

# **Die Rolle der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) im Mammakarzinom**

Von der Fakultät Energie-, Verfahrens- und Biotechnik der Universität Stuttgart  
zur Erlangung der Würde eines Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigte Abhandlung

vorgelegt von

Ina S. Abele (geb. Merz)

aus Aalen

Hauptberichter: Prof. Dr. K. Pfizenmaier

Mitberichter: Prof. Dr. C. Knabbe

Tag der mündlichen Prüfung: 30. September 2008

Institut für Zellbiologie und Immunologie der Universität Stuttgart

Dr. Margarete Fischer-Bosch Institut für Klinische Pharmakologie

2008

Hiermit erkläre ich, dass die vorliegende Dissertation selbstständig, unter ausschließlicher Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und der Ratschläge von jeweils namentlich aufgeführten Personen angefertigt wurde.

Ina Abele

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>6</b>
<b>1 ABSTRACT</b>	<b>8</b>
<b>2 ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>11</b>
<b>3 EINLEITUNG</b>	<b>13</b>
3.1 <i>Das Mammakarzinom und seine hormonelle Regulation</i>	13
3.2 <i>Antiöstrogene Therapie des Mammakarzinoms</i>	14
3.3 <i>Resistenzbildung in der endokrinen Therapie</i>	15
3.4 <i>Die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) und ihre Rolle in der Entgiftung von Epoxiden</i>	16
3.5 <i>mEH und AEBS</i>	17
3.6 <i>mEH im hormonellen System</i>	19
3.7 <i>Ziel der Arbeit</i>	20
<b>4 MATERIAL</b>	<b>21</b>
4.1 <i>Chemikalien, Reagenzien und Enzyme</i>	21
4.1 <i>Medien, Puffer, Lösungen</i>	23
4.1.1 Medien für eukaryotische Kulturen	23
4.1.2 Medien für prokaryotische Kulturen	24
4.1.3 Puffer	24
4.1.4 Lösungen	27
4.2 <i>Prokaryoten und Eukaryoten</i>	27
4.2.1 Zelllinien	27
4.2.2 Bakterien	28
4.3 <i>Primer, Plasmide und Antikörper</i>	28
4.3.1 Primer	28
4.3.2 Plasmide	29
4.3.3 Antikörper	30
4.4 <i>Geräte und Hilfsmittel</i>	30

<b>5</b>	<b>METHODEN</b>	<b>32</b>
5.1	<b><i>Zellbiologische Methoden</i></b>	<b>32</b>
5.1.1	Kultivierung eukaryotischer Zellen	32
5.1.2	Behandlung eukaryotischer Zellen	32
5.1.3	Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen	32
5.1.4	Transiente Transfektion für Luciferase Reporteragenassay	33
5.1.5	Transiente Transfektion für anschließende RNA- bzw. Protein-Ernte	34
5.2	<b><i>Detektion des mRNA-Levels</i></b>	<b>34</b>
5.2.1	cDNA-Synthese	34
5.2.2	LightCycler quantitative RT-PCR	34
5.3	<b><i>Detektion des Reportergens Luciferase</i></b>	<b>35</b>
5.4	<b><i>Protein-Analyse und Präparation</i></b>	<b>36</b>
5.4.1	Protein Isolierung und Quantifizierung	36
5.4.2	Mikrosomen- und Cytosolisolierung	37
5.4.3	Probenvorbereitung für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	37
5.4.4	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	38
5.4.5	Probenvorbereitung für native Polyacrylamidgelelektrophorese	38
5.4.6	Native Polyacrylamidgelelektrophorese	39
5.4.7	Western Blot	39
5.4.8	Nachweis Membran-gebundener Proteine durch Antikörpern	40
5.5	<b><i>DNA Analyse und Präparation</i></b>	<b>42</b>
5.5.1	Transformation von DNA in <i>E. coli</i> Bakterien	42
5.5.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	42
5.5.3	Konzentrationsbestimmung von DNA	42
5.5.4	Restriktionsverdau	43
5.5.5	Ligation	43
5.5.6	DNA-Amplifikation	43
5.5.7	Aufreinigung von PCR-Produkten	44
5.5.8	Sequenzierung	44
5.6	<b><i>Immunhistochemische Analyse der Corpusendometrium Proben</i></b>	<b>45</b>
5.6.1	Verarbeitung von Gewebe und Patientendaten	45
5.6.2	Immunhistochemische Färbung	45
5.6.3	Analyse immunhistochemischer Proben	46
5.7	<b><i>Statistische Auswertung</i></b>	<b>47</b>
<b>6</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>48</b>
6.1	<b><i>Funktionelle Analyse</i></b>	<b>48</b>
6.1.1	Untersuchung der mEH-Expression in Mammakarzinomzelllinien	48
6.1.2	mEH als Bestandteil der AEBS	50
6.1.3	mEH-Proteinexpression in Lebergewebe	52
6.1.4	Einfluss der mEH auf den Östradiolsignalweg	54

6.1.5	Analyse der verkürzten mEH	57
6.1.6	SNP-Analyse im humanen Mammakarzinom	59
6.1.7	Inhibition der mEH-Expression	60
6.1.8	Lokalisierung der mEH	63
6.1.9	Native Proteinanalyse der mEH	64
<b>6.2</b>	<b><i>Regulation der mEH</i></b>	<b>66</b>
6.2.1	Analyse der mEH-Expression in Mammakarzinomzelllinien unter Behandlung mit Hormonen	66
6.2.2	mEH im hormonellen System	68
6.2.3	Analyse der immunhistochemischen Färbung von mEH	69
6.2.4	Auswertung der Patientendaten	70
6.2.5	mEH Lokalisation in frischen Corpusendometrium-Proben	72
6.2.6	Analysen im humanen Endometrium-Zellkultursystem	73
6.2.7	Immunhistochemische Analyse von PR, ER $\alpha$ und pS2	76
<b>7</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>79</b>
7.1	<i>Funktionelle Analyse</i>	79
7.2	<i>Regulation der mEH</i>	82
7.3	<i>Schlussbetrachtung</i>	86
<b>8</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>DANKSAGUNG</b>	<b>96</b>

## Abkürzungsverzeichnis

a	ato
Abb.	Abbildung
AEBS	„ <i>antiestrogen binding site</i> “
AMV	Reverse Transkriptase aus dem Affen-Myeloblastosis-Virus
APS	Ammoniumpersulfat
as	„ <i>antisense</i> “
$\beta E_2$	17 $\beta$ -Östradiol
bp	Basenpaare
BSA	„ <i>Bovine Serum Albumin</i> “
bzw.	beziehungsweise
CCS	von Steroiden befreites fötales Kälberserum („ <i>charcoal-stripped FCS</i> “)
cDNA	„ <i>copy DNA</i> “
°C	Grad Celsius
DMEM	„ <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> “
DNA	Desoxyribonukleinsäure („ <i>desoxyribonucleic acid</i> “)
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DPPE	N,N-Diethyl-2-[4-(phenylmethyl)phenoxy]ethanamine
DTT	Dithiothreiol
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-tetraacetat
ER	„ <i>estrogen receptor</i> “
et al.	„ <i>et aliter</i> “
FCS	fötales Kälberserum („ <i>foetal calf serum</i> “)
G418	Geneticin-Disulfat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GUS	$\beta$ -Glucuronidase
h	Stunde
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
M	Molar
$\mu$	mikro
min	Minute

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

mRNA	„messenger ribonucleic acid“
n	Anzahl
p	pico
RNA	„ribonucleic acid“
RT	Reverse Transkriptase
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	“Polymerase Chain Reaction”
PMSF	Phenylmethansulfonylfourid
POD	Peroxidase
PR	Progesteronrezeptor
SBG	Serva Blue G
pS2	$\beta$ E <sub>2</sub> -Zielgen
s	Sekunde
SDS	“Sodiumdodecylsulfate”
se	“sense”
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris/Borat/EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
U	“Unit”
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volumen
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -galactopyranosid

## 1 Abstract

Antiestrogens are used in treatment of breast cancer during the last years. In some cases resistance during treatment could arise, leading to a disprofit for the patient. The functional mechanisms of this resistance are still largely unknown.

We have previously shown that high expression of microsomal epoxide hydrolase (mEH) is correlated with poor disease outcome in breast cancer patients receiving the antiestrogen tamoxifen [Fritz et al. 2001], suggesting that enhanced mEH expression could lead to tamoxifen resistance.

In this study hormone responsive MCF-7 breast cancer cells were chosen as a model system to further elucidate the involvement of mEH on tamoxifen treatment. Furthermore, we used endometrial tissue samples to investigate the hormonal regulation of mEH. The results of these investigations should contribute to a better understanding of the mechanisms of antiestrogen resistance during breast cancer treatment.

The first part of the study was focussed on the MCF-7 breast cancer cell line and the influence of mEH on tamoxifen treatment. Our results showed no significant effect of the *antiestrogen binding site* (AEBS) in the tamoxifen treatment of MCF-7 cells. The MCF-7 cell growth after co-treatment with Tamoxifen and the AEBS-inhibitor DPPE remained unchanged.

A possible influence of mEH on antiestrogen treatment could be an enhancement of the estrogen response, because of the competitive interaction between estrogens and antiestrogens. Therefore, an estrogen response element (ERE-) reporter gene construct was used to analyze the estradiol-response under treatment with tamoxifen



## ABSTRACT

---

or estradiol ( $\beta E_2$ ) and overexpression of mEH or mEH\_6C (C-terminal truncated mEH). The results showed a sensitizing influence of mEH\_6C on the  $\beta E_2$  response but not full-length mEH. In contrast to these results, inhibition of the mEH expression via siRNA led to a repression of the  $\beta E_2$ -response. Inhibition of the mEH expression resulted in a decrease of the mRNA level of pS2 ( $\beta E_2$ -response gene) and estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ). Summarizing the first results, mEH seems to play a role during regulation of the  $\beta E_2$  signaling pathway.

To better understand the role of mEH in hormone dependent tissue we investigated samples of the endometrial uterine corpus for immunohistological analysis of mEH resulting in the following expression pattern of mEH during the menstrual cycle: In the first half of the cycle mEH expression was low, increased during the second half and reached highest expression during pregnancy.

Due to the similarity between the expression pattern of mEH and progesterone serum level we investigated the regulation of mEH expression in response to progesterone in human endometrial cell lines (IKPRAB-36: progesterone receptor positive (PRA+, PRB+) and estrogen receptor  $\alpha$  negative (ER $\alpha$ -); ECC1PRAB-72: PRA+, PRB+ and ER $\alpha$ +) by Western Blot analysis and RT-PCR. In ECC1PRAB-72 (ER $\alpha$ +) we observed an increase of mEH expression after addition of medroxyprogesterone acetate (MPA), whereas in IKPRAB-36 (ER $\alpha$ -) MPA had no influence on mEH expression, suggesting that MPA regulation of mEH is dependent on ER $\alpha$ .

In conclusion, we could show that the mEH has an influence on  $\beta E_2$  signaling, which could be of importance during tamoxifen therapy of breast cancer. In the second part we showed that the expression of mEH is regulated by progesterone in a classical hormone target tissue like the human endometrium. Although mEH is well

## *ABSTRACT*

---

characterized for detoxification of epoxides, our results suggest that mEH could also play an important role in the hormonal system.

## 2 Zusammenfassung

Antiöstrogene wurden in den letzten Jahren sehr effektiv in der Therapie des Mammakarzinoms eingesetzt. Im Verlauf der Therapie kann es jedoch zur Ausbildung von Tamoxifenresistenzen kommen, die den Ausgang negativ beeinflussen. Die funktionellen Mechanismen, die zur Entstehung dieser Resistenz führen, sind bisher noch weitgehend unbekannt.

Grundlage dieser Arbeit ist eine Studie, in der gezeigt wurde, dass eine hohe Expression der mikrosomalen Epoxidhydrolase (mEH) zu einem schlechteren Verlauf der Tamoxifentherapie bei Patientinnen mit Mammakarzinom führt (Fritz et al. 2001). Dies wiederum lässt die Vermutung zu, dass eine erhöhte mEH-Expression zu einer Tamoxifenresistenz führen könnte. Eine funktionelle Analyse der möglichen Mechanismen hinter dieser Beobachtung könnte zu einem besseren Verständnis der Resistenzausbildung und somit zu möglichen neuen Therapieansätzen führen.

Im ersten Teil der Arbeit wurden hormonsensitive MCF-7 Mammakarzinom Zelllinien eingesetzt, um den möglichen Einfluss der mEH auf die *antiestrogen binding site* (AEBS) zu untersuchen. Die Ergebnisse zeigten, dass nach Behandlung mit Tamoxifen und dem AEBS-Inhibitor DPPE keine Änderung des Zellwachstums beobachtet werden konnte. Somit hat die mEH als Untereinheit der AEBS keinen Einfluss auf die Tamoxifenwirkung.

Auf Grund der kompetitiven Wirkung von Östrogenen und Antiöstrogenen, könnte mEH die Tamoxifenbehandlung auf indirektem Weg über den Östradiol-( $\beta E_2$ -)signalweg beeinflussen. Um dies zu untersuchen wurde ein ERE- (*estrogen response element*)-Reportergenkonstrukt verwendet und die  $\beta E_2$ -Antwort nach Behandlung mit Tamoxifen oder  $\beta E_2$  und Transfektion von mEH oder mEH\_6C

(verkürzte mEH, die durch ein früheres Stop-Codon kein aktives Zentrum beinhaltet) untersucht. Es zeigte sich eine Sensitivierung gegenüber  $\beta E_2$  nach Überexpression von mEH\_6C. Des Weiteren konnte nach Inhibition der mEH mittels siRNA eine Hemmung der  $\beta E_2$ -Antwort beobachtet werden. Analysen der mRNA von pS2 ( $\beta E_2$ -Zielgen) und dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) zeigten eine Inhibition in Abwesenheit der mEH.

In einem weiteren, hormonell regulierten System, dem Corpusendometrium der Frau, sollte eine mögliche hormonelle Regulation der mEH innerhalb des Menstruationszyklus untersucht werden. Es zeigte sich nach Analyse der Paraffinschnitte eine signifikante Erhöhung der mEH-Expression im Verlauf des Zyklus. Während der Schwangerschaft erreichte diese ihren Höhepunkt.

Da die mEH-Expression Ähnlichkeiten zur Progesteronexpression im Verlauf des Zyklus aufweist, wurde im Zellkultursystem eine mögliche Regulation der mEH durch Progesteron (Medroxy Progesteronacetat, MPA) untersucht. Anhand von zwei Endometrium-Zelllinien, der ER $\alpha$ -positiven (ER $\alpha$ +) ECC1PRAB-72 (PRA+, PRB+) und der ER $\alpha$ -negativen (ER $\alpha$ -) IKPRAB-36 (PRA+, PRB+) konnte gezeigt werden, dass MPA die mEH-Expression in Abhängigkeit des ER $\alpha$  hoch reguliert.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mEH einen regulatorischen Einfluss auf die  $\beta E_2$ -Antwort ausübt und gleichzeitig die mEH-Expression durch Progesteron reguliert wird. Somit scheint die mEH eine bis dahin noch unbekannt Funktion im hormonellen System auszuüben, die eine wichtige Rolle spielen könnte und möglicherweise einen neuen Ansatz zur Überwindung der Antiöstrogenresistenz des Mammakarzinoms liefern könnte.

### 3 Einleitung

#### 3.1 *Das Mammakarzinom und seine hormonelle Regulation*

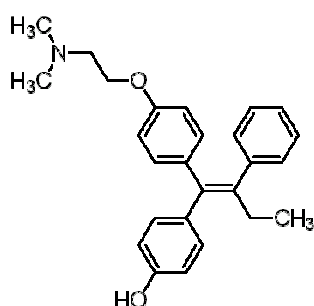
In Deutschland ist das Mammakarzinom die häufigste Krebserkrankung der Frau. Im Jahr 2002 erkrankten 55.150 Frauen an Brustkrebs, was einen Anteil von ca. 25 % aller Krebsneuerkrankungen ausmacht (Deutsche Krebsgesellschaft e.V.) und somit die häufigste Tumorerkrankung der weiblichen Bevölkerung darstellt. Im Durchschnitt erkrankt jede 8. bis 10. Frau im Laufe ihres Lebens an Brustkrebs und zwischen dem 30. und 60. Lebensjahr ist Brustkrebs die häufigste Todesursache bei Frauen in der westlichen Welt. Laut WHO starben 2005 weltweit ca. 502.000 Frauen an Brustkrebs.

Das Mammakarzinom kann durch verschiedenste Faktoren entstehen. Eine wichtige Rolle spielen jedoch hormonelle Einflüsse in der Entwicklung und dem weiteren Wachstum des Tumors. Dies zeigt sich auch in der Tatsache, dass 70 % aller Mammakarzinome Östrogenrezeptor-positiv (ER+) sind und durch Bindung des Liganden 17 $\beta$ -Östradiols ( $\beta$ E<sub>2</sub>) zur Proliferation angeregt werden. Dies geschieht durch Expression verschiedenster Gene, die das Wachstum und die Entwicklung des Brustgewebes und somit auch des Mammakarzinoms beeinflussen. Lippman et al. (1986) zeigte, dass Mammakarzinomzellen unter  $\beta$ E<sub>2</sub>-Behandlung Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, TGF $\alpha$ ) sezernieren, welche auf parakrinem Weg Tumorzellen und angrenzende Stromazellen zur Teilung anregen. Da das Mammakarzinom aber auch wachstumshemmende Stoffe sezerniert (z. B. TGF $\beta$ ) ist das Gleichgewicht zwischen Proliferations-induzierenden und -inhibitorischen Faktoren maßgeblich für das maligne Potenzial des Tumors. Durch eine endokrine Therapie kann dieses Gleichgewicht im hormonabhängigen Mammakarzinom zum Beispiel in die proliferations-inhibierende Richtung verschoben werden.

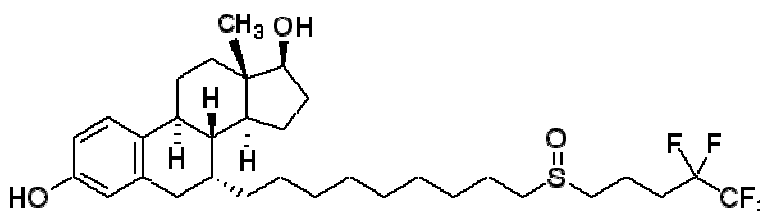
### 3.2 Antiöstrogene Therapie des Mammakarzinoms

Im hormonabhängigen Mammakarzinom werden Antiöstrogene häufig als endokrine Therapie eingesetzt. Sie wirken als kompetitiver Inhibitor gegenüber  $\beta E_2$ , da sie als Ligand des ER fungieren. Die Bindung des jeweiligen Liganden ( $\beta E_2$  bzw. Antiöstrogene) findet am ER mit Hilfe spezifischer Aminosäuren statt. Dabei binden  $\beta E_2$  bzw. Antiöstrogene an unterschiedliche Aminosäuren, wodurch der Rezeptor verschiedene Konformationen einnimmt und die Transkription unterschiedlicher Zielgene induziert (Katzenellenbogen BS et al. 1997). Durch Bindung von  $\beta E_2$  wird eine vollständige Aktivierung der beiden transaktivierenden Domänen (AF1 und AF2) des ER angeregt. Die Bindung von Antiöstrogenen dagegen inhibiert diese transaktivierenden Domänen teilweise (Bindung von Tamoxifen: AF2 inhibiert) oder vollständig (Bindung von Fulvestrant, ICI 182.720: AF1 und AF2 inhibiert) (Berry et al. 1990). Durch die partielle Inhibition durch Tamoxifen wird der ER nicht vollständig inhibiert (AF1 bleibt aktiv) und kann so als Komplex an AF1 abhängigen Promotoren die Transkription der entsprechenden Zielgene induzieren. Dies erklärt die Beobachtung, dass Tamoxifen im Brustgewebe eine antiöstrogene Wirkung zeigt, in anderen Geweben jedoch östrogenartige Wirkung entfalten kann (z. B. Knochengewebe), da Tamoxifen durch die unvollständige Inhibition der transaktivierenden Domänen als partielles Antiöstrogen wirkt.

(A)



(B)



**Abb. 1:** Strukturformel des Antiöstrogens 4-Hydroxytamoxifen (A) und Fulvestrant/ICI 182.780 (B)

### 3.3 Resistenzbildung in der endokrinen Therapie

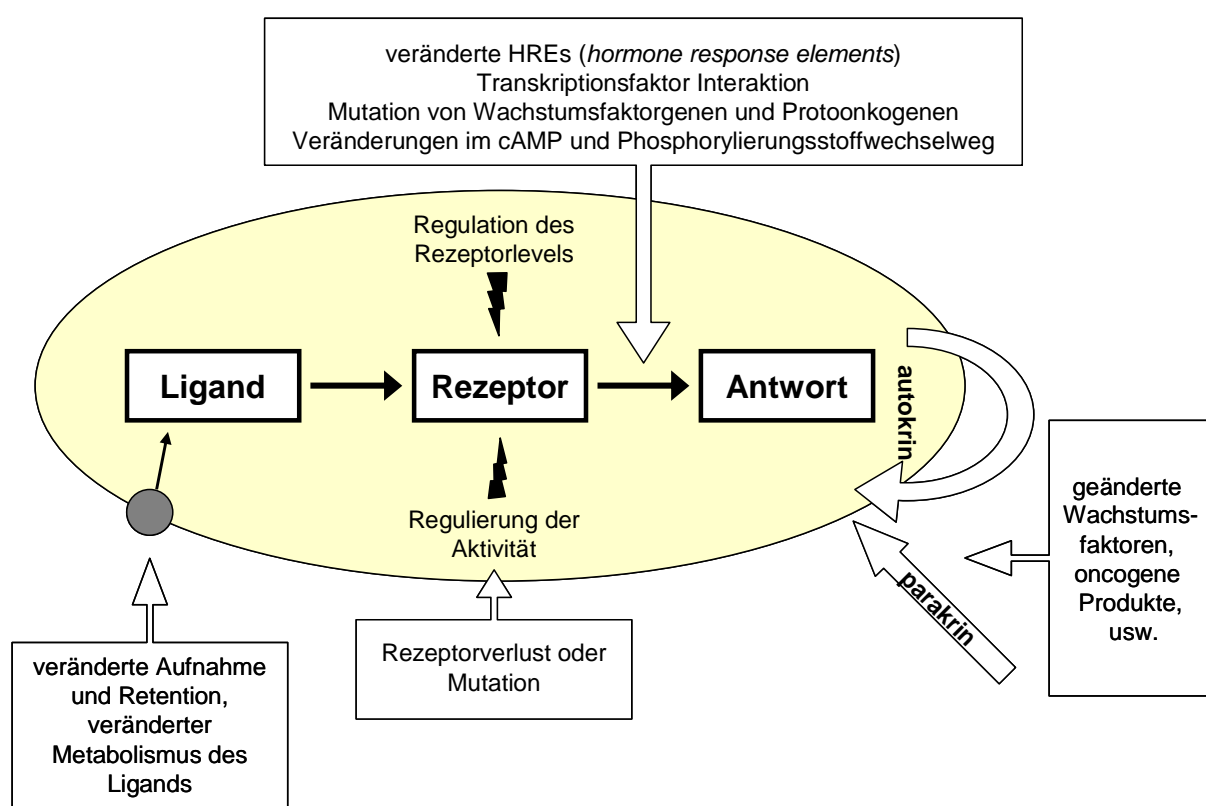
Wie bei Katzenellenbogen B.S. et al. (1997) beschrieben, sprechen 75 % aller Patientinnen mit ER-positivem (ER+) und Progesteronrezeptor-positivem (PR+) Mammakarzinom auf eine endokrine Therapie an. Allerdings kann es innerhalb der Behandlung zur Ausbildung von Resistenzen und somit zum Versagen der Therapie kommen. Katzenellenbogen J.A. et al. (1996) beschreiben die Selektivität eines Liganden mit Hilfe von drei Ebenen, die somit unterschiedliche Ansätze für eine Resistenzbildung ermöglichen. Die erste Ebene bezieht sich auf den Liganden selbst. Abhängig von seinem Metabolismus ist er in verschiedenen Geweben/Zellen unterschiedlich aktiv (selektive Bioaktivierung). Die zweite Ebene ist Rezeptorbezogen, d. h. die jeweilige Zusammensetzung der Rezeptoren (Konzentration, vorhandene Subtypen, Isoformen) bestimmt die Aktivität und kann in verschiedenen Geweben/Zellen variieren. Die dritte Ebene ist die effektorbezogene, d. h. die gleichen Liganden und Rezeptoren können in verschiedenen Geweben unterschiedliche Interaktionen und somit andere Gentranskriptionen auslösen. Dies zeigt, dass es verschiedene Ebenen der Wirkung eines Liganden gibt, die zu unterschiedlichen Resistenzmechanismen führen können.

Laut Katzenellenbogen B.S. et al. (1997) entstehen Antiöstrogen-Resistenzen innerhalb der endokrinen Therapie auf vier verschiedene Arten (siehe auch Abb. 2):

- (1) durch den Verlust oder durch Mutation des ER,
- (2) durch Störungen im Postrezeptorbereich, wie z. B. Änderungen im cAMP Stoffwechselweg oder innerhalb der Phosphorylierung, aber auch durch Veränderungen der Coregulator- und Transkriptionsfaktorinteraktion, da dies die transkriptionelle Aktivität des ER beeinflusst.
- (3) Änderungen in der Produktion von Wachstumsfaktoren oder Sensitivität gegenüber diesen Stoffen, aber auch in der parakrinen Zell-Zell-Interaktion können zur endokrinen Resistenz führen.
- (4) Als letzte Möglichkeit werden pharmakologische Veränderungen im Antiöstrogen beschrieben. Diese können ebenfalls zu Resistenzen führen, da sie Einfluss auf die Aufnahmerate aber auch auf den Metabolismus der Antiöstrogene ausüben können. Somit sind die Ausbildungen von Resistenzen

auf allen Ebenen der Ligandenselektivität möglich: Rezeptor-bezogen (1), auf Effektorebene (2) und (3) und auf Ebene des Liganden (4).

Unsere Gruppe konnte innerhalb der endokrinen Therapie ein Protein identifizieren, das offensichtlich eine Rolle im Verlauf der Tamoxifenresistenz spielt, die bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannt war. Fritz et al. (2001) konnten zeigen, dass die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) ein prognostischer Faktor der Tamoxifen Therapie sein könnte. Eine Studie mit 179 Patientinnen zeigte, dass eine hohe mEH Expression innerhalb des Mammakarzinoms signifikant mit einem schlechten Ausgang der Tamoxifentherapie korreliert. Die funktionellen Hintergründe sind bisher nicht bekannt.



**Abb. 2:** Modell zur Darstellung der zellulären Veränderungen, welche einer Antiöstrogen Resistenz zugrunde liegen können.

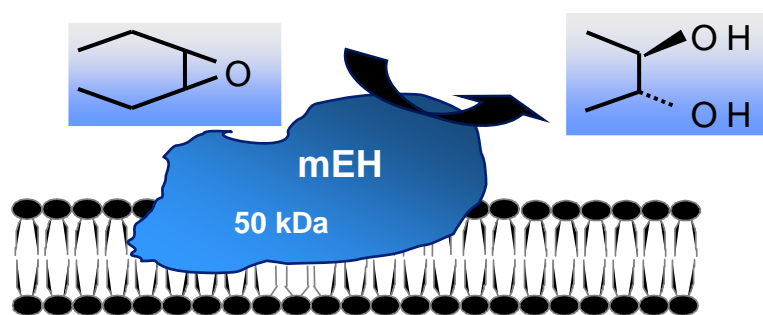
### 3.4 Die mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH) und ihre Rolle in der Entgiftung von Epoxiden

Die mEH ist in der Literatur vor allem als Phase I Enzym bei der Entgiftung von Epoxiden beschrieben (Oesch et al. 1973). Sie spielt eine wichtige Rolle in der Hydrolyse einer Vielzahl von Epoxiden (siehe auch Abb. 3) und deren



Zwischenprodukten (Seidegard et al. 1983; Guengerich et al. 1982). Ihre Sequenz ist innerhalb verschiedener Säugetierspezies hoch konserviert und sie wird in allen bisher untersuchten Organen exprimiert (Cresteil et al. 1985; Pacifici et al. 1983; Omiecinski et al. 1994). Substrate der mEH sind endogene Epoxidsteroidoide (Vogel-Bindel et al. 1982), aber auch Gallensäuren (von Dippe et al. 1996), was vermuten lässt, dass sie eine wichtige physiologische Rolle im Organismus spielt.

Nach Protein-Protein-Interaktionsanalysen konnten Taura et al. (2000) zeigen, dass CYP1A1, ein Mitglied der P450-Familie, mit mEH möglicherweise einen Komplex bildet. Beide Enzyme spielen eine wichtige Rolle im Verlauf des Arzneimittelmetabolismus.



**Abb. 3:** Schematische Darstellung der Hydrolyse von Epoxiden durch die mEH

### 3.5 mEH und AEBS

Obgleich der mEH vor allem die Entgiftung von Epoxiden zusammen mit Enzymen aus der P450-Familie zugeschrieben wird, findet man in der Literatur dennoch Hinweise auf einen mEH-Einfluss innerhalb der Antiöstrogentherapie. Mésange et al. beschrieben 1998, dass in der Rattenleber mEH ein Bestandteil der so genannten *antiestrogen binding site* (AEBS) ist. Die erstmals 1980 von Sutherland et al. beschriebene Antiöstrogenbindestelle ist unabhängig vom ER und zeigt eine hohe Affinität gegenüber Antiöstrogenen. Im Gegensatz zum ER zeigt die AEBS gleichwertige Affinitäten ( $K_d$   $1-2 \times 10^{-9}$  M) gegenüber den Antiöstrogenen Tamoxifen und 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT). ER hingegen bindet 4-OHT ( $K_d \sim 1 \times 10^{-10}$  M) mit ca. 50-fach höherer Affinität als Tamoxifen (Faye et al. 1983). Außerdem kann die Bindung von Tamoxifen an die AEBS nicht durch  $\beta E_2$  inhibiert werden (Kon 1983) womit dargestellt werden konnte, dass die AEBS eine Antiöstrogenbindestelle

unabhängig vom ER sein muss, da am ER die Bindung von  $\beta E_2$  mit der Bindung von Tamoxifen konkurriert. An die AEBS hingegen binden ausschließlich Antiöstrogene. Mit Hilfe von verschiedensten, synthetisch hergestellten Antiöstrogenderivaten wurden die möglichen Bestandteile des Multienzymkomplexes AEBS von verschiedenen Arbeitsgruppen untersucht: Fargin et al. (1988) konnten in Rattengewebe zwei Proteine isolieren, wobei das 50 kDa Protein durch partielle Sequenzierung der Peptide als Ratten-mEH identifiziert werden konnte. Das zweite Protein mit 40 kDa konnte nicht bestimmt werden. Allerdings konnte durch Überexpression der mEH keine Tamoxifenbindestelle rekonstruiert werden, was vermuten lässt, dass mEH alleine nicht ausreichend zur Bildung einer AEBS ist. Mésange et al. (1998 und 2002) konnten ebenfalls ein 50 kDa Protein isolieren und dieses als mEH identifizieren, ebenso wie ein Protein mit 40 kDa (1998). Bei späteren Untersuchungen an Rattengewebe im Jahr 2002 wurde erneut die mEH als Bestandteil der AEBS bestimmt und es konnten weitere Untereinheiten der AEBS isoliert und identifiziert werden, darunter mit 60 kDa die Carboxylesterase aus der Ratte, mit 14 kDa das *liver fatty acid binding protein* (L-FABP) der Ratte, und ein 27,5 kDa großes Protein, welches nicht weiter analysiert werden konnte. Auf Grund der Größe wurde jedoch vermutet, dass es sich bei diesem Protein um den Sigma I Rezeptor handelt, da Kedjouar et al. 1999 eine hohe Affinität zwischen synthetisierten AEBS Liganden und selektiven Sigma I Liganden zeigen konnte. Dies lässt die Vermutung zu, dass beide Bindestellen verwandte Entitäten besitzen können.

2004 konnten Kedjouar et al. durch Überexpression von  $3\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -Isomerase (D8D7I, 28 kDa) und  $3\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta^7$ -Reduktase (DHCR24, 40 kDa) in COS-7 Zellen eine Tamoxifenbindestelle mit hoher Affinität erzeugen. Somit ergab sich die Schlussfolgerung, dass D8D7I und DHCR24 als Untereinheiten für eine Tamoxifen-bindende AEBS notwendig sind. Interessant dabei ist, dass D8D7I in die Biosynthese des Cholesterols involviert ist und die Behandlung mit Tamoxifen zu einer Anreicherung von Cholesterolvorstufen führt.

### 3.6 mEH im hormonellen System

Da die mEH hauptsächlich im Bereich der Entgiftung untersucht wurde, ist nur wenig über ihre mögliche Rolle innerhalb des hormonellen Systems bekannt. Nicht nur ihre Funktion als strukturelle Untereinheit der AEBS, sondern auch ein weiterer Zusammenhang mit dem hormonellen Systems innerhalb des Insulinhaushalts ist beschrieben. Kim und Novak zeigten 2007 die Zusammenhänge zwischen den intrazellulären Signalwegen in der Insulin-vermittelten Regulation von Arzneimittel-metabolisierenden Enzymen. Sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene wird die mEH Expression durch Insulin und Glukagon geregelt. Durch Insulin wird die Expression erhöht, durch Glukagon reduziert. Außerdem ist die mEH Expression im Falle einer Diabeteserkrankung verringert (Kim et al. 2003). An Ratten konnte gezeigt werden, dass nach künstlicher Erzeugung eines Diabetes für fünf, sieben und zehn Tage die Erhöhung des Glucosespiegels im Blut die Aktivität der mEH auf 71 % (im Vergleich zur Kontrolle) reduzierte. Die Gabe von Insulin normalisierte die Enzymaktivität wieder. Unterzog man die Ratten dagegen für einige Zeit einer Hungerperiode, verringerte sich die Aktivität der mEH auf ca. 60 % (Thomas et al. 1989).

Eine weitere Funktion der mEH im hormonellen System wurde von Hattori et al. (2005) beschrieben, der nach Behandlung mit dem mEH Inhibitor EETCP (1,2-Epoxy-3,3,3-Trichloropropan) von kultivierten Granulosazellen eine reduzierte  $\beta E_2$ -Produktion aus Testosteron beobachtete. Dabei konnte ausgeschlossen werden, dass ETCP einen Einfluss auf die Aromatase ausübt, dem Enzym, welches für die Synthese von  $\beta E_2$  aus Testosteron verantwortlich ist. Durch Behandlung mit ETCP konnte keine Veränderung der Aromataseaktivität detektiert werden, im Gegensatz zur mEH, welche dosisabhängig von ETCP inhibiert wurde.

Ein direkter Einfluss der mEH auf die Wirkung von  $\beta E_2$  wurde bisher jedoch nicht beobachtet.

### 3.7 Ziel der Arbeit

In der Behandlung des Mammakarzinoms haben sich Antiöstrogene neben den Aromataseinhibitoren als wirkungsvolle endokrine Therapie erwiesen. Allerdings gibt es trotz nachweisbarer Östrogenrezeptoren bei ca. 30 % der Patientinnen kein Ansprechen auf die Therapie mit Antiöstrogenen (Paik et al. 1994). Die genauen Mechanismen hinter diesen Antiöstrogenresistenzen sind bisher unklar, jedoch essentiell für eine Verbesserung der Therapie bei diesen Patientinnen. Aus diesem Grund sollen in dieser Arbeit die funktionellen Hintergründe einer möglichen Resistenzausbildung aufgeklärt werden.

Hintergrund dieser Arbeit ist, dass Fritz et al. (2001) in seiner Studie zeigte, dass eine erhöhte mEH Expression im Mammakarzinom signifikant mit einem schlechten Verlauf der Tamoxifentherapie korreliert. Somit könnte die mEH einerseits als Prognosefaktor eingesetzt werden, andererseits könnte sie eine Rolle innerhalb der Mechanismen spielen, die zu einer Tamoxifenresistenz führen. Mögliche funktionelle Hintergründe dieser These sind bisher jedoch noch unklar und sollten in dieser Arbeit untersucht werden.

Somit lag ein Schwerpunkt der Arbeit in der funktionellen Analyse der mEH innerhalb des Mammakarzinoms. Dazu wurden hormonsensitive MCF-7 Zellen eingesetzt, die im ersten Teil auf eine mögliche funktionelle AEBS untersucht wurden. Außerdem wurde mit Hilfe des AEBS Inhibitors DPPE, der laut Kedjouar et al. (2004) die Bindung von Tamoxifen an die AEBS inhibiert, der Einfluss der AEBS auf die Tamoxifenwirkung in MCF-7 Zellen untersucht.

In weiteren Untersuchungen wurde durch Überexpression der mEH unter Behandlung mit  $\beta E_2$ , die Auswirkungen der mEH auf dieses hormonelle System untersucht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde mit Hilfe von Gewebeproben aus dem humanen Corpusendometrium versucht, die hormonelle Regulation der mEH zu ergründen. Durch immunhistochemische Färbungen von Paraffinschnitten in verschiedenen Menstruationszyklusphasen sollte die mEH Expression analysiert werden.

Im Endometriumzellsystem sollten weitere Regulationsanalysen unter MPA-Behandlung untersucht werden, um zusätzliche Informationen über die Funktion der mEH innerhalb der hormonellen Regulation zu erhalten.

## 4 MATERIAL

### 4.1 Chemikalien, Reagenzien und Enzyme

1 kb Plus DNA Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
100 bp DNA Leiter	Gibco BRL, Karlsruhe
2'-Deoxyadenosine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxycytidine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxyguanosine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
2'-Deoxythymidine 5'-Triphosphate	Amersham, Braunschweig
24-Well-Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
2-Mercaptoethanol	Sigma, Deisenhofen
30% Acrylamid/Bis solution 37,5 : 1	Bio-Rad, München
4-Hydroxytamoxifen	Sigma, Deisenhofen
6-Well-Zellkulturplatten	Nunc, Roskilde, DK
Agarose Ultra Pure	Gibco BRL, Karlsruhe
Albumin	Sigma, Deisenhofen
Ammoniumperoxidsulfat	Roth, Karlsruhe
Ampicillin	Roth, Karlsruhe
AMV Reverse Transkriptase	Stratagene, Amsterdam, NL
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Erembodegem, Belgien
Blotting-Papier	Schleicher & Schüll, Dassel
Bradford-Reagenz	BioRad, München
BSA	Sigma, Deisenhofen
DMEM	Gibco BRL, Karlsruhe
DMEM/F12	Gibco BRL, Karlsruhe
DMSO	Sigma, Deisenhofen
DNase I	Amersham, Braunschweig
DTT	Sigma, Deisenhofen
Dual-Luciferase Reporter Assay System	Promega, Mannheim
EcoRI	Gibco BRL, Karlsruhe

## MATERIAL & METHODEN

---

G418	Sigma, Deisenhofen
Gentamycin	Gibco BRL, Karlsruhe
Glycin	Serva, Heidelberg
HindIII	Gibco BRL, Karlsruhe
ICI. 182.780	Tocris, Bristol, UK
LB-Agar	Sigma, Deisenhofen
LB-Medium	Sigma, Deisenhofen
Na-Pyruvat	Gibco BRL, Karlsruhe
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Oligonukleotide	MWG, Ebersberg
PMSF	Sigma, Deisenhofen
Poinceau-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein-Assay	Bio-Rad, München
PstI	Roche, Mannheim
PVDF-Membran	Roche, Mannheim
QIAfilter Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Rainbowmarker	Amersham, Braunschweig
Ready-To-Go T4 DNA Ligase	Amersham, Braunschweig
RNA Transcription Kit	Stratagene, Amsterdam, NL
RNeasy Mini-Kit	Qiagen, Hilden
SDS	Sigma, Deisenhofen
SuperScript First-Strand Synthesis	Gibco BRL, Karlsruhe
T75 Zellkulturflaschen	Corning, Wiesbaden
TA Cloning Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Taq-DNA-Polymerase	Gibco BRL, Karlsruhe
Temed	Roth, Karlsruhe
Thermo Sequenase	Amersham, Braunschweig
fluorescent labelled primer cycle	
TGF $\beta$ 1	R&D, Minneapolis, USA
Tris	Roth, Karlsruhe
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Karlsruhe
Western Blocking Reagent	Roche, Mannheim

X-Gal	Roth, Karlsruhe
Xhol	NEB, Frankfurt a. M.

#### 4.1 Medien, Puffer, Lösungen

##### 4.1.1 Medien für eukaryotische Kulturen

CCS: Vorbehandeltes FCS für die Zellkultur: 500 ml FCS wird für 2 Stunden bei 37 °C mit 2 U/ml Sulfatase inkubiert und zweimal für 30 min. bei 56 °C hitzeinaktiviert

DMEM 10 % FCS  
DMEM  
FCS 10 %  
Pyruvat 1 mM  
Gentamycin 50 µg/ml

DMEM 5 % CCS  
DMEM  
CCS 5 %  
Pyruvat 1 mM  
Gentamycin 50 µg/ml

DMEM/F12 5 % FCS  
DMEM/F12 (50/50)  
FCS 5 %  
Gentamycin 1 mM

DMEM/F12 5 % CCS  
DMEM/F12 (50/50)  
CCS 5 %  
Gentamycin 1 mM

#### 4.1.2 Medien für prokaryotische Kulturen

SOC	Trypton 2 %
	Hefe-Extrakt 0,5 %
	NaCl 10 mM
	KCl 2,5 mM
	MgCl <sub>2</sub> 10 mM
	MgSO <sub>4</sub> 10 mM
	Glucose 20 mM

#### 4.1.3 Puffer

Homogenisierungspuffer	Kaliumphosphat 0,1 M
	D-Saccharose 250 mM

Microsomenpuffer	Kaliumphosphat 0,1 M
	Glycerine 10 %

10 x Ligations Puffer:	Tris-HCl, pH 7.5 60 mM
	MgCl <sub>2</sub> 60 mM
	NaCl 50 mM
	BSA 1 mg/ml
	β-Mercaptoethanol 70 mM
	ATP 1 mM
	DTT 20 mM
	Spermidin 10 mM

10 x PCR Puffer:	Tris-HCl, pH 8,8 100 mM
	KCl 500 mM
	MgCl <sub>2</sub> 15 mM
	Gelatine 0,01 % (w/v)



## MATERIAL & METHODEN

---

10 x Zell-Lysis-Puffer	Tris-HCl pH 7.5 200 mM NaCl 1,5 mM EDTA 10 mM EGTA 10 mM Triton X-100 10 % Sodiumphosphat 25 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 10 mM Leupeptin 10 µg/ml
Transferpuffer:	Tris 48 mM Glycin 39 mM SDS 0,037 % Methanol 20 % pH auf 9.1 einstellen
PonceauS Lösung (Sigma-Aldrich, Steinheim)	Ponceau S 0,1 % Essigsäure 5 %
TBS 10 x	NaCl 1,45 M KCl 25 mM Tris 250 mM pH 7.4 mit konz. HCl einstellen
TBST 1 x	1:10 Verdünnung 10 x TBS-Konzentrat + Tween 20 0,2 %
Laufpuffer 10 x	Tris 250 mM Glycin 2 M SDS 10 %
Stripping-Puffer	Tris HCl pH 6.7 62,5 mM SDS 2 % (w/v) β-Mercaptoethanol 100 mM (vor Gebrauch zugeben)

## MATERIAL & METHODEN

---

Lämmli-Puffer 5 x	Tris-HCl pH 6.8 312,5 mM Glycerol 25 % SDS 10 % Bromphenolblau 0,05 % β-Mercaptoethanol 25 %
SBG loading Puffer 5 x	Tris-Cl pH 8.0 500 mM Glycerol 50 % Sera Blue G 2,5 %
SBG Kathodenpuffer	L-Histidin Puffer 100 mM
SBG Anodenpuffer	100 mM Tris-Cl pH 8.8
RIPA	50mM Tris/HCl pH8 250 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Nonidet p-40  Proteinase Inhibitor Cocktail III (1:1000) PMSF (1:1000) → jeweils erst vor Gebrauch zugegeben
RIPA/BSA	RIPA-Puffer (siehe oben) 1% BSA NaAc

#### 4.1.4 Lösungen

4-Hydroxytamoxifen	10 <sup>-4</sup> M in 96% Ethanol
APS 10 %	1 g Ammoniumperoxiddisulfat ad. 100 ml aq. dest.
ICI 182.780	10 <sup>-6</sup> M in 96% Ethanol
SDS 10 %	10 g Natriumdodecylsulfat ad 100 ml aq. dest.
Tris-HCl 0,5 M	30 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 6,8 mit konz. HCl einstellen, aq. dest ad 500 ml
Tris-HCl 1,5 M	90,75 g Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, pH 8,8 mit konz. HCl einstellen, aq. dest ad 500 ml
X-Gal 4 %	40 mg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactosid in DMF
2 % Serva Blue G	2 g Serva Blue G ad. 100 ml aq. dest.

## 4.2 Prokaryoten und Eukaryoten

### 4.2.1 Zelllinien

Als Modell für die Untersuchungen im Mammakarzinom wurden einerseits die Östrogenrezeptor-positive (ER+) Zelllinie MCF-7 und andererseits die Östrogenrezeptor-negative (ER-) Zelllinie MDA-MB-435 verwendet. Beide Zelllinien wurden aus Flüssigkeitsansammlungen in der Pleurahöhle von Mammakarzinompatientinnen etabliert.

Zur Untersuchung der hormonellen Abhängigkeit der mikrosomalen Epoxidhydrolase-Expression im Corpusendometrium wurden als Zellmodell die von Leen J. Blok zur Verfügung gestellten Endometriumzelllinien IKPRAB36 und ECC1-PRAB72 verwendet. Diese endometrialen Zelllinien sind stabil transfiziert und benötigen deshalb folgende zusätzlichen Supplemente im Kulturmedium:

<i>Zelllinie</i>	<i>Stabil transfiziert mit:</i>	<i>Supplement</i>
ECC1-PRAB72	PR A, PR B, ER $\alpha$	Hygromycin [250 $\mu$ g/ml] Hygromycin [250 $\mu$ g/ml],
IKPRAB36	PR A, PR B	G418 [250 $\mu$ g/ml]

#### 4.2.2 Bakterien

*E. coli* INV $\alpha$  Bakterien wurden von Invitrogen (Groningen, NL) bezogen und zur Plasmidherstellung eingesetzt.

#### 4.3 Primer, Plasmide und Antikörper

##### 4.3.1 Primer

Folgende Primer / Oligonukleotide wurden bei den Untersuchungen eingesetzt

CES2 RT1 as	TGG TCC AGG TAG CCC CAG TT
CES2 RT1 se	ATC CAG TAC CGC CTG GGT GT
DHCR7 RT1 as	ACC CGG AAG ATG TAG TAG CC
DHCR7 RT1 se	TTC TTC TGG AAC GAA ACC TG
EBP RT1 as	CCA GGA TGT ATC GGC TGT CT
EBP RT1 se	TTG CAG TGT GTG GGT TCA TT
FABP1 RT1 as	CTT CCC ATT CTG CAC GAT TT
FABP1 RT1 se	TTT CTC CGG CAA GTA CCA AC
FABP3 RT1 as	TGG TAG GCT TTG GTC ATG CTG
FABP3 RT1 se	TTG CAC GCC TGC TCT CTT GT
GUS as	ATG CCC TTT TTA TTC CCC AGC
GUS se	GCT CAT TTG GAA TTT TGC CG
mEH LC1 as	TGG TCC AGG TGG AAA ACT TC
mEH LC1 se	TCT ACC CTG ACC CTC CTC CT
OPRS1 RT1 as	CTC CAC CAT CCA TGT GTT TG
OPRS1 RT1 se	TGG GCT GAG ATC TCG GAT AC
pS2as	TGG GAC TAA TCA CCG TGC TG
pS2se	CCA GAC AGA GAC GTG TAC AG

### 4.3.2 Plasmide

Folgende Plasmide wurden bei den Untersuchungen eingesetzt

pGL3-Basic	Luciferase Reporter Vektor (Phontius pyralis Luciferase) ohne eukaryotische Promotoren oder Enhancer Sequenzen	Promega, Mannheim
pGL3-ERE	Östrogen-sensitiver Reportervektor, welcher die Sequenz des ERE ( <i>estrogen response element</i> ) enthält, kloniert in pGL3-Basic	Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. M. Buck
phRLTK	Kontroll-Luciferase-Plasmid, enthält das Renilla Gen unter Kontrolle eines Herpes simplex Virus Thymidinkinase Promotors (HSV-TK)	Promega, Mannheim
pcDNA3.1(+)	Eukaryotischer Expressionsvektor mit CMV Promotor und einer MCS ( <i>multiple cloning site</i> )	Invitrogen, Groningen, Holland
pcDNA3.1(+)-mEH*	Expressionsvektor für mikrosomale Epoxidhydrolase (mEH): pcDNA3.1(+) mit mEH als Insert (Nukleotide 239-1716, NM_000120) unter Kontrolle des CMV Promotors	Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. M. Buck
pcDNA3.1(+)-mEHkurz	Expressionsvektor für verkürzte mEH: pcDNA3.1(+) mit verkürzter mEH als Insert (Nukleotide 239-930, NM_000120) unter Kontrolle des CMV Promotors	Generiert von I. Abele

### 4.3.3 Antikörper

Folgende Antikörper wurden zur Proteinanalyse eingesetzt:

Zielprotein	Antikörper	Hersteller
mEH	anti-mEH	Generiert und zur Verfügung gestellt von Dr. U. Zanger
	anti-mEPHX	BD Bioscience, San Jose, CA USA
ER $\alpha$	anti-ER $\alpha$	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA USA
PR	anti-PR	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
GAPDH	anti-GAPDH	BIODESIGN International® and OEM Concepts Brands, Saco, ME USA

### 4.4 Geräte und Hilfsmittel

Agarose-Gelkammer	B1A	PeqLab, Erlangen
Bakterienschüttler	HAT	Infors, Bottmingen
Blotting Kammer	Fast-Blot B33	Biometra, Göttingen
DNA-Messung	GenQuant	Pharmacia Biotech, Freiburg
Luminometer	Autolumat Plus	Berthold, Bad Wildbach
Pipetten	0,5-10 $\mu$ l, 10-100 $\mu$ l, 200-1000 $\mu$ l	Eppendorf, Hamburg
Sequenzier	Li-Cor 4000	MWG, Ebersberg
Software	GraphPad Prism	GraphPad Software Inc., San Diego, USA

## MATERIAL & METHODEN

---

Spannungsquellen	Power Pac P25 (Fast-Blot)	Biometra, Göttingen
	Power Pac 3000 (PAGE)	BioRad, München
	E143 (Agarose-Gele)	
Spectrophotometer	8452 A	
Thermo-Cycler	LightCycler	Roche, Mannheim
	MiniCycler MJ Research	
	PE9600	Perkin Elmer
	(Sequenzier-PCRs)	
Vertikal- elektrophoresekammer	Protean II xi Cell	BioRad, München
Zellzahlbestimmung	Casy-Counter	Schärfe System, Reutlingen
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus, Fellbach

## 5 METHODEN

### 5.1 Zellbiologische Methoden

#### 5.1.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Alle Zelllinien wurden in Inkubatoren bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert. Die Kultivierung der Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und MDA-MB-435 erfolgte in „Dulbecco's Modified Eagle Medium“ (DMEM, Invitrogen), welches mit 10 % FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat (Invitrogen) und 50 µg/ml Gentamycin (Invitrogen) versetzt wurde.

Für die endometrischen Zelllinien wurde DMEM/F12 (50/50), versetzt mit 5 % FCS, 1 mM Natrium-Pyruvat und 50 µg/ml Gentamycin, zur Kultivierung verwendet.

Alle Zelllinien wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium abgenommen, mit 1x PBS das restliche Medium abgewaschen und anschließend mit Trypsin-EDTA (0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA) die Zellen von der Kulturflasche abgelöst. Die Zellen wurden in ein frisches Kulturmedium aufgenommen und, entsprechend ihrem Wachstum, verdünnt in eine neue Kulturflasche überführt.

#### 5.1.2 Behandlung eukaryotischer Zellen

Um Zellen mit endokrin-aktiven Substanzen behandeln zu können, wurden die Zellen eine Passage vor Versuchsbeginn in ein Kulturmedium gesetzt, welches anstelle von FCS 5 % CCS (*charcoal-stripped FCS*) enthält. CCS wird eingesetzt, um die Effekte von Hormonen in verschiedensten *in vitro* Systemen aufzuklären. Durch Aufreinigung des FCS mittels Aktivkohle und Sulfatase können enthaltene Hormone entfernt werden, wodurch eine definierte Behandlung mit zugesetzten Hormonen ermöglicht wird. Die Behandlungsreagenzien wurden dabei aus den entsprechenden Stammlösungen in einer 1:1000 Verdünnung dem Medium zugesetzt, bzw. das vorherige Medium durch neues Medium mit entsprechenden Zusätzen ersetzt.

#### 5.1.3 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Für alle transienten Transfektionen von eukaryotischen Zellen mit Expressions- und Reporter-genvektoren wurde *Effectene* von Qiagen verwendet. Dieses



Transfektionsreagenz ermöglicht eine lipidische, nicht-liposomale Transfektion einer Vielzahl an eukaryotischer Zellen.

Der im Kit enthaltene *EC-Puffer* in Kombination mit dem ersten Reagenz *Enhancer* führt zur Kondensation der DNA. Durch Zugabe des *Effectenes* bilden sich kondensierte *Effectene*-DNA-Komplexe, welche spontan Micellen gleicher Größe bilden und so einen DNA-Transfer in eukaryotische Zellen ermöglichen.

Sämtliche Transfektionen wurden in einem Verhältnis 1:10 von *Effectene*:DNA nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

### 5.1.4 Transiente Transfektion für Luciferase Reporterassay

Für anschließende Messungen im Luciferase-Reporterassay wurden MCF-7 bzw. MDA-MB-435 eine Passage vor Versuchsbeginn in Medium mit CCS passagiert und einen Tag vor der Transfektion in eine mit 24 Vertiefungen ausgestattete Gewebekulturplatte mit 50.000 Zellen/Vertiefung ausgesät. Pro Transfektionsansatz wurde die entsprechende DNA-Mischung (genaue Zusammensetzung siehe im jeweiligen Ergebnisteil) vorbereitet. Als interne Kontrolle des Luciferase-Assays wurden pro Ansatz 10 ng pRLTK verwendet, welcher das Renilla-Luciferase-Gen trägt. Mittels dieser Kontrolle konnte die Transfektionseffizienz überprüft werden und eventuelle Wachstumsunterschiede (z.B. durch unterschiedliche Behandlungen) bei der späteren Auswertung berücksichtigt werden. Außerdem wurden vom Reportergenkonstrukt (pGL3-ERE) bzw. vom Kontrollkonstrukt (pGL3-Basic) 20 ng pro Ansatz eingesetzt. Diese Konstrukte führten zur Transkription der *FireFly*-Luciferase, welche im Reportergenkonstrukt durch ERE (*estrogen response element*) kontrolliert wurde.

Zusätzlich wurden Co-Transfektionen mit dem mEH-Expressionsvektor (pcDNA3.1(+)-mEH\*) bzw. dem leeren Expressionsvektor (pcDNA3.1) und in der ER $\alpha$ - Zelllinie MDA-MB-435 zusätzlich mit dem ER $\alpha$ -Expressionsvektor pcMV5-hER $\alpha$  durchgeführt. Die entsprechenden Mengen und Zusammensetzungen sind im Ergebnisteil aufgeführt. Grundsätzlich wurde für jeden Ansatz die Gesamtmenge an DNA durch Auffüllen mit dem Leervektor (pcDNA3.1) konstant gehalten, um Effekte durch unterschiedliche Transfektionsansätze auszuschließen.

Die DNA wurde anschließend entsprechend den Angaben des Herstellers mit dem Transfektionskit *Effectene* von Qiagen in die Zellen transfiziert.

Innerhalb der Inkubationszeiten wurden die Zellen mit neuem, eventuell behandeltem Medium versorgt. Dazu wurde das vorherige Medium vorsichtig abgesaugt und pro Vertiefung je 300 µl des neuen (behandelten) Mediums auf die Zellen gegeben. Bei einer Behandlung der Zellen wurde das Endvolumen von 500 µl (300 µl Behandlungsmedium + 200 µl Transfektionsansatz) beachtet.

Im Anschluss an Behandlung und Transfektion wurden die Zellen für 24 h bei 37 °C inkubiert, geerntet und für die Messung lysiert.

### **5.1.5 Transiente Transfektion für anschließende RNA- bzw. Protein-Ernte**

Die Transfektion wurde entsprechend der Ansätze für den Luciferase-Reporterassay durchgeführt. Pro RNA-Isolation wurden je 4 Vertiefungen mit dem identischen Ansatz eingesetzt, für Proteinisolation je 6 Vertiefungen. Um die Daten mit den Ergebnissen aus dem Reporterassay vergleichen zu können, wurden die DNA-Mischungen entsprechend übernommen. Nach 24 h wurden die Zellen geerntet und entsprechend weiter verarbeitet.

## **5.2 Detektion des mRNA-Levels**

### **5.2.1 cDNA-Synthese**

Mit Hilfe der isolierten mRNA und dem *SuperScript. III First-Strand Synthesis System for RT-PCR* von Invitrogen wurde nach Angaben des Herstellers cDNA hergestellt.

### **5.2.2 LightCycler quantitative RT-PCR**

Die aus mRNA synthetisierte cDNA wurde mittels quantitativer RT-PCR analysiert. Die quantitative RT-PCR ist eine Amplifikationsmethode für Nukleinsäuren, die auf dem Prinzip der herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung bietet. Die Quantifizierung wird mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen durchgeführt, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Die Fluoreszenz nimmt proportional mit der Menge der Amplikons zu und am Ende eines Laufes wird die Quantifizierung durch Analyse der exponentiellen Phase der PCR vorgenommen. Nur innerhalb der exponentiellen Phase ist eine korrekte Quantifizierung möglich, da innerhalb dieser Phase optimale Reaktionsbedingungen herrschen.

## MATERIAL & METHODEN

Durchgeführt wurde die quantitative LightCycler RT-PCR mit folgendem PCR-Ansatz:

	Finalkonzentration	Volumen [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O		2,34
5 x PCR-Puffer	1 x	2
dNTPs (2,5 mM)	250 $\mu$ M	1
se Primer (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	0,2
as Primer (10 $\mu$ M)	0,2 $\mu$ M	0,2
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	3 mM	0,6
BSA 0,1 %	0,01 %	1
SYBR Green 1:1000 (Roche: 1988131)		0,5
Taq Pol. 5 U/ $\mu$ l (Invitrogen)	0,8 U	0,16
cDNA	2,0 $\mu$ l	

Die PCR wurde mit 40 Zyklen durchgeführt, welche folgende Phasen beinhalteten:

Denaturierung	95 °C	2 s
Primer-Annealing	Spezifisch für jeweiliges Primerpaar	8 s
Elongation	72 °C	10 s

Im Anschluss an die 40 Zyklen fand eine Elongation bei 72 °C für 2 min statt.

Primer-Annealing und Fluoreszenzmessung fand bei für das jeweilige Primerpaar spezifischen Temperaturen statt, ebenso wurde die cDNA je nach Primerpaar unverdünnt, 1:10 oder 1:100 verdünnt eingesetzt. Die jeweiligen Bedingungen sind in der folgenden Auflistung dargestellt:

Zielgen	Primerpaar	cDNA	Annealing-T	Fluoreszenz-T
ER $\alpha$	ERaRT1se/as	1:10 verdünnt	68 °C	83 °C
pS2	pS2se/as	1:100 verdünnt	62 °C	85 °C
PR	PRseRT2/PRasRT2	unverdünnt	60 °C	88 °C

### 5.3 Detektion des Reportergens Luciferase

Zur Messung der Luciferase Aktivität in den Zelllysaten wurde das *Dual Luciferase® Reporter Assay System* von Promega verwendet. Durch Verwendung der Luciferase

des Leuchtkäfers *Phontinus pyralis* und der Luciferase des *Renilla reniformis* ermöglicht dieses System eine Analyse der Reporterexpression in eukaryotischen Zellen und eine Quantifizierung beider Reportergene in einem Ansatz.

Die Aktivität des zu untersuchenden ERE-Promotors wurde durch Expression der FireFly-Luciferase bestimmt, wohingegen die Renilla-Luciferase mit Hilfe des phRLTK Vektors als interne Transfektions- und Zellwachstumskontrolle diente.

Die Zellen wurden 24 h nach Transfektion und Behandlung geerntet. Dazu wurde das Medium von den Zellen abgesaugt, pro Vertiefung mit 1 ml 1x PBS gewaschen und die Zellen in je 100 µl 1x *Passive Lysis Buffer* (Promega) für 15 min bei RT unter Schütteln lysiert. Von diesem Zelllysat wurden anschließend 40 µl in ein Luminometerröhrchen überführt und im *Luminometer Autolumat Plus* (Berthold, Bad Wildbad) gemessen. Durch automatische Zugabe von 50 µl *Luciferase Assay Reagent II (Lar II)* von Promega wurde im ersten Messschritt die Aktivität der FireFly Luciferase bestimmt. Bei der zweiten Messung wurde durch automatische Zugabe von 50 µl 1x *Stop & Glo Reagenz* (Promega) die Lumineszenz der FireFly Luciferase nicht nur gestoppt, sondern auch die Renilla-Luciferase Aktivität gemessen. Durch Bildung des Quotienten aus beiden Messungen (FireFly/Renilla) ergibt sich eine relative Luciferase-Aktivität der gemessenen Vektoren, wodurch sich durch Verwendung des ERE-Promotors Rückschlüsse auf die  $\beta E_2$ -Antwort ergeben.

### 5.4 Protein-Analyse und Präparation

#### 5.4.1 Protein Isolierung und Quantifizierung

Um Proteine aus Zellen zu ernten, wurde der 10 x Cell Lysis Puffer 1:10 verdünnt und mit Protease Inhibitoren versetzt. Dann wurden die geernteten Zellen nach einmaligem waschen mit 1x PBS in Lysepuffer resuspendiert und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellkompartimente durch Zentrifugation bei 13.000 upm und 4 °C für 15 min entfernt und der Überstand mittels der kolorimetrischen Methode von Bradford quantifiziert.

Als Eichkurve zur Quantifizierung wurde BSA in Konzentrationen von 2-12 µg/ml verwendet, welches in 20 %igem Bradfordreagenz gelöst wurde. Die Proben wurden in einem entsprechenden Volumen aufgenommen und nach 5 min Inkubation bei RT

wurde die Absorption bei 595 nm in einem Spektralphotometer (Hewlett-Packard, Waldbronn) bestimmt.

Anhand des Standards konnte dann die Probenkonzentration ermittelt werden.

### 5.4.2 Mikrosomen- und Cytosolisolierung

Frischgewebeprobe aus dem Pathologischen Institut des Robert-Bosch-Krankenhauses (Stuttgart) wurden in gleich große Stücke geschnitten und bei -80 °C aufbewahrt.

Zur Mikrosomenisolierung wurden die Proben auf Eis aufgetaut, in Homogenisierungspuffer für 2 x 10 min im *Fast Prep FP 120* (Bio 101<sup>®</sup> Systems) lysiert und anschließend der Überstand bei 10.000 g und 4 °C für 20 min zentrifugiert, um die festen Zellkompartimente zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und bei 100.000 g und 4 °C für 60 min zentrifugiert. Dieser Zentrifugationsschritt führt zur Abtrennung der mikrosomalen Fraktion vom Cytosol (= Überstand). Nachdem das Cytosol in ein neues Gefäß überführt wurde, konnte die mikrosomale Fraktion (= Pellet) im Mikrosomenpuffer resuspendiert werden.

Anschließend wurde von allen Proben die Proteinkonzentration mittels Bradford (siehe oben) bestimmt.

### 5.4.3 Probenvorbereitung für SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese ermöglicht es, Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, ohne Einfluss von Struktur oder Ladung. Dazu wird die gewünschte Menge an Protein mit 5 x Lämmli Puffer (1/5 des Endvolumens) versetzt und mit Wasser auf das entsprechende Endvolumen aufgefüllt. Anschließend werden die Proben 5 min bei 95 °C denaturiert.

Durch die Behandlung mit  $\beta$ -Mercaptoethanol werden die Disulfidbindungen zu freien Sulfhydrylgruppen reduziert, wodurch die Sekundärstrukturen zerstört werden. Durch die Inkubation bei 95 °C werden zusätzlich die Tertiär- und Quartärstrukturen der Proteine zerstört. Außerdem lagert sich Natriumdodecylsulfat (SDS) an die Proteine an, welche dadurch eine konstant negative Ladung erhalten, welche später die gleichmäßige Auftrennung während der Elektrophorese ermöglicht.

#### 5.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die vorbereiteten Proteine wurden mittels eines denaturierenden SDS-Polyacrylamidgels elektrophoretisch nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Dazu wurde zunächst ein Trenngel (ca. 16 x 10 cm) gegossen und nach dessen Polymerisation ein Sammelgel (ca. 16 x 5 cm) aufgebracht, in welches ein entsprechender Kamm zur Bildung von Ladetaschen eingebracht wurde (Zusammensetzung der Gele siehe Tab. 1). Das polymerisierte Gel wurde dann in einer senkrechten Elektrophoresekammer eingespannt, nach Herstellerangaben mit Laufpuffer befüllt, und am Ende wurden die Proteinproben in die Ladetaschen gegeben. Die Auftrennung fand unter konstanter Spannung je nach Gelkonzentration und Zeitrahmen bei 30-170 V statt.

	Trenngele			Sammelgel
	7,5%iges Gel	10%iges Gel	12%iges Gel	
Acrylamid	6,25 ml	8,3 ml	9,95 ml	1,35 ml
H <sub>2</sub> O	12 ml	9,95 ml	8,3 ml	6,1 ml
1,5 M TRIS pH 8.8	6,22 ml	6,22 ml	6,22 ml	-
0,5 M TRIS pH 6.8	-	-	-	2,5 ml
10% SDS	250 µl	250 µl	250 µl	100 µl
Temed	25µl	25µl	25µl	10µl
10% APS	250µl	250µl	250µl	100µl

**Tab 1:** Zusammensetzung der SDS-Gele (Trenngele und Sammelgele).

#### 5.4.5 Probenvorbereitung für native Polyacrylamidgelelektrophorese

Für native Proteinelektrophorese wurden die Proteine entsprechend der Anleitung im Abschnitt „Protein Isolierung und Quantifizierung“ isoliert, die Konzentration bestimmt

und zwischen 50-100 µg entsprechend verdünnt. Diese Proteinlösung wurde dann mit 5 x *Serva Blue G* (SBG von Serva) *loading* Puffer vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend konnten die Proben auf das SDS-freie Gel aufgetragen werden.

#### 5.4.6 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die native Proteinauftrennung wurde das Mini-PROTEAN Tetra Electrophoresis System (BioRad) verwendet. Diese Methode ermöglicht es, Proteine bzw. Proteinkomplexe in ihrer nativen Form zu untersuchen. Dabei werden die Proteine nicht nur nach ihrer Größe sondern auch aufgrund ihrer eigenen Ladung aufgetrennt. Es wurde im Bereich der Anode 100 mM Tris-Cl pH 8.8 eingesetzt und im Bereich der Kathode 100 mM Histidin-Lösung (pH 8.0), welche im ersten Drittel der Elektrophorese mit 0,002 % SBG versetzt (vorsichtige Zugabe mittels 2 % SBG-Lösung nach Probenauftragung) und für den Rest der Elektrophorese gegen Histidin-Lösung ohne SBG ausgetauscht wurde. Die Proben wurden nach der nativen Probenaufarbeitung mit einem 4-20 % *Tris-Glycin Gel* (BioRad) aufgetrennt, wobei die Elektrophorese bei 4 °C und 70 V für 4 h stattfand. Anschließend wurde das Gel auf eine Nitrocellulosemembran geblottet.

#### 5.4.7 Western Blot

Die aufgetrennten Proteine innerhalb des Polyacrylamidgels wurden nach der Elektrophorese mittels elektrophoretischen Transfers nach Towbin et al. (1979) auf eine proteinbindende Nitrocellulosemembran übertragen. Dabei werden die Proteine durch Anlegen einer Spannung auf die Membran übertragen.

Dazu wurden die Polyacrylamidgele zunächst in Transferpuffer für 5 min inkubiert und anschließend der Transfer in einer Blotkammer (Whatman Biometra FastBlot B44) nach der Semidry-Transfermethode für 20 min bei 400 mA durchgeführt. Um die Transfereffizienz zu überprüfen, wurde anschließend eine Ponceau-S-Färbung durchgeführt, dazu wurde die Nitrocellulosemembran 10 min in Ponceau-S-Lösung inkubiert, Hintergrundfärbung mit H<sub>2</sub>O entfernt und anschließend die unspezifische

Anfärbung der Proteine überprüft. Zur Entfärbung wurden die Membranen mit TBST 3 x 10 min gewaschen.

#### **5.4.8 Nachweis Membran-gebundener Proteine durch Antikörpern**

Durch Antigen-spezifische Antikörper (Primärantikörper) wurden die auf der Nitrocellulosemembran immobilisierten Proteine nachgewiesen. Durch Bindung eines Sekundärantikörpers, der spezifisch für die Spezies des Primärantikörpers ist, kann die Antigenbande detektiert werden. Dieser sekundäre Antikörper ist mit Peroxidase gekoppelt, die eine Substratumwandlung katalysiert, bei der Chemilumineszenz entsteht.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden diese unspezifischen Bindungsstellen durch vorherige Inkubation der Membran mit Blockingreagenz über 1 h bei Raumtemperatur (RT) abgesättigt.

Die entsprechenden Bedingungen für die jeweiligen Primärantikörper sind in der folgenden Tabelle aufgelistet:



	mEH	EPHX	ERalpha	GAPDH	PR
<b>Blocking</b>	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST
Temperatur	RT	RT	RT	RT	RT
Zeit	> 1 h	> 1 h	> 1 h	> 1 h	> 1 h
<b>1. AK:</b>	anti-mEH	anti-EPHX	anti-ER $\alpha$	anti-GAPDH	anti-PR
verdünnt in:	5 % MM-TSBT	5 % MM-TSBT	5 % MM-TBST	5 % MM-TSBT	5 % MM-TSBT
Verdünnung	1:3000	1:500	1:2000	1:100000	1:1000
Temperatur	4 °C	4 °C	4 °C	RT	4 °C
Zeit	über Nacht	über Nacht	über Nacht	> 1 h	über Nacht
<b>2. AK:</b>	anti-rabbit	anti-mouse	anti-mouse	anti-mouse	anti-mouse
verdünnt in:	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST	5 % MM-TBST	5 % MM-TSBT	5 % MM-TBST
Verdünnung	1:5000	1:5000	1:5000	1:10000	1:5000
Temperatur	RT	RT	RT	RT	RT
Zeit	> 1 h	> 1 h	> 1 h	> 1 h	> 1 h

<b>Größe:</b>	50 kDa	50 kDa	66 kDa	35 kDa	PR <sub>A</sub> : 94 kDa PR <sub>B</sub> : 114 kDa
---------------	--------	--------	--------	--------	---

**Tab 2:** Bedingungen zur Detektion von Proteinbanden mittels spezifischen Antikörpern (AK).  
Abkürzungen: MM-TBST Magermilch-TBST

Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten (Blocking, Primär-, Sekundärantikörper) wurde die Membran je zweimal für 10 min in 1x TBST gewaschen. Alle Wasch- und Inkubationsschritte wurden auf einem Schüttler durchgeführt, um eine regelmäßige Benetzung der Membran zu gewährleisten. Nach Inkubation des Sekundärantikörpers wurde die Membran erneut zweimal für 10 min mit 1 x TBST gewaschen und anschließend mit dem Peroxidasesubstrat (500  $\mu$ l 20 x *Lumiglo Reagent* (CellSignaling) + 500  $\mu$ l 20 x *Peroxid* (CellSignaling) + 9 ml H<sub>2</sub>O) für 5 min bei RT unter Lichtausschluß inkubiert. Das Substrat wird durch die Peroxidase in einer lichterzeugenden Reaktion umgesetzt. Dieses Signal kann dann mittels Chemilumineszenzkamera (*CDD Camera LAS-1000*, Fuji) detektiert und mit Hilfe des Programms *Aida 2.1* (Raytest, Straubenhardt) ausgewertet werden.

## 5.5 DNA Analyse und Präparation

### 5.5.1 Transformation von DNA in *E. coli* Bakterien

Zur *in vivo* Amplifikation von Expressionsvektoren wurde *E. coli* verwendet. Dazu wurde pro Transformation 50 µl kompetenter *E. coli* INVαF' Zellen auf Eis aufgetaut und 10-100 ng DNA vorsichtig zupipettiert. Dieser Ansatz wurde 30 min auf Eis inkubiert und anschließend 90 sec bei 42 °C einem Hitzeschock ausgesetzt. Nach diesem Hitzeschock wurden die Zellen sofort wieder für 2 min auf Eis gekühlt und anschließend 250 µl SOC-Medium zugegeben. Diese Zellsuspension wurde 1 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert und anschließend auf Ampicillin-haltigen (0,1 mg/ml) LB-Agarplatten ausplattiert. Diese wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

### 5.5.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das *Mini-* bzw. *Maxi-Plasmid Purification Kit* von Qiagen verwendet.

Diese beiden Kits beruhen auf der Methode der alkalischen Lyse von Bakterien, wobei die Zellen lysiert werden und gleichzeitig die gesamte DNA (genomische und Plasmid-DNA), sowie die Proteine, denaturiert werden. Durch Neutralisation des Zelllysats befindet sich ausschließlich die Plasmid-DNA in Lösung. So kann diese durch Zentrifugationsschritte und eine Aufreinigung über Anionen-Austausch-Säulen aufgereinigt und gewaschen werden. Durch Elution mit H<sub>2</sub>O kann zum Schluss die Plasmid-DNA eluiert werden.

Die genauen Schritte wurden nach Anleitung des Herstellers durchgeführt.

### 5.5.3 Konzentrationsbestimmung von DNA

Um die Konzentration der DNA-Lösung zu bestimmen, wurde mit Hilfe eines Photometers (*Genequant II*) die Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm gemessen. Dabei wurde eine Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm verwendet, woraus sich folgende Berechnung der DNA-Konzentration ergibt:

$$\text{DNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = 0,05 * E_{260} * \text{Verdünnungsfaktor}$$

Zusätzlich zur DNA-Konzentration konnte mit Hilfe des Photometers die Reinheit der DNA bestimmt werden. Dazu wurden zusätzlich zur Extinktion bei  $\lambda = 260$  nm auch die Extinktion  $\lambda = 280$  nm (Absorptionsmaximum bei Proteinen) bestimmt. Der Quotient aus 260 nm/280 nm zeigt die Reinheit der DNA-Lösung: Liegt der Wert zwischen 1,8 und 2,0 kann die DNA als rein betrachtet werden. Niedrigere Werte deuten auf eine Verunreinigung durch Proteine hin, wohingegen höhere Werte auf eine Verunreinigung durch RNA hinweisen.

### 5.5.4 Restriktionsverdau

Um Expressionsvektoren genauer zu charakterisieren bzw. herzustellen, wurden Restriktionsenzyme aus Bakterien eingesetzt. Diese Enzyme können doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiesterbindung spalten und führen dies Sequenz-spezifisch durch.

Für die Reaktion wurden entsprechend den Herstellerangaben vorgegebene Units (meist 2-5) an Enzym pro  $\mu\text{g}$  DNA eingesetzt, der spezifische Restriktionspuffer zupipettiert und mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt. Anschließend wurde laut Herstellerangaben inkubiert (meist bei 37 °C für 1 h).

### 5.5.5 Ligation

Die zuvor mit Restriktionsenzymen verdaute Plasmid-DNA wurde mit den entsprechend verdauten DNA-Fragmenten vermischt und mit Hilfe der *T4-DNA Ligase* (Roche) ligiert. Dazu wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu\text{l}$  mit 1  $\mu\text{l}$  *T4-DNA Ligase* und 0,1  $\mu\text{l}$  *10 x T4-DNA-Ligase Puffer* über Nacht bei 14 °C inkubiert und anschließend in *E. coli* transformiert (siehe oben).

### 5.5.6 DNA-Amplifikation

Zur *in vitro* DNA-Amplifikation wurde die 1987 von Kary B. Mullis entwickelte Methode der Polymerase-Kettenreaktion eingesetzt. Für die PCR-Reaktion wurde eine thermostabile Taq-Polymerase verwendet.

Zur Durchführung der PCR-Reaktion wurde die Ausgangs-DNA (1-100 ng genomische oder Plasmid-DNA) mit 1  $\mu\text{l}$  1,25 mM dNTPs, je 4  $\mu\text{l}$  10  $\mu\text{M}$  sense-

Primer und antisense-Primer, 0,25 µl Taq-Polymerase, sowie 5 µl 10 x PCR-Puffer vermischt, und mit H<sub>2</sub>O<sub>dest.</sub> auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde der Ansatz in einem Thermocycler inkubiert, wobei das Standardprotokoll folgende Bedingungen hatte: Denaturierung bei 95 °C für 6 min, anschließend 35 Zyklen mit einer Denaturierungsphase bei 95 °C für 1 min, Anlagerung der Primer bei ca. 60 °C (je nach Primerpaar optimiert) für 1 min, Elongation (DNA-Synthese) bei 72 °C für 2 min und im Anschluss an diese 35 Zyklen eine abschließende Elongationsphase bei 72 °C für 5 min.

Parameter, wie die Anlagerungstemperatur der Primer und die Zeitspanne der Elongationsphase, wurden entsprechend der jeweiligen Primerpaare und deren Schmelztemperaturen bzw. der Amplikongröße angepasst.

Im Anschluss wurde die Amplifikation elektrophoretisch analysiert, um unspezifische Produkte ausschließen zu können.

### 5.5.7 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um störende Einflüsse der zusätzlichen PCR-Komponenten in weiteren Arbeitsschritten zu verhindern, wurden Amplikons vor der weiteren Bearbeitung mittels des *Qiaquick PCR-Purification Kits* (Qiagen) nach Herstellerangaben aufgereinigt.

### 5.5.8 Sequenzierung

Um die Sequenz von bestimmten DNA-Abschnitten zu kontrollieren wurden Sequenzierungen auf der Basis nach der von Sanger, Nickeln und Coulson (Sanger et al. 1977) entwickelten Methode in Form des „*cycle-sequencing*“ Protokolls (Lee et al. 1992) durchgeführt.

Für die Durchführung dieses Protokolls wurde das ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Applied Biosystems) eingesetzt. Dieser Mix enthält bereits dNTPs, markierte dNTPs, Taq-Polymerase, MgCl<sub>2</sub> und Reaktionspuffer, so dass zu 8 µl dieses Mix nur noch 0,4-0,5 µg Template-DNA und 3,2 pmol Primer zugegeben werden mussten. Im Anschluss wurde eine Sequenzier-PCR unter folgenden Bedingungen durchgeführt: Auf die Denaturierung für 2 min bei 96 °C folgten 25 Zyklen mit 10 sec Denaturierung bei 96 °C, Primer-Anlagerung bei

50 °C für 5 sec und Elongation für 4 min bei 60 °C. Nach Durchführung der Sequenzier-PCR wurde die DNA in 120 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen, mit 15 µl 3 M Natriumacetat pH 5,2 und 375 µl 100 % Ethanol gefällt und mit Hilfe von 11 µl Dextranblau angefärbt. Durch Zentrifugation bei 13000 upm und 4 °C für 20 min wurde die gefällte DNA isoliert, der Überstand dekantiert und das DNA-Pellet mit 250 µl 100% Ethanol gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13000 upm und 4 °C für 5 min wurde der Überstand dekantiert, das DNA-Pellet mindestens 15 min an der Luft getrocknet und anschließend in 20 µl H<sub>2</sub>O gelöst.

Die so aufgereinigte DNA wurde dann in einem *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* analysiert.

## *5.6 Immunhistochemische Analyse der Corpusendometrium Proben*

### **5.6.1 Verarbeitung von Gewebe und Patientendaten**

Aus den archivierten Patientenproben des Pathologischen Instituts des Robert-Bosch-Krankenhauses wurden, ohne vorherige Klassifizierung, Corpusendometrien verschiedener Zyklusphasen ausgewählt und immunhistochemisch auf ihre mEH-Expression untersucht. Die Anamnese wurde dabei mit Hilfe des Patientenblattes für jeden Patienten erstellt. Indikationen, wie z. B. Blutungsunregelmäßigkeiten, Blutungen innerhalb der postmenopausalen Phase oder Abort waren dabei am häufigsten vorhanden.

Zur Analyse der mEH-Regulation innerhalb des menstruellen Zyklus der Frau, während der Schwangerschaft bzw. nach der Menopause wurden vier Patientengruppen unterschieden:

- (1) Erste Zyklushälfte (Proliferationsphase)
- (2) Zweite Zyklushälfte (Sekretorische Phase)
- (3) Schwangerschaft (Abort Material unter Ausschluss der Mola)
- (4) Postmenopause (Atrophisches Endometrium)

### **5.6.2 Immunhistochemische Färbung**

Die Färbung von mEH, Progesteronrezeptor (PR), Östrogenrezeptor α (ERα) und pS2 (βE<sub>2</sub>-Zielgen) wurde mit Hilfe des *Dako REAL™ EnVision™ Detection System*

durchgeführt. Für die mEH Färbung wurde ein Antikörper eingesetzt, dessen Spezifität bereits in früheren Veröffentlichungen mit Hilfe von Western Blot Analysen beschrieben wurde (Fritz et al. 1996). Es handelt sich dabei um einen Primärantikörper aus Kaninchen, welcher gegen die mikrosomale Epoxidhydrolase gerichtet ist.

Die eingesetzten Verdünnungen und die Antikörper, welche zur Färbung von PR, ER $\alpha$  und pS2 verwendet wurden, sind in Tabelle 2 beschrieben. Als Sekundärantikörper wurde das *Dako REAL<sup>TM</sup> EnVision<sup>TM</sup>/HRP, Rabbit/Mouse (ENV) detection reagent* entsprechend der Anleitung des Herstellers verwendet.

Um die endgültige Färbereaktion zu erhalten, wurde das Zweikomponenten-Substrat System (*Dako REAL<sup>TM</sup> Substrate Buffer and Dako REAL<sup>TM</sup> DAB<sup>+</sup> Chromogen*) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt, welches in einer unlöslichen braunen Färbung resultiert. Außerdem wurden folgende Kontrollen verwendet:

- (1) Lebergewebe als Positivkontrolle
- (2) Negativkontrolle (Auslassen des Primärantikörpers)
- (3) CK18 Färbung (Dako).

### 5.6.3 Analyse immunhistochemischer Proben

Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden von mindestens zwei Personen unabhängig voneinander begutachtet. Die Auswertung erfolgte im Vergleich zur mEH-Expression in Leberproben (= 100 %) und wurde in vier Kategorien bzw. Intensitätsfaktoren entsprechend der folgenden Tabelle eingeteilt:

<b>Intensitätsfaktor</b>	<b>% mEH Expression der Leber</b>
3	100
2	bis zu 50
1	weniger als 25
0	negativ

Der so ermittelte Intensitätsfaktor wurde mit dem prozentualen Anteil der exprimierenden Zellen mit Hilfe folgender Formel zur Auswertung der Schnitte eingesetzt:

$$\text{Expressionsintensität} = \text{Intensitätsfaktor} \times \% \text{ exprimierender Zellen}$$

Daraus resultiert ein Minimum von 0 (negative Probe: Intensitätsfaktor 0 x 0 % exprimierende Zellen) und ein Maximum von 300 (mEH Expression vergleichbar zur positiv Kontrolle Leber: Intensitätsfaktor 3 x 100 % exprimierende Zellen).

### 5.7 Statistische Auswertung

Für statistische Auswertungen, vor allem der immunohistochemischen Analysen der mEH-Expression im Corpusendometrium, wurde *GraphPad Prism Version 4.03* (t-test, ANOVA) eingesetzt.

Wenn keine expliziten Angaben vorlagen, wurden alle weiteren Analysen durch Angabe des Mittelwertes  $\pm$  SEM dargestellt.

## 6 Ergebnisse

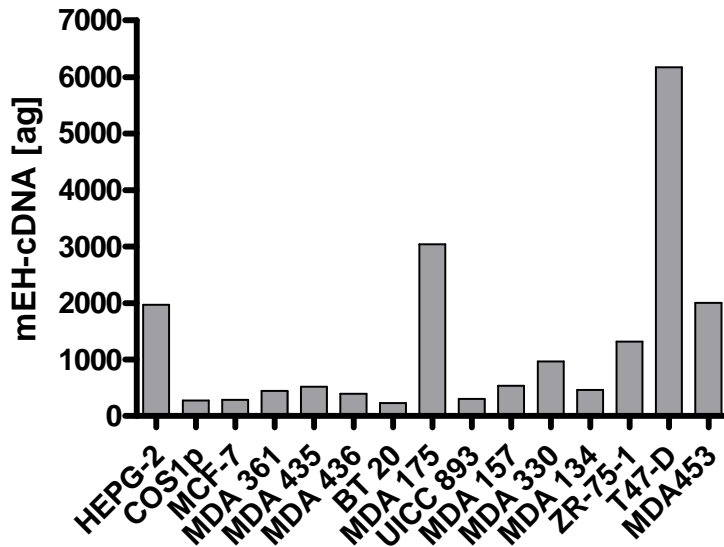
### 6.1 Funktionelle Analyse

Die mEH konnte in Zusammenhang mit dem Verlauf der Tamoxifentherapie des Mammakarzinoms gebracht werden (Fritz et al. 2001), was sie zu einem möglichen Prognosefaktor der Therapie macht. Die funktionellen Hintergründe ihrer denkbaren Wirkung im endokrinen System sind jedoch unklar. Aus diesem Grund sollte im ersten Teil der Arbeit die Funktion der mEH im endokrinen System des Mammakarzinoms analysiert werden. Dazu wurde nach einem geeigneten Zellsystem gesucht, anhand dessen die Wirkung der mEH beobachtet werden kann. Im verwendeten Zellsystem sollte keine endogene mEH-Expression vorhanden sein oder eine Expression, die niedrig genug sein sollte, um die Effekte überexprimierter mEH deutlich zu sehen.

#### 6.1.1 Untersuchung der mEH-Expression in Mammakarzinomzelllinien

In der Literatur wird beschrieben, dass die mEH-Expression in allen bisher untersuchten Geweben messbar ist (Coller et al. 2001; Hammock et al. 1997), allerdings stark im Expressionsniveau zwischen verschiedenen Spezies, Organen oder Individuen variiert. Dies könnte darauf hinweisen, dass die mEH eine wichtige Rolle innerhalb der Zelle spielt und offensichtlich einer starken Regulation unterliegt. Um ein geeignetes Zellsystem zu finden, wurde zunächst die mEH-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels RT-PCR analysiert. Im Vordergrund standen vor allem Mammakarzinomzelllinien, es wurden jedoch auch eine Leberkarzinomlinie (HepG2) und eine Nierenzelllinie (COS-1p) auf ihre mEH-Expression untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 dargestellt.

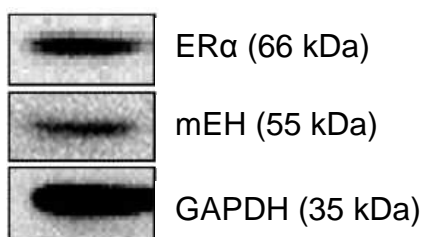




**Abb. 4:** Analyse der mEH-Expression in verschiedenen Zelllinien mittels RT-PCR.

Aus Abb. 4 wird ersichtlich, dass die mEH in den verschiedenen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert wird, es gibt jedoch keine mEH-negative Zelllinie. Als Positivkontrolle für die Proteinexpression wird in der Literatur vielfach Lebergewebe eingesetzt. Wie in Abb.4 zu erkennen ist, findet man in der Leberkarzinomzelllinie HepG-2 einen deutlich erhöhten mEH mRNA Level, der sich von den überwiegenden Mammakarzinomlinien abhebt. Nur in den Linien MDA 175 und MDA 435 findet man ebenfalls erhöhte Expressionslevel. In T47D ist die mEH-Expression im Vergleich dazu noch deutlich verstärkt (über Faktor 3). Betrachtet man die drei Mammakarzinomlinien, die mEH deutlich erhöht exprimieren, so handelt es sich bei T47D und MDA 453 um Östrogenrezeptor-positive (ER+) Zelllinien und bei MDA 175 um eine ER-negative (ER-) Zelllinie.

In der ER+ Mammakarzinomlinie MCF-7 ist die Expression auf mRNA-Ebene gering. Überprüft man jedoch die Proteinexpression mittels Western Blot, ist zu erkennen, dass auch hier eine deutliche mEH-Expression vorhanden ist. Somit findet man in diesen Zellen zwar eine endogene mEH-Expression, die aber immer noch niedrig genug ist, um eine Überexpression deutlich zu erkennen (Abb. 5).



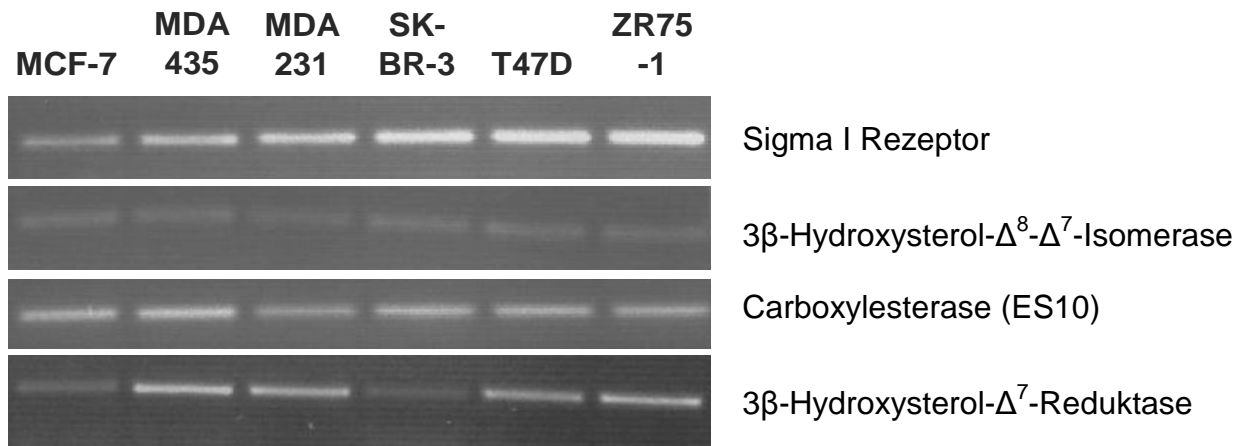
**Abb. 5:** Analyse der endogenen mEH-Expression in MCF-7 Zellen mittels spezifischen Antikörpers (im Vergleich zur Expression von ER $\alpha$  und GAPDH).

Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die mEH in allen Mammakarzinomzelllinien, aber auch in Zelllinien aus anderen Geweben, wie HepG-2 oder COS-1p, basal exprimiert wird.

### 6.1.2 mEH als Bestandteil der AEBS

Die Funktion der mEH als Entgiftungsenzym in Kooperation mit den Enzymen aus der P450 Familie wurde bisher am besten untersucht. Eine weitere Funktion der mEH, die noch nicht vollständig aufgeklärt werden konnte, ist ihre Rolle innerhalb der AEBS. Die mEH wird als konstruktiver Bestandteil der AEBS beschrieben, der eine Rolle bei der Strukturbildung des Enzymkomplexes spielt, es konnte jedoch keine direkte Funktion bei der Bindung von Tamoxifen nachgewiesen werden (Mésange et al. 1998 & 2002). Diese Funktion innerhalb der AEBS könnte den Einfluss der mEH auf die Tamoxifentherapie der Patientinnen in der Studie von Dr. Fritz (Pathologisches Institut, Robert Bosch Krankenhaus, Stuttgart) erklären (Fritz et al. 2001). In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte Expression der mEH im Verlauf der Tamoxifentherapie des Mammakarzinoms mit einem schlechteren Therapieverlauf der Patientinnen korrelierte. Möglicherweise wird durch die Bildung einer Tamoxifen-bindenden AEBS im Mammakarzinom Tamoxifen von seiner proliferationsinhibierenden Wirkung abgehalten. Aus diesem Grund wurde als erster Schritt untersucht, ob in den verwendeten Mammakarzinomzelllinien die in der Literatur beschriebenen Bestandteile der AEBS vorhanden sind. Es handelte sich dabei um die mEH, welche in allen Mammakarzinomzelllinien exprimiert wird (siehe Abb. 4). Weitere Bestandteile waren  $3\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta^8$ - $\Delta^7$ -Isomerase und  $3\beta$ -Hydroxysterol- $\Delta^7$ -Reduktase (Kedjouar et al. 2004), Carboxylesterase und *liver fatty acid binding protein* (L-FABP) wie von Mésange et al. 2002 beschrieben und möglicherweise auch ein Sigma I Rezeptor (Kedjouar et al. 1999).

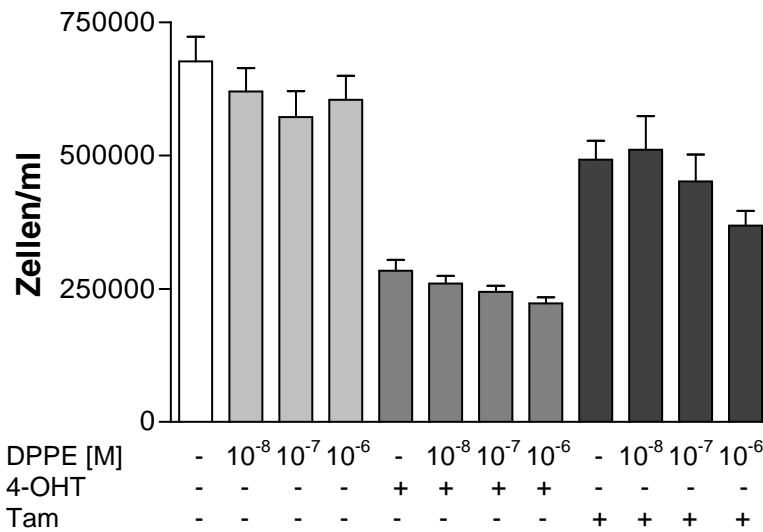
Es wurde mittels mRNA Analyse die Expression der einzelnen Untereinheiten der AEBS in verschiedenen Mammakarzinomzelllinien untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 dargestellt.



**Abb. 6:** Darstellung der AEBS Untereinheiten in Mammakarzinomzelllinien mittels RT-PCR. Die in der Literatur beschriebenen Bestandteile werden alle, außer L-FABP (Daten nicht gezeigt), exprimiert.

In den ausgewählten Zelllinien konnten die meisten AEBS Komponenten identifiziert werden, wenn auch mit unterschiedlichen Expressionsintensitäten. Einzig das von Mésange et al. (2002) in Rattenlebern nachgewiesene L-FABP konnte in den von uns ausgewählten humanen Mammakarzinomzelllinien auf mRNA-Ebene nicht identifiziert werden.

Da in MCF-7 Zellen die meisten Untereinheiten der AEBS exprimiert werden, wurde im nächsten Schritt die Funktionalität der AEBS in MCF-7 untersucht. Es sollte geklärt werden, ob die AEBS durch die Bindung von Tamoxifen dessen proliferationsinhibierende Wirkung auf die MCF-7 Zelllinie aufheben kann. Dazu wurden die Zellen mit dem AEBS-Inhibitor DPPE behandelt, welcher zu den Diphenylmethanderivaten von Tamoxifen gehört und die Bindung von Tamoxifen an die AEBS durch Blockade der Bindestelle inhibiert (Kedjouar et al. 2004). Zusätzlich wurde entweder das Vehikel EtOH bzw. die Antiöstrogene 4-Hydroxytamoxifen (4-OHT) bzw. Tamoxifen (Tam) zugegeben. Anschließend wurde das Zellwachstum nach 5 Tagen ermittelt, da zu diesem Zeitpunkt die beste Tamoxifenwirkung in MCF-7 beobachtet werden konnte. Durch Verwendung des AEBS-Inhibitors DPPE wird die Antiöstrogenbindestelle blockiert. Sollte Tamoxifen an dieser Stelle binden, kann dies durch Zugabe von DPPE verhindert werden, wodurch Tamoxifen als Inhibitor der Proliferation wirken kann.



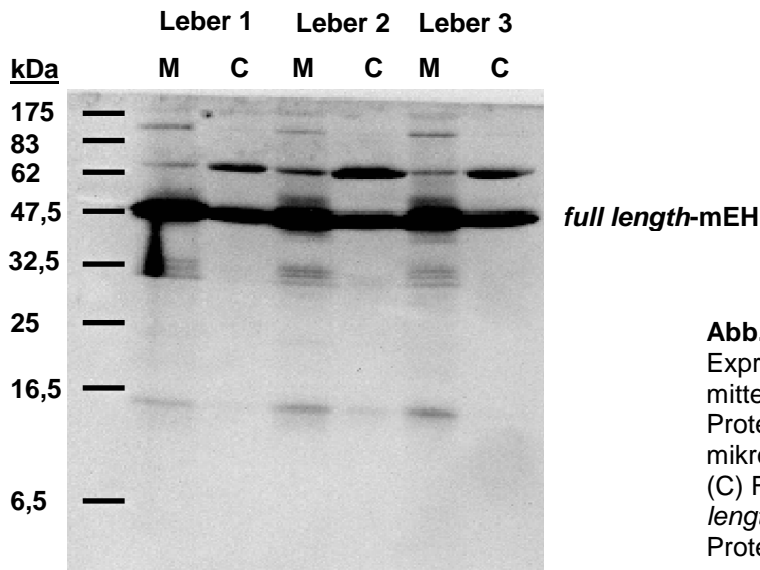
**Abb. 7:** Zellproliferationsassay zur Analyse des DPPE-Einflusses auf die Tamoxifenwirkung in MCF-7 Zellen. Durch Behandlung mit dem AEBS-Inhibitor DPPE und gleichzeitiger Behandlung mit der Kontrolle EtOH (weiß bzw. hellgrau), 4-OHT (mittelgrau) oder Tam (dunkelgrau) konnte gezeigt werden, dass in MCF-7 die AEBS keinen Einfluss auf die Inhibition der Zellproliferation durch Tamoxifen hat.

Die Ergebnisse zeigen jedoch, dass durch DPPE-Zugabe der proliferationsinhibierende Effekt von 4-OHT bzw. Tam nicht aufgehoben, sondern sogar leicht verstärkt wird (Abb. 7). Somit hat die Blockade der AEBS-Bindestelle keinen Einfluss auf die Tamoxifenwirkung in MCF-7 Zellen, was den Schluss zulässt, dass die DPPE-Bindungsposition der AEBS Tamoxifen nicht bindet und so die Proliferationsinhibition unterdrückt. Durch DPPE-Bindung an die AEBS und zusätzlicher Behandlung mit Tamoxifen scheint die proliferationsinhibierende Wirkung von Tam verstärkt zu werden (25 % Proliferationsinhibition bei 10<sup>-6</sup> M DPPE; normiert auf Kontrolle).

Die These, dass Tamoxifen durch Bindung an die AEBS von seiner Wirkung als Proliferationsinhibitor abgehalten wird, konnte in diesem Modellsystem nicht bestätigt werden. Da sich keine Änderung der Tamoxifenwirkung nach Behandlung mit dem AEBS-Inhibitor DPPE zeigte, kann auch keine Aussage über die Rolle der mEH innerhalb der AEBS in diesem Modellsystem gemacht werden. Möglicherweise kann die Regulation der Tamoxifentherapie durch die mEH nicht mit ihrer Funktion innerhalb der AEBS in Verbindung gebracht werden.

### 6.1.3 mEH-Proteinexpression in Lebergewebe

Die höchste Konzentration an mEH findet sich in Lebergewebe. Daher wurde dieses Gewebe zur Analyse der Proteinexpression eingesetzt und, nach einer Auftrennung in die mikrosomale und cytosolische Fraktion, die mEH Proteinexpression mittels eines mEH-spezifischen Antikörpers (AK) untersucht. (Abb. 8).



**Abb. 8:** Analyse der mEH-Expression in Lebergewebe mittels mEH-spezifischem AK. Die Proteinproben wurden in mikrosomale (M) und cytosolische (C) Fraktionen aufgetrennt. *Full length*-mEH hat eine theoretische Proteingröße von 50 kDa.

Abb. 8 zeigt eine starke Bande auf Höhe der 47,5 kDa Markerbande, die der vom Hersteller beschriebenen Laufposition der *full length*-mEH (theoretisches Molekulargewicht: 50 kDa) entspricht. Vor allem in den Mikrosomenfraktionen ist ein hoher Proteingehalt detektierbar, somit konnte die Expression in den mikrosomalen Membranen nachgewiesen werden. Durch die starke Expression im Lebergewebe findet sich auch eine mEH-Expression im Cytosol, welche möglicherweise auf Verunreinigung während der Aufreinigung zurück zu führen ist. Durch die starke Expression der mEH in Lebergewebe konnte im Verlauf der Aufreinigung von Mikrosomen durch Ultrazentrifugation eine Verunreinigung des Cytosols nicht verhindert werden.

Zusätzlich zur Hauptbande bei 50 kDa sind weitere Proteinbanden mit verschiedenen Größen zu erkennen. Bei den Banden > 62 kDa könnte es sich um Vorstufen der mEH handeln (mutmaßliche Epoxidhydrolase-Vorstufe wurde in *Rhizobium leguminosarum* bv. *viciae* detektiert: <http://beta.uniprot.org/uniprot/Q1M4G3>). Bei den detektierten Banden mit 32 und 16,5 kDa könnte es sich möglicherweise um Splicingvarianten der mEH handeln. Möglicherweise auch um mutierte Versionen der mEH, die durch verfrühte Stoppcodons zu verkürzten Varianten führen. Spekulativ könnte zum Beispiel der Sequenzbereich 393-399 bp zu so einer verkürzten Variante führen. Die Wiederholung von sieben Cytosinen könnte durch die Deletion eines Cytosins zu einer Verschiebung des Leserasters um eine Base und dadurch zu einem früheren Stoppcodon führen. Das Ergebnis wäre eine verkürzte mEH mit einem Molekulargewicht von etwa 17 kDa, was der untersten Bande in Abb. 8 entsprechen

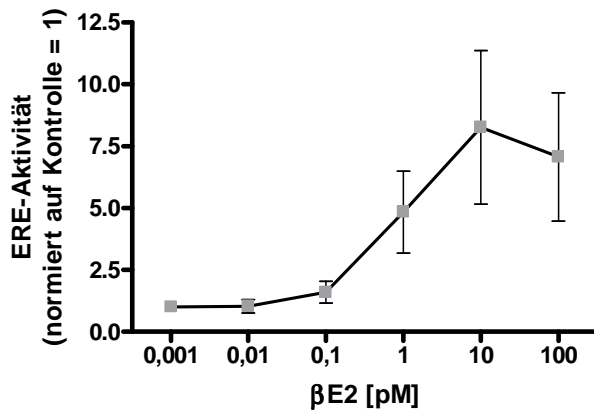
könnte. Da der hier verwendete monoklonale Antikörper den N-terminalen Bereich der mEH als Antigen verwendet, sollte diese verkürzte Variante auch mittels Western Blot detektierbar sein.

#### **6.1.4 Einfluss der mEH auf den Östradiol-signalweg**

Da kein Einfluss der mEH auf die Tamoxifenwirkung in Zusammenhang mit der AEBS nachgewiesen werden konnte, wäre eine zusätzliche Möglichkeit, wie mEH zu einer Tamoxifenresistenz führen könnte, eine Verknüpfung mit der Wirkung des Östradiol-signalwegs. Diese These beruht auf der Tatsache, dass Tamoxifen und  $\beta E_2$  um den gemeinsamen Rezeptor ( $ER\alpha$ ) konkurrieren, wodurch ein direkter Einfluss durch  $\beta E_2$  auf die Tamoxifenwirkung stattfindet. Diese Konkurrenz und die unterschiedlichen, weiteren Signalwege ergeben verschiedene Einflussmöglichkeiten, die zu einer Tamoxifenresistenz führen. So könnte z.B. durch eine Verstärkung der  $\beta E_2$  Wirkung der Einfluss des Tamoxifens unterdrückt werden.

Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein Luziferase-Reporter-genkonstrukt verwendet, welches durch das enthaltene ERE (*estrogen response element*) eine Luziferaseexpression induziert. Da ERE durch Bindung eines aktiven  $\beta E_2$ - $ER\alpha$ -Komplexes die Transkription des Luziferasegens starten kann, wird durch die anschließende Messung der Biolumineszenz die Intensität der  $\beta E_2$ -Wirkung auf seinen Rezeptor detektiert. Durch die Aktivierung des  $ER\alpha$  durch  $\beta E_2$  und die anschließende Bindung an das ERE des Reporter-genkonstrukts wird die Transkription des Luziferasegens induziert. Die entstandene Proteinmenge kann im Anschluss durch Zugabe des Luziferasesubstrats als Enzym-Aktivität analysiert werden.

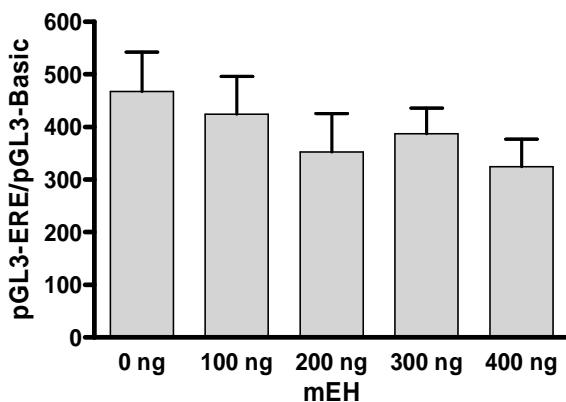
Als erster Schritt wurden MCF-7 Zellen mit dem ERE-Reporter-genkonstrukt (pGL3-ERE) transfiziert und mit ansteigenden  $\beta E_2$ -Konzentrationen behandelt. Nach 24 h wurde die Biolumineszenzzunahme von Luziferin, dem natürlichen Substrat der Luziferase, gemessen (Abb. 9). Dabei wurde innerhalb aller Experimente als Kontrolle für die Zellproliferation und als interne Kontrolle für den Assay die *Renilla*-Luciferase co-transfiziert und gemessen.



**Abb. 9:** Analyse der ERE-Aktivität in Abhängigkeit von der  $\beta E_2$ -Konzentration. Durch steigende  $\beta E_2$  Konzentrationen erhält man eine höhere ERE-Aktivität (n = 3).

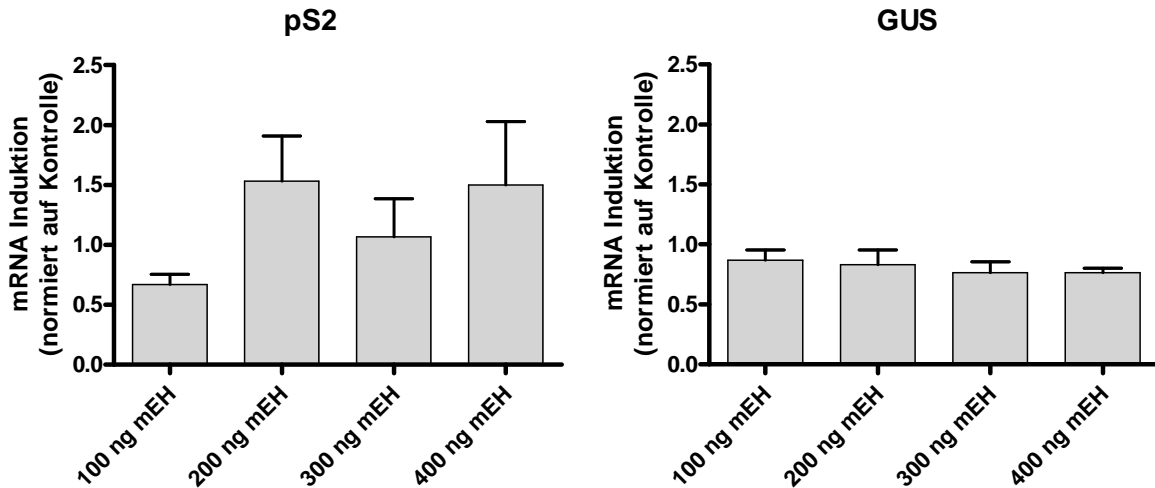
Deutlich zu erkennen ist eine steigende ERE-Aktivität bei höheren  $\beta E_2$  Konzentrationen. Der lineare Bereich der Induktion befindet sich zwischen 0,01 pM und 10 pM und erreicht bei höheren Konzentrationen ein Plateau.

Des Weiteren wurden MCF-7 Zellen mit steigenden Mengen an mEH-Expressionsplasmid transfiziert, wobei gleichzeitig das ERE-Reportergenkonstrukt co-transfiziert wurde. Nach Behandlung mit 1 pM  $\beta E_2$  ( $\beta E_2$ -Konzentration, welche im mittleren Bereich der linearen Phase liegt, ermöglicht eine Detektion von Verschiebungen in beide Richtungen, siehe auch Abb. 9) wurde nach 24 h die ERE-Aktivität mittels Luziferase-Assay ermittelt. Wie aus Abb. 10 hervorgeht, beeinflusst die mEH die ERE-Aktivität nur in geringem Ausmaß.



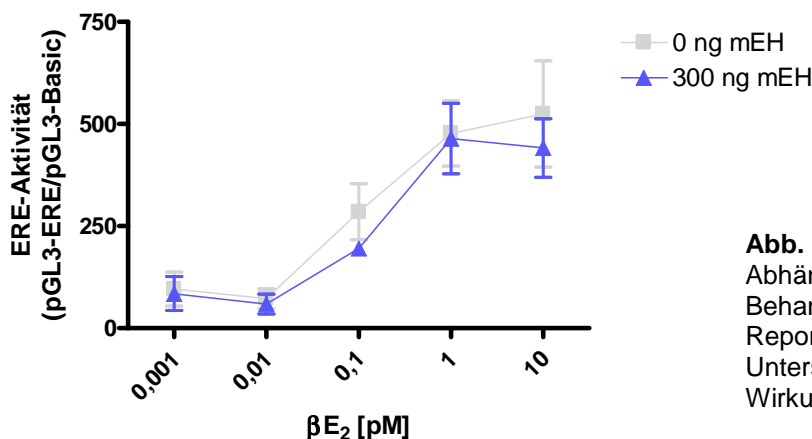
**Abb. 10:** Analyse der ERE-Aktivität in Abhängigkeit von mEH. Es ist ein geringer Abfall durch steigende mEH Mengen festzustellen.

Parallel wurde aus einem gleichen Versuchsansatz die RNA isoliert, cDNA synthetisiert und anschließend das  $\beta E_2$ -Zielgen pS2 mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 11). Als Kontrolle wurde der leere Expressionsvektor pcDNA3.1 transfiziert (0 ng mEH).



**Abb. 11:** Einfluss der mEH auf die  $\beta E_2$ -Antwort. Durch Co-Transfektion der mEH und des ERE-Reportergenkonstrukts konnte die Wirkung der mEH auf die  $\beta E_2$ -Wirkung analysiert werden. Das  $\beta E_2$ -Zielgen pS2 wird durch Transfektion von 200 ng mEH stärker induziert. Dagegen hat mEH auf das Kontrollgen GUS keinen Einfluss.

Im Gegensatz zum Kontrollgen  $\beta$ -Glucuronidase (GUS; de Kok et al. 2005; Bracey and Paigen 1987) sieht man beim  $\beta E_2$ -Zielgen einen Einfluss von mEH auf das pS2 mRNA-Level ab 200 ng transfizierter mEH. Dies lässt den Schluss zu, dass die mEH möglicherweise einen verstärkenden Einfluss auf den Östradiol-signalweg ausübt. Da dieser Effekt einen Einfluss auf die Tamoxifen Therapie ausüben würde, wurde die Beobachtung im Folgenden genauer untersucht. Im nächsten Schritt wurde eine Dosis-Wirkungskurve erstellt, siehe Abb. 12.



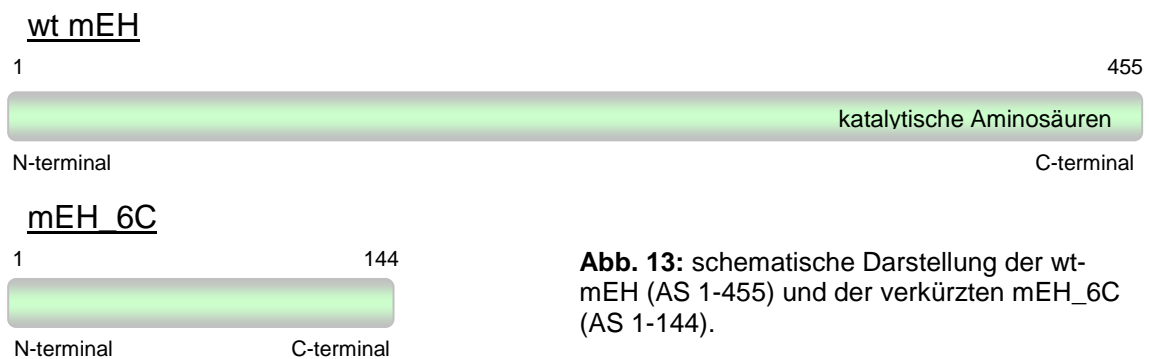
**Abb. 12:** Analyse der ERE-Aktivität in Abhängigkeit von mEH unter Behandlung mit  $\beta E_2$  mittels Reportergenassay. Es zeigt sich kein Unterschied zwischen den Dosis-Wirkungskurven mit und ohne mEH.

Die Ergebnisse in Abb. 12 zeigen, dass zwischen der Dosis-Wirkungskurve ohne und mit mEH kein Unterschied in der  $\beta E_2$ -Antwort des Reportergens zu sehen ist. Auf mRNA Ebene konnte jedoch ein Einfluss der mEH auf die  $\beta E_2$ -Antwort festgestellt werden, die im Folgenden näher untersucht werden sollte.



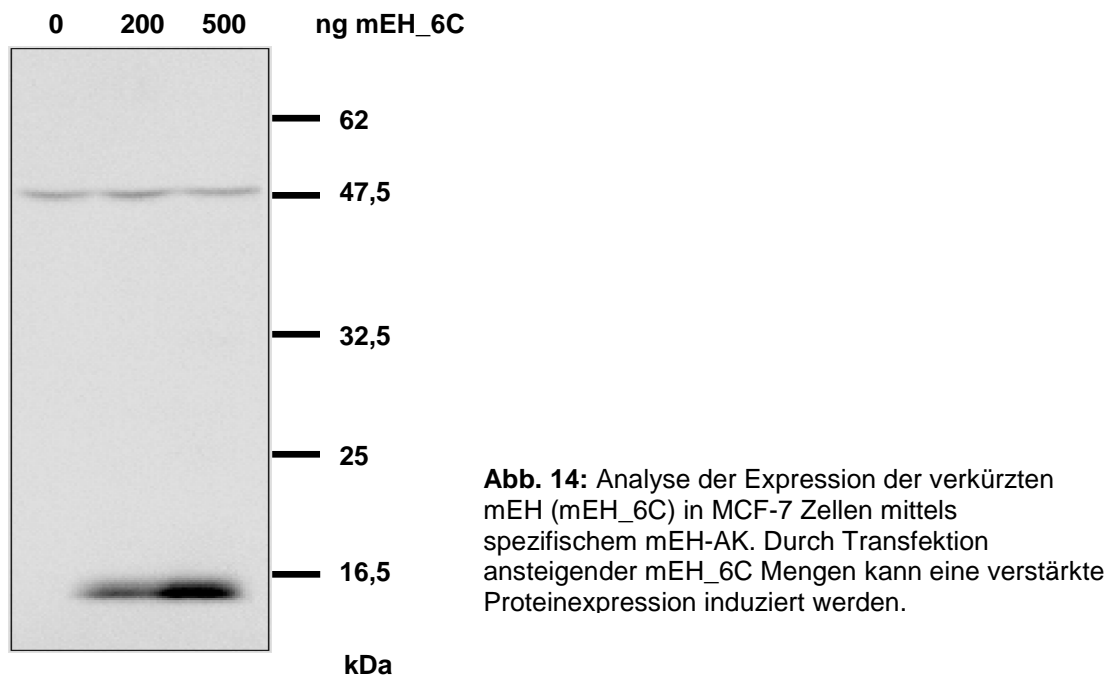
### 6.1.5 Analyse der verkürzten mEH

Um die Fragestellung zu klären, ob für den geringfügigen Einfluss der mEH auf die pS2-mRNA die katalytische Aktivität der mEH notwendig ist und möglicherweise durch bisher unbekannte Substrate der mEH ein Einfluss auf die Tamoxifen/ $\beta$ E<sub>2</sub>-Wirkung erfolgt, wurde im nächsten Schritt eine verkürzte mEH eingesetzt, welche den C-terminalen Bereich, der das katalytische Zentrum beinhaltet, nicht mehr aufweist. Dazu wurde eine verkürzte Variante der mEH (mEH\_6C) verwendet. Sie entsteht durch eine Deletion eines Cytosins innerhalb von sieben Cytosinen im Bereich von 394-400 bp. Diese Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch zu einem früheren Stop-Codon bei 435 bp. Wie Abb. 13 schematisch zeigt, beinhaltet die so verkürzte mEH (mEH\_6C) den N-Terminus. Somit fehlen die enzymatisch aktiven Aminosäuren Asp<sup>226</sup>, Glu<sup>404</sup> und His<sup>431</sup> der katalytische Triade (Arand et al. 1999).



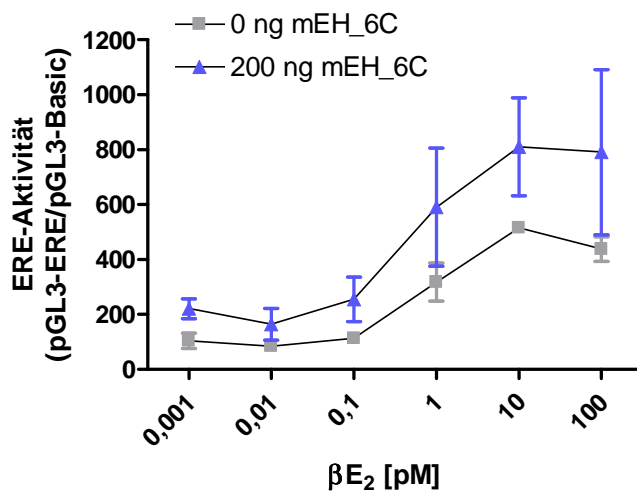
**Abb. 13:** schematische Darstellung der wt-mEH (AS 1-455) und der verkürzten mEH\_6C (AS 1-144).

Nach Klonierung dieser verkürzten mEH in den Expressionsvektor pcDNA3.1(-) wurde das Konstrukt (pcDNA3.1-mEH\_6C) in steigenden Mengen in MCF-7-Zellen transfiziert und die Proteinexpression (Gesamtzelllysat) nach 24 h untersucht (siehe Abb. 14).



Deutlich zu erkennen ist die endogene mEH-Proteinbande bei ~50 kDa und die Bande der transfizierten, verkürzten mEH\_6C bei 17 kDa. Da in MCF-7-Zellen eine geringe endogene mE-Expression vorliegt, sind im Gegensatz zu Abb. 8 weitere mEH –Banden nicht zu erkennen (vergleiche wt mEH-Expression bei 50 kDa zwischen Abb. 8 & 14).

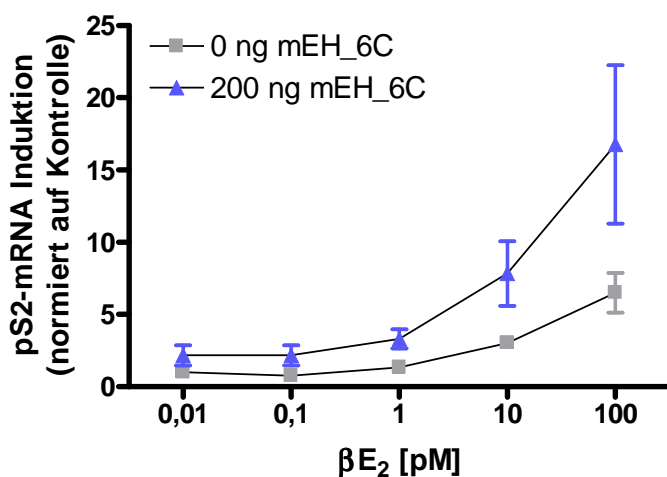
Um die Wirkung der mEH\_6C auf das  $\beta E_2$ -System untersuchen zu können, wurde die mEH\_6C zusammen mit dem ERE-Reportergenkonstrukt in MCF-7 Zellen co-transfiziert und die ERE-Aktivität nach 24 h untersucht. In Abb. 15 ist zu erkennen, dass eine Überexpression der verkürzten mEH mit steigender  $\beta E_2$  Konzentration zu einer Steigerung der ERE-Aktivität gegenüber der Kontrolle führt.



**Abb. 15:** Analyse der ERE-Aktivität in Abhängigkeit von mEH\_6C unter Behandlung mit  $\beta E_2$ . Durch Anwesenheit der mEH\_6C erfolgt bei steigenden  $\beta E_2$ -Konzentrationen eine Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurve.

In Abb. 15 ist die Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurve durch mEH\_6C zu erkennen. Die Überexpression der verkürzten mEH führt zu einer stärkeren Aktivierung der  $\beta E_2$ -Antwort. Diese Parallelverschiebung der Dosis-Wirkungskurve entspricht einer Sensitivierung und Verstärkung der  $\beta E_2$ -Antwort durch Überexpression von mEH\_6C.

Eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve kann auch schon auf mRNA Ebene beobachtet werden (Abb. 16). Das  $\beta E_2$ -Zielgen pS2 wird ebenfalls durch Überexpression der mEH\_6C bereits bei einer geringeren  $\beta E_2$  Konzentration induziert und erreicht höhere mRNA-Levels im Vergleich zur Kontrolle.



**Abb. 16:** Analyse der pS2-Induktion in Abhängigkeit von mEH\_6C unter Behandlung mit  $\beta E_2$ . Durch Anwesenheit der verkürzten mEH (mEH\_6C) wird die mRNA des pS2 stärker synthetisiert, was zu einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve von  $\beta E_2$  führt.

Diese Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die verkürzte mEH einen stärkeren Einfluss auf den Östradiol-signalweg hat als die wt-mEH.

Als nächster Schritt sollte überprüft werden, ob die von uns beobachtete Mutation auch im natürlichen Gewebe von Mammakarzinomen vorkommt.

### 6.1.6 SNP-Analyse im humanen Mammakarzinom

Bei der zu analysierenden Mutation handelt es sich um eine Cytosindeletion. Sie liegt in einem Sequenzbereich (393-399 bp), der im wt sieben Cytosine beinhaltet und in der Mutation, durch Deletion eines Cytosins, nur sechs. Als Analyse-methode wurde die Sequenzierung gewählt, um mit für diesen Bereich spezifischen Primern eine Detektion der Deletion zu ermöglichen.

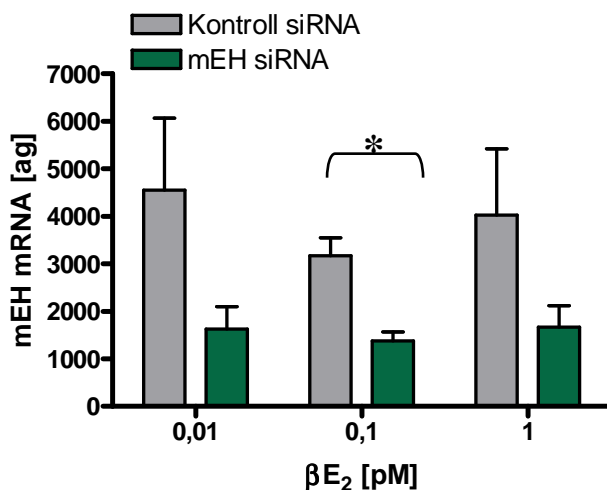
Um das Screening durchführen zu können, wurden 99 DNA-Isolierungen aus Paraffinschnitten von Mammakarzinompatientinnen und 96 DNA-Isolierungen aus gesunden Blutproben (als Kontrollgruppe) verwendet. Das analysierte PCR-Produkt

(mEH782\_as: GTT CTT GGG GTC AGT CAG GA und mEH\_In3/4a\_se: AGG GTG GCA GGA CTC AAT) wurde in einer spezifischen Sequenzier-PCR eingesetzt.

Die Proben aus Paraffinschnitten waren teilweise degradiert, weshalb die DNA nicht amplifiziert werden konnte. 63 der 99 Proben waren auswertbar und wurden als wt mEH detektiert. Von den Kontrollproben konnten 65 von 96 ausgewertet werden, bei denen ebenfalls alle nur die wt-Variante der mEH enthielten. Somit konnte die Mutation mittels Sequenzierung auf genomischer Ebene bisher nicht nachgewiesen werden.

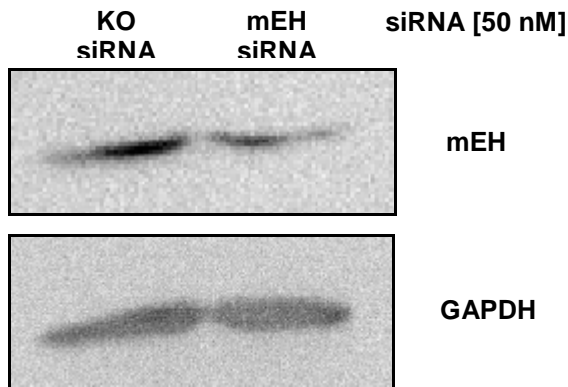
### 6.1.7 Inhibition der mEH-Expression

Durch Überexpression der mEH konnte, vor allem für die verkürzte mEH, eine Aktivierung bzw. Sensitivierung des  $\beta E_2$ -Systems gezeigt werden. Unklar ist jedoch, wie sich das  $\beta E_2$ -System in Abwesenheit der mEH verhält. Da keine mEH-negative Zelle existiert (siehe Kapitel 6.1.1), wurde mEH-spezifische siRNA eingesetzt, um die Auswirkung auf den Östradiol-signalweg unter Entzug der mEH zu analysieren. Die mEH-spezifische siRNA wurde mittels *RNAi-ect* von Qiagen in MCF-7 Zellen transfiziert und anschließend die Expression der mEH mittels mRNA-Analyse detektiert. Dazu wurde eine quantitative RT-PCR durchgeführt und mEH-spezifische Primer eingesetzt. (Abb. 17)



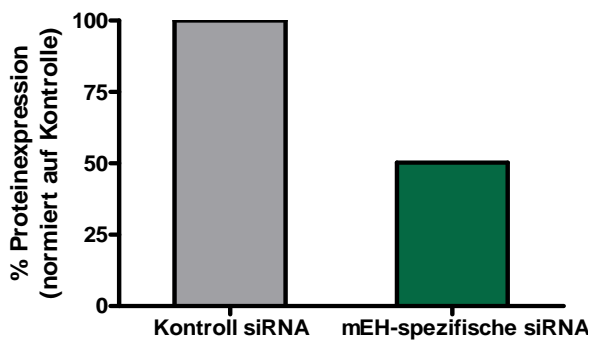
**Abb. 17:** Analyse der mEH-Induktion nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit  $\beta E_2$  und mEH-spezifischer siRNA (50nM) bzw. Kontroll-siRNA. Die mEH-Expression wird im Durchschnitt auf 47 % reduziert. \*  $p < 0,05$

Im Vergleich zur Kontroll-siRNA wird die mEH mRNA-Synthese durch die spezifische siRNA im Durchschnitt auf 47 % des Kontrollwerts reduziert, unabhängig von der eingesetzten  $\beta E_2$ -Konzentration ( $p = 0,0132$ ). Auch auf Proteinebene ist nach Transfektion mit mEH spezifischer siRNA eine deutliche Reduktion der mEH-Expression zu erkennen (Abb. 18).



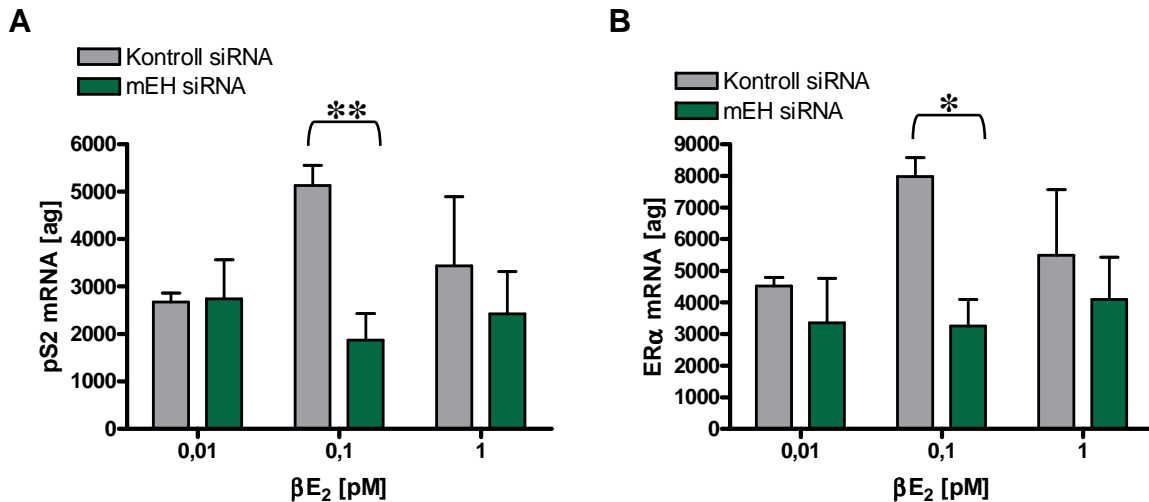
**Abb. 18:** Analyse der mEH-Expression nach 24 h Behandlung mit Kontroll- (KO-) bzw. mEH-spezifischer (EPHX) siRNA [50 nM]. Durch die mEH-spezifische siRNA wurde die mEH-Expression inhibiert.

Die densitometrische Auswertung der mEH-Proteinexpression mittels Western Blot ergab eine Hemmung um 50 % (siehe Abb. 19) und entspricht somit dem Ergebnis auf mRNA-Ebene.



**Abb. 19:** Densitometrische Analyse des Western Blots aus Abb. 18. Die Auswertung ergab eine Hemmung der mEH-Proteinexpression auf 50 % durch die mEH spezifische siRNA.

Als nächster Schritt sollte mittels RT-PCR die Reaktion des  $\beta E_2$ -Signalwegs auf die verringerte mEH-Expression untersucht werden. Dazu wurden die mRNA Levels des  $\beta E_2$ -Zielgens pS2 und des Rezeptors  $ER\alpha$  analysiert (Abb. 20).

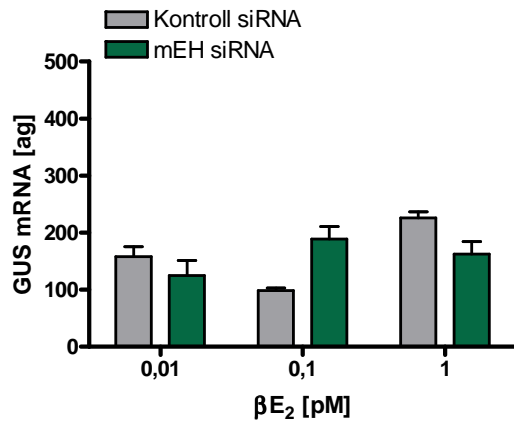


**Abb. 20:** Analyse des pS2-mRNA-Niveaus bzw. des ER $\alpha$ -mRNA-Niveaus nach Behandlung mit  $\beta$ E<sub>2</sub> und mEH-spezifischer siRNA [50 nM] bzw. Kontroll-siRNA. Beide untersuchten Gene zeigen eine maximale Induktion bei 0,1 pM  $\beta$ E<sub>2</sub>. Sowohl die Induktion von pS2 (A) als auch von ER $\alpha$  (B) durch 0,1 pM  $\beta$ E<sub>2</sub> werden nach Inhibition von mEH unterdrückt. \* p < 0,05 \*\* p < 0,01

Durch Inhibition der mEH mit Hilfe der spezifischen siRNA wird das  $\beta$ E<sub>2</sub>-Zielgen pS2 inhibiert. Die Expressionsinduktion durch Östradiol (siehe graue Balken der Kontroll-siRNA in Abb. 20), welche ein Maximum bei 0,1 pM erreicht, wird bei allen untersuchten  $\beta$ E<sub>2</sub>-Konzentrationen unter mEH-Hemmung vollständig unterdrückt. Bei der maximalen Induktion von pS2 (0,1 pM  $\beta$ E<sub>2</sub>) erfolgt eine Inhibition um Faktor 2,9 (p = 0,0098), bei ER $\alpha$  um den Faktor 2,5 (p = 0,0103).

Dies führt zu der Schlussfolgerung, dass die mEH in der Regulation der  $\beta$ E<sub>2</sub>-Antwort eine Rolle spielt. Zum Einen zeigen diese siRNA Ergebnisse, dass die Hemmung der mEH-Expression zu einer Inhibition der  $\beta$ E<sub>2</sub>-Antwort führt, zum Anderen konnte bisher keine mEH-negative Zelllinie bzw. Gewebe nachgewiesen werden, was den Schluss zulässt, dass die mEH möglicherweise eine wichtige Rolle innerhalb der Regulation der Zelle übernimmt.

Um zu überprüfen, ob diese Effekte nicht auf eine unspezifische siRNA-Bindung an die DNA zurückzuführen sind, wurde im Vergleich dazu das Kontrollgen GUS (Abb. 21) dargestellt:



**Abb. 21:** Analyse des Kontrollgens GUS nach Behandlung mit  $\beta E_2$  und mEH-spezifischer siRNA bzw. Kontroll-siRNA. Durch Behandlung mit mEH-spezifischer siRNA findet keine Änderung in des GUS-mRNA-Levels statt.

Die Abbildung zeigt, dass die mEH-siRNA keinen inhibitorischen Effekt auf das Kontrollgen ausübt. Somit sind die Effekte auf mEH und die dadurch ausgelösten Effekte auf pS2 und ER $\alpha$  spezifisch, d.h. die mEH hat auf die  $\beta E_2$ -Antwort einen bisher unbekanntem regulatorischen Einfluss. Durch Inhibition der mEH wird eine Inhibition von ER $\alpha$  und pS2 induziert. Dies lässt den Schluss zu, dass eine direkte Regulation der  $\beta E_2$ -Antwort durch mEH besteht.

### 6.1.8 Lokalisierung der mEH

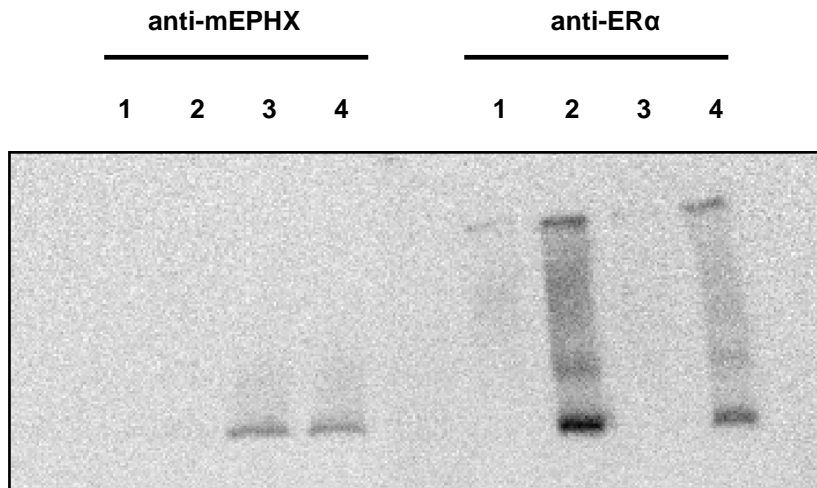
Aufgrund ihrer Ankersequenz im N-terminalen Bereich, ist die mEH in der mikrosomalen Membran lokalisiert. Um überprüfen zu können, ob die mEH auch in der Zelllinie MCF-7 in der mikrosomalen Membran lokalisiert ist, wurden MCF-7 mit dem Kontrollvektor pcDNA3.1(-) (KO) bzw. mit dem mEH-Expressionsvektor pcDNA3.1-mEH transfiziert. Nach 24 h wurden mikrosomale und cytosolische Proteine isoliert und mittels Western Blot analysiert. Wie in Abb. 22 zu erkennen ist, ist die mEH überwiegend in der mikrosomalen Proteinfraction vertreten und somit auch in MCF-7 Zellen innerhalb der Mikrosomenmembran lokalisiert.



**Abb. 22:** Überprüfung der Lokalisation der mEH in MCF-7 Zellen. Durch Trennung in mikrosomale und cytosolische Proteine konnte dargestellt werden, dass in MCF-7 Zellen die mEH überwiegend in den Mikrosomen lokalisiert ist. KO = Kontrollvektor, mEH = mEH-Expressionsvektor.

### 6.1.9 Native Proteinanalyse der mEH

Die bisherigen Ergebnisse zeigen, dass die mEH innerhalb des hormonellen Systems eine bis dahin unbekannte Rolle spielt. Sie übt einen Einfluss auf den Östradiol-signalweg aus, der abhängig von ER $\alpha$  ist. Da ER $\alpha$  überwiegend im Cytoplasma bzw. im Zellkern vorliegt, sollte im nächsten Schritt analysiert werden, ob ein direkter Einfluss der mEH auf ER $\alpha$  möglich ist. Eine mögliche Komplexbildung der beiden Komponenten sollte mit Hilfe eines nativen Polyacrylamidgels beantwortet werden. MCF-7 Zellen wurden mit mEH oder ER $\alpha$  bzw. mit beiden Expressionsvektoren gemeinsam transfiziert und die Proteine nach 24 h mittels nativer Proteingelelektrophorese aufgetrennt. Eine Analyse der Proteinbanden mit spezifischen mEH und ER $\alpha$  AK ergab folgendes Ergebnis (Abb. 23):



**Abb. 23:** Native Proteingelelektrophorese von  $\beta$ E<sub>2</sub>-behandelten MCF-7 Zellen nach 24 h Transfektion mit:  
 1: 2  $\mu$ g pcDNA3.1(-),                      2: 2  $\mu$ g pCMV5-hER $\alpha$ ,  
 3: 2  $\mu$ g pcDNA3.1-mEH,                      4: 1  $\mu$ g pCMV5-hER $\alpha$  + 1  $\mu$ g pcDNA3.1-mEH.  
 Durch spezifische ER $\alpha$  (links) und mEH (rechts) AK wurden die entsprechenden Proteinbanden analysiert.

Betrachtet man diesen repräsentativen Versuch (aus n = 3), kann man sowohl bei anti-mEPHX als auch bei anti-ER $\alpha$  in Spur 1 keine endogene Proteinexpression nachweisen. Durch Überexpression der beiden Proteine (Spur 3 & 4 für mEH und Spur 2 & 4 für ER $\alpha$ ) kann man in der nativen Proteinelektrophorese mittels spezifischer Antikörper Proteine detektieren. Jedoch befindet sich die Bande bei Überexpression des einzelnen Proteins (ER $\alpha$ : Spur 2, mEH: Spur 3) auf gleicher Laufhöhe wie nach Überexpression beider Proteine zusammen (Spur 4). Sollte eine Komplexbildung stattfinden, würde man ein unterschiedliches Laufverhalten im nativen Proteingel erwarten. Jedoch ist auch nicht auszuschließen, dass der



Komplex möglicherweise dasselbe Laufverhalten aufweist, wie die einzelnen Komponenten. Somit ist keine eindeutige Interaktion nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass über eine mögliche Komplexbildung zwischen ER $\alpha$  und mEH keine eindeutige Aussage getroffen werden kann jedoch eine Bindung zwischen mEH und ER $\alpha$  auch nicht auszuschließen ist.

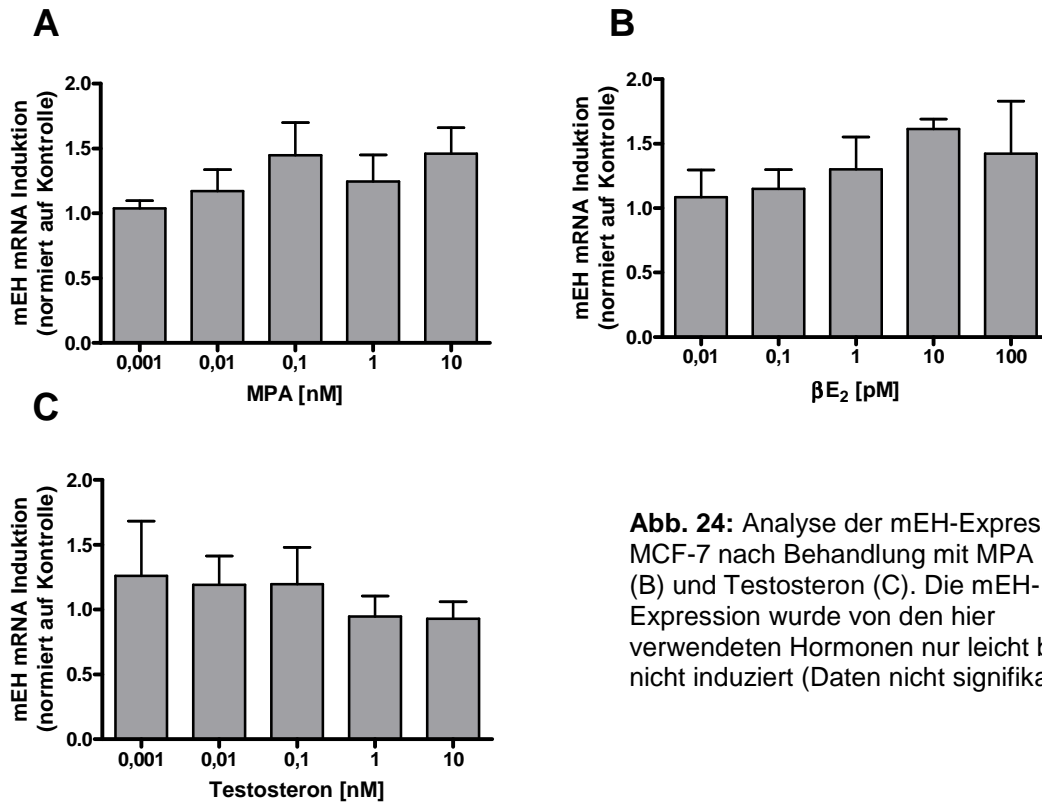
## 6.2 Regulation der mEH

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Regulation der mEH untersucht werden. Die Ergebnisse aus dem ersten Teil (6.1) zeigen, dass die mEH im hormonellen System offensichtlich eine Rolle bei der  $\beta E_2$ -Antwort spielt, die in dieser Form bisher nicht untersucht wurde. Zum besseren Verständnis wurde nun die Regulation der mEH innerhalb des hormonellen Systems genauer untersucht. Dazu wurden zwei hormonell regulierte Systeme betrachtet, das Mammakarzinom und das Corpusendometrium der Frau im Verlauf des menstruellen Zyklus.

### 6.2.1 Analyse der mEH-Expression in Mammakarzinomzelllinien unter Behandlung mit Hormonen

Die Rolle der mEH innerhalb des hormonellen Systems war bisher auf ihre Funktion als strukturelle Untereinheit der AEBS begrenzt. Die Ergebnisse aus der Studie von Fritz et al. (2001) sowie aus unseren Untersuchungen innerhalb des  $\beta E_2$ -Signalwegs zeigen, dass die mEH einen stärkeren Einfluss, als bisher bekannt, ausübt. Um diesen Einfluss genauer untersuchen zu können, wurde zunächst analysiert, ob die mEH-Expression unter hormoneller Behandlung reguliert wird. Die beiden Mammakarzinomzelllinien MCF-7 und T47D wurden für 24 h mit ansteigenden Konzentrationen von Medroxyprogesteronacetat (MPA),  $\beta E_2$  und Testosteron behandelt und anschließend die mEH-Expression auf mRNA Ebene mittels RT-PCR analysiert.

In Abb. 24 A-C ist die mEH-Expression der Zelllinie MCF-7 dargestellt.

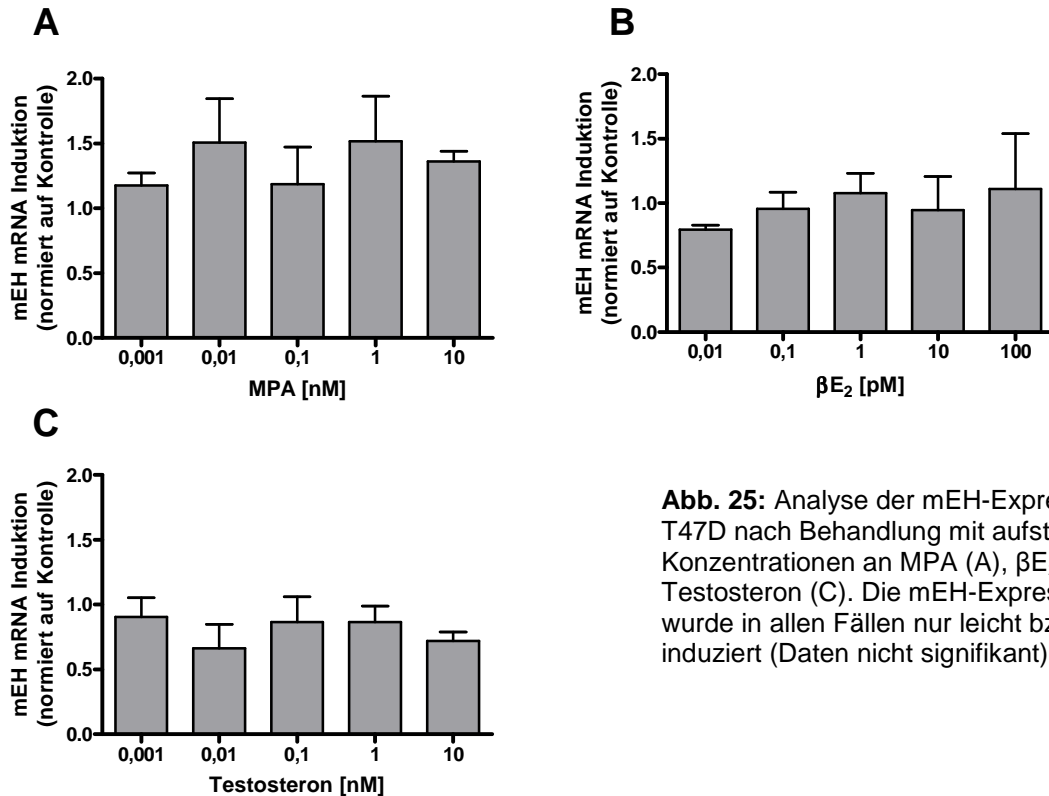


**Abb. 24:** Analyse der mEH-Expression in MCF-7 nach Behandlung mit MPA (A),  $\beta E_2$  (B) und Testosteron (C). Die mEH-Expression wurde von den hier verwendeten Hormonen nur leicht bzw. nicht induziert (Daten nicht signifikant).

Als Kontrolle wurden unbehandelte (mit Vehikel EtOH) Zellen eingesetzt, sowohl bei MCF-7 (Abb. 24) und T47D (Abb. 25).

Die Ergebnisse zeigen, dass in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit MPA ein geringer Anstieg der mEH-mRNA-Synthese festgestellt werden konnte (Faktor  $1,5 \pm 0,2$  bei 10 nM MPA (Abb. 24A)). Bei  $\beta E_2$  wurde ebenfalls ein leichter Anstieg beobachtet, der bei 10 pM den maximalen Faktor  $1,6 \pm 0,1$  im Vergleich zur Kontrolle betrug (B). Bei der Behandlung mit Testosteron (C) konnte keine Induktion der mEH-Expression nachgewiesen werden, sondern eine leichte Inhibition ab 1 nM. Somit führt die Behandlung mit Hormonen in MCF-7 Zellen zu keiner signifikanten Induktion der mEH-mRNA-Expression.

In Abb. 25 A-C ist die mEH mRNA Expression in T47D Zellen nach Behandlung mit MPA,  $\beta E_2$  und Testosteron dargestellt.



**Abb. 25:** Analyse der mEH-Expression in T47D nach Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen an MPA (A),  $\beta E_2$  (B) und Testosteron (C). Die mEH-Expression wurde in allen Fällen nur leicht bzw. nicht induziert (Daten nicht signifikant).

In Abb. 25A ist zu sehen, dass die mEH-Expression in T47D Zellen durch MPA leicht induziert wird (maximal um Faktor  $1,5 \pm 0,3$  bei 1 nM). Die Zugabe von  $\beta E_2$  führt zu keiner signifikanten Änderung des mRNA Levels (Abb. 25B). Durch Testosteron wird die mEH leicht herunterreguliert. Bei 10 nM Testosteron (Abb. 25C) um  $0,7 \pm 0,1$ . Alle Änderungen im Vergleich zur Kontrolle (mit EtOH behandelte Zellen) sind jedoch nicht signifikant, was zu der Schlussfolgerung führt, dass mEH in T47D Zellen durch diese Hormone nicht reguliert wird.

Als Kontrollgen wurde in allen Versuchen GUS betrachtet, es konnte jedoch keine signifikante Regulation des Kontrollgens durch die Hormone in den beiden Zelllinien detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

### 6.2.2 mEH im hormonellen System

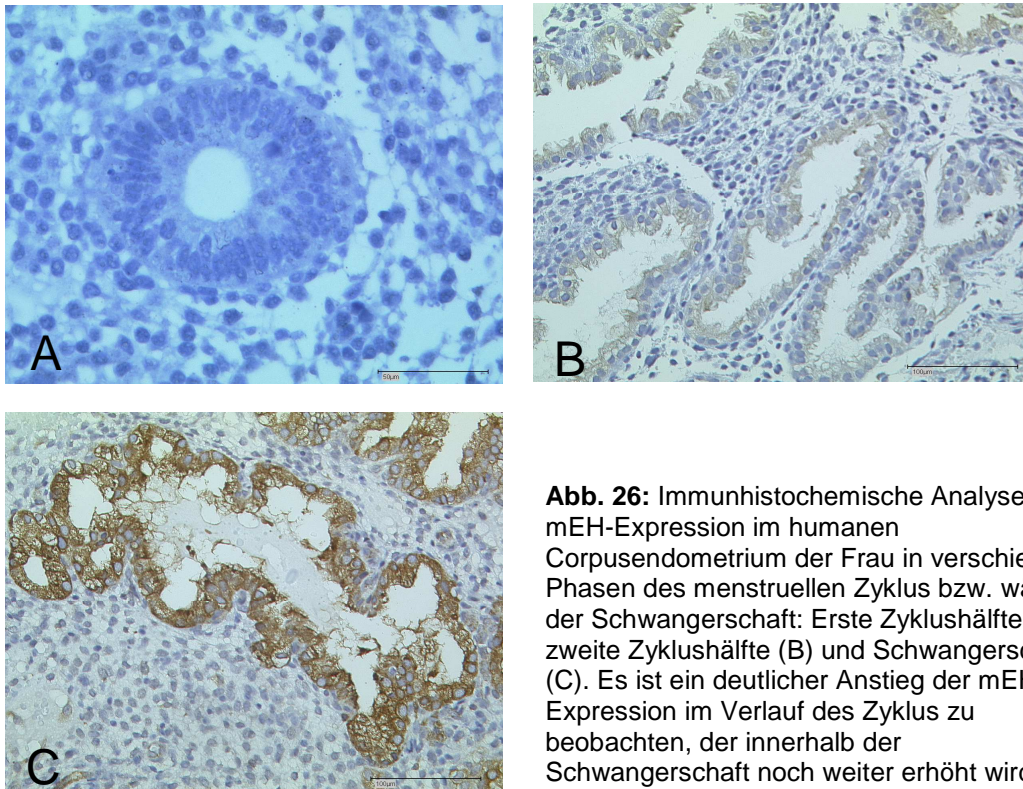
Die bisherigen Versuche wurden in MCF-7 bzw. T47D Zellen durchgeführt, welche zwar als hormonell reguliertes Zellsystem geeignet waren, aber doch ein sehr artifizielles System darstellen. Aufgrund dessen sollte in den nächsten Untersuchungen humanes Gewebe verwendet werden, um die mögliche Regulationsfunktion der mEH im hormonellen System aufzuklären. Somit wurde in dieser Arbeit die mEH-Expression in einem zweiten, hormonell regulierten System

untersucht, dem Corpusendometrium der Frau. Der Menstruationszyklus der Frau stellt ein System dar, welches stark von Hormonen beeinflusst wird. Das Corpusendometrium unterliegt innerhalb des Zyklus der hormonellen Regulation und zeigt deutliche, histologische Veränderungen während der verschiedenen Phasen. Innerhalb der ersten Phase des menstruellen Zyklus, der Proliferationsphase, findet der Aufbau der Schleimhaut statt, während in der zweiten Hälfte, der Sekretionsphase, eine Auflockerung der Schleimhaut erfolgt, die wiederum mit dem Abbau endet. Im Falle einer Schwangerschaft, findet dieser Abbau aufgrund der Einnistung einer Eizelle nicht statt (Schwangerschaft/Gravidität = Hypersekretionsphase). Im nächsten Schritt sollte untersucht werden, ob mEH in diesem Gewebe exprimiert wird und ob die hormonellen Änderungen möglicherweise zu einer Regulation der mEH-Expression führen.

Dazu wurden mit Hilfe des Pathologischen Instituts des Robert-Bosch-Krankenhauses humane Proben aus dem Corpusendometrium des Uterus von 87 Frauen in verschiedenen Zyklusphasen gesammelt und mittels immunhistochemischer Färbemethoden auf ihre mEH-Expression untersucht.

### **6.2.3 Analyse der immunhistochemischen Färbung von mEH**

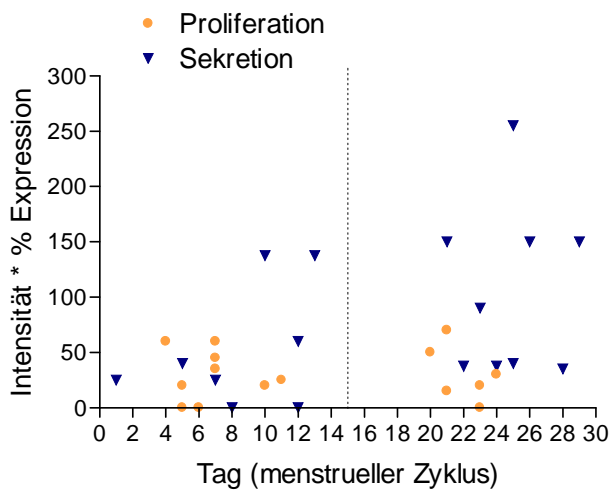
Zur Beobachtung der mEH-Expression während des weiblichen Zyklus wurden 28 Proben innerhalb der ersten Zyklushälfte, der Proliferationsphase, 26 in der zweiten Zyklushälfte, der sekretorischen Phase, und 21 Proben nach Schwangerschaftsabbruch (Gravidität bzw. Hypersekretionsphase) untersucht. Nach immunhistochemischer Färbung mit einem mEH-spezifischen Antikörper (zur Verfügung gestellt von U. Zanger) wurde die mEH-Expression der Paraffinschnitte ausgewertet. Dabei zeigte sich, dass die Proben während der Proliferationsphase eine niedrige mEH-Expression aufweisen, die Expression innerhalb der sekretorischen Phase ansteigt und ihren Höhepunkt in der Hypersekretionsphase (Gravidität) erreicht, wie in Abb. 26 A-C zu sehen ist. Somit scheint die mEH-Expression im Verlauf des menstruellen Zyklus anzusteigen, was auf eine Regulation in diesem System schließen lässt.



**Abb. 26:** Immunhistochemische Analyse der mEH-Expression im humanen Corpusendometrium der Frau in verschiedenen Phasen des menstruellen Zyklus bzw. während der Schwangerschaft: Erste Zyklushälfte (A), zweite Zyklushälfte (B) und Schwangerschaft (C). Es ist ein deutlicher Anstieg der mEH-Expression im Verlauf des Zyklus zu beobachten, der innerhalb der Schwangerschaft noch weiter erhöht wird.

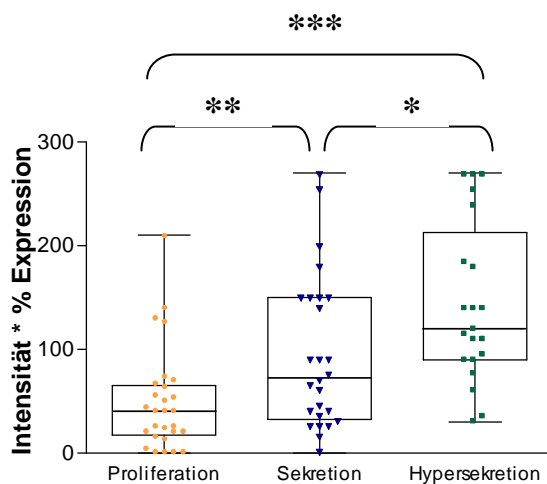
#### 6.2.4 Auswertung der Patientendaten

Um den Verlauf der mEH-Expression während des weiblichen Zyklus ermitteln zu können, wurde der genaue Zykluszeitpunkt der jeweiligen Proben anhand der Patientendaten ermittelt und die mEH-Expression gegenüber des Zyklustages aufgetragen. In Abb. 27 ist ein Anstieg der mEH-Expression im Verlauf des menstruellen Zyklus zu erkennen.



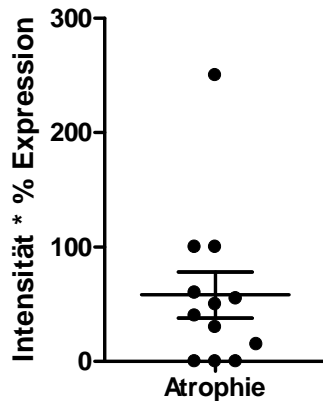
**Abb. 27:** Immunhistochemische Analyse der mEH-Expression gegenüber dem Zyklustag. Symbole stehen für den Pathologischen Befund: ● = Proliferation (erste Zyklushälfte), ▼ = Sekretion (zweite Zyklushälfte). Deutlich zu erkennen ist der Anstieg der mEH-Expression innerhalb des Zyklus.

Die immunhistochemischen Ergebnisse innerhalb der drei Gruppen (erste und zweite Zyklushälfte bzw. Schwangerschaft) wurden statistisch analysiert. Das daraus resultierende Diagramm ist in Abb. 28 zu sehen und zeigt, dass die niedrige mEH-Expression in der Proliferationsphase (Mittelwert (MW) =  $48,8 \pm 9,4$ ) signifikant ansteigt in der Sekretionsphase ( $48,8 \pm 9,4$  vgl. mit  $94,8 \pm 14,6$ ). Ein weiterer signifikanter Anstieg erfolgt von der Sekretionsphase zur Hypersekretionsphase/Schwangerschaft ( $94,8 \pm 9,4$  vgl. mit  $143,9 \pm 17,0$ ). Vergleicht man die Proliferationsphase mit der Hypersekretionsphase zeigt sich eine hohe Signifikanz ( $p = 0,0291$ ).



**Abb. 28:** Statistische Analyse der immunhistochemischen Färbung der mEH-Expression. Es zeigt sich eine deutliche Signifikanz zwischen der Proliferation (erste Zyklushälfte) und der Hypersekretion (Schwangerschaft), aber auch Sekretionsphase (zweite Zyklushälfte) und Proliferationsphase weisen signifikante Unterschiede in der mEH-Expression auf (siehe auch Text).  
\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$

Zusätzlich zu den beschriebenen Proben des menstruellen Zyklus bzw. innerhalb der Schwangerschaft wurden 12 atrophische Proben untersucht (Abb. 29). Diese Proben aus der postmenopausalen Phase zeigten eine niedrige mEH-Expression, ähnlich der Proliferationsphase (MW Atrophie =  $58,33 \pm 20,14$  und MW Proliferation =  $48,78 \pm 9,427$ ), mit einer geringeren Signifikanz gegenüber der höheren Expression in der Hypersekretionsphase ( $p = 0,014$ ), siehe Abb. 29. Gegenüber der Sekretionsphase zeigt sich keine Signifikanz.



**Abb. 29:** Darstellung der immunhistochemischen Färbung der mEH-Expression in postmenopausalen Proben. Es zeigt sich eine ähnliche mEH-Expression wie in der Proliferationsphase.

Auch diese Beobachtungen deuten darauf hin, dass die mEH im hormonell regulierten Corpusendometrium einer bis dahin unbekanntenen Regulation innerhalb des weiblichen Zyklus unterliegt.

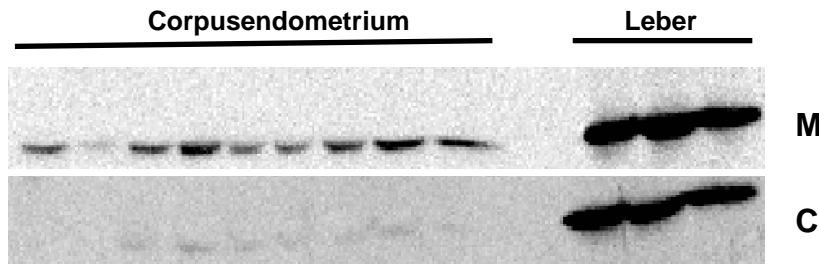
### 6.2.5 mEH Lokalisation in frischen Corpusendometrium-Proben

Zusätzlich zu den Proben der immunohistochemischen Analyse wurden 9 frisch gewonnene Gewebeproben (Abradate = Ausschabungen) mit Hilfe des Pathologischen Instituts und der Gynäkologie des RBK gesammelt. Durch eine Analyse der mikrosomalen, sowie der cytosolischen Proteine dieser Proben sollte die Lokalisation der mEH innerhalb des Corpusendometrium überprüft werden. Somit sollte sichergestellt werden, dass sich die mEH in der mikrosomalen Membran befindet.

In Abb. 30 sind die einzelnen Fraktionen dargestellt. Durch die Trennung von mikrosomalen und cytosolischen Proteinen konnte die mEH-Expression innerhalb der Mikrosomen deutlich dargestellt werden. In den Leberproben (Positivkontrollen) ist auch eine Expression im Cytosol zu erkennen, was durch die extrem starke Expression in diesem Gewebe erklärt werden kann, die zu einer Verunreinigung bei der Aufreinigung führte.

Des Weiteren wurden starke Expressionsunterschiede zwischen den verschiedenen Patientinnen festgestellt, wie in Abb. 30 zu erkennen ist, im Gegensatz zu den Leberkontrollen, die alle drei eine ähnlich starke mEH-Expression aufweisen.





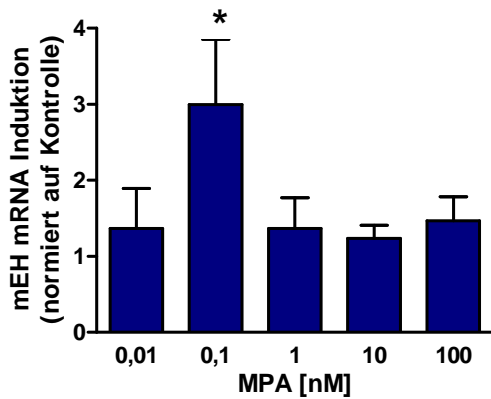
**Abb. 30:** Analyse der mEH-Lokalisation. Durch Auftrennung der Proteine in mikrosomale und cytosolische Fraktion konnte die mEH in den Abradaten (Corpusendometrium) überwiegend in den Mikrosomen (M) nachgewiesen werden. In der Positivkontrolle Leber findet sich auch eine Verunreinigung im Cytosol (C).

### 6.2.6 Analysen im humanen Endometrium-Zellkultursystem

Da die mEH-Expression in der immunhistochemischen Analyse während des Zyklus reguliert wird und das mEH-Expressionsmuster an die Sekretion des Progesterons innerhalb des Menstruationszyklus erinnert, wurde eine mögliche Regulation der mEH-Expression durch das Hormon Progesteron im humanen Zellkultursystem genauer untersucht. Dazu wurden zwei stabil transfizierte humane Endometriumzelllinien verwendet. Bei der ersten Zelllinie handelt es sich um ECC1-PRAB72, welche Progesteronrezeptor PR A und PR B positiv, ebenso wie ER $\alpha$  positiv ist. Die zweite Zelllinie IKPRAB36 ist ebenfalls PR A und PR B positiv, allerdings ER $\alpha$  negativ.

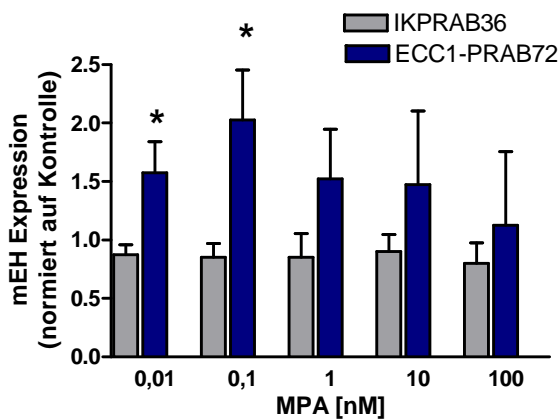
Als erstes wurde die ER $\alpha$ + Zelllinie mit MPA in verschiedenen Konzentrationen behandelt und anschließend die mEH-Expression mittels mRNA-Analyse (RT-PCR) nachgewiesen. Alle Angaben wurden auf die unbehandelte Kontrolle (mit EtOH behandelt) normiert.

Wie in Abb. 31 zu erkennen ist, erfolgt die Regulation der mEH-Expression auf Ebene der mRNA. Bei 0,1 nM MPA ist im Vergleich zur Kontrolle ohne MPA ein 3-facher Anstieg der mEH mRNA Synthese in Abhängigkeit des ER $\alpha$  zu sehen ( $p = 0,0399$ ). Bei den anderen Konzentrationen ist kein Einfluss von MPA auf die mEH-Expression zu beobachten.



**Abb. 31:** Analyse der mEH-mRNA-Expression nach Behandlung mit MPA (0,01 – 100 nM) über 24 h in der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie ECC1-PRAB72. Es ist eine Regulation der mEH-Expression (3x zur Kontrolle) bei 0,1 nM MPA zu beobachten (one-tailed unpaired t-test).  
\* p < 0,05

Im Folgenden wurde überprüft, ob diese Regulation auch auf Proteinebene erfolgt. Dazu wurden beide Zelllinien (ER $\alpha$ + und ER $\alpha$ -) mit MPA in verschiedenen Konzentrationen behandelt und anschließend die mEH-Expression mittels Western Blot nachgewiesen (Abb.32). Als Kontrolle wurde die unbehandelte (EtOH) Kontrolle verwendet.

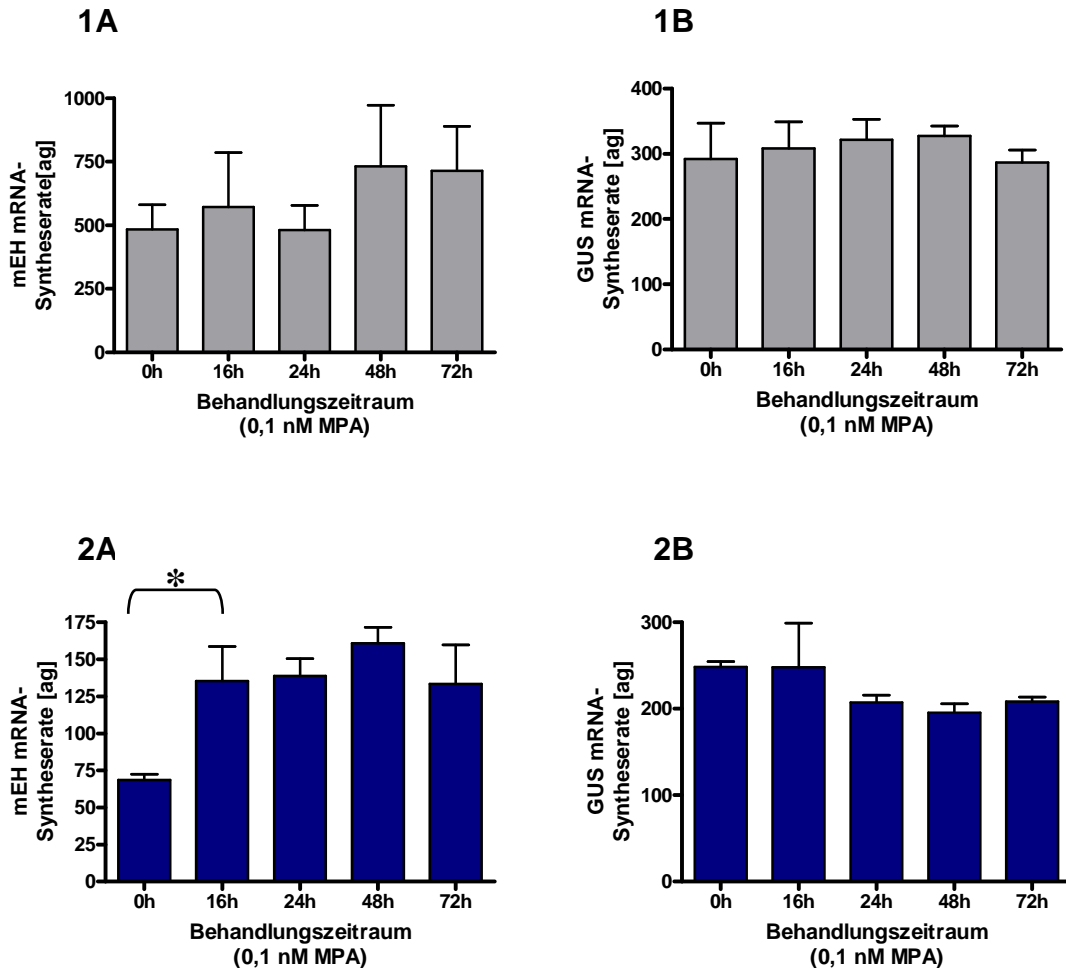


**Abb. 32:** Analyse der mEH Proteinexpression nach Behandlung mit MPA (0,01 – 100 nM) über 24 h. Die ER $\alpha$ -negative Zelllinie IKPRAB36 wird nicht beeinflusst. Bei der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie ECC1-PRAB72 ist eine Regulation der mEH-Expression (2x zur Kontrolle) bei 0,1 nM MPA zu erkennen ( $p_{0,01} = 0,046$ ;  $p_{0,1} = 0,0386$ ).

In Abb. 32 ist zu erkennen, dass in der ER $\alpha$ -negativen Zelllinie IKPRAB36 keine Änderung der mEH-Proteinexpression während der MPA Behandlung auftritt. In der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie ECC1-PRAB72 dagegen kann die stärkste Induktion der mEH-Expression bei 0,1 nM MPA beobachtet werden (Faktor 2 im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle; p = 0,0386). Auch bei den anderen MPA-Konzentrationen findet sich im Vergleich zur Kontrolle eine erhöhte mEH-Proteinexpression. (Abb. 32), die in Anwesenheit von 0,01 nM MPA ebenfalls signifikant ist (Faktor 1,6; p = 0,046). Somit wird die mEH Proteinexpression in Anwesenheit des ER $\alpha$  durch MPA reguliert.

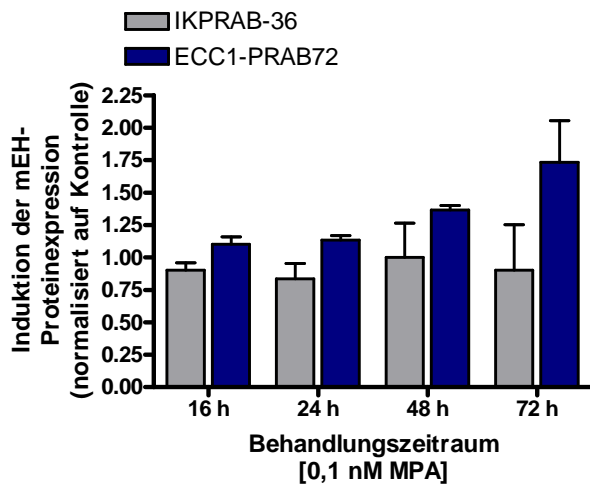
Anschließend wurde die zeitabhängige Induktion der mEH-Expression durch MPA untersucht und beide Zelllinien über 0-72 h mit 0,1 nM MPA behandelt. Nach dieser Behandlung wurde mittels quantitativer RT-PCR die mRNA-Levels der mEH

analysiert (Abb. 33), sowie durch Western Blot die mEH-Proteinexpression (Abb. 34). Dabei wurden alle Angaben zur mEH-Expression auf die mEH-Expression bei  $t = 0$  h normiert.



**Abb. 33:** Analyse der mEH- (A) und GUS- (B) mRNA-Levels in ER $\alpha$ -negativen IKPRAB-36 Zellen (1) und ER $\alpha$ -positiven ECC1-PRAB72 Zellen (2) nach Behandlung mit 0,1 nM MPA von 0-72 h. Die mEH-Analyse in den ER $\alpha$ -negativen Zellen (1A) zeigte keine signifikante Regulation, in den ER $\alpha$ -positiven Zellen (2A) konnte jedoch eine signifikante Regulation der mEH nach 16 h festgestellt werden. Die GUS-Kontrollen bei beiden Zelllinien (1B und 2B) zeigten keinen Einfluss der MPA-Behandlung über 72 h). \*  $p < 0,05$ .

Die mRNA-Levels (Abb. 33) zeigen, dass die Regulation der mEH durch MPA bereits auf mRNA-Ebene erfolgt. Hier findet eine Induktion des mRNA-Levels bereits nach 16 h statt (Faktor 2;  $p = 0,0346$ ). Dieser Anstieg bleibt so über den gesamten Behandlungszeitraum bestehen. Im Gegensatz dazu ist keine Veränderung bei der ER $\alpha$ - Zelllinie IKPRAB-36 festzustellen. In beiden Zelllinien wurde zusätzlich GUS als Kontrollgen eingesetzt. Es zeigt sich keine Regulation des Kontrollgens durch MPA. Anschließend wurden diese Effekte auf Proteinebene mittels Western Blot überprüft (Abb. 34).



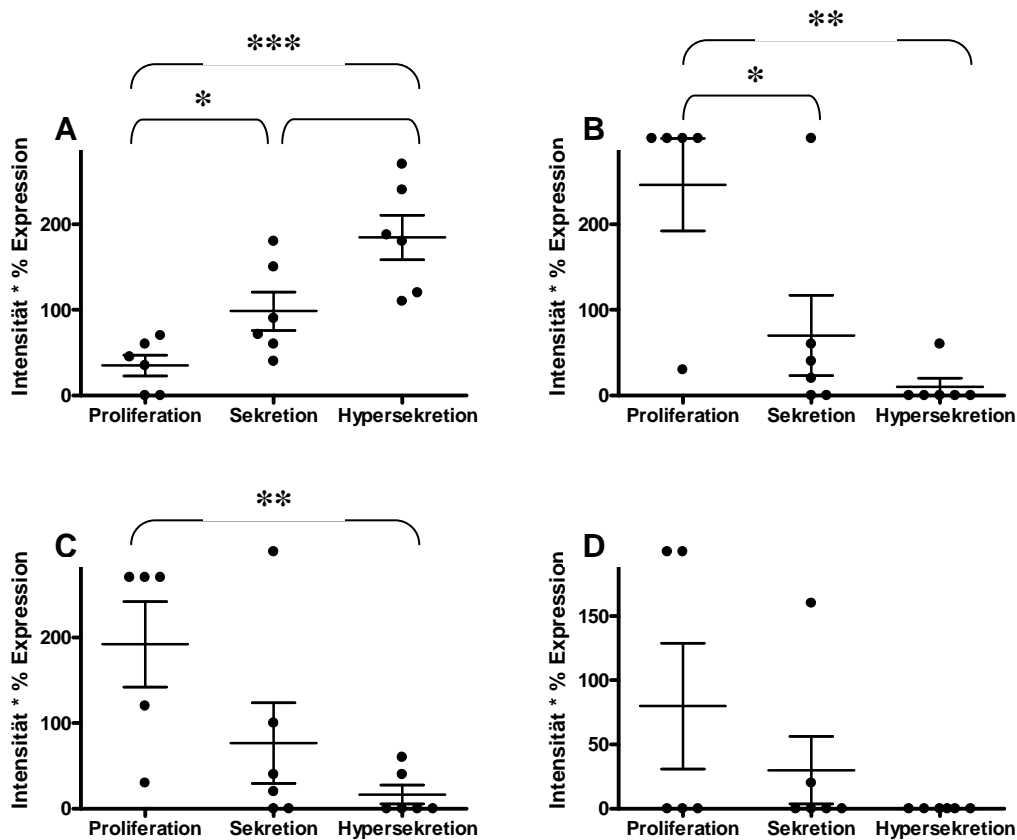
**Abb. 34:** Densitometrische Analyse der mEH-Proteinexpression nach Behandlung mit 0,1 nM MPA über 0-72 h in der ER $\alpha$ -negativen Zelllinie IKPRAB-36 und der ER $\alpha$ -positiven Zelllinie ECC1-PRAB72. Es ist eine Regulation der mEH-Expression (1,7 x zur Kontrolle) nach 72 h zu beobachten.

Die densitometrische Analyse der mEH-Proteinexpression nach Behandlung mit 0,1 nM MPA über 0 – 72 h zeigt im Vergleich zur Kontrolle (t = 0 h) eine Induktion nach 72 h um Faktor  $1,7 \pm 0,3$  (Abb. 34).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass im endometrischen Zellsystem eine Regulation der mEH-Expression durch MPA in Abhängigkeit von ER $\alpha$  nachgewiesen werden konnte.

### 6.2.7 Immunhistochemische Analyse von PR, ER $\alpha$ und pS2

Um die mEH-Expression mit den wichtigsten hormonell regulierten Proteinen in Relation bringen zu können, wurden Gewebeproben aus der ersten Zyklusphase (Proliferation; 5), aus der zweiten Phase (Sekretion; 6) sowie im Verlauf der Schwangerschaft (Hypersekretion; 6) zufällig ausgewählt und die Schnitte mit Hilfe spezifischer AK für PR, ER $\alpha$  und pS2 angefärbt. Wie in Abb. 35 A-D dargestellt ist, sieht man eine Änderung der Proteinexpression innerhalb des Zyklus.



**Abb. 35:** Immunhistochemische Färbung von mEH (A), PR (B), ER $\alpha$  (C) und pS2 (D) im Verlauf des menstruellen Zyklus (Proliferation und Sekretion) und während der Schwangerschaft (Hypersekretion). Alle Proteine erfahren eine Änderung der Expression innerhalb des Zyklus. Statistik. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,0001$ .

Die immunhistochemische Färbung von PR, ER $\alpha$  und PS2 ergab eine Regulation im Verlauf des Zyklus und während der Schwangerschaft, die entgegengesetzt zur Regulation der mEH verläuft. Die mEH steigt, wie bereits beschrieben, im Verlauf des Zyklus stetig signifikant an und erreicht während der Hypersekretion ihren Höhepunkt ( $p_{\text{Prol/Sekr}} = 0,0316$ ;  $p_{\text{Sekr/Hyp}} = 0,037$ ;  $p_{\text{Prol/Hypers.}} = 0,0004$ ). PR dagegen fällt innerhalb des Zyklus ab ( $p_{\text{Prol/Sekr}} = 0,0355$ ) und wird innerhalb der Schwangerschaft weiter herunter reguliert ( $p_{\text{Prol/Hypersekr}} = 0,0011$ ). Ebenso bei ER $\alpha$  ( $p_{\text{Prol/Hypersekr}} = 0,0044$ ) und pS2 (nicht signifikant).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die mEH-Expression innerhalb des Zyklus ansteigt und ihre höchste Expressionsrate in der Schwangerschaft erreicht, während die Expression der Rezeptoren ER $\alpha$ , PR und des  $\beta E_2$ -Zielgens pS2 in der ersten

Hälfte des Zyklus ihren höchsten Wert zeigt. Die Expression dieser Proteine fällt im Verlauf des Zyklus ab und wird innerhalb der Schwangerschaft weiter gehemmt.

## 7 Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden anhand des hormonsensitiven Zellsystems MCF-7 die funktionellen Mechanismen der mEH innerhalb der hormonellen Regulation des Mammakarzinoms untersucht. Außerdem wurde in einem zweiten System, dem humanen Corpusendometrium der Frau, die hormonelle Regulation der mEH-Expression analysiert und so eine weitere, bis dahin unbekannte Funktion der mEH demonstriert.

### 7.1 Funktionelle Analyse

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Funktion der mEH im endokrinen System des Mammakarzinoms analysiert werden. Aus vorangegangenen Arbeiten ist bekannt, dass die mEH im endokrinen System des Mammakarzinoms offensichtlich einen funktionellen Einfluss ausübt. Fritz et al. (2001) konnten zeigen, dass eine verstärkte Expression der mEH im Mammakarzinom zu einem schlechteren Verlauf der Tamoxifentherapie führt. Allerdings waren die funktionellen Hintergründe bisher unbekannt. Literaturrecherchen ergaben, dass die mEH ein Bestandteil der AEBS ist (Mésange et al. 1998), die durch Bindung von Tamoxifen zu einem schlechteren Verlauf der Therapie führen würde. Innerhalb dieser Arbeit konnte jedoch kein Zusammenhang zwischen der AEBS und der Tamoxifenwirkung in MCF-7 Zellen gezeigt werden.

Eine Analyse verschiedener Mammakarzinomzelllinien mittels RT-PCR auf ihre Expression der AEBS Untereinheiten zeigte, dass die meisten in der Literatur beschriebenen Enzyme vorhanden sind. Einzig L-FABP (laut Mésange et al. 2002) konnte in keiner Zelllinien nachgewiesen werden. Da die Untersuchungen von Mésange et al. jedoch mittels Proben aus Rattenleber durchgeführt wurden, ist L-FABP möglicherweise kein Bestandteil der AEBS im Mammakarzinom. Die genaue Zusammensetzung dieses Multiproteinkomplexes in den verschiedenen Geweben konnte bisher noch nicht aufgeklärt werden.

Durch Behandlung mit dem AEBS-Inhibitor DPPE sollte eine funktionelle Tamoxifenbindung durch die AEBS in MCF-7 untersucht werden. Kedjouar et al. (2004) beschrieben eine Inhibition der Tamoxifenbindung an die AEBS durch DPPE,

jedoch konnte dies in unseren Versuchen in MCF-7 nicht dargestellt werden. Es zeigte sich kein Unterschied in der wachstumsinhibierenden Wirkung von Tam oder 4-OHT nach Behandlung mit DPPE. Möglicherweise kann durch fehlende Untereinheiten (z.B. L-FABP) keine funktionsfähige AEBS in MCF-7 gebildet werden. Des Weiteren ist die genaue Zusammensetzung der AEBS, vor allem auch im Mammakarzinom, bis heute nicht eindeutig aufgeklärt. Die in der Literatur beschriebenen Untereinheiten ermöglichen keine definierte Zusammenstellung und wurden von verschiedenen Arbeitsgruppen ermittelt. Häufig wurde als Donorgewebe für die Analysen Lebergewebe, meist aus Ratten, verwendet. Da in verschiedenen Geweben vermutlich unterschiedliche Kombinationen der AEBS-Untereinheiten möglich sind, kann die Zusammensetzung der AEBS im Mammakarzinom durchaus zur Leber variieren.

Möglicherweise ist durch die Blockade der AEBS durch DPPE innerhalb der Zelle auch mehr Tamoxifen zur Verfügung, da es nicht weiter an die AEBS gebunden werden kann. Auf diesem Wege frei gewordenes Tamoxifen könnte dann über ER $\alpha$  verstärkt proliferationsinhibierend wirken (wie in Abb. 7: 25 % Proliferationsinhibition bei  $10^{-6}$  M DPPE, normiert auf Kontrolle).

Eine weitere Erklärung wäre, dass in MCF-7 Zellen keine AEBS gebildet wird und dadurch auch nicht mit DPPE-Behandlung nachgewiesen werden kann.

Tamoxifen und  $\beta E_2$  wirken auf den gleichen Rezeptor (ER $\alpha$ ) und beeinflussen sich dadurch gegenseitig auf kompetitive Art. Eine weitere Möglichkeit für den Einfluss der mEH auf die Tamoxifenwirkung könnte somit auch über eine Verstärkung der  $\beta E_2$ -Antwort erfolgen. Diese könnte über eine direkte Bindung der mEH an den ER $\alpha$  erfolgen oder eventuell über die Wirkung eines Aktivators/Repressors, der durch mEH synthetisiert oder abgebaut wird. Hätte dies eine Verstärkung der  $\beta E_2$ -Antwort zur Folge, würde die Tamoxifenwirkung verringert und somit die Therapie indirekt beeinflusst.

Versuche, in denen eine Überexpression der mEH in MCF-7 Zellen mit gleichzeitiger  $\beta E_2$ -Behandlung betrachtet wurde, zeigten jedoch keinen Einfluss der mEH auf das ERE-Reportergenkonstrukt. Allerdings konnte auf mRNA-Ebene eine leichte Verstärkung des  $\beta E_2$ -Antwortgens pS2 beobachtet werden.

Eine Wiederholung der Versuche mit der verkürzten mEH (ohne katalytisches Zentrum), zeigte eine Parallelverschiebung innerhalb der Dosis-Wirkungskurve des



Reporterassays gegenüber  $\beta E_2$ . Auf mRNA-Ebene zeigte sich eine deutliche Verstärkung der pS2-Induktion durch  $\beta E_2$  in Anwesenheit der verkürzten mEH. Dies lässt den Schluss zu, dass das katalytische Zentrum der mEH für einen Einfluss auf den  $\beta E_2$  Signalweg nicht notwendig ist.

Im Lebergewebe zeigte sich, dass verschiedene Banden für mEH nachgewiesen werden konnten, welche für mutierte Versionen oder Splicingvarianten der mEH stehen könnten. Für den eindeutigen Nachweis, dass es sich bei der nachgewiesenen Bande mit 17 kDa um die hypothetische, verkürzte mEH handelt, fehlt als letzter Nachweis eine N-terminale Sequenzierung der Proteinsequenz dieser Western Blot Bande.

Es besteht die Möglichkeit, dass außer der wt mEH weitere mEH-Varianten auch im Mammakarzinompatienten auftreten können. Durch die Sensitivierung gegenüber  $\beta E_2$  könnte eine vermehrte Expression der hypothetischen, verkürzten mEH-Variante, die im *In vitro*-Versuch eine neue, von der Enzymfunktion unabhängige, Funktion erfüllt, im Mammakarzinom einerseits zur verstärkten Proliferation des Mammakarzinoms und zur Inhibition der Tamoxifentherapie andererseits führen.

Um dies zu überprüfen, wurde ein Screening nach dieser Mutation in DNA-Isolierungen aus Paraffinschnitten von Mammakarzinomen und aus Blutproben einer gesunden Kontrollgruppe durchgeführt. In den auswertbaren Proben konnte jedoch nur die *full length*-mEH nachgewiesen werden. Möglicherweise erfolgten der Verlust des Cytosins und dadurch die Verschiebung des Leserasters erst bei der Translation durch fehlerhaftes Ablesen durch das Ribosom. Dadurch wäre ein Nachweis nur auf Proteinebene möglich. Wie auch in der Literatur beschrieben wird, können zum Beispiel nach Behandlung mit dem Antibiotikum *Hygromycin B* im Verlauf der Translation Lesefehler in Eukaryoten auftreten (Moazed und Noller, 1987). Diese Lesefehler können dann z. B. zu einem verfrühten Abbruch der Translation führen, ähnlich wie bei der verkürzten mEH. Diese Problematik kann durch die gleiche Basenfolge in diesem Bereich der Sequenz (sieben Cytosinreste) noch verstärkt werden. Im Bereich der Mikrosatelliten (repetitive DNA-Elemente, die im Genom häufig vorkommen und in ihren Wiederholungen variieren) konnte ein Zusammenhang zwischen der Instabilität dieser Mikrosatelliten in Brustkrebsgeweben und dem schlechteren Verlauf einer Hochdosis-Chemotherapie

gezeigt werden (Wild et al. 2004), was die Vermutung zulässt, dass repetitive Sequenzen innerhalb von Tumoren eine Rolle spielen können.

Dass die mEH jedoch offensichtlich eine essentielle Rolle in der Regulation der  $\beta E_2$ -Antwort spielt, konnte durch Inhibition der mEH-Expression mit siRNA dargestellt werden. In Abwesenheit der mEH wurde die maximale Induktion von  $\beta E_2$ -Zielgenen, wie pS2 und ER $\alpha$ , unter  $\beta E_2$ -Behandlung verhindert. Dies verdeutlicht, dass die mEH in der Regulation der hormonellen  $\beta E_2$ -Regulation eine bisher unbekannte Rolle spielen könnte.

Dies würde eine direkte Regulation der  $\beta E_2$ -Antwort durch die mEH ermöglichen, was auf Grund des gegenseitigen Einflusses von Östrogen und Antiöstrogen ebenfalls einen Einfluss auf die Antiöstrogenwirkung hätte. In weiteren Untersuchungen sollte die Funktion der mEH im endokrinen System deshalb genauer analysiert werden.

### 7.2 Regulation der mEH

Im zweiten Teil der Arbeit sollte die Regulation der mEH näher untersucht werden. Da durch die Ergebnisse des ersten Abschnitts dargestellt wurde, dass die mEH offensichtlich an der Regulation der  $\beta E_2$ -Antwort beteiligt ist, sollte im zweiten Teil eine mögliche hormonelle Expressionsregulation der mEH untersucht werden.

Bisher wurde in Ratten eine hormonelle Regulation der Expression von Epoxidhydrolasen durch Testosteron nachgewiesen (Denlinger and Vesell 1989). In kastrierten Individuen konnte durch Gabe von Testosteronpropionaten die mEH Aktivität erhöht werden. Ebenso konnte gezeigt werden, dass durch neonatale Testosteronbehandlung die mEH-Aktivität im adulten Tier beeinflusst wird. Ähnliche Ergebnisse wurden von Inoue et al. (1993) in Mäusen erhalten. Auch hier wird die mEH-Aktivität hormonell beeinflusst. So zeigten männliche Individuen deutlich stärkere mEH-Aktivität als weibliche und eine Kastration der Männchen führte zu einem Abfall der mEH-Aktivität. Die Behandlung dieser Tiere mit Testosteron führte zu einer Wiederherstellung der normalen Aktivität.  $\beta E_2$  dagegen führte zu einer Inhibition der mEH-Aktivität in Männchen und Weibchen. Diese Beobachtungen im

Tiermodell legen die Vermutung nahe, dass auch im humanen System eine hormonelle Regulation vorliegt.

Dazu wurden MCF-7 und T47D Zellen mit ansteigenden Konzentrationen  $\beta E_2$ , MPA und Testosteron für 24 h behandelt. Die Ergebnisse zeigten jedoch keine signifikante Regulation der mEH-Expression durch die verwendeten Hormone in diesen hormonsensitiven Zellsystemen.

Möglicherweise ist in den verwendeten artifiziellen Zellsystemen eine hormonelle Regulation der mEH nicht nachweisbar, weshalb die weiteren Untersuchungen in einem zweiten hormonell regulierten System, dem Corpusendometrium der Frau durchgeführt wurden. In Paraffin-Gewebeschnitten aus Patientinnen in verschiedenen Stadien des Menstruationszyklus sollte durch immunhistochemische Färbung zunächst eine mögliche mEH-Expression untersucht werden. Es konnte eine mEH Regulation im Verlauf des Menstruationszyklus nachgewiesen werden, die zu einer Erhöhung des mEH-Levels innerhalb der zweiten Hälfte des Zyklus führte, der während der Schwangerschaft sogar noch verstärkt wurde. Die statistische Analyse der mEH-Expression zeigte eine deutliche Varianz innerhalb der einzelnen Subgruppen, bei genauerem Betrachten der Patientendaten lässt sich diese allerdings durch unterschiedlich lange Zyklen bzw. durch eine hormonelle Therapie einzelner Fälle erklären. Nach Betrachtung der gesamten Gruppen ergab sich jedoch eine deutliche, signifikante Änderung der mEH-Expression innerhalb des menstruellen Zyklus der Frau.

Somit scheint die mEH auch im Menschen einer hormonellen Regulation zu unterliegen.

Als weitere Subgruppe wurden Proben von postmenopausalen Frauen untersucht. Diese wiesen eine geringe mEH-Expression ähnlich der ersten Zyklushälfte (Proliferation) auf. In der Postmenopause findet nur eine geringe Regulation durch Hormone statt. Möglicherweise lässt sich die geringe mEH-Expression in dieser Phase durch fehlende hormonelle Induktion erklären.

Zusätzlich zur immunhistochemischen Analyse der Paraffinschnitte wurden Frischgewebeproben mittels Western Blot analysiert. Die Ergebnisse zeigten zudem deutlich die bereits in der Literatur (Hammock et al. 1997) beschriebene Variabilität der mEH-Expression innerhalb des gleichen Organs bei verschiedenen Individuen.

Innerhalb der untersuchten Proben findet sich eine starke mEH-Expression, aber auch Proben mit sehr geringer, kaum noch detektierbarer Expression sind vorhanden.

Eine Unterscheidung der verschiedenen Subgruppen ist mit dieser Methode nicht möglich (Daten nicht gezeigt), da durch die Homogenisierung des gesamten Gewebes nicht mehr zwischen Endometrium und Stroma unterschieden werden kann. Da die mEH-Expression in den Paraffinschnitten vorwiegend im Endometrium auftrat, würde der Stromaanteil im jeweiligen Gewebe diese verfälschen. Aufgrund der Abhängigkeit der mEH-Expression von verschiedenen Faktoren können hormonell bedingte Änderungen mit diesem Versuchsaufbau nicht nachgewiesen werden.

Insgesamt zeigen die Expressionsmuster, die man anhand der immunhistochemischen Analysen für die mEH in dieser Arbeit zeigen konnte, eine starke Ähnlichkeit zur Progesteronexpression während des menstruellen Zyklus bzw. im Verlauf der Schwangerschaft. Aus diesem Grund wurde eine mögliche Regulation der mEH-Expression durch Progesteron untersucht. Im humanen Zellkultursystem konnte eine ER $\alpha$ -abhängige Regulation der mEH-Expression durch MPA gezeigt werden. In der ER $\alpha$ + Endometriumzelllinien konnte nach MPA Behandlung eine Induktion der mEH-Expression nachgewiesen werden, im Gegensatz zur ER $\alpha$ -Zelllinie. Diese Regulation konnte nicht nur auf mRNA- sondern auch auf Proteinebene in nachgewiesen werden. Dabei konnte in der ER $\alpha$ + Zelllinie in Gegenwart von 0,1 nM MPA die höchste Induktion erreicht werden. Diese Regulation der mEH durch MPA erfolgt offenbar nicht auf direktem Weg über den PR, da beide verwendeten Zelllinien diesen enthielten, sondern über einen unbekanntem, indirekten Weg, der ER $\alpha$  benötigt. Bisher ist durch Progesteron vor allem eine Regulation der hormonellen Rezeptoren bekannt. Selcer et al. (1988) beschrieben eine selektive Verringerung der nukleären ER-Expression durch Progesteron im Säugetieruterus, ebenso wie in Vögeln. Durch Behandlung mit Progesteron wurden die Rezeptorlevel bis auf 50 % im Vergleich zur Kontrolle reduziert. Nardulli und Katzenellenbogen beschrieben 1988 eine Regulation des PR selbst durch Progestin R5020 (synthetische Form von Progesteron). Durch hohe Dosen (20 nM) konnte der Rezeptor auf 15-20 % seiner Ausgangskonzentration herunterreguliert werden. Außerdem konnte mittels spezifischem AK gezeigt werden, dass auch beide

Isoformen (PRA und PRB) herunterreguliert werden. Dabei wird nicht nur der Abbau des Rezeptors initiiert, sondern auch die Neusynthese inhibiert.

Allerdings zeigte Ballaré et al in (2003) eine mögliche Erklärung für eine ER $\alpha$ -abhängige Regulation der mEH durch Progesteron. In dieser Veröffentlichung wurden zwei Domänen des PR beschrieben, welche mit dem ER interagieren und für eine Progesteron-abhängige Aktivierung des c-Src/Erk Signalwegs notwendig sind. Dieser Signalweg induziert dann die Transkription bestimmter Zielgene. Möglicherweise ist die mEH eine dieser Zielgene, was die Induktion der mEH-Expression durch MPA in Abhängigkeit des ER $\alpha$  erklären würde.

Um die mEH-Expression mit den wichtigsten hormonell regulierten Proteinen in Relation bringen zu können, wurde anhand der Paraffingewebeschnitte die Expression der Rezeptoren ER $\alpha$  und PR, ebenso wie die Expression des  $\beta$ E<sub>2</sub>-Zielgens pS2 überprüft. Es zeigte sich eine gegensätzliche Regulation von ER $\alpha$ , PR und pS2 im Vergleich zur Regulation der mEH: die mEH zeigte im Verlauf des Zyklus eine ansteigende Expression, während PR, ER $\alpha$  und pS2 eine abfallende Expression zeigten.

Die verminderte Expression des PR kann durch eine Feedback-Regulation seines Liganden Progesteron erklärt werden, da die Konzentration des Progesterons im Verlauf des Zyklus ansteigt und den höchsten Wert in der Schwangerschaft erreicht. Diese hohen Konzentrationen gegen Ende des Zyklus führen zum Abbau des PR, wie auch schon von Katzenellenbogen et al. (1998) beschrieben.

Die Abnahme des ER $\alpha$  wiederum kann durch die Tatsache erklärt werden, dass Progesteron auch in diesem Fall zu einem Abbau des ER $\alpha$  führt (Selcer et al. 1998). Durch die Regulation der Expression von pS2 durch  $\beta$ E<sub>2</sub> und sein Rezeptor ER $\alpha$  führt ein Abbau des Rezeptors im Verlauf des Zyklus wiederum zu einer verminderten Expression des pS2. Diese wurde bereits im Mammakarzinom beobachtet (Stacker et al. 1988; Pichon et al. 1993) und konnte nun im Corpusendometrium durch diese Ergebnisse bestätigt werden.

### 7.3 Schlussbetrachtung

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass mEH eine bisher unbekannte regulatorische Funktion innerhalb des  $\beta E_2$ -Systems einnimmt. Durch die Überexpression einer C-terminal verkürzten mEH konnte eine Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve von  $\beta E_2$  beobachtet werden. Dies hat zur Folge, dass der  $\beta E_2$ -Weg verstärkt wird und somit die Wirkung des Tamoxifen verringert wird. Gleichzeitig konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition der mEH-Expression mittels siRNA zu einer verringerten Induktion der  $\beta E_2$ -Zielgene pS2 und ER $\alpha$  führt. Zusammengefasst bedeutet dies, dass die mEH in der Regulation der  $\beta E_2$ -Antwort offensichtlich involviert und für eine Weiterführung des Signalwegs essentiell ist.

Da eine hormonelle Regulation der mEH-Expression bereits aus dem Tiermodell bekannt war, wurde zur genaueren Analyse der funktionellen Hintergründe die Regulation der mEH-Expression im humanen Corpusendometrium der Frau im Verlauf des Menstruationszyklus untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass die mEH in der ersten Zyklushälfte nur schwach exprimiert, im Verlauf der zweiten Hälfte jedoch verstärkt exprimiert wird. Während der Schwangerschaft ergab sich eine maximale mEH-Expression in diesem Gewebe.

Durch weitere Analysen im Endometrium-Zellsystem konnte eine Induktion der mEH-Expression in Abhängigkeit des ER $\alpha$  nachgewiesen werden.

Zusammenfassend ermöglichen diese Ergebnisse neue Einblicke in die eventuellen Mechanismen der Antiöstrogenresistenz beim Mammakarzinom. Durch die Sensitivierung gegenüber  $\beta E_2$  wird die Tamoxifenwirkung inhibiert. Ebenso würde in diesem Fall die Therapie mit Aromataseinhibitoren negativ beeinflusst werden. Durch genauere Analyse der mEH Funktion in diesem System, könnte möglicherweise ein neuer Ansatz innerhalb der Mammakarzinomtherapie ermöglicht werden, der wiederum zu einem Benefit für antiöstrogenresistente Patientinnen führt.

## 8 Literatur

**Alves C, von Dippe P, Amoui M, Levy D.** Bile acid transport into hepatocyte smooth endoplasmic reticulum vesicles is mediated by microsomal epoxide hydrolase, a membrane protein exhibiting two distinct topological orientations. *J Biol Chem.* 1993 Sep 25;268(27):20148-55.

**Arand M, Muller F, Mecky A, Hinz W, Urban P, Pompon D, Kellner R, Oesch F** Catalytic triad of microsomal epoxide hydrolase: replacement of Glu404 with Asp leads to a strongly increased turnover rate. *Biochem J.* 1999 Jan 1;337 (Pt 1):37-43.

**Ballaré C, Uhrig M, Bechtold T, Sancho E, Di Domenico M, Migliaccio A, Auricchio F, Beato M.** Two domains of the progesterone receptor interact with the estrogen receptor and are required for progesterone activation of the c-Src/Erk pathway in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 2003 Mar;23(6):1994-2008.

**Berry M, Metzger D, Chambon P.** Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* 1990 Sep;9(9):2811-8.

**Bracey LT, Paigen K.** Changes in translational yield regulate tissue-specific expression of beta-glucuronidase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987 Dec;84(24):9020-4.

**Cresteil T, Beaune P, Kremers P, Celier C, Guengerich FP, Leroux JP.** Immunoquantification of epoxide hydrolase and cytochrome P-450 isozymes in fetal and adult human liver microsomes. *Eur J Biochem.* 1985 Sep 2;151(2):345-50.

**Coller JK, Fritz P, Zanger UM, Siegle I, Eichelbaum M, Kroemer HK, Murdter TE.**

Distribution of microsomal epoxide hydrolase in humans: an immunohistochemical study in normal tissues, and benign and malignant tumours. *Histochem J.* 2001 Jun;33(6):329-36.

**Denlinger CL, Vesell ES.** Hormonal regulation of the developmental pattern of epoxide hydrolases. Studies in rat liver. *Biochem Pharmacol.* 1989 Feb 15;38(4):603-10.

**von Dippe, P., Amoui, M., Stellwagen, R. H., and Levy, D.** The Functional Expression of Sodium-dependent Bile Acid Transport in Madin-Darby Canine Kidney Cells Transfected with the cDNA for Microsomal Epoxide Hydrolase (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 18176-18180

**Falany CN, McQuiddy P, Kasper CB** Structure and organization of the microsomal xenobiotic epoxide hydrolase gene. *J Biol Chem.* 1987 Apr 25;262(12):5924-30. Erratum in: *J Biol Chem* 1987 Jul 25;262(21):10412.

**Fargin A, Faye JC, le Maire M, Bayard F, Potier M, Beauregard G.** Solubilization of a tamoxifen-binding protein. Assessment of its molecular mass. *Biochem J.* 1988 Nov 15;256(1):229-36.

**Faye JC, Jozan S, Redeuilh G, Baulieu EE, Bayard F.** Physicochemical and genetic evidence for specific antiestrogen binding sites. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Jun;80(11):3158-62.

**Friedberg T, Lollmann B, Becker R, Holler R, Arand M, Oesch F.** Investigating the role of the microsomal epoxide hydrolase membrane topology and its implication for drug metabolism pathways. *Adv Exp Med Biol.* 1996;387:17-24. Review.



**Fritz P, Behrle E, Zanger UM, Murdter T, Schwarzmann P, Kroemer HK.** Immunohistochemical assessment of human microsomal epoxide hydrolase in primary and secondary liver neoplasm: a quantitative approach. *Xenobiotica*. 1996 Jan;26(1):107-16.

**Fritz P, Murdter TE, Eichelbaum M, Siegle I, Weissert M, Zanger UM.** Microsomal epoxide hydrolase expression as a predictor of tamoxifen response in primary breast cancer: a retrospective exploratory study with long-term follow-up. *J Clin Oncol*. 2001 Jan 1;19(1):3-9.

**Guengerich FP:** Epoxide hydrolase: properties and metabolic roles. *Rev Biochem Toxicol* 1982;4:5-30

**Hammock BD, Storms DH, Grant DF** Epoxide Hydrolases. In: Guengerich FP, editor. *Comprehensive toxicology*, vol. 3. Oxford: Pergamon; 1997. p. 283-305.

**Hassett C, Robinson KB, Beck NB, Omiecinski CJ.** The human microsomal epoxide hydrolase gene (EPHX1): complete nucleotide sequence and structural characterization. *Genomics*. 1994 Sep 15;23(2):433-42.

**Hattori N, Fujiwara H, Maeda M, Fujii S, Ueda M.** Epoxide hydrolase affects estrogen production in the human ovary. *Endocrinology*. 2000 Sep;141(9):3353-65.

**Inoue N, Yamada K, Imai K, Aimoto T.** Sex hormone-related control of hepatic epoxide hydrolase activities in mice. *Biol Pharm Bull*. 1993 Oct;16(10):1004-7.

**Kaneko, S.** Antiepileptic drug therapy and reproductive consequences: functional and morphologic effects. (1991) *Reprod. Toxicol*. 5, 179-198

**Katzenellenbogen BS, Montano MM, Ekena K, Herman ME, McInerney EM.**

Antiestrogens: mechanisms of action and resistance in breast cancer. William L. McGuire Memorial Lecture. Breast Cancer Res Treat. 1997 May;44(1):23-38. Review.

**Katzenellenbogen BS.** Mechanisms of action and cross-talk between estrogen receptor and progesterone receptor pathways. J Soc Gynecol Investig. 2000 Jan-Feb;7(1 Suppl):S33-7. Review.

**Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS.** Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. Mol Endocrinol. 1996 Feb;10(2):119-31. Review.

**Kedjouar B, Daunes S, Vilner BJ, Bowen WD, Klæbe A, Faye JC, Poirot M.** Structural similitudes between cytotoxic antiestrogen-binding site (AEBS) ligands and cytotoxic sigma receptor ligands. Evidence for a relationship between cytotoxicity and affinity for AEBS or sigma-2 receptor but not for sigma-1 receptor. Biochem Pharmacol. 1999 Dec 15;58(12):1927-39.

**Kedjouar B, de Medina P, Oulad-Abdelghani M, Payre B, Silvente-Poirot S, Favre G, Faye JC, Poirot M.** Molecular characterization of the microsomal tamoxifen binding site. J Biol Chem. 2004 Aug 6;279(32):34048-61. Epub 2004 Jun 2.

**Kim SK, Novak RF.** The role of intracellular signaling in insulin-mediated regulation of drug metabolizing enzyme gene and protein expression. Pharmacol Ther. 2007 Jan;113(1):88-120. Epub 2006 Nov 13. Review.

**Kim SK, Woodcroft KJ, Kim SG, Novak RF.** Insulin and glucagon signaling in regulation of microsomal epoxide hydrolase expression in primary cultured rat hepatocytes. Drug Metab Dispos. 2003 Oct;31(10):1260-8.

**Kisanga ER, Gjerde J, Guerrieri-Gonzaga A, Pigatto F, Pesci-Feltri A, Robertson C, Serrano D, Pelosi G, Decensi A, Lien EA.** Tamoxifen and metabolite concentrations in serum and breast cancer tissue during three dose regimens in a randomized preoperative trial. *Clin Cancer Res.* 2004 Apr 1;10(7):2336-43.

**de Kok JB, Roelofs RW, Giesendorf BA, Pennings JL, Waas ET, Feuth T, Swinkels DW, Span PN.** Normalization of gene expression measurements in tumor tissues: comparison of 13 endogenous control genes. *Lab Invest.* 2005 Jan;85(1):154-9.

**Kon OL.** An antiestrogen-binding protein in human tissues. *J Biol Chem.* 1983 Mar 10;258(5):3173-7.

**Kurebayashi J.** Endocrine-resistant breast cancer: underlying mechanisms and strategies for overcoming resistance. *Breast Cancer.* 2003;10(2) 112-9. Review.

**Lee LG, Connell CR, Woo SL, Cheng RD, McArdle BF, Fuller CW, Halloran ND, Wilson RK.** DNA sequencing with dye-labeled terminators and T7 DNA polymerase: effect of dyes and dNTPs on incorporation of dye-terminators and probability analysis of termination fragments. *Nucleic Acids Res.* 1992 May 25;20(10):2471-83.

**Lippman M, Bolan G, Huff K.** The effects of estrogens and antiestrogens on hormone-responsive human breast cancer in long-term tissue culture. *Cancer Res.* 1976 Dec;36(12):4595-601.

**Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A, Malet C, Fournier S.** Estradiol-progesterone interaction in normal and pathological human breast cells. *Ann Endocrinol (Paris).* 1986;47(3):179-87. Review. French.

**Mauvais-Jarvis P, Kuttann F, Gompel A.** Estradiol/progesterone interaction in normal and pathologic breast cells. *Ann N Y Acad Sci.* 1986;464:152-67.

**McDonnell DP, Dana SL, Hoener PA, Lieberman BA, Imhof MO, Stein RB**  
Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann N Y Acad Sci.* 1995 Jun 12;761:121-37

**Mesange F, Sebbar M, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P, Bayard F, Poirot M, Faye JC.** Identification of two tamoxifen target proteins by photolabeling with 4-(2-morpholinoethoxy)benzophenone. *Bioconjug Chem.* 2002 Jul-Aug;13(4):766-72.

**Mesange F, Sebbar M, Kedjouar B, Capdevielle J, Guillemot JC, Ferrara P, Bayard F, Delarue F, Faye JC, Poirot M.** Microsomal epoxide hydrolase of rat liver is a subunit of the anti-oestrogen-binding site. *Biochem J.* 1998 Aug 15;334 ( Pt 1):107-12.

**Miyata M, Kudo G, Lee YH, Yang TJ, Gelboin HV, Fernandez-Salguero P, Kimura S, Gonzalez FJ.** Targeted disruption of the microsomal epoxide hydrolase gene. Microsomal epoxide hydrolase is required for the carcinogenic activity of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Biol Chem.* 1999 Aug 20;274(34):23963-8.

**Moazed D, Noller HF.** Interaction of antibiotics with functional sites in 16S ribosomal RNA. *Nature.* 1987 Jun 4-10;327(6121):389-94.

**Montgomery Rice V.** Hormone replacement therapy: optimising the dose and route of administration. *Drugs Aging.* 2002;19(11):807-18. Review.

**Morisseau C, Newman JW, Dowdy DL, Goodrow MH, Hammock BD.** Inhibition of microsomal epoxide hydrolases by ureas, amides, and amines. *Chem Res Toxicol.* 2001 Apr;14(4):409-15.

**Mullis KB, Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 1987;155:335-50.

**Murphy LC, Sutherland RL.** A high-affinity binding site for the antioestrogens, tamoxifen and CI 628, in immature rat uterine cytosol which is distinct from the oestrogen receptor. *J Endocrinol.* 1981 Oct;91(1):155-61.

**Nardulli AM and Katzenellenbogen BS** Progesterone receptor regulation in T47D human breast cancer cells: analysis by density labeling of progesterone receptor synthesis and degradation and their modulation by progestin. *Endocrinology*, Vol 122, 1532-1540, 1988

**Newman JW, Morisseau C, Hammock BD** Epoxide hydrolases: their roles and interactions with lipid metabolism. *Prog Lipid Res.* 2005 Jan;44(1):1-51. Epub 2005 Jan 25. Review.

**Oesch F, Morris N, Daly JW.** Genetic expression of the induction of epoxide hydrolase and aryl hydrocarbon hydroxylase activities in the mouse by phenobarbital or 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol.* 1973 Sep;9(5):629-6.

**Oesch F.** Purification and specificity of a human microsomal epoxide hydratase. *Biochem J.* 1974 Apr;139(1):77-88.

**Omiecinski, C. J., Aicher, L., and Swenson, L.** Developmental expression of human microsomal epoxide hydrolase (1994) *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 269, 417-423

**Pacifici, G. M., Colizzi, C., Giuliani, L., and Rane, A.** Cytosolic epoxide hydrolase in fetal and adult human liver. (1983) *Arch. Toxicol.* 54, 331-341

**Paik S, Hartmann DP, Dickson RB, Lippman ME.** Antiestrogen resistance in ER positive breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat.* 1994;31(2-3):301-7. Review.

**Pichon MF, Milgrom E.** Clinical significance of the estrogen regulated pS2 protein in mammary tumors. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1993 Aug;15(1):13-21.

**Reddel RR, Murphy LC, Hall RE, Sutherland RL.** Differential sensitivity of human breast cancer cell lines to the growth-inhibitory effects of tamoxifen. *Cancer Res.* 1985 Apr;45(4):1525-31.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977 Dec;74(12):5463-7.

**Seidegard J, DePierre JW.** Microsomal epoxide hydrolase. Properties, regulation and function. *Biochim Biophys Acta.* 1983 Dec 29;695(3-4):251-70. Review.

**Selcer KW, Leavitt WW.** Progesterone down-regulation of nuclear estrogen receptor: a fundamental mechanism in birds and mammals. *Gen Comp Endocrinol.* 1988 Dec;72(3):443-52.

**Sinal CJ, Miyata M, Tohkin M, Nagata K, Bend JR, Gonzalez FJ.** Targeted disruption of soluble epoxide hydrolase reveals a role in blood pressure regulation. *J Biol Chem.* 2000 Dec 22;275(51):40504-10.

**Stack G, Kumar V, Green S, Ponglikitmongkol M, Berry M, Rio MC, Nunez AM, Roberts M, Koehl C, Bellocq P, et al.** Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells. *Cancer Treat Res.* 1988;40:185-206.

**Sutherland RL, Murphy LC, San Foo M, Green MD, Whybourne AM, Krozowski ZS.** High-affinity anti-oestrogen binding site distinct from the oestrogen receptor. *Nature.* 1980 Nov 20;288(5788):273-5.

**Taura KI, Yamada H, Hagino Y, Ishii Y, Mori MA, Oguri K.** Interaction between cytochrome P450 and other drug-metabolizing enzymes: evidence for an association of CYP1A1 with microsomal epoxide hydrolase and UDP-glucuronosyltransferase. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000 Jul 14;273(3):1048-52.

**Thomas H, Hartmann R, Oesch F.** Human liver cytosolic epoxide hydrolases. Schladt L. Eur J Biochem. 1988 Oct 1;176(3):715-23.

**Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci U S A. 1979 Sep;76(9):4350-4.

**Vogel-Bindel, U., Bentley, P., and Oesch, F.** Endogenous role of microsomal epoxide hydrolase. Ontogenesis, induction inhibition, tissue distribution, immunological behaviour and purification of microsomal epoxide hydrolase with 16 alpha, 17 alpha-epoxyandrostene-3-one as substrate. (1982) Eur. J. Biochem. 126, 425-431

**Wang X, Wang M, Niu T, Chen C, Xu X.** Microsomal epoxide hydrolase polymorphism and risk of spontaneous abortion. Epidemiology. 1998 Sep;9(5):540-4.

**Watts CK, Murphy LC, Sutherland RL.** Microsomal binding sites for nonsteroidal anti-estrogens in MCF 7 human mammary carcinoma cells. Demonstration of high affinity and narrow specificity for basic ether derivatives of triphenylethylene. J Biol Chem. 1984 Apr 10;259(7):4223-9.

**Wild PJ, Reichle A, Andreesen R, Rockelein G, Dietmaier W, Ruschoff J, Blaszyk H, Hofstadter F, Hartmann A.** Microsatellite instability predicts poor short-term survival in patients with advanced breast cancer after high-dose chemotherapy and autologous stem-cell transplantation. Clin Cancer Res. 2004 Jan 15;10(2):556-64.

**Zhu Q, von Dippe P, Xing W, Levy D** Membrane topology and cell surface targeting of microsomal epoxide hydrolase. Evidence for multiple topological orientations. J Biol Chem. 1999 Sep 24;274(39):27898-904.

## 9 Danksagung

### Mein besonderer Dank geht

an Prof. Dr. Klaus Pfizenmaier für die Übernahme des Hauptreferats und die Betreuung der Arbeit von universitärer Seite aus.

an Prof. Dr. Cornelius Knabbe vom Robert Bosch Krankenhaus in Stuttgart für die Übernahme des Co-Referats und die Möglichkeit zur Durchführung meiner Promotion am IKP Stuttgart. Ebenso für die Themenstellung, für die Betreuung, die Diskussionen und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

an Prof. Dr. Michel Eichelbaum und Prof. Dr. Matthias Schwab für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes am IKP Stuttgart.

an Dr. Peter Fritz für die Probenbereitstellung aus der Pathologie des Robert Bosch Krankenhauses, die Ideen und die nette Diskussionsatmosphäre.

an Miriam Buck, Simone Popp, Matthias Stope, Christian Joffroy, Steffanie Laukemann, Monika Orendi, Tabea Peusser und Jan Weile für die nette Atmosphäre in der Arbeitsgruppe, die gemeinsame Arbeit im Labor und für wertvolle wissenschaftliche Diskussionen.

an alle Mitglieder des IKP für die freundliche Arbeitsatmosphäre und für viele Stunden mit lachenden und weinenden Augen ganz besonders an Maike, Ioanna, Silke, Julia, Kerstin und alle, die ich jetzt vergessen habe.

an meine Mutter und meine Geschwister für ihre immerwährende Unterstützung.

vor allem an meinen Mann Thorsten für die Unterstützung, die Ratschläge und ganz besonders dafür, dass er immer für mich da ist.