

**Vergleichende Studie über die Rolle von Östrogenrezeptor alpha und  
Aromatase in Glioblastomzellen in vivo und in vitro**

Lisa Stefanie Hönigl



**Fakultät für Medizin der Technischen Universität München**

**Professur Neuropathologie**

(Leitung: Prof. Dr. Jürgen Schlegel)

**am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie der Technischen  
Universität München**

(Leitung: Prof. Dr. Wilko Weichert)

Vergleichende Studie über die Rolle von Östrogenrezeptor alpha und Aromatase in  
Glioblastomzellen in vivo und in vitro

Lisa Stefanie Hönikl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten  
Dissertation.

Vorsitzender:

Prof. Dr. Ernst J. Rummeny

Prüfende der Dissertation:

1. Prof. Dr. Jürgen Schlegel
2. Priv.-Doz. Dr. Jens Gempt

Die Dissertation wurde am 28.08.2019 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Medizin am 01.01.2020 angenommen.

## Inhaltsverzeichnis

### **Inhaltsverzeichnis**

Inhaltsverzeichnis.....	I
Abkürzungsverzeichnis.....	III
1 Einleitung.....	1
1.1 Problemstellung.....	1
1.2 Humanes Glioblastoma multiforme (GBM).....	1
1.3 Neurologische Erkrankungen mit geschlechterspezifischen Unterschieden.....	3
1.3.1 Geschlechterspezifische Unterschiede bei zerebraler Ischämie.....	4
1.3.2 Geschlechterspezifische Unterschiede bei Schädel-Hirn-Traumata.....	4
1.3.3 Geschlechterspezifische Unterschiede bei Glioblastoma multiforme.....	5
1.4 Sexualhormone im zentralen Nervensystem.....	6
1.4.1 Aromatase.....	7
1.4.2 Östrogen und Östrogenrezeptoren.....	8
2 Ziele der Doktorarbeit.....	11
3 Material und Methoden.....	12
3.1 Material.....	12
3.2 Methoden.....	15
3.2.1 Sammlung von GBM Patientengewebe und Patientendaten.....	15
3.2.2 Immunhistochemie.....	16
3.2.3 Zellkultur.....	18
3.2.4 Western-Analyse.....	20
3.2.5 MTT-Assay.....	23
3.2.6 Statistische Analysen.....	24
4 Ergebnisse.....	25
4.1 Analysen des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanen GBM Präparaten.....	25
4.1.1 Immunhistochemische Analyse des ER $\alpha$ und des Enzyms Aromatase.....	25

## Inhaltsverzeichnis

4.1.2	GBM-Patientencharakteristika .....	27
4.1.3	Überlebensanalyse von GBM Patienten hinsichtlich ER $\alpha$ und Aromatase .....	32
4.2	Analysen des ER $\alpha$ und Aromatase in humanen GBM-Zelllinien und Astrozyten .....	35
4.2.1	Hormonexpression nach Induktion von Zellstress .....	35
4.2.2	Kombinierte Östrogen- und Temozolomidtherapie der Glioblastomzelllinien .	38
5	Diskussion .....	42
5.1	Analyse der Expression des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanem GBM-Gewebe...	43
5.2	Analysen des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanen GBM-Zelllinien .....	45
6	Schlussfolgerung und Ausblick.....	49
7	Zusammenfassung .....	51
8	Summary .....	52
9	Literaturverzeichnis .....	53
10	Abbildungsverzeichnis.....	58
11	Tabellenverzeichnis .....	62
12	Danksagung .....	64
13	Anhang.....	65

## Abkürzungsverzeichnis

**Abkürzungsverzeichnis**

AR	Androgenrezeptor
BMI	Body-Mass-Index
DMEM	Dulbesco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonucleinacid
E2	17- $\beta$ -Estradiol
EGFR	Epidermaler Wachstumsfaktorrezeptor
EK	E2-Lösungsmittelkontrolle
ER	Östrogenrezeptor
FCS	Fetales Kälberserum
GBM	Glioblastoma multiforme
GCS	Glasgow Koma Skala
GFAP	Saures Gliafaserprotein (Glial fibrillary acidic protein)
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia inducible factor 1 alpha
HRP	Meerrettichperoxidase
IC <sub>50</sub>	Mittlere inhibitorische Konzentration
IDH	Isocitrat-Dehydrogenase
IgG	Immunglobulin G
IHC	Immunhistochemie
LOH	Loss of Heterozygosity
M	Männlich
MAP2	Mikrotubuli assoziiertes Protein 2
mER	Membraner Östrogenrezeptor
MGMT	O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NADPH	Nikotinamidadenindinukleotidphosphat
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (phosphate buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction)
PJ	Personenjahre
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTEN	Phosphatase und Tensin Homolog
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SDS	Sodium Dodecyl Sulfat
SHT	Schädel-Hirn-Trauma
TBS	Tris-buffered saline (Tris gepufferte Kochsalzlösung)
TBST	TBS mit Polysorbate 20 (Tween 20)

## Abkürzungsverzeichnis

TMZ	Temozolomid
TTF	Tumor treating fields
TUM	Technische Universität München
W	Weiblich
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Problemstellung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein hochmaligner hirneigener Tumor, welcher trotz aggressiver Kombinationstherapien ein mittleres Überleben von wenigen Monaten aufweist. Risikofaktoren für die Entstehung dieses Tumors sind bis dato noch nicht vollständig bekannt. Interessanterweise zeigt sich in der Tumorentwicklung eine Geschlechterprädisposition. Männer sind etwa doppelt so häufig von dieser Erkrankung betroffen wie Frauen. Man geht davon aus, dass sich das GBM aus astrozytären Gliazellen de novo entwickelt oder auch aus niedrig gradigeren glialen Tumoren entsteht. Astrozyten sind an unzähligen Prozessen im Gehirn beteiligt, unter anderem spielen sie eine Schlüsselrolle in neuroprotektiven Signalwegen. Da Männer ein deutlich höheres Risiko für die Tumorentwicklung aufweisen als Frauen, stellt sich die Frage, ob diese Effekte möglicherweise einer hormonellen Steuerung unterliegen. Deshalb sollte die Rolle von Östrogenrezeptor  $\alpha$  und Aromatase in Gliomzellen genauer untersucht werden.

## 1.2 Humanes Glioblastoma multiforme (GBM)

Das Glioblastoma multiforme ist eine diffus infiltrierende und hochmaligne gliale Neoplasie des zentralen Nervensystems (ZNS). Es stellt die häufigste und aggressivste Form der primären Hirntumore dar und wird dem Grad IV der Klassifikation der World Health Organisation (WHO) für Tumore des ZNS zugeordnet (Louis, Perry et al. 2016). Während sich 95% der GBM de novo entwickeln, entstehen etwa 5% aus niedrig gradigen glialen Tumoren, wie beispielsweise dem Astrozytom (Abbildung 1). Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen diesen Formen von Gliomen ist die Mutation der Isocitrat-Dehydrogenase (IDH1 und IDH2). Während vor allem die niedriggradigen Gliome und etwa 5% der Glioblastome eine Mutation der IDH aufweisen, liegt beim GBM in etwa 95% der Fälle das IDH Gen in seiner ursprünglichen Form vor, sogenanntes GBM IDH Wildtyp (Yan, Parsons et al. 2009). Die IDH Mutation sowie die damit assoziierten Tumore stellen damit eine eigene Entität an Hirntumoren dar und weisen eine bessere Prognose, sowie längeres Überleben auf, im Vergleich zum de novo entwickelten GBM IDH Wildtyp (Nobusawa, Watanabe et al. 2009).

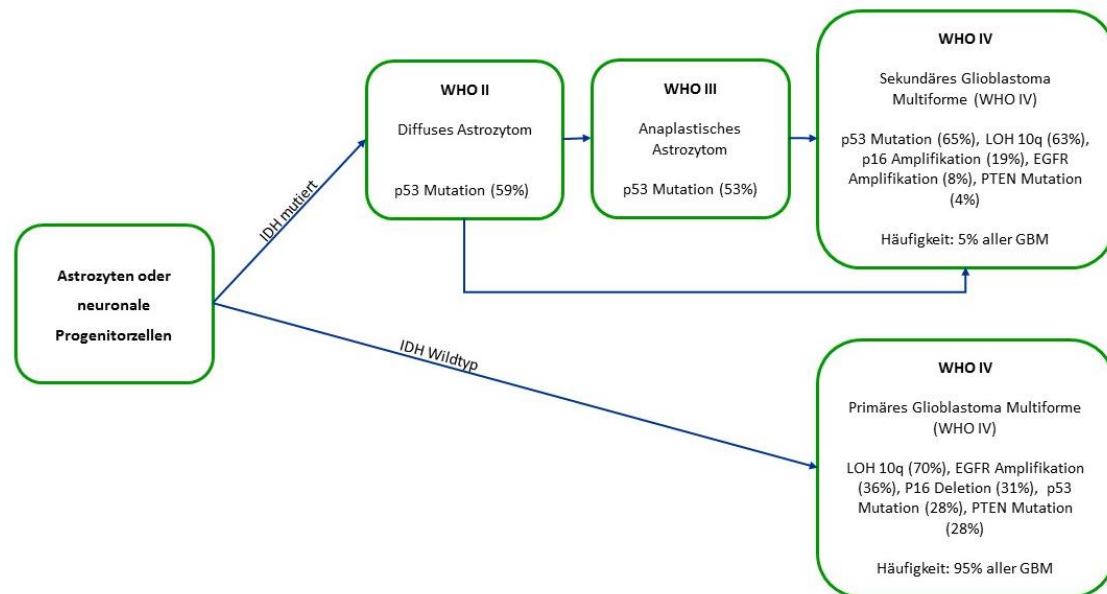


Abbildung 1: Übersicht über die Entwicklung des Malignoms aus der Progenitorzelle, mit der Aufführung von Mutationen und Häufigkeiten des GBM und niedriggradigen Astrozytomen. Häufigkeiten des Auftretens der einzelnen Mutationen nach Stadium. Das GBM IDH Wildtyp tritt dabei mit einer Häufigkeit von 95% und das GBM mit IDH Mutation mit ca. 5% auf. (Ohgaki et al., 2004)

Das GBM IDH Wildtyp entsteht durch eine spontane maligne Entartung von Astrozyten aufgrund verschiedener Mutationen, wie beispielsweise Deletion auf dem Chromosom 10q (Loss of Heterozygosity (LOH)), Epidermal Growth Factor-Rezeptor (EGFR) Amplifikation, p16 Deletion, Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, sowie einer Mutation der Phosphatase PTEN (Phosphatase und Tensin Homolog). Entwickelt sich das GBM jedoch aus einem niedriggradigen glialen Tumor mit Mutationen der IDH stehen vor allem die Mutationen des Tumorsuppressorgens p53, sowie die LOH 10q im Vordergrund, während Veränderungen von EGFR, p16 und PTEN weniger häufig auftreten (Ohgaki, Dessen et al. 2004, Crespo, Vital et al. 2015).

Ein starker Prädiktor für das therapeutische Ansprechen des GBM ist der Methylierungsstatus der O6-Methylguanin-DNA-Methyltransferase (MGMT). Die MGMT ist ein DNA-Reparaturenzym, welches die Fähigkeit besitzt entstandene DNA-Schäden zu reparieren. Die Expression dieses Gens wird über einen Promotor reguliert. Ist dieser Promotor methyliert, wird das Reparaturenzym nicht exprimiert und eine Reparatur der beschädigten DNA kann nicht erfolgen. Liegt jedoch ein negativer Methylierungsstatus vor, das heißt der Promoter ist nicht methyliert, wird die MGMT exprimiert und die DNA repariert. Letzteres ist jedoch ungünstig für den Erfolg einer Chemotherapie, da der zytotoxische Effekt durch das Reparaturenzym MGMT aufgehoben wird. Als Chemotherapeutikum der ersten Wahl zur Therapie des GBM wird Temozolomid, ein



alkylierendes Zytostatikum, verwendet. Die suffiziente Wirkung des Zytostatikums kann somit nur bei positivem Methylierungsstatus ausgeübt werden und verbessert dadurch das Überleben (Hegi, Diserens et al. 2005, Stupp, Hegi et al. 2009, Quillien, Lavenu et al. 2012).

Die Standardtherapie eines GBM besteht seit 2005, nach Veröffentlichung der Pivotal Phase 3 Studie, aus möglichst aggressiver Tumoresektion, Strahlentherapie und adjuvanter Chemotherapie mit sechs Zyklen Temozolomid, auch als „Stupp-Schema“ bezeichnet (Stupp, Mason et al. 2005). Trotz intensiver Therapie ist das GBM immer noch eine unheilbare Erkrankung mit schlechter Prognose. Das mediane Überleben bei Therapie gemäß des Stupp-Schemas liegt derzeit bei 15,6 Monaten (Stupp, Taillibert et al. 2015). Aufgrund der infiltrativen Eigenschaften weist das GBM ein hohes Rezidivrisiko innerhalb der ersten 7 Monaten auf (Alifieris and Trafalis 2015).

Das mittlere Erkrankungsalter des GBM liegt bei 64 Jahren, wobei ein Auftreten in jeder Altersklasse möglich ist (Ostrom, Gittleman et al. 2015). Die Inzidenz des GBM in den USA lag 2015 bei 3,2/100.000 Personenjahren (PJ), dabei sind Männer durchschnittlich 1,6-mal häufiger betroffen als Frauen (Ostrom, Gittleman et al. 2015). Zudem zeigten Frauen im reproduktionsfähigen Alter deutliche Überlebensvorteile gegenüber Männern und postmenopausalen Frauen (Hatch, Linet et al. 2005, Kabat, Etgen et al. 2010, Michaud, Gallo et al. 2010, Kabat, Park et al. 2011) .

Die Ursache für diesen geschlechterspezifischen Unterschied ist bis heute unklar. Die vorliegende Arbeit richtet ein besonderes Augenmerk auf die geschlechtsspezifischen zerebralen Unterschiede und stellt dabei die Expression der Sexualhormone in den Vordergrund. Dies könnte zukünftig therapeutisch genutzt werden und sich damit positiv auf die noch immer schlechte Prognose auswirken.

### **1.3 Neurologische Erkrankungen mit geschlechterspezifischen Unterschieden**

Einige weitere neurologische Erkrankungen wie Hirninfarkte (Wang, Jie et al. 2014), neurodegenerative Erkrankungen mit chronisch progressiven Verlauf (Kipp, Hochstrasser et al. 2016), sowie Schädel-Hirn-Traumata (Herson, Koerner et al. 2009) zeigen ebenfalls geschlechterspezifische Unterschiede. Bei all diesen Erkrankungen spielt die reaktive Gliose astrozytärer Zellen eine entscheidende Rolle, welche durch die Expression von Östrogen, Östrogenrezeptoren und weiteren Sexualhormonen beeinflusst wird.

### **1.3.1 Geschlechterspezifische Unterschiede bei zerebraler Ischämie**

Die zerebrale Ischämie ist eine Erkrankung bei der es aufgrund einer plötzlichen Durchblutungsstörung zu einem signifikanten neuronalen Untergang kommt. Die Erkrankung ist dabei mit einer hohen Mortalität vergesellschaftet und tritt vor allem im erhöhten Lebensalter auf. Die Inzidenz für ischämische Schlaganfälle ist im jungen Alter bei Männern höher, mit steigendem Lebensalter sind jedoch Frauen häufiger betroffen (Herson, Koerner et al. 2009, Roy-O'Reilly and McCullough 2018). Tierexperimente haben gezeigt, dass weibliche Ratten resistenter sind gegenüber zerebraler Ischämie als altersgleiche männliche und ovariectomierte weibliche Ratten (Alkayed, Harukuni et al. 1998). Weibliche homozygote Aromatase Knockout-Mäuse (Enzym für die Synthese von Östrogen, siehe 1.4.1) wiesen zudem ein größeres totales und regionales Infarktareal nach reversiblen Verschluss der Arteria cerebri media im Vergleich zu den Wildtyp-Geschwister auf und gaben damit einen starken Hinweis darauf, dass das Enzym Aromatase und das Produkt Östrogen eine wichtige neuroprotektive Funktion bei zerebraler Ischämie ausübt (McCullough, Blizzard et al. 2003).

### **1.3.2 Geschlechterspezifische Unterschiede bei Schädel-Hirn-Traumata**

Das Schädel-Hirn-Trauma (SHT) ist eine Verletzung des Gehirns aufgrund einer äußeren Gewalteinwirkung und kann in jeder Altersgruppe auftreten. Die größte Häufung findet sich dabei im jungen Erwachsenenalter. Aufgrund der steigenden Lebenserwartung bei gleichzeitig zunehmender Multimorbidität und einer damit assoziierten Sturzneigung steigt die Häufigkeit in der Altersgruppe >75 Jahren zunehmend an (Roozenbeek, Maas et al. 2013). Männer sind dabei im Vergleich häufiger von einem Schädel-Hirn-Trauma betroffen als Frauen (Peeters, van den Brande et al. 2015).

In verschiedenen in vitro und in vivo Studien konnte gezeigt werden, dass weibliche neuronale Zellen bzw. weibliche Versuchstiere resistenter sind gegenüber den Folgen experimentell induzierter Schädel-Hirn-Traumata und der damit einhergehenden Hypoxie im Vergleich zu männlichen neuronalen Zellen bzw. Versuchstieren (Herson, Koerner et al. 2009, Roselli, Liu et al. 2009). Es konnte auch gezeigt werden, dass weibliche Ratten kleinere posttraumatische Gewebeschäden aufweisen, im Vergleich zu männlichen und ovariectomierten weiblichen Ratten (Bramlett and Dietrich 2001). Es gibt zudem Evidenz in Tiermodellen, dass eine Therapie mit weiblichen Steroidhormonen nach einem SHT zu einer

Reduktion des zerebralen Hirnödems, des Untergangs von Neuronen und zu einer verbesserten funktionellen Rehabilitation führt (Herson, Koerner et al. 2009).

Diese Ergebnisse zeigen, dass weibliche Sexualhormone eine bedeutende Schlüsselrolle in der Neuroprotektion spielen, was nicht nur für SHT, sondern auch für die Therapie, beziehungsweise die Verbesserung der Überlebenszeit des GBM ein ausschlaggebender Faktor sein könnte.

### **1.3.3 Geschlechterspezifische Unterschiede bei Glioblastoma multiforme**

Wie bereits in Kapitel 1.1 beschrieben, weist das GBM eine geschlechterspezifische Inzidenz auf und Männer sind 1,6-mal häufiger betroffen als Frauen. Bei einem durchschnittlichen Erkrankungsalter von 64 Jahren kann davon ausgegangen werden, dass das GBM bei Frauen gehäuft postmenopausal und somit nach der hormonellen Umstellung auftritt (Ostrom, Gittleman et al. 2015). Einige epidemiologische Studien wiesen den Zusammenhang zwischen Sexualhormonen und dem Auftreten eines GBM signifikant nach (Hatch, Linet et al. 2005, Anic, Madden et al. 2014) und führten dabei die späte Menarche (>15. Lebensjahr) als wichtigsten Risikofaktor auf, während der Langzeitgebrauch von oralen Kontrazeptiva und Geburten eine Risikoreduktion darstellten.

Nach der Transplantation von Zellen eines GBM in athymische Mäuse (Verzat, Delisle et al. 1990) oder haarlose Ratten (Plunkett, Lis et al. 1999) zeigte sich ein deutlich schnelleres Wachstum bei männlichen als bei weiblichen Tieren, dies ist ein weiterer Hinweis darauf, dass weibliche Sexualhormone einen Einfluss auf das Wachstum von GBM-Zellen ausüben könnten. Die Therapie von haarlosen Ratten mittels Östrogen bei transplantiertem GBM zeigte eine geschlechterspezifische Verbesserung des Überlebens, mit einem weiblichen Geschlechtervorteil aufgrund höherer Östrogenspiegel.

Östrogen scheint eine positive Wirkung auf das Überleben und eine hemmende Wirkung auf das Wachstum von GBM Patienten auszuüben. Viele der experimentellen Studien wurden bisher hauptsächlich an Tieren durchgeführt, weswegen weitere Studien an humanem Gewebe benötigt werden, um diese Erkenntnisse zu bestätigen, künftige Therapien zu modifizieren und dadurch das Überleben beider Geschlechter zu verlängern.

#### **1.4 Sexualhormone im zentralen Nervensystem**

Sexualhormone sind Steroidhormone, die aus Cholesterin in den Gonaden, den Nebennieren, den Fettzellen, der Plazenta und dem Gehirn gebildet werden. Nach ihrer molekularen Funktion werden Sexualhormone in Untergruppen eingeteilt. Hierzu zählen die Androgene (Testosteron, Dihydrotestosteron), Östrogene (17- $\alpha$ -, 17- $\beta$ -Estradiol, Estrone, Estriol) sowie Progesterone (Progesteron, Allopregnanolol). Die Verteilung der Sexualhormone ist geschlechtsspezifisch. Während Männer deutlich mehr Androgene aufweisen, haben Frauen einen höheren Östrogen- und Progesteronspiegel im Blut.

Die Synthese der Steroidhormone (auch Steroidogenese genannt) erfolgt durch aufeinanderfolgende Enzymreaktionen, die in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum ablaufen. Ausgehend vom Cholesterin, welches zur inneren Mitochondrienmembran transportiert wird, entsteht Pregnenolon. Dieses Zwischenprodukt wird dann an das endoplasmatische Retikulum transportiert und weiter zu Progesteron synthetisiert. Progesteron wird dann über weitere Schritte zu Testosteron umgewandelt, welches mit Hilfe des Enzyms Aromatase (CYP19A1) in Östrogen (E2) umgebaut werden kann (siehe Abbildung 2).

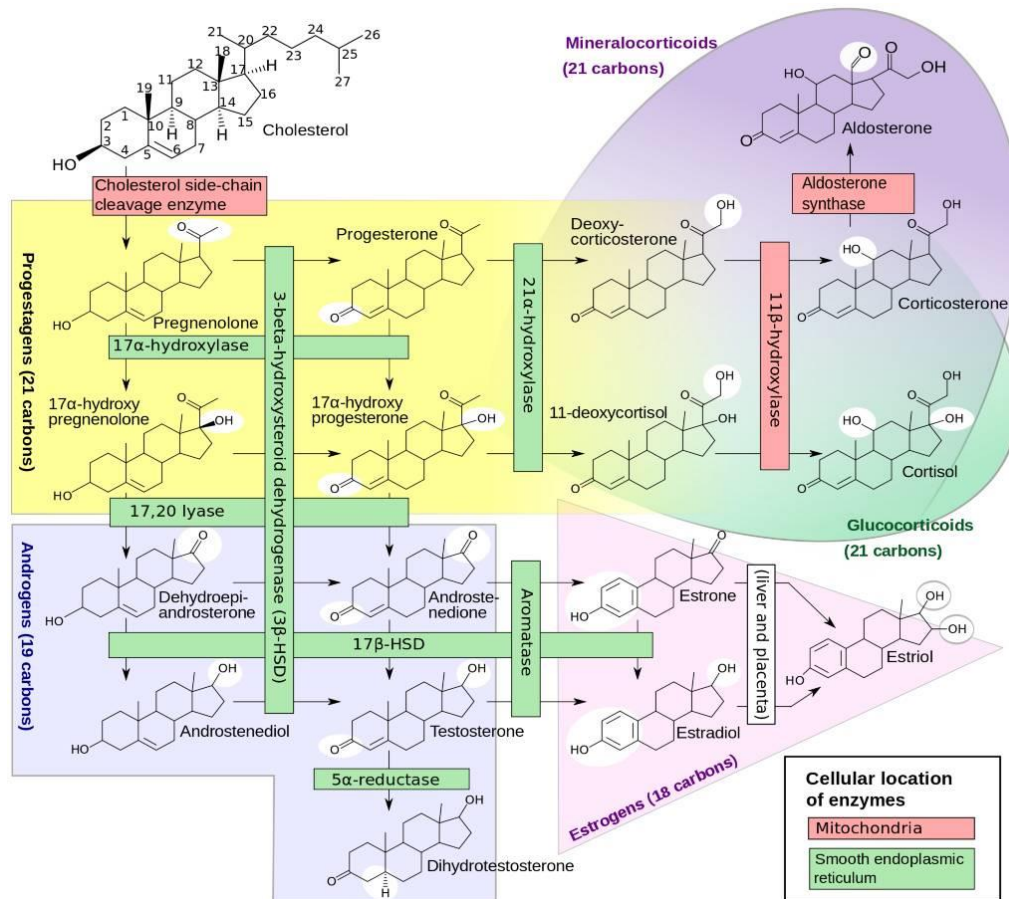


Abbildung 2: Darstellung Steroidhormonbiosynthese nach Häggström (Häggström, Stannared et al. 2014)

### 1.4.1 Aromatase

Die Aromatase gehört zu den CYP450 Enzymen und ist ein membranassoziiertes Protein des endoplasmatischen Retikulums. Es konvertiert Testosteron zu Östrogen als letzten Schritt der Östrogenbiosynthese. Die Aktivität des Enzyms ist dabei abhängig von der Konzentration des Endproduktes Östrogen, sowie der Aktivität der Östrogenrezeptoren. Das Enzym ist dabei sowohl in den Gonaden, als auch in Gliazellen, Neuronen und im Fettgewebe exprimiert (Boon, Chow et al. 2010). Die höchste Expressionsrate unter physiologischen Bedingungen im Gehirn weisen dabei vor allem Neurone auf. Zudem erfolgt eine kontinuierliche Expression des Enzyms von glialen Zellen (Azcoitia, Yague et al. 2011). Unter pathologischen Bedingungen, wie penetrierende Schädel-Hirn-Traumata, zerebrale Ischämie oder chronisch progressive Erkrankungen, erfolgt eine Verlagerung der Hauptexpression hin zu den Gliazellen, v.a. durch Astrozyten (Roselli, Liu et al. 2009, Acas-Fonseca, Avila-Rodriguez et al. 2016). Damit einhergehend kommt es zu erhöhten Östrogenlevel.

Möglicherweise erfolgt diese schnelle Hochregulierung über nicht-genomische Mechanismen, wie zum Beispiel direkte Phosphorylierung des Enzyms (Roselli 2007).

#### **1.4.2 Östrogen und Östrogenrezeptoren**

Die Synthese des Steroidhormons Östrogen findet in unterschiedlichen Geweben statt. Dazu gehören die Gonaden, die Nebennieren, das Fettgewebe, die Plazenta und das Gehirn. Im Gehirn haben Östrogene (17 $\beta$ -Estradiol) direkten Einfluss auf Endothelzellen, Neuronen und Gliazellen, wie Astrozyten, Oligodendrozyten und Mikroglia (Brann, Dhandapani et al. 2007, Acaz-Fonseca, Avila-Rodriguez et al. 2016). Zerebrale Zellen, wie Neurone und Gliazellen, können dabei nicht nur Östrogene aus der Blutbahn aufnehmen, sondern auch de novo synthetisieren (Caruso, Pesaresi et al. 2010, Caruso, Pesaresi et al. 2013). Da Östrogene unter anderem im Fettgewebe synthetisiert werden, spielt auch der Körperfettanteil eine Rolle für die Östrogenlevel im Blut. Östrogene beeinflussen dabei vor allem die Funktion der Astrozyten, sowohl im physiologischen als auch im pathologischen Zustand. Da die Aufgaben der Astrozyten sehr vielfältig sind, ist auch die Auswirkung des Östrogens dementsprechend mannigfaltig. Neben der bereits gut erforschten Wirkung des Östrogens auf die Reproduktion beeinflusst es auch höhere kortikale Funktionen, Schmerzmechanismen, motorische Fertigkeiten, psychische Stimmung sowie die Krampfneigung (McEwen 2001). Des Weiteren spielt Östrogen eine wichtige Rolle in der neuronalen Homöostase und zerebralen Plastizität (Brann, Dhandapani et al. 2007). Dem Östrogen wird zudem eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben v.a. in Bezug auf zerebrale Ischämie, Schädel-Hirn-Trauma und neurodegenerative Erkrankungen, wie beispielsweise Morbus Alzheimer oder dem idiopathischen Parkinsonsyndrom (Brann, Dhandapani et al. 2007, Raghava 2017). Die neuroprotektive Wirkung kann dabei auf unterschiedliche Arten entstehen (McEwen 2001): einerseits kann Östrogen wichtige neuronale Strukturen, wie beispielsweise weit projizierende dopaminerge, serotonerge und noradrenerge Bahnen aufrechterhalten. Andererseits spielen antioxidative Mechanismen eine wichtige Rolle zur Verminderung neurotoxischer Substanzen. Des Weiteren führt Östrogen zu einer Inhibition der Neuroinflammation. Genomische und auch nicht-genomische Signalwege führen dabei zu einer Inhibition der Apoptose und Promotion des zellulären Überlebens. Zudem beeinflusst das Östrogen auch die mitochondriale Bioenergetik und kann dadurch die suffiziente

neuronalen ATP-Versorgung aufrechterhalten (Raghava 2017). Eine Zusammenfassung der neuroprotektiven Wirkung des Östrogens bietet Abbildung 3.

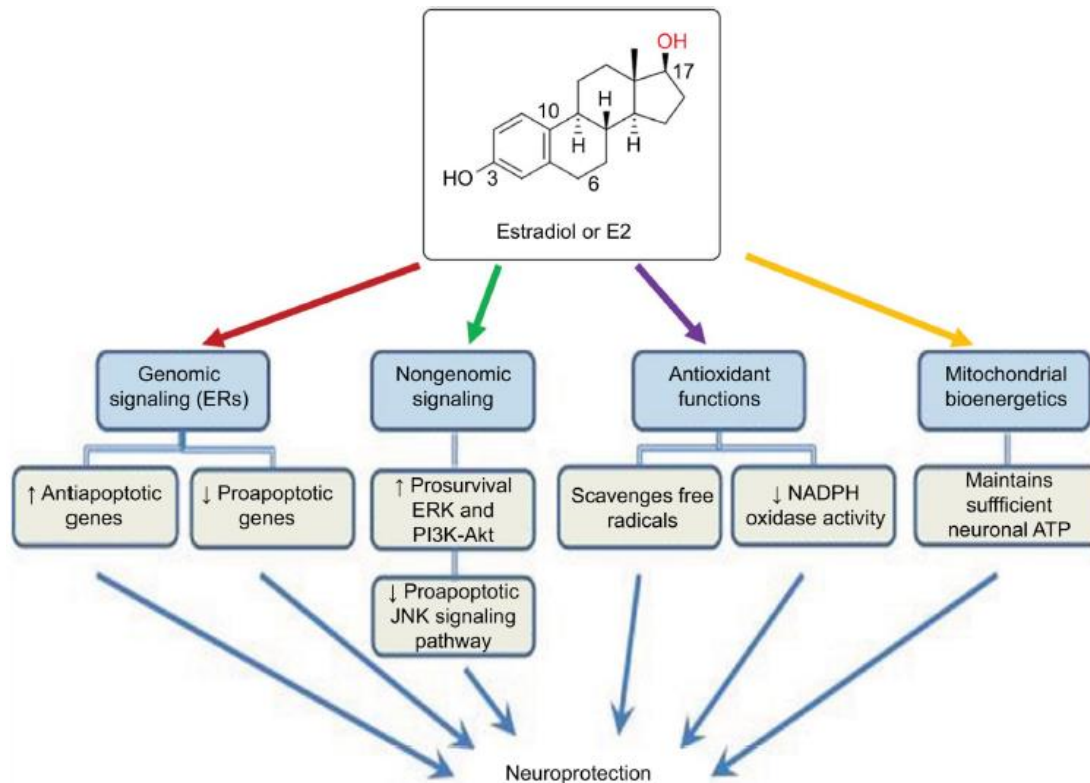


Abbildung 3: Zusammenfassung der unterschiedlichen neuroprotektiven Wirkungen des Östrogens. Dabei führen genomische und nicht-genomische Signalisierungsprozesse vor allem zur Aktivierung molekularer Komponenten, die eine Inhibition der Apoptose sowie Promotion des zellulären Überlebens einleiten. Antioxidative Funktionen führen dazu, dass freie reaktive Radikale reduziert werden, welche im Rahmen von Verletzungen des zentralen Nervensystem (ZNS) und Ungleichgewicht der neuronalen Homöostase entstehen können. Des Weiteren spielt Östrogen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Bioenergetik und somit der Produktion von neuronalen Adenosintriphosphat (ATP), ein universeller Energieträger (Raghava 2017).

Als Steroidhormon besitzt Östrogen aufgrund seiner molekularen Struktur lipophile Eigenschaften, weswegen es durch die Zellmembran diffundieren, sowie die Blut-Hirn-Schranke überqueren kann und an intrazelluläre Rezeptoren bindet. Durch die Bindung an nukleare Östrogenrezeptoren (ER) initiiert das Hormon die Genexpression unter physiologischen und pathologischen Bedingungen (Acáz-Fonseca, Avila-Rodríguez et al. 2016). Dabei kann die Wirkung des Östrogens über zwei Subtypen des nuklearen Östrogenrezeptors, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , ausgeübt werden (Thomas and Gustafsson 2011). Die beiden Isoformen sind sich dabei strukturell sehr ähnlich, besitzen aber unterschiedliche Bindungsdomänen für Liganden (Lo and Matthews 2010). Die Funktionen der ER Subtypen sind daher zum Teil sehr unterschiedlich, während ER $\alpha$  als Tumorpromoter beschrieben

wird, weist der ER $\beta$  antiproliferative Wirkungen auf und fungiert als Tumorsuppressor (Sareddy, Nair et al. 2012).

ER $\beta$  ist dabei vor allem im normalen Hirngewebe und in niedriggradigen Gliomen exprimiert und korreliert bei Gliomen mit schlechterem Überleben (Batistatou, Stefanou et al. 2004, Batistatou, Kyzas et al. 2006, Sareddy, Nair et al. 2012). Die Expression des ER $\alpha$  zeigte sich ebenfalls reduziert bei steigendem Grad der Malignität im Vergleich zum physiologischen Zustand, wies dabei jedoch höhere Raten als der ER $\beta$  auf (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014).

Im Rahmen von Schlaganfallstudien konnte gezeigt werden, dass die neuroprotektive Funktion des Östrogens hauptsächlich über ER $\alpha$  und nicht über ER $\beta$  ausgeübt wird (Dubal, Zhu et al. 2001, Dubal, Rau et al. 2006). Die Studien zeigten, dass während der Abwesenheit des ER $\alpha$  die neuroprotektive Wirkung des Östrogens verloren ging und das totale Infarktvolume deutlich größer war im Vergleich zu den Kontrollen. Die Abwesenheit von ER $\beta$  ergab keine Abweichung zur Kontrolle, am ehesten aufgrund der fortlaufenden Wirkung des Östrogens. Man kann somit davon ausgehen, dass die neuroprotektive Wirkung des Östrogens vor allem über den ER $\alpha$  ausgeübt wird.

Neben der Bindung von Östrogen an nukleare Östrogenrezeptoren und der Regulation von Gentranskription kann Östrogen auch nicht-genomische schnelle intrazelluläre Signalprozesse ausüben. Diese werden über G-Protein gekoppelte membranständige Östrogenrezeptoren (mERs) vermittelt (Milner, McEwen et al. 2001, Heldring, Pike et al. 2007, Welsh, Lannin et al. 2012, Acaz-Fonseca, Avila-Rodriguez et al. 2016).



## 2 Ziele der Doktorarbeit

Das Glioblastoma multiforme ist eine verheerende Erkrankung, welche trotz aggressiver Kombinationstherapien eine sehr schlechte Prognose aufweist. Männer sind dabei häufiger betroffen als Frauen. Dies legt die Hypothese nahe, dass Sexualhormone und dabei vor allem Östrogene eine wichtige Schlüsselrolle in der Tumorentwicklung einnehmen. Deshalb sollten in dieser Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

- Die Bewertung der Expression von ER $\alpha$  und Aromatase in humanen GBM-Präparaten in Abhängigkeit von Alter, Geschlecht, Überleben und Body-Mass-Index (BMI).
- Basierend darauf sollte der Einfluss von supraphysiologischen Dosen Östrogen auf humane GBM-Zellen in vitro in Kombination zur standardisierten Chemotherapie untersucht werden.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Material

Die für die Durchführung der Versuche verwendeten Chemikalien/Reagenzien, Materialien, Antikörper und Geräte sind in Tabelle 1, Tabelle 2, Tabelle 3 und Tabelle 4 aufgelistet.

Bilder der immunhistochemischen Färbungen wurden mit Hilfe der Software Aperio ImageScope 12.3.2 ausgearbeitet.

*Tabelle 1: Verwendete Chemikalien und Reagenzien*

<b>Substanz</b>	<b>Hersteller</b>
17 $\beta$ -Estradiol (E8875)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Accutase	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Acrylamid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
APS (Ammonium Persulfate)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Aqua Poly Mount	Polyscience Inc., Warrington, USA
Avidin/Biotin Blocking Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA
Bromphenollösung	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Citrat	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Dinatriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Distilled water DNase/RNase Frei	Life Technologies Corp., Paisley, UK
Dithiothreitol (DTT)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
DMSO	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Dulbecco's phosphate Buffered Saline	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
EDTA (Ethylendiamintetraacetat, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> )	Life Technologies Corp., Paisley, UK
Ethanol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Fetal calves serum (FCS) 10270	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Gelatine from cold water fish skin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Geltrex	Life Technologies Corp., Paisley, UK
Glycerol	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
HEPES (C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S)	Life Technologies Corp., Paisley, UK
HRP (Horseradish Peroxidase)	Merck KGaA, Darmstadt, DE
Hydrogen peroxide (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
ImmPACT DAB	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA
Kaliumchlorid (KCL)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
L-Glutamin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Lysis Buffer	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Meyer's Haematoxylin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
MTT labeling reagent	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
N <sub>2</sub>	Life Technologies Corp., Paisley, UK
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Natriumhydroxid (NaOH)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Normales Pferdeserum	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA
NP 40	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Page Ruler Plus Prestained	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
PMSF	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Ponceau S	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Protease Phosphatase Inhibitor Cocktail	Cell Signaling Technology, Danvers, USA
Protein Assay Dye Reagent Concentrate	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Rinderserumalbumin (BSA)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
SDS (Sodium Dodecyl Sulfat)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
TEMED	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Temozolomid	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tris-Cl	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Triton X100	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Trypsin	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA
Tween 20	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE
Vecastain ABC Kit	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA
WesternShure Pen	Li-Cor Corporate Offices – US, Nebraska, USA
Xylol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, DE

Tabelle 2: Verwendete Materialien

Material	Hersteller
CELLSTAR® Filter Top Zellkultur Flaschen 25 cm <sup>2</sup> , 75 cm <sup>2</sup> , Schalen 58 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, DE
Gibco® Human Astrocytes	Life Technologies Corp., Paisley, UK
LN-18 (humane Glioblastomzellen)	ATCC, Virginia, USA
LN-229 (humane Glioblastomzellen)	ATCC, Virginia, USA
Mikrotiterplatte (96 well plate)	TPP Techno Plastic Products AG, Trasadingen, CH
Nitrozellulosemembran	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Objektträger Süssefrost	Süsse Labortechnik GmbH & Co KG, Gundensberg, DE
Whatmann Filterpapier	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA

Tabelle 3: Verwendete Antikörper

Antikörper	Verwendung	Hersteller	Verdünnung
Erstantikörper:			
Cytochrom P450 19A1 (Aromatase)	IHC WB (57kDa)	Sigma-Aldrich Co., St. Louis, USA	IHC 1:150 WB 1:750
Estrogen-Rezeptor alpha Klon: 6F11	WB (66kDa)	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA	WB 1:500
Estrogen-Rezeptor alpha Klon: 6F11	IHC	DCS Innovative Diagnostik-Systeme Dr. C. Sartori, Hamburg, DE	IHC 1:20
Vinculin	WB (124kDa)	Abcam plc, Cambridge, UK	WB 1:20000
Zweitantikörper:			
Biotinylierter Pferde-Anti-Hase-IgG	IHC	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA	IHC 1:400
Biotinylierter Pferde-Anti-Maus-IgG	IHC	Vector Laboratories Inc., Burlingham, USA	IHC 1:200
HRP-gekoppelten Anti-Hase-IgG	WB	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	WB 1:5000
HRP-gekoppelter Anti-Maus-IgG	WB	Cell Signaling Technology, Danvers, USA	WB 1:5000

Tabelle 4: Verwendete Geräte

Gerät	Model	Hersteller
Abzug	Hera safe	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Brutschrank	Hera Cell 150	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA
Dampfgarer	TEFAL Steam cuisine	Groupe SEB Deutschland GmbH, Frankfurt am Main, DE
Energieversorger	PowerPac HC	Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, USA
Färbeautomat	VENTANA	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, DE
Magnetrührer	RCT basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Mikroskop	Zeiss Axio Imager Z1m	Carl Zeiss, Oberkochen, DE

Mikroskop	BH-2	Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, DE
Mikroskop	Eclipse TS 100	Nikon GmbH, Düsseldorf, DE
Mikrotom	RM 2255	Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, DE
pH-Meter	EL-30	Mettler-Toledo GmbH, Giessen, DE
Photometer	Infinite F200 pro	Tecan Group Ltd., Männendorf, CHE
Schüttelgerät	CAT RM5 -30V	neolab, Heidelberg, DE
Schüttelplatte	KS125basic	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Sonicator	BRANSON Digital Sonifier Model 250-D	G. Heinemann, Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd, DE
Vortexmischer	MS1 Minishaker	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, DE
Wasserbad	Aqualine AL 12	Lauda Dr. R. Wobser GMBH & CO. KG, Lauda-Königshofen, DE
Zentrifuge	4K15	Sigma, Deisenhofen, DE
Zentrifuge	5415D	Eppendorf AG, Hamburg, DE

### 3.2 Methoden

Alle Experimente wurden am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Fachbereich Neuropathologie der Technischen Universität München (TUM) im Labor der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel durchgeführt.

#### 3.2.1 Sammlung von GBM Patientengewebe und Patientendaten

Das humane Gewebematerial stammt aus dem Archivgewebe des Klinikums rechts der Isar, Universitätsklinikum der Technischen Universität München (TUM) und unterliegt den Richtlinien der Medizinischen Fakultät bezüglich Isolierung und Aufbewahrung von humanen Geweben. Alle Patienten stimmten der Archivierung und Verwendung des Gewebes für Forschungszwecke entsprechend dem lokalen Ethikkomitee zu.

Das Gewebe wurde an der Neurochirurgischen Klinik und Poliklinik des Klinikums rechts der Isar chirurgisch entfernt und durch zwei Neuropathologen (Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel, Dr. med. Claire Delbridge) am Institut für Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie im Fachbereich Neuropathologie der TUM histopathologisch und molekular genetisch als Glioblastoma multiforme, IDH Wildtyp entsprechend WHO Grad IV

diagnostiziert (Louis, Perry et al. 2016). Die Tumordiagnose eines GBM erfolgte lichtmikroskopisch anhand von Hämatoxylin-Eosin-Färbungen, sowie immunhistochemischen Färbungen dabei v.a. IDH1, aber auch saures Gliafaserprotein (GFAP), Ki67 (Proliferationsmarker), Mikrotubuli assoziiertes Protein 2 (MAP2), Tumorsuppressorgen p53, epidermalen Wachstumsfaktor (EGF, epidermal growth factor) und dem Methylierungsstatus der MGMT. Für diese retrospektive Studie wurden die Operationspräparate von insgesamt 60 GBM, IDH Wildtyp Patienten verwendet. Die Patienten wurden entsprechend des Stupp-Schemas (Stupp, Mason et al. 2005) behandelt. Von 7 der 60 GBM Patienten gab es keine Aufzeichnungen zum BMI, weswegen diese für die entsprechende Auswertung ausgeschlossen wurden. Tabelle 5 stellt eine Zusammenfassung der Patientencharakteristika dar.

*Tabelle 5: Patientencharakteristika wie Alter, Überleben nach Operation (OP) und Body-Mass-Index (BMI) der GBM Patienten nach Geschlecht*

	Weiblich (n=29)			Männlich (n=31)		
	Min.	Median	Max.	Min.	Median	Max.
Alter (in Jahren)	40	60	83	25	58	85
Überleben nach OP (in Tagen)	108	411	1920	22	432	1104
BMI (w: n=25, m: n=28)	15,4	23,5	39,2	20,4	26,4	34,6

### 3.2.2 Immunhistochemie

#### 3.2.2.1 Immunhistochemische Färbung (IHC)

Die am Mikrotom angefertigten 2µm dicken Gewebeschnitte aus Paraffinblöcken wurden auf Objektträger aufgetragen. Nach Deparaffinierung in Xylol und einer absteigenden Alkoholreihe (96% und 70% Ethanol) wurden die Schnitte in 10mM Zitratpuffer (pH 6,0) für 30 Minuten gekocht, um entstandene Quervernetzungen durch die Formaldehydfixierung wieder zu lösen. Zur Blockade der endogenen Peroxidase wurden die Schnitte für 10 Minuten bei Raumtemperatur (RT) in 1,5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inkubiert. Um unspezifische Bindungen durch die endogene Avidin-Biotin-Aktivität zu minimieren, wurden die Schnitte mit einem handelsüblichen Avidin/Biotin-Blockade-Kit, gelöst in Blockierungspuffer (Tabelle 6), für 30 Minuten behandelt und danach zweimal mit phosphatgepufferter Salzlösung (PBS) gewaschen. Die Gewebeschnitte wurden dann in einer feuchten Kammer über Nacht bei 4°C mit dem Erstantikörper ER $\alpha$ , bzw. Aromatase, verdünnt in Blockierungspuffer

(Verdünnungen siehe Tabelle 3), inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte nach zweimaliger Waschung in PBS die Inkubation mit dem biotinylierten Zweitantikörper (Anti-Maus für ER $\alpha$  und Anti-Hase für die Aromatase) für 30 Minuten bei RT. Danach wurde erneut mit PBS gewaschen und das ABC-Kit für weitere 30 Minuten bei RT angewandt. Zum Entwickeln wurden die Gewebeschnitte mit ImmPACT DAB unter visueller Kontrolle ca. 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurde mit Meyer`s Hämalaun gegengefärbt und mit Pertex eingedeckt.

Als Positivkontrolle wurde Plazentagewebe für das Enzym Aromatase und Brustdrüsengewebe für den Östrogenrezeptor verwendet. Als Negativkontrolle für alle Antikörper wurden Schnitte ohne Erstantikörper gefärbt.

Die Östrogenrezeptorfärbung, als eine Routinefärbung, wurde im Rahmen der Routinediagnostik mittels VENTANA-Färbemaschine durchgeführt.

*Tabelle 6: Puffer und Lösungen für IHC*

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Blockierungspuffer IHC	1 x PBS
	1% Rinderserumalbumin
	0,1% Triton X100
	0,2% Goldfischgelatine
	0,02% NA Azid
	2,5% normales Pferdeserum
PBS 10x pH 7,4	140mM NaCl
	2,7mM KCl
	20mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	1.8mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
Zitratpuffer 10mM pH 6,0	1.05g Citrat-Monohydrat pro 500 ml H <sub>2</sub> O

### **3.2.2.2 Auswertung und Punktbewertungsverfahren**

Die Schnitte wurden in Zusammenarbeit mit der Neuropathologin Claire Delbridge quantitativ ausgewertet. Dabei wurden jeweils 10 Gesichtsfelder bei 20-facher Vergrößerung begutachtet und je nachdem wieviele gliale Tumorzellen sich positiv anfärbten, erfolgte die Einteilung in 4 Gruppen. Die Gruppen gliederten sich wie folgt: Gruppe 1 enthielt Präparate mit 0-10%, Gruppe 2: 11-40%, Gruppe 3: 41-70% und Gruppe 4 enthielt 71-100% immunpositiver glialer Tumorzellen, welche sich in der vitalen Tumorregion befanden. Der

Nekrosekern wurde dabei nicht mitbeurteilt. Eine Zusammenfassung der Gruppeneinteilung ist in Tabelle 7 aufgelistet.

*Tabelle 7: Übersicht der Einteilung der IHC-Schnitte nach Prozentanzahl der immunpositiven glialen Tumorzellen zur Gesamtzellzahl*

Gruppe	Prozentzahl der immunpositiven glialen Tumorzellen von der Gesamtzellzahl
1	0-10%
2	11-40%
3	41-70%
4	71-100%

Als immunpositive Färbung des Enzyms Aromatase zählte, aufgrund seiner Lokalisation im endoplasmatischen Retikulum, eine deutliche Färbung des Zytoplasmas glialer Tumorzellen. Der verwendete ER-Antikörper Klon F611 bindet den ER $\alpha$  Subtyp. Dieser weist sowohl eine nukleare als auch eine zytoplasmatische Expression auf (Heldring, Pike et al. 2007, Acaz-Fonseca, Avila-Rodriguez et al. 2016), beides wurde als positive Färbung gewertet.

### 3.2.3 Zellkultur

Es wurden die etablierten kommerziell erworbenen humanen GBM-Tumorzelllinien LN18 und LN229 von ATCC<sup>TM</sup>, sowie etablierte primäre humane Astrozyten von Gibco<sup>®</sup> verwendet. Die Zelllinie LN18 wurde dabei laut Herstellerangaben von einem 65-jährigen Mann mit diagnostiziertem GBM isoliert (Diserens, de Tribolet et al. 1981). Die Zelllinie LN229 stammt hingegen von einer 60-jährigen Frau, welche ebenfalls an einem GBM litt. Die Isolation der Astrozyten erfolgte lt. Datenblatt der Firma Gibco<sup>®</sup> aus einem 18 Wochen alten hirngesunden Mädchen. Die Zellcharakteristika sind in Tabelle 8 zusammengefasst.

*Tabelle 8: Charakteristika der verwendeten Zelllinien LN18, LN229 und Astrozyten*

Zelllinie	Geschlecht	Alter	Erkrankung	Spezies
LN-18	Männlich	65 Jahre	GBM, WHO Grad 4	Human
LN-229	Weiblich	60 Jahre	GBM, WHO Grad 4	Human
Astrozyten	Weiblich	18 Wochen	Gesund	Human

#### 3.2.3.1 Kulturbedingungen

Die Zellen wurden in einer 75cm<sup>2</sup> großen Gewebekulturflasche bei 37°C, 95% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> in Wachstumsmedium, bestehend aus Dulbecco's Modified Eagle Medium – high Glucose (DMEM), versetzt mit 5% fetalem Kälberserum (FCS) und 1% L-



Glutamin, kultiviert. Die Astrozyten erhielten zusätzlich 1% N2 und wurden auf einer mit Geltrex beschichteten Flasche kultiviert. Alle Arbeitsschritte wurden steril unter dem Abzug mit vertikalem Luftstrom durchgeführt. Das verwendete Medium, sowie andere Lösungen wurden bei 4°C gelagert und für die Verwendung auf 37°C erwärmt. Alle zwei bis drei Tage wurde das Medium gewechselt. Mykoplasmentests wurden regelmäßig in Zeitabständen von 3 Monaten durchgeführt.

### **3.2.3.2 Passagieren der Zellen**

Bei Erreichen einer 90%igen Konfluenz wurden die Zellen gesplittet. Dabei wurde das Medium abgesaugt, mit Dulbecco's phosphate Buffered Saline (PBS) gewaschen und mit 2ml Trypsin (LN18, LN229) oder 2ml Accutase (Astrozyten) versetzt und für 2 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 2ml Medium zugegeben, um die Aktivität des Trypsins/Accutase zu neutralisieren. Sobald die Zellen in Suspension gebracht wurden, konnte mit Hilfe der Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt werden. Dabei wurde ein Tropfen der Zellsuspension in die Neubauer-Zählkammer pipettiert und die Zellen pro Quadrat ermittelt. Dabei galt:  $\text{Zellen/ml} = \text{gezählte Zellen pro Quadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$ . Die Zellsuspension wurde dann bei 14000 U/min für 4 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert.

### **3.2.3.3 Versuche**

#### **Induktion von Zellstress durch Serummangel**

Zellstress und pathologische Umweltbedingungen reaktivieren Astrozyten und veränderten ihre Hormonexpression, wie in 1.4 beschrieben. In diesem Versuch erfolgte die Induktion von Zellstress durch Serummangel.

Am Tag -1 erfolgte die Aussaat der Zellen auf 58cm<sup>2</sup> große Kulturschalen. Am Tag 0 wurde auf Hungermedium, bestehend aus: Dulbecco's Modified Eagle Medium – high glucose, 0,1% FCS und 1% L-Glutamin für die GBM-Zellen und zusätzlich mit 1% N2 für die Astrozyten, gewechselt. Alle 24h wurden die Zellen geerntet, beginnen mit Tag 1. Aufgrund eines Vorversuches wurde die Versuchsdauer auf 8 Tage festgelegt. Die Proben wurden lysiert, wie in 3.2.4.1 beschrieben und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

### Induktion von Zellstress durch Hypoxie

Durch die Reduktion des Sauerstoffgehaltes wurden ähnliche Zustände eines ischämischen Schlaganfalls nachgestellt. Für den Hypoxieversuch wurden die Zellen der jeweiligen Zelllinien (LN18, LN229 und Gibco®Astrozyten) in 25cm<sup>2</sup> große Gewebekulturflaschen ausgesät und mit Wachstumsmedium (beschrieben in 3.2.3.1) versorgt. Zum Zeitpunkt T0 wurde die Flasche luftdicht verschlossen. Jeweils nach 24 Stunden wurden die Zellen für den Western-Blot geerntet bis mehr als 70% der Zellen abgestorben waren (T8).

### Östrogen- und Temozolomidtherapie glialer Tumorzellen

LN18- und LN229-Zellen wurden am Tag 0 in einer Konzentration von 1500 Zellen/Well in einer 96 Well-Platte ausgesät. 24h nach der Aussaat erfolgte die erste Messung mittels MTT-Assay (siehe 3.2.5) als Ausgangswert. Am selben Tag begann die Therapie mit Östrogen (17 $\beta$ -Estradiol, E2) zu drei verschiedenen Konzentrationen: 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M und 50 $\mu$ M über 48h, welche gemäß der Produktinformation verdünnt wurden. Als Lösungsmittelkontrolle wurden jeweils Zellen mit Wachstumsmedium (siehe 3.2.3.1) und äquivalenten Mengen an Ethanol behandelt. Nach 48 Stunden Inkubation erfolgte die 2. Messung mittels MTT-Assay, um die Wirkung des Östrogens zu beurteilen. Ab diesem Zeitpunkt wurde das Chemotherapeutikum Temozolomid (TMZ) zu fünf verschiedenen Dosierungen: 25 $\mu$ M, 50 $\mu$ M, 100 $\mu$ M, 200 $\mu$ M und 400 $\mu$ M über insgesamt fünf Tage appliziert. Dabei musste aufgrund der kurzen Wirkungsdauer die Applikation alle 24h wiederholt werden. Am Versuchsende wurde erneut die Zellviabilität mittels MTT-Assay gemessen. Eine Übersicht über den Versuchsablauf liefert dabei Abbildung 4. Eine Messung setzte sich dabei jeweils aus drei gleich behandelten Wells (Triplet) zusammen und der Versuch wurde dreimalig wiederholt.

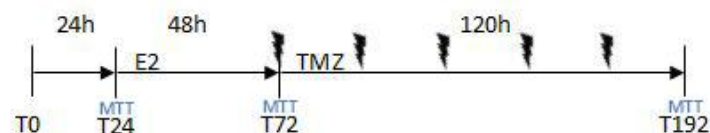


Abbildung 4: Schaubild des Versuchsaufbaus Östrogen- und Temozolomidtherapie glialer Tumorzellen

### 3.2.4 Western-Analyse

#### 3.2.4.1 Vorbereitung der Zellen aus der Zellkultur (Zelllyse)

Nach Entfernen des Mediums wurde zweimal mit kaltem PBS gewaschen und mit 250 $\mu$ l RIPA-Lysepuffer (für 58cm<sup>2</sup> Platten) lysiert (siehe Tabelle 9). Die Zellen wurden dann

geerntet, in ein Eppendorfgefäß überführt und mit Hilfe des Sonicators (Beschallungsgerät) für 30 Sekunden beschallt um die Membran der Zellen weiter aufzubrechen. Nach einer 15 minütigen Inkubation auf Eis wurde das Lysat bei 4°C mit 14000 U/min über 10 Minuten zentrifugiert. Ein Teil des Überstandes wurde 1:10 mit destilliertem Wasser verdünnt und für die Bradfordanalyse (3.2.4.2) verwendet, der restliche Überstand wurde im Verhältnis 5:1 mit Lämmli-Puffer (siehe Tabelle 9) vermischt, bei 95°C für 5 Minuten gekocht und danach bei -20°C für die weitere Verarbeitung aufbewahrt.

*Tabelle 9: Puffer für die Zellyse und Vorbereitung auf den Western-Blot*

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
RIPA-Lysepuffer	Destilliertes Wasser
	10mM HEPES
	150mM NaCl
	2mM EDTA
	1% NP-40
	1% TritonX-100
	Pro 1ml RIPA-Puffer wurde je 10µl PMSF und Protease-Phosphatas-Inhibitor frisch zugegeben
Lämmli-puffer	Destilliertes Wasser
	10% SDS
	125mM Tris
	10% Glycerol
	0,2% Bromphenollösung
	250mM DTT (frisch zugeben)

### **3.2.4.2 Proteinbestimmung mittels Bradford-Analyse**

Zur quantitativen Analyse der Proteinmenge erfolgte eine photometrische Bestimmung, sog. Bradford-Analyse (Bradford 1976). In einer 96-Well-Platte wurden jeweils 10µl des Leerwertes, der Kontrolle, der Standardverdünnungsreihe aus Rinderserumalbumin (2mg/ml) und der unbekanntenen Proben in Triplets aufgetragen, mit 200µl der verdünnten Färbelösung (Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent) vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Bei 595nm erfolgte dann die Messung im Photometer mithilfe der Software Magellan 7.1. Eine lineare Eichkurve wurde erstellt und die Proteinkonzentrationen in mg/ml abgelesen.

### 3.2.4.3 Western Blot

Für den Western Blot wurden zuerst die 10%-SDS-Gele (Tabelle 10), bestehend aus dem Trenngel (Auftrennen der Proteine nach Größe) und dem danach aufgetragenen Sammelgel angefertigt und in den vorbereiteten Gelkammern für jeweils 20 Minuten ausgehärtet.

Danach wurden die Gele in eine Elektrophoresekammer eingesetzt, welche mit 1x Laufpuffer gefüllt war (Tabelle 10) und mit den Proben beladen. Eine elektrische Spannung von 180V wurde angelegt, bis die Lauffront des Markers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Der Proteintransfer auf die Nitrozellulosemembran erfolgte als sog. Gel-Sandwich in einer gitterförmigen Kunststoffkassette mit in 1x Transferpuffer (siehe Tabelle 10) getränktem Schwamm, Filterpapier, Nitrozellulosemembran, Gel, Filterpapier und einem weiteren Schwamm. Die Kunststoffkassette wurde dann mit der Membranseite zur Anode in die mit 1x Transferpuffer gefüllte Transferkammer gestellt. Es wurden 100V angelegt und für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach abgeschlossenem Proteintransfer wurden die Proteine auf der Nitrozellulosemembran als Kontrolle reversibel mit Ponceau S angefärbt.

Zur Blockierung unspezifischer Proteinbindungsstellen der Nitrozellulosemembran erfolgte die Inkubation mit Blockierungspuffer (Tabelle 10) für eine Stunde bei RT. Nach mehrfachem Waschen der Membran in TBST (Tabelle 10) wurde der jeweilige Erstantikörper (Tabelle 3) verdünnt in Blockierungspuffer zugegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde erneut mit TBST gewaschen, der HRP-gekoppelte Zweitantikörper (Tabelle 3), verdünnt in Blockierungslösung, aufgetragen und für 45 Minuten bei RT auf dem Schüttelgerät inkubiert. Nach erneutem Waschen mit TBST wurden die Membranen in eine Röntgenkassette gelegt und mit dem HRP Substrat, bestehend aus Luminol Reagenz und Peroxidaselösung, für 5 Minuten bei RT inkubiert. Um das entstandene Lumineszenzsignal sichtbar zu machen, wurden Röntgenfilme mit den Membranen über 30 Sekunden bis 5 Minuten inkubiert und anschließend durch eine automatische Entwicklermaschine sichtbar gemacht.

Für die Evaluation der Expression von ER $\alpha$  und Aromatase in GBM-Zelllinien wurden primäre Astrozyten als Kontrolle verwendet, da diese native astrozytäre Zellen darstellen und wie in 1.4 beschrieben, sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen ER $\alpha$  und Aromatase exprimieren.

Tabelle 10: verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot

Gele und Puffer für Western Blot	Zusammensetzung
Trenngel 10%, für 2 Gele	6,64ml destilliertes Wasser
	5,32ml Acrylamid
	4,00ml 1M Tris-Cl pH 8,8
	0,10ml SDS 20%
	0,10 ml APS 10%
	0,02ml TEMED
Sammelgel 5%, für 2 Gele	7,00ml destilliertes Wasser
	1,67ml Acrylamid
	1,25ml 1M Tris-Cl pH 6,8
	0,05ml SDS 20%
	0,05ml APS 10%
	0,01ml TEMED
Laufpuffer 10-fach konzentriert	250mM Tris
	1,92M Glycine
	1% SDS
Transferpuffer pH 8,3 10-fach konzentriert	190mM Glycine
	25mM Tris
	Zur Anwendung: 10x Transferpuffer mit Ethanol und dH <sub>2</sub> O im Verhältnis 1:2:7 vermischen
Tris gepufferte Salzlösung (TBS, 10-fachkonzentriert)	150mM NaCl
	20mM Tris
TBST (TBS + Tween)	TBS einfachkonzentriert (verdünnt in dH <sub>2</sub> O)
	0,1% Tween-20
Blockierungspuffer	TBST
	5% Rinderserumalbumin (AR, ER, Aromatase) oder 5% Milchpulver (Vinculin)

### 3.2.5 MTT-Assay

Der MTT-Assay ist ein Verfahren zur Bestimmung der metabolischen Zellaktivität und der damit korrelierenden Zellviabilität (Anteil lebender Zellen zur Gesamtpopulation). Dabei wird die Reduktion eines gelben, wasserlöslichen Farbstoffes (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid) mittels NADH und NADPH in ein blauviolette wasserunlösliches Formazan sichtbar gemacht, was letztlich der Glykolyserate der Zellen entspricht. Die Zellen wurden in 96-Wellplatten in jeweils 100µm Medium ausgesät. Nach dem jeweiligen Experiment wurden 10µl des MTT-Markierungsreagenz (0,5mg/ml) in jedes

behandelte Well pipettiert und für vier Stunden unter normalen Wachstumsbedingungen inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und durch 100µl DMSO ersetzt. Nach weiteren 30 Minuten Inkubationszeit auf dem Schüttler bei RT wurde photometrisch die Umsetzung von MTT zu Formazan bei einer Wellenlänge von 595nm und einer Referenzwellenlänge von 650nm gemessen. Als Leerwert wurde jeweils ein Well-Triplet pro Platte unter Versuchsbedingungen, jedoch ohne Zellen, mitbehandelt.

### **3.2.6 Statistische Analysen**

Excel 2016 und SPSS Statistics 24 wurden für alle statistischen Auswertungen verwendet. Die Überlebensanalysen erfolgten mit Hilfe von Kaplan Meier Kurven und Cox-Regressionsanalysen entsprechend den REMARK-Richtlinien (McShane, Altman et al. 2005). Ein Signifikanzniveau von  $\alpha=0,05$  wurde festgelegt.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Analysen des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanen GBM Präparaten

#### 4.1.1 Immunhistochemische Analyse des ER $\alpha$ und des Enzyms Aromatase

Die Gewebeschnitte wurden, wie in Kapitel 3.2.2.2 auf Seite 17 beschrieben, quantitativ bewertet und in 4 Gruppen eingeteilt: 1=0-10%, 2=11-40%, 3=41-70%, 4=71-100% immunpositiver glialer Tumorzellen in der vitalen Tumorregion. Die Klassifikation entstand aus dem Grund, dass viele der Gewebeschnitte keine oder nur eine sehr geringe immunhistochemische Färbung des ER $\alpha$  aufzeigten. Damit war eine bessere Differenzierung von Gewebeschnitten mit fehlender und geringer Expressionsraten möglich. Für weitere Klassifikationen wurden 0-40% immunpositiver glialer Tumorzellen als niedrige Expression des Rezeptors/Enzyms gewertet und 41-100% immunpositive Tumorzellen zählten als hohe Expression. Anhand der Punktebewertung wiesen deutlich mehr Gewebeschnitte eine hohe Expression des Enzyms Aromatase auf (Median Färbungsgruppe 4), während die Expression von ER $\alpha$  deutlich geringer ausfiel (Median Färbungsgruppe 2).

Beispiele der jeweiligen Färbungsgruppen der immunhistochemischen Färbung des ER $\alpha$  und der Aromatase sind in Abbildung 5 und Abbildung 6 dargestellt.

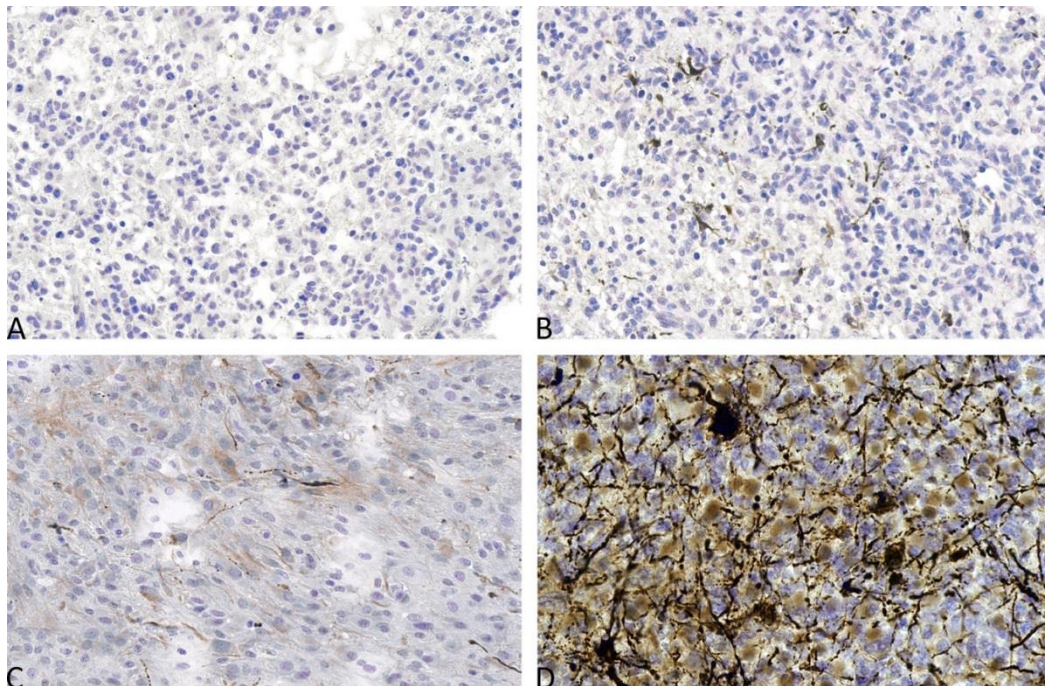


Abbildung 5: IHC, 20x, ER $\alpha$ . GBM-Gewebeschnitte der vier Bewertungsgruppen. In der oberen Reihe sind Schnitte dargestellt, die der Gruppe 1 (0-10%, A) und der Gruppe 2 (11-40%, B) zugeordnet wurden. Die unteren Abbildungen zeigen Beispiele für die Gruppe 3 (41-70%, C) und der Gruppe 4 (71-100%, D).

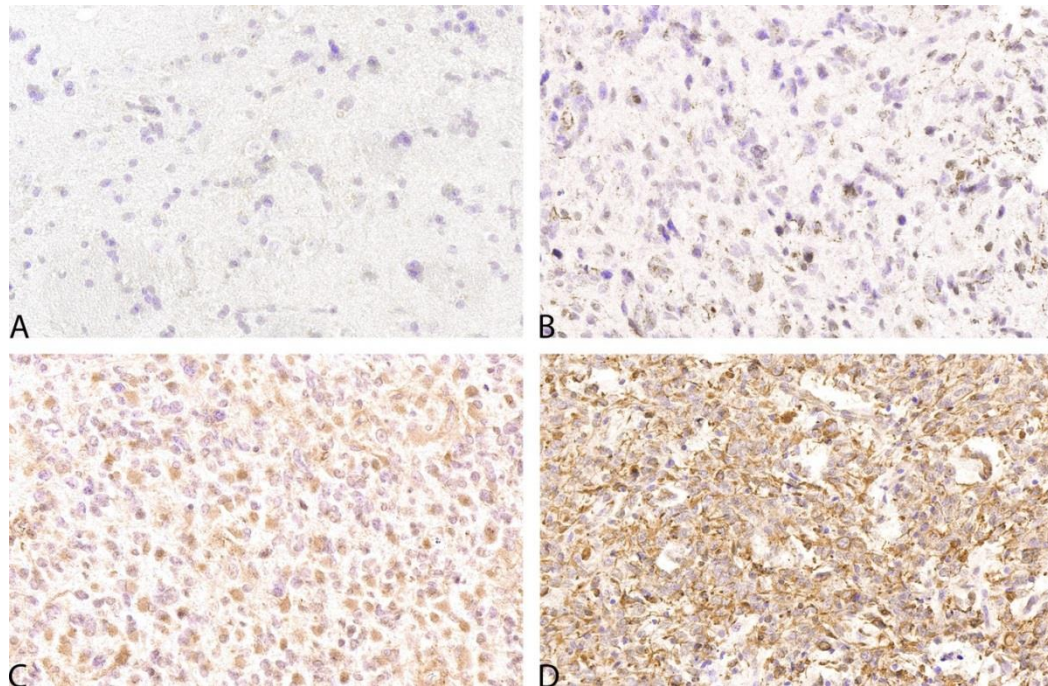


Abbildung 6: IHC, 20x, Aromatase. GBM-Patientenbeispiele der vier Bewertungsgruppen. In der oberen Reihe sind Schnitte dargestellt, die der Gruppe 1 (0-10%, A) und der Gruppe 2 (11-40%, B) zugeordnet wurden. Die unteren beiden Abbildungen zeigen Beispiele für die Gruppe 3 (41-70%, C) und die Gruppe 4 (71-100%, D).

Die Auswertung der Färbung des ER $\alpha$  zeigte, dass insgesamt 22 der 60 Patienten (12 Frauen, 10 Männer) weniger als 10% immunpositive gliale Tumorzellen in der vitalen Tumorregion aufwiesen. Die zweite Gruppe mit 11-40% der immunpositiven Tumorzellen beinhaltete 20 Gewebeschnitte (8 Frauen, 12 Männer). 13 Gewebeschnitte (5 Frauen, 8 Männer) enthielten zwischen 41 und 70% immunpositive Tumorzellen. Die vierte Gruppe (>71% immunpositive Tumorzellen) enthielt 5 Gewebeschnitte, bestehend aus 4 Frauen und einem Mann.

Die Evaluation der immunhistochemischen Färbung des Enzyms Aromatase zeigte 2 Gewebeschnitte (2 Frauen) mit weniger als 10% immunpositiver Tumorzellen. Acht GBM-Schnitte (4 Frauen, 4 Männer) wiesen dabei 11-40% immunpositive Tumorzellen auf und zählten somit zu Gruppe 2. Die 3. Gruppe der immunhistochemisch positiv gefärbten Tumorzellen enthielt 11 Tumorschnitte (8 Frauen, 3 Männer). 39 von 60 Gewebeschnitten zeigten mehr als 71% immunpositive Tumorzellen, davon waren 15 Frauen und 24 Männer. Eine Zusammenfassung dieser Verteilung kann Tabelle 11 entnommen werden. Eine ausführlichere Auflistung der Gewebeproben mit Patientencharakteristika und Punktbewertung zu den jeweiligen Färbungen kann der Tabelle 16 im Anhang auf Seite 65 entnommen werden.



*Tabelle 11: Zusammenfassung der Einteilung der Gewebeschnitte nach Geschlecht in die 4 Gruppen der immunhistochemisch positiv gefärbten glialen Tumorzellen zur Gesamtzellzahl in der vitalen Tumorregion*

Färbungsgruppe	ER $\alpha$		Aromatase	
	Frauen	Männer	Frauen	Männer
Gruppe 1: 0-10%	12	10	2	0
Gruppe 2: 11-40%	8	12	4	4
Gruppe 3: 41-70%	5	8	8	3
Gruppe 4: 71-100%	4	1	15	24

ER $\alpha$  positive gliale Tumorzellen zeigten eine diffuse Gewebsinfiltration, besondere Anhäufungen konnten dabei nicht beobachtet werden. Es kam dabei sowohl zu einer immunpositiven Anfärbung der Zellkerne als auch des Zytoplasmas.

Zellen, die eine Aromatase positive Immunreaktion zeigten, wiesen häufig einen kleinen Zellkörper mit weiten Ausläufern und Fortsätzen auf, welche ebenfalls sehr diffus im Tumorbereich verstreut waren. Ein gehäuftes Auftreten von Aromatase immunpositiven glialen Tumorzellen konnte vor allem um Blutgefäße beobachtet werden (siehe Abbildung 6D).

Die ER $\alpha$  und Aromatase immunpositiven Zellen konnte man in der Infiltrationszone des Tumors finden, wohingegen das Tumorzentrum oder Nekroseareale keine immunpositiven Zellen aufzeigte.

#### **4.1.2 GBM-Patientencharakteristika**

Die GBM Kohorte dieser Arbeit enthielt 60 Patienten bestehend aus 29 Frauen und 31 Männern in einem Alter zwischen 25 und 85 Jahren. Das mediane Alter lag für Frauen bei 60 und für Männer bei 58 Jahren. Die Überlebenszeiten der GBM-Patienten lagen postoperativ zwischen 22 und 1920 Tagen. Weibliche Patienten zeigten dabei ein medianes Überleben von 411 Tagen. Das mediane Überleben von Männern betrug 432 Tage. Zusätzlich erfolgte die Analyse des Body-Mass-Index (BMI). Wie in 1.4 beschrieben, beeinflusst die Östrogensynthese in Fettzellen die Höhe des Östrogenblutspiegels und damit auch die zerebralen Hormonkonzentrationen (Boon, Chow et al. 2010). Frauen wiesen dabei einen BMI zwischen 15,4 und 39,2, mit einem Median von 23,5 auf. Der BMI der männlichen GBM

Patienten lag im Median bei 26,4 mit einer Spannweite zwischen 20,4 und 34,6. Eine Zusammenfassung der Patientencharakteristika kann Tabelle 12 entnommen werden.

Tabelle 12: Patientencharakteristika wie Alter, Überleben nach Operation (OP) und Body-Mass-Index (BMI) der GBM Patienten nach Geschlecht

	Weiblich (n=29)			Männlich (n=31)		
	Min.	Median	Max.	Min.	Median	Max.
Alter (in Jahren)	40	60	83	25	58	85
Überleben nach OP (in Tagen)	108	411	1920	22	432	1104
BMI (w: n=25, m: n=28)	15,4	23,5	39,2	20,4	26,4	34,6

#### 4.1.2.1 Geschlecht

Es konnte kein signifikanter geschlechterspezifischer Unterschied in den GBM-Schnitten hinsichtlich der Höhe der Immunreaktivität gegenüber ER $\alpha$  (Chi<sup>2</sup> p=0,332), sowie gegenüber Aromatase (Chi<sup>2</sup> p=0,098) festgestellt werden. Die Verteilung zwischen niedriger und hoher Expression des Rezeptors ER $\alpha$  und des Enzyms Aromatase zeigte sich somit ähnlich zwischen Männern und Frauen. Der Median der Färbungsgruppen lag geschlechterunabhängig für die Immunreaktivität gegenüber ER $\alpha$  bei Gruppe 2 und gegenüber Aromatase bei Gruppe 4. Abbildung 7 zeigt eine graphische Darstellung der relativen Verteilung von Männern und Frauen in den 4 IHC-Färbungsgruppen für ER $\alpha$  und das Enzym Aromatase.

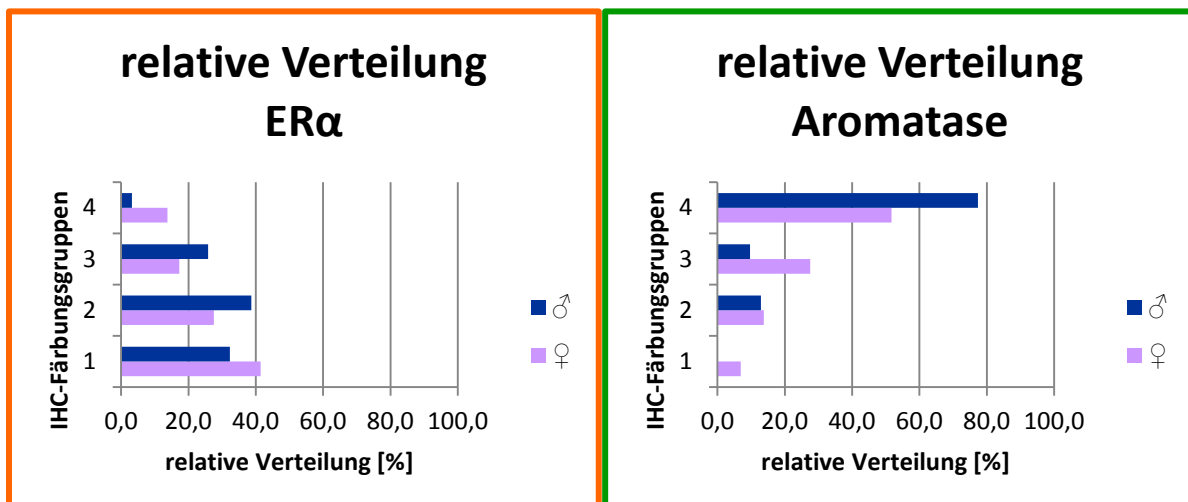


Abbildung 7: relative Verteilung des ER $\alpha$  (orange) und der Aromatase (grün) zwischen Männern und Frauen hinsichtlich der 4 IHC-Färbungsgruppen.

#### 4.1.2.2 Alter

Die Verteilung der Färbungsgruppen nach Altersklassen zeigte, dass die Expression des ER $\alpha$  im Alter zwischen 41-50 Jahren höher ist als in allen anderen Altersgruppen, wenn man

Männer und Frauen gemeinsam beobachtet. Die Expression des ER $\alpha$  nahm dabei für Männern und Frauen gemeinsam mit zunehmendem Alter ab. Die Aromataseexpression zeigte sich über die Altersgruppen relativ konstant, mit niedrigeren Werten zwischen 41-50 Jahren. Eine graphische Zusammenfassung bietet dafür Abbildung 8.

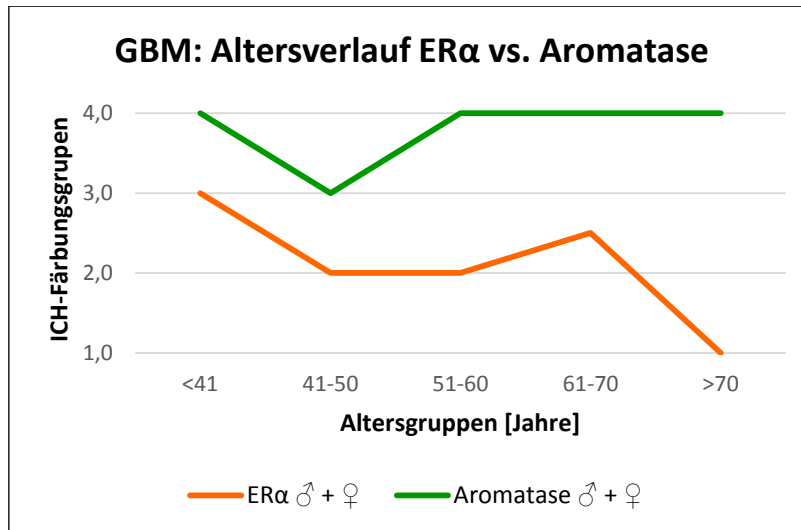


Abbildung 8: Verteilung der Höhe des ER $\alpha$  (orange) und der Aromatase (grün) anhand der IHC-Färbungsgruppen nach Altersklassen für Männer und Frauen gemeinsam. Dabei zeigt der ER $\alpha$  insgesamt eine Abnahme über die Altersklassen. Die Aromatase hingegen zeigt sich, mit Ausnahme der Altersgruppe 41-50 Jahren, konstant in der höchsten Färbungsgruppe.

Bei geschlechterspezifischer Betrachtung fiel auf, dass die gesehene Abnahme des ER $\alpha$  vor allem der Expression der männlichen ER $\alpha$  entsprach. Diese wiesen höchste Werte bei der Gruppe unter 40 Jahren auf, gefolgt von mittleren Werten zwischen 41-50 Jahren und niedrigen Werten bei den über 70-jährigen GBM Patienten. Bei den Frauen konnte ein Peak an ER $\alpha$  immunreaktiven Tumorzellen in der Altersklasse 61-70 Jahren gesehen werden, welche ebenfalls von einer Abnahme in der Altersklasse über 70 Jahren gefolgt war.

Bei Männern war der Verlauf der Expression von Aromatase anhand der Färbungsgruppen bis zum 70. Lebensjahr konstant und nahm in der Altersklasse der über 70-jährigen ab (<70 Jahre: Median Gruppe 4, >70 Jahre: Median zwischen Gruppe 3 und 4). Die Aromatase-Immunreaktivität bei Frauen verlief in den Altersklassen jeweils gegenläufig zur ER $\alpha$ -Immunreaktivität. Man konnte eine niedrige Expression zwischen 41 und 50 Jahren sehen, gefolgt von einem Anstieg in der Altersgruppe 51-60 Jahren auf die Höchstgruppe. Die Expression sank zwischen 61-70 Jahren erneut ab und erreichte in der Altersgruppe über 70 Jahren erneut die höchste Gruppe 4.

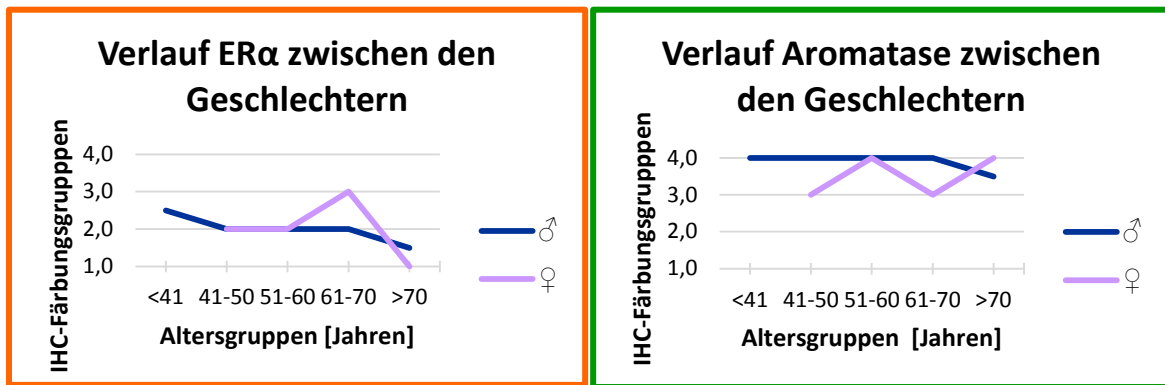


Abbildung 9: Verteilung des ERα (orangenes Kästchen) und der Aromatase (grünes Kästchen) anhand der IHC-Färbungsgruppen nach Altersklassen zwischen Männern und Frauen. Der ERα zeigte sich bei Männern <40. Lebensjahr hoch und nahm bis ins >70. Lebensjahr ab. Bei Frauen konnte ein deutlicher Peak im Alter zwischen 61-70 Jahren gesehen werden. Eine deutliche Abnahme der Expression wiesen Patienten über 70 Jahren auf. Die Aromatase zeigte sich bei Männern relativ konstant mit einer Abnahme der Expression im Alter >70 Jahren. Die Expression der Aromatase bei Frauen zeigte niedrige Spiegel im Alter zwischen 41-50 Jahren, stieg dann zwischen 51-60 Jahren an, nahm erneut ab zwischen 61-70 Jahren und stieg in der Gruppe der >70-jährigen.

#### 4.1.2.3 Body-Mass-Index (BMI)

Die Analyse der Korrelation zwischen der Expression des ERα und dem BMI zeigte, dass Gewebeschnitte mit weniger als 10% immunpositiver Tumorzellen Patienten mit einem durchschnittlichen BMI von 24,3 kg/m<sup>2</sup> beinhalteten. Der BMI in der zweiten Färbungsgruppe (11-40% immunpositive Tumorzellen) lag bei 25,1kg/m<sup>2</sup>, in der dritten Gruppe bei 28,3kg/m<sup>2</sup> und für die Gewebeschnitte in der höchsten Färbungsgruppe 4 lag der BMI bei 23,2 kg/m<sup>2</sup> (Tabelle 13). Für die Expression von Aromatase im Vergleich zum BMI zeigte sich für die Färbungsgruppe 1 eine durchschnittlicher BMI von 19,3 kg/m<sup>2</sup>, für Gruppe 2 lag er bei 28,5 kg/m<sup>2</sup>, für Gruppe 3 bei 24,0 kg/m<sup>2</sup> und für die Färbungsgruppe 4 lag der BMI bei 25,8 kg/m<sup>2</sup> (Tabelle 13).

Tabelle 13: Mittelwerte des Body-Mass-Indexe in Korrelation zur Färbungsgruppe für ERα und Aromatase für beide Geschlechter.

Färbungsgruppe	Durchschnittlicher Body-Mass-Index in kg/m <sup>2</sup>	
	ERα	Aromatase
Gruppe 1	24,3	19,3
Gruppe 2	25,1	28,5
Gruppe 3	28,3	24,0
Gruppe 4	23,2	25,8

Mittel zweifaktorieller Varianzanalyse konnte dabei weder für die Immunreaktivität gegenüber dem ER $\alpha$  ( $p=0,067$ ) noch für die Aromatase ( $p=0,212$ ) ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen BMI und Geschlecht gezeigt werden. Frauen zeigten für die Immunreaktivität gegenüber dem ER $\alpha$  einen Trend zwischen steigendem Grad der Färbungsgruppe und Anstieg des BMI auf (siehe Abbildung 10). Der mediane BMI nahm von Gruppe 1 mit 23,2 kg/m<sup>2</sup> ( $n=12$ ) bis Gruppe 3 mit 28,4kg/m<sup>2</sup> ( $n=5$ ) deutlich zu. Der mediane BMI in Gruppe 4 betrug 22,6 kg/m<sup>2</sup> ( $n=4$ ) und setzte sich zusammen aus zwei Untergewichtigen, einer Übergewichtigen und einer adipösen Frau (Standardabweichung von 7,44 kg/m<sup>2</sup>). Bei Männern konnte kein Trend in der Korrelation von ER $\alpha$  und BMI gesehen werden (siehe Abbildung 11).

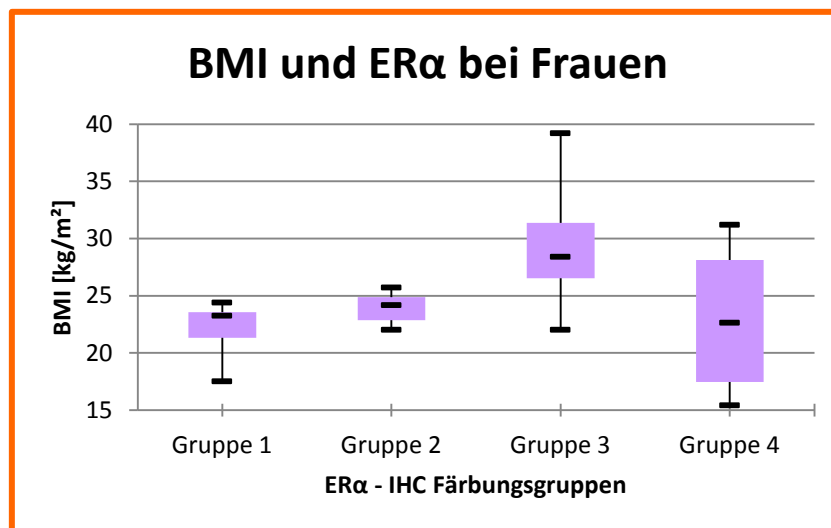


Abbildung 10: Body-Mass-Index und ER $\alpha$  Immunreaktivität bei weiblichen Gliompatienten nach den 4 Gruppen. In den Gruppen 1-3 ist ein Trend hinsichtlich BMI Anstieg und Anstieg an ER $\alpha$  positiven Zellen zu beobachten. Gruppe 4 folgt nicht dem Trend.

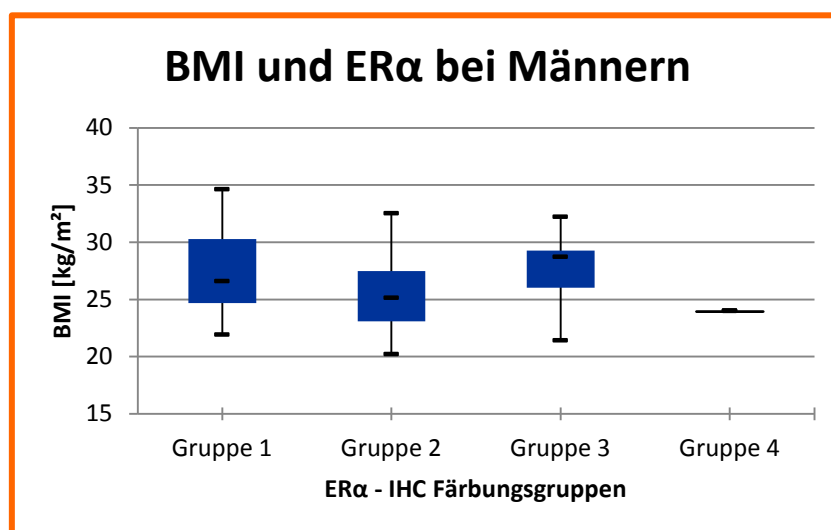


Abbildung 11: Body-Mass-Index und ER $\alpha$  Immunreaktivität bei männlichen Gliompatienten nach den 4 Gruppen. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht beobachtet werden.

#### 4.1.2.4 MGMT-Status

Eine Berechnung mittels Chi<sup>2</sup>-Test zeigte keinen Zusammenhang zwischen dem Methylierungsstatus der MGMT und der Immunreaktivität gegenüber ER $\alpha$  ( $p=0,289$ ). Die Korrelation der Färbungsgruppen der Aromatase zeigte ebenso keine Abhängigkeit vom Methylierungsstatus der MGMT ( $p=0,395$ ).

Es konnte jedoch in dieser Kohorte ein signifikanter Zusammenhang zwischen dem Geschlecht und dem Methylierungsstatus berechnet werden ( $p=0,012$ ). Männliche GBM Patienten wiesen häufiger einen negativen Methylierungsstatus auf, während weibliche GBM-Patienten häufiger eine Methylierung des Enzyms aufzeigten.

#### 4.1.3 Überlebensanalyse von GBM Patienten hinsichtlich ER $\alpha$ und Aromatase

Für die Überlebensanalysen wurden die Färbungsgruppen aufgrund der Übersichtlichkeit, wie bereits in 4.1.1 beschrieben, in zwei Gruppen zusammengefasst: geringe Rezeptoren- bzw. Enzymexpression 0-40% (Färbungsgruppe 1 und 2) und hohe Expression mit 41-100% (Färbungsgruppe 3 und 4) immunpositiver glialer Tumorzellen in der vitalen Tumorregion. Die Kaplan-Meier Analyse für die Immunreaktivität gegenüber ER $\alpha$  in GBM-Patienten zeigte ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit hoher ER $\alpha$  Expression (>40% der glialen Tumorzellen) im Vergleich zu einer geringen Expression des Rezeptors mit <40% immunpositiver Tumorzellen (Log-Rank:  $p=0,0111$ , Abbildung 12). Patienten mit hoher ER $\alpha$  Expression, entsprechend Patienten mit >40% immunpositiver Tumorzellen, wiesen ein durchschnittliches Überleben von 626,7 Tagen (mittleres Überleben: 492 Tage) auf, während Patienten mit <40% immunpositiver GBM-Zellen ein durchschnittliches Überleben von 405,1 Tagen (Median: 371 Tage) zeigten. GBM Patienten mit hoher Expression lebten damit durchschnittlich 221,6 Tage länger als Patienten mit niedriger Expression.

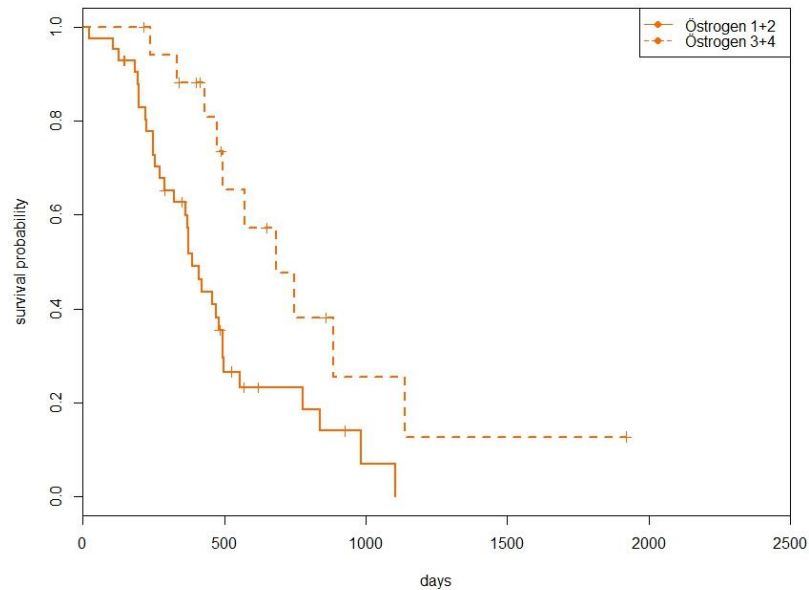


Abbildung 12: Kaplan Meier Analyse von ER $\alpha$  positiven GBM-Schnitten und dem Überleben der Patienten. Die Gruppen mit niedriger ER $\alpha$  Immunreaktivität (durchgezogene Linie, Gruppe 1 und 2), sowie die Gruppen mit hoher Immunreaktivität (gestrichelte Linie) wurden für die Anschaulichkeit zusammengefasst. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit hoher ER $\alpha$  Expression, Log rank:  $p=0,0111$ .

Der gleiche Effekt konnte hinsichtlich der Expression des Enzyms Aromatase und dem Überleben der GBM Patienten gesehen werden. Gewebeschnitte mit >40% immunpositiver glialer Tumorzellen korrelierten mit längerem Überleben (Log rank:  $p=0,0104$ ) im Vergleich zu niedriger Expression des Enzyms Aromatase mit <40% immunpositiver Tumorzellen (siehe Abbildung 13). GBM Patienten mit geringer Enzymexpression wiesen ein durchschnittliches Überleben von 292,8 Tagen (mittleres Überleben: 236 Tage) auf. Patienten mit hoher Aromataseexpression lebten im Durchschnitt 507,3 Tagen (Median: 444). Damit ergab sich eine Differenz des durchschnittlichen Überlebens von 214,5 Tagen.

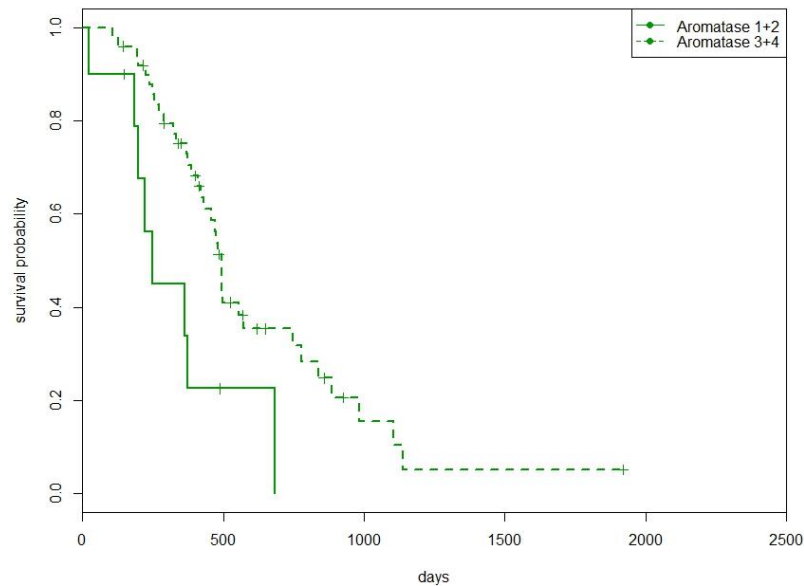


Abbildung 13: Kaplan Meier Analyse von Aromatase positiven GBM-Zellen und dem Überleben der Patienten. Für die Anschaulichkeit wurden die Gruppen 1 und 2 (durchgezogene Linie, niedrige Aromatase Immunreaktivität) und die Gruppen 3 und 4 (gestrichelte Linie, hohe Aromatase Immunreaktivität) zusammengefasst. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit hoher Aromataseexpression, Log rank:  $p=0,0104$ .

Vergleicht man die durchschnittliche Überlebenszeit zwischen Frauen und Männern, ergab sich ein Überlebensvorteil für Frauen von 44,7 Tagen (Überleben: Frauen 494,9 Tage, Männer 449,7 Tage). Diese Differenz verschwindet jedoch, wenn man das mittlere Überleben zwischen Frauen mit 411 und Männern mit 432 Tagen vergleicht. Daher konnte auch in der Kaplan Meier Analyse im Vergleich zwischen Männern und Frauen kein signifikanter Unterschied beobachtet werden (Abbildung 14).

Die Berechnung der Kaplan Meier Kurven erfolgten unter Adjustierung an Geschlecht und BMI (McShane, Altman et al. 2005).



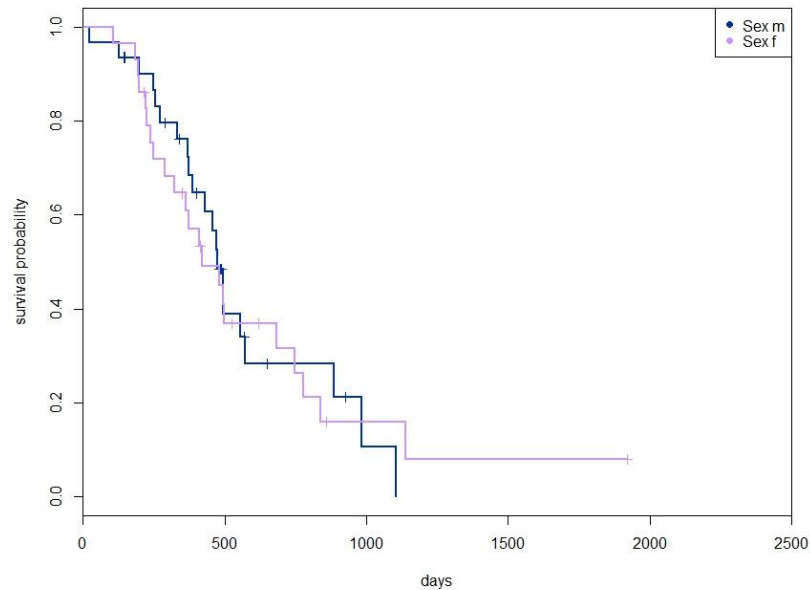


Abbildung 14: Kaplan Meier Analyse für das Überleben zwischen männlicher (m) und weiblicher (f) GBM Patienten. Es konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Überlebensvorteil beobachtet werden (Log rank:  $p=0,89$ ).

## 4.2 Analysen des ER $\alpha$ und Aromatase in humanen GBM-Zelllinien und Astrozyten

### 4.2.1 Hormonexpression nach Induktion von Zellstress

#### 4.2.1.1 Serummangel

Unter Veränderung der Wachstumsbedingungen und Induktion von Zellstress durch Wegnahme von Serum und damit auch Wachstums- und Steroidhormonen konnte gezeigt werden, dass die Zelllinie LN229 (Zelltod von >30% der Zellen nach 16 Tagen) resistenter gegenüber der veränderten Bedingungen war als die Zelllinie LN18 (Zelltod von >30% der Zellen nach 10 Tagen). Die Astrozyten wiesen nach 12 Tagen mehr als 30% abgelöste Zellen auf. Für den Western Blot wurde das Protein Vinculin (124kDa) als Ladungskontrolle verwendet.

Die Hormonexpression der Zelllinie LN229 (siehe Abbildung 15) veränderte sich unter Induktion von Zellstress. Die Bandenstärke des ER $\alpha$  mit 66kDa nahm bei gleichmäßiger Proteinbeladung bis zum 8. Tag zu. Die Expression der Aromatase mit 57kDa war in der Kontrolle kaum sichtbar und zeigte ebenfalls eine Zunahme bis zum 8. Tag.

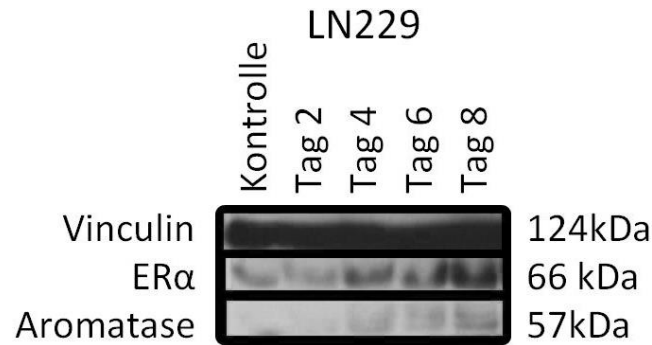


Abbildung 15: Western Blot Analyse nach Induktion von Zellstress durch verminderte Zufuhr von Serum für die Zelllinie LN229. Die Beladungskontrolle Vinculin (124kDa) weist eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Versuchstage auf. Die Bande für die Expression des ER $\alpha$  (36-66kDa) nimmt von Tag 4 bis Tag 8 deutlich zu. Für das Enzym Aromatase zeigt sich eine Zunahme der Bandendicke bis zum Tag 8.

Die Zelllinie LN18 (siehe Abbildung 16) zeigte bei gleicher Proteinbleadung eine Zunahme der Bandenstärke für den ER $\alpha$  am 2. Tag im Vergleich zur Kontrolle. Danach konnte eine Abnahme der Bandenstärke beobachtet werden. Die Expression der Aromatase nahm bereits ab Tag 2 kontinuierlich ab.

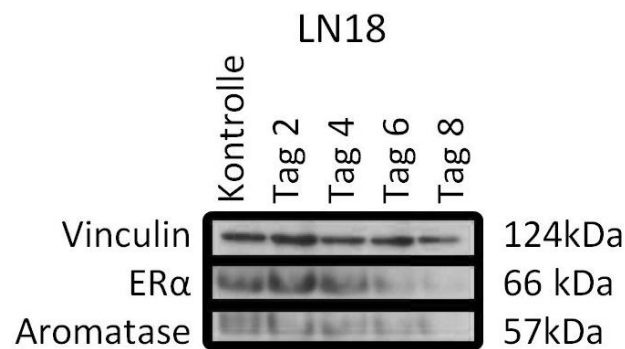


Abbildung 16: Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch die verminderte Zufuhr von Serum für die Zelllinie LN18. Die Bandenstärke der Reaktivität gegenüber dem ER $\alpha$  nahm nach einer kleinen Zunahme am Tag 2 bis zu Tag 8 kontinuierlich ab. Die Signalstärke der Expression des Enzyms Aromatase nahm, im Vergleich zur Kontrolle, von Tag 2-8 ab.

Die Astrozyten wiesen ebenfalls eine Veränderung in ihrer Hormonrezeptorexpression durch die Induktion von Zellstress auf (siehe Abbildung 17). Bei gleichmäßiger Proteinladung (siehe Vinculin) zeigte sich eine diskrete Zunahme des Bandensignals für ER $\alpha$  bis zum 6. Tag. Der 8. Tag wies eine deutlich schwächere Bandenintensität auf, welche sogar in geringer Intensität als die Kontrolle zur Darstellung kam. Die Expression des Enzyms Aromatase erfuhr eine Zunahme der Bandenstärke bis zum Tag 6 und war am Tag 8 kaum nachweisbar.

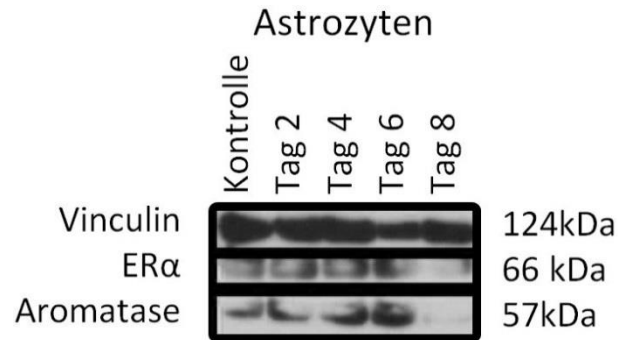


Abbildung 17: Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch die verminderte Zufuhr von Serum für Astrozyten. Man konnte eine Zunahme für die Expression des ER $\alpha$  beobachten bis Tag 6 beobachtet gefolgt von einer verminderten Signalstärke am Tag 8.. Die Bandenstärke für die Expression der Aromatase zeigte eine Zunahme bis zum Tag 6, mit minimaler Expression am Tag 8.

#### 4.2.1.2 Hypoxie

Die Induktion von Zellstress durch das Erzeugen einer Hypoxie zeigte, dass die Zelllinie LN229 deutlich resistenter gegenüber Sauerstoffmangel war als die Zelllinie LN18 und die Astrozyten.

Bei der Zelllinie LN229 (siehe Abbildung 18) nahm die Bandenintensität für die Expression des ER $\alpha$  bei gleichmäßiger Proteinbeladung (siehe Vinculin) über die ersten 48 Stunden diskret zu und war von einer Abnahme gefolgt. Eine Zunahme der Bandenstärke für die Expression der Aromatase (57kDa) konnte bis zu 72 Stunden nach Stoppen der O<sub>2</sub>-Zufuhr beobachtet werden. Nach 96h war die Expression der Aromatase kaum mehr nachweisbar.

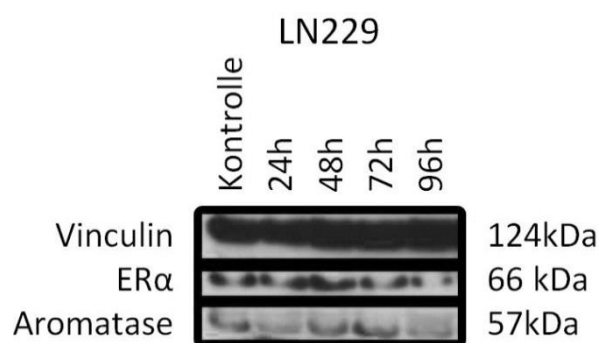


Abbildung 18: Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch Hypoxie für die Zelllinie LN229. Es zeigte sich bei gleicher Proteinbeladung, siehe gleichmäßige Bandenstärken für Vinculin. Die Bandenintensität für den ER $\alpha$  nahm bis zu dem Zeitpunkt 48h diskret zu und erfuhr nach 72h eine Abnahme der Signalintensität. Eine Zunahme der Bandenstärke konnte für die Aromatase bis zu 72h nach verschließen der Flasche beobachtet werden, gefolgt von einer Abnahme nach 96h.

Die Zelllinie LN18 (siehe Abbildung 19) wies in der Western Blot Analyse bei gleichmäßiger Proteinbeladung eine Zunahme der Bandenintensität des ER $\alpha$  nach 24h auf, gefolgt von

einer kontinuierlichen Abnahme. Die Expression des Enzyms Aromatase nahm bis 48 Stunden nach dem luftdichten Verschluss der Gewebekulturflasche zu. Nach 72 und 96 Stunden reduzierte sich die Expression so stark, dass sie kaum noch nachweisbar war.

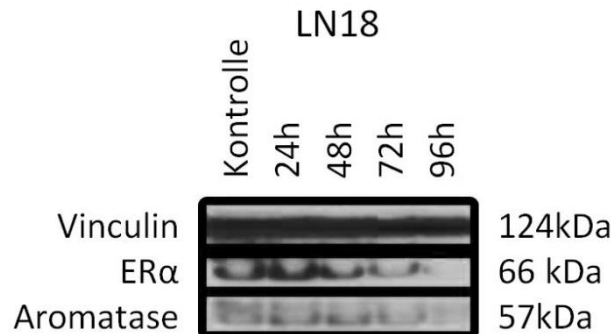


Abbildung 19: Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch Hypoxie für die Zelllinie LN18. Die Signalstärke für den ERα bei gleichmäßiger Signalstärke der Ladungskontrolle (Vinculin) zeigte eine Zunahme nach 24h, gefolgt von einer deutlichen Abnahme der Bandenstärke. Die Aromatase Expression wies eine Zunahme bis nach 48h auf und war von einer Abnahme der Signalstärke gefolgt.

Die Auswertung der Reaktion von Astrozyten nach O<sub>2</sub>-Mangel konnte aufgrund niedrigster Proteinmengen nicht aussagekräftig durchgeführt werden.

#### 4.2.2 Kombinierte Östrogen- und Temozolomidtherapie der Glioblastomzelllinien

Vor Beginn der Therapie wurde das Vorhandensein des ERα in den GBM-Zelllinien kontrolliert. Dies diente der Kontrolle, dass die GBM Zellen die Signalwege und neuroprotektiven Funktionen des Östrogens über den ERα ausüben können, wie dies für native Astrozyten beschrieben ist. Native primäre Astrozyten wurden daher als Positivkontrolle verwendet (3.2.4.3). Für beide Tumorzelllinien konnte eine deutliche Bandenintensität für den ERα mit 66 kDa unter normalen Kulturbedingungen nachgewiesen werden (Abbildung 20).

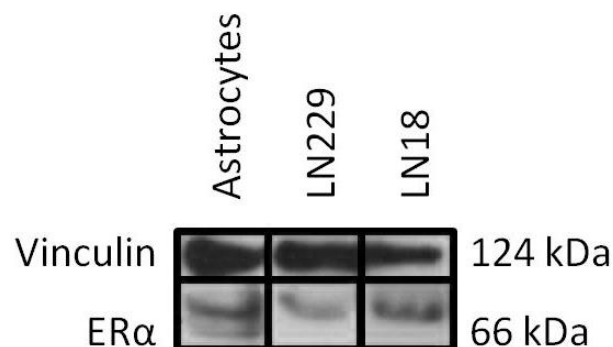


Abbildung 20: Western Blot Analyse für die Zelllinien LN18 und LN229 hinsichtlich der Expression des ERα. Bei gleichmäßiger Proteinbeladung, siehe Vinculin mit 124 kDa, zeigte sich eine deutliche Bande mit 66kDa, entsprechend ERα, für beide Zelllinien.

Die Bestimmung der Zellviabilität nach Therapie mit Östrogen (siehe 3.2.3.3) und Temozolomid wurde mittels MTT-Test durchgeführt und die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) für die Östrogentherapie als auch für die Kombination Östrogen und TMZ berechnet. Als mittlere inhibitorische Konzentration wird die Konzentration eines Stoffes bezeichnet, bei der die Zellviabilität eine 50%ige Reduktion bzw. Hemmung aufweist. Hohe Östrogenkonzentrationen wiesen dabei im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Tumorzellviabilität auf. Die mittlere inhibitorische Konzentration ( $IC_{50}$ ) betrug für die Zelllinie LN229 43,11  $\mu\text{M}$  17 $\beta$ -Estradiol (E2) und für die Zelllinie LN18 20,96  $\mu\text{M}$  17 $\beta$ -Estradiol (Abbildung 21). Die  $IC_{50}$ -Werte für die Lösungsmittelkontrolle lagen für die Zelllinie LN229 bei 188,01 $\mu\text{M}$  E2 und für die Zelllinie LN18 bei -191,14 $\mu\text{M}$  E2. Da der Wert kleiner 0 war, zeigte sich keine Inhibition sondern ein Wachstum während der Therapie. In Tabelle 14 sind die  $IC_{50}$ -Werte nach Östrogentherapie zusammengefasst. Eine Übersicht aller  $IC_{50}$ -Werte kann dem Anhang auf Seite 65 entnommen werden.

Tabelle 14:  $IC_{50}$ -Werte nach der Therapie mit Östrogen für die Zelllinie LN229 und LN18.

Zelllinie	$IC_{50}$ (in $\mu\text{M}$ E2)
LN229	43,11
LN229 Lösungsmittelkontrolle	188,02
LN18	20,96
LN18 Lösungsmittelkontrolle	-191,14

### LN229 + LN18: $IC_{50}$ nach E2 Therapie

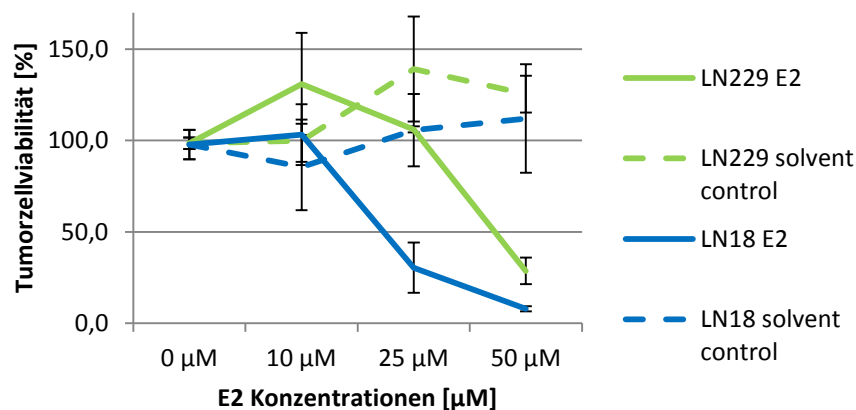


Abbildung 21:  $IC_{50}$ -Werte nach der Therapie von Östrogen (0 $\mu\text{M}$ , 10 $\mu\text{M}$ , 25 $\mu\text{M}$  und 50 $\mu\text{M}$ ) für die Zelllinie LN229 (grün) und LN18 (blau). Der  $IC_{50}$  Wert lag für die Zelllinie LN229 bei 43,11 $\mu\text{M}$  und für die Zelllinie LN18 bei 20,96 $\mu\text{M}$ .

Nach der Therapie der GBM Zelllinien mit Östrogen und TMZ konnte eine signifikant ( $p < 0,05$ ) niedrigere Zellviabilität im Vergleich zur alleinigen Therapie mit TMZ und damit am ehesten erhöhte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum beobachtet werden. Dies zeigte sich vor allem für die Konzentrationen  $25\mu\text{M}$  und  $50\mu\text{M}$   $17\beta$ -Estradiol. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden in den Diagrammen der Kombinationstherapie die Vortherapie mit  $10\mu\text{M}$  E2, sowie deren Lösungsmittelkontrolle weggelassen, da der Unterschied zur Kontrolle deutlich geringer ausfiel als für die beiden anderen Konzentrationen.

Die  $\text{IC}_{50}$ -Berechnung bei der Zelllinie LN229 nach kombinierter Therapie ergab für die Kontrolle einen Ausgangswert von  $237,08\mu\text{M}$  Temozolomid. Durch die Vortherapie mit  $10\mu\text{M}$  Östrogen konnte der  $\text{IC}_{50}$ -Wert auf  $149,21\mu\text{M}$  Temozolomid gesenkt werden. Bei  $25\mu\text{M}$  E2-Vortherapie lag der  $\text{IC}_{50}$ -Wert für TMZ bei  $73,64\mu\text{M}$  und bei  $50\mu\text{M}$  E2-Vortherapie konnte der  $\text{IC}_{50}$  auf  $21,06\mu\text{M}$  TMZ reduziert werden (siehe Abbildung 22).

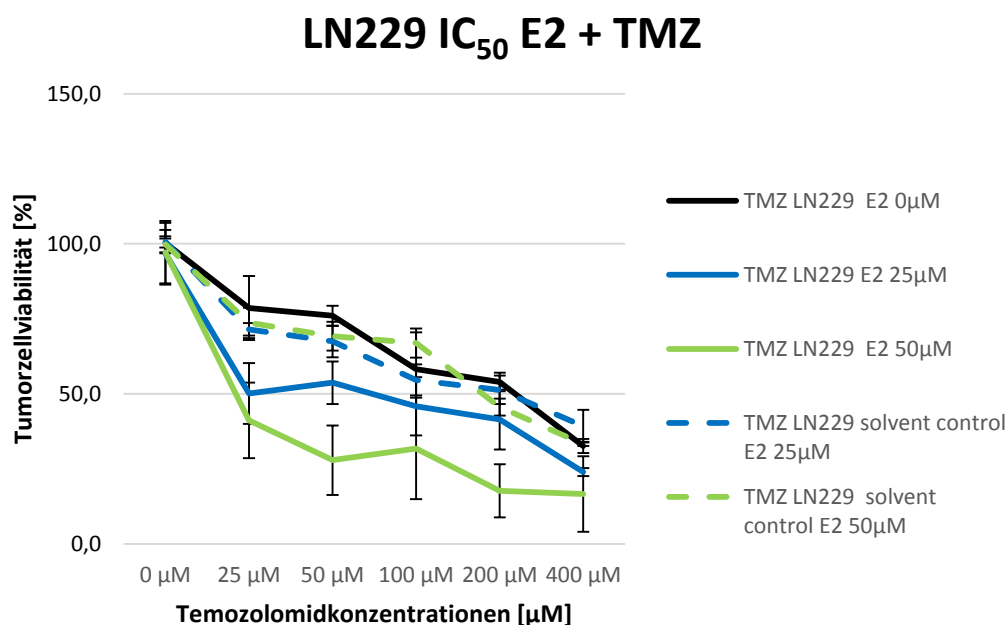


Abbildung 22:  $\text{IC}_{50}$ -Werte nach der Therapie von Östrogen und Temozolomid (TMZ) für die Zelllinie LN229. Die Kontrolle ist schwarz dargestellt.  $25\mu\text{M}$  Vortherapie entspricht der blauen Linie, die dazugehörige Lösungsmittelkontrolle besitzt dieselbe Farbe nur gestrichelt. Die Vortherapie mit  $50\mu\text{M}$  (durchgezogene Linie) und die Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie) sind grün dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle ( $\text{IC}_{50}=237,08\mu\text{M}$ ) zeigten die mit Östrogen therapierten Zellen  $10\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}=149,21\mu\text{M}$ ),  $25\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}=73,64\mu\text{M}$ ) und  $50\mu\text{M}$  ( $\text{IC}_{50}=21,06$ ) eine deutliche Reduktion des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes.

Für die Zelllinie LN18 konnte ebenso eine signifikante Reduktion des  $\text{IC}_{50}$ -Wertes bei Vortherapie mit  $25\mu\text{M}$  und  $50\mu\text{M}$  Östrogen im Vergleich zur Kontrolle erreicht werden (siehe Abbildung 23). Der  $\text{IC}_{50}$ -Wert lag dabei für die Kontrolle bei  $763,12\mu\text{M}$  Temozolomid. Bei der

Vortherapie mit 10 $\mu$ M E2 erreichte der IC<sub>50</sub> einen Wert von 4575,83 $\mu$ M Temozolomid. Durch die vorangegangene Behandlung von 25 $\mu$ M und 50 $\mu$ M Östrogen konnte der IC<sub>50</sub>-Wert um mehr als die Hälfte gesenkt werden. Bei 25 $\mu$ M E2-Vortherapie lag der IC<sub>50</sub>-Wert bei 364,85 $\mu$ M und bei 50 $\mu$ M E2 bei 276,01 $\mu$ M Temozolomid.

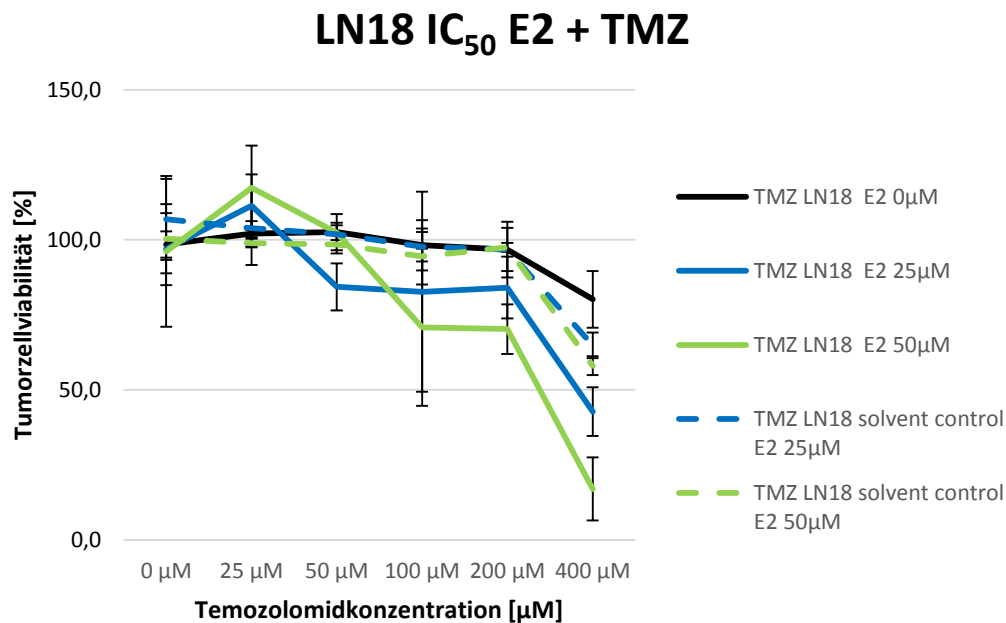


Abbildung 23: IC<sub>50</sub>-Werte nach der Therapie von Östrogen und Temozolomid (TMZ) für die Zelllinie LN18. Die Kontrolle (TMZ LN18 E0 T3) zeigte einen IC<sub>50</sub> von 763,12 $\mu$ M TMZ (schwarze Linie). Die blaue Linie entspricht der Therapie mit 25 $\mu$ M E2 (durchgezogene Linie) und deren Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie). Die Therapie mit 50 $\mu$ M E2 (durchgezogene Linie) als auch die dazugehörige Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie) sind in grün dargestellt. Dabei zeigte sich eine IC<sub>50</sub> für 25 $\mu$ M E2 Vortherapie von 364,85 $\mu$ M TMZ. Bei einer Vortherapie von 50 $\mu$ M E2 wurde ein IC<sub>50</sub> von 276,01 $\mu$ M TMZ beobachtet. Die Lösungsmittelkontrollen (gestrichelte Linien) zeigen keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle.

Eine Übersicht über die einzelnen IC<sub>50</sub>-Werte der Kombinationstherapie gibt Tabelle 15. Die Zusammenfassung aller IC<sub>50</sub>-Werte für die Kombinationstherapie der Zelllinien LN18 und LN229 kann dem Anhang auf Seite 65 entnommen werden.

Tabelle 15: Übersicht der einzelnen IC<sub>50</sub>-Werte nach Kombinationstherapie E2 und TMZ.

IC <sub>50</sub> in $\mu$ M TMZ	LN229	LN18
Kontrolle	237,08	763,12
10 $\mu$ M E2-Vortherapie	149,21	4575,83
25 $\mu$ M E2-Vortherapie	73,64	364,85
50 $\mu$ M E2-Vortherapie	21,06	276,01

## 5 Diskussion

Das Glioblastoma multiforme (WHO Grad IV) ist eine verheerende diffus infiltrierende gliale Neoplasie, die bis heute eine sehr schlechte Prognose aufweist. Trotz maximaler Therapie geht die Erkrankung mit einem mittleren Überleben von 15 Monaten einher (Stupp, Taillibert et al. 2015). Interessanterweise fällt in der Inzidenz auf, dass Männer deutlich häufiger betroffen sind als Frauen (Ostrom, Gittleman et al. 2015), weswegen an eine hormonelle Beeinflussung gedacht werden muss. In dieser Arbeit konnte erfolgreich gezeigt werden, dass eine hohe Expression von ER $\alpha$  und Aromatase einen geschlechterunabhängigen Überlebensvorteil in GBM Patienten aufwies. Dabei zeigte sich die Expression sowohl von ER $\alpha$  als auch von Aromatase interessanterweise unabhängig von Geschlecht, Body-Mass-Index und Alter, wobei tendentiell eine erhöhte Östrogenrezeptorabnahme im hohen Lebensalter zu beobachten war. Des Weiteren zeigten GBM-Zelllinien durch die Zugabe von Östrogen zur standardisierten Chemotherapie eine deutlich erniedrigte Zellviabilität und damit einhergehend erhöhte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum. Folglich scheinen Östrogene im Gehirn eine Schlüsselrolle im Mikromilieu der Tumore einzunehmen v.a. hinsichtlich Tumorentstehung und –wachstum als auch Ansprechen auf adjuvante Therapien, weswegen Östrogenrezeptoren künftig als geschlechterunabhängiger prognostische Marker v.a. hinsichtlich des Ansprechens auf adjuvante Therapien genutzt werden könnte und eine Beeinflussung durch die externe Zufuhr von Östrogen noch weiter evaluiert werden sollte.

Da das Enzym Östrogen den letzten Schritt der Östrogenbiosynthese darstellt und der Östrogenrezeptor als Bindungsstelle des Östrogens dient, konnten dadurch nützliche Rückschlüsse auf die Höhe des Hormons Östrogen und deren Aktivität am Rezeptor gezogen werden. Aufgrund der beschriebenen neuroprotektiven Funktionen des ER $\alpha$  astrozytärer Zellen (Dubal, Zhu et al. 2001) und der schlechteren Prognose für Patienten mit niedrigen ER $\alpha$  (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014) wurden die GBM-Schnitte in dieser Studie hinsichtlich dieser Östrogenrezeptorisoform untersucht.

Die Immunhistochemie ist eine gut etablierte Methode zur histopathologischen Evaluation des Enzyms Aromatase und des ER $\alpha$  in humanen GBM-Zellen. Sie ermöglicht die Beurteilung der Expression und Verteilung im humanen Gewebe. Die Therapie der etablierten GBM Zelllinien LN18 und LN229 mit 17 $\beta$ -Estradiol und Temozolomid stellt eine repräsentative in



in vitro Methode dar, um direkte Effekte des Östrogens alleine und in Kombination mit TMZ aufzuzeigen. Der Lebendzellanteil, sog. Zellviabilität, wurden in dieser Arbeit mit der gut etablierten Methode des MTT-Assays evaluiert. Dieser aussagekräftige Assay war sehr gut geeignet für den Nachweis der inhibierenden Wirkung des Östrogens auf die Tumorzellen und das Aufzeigen einer erhöhten Sensitivität gegenüber Temozolomid nach Östrogenvortherapie.

### **5.1 Analyse der Expression des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanem GBM-Gewebe**

Während bisherige Studien (Yague, Lavaque et al. 2004, Barone, Gorski et al. 2009) ihren Fokus entweder auf den ER $\alpha$  oder das Enzym Aromatase gelegt hatten, wurden die GBM-Schnitte in dieser Arbeit hinsichtlich beider Faktoren: ER $\alpha$  und Aromatase untersucht, um einerseits Hinweise auf Östrogenbiosynthese zu bekommen und andererseits die Auswirkung des Östrogens über die Expression der Rezeptoren genauer zu betrachten. Nachdem sowohl für selektive Östrogenrezeptormodulatoren (Balca-Silva, Matias et al. 2015, Baritchii, Jurj et al. 2016) als auch für direkte Östrogenrezeptoragonisten (Sareddy, Nair et al. 2012, Sareddy, Li et al. 2016) eine Wachstumshemmung glialer Tumore durch vermehrten Zelltod gezeigt wurde, gibt dies weitere Hinweise darauf, dass Signalwege über die klassischen nukleären Östrogenrezeptoren einen bedeutenden Einfluss auf das Tumorstadium ausüben. Der Grad der Expression des Enzyms Aromatase gibt zudem Hinweise auf die mögliche Östrogenkonzentration, da es den letzten Schritt der Östrogenbiosynthese ausführt. Die Synthese und die Effekte des Östrogens kommen dabei nicht nur von glialen Tumorzellen sondern auch durch das Mikroenvironment zustande. Dieses besteht aus reaktiven Astrozyten, Mikroglia und Neuronen. Alle Zellen im Tumorrandbereich stellen damit eine weitere Quelle der Hormonsynthese dar und können ebenfalls ER $\alpha$  und Aromatase exprimieren (Acaz-Fonseca, Avila-Rodriguez et al. 2016). Aufgrund dessen wurde versucht, die vitale Tumoregion der GBM-Schnitte mit vielen malignen Zellen zu analysieren, dennoch kann nicht komplett ausgeschlossen werden, dass auch reaktive Astrozyten sich immunpositiv darstellten und damit in die Bewertung miteingeschlossen wurden. Es ist dabei immunhistochemisch nicht möglich, GBM-Zellen von nativen astrozytären Zellen zu unterscheiden. Letztlich ist aber hier vor allem das

Tumormilieu, das in diffus infiltrierenden Gliomen immer von der Kombination aus Tumorzellen und (Mikro-) Glia bestimmt wird, für die Fragestellung dieser Arbeit interessant. Analysen aus humanen Gewebebiopsien unterschiedlicher glialer Tumore zeigten, dass GBM-Gewebebiopsien deutlich höhere Konzentrationen an Östrogen aufwiesen als niedriggradige astrozytäre Tumore und zudem eine direkte Korrelation zwischen der Östrogenkonzentration und der Expression der Aromatase aufzeigten (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014). Zusätzlich zeigte die Studie eine höhere mRNA Expression von ER $\alpha$  im Vergleich zum ER $\beta$  in GBM-Biopsien. Diese Studie beschrieb zudem höchste Expressionslevel für das Enzym Aromatase, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Diese hohen Werte lassen sich beispielsweise dadurch erklären, dass der Gewebefaktor HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor 1 alpha) in hypoxischem Gewebe, wie auch in schnell wachsendem Tumorgewebe, freigesetzt wird und dadurch die Expression der Aromatase initiiert (Samarajeewa, Docanto et al. 2013).

Die Kohorte dieser Arbeit bestand aus 60 Gewebeproben, welche von Patienten im Rahmen der Operation für die Tumorklassifikation entnommen und als GBM IDH-Wildtyp klassifiziert wurden. Die Kohorte bestand dabei aus äquivalenten Mengen an Frauen (29) und Männern (31). Das mediane Alter beider Gruppen war ebenfalls sehr ähnlich und betrug 60 Jahre bei Frauen und 58 Jahre bei Männern. Somit konnte von einer guten Vergleichbarkeit der beiden Gruppen ausgegangen werden. Mit einem medianen Alter von 60 Jahren befand sich bereits ein Großteil der Patientinnen in der Menopause. Die Expression des ER $\alpha$  und der Aromatase zeigte sich in ihrer Verteilung anhand der Färbungsgruppen sehr ähnlich zwischen Männern und Frauen, wobei anhand der Immunhistochemie keine Angaben zur Aktivität des Enzyms gemacht werden kann. Von epidemiologischen Studien ist bekannt, dass Männern 1,6-mal häufiger von einem GBM betroffen sind als Frauen (Ostrom, Gittleman et al. 2015) und dieser Effekt vor allem dann sichtbar wird, wenn man Frauen vor der Menopause mit Männern vergleicht. Der Geschlechtervorteil erlischt jedoch bei postmenopausalen Frauen (Kabat, Etgen et al. 2010). Da diese Kohorte vor allem aus postmenopausalen Frauen und Männern bestand, könnte dies der Grund dafür sein, dass sich die Verteilung der Expression des ER $\alpha$  und der Aromatase zwischen den Geschlechtern sehr gleichsinnig präsentierte. Beide Geschlechter zeigten eine Abnahme des ER $\alpha$  bei den über 70-jährigen Patienten, wohingegen die Aromatase gleichmäßig hoch blieb, um damit die möglicherweise fehlende hormonelle Aktivität im erhöhten Lebensalter auszugleichen. Die Auswertung hinsichtlich

des BMI zeigte, dass Frauen durchschnittlich einen normalen und Männer in dieser Kohorte einen übergewichtigen Ernährungszustand aufwiesen. Bei Frauen zeigte sich zudem ein Trend hinsichtlich der Korrelation von steigendem BMI und Zunahme der Expression des ER $\alpha$ . Lediglich Patientinnen in der höchsten Expressionsgruppe von ER $\alpha$  zeigten eine Abweichung zu dem in den anderen Gruppen gesehenen Trend. Dabei ist zu erwähnen, dass diese Gruppe aus übergewichtigen und untergewichtigen Frauen bestand. Zudem wäre es interessant, ob einige dieser Frauen eine Hormonersatztherapie eingenommen haben und damit veränderte Östrogenkonzentrationen aufwiesen. Dies konnte jedoch nicht geklärt werden, da für diese Arbeit keine Informationen zur Medikamenteneinnahme der Patienten bekannt waren.

In epidemiologischen Studien konnten geschlechterspezifische Überlebensvorteile aufgezeigt werden, mit einem größeren Anteil an Frauen als Langzeit-Überlebende (Tseng and Tseng 2005, Claus and Black 2006). Auch Tiermodelle wiesen ein längeres Überleben und geringeres Tumorstadium für weibliche Versuchstiere nach (Barone, Gorski et al. 2009). Der beschriebene Überlebensvorteil konnte in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Dies kann daran liegen, dass die Kohorte viele postmenopausale Frauen enthielt. Dabei zeigten sowohl Männer als auch Frauen mit hoher Expression von ER $\alpha$  ein längeres Überleben. Wie in der Literatur bekannt, ist für Gliome mit niedrigem ER $\alpha$  eine schlechtere Prognose beschrieben (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014). In der untersuchten Kohorte lebten Patienten deren GBM eine hohe Expression von ER $\alpha$  aufwies durchschnittlich 221,6 Tage länger, als jene mit niedriger Expression des Rezeptors. Dieses Ergebnis korreliert daher mit der oben beschriebenen Prognoseeinschätzung. In der Literatur wurde bereits gezeigt, dass die mRNA von Aromatase in glialen Tumorzellen invers mit dem Überleben korreliert (Duenas Jimenez, Candanedo Arellano et al. 2014). In dieser Arbeit konnte hingegen gezeigt werden, dass der immunhistochemische Nachweis einer hohen Expression von Aromatase positiv mit dem Überleben assoziiert ist. Aufgrund des geringen Patientenkollektives in der beschriebenen Studie könnte die inverse Korrelation zwischen Aromatase und dem Überleben auf eine geringe Validität zurückzuführen sein.

## **5.2 Analysen des ER $\alpha$ und der Aromatase in humanen GBM-Zelllinien**

Östrogen interagiert mit den beiden nuklearen Östrogenrezeptoren: ER $\alpha$  und ER $\beta$ . Die genauen Signalisierungsprozesse und Einflüsse auf die Entstehung und das Wachstum von

glialen Tumoren sind dabei noch nicht vollständig geklärt. Während der ER $\beta$  als Tumorsuppressor beschrieben ist und die Therapie mit ER $\beta$ -Agonisten in Studien zu einer signifikanten Reduktion des Tumorwachstums führte (Sareddy, Li et al. 2016), ist der ER $\alpha$  als Tumorpromoter beschrieben und zeigte in Studien zu ischämischen Schlaganfall deutlich neuroprotektivere Effekte als der ER $\beta$  (Dubal, Zhu et al. 2001). Im Vergleich zwischen ER $\alpha$  und ER $\beta$  Knockout-Mäusen zeigte sich unter der Therapie von Östrogen, dass ER $\alpha$ -Knockout-Mäuse einen deutlich größeren Gewebeschaden aufwiesen, während bei ER $\beta$ -Knockout-Mäusen keine Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle beobachtet wurden (Dubal, Zhu et al. 2001).

Viele neuroprotektive Funktionen gehen unter pathologischen Bedingungen von nativen Astrozyten und deren Östrogenproduktion, sowie von wichtigen Einflüssen auf die neuronale Homöostase aus. Es ist jedoch unklar ob diese Funktionen bei Entartung erhalten bleiben. Zur Evaluation der Hormonexpression zwischen nativen und entarteten astrozytären Zellen unter pathologischen Bedingungen erfolgten die Versuche zur Induktion von Zellstress. Dabei konnten ähnliche Proteinlevel von ER $\alpha$  und Aromatase zwischen GBM-Zellen und Astrozyten beobachtet werden. Durch die Veränderung der Kulturbedingungen zeigte sich nicht nur in den Astrozyten, sondern auch in den Tumorzellen ein Anstieg der Bandenintensität von ER $\alpha$  und Aromatase. Dies lässt damit schlussfolgern, dass die glialen Tumorzellen ähnlich der reaktiven Astrozyten agieren können und somit auch der neuroprotektive Effekt durch den ER $\alpha$  getriggert werden kann. Der ER $\alpha$  stieg dabei in der weiblichen Zelllinie LN229 deutlicher an und die Zellen waren zudem resistenter gegenüber den jeweiligen Bedingungen als ihr männliches Pendant LN18. Aufgrund dessen, dass nur eine männliche und eine weibliche Zelllinie untersucht wurden lässt sich damit natürlich lediglich ein Trend aufzeigen.

Nicht nur bei neurologischen Erkrankungen, sondern vor allem bei gynäkologischen Tumoren spielen Sexualhormone eine große Rolle. In diesem Bereich konnte sich die Hormontherapie mittels Östrogenrezeptormodulatoren bereits gut etablieren. In initialen Studien wurde die Therapie von ER positivem Brustdrüsengewebe mit supraphysiologischen Dosen (5-100 $\mu$ M) Östrogen untersucht, welche zu einer Inhibition des Tumorwachstums führte. Zur genaueren Evaluation der Wirkung wurden die Zellen in ihren Zellphasen beobachtet und es wurde gezeigt, dass der Prozentsatz an Zellen in der S-, G2- und M-Phase Anstieg, bei gleichzeitiger Reduktion des Prozentsatzes von Zellen in der G0 und G1-

Phase (Reddel and Sutherland 1987). Die Studie beschrieb zudem, dass  $17\beta$ -Estradiol die höchste Bindungsaffinität zum ER aufweist, verglichen mit anderen C19-Steroidhormonen, wie  $17\alpha$ -Estradiol, Estriol, Estrone und Testosteron. Unter dieser Annahme wurden die GBM Zellen in dieser Arbeit ebenfalls mit supraphysiologischen Dosen an  $17\beta$ -Estradiol ( $10\mu\text{M}$ ,  $25\mu\text{M}$  und  $50\mu\text{M}$ ) behandelt als Vortherapie zur üblichen Chemotherapie. Das Chemotherapeutikum wurde dabei über 5 Tage gegeben, entsprechend einem klinischen Therapiezyklus. Die TMZ Dosen basierten auf den bekannten  $\text{IC}_{50}$ -Dosierungen für die Zelllinien LN18 und LN229 (Happold, Roth et al. 2012). Die mit Östrogen vortherapierten Zellen wiesen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem Chemotherapeutikum auf, im Vergleich zur Kontrolle. Geht man davon aus, dass sich durch die Östrogenvortherapie die Zellen vor allem in der S-, G2- und M-Phase befanden und nicht im Ruhezustand G0, so konnte das alkylierende Chemotherapeutikum die Zellreplikation leichter hemmen und die Apoptose einleiten. Trotz supraphysiologischer Dosen Östrogen zeigte die Therapie mit  $10\mu\text{M}$  E2 kaum eine Abweichung von den Kontrollwerten, was einer beschriebenen dosisabhängigen Wirkung geschuldet sein kann (Reddel and Sutherland 1987, Barone, Gorski et al. 2009).

Diese Arbeit ist dabei die erste experimentelle Studie mit einer kombinierten  $17\beta$ -Estradiol und TMZ Therapie der humanen Glioblastomzelllinien LN18 und LN229. Es gibt diverse Studien, die beispielsweise eine Kombination zwischen 2ME2 (E2 Metabolit) und Bestrahlung (Eyvazzadeh, Neshasteh-Riz et al. 2015), ER $\beta$ -Agonisten in Kombination mit TMZ (Liu, Wang et al. 2015, Sareddy, Li et al. 2016) oder selektive Östrogenrezeptormodulatoren mit TMZ (Baritchii, Jurj et al. 2016) durchführten und jeweils eine Sensitivierung gegenüber der Bestrahlung oder Chemotherapie mit einer Reduktion der Zellviabilität aufzeigten. Somit kann nicht nur  $17\beta$ -Estradiol, sondern auch der Östrogenmetabolit 2ME2, durch die Veränderung der Zellzyklusphasen zu einer Sensitivierung der Zellen gegenüber Bestrahlung und Chemotherapie führen. Die Therapie mit ER $\beta$ -Agonisten konnte zu einer Hemmung der Zellproliferation in GBM-Zellen führen und die Apoptose von Tumorzellen vermehrt initiieren (Liu, Wang et al. 2015, Sareddy, Li et al. 2016).

Neben den neuroprotektiven Effekten von Östrogen für das Gehirn und der Reduktion der Zellviabilität in Kombinationsstudien weist eine Therapie mit Sexualhormonen viele unerwünschte Wirkungen auf. Zu diesen Nebenwirkungen zählen vor allem erhöhtes kardiovaskuläres Risiko, Thrombosen, Lungenembolien, Hüftfrakturen durch Osteoporose,

Entstehung unterschiedlicher Tumore, wie Brustkrebs, endometriale Tumore, als auch Kolonkarzinome und Feminisierung von Männern (Rossouw, Anderson et al. 2002). All jene Nebenwirkungen, welche auch im Rahmen von postmenopausalen Hormonersatztherapien abgewogen werden müssen.

Weitere Studien sind notwendig um ein besseres Verständnis der molekularen Mechanismen der Östrogenrezeptor-Subtypen zu erlangen und spezielle, zielgerichtete Therapien zu designen, die weniger schwere Nebenwirkungen aufweisen.

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend zeigte sich in dieser Arbeit, dass eine hohe Expression des ER $\alpha$  und des Enzyms Aromatase mit einem geschlechterunabhängigen Überlebensvorteil in der humanen GBM Kohorte einherging. Zudem führte die kombinierte Therapie von Östrogen und Temozolomid zu einer Hemmung des Tumorwachstums und zu einer verbesserten Wirkung des Chemotherapeutikums.

Geschlechterspezifische Vorteile des GBM sind mittlerweile zahlreich beschrieben. Nicht nur die Inzidenz zeigt dabei einen Geschlechtervorteil (Ostrom, Gittleman et al. 2015), sondern weist auch das Wachstum und damit einhergehend das Überleben in Tierstudien einen weiblichen Geschlechtervorteil auf (Barone, Gorski et al. 2009). Dabei spielt zudem das Alter der Patientinnen eine entscheidende Rolle, mit einem verminderten Schutz in den postmenopausalen Jahren (Hatch, Linet et al. 2005, Anic, Madden et al. 2014). Aufgrund des erhöhten Alters der Patientinnen in dieser Arbeit, muss davon ausgegangen werden, dass die meisten Patientinnen bereits postmenopausal waren und dadurch kein Überlebensvorteil für die Frauen gezeigt werden konnte. Hierfür wäre es interessant in weiteren Studien die Verteilung der Expression des ER $\alpha$  und der Aromatase zwischen prä-, postmenopausalen Frauen und Männern zu analysieren.

Da anhand immunhistochemischer Färbungen kein Rückschluss auf die Aktivität des Enzyms Aromatase und die Auswirkungen des ER $\alpha$  auf die Gentranskription gezogen werden kann, bedarf es weiterer molekularer Untersuchungen, um einen genaueren Einblick in diese zellulären Vorgänge gewinnen zu können.

Die immunhistologische Unterscheidung zwischen reaktiven Astrozyten und GBM Zellen ist bis heute schwer möglich, da es kaum immunhistochemische Marker gibt mit denen eine eindeutige Unterscheidung möglich wäre. Dies wäre jedoch wichtig, da man damit eine bessere Differenzierung hinsichtlich des Einflusses von reaktiven Astrozyten im Tumorrandbereich durch die Ausbildung einer Glianarbe und der Synthese von Östrogen gewährleisten könnte. Letztlich hat das Mikroenvironment des Tumors einen großen Einfluss auf die Entstehung und das Wachstum glialer Tumore.

Die Ergebnisse dieser Arbeit hinsichtlich der Korrelation zwischen ER $\alpha$  und dem Überleben zeigen, dass die neuroprotektiven Eigenschaften des Östrogens vor allem über den ER $\alpha$  ausgeübt werden. Daher könnte dieser eine wichtige Rolle als Biomarker für die Evaluation

der Prognose genutzt werden. Weitere Versuche in der Zellkultur und in Tiermodellen sind notwendig um die genauen Funktionen der beiden Östrogenrezeptorisoformen genauer zu verstehen.

Die Therapie der GBM Zellen mit Östrogen und vor allem in Kombination mit dem Chemotherapeutikum zeigte eine deutlich reduzierte Zellviabilität. Eine Therapie mit Östrogen vor der konventionellen postoperativen Chemotherapie und Bestrahlung könnte sich für GBM Patienten ebenso von Vorteil erweisen. Weitere Tierversuche sind notwendig um die Wirkung des Östrogens in vivo zu evaluieren. Möglicherweise könnte eine lokal applizierte Menge an Östrogen im Rahmen der Operation zu einem Erfolg führen, da wie in dieser Arbeit die Therapie über 48h bereits zu einer deutlichen Reduktion der Tumorzellen führte. Weitere Untersuchungen hinsichtlich einer zielgerichteten Therapie sind notwendig und könnten damit das Therapieschema des GBM revolutionieren.



## 7 Zusammenfassung

Das Glioblastoma multiforme (GBM) ist ein hochmaligner hirneigener Tumor, welcher trotz aggressiver Standardtherapie (Stupp-Schema) ein mittleres Überleben von wenigen Monaten aufweist. Interessanterweise zeigt sich in der Tumorentwicklung, dass Männer etwa doppelt so häufig betroffen sind wie Frauen. Der Grund für diesen geschlechterspezifischen Unterschied ist bis heute unklar. Man geht davon aus, dass das GBM aus astrozytären Zellen de novo entsteht oder sich aus niedriggradigen Astrozytomen entwickelt. Astrozytäre Zellen sind dabei an unzähligen Prozessen im Gehirn beteiligt wie beispielsweise neuroprotektive Signalwege. Aufgrund der geschlechterspezifischen Unterschiede im Auftreten der Erkrankung, stellt sich die Frage, ob diese Effekte möglicherweise einer hormonellen Steuerung unterliegen. Deshalb sollte in dieser Studie die Rolle von Östrogenrezeptor  $\alpha$  und Aromatase in humanen Gliomzellen evaluiert und der Einfluss supraphysiologischer Dosen Östrogen auf humane GBM-Zellen in vitro in Kombination zur Standardchemotherapie untersucht werden.

60 Gewebeproben von GBM-Patienten (29 Frauen, 31 Männern) wurden dabei immunhistochemisch hinsichtlich des ER $\alpha$  und der Aromatase in Korrelation zum Überleben, Alter, Geschlecht und Body-Mass-Index untersucht. Für die Kombinationstherapie wurden die Zelllinien LN18 und LN229 mit 17 $\beta$ -Estradiol in verschiedenen Dosierungen vorbehandelt, gefolgt vom Chemotherapeutikum Temozolomid unterschiedlicher Konzentrationen. Dabei wurde jeweils die Zellviabilität mittels MTT-Assay untersucht.

Es zeigte sich dabei, dass die Höhe der Expression von ER $\alpha$  eine positive Korrelation mit dem Überleben der Patienten aufwies, unabhängig vom Geschlecht und Body-Mass-Index. Ein längeres Überleben konnte dabei ebenfalls bei hoher Expression des Enzyms Aromatase gezeigt werden. Die Therapie supraphysiologischer Dosen Östrogen führte dabei zu einer reduzierten Zellviabilität im Vergleich zur Kontrolle. Zudem konnte eine erhöhte Sensitivität gegenüber Temozolomid nach Östrogenvortherapie beobachtet werden.

Der ER $\alpha$  und die Aromatase scheinen eine wichtige Rolle als prognostischer Biomarker für die Entstehung und den Verlauf des GBM zu spielen. Die Kombination des Östrogens zur Standardchemotherapie könnte dabei zu einer Verbesserung der Prognose führen.

## 8 Summary

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most common and most malignant primary brain tumor in adults. Despite maximal therapy consisting of surgery, radiation and chemotherapy the prognosis is still poor with a median overall survival of few months. Men are affected 1.6 times more often than women. The reason for this gender-specific predominance still is unclear. GBM develops from astrocytic glia cells de novo or astrocytomas. Astrocytes are involved in many cerebral processes, like neuroprotective signalling pathways. On the basis of the fact that men are more often affected than women, the question arises whether these effects are subject of hormonal control. The purpose of this study was to examine the expression of estrogen receptor  $\alpha$  and aromatase in human GBM tissue samples in relation to patient survival and furthermore to investigate the effect of standard chemotherapy in combination with estradiol treatment on glioblastoma tumor cell lines in vitro.

60 tissue samples of GBM patients (29 female, 31 male) were analysed with immunohistochemistry for ER $\alpha$  and aromatase for survival analyses. The cell lines LN18 and LN229 were treated with 17 $\beta$ -estradiol in different dosing regimens and the cell viability was measured with MTT assay. After estradiol pre-treatment Temozolomide was added and tested again.

High expression of ER alpha in the GBM cohort was associated with significantly longer survival times of GBM patients regardless of gender and body-mass-index. A longer survival time was also seen for high amounts of aromatase in glial tumor cells, compared to cells with low enzyme expression. The treatment with high concentrations of estradiol resulted in lower tumor cell viability, compared to control. The cells significantly showed a stronger sensitivity against TMZ after estradiol pre-treatment.

ER $\alpha$  seems to play an important role as biomarker for prognosis in GBM tumor as well as the expression of enzyme Aromatase. The treatment of GBM with standard chemotherapy and estradiol may be beneficial to patient's survival.

## 9 Literaturverzeichnis

- Acaz-Fonseca, E., M. Avila-Rodriguez, L. M. Garcia-Segura and G. E. Barreto (2016).** "Regulation of astroglia by gonadal steroid hormones under physiological and pathological conditions." Prog Neurobiol **144**: 5-26.
- Alifieris, C. and D. T. Trafalis (2015).** "Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment." Pharmacol Ther **152**: 63-82.
- Alkayed, N. J., I. Harukuni, A. S. Kimes, E. D. London, R. J. Traystman and P. D. Hurn (1998).** "Gender-linked brain injury in experimental stroke." Stroke **29**(1): 159-165; discussion 166.
- Anic, G. M., M. H. Madden, L. B. Nabors, J. J. Olson, R. V. LaRocca, Z. J. Thompson, S. J. Pamnani, P. A. Forsyth, R. C. Thompson and K. M. Egan (2014).** "Reproductive factors and risk of primary brain tumors in women." J Neurooncol **118**(2): 297-304.
- Azcoitia, I., J. G. Yague and L. M. Garcia-Segura (2011).** "Estradiol synthesis within the human brain." Neuroscience **191**: 139-147.
- Balca-Silva, J., D. Matias, A. do Carmo, H. Girao, V. Moura-Neto, A. B. Sarmiento-Ribeiro and M. C. Lopes (2015).** "Tamoxifen in combination with temozolomide induce a synergistic inhibition of PKC-pan in GBM cell lines." Biochim Biophys Acta **1850**(4): 722-732.
- Baritchii, A., A. Jurj, O. Soritau, C. Tomuleasa, L. Raduly, O. Zanoaga, D. Cernea, C. Braicu, I. Neagoe and I. Stefan Florian (2016).** "Sensitizer drugs for the treatment of temozolomide-resistant glioblastoma." J buon **21**(1): 199-207.
- Barone, T. A., J. W. Gorski, S. J. Greenberg and R. J. Plunkett (2009).** "Estrogen increases survival in an orthotopic model of glioblastoma." J Neurooncol **95**(1): 37-48.
- Batistatou, A., P. A. Kyzas, A. Goussia, E. Arkoumani, S. Voulgaris, K. Polyzoidis, N. J. Agnantis and D. Stefanou (2006).** "Estrogen receptor beta (ERbeta) protein expression correlates with BAG-1 and prognosis in brain glial tumours." J Neurooncol **77**(1): 17-23.
- Batistatou, A., D. Stefanou, A. Goussia, E. Arkoumani, A. G. Papavassiliou and N. J. Agnantis (2004).** "Estrogen receptor beta (ERbeta) is expressed in brain astrocytic tumors and declines with dedifferentiation of the neoplasm." J Cancer Res Clin Oncol **130**(7): 405-410.
- Boon, W. C., J. D. Y. Chow and E. R. Simpson (2010).** "The multiple roles of estrogens and the enzyme aromatase." Prog Brain Res **181**: 209-232.
- Bradford, M. M. (1976).** "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- Bramlett, H. M. and W. D. Dietrich (2001).** "Neuropathological protection after traumatic brain injury in intact female rats versus males or ovariectomized females." J Neurotrauma **18**(9): 891-900.
- Brann, D. W., K. Dhandapani, C. Wakade, V. B. Mahesh and M. M. Khan (2007).** "Neurotrophic and Neuroprotective Actions of Estrogen: Basic Mechanisms and Clinical Implications." Steroids **72**(5): 381-405.
- Caruso, D., M. Pesaresi, F. Abbiati, D. Calabrese, S. Giatti, L. M. Garcia-Segura and R. C. Melcangi (2013).** "Comparison of plasma and cerebrospinal fluid levels of neuroactive steroids with their brain, spinal cord and peripheral nerve levels in male and female rats." Psychoneuroendocrinology **38**(10): 2278-2290.
- Caruso, D., M. Pesaresi, O. Maschi, S. Giatti, L. M. Garcia-Segura and R. C. Melcangi (2010).** "Effect of short-and long-term gonadectomy on neuroactive steroid levels in the central and peripheral nervous system of male and female rats." J Neuroendocrinol **22**(11): 1137-1147.

- Claus, E. B.** and P. M. Black (2006). "Survival rates and patterns of care for patients diagnosed with supratentorial low-grade gliomas: data from the SEER program, 1973-2001." Cancer **106**(6): 1358-1363.
- Crespo, I.,** A. L. Vital, M. Gonzalez-Tablas, M. d. C. Patino, A. Otero, M. C. Lopes, C. de Oliveira, P. Domingues, A. Orfao and M. D. Taberero (2015). "Molecular and Genomic Alterations in Glioblastoma Multiforme." Am J Pathol **185**(7): 1820-1833.
- Diserens, A. C., N. de Tribolet, A. Martin-Achard, A. C. Gaide, J. F. Schnegg and S. Carrel (1981). "Characterization of an established human malignant glioma cell line: LN-18." Acta Neuropathol **53**(1): 21-28.
- Dubal, D. B.,** S. W. Rau, P. J. Shughrue, H. Zhu, J. Yu, A. B. Cashion, S. Suzuki, L. M. Gerhold, M. B. Bottner, S. B. Dubal, I. Merchanthaler, M. S. Kindy and P. M. Wise (2006). "Differential modulation of estrogen receptors (ERs) in ischemic brain injury: a role for ERalpha in estradiol-mediated protection against delayed cell death." Endocrinology **147**(6): 3076-3084.
- Dubal, D. B.,** H. Zhu, J. Yu, S. W. Rau, P. J. Shughrue, I. Merchanthaler, M. S. Kindy and P. M. Wise (2001). "Estrogen receptor alpha, not beta, is a critical link in estradiol-mediated protection against brain injury." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(4): 1952-1957.
- Duenas Jimenez, J. M.,** A. Candanedo Arellano, A. Santerre, S. Orozco Suarez, H. Sandoval Sanchez, I. Feria Romero, R. Lopez-Elizalde, M. Alonso Venegas, B. Netel, B. de la Torre Valdovinos and S. H. Duenas Jimenez (2014). "Aromatase and estrogen receptor alpha mRNA expression as prognostic biomarkers in patients with astrocytomas." J Neurooncol **119**(2): 275-284.
- Eyvazzadeh, N.,** A. Neshasteh-Riz, S. R. Mahdavi and A. Mohsenifar (2015). "Genotoxic Damage to Glioblastoma Cells Treated with 6 MV X-Radiation in The Presence or Absence of Methoxy Estradiol, IUDR or Topotecan." Cell J **17**(2): 312-321.
- Häggsström, M.,** Stannered, Hoffmeier, Settlers and D. Riechfield (2014). "Diagram of the pathway of human steroidogenesis." WikiJournal of Medicine **1**(5).
- Happold, C.,** P. Roth, W. Wick, N. Schmidt, A.-M. Florea, M. Silginer, G. Reifenberger and M. Weller (2012). "Distinct molecular mechanisms of acquired resistance to temozolomide in glioblastoma cells." J Neurochem **122**(2): 444-455.
- Hatch, E. E.,** M. S. Linet, J. Zhang, H. A. Fine, W. R. Shapiro, R. G. Selker, P. M. Black and P. D. Inskip (2005). "Reproductive and hormonal factors and risk of brain tumors in adult females." Int J Cancer **114**(5): 797-805.
- Hegi, M. E.,** A.-C. Diserens, T. Gorlia, M.-F. Hamou, N. de Tribolet, M. Weller, J. M. Kros, J. A. Hainfellner, W. Mason, L. Mariani, J. E. C. Bromberg, P. Hau, R. O. Mirimanoff, J. G. Cairncross, R. C. Janzer and R. Stupp (2005). "MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma." N Engl J Med **352**(10): 997-1003.
- Heldring, N.,** A. Pike, S. Andersson, J. Matthews, G. Cheng, J. Hartman, M. Tujague, A. Strom, E. Treuter, M. Warner and J.-A. Gustafsson (2007). "Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets." Physiol Rev **87**(3): 905-931.
- Herson, P. S.,** I. P. Koerner and P. D. Hurn (2009). "Sex, sex steroids, and brain injury." Semin Reprod Med **27**(3): 229-239.
- Kabat, G. C.,** A. M. Etgen and T. E. Rohan (2010). "Do steroid hormones play a role in the etiology of glioma?" Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(10): 2421-2427.
- Kabat, G. C.,** Y. Park, A. R. Hollenbeck, A. Schatzkin and T. E. Rohan (2011). "Reproductive factors and exogenous hormone use and risk of adult glioma in women in the NIH-AARP Diet and Health Study." Int J Cancer **128**(4): 944-950.

- Kipp, M., T. Hochstrasser, C. Schmitz and C. Beyer (2016).** "Female sex steroids and glia cells: Impact on multiple sclerosis lesion formation and fine tuning of the local neurodegenerative cellular network." Neurosci Biobehav Rev **67**: 125-136.
- Liu, X., L. Wang, J. Chen, Q. Ling, H. Wang, S. Li, L. Li, S. Yang, M. Xia and L. Jing (2015).** "Estrogen receptor beta agonist enhances temozolomide sensitivity of glioma cells by inhibiting PI3K/AKT/mTOR pathway." Mol Med Rep **11**(2): 1516-1522.
- Lo, R. and J. Matthews (2010).** "A new class of estrogen receptor beta-selective activators." Mol Interv **10**(3): 133-136.
- Louis, D. N., A. Perry, G. Reifenberger, A. von Deimling, D. Figarella-Branger, W. K. Cavenee, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, P. Kleihues and D. W. Ellison (2016).** "The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary." Acta Neuropathol **131**(6): 803-820.
- McCullough, L. D., K. Blizzard, E. R. Simpson, O. K. Oz and P. D. Hurn (2003).** "Aromatase cytochrome P450 and extragonadal estrogen play a role in ischemic neuroprotection." J Neurosci **23**(25): 8701-8705.
- McEwen, B. S. (2001).** " " J Appl Physiol (1985) **91**(6): 2785-2801.
- McShane, L. M., D. G. Altman, W. Sauerbrei, S. E. Taube, M. Gion and G. M. Clark (2005).** "Reporting recommendations for tumour MARKer prognostic studies (REMARK)." Eur J Cancer **41**(12): 1690-1696.
- Michaud, D. S., V. Gallo, B. Schlehofer, A. Tjonneland, A. Olsen, K. Overvad, C. C. Dahm, R. Kaaks, A. Lukanova, H. Boeing, M. Schutze, A. Trichopoulou, C. Bamia, A. Kyzozis, C. Sacerdote, C. Agnoli, D. Palli, R. Tumino, A. Mattiello, H. B. Bueno-de-Mesquita, M. M. Ros, P. H. M. Peeters, C. H. van Gils, E. Lund, K. Bakken, I. T. Gram, A. Barricarte, C. Navarro, M. Dorronsoro, M. J. Sanchez, L. Rodriguez, E. J. Duell, G. Hallmans, B. S. Melin, J. Manjer, S. Borgquist, K.-T. Khaw, N. Wareham, N. E. Allen, K. K. Tsilidis, I. Romieu, S. Rinaldi, P. Vineis and E. Riboli (2010).** "Reproductive factors and exogenous hormone use in relation to risk of glioma and meningioma in a large European cohort study." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev **19**(10): 2562-2569.
- Milner, T. A., B. S. McEwen, S. Hayashi, C. J. Li, L. P. Reagan and S. E. Alves (2001).** "Ultrastructural evidence that hippocampal alpha estrogen receptors are located at extranuclear sites." J Comp Neurol **429**(3): 355-371.
- Nobusawa, S., T. Watanabe, P. Kleihues and H. Ohgaki (2009).** "IDH1 mutations as molecular signature and predictive factor of secondary glioblastomas." Clin Cancer Res **15**(19): 6002-6007.
- Ohgaki, H., P. Dessen, B. Jourde, S. Horstmann, T. Nishikawa, P.-L. Di Patre, C. Burkhard, D. Schuler, N. M. Probst-Hensch, P. C. Maiorka, N. Baeza, P. Pisani, Y. Yonekawa, M. G. Yasargil, U. M. Lutolf and P. Kleihues (2004).** "Genetic pathways to glioblastoma: a population-based study." Cancer Res **64**(19): 6892-6899.
- Ostrom, Q. T., H. Gittleman, J. Fulop, M. Liu, R. Blanda, C. Kromer, Y. Wolinsky, C. Kruchko and J. S. Barnholtz-Sloan (2015).** "CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008-2012." Neuro Oncol **17** Suppl 4: iv1-iv62.
- Peeters, W., R. van den Brande, S. Polinder, A. Brazinova, E. W. Steyerberg, H. F. Lingsma and A. I. R. Maas (2015).** "Epidemiology of traumatic brain injury in Europe." Acta Neurochir (Wien) **157**(10): 1683-1696.
- Plunkett, R. J., A. Lis, T. A. Barone, M. D. Fronckowiak and S. J. Greenberg (1999).** "Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model." J Neurosurg **90**(6): 1072-1077.

- Quillien, V., A. Lavenu, L. Karayan-Tapon, C. Carpentier, M. Labussiere, T. Lesimple, O. Chinot, M. Wager, J. Honnorat, S. Saikali, F. Fina, M. Sanson and D. Figarella-Branger (2012).** "Comparative assessment of 5 methods (methylation-specific polymerase chain reaction, MethyLight, pyrosequencing, methylation-sensitive high-resolution melting, and immunohistochemistry) to analyze O6-methylguanine-DNA-methyltransferase in a series of 100 glioblastoma patients." *Cancer* **118**(17): 4201-4211.
- Raghava, N. (2017).** "Neuroprotective effects of estrogen in CNS injuries: insights from animal models." *6*: 15-29.
- Reddel, R. R. and R. L. Sutherland (1987). "Effects of pharmacological concentrations of estrogens on proliferation and cell cycle kinetics of human breast cancer cell lines in vitro." *Cancer Res* **47**(20): 5323-5329.
- Rozenbeek, B., A. I. R. Maas and D. K. Menon (2013).** "Changing patterns in the epidemiology of traumatic brain injury." *Nat Rev Neurol* **9**(4): 231-236.
- Roselli, C. E., M. Liu and P. D. Hurn (2009). "Brain aromatization: classic roles and new perspectives." *Semin Reprod Med* **27**(3): 207-217.
- Roselli, C. F. (2007).** "Brain aromatase: roles in reproduction and neuroprotection." *J Steroid Biochem Mol Biol* **106**(1-5): 143-150.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, R. L. Prentice, A. Z. LaCroix, C. Kooperberg, M. L. Stefanick, R. D. Jackson, S. A. A. Beresford, B. V. Howard, K. C. Johnson, J. M. Kotchen and J. Ockene (2002).** "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *Jama* **288**(3): 321-333.
- Roy-O'Reilly, M. and L. D. McCullough (2018).** "Age and Sex Are Critical Factors in Ischemic Stroke Pathology." *Endocrinology*.
- Samarajewwa, N. U., M. M. Docanto, E. R. Simpson and K. A. Brown (2013).** "CREB-regulated transcription co-activator family stimulates promoter II-driven aromatase expression in preadipocytes." *Horm Cancer* **4**(4): 233-241.
- Sareddy, G. R., X. Li, J. Liu, S. Viswanadhapalli, L. Garcia, A. Gruslova, D. Cavazos, M. Garcia, A. M. Strom, J.-A. Gustafsson, R. R. Tekmal, A. Brenner and R. K. Vadlamudi (2016).** "Selective Estrogen Receptor  $\beta$  Agonist LY500307 as a Novel Therapeutic Agent for Glioblastoma." *Sci Rep* **6**.
- Sareddy, G. R., B. C. Nair, V. K. Gonugunta, Q.-g. Zhang, A. Brenner, D. W. Brann, R. R. Tekmal and R. K. Vadlamudi (2012).** "Therapeutic significance of estrogen receptor beta agonists in gliomas." *Mol Cancer Ther* **11**(5): 1174-1182.
- Stupp, R., M. E. Hegi, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. J. B. Taphoorn, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, A. Allgeier, B. Fisher, K. Belanger, P. Hau, A. A. Brandes, J. Gijtenbeek, C. Marosi, C. J. Vecht, K. Mokhtari, P. Wesseling, S. Villa, E. Eisenhauer, T. Gorlia, M. Weller, D. Lacombe, J. G. Cairncross and R.-O. Mirimanoff (2009).** "Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial." *Lancet Oncol* **10**(5): 459-466.
- Stupp, R., W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. B. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer and R. O. Mirimanoff (2005).** "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma." *N Engl J Med* **352**(10): 987-996.
- Stupp, R., S. Taillibert, A. A. Kanner, S. Kesari, D. M. Steinberg, S. A. Toms, L. P. Taylor, F. Lieberman, A. Silvani, K. L. Fink, G. H. Barnett, J.-J. Zhu, J. W. Henson, H. H. Engelhard, T. C.**

- Chen, D. D. Tran, J. Sroubek, N. D. Tran, A. F. Hottinger, J. Landolfi, R. Desai, M. Caroli, Y. Kew, J. Honnorat, A. Idbaih, E. D. Kirson, U. Weinberg, Y. Palti, M. E. Hegi and Z. Ram (2015). "Maintenance Therapy With Tumor-Treating Fields Plus Temozolomide vs Temozolomide Alone for Glioblastoma: A Randomized Clinical Trial." Jama **314**(23): 2535-2543.
- Thomas**, C. and J.-A. Gustafsson (2011). "The different roles of ER subtypes in cancer biology and therapy." Nat Rev Cancer **11**(8): 597-608.
- Tseng**, M.-Y. and J.-H. Tseng (2005). "Survival analysis for adult glioma in England and Wales." J Formos Med Assoc **104**(5): 341-348.
- Verzat**, C., M. B. Delisle, P. Courriere and E. Hollande (1990). "Influence of host sex on the growth of a human glioblastoma line in athymic mice." Neuropathol Appl Neurobiol **16**(2): 141-151.
- Wang**, C., C. Jie and X. Dai (2014). "Possible roles of astrocytes in estrogen neuroprotection during cerebral ischemia." Rev Neurosci **25**(2): 255-268.
- Welsh**, A. W., D. R. Lannin, G. S. Young, M. E. Sherman, J. D. Figueroa, N. L. Henry, L. Ryden, C. Kim, R. R. Love, R. Schiff and D. L. Rimm (2012). "Cytoplasmic estrogen receptor in breast cancer." Clin Cancer Res **18**(1): 118-126.
- Yague**, J. G., E. Lavaque, J. Carretero, I. Azcoitia and L. M. Garcia-Segura (2004). "Aromatase, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis, is expressed by human and rat glioblastomas." Neurosci Lett **368**(3): 279-284.
- Yan**, H., D. W. Parsons, G. Jin, R. McLendon, B. A. Rasheed, W. Yuan, I. Kos, I. Batinic-Haberle, S. Jones, G. J. Riggins, H. Friedman, A. Friedman, D. Reardon, J. Herndon, K. W. Kinzler, V. E. Velculescu, B. Vogelstein and D. D. Bigner (2009). "IDH1 and IDH2 mutations in gliomas." N Engl J Med **360**(8): 765-773.

## 10 Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Übersicht über die Entwicklung des Malignoms aus der Progenitorzelle, mit der Aufführung von Mutationen und Häufigkeiten des GBM und niedriggradigen Astrozytomen. Häufigkeiten des Auftretens der einzelnen Mutationen nach Stadium. Das GBM IDH Wildtyp tritt dabei mit einer Häufigkeit von 95% und das GBM mit IDH Mutation mit ca. 5% auf. (Ohgaki et al., 2004) .....	2
<b>Abbildung 2:</b> Darstellung Steroidhormonbiosynthese nach Häggström (Häggström, Stannared et al. 2014) .....	7
<b>Abbildung 3:</b> Zusammenfassung der unterschiedlichen neuroprotektiven Wirkungen des Östrogens. Dabei führen genomische und nicht-genomische Signalisierungsprozesse vor allem zur Aktivierung molekularer Komponenten, die eine Inhibition der Apoptose sowie Promotion des zellulären Überlebens einleiten. Antioxidative Funktionen führen dazu, dass freie reaktive Radikale reduziert werden, welche im Rahmen von Verletzungen des zentralen Nervensystem (ZNS) und Ungleichgewicht der neuronalen Homöostase entstehen können. Des Weiteren spielt Östrogen eine wichtige Rolle für die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Bioenergetik und somit der Produktion von neuronalen Adenosintriphosphat (ATP), ein universeller Energieträger (Raghava 2017). .....	9
<b>Abbildung 4:</b> Schaubild des Versuchsaufbaus Östrogen- und Temozolomidtherapie glialer Tumorzellen.....	20
<b>Abbildung 5:</b> IHC, 20x, ER $\alpha$ . GBM-Gewebeschnitte der vier Bewertungsgruppen. In der oberen Reihe sind Schnitte dargestellt, die der Gruppe 1 (0-10%, A) und der Gruppe 2 (11-40%, B) zugeordnet wurden. Die unteren Abbildungen zeigen Beispiele für die Gruppe 3 (41-70%, C) und der Gruppe 4 (71-100%, D). .....	25
<b>Abbildung 6:</b> IHC, 20x, Aromatase. GBM-Patientenbeispiele der vier Bewertungsgruppen. In der oberen Reihe sind Schnitte dargestellt, die der Gruppe 1 (0-10%, A) und der Gruppe 2 (11-40%, B) zugeordnet wurden. Die unteren beiden Abbildungen zeigen Beispiele für die Gruppe 3 (41-70%, C) und die Gruppe 4 (71-100%, D). .....	26
<b>Abbildung 7:</b> relative Verteilung des ER $\alpha$ (orange) und der Aromatase (grün) zwischen Männern und Frauen hinsichtlich der 4 IHC-Färbungsgruppen. ....	28
<b>Abbildung 8:</b> Verteilung der Höhe des ER $\alpha$ (orange) und der Aromatase (grün) anhand der IHC-Färbungsgruppen nach Altersklassen für Männer und Frauen gemeinsam. Dabei zeigt	



der ER $\alpha$  insgesamt eine Abnahme über die Altersklassen. Die Aromatase hingegen zeigt sich, mit Ausnahme der Altersgruppe 41-50 Jahren, konstant in der höchsten Färbungsgruppe. . 29

**Abbildung 9:** Verteilung des ER $\alpha$  (oranges Kästchen) und der Aromatase (grünes Kästchen) anhand der IHC-Färbungsgruppen nach Altersklassen zwischen Männern und Frauen. Der ER $\alpha$  zeigte sich bei Männern <40. Lebensjahr hoch und nahm bis ins >70. Lebensjahr ab. Bei Frauen konnte ein deutlicher Peak im Alter zwischen 61-70 Jahren gesehen werden. Eine deutliche Abnahme der Expression wiesen Patienten über 70 Jahren auf. Die Aromatase zeigte sich bei Männern relativ konstant mit einer Abnahme der Expression im Alter >70 Jahren. Die Expression der Aromatase bei Frauen zeigte niedrige Spiegel im Alter zwischen 41-50 Jahren, stieg dann zwischen 51-60 Jahren an, nahm erneut ab zwischen 61-70 Jahren und stieg in der Gruppe der >70-jährigen..... 30

**Abbildung 10:** Body-Mass-Index und ER $\alpha$  Immunreaktivität bei weiblichen Gliompatienten nach den 4 Gruppen. In den Gruppen 1-3 ist ein Trend hinsichtlich BMI Anstieg und Anstieg an ER $\alpha$  positiven Zellen zu beobachten. Gruppe 4 folgt nicht dem Trend. .... 31

**Abbildung 11:** Body-Mass-Index und ER $\alpha$  Immunreaktivität bei männlichen Gliompatienten nach den 4 Gruppen. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte nicht beobachtet werden. .... 31

**Abbildung 12:** Kaplan Meier Analyse von ER $\alpha$  positiven GBM-Schnitten und dem Überleben der Patienten. Die Gruppen mit niedriger ER $\alpha$  Immunreaktivität (durchgezogene Linie, Gruppe 1 und 2), sowie die Gruppen mit hoher Immunreaktivität (gestrichelte Linie) wurden für die Anschaulichkeit zusammengefasst. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit hoher ER $\alpha$  Expression, Log rank: p=0,0111. .... 33

**Abbildung 13:** Kaplan Meier Analyse von Aromatase positiven GBM-Zellen und dem Überleben der Patienten. Für die Anschaulichkeit wurden die Gruppen 1 und 2 (durchgezogene Linie, niedrige Aromatase Immunreaktivität) und die Gruppen 3 und 4 (gestrichelte Linie, hohe Aromatase Immunreaktivität) zusammengefasst. Es zeigte sich ein signifikant längeres Überleben für Patienten mit hoher Aromataseexpression, Log rank: p=0,0104..... 34

**Abbildung 14:** Kaplan Meier Analyse für das Überleben zwischen männlicher (m) und weiblicher (f) GBM Patienten. Es konnte kein signifikanter geschlechtsspezifischer Überlebensvorteil beobachtet werden (Log rank: p=0,89). .... 35

- Abbildung 15:** Western Blot Analyse nach Induktion von Zellstress durch verminderte Zufuhr von Serum für die Zelllinie LN229. Die Beladungskontrolle Vinculin (124kDa) weist eine gleichmäßige Beladung der einzelnen Versuchstage auf. Die Bande für die Expression des ER $\alpha$  (36-66kDa) nimmt von Tag 4 bis Tag 8 deutlich zu. Für das Enzym Aromatase zeigt sich eine Zunahme der Bandendicke bis zum Tag 8..... 36
- Abbildung 16:** Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch die verminderte Zufuhr von Serum für die Zelllinie LN18. Die Bandenstärke der Reaktivität gegenüber dem ER $\alpha$  nahm nach einer kleinen Zunahme am Tag 2 bis zu Tag 8 kontinuierlich ab. Die Signalstärke der Expression des Enzyms Aromatase nahm, im Vergleich zur Kontrolle, von Tag 2-8 ab. .... 36
- Abbildung 17:** Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch die verminderte Zufuhr von Serum für Astrozyten. Man konnte eine Zunahme für die Expression des ER $\alpha$  beobachten bis Tag 6 beobachten gefolgt von einer verminderten Signalstärke am Tag 8.. Die Bandenstärke für die Expression der Aromatase zeigte eine Zunahme bis zum Tag 6, mit minimaler Expression am Tag 8. .... 37
- Abbildung 18:** Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch Hypoxie für die Zelllinie LN229. Es zeigte sich bei gleicher Proteinbeladung, siehe gleichmäßige Bandenstärken für Vinculin. Die Bandenintensität für den ER $\alpha$  nahm bis zu dem Zeitpunkt 48h diskret zu und erfuhr nach 72h eine Abnahme der Signalintensität. Eine Zunahme der Bandenstärke konnte für die Aromatase bis zu 72h nach verschließen der Flasche beobachtet werden, gefolgt von einer Abnahme nach 96h..... 37
- Abbildung 19:** Western Blot Analyse nach der Induktion von Zellstress durch Hypoxie für die Zelllinie LN18. Die Signalstärke für den ER $\alpha$  bei gleichmäßiger Signalstärke der Ladungskontrolle (Vinculin) zeigte eine Zunahme nach 24h, gefolgt von einer deutlichen Abnahme der Bandenstärke. Die Aromatase Expression wies eine Zunahme bis nach 48h auf und war von einer Abnahme der Signalstärke gefolgt. .... 38
- Abbildung 20:** Western Blot Analyse für die Zelllinien LN18 und LN229 hinsichtlich der Expression des ER $\alpha$ . Bei gleichmäßiger Proteinbeladung, siehe Vinculin mit 124 kDa, zeigte sich eine deutliche Bande mit 66kDa, entsprechend ER $\alpha$ , für beide Zelllinien. .... 38
- Abbildung 21:** IC<sub>50</sub>-Werte nach der Therapie von Östrogen (0 $\mu$ M, 10 $\mu$ M, 25 $\mu$ M und 50 $\mu$ M) für die Zelllinie LN229 (grün) und LN18 (blau). Der IC<sub>50</sub> Wert lag für die Zelllinie LN229 bei 43,11 $\mu$ M und für die Zelllinie LN18 bei 20,96 $\mu$ M. .... 39

**Abbildung 22:** IC<sub>50</sub>-Werte nach der Therapie von Östrogen und Temozolomid (TMZ) für die Zelllinie LN229. Die Kontrolle ist schwarz dargestellt. 25µM Vortherapie entspricht der blauen Linie, die dazugehörige Lösungsmittelkontrolle besitzt dieselbe Farbe nur gestrichelt. Die Vortherapie mit 50µM (durchgezogene Linie) und die Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie) sind grün dargestellt. Im Vergleich zur Kontrolle (IC<sub>50</sub>=237,08µM) zeigten die mit Östrogen therapierten Zellen E10µM (IC<sub>50</sub>=149,21µM), E25µM (IC<sub>50</sub>=73,64µM) und E50µM (IC<sub>50</sub>=21,06) eine deutliche Reduktion des IC<sub>50</sub>-Wertes..... 40

**Abbildung 23:** IC<sub>50</sub>-Werte nach der Therapie von Östrogen und Temozolomid (TMZ) für die Zelllinie LN18. Die Kontrolle (TMZ LN18 E0 T3) zeigte einen IC<sub>50</sub> von 763,12µM TMZ (schwarze Linie). Die blaue Linie entspricht der Therapie mit 25µM E2 (durchgezogene Linie) und deren Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie). Die Therapie mit 50µM E2 (durchgezogene Linie) als auch die dazugehörige Lösungsmittelkontrolle (gestrichelte Linie) sind in grün dargestellt. Dabei zeigte sich eine IC<sub>50</sub> für 25µM E2 Vortherapie von 364,85µM TMZ. Bei einer Vortherapie von 50µM E2 wurde ein IC<sub>50</sub> von 276,01µM TMZ beobachtet. Die Lösungsmittelkontrollen (gestrichelte Linien) zeigen keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Kontrolle..... 41

## 11 Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Verwendete Chemikalien und Reagenzien .....	12
<b>Tabelle 2:</b> Verwendete Materialien .....	13
<b>Tabelle 3:</b> Verwendete Antikörper .....	14
<b>Tabelle 4:</b> Verwendete Geräte .....	14
<b>Tabelle 5:</b> Patientencharakteristika wie Alter, Überleben nach Operation (OP) und Body-Mass-Index (BMI) der GBM Patienten nach Geschlecht.....	16
<b>Tabelle 6:</b> Puffer und Lösungen für IHC .....	17
<b>Tabelle 7:</b> Übersicht der Einteilung der IHC-Schnitte nach Prozentanzahl der immunpositiven glialen Tumorzellen zur Gesamtzellzahl.....	18
<b>Tabelle 8:</b> Charakteristika der verwendeten Zelllinien LN18, LN229 und Astrozyten.....	18
<b>Tabelle 9:</b> Puffer für die Zellyse und Vorbereitung auf den Western-Blot.....	21
<b>Tabelle 10:</b> verwendete Puffer und Lösungen für den Western Blot.....	23
<b>Tabelle 11:</b> Zusammenfassung der Einteilung der Gewebeschnitte nach Geschlecht in die 4 Gruppen der immunhistochemisch positiv gefärbten glialen Tumorzellen zur Gesamtzellzahl in der vitalen Tumorregion.....	27
<b>Tabelle 12:</b> Patientencharakteristika wie Alter, Überleben nach Operation (OP) und Body-Mass-Index (BMI) der GBM Patienten nach Geschlecht.....	28
<b>Tabelle 13:</b> Mittelwerte des Body-Mass-Indexe in Korrelation zur Färbungsgruppe für ER $\alpha$ und Aromatase für beide Geschlechter. ....	30
<b>Tabelle 14:</b> IC <sub>50</sub> -Werte nach der Therapie mit Östrogen für die Zelllinie LN229 und LN18. ...	39
<b>Tabelle 15:</b> Übersicht der einzelnen IC <sub>50</sub> -Werte nach Kombinationstherapie E2 und TMZ. ...	41
<b>Tabelle 16:</b> Zusammenfassung der Glioblastompatientencharakteristika mit der Gruppenauswertung für die immunhistochemische Färbung gegen ER $\alpha$ und Aromatase. Männliche Patienten wurden mit 1 und weibliche Patienten mit 2 verschlüsselt. Die Verschlüsselung des MGMT Status: 0=nicht methyliert, 1= methyliert, kein Eintrag = keine Überprüfung. Die Gruppenbewertung für ER $\alpha$ und Aromatase sind in 3.2.2.2 auf Seite 17 aufgeführt.....	65
<b>Tabelle 17:</b> Zusammenfassung der IC <sub>50</sub> -Werte für die Zelllinien LN229 und LN18 nach Östrogentherapie und jeweiliger Lösungsmittelkontrolle. ....	66

<b>Tabelle 18:</b> Zusammenfassung der IC50-Werte für die Zelllinien LN229 und LN18 nach TMZ Therapie bei E2 Vorbehandlung und jeweiliger Lösungsmittelkontrolle (EK) .....	66
---	----

## 12 Danksagung

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. med. Jürgen Schlegel, der mir die Möglichkeit gegeben hat, meine Dissertation in seinem Team anzufertigen und in die spannende Welt der Neuropathologie einzutauchen. Er war mir dabei stets ein hilfsbereiter und geduldiger Ansprechpartner, der mich durch kritisches Hinterfragen der Sachverhalte zum Weiterdenken angeregt und mir damit immer eine konstruktive Hilfestellung geboten hat.

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Wilko Weichert an dessen Institut ich diese Arbeit anfertigen durfte.

Ein weiterer Dank geht an PD Dr. med. Jens Gempt für den klinischen Input und die Patientendaten.

Ein ganz besonderer Dank geht an Dr. med. Claire Delbridge, welche mich in jeder Phase meiner Dissertation unterstützt und aufgrund ihrer klinischen Arbeit die Weichen für dieses Projekt und das Thema gestellt hatte. Sie war dabei immer mein erster Ansprechpartner und hat mich tatkräftig unterstützt. Ohne ihre Hilfestellung würde es diese Arbeit in dieser Form nicht geben. Tausend Dank!

Zudem möchte ich mich auch bei meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor bedanken, die mir die Methodik näher gebracht, mich mit wissenschaftliche Diskussionen auf neue Wege geführt und mit denen ich unterhaltsame Stunden verbracht habe. Dabei möchte ich Dr. Friederike Lämmer, Sandra Baur, Christine Grubmüller, Dr. Martin Schönfelder und Dr. Lukas Bauer namentlich erwähnen.

Danke Christian für deine persönliche Unterstützung, Aufmunterung und motivierenden Zusprüche nach misslungenen Versuchen und Stunden vor dem Computer.

Zuletzt möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken. Es ist auch ein Teil eures Verdienstes, dass diese Arbeit fertig gestellt werden konnte.

## 13 Anhang

Tabelle 16: Zusammenfassung der Glioblastompatientencharakteristika mit der Gruppenauswertung für die immunohistochemische Färbung gegen ER $\alpha$  und Aromatase. Männliche Patienten wurden mit 1 und weibliche Patienten mit 2 verschlüsselt. Die Verschlüsselung des MGMT Status: 0=nicht methyliert, 1= methyliert, kein Eintrag = keine Überprüfung. Die Gruppenbewertung für ER $\alpha$  und Aromatase sind in 3.2.2.2 auf Seite 17 aufgeführt.

Geschlecht	Geburtstag	letztes Ereignis	Alter [Jahren]	Überleben ( $\Delta p$ last event [Tage])	MGMT Status	ER $\alpha$	Aromatase
♂	07.01.1966	23.02.2012	44	456	0	1	4
♂	24.10.1965	26.05.2015	49	147	1	1	2
♂	09.03.1962	13.01.2015	51	386		1	4
♂	28.11.1957	30.05.2013	54	272	0	1	4
♂	21.12.1948	06.04.2015	64	472	0	1	4
♂	17.08.1944	24.05.2014	67	554	0	1	4
♂	24.04.1941	20.06.2012	68	1104	1	1	4
♂	21.03.1940	26.10.2014	73	373	0	1	2
♂	05.05.1935	09.02.2013	77	255	1	1	4
♂	19.05.1932	02.07.2011	79	22	0	1	2
♂	19.02.1987	25.01.2015	26	369	1	2	4
♂	24.04.1970	28.02.2015	43	494	0	2	3
♂	30.03.1966	12.11.2015	48	290	0	2	4
♂	01.09.1960	29.03.2015	52	496	0	2	4
♂	02.08.1960	06.08.2015	53	483	1	2	4
♂	28.02.1958	26.05.2015	56	250	1	2	3
♂	20.12.1950	09.03.2012	58	982	1	2	4
♂	01.05.1949	28.10.2015	64	568	0	2	4
♂	20.05.1948	12.06.2014	65	126	0	2	4
♂	22.02.1937	01.05.2011	73	199	1	2	4
♂	13.11.1936	25.08.2015	76	925	1	2	3
♂	09.01.1930	12.10.2015	85	144	0	2	4
♂	15.06.1987	18.06.2014	25	475	0	3	4
♂	31.05.1968	12.12.2013	43	884	0	3	4
♂	26.01.1965	26.05.2014	48	334	0	3	4
♂	09.10.1963	30.10.2015	50	648	0	3	4
♂	03.07.1956	23.11.2015	58	340	0	3	4
♂	03.10.1946	21.10.2013	65	572	0	3	4
♂	03.08.1944	31.12.2014	69	432	0	3	4
♂	27.02.1945	17.11.2015	69	489	1	3	2
♂	14.11.1947	25.02.2015	66	400	0	4	4
♀	22.09.1960	12.07.2009	47	362	1	1	2
♀	19.05.1961	05.12.2011	49	222		1	1
♀	12.11.1960	01.08.2012	50	373	1	1	3
♀	09.08.1952	03.01.2009	55	499	1	1	4

♀	02.01.1955	10.07.2014	58	289	0	1	4
♀	19.06.1953	15.06.2014	60	250	0	1	2
♀	25.04.1949	10.09.2012	63	108	1	1	4
♀	08.12.1940	02.07.2013	71	419	1	1	4
♀	28.03.1941	08.10.2015	73	349	0	1	4
♀	01.03.1939	27.05.2014	74	183	1	1	2
♀	18.02.1936	24.06.2014	77	197	0	1	1
♀	05.02.1935	27.03.2014	78	226	1	1	3
♀	12.01.1959	08.10.2010	48	480	1	2	4
♀	06.03.1961	07.05.2012	50	411	1	2	3
♀	11.10.1960	15.08.2013	50	778	0	2	3
♀	29.11.1960	04.07.2014	51	837	0	2	3
♀	24.10.1958	24.11.2015	55	620	1	2	4
♀	18.01.1948	11.11.2015	66	526	0	2	3
♀	31.07.1929	27.08.2012	82	322		2	4
♀	05.07.1927	31.03.2011	83	195	1	2	4
♀	15.04.1971	10.11.2012	40	495	0	3	4
♀	06.04.1951	12.11.2015	59	1920	1	3	4
♀	07.04.1953	23.11.2015	60	857	1	3	4
♀	17.03.1949	14.10.2015	65	215	1	3	4
♀	28.03.1936	06.10.2015	78	414	0	3	4
♀	20.09.1958	03.06.2012	50	1138	1	4	3
♀	19.12.1948	16.12.2014	65	238	1	4	3
♀	18.03.1943	15.09.2013	68	683	1	4	2
♀	31.08.1939	22.12.2012	71	747	1	4	4

Tabelle 17: Zusammenfassung der IC50-Werte für die Zelllinien LN229 und LN18 nach Östrogentherapie und jeweiliger Lösungsmittelkontrolle.

In $\mu\text{M}$	Versuch	WH 1	WH 2	WH 3	Mittelwert	Stabw
LN229 E2	43,11	41,89	43,05	45,96	43,50	1,73
LN229 EK	188,02	121,94	73,30	-44,01	127,75	57,58
LN18	20,96		28,17	19,35	22,82	4,69
LN18 EK	-191,14		176,94	278,10	227,52	71,53

Tabelle 18: Zusammenfassung der IC50-Werte für die Zelllinien LN229 und LN18 nach TMZ Therapie bei E2 Vorbehandlung und jeweiliger Lösungsmittelkontrolle (EK)

In $\mu\text{M}$ TMZ	E2 0 $\mu\text{M}$	E2 10 $\mu\text{M}$	E2 25 $\mu\text{M}$	E2 50 $\mu\text{M}$	EK 10	EK 25	EK 50
LN229	237,08	149,21	73,64	21,06	333,45	222,11	179,39
LN18	763,12	4575,83	364,85	276,01	550,61	492,78	440,88