

Aus der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe
der Universität zu Lübeck
Direktor: Prof. Dr. med. Achim Rody

Medikamentöser Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition bei triple-negativen Brustkrebszelllinien

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -



vorgelegt von

Johanna Susanne Stelbrink
aus Soest

Lübeck 2021

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Frank Köster
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Heinz-Wolfram Bernd

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2021

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 10.12.2021

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VII
1. Einleitung.....	9
1.1 Das Mammakarzinom.....	9
1.1.1 Epidemiologie.....	9
1.1.2 Risikofaktoren	9
1.1.3 Prognose und Prädiktion	10
1.1.4 Therapie.....	11
1.1.5 Screening	11
1.2 Epithelial-mesenchymale Transition.....	12
1.2.1 Einführung.....	12
1.2.2 Molekulare Marker der EMT.....	12
1.2.3 Die Rolle der EMT bei Metastasierung und Therapieresistenz	14
1.3 Transforming Growth Factor β	14
1.3.1 Einführung und Signaltransduktion	14
1.3.2 Der Einfluss von TGF β auf Tumorzellen	16
1.3.3 Der Einfluss von TGF β auf die EMT.....	17
1.4 Antagonisten des <i>growth hormone-releasing hormone</i>	18
1.4.1 Einführung.....	18
1.4.2 Die Wirkung von GHRH auf Tumorzellen.....	18
1.4.3 Der Wirkmechanismus von GHRH-Antagonisten.....	19
1.4.4 Der Einfluss von GHRH-Antagonisten auf die EMT	20
1.5 Resveratrol	21
1.5.1 Einführung.....	21
1.5.2 Die chemopräventive Wirkung von Resveratrol	21
1.5.3 Die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol	21
1.5.4 Der Einfluss von Resveratrol auf die EMT	22

1.6 Calcitriol.....	23
1.6.1 Einführung.....	23
1.6.2 Die Wirkung von Calcitriol auf Tumorzellen	23
1.6.3 Der Einfluss von Calcitriol auf die EMT	24
1.7 Zielsetzung.....	25
2. Material und Methoden.....	26
2.1 Material.....	26
2.1.1 Zelllinien.....	26
2.1.2 Zellkulturmedien, -zusätze und -zubehör	26
2.1.3 Allgemeine Labormaterialien.....	26
2.1.4 Laborgeräte.....	27
2.1.5 Zubehör mRNA-Expression	27
2.1.6 Western-Blot - Zubehör.....	28
2.1.7 Software.....	28
2.1.8 Chemikalien und Gebrauchslösungen	29
2.1.9 Testsubstanzen.....	29
2.2 Methoden	29
2.2.1 Zellkultur	29
2.2.2 Passagieren der Zellen	29
2.2.3 Zählen der Zellen	30
2.2.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen.....	30
2.2.5 Proliferationsassay.....	30
2.2.5.1 Vorbehandlung der Zellen.....	31
2.2.5.2 MTS-Assay.....	31
2.2.6 Migrationsassay	31
2.2.7 Immunhistochemischer Proteinnachweis	32
2.2.7.1 Behandlung der Zellen für den Western Blot	32
2.2.7.2 Proteinisolierung	32

2.2.7.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration	32
2.2.7.4 Probenvorbereitung für den Western Blot	33
2.2.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.2.7.6 Semi-Dry-Blot.....	34
2.2.7.7 Immundetektion.....	34
2.2.8 Vergleich der mRNA-Expression.....	35
2.2.8.1 Behandlung der Zellen für mRNA Quantifizierung	35
2.2.8.2 RNA Isolierung	35
2.2.8.3 Reverse Transkription	35
2.2.8.4 Quantitative Real-Time PCR	36
2.2.8.5 Auswertung	38
2.2.9 Statistik	38
3. Ergebnisse	39
3.1 Einfluss auf das Zellwachstum	39
3.1.1 Einfluss eines GHRH-Antagonisten auf das Zellwachstum.....	39
3.1.2 Einfluss von Resveratrol auf das Zellwachstum	40
3.1.3 Einfluss von Calcitriol auf das Zellwachstum	41
3.2. Einfluss auf die Zellmigration.....	42
3.2.1 Einfluss des GHRH-Antagonisten MIA-602 auf die Zellmigration.....	42
3.2.2 Einfluss von Resveratrol auf die Zellmigration	45
3.2.3 Einfluss von Calcitriol auf die Zellmigration	48
3.3 Einfluss auf die Proteinexpression	50
3.3.1 Einfluss von MIA-602, Resveratrol und Calcitriol auf die Expression von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie HCC1806.....	51
3.3.2 Einfluss von MIA-602, Resveratrol und Calcitriol auf die Expression von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie MDA-MB-231	53
3.4 Einfluss auf die mRNA-Expression.....	55
3.4.1 Einfluss von Resveratrol und Calcitriol auf die mRNA-Expression in der Zelllinie HCC1806	55

3.4.2 Einfluss von Resveratrol und Calcitriol auf die mRNA-Expression in der Zelllinie MDA-MB-231	58
4. Diskussion	62
4.1 Wird das Wachstum von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?	62
4.2 Wird die Migration von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?	67
4.3. Reguliert die Behandlung mit dem GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol die Transkription oder die Proteinbiosynthese von EMT-Markern?	70
4.4 Beeinflussen der GHRH-Antagonist MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol eine mit TGF β induzierte EMT?	73
5. Zusammenfassung	77
6. Literaturverzeichnis	78
7. Anhang	92
7.1 TNM-Klassifikation	92
8. Danksagung	95
Publikationen und Vorträge	96

Abkürzungsverzeichnis

Im Duden zu findende Abkürzungen und SI-Einheiten sind hier nicht aufgeführt.

ABC	ATP-bindende Kasette
BCA	Bicinchoninsäure
BRCA1	Brustkrebsgen 1
BRCA2	Brustkrebsgen 2
CDK	Cyclin-abhängige Kinase, engl. <i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
COX-2	Cyclooxygenase-2
DCIS	duktales Carcinoma in situ
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	Östradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor, engl. <i>epidermal growth factor</i>
EMT	epithelial-mesenchymale Transition
ER	Östrogenrezeptor
FCS	fötale Kälberserum, engl. <i>fetal calf serum</i>
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor, engl. <i>fibroblast growth factor</i>
GF	Wachstumsfaktor, engl. <i>growth factor</i>
GH	Wachstumshormon, engl. <i>growth hormone</i>
GHRH	engl. <i>growth hormone-releasing hormone</i>
GHRH-R	engl. <i>growth hormone-releasing hormone receptor</i>
HER2/neu	engl. <i>human epidermal growth factor receptor 2</i>
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. <i>horseradish peroxidase</i>
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration
IGF-1	engl. <i>insulin-like growth factor 1</i>
IGF-2	engl. <i>insulin-like growth factor 2</i>
iNOS	induzierbare NO-Synthase
I-Smad	Inhibitor-Smad

MET	mesenchymal-epitheliale Transition
MPP	Matrix-Metalloproteinasen
mRNA	Boten-RNA, engl. <i>messenger RNA</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung, engl. <i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion, engl. <i>polymerase chain reaction</i>
PR	Progesteronrezeptor
P/S	Penicillin/Streptomycin
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	real-time quantitative PCR
ROS	reaktive oxidative Substanzen
R-Smad	Regulator-Smad
RIPA	Radioimmunpräzipitationsassay
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
SDS	Natriumdodecylsulfat, engl. <i>sodium dodecyl sulfate</i>
SRC-1	Steroid Rezeptor Koaktivator-1
SV1	Splicevariante 1 (des GHRH-R)
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20, engl. <i>tris-buffered saline with Tween</i>
TGF β	engl. <i>transforming growth factor beta</i>
TGF β RI	TGF β -Rezeptor 1
TGF β RII	TGF β -Rezeptor 2
TNF- α	Tumornekrosefaktor-alpha
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VEGF	vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor, engl. <i>vascular endothelial growth factor</i>

1. Einleitung

1.1 Das Mammakarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Mammakarzinom macht in Deutschland mit ca. 70 000 Neuerkrankungen pro Jahr einen Anteil von 30 % aller bösartigen Neubildungen der Frau aus. Damit ist das Mammakarzinom die häufigste maligne Erkrankung der weiblichen Bevölkerung in Deutschland. Eine von acht Frauen erkrankt während ihres Lebens an einem Mammakarzinom [150]. Das durchschnittliche Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren, allerdings erkranken 10 % der Patientinnen bereits vor dem 45. Lebensjahr [74]. Mit ca. 600 Neuerkrankungen pro Jahr erkranken Männer deutlich seltener an einem Mammakarzinom [150]. Die altersstandardisierte Mortalität lag im Jahr 2016 bei 24/100 000 Frauen. Damit ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen 35 und 55 Jahren in Deutschland, wobei die 5-Jahres Überlebensrate bei 87 % liegt [150].

1.1.2 Risikofaktoren

Zahlreiche Faktoren beeinflussen das Risiko, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Neben dem weiblichen Geschlecht ist vor allem das Alter ein bedeutender Risikofaktor, denn ab dem fünften Lebensjahrzehnt steigt die Prävalenz des Mammakarzinoms an [150]. Hinzu kommen Faktoren wie eine vorausgegangene Brustkrebserkrankung, dichtes Brustdrüsengewebe und hormonelle Einflüsse. Letztere werden durch eine frühe Menarche, eine späte Menopause, Nulliparität und Stillverzicht beeinflusst [39, 74]. Eine längerfristige Einnahme von kombinierten Östrogen-Gestagen-Präparaten zur Linderung von klimakterischen Beschwerden erhöht das Risiko ebenfalls [34]. Auch orale Kontrazeptiva erhöhen das Brustkrebsrisiko geringfügig. Dieser Effekt schwindet allerdings 5 bis 10 Jahre nach der letzten Einnahme [84, 111]. Außerdem sind Alkoholabusus, Übergewicht und eine fettreiche Ernährung als Risikofaktoren zu nennen [150, 167]. 5 bis 10 % der Patientinnen erkranken im Rahmen einer hereditären Disposition. Am häufigsten sind Keimbahnmutationen im BRCA1- und BRCA2-Gen [74].

1.1.3 Prognose und Prädiktion

Die Prognose einer Brustkrebserkrankung ist abhängig von mehreren klinisch-pathologischen Kriterien. Entscheidend sind die TNM-Klassifikation (siehe Anhang), das Grading, der Hormonrezeptorstatus, der *human epidermal growth factor receptor 2* (Her2/neu) - Status sowie der Proliferationsmarker Ki-67. In Grenzfällen besteht die Möglichkeit zusätzlich ein Multigenprofil zu bestimmen [42, 51]. Bei einem nichtmetastasierten Mammakarzinom ist die Therapieintention kurativ. Wenn hingegen Fernmetastasen vorliegen, kann der Tumor nur noch palliativ behandelt werden [51].

Auf Basis von molekulargenetischen Untersuchungen Ende der 90er Jahre wird das Mammakarzinom in molekulare Subgruppen unterteilt (siehe Tabelle 1) [137]. Die Identifikation dieser Subgruppen erfolgt in der klinischen Routine anhand von immunhistochemischen Surrogatparametern und ist prädiktiv für die medikamentöse Therapie: Das Wachstum hormonrezeptorpositiver Mammakarzinome kann durch eine endokrine Therapie unterdrückt werden, während Patientinnen mit einer Überexpression von Her2/neu mit zielgerichteten Antikörpern behandelt werden [51]. Wird keine dieser Zielstrukturen im Tumorgewebe exprimiert, spricht man von einem triple-negativen Mammakarzinom. Ca. 10 bis 17 % aller Mammakarzinome sind triple-negativ. Patientinnen mit dieser Subgruppe haben eine besonders schlechte Prognose und zusätzlich nicht die Option einer zielgerichteten Therapie, sodass hierfür dringend neue therapeutische Ansätze benötigt werden [41, 181].

Tabelle 1: Molekulare Subtypen des Mammakarzinoms [74]

Subtyp		ER/PR-Status	Her2-Status	Ki-67
Luminal A		positiv	negativ	niedrig
Luminal B	Her2-negativ	positiv	negativ	hoch
	Her2-positiv		positiv	jeder Wert
Her2-positiv		negativ	positiv	jeder Wert
Basal-like / triple-negativ		negativ	negativ	jeder Wert

1.1.4 Therapie

Entsprechend der prognostischen Faktoren und der molekularen Subgruppe des Mammakarzinoms wird für jede Patientin eine individuelle Therapiestrategie gewählt. Hierbei sollte auch das Alter und die körperliche Belastbarkeit der Patientin berücksichtigt werden [74]. Aktuelle Therapieempfehlungen und Leitlinien werden durch die deutsche Krebsgesellschaft [42] und die Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V. [7] publiziert.

Im Vordergrund der Therapie steht die operative Entfernung des Tumors, die bei fehlenden Kontraindikationen brusterhaltend erfolgt. Im Rahmen der Operation wird zusätzlich eine Biopsie des Wächterlymphknotens durchgeführt bzw. die axillären Lymphknoten entfernt. Postoperativ schließt sich fast immer eine Radiotherapie an. Abhängig von der molekularen Subgruppe gibt es neben dieser lokalen Form der Therapie zusätzlich die Möglichkeit zur systemischen Therapie in Form von Chemotherapie, antihormoneller- und Antikörpertherapie [74].

1.1.5 Screening

Zwischen 2005 und 2009 wurde in Deutschland flächendeckend das Mammographie-Screening zur Früherkennung des Mammakarzinoms und dessen Vorläuferläsionen eingeführt [83]. Das langfristige Ziel des Screenings ist es, die brustkrebsbedingte Mortalität zu senken. Das Programm richtet sich an asymptomatische Frauen zwischen 50 und 69 Jahren und beinhaltet die röntgenologische Untersuchung der Brust in einem Abstand von zwei Jahren. Im Jahr 2017 nahmen fast drei Millionen Frauen in Deutschland am Mammographie-Screening teil. Das entsprach einer Teilnehmerrate von 49 % [90]. Epidemiologisch messbar zeigt sich der Erfolg des Screenings aktuell durch eine Abnahme der Inzidenz von fortgeschrittenen Mammakarzinomen um ca. 25 % seit der Einführung des Screenings [83].

1.2 Epithelial-mesenchymale Transition

1.2.1 Einführung

Als epithelial-mesenchymale Transition (EMT) wird der Übergang von epithelialen Zellen zu Zellen mit mesenchymalen Eigenschaften bezeichnet. Dieser Ablauf ist ein physiologischer Bestandteil der Embryogenese und der Wundheilung [76], spielt aber auch in pathologischen Prozessen wie der Tumorprogression eine entscheidende Rolle [177]. Die Epithelzellen verlieren ihre Zell-Zell-Kontakte, die Haftung zur Basalmembran und ihre apikal-basale Polarität. Als mesenchymale Zellen haben sie eine erhöhte Motilität und können den epithelialen Zellverband verlassen sowie über den inversen Ablauf, die mesenchymal-epitheliale Transition (MET), ihre epithelialen Eigenschaften zurückerlangen [80, 107]. Die EMT ist kein binärer Prozess, sondern vielmehr die Abfolge unterschiedlicher Zwischenstadien, sodass die Begriffe epithelial-mesenchymale Plastizität oder auch Hybrid-EMT in den letzten Jahren verstärkt Einzug gehalten haben [125, 132]. In Abb. 1 ist die EMT schematisch dargestellt. Zusätzlich sind charakteristische epitheliale und mesenchymale Proteine aufgelistet.

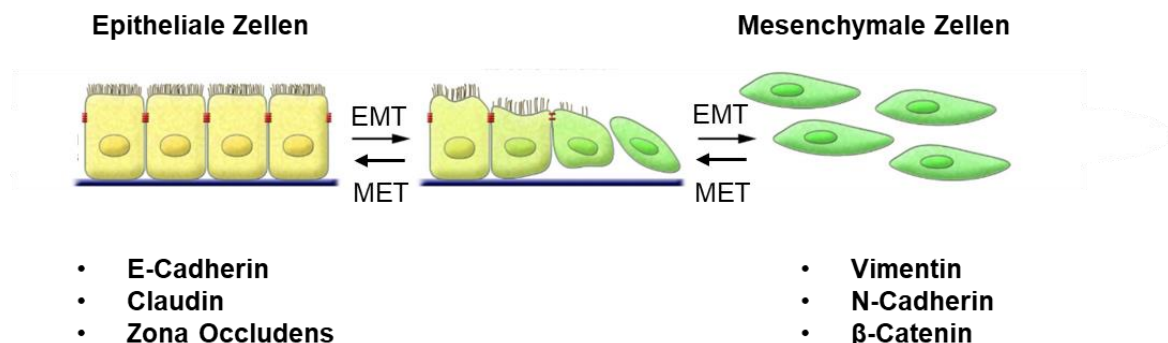


Abbildung 1: Schematische Darstellung der EMT und Auflistung charakteristischer epithelialer und mesenchymaler Marker. Modifizierte Abbildung nach Kalluri und Weinberg [80].

1.2.2 Molekulare Marker der EMT

Im Laufe der EMT werden epitheliale Proteine weniger und mesenchymale Proteine verstärkt exprimiert. Dieser Ablauf wird durch ein komplexes Zusammenspiel von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren reguliert, das in Abb. 2 beispielhaft für den Transkriptionsfaktor SNAIL dargestellt ist [189]. Neben SNAIL begünstigen

auch die Transkriptionsfaktoren SLUG und TWIST sowie die Zinkfingerproteine ZEB1 und ZEB2 die EMT [133].

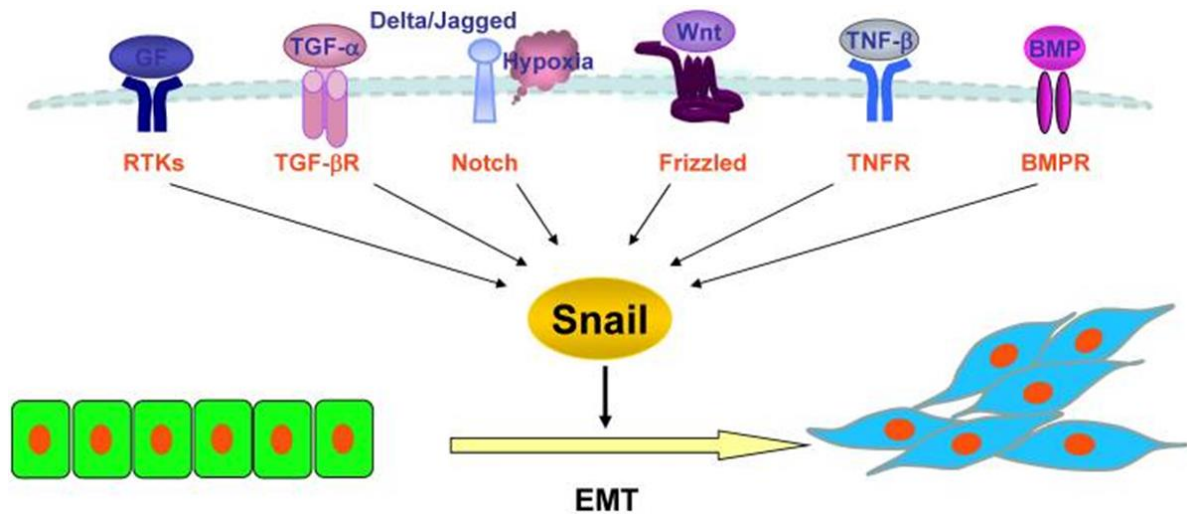


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Signalwege, die zu einer SNAIL-Expression führen. Der Transkriptionsfaktor SNAIL aktiviert die EMT. Die Abbildung von SNAIL ist beispielhaft, andere Transkriptionsfaktoren werden ebenfalls aktiviert. Abkürzungen: BMP: knochenmorphogenetisches Protein, BMPR: Rezeptor für knochenmorphogenetisches Protein, GF: Growth factor, RTK: Rezeptor Tyrosin Kinase, TGF: Transforming Growth Factor, TGF β -R: TGF β -Rezeptor, TNF- β : Tumornekrosefaktor-beta, TNFR: TNF-Rezeptor. Modifizierte Abbildung nach Wang und Kollegen [189].

Claudine sind Transmembranproteine und wichtiger Bestandteil der epithelialen Schlussleisten (*tight junctions*). Sie werden während der EMT durch den Transkriptionsfaktor SNAIL herunterreguliert [133, 189]. Cadherine sind ebenfalls transmembranäre Proteine, die über ihre extrazelluläre Domäne stabile Zell-Zell-Kontakte ausbilden. Während E-Cadherin in Epithelzellen vorkommt, kann N-Cadherin in mesenchymalen Zellen nachgewiesen werden. Die EMT ist häufig durch einen „Cadherin-Switch“ gekennzeichnet, bei dem es zu einem Verlust von E-Cadherin und einer verstärkten Expression von N-Cadherin kommt [191]. Neben N-Cadherin ist Vimentin der wichtigste mesenchymale Marker. Vimentin gehört zu den Intermediärfilamenten des Zytoskeletts in mesenchymalen Zellen. In einer Vielzahl von Karzinomen konnte eine erhöhte Vimentin-Expression nachgewiesen werden [153].

1.2.3 Die Rolle der EMT bei Metastasierung und Therapieresistenz

Die Fähigkeit maligner Tumore, invasiv in umliegende Gewebe zu wachsen und Tochtergeschwulste in anderen Körperteilen zu bilden, stellt die Medizin vor große Herausforderungen. Die EMT gilt als wichtiger molekularer Ansatz für das Verständnis der Metastasierung [75, 107]: Im Primärtumor bildet sich eine Invasionsfront aus Zellen, die die EMT in unterschiedlichem Maße durchlaufen haben. Der mesenchymale Phänotyp bzw. ein epithelial-mesenchymaler Zwischentyp ermöglicht den Zellen die Basalmembran zu durchbrechen, was als Invasion bezeichnet wird. Im nächsten Schritt, der Intravasation, brechen die Zellen in Lymph- und Blutgefäße des subepithelialen Bindegewebes ein und strömen in entfernte Körperregionen. Während der Extravasation verlassen die Zellen das Gefäßlumen wieder und durchlaufen eine MET. Es kommt zur Absiedelung von Metastasen.

Aktuelle Studien fokussieren zusätzlich die Rolle der EMT bei der Entstehung von Therapieresistenzen [55, 205]. Vor allem Tumorrezidive entwickeln häufig Resistenzen gegen die gängigen Therapieschemata. Für das Mammakarzinom sind Resistenzen sowohl gegen Chemotherapeutika als auch gegen Antikörper- und Hormontherapien bekannt [73]. Die resistenten Tumorzellen exprimieren dabei häufig mesenchymale Marker hoch, während die Expression epithelialer Marker vermindert ist. Durch den mesenchymalen Phänotyp entwickeln die Zellen Eigenschaften von Tumorstammzellen, d. h. sie exprimieren verstärkt Effluxpumpen, ATP-bindende-Kassetten-Transporter (ABC-Transporter) und erlangen antiapoptische Eigenschaften [108]. Durch die Blockade der EMT-Induktoren SNAIL und ZEB1 konnten *in vitro* Gemcitabin-resistente Pankreaskarzinomzellen resensibilisiert werden [109, 121].

1.3 Transforming Growth Factor β

1.3.1 Einführung und Signaltransduktion

Es sind über 30 Zytokine der *Transforming Growth Factor β* - (TGF β) Superfamilie bekannt. Dazu gehören u. a. die Isoformen TGF β 1 - 3. Die Zytokine der TGF β -Superfamilie kontrollieren zahlreiche Prozesse auf zellulärer Ebene, u. a. das Zellwachstum, die Zelldifferenzierung und die Apoptose [66]. Des Weiteren konnte

TGF β neben seiner antiinflammatorischen Eigenschaft als wichtiger Induktor der EMT identifiziert werden [114].

TGF β bindet als Ligand an spezifische Typ I- und Typ II- Serin/Threonin-Kinase-Rezeptoren (TGF β RI, TGF β RII), die daraufhin dimerisieren. Der Rezeptorkomplex aktiviert über Phosphorylierung intrazelluläre Rezeptor-regulierte Smad-Proteine (R-Smads). Nach Aktivierung durch TGF β , findet die Signalweiterleitung über SMAD2 und SMAD3 statt. Die R-Smads dimerisieren mit dem „common partner“ SMAD4. Dieser Komplex transloziert in den Zellkern und aktiviert zusammen mit weiteren Faktoren die Transkription von TGF β -Zielgenen (siehe Abb. 3).

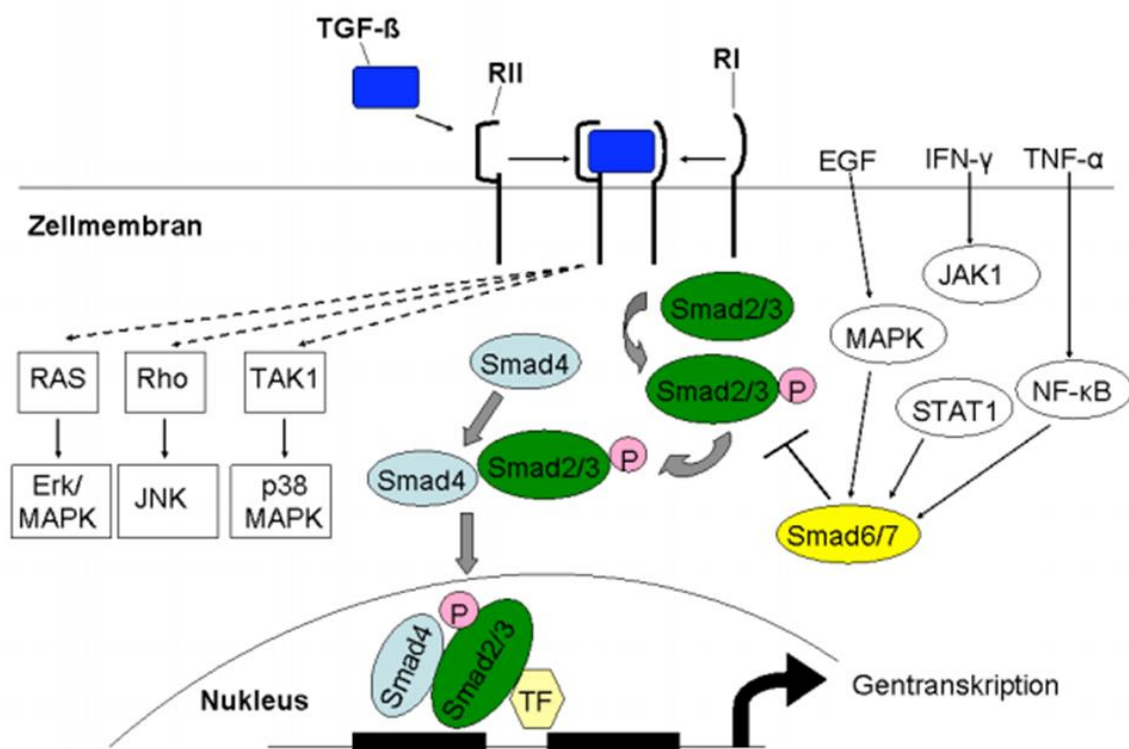


Abbildung 3 : Schematische Darstellung des TGF β -Signalwegs. Die SMAD-abhängige Signaltransduktion ist farbig unterlegt. Zusätzlich kann TGF β noch weitere Signalkaskaden aktivieren. Abkürzungen: EGF: epidermaler Wachstumsfaktor, IFN- γ : Interferon-gamma, P: Phosphat, TNF- α : Tumornekrosefaktor-alpha, TF: Transkriptionsfaktor. Abbildung nach Lutz und Knaus [106].

Die angelagerten Kofaktoren bestimmen welche der unterschiedlichen Zielgene transkribiert werden und tragen somit maßgeblich zur pleiotropen Wirkung des TGF β -Signalwegs bei [67]. Um die Signalweiterleitung zu beenden, existieren mehrere negative Feedback-Schleifen: SMAD6 und 7 (I-Smads) sowie die inhibitorisch-

en Ko-Repressoren SNON und SKI können die Signalkaskade auf intrazellulärer Ebene unterbrechen und somit die Transkription von TGF β -Zielgenen verhindern [190]. Neben der SMAD-abhängigen Signaltransduktion kann TGF β u. a. auch ERK, JNK und p38-MAPK sowie PI3K/Akt aktivieren und so die zelluläre Antwort modulieren [168, 204].

1.3.2 Der Einfluss von TGF β auf Tumorzellen

In der Tumorgenese nimmt TGF β eine duale Rolle ein: In prämaligen Zellen inhibiert TGF β durch seine proapoptischen und zytostatischen Eigenschaften das Zellwachstum, während es in späteren Stadien die Metastasierung und das weitere Vorschreiten der Erkrankung begünstigt. Grundlage für diesen funktionellen Richtungswechsel sind Mutationen in den Tumorzellen [151, 157].

In prämaligen Zellen aktiviert TGF β über die an den SMAD3/4-Komplex angelagerten Kofaktoren FOXO und SP1 die Transkription der CDK-Inhibitoren p15^{INK4b}, p21^{CIP1} und p27^{KIP1} und führt damit zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase [157]. Durch die angelagerten Kofaktoren p107, E2F4 und E2F5 blockiert der SMAD3/4-Komplex zusätzlich die Promotorregion des Onkogens C-MYC und wirkt somit antiproliferativ [29]. Des Weiteren induziert TGF β SMAD-abhängig die Expression des Transkriptionsfaktors ATF3, der wiederum die Transkription des ID1-Gens (*Inhibitor of differentiation/DNA binding*) unterdrückt und somit die Zelldifferenzierung fördert [81]. Über die E3-Ligase TRAF6 kann TGF β SMAD-unabhängig die Apoptose einer Zelle einleiten. TRAF6 bindet konstitutiv an den TGF β RI. Wenn dieser mit dem TGF β RII dimerisiert, wird TRAF6 durch Autoubiquitinierung aktiviert. Es kommt zur Signaltransduktion über den TRAF6–TAK1–MKK3/6–p38 Signalweg, an dessen Ende der programmierte Zelltod steht [163, 195].

Tumorzellen können durch verschiedene Mechanismen der antikanzerogenen Wirkung von TGF β entgehen. Somatische Mutationen oder epigenetisches Silencing inaktivieren die TGF β RI/II bzw. die SMAD-abhängige Signaltransduktion und somit auch die antikanzerogene Wirkung von TGF β [103]. Zahlreiche dieser Veränderungen konnten in Kolon-, Magen- und Ösophaguskarzinomen sowie in Kopf-Hals-Tumoren nachgewiesen werden [103]. Durch Mutationen in weiteren Signalwegen kommt es zu einer veränderten Expressionsrate von den an die R-Smads angelagerten Kofaktoren und somit zu einer zusätzlich veränderten Wirkung von TGF β auf die Zelle. Die Arbeitsgruppe von Seoane konnte zeigen, dass in

Glioblastomzellen der stark aktivierte PI3K-Akt Signalweg den Smad-Kofaktor FOXO an der nukleären Translokation hindert und somit die Transkription von CDK-Inhibitoren hemmt [158]. Tumorzellen, die verstärkt den Transkriptionsfaktor C-MYC exprimieren, entwickeln ebenfalls Resistenzen gegen die antiproliferative Wirkung von TGF β . Der C-MYC-bindenden Faktor MIZ-1 bildet einen Komplex mit C-MYC und blockiert die Transkription von CDK-Inhibitoren [164]. In metastasierten Mammakarzinomzellen konnte eine aberrante Wirkung von TGF β auf ID1 festgestellt werden. Die Stimulation mit TGF β führte zu einer erhöhten Expressionsrate von ID1, anstatt diese zu unterdrücken [129].

Die Tumorzellen selbst produzieren große Mengen TGF β , das als autokriner Faktor die TGF β -induzierten Prozesse verstärkt und parakrin auf umliegende Stromazellen wirkt. Diese wiederum sezernieren Zytokine, u. a. Liganden des Wnt- und des Notch-Signalwegs, und unterstützen so den kanzerogenen Effekt von TGF β [113]. Die hohen Konzentrationen von TGF β im Tumorgewebe wirken zusätzlich stark immunsuppressiv, sodass die entarteten Zellen der Kontrolle des Immunsystems entgehen [31, 58].

1.3.3 Der Einfluss von TGF β auf die EMT

In Karzinomzellen wirkt TGF β über unterschiedliche Mechanismen als potenter Induktor der EMT. So induziert TGF β SMAD-abhängig die Expression des HMGA2 (*high mobility group*) Proteins, das wiederum als SMAD-Kofaktor die Transkription von SNAIL fördert [179]. Über die MRTF (*myocardin-related transcription factors*) erhöht TGF β die Expression von SLUG [112]. Auch der durch TGF β -induzierte Notch-Signalweg erhöht direkt die Expression von SLUG [102]. SMAD-unabhängig phosphoryliert der TGF β RII das polare Protein Par6, das in seiner aktivierten Form über das G-Protein RhoA epitheliale Schlussleisten löst [128]. Über die bereits erwähnte E3-Ligase TRAF6 aktiviert TGF β den JNK- und den p38-Signalweg, die über Transkriptionskontrolle ebenfalls die Expression des mesenchymalen Phänotyps unterstützen [195].

1.4 Antagonisten des *growth hormone-releasing hormone*

1.4.1 Einführung

Das *growth hormone-releasing hormone* (GHRH) ist ein Peptidhormon, das im Hypothalamus ausgeschüttet wird und über die Portalvene zur Hypophyse gelangt. Durch Bindung an den GHRH-Rezeptor (GHRH-R) wird die Sekretion vom Wachstumshormon (GH) aus der Adenohypophyse stimuliert. GH selbst wirkt hauptsächlich indirekt über den in der Leber produzierten *insulin-like growth factor 1* (IGF-1) und beeinflusst neben dem Körper- und Organwachstum zahlreiche anabole Stoffwechselprozesse. Negativ reguliert wird die somatotrope Achse über den direkten Gegenspieler Somatostatin, aber auch das Effektorhormon IGF-1 bewirkt eine negative Rückkopplung [15]. Der *insulin-like growth factor 2* (IGF-2) wird GH-unabhängig in der Leber produziert. Seine physiologische Funktion liegt vor allem in der Zellproliferation und Differenzierung während der Embryonalzeit. Auch Tumorzellen sind in der Lage IGF-1 und IGF-2 zu produzieren und als auto- und parakrine Wachstumsfaktoren für sich zu nutzen [85]. In Brustkrebszellen konnten sowohl erhöhte IGF-1- als auch IGF-2-Spiegel nachgewiesen werden [145]. Da für Somatostatin-Analoga kein ausgeprägter antikanzerogener Effekt in IGF-1 abhängigen Tumoren nachgewiesen werden konnte, wurde eine Vielzahl an GHRH-Antagonisten entwickelt [185, 201], deren antiproliferative Wirkung auf Tumorzellen in zahlreichen Studien belegt wurde [155].

1.4.2 Die Wirkung von GHRH auf Tumorzellen

In den 90er Jahren gelang der Nachweis einer GHRH-Expression in peripheren Geweben und Tumorentitäten, u. a. auch im Mammakarzinom [79]. In Tumorzellen fungiert GHRH – unabhängig von der somatotropen Achse – als autokriner und parakriner Wachstumsfaktor. So konnten Schally und Kollegen zeigen, dass die Behandlung von Tumorzellen *in vitro* mit GHRH das Zellwachstum steigert. Dabei wirkt GHRH direkt proliferationsfördernd auf Tumorzellen und stimuliert zusätzlich die lokale Bildung von IGF-1 und IGF-2 [155]. Diese Wirkung wird über den GHRH-R und dessen Splicevarianten vermittelt, die auf der Oberfläche von Tumorzellen exprimiert werden. Hierbei dominiert die Splicevariante1 (SV1), die sich strukturell am N-Terminus vom hypophysären GHRH-R unterscheidet [146]. Die Arbeitsgruppe von Köster untersuchte Gewebeproben aus triple-negativen Mammakarzinomen

und konnte in 70 % der Fälle mRNA für die SV1 nachweisen und in 25 % der Fälle die mRNA für den hypophysären GHRH-R [91]. Pozsgai und Kollegen untersuchten neun unterschiedliche Mammakarzinomzelllinien, darunter auch die triple-negativen Linien HCC1806 und MDA-MB-231. In allen Linien konnte die SV1 nachgewiesen werden. In sechs Zelllinien gelang zusätzlich der Nachweis des hypophysären GHRH-R [143]. Immunhistochemisch konnte eine SV1-Expression in 40 % aller Mammakarzinomentitäten gezeigt werden [26].

1.4.3 Der Wirkmechanismus von GHRH-Antagonisten

GHRH-Antagonisten werden durch das gezielte Austauschen einzelner Aminosäuren am N-Terminus des GHRH-Peptids synthetisiert [185]. Wie in Abb. 4 aufgezeigt, blockieren GHRH-Antagonisten den GHRH-R in der Adenohypophyse und somit die Freisetzung von GH und IGF-1; ein indirekter Mechanismus, der vor allem das Wachstum IGF-1-abhängiger Tumoren inhibiert.

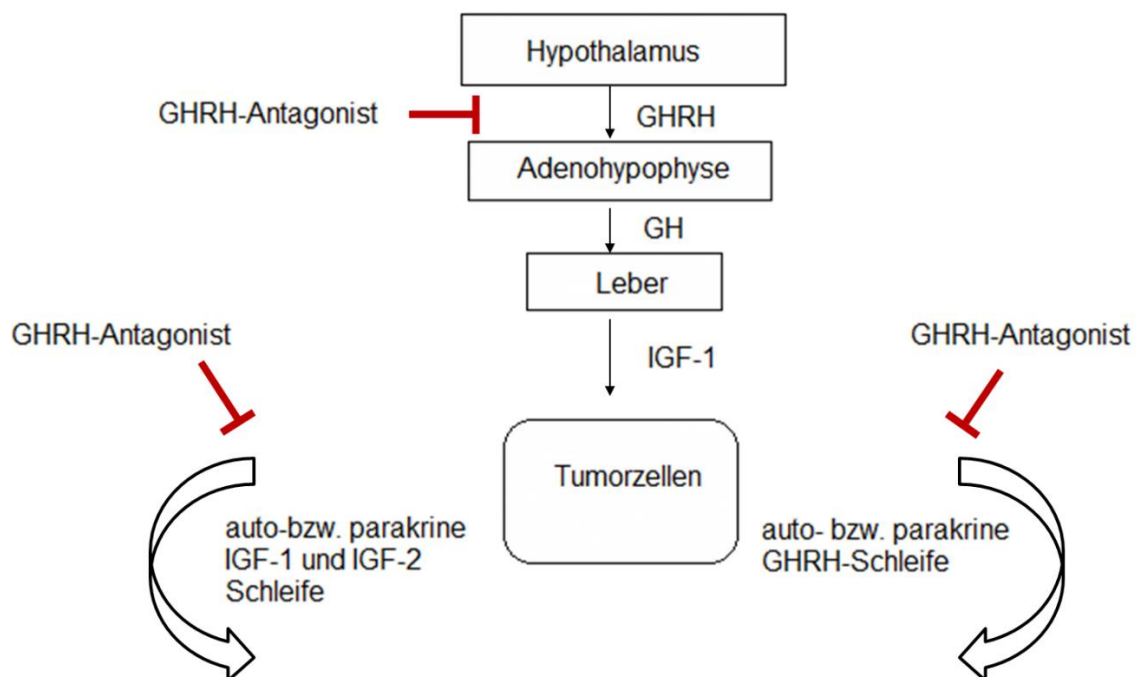


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Angriffspunkte von GHRH-Antagonisten. Über kompetitive Bindung an den GHRH-R und die SV1 supprimieren sie das Tumorzellwachstum. Abbildung erstellt nach Schally und Kollegen [155].

Zusätzlich wirken GHRH-Antagonisten direkt an der Tumorzelle, indem sie die autokrine und parakrine Wachstumsschleife durch GHRH selbst und somit auch durch intrinsisches IGF-1 und IGF-2 blockieren [155]. Es gibt immer mehr Evidenz, dass GHRH-Antagonisten zusätzlich auch proapoptotische Signalwege und den Zellzyklus beeinflussen [69, 144, 188].

MIA-602 ist ein synthetisch hergestellter GHRH-Antagonist aus dem *Endocrine, Polypeptide and Cancer Institute* (Professor Dr. [mult] Andrew V. Schally), *University of Miami*, Miami, FL, USA. Sowohl in Zellkulturen als auch in Tiermodellen inhibierte MIA-602 das Tumorzellwachstum signifikant und zeigte gleichzeitig eine gute Verträglichkeit [10, 155, 201]. Die Aminosäuresequenz von MIA-602 ist in Abb. 5 dargestellt.

Position	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
GHRH		Tyr	Ala	Asp	Ala	Ile	Phe	Thr	Asn	Ser	Tyr	Arg	Lys	Val	Leu	Gly
MIA-602	PhAc-Ada	■	D-Arg	■	■	■	Fpa5	■	Ala	Har	N-Me-Tyr	His	Orn	■	■	Abu
Position	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29		
GHRH		Gln	Leu	Ser	Ala	Arg	Lys	Leu	Leu	Gln	Asp	Ile	Met	Ser	Arg	NH ₂
MIA-602		■	■	■	■	His	Orn	■	■	■	■	■	Nle	D-Arg	Har	NH ₂

Abbildung 5: Vergleich der Aminosäuresequenz von GHRH(1-29)NH₂ und des GHRH-Antagonisten MIA-602. Identische Aminosäuren sind als Punkt dargestellt. Kodierte Aminosäuren sind im standardisierten Dreibuchstabencode abgekürzt. Weitere Abkürzungen: Abu: α -Aminobuttersäure, Ada: Aminododecanoyl, D-Arg: D-Arginin, Fpa₅: Pentafluoro-Phenylalanin, Har: Homoarginin, Nle: Norleucin, PhAc: Phenylacetyl, N-Me-Tyr: N-Methyl-Tyrosin Ether. Abbildung erstellt nach Zarandi und Kollegen [201].

1.4.4 Der Einfluss von GHRH-Antagonisten auf die EMT

Der Einfluss von GHRH-Antagonisten auf die EMT ist nur wenig untersucht. Popovics und Kollegen konnten zeigen, dass die Behandlung mit GHRH-Antagonisten in entzündeten Epithelzellen der Prostata nicht nur zu einer verminderten Zellproliferation, sondern auch zu einer verminderten Expression des mesenchymalen Markers N-Cadherin führte [140]. Bellyei und Kollegen demonstrierten, dass GHRH-Antagonisten die epitheliale Differenzierung der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-468 förderten [10].

1.5 Resveratrol

1.5.1 Einführung

Resveratrol (Trans-3,4,5-trihydroxystilben) ist ein sekundärer Pflanzenstoff und gehört zur Gruppe der Polyphenole. Es kommt vor allem in Weintrauben und Erdnüssen vor sowie – in geringeren Konzentrationen – in Beeren und Pilzen. Biologisch wirkt Resveratrol als Phytoalexin und ist damit Bestandteil des pflanzlichen Immunsystems [65]. Durch die epidemiologische Beobachtung in Südfrankreich, dass der Konsum von Rotwein das kardiovaskuläre Risiko senkt, rückte Resveratrol in den Fokus der populären Wissenschaft [147]. Zusätzlich zur kardioprotektiven Wirkung werden Resveratrol chemopräventive und antikanzerogene Wirkungen zugeschrieben [2].

1.5.2 Die chemopräventive Wirkung von Resveratrol

Chronische Entzündungen [4, 95] und oxidativer Stress [89, 94] sind Risikofaktoren für die Entstehung einer Krebserkrankung. Dabei gilt die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors NF- κ B als zentral [46, 95, 138]: NF- κ B induziert die Transkription zahlreicher proinflammatorischer Zytokine u. a. den Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und die Interleukine -1, -6, und -8. Auch die Cyclooxygenase-2 (COX-2), die die Synthese von Prostaglandinen katalysiert, wird verstärkt transkribiert. Des Weiteren wird die Transkription der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) über NF- κ B reguliert. Es kommt zur Freisetzung reaktiver oxidativer Substanzen (ROS), die zu mutagenen DNA-Schäden führen. Resveratrol unterdrückt die nukleäre Translokation von NF- κ B und wirkt dadurch stark antiinflammatorisch und antioxidativ [37, 131].

1.5.3 Die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol

Resveratrol besitzt zahlreiche antikanzerogene Eigenschaften. Der antiproliferative Effekt von Resveratrol ist auf die Fähigkeit zurückzuführen, den Zellzyklus zu arretieren und eine Apoptose einzuleiten. Zusätzlich wirkt Resveratrol antiangiogenetisch.

Die proapoptotischen Eigenschaften vermittelt Resveratrol auf zellulärer Ebene durch unterschiedliche Mechanismen. Auf der einen Seite stimuliert Resveratrol die Expression proapoptotischer Faktoren aus der Bcl-Familie, u. a. BAX und BAD, die

über die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und der darauffolgenden Aktivierung von Caspase 9 die Apoptose der Zelle einleiten [47, 180]. Des Weiteren bindet Resveratrol an den Fas-Rezeptor und führt somit zur autokatalytischen Aktivierung von Caspase 8, die ebenfalls den programmierten Zelltod einleitet [38]. Über den „Wächter des Genoms“ p53 interferiert Resveratrol mit dem Zellzyklus. p53 führt zu einer erhöhten Expression der Cyclin-abhängigen Kinase (CDK)-Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP1}, sodass es zu einem Zellzyklusarrest am Übergang von der G1- in die S-Phase kommt [3, 96, 161]. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass Resveratrol den Übergang von der G2- in die M-Phase unterbindet [126, 183]. Um bei zunehmendem Tumolvolumen ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden, produzieren Tumorzellen verstärkt den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF), der die Angiogenese im Umfeld des Tumors fördert. In zahlreichen Zelllinien konnte gezeigt werden, dass die antikanzerogene Wirkung von Resveratrol mit der Inhibition von VEGF assoziiert ist [105, 197, 203]. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit zu Östradiol (E2) besitzt Resveratrol eine Bindungsaffinität zum ER. Dennoch ist die Wirkung von Resveratrol als Phytoöstrogen umstritten, da sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen beobachtet werden konnten [5, 14].

Insgesamt spricht immer mehr dafür, dass die antikanzerogenen Effekte von Resveratrol dosisabhängig sind. In niedrigeren Konzentrationen wirkt Resveratrol vor allem in ER α -positiven Mammakarzinomzellen proliferationsfördernd und erst bei höheren Konzentrationen treten die antiproliferativen und somit auch die antikanzerogenen Effekte ein [118, 152, 175], wodurch die mittlere inhibitorische Konzentration (IC₅₀) nicht klar definierbar zu sein scheint [141].

1.5.4 Der Einfluss von Resveratrol auf die EMT

Zusätzlich zu den bereits beschriebenen antikanzerogenen Eigenschaften, beeinflusst Resveratrol auch die EMT. Bei der triple-negativen Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-231 führte die Behandlung mit Resveratrol zu einer erhöhten Expression von E-Cadherin, während Vimentin, SNAIL und SLUG herunterreguliert wurden [168]. Ähnliche Ergebnisse wurden auch für Gliome und Bronchialkarzinome gezeigt [162, 187].

1.6 Calcitriol

1.6.1 Einführung

Calcitriol (1,25-Dihydroxycholecalciferol) ist die biologisch aktive Form von Vitamin D₃, das über Bindung an den intrazellulären Vitamin-D-Rezeptor (VDR), den Kalzium- und Phosphathaushalt reguliert. Der Großteil des Vitamin-D-Bedarfs wird über endogene Synthese aus körpereigenem Cholesterin bereitgestellt. Dabei wird das in der Leber gespeicherte Cholesterin zu 7-Dehydrocholesterin umgebaut und in der Haut durch UVB-Strahlung aufgebrochen. Das entstandene Prävitamin D₃ isomerisiert spontan zu Cholecalciferol und wird über den Blutkreislauf zur Leber transportiert. Dort wird das C²⁵-Atom hydroxyliert, sodass 25-Hydroxycholecalciferol (Calcidiol) entsteht. Der letzte Schritt findet in der Niere statt: Über die 1 α -Hydroxylase wird das C¹-Atom hydroxyliert und es entsteht Calcitriol [64].

Zahlreiche Karzinomerkrankungen, so auch das Mammakarzinom, werden mit einem Vitamin-D-Mangel in Verbindung gebracht [71, 88, 170]. Sowohl *in vitro* als auch *in vivo* beeinflusst Calcitriol – neben der Kalziumhomöostase – auch Zellzyklus, Apoptose, Zelldifferenzierung und Metastasierung [11].

1.6.2 Die Wirkung von Calcitriol auf Tumorzellen

Die antikanzerogenen Effekte von Calcitriol werden hauptsächlich über den VDR vermittelt. Eine zentrale Rolle nimmt dabei der Zellzyklusarrest ein: Der aktivierte VDR erhöht als Transkriptionsfaktor die Expression der CDK-Inhibitoren p21^{WAF1/CIP1} und p27^{KIP1} und unterdrückt parallel die Transkription zahlreicher Cycline, sodass der Zellzyklus in der G1-Phase arretiert [77, 186]. Zusätzlich verhindert Calcitriol die Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins, das in dephosphoryliertem Zustand den Transkriptionsfaktor E2F inaktiviert und somit den Übergang von der G1- in die S-Phase des Zellzyklus unterbricht [50]. Seine proapoptotischen Effekte vermittelt Calcitriol über die Expression der proapoptotischen Faktoren BAX und BAD, die über zellinterne Prozesse den programmierten Zelltod auslösen [199]. Es gibt immer mehr Evidenz, dass Calcitriol über Modulation von MAP-Kinasen und des PI3K-Akt-Signalwegs ebenfalls antikanzerogen wirkt [16, 40].

Therapeutisch zeigte Calcitriol sowohl *in vitro* bei der ER-positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 als auch *in vivo* am Mausmodell eine deutliche Wachstumsrestriktion [171, 178]. In einer klinischen Studie wurde Calcitriol bereits an Patientin-

nen mit Mammakarzinom eingesetzt und lieferte vielversprechende Ergebnisse [202].

1.6.3 Der Einfluss von Calcitriol auf die EMT

In vitro führte die Behandlung von Kolon- und Ovarialkarzinomzellen mit Calcitriol zu einer epithelialen Differenzierung der Zellen. Adhäsionsmoleküle wie E-Cadherin wurden hochreguliert, während die Transkriptionsfaktoren SNAIL und SLUG inhibiert wurden [72, 130]. Diese Beobachtungen zeigten sich auch bei gleichzeitig induzierter EMT durch Gabe von TGF β [32, 148].

1.7 Zielsetzung

Um zielgerichtete Therapieoptionen für das triple-negative Mammakarzinom zu finden, wird verstärkt auf molekularer Ebene nach neuen Angriffspunkten gesucht. Hierbei gilt die EMT als wichtiger Prozess für die Metastasierung und die Entwicklung von Therapieresistenzen. Studienergebnisse über die antikanzerogene Wirkung von GHRH-Antagonisten, Resveratrol und Calcitriol stellen potenzielle Therapieansätze in Aussicht. In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob der GHRH-Antagonist MIA-602, das Phytoalexin Resveratrol und Calcitriol das Wachstum und die EMT von Mammakarzinomzellen beeinflussen. Die Versuche wurden mit den triple-negativen Mammakarzinomzelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 durchgeführt.

Ziel dieser Arbeit ist es, folgende Fragen zu beantworten:

- Wird das Wachstum von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?
- Wird die Migration von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?
- Reguliert die Behandlung mit dem GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol die Transkription und Proteinbiosynthese von EMT-Markern?
- Beeinflussen der GHRH-Antagonist MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol eine mit TGF β induzierte EMT?

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Zelllinien

Bezeichnung	Bezugsquelle
MDA-MB-231	LGC Standards, Wesel
HCC1806	

2.1.2 Zellkulturmedien, -zusätze und -zubehör

Bezeichnung	Bezugsquelle
RPMI 1640, 25 µM HEPES, L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Phosphat gepufferte Salzlösung (DPBS)	PAA Laboratories, Cölbe
Fötale Kälberserum (FCS)	
Penicillin/Streptomycin	
Trypsin-EDTA 0,05 %, UV-behandelt	
Trypanblau-Lösung (0,4 % w/v)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Serum Replacement 1 (50x)	
Bovines Serum Albumin (BSA)	
Magermilchpulver Difco™ Skim Milk	Difco Laboratories, Augsburg
Zellkulturflaschen 75 und 175 cm ²	Sarstedt, Nümbrecht
Zellzählgerät TC20™ Automated Cell Counter	Bio-Rad, München
Objektträger Dual Chamber for Cell Counter	

2.1.3 Allgemeine Labormaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Serologische Pipetten (5, 10, 25 ml), Cellstar	
Kryogefäße, 1,5 ml	Sarstedt, Nümbrecht
Gewebekulturplatten, 6, 12, 96-Well	
Pipettenspitzen mit und ohne Filter (10, 100, 1000 µl)	
Reaktionsgefäße (1,5, 2, 5 ml)	
Mehrfachdispenser Multipette Plus	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zellschaber	Biochrom, Berlin
Pasteurpipetten	Glaswarenfabrik Karl Hecht, Sondheim
Pipettierhilfe Accu-Jet	Brand, Wertheim

2.1.4 Laborgeräte

Bezeichnung	Bezugsquelle
Sterile Sicherheitswerkbank CleanAir BS-5726	CleanAir, Wören; Niederlande
CO ₂ -Inkubator NUAIRE US-Autoflow NU440-400 E	Integra Biosciences, Fernwald
Absaugpumpe Gel Pump GP110	Savant, New York, USA
Pipettierhilfe Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Wasserbad	Memmert, Schönaich
Vortex-Schüttler VWR 1719	VWR International, Darmstadt
Mikroskop (Wilovert A)	Hund, Wetzlar
Fotomikroskop Eclipse TS 100 mit Kamera Nikon Digital Sight DS-V3	Nikon, Düsseldorf
Kühlzentrifuge Sigma 2K15	Sigma, Osterode am Harz
Zentrifuge Universal 32	Hettich, Tuttlingen
Mikrozentrifuge Rotalibo®	Roth, Karlsruhe
Mikrozentrifuge MC6	Sarstedt, Nümbrecht
Horizontalschüttler Vibrax VXR S15	IKA Labortechnik, Staufen
Orbitalschüttler Shaker S4	ELMI Lab. Equipment, Riga, Lettland
Heizblock Thermomixer compact	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Feinwaage Scaltec SBC 21	Scaltec Instruments, Heiligenstadt
Laborwaage Sartorius basic BA310S	Sartorius, Göttingen
Magnetrührer MR82	Heidolph Instruments, Schwabach
Biometra Thermocycler TPersonal 48	Biometra, Göttingen
Echtzeit-PCR-Gerät DNA Engine Opticon 2	Bio-Rad, München
Spektralphotometer NanoDrop 2000c	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Mikroplattenleser Epoch	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall
Stromgeber PowerPac 200	Bio-Rad, München
Gelkammer Mini-Protean® Tetra Sys.	
Gel- und Blotimager ChemiDoc™	
Turboblotter Trans-Blot®Turbo	
Hoefer Semi Dry Transfer Unit TE 70	GE Healthcare, München
Flockeneisbereiter Icematic F80C	Icematic Deutschland, Düsseldorf

2.1.5 Zubehör mRNA-Expression

Bezeichnung	Bezugsquelle
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
Ultra Pure™ Distilled Water	Invitrogen, Karlsruhe
Superscript™ II Reverse Transcriptase-Kit	
Random Primer	
Platinum® SYBR® Green qPCR Super Mix UDG	
dNTP-Mix	Thermo Fisher Scientific, Bonn
96-Well Multiply® -PCR Platte	Sarstedt, Nümbrecht

2.1.6 Western-Blot - Zubehör

Bezeichnung	Bezugsquelle
BCA™ Protein Assay Kit	Pierce, Thermo Fisher Scientific, Bonn
Laemmli Sample Buffer; 4x	Bio-Rad, München
Precision Plus Protein Dual Colour Std.	
Protein Gele Mini-Protean® TGX™ Precast; 12 %	
PVDF (Polyvinylidenfluorid) Membran	
Laufpuffer	
Transferpuffer Trans-Blot® Turbo™ 5x	
Clarity Max Western ECL Substrate- Luminol Lösung	
Puffer Konzentrat; 10x TBS	
Puffer TBS mit 1 % Tween-20 (TBS-T)	
Primärantikörper EMT-Kit	Cell Signaling, Frankfurt a.M.
Filterpapier	Whatman, GE Healthcare, München
Sekundär-Antikörper Anti-Kaninchen	GE Healthcare, München
Filmkassette	Amersham, GE Healthcare, München
Hyperfilm ECL	
Immobilon-Western-Chemiluminescent HRP-Substrat	Millipore, Schwalbach
Röntgen Entwickler- und Fixiererkonz.	Adefo-Chemie, Dietzenbach
Wb Stripping-Lösung Re-Blot Plus, 10x	Chemicon International, Hofheim

2.1.7 Software

Bezeichnung	Bezugsquelle
Tabellenkalkulationsprogramm Microsoft Excel, 2010	Microsoft Corporation, 2010, Redmond, WA, USA
Statistik- und Graphiksoftware GraphPad Prism 4.03	GraphPad Software Inc, 2009, San Diego, CA, USA
Quantifizierungssoftware NanoDrop 2000	Thermo Fisher Scientific, 2016, Bremen
Datenanalysesoftware Gen5 2.05	BioTek Instruments, 2016, Bad Friedrichshall
Geldokumentationssoftware Herolab- EasyWin32®, Version 4.00.219	Herolab GmbH, Wiesloch
Bildgebungssoftware Nis-Elements Doc.	Nikon, Düsseldorf
Bildbearbeitungssoftware Adobe Photoshop CS	Adobe Systems, 2017, München
Analysesw. MJ OpticonMonitor™ Version 3.1	Bio-Rad, 2017, München

2.1.8 Chemikalien und Gebrauchslösungen

Bezeichnung	Bezugsquelle
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Methanol	Baker Chemikalien, Groß-Gerau
2-Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
TRIS-Puffer	Roth, Karlsruhe
Polysorbat Tween® 20	Merck, Darmstadt
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Phosphatase Inhibitor Cocktail	
Protease Inhibitor Cocktail	
Cell Titer 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (MTS)	Promega, Mannheim

2.1.9 Testsubstanzen

Bezeichnung	Bezugsquelle
GHRH-Antagonist MIA-602	Überlassen von Andrew V. Schally, University of Miami, FL, USA
Calcitriol	Biomol, Hamburg
Resveratrol	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
TGF-β1	R&D Systems, Wiesbaden

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur

Alle Zellbehandlungen wurden unter Verwendung steriler Reagenzien und Arbeitsmaterialien in einer sterilen Sicherheitswerkbank durchgeführt. Die adhären-ten Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 wurden in 175 cm² Zellkulturflaschen (T175) mit 25 ml Nährmedium (RMPI 1640 mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S, 10 000 Units/ml/ 10 mg/ml)) bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 % CO₂ kultiviert. Das Medium enthielt Phenolrot als Farbindikator, der bei einem Farbumschlag von rot zu gelb anzeigte, dass das Medium gewechselt werden sollte.

2.2.2 Passagieren der Zellen

Bei einer Konfluenz der Zellen von 80-90 % wurden die Zellen passagiert. Hierfür wurden die adhären-ten Zellen mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung (*Dulbecco's Phosphat Buffered Saline*, DPBS) gewaschen und für ca. 10 min mit einer

Trypsin-EDTA-Lösung (0,05 %) vom Boden der Kulturflasche gelöst. Die Reaktion wurde durch den Zusatz von 5 ml Nährmedium gestoppt und die Suspension für 5 min bei Raumtemperatur mit 1 500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt und das Zellpellet in 10 ml frischem Nährmedium resuspendiert. Je nach Teilungsrate der Zelllinien wurde ein Zehntel (MDA-MB-231) bis ein Fünftel (HCC1806) der Ausgangsmenge in eine neue T175-Zellkulturflasche mit 25 ml vorgelegtem angewärmten Nährmedium überführt.

2.2.3 Zählen der Zellen

Die Zellkonzentration wurde im automatischen Zellzählgerät (TC20™ Automated Cell Counter, Bio Rad, München) bestimmt. Dafür wurde die Zellsuspension 1:2 mit 0,4 % Trypanblau (Sigma Aldrich, Taufkirchen) verdünnt und 10 µl wurden auf einen Zählobjektträger (Dual Chamber for Cell Counter, Bio-Rad) pipettiert. Aufgrund des fehlenden Membranpotentials dringt der Farbstoff in tote Zellen ein und färbt sie blau, sodass sich diese von den lebenden Zellen unterscheiden lassen.

2.2.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen mit Trypsin vom Boden der Kulturflasche gelöst und zentrifugiert (siehe „Passagieren der Zellen“). Das Zellpellet wurde in Nährmedium resuspendiert, mit 0,1 Vol Dimethylsulfoxid (DMSO) gemischt und je 1 ml in einem Kryogefäß bei - 80 °C eingefroren.

Zum Auftauen wurde die Zellsuspension im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und die Zellsuspension mit 9 ml Nährmedium vermischt. Um das DMSO aus der Suspension zu entfernen, wurde diese mit 1 500 U/min für 5 min bei Raumtemperatur zentrifugiert, das Zellpellet in Nährmedium resuspendiert und in einer T175-Zellkulturflasche mit Nährmedium inkubiert.

2.2.5 Proliferationsassay

Die Wirkung der Testsubstanzen auf die Zellproliferation wurde im MTS-Zellproliferationsassay ermittelt. Hierbei wird der Umsatz metabolisch aktiver Zellen als ein Maß für die Menge aktiver Zellen und folglich für Proliferation der behandelten Kulturen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollkulturen gemessen.

2.2.5.1 Vorbehandlung der Zellen

700 Zellen/Loch wurden auf eine 96-Well-Platte ausgesät und im Nährmedium unter Standardbedingungen 24 h inkubiert. Die äußersten Spalten und Zeilen der Well-Platte wurden ausgelassen. Das Nährmedium wurde durch Behandlungsmedium ohne FCS (RPMI 1640-Medium mit 1 % P/S und 0,5-fach Serum Replacement (Sigma-Aldrich, Taufkirchen)) ersetzt und für weitere 24 h inkubiert (FCS-Entzug). Danach wurde das Medium gegen 100 µl-Ansätze der Testsubstanzen und Kontrollen in Behandlungsmedium getauscht. Dabei wurden jeweils 6 Löcher mit der gleichen Testsubstanz für 72 h unter Standardbedingungen inkubiert.

2.2.5.2 MTS-Assay

Zur Bestimmung der Zellproliferation wurde das Cell Titer 96[®] AQueous One Solution Cell Proliferation Assay-Kit (Promega, Mannheim) benutzt. Das Prinzip des Tests basiert auf der Reduktion des gelben MTS ([3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) zu braunem Formazan. Die MTS-Lösung wurde im Verhältnis 1:10 mit RPMI 1640-Medium mit 1 % P/S verdünnt, 100 µl in die vorher entleerten Wells pipettiert und für 30 s auf dem Horizontalschüttler geschüttelt. Danach wurden die Zellen für 1-4 h im Brutschrank inkubiert, bis die Lösung braun wurde. Die Farbintensitäten wurden im Mikroplattenleser (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) bei 490 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm photometrisch quantifiziert.

2.2.6 Migrationsassay

Um die Migration von Zellen zu untersuchen, wurden Scratch-Assays durchgeführt. Hierfür wurden 150 000 Zellen/Loch auf eine 12-Well-Platte ausgesät und unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 24 h wurde ein FCS-Entzug durchgeführt und nach weiteren 24 h die Zellen mit den Testsubstanzen in Behandlungsmedium behandelt. Unmittelbar nach der Behandlung (0 h) wurde eine Pipettenspitze (Quality Pipette Tips für 0,1 – 10 µl, Sarstedt, Nümbrecht) senkrecht durch den Zellrasen gezogen und somit eine Wunde (engl. *scratch*) erzeugt. Die Breite der Wunde wurde an gleicher Stelle in regelmäßigen Abständen im Mikroskop (Eclipse TS 100, Nikon, Düsseldorf) bei 40-facher Vergrößerung fotografiert. Zur quantitativen Beurteilung wurde während des Fotografierens eine µm-Skala (NIS-Elements

Documentation 3.2, Nikon, Düsseldorf) auf das Foto projiziert. Die Veränderung der Scratchbreite über die Zeit wurde prozentual berechnet.

2.2.7 Immunhistochemischer Proteinnachweis

Zur Detektion und Quantifizierung spezifischer Proteine wurden Western Blots durchgeführt. Dafür wurden Proteine isoliert, in der Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt, auf eine Membran transferiert und mit Antikörpern gebunden. Diese Bindung wurde mit einer Chemolumineszenzreaktion auf einem Film sichtbar gemacht.

2.2.7.1 Behandlung der Zellen für den Western Blot

Für die Proteinisolation wurden die Zelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 mit 300 000 Zellen pro Loch auf einer 6-Well-Platte ausgesät und bei Standardbedingungen in 2 ml Nährmedium pro Loch für 24 h inkubiert. Nach 24 h FCS-Entzug wurden die Zellen für 48 h mit den Testsubstanzen in Behandlungsmedium behandelt.

2.2.7.2 Proteinisolierung

Für die Proteinextraktion wurden die Zellen mit 150 µl RIPA-Puffer, mit 1,5 µl Phosphataseinhibitor-Cocktail und 1,5 µl Proteaseinhibitor-Cocktail (beide Sigma-Aldrich, Taufkirchen) pro Loch lysiert. Die Lysate wurden mit einem Zellschaber abgeschabt, mit einer Pipette homogenisiert, in ein Reaktionsgefäß überführt und dann für 1 h auf Eis inkubiert. Währenddessen wurden sie zweimal auf dem Vortex-Mischer für 10 s geschüttelt. Um Zellreste zu pelletieren, wurden die Lysate bei 4 °C mit 15 000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand mit dem Protein wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bei -80 °C eingefroren.

2.2.7.3 Quantifizierung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde im BCATM Protein Assay bestimmt. Der Assay beruht auf der Biuret-Methode. Hierbei werden in alkalischer Lösung zweiwertige Kupferionen durch die Peptidbindungen der Proteine zu einwertigen Kupferionen reduziert. Das einwertige Kupfer bildet Chelate mit jeweils zwei Molekülen Bicinchoninsäure (BCA), das die Lösung violett färbt.

Den Herstellerangaben entsprechend wurde eine Standardverdünnungsreihe von 20 – 2 000 µg/ml Protein aus bovinem Serumalbumin (BSA) in Wasser angefertigt. In Doppelbestimmungen wurden die Kavitäten einer 96-Well-Platte mit 10 µl des Proteinstandards bzw. 10 µl der Testproben befüllt. Die Proteinlysate wurden 1:10 mit Wasser verdünnt. Zu jedem Ansatz wurden 200 µl Arbeitsreagenz (BCA™ Reagenz A und BCA™ Reagenz B gemischt im Verhältnis 50:1, Thermo Fisher Scientific, Bonn) pipettiert. Die Proben wurden für 30 s auf dem Horizontalschüttler gemischt und für 30 min im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Die optische Dichte wurde bei 560 nm im Multiplate-Reader (BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) gemessen. Aus den Extinktionswerten der Standardreihe wurde eine Standardkurve erstellt (Gen5-Programm 2.05, 2016, BioTek Instruments, Bad Friedrichshall) und die Proteinkonzentration der Proben errechnet.

2.2.7.4 Probenvorbereitung für den Western Blot

Um eine Proteinmenge von 20 µg in 15 µl pro Tasche des Sammelgels auftragen zu können, wurden die Proteinlysate entsprechend ihrer Konzentration mit Wasser verdünnt. Die Ansätze wurden im Verhältnis 1:4 mit 4x Lämmli Auftragspuffer (Bio-Rad, München) gemischt, für 5 min bei 95 °C im Heizblock denaturiert und anschließend 1 min bei Raumtemperatur mit 10 000 U/min zentrifugiert.

2.2.7.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) werden die Proteine im elektrischen Feld aufgetrennt. Der Zusatz von Natriumdodecylsulfat (SDS) gleicht die unterschiedlichen Ladungen der Proteine aus, wodurch die Auftrennung ausschließlich durch das Molekulargewicht erfolgt.

Für die Gelelektrophorese wurde ein diskontinuierliches System verwendet. Das Gel besteht aus 4 %-igem Sammelgel und einem Trenngel mit 12 % Polyacrylamid. Das chemische Milieu im Sammelgel fokussiert die Proteine zu einer scharfen Bande.

2.2.7.6 Semi-Dry-Blot

Zwei Filterpapiere und eine in Methanol aktivierte Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran wurden für 5 min in Transferpuffer (Trans-Blot® Turbo™ 5x, Bio-Rad,) geschwenkt.

Für den Aufbau des Blots wurde das erste Filterpapier auf die Anodenplatte der Blotapparatur platziert. Darauf wurde die aktivierte PVDF-Membran, dann das Gel und abschließend das zweite Filterpapier gelegt. Mit einer Rolle wurden etwaige Luftblasen entfernt. Die Apparatur wurde mit der Kathodenplatte geschlossen. Die Proteine wurden bei einer Spannung von 20 V und einer Stromstärke von 200 mA innerhalb von 40 min auf die Membran übertragen.

2.2.7.7 Immundetektion

Der Blot wurde für 1 h in Tris-gepufferter Salzlösung mit Tween-20 (TBS-T) mit 5 % Trockenmilchpulver geschwenkt, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach 3 x 5 min Waschen in TBS-T wurde die Membran über Nacht mit dem Primärantikörper inkubiert. Die Verdünnungen der Primärantikörper wurden, wie in Tabelle 2 angegeben, mit 5 % Rinderserumalbumin (BSA) in TBS-T angesetzt. Die verwendeten Primärantikörper stammen aus dem EMT-Kit von Cell Signaling (*Epithelial-Mesenchymal Transition Antibody Sampler Kit*, Cell Signaling, Frankfurt a.M.). Nach der Antikörperinkubation wurde der Blot 3 x 5 min in TBS-T gewaschen und 1 h bei Raumtemperatur mit einem Meerrettich-Peroxidase (HRP) konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Für die Antikörper des EMT-Kits wurde ein Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper und für β -Aktin ein Anti-Maus-Sekundärantikörper verwendet. Die Verdünnungen der Sekundärantikörper wurden in 5 %-igem Trockenmilchpulver in TBS-T angesetzt (siehe Tab. 2).

Tabelle 2: Verdünnung der verwendeten Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Größe [kDa]	Verdünnung der Primärantikörper	Verdünnung der Sekundärantikörper
E-Cadherin	135	1: 10 000	1: 10 000
N-Cadherin	140	1: 2 000	1: 4 000
Claudin1	20	1: 2 000	1: 4 000
β -Aktin	42	1: 20 000	1: 10 000

Es folgte ein weiterer Waschschrift für 3 x 15 min in TBS-T. Um die Proteinbanden detektieren zu können, wurde die Membran für 5 min mit Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrat (Millipore, Schwalbach) überschichtet. Dieses Substrat oxidiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid das Luminol, welches dann Licht emittiert, das in einer Autoradiografie sichtbar gemacht wurde. Die Dauer der Filmexposition variierte nach jeweiligem Antikörper zwischen 30 s und 2 h. Zur Interpretation und Quantifizierung der Banden im Western Blot wurden mit dem Programm EasyWin32 (Herolab GmbH, Wiesloch) die Volumina der Schwärzungen verglichen.

2.2.8 Vergleich der mRNA-Expression

Die RNA wurde aus behandelten Zellen isoliert, in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben und in einer Real-Time PCR (qPCR) quantifiziert.

2.2.8.1 Behandlung der Zellen für mRNA Quantifizierung

Es wurden 400 000 Zellen pro Loch auf einer 6-Well-Platte ausgesät und für 24 h unter Standardbedingungen inkubiert. Nach einem 24-stündigen FCS-Entzug wurden die Zellen für 2 h mit den Testsubstanzen in Behandlungsmedium behandelt.

2.2.8.2 RNA Isolierung

Die RNA wurde den Herstellerangaben entsprechend mit dem RNeasy[®] Plus Mini Kit (Qiagen, Hilden) isoliert. Die Konzentration wurde im NanoDrop[™] 2000/2000c Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen) gemessen, die Reinheit der RNA anhand der Ratio von 260 nm/280 nm bestimmt und Proben mit einem Wert um 2,0 für weitere Analysen verwendet. Die RNA wurde bei -20 °C eingefroren.

2.2.8.3 Reverse Transkription

1 µg der RNA wurde mit 1 µl Random Primer und 1 µl Desoxynucleosidtriphosphat-Mix (dNTP-Mix) mit RNase-freiem Wasser ad 12 µl aufgefüllt. Dieser Mix wurde für 5 min bei 65 °C denaturiert, danach auf Eis gestellt und das Gefäß kurz zentrifugiert. Zu jeder Probe wurden 4 µl 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCL; 375 mM KCl; 15 mM MgCl₂) und 2 µl 0,1 M Dithiothreitol (DTT) hinzugefügt und für 2 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde in jede Probe 1 µl SuperScript[™] II Reverse

Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) eingemischt. Um die Primerhybridisierung an die cDNA zu gewährleisten, wurden die Proben für 10 min bei 25 °C inkubiert. Die cDNA-Synthese erfolgte bei 42 °C für 50 min und wurde bei 70 °C für 15 min gestoppt. Um eine mögliche DNA-Kontamination zu kontrollieren, wurde ein Ansatz ohne die Zugabe reverser Transkriptase mitgeführt (rT-minus-Kontrolle). Die cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.2.8.4 Quantitative Real-Time PCR

Mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) können definierte DNA-Abschnitte in Temperaturzyklen exponentiell amplifiziert werden. Ein Zyklus besteht aus den Einzelschritten Denaturierung, Primeranlagerung und Polymerisation. Bei der quantitativen PCR (qPCR) wird nach jedem Zyklus die Menge doppelsträngiger DNA mit einer Messoptik anhand des eingelagerten DNA-Fluoreszenzfarbstoffs SYBR-Green quantifiziert. Das Fluoreszenzsignal ist somit proportional zu der Menge der amplifizierten DNA. Wenn das fluoreszierende Signal einen bestimmten Schwellenwert überschreitet, gibt die Anzahl der benötigten Zyklen Rückschluss auf die anfänglich eingesetzte Menge der entsprechenden genspezifischen mRNA. Die Zykluszahlen (ct) behandelter Proben wurden mit denen von einem parallel amplifizierten Housekeeping-Gen normalisiert und mit den ct-Werten unbehandelter Proben verglichen. Als Housekeeping-Gen diente die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1 (HPRT1). Die verwendeten Primer sind in Tab. 3 aufgeführt.

Die cDNA wurde im Verhältnis 1:10 mit RNase-freiem Wasser verdünnt. Jeweils 4 µl der verdünnten cDNA wurden in die Kavitäten einer 96-Well-Multiply-PCR-Platte vorgelegt. Für jedes Loch wurde ein Mastermix aus 12,5 µl GoTaq®, 0,5 µl eines 10 µM Primer-Mix (forward und reverse) und 8 µl RNase-freiem Wasser vorbereitet und auf die cDNA pipettiert. Die rT-minus-Kontrolle und eine H₂O Kontrolle ohne DNA wurden mitgeführt. Die PCR-Platte wurde mit einer Folie luftdicht verschlossen und für 1 min bei 1 000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Platte in den PCR-Cycler (DNA Engine Opticon 2, Biozym, Oldendorf) gestellt und die qPCR gestartet. Das qPCR-Protokoll ist Tab. 4 zu entnehmen.

Um die Reinheit des PCR-Produktes zu bestimmen, wurde eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dafür wurde die Temperatur unter kontinuierlicher Fluoreszenzmessung stetig bis auf 90 °C erhöht. Bei einer für das Produkt spezifischen

Schmelztemperatur denaturiert der Doppelstrang vollständig zu Einzelsträngen und der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff wird freigesetzt.

Tabelle 3: Verwendete Primer

Gen	Basensequenz (5´-3´)	Amplikonlänge (bp)
HPRT1	forward Primer: TCAGGCAGTATAATCCAAAGATGGT reverse Primer: AGTCTGGCTTATATCCAACACTTCG	84
SNAIL	forward Primer: ACTGCAACAAGGAATACCTCAG reverse Primer: GCACTGGTACTTCTTGACATCTG	242
SLUG	forward Primer: GCCTCCAAAAAGCCAAACTA reverse Primer: CACAGTGATGGGGCTGTATG	138
Vimentin	forward Primer: AGTCCACTGAGTACCGGAGAC reverse Primer: CATTTCACGCATCTGGCGTTC	98
N-Cadherin	forward Primer: AGCCAACCTTAACTGAGGAGT reverse Primer: GGCAAGTTGATTGGAGGGATG	136
Claudin1	forward Primer: CCGTTGGCATGAAGTGTATG reverse Primer: AGCCAGACCTGCAAGAAGAA	101

Tabelle 4: qPCR-Protokoll

Schritt	Beschreibung	Temperatur	Dauer
1	initiale Denaturierung	95 °C	2 min
2	Denaturierung	95 °C	8 s
3	Primerhybridisierung	60 °C	10 s
4	Elongation	72 °C	20 s
5	Schmelzkurvenanalyse	60 °C – 90 °C	1°C/s

} 43 x

2.2.8.5 Auswertung

Zur relativen Quantifizierung der mRNA wurde die Methode nach Pfaffl (siehe Abb. 6) im Programm REST-MCS (*relative expression software tool*) benutzt. Die Effizienz wurde approximativ als 2 angenommen.

$$R = \frac{(E_{\text{Zielgen}})\Delta Ct_{\text{Zielgen}}^{(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}{(E_{\text{Referenzgen}})\Delta Ct_{\text{Referenzgen}}^{(MW \text{ Kontrolle} - MW \text{ Behandlung})}}$$

Abb. 6: Relative Quantifizierung nach Pfaffl

2.2.9 Statistik

Alle Versuche wurden unabhängig voneinander dreimal wiederholt. Zur statistischen Auswertung wurden die Softwares *GraphPad Prism* (Version 4.03) und *Microsoft Excel 2010* verwendet. Beim Vergleich von zwei Datensätzen wurde ein ungepaarter t-Test durchgeführt. Als statistisch signifikant galten p-Werte < 0,05. Das Signifikanzniveau ist mit *p < 0,05, **p < 0,01 und ***p < 0,001 angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Einfluss auf das Zellwachstum

Das Zellwachstum der Brustkrebszelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 sollte unter Einfluss des GHRH-Antagonisten MIA-602, von Resveratrol und Calcitriol untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss in Kombination mit TGF β untersucht werden, um den Effekt der potenziellen Medikamente auch in Bezug auf eine TGF β -induzierte EMT analysieren zu können.

3.1.1 Einfluss eines GHRH-Antagonisten auf das Zellwachstum

Der GHRH-Antagonist MIA-602 inhibierte das Wachstum in den Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO (siehe Abb. 7). Bei HCC1806 inhibierte 1 μ M MIA-602 das Zellwachstum auf 77 % \pm 6 % ($p \leq 0,008$) und bei MDA-MB-231 auf 80 % \pm 3 % ($p \leq 0,001$).

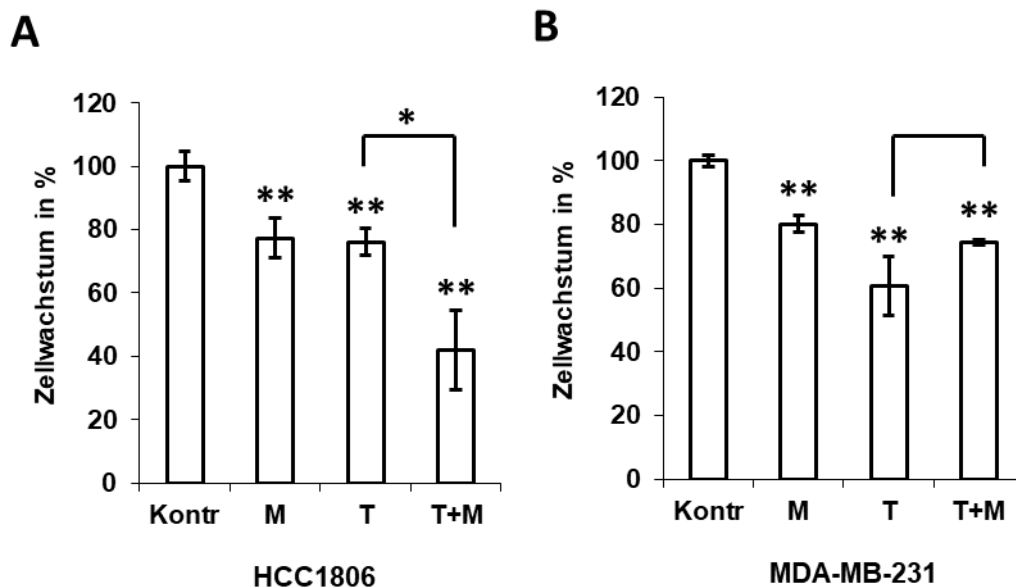


Abbildung 7: Einfluss von 1 μ M des GHRH-Antagonisten MIA-602 (M), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+M) auf das Wachstum der Zelllinien HCC1806 (A) und MDA-MB-231 (B) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,033 % DMSO. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Sechsfachbestimmung dar. Die Standardabweichungen (\pm) und die P-Werte resultieren aus den drei gemittelten Werten. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

5 ng/ml TGF β inhibierte das Zellwachstum bei HCC1806 auf 76 % \pm 4 % ($p \leq 0,003$) und bei MDA-MB-231 auf 61 % \pm 9 % ($p \leq 0,003$). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle inhibierte die Kombinationsbehandlung aus 5 ng/ml TGF β und 1 μ M MIA-602 das Zellwachstum der Zelllinie HCC1806 auf 42 % \pm 13 % ($p \leq 0,009$) und das Zellwachstum von MDA-MB-231 auf 74 % \pm 1 % ($p \leq 0,002$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β inhibierte die Kombinationsbehandlung das Wachstum von HCC1806 signifikant ($p \leq 0,031$). Bei der Zelllinie MDA-MB-231 erzielte die Kombination im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β keinen signifikanten Unterschied ($p \leq 0,057$).

3.1.2 Einfluss von Resveratrol auf das Zellwachstum

Resveratrol inhibierte das Wachstum beider Zelllinien signifikant (siehe Abb. 8). 10 μ M Resveratrol inhibierte das Wachstum der Zelllinie HCC1806 auf 65 % \pm 9 % ($p \leq 0,012$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO und 25 μ M Resveratrol auf 16 % \pm 7 % ($p < 0,0001$). Bei MDA-MB-231 wurde das Wachstum durch 10 μ M Resveratrol auf 71 % \pm 4 % ($p \leq 0,002$) gesenkt und durch 25 μ M Resveratrol auf 36 % \pm 3 % ($p < 0,0001$). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β hemmte das Zellwachstum beider Zelllinien signifikant auf 76 % \pm 4 % ($p \leq 0,003$) bzw. auf 61 % \pm 9 % ($p \leq 0,003$). Im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle inhibierte die Kombinationsbehandlung aus 5 ng/ml TGF β und 10 μ M Resveratrol das Zellwachstum der Zelllinie HCC1806 auf 27 % \pm 12 % ($p \leq 0,005$) und die Kombination mit 25 μ M Resveratrol auf 16 % \pm 4 % ($p \leq 0,001$). Bei MDA-MB-231 führte die Kombinationsbehandlung von TGF β und 10 μ M Resveratrol zu einer Wachstumsinhibition auf 92 % \pm 5 % ($p \leq 0,12$) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle und die Kombination von TGF β und 25 μ M Resveratrol zu einer Wachstumsrestriktion auf 43 % \pm 3 % ($p \leq 0,001$). Bei HCC1806 inhibierte die Kombination von 5 ng/ml TGF β mit 10 μ M bzw. 25 μ M Resveratrol das Zellwachstum signifikant stärker als die Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β ($p \leq 0,012$, $p < 0,0001$). Bei den MDA-MB-231-Zellen konnte nur die Kombination von 5 ng/ml TGF β mit 25 μ M Resveratrol das Zellwachstum, im Vergleich zur TGF β -Einzelbehandlung, signifikant reduzieren ($p \leq 0,03$). Die Kombination mit 10 μ M Resveratrol führte zu einem signifikant verstärkten Zellwachstum ($p \leq 0,03$).

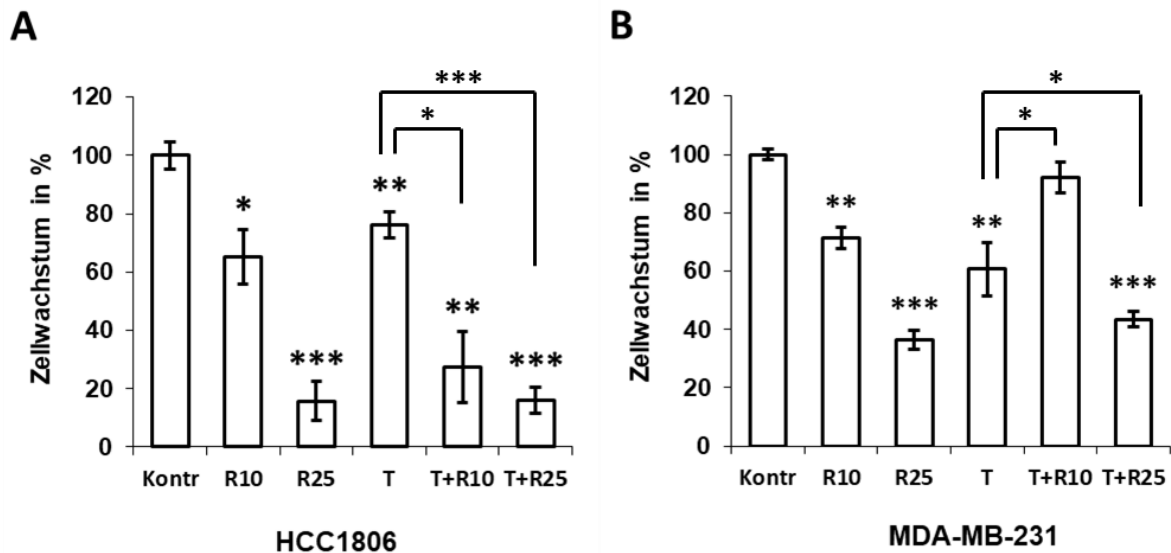


Abbildung 8: Einfluss von 10 μM und 25 μM Resveratrol (R10, R25), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination auf das Wachstum der Zelllinien HCC1806 (A) und MDA-MB-231 (B) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,033 % DMSO. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Sechsfachbestimmung dar. Die Standardabweichungen (\pm) und die P-Werte resultieren aus den drei gemittelten Werten. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ und *** $p < 0,001$.

3.1.3 Einfluss von Calcitriol auf das Zellwachstum

1 μM Calcitriol inhibierte das Zellwachstum weder bei der Zelllinie HCC1806 ($p \leq 0,7$) noch bei der Zelllinie MDA-MB-231 ($p \leq 0,3$) signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,05 % Ethanol (siehe Abb. 9). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β führte bei beiden Zellreihen zu einer signifikanten Inhibition im Vergleich zur Kontrolle. Bei HCC1806 verringerte 5ng/ml TGF β das Zellwachstum auf 83 % \pm 5 % ($p \leq 0,008$), bei MDA-MB-231 wurde das Wachstum auf 61 % \pm 10 % ($p \leq 0,003$) gesenkt. Die Kombinationsbehandlung aus 5 ng/ml TGF β und 1 μM Calcitriol inhibierte das Zellwachstum bei beiden Zelllinien signifikant verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle, bei der Zelllinie HCC1806 auf 76 % \pm 2 % ($p \leq 0,002$) und bei MDA-MB-231 auf 78 % \pm 3 % ($p \leq 0,002$). Bei HCC1806 inhibierte die Kombinationsbehandlung das Zellwachstum jedoch nicht signifikant im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β ($p \leq 0,7$). Bei MDA-MB-231 führte die Kombinationsbehandlung zu einem signifikant erhöhten Zellwachstum ($p \leq 0,04$) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β .

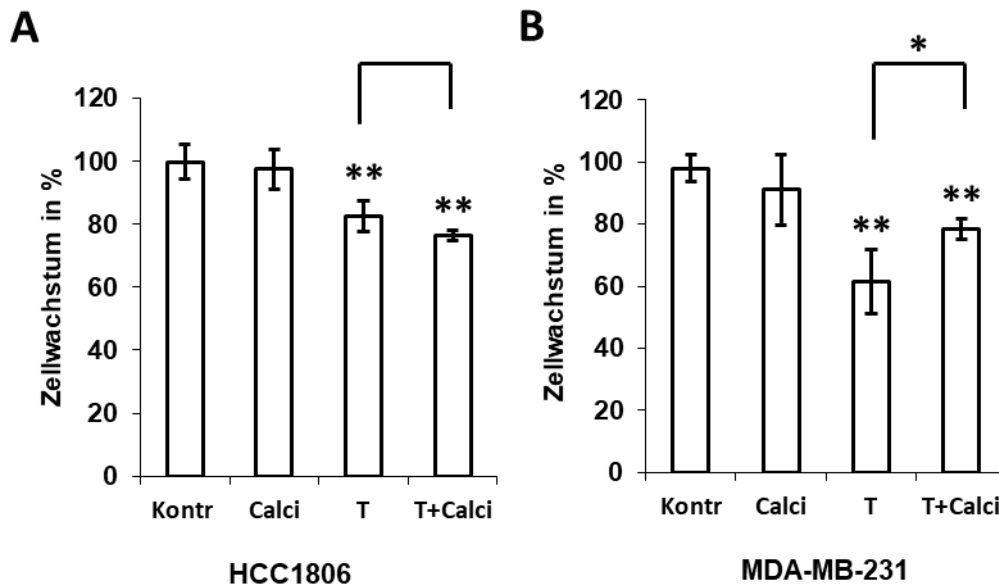


Abbildung 9: Einfluss von 1 μM Calcitriol (Calci), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination auf das Wachstum der Zelllinien HCC1806 (A) und MDA-MB-231 (B) in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,05 % Ethanol. Die Balken stellen die Mittelwerte aus drei unabhängigen Versuchen mit Sechsfachbestimmung dar. Die Standardabweichungen (\pm) und die P-Werte resultieren aus den drei gemittelten Werten. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$ und ** $p < 0,01$.

3.2. Einfluss auf die Zellmigration

Das Migrationsverhalten der Brustkrebszelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 sollte unter Einfluss der potenziellen Medikamente Resveratrol, des GHRH-Antagonisten MIA-602 und Calcitriol untersucht werden. Zudem sollte der Einfluss in Kombination mit TGF β untersucht werden, um die Wirkung auch in Bezug auf eine TGF β -induzierte EMT analysieren zu können.

3.2.1 Einfluss des GHRH-Antagonisten MIA-602 auf die Zellmigration

Der GHRH-Antagonist MIA-602 inhibierte die Migration der Zelllinien HCC1806 (siehe Abb. 10) und MDA-MB-231 (siehe Abb. 11) signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO. Durch die Behandlung mit 1 μM MIA-602 waren bei der Zelllinie HCC1806 nach 24 h 81 % \pm 2 % des Scratches nicht zugewachsen (Kontr. 36 % \pm 6 %; $p \leq 0,002$) und nach 48 h waren 67 % \pm 5 % des Scratches weiterhin offen (Kontr. 16 % \pm 2 %; $p \leq 0,002$). Bei der Zelllinie MDA-MB-

231 waren nach 24 h $76 \% \pm 5 \%$ der Ausgangsbreite nicht zugewachsen (Kontr. $33 \% \pm 3 \%$; $p \leq 0,0001$) und nach 48 h $63 \% \pm 5 \%$ weiterhin offen (Kontr. $24 \% \pm 12 \%$; $p \leq 0,02$). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β führte bei beiden Zelllinien zu einer gesteigerten Zellmigration. Bei HCC1806 waren nach 24 h $7 \% \pm 1 \%$

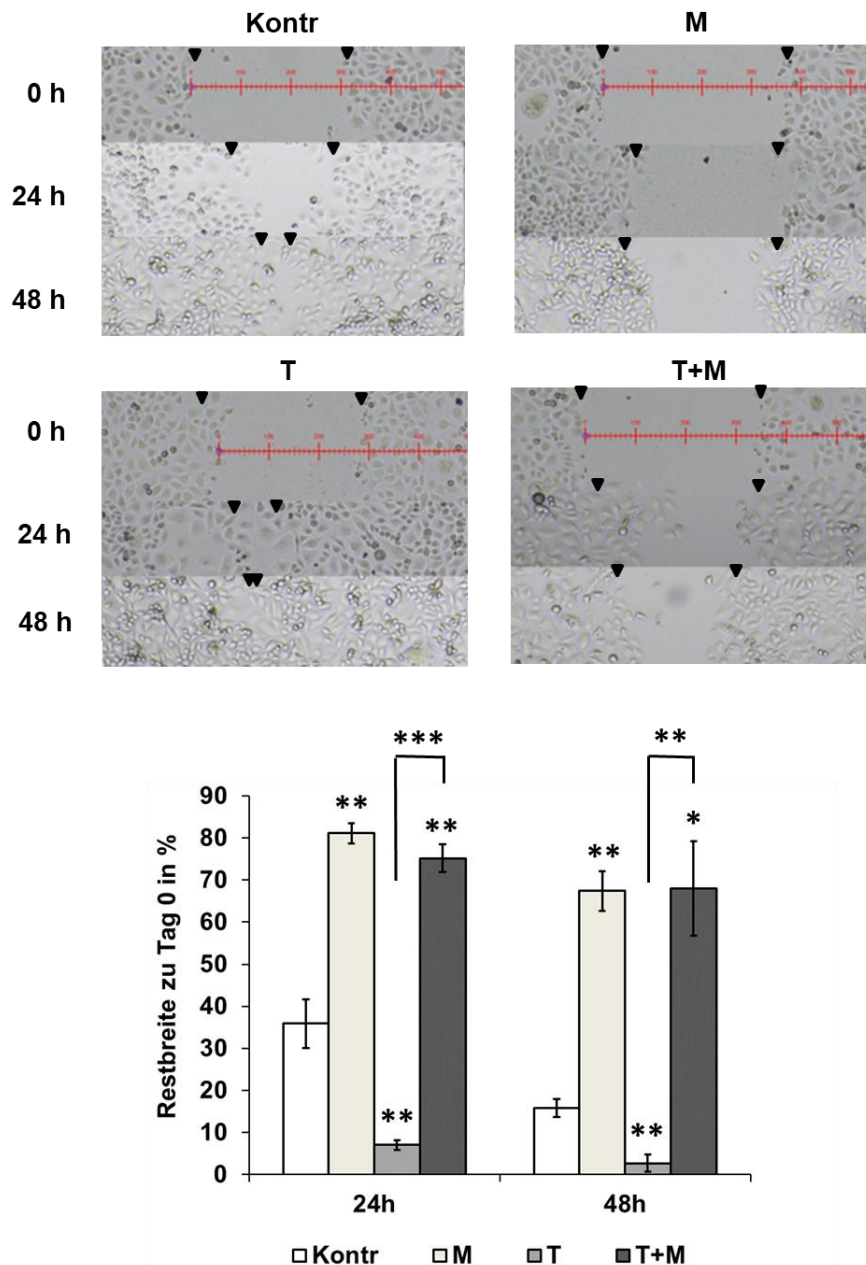


Abbildung 10: Einfluss von 1 μM des GHRH-Antagonisten MIA-602 (M), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+M) auf die Zellmigration der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,033 % DMSO nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

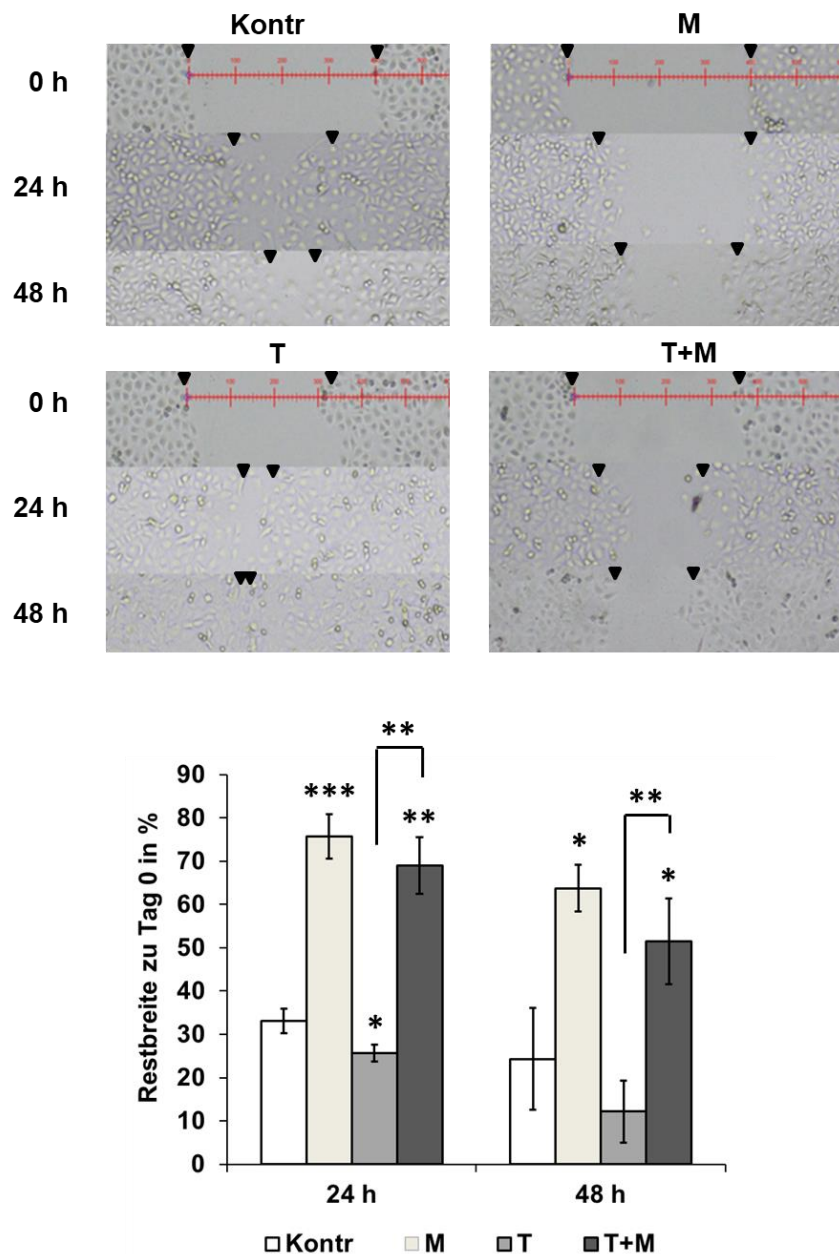


Abbildung 11: Einfluss von 1 μM des GHRH-Antagonisten MIA-602 (M), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+M) auf die Zellmigration der Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,033 % DMSO nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

des Scratches offen ($p \leq 0,01$), nach 48 h 3 % \pm 2 % ($p \leq 0,003$). Bei MDA-MB-231 waren nach 24 h noch 25 % \pm 2 % des Scratches offen ($p \leq 0,02$) und nach 48 h 12 % \pm 7 % ($p \leq 0,2$). Die Kombinationsbehandlung von 1 μM MIA-602 und 5 ng/ml TGF β inhibierte die Migration beider Zelllinien im Vergleich zur Kontrolle. Bei der

Zelllinie HCC1806 waren nach 24 h noch 75 % \pm 3 % des Scratches offen ($p \leq 0,0014$) und nach 48 h noch 68 % \pm 11 % ($p \leq 0,019$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β war der Scratch mit der Kombinationsbehandlung sowohl nach 24 h ($p \leq 0,0002$) als auch nach 48 h ($p \leq 0,01$) signifikant breiter. Bei MDA-MB-231 waren 24 h nach der Kombinationsbehandlung noch 69 % \pm 6 % des Scratches offen ($p \leq 0,004$) und nach 48 h 51 % \pm 10 % ($p \leq 0,04$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β war der Scratch auch in dieser Zelllinie nach 24 h ($p \leq 0,004$) und nach 48 h ($p \leq 0,006$) signifikant breiter.

3.2.2 Einfluss von Resveratrol auf die Zellmigration

Die Behandlung mit 10 μ M Resveratrol beeinflusste das Migrationsverhalten der Zelllinie HCC1806 nicht signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO. Nach 24 h waren 32 % \pm 5 % des Scratches offen (Kontr. 36 % \pm 6 %; $p \leq 0,44$) und nach 48 h waren 20 % \pm 6 % des Scratches nicht zugewachsen (Kontr. 16 % \pm 2 %; $p \leq 0,25$). 25 μ M Resveratrol inhibierte die Zellmigration bei HCC1806 signifikant. Nach 24 h waren 66 % \pm 5 % ($p \leq 0,003$) des Scratches nicht zugewachsen und nach 48 h waren 49 % \pm 10 % offen ($p \leq 0,04$). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β führte zu einer erhöhten Zellmigration verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Nach 24 h waren 7 % \pm 1 % des Scratches offen ($p \leq 0,01$), nach 48 h 3 % \pm 2 % ($p \leq 0,003$). Die Kombination von 10 bzw. 25 μ M Resveratrol und 5 ng/ml TGF β inhibierte die Zellmigration. 24 h nach der Behandlung mit 10 μ M Resveratrol und TGF β waren noch 56 % \pm 12 % des Scratches offen ($p \leq 0,07$) und nach 48 h 71 % \pm 5 % ($p \leq 0,006$). 24 h nach der Behandlung mit 25 μ M Resveratrol und TGF β waren 81 % \pm 6 % ($p \leq 0,007$) des Scratches nicht zugewachsen und nach 48 h waren 74 % \pm 6 % offen ($p \leq 0,0012$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β inhibierte die Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Resveratrol die Zellmigration zu beiden Zeitpunkten signifikant ($p \leq 0,017$, $p \leq 0,004$). Die Kombination mit 25 μ M Resveratrol reduzierte die Zellmigration ebenfalls zu beiden Zeitpunkten signifikant verglichen mit TGF β ($p \leq 0,002$, $p \leq 0,0012$). Der Einfluss von Resveratrol auf die Zellmigration von HCC1806 ist in Abb. 12 dargestellt.

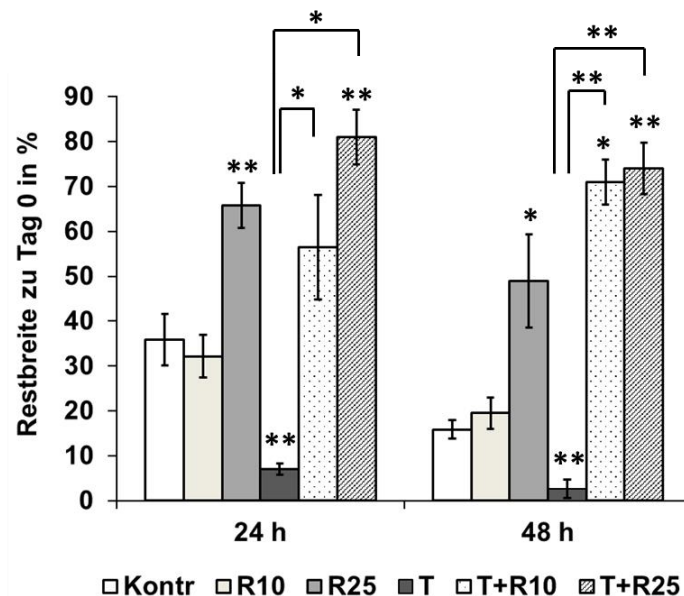
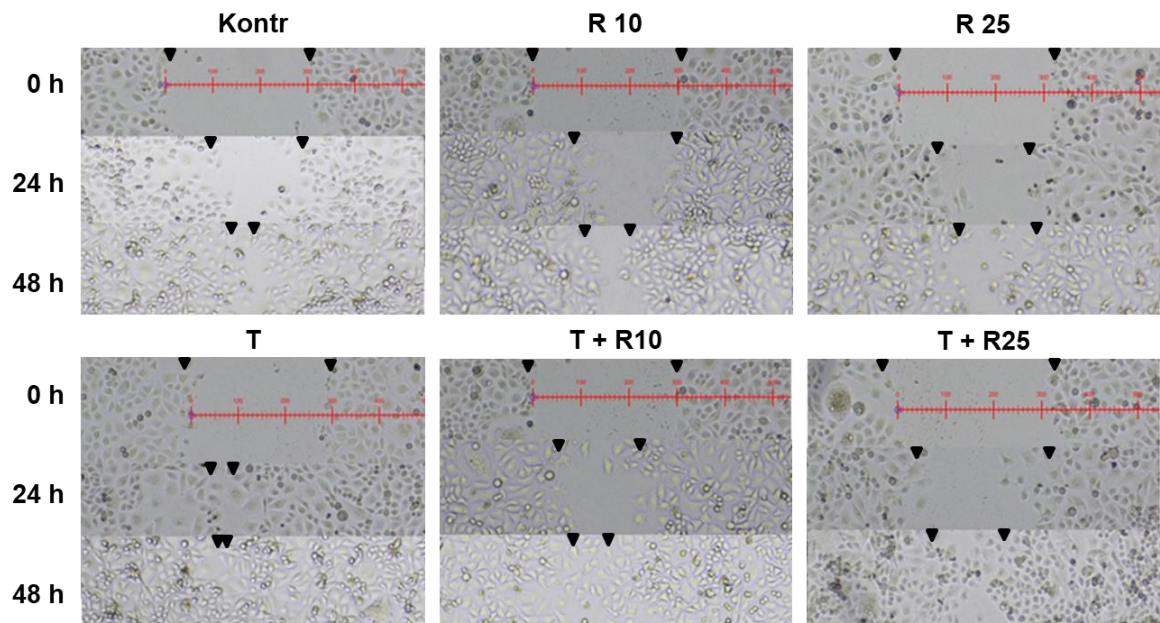


Abbildung 12: Einfluss von 10 μM (R10) und 25 μM Resveratrol (R25), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+R10, T+R25) auf die Zellmigration der Zelllinie HCC 1806 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,033 % DMSO nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

In der Zelllinie MDA-MB-231 beeinflusste die Behandlung mit 10 μM Resveratrol das Migrationsverhalten der Zellen nicht signifikant im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO. Nach 24 h waren 38 % \pm 6 % des Scratches offen

(Kontr. $33\% \pm 3\%$; $p \leq 0,3$) und nach 48 h $35\% \pm 22\%$ (Kontr. $24\% \pm 12\%$; $p \leq 0,5$). $25\ \mu\text{M}$ Resveratrol inhibierte die Zellmigration signifikant (siehe Abb. 13).

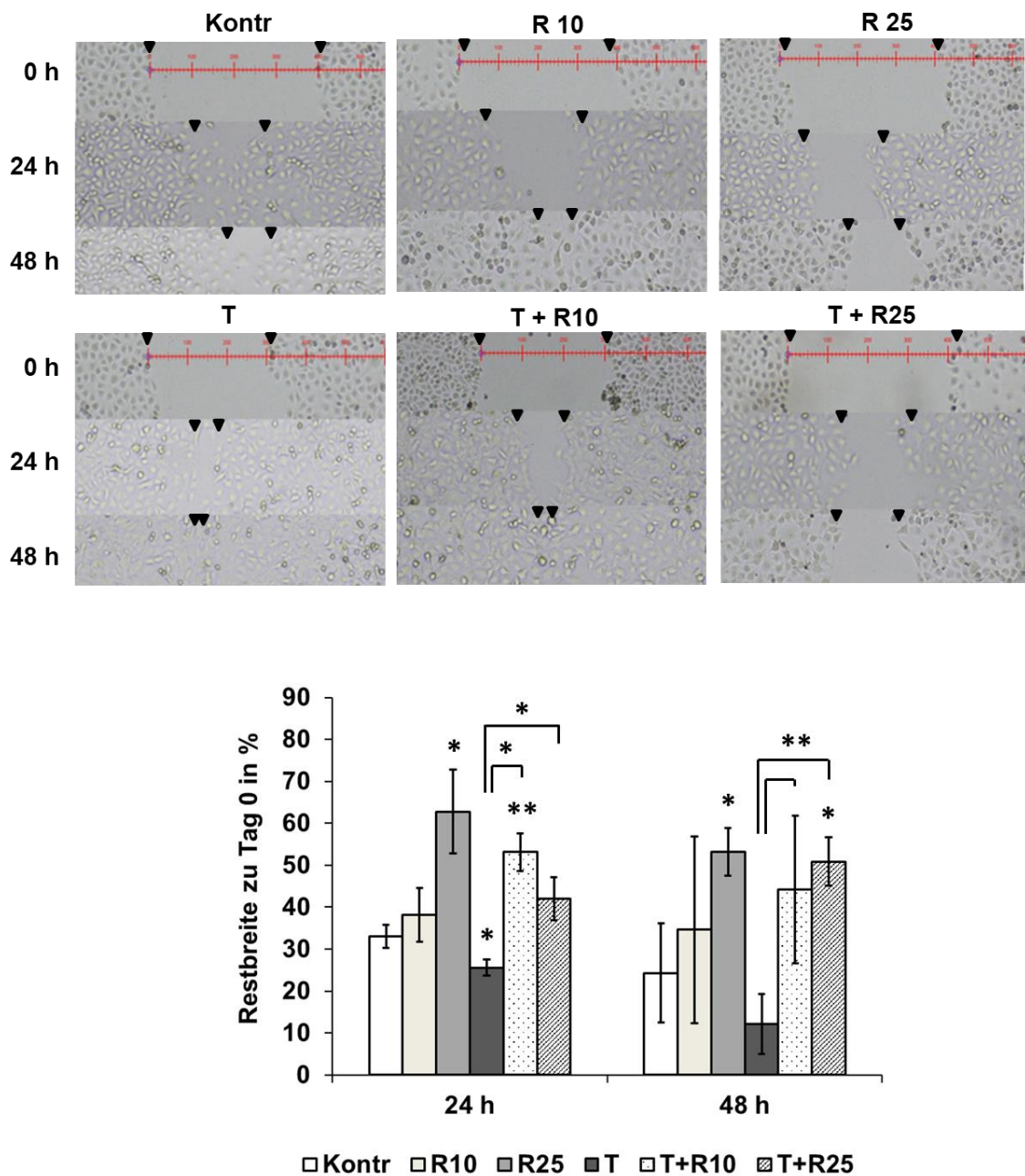


Abbildung 13: Einfluss von $10\ \mu\text{M}$ (R10) und $25\ \mu\text{M}$ Resveratrol (R25), $5\ \text{ng/ml}$ TGF β (T) sowie deren Kombination (T+R10, T+R25) auf die Zellmigration der Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit $0,033\%$ DMSO nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$.

Nach 24 h waren $63 \% \pm 10 \%$ des Scratches offen ($p \leq 0,03$) und nach 48 h $53 \% \pm 6 \%$ ($p \leq 0,03$). 5 ng/ml TGF β führte nur nach 24 h zu einer signifikant verstärkten Zellmigration. Nach 24 h waren noch $25 \% \pm 2 \%$ des Scratches offen ($p \leq 0,02$) und nach 48 h $12 \% \pm 7 \%$ ($p \leq 0,2$). Die Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Resveratrol und 5 ng/ml TGF β inhibierte die Zellmigration nach 24 h signifikant. $53 \% \pm 5 \%$ des Scratches waren offen ($p \leq 0,005$). Nach 48 h hatte diese Kombination keinen signifikanten Einfluss auf das Migrationsverhalten, $44 \% \pm 18 \%$ des Scratches waren nicht zugewachsen ($p \leq 0,19$). Die Kombination von 25 μ M Resveratrol und 5 ng/ml TGF β führte lediglich nach 48 h zu einer signifikanten Inhibition der Zellmigration. $51 \% \pm 6 \%$ des Scratches waren noch offen ($p \leq 0,04$). Nach 24 h waren $42 \% \pm 5 \%$ des Scratches offen ($p \leq 0,08$). Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β hatte die Kombination von 10 μ M Resveratrol zusammen mit 5 ng/ml TGF β nach 24 h einen inhibierenden Effekt auf die Zellmigration ($p \leq 0,003$), nach 48 h zeigte sich hier kein signifikanter Einfluss ($p \leq 0,07$). Die Kombination von 25 μ M Resveratrol und TGF β führte zu beiden Zeitpunkten zu einer signifikanten Inhibition der Zellmigration im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β ($p \leq 0,02$, $p \leq 0,002$).

3.2.3 Einfluss von Calcitriol auf die Zellmigration

1 μ M Calcitriol beeinflusste das Migrationsverhalten beider Zelllinien weder nach 24 h noch nach 48 h signifikant zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,05 % Ethanol. Bei HCC1806 waren nach 24 h $41 \% \pm 7 \%$ des Scratches offen (Kontr. $44 \% \pm 7 \%$; $p \leq 0,62$) und nach 48 h $33 \% \pm 1 \%$ (Kontr. $19 \% \pm 5 \%$; $p \leq 0,6$; siehe Abb. 14). Bei MDA-MB-231 waren nach 24 h $39 \% \pm 3 \%$ des Scratches offen (Kontr. $35 \% \pm 9 \%$; $p \leq 0,48$) und nach 48 h $42 \% \pm 12 \%$ (Kontr. $24 \% \pm 7 \%$; $p \leq 1,0$; siehe Abb. 15). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β führte nur bei HCC1806 zu einer signifikant gesteigerten Migration. Hier waren nach 24 h $7 \% \pm 1 \%$ des Scratches offen ($p \leq 0,006$), nach 48 h $3 \% \pm 2 \%$ ($p \leq 0,03$). Bei MDA-MB-231 waren nach 24 h $26 \% \pm 9 \%$ ($p \leq 0,21$) der Wundfläche nicht zugewachsen und nach 48 h $24 \% \pm 7 \%$ ($p \leq 0,12$). Die Kombinationsbehandlung von 1 μ M Calcitriol zusammen mit 5 ng/ml TGF β inhibierte die Zellmigration im Vergleich zur Kontrolle. Bei HCC1806 waren nach 24 h $76 \% \pm 3 \%$ ($p \leq 0,003$) der Fläche nicht zugewachsen und nach 48 h waren $66 \% \pm 1 \%$ offen ($p \leq 0,004$). Bei MDA-MB-231 waren nach 24 h $66 \% \pm 1 \%$ ($p \leq 0,03$) des Scratches offen und nach 48 h $32 \% \pm 6 \%$

($p \leq 0,29$). Die Kombinationsbehandlung aus Calcitriol und TGF β inhibierte die Zellmigration in der Zelllinie HCC1806 zu beiden Zeitpunkten signifikant im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β ($p \leq 0,0001$, $p \leq 0,0002$) und auch in der Zelllinie MDA-MB-231 zeigte sich zu beiden Zeitpunkten eine signifikant reduzierte Migration ($p \leq 0,014$, $p \leq 0,02$).

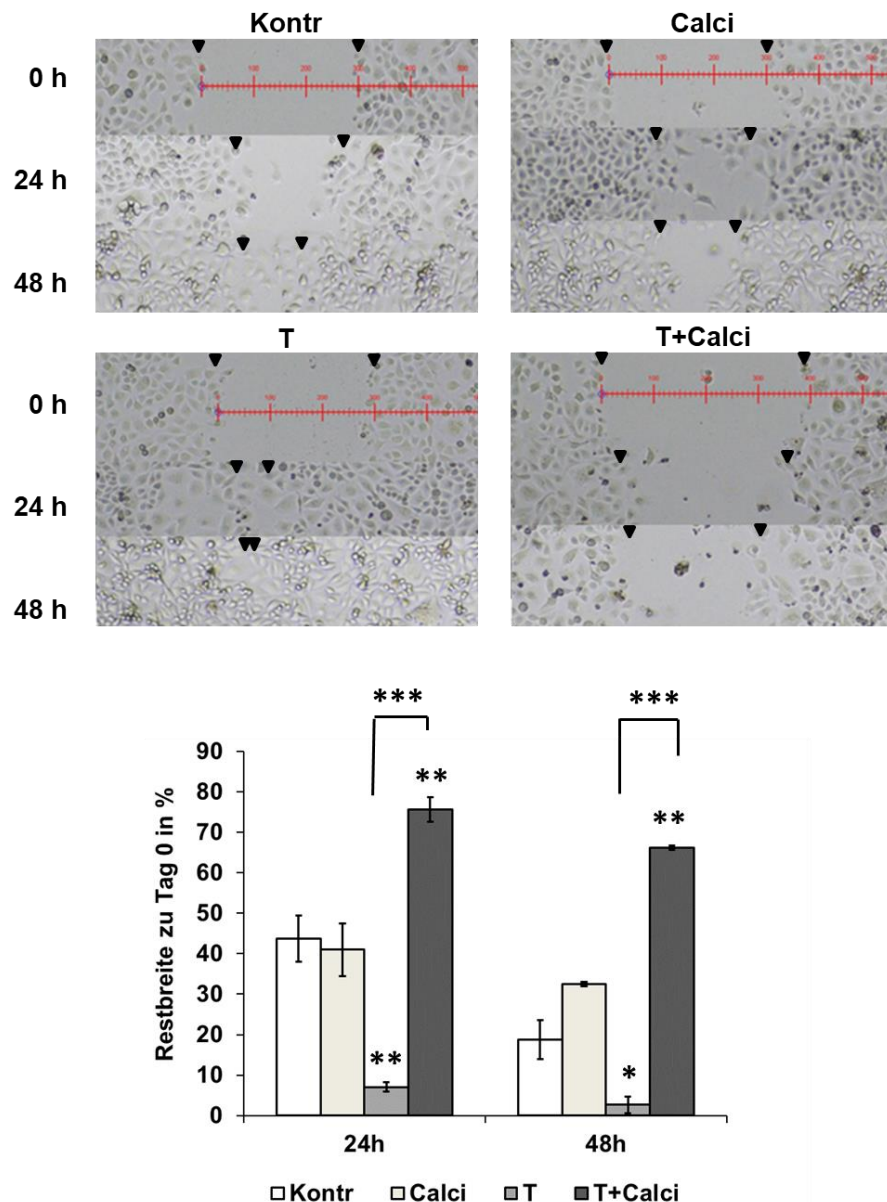


Abbildung 14: Einfluss von 1 μM Calcitriol (Calci), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+M) auf die Zellmigration der Zelllinie HCC1806 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,05 % Ethanol nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

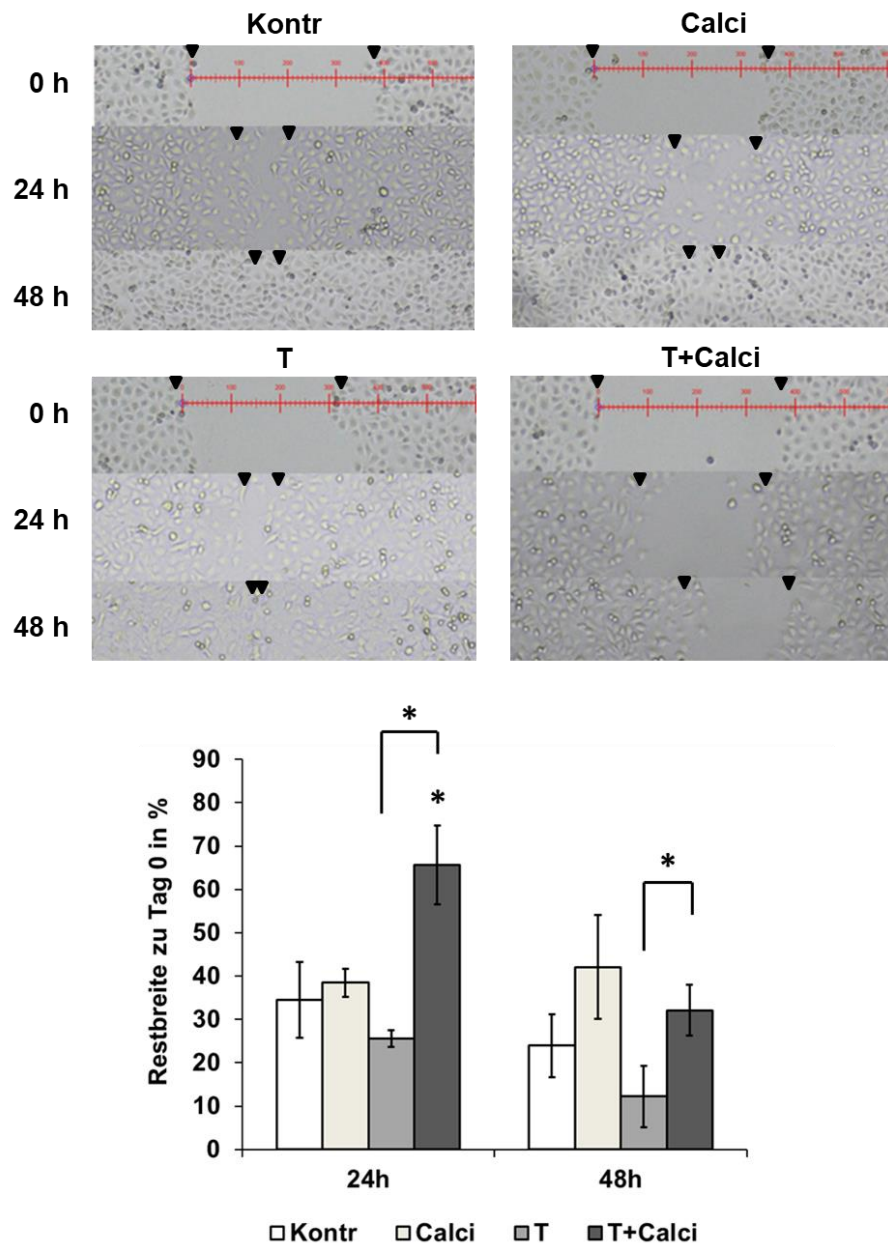


Abbildung 15: Einfluss von 1 μ M Calcitriol (Calci), 5 ng/ml TGF β (T) sowie deren Kombination (T+M) auf die Zellmigration der Zelllinie MDA-MB-231 im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr) mit 0,05 % Ethanol nach 24 h und nach 48 h. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen mit drei Einzelwerten dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$.

3.3 Einfluss auf die Proteinexpression

Die Proteinexpression von Claudin1 und N-Cadherin in den Brustkrebszelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 sollte unter Einfluss von Resveratrol, des GHRH-Antagonisten MIA-602 und Calcitriol untersucht werden. Zusätzlich wurde der

Einfluss durch die Kombination mit TGF β untersucht, um die Wirkung der potenziellen Medikamente auch in Bezug auf eine TGF β -induzierte EMT analysieren zu können.

3.3.1 Einfluss von MIA-602, Resveratrol und Calcitriol auf die Expression von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie HCC1806

Die Behandlung der Zelllinie HCC1806 mit 5 ng/ml TGF β führte zu einer signifikant verstärkten Expression von N-Cadherin auf 145 % \pm 8 % ($p \leq 0,002$) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO, während die Expression von Claudin auf 9 % \pm 2 % ($p \leq 0,004$) reduziert wurde. 1 μ M MIA-602 verringerte die Expression von N-Cadherin auf 16 % \pm 5 % ($p \leq 0,001$). Die Expression von Claudin wurde durch 1 μ M MIA-602 nicht signifikant auf 80 % \pm 9 % ($p \leq 0,07$) reduziert. 10 μ M Resveratrol reduzierte die Expression von N-Cadherin signifikant auf 71 % \pm 4 % ($p \leq 0,014$) und 25 μ M Resveratrol auf 77 % \pm 7 % ($p \leq 0,020$). Während 10 μ M Resveratrol die Expression von Claudin nicht signifikant auf 77 % \pm 13 % ($p \leq 0,08$) verringerte, erhöhte die Behandlung mit 25 μ M Resveratrol die Expression von Claudin auf 169 % \pm 17 % ($p \leq 0,006$). Die Behandlung mit 1 μ M Calcitriol beeinflusste weder die Expression von N-Cadherin noch von Claudin signifikant verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle mit 0,05 % Ethanol. Die Expression von N-Cadherin wurde auf 80 % \pm 18 % ($p \leq 0,062$) reduziert und die Expression von Claudin wurde auf 116 % \pm 16 % ($p \leq 0,41$) erhöht. Die Kombination der Testsubstanzen mit 5 ng/ml TGF β führte zu einer signifikant erhöhten Expression von N-Cadherin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, während die Expression von Claudin signifikant reduziert wurde. Die Kombination von TGF β und 1 μ M MIA-602 erhöhte die Expressionsrate von N-Cadherin auf 215 % \pm 20 % ($p \leq 0,004$) und die Kombination mit 1 μ M Calcitriol auf 193 % \pm 6 % ($p \leq 0,0006$). In Kombination mit 10 μ M Resveratrol wurde die Expression von N-Cadherin auf 192 % \pm 9 % ($p \leq 0,0002$) erhöht und in Kombination mit 25 μ M Resveratrol auf 222 % \pm 11 % ($p \leq 0,0002$). Die Kombination von TGF β und 1 μ M MIA-602 verringerte die Expression von Claudin auf 17 % \pm 4 % ($p \leq 0,003$) und die Kombination mit 1 μ M Calcitriol auf 21 % \pm 9 % ($p \leq 0,002$). Die Kombination von TGF β mit 10 μ M Resveratrol führte zu einer Expressionsrate von 27 % \pm 7 % ($p \leq 0,0014$) und die Kombination mit 25 μ M Resveratrol zu einer Claudin-Expression von 22 % \pm 17 % ($p \leq 0,004$). Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Proteinbiosynthese von N-Cadherin und

Claudin in der Zelllinie HCC1806 ist in Abb. 16 dargestellt. Im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β führten die Kombinationsbehandlungen von TGF β mit MIA-602, 10 μ M und 25 μ M Resveratrol und Calcitriol zu einer signifikant erhöhten Expression von N-Cadherin ($p \leq 0,015$, $p \leq 0,003$, $p \leq 0,001$, $p \leq 0,002$). Die Expression von Claudin erhöhte sich durch die Kombination von TGF β mit 1 μ M MIA-602

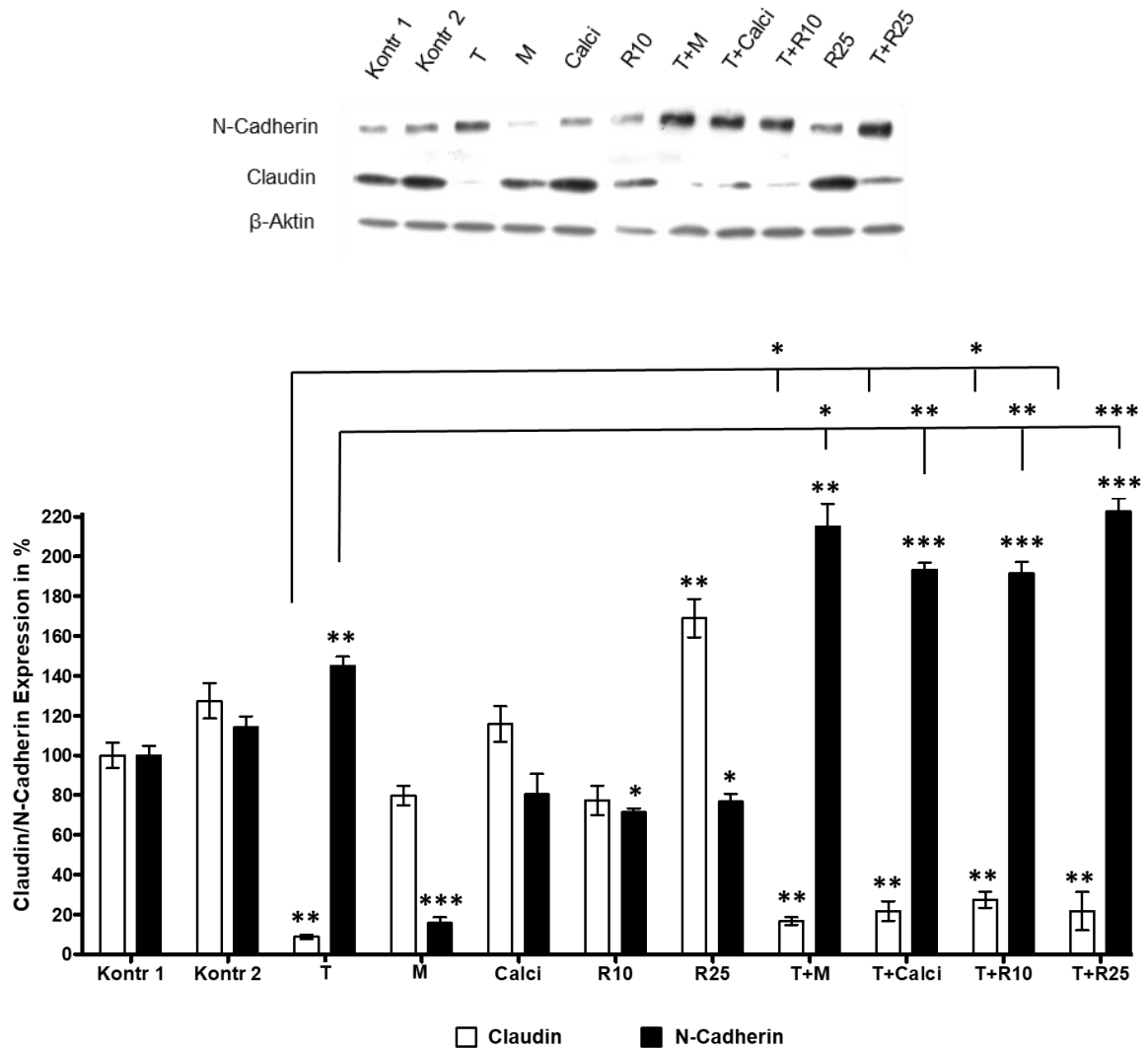


Abbildung 16: Einfluss von 5 ng/ml TGF β (T), 1 μ M des GHRH-Antagonisten MIA 602 (M), 1 μ M Calcitriol (Calci) und 10 bzw. 25 μ M Resveratrol (R10, R25) allein sowie deren Kombination auf die Expression von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie HCC1806 in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr 1: 0,033 % DMSO, Kontr 2: 0,05 % Ethanol). Dargestellt sind die Proteinbanden von N-Cadherin bei 140 kDa, von Claudin bei 20 kDa und von β -Aktin bei 42 kDa in einem repräsentativen Western Blot. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

signifikant verglichen mit TGF β allein ($p \leq 0,042$) und auch die Kombination mit 10 μM Resveratrol führte zu einer signifikant erhöhten Expression von Claudin ($p \leq 0,039$). Die Kombinationsbehandlungen von TGF β mit Calcitriol und 25 μM Resveratrol konnten die Claudin-Expression im Vergleich zur TGF β -Einzelbehandlung nicht signifikant verändern ($p \leq 0,116$; $p \leq 0,308$).

3.3.2 Einfluss von MIA-602, Resveratrol und Calcitriol auf die Expression von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie MDA-MB-231

Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β führte in der Zelllinie MDA-MB-231 zu einer signifikant erhöhten Expression von N-Cadherin auf 233 % \pm 14 % ($p \leq 0,0003$) im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO. Die Expression von Claudin wurde durch die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β auf 10 % \pm 5 % ($p \leq 0,003$) reduziert. Während 1 μM MIA-602 die Expression von N-Cadherin auf 78 % \pm 5 % ($p \leq 0,034$) reduzierte, wurde die Expression von Claudin durch MIA-602 nicht signifikant auf 98 % \pm 27 % ($p \leq 0,928$) verringert. Auch die Behandlung mit Calcitriol und Resveratrol hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Expression von Claudin. 10 μM Resveratrol reduzierte die Expression von Claudin auf 68 % \pm 16 % ($p \leq 0,060$) und 25 μM Resveratrol auf 98 % \pm 6 % ($p \leq 0,796$). 1 μM Calcitriol verringerte die Expression von Claudin auf 82 % \pm 33 % ($p \leq 0,347$) im Vergleich zur Kontrolle mit 0,05 % Ethanol. Die Behandlung mit 10 μM und 25 μM Resveratrol führte zu einer signifikant verringerten Expression von N-Cadherin auf 75 % \pm 10 % ($p \leq 0,034$) bzw. auf 77 % \pm 9 % ($p \leq 0,035$) verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. 1 μM Calcitriol führte zu einer nicht signifikant verringerten Expression von N-Cadherin auf 81 % \pm 14 % ($p \leq 0,057$). Die Kombination der Testsubstanzen mit 5 ng/ml TGF β führte zu einer signifikant erhöhten Expression von N-Cadherin verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Die Kombination von TGF β und 1 μM MIA-602 erhöhte die Expression von N-Cadherin auf 240 % \pm 10 % ($p \leq 0,001$) und die Kombination mit Calcitriol auf 236 % \pm 7 % ($p \leq 0,001$). Durch die Kombination von TGF β mit 10 μM Resveratrol erhöhte sich die Expression von N-Cadherin auf 205 % \pm 18% ($p \leq 0,003$) und durch die Kombination mit 25 μM Resveratrol auf 236 % \pm 6 % ($p \leq 0,001$). Die Kombinationsbehandlungen führten zu einer signifikant erniedrigten Expression von Claudin im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die Kombination von TGF β und 1 μM MIA-602 verringerte die Expression von Claudin auf 39 % \pm 8 % ($p \leq 0,004$), die Kombination mit 1 μM Calcitriol auf 45 % \pm 14 %

($p \leq 0,006$), die Kombination mit 10 μM Resveratrol auf $32 \% \pm 12 \%$ ($p \leq 0,003$) und die Kombination mit 25 μM Resveratrol auf $26 \% \pm 6 \%$ ($p \leq 0,003$). Der Einfluss der drei Testsubstanzen auf die Proteinbiosynthese von N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie MDA-MB-231 ist in Abb. 17 dargestellt.

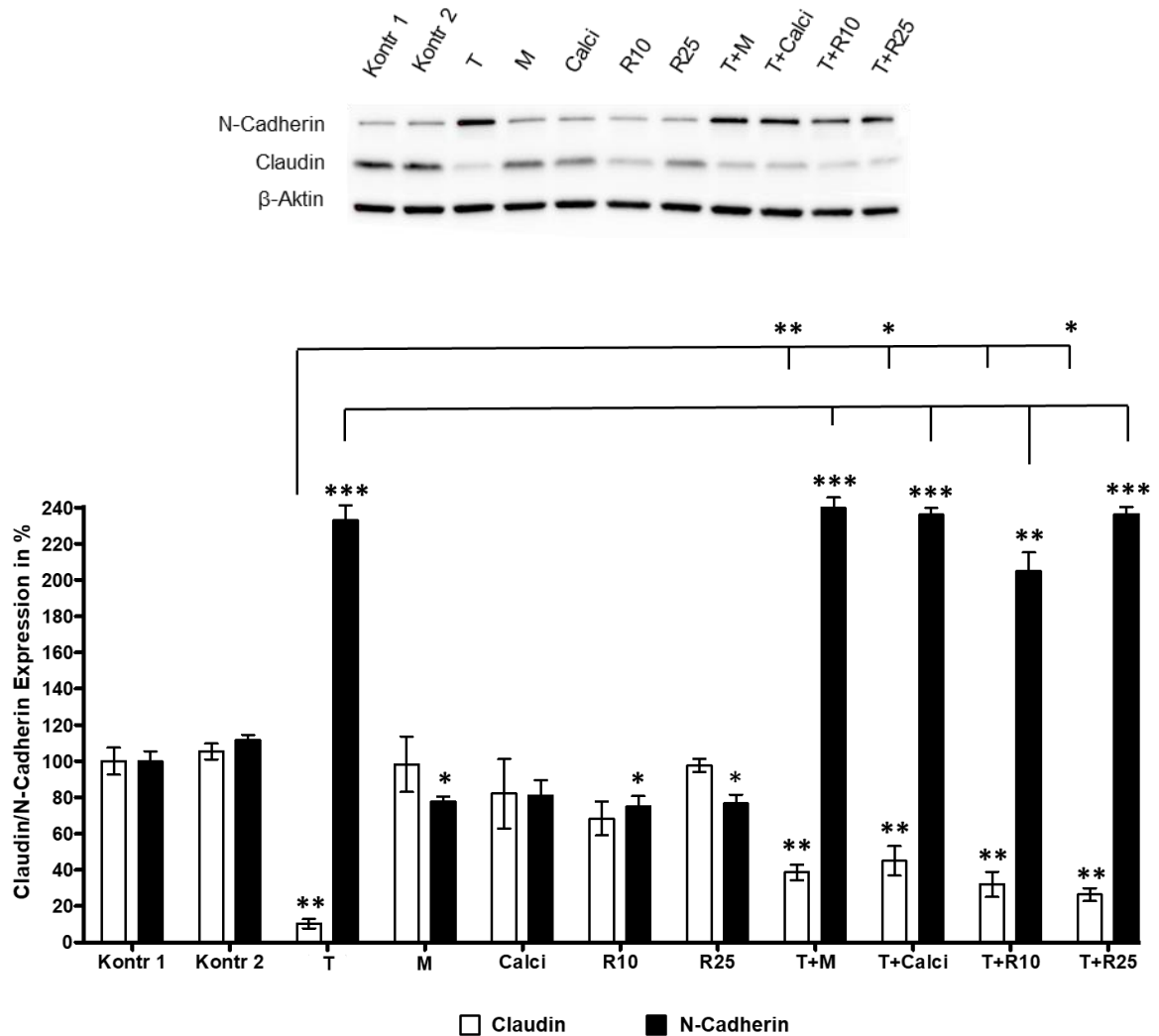


Abbildung 17: Einfluss von 5 ng/ml TGF β (T), 1 μM des GHRH-Antagonisten MIA 602 (M), 1 μM Calcitriol (Calci) und 10 bzw. 25 μM Resveratrol (R10, R25) allein sowie deren Kombination auf die Proteinexpression der Zelllinie MDA-MB-231 in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle (Kontr 1: 0,033 % DMSO, Kontr 2: 0,05 % Ethanol). Dargestellt sind die Proteinbanden von N-Cadherin bei 140 kDa, von Claudin bei 20 kDa und von β -Aktin bei 42 kDa in einem repräsentativen Western Blot. Die Balken stellen die Mittelwerte \pm die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Verglichen mit der TGF β -Einzelbehandlung führte die Kombination von TGF β mit 1 μ M MIA-602 zu einer signifikant erhöhten Expression von Claudin ($p \leq 0,008$) und die Kombination mit Calcitriol ebenfalls ($p \leq 0,039$). Die Kombination von TGF β und 10 μ M Resveratrol beeinflusste die Expression von Claudin nicht signifikant im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β ($p \leq 0,074$), während die Kombination mit 25 μ M Resveratrol die Expression von Claudin signifikant verstärkte ($p \leq 0,025$). Verglichen mit der TGF β -Einzelbehandlung beeinflusste keine der Kombinationsbehandlungen die Expression von N-Cadherin signifikant ($p \leq 0,547$, $p \leq 0,762$, $p \leq 0,103$, $p \leq 0,737$).

3.4 Einfluss auf die mRNA-Expression

Die mRNA-Expression der mesenchymalen Marker SLUG, SNAIL, Vimentin und N-Cadherin sowie des epithelialen Markers Claudin sollte unter Einfluss von Resveratrol und Calcitriol untersucht werden. Zusätzlich wurde der Einfluss durch die Kombination mit TGF β untersucht, um die Wirkung der potenziellen Medikamente auch in Bezug auf eine TGF β -induzierte EMT analysieren zu können.

3.4.1 Einfluss von Resveratrol und Calcitriol auf die mRNA-Expression in der Zelllinie HCC1806

Die Behandlung mit 25 μ M Resveratrol führte zu einer signifikant erhöhten mRNA-Expression von Claudin um $7,989 \pm 4,064$ ($p \leq 0,003$). Die mRNA-Expression von SLUG wurde durch die Behandlung mit 25 μ M Resveratrol $1,427 \pm 0,955$ -fach ($p \leq 0,508$) erhöht, während die Expressionsrate der anderen mesenchymalen Marker nicht signifikant reduziert wurde. So wurde die mRNA-Expression von SNAIL auf $0,666 \pm 0,584$ ($p \leq 0,795$) reduziert, die von Vimentin auf $0,471 \pm 0,201$ ($p \leq 0,054$) und die von N-Cadherin auf $0,285 \pm 0,364$ ($p \leq 0,414$). Durch die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β wurde die mRNA aller mesenchymalen Marker verstärkt exprimiert. Die mRNA von SLUG wurde $23,637 \pm 6,172$ ($p \leq 0,0011$), SNAIL $10,112 \pm 3,185$ ($p \leq 0,0013$), Vimentin $5,344 \pm 1,702$ ($p \leq 0,017$) und N-Cadherin $5,134 \pm 2,246$ -mal verstärkt ($p \leq 0,014$). Die mRNA-Expression von Claudin wurde durch die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β nicht signifikant auf $0,541 \pm 0,197$ verringert ($p \leq 0,283$). Die Kombinationsbehandlung von 25 μ M Resveratrol

zusammen mit 5 ng/ml TGF β führte zu einer tendenziell verminderten mRNA-Expression der mesenchymalen Marker. Die mRNA von SLUG wurde auf $0,755 \pm 0,389$ ($p \leq 0,916$) verringert, SNAIL auf $0,847 \pm 0,194$ ($p \leq 0,801$), Vimentin auf $0,648 \pm 0,313$ ($p \leq 0,879$) und N-Cadherin auf $0,642 \pm 0,323$ ($p \leq 0,892$). Die mRNA von Claudin wurde durch die Behandlung um $4,691 \pm 1,156$ nicht signifikant ($p \leq 0,465$; siehe Abb. 18 A) verstärkt exprimiert.

Die Behandlung mit 1 μ M Calcitriol führte zu keiner signifikant veränderten mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,05 % Ethanol. Die mRNA von SLUG wurde auf $0,548 \pm 0,324$ ($p \leq 0,442$) verringert, SNAIL auf $0,441 \pm 0,326$ ($p \leq 0,367$), Vimentin auf $0,658 \pm 0,180$ ($p \leq 0,335$) und N-Cadherin auf $0,339 \pm 0,152$ ($p \leq 0,149$). Die Behandlung mit 1 μ M Calcitriol führte zu einer nicht signifikant erhöhten mRNA-Expression von Claudin auf $2,390 \pm 1,192$ ($p \leq 0,101$). Durch 5 ng/ml TGF β konnte die mRNA Expression der mesenchymalen Marker SLUG und SNAIL signifikant auf das $13,804 \pm 5,64$ -fache ($p \leq 0,003$) bzw. auf das $9,829 \pm 2,805$ -fache ($p \leq 0,002$) erhöht werden verglichen zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,05% Ethanol. Die mRNA-Expression von Vimentin wurde nicht signifikant auf $3,590 \pm 0,989$ ($p \leq 0,341$) und die mRNA-Expression von N-Cadherin wurde auf $2,936 \pm 1,763$ ($p \leq 0,528$) erhöht. Die mRNA von Claudin wurde nicht signifikant auf $0,658 \pm 0,290$ ($p \leq 0,845$) verringert. Durch die Kombinationsbehandlung von 1 μ M Calcitriol zusammen mit 5 ng/ml TGF β zeigten sich keine signifikanten Veränderungen der mRNA-Expression verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle. Die mRNA von SLUG wurde $0,506 \pm 0,209$ -fach ($p \leq 0,805$) herunterreguliert, SNAIL auf $0,824 \pm 0,429$ ($p \leq 0,920$) und Vimentin und N-Cadherin auf $0,737 \pm 0,302$ ($p \leq 0,903$) bzw. auf $0,696 \pm 0,397$ ($p \leq 0,857$). Die mRNA von Claudin wurde nicht signifikant auf $2,574 \pm 1,178$ ($p \leq 0,773$) erhöht (siehe Abb. 18 B).

Die Kombinationsbehandlung von 5 ng/ml TGF β und 25 μ M Resveratrol erhöhte die mRNA-Expression von Claudin signifikant auf das $8,664 \pm 2,869$ -fache ($p \leq 0,007$) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit TGF β . Die mesenchymalen Marker wurden nicht signifikant beeinflusst. Die mRNA von SLUG wurde auf $0,032 \pm 0,017$ ($p \leq 0,131$) verringert und die mRNA von SNAIL auf $0,048 \pm 0,019$ ($p \leq 0,177$). Die mRNA von Vimentin wurde auf $0,121 \pm 0,057$ ($p \leq 0,257$) reduziert und die mRNA von N-Cadherin auf $0,125 \pm 0,059$ ($p \leq 0,259$). Verglichen mit der Einzelbehandlung von 5 ng/ml TGF β reduzierte die Kombinationsbehandlung zusammen mit 1 μ M Calcitriol die mRNA-Expression von SLUG signifikant auf $0,037 \pm 0,020$ ($p \leq 0,046$),

SNAIL auf $0,084 \pm 0,047$ ($p \leq 0,046$) und Vimentin auf $0,205 \pm 0,095$ ($p \leq 0,046$). Die mRNA von N-Cadherin wurde nicht signifikant auf $0,237 \pm 0,166$ ($p \leq 0,138$) verringert, während die mRNA von Claudin signifikant auf $3,910 \pm 2,235$ ($p \leq 0,047$) anstieg (siehe Abb. 18 C).

Zur besseren Übersicht sind die Veränderungen der mRNA-Expression in der Zelllinie HCC1806 in Tab. 5 und Tab. 6 aufgelistet und in Abb. 18 logarithmisch dargestellt.

Tabelle 5: Relative Veränderungen der mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO (oberer Teil) und 0,05 % Ethanol (unterer Teil) in der Zelllinie HCC1806. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

	SLUG	SNAIL	Vimentin	N-Cadherin	Claudin
25 μ M Resveratrol	$1,427 \pm 0,955$	$0,666 \pm 0,584$	$0,471 \pm 0,201$	$0,285 \pm 0,364$	$7,989 \pm 4,064$
5 ng/ml TGF β	$23,64 \pm 6,172$	$10,11 \pm 3,185$	$5,344 \pm 1,702$	$5,134 \pm 2,246$	$0,541 \pm 0,197$
5 ng/ml TGF β + 25 μ M Resveratrol	$0,755 \pm 0,389$	$0,487 \pm 0,194$	$0,648 \pm 0,313$	$0,642 \pm 0,323$	$4,691 \pm 1,156$
1 μ M Calcitriol	$0,548 \pm 0,324$	$0,441 \pm 0,326$	$0,658 \pm 0,180$	$0,339 \pm 0,152$	$2,390 \pm 1,192$
5 ng/ml TGF β	$13,80 \pm 5,64$	$9,829 \pm 2,805$	$3,590 \pm 0,989$	$2,936 \pm 1,763$	$0,658 \pm 0,290$
5 ng/ml TGF β + 1 μ M Calcitriol	$0,506 \pm 0,209$	$0,824 \pm 0,429$	$0,737 \pm 0,302$	$0,696 \pm 0,397$	$2,574 \pm 1,176$

Tabelle 6: Relative Veränderungen der mRNA-Expression im Vergleich zu 5 ng/ml TGF β in der Zelllinie HCC1806. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

	SLUG	SNAIL	Vimentin	N-Cadherin	Claudin
5 ng/ml TGF β + 25 μ M Resveratrol	$0,032 \pm 0,017$	$0,048 \pm 0,019$	$0,121 \pm 0,057$	$0,125 \pm 0,059$	$8,664 \pm 2,869$
5 ng/ml TGF β + 1 μ M Calcitriol	$0,037 \pm 0,020$	$0,084 \pm 0,047$	$0,205 \pm 0,095$	$0,237 \pm 0,166$	$3,910 \pm 2,235$

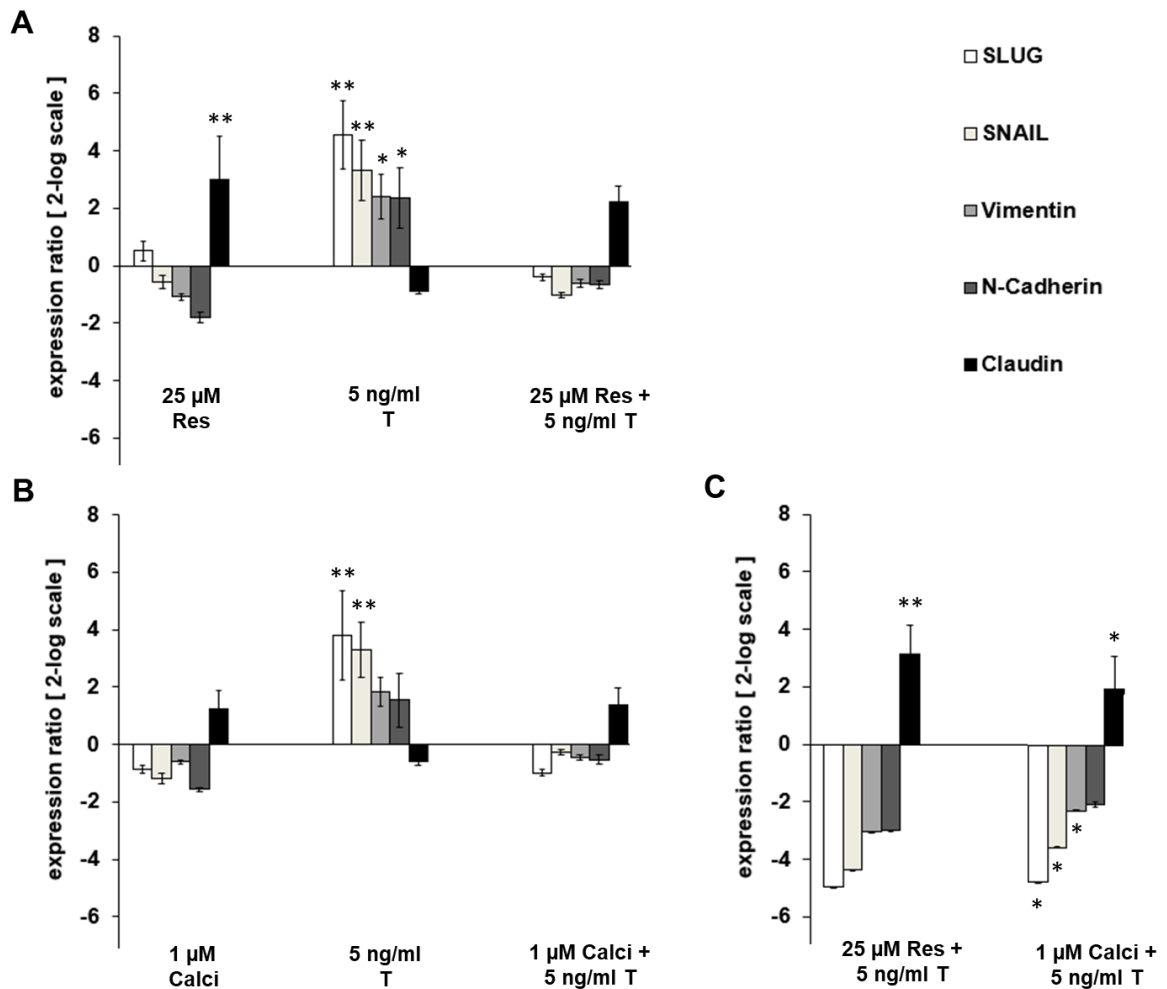


Abbildung 18: Einfluss von 25 µM Resveratrol (Res), 1 µM Calcitriol (Calci) und 5 ng/ml TGFβ (T) allein sowie deren Kombinationen auf die mRNA-Expression von SLUG, SNAIL, Vimentin, N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie HCC1806 in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO (A), 0,05 % Ethanol (B) und zu 5 ng/ml TGFβ (C). Die Balken stellen die Mittelwerte ± die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dar. Statistische Signifikanz: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$. Man beachte die logarithmische Skalierung der Y-Achse.

3.4.2 Einfluss von Resveratrol und Calcitriol auf die mRNA-Expression in der Zelllinie MDA-MB-231

Die Behandlung mit 25 µM Resveratrol führte zu einer signifikant verringerten mRNA-Expression von SLUG auf $0,299 \pm 0,303$ ($p \leq 0,002$). Die mRNA von SNAIL, Vimentin und N-Cadherin wurde durch die Behandlung mit 25 µM Resveratrol nicht signifikant auf $0,409 \pm 0,423$ ($p \leq 0,063$) bzw. auf $0,857 \pm 0,905$ ($p \leq 0,825$) und $0,600 \pm 0,603$ ($p \leq 0,226$) reduziert. Die mRNA-Expression von Claudin wurde nicht signifikant $1,336 \pm 1,549$ -fach ($p \leq 0,709$) erhöht. Die Behandlung mit 5 ng/ml TGFβ

erhöhte die mRNA-Expressionen von SLUG auf das $4,438 \pm 2,083$ -fache ($p \leq 0,004$), SNAIL auf das $4,538 \pm 2,243$ -fache ($p \leq 0,003$), Vimentin auf das $2,334 \pm 1,197$ -fache ($p \leq 0,002$) und N-Cadherin auf das $1,656 \pm 0,828$ -fache ($p \leq 0,045$) signifikant. Die Kombinationsbehandlung aus $25 \mu\text{M}$ Resveratrol und 5 ng/ml TGF β führte zu keiner signifikant veränderten mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle. Die mRNA von SLUG wurde auf $0,338 \pm 0,274$ ($p \leq 0,114$) verringert, SNAIL auf $0,705 \pm 0,509$ ($p \leq 0,547$), Vimentin auf $0,601 \pm 0,425$ ($p \leq 0,352$) und N-Cadherin auf $0,401 \pm 0,290$ ($p \leq 0,084$; siehe Abb. 19 A). Die Behandlung mit $1 \mu\text{M}$ Calcitriol führte nicht zu einer signifikant veränderten mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit $0,05 \%$ Ethanol. Die mRNA von SLUG wurde auf $0,462 \pm 0,450$ ($p \leq 0,654$) reduziert, SNAIL auf $0,822 \pm 0,446$ ($p \leq 0,942$), Vimentin auf $0,401 \pm 0,179$ ($p \leq 0,721$) und N-Cadherin auf $0,544 \pm 0,300$ ($p \leq 0,730$). Die mRNA-Expression von Claudin wurde durch $1 \mu\text{M}$ Calcitriol nicht signifikant verdoppelt ($2,035 \pm 1,092$; $p \leq 0,845$). Die Behandlung mit 5 ng/ml TGF β steigerte die mRNA-Expression von SLUG signifikant auf $4,014 \pm 1,570$ ($p \leq 0,021$), von SNAIL auf $3,655 \pm 1,450$ ($p \leq 0,011$ verglichen mit der Ethanol-Kontrolle). Die mRNA-Expression von Vimentin nicht signifikant auf $2,402 \pm 1,050$ ($p \leq 0,068$) und die von N-Cadherin nicht signifikant auf $1,774 \pm 0,699$ ($p \leq 0,164$) erhöht. Die mRNA von Claudin wurde signifikant verringert ($0,370 \pm 0,165$; $p \leq 0,002$). Die Kombinationsbehandlung von 5 ng/ml TGF β und $1 \mu\text{M}$ Calcitriol führte zu keiner signifikanten Veränderung in der mRNA-Expression. SLUG wurde auf $0,535 \pm 0,262$ ($p \leq 0,114$) reduziert, SNAIL auf $0,437 \pm 0,180$ ($p \leq 0,547$), Vimentin auf $0,842 \pm 0,347$ ($p \leq 0,352$) und N-Cadherin auf $0,491 \pm 2,223$ ($p \leq 0,084$). Claudin wurde nicht signifikant erhöht ($1,117 \pm 0,588$; $p \leq 0,621$; siehe Abb. 19 B).

Die Kombination von 5 ng/ml TGF β und $25 \mu\text{M}$ Resveratrol verminderte die mRNA-Expression der mesenchymalen Marker signifikant im Vergleich zu Einzelbehandlung mit 5 ng/ml TGF β . SLUG wurde auf $0,076 \pm 0,053$ ($p \leq 0,008$) und SNAIL auf $0,155 \pm 0,090$ ($p \leq 0,002$) gesenkt Vimentin wurde auf $0,257 \pm 0,137$ ($p \leq 0,002$) und N-Cadherin auf $0,242 \pm 0,146$ ($p \leq 0,0013$) verringert. Claudin wurde im Vergleich zur TGF β -Einzelbehandlung nicht signifikant auf das $5,144 \pm 3,438$ -fache ($p \leq 1,01$) verstärkt. Verglichen mit der TGF β -Einzelbehandlung führte die Kombinationsbehandlung zusammen mit $1 \mu\text{M}$ Calcitriol zu einer signifikanten Verringerung der mRNA-Expression von SLUG auf $0,133 \pm 0,059$ ($p \leq 0,0013$) und von

SNAIL auf $0,119 \pm 0,044$ ($p \leq 0,002$). Die mRNA von Vimentin wurde nicht signifikant auf $0,351 \pm 0,147$ ($p \leq 0,361$) und die von N-Cadherin auf $0,277 \pm 0,122$ ($p \leq 0,211$) verringert. Die mRNA-Expression von Claudin wurde nicht signifikant auf $3,017 \pm 1,260$ ($p \leq 0,412$) erhöht (siehe Abb. 19 C).

Zur besseren Übersicht sind die Veränderungen der mRNA-Expression in der Zelllinie MDA-MB-231 in Tab. 7 und Tab. 8 aufgelistet und in Abb. 19 logarithmisch dargestellt.

Tabelle 7: Relative Veränderungen der mRNA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO (oberer Teil) und 0,05 % Ethanol (unterer Teil) in der Zelllinie MDA-MB-231. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

	SLUG	SNAIL	Vimentin	N-Cadherin	Claudin
25 µM Resveratrol	0,299 ± 0,303	0,409 ± 0,423	0,857 ± 0,905	0,600 ± 0,603	1,336 ± 1,549
5 ng/ml TGFβ	4,438 ± 2,083	4,538 ± 2,243	2,334 ± 1,197	1,656 ± 0,828	0,299 ± 0,227
5 ng/ml TGFβ + 25 µM Resveratrol	0,338 ± 0,274	0,705 ± 0,509	0,601 ± 0,425	0,401 ± 0,290	1,540 ± 1,46
1 µM Calcitriol	0,462 ± 0,450	0,822 ± 0,446	0,401 ± 0,179	0,544 ± 0,300	2,035 ± 1,092
5 ng/ml TGFβ	4,014 ± 1,570	3,655 ± 1,450	2,402 ± 1,050	1,774 ± 0,699	0,370 ± 0,165
5 ng/ml TGFβ + 1 µM Calcitriol	0,535 ± 0,262	0,437 ± 0,180	0,842 ± 0,347	0,491 ± 2,223	1,117 ± 0,588

Tabelle 8: Relative Veränderungen der mRNA-Expression im Vergleich zu 5 ng/ml TGFβ in der Zelllinie MDA-MB-231. Signifikante Ergebnisse sind fett hervorgehoben.

	SLUG	SNAIL	Vimentin	N-Cadherin	Claudin
5 ng/ml TGFβ + 25 µM Resveratrol	0,076 ± 0,053	0,155 ± 0,090	0,257 ± 0,137	0,242 ± 0,146	5,144 ± 3,438
5 ng/ml TGFβ + 1 µM Calcitriol	0,133 ± 0,059	0,119 ± 0,044	0,351 ± 0,147	0,277 ± 0,122	3,017 ± 1,260

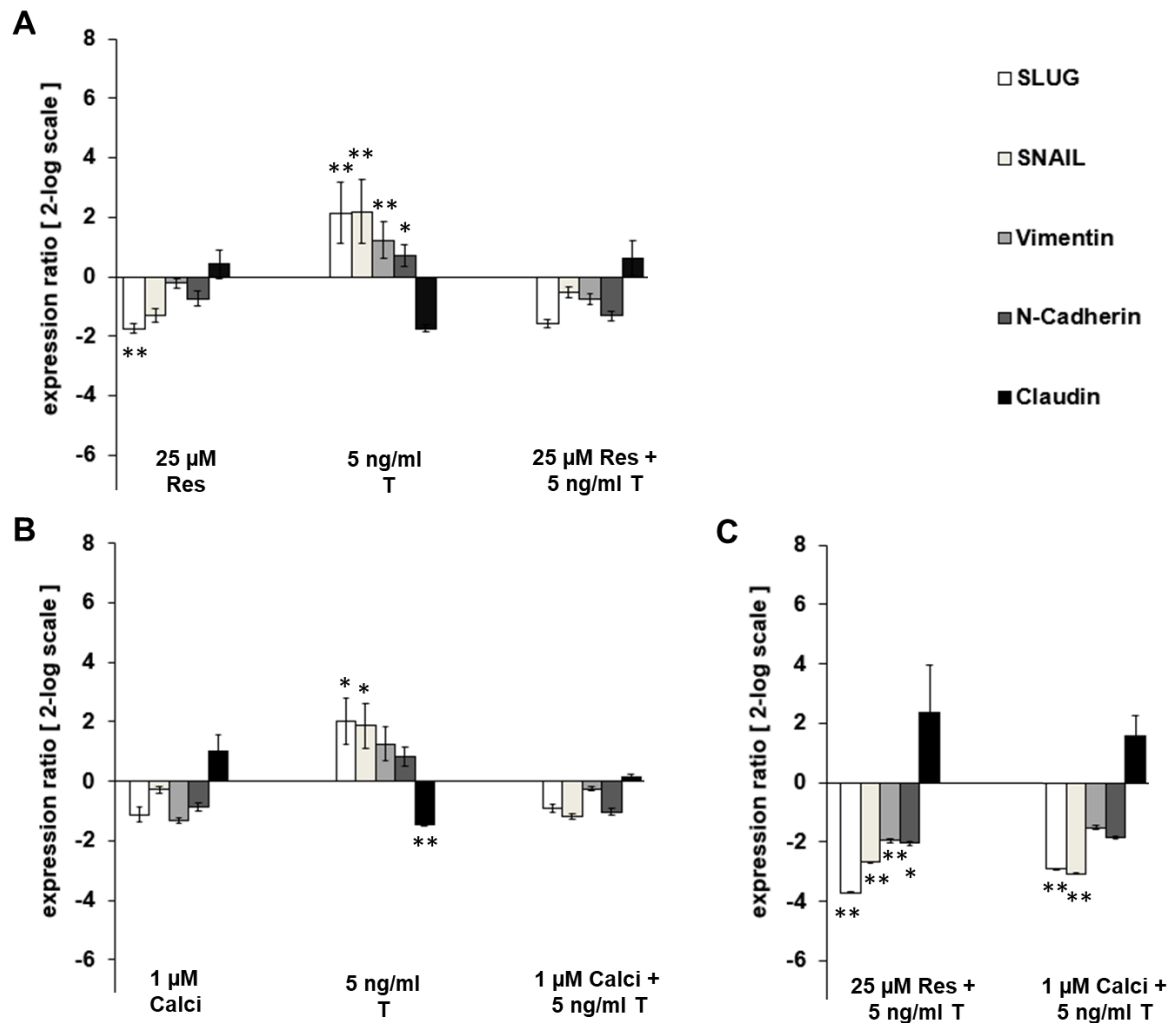


Abbildung 19: Einfluss von 25 µM Resveratrol (Res), 1 µM Calcitriol (Calci) und 5 ng/ml TGFβ (T) allein sowie deren Kombination auf die mRNA-Expression von SLUG, SNAIL, Vimentin, N-Cadherin und Claudin in der Zelllinie MDA-MB-231 in Bezug zur Lösungsmittelkontrolle mit 0,033 % DMSO (A), 0,05 % Ethanol (B) und zu 5 ng/ml TGFβ (C). Die Balken stellen die Mittelwerte ± die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen dar. Statistische Signifikanz: *p < 0,05, **p < 0,01. Man beachte die logarithmische Skalierung der Y-Achse.

4. Diskussion

Triple-negative Mammakarzinome exprimieren weder Östrogen- oder Progesteronrezeptoren noch weisen sie eine Überexpression des Wachstumsrezeptors Her2/neu auf, die als Zielstrukturen für die adjuvante Therapie fungieren könnten. Dementsprechend wird intensiv nach neuen Therapieansätzen für triple-negative Mammakarzinome geforscht. Das Vorliegen von Metastasen ist prognostisch besonders ungünstig, da ab diesem Zeitpunkt nur noch palliativ behandelt werden kann. Die EMT gilt als wichtiger Prozess, der zur Metastasierung führt. In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss eines GHRH-Antagonisten, von Resveratrol und von Calcitriol auf das Wachstum und die Migration in triple-negativen Mammakarzinomzellen untersucht. Zusätzlich wurde die Proteinexpression von EMT-Markern sowie die mRNA-Expression der Transkriptionsfaktoren SNAIL und SLUG sowie weiterer EMT-Gene bestimmt. Ein besonderes Augenmerk wurde auf die Kombinationsbehandlung mit TGF β gelegt, um die Wirkung der potenziellen Medikamente auch hinsichtlich einer TGF β -induzierten EMT analysieren zu können. Die Gliederung der Diskussion erfolgt anhand der Fragestellung in Kapitel 1.7.

4.1 Wird das Wachstum von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?

Die Entdeckung, dass triple-negative Mammakarzinome den hypothalamischen GHRH-R bzw. die SV1 auf ihrer Oberfläche exprimieren, macht GHRH-Antagonisten als potenzielle Medikamente interessant [91, 143]. Zahlreiche präklinische Studien belegen mittlerweile eine antiproliferative Wirkung von GHRH-Antagonisten auf triple-negative Mammakarzinomzellen [27, 91, 155]. Für den GHRH-Antagonisten MIA-602 wird in der Literatur eine IC₃₀ von 1 μ M beschrieben [143], sodass die Experimente in der vorliegenden Arbeit mit dieser Konzentration durchgeführt wurden. In Übereinstimmung mit der Literatur inhibierte 1 μ M MIA-602 in der vorliegenden Arbeit die Zellproliferation der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 signifikant. Erhoben wurden diese Daten nach 72 h Inkubation im MTS-Proliferationsassay. Hierbei zeigte sich in der Zelllinie HCC1806 eine Wachstumsrestriktion auf 77 % und in der Zelllinie MDA-MB-231 auf 80 %. Pozsgai und Kollegen konnten durch die Behandlung mit MIA-602 eine signifikante Wachstumsinhibition in mehreren Mammakarzinomzelllinien nachweisen, darunter auch HCC1806 und MDA-MB-

231 [143]. Antiproliferative Wirkungen von MIA-602 wurden auch am Mausmodell untersucht. Die Arbeitsgruppe von Perez zeigte, dass sich in Mäusen, denen die triple-negativen Mammakarzinomzelllinien HCC1806 oder MX-1 xenotransplantiert worden waren, das Tumolvolumen durch die Behandlung mit MIA-602 mehr als halbierte im Vergleich zu unbehandelten Tieren [136]. Des Weiteren konnte durch Buchholz und Kollegen gezeigt werden, dass GHRH-Antagonisten die zytostatische Wirkung von Chemotherapeutika verstärkten. Durch die Kombination des GHRH-Antagonisten JMR-132 mit Docetaxel konnte sowohl das Tumolvolumen als auch das Tumorgewicht von MX-1-xenotransplantierten Mäusen im Vergleich zur Einzelbehandlung signifikant reduziert werden [18]. Diese Beobachtung wurde durch Seitz und Kollegen in MDA-MB-231-xenotransplantierten Mäusen bestätigt [156]. Docetaxel gehört zur Gruppe der Taxane und ist ein Standardmedikament in der chemotherapeutischen Behandlung des Mammakarzinoms. Ein Erklärungsansatz für diese synergistische Wirkung könnte durch eine von Perez und Kollegen publizierte Studie geliefert werden. Dort supprimierte die zusätzliche Gabe von MIA-602 zu dem Chemotherapeutikum Doxorubicin signifikant die Expression des MDR1-Gens (*multidrug resistance gene 1*), das für Resistenzen gegen Medikamente ursächlich sein kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass MIA-602 die Aktivität der MDR1-Transporter in den Zelllinien HCC1806 und MX-1 signifikant reduzierte [135]. Obwohl in präklinischen Experimenten die antiproliferative Wirkung von GHRH-Antagonisten für zahlreichen Tumorentitäten eindrucksvoll belegt werden konnte, fehlen hierzu klinische Daten. Die Studien, die bis dato mit GHRH-Antagonisten durchgeführt wurden, umfassten maximal 14 Personen und konzentrierten sich lediglich auf den Einfluss der Antagonisten auf die physiologische GH-Sekretion [60] [61, 127] und auf Patienten mit Akromegalie [44]. Hierbei zeigte sich eine gute Verträglichkeit der GHRH-Antagonisten, sodass weitere klinischen Daten, auch hinsichtlich der Wirkung auf Tumorerkrankungen, erhoben werden sollten.

Dem Phytoalexin Resveratrol werden zahlreiche antikanzerogene Eigenschaften zugesprochen. Das macht Resveratrol auch für die Behandlung von triple-negativen Mammakarzinomen interessant. So konnten mittlerweile zahlreiche Studien einen antiproliferativen Effekt auf das Zellwachstum von ER-negativen Brustkrebszelllinien belegen. Aufgrund der inkonsistenten Datenlage bzgl. der IC₅₀ von Resveratrol wurde in der vorliegenden Arbeit mit 10 µM und 25 µM gearbeitet. 10 µM Resveratrol inhibierte in der vorliegenden Arbeit das Zellwachstum in der Zelllinie

HCC1806 signifikant auf 65 % und in der Zelllinie MDA-MB-231 auf 71 %. Dieser Effekt war durch die Behandlung mit 25 μM Resveratrol stärker mit einer Inhibition auf 16 % in der Zelllinie HCC1806 und auf 36 % in der Zelllinie MDA-MB-231. Die konzentrationsabhängige Inhibition des Zellwachstums durch Resveratrol in ER-negativen Zelllinien fanden auch Poschner und Kollegen [142]. Nach 48 h Inkubation zählten sie ab einer Konzentration von 7,5 μM eine signifikant reduzierte Zellzahl in der Zelllinie MDA-MB-231. Ähnliche Ergebnisse konnten durch Nguyen und Kollegen [123] und durch Murias und Kollegen [117] im MTT-Proliferationsassay erhoben werden. Die Inkubationszeiten dort betragen 24 h und 48 h bzw. 72 h. Dennoch gibt es Arbeitsgruppen, die die inhibitorischen Effekte von Resveratrol erst bei deutlich höheren Konzentrationen detektierten. So zeigte die Arbeitsgruppe von Li im MTT-Proliferationsassay erst ab Konzentrationen von 40 μM eine signifikant reduzierte Zellproliferation für die Zelllinie MDA-MB-231. Die Konzentrationsspanne von 2 - 20 μM führte hingegen zu einem verstärkten Zellwachstum [104]. Zu diskutieren ist, ob die von dieser Arbeitsgruppe verwendete Zelldichte mit 8000 Zellen/Well – über zehnmal mehr als in dieser Arbeit – zu hoch war, um nach 24 h einen antiproliferativen Effekt im niedrigen Konzentrationsbereich zu erzielen. Der von Li und Kollegen beschriebene duale Effekt von Resveratrol auf die Zellproliferation wird in der Literatur mehrheitlich für ER-positive Zelllinien beschrieben [9, 119, 142]. Aufgrund dieser Beobachtungen warnt ein Kreis von Wissenschaftlern vor verfrühten Einsätzen des Phytoalexins in der Therapie des Mammakarzinoms und hält weiterführende Studien für dringend notwendig, um das unklare Potential von Resveratrol in Mammakarzinompatientinnen aufzuklären [24]. Eine besondere Gefahr sehen die Forscher auch in der Fähigkeit von Mammakarzinomzellen ihren Rezeptorstatus im Laufe der Erkrankung zu ändern, in dessen Folge sich auch die Wirkung von Resveratrol auf die Tumorzellen ändern könnte. Eine mögliche Erklärung für die duale Wirkung könnte die strukturelle Ähnlichkeit zwischen Resveratrol und Östradiol (E2) sein, durch die Resveratrol sowohl mit ER α als auch mit ER β interagiert [141]. In Abhängigkeit von dem dominierenden ER-Subtyp und der E2-Konzentration wurden sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen beschrieben [5, 14]. Da die Bindungsaffinität von Resveratrol jedoch gering ist, herrscht in wissenschaftlichen Kreisen der Konsens, dass Resveratrol diesen dualen Effekt über weitere Mechanismen vermittelt. Eine durch Resveratrol regulierte Erhöhung des Östrogenspiegels wird als mögliche Lösung diskutiert [35, 49, 154].

Auch am Mausmodell konnte die antiproliferative Wirkung von Resveratrol nicht durchgängig bestätigt werden. Während zahlreiche Studien einen inhibierenden Effekt von Resveratrol auf das Tumorstadium detektierten [22, 30, 87, 101], konnten Castillo-Pichardo und Kollegen diesen Effekt nicht beobachten, sondern verzeichneten ein verstärktes Tumorstadium durch die Behandlung mit Resveratrol in MDA-MB-231-xenotransplantierten Mäusen [24]. Bove und Kollegen hingegen sahen keinen Einfluss von Resveratrol auf die Tumorstadium im Mausmodell [13]. Hierbei könnten die unterschiedlichen Studiendesigns sowie zum Teil fehlende Informationen zur Reinheit und Bezugsquelle von Resveratrol zu den konträren Ergebnissen geführt haben [23]. Castillo-Pichardo und Kollegen sehen in den unterschiedlichen Resveratrolkonzentrationen eine mögliche Ursache [24]. Aufgrund des unklaren Potentials von Resveratrol auf Mammapkarzinomzellen, wurde es bis dato nicht in klinischen Studien mit Brustkrebpatientinnen eingesetzt, jedoch bei Patienten mit kolorektalem Karzinom. Die Arbeitsgruppe von Nguyen untersuchte in einer ersten Phase I-Studie den Einfluss von Resveratrol und Traubenpulver auf die Genexpression des Wnt-Signalwegs in 8 Patienten mit kolorektalem Karzinom [122]. Der Wnt-Signalweg ist in 85 % der sporadisch auftretenden kolorektalen Karzinome durch Mutationen aktiviert und gilt als wichtiger molekularer Erklärungsansatz für deren Entstehung. Zum Zeitpunkt der Diagnose und nach 14-tägiger Applikation von Resveratrol bzw. des Traubenpulvers wurden Biopsien aus gesunder und kanzeröser Darmmukosa entnommen. In dem tumorösen Gewebe konnte kein positiver Einfluss von Resveratrol oder des Traubenpulvers auf die Aktivität des Wnt-Signalwegs festgestellt werden, jedoch in der gesunden Mukosa, sodass von den Studienleitern lediglich ein chemopräventiver Effekt von Polyphenolen inkl. Resveratrol resümiert werden konnte. Tomé-Carneiro und Kollegen bemängeln eine fehlende diätetische Restriktion und mögliche Arzneimittelinteraktionen im Studiendesign, die möglicherweise zu verfälschten Ergebnissen geführt haben könnten [182]. Weitere klinische Studien an gesunden Probanden bestätigten jedoch den chemopräventiven Effekt von Resveratrol. Brown und Kollegen detektierten nach einer 29-tägigen Einnahme von Resveratrol einen signifikant reduzierten IGF-1-Serumspiegel [17] und auch Chow und Kollegen demonstrierten nach einer vierwöchigen Resveratrol-Supplementierung erhöhte Aktivitätslevel bei zahlreichen antikanzergen Enzymen [36]. Ein therapeutischer Effekt konnte bis jetzt für Resveratrol in klinischen Studien nicht nachgewiesen werden. Es muss jedoch betont

werden, dass diesbezüglich aufgrund der geringen Anzahl der Studien und Probanden noch keine repräsentative Datenlage existiert und weitere Studien, auch hinsichtlich Toxizität und Arzneimittelinteraktion, benötigt werden.

Calcitriol beeinflusst den Zellzyklus, die Apoptose und die Zelldifferenzierung. Viele Tumorerkrankungen werden mit einem Vitamin-D-Mangel assoziiert, sodass Calcitriol als potenzielles Medikament diskutiert wird. 1 μM Calcitriol inhibierte in der vorliegenden Arbeit weder die Proliferation der Zelllinie HCC1806 noch die der Zelllinie MDA-MB-231 signifikant. In Studien aus der Literatur konnte Calcitriol bei Konzentrationen zwischen 0,001 μM und 0,1 μM einen antiproliferativen Effekt auf ER-positive Zellen erzielen, jedoch nicht auf ER-negative Zelllinien [16, 20, 43, 149, 178]. Eine Erklärung für die stärkere Wirkung von Calcitriol auf ER-positive Zellen im Vergleich zu ER-negativen Zellen könnte aus einer Studie von Krishnan und Kollegen entnommen werden. Dort führte Calcitriol *in vitro* und *in vivo* zu einer reduzierten Expression des östrogensynthetisierenden Enzyms Aromatase und des ER α , wodurch die wachstumsfördernde Wirkung der Östrogene abgeschwächt wurde [92, 93, 169, 172]. Auch die schlechtere Differenzierung von triple-negativen Zellen im Vergleich zu ER-positiven Zellen und der konsekutiv verminderten Expression des VDR könnte eine Erklärung für das schwache Ansprechen von MDA-MB-231 und HCC1806 auf Calcitriol sein [20]. Da für diese beiden Zelllinien Mutationen im p53-Gen beschrieben wurden [28], könnte auch der Nachweis von Stambolsky und Kollegen einen Erklärungsansatz bieten, wonach p53-mutierte Zellen die proapoptischen Effekte von Calcitriol in ein antiapoptisches Signal umwandeln [165]. Zusätzlich konnten Swami und Kollegen zeigen, dass Calcitriol in der ER-positiven Zelllinie MCF-7 ein anderes Genspektrum aktiviert als in der ER-negativen Linie MDA-MB-231. Während bei MCF-7 vor allem Gene, die mit Zellzyklusarrest und Apoptose assoziiert sind, durch Calcitriol aktiviert wurden, zeigte sich in der Zelllinie MDA-MB-231 kein Effekt [174]. Dahingegen zeigten die Arbeitsgruppen von Flanagan [56] und LaPorta [97] eine Wachstumsrestriktion durch Calcitriol auch in triple-negativen Brustkrebszellen. Problematisch hierbei ist jedoch die Tatsache, dass die Arbeitsgruppe von LaPorta für ihre Studien keine kommerzielle Zelllinie verwendete, sondern eine in ihrem Labor etablierte Linie. Die antiproliferativen Wirkungen von Calcitriol wurden in der Literatur auch im Mausmodell untersucht. Swami und Kollegen zeigten, dass in ER-positiven Mausmodellen das Tumorumfängen durch Calcitriol signifikant reduziert wurde [171, 173], während in triple-negativ-

en Modellen lediglich eine tendenzielle Reduktion beobachtet werden konnte. Signifikante Ergebnisse ließen sich hier nur durch die Kombination von Calcitriol mit weiteren Substanzen erreichen [12, 57], was jedoch ebenfalls einen potenziellen Therapieansatz darstellen könnte. Calcitriol wurde bereits in klinischen Studien eingesetzt. Zeichner und Kollegen untersuchten den Einfluss von Calcitriol an 308 Patientinnen mit einem nicht metastasierten Her2/neu-positiven Mammakarzinom. Die Patientinnen wurden zielgerichtet mit dem Her2/neu-Antikörper Trastuzumab sowie mit einer zytostatischen Therapie behandelt. Die Patientengruppe, die zusätzlich Calcitriol erhielt, zeigte eine signifikant verringerte Rezidivrate nach 5 Jahren. Das Gesamtüberleben wurde jedoch nicht beeinflusst [202]. An Patientinnen mit triple-negativen Mammakarzinomen wurde Calcitriol bis jetzt noch nicht getestet.

Zusammenfassend betrachtet kann die Frage, ob die Proliferation von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602 und Resveratrol beeinflussbar ist, positiv beantwortet werden. Für Resveratrol zeigte sich zusätzlich ein konzentrationsabhängiger Effekt. Für Calcitriol konnte kein signifikanter Einfluss detektiert werden.

4.2 Wird die Migration von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol beeinflusst?

Tumorzellen, die eine EMT durchlaufen haben, weisen eine erhöhte Motilität auf und können sich aus dem epithelialen Zellverband lösen und Metastasen in fernen Körperregionen bilden. Die Zellmigration ist folglich für den Prozess der Metastasierung wichtig. Die Motilität der Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 wurde in der vorliegenden Arbeit im Scratch-Assay 24 h und 48 h nach Beginn der Inkubation mit den potenziellen Medikamenten analysiert. 1 μ M des GHRH-Antagonisten MIA-602 inhibierte die Migration in beiden Zelllinien signifikant. Diese Beobachtungen machten auch Bellyei und Kollegen sowie Vacas und Kollegen, die bei der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-468 durch die Behandlung mit dem GHRH-Antagonisten MIA-602 bzw. MIA-609 eine verminderte Motilität feststellten [10, 184]. Der inhibierende Effekt des GHRH-Antagonisten MIA-602 auf die Zellmigration wurde auch in anderen Tumorentitäten beobachtet [188, 194]. In der vorliegenden Arbeit konnte dieser Effekt erstmals für die triple-negativen Mammakarzinomzelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 gezeigt werden. Andere Arbeitsgruppen fanden am

Mausmodell, dass MIA-602 die Metastasenbildung von androgen-unabhängigen Prostatakarzinomen und von Bronchialkarzinomen verminderte [115, 188]. Studien, die den Einfluss von MIA-602 auf die Metastasierung von triple-negativen Mamma-karzinomen *in vivo* untersuchten, konnten in der Literatur nicht gefunden werden. Hierzu wäre es – auch im Hinblick auf die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit – sinnvoll, Untersuchungen durchzuführen.

In beiden in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zelllinien inhibierte 25 μM Resveratrol die Zellmigration signifikant. Für 10 μM Resveratrol konnte lediglich ein tendenzieller Effekt beobachtet werden. In der Literatur wurde der inhibierende Effekt von Resveratrol auf die Zellmigration von triple-negativen Zelllinien schon mehrfach beschrieben [52, 99, 166]. In der vorliegenden Arbeit konnte jedoch erstmals für die Zelllinie HCC1806 gezeigt werden, dass 25 μM Resveratrol die Migration hemmt. Lee und Kollegen detektierten einen inhibierenden Effekt von Resveratrol auf die Zellmigration der Mauszelllinie 4T1 ab einer Konzentration von 10 μM [99]. Die Arbeitsgruppen von Suh [166] und Ferraz da Costa [52] hingegen konnten diesen Effekt in der Zelllinie MDA-MB-231 erst ab Konzentrationen von 50 μM bzw. 100 μM demonstrieren. Da die beiden Arbeitsgruppen auch in weiteren Experimenten eine signifikante Wirkung durch Resveratrol erst in hohen Konzentrationsbereichen erzielten, könnten unterschiedliche Kulturbedingungen und Zellpassagen ursächlich dafür sein, dass eine Wirkung mit abweichenden Konzentrationen erzielt werden konnte. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass im Rahmen dieser Arbeit die Methode des Scratch-Assays in unsere Arbeitsgruppe eingeführt wurde. Mithilfe eines gründlichen Literaturstudiums bzgl. Vorbereitung und Ablauf sowie mehreren Testdurchläufen wurden standardisierte Abläufe erprobt, diese können sich jedoch ggf. von denen anderer Arbeitsgruppen unterscheiden. Da sich in der vorliegenden Arbeit die Ergebnisse für beide Zelllinien größtenteils gut im Scratch-Assay darstellen und reproduzieren ließen, halten wir unsere Ergebnisse für valide. Der inhibierende Effekt von Resveratrol auf die Zellmigration *in vitro* wurde auch in weiteren Tumorentitäten nachgewiesen [8, 25, 86, 200]. Die Datenlage bzgl. der Wirkung von Resveratrol auf die Metastasierung im Mausmodell ist hingegen nicht eindeutig. Sun und Kollegen fanden nach der Applikation von 40 mg Resveratrol pro kg Körpergewicht für 2 Monate eine signifikant reduzierte Anzahl von Lungenmetastasen bei MDA-MB-231-xenotransplantierten Mäusen [168]. Castillo-Pichardo und Kollegen fanden hingegen im gleichen Mausmodell durch die Applikation von

5 mg und 50 mg Resveratrol pro kg Körpergewicht für 108 Tage eine signifikant erhöhte Anzahl von Lungenmetastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Für die Zelllinie MDA-MB-435 zeigte dieselbe Arbeitsgruppe unter gleichen Studienbedingungen eine tendenziell erhöhte Anzahl von Lungenmetastasen [24]. Für die Zelllinie HCC1806 konnten in der Literatur keine Studien mit Resveratrol am Mausmodell gefunden werden.

1 μ M Calcitriol inhibierte die Zellmigration weder in der Zelllinie HCC1806 noch in der Zelllinie MDA-MB-231 signifikant. Es konnte lediglich ein tendenzieller Effekt beobachtet werden, der in beiden Zelllinien sichtbar war. Auch Hillyer und Kollegen konnten keinen signifikanten Einfluss von Calcitriol auf die Migration der Zelllinie MDA-MB-231 im Scratch-Assay nach 48 h detektieren [68]. Diese Ergebnisse stehen im Gegensatz zu der Beobachtung von mehreren Arbeitsgruppen, die herausfanden, dass Calcitriol die Zellmigration von triple-negativen Zellen hemmt [33, 206]. Besonders interessant ist dabei die Beobachtung von Hansen und Kollegen, dass Calcitriol zwar die Zellmigration der Zelllinie MDA-MB-231 inhibierte, jedoch nicht die Zellproliferation [62]. Einen möglichen Erklärungsansatz könnte die Studie von Swami und Kollegen liefern, in der mithilfe von Genexpressionsanalysen der Effekt von Calcitriol auf die Expression von 2000 tumorassoziierten Genen in der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-231 untersucht worden ist. Hierbei modulierte Calcitriol vor allem Gene, die eine Zellmigration beeinflussen wie z. B. Matrix-Metalloproteinasen (MMP) und Zelladhäsionsmoleküle. Gene, die mit Apoptose oder Zellzyklusarrest assoziiert sind, wurden in deutlich geringerem Ausmaß reguliert [174]. Hansen und Kollegen hatten ihre Ergebnisse mit einem Transwell-Migrationsassay nach 4 Tagen Behandlung erzielt [62]. Hier könnte ein Grund für den Unterschied zu dem in der vorliegenden Arbeit erhaltenen Ergebnis mit dem Scratch-Assay liegen. Die antimetastasierende Wirkung von Calcitriol wurde auch am Mausmodell untersucht. *In vivo* ist der Anwendungsbereich von Calcitriol aufgrund hyperkalzämischer Nebenwirkungen jedoch eingeschränkt. Während Anisiewicz und Kollegen eine im Vergleich zur Kontrollgruppe verstärkte Lungenmetastasierung in Mäusen mit Tumoren aus triple-negativen 4T1-Zellen demonstrierten [6], zeigten Wilmanski und Kollegen eine verminderte Metastasenzahl, jedoch nur an einem artifiziellen Modell [192]. Um die unerwünschten Nebenwirkungen von Calcitriol *in vivo* zu umgehen, wurde eine Vielzahl von Vitamin D-Analoga synthetisiert, die weniger Einfluss auf

den Kalziumhaushalt haben. Deren antimetastasierender Effekt – auch auf Mammakarzinomzellen – konnte in mehreren Studien gezeigt werden [48, 53, 120].

Die Frage, ob die Migration von triple-negativen Mammakarzinomzellen durch den GHRH-Antagonisten MIA-602 und das Phytoalexin Resveratrol beeinflussbar ist, kann positiv beantwortet werden. Calcitriol bewirkte in beiden Zelllinien nur einen tendenziellen Effekt.

4.3. Reguliert die Behandlung mit dem GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol die Transkription oder die Proteinbiosynthese von EMT-Markern?

Nach den vielversprechenden Ergebnissen im Proliferations- und Migrationsassay, ist die Frage interessant, ob die einzelnen Substanzen auch auf die Regulation der mRNA-Transkription oder der Proteinbiosynthese gewirkt haben. Stellvertretend für den epithelialen Phänotyp wurde die Transkription von Claudin untersucht, während auf mesenchymaler Seite die Transkription von SLUG, SNAIL, Vimentin und N-Cadherin analysiert wurde. Bei Claudin und N-Cadherin wurden auch die synthetisierten Proteinmengen gemessen.

MIA-602 beeinflusste die Proteinexpression von Claudin nicht signifikant, während N-Cadherin signifikant reduziert wurde. Der mäßige Einfluss von MIA-602 auf die Proteinbiosynthese des epithelialen Markers Claudin steht augenscheinlich im Gegensatz zu der eindrücklichen Wirkung des GHRH-Antagonisten auf die Zellproliferation und Migration. Einen Erklärungsansatz hierfür könnte eine von Niemann und Kollegen publizierte Studie liefern. Dort zeigte die Arbeitsgruppe, dass vor allem N-Cadherin die Invasivität und Motilität von Tumorzellen beeinflusst, während epitheliale Marker diesbezüglich eine untergeordnete Rolle zu spielen scheinen [124]. Wheelock und Kollegen definierten in Anlehnung daran den Begriff „Cadherin-Switching“ neu und stellten die erhöhte Expression von N-Cadherin in den Fokus, während die Expression von E-Cadherin an Bedeutung verlor [191]. Als möglicher Mechanismus, über den N-Cadherin zu erhöhter Motilität und Invasivität von Tumorzellen führt, wird die Interaktion mit Rezeptor-Tyrosinkinasen diskutiert. Doherty und Kollegen ziehen in Erwägung, dass N-Cadherin die Dimerisierung des FGF-Rezeptors (*fibroblast growth factor*-Rezeptor) erleichtert und zu einer unabhängigen Signalweiterleitung führt [45]. Auch Interaktionen mit weiteren Rezeptor-

Tyrosinkinasen werden vermutet [176, 191]. Des Weiteren erleichtert das von Tumorzellen exprimierte N-Cadherin über direkte Bindung an endotheliales N-Cadherin den Zugang zum Gefäßsystem und somit die Möglichkeit zur Metastasierung [63]. Die von Niemann und Kollegen publizierte Annahme, dass vor allem die Reduktion der mesenchymalen Marker entscheidend ist, wird durch die Literatur zum Einfluss von GHRH-Antagonisten auf die Genexpression von EMT-Markern unterstützt. Denn obwohl die aufgeführten Arbeitsgruppen alle einen inhibierenden Effekt von GHRH-Antagonisten auf die Zellproliferation und Migration *in vitro* beobachteten, zeigten lediglich Bellyei und Kollegen in der triple-negativen Zelllinie MDA-MB-468 – bei einer gleichzeitigen Reduktion des mesenchymalen Markers β -Catenin – auch eine Erhöhung von E-Cadherin im Western Blot [10]. Muñoz-Moreno und Kollegen hingegen demonstrierten nach der Behandlung von Prostatakarzinomzellen mit den GHRH-Antagonisten JMR-132 und JV-1-38 sowohl eine verringerte Expression von β -Catenin als auch eine Reduktion von E-Cadherin [115]. Popovics und Kollegen konnten ausschließlich eine signifikante Reduktion von N-Cadherin durch den GHRH-Antagonisten MIA-690 in chronisch entzündeten Prostatazellen zeigen, während die Expression von E-Cadherin nicht beeinflusst wurde [140]. Dennoch muss daraufhin gewiesen werden, dass die aktuelle Datenlage bzgl. der Wirkung von GHRH-Antagonisten auf die EMT spärlich ist und durch weitere Experimente ergänzt werden sollte, sodass statistisch valide Aussagen diesbezüglich getroffen werden können.

Resveratrol reduziert die Genexpression von mesenchymalen Markern und erhöht parallel dazu die epithelialen Marker signifikant, wie eine Vielzahl von Arbeitsgruppen zeigte [19, 78, 82, 159, 198, 200]. In der vorliegenden Arbeit reduzierten 10 μ M und 25 μ M Resveratrol die Proteinbiosynthese von N-Cadherin in beiden Zelllinien signifikant, während in der Zelllinie HCC1806 erst bei 25 μ M Resveratrol eine signifikant verstärkte Expression von Claudin beobachtet werden konnte. Auf die mRNA-Transkription hatte 25 μ M Resveratrol in beiden Zelllinien hauptsächlich tendenzielle Einflüsse. Zur Diskussion steht, ob das abweichende Ergebnis bzgl. der epithelialen Expression in der vorliegenden Arbeit durch die getroffene Auswahl von Claudin als epithelialen Marker erklärt werden könnte, da in der Literatur fast ausschließlich die Expression von E-Cadherin untersucht wurde. Auf dieses Problem weisen auch Singh und Kollegen hin, die betonen, dass die EMT-assoziierten Veränderungen von Claudin komplexer seien als die von E-Cadherin und nicht zwangs-

läufig miteinander verglichen werden könnten [160]. Da sich der medikamentöse Einfluss auf den epithelialen Phänotyp gut am Beispiel von Claudin in der vorliegenden Arbeit darstellen ließ, wurde an Claudin festgehalten. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass in Arbeiten aus der Literatur häufig mit deutlich höheren Konzentrationen und mit längeren Inkubationszeiten gearbeitet wurde. Die Tatsache, dass die Behandlung mit 25 μM Resveratrol die Genexpression von Claudin zumindest in der Zelllinie HCC1806 signifikant erhöhte, könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Expression von Claudin erst bei höheren Konzentrationen signifikant beeinflusst wird. In zukünftigen Experimenten sollte die Konzentration von Resveratrol dementsprechend probeweise erhöht werden.

Calcitriol hatte in der vorliegenden Arbeit in der Konzentration von 1 μM ausschließlich einen tendenziellen Effekt auf die Genexpression der epithelialen und mesenchymalen Marker. Dieses Ergebnis geht einher mit der in der vorliegenden Arbeit detektierten schwachen Wirkung von Calcitriol auf die Proliferation und Migration, steht jedoch im Gegensatz zu den Angaben aus der Literatur. Chiang und Kollegen demonstrierten in der Zelllinie MDA-MB-231 nach 48 h Behandlung mit 0,1 μM Calcitriol eine signifikante Reduktion von N-Cadherin im Western Blot und eine signifikant erhöhte Expression von E-Cadherin [33]. Da Calcitriol in dieser Publikation allerdings auch die Migration und die Invasion inhibierte, kann davon ausgegangen werden, dass die Zellen allgemein sensibel für Calcitriol waren, was durch andere Kulturbedingungen erklärt werden könnte. Abdel-Mohsen und Kollegen untersuchten die Wirkung von Calcitriol auf die Transkription von E-Cadherin in der Zelllinie HCC1806. Erst nach einer Inkubation von 6 Tagen mit 0,1 μM Calcitriol detektierten sie eine signifikante Erhöhung von E-Cadherin in der pCR [1]. Dieser Effekt trat deutlich früher ein, wenn die Zellen in Folge einer Transfektion den VDR überexprimierten, sodass von einer direkten Transkriptionskontrolle über den nukleären Rezeptor ausgegangen werden kann. Pendás-Franco und Kollegen detektierten 72 h nach Calcitriolgabe eine signifikante Reduktion von N-Cadherin auf die triple-negative Zelllinie MDA-MB-453 im Western Blot, während die Expression von Claudin erhöht war [134]. Hierzu muss jedoch erwähnt werden, dass im Rahmen der Publikation initial das Ansprechen unterschiedlicher Brustkrebszelllinien auf Calcitriol untersucht wurde. Während sich in der Zelllinie MDA-MB-453 durch die Behandlung mit Calcitriol die Expression des VDR stark erhöhte, zeigten sich dahingehend in der Zelllinie MDA-MB-231 keine signifikanten Änderungen. Es kann

also vermutet werden, dass in der Zelllinie MDA-MB-231 ebenfalls kein Einfluss von Calcitriol auf die Genexpression von EMT-Markern hätte detektiert werden können. Zusätzlich muss erwähnt werden, dass von mehreren Forschungsgruppen eine Her2/Neu-Überexpression in Zelllinie MDA-MB-453 gefunden wurde, sodass möglicherweise keine triple-negative Linie vorliegt [70, 100]. Die Wirkung von Calcitriol auf die EMT wurde besonders intensiv am kolorektalen Karzinom erforscht, wo durch zahlreiche Arbeitsgruppen ein signifikanter Effekt auf die Genexpression von EMT-Markern gezeigt werden konnte [98]. Diese Ergebnisse können jedoch aufgrund der unterschiedlichen Tumorbiologie nicht zwangsläufig mit triple-negativen Mammakarzinomzellen verglichen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Regulation der mRNA-Transkription nach 2 h Behandlung gemessen. Die Effekte waren meistens tendenziell. Hier hätten eventuell andere Messpunkte zu signifikanten Unterschieden geführt. SLUG und SNAIL werden als Transkriptionsfaktoren zeitlich vor den Effektorproteinen wie N-Cadherin, Vimentin und Claudin reguliert, sodass in zukünftigen Experimenten ggf. mit mehreren Messpunkten gearbeitet werden sollte. Des Weiteren sollte berücksichtigt werden, dass die EMT kein binärer Prozess ist, sondern eine Abfolge von unterschiedlichen epithelial-mesenchymalen Zwischenstadien, die durch individuelle Expressionslevel der Proteine charakterisiert sind. Der medikamentöse Einfluss auf die Genexpression muss somit nicht alle Marker gleichzeitig oder gleichermaßen betreffen.

Die Frage, ob die untersuchten Substanzen einen Effekt auf die Genexpression von EMT-Markern haben, kann für MIA-602 und Resveratrol positiv beantwortet werden, da sie die Proteinbiosynthese des für die Invasion und Zellmigration entscheidenden Proteins N-Cadherin signifikant reduzierten. Für Calcitriol konnte kein signifikanter Einfluss detektiert werden.

4.4 Beeinflussen der GHRH-Antagonist MIA-602, Resveratrol oder Calcitriol eine mit TGF β induzierte EMT?

In den vorangegangenen Experimenten konnte bereits gezeigt werden, dass der GHRH-Antagonist MIA-602 und Resveratrol die EMT in triple-negativen Mammakarzinomzellen direkt beeinflussen, für Calcitriol konnte diesbezüglich kein Effekt nachgewiesen werden. Da Tumorzellen *in vivo* verstärkt den Wachstumsfaktor

TGF β exprimieren, der über autokrine und parakrine Sekretion die EMT induziert und aufrechterhält, könnte es aufschlussreich sein, die Wirkung der drei potenziellen Medikamente auch in Anwesenheit von TGF β zu überprüfen.

Die Behandlung der triple-negativen Zelllinien HCC1806 und MDA-MB-231 mit TGF β führte zu einer verstärkten Zellmigration in beiden Zellreihen. TGF β verstärkte die mRNA der Transkriptionsfaktoren SNAIL und SLUG signifikant sowie meistens auch die mRNA von Vimentin und N-Cadherin. Die mRNA von Claudin wurde tendenziell verringert. Im Western Blot konnte eine signifikante Reduktion von Claudin durch TGF β gemessen werden, während die Expression von N-Cadherin signifikant erhöht wurde. Dies stimmt mit Ergebnissen aus der Literatur überein und belegt die potente Wirkung von TGF β als EMT-Induktor [114, 168, 187]. Ebenfalls in Übereinstimmung mit Literaturdaten inhibierte TGF β die Zellproliferation in beiden Zelllinien signifikant, wobei ein Zellzyklusarrest in der G1-Phase als ausschlaggebend betrachtet wird [116]. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass die EMT mit einer transienten Reduktion der Zellproliferation assoziiert sein könnte [59]. Die Effektivität, mit der Medikamente eine TGF β -induzierte EMT beeinflussen, wird laut Literatur hauptsächlich anhand der Zellmigration sowie der Genexpression von EMT-Markern beurteilt. Deshalb fokussiert sich die folgende Diskussion ebenfalls auf diese Aspekte.

MIA-602 konnte in beiden Zelllinien die TGF β -induzierte Zellmigration aufheben. Auch im Western Blot führte die zusätzliche Gabe von MIA-602 zu einer signifikant verstärkten Proteinbiosynthese von Claudin. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass MIA-602 in der Lage ist einer TGF β -induzierten EMT entgegenzuwirken. Ein ähnliches Ergebnis demonstrierten Popovics und Kollegen in entzündeten Prostatazellen als Modell für benigne Prostatahyperplasie [139].

Auch Resveratrol konnte in beiden Zelllinien die TGF β -induzierte Migration aufheben. Nach zusätzlicher Gabe von Resveratrol konnte im Western Blot eine verstärkte Expression von Claudin nachgewiesen werden. Der Effekt war in der Zelllinie MDA-MB-231 konzentrationsabhängig. Die Transkription der mRNA von Claudin wurde in der Zelllinie HCC1806 signifikant erhöht und die mesenchymalen Marker wurden tendenziell erniedrigt. Bei MDA-MB-231 war hingegen die Transkription der mesenchymalen Marker signifikant erniedrigt und die von Claudin tendenziell erhöht. Insgesamt betrachtet weisen unsere Versuche daraufhin, dass Resveratrol die TGF β -induzierte EMT in triple-negativen Mammakarzinomzellen inhibiert, wobei der

Effekt bei einer Konzentration von 25 μM stärker war als bei 10 μM . Der Einfluss von Resveratrol auf eine TGF β -induzierte EMT wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen untersucht. Song und Kollegen demonstrierten einen inhibierenden Effekt auf die TGF β -induzierte EMT in Glioblastomzellen und Wang und Kollegen in Bronchialkarzinomzellen [162, 187]. Sun und Kollegen zeigten diesen Effekt für die Zelllinie MDA-MB-231 [168]. Zusätzlich konnte durch die Arbeitsgruppe im Western Blot gezeigt werden, dass Resveratrol die Expression von SMAD2 und SMAD3 sowie von P-PI3K und P-Akt signifikant reduzierte, was zu dem Rückschluss führt, dass Resveratrol die SMAD-abhängige Signaltransduktion und den PI3K/Akt-Signalweg moduliert und dadurch die TGF β -induzierte EMT abschwächt. Auch die reduzierte Expression der Transkriptionsfaktoren SNAIL und SLUG sowie der Effektorproteine MMP-2 und MMP-9 unterstützen diese These. In der vorliegenden Arbeit konnte die Beobachtung von Sun und Kollegen bzgl. der Wirkung von Resveratrol auf die TGF β -induzierte EMT in der Zelllinie MDA-MB-231 bestätigt werden und erstmals für die triple-negative Zelllinie HCC1806 gezeigt werden. Zukünftig sollten weitere triple-negative Zelllinien dahingehend untersucht werden, um die Aussagen zu validieren und das medikamentöse Potential von Resveratrol besser abschätzen zu können.

Calcitriol wirkte in der vorliegenden Arbeit nicht allein auf die EMT, aber als zusätzliche Gabe gegenüber den nur mit TGF β -induzierten Proben hatte es einen signifikanten Effekt. Im Migrationsassay reduzierte Calcitriol die durch TGF β -induzierte Zellmigration in beiden Zelllinien signifikant und auch bei der mRNA-Transkription führte die Kombination von TGF β und Calcitriol gegenüber TGF β alleine zu einer reduzierten Transkription der mesenchymalen Marker, während Claudin verstärkt transkribiert wurde. Im Western Blot zeigte sich die durch TGF β reduzierte Expression von Claudin durch den Zusatz von Calcitriol erhöht. Einige der aufgezählten Effekte waren nur tendenziell, aber die mehrheitlich signifikanten Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Calcitriol eine TGF β -induzierte EMT in triple-negativen Mammakarzinomzellen abschwächt. Ähnliche Beobachtungen wurden von Fischer und Kollegen in Bronchialepithelzellen gemacht [54] sowie von Chen und Kollegen in Kolonkarzinomzellen [32]. Das Zusammenspiel der beiden Signalwege auf molekularer Ebene ist noch nicht vollständig entschlüsselt, dennoch wird angenommen, dass das durch TGF β -aktivierte SMAD3 zusammen mit dem Koaktivator SRC-1 (Steroid Rezeptor Koaktivator-1) einen Komplex bildet, der den VDR

aktiviert und somit Calcitriol-abhängige Effekte verstärkt [196]. Auch eine aktuelle Publikation von Ricca und Kollegen bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die starke Wirkung von Calcitriol auf die EMT in TGF β -induzierten Systemen [148]. Die Arbeitsgruppe zeigte, dass die Behandlung von Bronchialepithelzellen mit TGF β zu einer 3-fach stärkeren Expression des VDR führte als durch eine alleinige Behandlung mit Calcitriol und dadurch die VDR-abhängigen, antikanzerogenen Effekte von Calcitriol in Anwesenheit von TGF β verstärkt wurden. Dass dieser Effekt nur dann detektiert werden konnte, wenn Calcitriol zusammen mit oder vor TGF β zu den Zellen gegeben wurde, jedoch nicht in TGF β -vorbehandelten Zellen, könnte eine mögliche Erklärung sein, warum in klinischen Studien mehrheitlich präventive anstatt therapeutischer Effekte von Calcitriol auf Tumorerkrankungen beobachtet wurden [21, 110, 202]. Die Tatsache, dass in der vorliegenden Arbeit Calcitriol die durch TGF β erhöhte Transkription von SLUG und SNAIL reduzierte, bestätigt die Annahme, dass Calcitriol auf transkriptioneller Ebene die Effekte von TGF β moduliert.

Dass für alle 3 Substanzen in Anwesenheit von TGF β keine Modulation von N-Cadherin im Western Blot nachgewiesen werden konnte – obwohl bei alleiniger Gabe der 3 Substanzen N-Cadherin reduziert wurde – könnte ein Hinweis darauf sein, dass sich der Wirkmechanismus von Medikamenten in Anwesenheit von TGF β von der direkten Wirkung unterscheidet.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit konnten erstmals zeigen, dass MIA-602 und Calcitriol eine TGF β -induzierte EMT in triple-negativen Mammakarzinomzellen abschwächen. Für Resveratrol war dies bereits für die Zelllinie MDA-MB-231 bekannt und konnte hier in der triple-negativen Linie HCC1806 bestätigt werden. Weiterführende Studien sollten untersuchen, ob die in der vorliegenden Arbeit erzielten Wirkungen auch auf triple-negative Mammakarzinome *in vivo* nachvollziehbar sind.

5. Zusammenfassung

Das Mammakarzinom ist die häufigste Malignomerkrankung der Frau und kann im metastasierten Zustand nur noch palliativ behandelt werden. Als prognostisch besonders ungünstig gilt das triple-negative Mammakarzinom. In dieser Subgruppe sind weder Hormonrezeptoren exprimiert noch ist eine Überexpression des Wachstumsrezeptors Her2/neu vorhanden, sodass hier keine Option für eine zielgerichtete Therapie besteht. Alternative Therapieansätze werden also dringend gesucht. Die epithelial-mesenchymale Transition (EMT) gilt als wichtiger Prozess für die Metastasierung und die Entstehung von Therapieresistenzen. In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss des GHRH-Antagonisten MIA-602, des Phytoalexins Resveratrol und von Calcitriol auf die Zellproliferation, die Zellmigration sowie auf die Genexpression von EMT-Markern in den triple-negativen Mammakarzinomzelllinien MDA-MB-231 und HCC1806 untersucht werden. Für MIA-602 und Resveratrol konnte ein inhibierender Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellmigration gezeigt werden, während Calcitriol hier keinen Einfluss hatte. Diese Beobachtungen wurde im Western Blot bestätigt, da MIA-602 und Resveratrol die Expression des mesenchymalen Phänotyps reduzierten, Calcitriol hingegen nicht. Der Wachstumsfaktor TGF β wurde eingesetzt, um eine EMT zu induzieren und die Wirkung der potenziellen Medikamente wurde erneut untersucht. In beiden Zelllinien schwächten alle 3 getesteten Substanzen TGF β -induzierte EMT, was sowohl im Migrationsassay als auch bei der Transkription und Proteinbiosynthese gezeigt werden konnte.

Die vorliegende Arbeit belegt eine inhibierende Wirkung durch den GHRH-Antagonisten MIA-602, Resveratrol und Calcitriol auf die TGF β -induzierte EMT in triple-negativen Mammakarzinomzellen. Mit Ausnahme der Wirkung von Resveratrol in der Zelllinie MDA-MB-231 waren die anderen Untersuchungen bis dato noch nicht publiziert. Die hier vorgestellten Ergebnisse sind vielversprechend für die weitere Erforschung der drei Substanzen als potenzielle Therapieoption zur Vermeidung von Metastasen beim triple-negative Mammakarzinom. Resveratrol ist wegen bereits vorher bekannten fraglichen Effekten im niedrigen Konzentrationsbereich kritisch zu beurteilen. Die vielversprechenden Ergebnisse mit dem GHRH-Antagonisten MIA-602 könnten in weiteren Studien vertieft werden.

6. Literaturverzeichnis

- [1] M. Abdel-Mohsen, S. Abo Deif, L. Abou-Shamaa, IL-6 Impairs the Activity of Vitamin D3 in the Regulation of Epithelial-Mesenchymal Transition in Triple Negative Breast Cancer, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*. 20 (2019) 2267–2273.
- [2] B. Aggarwal, A. Bhardwaj, R. Aggarwal, N. Seeram, S. Shishodia, Y. Takada, Role of resveratrol in prevention and therapy of cancer: preclinical and clinical studies, *Anticancer Res*. 24 (2004) 2783–2840.
- [3] N. Ahmad, V. Adhami, F. Afaq, D.K. Feyes, H. Mukhtar, Resveratrol causes WAF-1/p21-mediated G(1)-phase arrest of cell cycle and induction of apoptosis in human epidermoid carcinoma A431 cells, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res*. 7 (2001) 1466–1473.
- [4] P. Allavena, G. Germano, F. Marchesi, A. Mantovani, Chemokines in cancer related inflammation, *Exp. Cell Res*. 317 (2011) 664–673.
- [5] H. Anandhi Senthilkumar, J. Fata, E. Kennelly, Phytoestrogens: The current state of research emphasizing breast pathophysiology, *Phytother. Res. PTR*. 32 (2018) 1707–1719.
- [6] A. Anisiewicz, A. Pawlik, B. Filip-Psurska, E. Turlej, S. Dzimira, M. Milczarek, K. Gdesz, D. Papiernik, J. Jarosz, D. Kłopotowska, A. Kutner, A. Mazur, J. Wietrzyk, Unfavorable effect of calcitriol and its low-calcemic analogs on metastasis of 4T1 mouse mammary gland cancer, *Int. J. Oncol*. 52 (2018) 103–126.
- [7] Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie e.V., ed., *Leitlinie – Diagnostik und Therapie primärer und metastasierter Mammakarzinome*, 2020.
- [8] Y. Bai, H. Yang, G. Zhang, L. Hu, Y. Lei, Y. Qin, Y. Yang, Q. Wang, R. Li, Q. Mao, Inhibitory effects of resveratrol on the adhesion, migration and invasion of human bladder cancer cells, *Mol. Med. Rep*. 15 (2017) 885–889.
- [9] J.-P. Basly, F. Marre-Fournier, J.-C. Le Bail, G. Habrioux, A.J. Chulia, Estrogenic/antiestrogenic and scavenging properties of (E)- and (Z)-resveratrol, *Life Sci*. 66 (2000) 769–777.
- [10] S. Bellyei, A. Schally, M. Zarandi, J. Varga, I. Vidaurre, E. Pozsgai, GHRH antagonists reduce the invasive and metastatic potential of human cancer cell lines in vitro, *Cancer Lett*. 293 (2010) 31–40.
- [11] G. van den Bemd, G. Chang, Vitamin D and vitamin D analogs in cancer treatment, *Curr. Drug Targets*. 3 (2002).
- [12] L. Bohl, S. Guizzardi, V. Rodríguez, L. Hinrichsen, V. Rozados, D. Cremonuzzi, N. Tolosa de Talamoni, G. Picotto, Combined calcitriol and menadione reduces experimental murine triple negative breast tumor, *Biomed. Pharmacother. Biomedecine Pharmacother*. 94 (2017) 21–26.
- [13] K. Bove, D. Lincoln, M.-F. Tsan, Effect of resveratrol on growth of 4T1 breast cancer cells in vitro and in vivo, *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 291 (2002) 1001–1005.
- [14] J. Bowers, V. Tyulmenkov, S. Jernigan, C. Klinge, Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta, *Endocrinology*. 141 (2000) 3657–3667.
- [15] R. Brandes, F. Lang, R. Schmidt, eds., in: *Physiol. Menschen mit Pathophysiol.*, 32. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, 2018: pp. 925–927.

- [16] C. Brosseau, G. Pirianov, K. Colston, Involvement of stress activated protein kinases (JNK and p38) in 1,25 dihydroxyvitamin D₃-induced breast cell death, *Steroids*. 75 (2010) 1082–1088.
- [17] V. Brown, K. Patel, M. Viskaduraki, J.A. Crowell, M. Perloff, T.D. Booth, G. Vasilinin, A. Sen, A.M. Schinas, G. Piccirilli, K. Brown, W.P. Steward, A.J. Gescher, D.E. Brenner, Repeat Dose Study of the Cancer Chemopreventive Agent Resveratrol in Healthy Volunteers: Safety, Pharmacokinetics and Effect on the Insulin-like Growth Factor Axis, *Cancer Res*. 70 (2010) 9003–9011.
- [18] S. Buchholz, A. Schally, J. Engel, F. Hohla, E. Heinrich, F. Koester, J.L. Varga, G. Halmos, Potentiation of mammary cancer inhibition by combination of antagonists of growth hormone-releasing hormone with docetaxel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 1943–1946.
- [19] C. Buhrmann, Shayan P, Kraehe P, P. B, Goel A, Shakibaei M, Resveratrol induces chemosensitization to 5-fluorouracil through up-regulation of inter-cellular junctions, Epithelial-to-mesenchymal transition and apoptosis in colorectal cancer, *Biochem. Pharmacol.* 98 (2015).
- [20] R. Buras, L. Schumaker, F. Davoodi, R. Brenner, M. Shabahang, R.J. Nauta, S.R. Evans, Vitamin D receptors in breast cancer cells, *Breast Cancer Res. Treat.* 31 (1994) 191–202.
- [21] H. Cao, Y. Xu, R. de Necochea-Campion, D.J. Baylink, K.J. Payne, X. Tang, C. Ratanatharathorn, Y. Ji, S. Mirshahidi, C.-S. Chen, Application of vitamin D and vitamin D analogs in acute myelogenous leukemia, *Exp. Hematol.* 50 (2017) 1–12.
- [22] N. Carbó, P. Costelli, F. Baccino, F. López-Soriano, J.M. Argilés, Resveratrol, a natural product present in wine, decreases tumour growth in a rat tumour model, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254 (1999) 739–743.
- [23] L. Carter, J. D’Orazio, K. Pearson, Resveratrol and cancer: focus on in vivo evidence, *Endocr. Relat. Cancer*. 21 (2014) R209-225.
- [24] L. Castillo-Pichardo, L. Cubano, S. Dharmawardhane, Dietary grape polyphenol resveratrol increases mammary tumor growth and metastasis in immunocompromised mice, *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (2013) 6.
- [25] R. Chai, H. Fu, Z. Zheng, T. Liu, S. Ji, G. Li, Resveratrol inhibits proliferation and migration through SIRT1 mediated post-translational modification of PI3K/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells, *Mol. Med. Rep.* 16 (2017) 8037–8044.
- [26] I. Chatzistamou, A. Schally, H. Kiaris, E. Politi, J. Varga, G. Kanellis, A. Kalofoutis, A. Pafiti, H. Koutselini, Immunohistochemical detection of GHRH and its receptor splice variant 1 in primary human breast cancers, *Eur. J. Endocrinol.* 151 (2004) 391–396.
- [27] I. Chatzistamou, A. Schally, J. Varga, K. Groot, R. Busto, P. Armatis, G. Halmos, Inhibition of growth and metastases of MDA-MB-435 human estrogen-independent breast cancers by an antagonist of growth hormone-releasing hormone, *Anticancer. Drugs*. 12 (2001) 761–768.
- [28] K. Chavez, S. Garimella, S. Lipkowitz, Triple Negative Breast Cancer Cell Lines: One Tool in the Search for Better Treatment of Triple Negative Breast Cancer, *Breast Dis.* 32 (2010) 35–48.
- [29] C.-R. Chen, Y. Kang, P. Siegel, J. Massagué, E2F4/5 and p107 as Smad co-factors linking the TGFβ receptor to c-myc repression, *Cell*. 110 (2002) 19–32.
- [30] J. Chen, X. Dong, X. Guo, Inhibitory effect of resveratrol on the growth of human colon cancer Is174t cells and its subcutaneously transplanted tumor in

- nude mice and the mechanism of action, *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi.* 31 (2009) 15–19.
- [31] M.-L. Chen, M. Pittet, L. Gorelik, R. Flavell, R. Weissleder, H. von Boehmer, K. Khazaie, Regulatory T cells suppress tumor-specific CD8 T cell cytotoxicity through TGF- β signals in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 419–424.
- [32] S. Chen, J. Zhu, S. Zuo, J. Ma, J. Zhang, G. Chen, X. Wang, Y. Pan, Y. Liu, P. Wang, 1,25(OH)₂D₃ attenuates TGF- β 1/ β 2-induced increased migration and invasion via inhibiting epithelial-mesenchymal transition in colon cancer cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 468 (2015) 130–135.
- [33] K.-C. Chiang, T.-S. Yeh, S.-C. Chen, J.-H.S. Pang, C.-N. Yeh, J.-T. Hsu, L.-W. Chen, S.-F. Kuo, M. Takano, A. Kittaka, T.C. Chen, C.-C. Sun, H.-H. Juang, The Vitamin D Analog, MART-10, Attenuates Triple Negative Breast Cancer Cells Metastatic Potential, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016) 606.
- [34] R. Chlebowski, S. Hendrix, R. Langer, M. Stefanick, M. Gass, D. Lane, R.J. Rodabough, M.A. Gilligan, M.G. Cyr, C.A. Thomson, J. Khandekar, H. Petrovitch, A. McTiernan, for the W. Investigators, Influence of Estrogen Plus Progestin on Breast Cancer and Mammography in Healthy Postmenopausal Women: The Women’s Health Initiative Randomized Trial, *JAMA.* 289 (2003) 3243–3253.
- [35] H. Chow, L. Garland, B. Heckman-Stoddard, C.-H. Hsu, V. Butler, C.A. Cordova, W.M. Chew, T.L. Cornelison, A pilot clinical study of resveratrol in postmenopausal women with high body mass index: effects on systemic sex steroid hormones, *J. Transl. Med.* 12 (2014) 223.
- [36] H. Chow, L. Garland, C.-H. Hsu, D. Vining, W. Chew, J.A. Miller, M. Perloff, J.A. Crowell, D.S. Alberts, Resveratrol modulates drug- and carcinogen-metabolizing enzymes in a healthy volunteer study, *Cancer Prev. Res. Phila. Pa.* 3 (2010) 1168–1175.
- [37] A. Cianciulli, R. Calvello, P. Cavallo, T. Dragone, V. Carofiglio, M.A. Panaro, Modulation of NF- κ B activation by resveratrol in LPS treated human intestinal cells results in downregulation of PGE₂ production and COX-2 expression, *Toxicol. Vitro Int. J. Publ. Assoc. BIBRA.* 26 (2012) 1122–1128.
- [38] M. Clément, J. Hirpara, S. Chawdhury, S. Pervaiz, Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, triggers CD95 signaling-dependent apoptosis in human tumor cells, *Blood.* 92 (1998) 996–1002.
- [39] G. Dall, K. Britt, Estrogen Effects on the Mammary Gland in Early and Late Life and Breast Cancer Risk, *Front. Oncol.* 7 (2017).
- [40] K. Deeb, D. Trump, C. Johnson, Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 684–700.
- [41] R. Dent, M. Trudeau, K. Pritchard, W. Hanna, H. Kahn, C.A. Sawka, L.A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, S.A. Narod, Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 13 (2007) 4429–4434.
- [42] Deutsche Krebsgesellschaft e.V., Deutsche Krebshilfe e.V., AWMF, eds., S3-Leitlinie Früherkennung, Diagnose, Therapie und Nachsorge des Mammakarzinoms, 2020.
- [43] P. Dhawan, R. Weider, S. Christakos, CCAAT Enhancer-binding Protein α Is a Molecular Target of 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ in MCF-7 Breast Cancer Cells, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 3086–3095.
- [44] E.V. Dimaraki, W.F. Chandler, M.B. Brown, C.A. Jaffe, S.Y. Kim, R. Taussig, V. Padmanabhan, A.L. Barkan, The role of endogenous growth hormone-re-

- leasing hormone in acromegaly, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 91 (2006) 2185–2190.
- [45] P. Doherty, G. Williams, E. Williams, CAMs and axonal growth: a critical evaluation of the role of calcium and the MAPK cascade, *Mol. Cell. Neurosci.* 16 (2000) 283–295.
- [46] X. Dolcet, D. Llobet, J. Pallares, X. Matias-Guiu, NF- κ B in development and progression of human cancer, *Virchows Arch. Int. J. Pathol.* 446 (2005) 475–482.
- [47] J. Dörrie, H. Gerauer, Y. Wachter, S.J. Zunino, Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells, *Cancer Res.* 61 (2001) 4731–4739.
- [48] K. El Abdaimi, Dion N, Papavasiliou V, Cardinal Pe, Binderup L, G. D, S.-M. Lg, K. R, The vitamin D analogue EB 1089 prevents skeletal metastasis and prolongs survival time in nude mice transplanted with human breast cancer cells, *Cancer Res.* 60 (2000).
- [49] N. El-Sayed, Y. Bayan, Possible role of resveratrol targeting estradiol and neprilysin pathways in lipopolysaccharide model of Alzheimer disease, *Adv. Exp. Med. Biol.* 822 (2015) 107–118.
- [50] F. Fan, W. Yu, 1,25-Dihydroxyvitamin D3 suppresses cell growth, DNA synthesis, and phosphorylation of retinoblastoma protein in a breast cancer cell line, *Cancer Invest.* 13 (1995) 280–286.
- [51] T. Fehm, W. Janni, E. Stickeler, C.B. Tempfer, in: *Gynäkolog. Differ.*, 1. Auflage, Elsevier, München, 2020: pp. 146–147.
- [52] D. Ferraz da Costa, N. Campos, R. Santos, F.H. Guedes-da-Silva, M.M.D.C. Martins-Dinis, L. Zanphorlin, C. Ramos, L.P. Rangel, J.L. Silva, Resveratrol prevents p53 aggregation in vitro and in breast cancer cells, *Oncotarget.* 9 (2018) 29112–29122.
- [53] M. Ferronato, D. Obiol, M. Fermento, N.A. Gandini, E.N. Alonso, D.G. Salomón, C. Vitale, E. Mascaró, Y. Fall, A.R. Raimondi, A.C. Curino, M.M. Facchinetti, The alkynylphosphonate analogue of calcitriol EM1 has potent anti-metastatic effects in breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 154 (2015) 285–293.
- [54] K. Fischer, D. Agrawal, Vitamin D regulating TGF- β induced epithelial-mesenchymal transition, *Respir. Res.* 15 (2014).
- [55] K. Fischer, A. Durrans, S. Lee, J. Sheng, F. Li, S. Wong, H. Choi, T. El Rayes, S. Ryu, J. Troeger, R.F. Schwabe, L.T. Vahdat, N.K. Altorki, V. Mittal, D. Gao, EMT is not required for lung metastasis but contributes to chemoresistance, *Nature.* 527 (2015) 472–476.
- [56] L. Flanagan, K. Packman, B. Juba, S. O'Neill, M. Tenniswood, J. Welsh, Efficacy of Vitamin D compounds to modulate estrogen receptor negative breast cancer growth and invasion, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 84 (2003) 181–192.
- [57] J. García-Quiroz, R. García-Becerra, C. Santos-Cuevas, G.J. Ramírez-Nava, G. Morales-Guadarrama, N. Cárdenas-Ochoa, M. Segovia-Mendoza, H. Prado-García, D. Ordaz-Rosado, E. Avila, A. Olmos-Ortiz, S. López-Cisneros, F. Larrea, L. Díaz, Synergistic Antitumorigenic Activity of Calcitriol with Curcumin or Resveratrol is Mediated by Angiogenesis Inhibition in Triple Negative Breast Cancer Xenografts, *Cancers.* 11 (2019).
- [58] F. Ghiringhelli, C. Ménard, M. Terme, C. Flament, J. Taieb, N. Chaput, P.E. Puig, S. Novault, B. Escudier, E. Vivier, A. Lécésne, C. Robert, J.-Y. Blay, J. Bernard, S. Caillat-Zucman, A. Freitas, T. Tursz, O. Wagner-Ballon, C.

- Capron, W. Vainchencker, F. Martin, L. Zitvogel, CD4+CD25+ regulatory T cells inhibit natural killer cell functions in a transforming growth factor-beta-dependent manner, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 1075–1085.
- [59] N. Gunasinghe, A. Wells, E. Thompson, H.J. Hugo, Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer, *Cancer Metastasis Rev.* 31 (2012) 469–478.
- [60] K. Hanew, A. Tanaka, A. Utsumi, A. Sugawara, K. Abe, Plasma GH responses to human GHRH-antagonist in normal subjects, *Eur. J. Endocrinol.* 134 (1996) 67–72.
- [61] K. Hanew, A. Tanaka, A. Utsumi, A. Sugawara, K. Abe, The inhibitory effects of growth hormone-releasing hormone (GHRH)-antagonist on GHRH, L-dopa, and clonidine-induced GH secretion in normal subjects, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 1952–1955.
- [62] Hansen C, 1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the invasive potential of human breast cancer cells in vitro, *Clin. Exp. Metastasis.* 12 (1994).
- [63] R. Hazan, G. Phillips, R. Qiao, L. Norton, S.A. Aaronson, Exogenous expression of N-cadherin in breast cancer cells induces cell migration, invasion, and metastasis, *J. Cell Biol.* 148 (2000) 779–790.
- [64] P. Heinrich, M. Müller, L. Graeve, G. Löffler, P.E. Petrides, eds., in: Löffler/Petrides *Biochem. Pathobiochem.*, 9., vollständig überarbeitete Auflage, Springer, Berlin Heidelberg, 2014: pp. 712–714.
- [65] A. Held, D. Sadava, J. Markl, B. Jarosch, D.M. Hillis, H.C. Heller, L. Seidler, S.D. Hacker, M. Niehaus-Osterloh, E. Sixt, in: *Purves Biol.*, Springer, Berlin, Heidelberg, 2019: pp. 1159–1160.
- [66] C.-H. Heldin, M. Landström, A. Moustakas, Mechanism of TGF-beta signaling to growth arrest, apoptosis, and epithelial-mesenchymal transition, *Curr. Opin. Cell Biol.* 21 (2009) 166–176.
- [67] C.-H. Heldin, A. Moustakas, Role of Smads in TGFβ signaling, *Cell Tissue Res.* 347 (2012) 21–36.
- [68] R. Hillyer, P. Sirinvasin, M. Joglekar, R.A. Sikes, K.L. van Golen, A. Nohe, Differential effects of vitamin D treatment on inflammatory and non-inflammatory breast cancer cell lines, *Clin. Exp. Metastasis.* 29 (2012) 971–979.
- [69] F. Hohla, S. Buchholz, A. Schally, S. Seitz, F.G. Rick, L. Szalontay, J.L. Varga, M. Zarandi, G. Halmos, I. Vidaurre, A. Krishan, M. Kurtoglu, S. Chandna, E. Aigner, C. Datz, GHRH antagonist causes DNA damage leading to p21 mediated cell cycle arrest and apoptosis in human colon cancer cells, *Cell Cycle Georget. Tex.* 8 (2009) 3149–3156.
- [70] D.L. Holliday, V. Speirs, Choosing the right cell line for breast cancer research, *Breast Cancer Res. BCR.* 13 (2011) 215.
- [71] S. Hossain, M. Beydoun, H. Beydoun, X. Chen, A.B. Zonderman, R.J. Wood, Vitamin D and breast cancer: A systematic review and meta-analysis of observational studies, *Clin. Nutr. ESPEN.* 30 (2019) 170–184.
- [72] Y.-F. Hou, S.-H. Gao, P. Wang, H.-M. Zhang, L.-Z. Liu, M.-X. Ye, G.-M. Zhou, Z.-L. Zhang, B.-Y. Li, 1α,25(OH)₂D₃ Suppresses the Migration of Ovarian Cancer SKOV-3 Cells through the Inhibition of Epithelial-Mesenchymal Transition, *Int. J. Mol. Sci.* 17 (2016).
- [73] J. Huang, H. Li, G. Ren, Epithelial-mesenchymal transition and drug resistance in breast cancer (Review), *Int. J. Oncol.* 47 (2015) 840–848.
- [74] J. Hübner, T. Fehm, O. Ortmann, eds., in: *Gynäkol. Tumoren*, 1. Auflage, Elsevier, München, 2016: pp. 201–276.

- [75] H. Hugo, M. Ackland, T. Blick, M.G. Lawrence, J.A. Clements, E.D. Williams, E.W. Thompson, Epithelial--mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions in carcinoma progression, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 374–383.
- [76] M. Iwatsuki, K. Mimori, T. Yokobori, H. Ishi, T. Beppu, S. Nakamori, H. Baba, M. Mori, Epithelial–mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance, *Cancer Sci.* 101 (2010) 293–299.
- [77] S. Jensen, M. Madsen, Bartek J, Inhibitory effects of 1 α ,25-dihydroxy-vitamin D(3) on the G(1)-S phase-controlling machinery, *Mol. Endocrinol.* Baltim. Md. 15 (2001).
- [78] X. Jin, Y. Wei, Y. Liu, X. Lu, F. Ding, J. Wang, S. Yang, Resveratrol promotes sensitization to Doxorubicin by inhibiting epithelial-mesenchymal transition and modulating SIRT1/ β -catenin signaling pathway in breast cancer, *Cancer Med.* 8 (2019) 1246–1257.
- [79] Z. Kahan, J. Arencibia, V. Csernus, K. Groot, R.D. Kineman, W.R. Robinson, A.V. Schally, Expression of growth hormone-releasing hormone (GHRH) messenger ribonucleic acid and the presence of biologically active GHRH in human breast, endometrial, and ovarian cancers, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84 (1999) 582–589.
- [80] R. Kalluri, R. Weinberg, The basics of epithelial-mesenchymal transition, *J. Clin. Invest.* 119 (2009) 1420–1428.
- [81] Y. Kang, C.-R. Chen, J. Massagué, A self-enabling TGF β response coupled to stress signaling: Smad engages stress response factor ATF3 for Id1 repression in epithelial cells, *Mol. Cell.* 11 (2003) 915–926.
- [82] F. Karimi Dermeni, M. Saidijam, R. Amini, A. Mahdavezhad, K. Heydari, R. Najafi, Resveratrol Inhibits Proliferation, Invasion, and Epithelial-Mesenchymal Transition by Increasing miR-200c Expression in HCT-116 Colorectal Cancer Cells, *J. Cell. Biochem.* 118 (2017) 1547–1555.
- [83] A. Katalinic, N. Eisemann, K. Kraywinkel, M.R. Noftz, J. Hübner, Breast cancer incidence and mortality before and after implementation of the German mammography screening program, *Int. J. Cancer.* 147 (2020) 709–718.
- [84] T. Key, G. Appleby, R. Travis, A. Alberg, Sex hormones and breast cancer risk in premenopausal women: collaborative reanalysis of seven prospective studies, *Lancet Oncol.* 14 (2013) 1009–1019.
- [85] H. Khandwala, I. McCutcheon, A. Flyvbjerg, K.E. Friend, The effects of insulin-like growth factors on tumorigenesis and neoplastic growth, *Endocr. Rev.* 21 (2000) 215–244.
- [86] F. Khusbu, X. Zhou, M. Roy, F.-Z. Chen, Q. Cao, H.-C. Chen, Resveratrol induces depletion of TRAF6 and suppresses prostate cancer cell proliferation and migration, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 118 (2020) 105644.
- [87] Y. Kimura, H. Okuda, Resveratrol isolated from *Polygonum cuspidatum* root prevents tumor growth and metastasis to lung and tumor-induced neovascularization in Lewis lung carcinoma-bearing mice, *J. Nutr.* 131 (2001) 1844–1849.
- [88] L. Klampfer, Vitamin D and colon cancer, *World J. Gastrointest. Oncol.* 6 (2014) 430–437.
- [89] J. Klaunig, Oxidative Stress and Cancer, *Curr. Pharm. Des.* 24 (2018) 4771–4778.
- [90] Kooperationsgemeinschaft Mammographie, ed., Jahresbericht Evaluation 2017. Deutsches Mammographie-Screening-Programm., Berlin, 2019.
- [91] F. Köster, J. Engel, A. Schally, A. Hönig, A. Schröer, S. Seitz, F. Hohla, O. Ortmann, K. Diedrich, S. Buchholz, Triple-negative breast cancers express

- receptors for growth hormone-releasing hormone (GHRH) and respond to GHRH antagonists with growth inhibition, *Breast Cancer Res. Treat.* 116 (2009) 273–279.
- [92] A. Krishnan, S. Swami, D. Feldman, The potential therapeutic benefits of vitamin D in the treatment of estrogen receptor positive breast cancer, *Steroids*. 77 (2012) 1107–1112.
- [93] A. Krishnan, S. Swami, L. Peng, J. Wang, J. Moreno, D. Feldman, Tissue-selective regulation of aromatase expression by calcitriol: implications for breast cancer therapy, *Endocrinology*. 151 (2010) 32–42.
- [94] J. Kruk, H. Aboul-Enein, Reactive Oxygen and Nitrogen Species in Carcinogenesis: Implications of Oxidative Stress on the Progression and Development of Several Cancer Types, *Mini Rev. Med. Chem.* 17 (2017) 904–919.
- [95] J. Kundu, Y.-J. Surh, Inflammation: gearing the journey to cancer, *Mutat. Res.* 659 (2008) 15–30.
- [96] P.-L. Kuo, L.-C. Chiang, C.-C. Lin, Resveratrol-induced apoptosis is mediated by p53-dependent pathway in Hep G2 cells, *Life Sci.* 72 (2002) 23–34.
- [97] E. LaPorta, J. Welsh, Modeling vitamin D actions in triple negative/basal-like breast cancer, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 144PA (2014) 65–73.
- [98] M. Larriba, A. García de Herreros, A. Muñoz, Vitamin D and the Epithelial to Mesenchymal Transition, *Stem Cells Int.* 2016 (2016) 6213872.
- [99] H. Lee, A. Ha, W. Kim, Effect of resveratrol on the metastasis of 4T1 mouse breast cancer cells in vitro and in vivo, *Nutr. Res. Pract.* 6 (2012) 294–300.
- [100] Lee M, Ye As, Gardino Ak, Heijink Am, Sorger Pk, MacBeath G, Yaffe M, Sequential application of anticancer drugs enhances cell death by rewiring apoptotic signaling networks, *Cell*. 149 (2012).
- [101] M.-H. Lee, B. Choi, J. Kundu, Y.K. Shin, H.-K. Na, Y.-J. Surh, Resveratrol Suppresses Growth of Human Ovarian Cancer Cells in Culture and in a Murine Xenograft Model: Eukaryotic Elongation Factor 1A2 as a Potential Target, *Cancer Res.* 69 (2009) 7449–7458.
- [102] K. Leong, K. Niessen, I. Kulic, A. Raouf, C. Eaves, I. Pollet, A. Karsan, Jagged1-mediated Notch activation induces epithelial-to-mesenchymal transition through Slug-induced repression of E-cadherin, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2935–2948.
- [103] L. Levy, C. Hill, Alterations in components of the TGF-beta superfamily signaling pathways in human cancer, *Cytokine Growth Factor Rev.* 17 (2006) 41–58.
- [104] Y. Li, J. Liu, X. Liu, K. Xing, Y. Wang, F. Li, L. Yao, Resveratrol-induced cell inhibition of growth and apoptosis in MCF7 human breast cancer cells are associated with modulation of phosphorylated Akt and caspase-9, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 135 (2006) 181–192.
- [105] Z. Liu, Y. Li, R. Yang, Effects of resveratrol on vascular endothelial growth factor expression in osteosarcoma cells and cell proliferation, *Oncol. Lett.* 4 (2012) 837–839.
- [106] M. Lutz, P. Knaus, Integration of the TGF-beta pathway into the cellular signalling network, *Cell. Signal.* 14 (2002) 977–988.
- [107] H. Maier, T. Wirth, H. Beug, Epithelial-Mesenchymal Transition in Pancreatic Carcinoma, *Cancers*. 2 (2010) 2058–2083.
- [108] S. Mani, W. Guo, M.-J. Liao, E. Ng. Eaton, A. Ayyanan, A.Y. Zhou, M. Brooks, F. Reinhard, C.C. Zhang, M. Shipitsin, L.L. Campbell, K. Polyak, C. Brisken,

- J. Yang, R.A. Weinberg, The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells, *Cell*. 133 (2008) 704–715.
- [109] S. Meidhof, S. Brabletz, W. Lehmann, B.-T. Preca, K. Mock, M. Ruh, J. Schüler, M. Berthold, A. Weber, U. Burk, M. Lübbert, M. Puhr, Z. Culig, U. Wellner, T. Keck, P. Bronsert, S. Küsters, U.T. Hopt, M.P. Stemmler, T. Brabletz, ZEB1-associated drug resistance in cancer cells is reversed by the class I HDAC inhibitor mocetinostat, *EMBO Mol. Med.* 7 (2015) 831.
- [110] V. Morales-Oyarvide, J. Meyerhardt, K. Ng, Vitamin D and Physical Activity in Patients with Colorectal Cancer: Epidemiological Evidence and Therapeutic Implications, *Cancer J. Sudbury Mass.* 22 (2016) 223–231.
- [111] L. Mørch, C. Skovlund, P. Hannaford, L. Iversen, S. Fielding, Ø. Lidegaard, Contemporary Hormonal Contraception and the Risk of Breast Cancer, *N. Engl. J. Med.* 377 (2017) 2228–2239.
- [112] T. Morita, T. Mayanagi, K. Sobue, Dual roles of myocardin-related transcription factors in epithelial mesenchymal transition via slug induction and actin remodeling, *J. Cell Biol.* 179 (2007) 1027–1042.
- [113] A. Moustakas, C.-H. Heldin, Signaling networks guiding epithelial-mesenchymal transitions during embryogenesis and cancer progression, *Cancer Sci.* 98 (2007) 1512–1520.
- [114] A. Moustakas, C.-H. Heldin, Mechanisms of TGF β -Induced Epithelial–Mesenchymal Transition, *J. Clin. Med.* 5 (2016).
- [115] L. Muñoz-Moreno, M. Arenas, A. Schally, A.B. Fernández-Martínez, E. Zarka, M. González-Santander, M.J. Carmena, E. Vacas, J.C. Prieto, A.M. Bajo, Inhibitory effects of antagonists of growth hormone-releasing hormone on growth and invasiveness of PC3 human prostate cancer, *Int. J. Cancer.* 132 (2013) 755–765.
- [116] C. Mur, P. Martínez-Carpio, M. Fernández-Montolí, J.M. Ramon, P. Rosel, M.A. Navarro, Growth of MDA-MB-231 cell line: different effects of TGF-beta(1), EGF and estradiol depending on the length of exposure, *Cell Biol. Int.* 22 (1998) 679–684.
- [117] M. Murias, M. Miksits, S. Aust, M. Spatzenegger, T. Thalhammer, T. Szekeres, W. Jaeger, Metabolism of resveratrol in breast cancer cell lines: impact of sulfotransferase 1A1 expression on cell growth inhibition, *Cancer Lett.* 261 (2008) 172–182.
- [118] H. Nakagawa, Y. Kiyozuka, Y. Uemura, H. Senzaki, N. Shikata, K. Hioki, A. Tsubura, Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (2001) 258–264.
- [119] H. Nakagawa, Y. Kiyozuka, Y. Uemura, H. Senzaki, N. Shikata, K. Hioki, A. Tsubura, Resveratrol inhibits human breast cancer cell growth and may mitigate the effect of linoleic acid, a potent breast cancer cell stimulator, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 127 (2001) 258–264.
- [120] Nakagawa, Sasaki Y, Kato S, Kubodera N, Okano T, 22-Oxa-1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits metastasis and angiogenesis in lung cancer, *Carcinogenesis.* 26 (2005).
- [121] T. Namba, R. Kodama, S. Moritomo, T. Hoshino, T. Mizushima, Zidovudine, an anti-viral drug, resensitizes gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells to gemcitabine by inhibition of the Akt-GSK3 β -Snail pathway, *Cell Death Dis.* 6 (2015) e1795.
- [122] A. Nguyen, M. Martinez, M. Stamos, M. Moyer, K. Planutis, C. Hope, R.F. Holcombe, Results of a phase I pilot clinical trial examining the effect of plant-

- derived resveratrol and grape powder on Wnt pathway target gene expression in colonic mucosa and colon cancer, *Cancer Manag. Res.* 1 (2009) 25–37.
- [123] T.-H. Nguyen, F. Mustafa, S. Pervaiz, F.S.P. Ng, L.H.K. Lim, ERK1/2 activation is required for resveratrol-induced apoptosis in MDA-MB-231 cells, *Int. J. Oncol.* 33 (2008) 81–92.
- [124] M. Nieman, R. Prudoff, K. Johnson, M.J. Wheelock, N-Cadherin Promotes Motility in Human Breast Cancer Cells Regardless of Their E-Cadherin Expression, *J. Cell Biol.* 147 (1999) 631–644.
- [125] M. Nieto, R. Huang, R. Jackson, J.P. Thiery, EMT: 2016, *Cell.* 166 (2016) 21–45.
- [126] G. Notas, A.-P. Nifli, M. Kampa, J. Vercauteren, E. Kouroumalis, E. Castanas, Resveratrol exerts its antiproliferative effect on HepG2 hepatocellular carcinoma cells, by inducing cell cycle arrest, and NOS activation, *Biochim. Biophys. Acta.* 1760 (2006) 1657–1666.
- [127] B. Ocampo-Lim, W. Guo, R. DeMott-Friberg, A.L. Barkan, C.A. Jaffe, Nocturnal growth hormone (GH) secretion is eliminated by infusion of GH-releasing hormone antagonist, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 81 (1996) 4396–4399.
- [128] B. Ozdamar, R. Bose, M. Barrios-Rodiles, H.-R. Wang, Y. Zhang, J.L. Wrana, Regulation of the Polarity Protein Par6 by TGF β Receptors Controls Epithelial Cell Plasticity, *Science.* 307 (2005) 1603–1609.
- [129] D. Padua, X. Zhang, Q. Wang, C. Nadal, W.L. Gerald, R.R. Gomis, J. Massagué, TGF β primes breast tumors for lung metastasis seeding through angiopoietin-like 4, *Cell.* 133 (2008) 66–77.
- [130] H. Palmer, J. González-Sancho, J. Espada, M.T. Berciano, I. Puig, J. Baulida, M. Quintanilla, A. Cano, A.G. de Herreros, M. Lafarga, A. Muñoz, Vitamin D(3) promotes the differentiation of colon carcinoma cells by the induction of E-cadherin and the inhibition of beta-catenin signaling, *J. Cell Biol.* 154 (2001) 369–387.
- [131] M. Panaro, V. Carofiglio, A. Acquafredda, P. Cavallo, A. Cianciulli, Anti-inflammatory effects of resveratrol occur via inhibition of lipopolysaccharide-induced NF- κ B activation in Caco-2 and SW480 human colon cancer cells, *Br. J. Nutr.* 108 (2012) 1623–1632.
- [132] I. Pastushenko, C. Blanpain, EMT Transition States during Tumor Progression and Metastasis, *Trends Cell Biol.* 29 (2019) 212–226.
- [133] H. Peinado, D. Olmeda, A. Cano, Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype, *Nat. Rev. Cancer.* 7 (2007) 415–428.
- [134] N. Pendás-Franco, J.-M. González-Sancho, Y. Suárez, O. Aguilera, A. Steinmeyer, C. Gamallo, M.T. Berciano, M. Lafarga, A. Muñoz, Vitamin D regulates the phenotype of human breast cancer cells, *Differ. Res. Biol. Divers.* 75 (2007) 193–207.
- [135] R. Perez, A. Schally, P. Popovics, R. Cai, W. Sha, R. Rincon, F.G. Rick, Antagonistic analogs of growth hormone-releasing hormone increase the efficacy of treatment of triple negative breast cancer in nude mice with doxorubicin; A preclinical study, *Oncoscience.* 1 (2014) 665–673.
- [136] R. Perez, A. Schally, I. Vidaurre, R. Rincon, N.L. Block, F.G. Rick, Antagonists of growth hormone-releasing hormone suppress in vivo tumor growth and gene expression in triple negative breast cancers, *Oncotarget.* 3 (2012) 988–997.

- [137] Perou C, Sørli T, Eisen M, van de Rijn M, Jeffrey Ss, Rees Ca, Pollack Jr, R. Dt, Johnsen H, Akslen La, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu Sx, L. Pe, Børresen-Dale Al, Brown Po, Botstein D, Molecular portraits of human breast tumours, *Nature*. 406 (2000).
- [138] E. Pikarsky, R. Porat, I. Stein, R. Abramovitch, S. Amit, S. Kasem, E. Gutkovich-Pyest, S. Urieli-Shoval, E. Galun, Y. Ben-Neriah, NF-kappaB functions as a tumour promoter in inflammation-associated cancer, *Nature*. 431 (2004) 461–466.
- [139] P. Popovics, A. Schally, L. Salgueiro, K. Kovacs, F.G. Rick, Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit proliferation induced by inflammation in prostatic epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 1359–1364.
- [140] P. Popovics, A. Schally, L. Salgueiro, K. Kovacs, F.G. Rick, Antagonists of growth hormone-releasing hormone inhibit proliferation induced by inflammation in prostatic epithelial cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 114 (2017) 1359–1364.
- [141] S. Poschner, A. Maier-Salamon, T. Thalhammer, W. Jäger, Resveratrol and other dietary polyphenols are inhibitors of estrogen metabolism in human breast cancer cells, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 190 (2019) 11–18.
- [142] S. Poschner, A. Maier-Salamon, M. Zehl, J. Wackerlig, D. Dobusch, A. Meshcheryakova, D. Mechtcheriakova, T. Thalhammer, B. Pachmann, W. Jäger, Resveratrol Inhibits Key Steps of Steroid Metabolism in a Human Estrogen-Receptor Positive Breast Cancer Model: Impact on Cellular Proliferation, *Front. Pharmacol.* 9 (2018).
- [143] E. Pozsgai, A. Schally, E. Hocsak, M. Zarandi, F. Rick, S. Bellyei, The effect of a novel antagonist of growth hormone releasing hormone on cell proliferation and on the key cell signaling pathways in nine different breast cancer cell lines, *Int. J. Oncol.* 39 (2011) 1025–1032.
- [144] E. Pozsgai, A. Schally, M. Zarandi, J.L. Varga, I. Vidaurre, S. Bellyei, The effect of GHRH antagonists on human glioblastomas and their mechanism of action, *Int. J. Cancer.* 127 (2010) 2313–2322.
- [145] A. Rasmussen, K. Cullen, Paracrine/autocrine regulation of breast cancer by the insulin-like growth factors, *Breast Cancer Res. Treat.* 47 (1998) 219–233.
- [146] Z. Rekasi, T. Czompoly, A. Schally, G. Halmos, Isolation and sequencing of cDNAs for splice variants of growth hormone-releasing hormone receptors from human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 10561–10566.
- [147] S. Renaud, M. de Lorgeril, Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease, *Lancet Lond. Engl.* 339 (1992) 1523–1526.
- [148] C. Ricca, A. Aillon, M. Viano, L. Bergandi, E. Aldieri, F. Silvagno, Vitamin D inhibits the epithelial-mesenchymal transition by a negative feedback regulation of TGF- β activity, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 187 (2019) 97–105.
- [149] S. Richards, K. Weierstahl, J. Kelts, Vitamin D effect on growth and vitamin D metabolizing enzymes in triple-negative breast cancer, *Anticancer Res.* 35 (2015) 805–810.
- [150] Robert Koch-Institut, Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V., eds., in: *Krebs Dtschl. 2015/2016*, 12. Auflage, Rucksal-druck, Berlin, 2019.
- [151] A. Roberts, L. Wakefield, The two faces of transforming growth factor β in carcinogenesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 8621–8623.
- [152] Á. San Hipólito-Luengo, A. Alcaide, M. Ramos-González, E. Cercas, S. Vallejo, A. Romero, E. Talero, C.F. Sánchez-Ferrer, V. Motilva, C. Peiró, Dual

- Effects of Resveratrol on Cell Death and Proliferation of Colon Cancer Cells, *Nutr. Cancer*. 69 (2017) 1019–1027.
- [153] A. Satelli, S. Li, Vimentin as a potential molecular target in cancer therapy Or Vimentin, an overview and its potential as a molecular target for cancer therapy, *Cell. Mol. Life Sci. CMLS*. 68 (2011) 3033–3046.
- [154] M. Sato, R. Pei, T. Yuri, N. Danbara, Y. Nakane, A. Tsubura, Prepubertal resveratrol exposure accelerates N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary carcinoma in female Sprague-Dawley rats, *Cancer Lett*. 202 (2003) 137–145.
- [155] A. Schally, J. Varga, J. Engel, Antagonists of growth-hormone-releasing hormone: an emerging new therapy for cancer, *Nat. Clin. Pract. Endocrinol. Metab*. 4 (2008) 33–43.
- [156] S. Seitz, F. Rick, A. Schally, A. Treszl, F. Hohla, L. Szalontay, M. Zarandi, O. Ortmann, J.B. Engel, S. Buchholz, Combination of GHRH antagonists and docetaxel shows experimental effectiveness for the treatment of triple-negative breast cancers, *Oncol. Rep*. 30 (2013) 413–418.
- [157] J. Seoane, R. Gomis, TGF- β Family Signaling in Tumor Suppression and Cancer Progression, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 9 (2017).
- [158] J. Seoane, H.-V. Le, L. Shen, S. Anderson, J. Massagué, Integration of Smad and forkhead pathways in the control of neuroepithelial and glioblastoma cell proliferation, *Cell*. 117 (2004) 211–223.
- [159] X.-P. Shi, S. Miao, Y. Wu, W. Zhang, X.-F. Zhang, H.-Z. Ma, H.-L. Xin, J. Feng, A.-D. Wen, Y. Li, Resveratrol sensitizes tamoxifen in antiestrogen-resistant breast cancer cells with epithelial-mesenchymal transition features, *Int. J. Mol. Sci*. 14 (2013) 15655–15668.
- [160] A. Singh, P. Dhawan, Claudins and cancer: Fall of the soldiers entrusted to protect the gate and keep the barrier intact, *Semin. Cell Dev. Biol*. 42 (2015) 58–65.
- [161] S. Singh, S. Banerjee, E. Acosta, J.W. Lillard, R. Singh, Resveratrol induces cell cycle arrest and apoptosis with docetaxel in prostate cancer cells via a p53/ p21WAF1/CIP1 and p27KIP1 pathway, *Oncotarget*. 8 (2017) 17216–17228.
- [162] Y. Song, Y. Chen, Y. Li, X. Lyu, J. Cui, Y. Cheng, T. Zheng, L. Zhao, G. Zhao, Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling, *BioMed Res. Int*. 2019 (2019).
- [163] A. Sorrentino, N. Thakur, S. Grimsby, A. Marcusson, V. von Bulow, N. Schuster, S. Zhang, C.-H. Heldin, M. Landström, The type I TGF-beta receptor engages TRAF6 to activate TAK1 in a receptor kinase-independent manner, *Nat. Cell Biol*. 10 (2008) 1199–1207.
- [164] P. Staller, K. Peukert, A. Kiermaier, J. Seoane, J. Lukas, H. Karsunky, T. Möröy, J. Bartek, J. Massagué, F. Hänel, M. Eilers, Repression of p15INK4b expression by Myc through association with Miz-1, *Nat. Cell Biol*. 3 (2001) 392–399.
- [165] P. Stambolsky, Y. Tabach, G. Fontemaggi, L. Weisz, R. Maor-Aloni, Z. Siegfried, Z. Sigfried, I. Shiff, I. Kogan, M. Shay, E. Kalo, G. Blandino, I. Simon, M. Oren, V. Rotter, Modulation of the vitamin D3 response by cancer-associated mutant p53, *Cancer Cell*. 17 (2010) 273–285.
- [166] J. Suh, D.-H. Kim, Y.-J. Surh, Resveratrol suppresses migration, invasion and stemness of human breast cancer cells by interfering with tumor-stromal crosstalk, *Arch. Biochem. Biophys*. 643 (2018).

- [167] Y. Sun, Z. Zhao, Z. Yang, F. Xu, H.-J. Lu, Z.-Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P.-P. Yao, H.-P. Zhu, Risk Factors and Preventions of Breast Cancer, *Int. J. Biol. Sci.* 13 (2017) 1387–1397.
- [168] Y. Sun, Q.-M. Zhou, Y.-Y. Lu, H. Zhang, Q.-L. Chen, M. Zhao, S.-B. Su, Resveratrol Inhibits the Migration and Metastasis of MDA-MB-231 Human Breast Cancer by Reversing TGF- β 1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition, *Molecules*. 24 (2019).
- [169] S. Swami, A. Krishnan, D. Feldman, 1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ down-regulates estrogen receptor abundance and suppresses estrogen actions in MCF-7 human breast cancer cells, *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 6 (2000) 3371–3379.
- [170] S. Swami, A. Krishnan, D. Feldman, Vitamin D Metabolism and Action in the Prostate: Implications for Health and Disease, *Mol. Cell. Endocrinol.* 347 (2011) 61–69.
- [171] S. Swami, A. Krishnan, J. Wang, K. Jensen, R. Horst, M.A. Albertelli, D. Feldman, Dietary vitamin D₃ and 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (calcitriol) exhibit equivalent anticancer activity in mouse xenograft models of breast and prostate cancer, *Endocrinology*. 153 (2012) 2576–2587.
- [172] S. Swami, A. Krishnan, J. Wang, K. Jensen, L. Peng, M.A. Albertelli, D. Feldman, Inhibitory effects of calcitriol on the growth of MCF-7 breast cancer xenografts in nude mice: selective modulation of aromatase expression in vivo, *Horm. Cancer*. 2 (2011) 190–202.
- [173] S. Swami, A. Krishnan, J. Wang, K. Jensen, L. Peng, M.A. Albertelli, D. Feldman, Inhibitory Effects of Calcitriol on the Growth of MCF-7 Breast Cancer Xenografts in Nude Mice: Selective Modulation of Aromatase Expression in vivo, *Horm. Cancer*. 2 (2011) 190–202.
- [174] S. Swami, N. Raghavachari, U. Muller, Y. Bao, D. Feldman, Vitamin D growth inhibition of breast cancer cells: gene expression patterns assessed by cDNA microarray, *Breast Cancer Res. Treat.* 80 (2003) 49–62.
- [175] B. Szende, E. Tyihák, Z. Király-Véghely, Dose-dependent effect of resveratrol on proliferation and apoptosis in endothelial and tumor cell cultures, *Exp. Mol. Med.* 32 (2000) 88–92.
- [176] C. Theisen, J. Wahl, K. Johnson, M.J. Wheelock, NHERF links the N-cadherin/catenin complex to the platelet-derived growth factor receptor to modulate the actin cytoskeleton and regulate cell motility, *Mol. Biol. Cell*. 18 (2007) 1220–1232.
- [177] J.P. Thiery, Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression, *Nat. Rev. Cancer*. 2 (2002) 442–454.
- [178] M. Thill, T. Cordes, F. Hoellen, S. Becker, C. Dittmer, S. Kümmel, D. Salehin, M. Friedrich, K. Diedrich, F. Köster, Influence of Calcitriol on Prostaglandin- and Vitamin D-metabolising Enzymes in Benign and Malignant Breast Cell Lines, *Anticancer Res.* 32 (2012) 359–365.
- [179] S. Thuault, E.-J. Tan, H. Peinado, A. Cano, C.-H. Heldin, A. Moustakas, HMGA2 and Smads co-regulate SNAIL1 expression during induction of epithelial-to-mesenchymal transition, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 33437–33446.
- [180] I. Tinhofer, D. Bernhard, M. Senfter, G. Anether, M. Loeffler, G. Kroemer, R. Kofler, A. Csordas, R. Greil, Resveratrol, a tumor-suppressive compound from grapes, induces apoptosis via a novel mitochondrial pathway controlled by Bcl-2, *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 15 (2001) 1613–1615.

- [181] M. Tischkowitz, J.-S. Brunet, L.R. Bégin, D. Huntsman, M. Cheang, L.A. Akslen, T.O. Nielsen, W.D. Foulkes, Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer, *BMC Cancer*. 7 (2007) 134.
- [182] J. Tomé-Carneiro, M. Larrosa, A. González-Sarrías, F.A. Tomás-Barberán, M.T. García-Conesa, J.C. Espín, Resveratrol and Clinical Trials: The Crossroad from In Vitro Studies to Human Evidence, *Curr. Pharm. Des.* 19 (2013) 6064–6093.
- [183] S. Ulasli, S. Celik, E. Gunay, M. Ozdemir, O. Hazman, A. Ozyurek, T. Koyuncu, M. Unlu, Anticancer effects of thymoquinone, caffeic acid phenethyl ester and resveratrol on A549 non-small cell lung cancer cells exposed to benzo(a)pyrene, *Asian Pac. J. Cancer Prev. APJCP*. 14 (2013) 6159–6164.
- [184] E. Vacas, L. Muñoz-Moreno, P. Valenzuela, J.C. Prieto, A.V. Schally, M.J. Carmena, A.M. Bajo, Growth hormone-releasing hormone induced transactivation of epidermal growth factor receptor in human triple-negative breast cancer cells, *Peptides*. 86 (2016) 153–161.
- [185] J. Varga, A. Schally, V. Csernus, M. Zarándi, G. Halmos, K. Groot, Z. Rékási, Synthesis and biological evaluation of antagonists of growth hormone-releasing hormone with high and protracted in vivo activities, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 692–697.
- [186] L. Verlinden, A. Verstuyf, R. Convents, S. Marcelis, M. Van Camp, R. Bouillon, Action of 1,25(OH)₂D₃ on the cell cycle genes, cyclin D1, p21 and p27 in MCF-7 cells, *Mol. Cell. Endocrinol.* 142 (1998) 57–65.
- [187] H. Wang, H. Zhang, L. Tang, H. Chen, C. Wu, M. Zhao, Y. Yang, X. Chen, G. Liu, Resveratrol inhibits TGF-β₁-induced epithelial-to-mesenchymal transition and suppresses lung cancer invasion and metastasis, *Toxicology*. 303 (2013) 139–146.
- [188] H. Wang, X. Zhang, I. Vidaurre, R. Cai, W. Sha, A.V. Schally, Inhibition of experimental small-cell and non-small-cell lung cancers by novel antagonists of growth hormone-releasing hormone, *Int. J. Cancer*. 142 (2018) 2394–2404.
- [189] Y. Wang, J. Shi, K. Chai, X. Ying, B.P. Zhou, The Role of Snail in EMT and Tumorigenesis, *Curr. Cancer Drug Targets*. 13 (2013) 963–972.
- [190] K. Wegner, A. Bachmann, J.-U. Schad, P. Lucarelli, S. Sahle, P. Nickel, C. Meyer, U. Klingmüller, S. Dooley, U. Kummer, Dynamics and feedback loops in the transforming growth factor β signaling pathway, *Biophys. Chem.* 162 (2012) 22–34.
- [191] M. Wheelock, Y. Shintani, M. Maeda, Y. Fukumoto, K.R. Johnson, Cadherin switching, *J. Cell Sci.* 121 (2008) 727–735.
- [192] T. Wilmanski, A. Barnard, M. Parikh, J. Kirshner, K. Buhman, J. Burgess, D. Teegarden, 1α,25-Dihydroxyvitamin D inhibits the metastatic capability of MCF10CA1a and MDA-MB-231 cells in an in vitro model of breast to bone metastasis, *Nutr. Cancer*. 68 (2016) 1202.
- [193] C. Wittekind, Union for International Cancer Control, eds., *TNM - Klassifikation maligner Tumoren*, 8. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2017.
- [194] H.-M. Wu, H.-Y. Huang, A. Schally, A. Chao, H.-H. Chou, P.C.K. Leung, H.-S. Wang, Growth hormone-releasing hormone antagonist inhibits the invasiveness of human endometrial cancer cells by down-regulating twist and N-cadherin expression, *Oncotarget*. 8 (2017) 4410–4421.

- [195] M. Yamashita, K. Fatyol, C. Jin, X. Wang, Z. Liu, Y.E. Zhang, TRAF6 mediates Smad-independent activation of JNK and p38 by TGF- β , *Mol. Cell.* 31 (2008) 918–924.
- [196] J. Yanagisawa, Y. Yanagi, Y. Masuhiro, M. Suzawa, M. Watanabe, K. Kashiwagi, T. Toriyabe, M. Kawabata, K. Miyazono, S. Kato, Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators, *Science.* 283 (1999) 1317–1321.
- [197] R. Yang, H. Zhang, L. Zhu, Inhibitory effect of resveratrol on the expression of the VEGF gene and proliferation in renal cancer cells, *Mol. Med. Rep.* 4 (2011) 981–983.
- [198] Z. Yang, Q. Xie, Z. Chen, H. Ni, L. Xia, Q. Zhao, Z. Chen, P. Chen, Resveratrol suppresses the invasion and migration of human gastric cancer cells via inhibition of MALAT1-mediated epithelial-to-mesenchymal transition, *Exp. Ther. Med.* 17 (2019) 1569–1578.
- [199] T. Ylikomi, I. Laaksi, Y.-R. Lou, P. Martikainen, S. Miettinen, P. Pennanen, S. Purmonen, H. Syväälä, A. Vienonen, P. Tuohimaa, Antiproliferative action of vitamin D, *Vitam. Horm.* 64 (2002) 357–406.
- [200] L. Yuan, M. Zhou, D. Huang, H.S. Wasan, K. Zhang, L. Sun, H. Huang, S. Ma, M. Shen, S. Ruan, Resveratrol inhibits the invasion and metastasis of colon cancer through reversal of epithelial- mesenchymal transition via the AKT/GSK-3 β /Snail signaling pathway, *Mol. Med. Rep.* 20 (2019) 2783–2795.
- [201] M. Zarandi, R. Cai, M. Kovacs, P. Popovics, L. Szalontay, T. Cui, W. Sha, M. Jaszberenyi, J. Varga, X. Zhang, N.L. Block, F.G. Rick, G. Halmos, A.V. Schally, Synthesis and structure-activity studies on novel analogs of human growth hormone releasing hormone (GHRH) with enhanced inhibitory activities on tumor growth, *Peptides.* 89 (2017) 60–70.
- [202] S. Zeichner, T. Koru-Sengul, N. Shah, L. Q, M. Nj, M. Aj, G. S, S. O, A. Er, Improved clinical outcomes associated with vitamin D supplementation during adjuvant chemotherapy in patients with HER2+ nonmetastatic breast cancer, *Clin. Breast Cancer.* 15 (2015).
- [203] H. Zhang, R. Yang, Resveratrol inhibits VEGF gene expression and proliferation of hepatocarcinoma cells, *Hepatogastroenterology.* 61 (2014) 410–412.
- [204] Y. Zhang, Non-Smad Signaling Pathways of the TGF- β Family, *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 9 (2017).
- [205] X. Zheng, J. Carstens, J. Kim, M. Scheible, J. Kaye, H. Sugimoto, C.-C. Wu, V.S. LeBleu, R. Kalluri, EMT Program is Dispensable for Metastasis but Induces Chemoresistance in Pancreatic Cancer, *Nature.* 527 (2015) 525–530.
- [206] Z. Zheng, T. Lang, X. Huang, G. Wang, R.J. Lee, L. Teng, Q. Yin, Y. Li, Calcitriol-Loaded Dual-pH-Sensitive Micelle Counteracts Pro-Metastasis Effect of Paclitaxel in Triple-Negative Breast Cancer Therapy, *Adv. Healthc. Mater.* 9 (2020) e2000392.

7. Anhang

7.1 TNM-Klassifikation

Tabelle 9: Tumorgröße [193]

Stadium	Größe des Primärtumors
TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Größte Tumorausdehnung ≤ 2 cm
T1mi	Mikroinvasion mit Ausdehnung $\leq 0,1$ cm
T1a	Tumorausdehnung $> 0,1$ cm aber $\leq 0,5$ cm
T1b	Tumorausdehnung $> 0,5$ cm aber ≤ 1 cm
T1c	Tumorausdehnung > 1 cm aber ≤ 2 cm
T2	Tumorausdehnung > 2 cm aber ≤ 5 cm
T3	Tumorausdehnung > 5 cm
T4	Tumor jeder Größe mit Infiltration der Haut/ Brustwand
T4a	Infiltration der Brustwand
T4b	Ulzeration, Hautödem, Satelliten-Metastase der Haut
T4c	T4a und T4b
T4d	Inflammatorisches Mammakarzinom

Tabelle 10: Lymphknotenbefall [193]

Klinische Klassifikation		Pathologische Klassifikation	
NX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden	pNX	Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	Keine Lymphknotenmetastasen	pN0	Keine Lymphknotenmetastasen
N1	Nicht fixierte Lymphknotenmetastasen der ipsilateralen Axilla Level I-II	pN1mi	Mikrometastasen in 1-3 Lymphknoten der ipsilateralen Axilla und/oder in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna
		pN1a	Metastasen $> 0,2$ mm in 1-3 Lymphknoten der ipsilateralen Axilla

		pN1b	Metastasen in ipsilateralen Lymphknoten entlang der A. mammaria interna ohne axilläre Metastasen
		pN1c	pN1a und pN1b
N2a	Fixierte Lymphknotenmetastasen der ipsilateralen Axilla Level I-II	pN2a	Metastasen in 4-9 Lymphknoten der ipsilateralen Axilla
N2b	Klinisch erkennbare Lymphknotenmetastasen entlang der ipsilateralen A. mammaria interna	pN2b	Metastasen in 4-9 Lymphknoten ipsilateral entlang der A. mammaria interna ohne axillären Befall
N3a	Metastasen in ipsilateralen infraklavikulären Lymphknoten	pN3a	Metastasen in >10 Lymphknoten der ipsilateralen Axilla oder infraklavikulär
N3b	Lymphknotenmetastasen ipsilateral entlang der A. mammaria interna und in der Axilla	pN3b (1)	Metastasen in klinisch erkennbaren Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit ≥ 1 Lymphknotenmetastase axillär
		pN3b (2)	Senitnel-Lymphknoten entlang der A. mammaria interna mit > 3 Lymphknotenmetastasen axillär
N3c	Metastase in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten	pN3c	Metastase in ipsilateralen supraklavikulären Lymphknoten

Tabelle 11: Fernmetastasierung [193]

Stadium	Fernmetastasierung
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Tabelle 12: Stadieneinteilung nach UICC [193]

UICC-Stadium	TNM-Klassifikation
0	Tis, N0, M0
IA	T1mi/T1, N0, M0
IB	T0-T1, N1mi, M0
IIA	T0-T1, N1, M0 oder T2, N0, M0
IIB	T2, N1, M0 oder T3, N0, M0
IIIA	T0-T2, N2, M0 oder T3, N1-N2, M0
IIIB	T4, N0-N2, M0
IIIC	Jedes T, N3, M0
IV	Jedes T, jedes N, M1

8. Danksagung

Bei meiner Arbeit habe ich von verschiedenster Seite Hilfe und Unterstützung erfahren:

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. Achim Rody, dem Direktor der Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein in Lübeck, für die Möglichkeit diese Arbeit in seiner Klinik anfertigen zu dürfen und für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater und Betreuer, Herrn PD Dr. rer. nat. Frank Köster, für das Überlassen des interessanten Themas und die zuverlässige und professionelle Betreuung während aller Phasen dieser Arbeit.

Ich danke Frau Dr. rer. nat. Karen Bräutigam, die mir ebenfalls jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Herzlich bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Stephan Polack für die freundliche Aufnahme im Labor und die Unterstützung bei der praktischen Arbeit.

Für die nette Stimmung und die gegenseitige Hilfsbereitschaft im Labor sorgten nicht zuletzt meine Mitdotorandinnen Nathalie Vobmann, Mirja Seeber, Paulina Vogt, Eva Schall, Elodie Karabore-Wolff, Steffi Meier und Talina Schmidt. Vielen Dank dafür.

Dankbar erwähnen möchte ich zu guter Letzt auch meine Familie und meine Freunde. Ihre bedingungslose Unterstützung und die vielen ermutigenden Worte trugen mehr zum Abschluss dieser Arbeit bei, als sie vielleicht ahnen.

Publikationen und Vorträge

Vortragende sind unterstrichen.

1. Posterpräsentation und Preisvortrag bei der 132. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG) in Hannover, 08.-09.09.2017:
Johanna Stelbrink, Li Jin, Yuanming Shen, Daniela Hornung, Gabriele Marschner, Achim Rody, Dominique Finas und Frank Köster. Wirkung eines Antagonisten des Growth-Hormon-Releasing-Hormons bei Endometriose *in vitro* und in einem *in vivo* Mausmodell.
2. Vortrag beim Trafo-Meeting der Arbeitsgemeinschaft Gynäkologische Onkologie (AGO) 2017, 12.10.2017:
Johanna Stelbrink, Nathalie Fournier, Luca Höhne, Christoph Cirkel, Karen Bräutigam, Achim Rody und Frank Köster. Einfluss von potenziell therapeutischen Substanzen auf die epithelial-mesenchymale Transition in der Zervixkarzinomzelllinie CaSki.
3. Posterpräsentation bei der 134. Tagung der Norddeutschen Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe (NGGG) in Lübeck, 22.-23.10.2021:
Johanna Stelbrink, Karen Bräutigam, Achim Rody und Frank Köster. Medikamentöser Einfluss auf die epithelial-mesenchymale Transition in triple-negativen Brustkrebszelllinien.