

**In vitro Evaluierung des
Androgenrezeptorantagonisten Enzalutamid
in gynäkologischen Malignitäten**

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Antonia Rolf

aus Berlin-Zehlendorf

2024

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachter: PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Frank Schildberg

Tag der Mündlichen Prüfung: 15.10.2024

Aus der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie und gynäkologischer Onkologie
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea

„In der Ruhe liegt die Kraft.“

- meine Eltern, immer.

Danke für alles!

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	7
1.	Einleitung	8
1.1	Epidemiologie und Therapie des Mammakarzinoms	8
1.2	Epidemiologie und Therapie des Ovarialkarzinoms	9
1.3	Epidemiologie und Therapie des Endometriumkarzinoms	10
1.4	Epidemiologie und Therapie des uterinen Leiomyosarkoms	10
1.5	Steroidrezeptoren in der Tumorbiologie	11
1.6	Enzalutamid	12
1.7	Zielsetzung	12
2.	Material	14
2.1	Geräte	14
2.2	Hilfsmittel	16
2.3	Verbrauchsmaterialien	17
2.4	Chemikalien und kommerzielle Lösungen	18
2.5	Puffer und Lösungen	19
2.6	Primärantikörper	20
2.7	Sekundärantikörper	21
2.8	Zelllinien	21
2.9	Chemotherapeutikum	22
2.10	Software	22
3.	Methoden	23
3.1	Zellbiologische Methoden	23
3.1.1	Kryokonservierung und Auftauen von Zellen	23
3.1.2	Kultivierung und Passagieren von Zellen	23
3.1.3	Aussaat von Zellen und Behandlung mit Enzalutamid	24
3.1.4	Ernte der Zellen und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter	25
3.1.5	Zellzahlbestimmung mittels MTT-Vitalitäts-Assay	25
3.2	Proteinbiochemische Methoden	26
3.2.1	Proteinisolierung	26
3.2.2	Herstellung von Polyacrylamid-Gelen	26

3.2.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
3.2.4	Western-Blotting	28
3.3	Statistische Auswertung	28
4.	Ergebnisse	29
4.1	Bestimmung der IC ₅₀ für Enzalutamid mittels MTT-Vitalitäts-Assay	29
4.2	Bestimmung der IC ₅₀ für Enzalutamid mittels Zellzahlbestimmung am CASY Modell TT Cell Counter and Analyzer	30
4.3	Analyse der Basalexpression von AR, ER α , ER β 1 und ER β 2 mittels Westernblot	33
4.4	Analyse der Expression von AR unter Einfluss von Enzalutamid mittels Westernblot	33
4.5	Analyse der Expression von ER α unter Einfluss von Enzalutamid mittels Westernblot	34
5.	Diskussion	38
5.1	Basalexpression der Steroidrezeptoren AR und ER α	38
5.2	Basalexpression der Steroidrezeptoren ER β 1 und ER β 2	41
5.3	Antiproliferative Wirkung von Enzalutamid	46
5.4	Einfluss von Enzalutamid auf die Expression von AR und ER α	48
6.	Zusammenfassung	51
7.	Abbildungsverzeichnis	53
8.	Tabellenverzeichnis	54
9.	Literaturverzeichnis	55
10.	Danksagung	71

Abkürzungsverzeichnis

A. demin.	Aqua demineralisata
APS	Ammoniumperoxidisulfat
AR	Androgenrezeptor
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endometriumkarzinom
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Enz	Enzalutamid
ER	Estrogenrezeptor
FBS	Fetal Bovine Serum
G1	Grading 1 (gut differenziert)
GR	Glukokortikoidrezeptor
HER2-NEU	human epidermal growth factor receptor 2
HSP	Hitzeschockprotein
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IP-MS	Immunopräzipitation und Massenspektrometrie
MC	Mammakarzinom
MPA	Medroxyprogesteronacetat
MSL	mesenchymal stem-like
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NC	Nitrocellulose
OC	Ovarialkarzinom
PC	Prostatakarzinom
PR	Progesteronrezeptor
R0	Resektion des Tumors im Gesunden
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
TBS-T	Tris-buffered Saline mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TNBC	triple negative breast cancer
uLMS	uterines Leiomyosarkom

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Therapie des Mammakarzinoms

Das Mammakarzinom (MC) ist mit 30,5 % die häufigste weibliche Krebserkrankung sowie auch der häufigste Krebssterbefall (17,6 %) in Deutschland (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2023). Als Basistherapie erfolgt bei einem nicht fortgeschrittenen MC die R0-Resektion, wobei eine brusterhaltende Therapie mit adjuvanter Radiotherapie und eine alleinige Mastektomie hinsichtlich der Überlebensrate als gleichwertig gelten. Bei einem invasiven MC ist als Primärdiagnostik die Bestimmung des Hormonrezeptorstatus von Estrogenrezeptor α ($ER\alpha$), Progesteronrezeptor (PR) und human epidermal growth factor receptor 2 (HER2-NEU) indiziert, insbesondere unter Bezug auf einen möglichen Nutzen einer adjuvanten endokrinen Systemtherapie oder Chemotherapie (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021a). $ER\alpha$ gilt als etablierter Parameter für Prognose und Therapieansatz bei MC, er wird in bis zu 75 % der diagnostizierten Tumore exprimiert. Hier korreliert ein positiver $ER\alpha$ -Status negativ mit Tumordurchmesser und Tumor-Node-Metastasis-Klassifikation und verhält sich demnach prognostisch günstig, nicht zuletzt durch die Möglichkeit einer adjuvanten endokrinen Therapie (Hayashi et al., 2003; Sun et al., 2014). Zur Verfügung stehen, je nach Menopausenstatus, Antiestrogene, wie Tamoxifen (prämenopausal) und Aromataseinhibitoren (postmenopausal), welche das Rezidivrisiko um relativ 40 % und das Sterberisiko um relativ 30 % signifikant senken. Eine ausreichende Therapieadhärenz über 5 Jahre ist entsprechend notwendig, allerdings aufgrund des Nebenwirkungsprofils nur bei der Hälfte aller Patienten gegeben (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021a). Als weitere klinische Herausforderung in der Behandlung zeigen $ER\alpha$ -positive MC eine de-novo oder im Verlauf erworbene Resistenz gegenüber der antiestrogenen Therapie (Mohamed et al., 2013). Bei einem Rezidiv nach adjuvanter endokriner Therapie zeigt sich der $ER\alpha$ -Status bei Patienten mit einem primär $ER\alpha$ -positiven MC und einer de-novo Resistenz als reversibel (Johnston et al., 1995). Ein $ER\alpha$ -negativer Status ist häufig mit aggressiveren Phänotypen und einer schlechten Prognose assoziiert (Hayashi et al., 2003). Gleiches gilt für triple negative breast cancer (TNBC), der über 15 % aller MC ausmacht. TNBC ($ER\alpha$ -, PR- und HER2-NEU-negativ) können weder der gängigen $ER\alpha$ - noch HER2-NEU-zielgerichteten Therapie zugeführt

werden (Rakha et al., 2007). Als alternativer Therapieansatz ist in den vergangenen Jahren der Androgenrezeptor (AR) weiter in den Mittelpunkt der Forschung gerückt. 70-80 % aller MC exprimieren AR (Niemeier et al., 2010; Park et al., 2010). Es existieren widersprüchliche Publikationen zur AR-Expression in TNBC. Rampurwala et al. (2016) fassen einen AR-positiven Status in TNBC von 6,6-75 % zusammen und führen die große Spannweite in der Literatur auf unterschiedliche Grenzwerte und Methoden zur Bestimmung einer AR-Expression zurück. AR-positive MC zeigen unabhängig von der ER-Expression ein längeres Gesamt- und krankheitsfreies Überleben (Vera-Badillo et al., 2014). Hingegen sind AR-negative Tumore mit einem höherem Grading und einer höheren Metastasierungs- und Rezidivrate assoziiert (Rakha et al., 2007). Moinfar et al. (2003) charakterisieren den AR- und ER α -Status in MC und beschreiben ein, zwar mit steigendem Tumorstadium zurückgehendes, aber dennoch höheres Niveau der AR-Expression verglichen mit der ER α -Expression. Aufgrund dieser hochfrequenten AR-Expression und einem Versagen der adjuvanten antiestrogenen Therapie durch Resistenzen, stellt AR ein attraktives Therapieziel für MC dar.

1.2 Epidemiologie und Therapie des Ovarialkarzinoms

Auch in Ovarialkarzinomen (OC) ist ein AR-positiver Status bekannt. In ca. 90 % der Fälle handelt es sich um ein epitheliales OC (Scully, 1995), welches über 80 % AR exprimiert (Lee et al., 2005). Das OC ist mit 5,2 % der zweithäufigste gynäkologische Krebssterbefall nach MC in Deutschland (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a). Neben einem primären radikalen operativem Staging und einer adjuvanten carboplatinhaltigen Polychemotherapie (außer in Stadium IA G1, ab Stadium III zusätzlich Erhaltungstherapie mit Bevacizumab oder Poly-ADP-Ribose-Polymerase-Inhibitoren) wird eine endokrine Therapie mit Antiestrogenen bisher nicht empfohlen, auch nicht im Falle eines Rezidivs (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a; Williams et al., 2010). 73 % der OC werden in einem fortgeschrittenen Stadium diagnostiziert, das mit einem relativen 5-Jahre Gesamtüberleben von 42 % in Stadium III und 21 % in Stadium IV einhergeht (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2021). Dies bedingt sich nicht zuletzt durch das Fehlen wirklich effizienter Therapieformen in fortgeschrittenen OC (Aabo et al., 1998), sodass hinsichtlich der häufigen AR-Expression in OC, der Steroidrezeptor ein durchaus alternatives Therapieziel darstellen könnte. Auf Zellebene beschreiben Zhu et al. (2017) eine

gesteigerte Proliferation und Migration der OC-Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 durch AR-Überexpression. Den nachhaltigen Effekt einer antiandrogenen Therapie in OC konnten Limaye et al. (2020) durch Gabe von AR-Inhibitor Bicalutamide in der Rezidivtherapie eines AR-positivem high-grade serösen OC demonstrieren.

1.3 Epidemiologie und Therapie des Endometriumkarzinoms

Das Endometriumkarzinom (EC) ist mit 4,8 % die fünfthäufigste weibliche Krebserkrankung in Deutschland. Klinisch-pathologisch werden estrogenabhängige Typ 1- (endometrioid) und estrogenuabhängige Typ 2- (serös, klarzellig) EC unterschieden, immunhistochemische bzw. molekulare Aspekte werden zunehmend in Klassifikationen mit einbezogen. EC werden operativ durch eine totale Hysterektomie und beidseitiger Adnexektomie sowie stadienabhängig mit einer postoperativen Strahlen- oder Chemotherapie behandelt. Eine endokrine Therapie ist für Frauen mit EC-Rezidiv vorgesehen, allerdings bislang in ihrer Wirksamkeit einer Chemotherapie oder best supportive care nicht nachweislich überlegen. Verwendung finden vorwiegend Medroxyprogesteronacetat (MPA) oder Tamoxifen (Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b). In einer Übersichtsarbeit konnte eine durchschnittliche Ansprechrate für Tamoxifen von 10-53 %, in Kombination mit einem Gestagen von 19-58 % gezeigt werden (van Weelden et al., 2019). Invasive EC charakterisieren sich häufig durch einen Verlust von ER α und PR (Bircan et al., 2005; Hanekamp et al., 2003). Da die Wirksamkeit von MPA eng mit der Expression von PR korreliert, erweist sich die Hormontherapie bei invasiven Tumoren häufig als wenig vorteilhaft (Kavlashvili et al., 2016; Thigpen et al., 1999). Denkbar wäre AR als alternatives Behandlungsziel, wobei die bislang in der Literatur zum Teil widersprüchliche Ausprägung der AR-Expression in EC zunächst einer systematischen Evaluierung bedarf (Hashmi et al., 2018; Ito et al., 2002; Tanaka et al., 2015). Eine aktuelle Übersichtsarbeit und Metaanalyse konnte AR aber als positiven prognostischen Biomarker in EC nachweisen und eine signifikant erhöhte Expression in Typ 1 zeigen (Wu et al., 2022).

1.4 Epidemiologie und Therapie des uterinen Leiomyosarkoms

Ähnlich verhält es sich beim uterinen Leiomyosarkom (uLMS), welches 60-70 % aller uterinen Sarkome ausmacht. Hierbei handelt es sich um ein aggressives Tumorleiden mit einer Rezidivrate von 53-71 %. Bislang ist eine komplette Hysterektomie die Therapie der

Wahl. Eine adjuvante systemische Therapie wird nicht regulär empfohlen, gleichwohl ist eine Chemotherapie bei inoperablen Tumoren in palliativer Absicht möglich. Bislang fehlen Daten, um den Nutzen einer adjuvanten endokrinen Therapie bei diffuser ER α - und PR-Expression abschließend beurteilen zu können (AWMF Leitlinien-Register, 2021). Durch den Einsatz von Letrozol konnte im Rahmen einer Phase-II-Studie ein mittleres progressionsfreies Überleben für 12 Wochen in 50 % gezeigt werden (George et al., 2014). Die Datenlage zur AR-Expression in uLMS ist sehr spärlich und aufgrund variierender Probenmenge kontrovers zu diskutieren (Baek et al., 2018; Koivisto-Korander et al., 2011; Leitao et al., 2004). Damit stellt der Steroidrezeptor zwar keinen allzu prominenten Angriffspunkt für eine Hormontherapie dar, scheint aber hinsichtlich der schlechten Prognose und einem vom Tumorstadium abhängigen 5-Jahres Gesamtüberleben zwischen 25-51 % eine wertvolle Alternative zu sein (AWMF Leitlinien-Register, 2021).

1.5 Steroidrezeptoren in der Tumorbilogie

Zielgerichtete Therapieansätze (targeted therapies) sind heutzutage ein fester Bestandteil der Onkologie. Hierbei werden spezielle Signalkaskaden oder Proteine blockiert, die mit Tumorproliferation und -progression assoziiert sind (Pérez-Herrero und Fernández-Medarde, 2015). Steroidrezeptoren (AR, ER, PR, Glukokortikoidrezeptor (GR), Mineral-kortikoidrezeptor, Vitamin D Rezeptor) gehören zur Gruppe der nukleären Hormonrezeptoren. Als Transkriptionsfaktoren bedingen sie die Expression bestimmter Gene, nachdem durch Bindung des Liganden und Dimerisation des Rezeptors die Translokation in den Nukleus und Bindung an spezifische DNA-Abschnitte (responsives Element) erfolgt ist (Abb. 1A). Es existieren auch hormonunabhängige Signalkaskaden. Steroidrezeptoren spielen eine wesentliche Rolle in der Pathogenese und Pathophysiologie von Tumoren (Kowalczyk et al., 2021). Ein bekanntes Beispiel für die Verwendung von AR als Therapieziel findet sich in der Behandlung des Prostatakarzinoms (PC). Das PC ist die dritthäufigste Krebstodesursache beim Mann. Während zur Therapie des lokal begrenzten PC die radikale Prostatektomie, perkutane Strahlentherapie und Brachytherapie im Fokus stehen, wird beim metastasierten hormonsensitiven oder kastrationsresistenten PC eine Androgendeprivation, gegebenenfalls in Kombination mit einer Hormon- oder Chemotherapie angestrebt (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021b).

1.6 Enzalutamid

Ein prominenter Vertreter der Androgendeprivationstherapie ist Enzalutamid (Enz) (Leitlinienprogramm Onkologie, 2021b). Dieser antiproliferative Wirkstoff ist ein direkter AR-Antagonist, der die Translokation des Steroidrezeptors in den Nukleus, die Bindung an DNA und Cofaktoren und damit resultierende Transkriptionsaktivität blockiert (Linder et al., 2019) (Abb. 1B). Abazid et al. (2019) konnten an PC-Zelllinien Enz einen suppressierenden Einfluss auf die Expression von Hitzeschockproteinen (HSP27, HSP90 β) und Co-Chaperonen (HSP40, HOP) nachweisen, wodurch die initial stabilisierende Komplexbildung aus Steroidrezeptor und Hitzeschockprotein geschwächt und die AR-Signalkaskade gehemmt wird. Weiter beschreiben sie einen AR-unabhängigen Wirkmechanismus von Enz an AR-negativen PC-3 Zellen und eine Hemmung der ER-Isoformen.

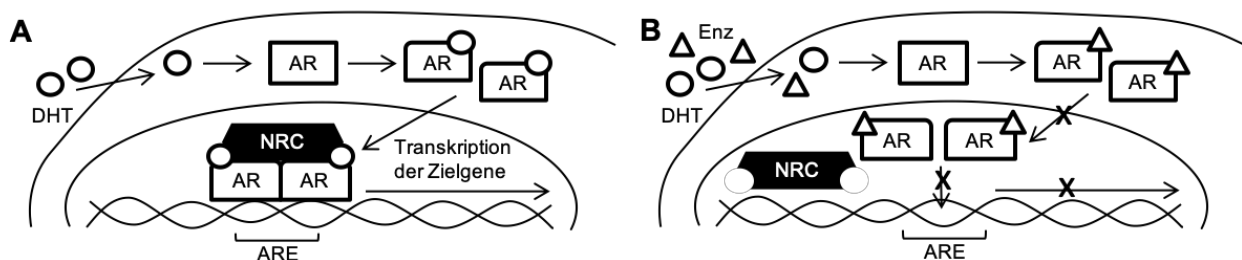


Abb. 1: Modell der AR Signalkaskade (A) unter Einfluss von Enz (B) modifiziert nach Linder et al. (2019). (A) Dihydrotestosteron (DHT) bindet AR, bedingt eine AR-Dimerisation, transloziert in den Nukleus und bindet das androgenresponsive Element (ARE) der DNA. Unter Bindung eines Nuklear-Rezeptor-Coregulators (NRC) erfolgt die Transkription der Zielgene. (B) Enz hemmt als direkter AR-Antagonist die Translokation in den Nukleus, die Bindung des ARE der DNA und dadurch die Transkription der Zielgene.

1.7 Zielsetzung

Enz ist als AR-Inhibitor ein etablierter Bestandteil der Therapie des PC. Bisherige Publikationen weisen allerdings daraufhin, dass die Wirkung von Enz nicht ausschließlich AR-spezifisch ist, sondern auch ER-Isoformen gehemmt werden können (Abazid et al., 2019).

In dieser Arbeit wurde deshalb der antiproliferative Einfluss des AR-Inhibitors auf vier gynäkologische Tumorentitäten anhand von Zellmodellen untersucht (MC: MCF-7, MDA-MB-231, OC: OVCAR-3, SKOV-3, EC: MFE-296, uLMS: SK-UT-1). Die pharmakologische Wirkung von Enz und Bestimmung der mittleren inhibitorischen Konzentration

(IC₅₀) wurde mittels 3-(4,5-Dimethylthiazolyl-2)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid (MTT)-Vitalitäts-Assay und Lebendzellzahlbestimmung mit CASY Modell TT Cell Counter and Analyzer erhoben. Zur näheren Charakterisierung des Wirkmechanismus von Enz auf Zellebene wurde die Expression von AR- und ER α unter Enz mittels Westernblot untersucht. Initial wurde eine Analyse der Basalexpression der Steroidrezeptoren (AR, ER α , ER β 1, ER β 2) in den verschiedenen Entitäten durchgeführt.

2. Material

2.1 Geräte

Tab. 1: Verwendete Geräte und Hersteller

Gerät	Hersteller
accu-jet pro	BRAND GmbH (Wertheim, Deutschland)
Analysenwaage KERN ABS 120-4	Kern & Sohn GmbH (Balingen-Frommern, Deutschland)
Autoklav VX-150	Systec GmbH LaborSystemtechnik (Wettenberg, Deutschland)
Big Digit Timer C5079	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
CASY Modell TT Cell counter and Analyzer	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Kohlenstoffdioxid (CO ₂) Inkubator MCO-18 AIC	Sanyo (Moriguchi, Japan)
Digitaler Taumelrollenmischer SRT6D	Bibby Scientific Limited (Staffordshire, UK)
DITABIS HLC Aspiration systems AZ 02/04	DITABIS - Digital Biomedical Imaging Systems AG (Pforzheim, Deutschland)
Flockeneisbereiter RF 0399 A	Manitowoc Deutschland GmbH (Herborn, Deutschland)
Hand-Stückzähler economy 0-9999, Kunststoff gelb, 1-7511	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Infrarot-Scanner Odyssey Imaging System ODY-2065	LI-COR Biosciences (Lincol, NB, USA)
Inkubationsbad 1003	GFL (Burgwedel, Deutschland)
Kryo-Aufbewahrungsbox mit Deckel	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty	Nalgene Labware, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Mikroskop Nikon TMS 302370	Nikon (Tokio, Japan)
Sicherheitswerkbank HERAsafe KS9	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

Sprout Kompakte Mini Zentrifuge	Heathrow Scientific (Vernon Hills, IL, USA)
Stromversorgungsgerät PowerPack™	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Sunlab Mini Vortex Mixer SU1900	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Tecan readers with i-control microplate reader software / infinite M200 Pro	Tecan Group Ltd, Männedorf (Schweiz)
Thermomixer 5437	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Tischabzug Scala	Waldner Laboreinrichtungen GmbH & Co. KG (Wangen, Deutschland)
Trans Blot Turbo	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
Vortex Mixer RS-VF10	Phoenix Instrument (Garbsen, Deutschland)
Vortex Mixer 7-2020	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
VWR™ Analog Vortex Mixer 945304	VWR International (Radnor, PA, USA)
Zentrifugen 5810 R, 5415 R	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
4 °C Laborkühlschrank medline LKv3910	Liebherr-International Deutschland GmbH (Biberach an der Riß, Deutschland)
-20 °C MDF-U333	Sanyo (Moriguchi, Japan)
-80 °C MDF-U53V	Sanyo (Moriguchi, Japan)
-80 °C Tiefkälte-Lagerschrank Kryotec KLS6086-2	Kryotec-Kryosafe GmbH (Hamburg, Deutschland)
-140 °C Ultra-Low Temperature Freezer ULT10140-9-M22	Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)

2.2 Hilfsmittel

Tab. 2: Verwendete Hilfsmittel und Hersteller

Hilfsmittel	Hersteller
Acetal Kunststoff unwire Test Tube Half Rack für 30 mm Test Tubes	Nalgene Labware, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Acrylglasgestell 2x12, 4x12, 6x12	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Becherglas 250 ml	VWR International (Radnor, PA, USA)
BD Microlance 3 Kanülen 20 G 1 1/2 0,9 x 40 mm	Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, USA)
Erlenmeyerkolben 100 ml	DURAN Group GmbH (Wertheim, Deutschland)
Laborglasflaschen 100 ml, 250 ml, 500 ml 1000 ml, 2000 ml	DURAN Group GmbH (Wertheim, Deutschland)
Messzylinder 100 ml	VWR International (Radnor, PA, USA)
Messzylinder 500 ml, 1000 ml	ISOLAB Laborgeräte GmbH (Wertheim, Deutschland)
Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module	Bio-Rad Laboratories, Inc. (Hercules, CA, USA)
neoRack-Röhrchen-Gestell 4x4, 7x7	Nalgene Labware, Thermo Scientific (Waltham, MA, USA)
Neubauer-Zählkammer	LO-Laboroptik (Lancing, UK)
pH-Meter	AQUALYTIC (Dortmund, Deutschland)
Pinzette	neoLab (Heidelberg, Deutschland)
Pipettensätze 0,1-2,5 µl, 0,5-10 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Pipettensätze 0,5-10 µl, 10-100 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Vitlab GmbH (Großostheim, Deutschland)
Stegeinsatz für Kryoboxen	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.3 Verbrauchsmaterialien

Tab. 3: Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Amersham™ Protran® Nitrocellulose (NC) 0,2 µm	GE Healthcare Life Sciences (Freiburg, Deutschland)
CASY Röhrchen	Roche Diagnostics (Basel, Schweiz)
Handtuchpapier Zick-Zack Handtücher	Heemann OHG (Falkensee, Deutschland)
Kosmetiktücher fusselarm	Abena (Abenraa, Dänemark)
Kryo-Röhrchen	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Nitrile Risk-CHEMO-protectLAB	Company of Kirchhoff Group (Hamburg, Deutschland)
Pasteur Glaspipetten	VWR International (Radnor, PA, USA)
Peha-soft nitrile	Paul Hartmann AG (Heidenheim, Deutschland)
Pipettenspitzen 0,1-10 µl	VWR International (Radnor, PA, USA)
Pipettenspitzen 200 µl, 1250 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipettenspitzen Multi® Flex 0,5-200 µl	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Pipettenspitzen SurPhob 10 µl	Biozym Scientific GmbH (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Premium-CHEMO-protect-300 WHITE	HANSA-TRADING HTH GmbH & Co. KG
Reagiergefäß 0,5 ml, 1,5 ml, 2,0 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Serologische Pipetten 5 ml, 10 ml, 25 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Flasche T25, T75, T175	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Platte 6-Well, 24-Well, 96-Well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
TC-Schale 35 mm	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Vernichtungsbeutel mit Tischständer	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Whatman Chromatography Paper 35x43 cm	GE Healthcare UK Ltd. (Buckinghamshire, UK)
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.4 Chemikalien und kommerzielle Lösungen

Tab. 4: Verwendete Chemikalien und kommerzielle Lösungen und Hersteller

Chemikalien und kommerzielle Lösungen	Hersteller
Acrylamid (30 %)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Ammoniumperoxidisulfat (APS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bovine serum albumin (BSA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Bromphenolblau	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Chameleon™ Duo Pre-stained Protein Ladder 928-60000	Li-Cor (Lincoln, NE, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
DMEM F12	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Ethanol vergällt 96 %	Universitätsapotheker der Universitäts- medizin Greifswald
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Fetal Bovine Serum (FBS)	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
Gentamycin	Ratiopharm (Ulm, Deutschland)
Glycerin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Glycin	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Händedesinfektion sensiva	Schülke GmbH (Norderstedt, Deutschland)
Insulin	Novo Nordisk A/S (Bagsværd, Dänemark)
Insulin-Transferrin-Selenium (ITS-G)	Gibco™ Thermo Fisher Scientific (Carlsbad, CA, USA)
Methanol J. T. Baker	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
MEM (Earle's)	Biochrom AG (Deutschland)
Milchpulver	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
MTT	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
DPBS	PAN-Biotech GmbH (Aidenbach, Deutschland)
RPMI1640	Biochrom AG (Deutschland)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tris	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Trypsin/EDTA Solution (10x) 0,5 %/0,2 %	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
Salzsäure rauchend 37 % (HCl)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
2-Propanol	Carl Roth (Karlsruhe, Deutschland)

2.5 Puffer und Lösungen

Tab. 5: Verwendete Puffer und Lösungen und Hersteller

Puffer und Lösungen	Hersteller
10 % APS	10 % APS ad Aqua demineralisata (A. demin.)
Bovine serum albumin (BSA)	0,2 mg BSA in 1 ml A. demin.
20x Blocking Puffer	0,9 M Tris, 0,78 M Glycin, 0,75 % SDS ad A. demin.
1x Blocking Puffer	100 ml 20xTransfer Puffer, 400 ml MeOH, 1500 ml A. demin.
CASY ton	154 mM NaCl, 0,1 mM EDTA in A. demin.
5x Ladepuffer	156 mM Tris-HCl, pH 6,8, 6,25 % Glycerin, 3,125 % β -Mercaptoethanol, 5 % SDS
2x Lämmli-Puffer	100 mM Tris-HCl pH 6,8, 4 % SDS, 20 % Glycerin, 0,02 % Bromphenolblau ad A. demin.
Lyse-Reagenz	2,5 g SDS, 24,8 ml DMSO, 150 μ l HCl (37 %)
Milchpulver	5 % Milchpulver ad Tris-buffered Saline mit Tween20 (TBS-T)
10x MTT	10 mg MTT in 2 ml A. demin.

Primärantikörper-Puffer	5 % BSA ad TBS-T
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris, pH 6,0, 15,52 g Tris/250 ml A. demin.
10 % SDS	10 % SDS ad A. demin.
10x SDS-Gelelektrophorese-Puffer	0,31 M Tris, 2,4 M Glycin, 43 mM SDS ad A. demin.
1x SDS-Gelelektrophorese-Puffer	500 ml 10x SDS-Laufpuffer, 4500 ml A. demin.
Sekundärantikörper-Puffer	5 % BSA in TBS-T, 0,01 % SDS ad A. demin.
10x TBS	385 mM Tris, 1500 mM NaCl ad A. demin.
1x TBS-T	50 mM Tris HCl, 150 mM NaCl, 0,1 % Tween20 ad A. demin.
Trenngelpuffer	1,5 M Tris, pH 8,8, 181,71 g Tris/1 l A. demin
1 M Tris-HCl	12,14 g Tris auf 100 ml A. demin., pH 6,8 mit HCl eingestellt
1x Trypsin/EDTA Solution	100 ml 10xTrypsin/EDTA Solution, 900 ml DPBS

2.6 Primärantikörper

Tab. 6: Verwendete Primärantikörper und Hersteller

Primärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
Anti-AR-XPTM rabbit (#5153)	1:10000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-ERalpha rabbit (#8644)	1:5000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)
Anti-ERbeta1 mouse (ab187291)	1:1000	Abcam plc. (Cambridge, UK)
Anti-ERbeta2 rabbit (orb33298)	1:3000	Biorbyt Ltd. (Cambridge, UK)
Anti-beta-actin mouse (r)	1:800000	Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)
Anti-beta-actin rabbit (4970)	1:40000	Cell Signaling Technology, Inc. (Danvers, USA)

2.7 Sekundärantikörper

Tab. 7: Verwendete Sekundärantikörper und Hersteller

Sekundärantikörper	Gebrauchs- verdünnung	Hersteller
Anti-rabbit 680 nm (926-32221)	1:10000	Li-Cor (Lincoln, NE, USA)
Anti-mouse 800 nm (926-32210)	1:10000	Li-Cor (Lincoln, NE, USA)

2.8 Zelllinien

Tab. 8: Verwendete Zelllinien, Zellkulturmedien und Hersteller

Entität	Zelllinie	Zellkulturmedium	Hersteller
MC	MCF-7	DMEM F12 + 10 % FBS +	American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)
	MDA-MB-231	0,125 % Gentamycin	
OC	OVCAR-3	RPMI1640 + 10 % FBS + 0,125 % Gentamycin + 0,1 % Insulin	Cell Lines Service (Ep- penheim, Deutschland)
	SKOV-3	DMEM F12 + 5 % FBS + 0,125 % Gentamycin	
EC	MFE-296	40 % RPMI1460 + 40 % MEM (Earle's) + 20 % h.i. FBS + 1x ITS-G + 0,125 % Gentamycin	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen DSMZ (Braunschweig, Deutschland)
uLMS	SK-UT-1	DMEM F12 + 10 % FBS + 0,125 % Gentamycin	Cell Lines Service (Ep- penheim, Deutschland)
MC: Mammakarzinom; OC: Ovarialkarzinom; EC: Endometriumkarzinom; uLMS: uterines Leiomyosarkom			

2.9 Chemotherapeutikum

Tab. 9: Verwendetes Chemotherapeutikum und Hersteller

Chemotherapeutikum	Stammlösung	Hersteller
Enz	10 mM in 100 % DMSO	Selleckchem (Houston, TX, USA)

2.10 Software

Tab. 10: Verwendete Software und Hersteller

Software	Hersteller
GraphPad Prism 5	GraphPad Software, Inc. (CA, USA)
Image Studio Lite Version 5	Li-Cor (Lincoln, NE, USA)
Microsoft Excel 2010	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Power Point 2010	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Microsoft Word 2010	Microsoft Corporation (Redmond, WA, USA)
Odyssey 3.0 CLx	Li-Cor (Lincoln, NE, USA)

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kryokonservierung und Auftauen von Zellen

Um eine langfristige Lagerung von Zellen zu gewährleisten, erfolgte die Kryokonservierung in niedriger Passage. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden wurden die Zellen mit 3 ml DPBS gewaschen und mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA behandelt. Nach Resuspension mit 9 ml DPBS und 1 ml FBS folgte die Zentrifugation bei 300 g für 5 min zum Sedimentieren. Das Zellpellet wurde in wenigen ml Medium gelöst und die Zellzahl mit der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Pro Kryovate wurden 3×10^6 Zellen in 1 ml Einfriermedium gegeben, dann für 24 h bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ in Isopropanol gekühlt und anschließend bei $-140\text{ }^{\circ}\text{C}$ in flüssigem Stickstoff gelagert.

Zur Rekultivierung der Zellen wurden die Kryovate für 30 s in einem Wasserbad bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ erwärmt. Es folgte die Resuspension der Zellen mit entsprechend angewärmtem Medium und Zentrifugation bei 300 g für 5 min. Das Zellpellet wurde vom Überstand befreit und in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend erfolgte zur weiteren Kultivierung die Aussaat der Zellen im Verhältnis 1:3 in eine Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium und die Inkubation in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

3.1.2 Kultivierung und Passagieren von Zellen

Das Passagieren der Zelllinien erfolgte nach 72-96 h bei einer Konfluenz der Zellen von etwa 90 %. Das alte Medium wurde abgenommen und die Zellen mit 4 ml DPBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Flaschenboden inkubierten die Zellen unter Einwirkung von 2 ml 1x Trypsin/EDTA zelllinienspezifisch für 3-15 min im Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Zur Inaktivierung des 1x Trypsin/EDTA erfolgte die Resuspension mit 9 ml DPBS und 1 ml FBS. Die Zellen wurden in ein 50 ml Falcon überführt und zum Pelletieren bei 300 g für 5 min zentrifugiert. Der Zellkulturüberstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend folgte die Aussaat der Zellen im zelllinienspezifischen Verhältnis (MC-Zellen 1:3|1:4, OC-Zellen 1:3|1:5, EC- und uLMS Zellen 1:10|1:12) in eine Zellkulturflasche mit 10 ml frischem Medium und Inkubation in einem Brutschrank bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, 5 % CO_2 und gesättigter Luftfeuchtigkeit.

3.1.3 Aussaat von Zellen und Behandlung mit Enzalutamid

Die Zellaussaat entsprach zunächst dem Vorgang des Passagierens. Die Zellen wurden mit 4 ml DPBS gewaschen und unter Inkubation mit 2 ml 1x Trypsin/EDTA vom Flaschenboden gelöst. Nach Resuspension mit 9 ml DPBS und 1 ml FBS folgte die Zentrifugation bei 300 *g* für 5 min. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet mit 1 ml Medium resuspendiert. Anschließend folgte die Zellzahlbestimmung der Suspension mit der Neubauer-Zählkammer ($[\text{Zellen/ml}] = [\text{gezählte Zellen}/4] \times 10^5$). Hierzu wurden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl unsterilem DPBS in einer 96-Well-Platte resuspendiert und davon 10 μl in die Zählkammer gegeben. Ein entsprechend berechnetes Volumen aus Zellsuspension und Medium wurde je Methode gleichmäßig in 24- (Proliferationskinetik) oder 96-Well-Platten (MTT-Vitalitäts-Assay) und 35 mm Zellkulturschalen (Westernblot) verteilt. Es folgte die Inkubation der Zellkulturplatten in einem Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die angestrebte Zellzahl war dabei aufgrund verschiedener Wachstumseigenschaften zelllinienspezifisch. Zur Ermittlung einer ausreichenden Zellzahl wurden vorab probatorische Wachstumskinetiken mit verschiedenen Zellzahlen in 6-, 24- und 96-Well-Platten methodenspezifisch über 72-120 h durchgeführt, um ein exponentielles Zellwachstum zu gewährleisten (Tab. 11).

Enz wurde als kristalliner Wirkstoff in DMSO gelöst [10 mM in 100 % DMSO] und bei -20 °C gelagert. Die erste Behandlung der Zellen erfolgte 24 h nach Aussaat, um ein initial stressfreies Anwachsen zu gewährleisten. Das alte Medium wurde abgetragen und durch ein neu berechnetes Volumen aus Medium mit erwünschter Enz Konzentration ersetzt. Kontrollreihen wurden adäquat mit DMSO behandelt. Methodenspezifisch wurden die Zelllinien mit verschiedenen Wirkstoffkonzentrationen behandelt und unter Einfluss von Enz bis zu 120 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Tab. 11: Methoden- und zelllinienspezifische Zellzahlen

Entität	Zelllinie	MTT-Assay [Zellen/Well]	Kinetik [Zellen/Well]	Westernblot [Zellen/Schale]		
				24 h	48 h	72 h
MC	MCF-7	9000	10000	150000	75000	37500
MC	MDA-MB-231	6000	10000	650000	325000	162500
OC	OVCAR-3	2500	5000	525000	262500	131250
OC	SKOV-3	2500	15000	300000	150000	75000
EC	MFE-296	3000	5000	125000	62500	31250
uLMS	SK-UT-1	2000	10000	150000	75000	37500
MC: Mammakarzinom, OC: Ovarialkarzinom, EC: Endometriumkarzinom, uLMS: uterines Leiomyosarkom						

3.1.4 Ernte der Zellen und Zellzahlbestimmung mittels CASY TT Cell Counter

Im Rahmen der Proliferationskinetik erfolgte die erste Ernte 4 h nach Behandlung der Zellen mit Enz in jeweils drei zelllinienspezifischen Wirkstoffkonzentrationen (Kontrollreihen adäquat mit DMSO), anschließend alle 24 h für 120 h. Hierzu wurde der Kulturüberstand abgetragen und die Zellen mit 500 µl DPBS gewaschen. Zur Ablösung der Zellen vom Boden der 24-Well-Platte folgte die Gabe von 200 µl 1x Trypsin/EDTA und Inkubation für 1 min im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Nach mehrmaligem Resuspendieren im Well wurde die Zellsuspension in ein Reaktionsgefäß gegeben. Um auch verbliebene Zellen zu erfassen, erfolgte ein weiteres Spülen des Wells mit 800 µl DPBS und anschließender Gabe ins Reaktionsgefäß. Zur Bestimmung der Zellzahl mittels CASY TT Cell Counter wurden 100 µl der Probe in 10 ml CASY-ton gegeben und das CASY Cup dreimal invertiert. Nach Eichung der Zelllinie am CASY TT Cell Counter erfolgte eine dreimalige Messung der Probe und Bildung eines Mittelwerts. Durch Zählung der lebenden Zellen war dadurch eine direkte Bestimmung des Zellwachstums möglich.

3.1.5 Zellzahlbestimmung mittels MTT-Vitalitäts-Assay

Der MTT-Assay ermöglicht die Messung der Zellvitalität, die mit dem Zellwachstum und der metabolischen, enzymatischen Aktivität der Zellen korreliert. Je nach Ausprägung des

Zellwachstums kommt es in den Zellen unter Gabe des membrangängigen Farbstoffs MTT zu einer unterschiedlich starken enzymatischen Bildung von Formazankristallen, welche photometrisch messbar ist und die Biomasse indirekt darstellt. Nach Behandlung der Zelllinien mit Enz in acht verschiedenen Konzentrationen (0,3 μM , 1 μM , 3 μM , 10 μM , 30 μM , 100 μM , 300 μM , 1000 μM) folgte die Zellzahlbestimmung nach Inkubation für 120 h im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und gesättigter Luftfeuchtigkeit. Die Kontrollreihe wurde adäquat mit DMSO behandelt. Es erfolgte die Gabe von 20 μl 10x MTT zum Zellkulturüberstand pro Well. Nach erneuter Inkubation für 2,5 h im Brutschrank wurde der Überstand abgetragen und der Zellrasen mit 120 μl Lyse-Reagenz pro Well versetzt. Nach weiteren 10 min Inkubation im Brutschrank folgte die photometrische Messung der Zellvitalität bei 550 nm am Tecan infinite M200 Pro.

3.2 Proteinbiochemische Methoden

3.2.1 Proteinisolierung

Für den Westernblot wurden die Zellen in 35 mm Zellkulturschalen mit der im Rahmen der Proliferationskinetik zelllinienspezifisch ermittelten IC₅₀ für Enz und als Kontrolle adäquat mit DMSO behandelt und bis zu 72 h inkubiert. Die Ernte erfolgte alle 24 h. Hierzu wurde der Überstand abgetragen und die Zellen mit 500 μl DPBS gewaschen. Es folgte die Gabe von 200 μl Lämmli-Puffer bei Lagerung auf Eis. Mit einer Pipette konnte das Zelllysate abgekratzt und in ein auf Eis gestelltes Reaktionsgefäß gegeben werden. Anschließend wurden die Proben zur Proteindenaturierung für 5 min bei 95 °C in den Thermomixer gestellt und weitere 2 min auf Eis gekühlt. Eine Lagerung erfolgte bei -20 °C.

3.2.2 Herstellung von Polyacrylamid-Gelen

Zur Herstellung von Polyacrylamid-Gelen wurde das Mini-PROTEAN Tetra Cell Casting Module verwendet. Die Ansetzung des 10 % Trenn- und 5 % Sammelgels erfolgte parallel in Bechergläsern (Tab. 12). Der Trenngelansatz wurde nach Zugabe von APS und TEMED zwischen die aneinandergelegten Glasplatten gegossen und die Gelschicht mit kaltem A. demin. überschichtet. Nach 20-25 min war das Gel fest, das überschichtete Wasser konnte dekantiert und der Rest mit Filterpapier abgezogen werden. Es folgte die Zugabe von APS und TEMED zum Sammelgelansatz und Überschichtung des Trenngels.

Zwischen die Glasplatten wurde zügig ein Kamm in das Sammelgel eingesetzt. Nach 15 min konnte der Kamm aus dem nun festen Gel wieder entfernt und die Taschen mit A. demin. gespült werden. Die Lagerung der Gele erfolgte in feuchtem Zellstoff bei 4 °C für eine Woche.

Tab. 12: Herstellung eines Polyacrylamid-Gels

	10 % Trenngel	5 % Sammelgel
A.demin	2,4 ml	2,1 ml
Trenngelpuffer	1,5 ml	0,375 ml
Acrylamid (30 %)	2 ml	0,5 ml
SDS (10 %)	60 µl	30 µl
APS (10 %)	60 µl	30 µl
TEMED	6 µl	3 µl

3.2.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung der Proteine nach ihrem Molekulargewicht. Eingefrorene Proben wurden zunächst für 5 min bei 95 °C im Thermomixer denaturiert, anschließend auf Eis abgekühlt und zentrifugiert. In die Elektrophorese-Kammer konnten die im Vorfeld gegossenen Polyacrylamid-Gele eingespannt und 1x SDS-Laufpuffer aufgefüllt werden. Zur Detektion der Steroidrezeptoren folgte die Gabe der Proben in die gespülten Geltaschen. Hierzu wurden 35 µl Proteingemisch aus Enz- bzw. Kontrollproben sowie 2 µl Marker als Größenstandard aufgetragen. Bei starken β -Aktin-Bandensignalen wurde eine 1:5 Verdünnung der Proben gewählt (10 µl Probe und 40 µl Lämmli-Puffer) und das Zelllysate mit 15 µl auf einer separaten Trägermatrix aufgetragen. Leertaschen sollten mit 15 µl bzw. 35 µl Lämmli-Puffer aufgefüllt werden. Bis zur Auftrennung des Größenstandards an der Trenngelgrenze liefen die Proben für 15 min bei 80 V, dann weitere 90 min bei 120 V. Nach Anlage von Spannung in der Elektrophorese-Kammer wandern negativ geladenen Proteine zur Anode. Die negative Ladung bedingt sich aus der Behandlung der Probe mit Lämmli-Puffer, dem dort enthaltenen anionischem SDS sowie der Denaturierung der Proteine bei 95 °C. Kürzere Proteinketten durchlaufen das Polyacrylamid-Gel dabei schneller als längere.

3.2.4 Western-Blotting

Nach erfolgter Gelelektrophorese wurden die Polypeptidbanden auf eine feste (hier NC-) Trägermembran übertragen. Hierzu wurden die Gele aus der Apparatur ausgespannt, die Sammelgele vorsichtig abgetrennt und die Trenngele für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Es folgte die Schichtung und Lagerung des sogenannten Blots aus zwei Filterpapieren, einer NC-Membran, dem 10 % Trenngel und drei weiteren Filterpapieren im TurboBlot-Gerät für 30 min bei 15 V. Auch NC-Membran und Filterpapiere wurden vorher für 5 min in Transferpuffer inkubiert. Nach erfolgreicher Übertragung der Polypeptidbanden auf eine Trägermembran können Proteine unter Verwendung spezifischer Antikörper gebunden und dargestellt werden. Um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren, erfolgte die Inkubation der NC-Membran in einem 50 ml Falcon mit 3 ml Milchpulver für 1 h auf einem Rollmischer, anschließend wurde die Trägermembran mit 5 ml 1x TBS-T gewaschen. Es folgte die Gabe des Primäantikörpers in den angegebenen Verdünnungen (Tab. 6) und Inkubation über Nacht auf einem Rollmischer bei 4 °C. Am Folgetag wurde die Trägermembran zur Entfernung ungebundener Primäantikörper 3x 5 min mit 5 ml 1x TBS-T gewaschen und dann für 1 h mit dem entsprechend passenden Sekundäantikörper in den angegebenen Verdünnungen (Tab. 7) auf einem Rollmischer inkubiert. Die NC-Membran wurde abschließend 3x 5 min mit 5 ml 1x TBS-T gewaschen, bevor die nasse Detektion der Proteinbanden mittels ODYSSEY-Detektor erfolgte. Eine nähere Bandenanalyse- und quantifizierung konnte mit dem Programm Image Studio Lite Version 5 durchgeführt werden.

3.3 Statistische Auswertung

Die Daten dieser Arbeit wurden nach Durchführung von mindestens drei unabhängigen Versuchen pro Experiment ausgewertet. Normiert auf die entsprechende Kontrolle wurden sie als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Die statistische Auswertung erfolgte durch den Student's t-Test mittels Microsoft Excel 2010. Statistische Signifikanz wurde als $p < 0,0500$ (*), $p \leq 0,0100$ (**) und $p \leq 0,0010$ (***) definiert.

4. Ergebnisse

4.1 Bestimmung der IC_{50} für Enzalutamid mittels MTT-Vitalitäts-Assay

Enz ist ein antiproliferativer Wirkstoff, dessen Effekte auf gynäkologische Tumorzellen verschiedener Entitäten charakterisiert werden sollten. Der MTT-Vitalitäts-Assay ermöglicht die Messung der Zellvitalität, die mit dem Zellwachstum und der metabolischen, enzymatischen Aktivität der Zellen korreliert.

Unter Einfluss des Wirkstoffs in acht verschiedenen Konzentrationen (0,3-1000 μM), konnte die Proliferationsfähigkeit gehemmt und eine Aussage zur IC_{50} von Enz getroffen werden. Es entstanden für alle sechs Zelllinien sigmoidale Kurvenverläufe (Abb. 2). Bei geringen Konzentrationen von 0,3-3 μM war bei jeder Entität nahezu 100 % physiologische Aktivität zu detektieren. Mit entsprechend höheren Konzentrationen von 300-1000 μM zeigten die Zellen nur noch minimale bis keine Vitalität. Die IC_{50} konnte mithilfe des Programms GraphPad Prism 5 ermittelt werden.

Die halbmaximale Inhibition des Zellwachstums durch Enz unterschied sich innerhalb der untersuchten MC- und OC-Zelllinien erheblich. So lag die IC_{50} von MCF-7 bei 85 μM (Abb. 2A), von MDA-MB-231 bereits bei 34 μM (Abb. 2B). OVCAR-3 erreichte seine mittlere Proliferationsfähigkeit mit einer IC_{50} von 92 μM (Abb. 2C), SKOV-3 schon mit 50 μM (Abb. 2D).

Die IC_{50} der EC-Zellen MFE-296 lag im Vergleich zu allen anderen Entitäten mit 28 μM am niedrigsten (Abb. 2E). Bei den uLMS-Zellen SK-UT-1 betrug die IC_{50} 40 μM (Abb. 2F).

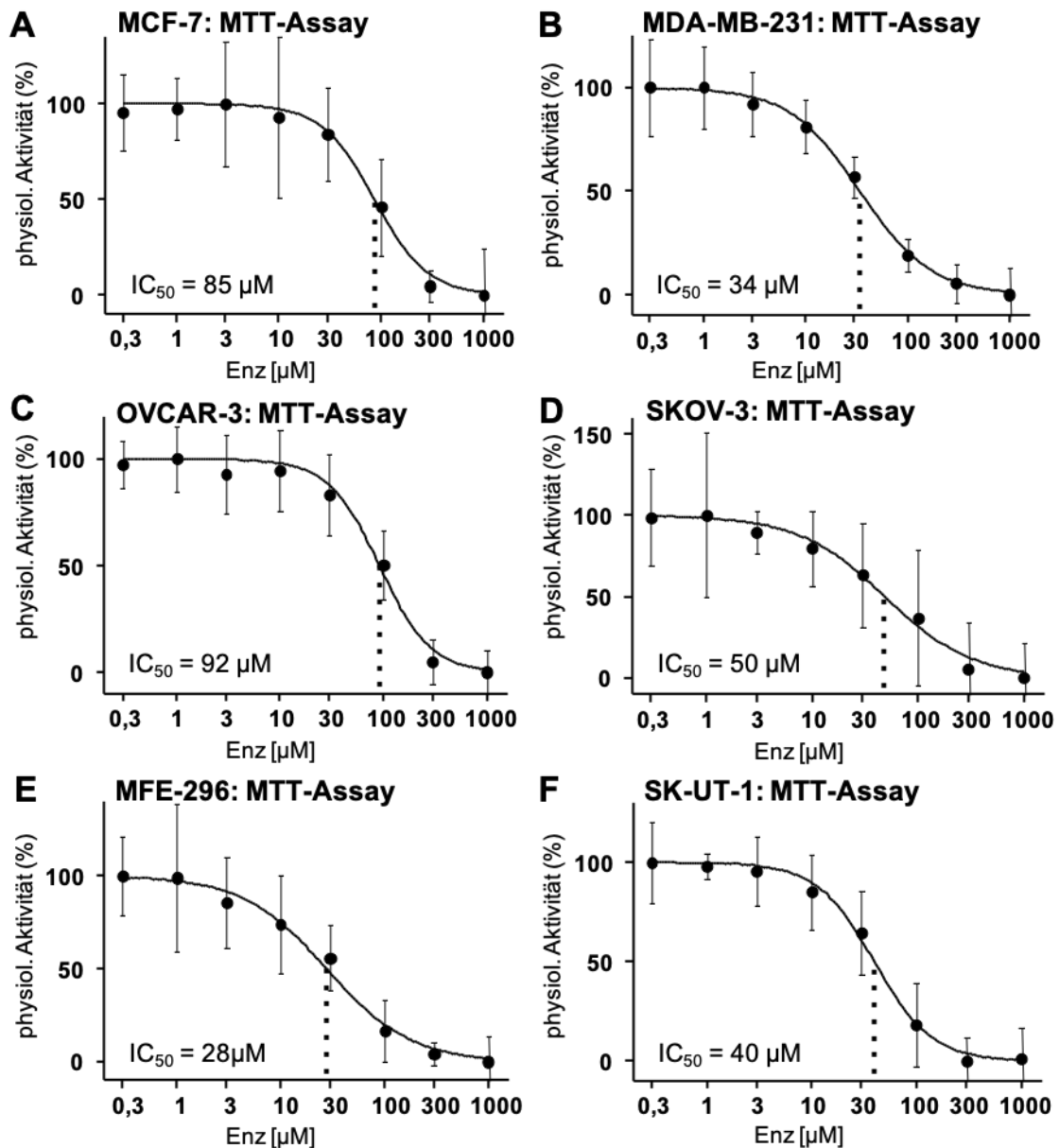


Abb. 2: Bestimmung der zelllinienspezifischen IC_{50} mittels MTT-Vitalitäts-Assay anhand der Zellvitalität unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Enz nach 120 h. Unter Gabe steigender Konzentrationen von Enz ergab sich mit Hinblick auf die Zellvitalität ein sigmoidaler Kurvenverlauf in allen Zelllinien. Die IC_{50} betrug bei MC-Zelllinien MCF-7 85 μM und MDA-MB-231 34 μM , bei OC-Zelllinien OVCAR-3 92 μM und SKOV-3 50 μM , bei EC-Zelllinie MFE-296 28 μM , bei uLMS-Zelllinie SK-UT-1 40 μM .

4.2 Bestimmung der IC_{50} für Enzalutamid mittels Zellzahlbestimmung am CASY Modell TT Cell Counter and Analyzer

Der MTT-Vitalitäts-Assay gibt die Biomasse der Zellen indirekt wieder und eine Beeinflussung der physiologischen Prozesse durch den Wirkstoff ist nicht auszuschließen. Zur

Überprüfung der ermittelten IC_{50} durch den MTT-Vitalitäts-Assay erfolgten Proliferationskinetiken mit drei unterschiedlichen Konzentrationen an Enz pro Zelllinie, bei denen das Zellwachstum direkt durch Zählung der lebenden Zellen bestimmt wurde.

Exponentielles Wachstum war in allen Zelllinien erkennbar (Abb. 3). MCF-7 Zellen wurden mit 40 μ M, 80 μ M und 120 μ M Enz behandelt (Abb. 3A). Nach Inkubation mit 80 μ M für 96 h bestand die halbmaximale Inhibition des Zellwachstums mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p= 0,0070$) zu der mit DMSO behandelten Kontrollreihe. Die IC_{50} der Proliferationskinetik (80 μ M) stimmte mit dem Ergebnis des MTT-Vitalitäts-Assays (85 μ M) überein (Abb. 2A). MDA-MB-231 Zellen wurden 120 h mit 10 μ M, 50 μ M und 90 μ M Enz inkubiert (Abb. 3B). Die Behandlung mit 90 μ M ergab nach 72 h eine statistisch signifikante Abweichung ($p= 0,0032$) von der Kontrollreihe und entsprach der IC_{50} . Sie unterschied sich erheblich von der durch den MTT-Vitalitäts-Assay ermittelten IC_{50} von 34 μ M (Abb. 2B).

Die OC-Zelllinie OVCAR-3 inkubierte 120 h mit 50 μ M, 100 μ M und 150 μ M des antiproliferativen Wirkstoffs Enz (Abb. 3C). Durch die Inkubation mit 100 μ M war bereits nach 72 h ein signifikanter Unterschied ($p= 0,0044$) zu den mit DMSO behandelten Zellen deutlich. Eine statistisch signifikante halbmaximale Hemmung ($p= 0,0009$) war ab 96 h bei gleicher Konzentration erkennbar. Die IC_{50} von 100 μ M entsprach den ermittelten 92 μ M durch den MTT-Vitalitäts-Assay (Abb. 2C). SKOV-3 Zellen wurden mit 60 μ M, 90 μ M und 120 μ M Enz behandelt (Abb. 3D). Bei 90 μ M zeigte sich nach 48 h ein erster signifikanten Rückgang ($p= 0,0067$) im Zellwachstum, ab 72 h nur noch mittlere Proliferationsfähigkeit ($p < 0,0001$). Die IC_{50} von 90 μ M ähnelte zwar jener von OVCAR-3, unterschied sich aber erheblich von den 50 μ M, die für SKOV-3 durch den MTT-Vitalitäts-Assay ermittelt wurden (Abb. 2D).

Auch für MFE-296 Zellen ergaben sich gleichermaßen Unterschiede zwischen den ermittelten IC_{50} . Im Rahmen der Proliferationskinetik wurde die EC-Zelllinie mit 30 μ M, 60 μ M und 90 μ M Enz behandelt (Abb. 3E). Die IC_{50} lag nach 120 h mit einem statistisch signifikanten Unterschied ($p= 0,0042$) zur Kontrollreihe bei 60 μ M und damit etwa 30 μ M höher als die IC_{50} , die mit 28 μ M durch den MTT-Vitalitäts-Assay ermittelt wurde (Abb. 2E). In der Wachstumskinetik von MFE-296 Zellen zeigte eine Behandlung mit 30 μ M Enz allerdings keinen signifikanten Unterschied zu den mit DMSO behandelten Zellen.

Die uLMS-Zelllinie SK-UT-1 inkubierte 120 h mit 20 μM , 60 μM und 100 μM Enz (Abb. 3F) und zeigte nach 72 h eine signifikante mittlere Zellwachstumsreduktion ($p=0,0051$) bei 60 μM . Eine annähernd ähnliche IC_{50} wurde mit 40 μM durch den MTT-Vitalitäts-Assay bestimmt (Abb. 2F). Die IC_{50} von MFE-296 und SK-UT-1 war mit 60 μM identisch.

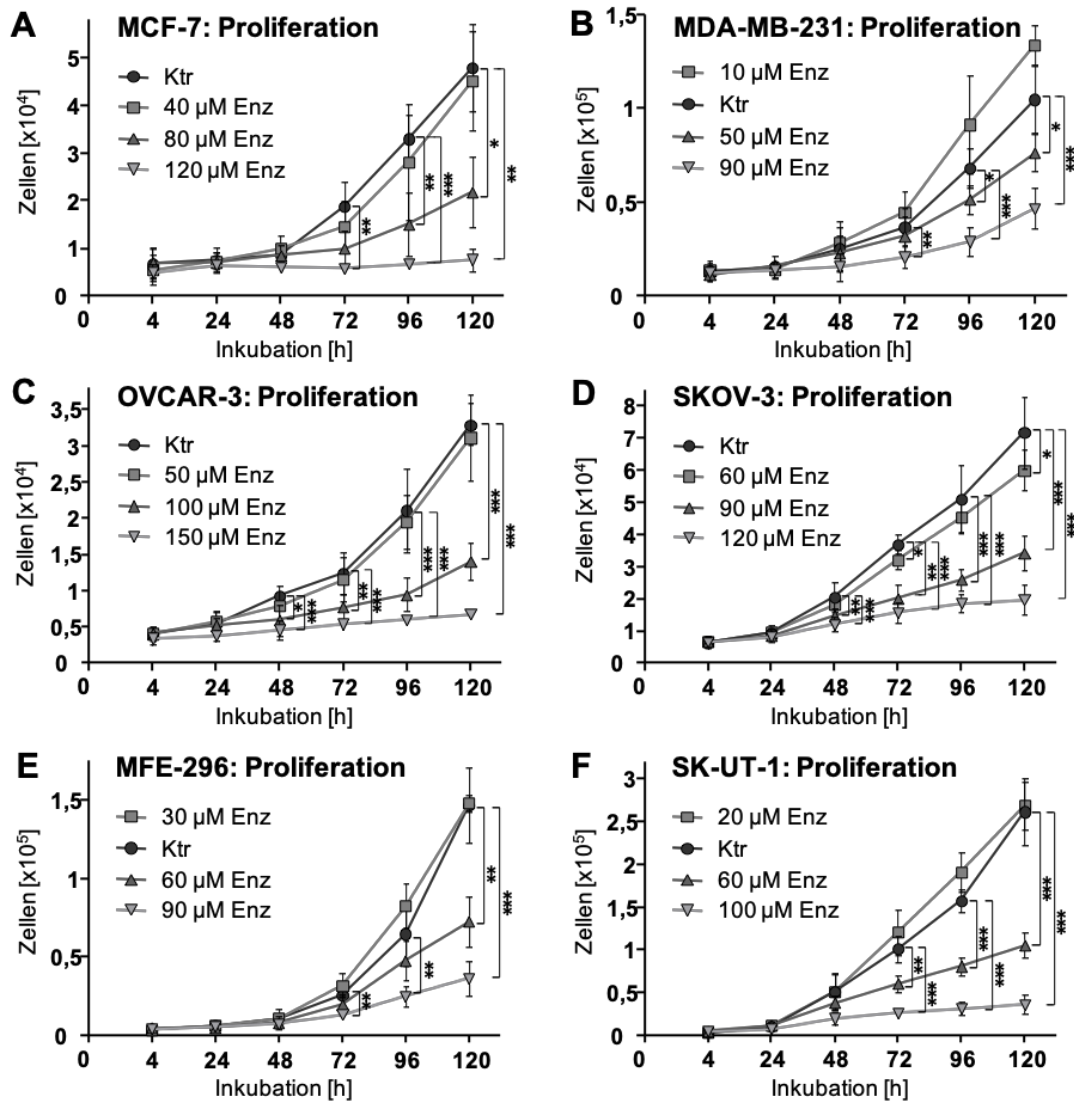


Abb. 3: Bestimmung der zelllinienspezifischen IC_{50} mittels CASY Modell TT Cell Counter and Analyzer anhand der Zellzahl unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Enz nach 120 h. Unter Gabe steigender Konzentrationen von Enz ergab sich mit Hinblick auf die Zellzahl ein exponentielles Wachstum in allen Zelllinien. Die IC_{50} betrug bei MC-Zelllinien MCF-7 80 μM (96 h: $p=0,0070$) und MDA-MB-231 90 μM (72 h: $p=0,0032$), bei OC-Zelllinien OVCAR-3 100 μM (96 h: $p=0,0009$) und SKOV-3 90 μM (72 h: $p<0,0001$), bei EC-Zelllinie MFE-296 60 μM (120 h: $p=0,0042$), bei uLMS-Zelllinie SK-UT-1 60 μM (72 h: $p=0,0051$).

4.3 Analyse der Basalexpression von AR, ER α , ER β 1 und ER β 2 mittels Westernblot

Der Wirkmechanismus von Enz beruht auf der Inhibition des AR. Abazid et al. (2019) demonstrieren an urologischen PC-Zellen LNCaP (AR-positiv) und PC-3 (AR-negativ), dass eine Zellwachstumsreduktion unter Einfluss von Enz unabhängig von der AR-Expression besteht und beschreiben eine Beteiligung der ER-Isoformen. Aus diesem Grund wurde der Effekt von Enz auf AR und ER in gynäkologischen Zelllinien mittels MTT-Vitalitäts-Assay, Proliferationskinetik und Westernblot näher charakterisiert. Eine AR-Expression wurde in den Zelllinien MCF-7 und MFE-296 detektiert (Abb. 4A). Die OC-Zellen SKOV-3 und OVCAR-3 sowie die MC-Zelllinie MCF-7 zeigten eine Expression von ER α (Abb. 4B). Eine Basalexpression der Isoformen ER β 1 und ER β 2 konnte in keiner Zelllinie nachgewiesen werden (Abb. 4C+D).

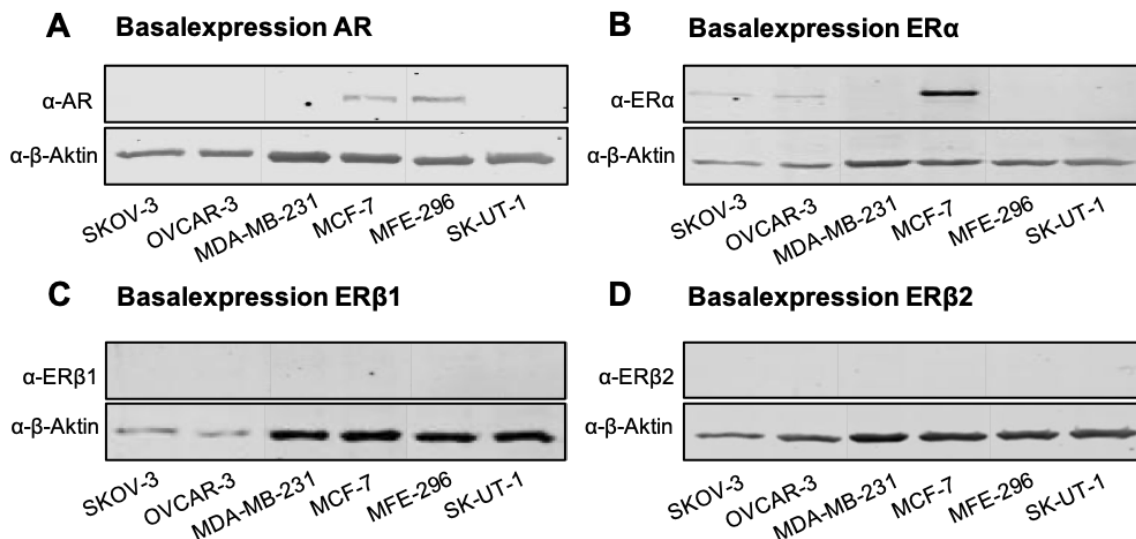


Abb. 4: Bestimmung der zelllinienspezifischen Basalexpression von AR, ER α , ER β 1 und ER β 2 mittels Westernblot. Eine Expression von AR wurde in MCF-7 und MFE-296 Zellen, von ER α in OC-Zelllinien SKOV-3, OVCAR-3 und MC-Zelllinie MCF-7 detektiert. ER β 1 und ER β 2 konnten in keiner Zelllinie nachgewiesen werden.

4.4 Analyse der Expression von AR unter Einfluss von Enzalutamid mittels Westernblot

Unter Einfluss von Enz wurde die Expressionsrate von AR über 72 h in den AR-positiven MCF-7 und MFE-296 Zellen (Abb. 4A) detektiert. Die Behandlung der Zelllinien erfolgte mit der jeweils im Rahmen der Proliferationskinetik ermittelten IC₅₀ und einer dazu äquivalenten DMSO-Kontrollreihe. Bei beiden Zelllinien war ein signifikanter Rückgang der AR-Expression erkennbar (Abb. 5).

Die MC-Zelllinie MCF-7 inkubierte für 72 h mit 80 μ M Enz. Der AR wurde im Vergleich zur Kontrolle bereits nach 24 h auf $0,49\pm 0,04$ ($p < 0,0001$) und nach 72 h sogar auf $0,01\pm 0,01$ ($p = 0,0001$) supprimiert (Abb. 5A).

Die EC-Zelllinie MFE-296 wurde mit 60 μ M Enz behandelt. Ein statistisch signifikanter Rückgang des AR erfolgte erst nach 48 h auf $0,88\pm 0,02$ ($p < 0,0001$) und nach 72 h auf $0,66\pm 0,14$ ($p = 0,0122$) (Abb. 5B).

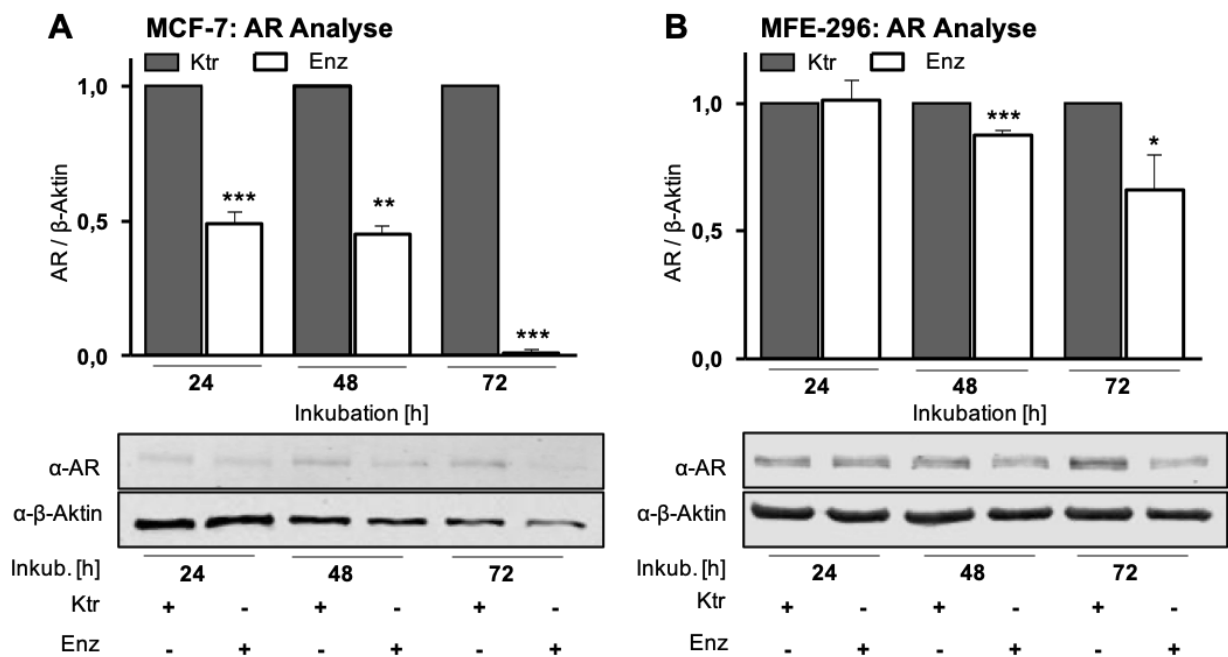


Abb. 5: Analyse der Expression von AR mittels Westernblot in den Zelllinien MCF-7 und MFE-296 unter Einfluss von Enz. Die Suppression von AR erfolgte bei MCF-7 Zellen nach 24 h auf $0,49\pm 0,04$ ($p < 0,0001$), nach 48 h auf $0,45\pm 0,03$ ($p = 0,0016$), nach 72 h auf $0,01\pm 0,01$ ($p = 0,0001$) und bei MFE-296 Zellen nach 48 h auf $0,88\pm 0,02$ ($p < 0,0001$), nach 72 h auf $0,66\pm 0,14$ ($p = 0,0122$). Bei MFE-296 Zellen gab es nach 24 h noch keine signifikante Veränderung der AR-Expression ($1,01\pm 0,08$ ($p = 0,795$)).

4.5 Analyse der Expression von $ER\alpha$ unter Einfluss von Enzalutamid mittels Westernblot $ER\alpha$ -positiv detektierte Zelllinien inkubierten für 72 h mit der jeweils im Rahmen der Proliferationskinetik ermittelten IC_{50} , Kontrollreihen wurde äquivalent mit DMSO behandelt (Abb. 6). Über diesen Zeitraum war bei den Zelllinien MCF-7 und SKOV-3 eine $ER\alpha$ -Suppression erkennbar (Abb. 6A+D), bei MFE-296 Zellen nur bis 24 h (Abb. 6B) und bei OVCAR-3 Zellen bis 48 h (Abb. 6C) nach Inkubationsbeginn.

Unter Einfluss von 80 μM Enz zeigte die MC-Zelllinie MCF-7 bereits nach 24 h eine abnehmende $\text{ER}\alpha$ -Expression auf $0,52\pm 0,07$ ($p= 0,0114$). Nach 48 h wurde der Steroidrezeptor weiter auf $0,47\pm 0,12$ ($p= 0,0015$) und nach 72 h auf $0,31\pm 0,1$ ($p= 0,0003$) statistisch signifikant supprimiert (Abb. 6A).

Die EC-Zellen MFE-296 inkubierten für 72 h mit 60 μM Enz. Nach 24 h war ein statistisch signifikanter Rückgang der $\text{ER}\alpha$ -Expression auf $0,89\pm 0,14$ ($p= 0,0151$), nach 48 h und 72 h eine signifikante Erhöhung auf $1,21\pm 0,26$ ($p= 0,0065$) und $1,37\pm 0,31$ ($p= 0,0007$) detektierbar (Abb. 6B).

Die Proteinexpression der OC-Zelllinie OVCAR-3 zeigte sich unter Inkubation mit 100 μM Enz sowohl nach 24 h auf $0,69\pm 0,31$ ($p= 0,0348$), als auch nach 48 h auf $0,68\pm 0,11$ ($p= 0,0076$) statistisch signifikant reduziert (Abb. 6C). Nach 72 h stieg die $\text{ER}\alpha$ -Expression zurück auf Kontrollhöhe an ($1,33\pm 0,32$, $p= 0,0903$).

Unter Einfluss von 90 μM Enz wurde die $\text{ER}\alpha$ -Expression der OC-Zellen SKOV-3 gegenüber der Kontrolle nach 24 h auf $0,38\pm 0,13$ ($p= 0,0001$), nach 48 h auf $0,67\pm 0,19$ ($p= 0,0127$) und nach 72 h auf $0,80\pm 0,12$ ($p= 0,0392$) statistisch signifikant gesenkt (Abb. 6D). Damit unterschied sich die $\text{ER}\alpha$ -Expression innerhalb der OC-Zelllinien nach 48 h Inkubation mit Enz.

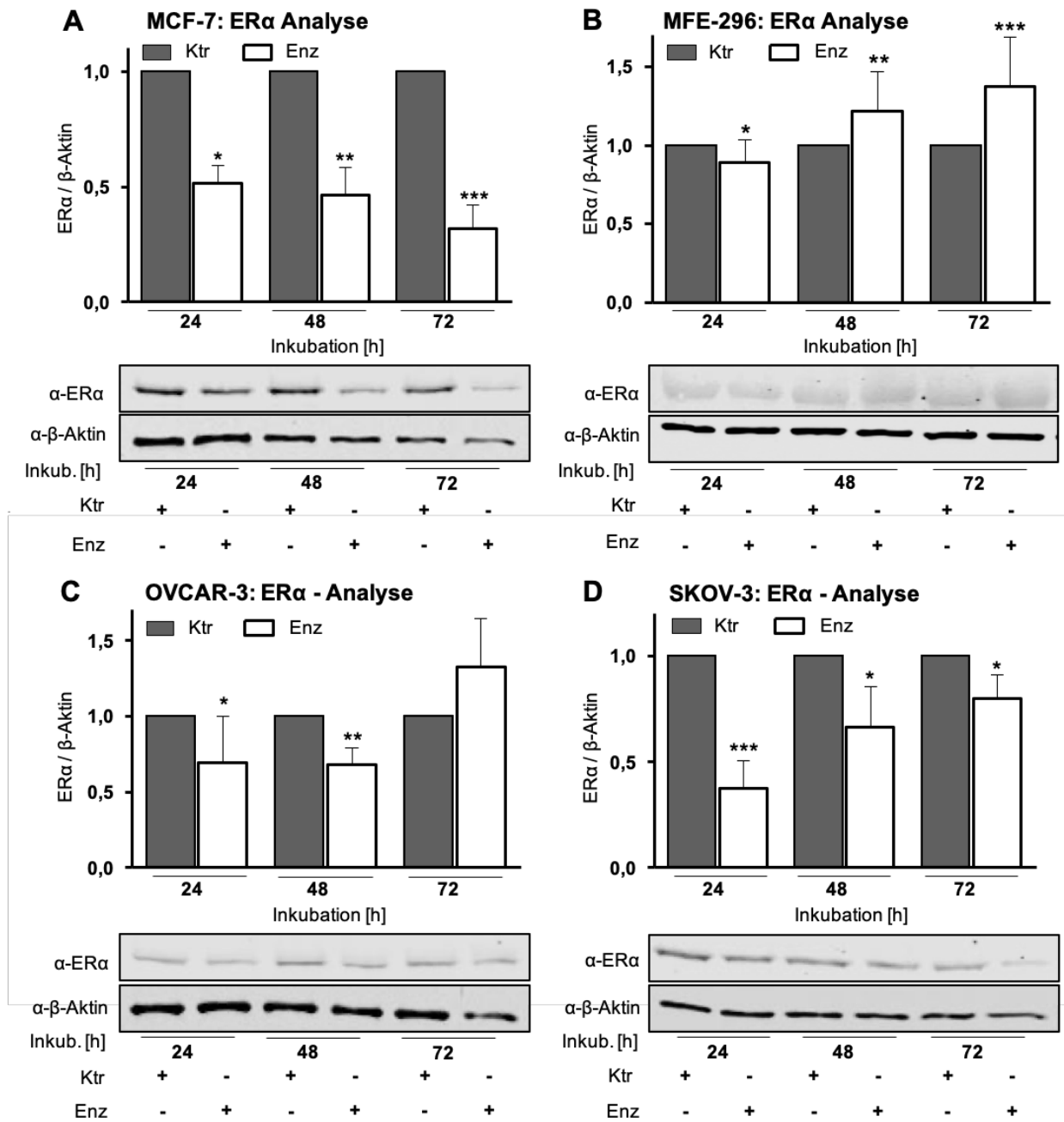


Abb. 6: Analyse der Expression von ER α mittels Westernblot in den Zelllinien MCF-7, MFE-296, OVCAR-3 und SKOV-3 unter Einfluss von Enz. Die ER α -Expression in MCF-7 Zellen wurde signifikant gehemmt (24 h: $0,52 \pm 0,07$, $p = 0,0114$; 48 h: $0,47 \pm 0,12$, $p = 0,0015$; 72 h: $0,31 \pm 0,1$, $p = 0,0003$). Bei MFE-296 Zellen war nach 24 h ein signifikanter Rückgang der ER α -Expression auf $0,89 \pm 0,14$ ($p = 0,0151$), nach 48 h und 72 h eine signifikante Erhöhung detektierbar (48 h: $1,21 \pm 0,26$, $p = 0,0065$; 72 h: $1,37 \pm 0,31$, $p = 0,0007$). In OVCAR-3 Zellen wurde die ER α -Expression innerhalb von 48 h signifikant gehemmt (24 h: $0,69 \pm 0,31$, $p = 0,0348$; 48 h: $0,68 \pm 0,11$, $p = 0,0076$). Nach 72 h stieg die ER α -Expression zurück auf Kontrollhöhe an ($1,33 \pm 0,32$, $p = 0,0903$). Die ER α -Expression in SKOV-3 Zellen wurde signifikant supprimiert (24 h: $0,38 \pm 0,13$, $p = 0,0001$; 48 h: $0,67 \pm 0,19$, $p = 0,0127$; 72 h: $0,80 \pm 0,12$, $p = 0,0392$).

Neben dem antiproliferativen Wirkmechanismus von Enz, der für alle Zelllinien durch zwei unabhängige Methoden nachgewiesen werden konnte, zeigte sich für die Expression von AR und ER α nur ein zelllinienspezifischer Einfluss von Enz (Tab. 13). Bei ER β 1- und ER β 2-negativem Status aller untersuchten Zelllinien konnte der Einfluss von Enz auf die ER β -Isoformen in dieser Arbeit nicht näher untersucht werden.

Tab. 13: Zelllinienspezifischer Einfluss von Enz auf Proliferation und Expression von AR, ER α , ER β 1, ER β 2

Entität	Zelllinie	Kinetik IC ₅₀ [μ M]	MTT-Assay IC ₅₀ [μ M]	AR	ER α	ER β 1	ER β 2
MC	MCF-7	80	85	↓	↓	–	–
	MDA-MB-231	90	34	–	–	–	–
OC	OVCAR-3	100	92	–	↓	–	–
	SKOV-3	90	50	–	↓	–	–
EC	MFE-296	60	40	↓	↑	–	–
uLMS	SK-UT-1	60	28	–	–	–	–

MC: Mammakarzinom, OC: Ovariakarzinom, EC: Endometriumkarzinom,
uLMS: uterines Leiomyosarkom, IC₅₀: halbmaximale inhibitorische Konzentration,
AR: Androgenrezeptor, ER: Estrogenrezeptor

5. Diskussion

Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit ist die Wirkung des AR-Antagonisten Enz auf gynäkologische Tumorzellen. In aktuellen Studien wird auch ein hemmender Einfluss auf ER-Isoformen beschrieben (Abazid et al., 2019), weshalb zunächst die Basalexpression der Steroidrezeptoren AR, ER α , ER β 1 und ER β 2 untersucht wurde. Einigen der sechs gynäkologischen Tumorzelllinien liegt hinsichtlich der Rezeptordetektion sehr heterogene Literatur zugrunde.

5.1 Basalexpression der Steroidrezeptoren AR und ER α

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten MCF-7 Zellen in dieser Arbeit auf Proteinebene als AR- (Cochrane et al., 2014; D'Amato et al., 2016) und ER α -positiv (Al-Bader et al., 2011; Austin et al., 2018; Chan et al., 2014; Cochrane et al., 2014; D'Amato et al., 2016; Ford et al., 2011; Jonsson et al., 2014; O'Donnel et al., 2005) detektiert werden. Auch auf mRNA Ebene zeigen Hu et al. (2014) eine AR- und Ford et al. (2011) sowie Tong et al. (2002) eine ER α -Expression.

Veröffentlichungen zu MDA-MB-231 Zellen zeigen sich im Vergleich divergent. Die MCF-7 Zelllinie wird als TNBC charakterisiert, wodurch sie neben PR- und HER2-NEU- als ER α -negativ definiert ist (Kao et al., 2009). Letzteres konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden und bestätigt Ergebnisse von Austin et al. (2018) und O'Donnel et al. (2005) auf Proteinebene. Auch auf mRNA Ebene zeigen Tong et al. (2002) keine ER α -Expression. Publikationen von Al-Bader et al. (2011) und Ford et al. (2011), in denen MDA-MB-231 Zellen auf mRNA- und Proteinebene als ER α -positiv beschrieben werden, sind kritisch zu betrachten, da parallel an ER α -positiven MCF-7 Zellen geforscht wurde und eine Kreuzkontaminierung sowie ein dadurch inkorrekt ermittelter Rezeptorstatus nicht auszuschließen sind.

Als AR-positiv werden MDA-MB-231 Zellen auf Proteinebene (Barton et al., 2015; Caiazza et al., 2016; Shen et al., 2017) und auf mRNA Ebene (Hu et al., 2014) detektiert. 6,6-75 % der TNBC exprimieren diesen Steroidrezeptor, wobei die große Spannweite auf unterschiedliche Grenzwerte und Methoden zur Bestimmung einer AR-Expression zurückgeführt wird (Rampurwala et al., 2016). Die Zelllinie wird als mesenchymal stemlike (MSL) TNBC-Subtyp klassifiziert (Lehmann et al., 2011) und exprimiert

verhältnismäßig wenig AR (Caiazza et al., 2016; Hu et al., 2014). Zwar wird eine AR-positive Darstellung durch längere Belichtungszeit durch Barton et al. (2015) beschrieben, konnte aber aufgrund methodischer Unterschiede in dieser Arbeit nicht getestet werden.

Ganz ähnlich ist es bei der hier AR-negativ detektierten OC-Zelllinie SKOV-3. Zwar wird sie in der Literatur als AR-positiv auf Proteinebene beschrieben (Burney et al., 2017; Ligr et al., 2011), jedoch befindet sich ihre AR-Expression an der unteren Nachweisgrenze (Evangelou et al., 2000). Ohnehin exprimieren SKOV-3 Zellen nur 3 % der AR mRNA, die OVCAR-3 Zellen bilden (Evangelou et al., 2000). Das AR-negative Detektionsergebnis dieser Arbeit stimmt mit dem ermittelten Rezeptorstatus auf mRNA Ebene durch Lau et al. (1999) überein. Da auch OVCAR-3 Zellen entgegen einstimmig konträren Publikationen auf Proteinebene als AR-negativ detektiert wurden (Burney et al., 2017; Evangelou et al., 2000; Grisham et al., 2014; Ligr et al., 2011; Park et al., 2016), könnte bei dem hier verwendeten AR Antikörper der Firma Cell Signaling Technology Inc. (Anti-AR-XPTM rabbit #5153) möglicherweise eine insgesamt geringe Sensitivität für AR in OC-Zelllinien vorliegen. Antikörper reagieren nicht gleichermaßen sensitiv in verschiedenen Geweben (Voskuil et al., 2017).

In Übereinstimmung mit der Literatur konnten die OC-Zelllinien SKOV-3 (Chan et al., 2014; Ligr et al., 2011; O'Donnel et al., 2005; Pinton et al., 2018) und OVCAR-3 (Ligr et al., 2011; Schüler-Toprak et al., 2017) als ER α -positiv auf Proteinebene nachgewiesen werden. Auch auf mRNA Ebene wird eine positive ER α -Expression für SKOV-3 Zellen (Chan et al., 2014; Lattrich et al., 2008; Lau et al., 1999; Pinton et al., 2018) und für OVCAR-3 Zellen (Chao et al., 2013; Lattrich et al., 2008) beschrieben. Als Besonderheit gilt, dass SKOV-3 Zellen zwar ER α -positiv, aber aufgrund einer 32bp-Deletion im Exon 1 des ER α Transkript estrogen-insensitiv und -resistent gegenüber Anti-Estrogenen sind (Hua et al., 1995; Lau et al., 1999). Durch die Kultivierung von Zellen kann es bei steigender Passagenzahl zu Mutationen und damit Veränderungen im Geno- und Phänotyp kommen (Esquenet et al., 1997; Yu et al., 1997). Beispielsweise beschreiben Chan et al. (2017) und O'Donnel et al. (2005) ER α -negative OVCAR-3 Zellen, die möglicherweise infolge einer zu hohen Passagenzahl mutationsbedingt detektiert wurden. Auch Hua et al. (1995) detektieren ER-negative OVCAR-3 Zellen, allerdings ohne Differenzierung der ER-Isoformen.

Auch für die Zelllinie MFE-296 ergab sich in dieser Arbeit ein AR-positiver Status auf Proteinebene, der durch weitere Publikationen bestätigt wird (Hackenberg et al., 1994; Hackenberg et al., 1997; Qiu et al., 2014). Sasaki et al. (2000) konnten eine AR-Expression auf mRNA Ebene nachweisen. Das Typ 1 EC ist mit über 80 % der häufigste histologische Subtyp (Hashmi et al., 2020). Auch die EC-Zelllinie MFE-296 wird als Typ 1 klassifiziert und ist mit einem hohen Tumorpotenzial assoziiert (Qu et al., 2019). Es existiert widersprüchliche Literatur zur AR-Expression in EC. Bei deutlich variierender Probenmenge (44-122) zeigen drei Publikationen einen AR-positiven Status in Typ 1 EC von 19-88,6 % (Hashmi et al., 2018; Ito et al., 2002; Tanaka et al., 2015). Kamal et al. (2016) beschreiben sogar eine mit steigendem Grading abnehmende AR-Expression in EC.

Eine ER α -Expression in MFE-296 Zellen wurde bislang nur auf mRNA Ebene gezeigt (Sasaki et al., 2001; Qu et al., 2019). In dieser Arbeit konnten die Zellen erstmalig auch auf Proteinebene als ER α -positiv nachgewiesen werden. Das hier im Westernblot schwach detektierte α -ER α -Bandensignal korreliert mit der durch Qu et al. (2019) beschriebenen niedrigen ER α mRNA Expressionsrate dieser EC-Zelllinie. In der initialen Analyse der ER α -Basalexpression aller Zelllinien mittels Westernblot war das vermeintlich schwache α -ER α -Bandensignal für MFE-296 Zellen nicht darstellbar. Ursächlich hierfür ist die Detektion des starken α -ER α -Bandensignal der MCF-7 Zelllinie auf derselben Membran und dadurch eingeschränkte Belichtungsmöglichkeiten.

Es existiert keine Literatur zum Rezeptorstatus von SK-UT-1 Zellen. Zwar untersuchten De Carvalho Fischer et al. (2018) epigenetische Wirkstoffe auf das Wachstumsverhalten von uLMS, unter anderem SK-UT-1 Zellen, eine Charakterisierung der Steroidrezeptorexpression erfolgte jedoch nicht. Die fehlenden Veröffentlichungen zu dieser Zelllinie dürfte sich durch die Seltenheit des uLMS erklären, welches nur 1-2 % aller uterinen Malignome ausmacht (AWMF Leitlinien-Register, 2021). Einzelne Publikationen finden sich stattdessen hinsichtlich des Rezeptorstatus auf Proteinebene im Probenmaterial von Patienten mit uLMS. Zur AR-Expression im primären uLMS-Material finden sich Veröffentlichungen mit verhältnismäßig geringen Fallzahlen. Leitao et al. (2004) beschreiben eine AR-Expression von 40 % in 25 uLMS-Proben. Baek et al. (2018) detektieren bei fast doppelter Fallzahl (42 uLMS-Proben) nur 26 % als AR-positiv. In

dieser Arbeit wurde die uLMS-Zelllinie SK-UT-1 auf Proteinebene als AR-negativ nachgewiesen und entspricht Ergebnissen von Koivisto-Korander et al. (2011), die 28 uLMS-Proben zu 100 % als AR-negativ zeigen.

Im Bereich der Forschung zum ER α existieren mehrere Quellen, die allerdings zu sehr verschiedenen Ergebnissen gelangt sind. Vier Publikationen beschreiben bei annähernd ähnlicher Probenmenge (19-26 Fälle) eine ER α -Expression auf Proteinebene von 26-57 % (Akhan et al., 2005; Bodner et al., 2004; Koivisto-Korander et al., 2011; Leitao et al., 2004). Auch hier ist die starke Diskrepanz der Ergebnisse durch die kleinen Fallzahlen erklärbar und daher kritisch zu betrachten. In zwei größeren Studien mit 42-43 uLMS-Proben zeigen Baek et al. (2018) und Leitao et al. (2012) eine ER α -Expression von nur 43 % und 42 %. In dieser Arbeit wurde die uLMS-Zelllinie SK-UT-1 als ER α -negativ auf Proteinebene detektiert.

5.2 Basalexpression der Steroidrezeptoren ER β 1 und ER β 2

Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die Detektion der ER β Isoformen 1 und 2. ER β wurde erst 1996 durch Kuiper et al. (1996) und Mosselman et al. (1996) kloniert, später folgte die Beschreibung weiterer Isoformen (ER β 1-5) (Moore et al., 1998). ER β 1 und ER β 2 werden neben zahlreichen anderen Geweben vor allem im Ovar und schwächer auch in der Mamma und dem Uterus exprimiert (Moore et al., 1998).

Trotz zahlreicher Studien ist die Literatur zur Funktion von ER β Isoformen durchaus widersprüchlich. ER β 1 gilt als einzige voll funktionstüchtige Isoform, die sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden kann und wird mehrheitlich als antiproliferativ, tumorsuppressiv und proapoptotisch charakterisiert (Leung et al., 2006; Paruthiyil et al., 2004; Treeck et al., 2007). Andere Publikationen beschreiben eine „bi-faceted role“ von ER β 1 in MC (Leygue und Murphy, 2013) und zeigen eine zusätzlich proliferative Funktion (Hou et al., 2004). Auch ER β 2 wirkt antiproliferativ. Diese Isoform hat keine intrinsische Aktivität, sondern heterodimerisiert neben ER β 1 vor allem mit ER α (Ogawa et al., 1998), wodurch dessen proteasom-abhängiger Abbau induziert und dadurch ER α -regulierte Gene supprimiert werden (Zhao et al., 2007).

Eine Vielzahl kontroverser Veröffentlichungen findet sich überdies zur Expression von ER β Isoformen auf mRNA- und Proteinebene gynäkologischer Tumore. Die erschwerte Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit von Studienergebnissen auf diesem Gebiet beruht neben zu kleinen Fallzahlen und Methodenvarianz, hauptsächlich auf einer großen Variabilität der verwendeten ER β -Antikörper. Problematisch sind hier Unterschiede in ER β -Sensibilität und -Spezifität sowie eine unklare Differenzierung zwischen den detektierten Isoformen (Shaaban et al., 2008; Wu et al., 2012). In den vergangenen Jahren wurden deshalb Studien zur Validierung von häufig kommerziell erhältlichen ER β -Antikörpern veröffentlicht (Andersson et al., 2017; Carder et al., 2005; Nelson et al., 2017; Skliris et al., 2002; Wu et al., 2012). Im Mittelpunkt standen hier unter anderem 14C8 von Abcam ab288 (Carder et al., 2005; Nelson et al., 2017) und GeneTex GTX70174 (Andersson et al., 2017, Skliris et al., 2002), PPG5/10 von Thermofisher MA1-81281 (Andersson et al., 2017; Nelson et al., 2017; Wu et al., 2012), DAKO M7292 (Andersson et al., 2017), BioRad MCA1974G1 (Andersson et al., 2017) und Serotec (Carder et al., 2005; Skliris et al., 2002), H150 von Santa Cruz Biotechnology sc-8974 (Andersson et al., 2017; Nelson et al., 2017). Diese ER β -Antikörper wurden auch oftmals in Publikationen zur Ermittlung des ER β -Status gynäkologischer Zelllinien eingesetzt. Publierte Detektionsergebnisse sind unter Evaluierung des verwendeten Antikörpers kritisch zu hinterfragen, da Validierungsstudien gängige ER β -Antikörper als ER β -unspezifisch nachweisen konnten.

Durch den Gesamt-ER β -Antikörper 14C8 ist zwar im Westernblot die Darstellung einer ER β 1-spezifischen Bande von 59-60 kDa möglich, jedoch zeigen Andersson et al. (2017) durch Immunopräzipitation und anschließender Massenspektrometrie (IP-MS), dass 14C8 anstelle von Gesamt-ER β vor allem das Protein POU2F1 (OCT1) bindet. Mit einem Molekulargewicht von 58,7 kDa ähnelt es ER β 1 deutlich.

PPG5/10 war bislang als ER β 1-spezifischer Antikörper erhältlich. Trotz zahlreich publizierter Westernblots mit PPG5/10, gilt der Antikörper für die Methode durch den Hersteller BioRad als nicht verifiziert (BioRad, 2024a). Auch Andersson et al. (2017) und Nelson et al. (2017) beweisen eine Detektion von 75-100 kDa Banden in positiv- und negativ-Kontrollen anstelle von 59 kDa Banden. Mittels IP-MS belegen Andersson et al.

(2017), dass PPG5/10 anstelle von ER β 1 eine Reihe nuklearer Proteine bindet, beispielsweise die Transkriptionsaktivatoren EWSR1 und YTHDF3.

Da ER β erst seit 1996 in seiner Funktion und Expression erforscht wird, handelt es sich um ein vergleichsweise junges Forschungsgebiet, weshalb auch ER β -Antikörper in ihrer Spezifität noch häufig kritisch zu betrachten sind. Isoform-spezifische Antikörper sind bislang weiterhin selten. Hier wurden ER β 1-spezifischer Antikörper ab187291 (Abcam) und Gesamt-ER β Antikörper orb33298 (Biorbyt) verwendet.

Es existieren widersprüchliche Publikationen zur Expression von ER β 1 und ER β 2 auf mRNA- und Proteinebenen in gynäkologischen Krebszellen.

In dieser Arbeit wurden die MC-Zellen MCF-7 und MDA-MB-231 als ER β 1-negativ auf Proteinebene detektiert, was durch Chan et al. (2014) und Nelson et al. (2017) bestätigt wird. Ursächlich für bisher konträre Veröffentlichungen zu beiden MC-Zelllinien ist die Verwendung von mittlerweile als ER β 1-unspezifisch validierten Antikörpern 14C8 (Song et al., 2019; Thomas et al., 2012) und PPG5/10 (Austin et al., 2018). Entsprechend dem negativen Detektionsergebnis dieser Arbeit, konnten auch Andersson et al. (2017) mit dem validierten Gesamt-ER β Antikörper PPZ0506 keine ER β 1-Expression durch Immunhistochemie in MC-Gewebe nachweisen. Weiter charakterisieren Al-Bader et al. (2011) MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen mittels H150 (sc-8974) als ER β 1-positiv. Der Antikörper wurde zwar im Rahmen der Validierungsstudie von Nelson et al. (2017) als ER β 1-spezifisch bewertet, das Detektionsergebnis sollte aber aufgrund folgender Punkte kritisch hinterfragt werden. Der veröffentlichte Westernblot von Al-Bader et al. (2011) lässt keine ER β 1-Detektion von 59 kDa nachvollziehen. Ursächlich ist ein falsch definiertes Molekulargewicht von 52-54 kDa. Allerdings muss hier berücksichtigt werden, dass in dem in der Studie eingesetzten Probenmaterial auch alternative Rezeptorvarianten mit leicht abweichendem Molekulargewicht exprimiert sein könnten. Weiter zeigen Chan et al. (2014) unter Verwendung des gleichen Antikörpers MCF-7 Zellen als ER β 1-negativ. H150 (sc-8974) ist seit 2016 nicht mehr erhältlich, weshalb publizierte Detektionsergebnisse nicht überprüfbar sind (Santa Cruz Biotechnology, 2024). Auch Ford et al. (2011) zeigen für beide MC-Zelllinien auf mRNA- und Proteinebene ein zu der vorliegenden Arbeit gegenteiliges Ergebnis für ER β 1, allerdings ohne konkrete Angabe von

Antikörperherkunft und -spezifität. Ebenso detektieren auch Fuqua et al. (1999) MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen als ER β 1-positiv. Hierfür wurde ein selbst hergestellter ER-spezifischer Antikörper eingesetzt. Die Überprüfung der Spezifität ist daher nicht möglich und ein Vergleich der Daten nur bedingt sinnvoll.

Beide MC-Zelllinien konnten in dieser Arbeit erstmalig auf Proteinebene als ER β 2-negativ gezeigt werden. Im Hinblick auf Publikationen, die ER β 1 und ER β 2 in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen auf mRNA Ebene nachweisen (Al-Bader et al., 2011; Tong et al., 2002; Zhao et al., 2003), ist festzuhalten, dass die Expression eines Rezeptors auf mRNA Ebene nicht direkt proportional zur Expression auf Proteinebene ist (Omoto et al., 2002). Ein fehlender Proteinnachweis trotz Anwesenheit von mRNA ist durch verschiedene post-transkriptionelle Regulationsmechanismen (Capping, Spleißen, Polyadenylierung) und mRNA Degradation (Deadenylierung) erklärbar (Bhagavan und Ha, 2015; Garneau et al., 2007). 60 % der Diskrepanzen zwischen mRNA- und Proteinebene sollen auf eine Kombination aus post-transkriptionellen Regulationsmechanismen und Messabweichungen zurückgehen (Vogel und Marcotte, 2012).

Ganz ähnlich werden auch die OC-Zelllinien OVCAR-3 und SKOV-3 bislang unter Verwendung der bereits als umstritten beschriebenen Antikörper 14C8 (Schüler-Toprak et al., 2017), PPG5/10 (Chan et al., 2017) und H150 (sc-8974) (Chan et al., 2014; Pinton et al., 2018) als ER β 1-positiv charakterisiert. Diese Arbeit konnte beiden Zelllinien einen ER β 1-negativen Status auf Proteinebene nachweisen, der bisherige Publikationen widerlegt. Ebenso konnte hier in OVCAR-3 und SKOV-3 Zellen kein ER β 2 detektiert werden. Dementgegen stehen Chan et al. (2017), die beide Zelllinien mittels ER β 2-Antikörper 57/3 als ER β 2-positiv zeigen. Der verwendete Antikörper vom Hersteller BioRad ist für Immunoblots nicht verifiziert, das Detektionsergebnis sollte deshalb hinterfragt werden (BioRad, 2024b).

Es existiert kaum Literatur zur Expression von ER β 1 und ER β 2 in der EC-Zelllinie MFE-296. Sasaki et al. (2001) und Qu. et al. (2019) zeigen die Zellen auf mRNA Ebene als ER β -positiv, nehmen allerdings keine Differenzierung der Isoformen vor. In dieser Arbeit wurde die Zelllinie erstmalig auf Proteinebene als ER β 1- und ER β 2-negativ

detektiert. Die Diskrepanz zwischen mRNA- und Proteinnachweis wird auch hier auf verschiedene post-transkriptionelle Regulationsmechanismen und mRNA-Degradation zurückgeführt (Bhagavan und Ha, 2015; Garneau et al., 2007).

Auch für die uLMS-Zelllinie SK-UT-1 gibt es keine Literatur zur ER β 1- und ER β 2-Expression. Bislang existiert nur eine Studie, die durch Immunhistochemie den ER β -Status im Probenmaterial von Patienten mit uLMS charakterisiert. Baek et al. (2018) zeigen mittels H150 (sc-8974) 100 % der 42 LMS-Proben als ER β -positiv, ohne Differenzierung der Isoformen. Wie bereits ausgeführt, ist die ER β -Spezifität von H150 (sc-8974) fraglich und auch nicht länger verifizierbar, da der Antikörper durch den Hersteller Santa Cruz Biotechnology nicht mehr vertrieben wird (Santa Cruz Biotechnology, 2024). In dieser Arbeit wurden die uLMS-Zellen als ER β 1- und ER β 2-negativ detektiert.

Verschiedene Publikationen weisen die MC- (Al-Bader et al., 2011; Austin et al., 2018; Lattrich et al., 2008; Tong et al., 2002; Zhao et al., 2003) und OC-Zelllinien (Lattrich et al., 2008; Treeck et al., 2007) auf mRNA Ebene als ER β 1- und ER β 2-positiv nach. In beiden Entitäten ist aber gegenüber gesundem Mamma- und Ovarialgewebe ein deutlicher Rückgang der Expression beider Isoformen zu erkennen, welcher zudem umgekehrt mit einer Hypermethylierung und resultierender Inaktivierung des ER β -Gen-Promotors korreliert (Suzuki et al., 2008; Zhao et al., 2003). ER β 1 wirkt in gesunden Zellen antiproliferativ, tumorsuppressiv und proapoptotisch, wohingegen die Isoform in Tumoren verringert bis gar nicht auf mRNA- und Proteinebene exprimiert wird. Ein Verlust von ER β 1 sollte hier also als Ursache der Karzinogenese in Betracht gezogen werden (Suzuki et al., 2008; Treeck et al., 2007; Zhao et al., 2003). Park et al. (2006) zeigen außerdem eine Assoziation zwischen dem Rückgang von ER β 2 mRNA und der Entwicklung von ER α -Brustkrebs. Eine verringerte Expression der Isoformen auf mRNA Ebene in den MC- und OC-Zelllinien würde in Zusammenschau von post-transkriptionellen Regulationsmechanismen und mRNA Degradation auch die Ergebnisse der niedrigen Proteinspiegel in der vorliegenden Arbeit erklären.

Veröffentlichungen zum Endometriumgewebe zeigen sich deutlich divergent im Hinblick auf einen Rückgang der ER β 1- und ER β 2-Expression auf mRNA Ebene in Tumoren. Auch diese Kontroverse wird vorwiegend auf Methodenvarianz und wenig spezifische ER β -Antikörper zurückgeführt (Häring et al., 2012).

Deutlich wird, die unklare Spezifität der ER β -Antikörper erschweren Untersuchungen und vor allem den Vergleich unterschiedlicher Studien. Nicht zuletzt spiegelt aber die komplexe Forschungslage auch die klinische Situation wieder, die sich durch sehr individuelle Tumore mit sehr heterogenen tumorbiologischen Charakteristika der Tumorzellen ähnlich vielschichtig darstellt. Eine systematische Evaluierung aller ER β -Antikörper ist daher dringend notwendig, umso mehr, da Analysen auf mRNA Ebene unter Umständen fragwürdig sind. Erst dann sind die ER β -Isoformen möglicherweise Biomarker für Diagnose, Prognose und/oder Therapieverlauf.

5.3 Antiproliferative Wirkung von Enzalutamid

Zentrales Thema dieser Arbeit war die antiproliferative Wirkung von Enz auf gynäkologische Tumorentitäten und konnte bisherige Publikationen bestätigen. Näher wurde hier zunächst die Konzentration für die halbmaximale Hemmung durch Enz ermittelt.

In Übereinstimmung mit der Literatur konnte in der vorliegenden Arbeit für die Zelllinie MDA-MB-231 mittels Proliferationskinetik eine IC₅₀ für Enz von 90 μ M nachgewiesen werden. Unter Einfluss von 0,05-100 μ M Enz untersuchten Caiazza et al. (2016) elf MC-Zelllinien und konnten für MDA-MB-231 Zellen eine halbmaximale Hemmung bei 100 μ M zeigen. Weiterhin wurde eine negative Korrelation zwischen der AR-Expression und dem Ansprechen auf Enz in TNBC-Zellen beschrieben. Im Hinblick auf die bereits ausgeführte MSL TNBC-Subtyp Klassifizierung der MDA-MB-231 Zelllinie (Lehmann et al., 2011) und der verhältnismäßig geringen AR-Expression (Caiazza et al., 2016; Hu et al., 2014), korreliert die hier bestimmte IC₅₀ von 90 μ M ebenfalls negativ mit dem detektierten Rezeptorstatus dieser Arbeit. Auch Liu et al. (2017) stellen mittels MTT-Vitalitäts-Assay bei 20 μ M Enz eine geringe Hemmung des Wachstums auf nur etwa 90 % der MDA-MB-231 Zellen dar. Dies ist außerdem konkordant mit dem Colony formation Assay

von Caiazza et al. (2016), die durch 10 μM Enz auch nur eine Wachstumshemmung von weniger als 5 % zeigen. Als ergänzende Methode konnte in dieser Arbeit mittels MTT-Vitalitäts-Assay eine IC_{50} von nur 34 μM für MDA-MB-231 Zellen nachgewiesen werden. Dies ist deutlich divergent zu der durch die Proliferationskinetik ermittelten halbmaximalen Hemmung. Barton et al. (2015) nennen zwar eine annähernd ähnliche IC_{50} von 10 μM für MDA-MB-231 Zellen, zeigen aber keine der dazu erhobenen Daten. Weiterhin beschreiben sie nach AR-Knockdown Änderungen der zellulären Morphologie der MDA-MB-231 Zelllinie. Demnach wären physiologische Änderungen der Zellen auch unter dem AR-Antagonisten Enz denkbar und könnten ein verändertes Ansprechen und eine dadurch abweichende IC_{50} mittels MTT-Vitalitäts-Assay erklären.

Bei der getesteten MC-Zelllinie MCF-7 entsprachen die MTT-Vitalitäts-Assay Daten jedoch recht genau den Ergebnissen, die mittels Lebendzellzahlbestimmung erhoben wurden. In dieser Arbeit konnte erstmalig mittels Proliferationskinetik eine IC_{50} von 80 μM für MCF-7 Zellen nachgewiesen und durch den MTT-Vitalitäts-Assay mit 85 μM bestätigt werden. Bisherige Publikationen zur Wachstumshemmung von MCF-7 Zellen unter Einfluss von 10-20 μM Enz waren im Hinblick auf die statistisch signifikante Abweichung von der Kontrollreihe untereinander und zu dieser Arbeit divergent (Cochrane et al., 2014; D'Amato et al., 2016). Dies beruht nicht zuletzt auf bestehender Methodenvarianz.

Im Bereich der Forschung zur halbmaximalen Hemmung des Wachstums der OC-Zelllinie OVCAR-3 mit Enz existieren widersprüchliche Studien. Burney et al. (2017) zeigen mittels MTT-Vitalitäts-Assay eine IC_{50} von 197,4 μM und Grisham et al. (2014) beschreiben eine IC_{50} von 25 nM. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig eine annähernd identische halbmaximale Hemmung für OVCAR-3 Zellen durch zwei unabhängige Methoden belegt werden. Durch Proliferationskinetik wurde eine IC_{50} von 100 μM und mittels MTT-Vitalitäts-Assay eine IC_{50} von 92 μM ermittelt.

Für die Zelllinie SKOV-3 konnte hier in Übereinstimmung mit der von Burney et al. (2017) durch den MTT-Vitalitäts-Assay bestimmten IC_{50} von 103,8 μM eine gleichartige halbmaximale Hemmung bei 90 μM mittels Proliferationskinetik gezeigt werden. Weiterhin wurde in dieser Arbeit ebenfalls mittels MTT-Vitalitäts-Assay eine IC_{50} von nur 50 μM Enz für SKOV-3 Zellen erhoben. Unterschiede in der methodischen Durchführung des MTT-

Vitalitäts-Assays sind vermutlich ursächlich für die in dieser Arbeit von Burney et al. (2017) abweichenden Werte zur halbmaximalen Hemmung.

Manning-Geist et al. (2022) sprachen sich im Rahmen einer Phase II Studie für den Einsatz des AR-Inhibitor Enz bei ausgewählten Patientinnen mit rezidiviertem OC aus. Die Studie fällt mit einer Overall Response Rate von 1,7 % in Hinblick auf Enz als alternatives Therapeutikum für OC negativ aus. Nicht zuletzt korreliert dies nicht unwesentlich mit der geringen Fallzahl von nur 59 eingeschlossenen Patienten und sollte deshalb zurückhaltend beurteilt werden. Möglicherweise profitieren auch nur bestimmte molekulare OC Subtypen von Enz, die erst identifiziert werden müssen. In dieser Arbeit konnte ein antiproliferativer Effekt von Enz auf AR- und ER α -positive OC Zelllinien gezeigt werden.

Für die EC- und uLMS-Zelllinien MFE-296 und SK-UT-1 existieren keine Publikationen auf dem Gebiet der Wirkung von Enz. In dieser Arbeit konnte erstmalig mittels Proliferationskinetik eine IC₅₀ von 60 μ M für beide Zelllinien gezeigt werden. Durch den MTT-Vitalitäts-Assay wurde SK-UT-1 Zellen eine annähernd ähnliche IC₅₀ von 40 μ M nachgewiesen, für MFE-296 Zellen belief sich die halbmaximale Hemmung durch die zweite Methode nur auf 28 μ M.

Die Tatsache, dass sich die erhobenen IC₅₀ Werte mittels MTT-Vitalitäts-Assay zuweilen von denen mittels Lebendzellzahlbestimmung unterscheiden, lässt sich durch die Methodik begründen. Der MTT-Vitalitäts-Assay gibt die Biomasse der Zellen nur indirekt wieder und eine Beeinflussung der physiologischen Prozesse durch den Wirkstoff ist nicht auszuschließen. Die Proliferationskinetiken beruhen hingegen auf einer direkten Zählung der lebenden Zellen und sollten dadurch im Vergleich stärker gewichtet werden.

5.4 Einfluss von Enzalutamid auf die Expression von AR und ER α

Neben der antiproliferativen Wirkweise von Enz wird in aktuellen Studien ein negativer Einfluss auf die AR-Expression beschrieben (Abazid et al., 2019; Cochrane et al., 2014). Weiterhin demonstrieren Abazid et al. (2019) an PC-Zellen LNCaP (AR-positiv) und PC-3 (AR-negativ), dass eine Zellwachstumsreduktion unter Einfluss von Enz zuweilen unabhängig von der AR-Expression besteht und auch ER-Isoformen gehemmt werden

können. In dieser Arbeit wurde die AR- und ER α -Expression unter Enz in gynäkologischen Tumorentitäten untersucht und bestätigt bisherige Publikationen.

Cochrane et al. (2014) beschreiben für die MC-Zellen MCF-7 eine reduzierte ligandenabhängige Stabilität des AR unter Einfluss von 10 μ M Enz nach 48 h. Übereinstimmend konnte in dieser Arbeit bei 80 μ M Enz sogar eine deutliche Reduktion der AR-Expression für MCF-7 Zellen dargestellt werden. Gleiches zeigte sich auch für die EC-Zelllinie MFE-296 unter Einfluss von 60 μ M Enz.

Abazid et al. (2019) beschreiben für PC-Zellen einen negativen Einfluss von Enz auf die ER β 1-Expression. Aufgrund des ER β 1-negativen Status aller untersuchten Zelllinien dieser Arbeit, konnte der Einfluss von Enz auf die ER β 1-Expression für gynäkologische Tumorentitäten hier nicht näher untersucht werden. Gleiches gilt für die Expression von ER β 2.

Gleichwohl zeigte sich in dieser Arbeit erstmalig ein deutlicher Einfluss von Enz auf die ER α -Expression. Für MCF-7 Zellen konnte unter 80 μ M Enz ein signifikanter Rückgang der ER α -Expression beschrieben werden. Ähnliches stellte sich auch bei den OC-Zelllinien SKOV-3 und OVCAR-3 dar. OVCAR-3 Zellen zeigten nach 72 h einen Anstieg des Steroidrezeptors zurück auf die Kontrollhöhe.

In der Behandlung von PC mit Enz können primäre und erworbene Resistenzen gegenüber dem Wirkstoff auftreten, für die sich in der Literatur verschiedene, zumeist AR-assoziierte Erklärungsansätze finden (Buttigliero et al., 2015). Blatt und Raj (2019) beschreiben in einer Übersichtsarbeit eine Modulation von AR-Cofaktoren durch Enz, wodurch eine veränderte Expression von AR-Co-Aktivatoren und -Repressoren die anti-proliferative Wirkung von Enz umgehen könnte. Eine direkte Beeinflussung von Cofaktoren durch Enz ist auch in Bezug auf das hier dargestellte ER α -Expressionsverhalten der OC-Zelllinie OVCAR-3 unter Einfluss des Wirkstoffes denkbar. Beispielsweise steigern die Co-Aktivatoren p44/Mep50/WDR77 die Transkriptionsaktivität von AR und ER α in OC, die Funktion von p44 ist außerdem ER α -abhängig gesteuert (Ligr et al., 2011).

Eine ähnliche ER α -Expression unter Enz zeigte sich für die EC-Zelllinie MFE-296. Nach einem ebenfalls initialen Rückgang, stieg die ER α -Expression der MFE-296 Zellen im Verlauf sogar signifikant über die Kontrollhöhe an. In diesem Bereich der Forschung existiert bislang nur eine Publikation. Koivisto et al. (2020) untersuchten über 8-16 Wochen in Typ 1 EC von Mäusen, die Wirkung von Enz auf die Expression von ER α , GR und PR. Die ER α -Expression blieb innerhalb der ersten 8 Wochen unter Enz unverändert und zeigte nach 16 Wochen einen moderaten Rückgang. Begründet wird die späte ER α -Suppression mit einer Resistenzbildung gegenüber Enz. MFE-296 Zellen werden als Typ 1 EC klassifiziert (Qu et al., 2019). Damit steht das Ergebnis der vorliegenden Arbeit vermeintlich im Widerspruch zur Literatur. Zu berücksichtigen ist hier allerdings, dass die Typ 1 Klassifikation mehrere EC-Zelllinien umfasst und diese im Steroidrezeptorstatus sowie dem tumorerregenden Potenzial deutlich voneinander abweichen (Qu et al., 2019). Nicht zuletzt sind Daten aus Tiermodellen nicht in jedem Fall auf Menschen übertragbar.

Abweichend zu anderen in dieser Arbeit untersuchten gynäkologischen Zelllinien, wurde für SK-UT-1 Zellen weder eine AR- noch ER α -Expression nachgewiesen. Dennoch konnte unter Einfluss von Enz eine signifikante Zellwachstumsreduktion der uLMS-Zelllinie dargestellt werden. Denkbar ist hier ein Wirkmechanismus über einen anderen, hier nicht analysierten Steroidrezeptor, beispielsweise PR, welcher in einer Studie von Baek et al. (2018) in 47,6 % der uLMS-Proben nachgewiesen werden konnte. Ähnliches zeigen Abazid et al. (2019), denn auch hier war der antiproliferative Effekt von Enz auf AR- und ER α -negative PC-Zellen der Zelllinie PC-3 nachweisbar. Als ursächlich wurde u.a. eine unter Einfluss des Wirkstoffs verminderte Expression des Hitzeschockproteins HSP27 postuliert, welche die Zellintegrität und -motilität reduziert.

6. Zusammenfassung

Als große klinische Herausforderung in der Behandlung gynäkologischer Tumore zeigt sich de-novo oder im Therapieverlauf erworbene Chemoresistenz. Diese kann durch neue Therapieansätze überwunden werden. Ein prominenter Vertreter zielgerichteter Therapien findet sich mit Enzalutamid in der Behandlung von Prostatakarzinomen. Enzalutamid ist ein direkter AR-Antagonist, der die Translokation des Steroidrezeptors in den Nukleus, die Bindung an DNA und Cofaktoren und damit resultierende Transkriptionsaktivität blockiert. Bisherige Publikationen weisen allerdings daraufhin, dass die antiproliferative Wirkung von Enzalutamid nicht ausschließlich AR-spezifisch ist, sondern auch ER-Isoformen gehemmt werden können. In dieser Arbeit wurde der Einfluss von Enzalutamid auf die vier gynäkologische Tumorentitäten Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinom sowie das uterine Leiomyosarkom untersucht.

Der antiproliferative Wirkmechanismus konnte für alle Zelllinien bestätigt und die mittlere inhibitorische Konzentration von Enzalutamid durch zwei unabhängige Methoden erhoben werden (Tab. 13). Neben der antiproliferativen Wirkung von Enzalutamid wird in aktuellen Studien ein negativer Einfluss auf die AR- und ER β 1-Expression beschrieben. Die AR-Suppression unter Enzalutamid konnte auch in der vorliegenden Arbeit für MCF-7 und MFE-296 Zellen gezeigt werden (Tab. 13). Bei ER β 1- und ER β 2-negativem Status aller untersuchten Zelllinien konnte der Einfluss von Enzalutamid auf die ER β -Isoformen für gynäkologische Tumorentitäten nicht näher untersucht werden. Es konnte erstmalig ein Einfluss von Enzalutamid auf die ER α -Expression nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine ER α -Suppression in MCF-7, SKOV-3 und OVCAR-3 Zellen (Tab. 13). OVCAR-3 Zellen zeigten nach 72 h einen Anstieg des Steroidrezeptors zurück auf die Kontrollhöhe. In MFE-296 Zellen kam es nach initialem Rückgang sogar zu einer vermehrten ER α -Expression. Trotz AR- und ER α -negativen Status konnte unter Einfluss von Enzalutamid eine signifikante Zellwachstumsreduktion der SK-UT-1 Zelllinie gezeigt werden. Denkbar ist hier eine Signalkaskade über einen anderen, hier nicht analysierten Steroidrezeptor.

Enzalutamid scheint entsprechend geeignet zur Therapie von Mamma-, Ovarial- und Endometriumkarzinomen sowie von uterinen Leiomyosarkomen. Hierbei kann die Expression von AR und ER moduliert werden, dies scheint jedoch keine Voraussetzung für die antiproliferative Wirkung des Therapeutikums zu sein.

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Modell der AR Signalkaskade (A) unter Einfluss von Enz (B) modifiziert nach Linder et al. (2019)	12
Abbildung 2:	Bestimmung der zelllinienspezifischen IC_{50} mittels MTT-Vitalitäts-Assay anhand der Zellvitalität unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Enz nach 120 h	30
Abbildung 3:	Bestimmung der zelllinienspezifischen IC_{50} mittels CASY Modell TT Cell Counter and Analyzer anhand der Zellzahl unter Einfluss von verschiedenen Konzentrationen von Enz nach 120 h	32
Abbildung 4:	Bestimmung der zelllinienspezifischen Basalexpression von AR, ER_{α} , $ER_{\beta 1}$ und $ER_{\beta 2}$ mittels Westernblot	33
Abbildung 5:	Analyse der Expression von AR mittels Westernblot in den Zelllinien MCF-7 und MFE-296 unter Einfluss von Enz	34
Abbildung 6:	Analyse der Expression von ER_{α} mittels Westernblot in den Zelllinien MCF-7, MFE-296, OVCAR-3 und SKOV-3 unter Einfluss von Enz	36

8. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Verwendete Geräte und Hersteller	14
Tabelle 2:	Verwendete Hilfsmittel und Hersteller	16
Tabelle 3:	Verwendete Verbrauchsmaterialien und Hersteller	17
Tabelle 4:	Verwendete Chemikalien und kommerzielle Lösungen und Hersteller	18
Tabelle 5:	Verwendete Puffer und Lösungen und Hersteller	19
Tabelle 6:	Verwendete Primäantikörper und Hersteller	20
Tabelle 7:	Verwendete Sekundäantikörper und Hersteller	21
Tabelle 8:	Verwendete Zelllinien, Zellkulturmedien und Hersteller	21
Tabelle 9:	Verwendetes Chemotherapeutikum und Hersteller	22
Tabelle 10:	Verwendete Software und Hersteller	22
Tabelle 11:	Methoden- und zelllinienspezifische Zellzahlen	25
Tabelle 12:	Herstellung eines Polyacrylamid-Gels	27
Tabelle 13:	Zelllinienspezifischer Einfluss von Enz auf Proliferation und Expression von AR, ER α , ER β 1, ER β 2	37

9. Literaturverzeichnis

Aabo K, Adams M, Adnitt P, Alberts DS, Athanazziou A, Barley V, Bell DR, Bianchi U, Bolis G, Brady MF, Brodovsky HS, Bruckner H, Buyse M, Canetta R, Chylak V, Cohen CJ, Colombo N, Conte PF, Crowther D, Edmonson JH, Gennatas C, Gilbey E, Gore M, Guthrie D, Kaye SB, Laing AH, Landoni F, Leonard RC, Lewis C, Liu PY, Mangioni C, Marsoni S, Meerpohl H, Omura GA, Parmar MKB, Pater J, Pecorelli S, Presti M, Sauerbrei W, Skarlos DV, Smalley RV, Solomon HJ, Stewart LA, Sturgeon JFG, Tattersall MHN, Wharton JT, ten Bokkel Huinink WW, Tomirotti M, Torri W, Trope C, Turbow MM, Vermorken JB, Webb MJ, Wilbur DW, Williams CJ, Wiltshaw E, Yeap BY. Chemotherapy in advanced ovarian cancer: four systematic meta-analyses of individual patient data from 37 randomized trials. *Br J Cancer* 1998; 78: 1479-1487

Abazid A, Martin B, Choinowski A, McNeill RV, Brandenburg LO, Ziegler P, Zimmermann U, Burchardt M, Erb H, Stope MB. The androgen receptor antagonist enzalutamide induces apoptosis, dysregulates the heat shock protein system, and diminishes the androgen receptor and estrogen receptor β 1 expression in prostate cancer cells. *J Cell Biochem* 2019; 120: 16711-16722

Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, Iyibozkurt CA, Topuz S, Tuzlali S, Bengisu E, Berkman S. The expression of Ki-67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in uterine leiomyosarcomas: a clinicopathologic study. *Gynecol Oncol* 2005; 99: 36-42

Al-Bader M, Ford C, Al-Ayadhy B, Francis I. Analysis of estrogen receptor isoforms and variants in breast cancer cell lines. *Exp Ther Med* 2011; 2: 537-544

Andersson S, Sundberg M, Pristovsek N, Ibrahim A, Jonsson P, Katona B, Clausson CM, Zieba A, Ramström M, Söderberg O, Williams C, Asplund A. Insufficient antibody validation challenges oestrogen receptor beta research. *Nat Commun* 2017; 8: 1-12

Austin D, Hamilton N, Elshimali Y, Pietras R, Wu Y, Vadgama J. Estrogen receptor-beta is a potential target for triple negative breast cancer treatment. *Oncotarget* 2018; 9: 33912-33930

AWMF Leitlinien-Register, 2021: S2k-Leitlinie Uterine Sarkome (Version 3.0). <https://register.awmf.org/de/leitlinien/detail/015-074> (Zugriffdatum: 16.01.2024)

Baek MH, Park JY, Park Y, Kim KR, Kim DY, Suh DS, Kim JH, Kim YM, Kim YT, Nam JH. Androgen receptor as a prognostic biomarker and therapeutic target in uterine leiomyosarcoma. *J Gynecol Oncol* 2018; 29: 1-11

Barton VN, D'Amato NC, Gordon MA, Lind HT, Spoelstra NS, Babbs BL, Heinz RE, Elias A, Jedlicka P, Jacobsen BM, Richer JK. Multiple molecular subtypes of triple-negative breast cancer critically rely on androgen receptor and respond to enzalutamide in vivo. *Mol Cancer Ther* 2015; 14: 769-778

Bhagavan NV, Ha CE. Regulation of Gene Expression. In: Academic Press, Hrsg. *Essentials of medical biochemistry*. San Diego: Academic Press, 2015: 447-464

Bircan S, Ensari A, Ozturk S, Erdogan N, Dundar I, Ortac F. Immunohistochemical analysis of c-myc, c-jun and estrogen receptor in normal, hyperplastic and neoplastic endometrium. *Pathol Oncol Res* 2005; 11: 32-39

BioRad, 2024a: Estrogen receptor beta 1 antibody PPG5/10. https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/human-estrogen-receptor-beta-1-antibody-ppg5-10-mca1974.html?f=purified&JSESSIONID_STERLING=361828541A4C0AD58E6BA8CDB12119D9.ecommerce1&JSESSIONID=4AC734C12D8F79524CDBA034CD5E0A8F.lids-e1c&evCntryLang=DE-de&cntry=DE&thirdPartyCookieEnabled=true (Zugriffdatum: 19.01.2024)

BioRad, 2024b: Estrogen receptor beta 2 antibody 57/3. https://www.bio-rad-antibodies.com/monoclonal/human-estrogen-receptor-beta-2-antibody-57-3-mca2279.html?f=purified&JSESSIONID_STERLING=867253A030F1CBAF74C209483A56CE55.ecommerce2&evCntryLang=CH-en&EU_COOKIE_PREFS=000&cntry=CH&thirdPartyCookieEnabled=true
(Zugriffsdatum: 19.01.2024)

Blatt EB, Raj GV. Molecular mechanisms of enzalutamide resistance in prostate cancer. *Cancer Drug Resist* 2019; 2: 189-197

Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K, Mayerhofer K. Estrogen and progesterone receptor expression in patients with uterine smooth muscle tumors. *Fertil Steril* 2004; 81: 1062-1066

Burney MN, Goradia R, Gaikwad A, Buleyeva N, Nugent EK, Smith JA. Pre-clinical evaluation of androgen receptor inhibitor enzalutamide for prevention of recurrent ovarian tumor growth. *J Cancer Ther Sci* 2017; 1: 1-5

Buttigliero C, Tucci M, Bertaglia V, Vignani F, Bironzo P, Di Maio M, Scagliotti GV. Understanding and overcoming the mechanisms of primary and acquired resistance to abiraterone and enzalutamide in castration resistant prostate cancer. *Cancer Treat Rev* 2015; 41: 884-892

Caiazza F, Murray A, Madden SF, Synnott NC, Ryan EJ, O'Donovan N, Crown J, Duffy MJ. Preclinical evaluation of the AR inhibitor enzalutamide in triple-negative breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2016; 23: 323-334

Carder PJ, Murphy CE, Dervan P, Kennedy M, McCann A, Saunders PTK, Shaaban AM, Foster CS, Witton CJ, Bartlett JMS, Walker RA, Speirs V. A multi-centre investigation towards reaching a consensus on the immunohistochemical detection of ER β in archival formalin-fixed paraffin embedded human breast tissue. *Breast Cancer Res Treat* 2005; 92: 287-293

Chan KKL, Leung THY, Chan DW, Wei N, Lau GTY, Liu SS, Siu MKY, Ngan HYS. Targeting estrogen receptor subtypes (ER α and ER β) with selective ER modulators in ovarian cancer. *J Endocrinol* 2014; 221: 325-336

Chan KKL, Siu MKY, Jiang YX, Wang JJ, Wang Y, Leung THY, Liu SS, Cheung ANY, Ngan HYS. Differential expression of estrogen receptor subtypes and variants in ovarian cancer: effects on cell invasion, proliferation and prognosis. *BMC Cancer* 2017; 17: 1-11

Chao KC, Wang PH, Chang CC, Yen MS, Chi CW. The role of estrogen in the survival of ovarian tumors - a study of the human ovarian adenocarcinoma cell lines OC-117-VGH and OVCAR3. *J Chin Med Assoc* 2013; 76: 63-70

Cochrane DR, Bernales S, Jacobsen BM, Cittelly DM, Howe EN, D'Amato NC, Spoelstra NS, Edgerton SM, Jean A, Guerrero J, Gómez F, Medicherla S, Alfaro IE, McCullagh E, Jedlicka P, Torkko KC, Thor AD, Elias AD, Protter AA, Richer JK. Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. *Breast Cancer Res* 2014; 16: 1-19

D'Amato NC, Gordon MA, Babbs B, Spoelstra NS, Butterfield KTC, Torkko KC, Phan VT, Barton VN, Rogers TJ, Sartorius CA, Elias A, Gertz J, Jacobsen BM, Richer JK. Cooperative dynamics of AR and ER activity in breast cancer. *Mol Cancer Res* 2016; 14: 1054-1067

De Carvalho Fischer C, Hu Y, Morreale M, Lin WY, Wali A, Thakar M, Karunasena E, Sen R, Cai Y, Murphy L, Zahnow CA, Keer H, Thakar M, Ahuja N. Treatment with epigenetic agents profoundly inhibits tumor growth in leiomyosarcoma. *Oncotarget* 2018; 9: 19379-19395

Esquenet M, Swinnen JV, Heyns W, Verhoeven G. LNCaP prostatic adenocarcinoma cells derived from low and high passage numbers display divergent responses not only to androgens but also to retinoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997; 62: 391-399

Evangelou A, Jindal SK, Brown TJ, Letarte M. Down-regulation of transforming growth factor β receptors by androgen in ovarian cancer cells. *Cancer Res* 2000; 60: 929-935

Ford CHJ, Al-Bader M, Al-Ayadhi B, Francis I. Reassessment of estrogen receptor expression in human breast cancer cell lines. *Anticancer Res* 2011; 31: 521-527

Fuqua SAW, Schiff R, Parra I, Friedrichs WE, Su JL, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Willson TM, Moore JT. Expression of wild-type estrogen receptor β and variant isoforms in human breast cancer. *Cancer Res* 1999; 59: 5425-5428

Garneau NL, Wilusz J, Wilusz CJ. The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; 8: 113-126

George S, Feng Y, Manola J, Nucci MR, Butrynski JE, Morgan JA, Ramaiya N, Quek R, Penson RT, Wagner AJ, Harmon D, Demetri GD, Krasner C. Phase 2 trial of aromatase inhibition with letrozole in patients with uterine leiomyosarcomas expressing estrogen and/or progesterone receptors. *Cancer* 2014; 120: 738-743

Grisham RN, Thapi D, Berman T, De Stanchina E, Zhou Q, Iasonos A, Iyer G, Aghajanian C, Spriggs DR. Effect of enzalutamide (Enza) on androgen receptor (AR) positive (+) ovarian cancer. *J Clin Oncol* 2014; 32: e16535-e16535

Hackenberg R, Beck S, Filmer A, Hushmand Nia A, Kunzmann R, Koch M, Slater EP, Schulz KD. Androgen responsiveness of the new human endometrial cancer cell line MFE-296. *Int J Cancer* 1994; 57: 117-122

Hackenberg R, Hawighorst T, Hild F, Schulz KD. Establishment of new epithelial carcinoma cell lines by blocking monolayer formation. *J Cancer Res Clin Oncol* 1997; 123: 669-673

Hanekamp EE, Gielen SCJP, Smid-Koopman E, Kühne LCM, De Ruiter PE, Chadha-Ajwani S, Brinkmann AO, Grootegoed JA, Burger CW, Huikeshoven FJ, Blok LJ. Consequences of loss of progesterone receptor expression in development of invasive endometrial cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9: 4190-4199

Häring J, Schüler S, Lattrich C, Ortmann O, Treeck O. Role of estrogen receptor β in gynecological cancer. *Gynecol Oncol* 2012; 127: 673-676

Hashmi AA, Hussain ZF, Amna Qadri A, Irfan M, Ramzan S, Faridi N, Khan A, Edhi MM. Androgen receptor expression in endometrial carcinoma and its correlation with clinicopathologic features. *BMC Res Notes* 2018; 11: 1-5

Hashmi AA, Iftikhar SN, Ali J, Shaheen F, Afroze F, Imran A. Morphological spectrum and pathological parameters of type 2 endometrial carcinoma: a comparison with type 1 endometrial cancers. *Cureus* 2020; 12: 1-10

Hayashi SI, Eguchi H, Tanimoto K, Yoshida T, Omoto Y, Inoue A, Yosida N, Yamaguchi Y. The expression and function of estrogen receptor α and β in human breast cancer and its clinical application. *Endocr Relat Cancer* 2003; 10: 193-202

Hou YF, Yuan ST, Li HC, Wu J, Lu JS, Liu G, Lu LJ, Shen ZZ, Ding J, Shao ZM. ER β exerts multiple stimulative effects on human breast carcinoma cells. *Oncogene* 2004; 23: 5799-5806

Hu DG, Hickey TE, Irvine C, Wijayakumara DD, Lu L, Tilley WD, Selth LA, Mackenzie PI. Identification of androgen receptor splice variant transcripts in breast cancer cell lines and human tissues. *Horm Canc* 2014; 5: 61-71

Hua W, Christianson T, Rougeot C, Rochefort H, Clinton GM. SKOV3 ovarian carcinoma cells have functional estrogen receptor but are growth-resistant to estrogen and antiestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 55: 279-289

Ito K, Suzuki T, Akahira J, Moriya T, Kaneko C, Utsunomiya H, Yaegashi N, Okamura K, Sasano H. Expression of androgen receptor and 5 α -reductases in the human normal endometrium and its disorders. *Int J Cancer* 2002; 99: 652-657

Johnston SR, Sacconi-Jotti G, Smith IE, Salter J, Newby J, Coppen M, Ebbs SR, Dowsett M. Changes in estrogen receptor, progesterone receptor, and pS2 expression in tamoxifen-resistant human breast cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3331-3338

Jonsson P, Katchy A, Williams C. Support of a bi-faceted role of estrogen receptor β (ER β) in ER α -positive breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer* 2014; 21: 143-160

Kamal AM, Bulmer JN, DeCruze SB, Stringfellow HF, Martin-Hirsch P, Hapangama DK. Androgen receptors are acquired by healthy postmenopausal endometrial epithelium and their subsequent loss in endometrial cancer is associated with poor survival. *Br J Cancer* 2016; 114: 688-696

Kao J, Salari K, Bocanegra M, Choi YL, Girard L, Gandhi J, Kwei KA, Hernandez-Boussard T, Wang P, Gazdar AF, Minna JD, Pollack JR. Molecular profiling of breast cancer cell lines defines relevant tumor models and provides a resource for cancer gene discovery. *PLoS One* 2009; 4: 1-16

Kavlashvili T, Jia Y, Dai D, Meng X, Thiel KW, Leslie KK, Yang S. Inverse relationship between progesterone receptor and myc in endometrial cancer. *PLoS One* 2016; 11: 1-14

Koivisto CS, Parrish M, Bonala SB, Ngoi S, Torres A, Gallagher J, Sanchez-Hodge R, Zeinner V, Nahhas GJ, Liu B, Cohn DE, Backes FJ, Goodfellow PJ, Chamberlin HM, Leone G. Evaluating the efficacy of enzalutamide and the development of resistance in a preclinical mouse model of type-I endometrial carcinoma. *Neoplasia* 2020; 22: 484-496

Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto AM, Leminen A. Immunohistochemical studies on uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma, and endometrial stromal sarcoma: expression and prognostic importance of ten different markers. *Tumor Biol* 2011; 32: 451-459

Kowalczyk W, Waliszczak G, Jach R, Dulińska-Litewka J. Steroid receptors in breast cancer: understanding of molecular function as a basis for effective therapy development. *Cancers (Basel)* 2021; 13: 1-35

Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JÅ. Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 5925-5930

Latrich C, Juhasz-Boess I, Ortmann O, Treck O. Detection of an elevated HER2 expression in MCF-7 breast cancer cells overexpressing estrogen receptor β 1. *Oncol Rep* 2008; 19: 811-817

Lau KM, Mok SC, Ho SM. Expression of human estrogen receptor- α and - β , progesterone receptor, and androgen receptor mRNA in normal and malignant ovarian epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96: 5722-5727

Lee P, Rosen DG, Zhu C, Silva EG, Liu J. Expression of progesterone receptor is a favorable prognostic marker in ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2005; 96: 671-677

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, Pietenpol JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J Clin Invest* 2011; 121: 2750-2767

Leitao MM, Soslow RA, Nonaka D, Olshen AB, Aghajanian C, Sabbatini P, Dupont J, Hensley M, Sonoda Y, Barakat RR, Anderson S. Tissue microarray immunohistochemical expression of estrogen, progesterone, and androgen receptors in uterine leiomyomata and leiomyosarcoma. *Cancer* 2004; 101: 1455-1462

Leitao MM, Hensley ML, Barakat RR, Aghajanian C, Gardner GJ, Jewell EL, O'Cearbhaill R, Soslow RA. Immunohistochemical expression of estrogen and progesterone receptors and outcomes in patients with newly diagnosed uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol* 2012; 124: 558-562

Leitlinienprogramm Onkologie, 2021a: S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms (Version 4.4). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/mammakarzinom/> (Zugriffsdatum: 15.01.2024)

Leitlinienprogramm Onkologie, 2021b: S3-Leitlinie Prostatakarzinom (Version 6.2). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/prostatakarzinom/> (Zugriffsdatum: 16.01.2024)

Leitlinienprogramm Onkologie, 2022a: S3-Leitlinie Diagnostik, Therapie und Nachsorge maligner Ovarialtumoren (Version 5.1). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/ovarialkarzinom/> (Zugriffsdatum: 15.01.2024)

Leitlinienprogramm Onkologie, 2022b: S3-Leitlinie Endometriumkarzinom (Version 2.0). <https://www.leitlinienprogramm-onkologie.de/leitlinien/endometriumkarzinom/> (Zugriffsdatum: 16.01.2024)

Leung YK, Mak P, Hassan S, Ho SM. Estrogen receptor (ER)- β isoforms: a key to understanding ER- β signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 13162-13167

Leygue E, Murphy LC. A bi-faceted role of estrogen receptor β in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 2013; 20: R127-R139

Ligr M, Patwa RR, Daniels G, Pan L, Wu X, Yirong Li Y, Tian L, Wang Z, Xu R, Wu J, Chen F, Liu J, Wei JJ, Lee P. Expression and function of androgen receptor coactivator p44/Mep50/WDR77 in ovarian cancer. *PLoS One* 2011; 6: 1-10

Limaye S, Kumar P, Pragya R, Sambath J, Patil D, Srinivasan A, Apurva S, Srivastava N, Patil S, Patil R, Datta V, Akolkar D, Datar R. A case report of androgen receptor inhibitor therapy in recurrent high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget* 2020; 11: 4358-4363

Linder S, Van der Poel HG, Bergman AM, Zwart W, Prekovic S. Enzalutamide therapy for advanced prostate cancer: efficacy, resistance and beyond. *Endocr Relat Cancer* 2019; 26: R31-R52

Liu CY, Lau KY, Hsu CC, Chen JL, Lee CH, Huang TT, Chen YT, Huang CT, Lin PH, Tseng LM. Combination of palbociclib with enzalutamide shows in vitro activity in RB proficient and androgen receptor positive triple negative breast cancer cells. *PLoS One* 2017; 12: 1-14

Manning-Geist BL, Gordhandas SB, Giri DD, Iasonos A, Zhou Q, Girshman J, O'Ceirbhail RE, Zamarin D, Lichtman SM, Sabbatini PJ, Tew WP, Li K, McDonnell AS, Aviki EM, Chi DS, Aghajanian CA, Grisham RN. Phase II study of enzalutamide in androgen receptor positive, recurrent, high- and low-grade serous ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2022; 164: 12-17

Mohamed A, Krajewski K, Cakar B, Ma CX. Targeted therapy for breast cancer. *Am J Pathol* 2013; 183: 1096-1112

Moinfar F, Okcu M, Tsybrovskyy O, Regitnig P, Lax SF, Weybora W, Ratschek M, Tavassoli FA, Denk H. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas. *Cancer* 2003; 98: 703-711

Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, Su JL, Klierer SA, Lehmann JM, Willson TM. Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 247: 75-78

Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER β identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996; 392: 49-53

Nelson AW, Groen AJ, Miller JL, Warren AY, Holmes KA, Tarulli GA, Tilley WD, Katzenellenbogen BS, Hawse JR, Gnanapragasam VJ, Carroll JS. Comprehensive assessment of estrogen receptor beta antibodies in cancer cell line models and tissue reveals critical limitations in reagent specificity. *Mol Cell Endocrinol* 2017; 440: 138-150

Niemeier LA, Dabbs DJ, Beriwal S, Striebel JM, Bhargava R. Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation. *Mod Pathol* 2010; 23: 205-212

O'Donnell AJM, Macleod KG, Burns DJ, Smyth JF, Langdon SP. Estrogen receptor- α mediates gene expression changes and growth response in ovarian cancer cells exposed to estrogen. *Endocr Relat Cancer* 2005; 12: 851-866

Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, Muramatsu M. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 3505-3512

Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, Ogawa S, Toyama T, Yamashita H, Muramatsu M, Gustafsson JÅ, Iwase H. Evaluation of oestrogen receptor β wild-type and variant protein expression and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Eur J Cancer* 2002; 38: 380-386

Park BW, Kim KS, Heo MK, Yang WI, Kim SI, Kim JH, Kim GE, Lee KS. The changes of estrogen receptor- β variants expression in breast carcinogenesis: decrease of estrogen receptor- β 2 expression is the key event in breast cancer development. *J Surg Oncol* 2006; 93: 504-510

Park BY, Grisham RN, Den Hollander B, Thapi D, Berman T, De Stanchina E, Zhou Q, Iyer G, Aghajanian C, Spriggs DR. Tumor inhibition by enzalutamide in a xenograft model of ovarian cancer. *Cancer Invest* 2016; 34: 517-520

Park S, Koo J, Park HS, Kim JH, Choi SY, Lee JH, Park BW, Lee KS. Expression of androgen receptors in primary breast cancer. *Ann Oncol* 2010; 21: 488-492

Paruthiyil S, Parmar H, Kerekatte V, Cunha GR, Firestone GL, Leitman DC. Estrogen receptor inhibits human breast cancer cell proliferation and tumor formation by causing a G2 cell cycle arrest. *Cancer Res* 2004; 64: 423-428

Pérez-Herrero E, Fernández-Medarde A. Advanced targeted therapies in cancer: drug nanocarriers, the future of chemotherapy. *Eur J Pharm Biopharm* 2015; 93: 52-79

Pinton G, Nilsson S, Moro L. Targeting estrogen receptor beta (ER β) for treatment of ovarian cancer: importance of KDM6B and SIRT1 for ER β expression and functionality. *Oncogenesis* 2018; 7: 1-11

Qiu M, Bao W, Wang J, Yang T, He X, Liao Y, Wan X. FOXA1 promotes tumor cell proliferation through AR involving the Notch pathway in endometrial cancer. *BMC Cancer* 2014; 14: 1-17

Qu W, Zhao Y, Wang X, Qi Y, Zhou C, Hua Y, Hou J, Jiang SW. Culture characters, genetic background, estrogen/progesterone receptor expression, and tumorigenic activities of frequently used sixteen endometrial cancer cell lines. *Clin Chim Acta* 2019; 489: 225-232

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007; 109: 25-32

Rampurwala M, Wisinski KB, O'Regan R. Role of the androgen receptor in triple-negative breast cancer. *Clin Adv Hematol Oncol* 2016; 14: 186-193

Santa Cruz Biotechnology, 2024: ER β Antikörper (H-150): sc-8974. <https://www.scbt.com/de/p/erbeta-antibody-h-150> (Zugriffsdatum: 19.01.2024)

Sasaki M, Kotcherguina L, Dharia A, Fujimoto S, Dahiya R. Cytosine-phosphoguanine methylation of estrogen receptors in endometrial cancer. *Cancer Res* 2001; 61: 3262-3266

Sasaki M, Oh BR, Dharia A, Fujimoto S, Dahiya R. Inactivation of the human androgen receptor gene is associated with CpG hypermethylation in uterine endometrial cancer. *Mol Carcinog* 2000; 29: 59-66

Schüler-Toprak S, Moehle C, Skrzypczak M, Ortmann O, Treeck O. Effect of estrogen receptor β agonists on proliferation and gene expression of ovarian cancer cells. *BMC Cancer* 2017; 17: 1-9

Scully RE. Pathology of ovarian cancer precursors. *J Cell Biochem Suppl* 1995; 13: 208-218

Shaaban AM, Green AR, Karthik S, Alizadeh Y, Hughes TA, Harkins L, Ellis IO, Robertson JF, Paish EC, Saunders PTK, Groome NP, Speirs V. Nuclear and cytoplasmic expression of ER β 1, ER β 2, and ER β 5 identifies distinct prognostic outcome for breast cancer patients. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 5228-5235

Shen Y, Yang F, Zhang W, Song W, Liu Y, Guan X. The androgen receptor promotes cellular proliferation by suppression of G-protein coupled estrogen receptor signaling in triple-negative breast cancer. *Cell Physiol Biochem* 2017; 43: 2047-2061

Skliris GP, Parkes AT, Limer JL, Burdall SE, Carder PJ, Speirs V. Evaluation of seven oestrogen receptor β antibodies for immunohistochemistry, western blotting and flow cytometry in human breast tissue. *J Pathol* 2002; 197: 155-162

Song P, Li Y, Dong Y, Liang Y, Qu H, Qi D, Lu Y, Jin X, Guo Y, Jia Y, Wang X, Xu W, Quan C. Estrogen receptor β inhibits breast cancer cells migration and invasion through CLDN6-mediated autophagy. *J Exp Clin Cancer Res* 2019; 38: 1-18

Sun W, Gu C, Xia M, Zhong G, Song H, Guo J. Significance of estrogen receptor subtypes in breast tumorigenesis and progression. *Tumour Biol* 2014; 35: 9111-9117

Suzuki F, Akahira JI, Miura I, Suzuki T, Ito K, Hayashi SI, Sasano H, Yaegashi N. Loss of estrogen receptor β isoform expression and its correlation with aberrant DNA methylation of the 5'-untranslated region in human epithelial ovarian carcinoma. *Cancer Sci* 2008; 99: 2365-2372

Tanaka S, Miki Y, Hashimoto C, Takagi K, Doe Z, Li B, Yaegashi N, Suzuki T, Ito K. The role of 5 α -reductase type 1 associated with intratumoral dihydrotestosterone concentrations in human endometrial carcinoma. *Mol Cell Endocrinol* 2015; 401: 56-64

Thigpen JT, Brady MF, Alvarez RD, Adelson MD, Homesley HD, Manetta A, Soper JT, Given FT. Oral medroxyprogesterone acetate in the treatment of advanced or recurrent endometrial carcinoma: a dose-response study by the Gynecologic Oncology Group. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1736-1744

Thomas C, Rajapaksa G, Nikolos F, Hao R, Katchy A, McCollum CW, Bondesson M, Quinlan P, Thompson A, Krishnamurthy S, Esteva FJ, Gustafsson JÅ. ER β 1 represses basal-like breast cancer epithelial to mesenchymal transition by destabilizing EGFR. *Breast Cancer Res* 2012; 14: 1-15

Tong D, Schuster E, Seifert M, Czerwenka K, Leodolter S, Zeillinger R. Expression of estrogen receptor beta isoforms in human breast cancer tissues and cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2002; 71: 249-255

Treeck O, Pfeiler G, Mitter D, Lattrich C, Piendl G, Ortmann O. Estrogen receptor β 1 exerts antitumoral effects on SK-OV-3 ovarian cancer cells. *J Endocrinol* 2007; 193: 421-433

Van Weelden WJ, Massuger LFAG, ENITEC, Pijnenborg JMA, Romano A. Anti-estrogen treatment in endometrial cancer: a systematic review. *Front Oncol* 2019; 9: 1-12

Vera-Badillo FE, Templeton AJ, De Gouveia P, Diaz-Padilla I, Bedard PL, Al-Mubarak M, Seruga B, Tannock IF, Ocana A, Amir E. Androgen receptor expression and outcomes in early breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106: 1-11

Vogel C, Marcotte EM. Insights into the regulation of protein abundance from proteomic and transcriptomic analyses. *Nat Rev Genet* 2012; 13: 227-232

Voskuil JLA. The challenges with the validation of research antibodies. *F1000Res* 2017; 6: 1-9

Williams C, Simera I, Bryant A. Tamoxifen for relapse of ovarian cancer. *Cochrane Database Syst Rev* 2010; 2010: 1-15

Wu X, Subramaniam M, Negron V, Cicek M, Reynolds C, Lingle WL, Goetz MP, Ingle JN, Spelsberg TC, Hawse JR. Development, characterization and applications of a novel estrogen receptor beta monoclonal antibody. *J Cell Biochem* 2012; 113: 711-723

Wu X, Zhong X, Huo X, Zhang J, Yang X, Zhang Y. The clinicopathological significance and prognostic value of androgen receptor in endometrial carcinoma: a meta-analysis. *Front Oncol* 2022; 12: 1-7

Yu H, Cook TJ, Sinko PJ. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm Res* 1997; 14: 757-762

Zentrum für Krebsregisterdaten, 2023: Krebs in Deutschland für 2019/2020. https://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/krebs_in_deutschland_node.html (Zugriffsdatum: 15.01.2024)

Zhao C, Lam EWF, Sunter A, Enmark E, Tamburo de Bella M, Coombes RC, Gustafsson JÅ, Dahlman-Wright K. Expression of estrogen receptor β isoforms in normal breast epithelial cells and breast cancer: regulation by methylation. *Oncogene* 2003; 22: 7600-7606

Zhao C, Matthews J, Tujague M, Wan J, Ström A, Toresson G, Lam EWF, Cheng G, Gustafsson JÅ, Dahlman-Wright K. Estrogen receptor β 2 negatively regulates the trans-activation of estrogen receptor α in human breast cancer cells. *Cancer Res* 2007; 67: 3955-3962

Zhu H, Zhu X, Zheng L, Hu X, Sun LZ, Zhu X. The role of the androgen receptor in ovarian cancer carcinogenesis and its clinical implications. *Oncotarget* 2017; 8: 29395-29405

10. Danksagung

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. med. Dr. h.c. Alexander Mustea als mein ehemaliger Doktorvater und damaliger stellvertretender Leiter der Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe an der Universitätsmedizin Greifswald, der mir ermöglichte in der gynäkologischen Onkologie unter bestmöglicher Betreuung promovieren zu können.

Mein außerordentlichster Dank gebührt meinem Betreuer und nunmehrigem Doktorvater Herrn PD Dr. rer. nat. Dr. rer. med. habil. Matthias Stope für die durchweg exzellente Betreuung und Unterstützung bei der Planung, Umsetzung und Auswertung dieser Arbeit. Besonders bedanken möchte ich mich für die vielen ermutigenden und konstruktiven Gespräche, die immer schnelle und kritische Durchsicht und das unentwegte Voranbringen meiner Arbeit.

Für ein hervorragendes Einarbeiten und stetes Begleiten kleiner und großer Probleme im Laborgeschehen möchte ich mich außerdem recht herzlich bei Anja Choinowski und Jens Ehrhardt bedanken. Auch gilt Dr. med. Andreas Nitsch B. Sc. mein Dank für das problemlose Einarbeiten in den MTT-Vitalitäts-Assay.

Mein letzter aber nicht minderer Dank gilt meiner Familie und meinem Partner, die mich durch alle Höhen und Tiefen dieser Arbeit und des Studiums getragen haben und nie aufhörten, motivierend an meiner Seite zu sein.