlich der immunhistochemischen Färbung die Vectastain ABC – Amp Kit (ABC Methode) verwendet. Der biotinylierte Sekundärantikörper wurde in Casein verdünnt (5 µl der Antikörper Lösung auf 5 ml 1% Casein- Lösung = Konzentration von 1,5 µg/ml) und der Membran hinzugefügt. Diese wurde für 40 Minuten inkubiert. Im nächsten Schritt erfolgt ein Waschvorgang über 3x 5 Minuten in 1% Casein. Nun wurde die kurz zuvor angesetzte ABC-Lösung hinzugefügt und für 20 Minuten belassen. Zur Herstellung der ABC- Amp Lösung wurden 10 µl der Lösung A, 10 µl der Lösung B auf 5 ml 1% Casein hinzugegeben. Nach Entfernung der ABC Lösung wurde erneut 3x 5 Minuten mit Casein gewaschen. Anschließend wurde die Membran für 5 Minuten in 0,1 Molarem Tris Puffer (pH 9,5) gelegt. Ziel des nächsten Schrittes war es, durch eine Farbreaktion die Banden sichtbar zu machen. Hierfür wurde eine Chromogensubstratlösung angesetzt und der Membran hinzugefügt, bis die Bandenfärbung sichtbar ist. Zur Herstellung der BCIP/NBT – Chromogen – Substratlösung wurden 10 ml 0,1 M Tris Puffer pH 9,5 + 4 Trpf. BCIP Lösung 1 gemischt, dann 4 Tropfen NBT Lösung 2 hinzugefügt und erneut gemischt. Zuletzt wurden 4 Tropfen MgCl<sub>2</sub> – Lösung 3 hinzugefügt und die Lösung erneut gemischt. Die Farbreaktion wurde mittels Aqua dest. gestoppt.

Auswertung der Blot – Membran erfolgte mit der Bio- Rad Universal Hood II. Zur Analyse wurde die Bio Rad Quantity One® Software verwendet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Ergebnisse der Immunhistochemie

Nach der Antikörperfärbung der Gewebsschnitte erfolgte die mikroskopische Beurteilung. Zur Beurteilung der Antikörperexpression wurde der IRS – Score (=immunreaktive Score) nach Remmele und Stegner berücksichtigt. Das Expressionsverhalten nuklear und zytoplasmatisch wurde beurteilt. Eine relevante isolierte membranständige Färbung konnte in keinem der Gewebsschnitte gesehen werden und wurde daher in der Auswertung nicht berücksichtigt. Angaben zu Merkmalen des Patientenkollektivs und Tumormerkmale stammen unter anderem aus der Datenbank der Münchner Krebsregister (MCR) des Tumorzentrums München. Die statistische Auswertung und Analyse erfolgte mit der Software SPSS.

Die Einteilung der untersuchten Gewebssproben erfolgte nach verschiedenen Variablen und Charakteristika. Die histopathologische Einteilung der Subtypen erfolgte nach den WHO – Kriterien sowie das Tumorgrading nach den Elston und Ellis – Kriterien. Hierbei werden die Kernpleomorphie, die tubuläre Differenzierung und die Mitoserate beurteilt. Je nach Summenscore werden die Zellen in die Differenzierungsgrade G1 bis G3 eingeteilt. G1 gilt als gut differenziert, G2 als mäßig differenziert und G3 als gering differenziert. Weiter wurde eine Einteilung der untersuchten Gewebsschnitte nach der Tumorgroße (T), Lymphknotenmetastasen (N), Patientenalter, Gesamtüberleben, rezidivfreies Überleben, dem Hormonrezeptorstatus (ER/PR) sowie dem Vorkommen von HER2 und HER4 vorgenommen. Nachfolgend wurde die TAAR1-Expression in Berücksichtigung der Merkmale analysiert.

Das Patientenkollektiv setzte sich aus 227 Patienten zusammen.

- Tumorgroße: 154 der Patienten (67,8 %) hatten einen Tumor kleiner und gleich 2 cm (Stadium pT1), 72 Patienten (31,7 %) wiesen einen Tumor größer 2 cm im größten Durchmesser auf (entsprechend Stadium pT2 bis pT4). Bei einem Patienten konnte die Tumorgroße nicht bestimmt werden (0,5 %).
- Tumorgrading: In 103 Fällen (45,4 %) waren diese gut bis mäßig differenziert (G1 oder G2), 53 Tumore (23,3 %) zeigten eine G3- Differenzierung. Bei 71 Tumoren (31,3 %) wurde aufgrund des histopathologischen Subtyps keine Differenzierung vorgenommen
- Lymphknotenmetastasen (N): 122 Patienten (53,7%) zeigten keine Lymphknotenmetastasen, 93 Patienten (41 %) wiesen Lymphknotenmetastasen auf. In 5,3 % Fällen wurde kein Lymphknotenstatus erhoben.
- Hormonrezeptoren (ER/PR): 175 der Tumore (77,1%) waren positiv auf den Östrogenrezeptor (ER – positiv), 30 der Tumore (13,2 %) zeigten keine Expression des Östrogenrezeptors (ER – negativ). Der Progesteronrezeptor konnte in 128 Fällen (56,4 %) nachgewiesen werden (PR – positiv). 62 Tumore (27,3 %) waren PR – negativ. Der Östrogenrezeptorstatus wurde in 22 (9,7 %) und der Progesteronrezeptorstatus in 37 Fällen (16,3 %) nicht erfasst.

- HER2/HER4: Die Erhebung des HER2 – Status erfolgte retrospektiv in Kooperation mit dem pathologischen Institut der LMU. 181 Fälle (79,8 %) waren HER2 – negativ und 23 (10,1 %) HER2 – positiv. In 23 Fällen (10,1 %) wurde keine ausreichende Erhebung erfasst. 16 Tumore (7,0 %) waren HER4 – positiv und 201 Tumore HER4 – negativ (88,6 %). In 10 Fällen wurde der HER4 – Status nicht erhoben (4,4 %)
- Alter: 136 Patienten (60 %) waren älter als 55 Jahre, während 90 Patienten (39,6 %) 55 oder jünger waren.
- Histologie: in 131 Fällen (57,7 %) wurde ein invasives Karzinom ohne speziellen Typ (NST = invasive carcinoma of no special type, ehemals invasiv - duktales Karzinom nicht anders spezifiziert) nachgewiesen, die restlichen 96 (42,3 %) waren invasive Karzinome mit speziellem Typ (nicht NST). Diese umfasst lobuläre, medulläre, muzinöse, tubuläre, papilläre und ducto – lobuläre Karzinome.

		Häufigkeit	Prozent (%)
Histologie	NST	131	57,7
	Non NST	96	42,3
Alter	> 55 Jahre	136	60,0
	≤ 55 Jahre	90	39,6
	Nb	1	0,4
Tumorgroße pT	pT1	154	67,8
	pT2 – pT4	72	31,7
	Nb (Nicht bestimmt)	1	0,5
Lymphknotenmetastasen	pN0	122	53,7
	pN1	93	41,0
	Nb	12	5,3
Tumorgrading	G1, G2	103	45,4
	G3	53	23,3
	Nb	71	31,3
CIS	Ja	120	52,9
	Nein	107	47,1
ER – Status	Positiv	175	77,1
	Negativ	30	13,2
	Nb	22	9,7
PR - Status	Positiv	128	56,4
	Negativ	62	27,3
	Nb	37	16,3
HER2	Positiv	20	8,8
	Negativ	160	70,5
	Nb	47	20,7
HER4	Positiv	16	7,0
	Negativ	201	88,6

Nb	10	4,4
----	----	-----

**Tabelle 1: Merkmale des Patientenkollektivs**

Die Färbung wurde im Zytosol und Zellkern getrennt ausgewertet. Eine relevante Membranfärbung konnte nicht gesehen werden.

Eine Expression (unabhängig von der Intensität) konnte in 218 (96 %) Gewebsschnitten im Zytoplasma und in 63 Schnitten (72,2 %) im Zellkern beobachtet werden.

TAAR1 - Expression im Zytoplasma		Anzahl	Prozent (%)
	TAAR1-negativ	9	4,0%
	TAAR1- positiv	218	96,0%

**Tabelle 2: TAAR 1 - Expression im Zytoplasma**

TAAR1- Expression im Zellkern		Anzahl	Prozent (%)
	TAAR1-negativ	164	72,2%
	TAAR1-positiv	63	27,8%

**Tabelle 3: TAAR 1 - Expression im Zellkern**

Folgende Tabelle zeigt die Verteilung des IRS-Scores im Zytoplasma. Der IRS – Score von 8 konnte am häufigsten (29,1%) beobachtet werden. In 9 Fällen (4%) war keine TAAR1-Expression zu beobachten. 23 Schnitte (10,1 %) zeigten einen IRS – Score von 12.

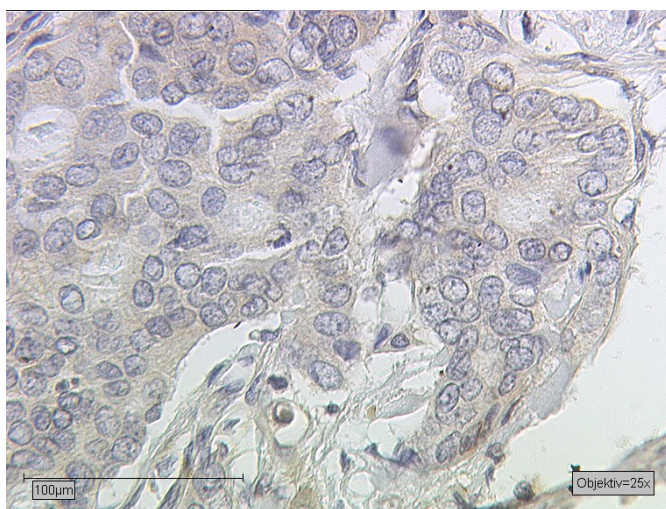
In 95 Fällen (41,9 %) konnte eine schwache Expression (IRS- Score kleiner 6) und in 127 der Fälle (55,9 %) eine starke Expression des TAAR1 (IRS- Score gleich 6 oder größer) beobachtet werden. In 5 Fällen (2,2 %) war keine Bestimmung möglich.

IRS – Score	n	Prozent (%)
0	9	4,0%
1	9	4,0%
2	28	12,3%
3	24	10,6%
4	28	12,3%
6	28	12,3%
8	66	29,1%
9	12	5,3%
12	23	10,1%

**Tabelle 4: Verteilung des IRS-Scores im Zytoplasma**

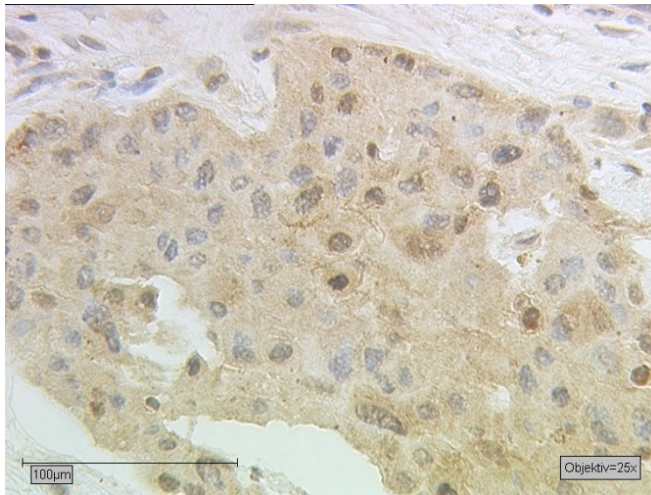
	n	Prozent (%)
IRS -Score < 6	95	41,9
IRS – Score ≥ 6	127	55,9
nb	5	2,2

**Tabelle 5: Verteilung IRS-Score größer gleich 6**

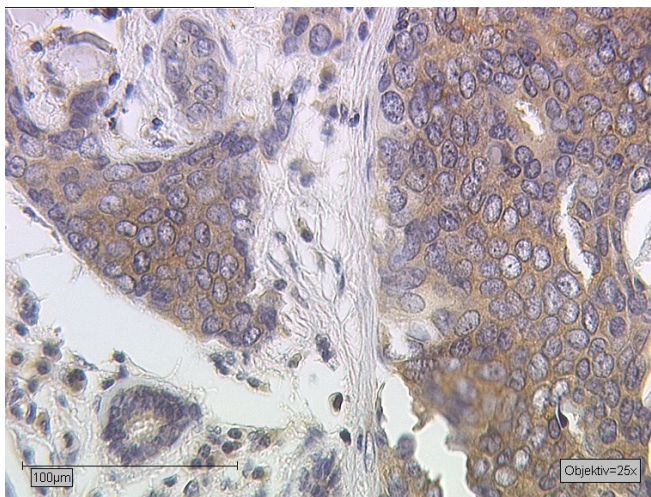


**Abbildung 5: Mammakarzinom mit schwacher TAAR1- Expression im Zellkern**

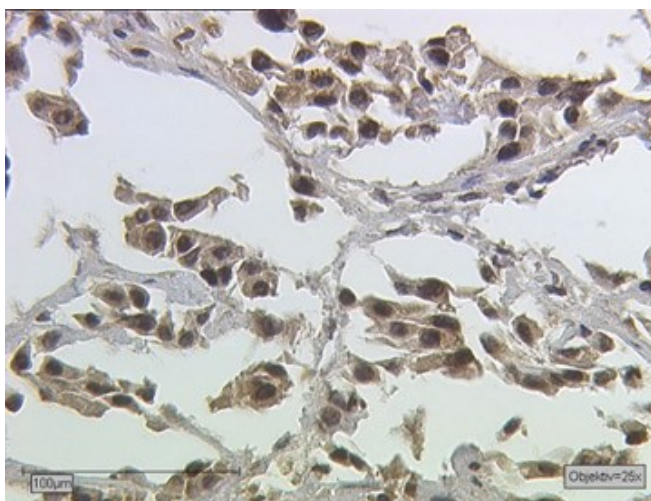




**Abbildung 6: Mammakarzinom mit mäßiger TAAR1- Expression im Zytoplasma**



**Abbildung 7: Mammakarzinom mit starker TAAR1-Expression im Zytoplasma**

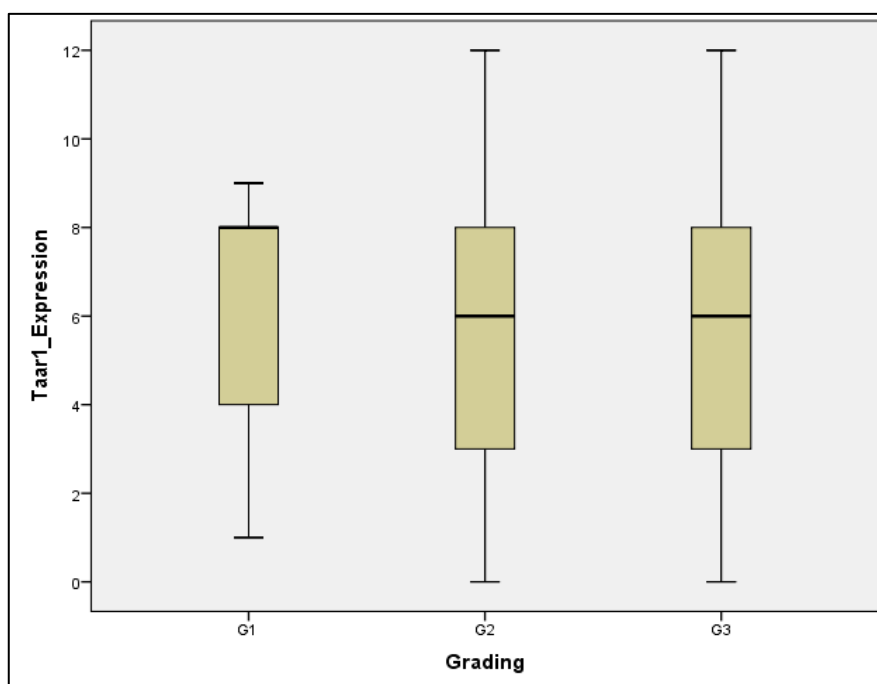


**Abbildung 8: Mammakarzinom mit mäßiger TAAR1-Expression im Zellkern**



### 4.1.1 TAAR1-Expression und Differenzierungsgrad der Tumore

Die Untersuchung der zytoplasmatischen Expression in Abhängigkeit vom Tumorigradung wurde untersucht. Hierbei konnte eine Korrelation der TAAR1- Expression mit dem Tumorigradung beobachten werden. Der Zusammenhang der Expression mit dem Tumorigradung wurde in einem Boxplot Diagramm festgehalten. In 17 Gewebsschnitten (10,9 %) zeigte sich eine G1 - Differenzierung, 86 der TAAR1 – positiven Schnitte (55,1 %) zeigten eine G2 – Differenzierung und in 53 Fällen (34,0%) lag eine G3 – Differenzierung vor. In der G1 – Gruppe zeigte sich der IRS – Medianwert bei 8, während in der G2 – und G3 – Gruppe ein IRS – Medianwert von 6 beobachtet wurde.



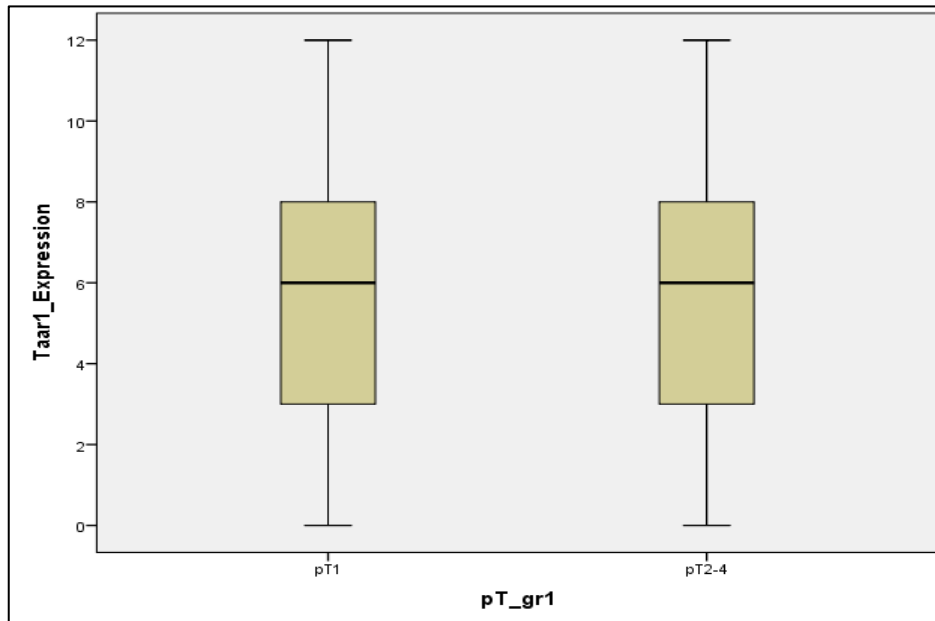
**Abbildung 9: Boxplot: TAAR1 – Expression und Tumorigradung.** G1 – Tumore zeigten einen mittleren IRS-Score von 8. Bei G2- und G3- Tumoren lag der mittlere IRS – Score bei 6

### 4.1.2 TAAR1 – Expression und Tumorigröße

In den untersuchten Gewebsschnitten konnte retrospektiv die Tumorigröße im Verhältnis zur TAAR1 – Expression untersucht werden. 153 (68%) der TAAR1 – exprimierenden Tumore waren zum Zeitpunkt der Entnahme pT1 – klassifiziert, 66 (29,3 %) der Tumore pT2-, 1 Schnitt (0,4 %) pT3- und 5 Schnitte (2,2 %) pT4 – klassifiziert. Eine signifikante Korrelation der Tumorigröße und der TAAR1 – Expression konnte nicht beobachtet werden. Eine Einteilung der Gruppe in Tumore, größer 2 cm zeigte in beiden Gruppen einen medianen IRS- Score von 6.

		n	%
TAAR1-Expression	pT1	153	68,0
	PT2	66	29,3
	pT3	1	0,4
	pT4	5	2,2

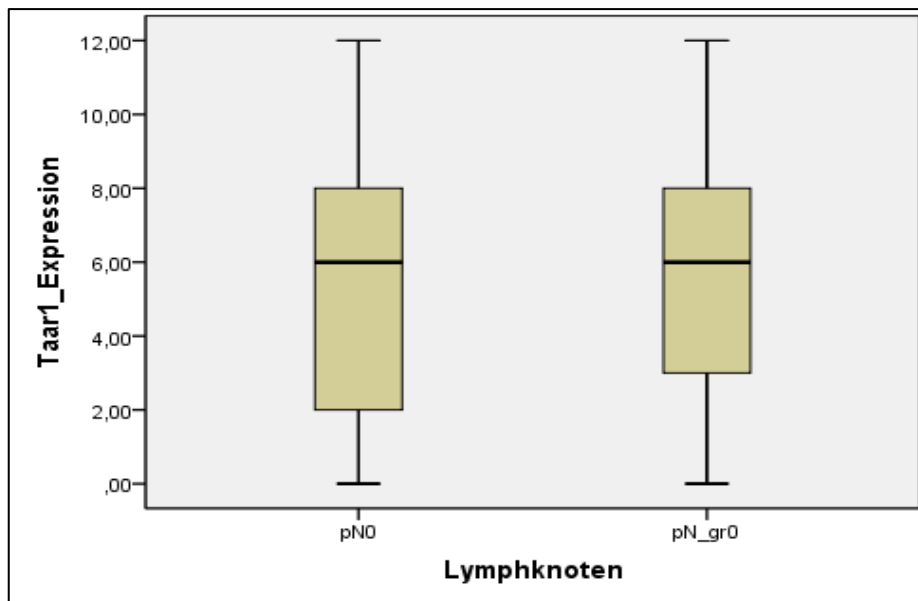
**Tabelle 6: TAAR1 – Expression in Abhängigkeit von der TumorgroÙe**



**Abbildung 10: Boxplot: TAAR1 – Expression und die TumorgroÙe.** Der mittlere IRS – Score der TAAR1 – Expression lag bei Tumoren >2 cm und Tumoren kleiner 2 cm bei 6.

#### 4.1.3 TAAR1 – Expression und Lymphknotenstatus

Der IRS – Score zytoplasmatisch wurde zudem retrospektiv in Abhängigkeit vom Vorhandensein von Lymphknotenmetastasen beurteilt. Hierbei wurden keine signifikanten Unterschiede ermittelt. In beiden Gruppen konnte ein IRS – Median von 6 gezeigt werden.



**Abbildung 11: Boxplot: TAAR1-Expression und Lymphknotenmetastasen.** Lymphatisch metastasierte Mammakarzinome zeigten einen mittleren IRS -Score von 6 in der zytoplasmatischen TAAR1 - Expression. Der mittlere IRS – Score von N0 - Mammakarzinomen lag ebenfalls bei 6.

#### 4.1.4 TAAR1 – Expression und histologischer Subtyp

Der IRS – Score im Zytoplasma wurde in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp untersucht. Signifikante Unterschiede konnten nicht nachgewiesen werden. Eine TAAR 1 – Expression konnte am häufigsten bei invasiven Karzinomen ohne speziellen Typ (NST, 55,6 %) gezeigt werden. Am zweithäufigsten konnte die Expression in invasiv lobulären Karzinomen (20,7 %), gefolgt vom medullären Karzinom (8,8%) gesehen werden.

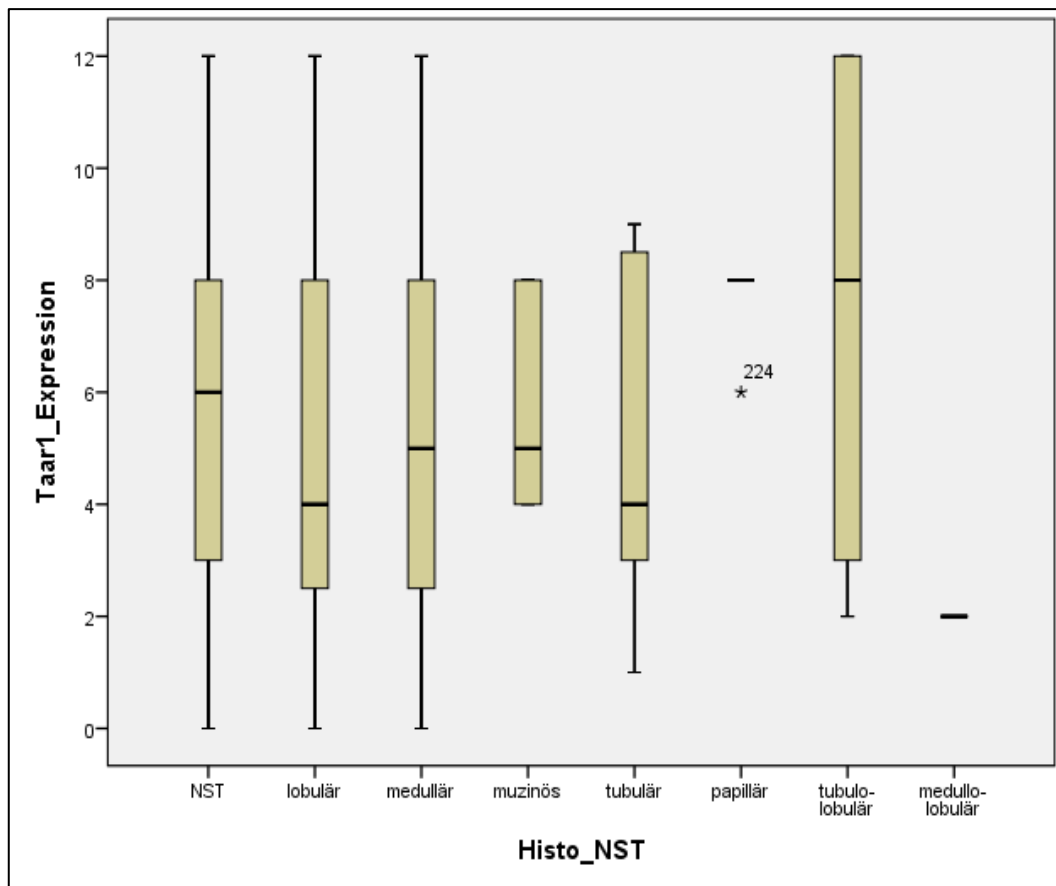
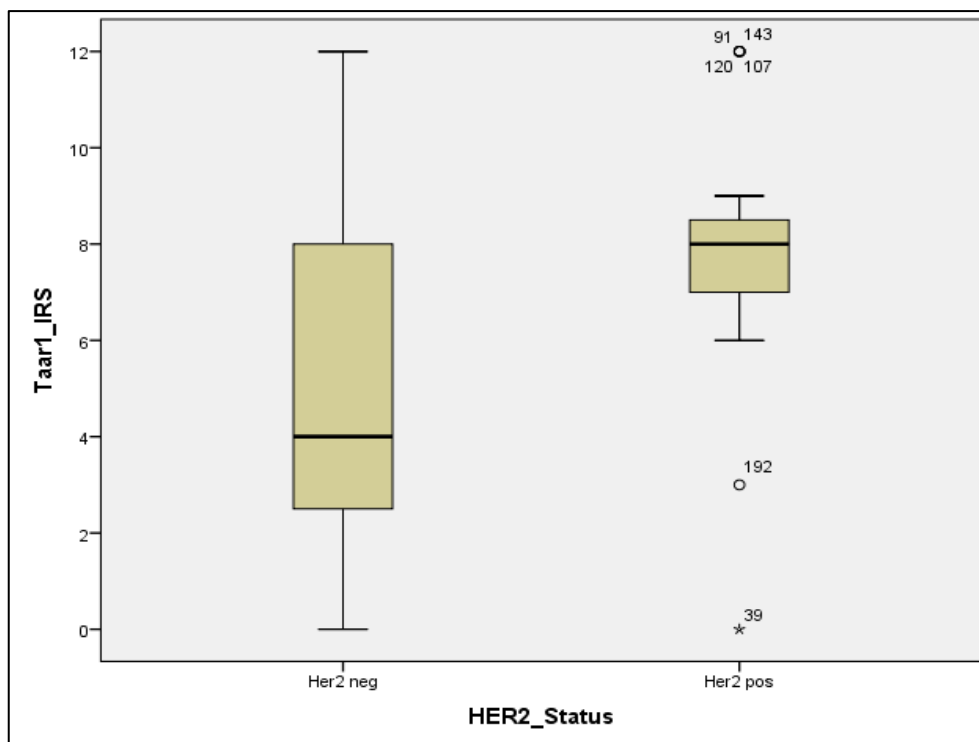


Abbildung 12: Boxplot: TAAR 1 - Expression in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp.

#### 4.1.5 Korrelation TAAR1 – Expression mit Vorliegen von HER2 – und HER4-Rezeptoren

Es konnte mit dem Kruskal – Wallis – Test eine signifikante Korrelation zwischen der TAAR1 – Expression und dem HER2 – Rezeptor nachgewiesen werden ( $p < 0,001$ ). Im nächsten Schritt wurde diese mithilfe des Mann-Whitney-U-Tests untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die zytoplasmatische TAAR1 – Expression höher bei HER2-positiven Tumoren ( $p = 0,001$ ) ist. Die HER2- positive Gruppe wies einen IRS – Median von 8 auf, während HER2 -negative Tumore einen mittleren IRS – Score von 4 zeigten. Darüber hinaus konnte eine signifikante Korrelation zwischen der Farbintensität, der zytoplasmatischen Färbung und dem HER2- Status gesehen werden ( $p = 0,004$ ). HER2 – positive Tumore zeigten eine intensivere TAAR1-Expression (90%  $\geq 2$ ) als HER2- negative Tumore. Es konnte keine Korrelation zwischen der nuklearen TAAR1 – Expression und dem HER2 – Status beobachtet werden.



**Abbildung 13: Boxplot: Die zytoplasmatische Expression von TAAR1 (IRS-Score) bei HER2- positiven und negativen Mammakarzinomen.** Der mittlere IRS -Score bei HER2 -negativen Tumoren lag bei 4. HER2 -positive Tumore zeigten einen mittleren IRS -Score von 8.

Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation zwischen der TAAR1 – Expression und dem HER4 – Status gezeigt werden. Hierbei wurde die TAAR1 – Expression im Zellkern und Zytoplasma isoliert bewertet. Die zytoplasmatische TAAR1 – Expression korrelierte mit der HER4 – Expression (IRS – Score). Eine ausgeprägte HER4 – Expression ging oft mit einer stärkeren TAAR1 – Expression einher. So zeigten Tumor mit einem IRS – Score von 0 oder 1 in der HER4 – Expression einen medianen TAAR1 IRS Score von 4 während Gewebsschnitte mit einem HER4- IRS – Score von 8 einen mittleren IRS Score von 12 für TAAR1 zeigten ( $p = 0,001$ ). In Abbildung 14 wird die IRS – Score Verteilung für TAAR1 und HER4 in einem Boxplot – Diagramm dargestellt. Abbildung 15 zeigt zudem eine isolierte Darstellung der Her4 – positiven und negativen Tumore. Es ergab sich eine positive Korrelation der TAAR1 – Expression mit dem HER4 – Status ( $p < 0,001$ ). Der IRS – Median in der HER4- positiven Gruppe lag bei 8, in der HER4 – negativen Gruppe zeigte sich ein medianer IRS – Score von 4.

Auch in Hinblick auf die Intensität der Färbung konnte eine signifikante Korrelation zur HER4 – Expression beobachtet werden ( $p = 0,003$ ).

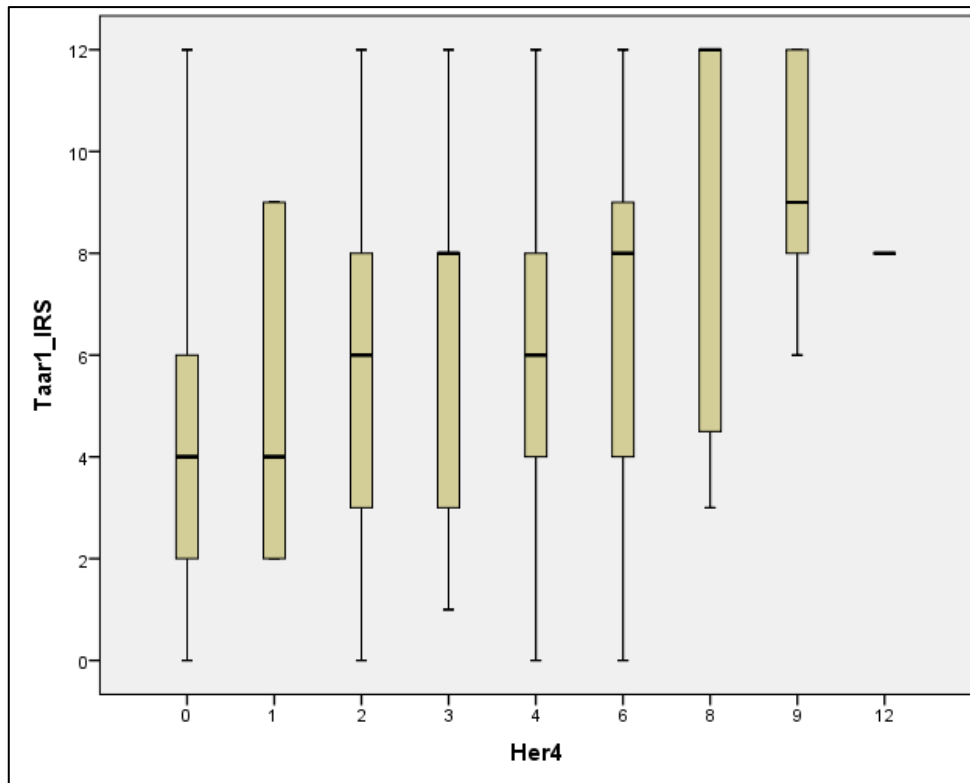


Abbildung 14: Boxplot: Übersicht über die Verteilung der HER4 - Expression und der zytoplasmatischen TAAR1 - Expression (IRS)

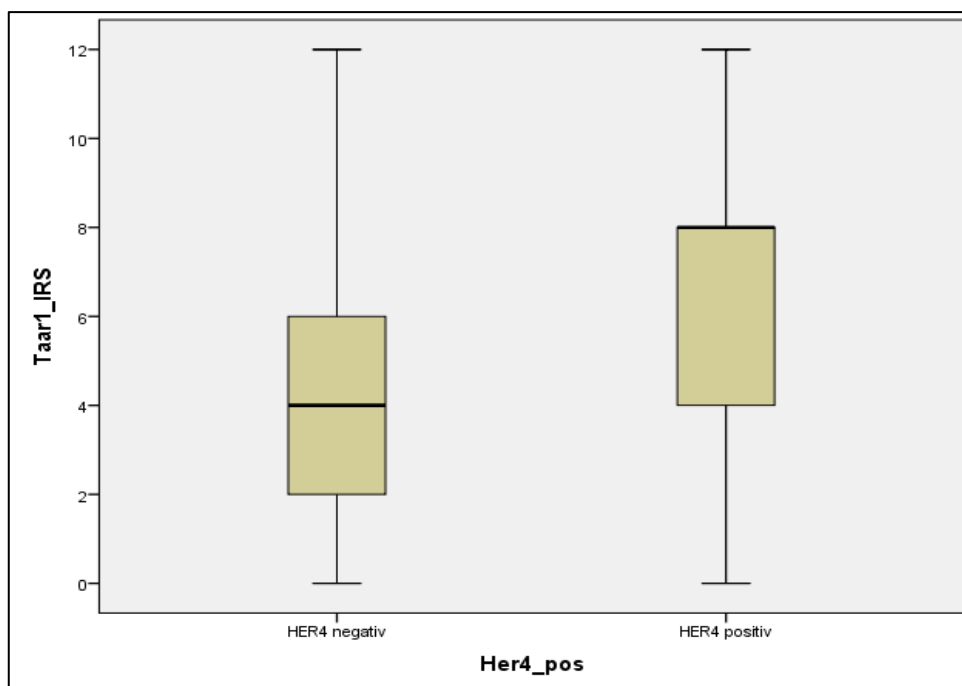
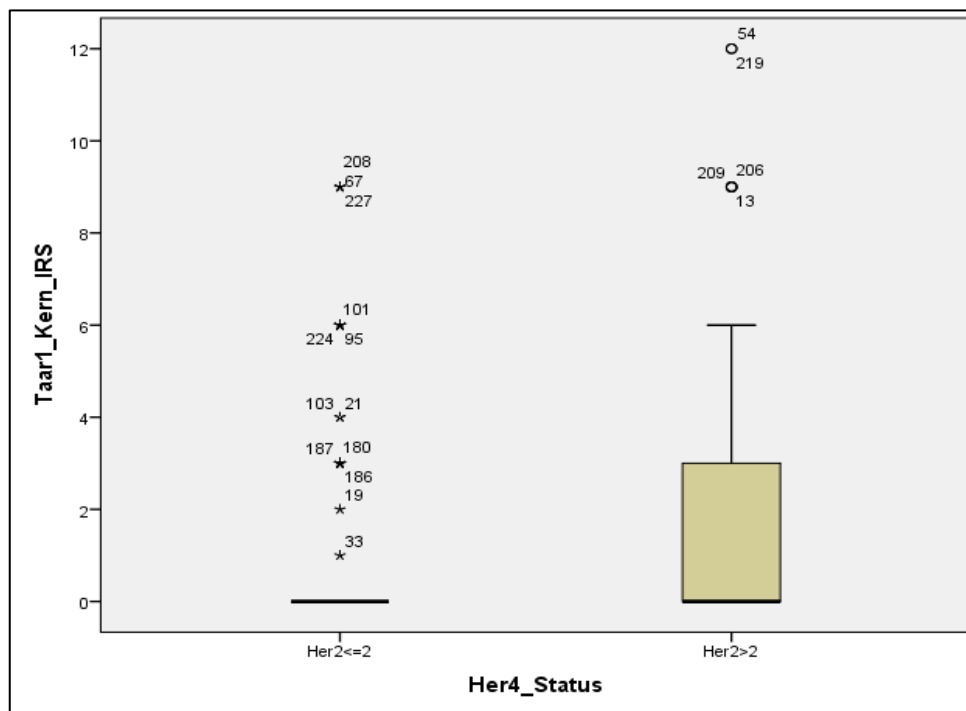


Abbildung 15: Boxplot: TAAR1 - Expression (IRS-Score) im Zytoplasma in HER4 - positiven Tumoren. Der mittlere IRS -Score in der HER4 -negativen Gruppe lag bei 4, in der HER4 - positiven Gruppe bei 8

Des Weiteren wurde mit einem Kruskal-Wallis-Test eine Korrelation der nukleären TAAR1 – Expression zum HER4 –IRS Score beobachtet ( $p= 0,032$ ). Zur weiteren Untersuchung wurde der Mann-Whitney-U-Test zum Vergleich der TAAR1- Expression in Gruppen mit einer höheren HER4- Expression und geringeren HER4 – Expression angewandt. Trotz eines medianen IRS – Score von 0 in beiden Gruppen konnte eine signifikante Korrelation gesehen werden ( $p = 0,025$ ).

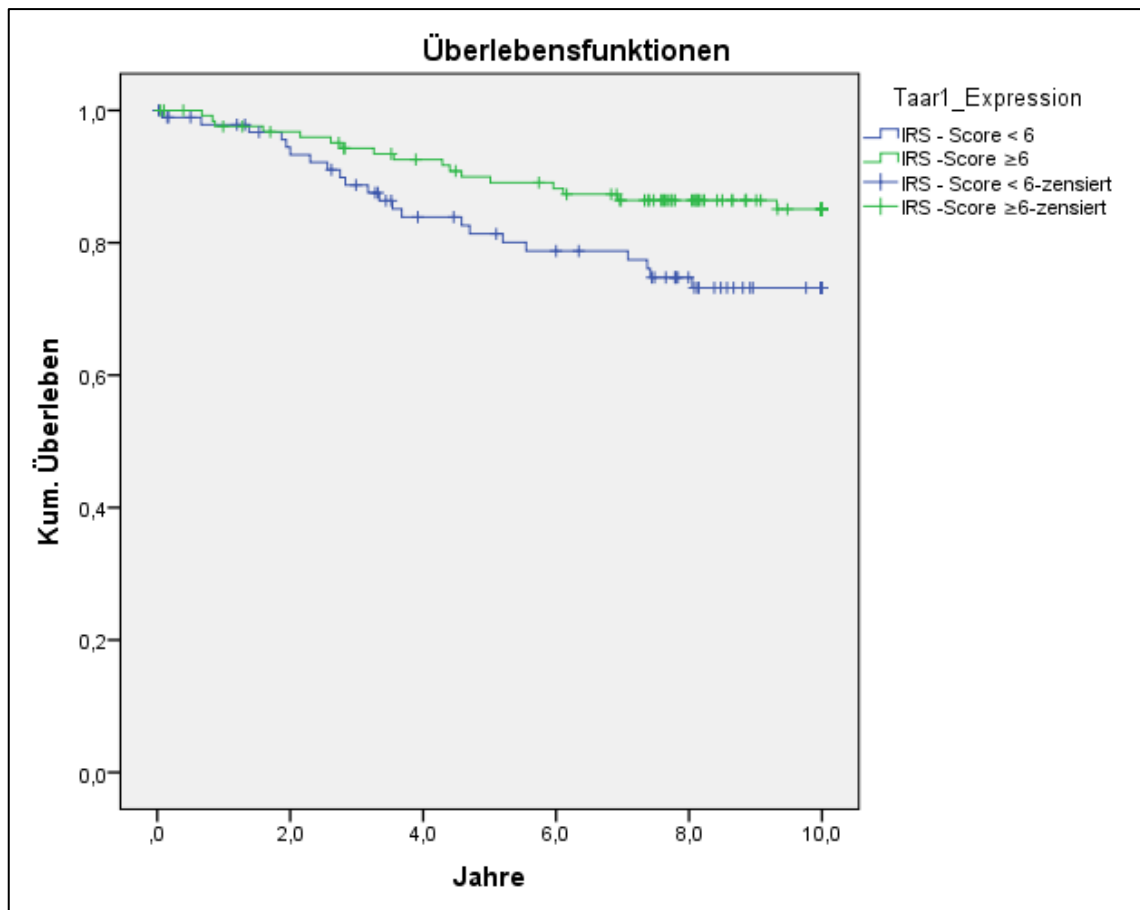


**Abbildung 16: Boxplot: Nukleare TAAR1 – Expression in Abhängigkeit vom HER4-Status**

Darüber hinaus wurde die Korrelation der TAAR1 – Expression mit dem Vorliegen von Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Sowohl für die zytoplasmatische Expression als auch die nukleare Expression konnte keine signifikante Korrelation zwischen der TAAR1- Expression (IRS) und dem ER – Rezeptor ( $p = 0,608$  für TAAR1 – Expression im Zytoplasma,  $p=0,486$  für nukleare TAAR1-Expression) sowie PR – Rezeptor ( $p= 0,597$  für zytoplasmatische Expression,  $p=0,295$  für Kern-Expression) beobachtet werden.

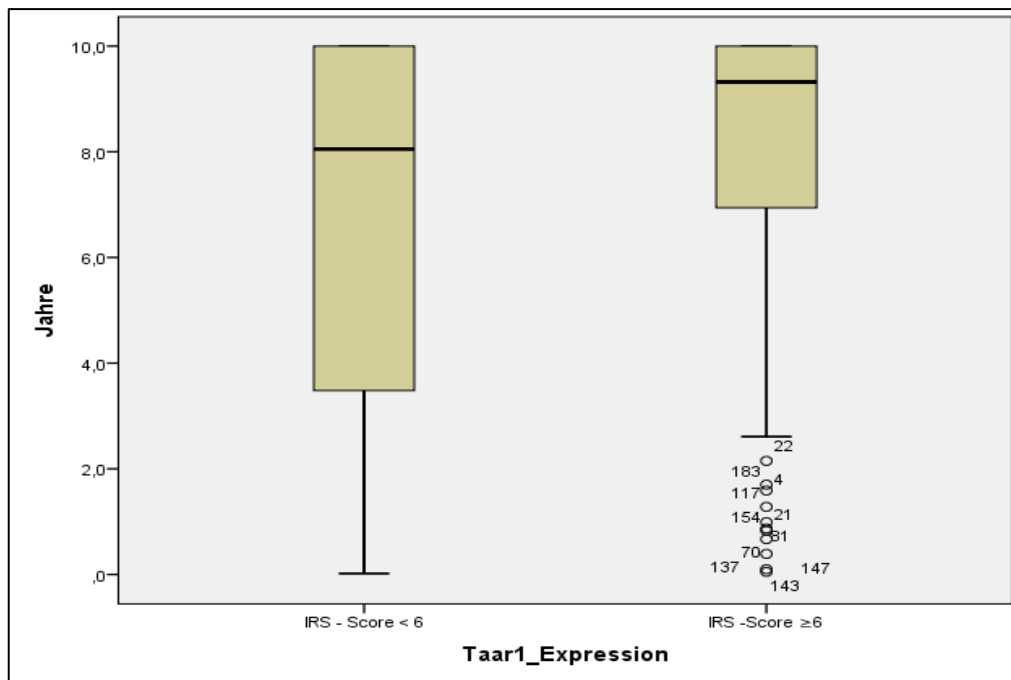
#### 4.1.6 Korrelation der TAAR1 – Expression mit der 10 – Jahres-Überlebensrate und dem Gesamtüberleben

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass eine stärkere TAAR1 – Expression mit einem längeren Gesamtüberleben sowie einer höheren 10 – Jahres-Überlebensrate korreliert. Aufgrund der Verteilung des Expressionsverhaltens erfolgte die Einteilung in zwei Gruppen. Die erste Gruppe mit einem IRS -Score  $< 6$  und die zweite Gruppe mit einem IRS – Score  $\geq 6$ . Bei einem IRS – Score  $\geq 6$  Punkten zeigte sich eine höhere 10 – Jahres-Überlebensrate ( $p= 0,035$ ). Die Kaplan – Meier-Kurve veranschaulicht den Gruppenvergleich. Der mittlere Median der TAAR1 – schwach exprimierenden Gruppe (IRS – Score  $< 6$ ) lag bei 8 Jahren, in der TAAR1 – stark exprimierenden Gruppe (IRS – Score  $\geq 6$ ) lag sie bei 9 Jahren.



**Abbildung 17: Darstellung der 10-Jahres-Überlebenskurve beider Gruppen.** Blau: TAAR1-schwach exprimierende Gruppe mit einem IRS -Score kleiner 6. Grün: TAAR1 – stark exprimierende Gruppe mit einem IRS-Score größer/gleich 6. Es zeigte sich eine bessere 10 – Jahres-Überlebensrate in der TAAR1 – positiven Gruppe (IRS – Score  $\geq 6$ )

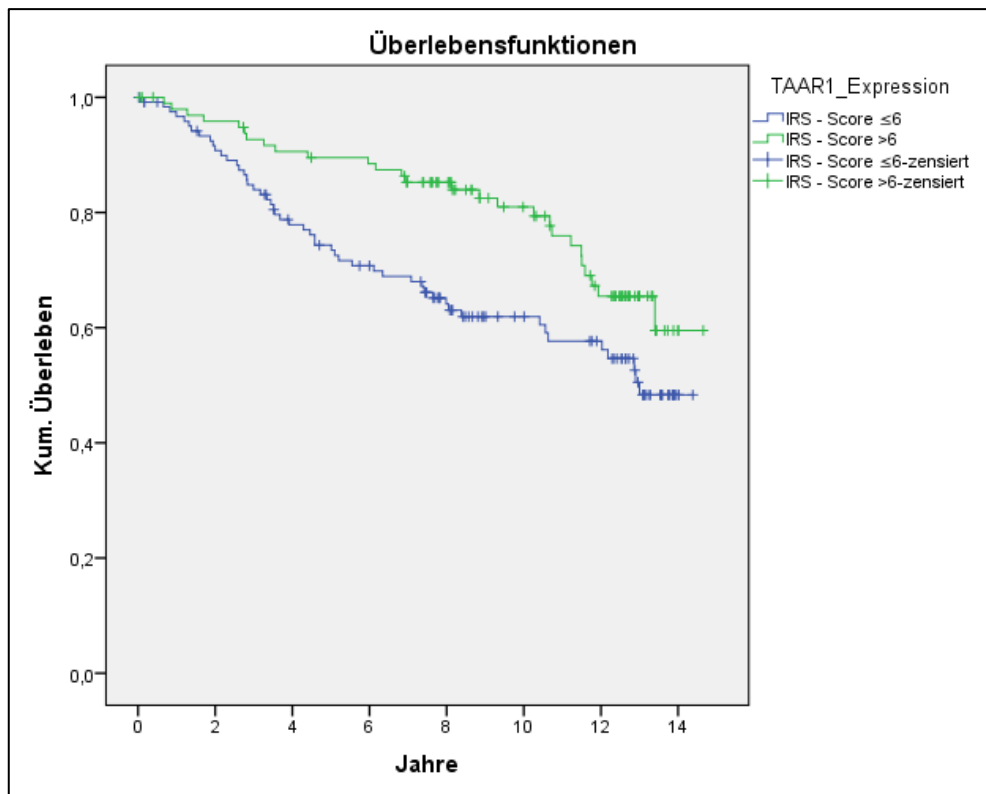




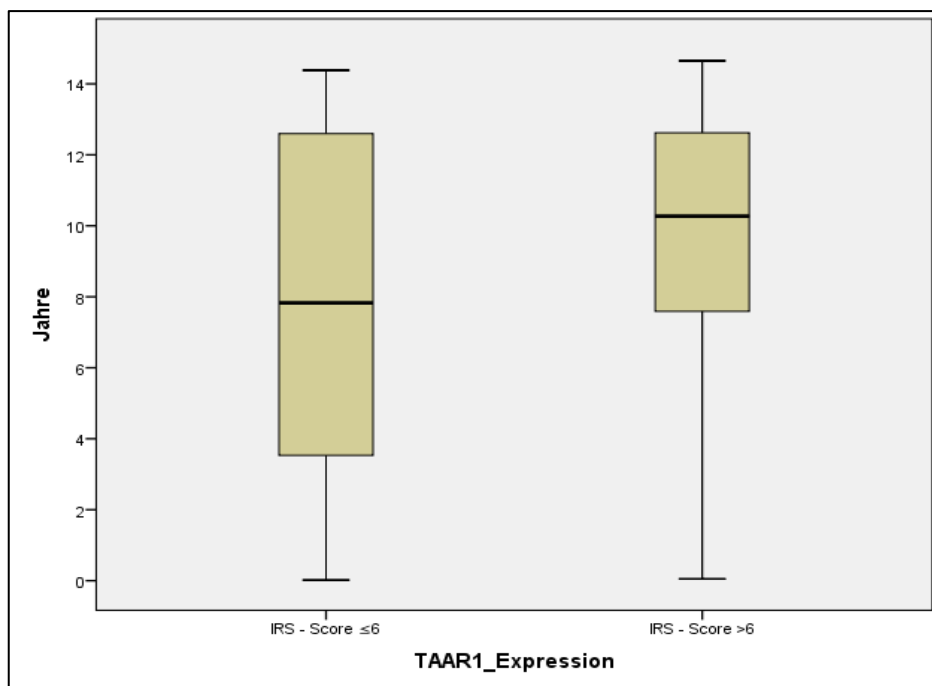
**Abbildung 18: Boxplot: TAAR1 und die mittlere Überlebensdauer.** Die mittlere Überlebensdauer betrug in der TAAR1 - negativen Gruppe 8 Jahre. In der TAAR1 - positiven Gruppe (IRS-Score  $\geq 6$ ) betrug sie 9 Jahre

Die mittlere Überlebenszeit innerhalb der ersten 10 Jahre lag in der TAAR1 – schwach exprimierenden Gruppe bei 8 und in der TAAR1 -stark exprimierenden Gruppe bei 9 Jahren.

Darüber hinaus wurde die TAAR1 – Expression in Bezug auf das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs untersucht. Auch hier konnte eine Korrelation zwischen der TAAR1 – Expression und dem Gesamtüberleben dargestellt werden. Die TAAR1- schwach exprimierende Gruppe (IRS-Score  $\leq 6$ ) zeigte ein geringeres Gesamtüberleben als die stark exprimierende Gruppe (IRS- Score  $> 6$ ). Die Signifikanz lag bei 0,013. Die mittlere Überlebensdauer der TAAR1 – schwachen Gruppe lag bei 8 Jahren, die der TAAR1- stark exprimierenden Gruppe bei 10 Jahren.



**Abbildung 19: Korrelation der TAAR1 – Expression mit dem Gesamtüberleben:** Grün: Starke TAAR1 – Expression mit einem IRS – Score > 6. Blau: TAAR1 schwach exprimierende Gruppe mit einem IRS – Score ≤6. Es konnte bei Patienten mit einer höheren TAAR1 – Expression ein längeres Gesamtüberleben beobachtet werden.



**Abbildung 20: Boxplot: TAAR1 – Expression und die Überlebensdauer.** Der mittlere Median der Überlebensjahre der TAAR1 - negativen Gruppe lag bei 8, in der TAAR1 - positiven Gruppe (IRS-Score über 6) bei 10

#### 4.1.7 Korrelationsanalyse

Zur Beurteilung ob zwei Variablen einen linearen Zusammenhang zeigen, erfolgte eine Korrelationsanalyse nach Spearman. Hierbei konnte eine positive Korrelation der TAAR1-Expression im Zytoplasma mit dem HER4 -Status beobachtet werden (Spearman correlation coefficient  $r = 0,337$ ;  $p < 0,001$ ) sowie eine positive Korrelation mit dem HER2 – Status (Spearman correlation coefficient  $r = 0,304$ ;  $p < 0,001$ ). Ebenso konnte eine positive Korrelation der HER4 -Expression mit der zytoplasmatischen Intensität der TAAR1 - Expression (Spearman correlation coefficient  $r = 0,184$ ;  $p = 0,006$ ) sowie der nuklearen Expression (Spearman correlation coefficient  $r = 0,299$ ;  $p < 0,001$ ) gesehen werden. Es konnte keine Korrelation der TAAR1 – Expression mit dem Hormonrezeptorstatus (ER/PR), der Tumorgöße ( $p=0,567$ ), dem Vorliegen von Lymphknotenmetastasen ( $p= 0,172$ ), dem Alter ( $p=0,651$ ) und dem Grading ( $p=0,229$ ) beobachtet werden.

Darüber hinaus erfolgte eine Cox – Regressionsanalyse bezüglich des Gesamtüberlebens. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die TAAR1- Expression einen unabhängigen prognostischen Faktor für das Gesamtüberleben darstellt ( $p= 0,021$ ). Des Weiteren konnte eine signifikante Korrelation des Alters zum Zeitpunkt der Operation ( $p=0,01$ ) und dem Lymphknotenstatus ( $p < 0,001$ ) mit dem Gesamtüberleben beobachtet werden.

## **4.2 Ergebnisse der Proliferationsversuche mit TAAR1-Agonisten auf Proteinebene anhand der Zelllinien MCF7 und HCC3153**

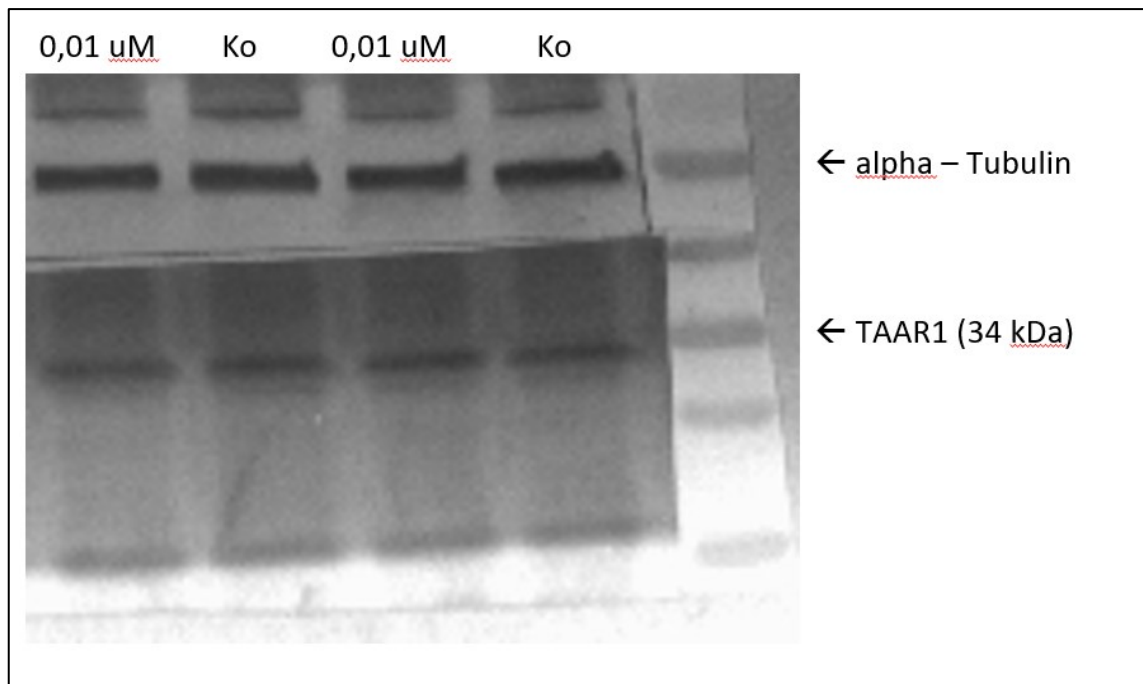
### **4.2.1 Zelllinie**

Zur Untersuchung der Expression nach Stimulation wurden die beiden Mammakarzinom-Zelllinien HCC3153 und MCF7 untersucht. Charakteristisch für die HCC3153-Zellen ist hierbei, dass sie eine Mutation in der BRCA1 – Region aufweisen. Die MCF7-Zelllinie entstammt einem Adenokarzinom der Brust. Kennzeichnend für sie ist eine hohe Östrogensensitivität.

### **4.2.2 Stimulation mit Tetrac (= 3,3',5,5'-Tetraiodothyroacetic acid= Tetraiodothyroessigsäure)**

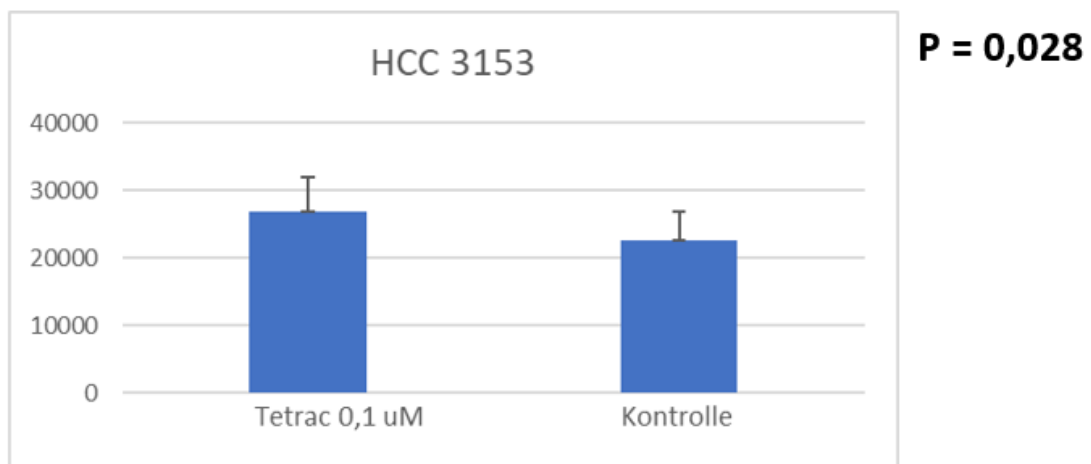
Zur Untersuchung der Proteinexpression wurden nach Stimulierung der beiden Zelllinien Western Blots durchgeführt. Nach Hinzufügen der Stimulanzien zu den Zelllinien erfolgte die Inkubation über 48 Stunden. Zur Kontrolle wurden nicht-simulierte Zellen mitgeführt. Anschließend erfolgte die Herstellung von Zelllysaten sowie die Bestimmung der Proteinmenge in den stimulierten Zellen und den Kontrollen nach Bradford. Zum Blotting wurde immer die gleiche Menge an Protein hinzugefügt. Je nach molekularer Masse erfolgte die Aufteilung der Proteine. TAAR1 konnte hierbei eine Bande bei 34 kDa generieren. Als endogene Kontrolle diente alpha – Tubulin. Die Quantifizierung der Ergebnisse erfolgte mit der Bio-Rad Quantity One® Software. Untersucht wurde die Anfärbungsintensität der Banden, nachdem diese in Bezug auf die endogene Kontrolle normalisiert wurden. Die Signifikanzbeobachtung erfolgte nach dem Wilcoxon-Mann-Whitney-Test.

Eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression in HCC3153- Zellen nach Stimulierung mit 0,1  $\mu$ M Tetrac im Vergleich zur Kontrollbande konnte beobachtet werden ( $p=0,028$ ). Abbildung 21 zeigt die TAAR1 Expression in HCC 3153 Zellen.



**Abbildung 21: WB HCC3153 – Zellen nach Stimulation mit 0,1 µM Tetrac über 48 Stunden.**

Die erste und dritte Bande von links stellen die stimulierte Bande, nach Hinzufügen von 0,01 µM Tetrac (Bande 1) sowie 0,1 µM Tetrac (Bande 4), dar. Bei der zweiten und vierten Bande handelt es sich um die nicht-stimulierte Kontrollbande.

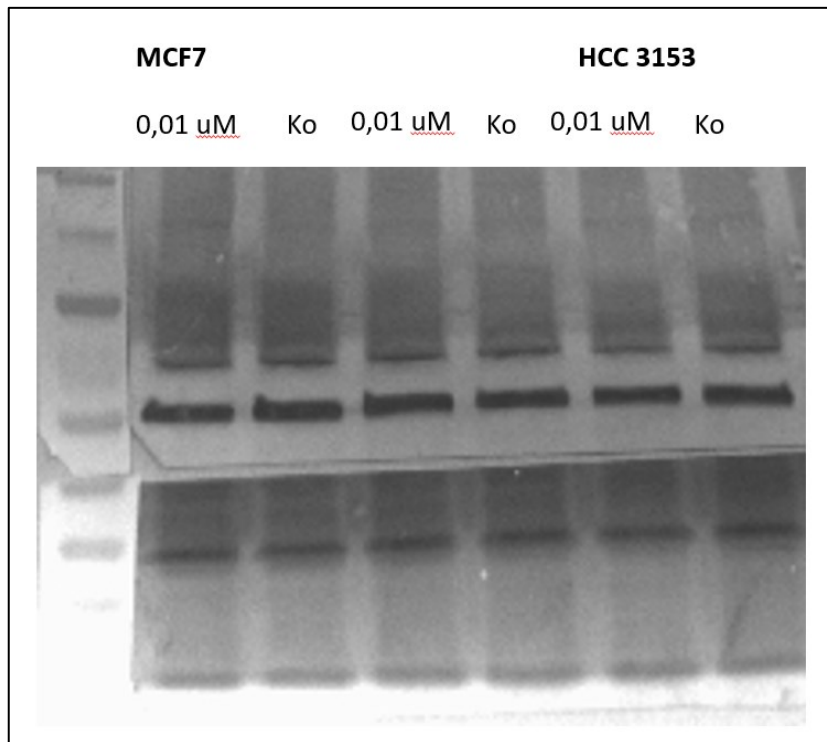


**Abbildung 22: TAAR1-Expression in HCC3153-Zelllysaten nach Stimulierung mit 0,1 µM**

**Tetrac.** In den Western Blot - Untersuchungen konnte eine signifikante Erhöhung der TAAR1 - Expression nach Stimulierung mit 0,1 µM Tetrac beobachtet werden.

In MCF7-Zellen konnte keine signifikante Reduktion bzw. Erhöhung der Proteinexpression nach Stimulation mit 0,1 µM oder 0,01 µM Tetrac beobachtet werden. Auch die HCC3153- Zelllysate

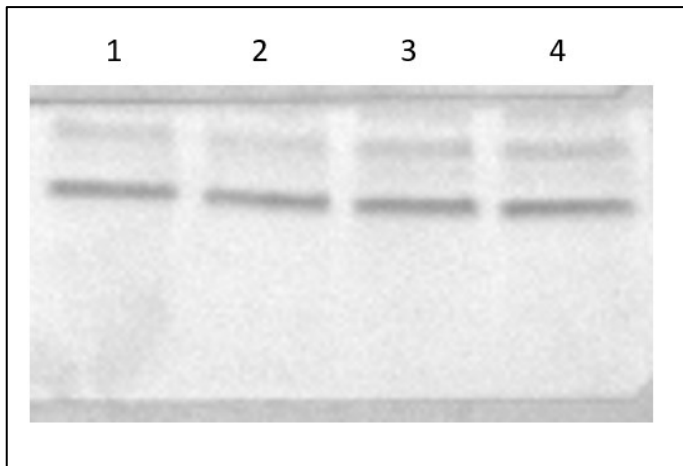
wiesen keine signifikante Veränderung der TAAR1 Expression nach Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  Tetrac im Vergleich zur unstimulierten Bande auf.



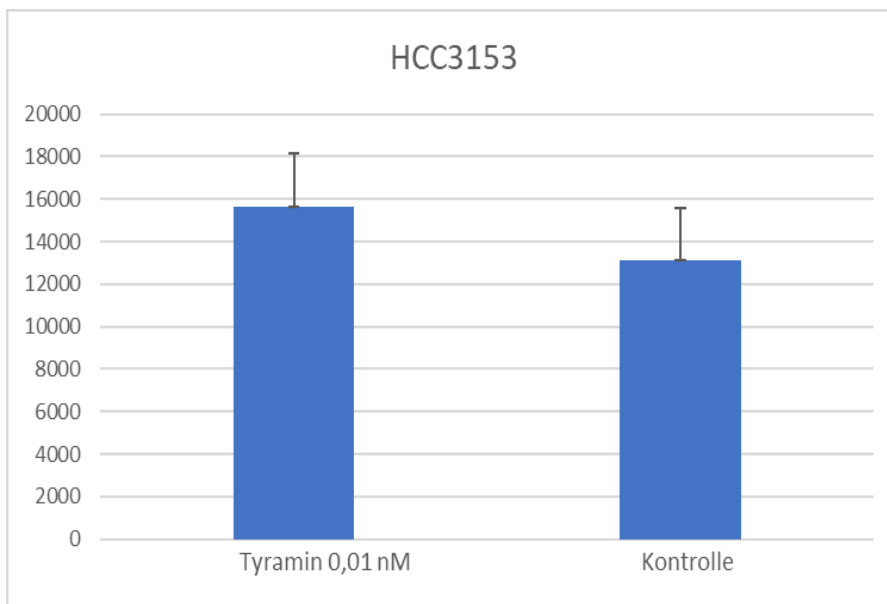
**Abbildung 23: Western Blot der TAAR1 Expression in MCF7- und HCC3153-Zellen**

#### 4.2.3 Stimulation mit Tyramin

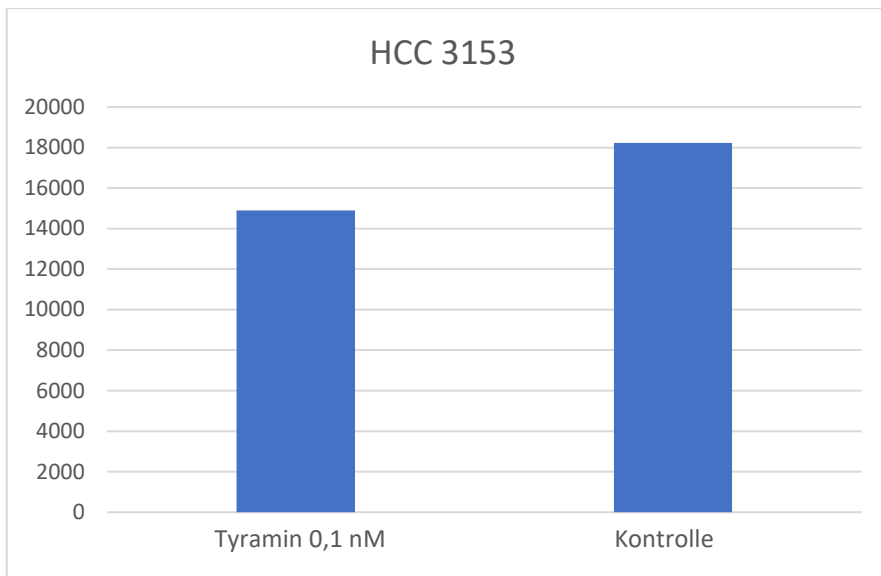
Des Weiteren wurde die Proteinexpression beider Zelllinien nach Stimulation mit Tyramin, einem biogenen Amin, welches durch Decarboxylierung aus der Aminosäure Tyrosin entsteht und zu den Neurotransmittern gezählt wird, untersucht. Beide Zelllinien MCF7 und HCC3153 wurden mit je 0,01 nM und 0,1 nM Tyramin stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden. Zum Vergleich wurden auch hier wieder Kontrollgruppen mitgeführt. Anschließend wurden Zelllysate erstellt. Jeweils 14,4  $\mu\text{g}$  Protein aus allen Zelllysaten wurden in die Blot-Taschen hinzugefügt. Nach dem Blotting erfolgte die Membranfärbung mit dem TAAR1 – Antikörper. Zur Beurteilung der Anfärbungsintensität wurde die Bio-Rad Quantity One® Software verwendet. Als endogene Kontrolle diente alpha – Tubulin. Eine signifikante Erhöhung der TAAR1 – Proteinexpression konnte in HCC3153-Zellen nach 48-stündiger Stimulation mit 0,01 nM Tyramin beobachtet werden. Bei einer Stimulation mit einer höheren Dosis (0,1 nM Tyramin) zeigte sich eine signifikante Reduktion der TAAR1-Proteinexpression im Vergleich zur Kontrollbande. Die Stimulation der MCF7 – Zellen ergab keine signifikante Veränderung der Proteinexpression nach Stimulation mit Tyramin (0,01 nM und 0,1 nM).



**Abbildung 24: HCC3153-Zellen nach Stimulation mit Tyramin.** Bande 1: TAAR1 – Expression nach Stimulation mit 0,01 nM Tyramin. Bande 3: Stimulation mit 0,1 nM Tyramin. Bande 2 und 4: Kontrollbanden

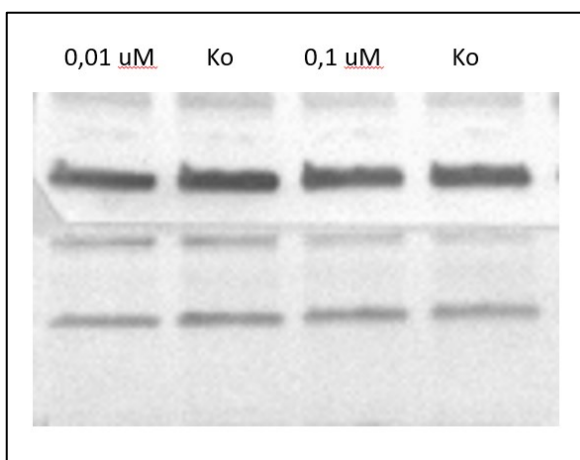


**Abbildung 25: TAAR1-Expression in HCC3153-Zellen nach Stimulation mit 0,01 nM.** Eine signifikante Erhöhung der Proteinexpression ( $p = 0,018$ ) zeigte sich nach Stimulation von HCC3153-Zellen mit 0,01 nM Tyramin über 48 Stunden



**Abbildung 26: Proteinexpression in HCC-3153 Zellen nach Stimulation mit 0,1 nM Tyramin über 48 Stunden.** Im Vergleich zur Kontrollbande konnte eine signifikante Reduktion der TAAR1- Proteinexpression beobachtet werden.

Eine Stimulation der MCF7 Zellen mit 0,01 bzw. 0,1 nM Tyramin zeigte in den Western Blot-Analysen keine signifikanten Veränderungen zur Kontrollbande.

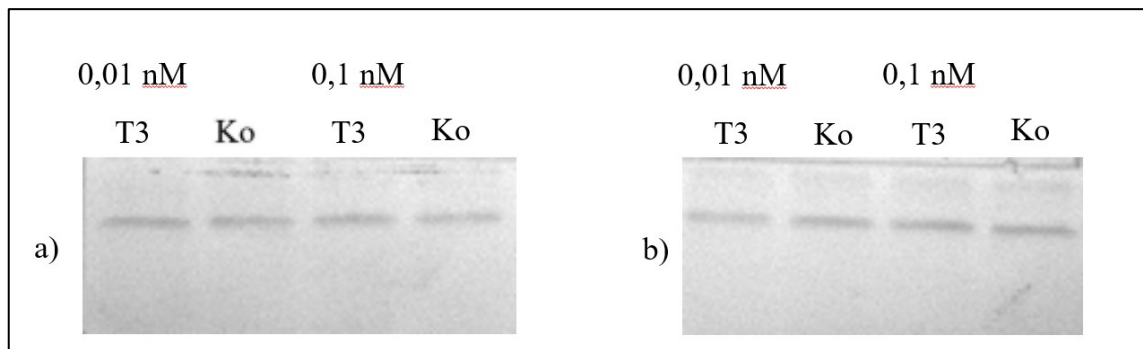


**Abbildung 27: TAAR1 – Expression in MCF7 -Zellen nach Stimulation mit 0,01 nM Tyramin sowie 0,1 nM Tyramin über 48 Stunden.** Nebestehende Banden wurden als Kontrolle (Ko) mitgeführt, hierbei handelt es sich um MCF7 – Zellen, welche nicht mit Tyramin stimuliert wurden. Es konnten keine signifikanten Veränderungen in der Proteinexpression nach Stimulation beobachtet werden.

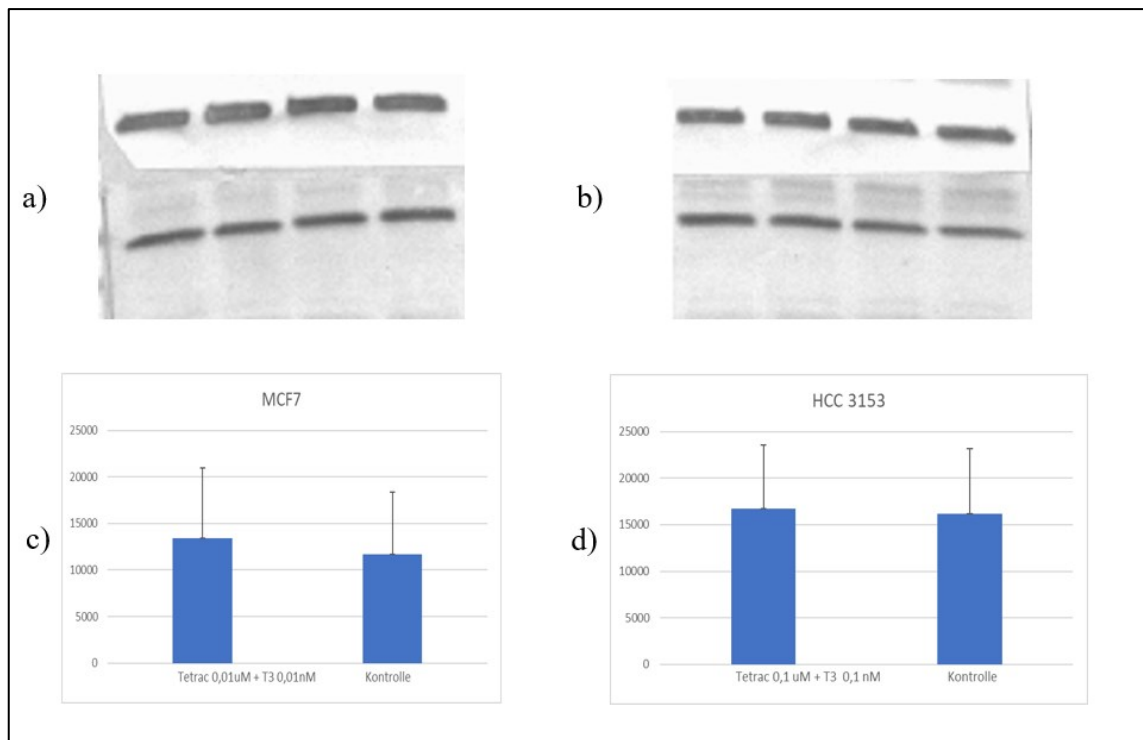


#### 4.2.4 Stimulation mit T3 (= 3, 3', 5 – Triiodo- L – thyronine) sowie Stimulation mit T3 + Tetrac

Weitere Untersuchungen zur TAAR-1 Proteinexpression erfolgten nach Stimulation mit Trijodthyronin (T3), einem Schilddrüsenhormon. Bekannte molekulare Derivate dieses Schilddrüsenhormons, wie das Thyronamin, sind nachgewiesene Liganden des TAAR1. MCF7- und HCC3153-Zellen wurden mit 0,01 und 0,1 nM T3 über 48 Stunden stimuliert. Es wurden Zellen ohne Stimulation als Kontrolle mitgeführt. In einer weiteren Reihe von Untersuchungen wurden MCF7 und HCC3153 Zellen zeitgleich mit Tetrac und T3 stimuliert. Die Inkubationszeit betrug 48 Stunden in beiden Versuchsreihen. Auch hier wurden Kontrollen ohne Stimulation mitgeführt. Anschließend erfolgte nach Herstellung der Zellysate und der Proteinmengenbestimmung mit dem Bradford Assay die Gelelektrophorese. Nach dem erfolgreichen Blotting wurden die Membrane auch hier mit TAAR1 nach Protokoll angefärbt. In beiden Versuchsreihen konnten keine signifikanten Veränderungen der Proteinexpression beobachtet werden.



**Abbildung 28: TAAR1 Proteinexpression in MCF7 – Zellen (a) und in HCC3153-Zellen (b) nach Stimulation mit 0,01 nM T3 und 0,1 nM T3**



**Abbildung 29: TAAR Expression in MCF 7 (a) und HCC 3153 -Zellen (b) nach Stimulation mit T3 + Tetrac**

Beide Zelllinien wurden zeitgleich mit 0,01 nM T3 und 0,01  $\mu$ M Tetrac sowie 0,1 nM T3 und 0,1  $\mu$ M Tetrac über 48 Stunden inkubiert. Als endogene Kontrolle wurde auch hier alpha – Tubulin verwendet. In beiden Versuchsreihen konnten keine signifikanten Veränderungen der TAAR1-Proteinexpression beobachtet werden (c + d).

## 5 Diskussion

Das Mammakarzinom stellt die häufigste Tumorerkrankung der Frau dar. Die Inzidenz der Erkrankung liegt bei 150 Neuerkrankungen pro Jahr. Bei etwa 5-10 % der Mammakarzinome spielt die genetische Prädisposition eine entscheidende Rolle. Oft liegt eine Mutation des BRCA1- Genes vor. Eine Mutation der BRCA-1 Region bei Patientinnen mit Mammakarzinom geht häufig mit einem negativen Hormonstatus einher, weshalb eine antihormonelle Therapie nur bedingt als Therapiemöglichkeit in Frage kommt. Liegt zudem ein HER2-negativer Status vor, spricht man von einem triple-negativen Tumor. Das individuelle Therapiekonzept für Patientinnen mit einem negativen Hormonstatus gestaltet sich schwierig, da es sich in diesen Fällen meist um aggressivere Tumorarten handelt, die den Einsatz bislang zugelassener zielgerichteter Therapien nur bedingt ermöglichen. Die einzige Therapiemöglichkeit nach der Operation ist meist die systemische Chemotherapie. Die Innovation neuer Signalwege bei der Entstehung, Proliferation und Apoptose der Tumorzellen sowie die Etablierung von neuen prognostischen und prädiktiven Faktoren können zur Erstellung eines verbesserten individuell orientierten und zielgerichteten Therapiekonzeptes beitragen. Das Forschungslabor um Prof. Jeschke konnte bereits Untersuchungen zur Korrelation von Brustkrebs mit Thyroidhormonrezeptoren veröffentlichen (Ditsch et al., 2010; Ditsch et al., 2013; Heublein et al., 2015). Thyroidhormonrezeptoren gehören wie die Steroidhormonrezeptoren zu den nukleären Rezeptoren. Bereits zuvor konnten einige Studien einen Zusammenhang zwischen Schilddrüsenerkrankungen und der Entstehung von Mammakarzinomen nachweisen. Untersuchungen zeigten eine häufige Korrelation von Brustkrebs mit der Entstehung von autoimmunen sowie nichtautoimmunen Schilddrüsenerkrankungen (Rasmussen et al., 2007; Turken et al., 2003). Auch eine höhere Konzentration der peripheren Schilddrüsenhormone konnte bei Patientinnen mit Brustkrebs gezeigt werden (Ditsch et al., 2010). Bislang durchgeführte Untersuchungen deuten auf eine höhere Protein- und Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren bei BRCA1-mutierten Mammakarzinom – Zelllinien hin (Heublein et al., 2015). Da eine Hormontherapie bei BRCA1-mutierten Mammakarzinomen nur bedingt zum Einsatz kommt, stellen die Schilddrüsenhormone und zugehörige Rezeptoren einen wichtigen therapeutischen und prognostischen Forschungsansatzpunkt dar.

Beim TAAR1 handelt es sich um einen G – Protein-gekoppelten Rezeptor mit intrazellulärer Lokalisation. Diese werden überwiegend in monoaminergen Neuronen des ZNA exprimiert, kommen jedoch auch im peripheren Gewebe vor (Xie et al., 2007; Xie & Miller, 2009). Bislang gibt es viele Studien, die die Expression des TAAR1 im ZNS und Immunsystem untersuchten, sowie die Assoziationen mit psychiatrischen und neurologischen Erkrankungen beschreiben. War initial der Forschungsschwerpunkt des TAAR1 seine Funktion im monoaminergen System und die Wirkung und Regulation von Psychostimulanzien auf die Rezeptorexpression, ist seit dem Nachweis des Rezeptors im peripheren Gewebe, der Rezeptor immer häufiger auch Schwerpunkt in der Krebs- und Immunforschung.

Ziel dieser Arbeit war es, die Expression des TAAR1 in Mammakarzinomen zu untersuchen. Des Weiteren wurde die Expression des Rezeptors in Abhängigkeit vom histologischen Subtyp, dem Tumorgrading, der Tumorgröße, dem Patientenalter, dem Lymphknotenstatus, dem

Gesamtüberleben, dem Hormonrezeptorstatus sowie dem Vorkommen von HER2 und HER4 untersucht. Im zweiten Abschnitt der Arbeit wurde die TAAR1-Expression auf Proteinebene nach Stimulation mit verschiedenen Liganden untersucht. Als einer der Rezeptoren, an welchem die Abbauprodukte der Schilddrüsenhormone binden, wird auch der Zusammenhang zwischen dem TAAR1 und der Schilddrüsenhormone untersucht.

## 5.1 Expressionsverhalten des TAAR1 in Mammakarzinomen

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde die Expression des Rezeptors untersucht. Hierfür erfolgte die immunhistochemische Färbung von 227 Mammakarzinompräparaten. Die Präparate wurden bereits zuvor nach verschiedenen Aspekten wie dem Tumorgrading, HER2- und HER4- Status, dem Gesamtüberleben, dem Lymphknotenstatus, der Histologie, dem Alter der Patientinnen und der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht. Eine Expression des TAAR1 wurde im Zytoplasma sowie im Zellkern nachgewiesen. Eine relevante Membranfärbung konnte nicht gezeigt werden.

Es konnte beobachtet werden, dass eine Korrelation zwischen der TAAR1 – Expression und dem Tumorgrading besteht. Das Tumorgrading nach Elston und Ellis (Modifikation des Bloom und Richardson-Gradings) gehört zu den wichtigen Prognosefaktoren (Elston & Ellis, 1991; Mizuno et al., 2009). Karzinome mit einem höheren Tumorgrading (G2 und G3) zeigten eine niedrigere zytoplasmatische TAAR1-Expression als G1 – Tumore. Je schlechter der Tumor differenziert ist, desto höher ist das Grading. Ein höheres Grading geht mit einem höheren Malignitätspotenzial einher. Es konnte gezeigt werden, dass eine stärkere TAAR1-Expression mit einem niedrigeren Tumorgrading assoziiert ist. Sowohl ein niedrigeres Tumorgrading als auch eine höhere TAAR1-Expression sind mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert. Aufgrund des histopathologischen Subtyps erfolgte bei 71 der 227 Mammakarzinome kein Tumorgrading, weshalb diese bei der Analyse nicht berücksichtigt wurden und somit zu einer begrenzten Aussagekraft und Limitation des Vergleiches führen.

Des Weiteren wurde die TAAR1-Expression in Abhängigkeit vom Gesamtüberleben und der 10 – Jahres-Überlebensrate untersucht. Hierbei konnte ein positiver Effekt der TAAR1 – Expression auf das Gesamtüberleben gezeigt werden. Eine stärkere TAAR1 – Expression geht mit einem längeren Gesamtüberleben sowie einer höheren 10 – Jahres-Überlebensrate einher. In der Gruppe der Mammakarzinompatientinnen mit einem IRS Score von über 6 Punkten konnte eine signifikant höhere Überlebensrate beobachtet werden. Die mittlere Überlebensdauer der TAAR1-schwach exprimierenden Gruppe lag bei 8 Jahren. Die durchschnittliche Überlebensdauer der Gruppe, die TAAR1 stark exprimierte, lag bei 10 Jahren. Eine höhere TAAR1 – Expression geht somit mit einem besseren Gesamtüberleben einher. Die genauen Mechanismen hierzu sind noch nicht geklärt. Bislang ist bekannt, dass die Ligandenbindung an TAAR1 über die Aktivierung der Adenylatzyklase zu einem Anstieg der intrazellulären cAMP- Konzentration führt (Barak et al., 2008; Borowsky et al., 2001; Espinoza et al., 2018) sowie im Weiteren je nach Aktivierung von Proteinkinase A oder/und C zu einer erhöhten Konzentration der Transkriptionsfaktoren

CREB und NFAT (Panas et al., 2012). Letzterer spielt auch eine Rolle bei der Immunaktivierung (Panas et al., 2012).

Im Jahre 2018 wurde von Fleischer et. al eine Metaanalyse veröffentlicht, in welcher die Hazard Ratio in Anhängigkeit von der TAAR1- Expression untersucht wurde (Fleischer et al., 2018; Goswami & Nakshatri, 2013; Mizuno et al., 2009). Eine stärkere TAAR1-Expression war mit einem längeren medianen Überleben bei Patienten mit Kolorektalem Karzinom, Magen-, Ovar-Blasen sowie Knochentumoren assoziiert während eine Korrelation zwischen niedriger TAAR1-Expression und einem längeren medianen Überleben bei Patienten mit Kopf- und Halstumoren sowie Hirn- und Hauttumoren beobachtet werden konnte (Fleischer et al., 2018). Für Patienten mit Brustkrebskarzinomen konnten Fleischer et al. (2018) keine signifikanten Unterschiede der Hazard Ratio beobachten. Hierzu ist jedoch hinzuzufügen, dass die Metaanalyse nicht das Krebsstadium der Patienten berücksichtigt. Die von uns untersuchte Patientenkohorte umfasst Frühstadien ohne Nachweis einer Fernmetastasierung. TAAR1 könnte somit als prognostischer Marker für das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Mammakarzinomen im Frühstadium herangezogen werden.

Die genauen Signalmechanismen der TAAR1-Aktivierung, die die Tumorpherifation positiv beeinflussen, sind nicht geklärt. Studien deuten jedoch daraufhin, dass die TAAR1 – Aktivierung nicht nur bei der Tumorentstehung eine wichtige Rolle spielt, sondern auch einen Einfluss auf die Malignität hat (Fleischer et al., 2018). Eine wichtige Rolle scheint hierbei der Ligand zu spielen. Für Amphetamine als potenzieller TAAR1-Ligand konnte gezeigt werden, dass ein regelmäßiger Missbrauch zu einem erhöhten Risiko für die Entstehung von Non – Hodgkin – Lymphomen bei HIV – Patienten beiträgt (Chao et al., 2009).

Eine wichtige Schlüsselrolle bei der Regulation und somit Ansatzpunkt für weitere Untersuchungen stellt vermutlich das Enzym L-DOPA- Decarboxylase (auch Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase genannt) dar. Durch eine Decarboxylierung der Aminosäure katalysiert das Enzym die Entstehung der Neurotransmitter Dopamin, Serotonin sowie der biogenen Amine wie Tryptamin (Scanlan et al., 2004; Sumi-Ichinose et al., 1992). Auch bei den Schilddrüsenhormonen handelt es sich chemisch gesehen um Aminosäuren. Durch eine Decarboxylierung der Schilddrüsenhormone entstehen Thyronamine (Phenethylamin – Derivate) (Scanlan, 2009). In Anbetracht der bislang vorliegenden Daten wäre eine Hochregulation des TAAR1 durch den vermehrten Abbau der Schilddrüsenhormone in biogene Amine denkbar. Scanlan et al. (2004) gelang der Nachweis von Thyronaminen, unter anderem von 3 – Iodthyronamin (T1AM), welches als Abbauprodukt von T4 über die Bindung von TAAR1 zu einer Bradykardie und Hypothermie sowie einem verringerten Herzschlagvolumen führt. Als ein hormonell aktiver Metabolit der Schilddrüsenhormone wirkt T1AM trotz der strukturellen Ähnlichkeit mit Schilddrüsenhormonen nicht über die nukleären Schilddrüsenrezeptoren, sondern über den TAAR1-Rezeptor. Eine 2017 veröffentlichte Studie konnte einen supprimierenden Einfluss von T1AM auf die Tumorzellproliferation zeigen (Rogowski et al., 2017). In – vitro-Untersuchungen demonstrierten den Einfluss von T1AM auf die Proliferation der Tumorzellen HepG2 (Hepatozelluläres Karzinom) und MCF7 (Adenokarzinom der Brustdrüse). Es konnte eine

Reduktion der Tumorzellproliferation und eine reduzierte Funktionsfähigkeit beobachtet werden (Rogowski et al., 2017). Studien zeigten, dass Patientinnen mit Schilddrüsendysfunktionen eine erhöhte Inzidenz von Brustkrebsfällen aufweisen. Im Jahre 2016 veröffentlichten Sogaard et al. ihre Untersuchungen zur Korrelation von Hyper- und Hypothyreodismus mit dem Auftreten von Brustkrebs (Sogaard et al., 2016). Ein Hyperthyreodismus geht mit erhöhten Konzentrationen der peripheren Schilddrüsenhormone im Blut einher. Im Rahmen dieser Untersuchungen wurde gezeigt, dass Patientinnen, die an Hyperthyroidismus leiden, im Vergleich zur Normalbevölkerung ein höheres Brustkrebsrisiko aufweisen (Sogaard et al., 2016). Bei Patientinnen mit Hypothyreodismus und somit niedrigerem Schilddrüsenhormonlevel konnte ein reduziertes Brustkrebsrisiko im Vergleich zur Normalpopulation beobachtet werden (Sogaard et al., 2016). Im Rahmen unserer Untersuchungen deutet das verbesserte Gesamtüberleben bei TAAR1 – stark exprimierenden Mammakarzinomen darauf hin, dass auch hier vermutlich ein beschleunigter Abbau der Schilddrüsenhormone zu biogenen Aminen stattfindet. Diese wiederum könnte eine TAAR1- Hochregulation und niedrigere Konzentrationen der Schilddrüsenhormone im peripheren Blut erklären. Als Abbauprodukte der Schilddrüsenhormone scheinen Thyronamine eine gegenteilige Wirkung sowohl bei der Tumorpheriferation als auch bei physiologischen Vorgängen zu haben.

Weitere Untersuchungen zeigten in T-Zellen, dass eine Aktivierung des TAAR1 zur Downregulation des Tumorpromotorgenes SPP1 führt (Babusyte et al., 2013; Wai & Kuo, 2008). SPP1 kodiert Osteopontin, ein Phosphoprotein, welches eine wichtige Rolle bei der Regulation der Knochensubstanzerhaltung hat (Wai & Kuo, 2008). Eine Überexpression des SPP1-Genes konnte in vielen Tumoren nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass es wesentlich zur Metastasenbildung beiträgt und die Tumorentstehung begünstigt (Wai & Kuo, 2008). Die Aktivierung läuft hierbei über die Proteinkinase C (PKC), welche ebenfalls einen potenzieller Signalmechanismus der TAAR1-Liganden darstellt (Fleischer et al., 2018).

Eine TAAR1- Aktivierung könnte zudem über die Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) zur Bildung des Transkriptionsfaktors NFκB beitragen (Bhat-Nakshatri et al., 2002; Karin, 2009). Eine gesteigerte Aktivität des NFκB konnte in vielen soliden Tumoren beobachtet werden (Karin, 2009). Dem Transkriptionsfaktor NFκB wird eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, Apoptose und Immunabwehr zugeschrieben. Eine gesteigerte NFκB-Aktivierung ist vermutlich Antwort einer inflammatorischen Umgebungsreaktion bei der Tumorentstehung (Karin, 2009). Es wird jedoch auch angenommen, dass er den Tumorprogress und die Malignität wesentlich beeinflusst (Fleischer et al., 2018; Hoesel & Schmid, 2013; Karin, 2009). Weitere Untersuchungen zur Rolle des NFκB bei der Tumorentstehung und -regulation sind Bestandteil gegenwärtiger Forschungen.

Unsere Untersuchungen zeigen, dass TAAR1 als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben einen neuen innovativen Ansatzpunkt für die pharmakologische Forschung darstellen könnte. Weitere Parameter in der von uns verwendeten histopathologischen Brustkrebskohorte, die als unabhängige prognostische Faktoren identifiziert werden konnten, waren ein positiver Lymphknotenstatus sowie das Alter der Patientinnen zum Zeitpunkt der

Operation. Ditsch et al. (2013) untersuchten die Expression der verschiedenen Schilddrüsenhormonrezeptoren in Mammakarzinomen. Hierbei konnte der Schilddrüsenhormonrezeptor  $THR\alpha 2$  als unabhängiger prognostischer Faktor für das Gesamtüberleben identifiziert werden. Zwei Jahre später wurden Ergebnisse zur Untersuchung der 5 – Jahres-Überlebensrate in Abhängigkeit von der Expression der  $THR\alpha$  und  $THR\beta$  – Rezeptoren bei BRCA1-mutierten und sporadischen Mammakarzinomen veröffentlicht (Heublein et al., 2015). Heublein et al. (2015) zeigten, dass eine  $THR\alpha$ -Expression mit einer signifikant reduzierten 5 -Jahres-Überlebensrate und eine  $THR\beta$  -Expression mit einer signifikant erhöhten 5- Jahres-Überlebensrate bei Patientinnen mit BRCA1-mutierten Mammakarzinomen einhergeht, während in sporadischen Mammakarzinomen keine signifikanten Veränderungen beobachtet werden konnten. Zudem konnte in BRCA1-mutierten Mammakarzinom-Zelllinien (HCC3153- Zellen) eine signifikant höhere Expression der Rezeptoren gezeigt werden (Heublein et al., 2015). Sowohl der TAAR1- Rezeptorstatus als auch die Rezeptoren der peripheren Schilddrüsenhormone stellen somit einen neuen therapeutischen Ansatzpunkt in der Brustkrebsforschung dar. Zur weiteren Unterstützung der Hypothese, dass TAAR1 einen prognostischen Faktor darstellt, sollten in Zukunft größere Patientenkohorten untersucht werden. Wichtig wäre hierbei auch, dass die Patientenkohorten nach genau definierten klinischen Aspekten unterteilt werden, um validere Aussagen treffen zu können.

## **5.2 Korrelation der TAAR1-Expression mit dem HER4- und HER2 - Status**

In dieser Arbeit wurde auch die Korrelation der TAAR1-Expression mit dem HER2- und HER4-Status untersucht. Die Rezeptoren HER2 und HER4 gehören zur Familie der epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptoren (erbB – Rezeptoren), bei denen es sich um transmembranöse Glykoproteine mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität handelt (Karamouzis et al., 2007; Koutras & Evans, 2008). Eine Ligandenbindung an den Rezeptor führt zu strukturellen Veränderungen mit Übergang in die aktive Form. Es kommt zu einer homogenen oder heterogenen Dimerbildung, welche in Folge die Autophosphorylierung einleitet (Herbst, 2004; Koutras & Evans, 2008). Die Folge ist die Aktivierung einer Signalkaskade, welche die Proliferation, das Überleben und die Differenzierung der Zelle beeinflusst (Herbst, 2004; Koutras et al., 2010; Koutras & Evans, 2008). In Tumorzellen wird oft eine Überexpression dieser Rezeptoren nachgewiesen. Eine Überexpression des HER2 ist bei 20 -30 % der Mammakarzinome nachweisbar und geht mit einer schlechteren Prognose einher (Dawood et al., 2008; Slamon et al., 1987). Zudem ist eine Überexpression oft assoziiert mit einem höheren Differenzierungsgrad, einem Lymphknotenbefall sowie einem negativen Hormonrezeptorstatus (Gusterson et al., 1992; Lebeau et al., 2003; Rilke et al., 1991). Die HER1-, HER3- und HER- 4 Rezeptoren präferieren bei der heterogenen Dimerbildung bevorzugt mit dem HER2-Rezeptor. Dimere mit einer HER2-Komponente gelten als besonders mitogen (Karamouzis et al., 2007). Der monoklonale Antikörper Pertuzumab greift direkt am HER2-Rezeptor und verhindert dessen Dimerbildung mit den anderen HER-Rezeptoren und somit die Aktivierung der Signalkaskade in Krebszellen. Während ein positiver HER2-Status mit einer schlechteren Prognose und einem fehlenden Ansprechen auf eine Hormontherapie einhergeht, erhöht ein positiver HER-4 Status die

Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens auf eine endokrine Therapie (Barnes et al., 2005). Der HER4-Rezeptor gehört zwar zur gleichen Rezeptorfamilie mit ähnlicher Struktur wie der HER2-Rezeptor, jedoch wird eine Interaktion des HER4-Rezeptors mit den G-Proteingekoppelten Rezeptoren angenommen (Pan et al., 2011). Eine verstärkte Expression des HER4-Rezeptors geht mit einer erhöhten Hormonrezeptorsensitivität und einer niedrigeren Tumorzellproliferation einher. HER4 scheint somit eine antiproliferative Zellantwort in Brustkrebszellen auszulösen (Barnes et al., 2005; Karamouzis et al., 2007). Zudem konnte für den HER4-Rezeptor gezeigt werden, dass 4 verschiedene Splicevarianten existieren und dass sie eine Diversität an Ligand-Rezeptor-Interaktionen aufweisen, mit hieraus resultierend unterschiedlicher Rezeptoraktivierung (Karamouzis et al., 2007). Des Weiteren konnte in Experimenten an Zelllinien gezeigt werden, dass eine Überexpression des HER4-Rezeptors in HER2-positiven Tumoren eine gesteigerte Apoptose und reduzierte Zellproliferation der Tumorzellen herbeiführt, was wieder zur Annahme führt, dass dem HER4-Rezeptor Tumorsuppressorgen-ähnliche Eigenschaften zugeschrieben werden können (Herbst, 2004; Karamouzis et al., 2007). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, dass das gleichzeitige Vorkommen des HER4-Rezeptors die Signalkaskade des HER2-Rezeptors unterdrückt (Barnes et al., 2005; Karamouzis et al., 2007). Insbesondere spezifische HER4-Bindungen führen über die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) die Apoptose herbei, aktivieren jedoch nicht diejenige Signalkaskade, welche zu einer gesteigerten Zellproliferation führt (Karamouzis et al., 2007; Yarden & Sliwkowski, 2001). Somit führt die Überexpression der HER4-Rezeptoren paradoxerweise indirekt zu einem besseren Outcome bei Mammakarzinomen.

Vergleichen wir nun an unserer Kohorte die Expression des TAAR1 und des HER4-Rezeptors, kann eine positive Korrelation beobachtet werden. Die TAAR1-Expression wurde hierbei isoliert nukleär und zytoplasmatisch untersucht. Die zytoplasmatische TAAR1-Expression korrelierte positiv mit der HER4-Expression. Zur Beurteilung der Expression wurde für beide Rezeptoren der IRS-Score ermittelt. Es konnte beobachtet werden, dass eine höhere HER4-Expression, welche oftmals mit einer Suppression der Tumorzellproliferation einhergeht, mit einer stärkeren TAAR1-Expression korrelierte. Mammakarzinom-Zellen mit einem mittleren IRS-Score von 8 in der HER4-Expression zeigten einen mittleren IRS-Score in der TAAR1-Expression von 12 ( $p=0,001$ ) während Mammakarzinome mit keiner oder sehr schwacher HER4-Expression (IRS-Score 0-1) eine schwächere TAAR-1 Expression zeigten (medianer IRS-Score 4). Auch die Beurteilung der Expressionsintensität zeigte eine positive Korrelation. Es konnte gezeigt werden, dass eine intensive TAAR1-Expression positiv mit dem HER4-Status korrelierte. Eine Überexpression des TAAR1-Rezeptors geht meistens mit einem besseren Gesamtüberleben und einem niedrigeren Tumorgrading einher. Die Ergebnisse verhalten sich somit ähnlich wie bisher in der Literatur das Verhalten der HER4-Expression beschrieben wurde. Eine HER4-Expression geht mit einer geringeren Tumorzellproliferation und einer verstärkten Apoptose einher. Dies führt zur Annahme, dass eine Expression der Rezeptoren mit einem besseren Outcome einhergeht. Eine Limitation in der Beurteilung der TAAR1-Expression stellt jedoch der Subtyp dar. 71 Patientinnen unserer Kohorte wurden aufgrund der Tumorsubtyp-Klassifizierung bei der Beurteilung des Tumorgradings nicht berücksichtigt. Um valide Aussagen treffen zu können, bedarf es in Zukunft der Untersuchung größerer Kohorten.



Bislang sind nicht alle Signalkaskaden, welche über den TAAR1 aktiviert werden, erforscht. Des Weiteren ist auch nicht geklärt, ob und welche Interaktion zwischen den erbB- Rezeptoren und dem TAAR1-Rezeptor vorliegt. Ein positiver HER2-Status geht mit einer schlechteren Prognose und einem aggressiveren Verlauf einher. HER2-gerichtete Medikamente, wie die Antikörper Trastuzumab und Pertuzumab wirken über den HER2-Rezeptor, indem sie die Zellproliferation der Krebszellen verhindern (Mates et al., 2015; Minckwitz et al., 2017). Die erbB-Rezeptoren gehören zu den Rezeptoren mit Enzymaktivität. TAAR1 hingegen gehört zu den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Welche Rolle die Expression und die Funktion der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in HER2 – positiven Tumorzellen spielt, ist bislang unklar. Bhat et. al (2018) führten Untersuchungen zur Rolle der GPCR in HER2-positiven Brustkrebszellen durch. Insgesamt wurden 352 GPCR untersucht. Als einziger Rezeptor konnte GPR110 mit einer Überexpression in anti – HER2-Therapie-resistenten Tumorzellen nachgewiesen werden (Bhat et al., 2018). Beim GPR110 handelt es sich um einen Orphan-Rezeptor, der vermutlich durch ein Protoonkogen kodiert wird, da er häufig verstärkt in Lungenkrebs, Prostatakrebs und Gliomen exprimiert wird (Bhat et al., 2018). Die Genunterdrückung des GPR110 – Rezeptors über siRNA Knockdown führte zu einem reduzierten Tumorwachstum der anti – HER2 -resistenten Tumorzellen (Bhat et al., 2018). Hierbei handelt es sich um HER2-positive Brustkrebstumorzellen, die nicht auf die HER2-gerichtete medikamentöse Therapien ansprechen. Die Therapie dieser Tumore gestaltet sich besonders schwierig und die Betroffenen sind oft mit einem Frührezidiv konfrontiert. In ihrer Studie über den Nachweis von G-Protein-gekoppelten Rezeptoren konnten Bhat et. al (2018) zeigen, dass der GPR110-Rezeptor die Tumorzellproliferation in HER2-positiven Brustkrebszellen sowie vermutlich auch das Ansprechen auf HER2-gerichtete Therapien beeinflusst. Es wird angenommen, dass G- Protein-gekoppelte Rezeptoren eine entscheidende Rolle in der Tumorgenese, -wachstum und –metastasierung spielen (Dorsam & Gutkind, 2007). Für TAAR1 konnte bislang gezeigt werden, dass die Aktivierung nicht nur die Tumorentstehung, sondern auch die Funktion und die Malignität der Tumorzellen beeinflusst (Fleischer et al., 2018). Das verbesserte Verständnis der Interaktion der GPCR und der erbB – Rezeptoren könnte in Zukunft dazu beitragen, dass neue pharmakologische Ansatzpunkte zur Therapie von Brustkrebs entstehen.

### **5.3 Untersuchungen zur TAAR1- Expression an den Zelllinien MCF7 und HCC3153 nach Liganden-Stimulation**

Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde die TAAR1-Expression nach Stimulation mit 3 verschiedenen Stimulanzien auf Proteinebene (Western Blot) untersucht. Die Expression wurde an den beiden Tumorzelllinien MCF7 und HCC3153 untersucht. Die Zelllinie HCC3153 charakterisiert sich durch eine Mutation in der BRCA1-Region. Die Zelllinie MCF7 entstammt einem duktalem Karzinom und ist gekennzeichnet durch eine hohe Östrogen-Sensitivität. Patientinnen, die eine BRCA1-Mutation aufweisen, leiden häufig an einem Mammakarzinom mit einem negativen Hormonstatus (Heublein et al., 2015; Stevens et al., 2013). Die Erstellung eines Therapiekonzeptes für diese Patientinnen gestaltet sich schwierig, da eine endokrine Therapie nur bedingt möglich ist (Heublein et al., 2015; Stevens et al., 2013). Oft werden die Patientinnen

gravierenden Vorbeugemaßnahmen wie einer beidseitigen Mastektomie und Ovariectomie unterzogen (Kurian et al., 2010). Die Erkennung neuer Signalmechanismen und die Untersuchung der Grundlagen des BRCA1-Mechanismus sind daher Bestandteil der aktuellen Forschung. Ziel ist es, neue Therapieansätze und Medikamente zu erforschen und in Zukunft für die Patientinnen ein verbessertes, individualisiertes Therapieregime zu erstellen. Einige In-vitro-Studien zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen Schilddrüsendysfunktionen sowie dem Entstehen von Mammakarzinomen. Im ersten Abschnitt unserer Arbeit konnte bei einer Langzeitbeobachtung von 14 Jahren ein signifikant erhöhtes Gesamtüberleben bei Brustkrebspatientinnen mit starker TAAR1-Expression (IRS >6) beobachtet werden. Im zweiten Abschnitt dieser Arbeit wurde das Proliferationsverhalten des TAAR1 nach Stimulation mit den Agonisten Tyramin, Tetrac sowie T3 untersucht. Tyramin ist ein biogenes Amin, welches durch die Decarboxylierung aus der Aminosäure Tyrosin entsteht und natürlicherweise in Nahrungsmitteln bei der Zersetzung von Eiweißen vorkommt sowie auch endogen im Körper synthetisiert wird (Andersen et al., 2019). Insbesondere bei der Fermentation können hohe Mengen an Tyramin entstehen. Hohe Tyramin-Konzentrationen sind vor allem im Käse bekannt (Andersen et al., 2019). Wie hoch die Konzentration in Lebensmitteln ist, obliegt hierbei verschiedenen Faktoren, wie dem natürlichen Vorkommen, den Umgebungsbedingungen wie dem pH – Wert oder der Temperatur sowie dem Vorkommen von Tyramin-bildenden Mikroorganismen (Andersen et al., 2019). Biogenen Aminen wie dem Tyramin wird eine Beteiligung an physiologischen Prozessen, insbesondere der Neuromodulation, zugeschrieben (Andersen et al., 2019; Mark D. Berry, 2004; Pei et al., 2016). Hierbei wird ein Zusammenspiel mit den Neurotransmittern angenommen (Mark D. Berry, 2004; Pei et al., 2016). Von allen biogenen Aminen ist Tyramin das mit der höchsten Toxizität bei Überkonsum (Andersen et al., 2019). Die Entstehung des Tyramins erfolgt über die Decarboxylierung der Aminosäure L-Tyrosin durch das Enzym Aromatische-L-Aminosäure-Decarboxylase (Mark D. Berry, 2004). Ihr Abbau erfolgt wiederum über die Monoaminoxidase A und B (Mark D. Berry, 2004; Yang & Neff, 1973). Toxische Konzentrationen, die z.B. bei der Einnahme von MAO – Hemmern entstehen können, führen über die vermehrte Freisetzung von Noradrenalin zu Bluthochdruck bis hin zur hypertensiven Krise, Kopfschmerzen sowie einem zunehmenden Atemminutenvolumen (Andersen et al., 2019). Diese Wirkung wird auch als „cheese effect“ bezeichnet (Andersen et al., 2019)

Es konnte gezeigt werden, dass „trace amines“ wie das Tyramin an TAA -Rezeptoren binden (Borowsky et al., 2001). Jedoch wird auch eine Wirkung über adrenerge Rezeptoren vermutet. An einem Herzmodell von Ratten konnte ein positiv chronotroper Effekt des Tyramins beobachtet werden. Die Wirkung konnte mit dem Betablocker Propranolol gehemmt werden, was die Annahme unterstützt, dass Tyramin über adrenerge Rezeptoren zu einer sympathomimetischen Reaktion führt (Andersen et al., 2019; Frascarelli et al., 2008). Das Schilddrüsenhormon – Derivat 3-Iodthyronamin, welches mit dem Tyramin verwandt ist, wirkt spezifisch über den TAAR1-Rezeptor und führt im kardiovaskulären System zu Reaktionen wie einer Bradykardie oder Hypothermie (Andersen et al., 2019; Brix et al., 2011; Scanlan et al., 2004). Es hat im Gegensatz zum Tyramin somit eine negativ chronotrope Wirkung. In Zusammenschau der Befunde ist dementsprechend eine modulierende Funktion des Tyramins im kardiovaskulären System über TAA-Rezeptoren, jedoch auch über den typischen Neurotransmitter-Rezeptor anzunehmen. Zum

Zeitpunkt unserer Untersuchungen gab es bereits Daten und Untersuchungen zur Wirkung von „trace amines“ im Nerven- und Herzkreislaufsystem, jedoch keine Studien zur Wirkung bei Brustkrebszellen.

Für die Schilddrüsenhormone T3 und T4 konnte in früheren Studien gezeigt werden, dass sie eine proangiogenetische Wirkung in Tumorzellen haben (Schmohl et al., 2019). Hierbei spielt die Signalaktivierung über den Oberflächenrezeptor Integrin  $\alpha\text{V}\beta 3$  eine wesentliche Rolle (Schmohl et al., 2019). Die Schilddrüsenhormone führen über die Bindung an diesen Oberflächenrezeptor zu einer gesteigerten Proliferation der Tumorzellen sowie einer gesteigerten Teilungsaktivität der Endothelzellen und der vaskulären Muskulatur, was schlussendlich eine gesteigerte Angiogenese zur Folge hat (Bharali et al., 2013). Die tumorproliferative Wirkung des Schilddrüsenhormons T4 erfolgt nach Bindung an  $\alpha\text{V}\beta 3$  und führt hierüber zu einer Aktivierung des MAP- Kinase- Weges (Bharali et al., 2013; Davis et al., 2006). Tetraiodothyroessigsäure (Tetrac), ein natürlich vorkommendes deaminiertes Derivat des Schilddrüsenhormons T4, hemmt die Wirkung der Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf die Tumorangiogenese, indem es das Oberflächenprotein Integrin  $\alpha\text{V}\beta 3$  blockiert (Bharali et al., 2013; Schmohl et al., 2019). Es führt über eine Hemmung der Transkription der vaskulären Wachstumsfaktoren (VGEF) zu einer reduzierten Proliferation der Endothelzellen und hemmt zudem die Tumorzellmigration (Schmohl et al., 2019). Bharali et al. (2013) untersuchten die Wirkung von Tetrac und Tetrac-Nanopartikeln bei therapieresistentem Brustkrebs. Hierbei konnte beobachtet werden, dass eine Behandlung mit Tetrac zu einer Abnahme der Tumormasse führt (Bharali et al., 2013; Tremmel et al., 2019). Rabaa et al. (2008) untersuchten die Wirkung von Tetrac an verschiedenen Krebszellen, unter anderem auch an der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Autoren beschreiben für alle untersuchten Zelllinien eine antiproliferative Wirkung nach Behandlung mit Tetrac, selbst in Tumorzellen, die eine Resistenz gegen das Chemotherapeutikum Doxorubin zeigten (Rebbaa et al., 2008). Im Rahmen unserer Untersuchungen erfolgte die Inkubation der beiden Zelllinien HCC3153 und MCF7 mit 0,01  $\mu\text{M}$  und 0,1 nM Tetrac über 48 Stunden. Für die Zelllinie HCC 3153 konnte nach Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Tetrac eine signifikante Erhöhung der TAAR1-Proteinexpression beobachtet werden ( $p=0,028$ ). Die Auswertung unserer immunhistochemischen Analysen zeigte, dass eine gesteigerte TAAR1- Expression mit einem verbesserten Gesamtüberleben einhergeht. Die Ergebnisse auf Proteinebene unterstützen bei einer Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$  Tetrac die Annahme, dass eine Behandlung mit Tetrac vermutlich über eine Bindung an den TAAR1-Rezeptor zu einer Überexpression dieser führt und somit eine inhibierende Wirkung auf das Tumorwachstum zeigt. Die TAAR1-Upregulation konnte hierbei bei der BRCA1-mutierten Zelllinie beobachtet werden, welche oft therapieresistent sind. Somit unterstützen unsere Ergebnisse indirekt die Studien von Bharali et. al. (2013).

Eine Stimulation mit 0,01  $\mu\text{M}$  Tetrac zeigte keine signifikante Beeinflussung der TAAR1-Expression in HCC3153-Zellen. Die 48 -stündige Inkubation von MC7- Zellen mit 0,01  $\mu\text{M}$  und 0,1  $\mu\text{M}$  Tetrac zeigte ebenfalls keine signifikante Änderung der TAAR1- Expression.

Der Unterschied zwischen beiden Zelllinien lässt vermuten, dass in der BRCA1-mutierten Zelllinie die TAAR1- Bindung vermutlich weitere Signalmechanismen aktiviert, welche zu einer

gesteigerten TAAR1-Expression führen. Patientinnen mit einer BRCA1-Mutation erleiden oft einen Brustkrebs mit negativem Hormonstatus (Heublein et al., 2015). Unsere immunhistochemische Auswertung zeigte eine positive Korrelation der TAAR1-Expression mit dem HER2-Status. Welche Interaktion zwischen dem G-Protein-gekoppelten Rezeptor TAAR1 und dem epidermalen Wachstumsrezeptor HER2 besteht, ist nicht geklärt. Möglicherweise agieren gemeinsame Coaktivatoren. Um herauszufinden ob TAAR1 eine tumorsuppressive Wirkung in HER2-mutierten Zellen aufweist, sollten in Zukunft spezifischere Genuntersuchungen, wie z.B. eine Genunterdrückung des Rezeptors erfolgen. Eine Möglichkeit wäre ein siRNA -Knockout mit anschließender Beobachtung des Tumorpherhaltens. Die Behandlung und Prophylaxe des BRCA1-mutierten Karzinoms gestaltet sich schwierig. Es wird bereits nach geeigneteren Medikamenten und Maßnahmen zur Prophylaxe und Therapie gesucht. Um die Therapie und Behandlung zu optimieren, sollten die biologischen Grundlagen und Mechanismen der Signaltransduktion des BRCA1 – mutierten Karzinoms weiter erforscht werden. Auch wenn die Interaktion mit dem TAAR1-Rezeptor nicht genau geklärt ist und definitiv weitere Untersuchungen notwendig sind, um valide Aussagen treffen zu können, könnte der TAAR1- Rezeptor und seine Agonisten in Zukunft neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Brustkrebs, insbesondere bei triple-negativen Tumoren, liefern.

2019 veröffentlichen Tremmel et. al (2019) Ergebnisse, die die TAAR1-Regulation anhand der beiden Zelllinien T47D und MCF7 nach Hinzugabe von Tetrac, T3 und Thyronamin auf Proteinebene und mittels PCR untersuchten. Hierbei beschreiben die Autoren eine signifikante Hochregulation des TAAR1- Rezeptors in MCF7-Zellen nach Stimulation mit 10 nM 3-Iodothyronamin (T<sub>1</sub>AM) über 24 Stunden. In den T47D -Zellen konnte eine signifikante Erhöhung des TAAR1-Rezeptors auf Proteinebene durch eine Stimulation mit 10 nM T<sub>1</sub>AM nach Vorbehandlung mit 10 µg/ml Estradiol erreicht werden. Eine signifikante Beeinflussung des TAAR1 -Rezeptors nach Stimulation mit T3 und Tetrac auf Proteinebene nach 24 -stündiger Inkubationszeit wird nicht beschrieben (Tremmel et al., 2019). Die Unterschiede zu unseren Ergebnissen liegen vermutlich zum einen an der Auswahl der Tumorzelllinien als auch an den unterschiedlichen Konzentrationen, die verwendet wurden, sowie der unterschiedlichen Stimulationsdauer. Zudem ist zu erwähnen, dass die PCR – Untersuchungen von Tremmel et. al. (2019) analog zu unseren Proteinuntersuchungen ebenfalls eine signifikante Erhöhung der TAAR1-mRNA Expression in MCF7- und T47D-Zellen nach 2-stündiger Inkubation mit 0,1 nM Tetrac zeigten. Tetrac könnte somit über die Hochregulation und Überexpression des TAAR1-Rezeptors eine tumorsupprimierende Wirkung herbeiführen. Ein wesentliches Augenmerk in zukünftigen Studien hierzu sollte auch auf die Interaktion der Liganden mit den peripheren Schilddrüsenhormonen erfolgen. Thyronamin entsteht aus Trijodthyronin (T3) durch Decarboxylierung und Deiodierung (Brix et al., 2011; Scanlan et al., 2004; Tremmel et al., 2019). Ähnlich dem Thyronamin kann auch Tetrac aus den Schilddrüsenhormonen durch eine Deaminierung entstehen (Tremmel et al., 2019). Thyronamin wird ebenfalls eine inhibierende Wirkung auf die Tumorzellproliferation zugeschrieben (Rogowski et al., 2017). Beide Metabolite wirken über den TAAR1- Rezeptor. Es ist somit denkbar, dass eine Bindung TAAR1 zu einem gesteigerten Abbau der Schilddrüsenhormone führt mit folglich verstärkter Rezeptorexpression.

In unserer Versuchsreihe mit dem biogenen Amin Tyramin, als weiterer TAAR1-Ligand, erfolgte die Inkubation der HCC3153- und MCF7-Zellen mit jeweils 0,01 nM Tyramin und 0,1 nM Tyramin über 48 Stunden. Interessanterweise zeigten sich hierbei für die Zelllinie HCC3153 paradoxe Ergebnisse. Während die Stimulation mit 0,01 nM Tyramin zu einer signifikanten Erhöhung der TAAR1-Expression führte, konnte nach Stimulation mit 0,1 nM Tyramin eine signifikante Reduktion der TAAR1-Proliferation beobachtet werden. Wie bereits beschrieben, wirkt Tyramin zum einen direkt über den TAAR1-Rezeptor. Es wird sogar eine besonders hohe Affinität beschrieben (Borowsky et al., 2001). Es weist jedoch, wie die anderen „trace amines“ auch, neuromodulatorische Eigenschaften auf. Eine Vermutung wäre somit, dass eine Stimulation der Tumorzellen mit einer niedrigeren Tyramin-Konzentration über TAAR1 zu einer gesteigerten TAAR1-Synthese führt. Eine Stimulation der Tumorzellen mit höheren Konzentrationen führt hingegen, vermutlich über eine Aktivierung von adrenergen Rezeptoren, zu einer Downregulation des TAAR1-Rezeptors. Bislang wurde in der Literatur den Adrenozeptoren eine beschleunigende Wirkung auf das Tumorstadium und die Metastasenbildung zugeschrieben (Cole & Sood, 2012).

Für die Zelllinie MCF7 konnten keine signifikanten Änderungen der TAAR1-Proliferation gezeigt werden. Bislang sind keine Untersuchungen zur Wirkung von „trace amines“ bei BRCA1-Mutationen beschrieben. Ob tatsächlich ein Zusammenhang besteht, ist daher fraglich. Daher sind, um die Ergebnisse zu untermauern, weitere Untersuchungen sowohl in-vitro als auch anhand von klinischen Studien notwendig. Eine Stimulation mit T3 zeigte in beiden Zelllinien keine signifikante Änderung der TAAR1-Expression. Gleiche Beobachtungen wurden durch Tremmel et al. beschrieben (Tremmel et al., 2019).

Die Untersuchung des Proliferationsverhaltens in unserer Arbeit erfolgte rein auf Proteinebene. Um valide Aussagen machen zu können, sollte in Zukunft das Proliferationsverhalten auch mit anderen quantitativen Methoden untersucht werden.

Die Proliferationsuntersuchungen deuten auf einen Zusammenhang zwischen der TAAR1-Expression und einer BRCA1-Mutation. In unserer immunhistochemischen Auswertung konnten wir eine positive Korrelation der TAAR1-Expression mit dem HER2-Status zeigen. Interessant wären daher in Zukunft auch In-vitro-Untersuchungen zur Beurteilung, ob der HER2-Status bei BRCA1-mutierten Mammakarzinomen durch eine Behandlung mit TAAR1-Agonisten beeinflussbar ist.

## 6 Zusammenfassung

Als die häufigste maligne Tumorerkrankung der Frau, spielt das Mammakarzinom eine wichtige Rolle in der Tumorforschung. In etwa 5-10 % der Erkrankungsfälle liegt eine genetische Prädisposition vor. Insbesondere Patientinnen mit einer Mutation der BRCA1 und BRCA2-Region neigen zur Erkrankung am Mammakarzinom. Diese Tumore weisen häufig einen negativen Hormonstatus auf und sind daher für eine endokrine Therapie oft nicht geeignet. Die Erforschung neuer pharmakologischer Zielstrukturen, vor allem bei den sogenannten triple-negativen Formen, ist Bestandteil zahlreicher Studien. Ziel ist es, im Sinne einer „targeted therapy“, neue spezifische Antikörper und niedermolekulare Strukturen zu erforschen, die in Kombination mit herkömmlichen Methoden die Krebstherapie verträglicher machen.

Vorhergehende Studien zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten von Mammakarzinomen und Schilddrüsenerkrankungen. Zudem konnte anhand von In-vitro-Untersuchungen eine höhere Protein- und Genexpression der Thyroidhormonrezeptoren in BRCA1-mutierten Brustkrebszellen beobachtet werden. Beim Abbau der Schilddrüsenhormone entstehen unter anderem endogene Amine wie das Thyronamin, die eine metabolische Aktivität aufweisen und, im Gegensatz zu den Schilddrüsenhormonen, an G-Protein-gekoppelte Rezeptoren binden. Ein Vertreter dieser Gruppe ist der TAAR1-Rezeptor. Dieser bindet neben dem 3-Iodthyronamin (TIAM) eine Reihe weiterer Liganden, die unter dem Begriff „trace amines“ zusammengefasst sind. Hierzu gehört unter anderem auch das Tyramin, ein endogenes Amin, das zudem neuromodulatorische Wirkungen besitzt. Bislang gibt es zahlreiche Studien, welche das Vorkommen und die Funktion des TAAR1-Rezeptors im zentralen Nervensystem untersuchten. Ob und welche Rolle der TAAR1-Rezeptor bei der Entstehung von Karzinomen spielt, ist hingegen bislang ein wenig untersuchtes Themengebiet und Bestandteil gegenwärtiger Forschung.

Ziel dieser Arbeit war es, das Expressionsverhalten des TAAR1-Rezeptors in Mammakarzinomen zu untersuchen. Neben der immunhistochemischen Auswertung an 227 Gewebsschnitten von Mammakarzinomen, erfolgte zudem die Untersuchung des Stimulationsverhaltens auf Proteinebene. Alle Gewebsschnitte entstammen von Patientinnen mit primärem Brustkrebs und ohne Nachweis von Fernmetastasen zum Zeitpunkt der intraoperativen Entnahme. Die Untersuchung des Stimulationsverhaltens im zweiten Abschnitt dieser Arbeit erfolgte unter Berücksichtigung der Wirkung auf BRCA1-mutierte Mammakarzinome. Als Grundlage wurden daher die beiden Zelllinien MCF7 und HCC3153 ausgewählt. MCF7 fungierte als Vertreter des sporadischen Mammakarzinoms, während HCC3153 als Vertreter des BRCA1-mutierten Mammakarzinoms ausgewählt wurde.

Es konnte eine Korrelation zwischen der TAAR1-Expression und dem Tumorgrading beobachtet werden. Eine stärkere TAAR1-Expression war mit einem niedrigeren Tumorgrading assoziiert. Ein niedriges Grading geht mit einem geringeren Malignitätspotential einher. Eine höhere Expression des Rezeptors ging sowohl mit einer besseren 10 -Jahres-Überlebensrate als auch einem verbesserten Gesamtüberleben einher. Sowohl ein niedrigeres Tumorgrading als auch eine

höhere TAAR1-Expression sind mit einem besseren Gesamtüberleben assoziiert und stützen die Annahme, dass die TAAR1-Expression mit einem besseren Outcome korreliert. Des Weiteren konnte eine positive Korrelation der TAAR1-Expression mit der HER2- und HER4-Expression gezeigt werden. Ein positiver HER2-Status ging mit einer stärkeren TAAR1-Expression einher. Ähnlich verhielt es sich mit der HER4-Expression. Je höher die Expression des HER4-Rezeptors war, desto stärker wurde auch TAAR1 exprimiert. Ein positiver HER4-Status erhöht die Wahrscheinlichkeit des Therapieansprechens auf eine endokrine Therapie und seine verstärkte Expression geht mit einer niedrigeren Tumorzellproliferation einher. Eine erhöhte TAAR1-Expression korrelierte in unseren Untersuchungen mit einem besseren Überleben. Die Untersuchungen untermauern somit die Annahme, dass die Expression beider Rezeptoren mit einem besseren Outcome assoziiert ist.

Zur Untersuchung des TAAR1-Stimulationsverhaltens wurden die beiden Zelllinien HCC3153 und MCF7 48 Stunden lang mit Tetrac, T3 und Tyramin sowie zeitgleich mit T3 und Tetrac inkubiert. Für die Zelllinie HCC3153 konnte eine signifikant höhere TAAR1-Proteinexpression nach Stimulation mit 0,1  $\mu$ M Tetrac und 0,01 nM Tyramin beobachtet werden. Eine TAAR1 – Upregulation durch entsprechende Agonisten, insbesondere bei den triple-negativen Tumoren, könnte somit neue therapeutische und prognostische Ansätze liefern. Bei einer Stimulation mit 0,1 nM Tyramin konnte in der Zelllinie HCC3153 eine signifikante Reduktion der Proteinexpression beobachtet werden. Die sporadische Karzinomzelllinie zeigte keine signifikanten Veränderungen. Die Diskrepanz zwischen beiden Zelllinien lässt vermuten, dass in der BRCA1-mutierten Zelllinie die TAAR1-Bindung vermutlich weitere Signalmechanismen aktiviert, die zu einer veränderten TAAR1-Expression führen.

Die Ergebnisse führen zu einer Annahme, dass TAAR1 ein unabhängiger Prognosefaktor für das Gesamtüberleben bei Patientinnen mit Brustkrebs darstellen könnte. Zum anderen deuten die Ergebnisse auf einen Zusammenhang zwischen der TAAR1-Expression und einer BRCA1-Mutation hin. Als ein potenzieller Marker für ein besseres Outcome ist es daher sicher empfehlenswert, weitere Experimente zur antitumoralen Wirkung des TAAR1 durchzuführen, um in Zukunft neue therapeutische Ansätze in der Behandlung von Mammakarzinomen zu liefern.

## 7 Literaturverzeichnis

- Alexander, S. P. H., Mathie, A. & Peters, J. A. (2011). Guide to Receptors and Channels (GRAC), 5th edition. *British Journal of Pharmacology*, 164 Suppl 1(Suppl 1), S1-324. [https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649\\_1.x](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01649_1.x)
- Andersen, G., Marcinek, P., Sulzinger, N., Schieberle, P. & Krautwurst, D. (2019). Food sources and biomolecular targets of tyramine. *Nutrition Reviews*, 77(2), 107–115. <https://doi.org/10.1093/nutrit/nuy036>
- Antoniou, A., Pharoah, P. D. P., Narod, S., Risch, H. A., Eyfjord, J. E., Hopper, J. L., Loman, N., Olsson, H., Johannsson, O., Borg, A., Pasini, B., Radice, P., Manoukian, S., Eccles, D. M., Tang, N., Olah, E., Anton-Culver, H., Warner, E., Lubinski, J., . . . Easton, D. F. (2003). Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. *American Journal of Human Genetics*, 72(5), 1117–1130. <https://doi.org/10.1086/375033>
- Audet, M. & Bouvier, M. (2012). Restructuring G-protein- coupled receptor activation. *Cell*, 151(1), 14–23. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.09.003>
- Babusyte, A., Kotthoff, M., Fiedler, J. & Krautwurst, D. (2013). Biogenic amines activate blood leukocytes via trace amine-associated receptors TAAR1 and TAAR2. *Journal of leukocyte biology*, 93(3), 387–394. <https://doi.org/10.1189/jlb.0912433>
- Baker, G. B., Bornstein, R. A., Rouget, A. C., Ashton, S. E., van Muyden, J. C. & Coutts, R. T. (1991). Phenylethylaminergic mechanisms in attention-deficit disorder. *Biological Psychiatry*, 29(1), 15–22.
- Balic, M., Thomssen, C., Würstlein, R., Gnant, M [Michael] & Harbeck, N [Nadia] (2019). St. Gallen/Vienna 2019: A Brief Summary of the Consensus Discussion on the Optimal Primary Breast Cancer Treatment. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 14(2), 103–110. <https://doi.org/10.1159/000499931>
- Barak, L. S., Salahpour, A., Zhang, X., Masri, B., Sotnikova, T. D [Tatyana D.], Ramsey, A. J., Violin, J. D., Lefkowitz, R. J., Caron, M. G [Marc G.] & Gainetdinov, R. R [Raul R.] (2008). Pharmacological characterization of membrane-expressed human trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) by a bioluminescence resonance energy transfer cAMP biosensor. *Molecular pharmacology*, 74(3), 585–594. <https://doi.org/10.1124/mol.108.048884>
- Barger, G. & Dale, H. H. (1910). Chemical structure and sympathomimetic action of amines. *Journal of Physiology*, 41(1-2), 19–59.
- Barnes, N. L. P., Khavari, S., Boland, G. P., Cramer, A., Knox, W. F. & Bundred, N. J. (2005). Absence of HER4 expression predicts recurrence of ductal carcinoma in situ of the breast. *Clinical Cancer Research*, 11(6), 2163–2168. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-04-1633>



- Bauerfeind, I. (2013). *Mammakarzinome* (14. Aufl.). *Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität*. Zuckschwerdt.
- Bauerfeind, I., Di Gioia, D., Harbeck, N [Nadia], Pigorsch, S. U. & Salat, C. (Hrsg.). (2021). *Manual / Tumorzentrum München an den Medizinischen Fakultäten der Ludwig-Maximilians-Universität und der Technischen Universität. Mammakarzinome: Empfehlungen zur Diagnostik, Therapie und Nachsorge* (18. Aufl.). Zuckschwerdt Verlag.
- Berry, M. D [M. D.] (2007). The potential of trace amines and their receptors for treating neurological and psychiatric diseases. *Reviews on recent clinical trials*, 2(1), 3–19.
- Berry, M. D [M. D.], Scarr, E., Zhu, M. Y., Paterson, I. A. & Juorio, A. V. (1994). The effects of administration of monoamine oxidase-B inhibitors on rat striatal neurone responses to dopamine. *British Journal of Pharmacology*, 113(4), 1159–1166.
- Berry, M. D [Mark D.] (2004). Mammalian central nervous system trace amines. Pharmacologic amphetamines, physiologic neuromodulators. *Journal of neurochemistry*, 90(2), 257–271. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02501.x>
- Bharali, D. J., Yalcin, M., Davis, P. J. & Mousa, S. A. (2013). Tetraiodothyroacetic acid-conjugated PLGA nanoparticles: a nanomedicine approach to treat drug-resistant breast cancer. *Nanomedicine*, 8(12), 1943–1954. <https://doi.org/10.2217/nnm.12.200>
- Bhat, R. R., Yadav, P., Sahay, D., Bhargava, D. K., Creighton, C. J., Yazdanfard, S., Al-Rawi, A., Yadav, V., Qin, L., Nanda, S., Sethunath, V., Fu, X., Angelis, C. de, Narkar, V. A., Osborne, C. K., Schiff, R. & Trivedi, M. V. (2018). GPCRs profiling and identification of GPR110 as a potential new target in HER2+ breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 170(2), 279–292. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4751-9>
- Bhat-Nakshatri, P., Sweeney, C. J. & Nakshatri, H. (2002). Identification of signal transduction pathways involved in constitutive NF-kappaB activation in breast cancer cells. *Oncogene*, 21(13), 2066–2078. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205243>
- Böcker, W. (2002). WHO classification of breast tumors and tumors of the female genital organs: pathology and genetics [WHO-Klassifikation der Tumoren der Mamma und des weiblichen Genitale: Pathologie und Genetik]. *Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, 86, 116–119.
- Borowsky, B., Adham, N., Jones, K. A., Raddatz, R., Artymyshyn, R., Ogozalek, K. L., Durkin, M. M., Lakhiani, P. P., Bonini, J. A., Pathirana, S., Boyle, N., Pu, X., Kouranova, E., Lichtblau, H., Ochoa, F. Y., Branchek, T. A [T. A.] & Gerald, C. (2001). Trace amines: identification of a family of mammalian G protein-coupled receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16), 8966–8971. <https://doi.org/10.1073/pnas.151105198>

- Branchek, T. A [Theresa A.] & Blackburn, T. P. (2003). Trace amine receptors as targets for novel therapeutics: legend, myth and fact. *Current Opinion in Pharmacology*, 3(1), 90–97. [https://doi.org/10.1016/s1471-4892\(02\)00028-0](https://doi.org/10.1016/s1471-4892(02)00028-0)
- Brierley, J. D. & Gospodarowicz, M. K. (2016). *TNM Classification of Malignant Tumours* (8th ed.). John Wiley & Sons Incorporated.  
<https://ebookcentral.proquest.com/lib/gbv/detail.action?docID=4792667>
- Brix, K., Fuhrer, D. & Biebermann, H. (2011). Molecules important for thyroid hormone synthesis and action - known facts and future perspectives. *Thyroid research*, 4 Suppl 1, S9. <https://doi.org/10.1186/1756-6614-4-S1-S9>
- Bunzow, J. R [J. R.], Sonders, M. S., Arttamangkul, S., Harrison, L. M., Zhang, G., Quigley, D. I., Darland, T., Suchland, K. L [K. L.], Pasumamula, S., Kennedy, J. L., Olson, S. B., Magenis, R. E., Amara, S. G. & Grandy, D. K [D. K.] (2001). Amphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, lysergic acid diethylamide, and metabolites of the catecholamine neurotransmitters are agonists of a rat trace amine receptor. *Molecular pharmacology*, 60(6), 1181–1188.
- Chao, C., Jacobson, L. P., Tashkin, D., Martínez-Maza, O., Roth, M. D., Margolick, J. B., Chmiel, J. S., Holloway, M. N., Zhang, Z.-F. & Detels, R. (2009). Recreational amphetamine use and risk of HIV-related non-Hodgkin lymphoma. *Cancer Causes and Control*, 20(5), 509–516. <https://doi.org/10.1007/s10552-008-9258-y>
- Coates, A. S., Winer, E. P., Goldhirsch, A., Gelber, R. D [R. D.], Gnant, M [M.], Piccart-Gebhart, M., Thürlimann, B. & Senn, H.-J. (2015). Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Annals of Oncology*, 26(8), 1533–1546. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv221>
- Cole, S. W. & Sood, A. K. (2012). Molecular pathways: beta-adrenergic signaling in cancer. *Clinical Cancer Research*, 18(5), 1201–1206. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-0641>
- Davis, F. B., Tang, H.-Y., Shih, A., Keating, T., Lansing, L., Hercbergs, A., Fenstermaker, R. A., Mousa, A., Mousa, S. A., Davis, P. J. & Lin, H.-Y. (2006). Acting via a cell surface receptor, thyroid hormone is a growth factor for glioma cells. *Cancer Research*, 66(14), 7270–7275. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4365>
- Dawood, S., Broglio, K., Esteva, F. J., Ibrahim, N. K., Kau, S.-W., Islam, R., Aldape, K. D [K. D.], Yu, T.-K., Hortobagyi, G. N. & Gonzalez-Angulo, A. M. (2008). Defining prognosis for women with breast cancer and CNS metastases by HER2 status. *Annals of Oncology*, 19(7), 1242–1248. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdn036>
- Ditsch, N., Kolberg-Liedtke, C., Friedrich, M., Jackisch, C., Albert, U.-S., Banys-Paluchowski, M., Bauerfeind, I., Blohmer, J.-U., Budach, W., Dall, P., Fallenberg, E. M., Fasching, P. A., Fehm, T., Gerber, B., Gluz, O., Harbeck, N [Nadia], Heil, J., Huober, J., Kreipe, H.-H., . . . Thill, M. (2021). AGO Recommendations for the

- Diagnosis and Treatment of Patients with Early Breast Cancer: Update 2021. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 16(3), 214–227. <https://doi.org/10.1159/000516419>
- Ditsch, N., Liebhardt, S., Koch, F. von, Lenhard, M., Vogeser, M., Spitzweg, C., Gallwas, J. & Toth, B. (2010). Thyroid function in breast cancer patients. *Anticancer Research*, 30(5), 1713–1717.
- Ditsch, N., Toth, B., Himsl, I., Lenhard, M., Ochsenkuhn, R., Friese, K., Mayr, D. & Jeschke, U. (2013). Thyroid hormone receptor (TR)alpha and TRbeta expression in breast cancer. *Histology and Histopathology*, 28(2), 227–237. <https://doi.org/10.14670/HH-28.227>
- Dorsam, R. T. & Gutkind, J. S. (2007). G-protein-coupled receptors and cancer. *Nature Reviews. Cancer*, 7(2), 79–94. <https://doi.org/10.1038/nrc2069>
- Eeles, R. A. (2000). Future possibilities in the prevention of breast cancer: Intervention strategies in BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Breast Cancer Research*, 2(4), 283. <https://doi.org/10.1186/bcr70>
- Elston, C. W. & Ellis, I. O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, 19(5), 403–410. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x>
- Espinoza, S [Stefano], Leo, D [Damiana], Sotnikova, T. D [Tatyana D.], Shahid, M., Kaariainen, T. M. & Gainetdinov, R. R [Raul R.] (2018). Biochemical and Functional Characterization of the Trace Amine-Associated Receptor 1 (TAAR1) Agonist RO5263397. *Frontiers in pharmacology*, 9, 645. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00645>
- Febbo, P. G., Ladanyi, M., Aldape, K. D [Kenneth D.], Marzo, A. M. de, Hammond, M. E., Hayes, D. F., Iafrate, A. J., Kelley, R. K., Marcucci, G., Ogino, S., Pao, W., Sgroi, D. C. & Birkeland, M. L. (2011). NCCN Task Force report: Evaluating the clinical utility of tumor markers in oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network*, 9 Suppl 5, S1-32; quiz S33. <https://doi.org/10.6004/jnccn.2011.0137>
- Fleischer, L. M., Somaiya, R. D. & Miller, G. M. (2018). Review and Meta-Analyses of TAAR1 Expression in the Immune System and Cancers. *Frontiers in pharmacology*, 9, 683. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.00683>
- Foord, S. M., Bonner, T. I., Neubig, R. R., Rosser, E. M., Pin, J.-P., Davenport, A. P., Spedding, M. & Harmar, A. J. (2005). International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacological reviews*, 57(2), 279–288. <https://doi.org/10.1124/pr.57.2.5>
- Frascarelli, S., Ghelardoni, S., Chiellini, G., Vargiu, R., Ronca-Testoni, S., Scanlan, T. S., Grandy, D. K [David K.] & Zucchi, R. (2008). Cardiac effects of trace amines: pharmacological characterization of trace amine-associated receptors. *European journal of pharmacology*, 587(1-3), 231–236. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.03.055>

- Galandrin, S., Oligny-Longpre, G. & Bouvier, M. (2007). The evasive nature of drug efficacy: implications for drug discovery. *Trends in pharmacological sciences*, 28(8), 423–430. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2007.06.005>
- Goswami, C. P. & Nakshatri, H. (2013). PROGgene: gene expression based survival analysis web application for multiple cancers. *Journal of clinical bioinformatics*, 3(1), 22. <https://doi.org/10.1186/2043-9113-3-22>
- Grandy, D. K. [David K.] (2007). Trace amine-associated receptor 1-Family archetype or iconoclast? *Pharmacology & therapeutics*, 116(3), 355–390. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.06.007>
- Granvogl, M., Bugan, S. & Schieberle, P. (2006). Formation of amines and aldehydes from parent amino acids during thermal processing of cocoa and model systems: new insights into pathways of the strecker reaction. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(5), 1730–1739. <https://doi.org/10.1021/jf0525939>
- Gusterson, B. A., Gelber, R. D. [R. D.], Goldhirsch, A., Price, K. N., Säve-Söderborgh, J., Anbazhagan, R., Styles, J., Rudenstam, C. M., Golouh, R. & Reed, R. (1992). Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. *Journal of Clinical Oncology*, 10(7), 1049–1056. <https://doi.org/10.1200/JCO.1992.10.7.1049>
- Harbeck, N. [N.], Aigner, M., Kuschel, B. & Kiechle, M. [M.] (2002). Mammakarzinom - prognostische und prädiktive Faktoren. *Der Onkologe*, 8(8), 808–816. <https://doi.org/10.1007/s00761-002-0355-3>
- Harmeier, A., Obermueller, S., Meyer, C. A. [Claas A.], Revel, F. G. [Florent G.], Buchy, D. [Daniele], Chaboz, S. [Sylvie], Dernick, G., Wettstein, J. G. [Joseph G.], Iglesias, A., Rolink, A., Bettler, B. & Hoener, M. C. [Marius C.] (2015). Trace amine-associated receptor 1 activation silences GSK3beta signaling of TAAR1 and D2R heteromers. *European neuropsychopharmacology : the journal of the European College of Neuropsychopharmacology*, 25(11), 2049–2061. <https://doi.org/10.1016/j.euroneuro.2015.08.011>
- Herbst, R. S. (2004). Review of epidermal growth factor receptor biology. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 59(2 Suppl), 21–26. <https://doi.org/10.1016/j.ijrobp.2003.11.041>
- Heublein, S., Mayr, D., Meindl, A., Angele, M., Gallwas, J., Jeschke, U. & Ditsch, N. (2015). Thyroid Hormone Receptors Predict Prognosis in BRCA1 Associated Breast Cancer in Opposing Ways. *PLoS ONE*, 10(6), e0127072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127072>
- Hoesel, B. & Schmid, J. A. (2013). The complexity of NF-κB signaling in inflammation and cancer. *Molecular Cancer*, 12, 86. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-86>
- Hudis, C. A. (2007). Trastuzumab--mechanism of action and use in clinical practice. *New England Journal of Medicine*, 357(1), 39–51. <https://doi.org/10.1056/NEJMra043186>

- Jansen, S. C., van Dusseldorp, M., Bottema, K. C. & Dubois, A. E. J. (2003). Intolerance to dietary biogenic amines: a review. *Annals of Allergy, Asthma, and Immunology*, 91(3), 233-40; quiz 241-2, 296. [https://doi.org/10.1016/S1081-1206\(10\)63523-5](https://doi.org/10.1016/S1081-1206(10)63523-5)
- Jones, R. S., Juorio, A. V. & Boulton, A. A. (1983). Changes in levels of dopamine and tyramine in the rat caudate nucleus following alterations in impulse flow in the nigrostriatal pathway. *Journal of neurochemistry*, 40(2), 396–401.
- Juorio, A. V., Paterson, I. A., Zhu, M. Y. & Matte, G. (1991). Electrical stimulation of the substantia nigra and changes of 2-phenylethylamine synthesis in the rat striatum. *Journal of neurochemistry*, 56(1), 213–220.
- Kaatsch, P., Spix, C., Katalinic, A., Autoren, 2. w., Meisegeier, S., Franke, M. & Werth, K. (2017). *Krebs in Deutschland für 2013/2014* (11. Ausgabe).
- Kaemmerer, D., Peter, L., Lupp, A., Schulz, S., Sängler, J., Baum, R. P., Prasad, V. & Hommann, M. (2012). Comparing of IRS and Her2 as immunohistochemical scoring schemes in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, 5, 187–194.
- Karamouzis, M. V., Badra, F. A. & Papavassiliou, A. G. (2007). Breast cancer: the upgraded role of HER-3 and HER-4. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 39(5), 851–856. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.11.017>
- Karin, M. (2009). NF-kappaB as a critical link between inflammation and cancer. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 1(5), a000141. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a000141>
- Karoum, F., Linnoila, M., Potter, W. Z., Chuang, L. W., Goodwin, F. K. & Wyatt, R. J. (1982). Fluctuating high urinary phenylethylamine excretion rates in some bipolar affective disorder patients. *Psychiatry Research*, 6(2), 215–222.
- Kiechle, M [Marion]. (2011). *Gynäkologie und Geburtshilfe: [mit dem Plus im Web]* (2., überarb. Aufl.). Urban & Fischer in Elsevier.
- Kohrle, J. (2002). Iodothyronine deiodinases. *Methods in Enzymology*, 347, 125–167. [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(02\)47014-0](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(02)47014-0)
- Koutras, A. K. & Evans, T. R. J. (2008). The epidermal growth factor receptor family in breast cancer. *OncoTargets and therapy*, 1, 5–19. <https://doi.org/10.2147/ott.s3842>
- Koutras, A. K., Fountzilas, G., Kalogeras, K. T., Starakis, I., Iconomou, G. & Kalofonos, H. P. (2010). The upgraded role of HER3 and HER4 receptors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 74(2), 73–78. <https://doi.org/10.1016/j.critrevonc.2009.04.011>
- Kurian, A. W., Sigal, B. M. & Plevritis, S. K. (2010). Survival analysis of cancer risk reduction strategies for BRCA1/2 mutation carriers. *Journal of Clinical Oncology*, 28(2), 222–231. <https://doi.org/10.1200/JCO.2009.22.7991>

- Lam, V. M., Espinoza, S [Stefano], Gerasimov, A. S., Gainetdinov, R. R [Raul R.] & Salahpour, A. (2015). In-vivo pharmacology of Trace-Amine Associated Receptor 1. *European journal of pharmacology*, 763(Pt B), 136–142.  
<https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.06.026>
- Lampert, T., Prütz, F., Seeling, S., Starker, A., Kroll, L. E., Rommel, A., Ryl, L. & Ziese, T. (Hrsg.). (2015). *Gesundheit in Deutschland: Gesundheitsberichterstattung des Bundes, gemeinsam getragen von RKI und Destatis*. Robert Koch-Institut.
- Lebeau, A., Unholzer, A., Amann, G., Kronawitter, M., Bauerfeind, I., Sendelhofert, A., Iff, A. & Löhrs, U. (2003). EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Research and Treatment*, 79(2), 187–198.  
<https://doi.org/10.1023/a:1023958324448>
- Ledonne, A., Federici, M., Giustizieri, M., Pessia, M., Imbrici, P., Millan, M. J., Bernardi, G. & Mercuri, N. B. (2010). Trace amines depress D(2)-autoreceptor-mediated responses on midbrain dopaminergic cells. *British Journal of Pharmacology*, 160(6), 1509–1520.  
<https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2010.00792.x>
- Leo, D [D.], Mus, L., Espinoza, S [S.], Hoener, M. C [M. C.], Sotnikova, T. D [T. D.] & Gainetdinov, R. R [R. R.] (2014). Taar1-mediated modulation of presynaptic dopaminergic neurotransmission: role of D2 dopamine autoreceptors. *Neuropharmacology*, 81, 283–291. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.02.007>
- Lindemann, L., Ebeling, M., Kratochwil, N. A., Bunzow, J. R [James R.], Grandy, D. K [David K.] & Hoener, M. C [Marius C.] (2005). Trace amine-associated receptors form structurally and functionally distinct subfamilies of novel G protein-coupled receptors. *Genomics*, 85(3), 372–385. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2004.11.010>
- Lindemann, L. & Hoener, M. C [Marius C.] (2005). A renaissance in trace amines inspired by a novel GPCR family. *Trends in pharmacological sciences*, 26(5), 274–281.  
<https://doi.org/10.1016/j.tips.2005.03.007>
- Lindemann, L., Meyer, C. A [Claas Aiko], Jeanneau, K., Bradaia, A [Amyaouch], Ozmen, L., Bluethmann, H., Bettler, B., Wettstein, J. G [Joseph G.], Borroni, E., Moreau, J.-L [Jean-Luc] & Hoener, M. C [Marius C.] (2008). Trace amine-associated receptor 1 modulates dopaminergic activity. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 324(3), 948–956. <https://doi.org/10.1124/jpet.107.132647>
- Mates, M., Fletcher, G. G., Freedman, O. C., Eisen, A., Gandhi, S., Trudeau, M. E. & Dent, S. F. (2015). Systemic targeted therapy for her2-positive early female breast cancer: a systematic review of the evidence for the 2014 Cancer Care Ontario systemic therapy guideline. *Current oncology (Toronto, Ont.)*, 22(Suppl 1), S114-22.  
<https://doi.org/10.3747/co.22.2322>

- Meric-Bernstam, F. & Hung, M.-C. (2006). Advances in targeting human epidermal growth factor receptor-2 signaling for cancer therapy. *Clinical Cancer Research*, 12(21), 6326–6330. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-06-1732>
- Miki, Y., Swensen, J., Shattuck-Eidens, D., Futreal, P. A., Harshman, K., Tavtigian, S., Liu, Q., Cochran, C., Bennett, L. M. & Ding, W. (1994). A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5182), 66–71. <https://doi.org/10.1126/science.7545954>
- Minckwitz, G. von, Procter, M., Azambuja, E. de, Zardavas, D., Benyunes, M., Viale, G., Suter, T., Arahmani, A., Rouchet, N., Clark, E., Knott, A., Lang, I., Levy, C., Yardley, D. A., Bines, J., Gelber, R. D [Richard D.], Piccart, M. & Baselga, J. (2017). Adjuvant Pertuzumab and Trastuzumab in Early HER2-Positive Breast Cancer. *New England Journal of Medicine*, 377(2), 122–131. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1703643>
- Mitri, Z., Constantine, T. & O'Regan, R. (2012). The HER2 Receptor in Breast Cancer: Pathophysiology, Clinical Use, and New Advances in Therapy. *Chemotherapy research and practice*, 2012, 743193. <https://doi.org/10.1155/2012/743193>
- Mizuno, H., Kitada, K., Nakai, K. & Sarai, A. (2009). PrognScan: a new database for meta-analysis of the prognostic value of genes. *BMC Medical Genomics*, 2, 18. <https://doi.org/10.1186/1755-8794-2-18>
- Mochly-Rosen, D., Das, K. & Grimes, K. V. (2012). Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nature Reviews. Drug Discovery*, 11(12), 937–957. <https://doi.org/10.1038/nrd3871>
- Nelson, D. A., Tolbert, M. D., Singh, S. J. & Bost, K. L. (2007). Expression of neuronal trace amine-associated receptor (Taar) mRNAs in leukocytes. *Journal of neuroimmunology*, 192(1-2), 21–30. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2007.08.006>
- Noll, S., Schaub-Kuhnen, S. & Höfler, H. (Hrsg.). (2000). *Praxis der Immunhistochemie* (1. Aufl.). Urban & Fischer.
- O'Reilly, R. L. & Davis, B. A. (1994). Phenylethylamine and schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 18(1), 63–75.
- Palczewski, K. (2006). G protein-coupled receptor rhodopsin. *Annual review of biochemistry*, 75, 743–767. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.75.103004.142743>
- Pan, B., Huang, X.-F. & Deng, C. (2011). Antipsychotic treatment and neuregulin 1-ErbB4 signalling in schizophrenia. *Progress in neuro-psychopharmacology & biological psychiatry*, 35(4), 924–930. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2011.04.002>
- Panas, M. W., Xie, Z., Panas, H. N., Hoener, M. C [Marius C.], Vallender, E. J. & Miller, G. M. (2012). Trace amine associated receptor 1 signaling in activated lymphocytes. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, 7(4), 866–876. <https://doi.org/10.1007/s11481-011-9321-4>

- Paterson, I. A. & Boulton, A. A. (1988). beta-Phenylethylamine enhances single cortical neurone responses to noradrenaline in the rat. *Brain Research Bulletin*, 20(2), 173–177.
- Paterson, I. A., Juorio, A. V. & Boulton, A. A. (1990). 2-Phenylethylamine: a modulator of catecholamine transmission in the mammalian central nervous system? *Journal of neurochemistry*, 55(6), 1827–1837.
- Pei, Y., Asif-Malik, A. & Canales, J. J. (2016). Trace Amines and the Trace Amine-Associated Receptor 1: Pharmacology, Neurochemistry, and Clinical Implications. *Frontiers in neuroscience*, 10, 148. <https://doi.org/10.3389/fnins.2016.00148>
- Philips, S. R. & Boulton, A. A. (1979). The effect of monoamine oxidase inhibitors on some arylalkylamines in rat striatum. *Journal of neurochemistry*, 33(1), 159–167.
- Potkin, S. G., Karoum, F., Chuang, L. W., Cannon-Spoor, H. E., Phillips, I. & Wyatt, R. J. (1979). Phenylethylamine in paranoid chronic schizophrenia. *Science (New York, N.Y.)*, 206(4417), 470–471.
- Premont, R. T., Gainetdinov, R. R [R. R.] & Caron, M. G [M. G.] (2001). Following the trace of elusive amines. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(17), 9474–9475. <https://doi.org/10.1073/pnas.181356198>
- Rasmussen, S. G. F., Choi, H.-J., Rosenbaum, D. M., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Edwards, P. C., Burghammer, M., Ratnala, V. R. P., Sanishvili, R., Fischetti, R. F., Schertler, G. F. X., Weis, W. I. & Kobilka, B. K. (2007). Crystal structure of the human beta2 adrenergic G-protein-coupled receptor. *Nature*, 450(7168), 383–387. <https://doi.org/10.1038/nature06325>
- Rassow, J., Hauser, K., Netzker, R. & Deutzmann, R. (2016). *Biochemie (4. Aufl.). Duale Reihe*. Georg Thieme Verlag. <http://doi.org/10.1055/b-003-129341>
- Rebbaa, A., Chu, F., Davis, F. B., Davis, P. J. & Mousa, S. A. (2008). Novel function of the thyroid hormone analog tetraiodothyroacetic acid: a cancer chemosensitizing and anti-cancer agent. *Angiogenesis*, 11(3), 269–276. <https://doi.org/10.1007/s10456-008-9110-8>
- Revel, F. G [F. G.], Moreau, J.-L [J.-L.], Pouzet, B [B.], Mory, R [R.], Bradaia, A [A.], Buchy, D [D.], Metzler, V [V.], Chaboz, S [S.], Groebke Zbinden, K., Galley, G., Norcross, R. D., Tuerck, D., Bruns, A., Morairty, S. R., Kilduff, T. S., Wallace, T. L., Risterucci, C., Wettstein, J. G [J. G.] & Hoener, M. C [M. C.] (2013). A new perspective for schizophrenia: TAAR1 agonists reveal antipsychotic- and antidepressant-like activity, improve cognition and control body weight. *Molecular psychiatry*, 18(5), 543–556. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.57>
- Revel, F. G [Florent G.], Moreau, J.-L [Jean-Luc], Gainetdinov, R. R [Raul R.], Bradaia, A [Amyaouch], Sotnikova, T. D [Tatyana D.], Mory, R [Roland], Durkin, S., Zbinden, K. G., Norcross, R., Meyer, C. A [Claas A.], Metzler, V [Veit], Chaboz, S [Sylvie], Ozmen, L., Trube, G., Pouzet, B [Bruno], Bettler, B., Caron, M. G [Marc G.], Wettstein, J. G [Joseph G.] & Hoener, M. C [Marius C.] (2011). TAAR1 activation modulates monoaminergic neurotransmission, preventing hyperdopaminergic and



- hypoglutamatergic activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(20), 8485–8490.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1103029108>
- Richard, S., Selle, F., Lotz, J.-P., Khalil, A., Gligorov, J. & Soares, D. G. (2016). Pertuzumab and trastuzumab: the rationale way to synergy. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias*, 88 Suppl 1, 565–577. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201620150178>
- Rilke, F., Colnaghi, M. I., Cascinelli, N., Andreola, S., Baldini, M. T., Bufalino, R., Della Porta, G., Ménard, S., Pierotti, M. A. & Testori, A. (1991). Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. *International Journal of Cancer*, 49(1), 44–49. <https://doi.org/10.1002/ijc.2910490109>
- Roeder, T. (1999). Octopamine in invertebrates. *Progress in neurobiology*, 59(5), 533–561.
- Rogowski, M., Gollahon, L., Chellini, G. & Assadi-Porter, F. M. (2017). Uptake of 3-iodothyronamine hormone analogs inhibits the growth and viability of cancer cells. *FEBS open bio*, 7(4), 587–601. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12205>
- Scanlan, T. S. (2009). Minireview: 3-Iodothyronamine (T1AM): a new player on the thyroid endocrine team? *Endocrinology*, 150(3), 1108–1111. <https://doi.org/10.1210/en.2008-1596>
- Scanlan, T. S., Suchland, K. L. [Katherine L.], Hart, M. E., Chiellini, G., Huang, Y., Kruzich, P. J., Frascarelli, S., Crossley, D. A., Bunzow, J. R. [James R.], Ronca-Testoni, S., Lin, E. T., Hatton, D., Zucchi, R. & Grandy, D. K. [David K.] (2004). 3-Iodothyronamine is an endogenous and rapid-acting derivative of thyroid hormone. *Nature medicine*, 10(6), 638–642. <https://doi.org/10.1038/nm1051>
- Schmohl, K. A., Nelson, P. J. & Spitzweg, C. (2019). Tetrac as an anti-angiogenic agent in cancer. *Endocrine-Related Cancer*, 26(6), R287-R304. <https://doi.org/10.1530/ERC-19-0058>
- Sinn, H.-P. & Kreipe, H. (2013). A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. *Breast care (Basel, Switzerland)*, 8(2), 149–154. <https://doi.org/10.1159/000350774>
- Slamon, D. J., Clark, G. M., Wong, S. G., Levin, W. J., Ullrich, A. & McGuire, W. L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science (New York, N.Y.)*, 235(4785), 177–182.  
<https://doi.org/10.1126/science.3798106>
- Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A., Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J. & Ullrich, A. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science (New York, N.Y.)*, 244(4905), 707–712.  
<https://doi.org/10.1126/science.2470152>
- Sogaard, M., Farkas, D. K., Ehrenstein, V., Jorgensen, J. O. L., Dekkers, O. M. & Sorensen, H. T. (2016). Hypothyroidism and hyperthyroidism and breast cancer risk: a

- nationwide cohort study. *European Journal of Endocrinology*, 174(4), 409–414.  
<https://doi.org/10.1530/EJE-15-0989>
- Sotnikova, T. D [Tatyana D.], Caron, M. G [Marc G.] & Gainetdinov, R. R [Raul R.] (2009). Trace amine-associated receptors as emerging therapeutic targets. *Molecular pharmacology*, 76(2), 229–235. <https://doi.org/10.1124/mol.109.055970>
- Stauber, M., Weyerstahl, T. & Beham, A. (2005). *Gynäkologie und Geburtshilfe: 213 Tabellen ; [mit Video-CD-ROM: Filme zu Spontangeburt und Sectio (2. Aufl.). Das duale Lehrbuch*. Thieme.
- Stevens, K. N., Vachon, C. M. & Couch, F. J. (2013). Genetic susceptibility to triple-negative breast cancer. *Cancer Research*, 73(7), 2025–2030. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-12-1699>
- Sumi-Ichinose, C., Ichinose, H., Takahashi, E., Hori, T. & Nagatsu, T. (1992). Molecular cloning of genomic DNA and chromosomal assignment of the gene for human aromatic L-amino acid decarboxylase, the enzyme for catecholamine and serotonin biosynthesis. *Biochemistry*, 31(8), 2229–2238. <https://doi.org/10.1021/bi00123a004>
- Tremmel, E., Hofmann, S., Kuhn, C., Heidegger, H., Heublein, S., Hermelink, K., Wuerstlein, R., Harbeck, N [Nadia], Mayr, D., Mahner, S., Ditsch, N., Jeschke, U. & Vattai, A. (2019). Thyronamine regulation of TAAR1 expression in breast cancer cells and investigation of its influence on viability and migration. *Breast cancer (Dove Medical Press)*, 11, 87–97. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S178721>
- Turken, O., NarIn, Y., DemIrbas, S., Onde, M. E., Sayan, O., KandemIr, E. G., YaylaI, M. & Ozturk, A. (2003). Breast cancer in association with thyroid disorders. *Breast Cancer Research*, 5(5), R110-3. <https://doi.org/10.1186/bcr609>
- Tuteja, N. (2009). Signaling through G protein coupled receptors. *Plant signaling & behavior*, 4(10), 942–947. <https://doi.org/10.4161/psb.4.10.9530>
- Vattai, A., Akyol, E., Kuhn, C., Hofmann, S., Heidegger, H., Koch, F. von, Hermelink, K., Wuerstlein, R., Harbeck, N [Nadia], Mayr, D., Spitzweg, C., Toth, B., Mahner, S., Jeschke, U. & Ditsch, N. (2017). Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(9), 1637–1647. <https://doi.org/10.1007/s00432-017-2420-8>
- Wai, P. Y. & Kuo, P. C. (2008). Osteopontin: regulation in tumor metastasis. *Cancer and Metastasis Reviews*, 27(1), 103–118. <https://doi.org/10.1007/s10555-007-9104-9>
- Wan, Q., Dingerdissen, H., Fan, Y., Gulzar, N., Pan, Y., Wu, T.-J., Yan, C., Zhang, H. & Mazumder, R. (2015). BioXpress: an integrated RNA-seq-derived gene expression database for pan-cancer analysis. *Database : the journal of biological databases and curation*, 2015. <https://doi.org/10.1093/database/bav019>

- Wasik, A. M., Millan, M. J., Scanlan, T., Barnes, N. M. & Gordon, J. (2012). Evidence for functional trace amine associated receptor-1 in normal and malignant B cells. *Leukemia Research*, 36(2), 245–249. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2011.10.002>
- Wöckel, A [A.] (Hrsg.). (2018). *Interdisziplinäre S3-Leitlinie für die Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms* (Langversion 4.1). Zuckschwerdt.
- Wolf, M. E. & Mosnaim, A. D. (1983). Phenylethylamine in neuropsychiatric disorders. *General Pharmacology*, 14(4), 385–390.
- Wooster, R., Bignell, G., Lancaster, J., Swift, S., Seal, S., Mangion, J., Collins, N., Gregory, S., Gumbs, C. & Micklem, G. (1995). Identification of the breast cancer susceptibility gene BRCA2. *Nature*, 378(6559), 789–792. <https://doi.org/10.1038/378789a0>
- Xie, Z. & Miller, G. M. (2009). Trace amine-associated receptor 1 as a monoaminergic modulator in brain. *Biochemical Pharmacology*, 78(9), 1095–1104. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2009.05.031>
- Xie, Z., Westmoreland, S. V., Bahn, M. E., Chen, G.-L., Yang, H., Vallender, E. J., Yao, W.-D., Madras, B. K. & Miller, G. M. (2007). Rhesus monkey trace amine-associated receptor 1 signaling: enhancement by monoamine transporters and attenuation by the D2 autoreceptor in vitro. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 321(1), 116–127. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.116863>
- Yang, H. Y. & Neff, N. H. (1973). Beta-phenylethylamine: a specific substrate for type B monoamine oxidase of brain. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 187(2), 365–371.
- Yarden, Y. & Sliwkowski, M. X. (2001). Untangling the ErbB signalling network. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2(2), 127–137. <https://doi.org/10.1038/35052073>
- Yen, P. M. (2001). Physiological and molecular basis of thyroid hormone action. *Physiological Reviews*, 81(3), 1097–1142. <https://doi.org/10.1152/physrev.2001.81.3.1097>
- Zhu, M. Y. & Juorio, A. V. (1995). Aromatic L-amino acid decarboxylase: biological characterization and functional role. *General Pharmacology*, 26(4), 681–696. [https://doi.org/10.1016/0306-3623\(94\)00223-a](https://doi.org/10.1016/0306-3623(94)00223-a)

## 8 Danksagung

Bei der Niederschrift dieser Arbeit habe ich von vielen Personen Unterstützung und Mithilfe erhalten. Diesen möchte ich auf diesem Wege meinen besonderen Dank aussprechen.

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Udo Jeschke bedanken ohne dessen überragende Hilfe diese Arbeit in dieser Form nicht hätte verwirklicht werden können. Er unterstützte mich über Jahre hinweg nicht nur bei den Tätigkeiten im Labor, sondern auch bei der Auswertung der Ergebnisse. Darüber hinaus gilt mein großer Dank meiner Betreuerin Prof. Dr. med. Nina Ditsch, die bei sämtlichen Fragen eine große Unterstützung war.

Des Weiteren möchte ich mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Labors der Frauenklinik Maistraße für die überragende Betreuung danken, insbesondere Christina Kuhn und Simone Hofmann für die großartige Einarbeitung, die Geduld, die professionelle Unterstützung, und die stets herzliche Atmosphäre im Labor.

Zuletzt möchte ich meinen Dank an meine Familie und Freunde richten, für ihre Motivation und Geduld, mit der sie mich durch diese Arbeit hindurch genauso wie über mein gesamtes Studium und Leben begleitet haben. Insbesondere meinem Bruder Emre und Ehemann Daniel möchte ich für die tatkräftige Unterstützung bei Formatierungsfragen danken. Besonderer Dank gebührt meinen Eltern, denen ich diese Arbeit widmen möchte. Ohne eure Unterstützung wäre das nicht möglich gewesen.

## 9 Veröffentlichungen

Teile der Arbeit wurden in folgender Publikation veröffentlicht:

Vattai, A., **Akyol, E.**, Kuhn, C., Hofmann, S., Heidegger, H., Koch, F. von, Hermelink, K., Wuerstlein, R., Harbeck, N [Nadia], Mayr, D., Spitzweg, C., Toth, B., Mahner, S., Jeschke, U. & Ditsch, N. (2017). Increased trace amine-associated receptor 1 (TAAR1) expression is associated with a positive survival rate in patients with breast cancer. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*, 143(9), 1637–1647.  
<https://doi.org/10.1007/s00432-017-2420-8>

## 10 Eidesstaatliche Versicherung



### Eidesstaatliche Versicherung

Rödel, Elif

Name, Vorname

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

**Untersuchungen zur prognostischen Bedeutung des Rezeptors TAAR1  
und zum Proliferationsverhalten von TAAR1 Liganden in Mammakarzinomen in vitro**

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.

Stuttgart, den 04.08.2024

Ort, Datum

Elif Rödel

Unterschrift Elif Rödel