



universität
wien

DIPLOMARBEIT

Expression von Estrogen-metabolisierenden Enzymen in
Ovarialkarzinom- und Osteosarkomzelllinien: Bedeutung für das
Tumorstadium

angestrebter akademischer Grad

Magistra der Pharmazie (Mag.pharm.)

Verfasserin:	Susanne Maria Elisabeth Linkesch
Matrikel-Nummer:	0104260
Studienrichtung:	Pharmazie (A-449)
Betreuer:	Ao. Univ. Prof. Walter Jäger

Wien, Oktober 2008

DANKSAGUNG

In dieser Diplomarbeit wurden die Laboruntersuchungen, am Institut für Pathophysiologie, Zentrum für Physiologie, Pathophysiologie und Immunologie der Medizinischen Universität Wien am AKH Wien (Vorstand: Univ. Prof. Dr. Erika Jensen-Jarolim), in Kooperation mit dem Department für klinische Pharmazie und Diagnostik am Pharmaziezentrum der Universität Wien (Leiter: Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger) zwischen Oktober 2007 und Februar 2008 durchgeführt.

An erster Stelle möchte ich mich herzlich bei Herrn Ao. Univ. Prof. Dr. Walter Jäger (Department für klinische Pharmazie und Diagnostik der Universität Wien) und Frau A.o Univ. Prof. Dr. Theresia Thalhammer bedanken. Ihrer guten Kooperation ist es zu verdanken, dass die Durchführung der praktischen Arbeit in der Arbeitsgruppe „Zelluläre Pathologie und Pharmakokinetik“ am AKH möglich war. Danken möchte ich besonders für die Unterstützung in wissenschaftlichen Fragestellungen und das stets freundliche und kollegiale Arbeitsklima.

Mein großer Dank gilt den Mitgliedern der Arbeitsgruppe am AKH, aber ganz speziell Herrn Mag. Martin Svoboda, für die überaus kompetente Hilfe bei der Durchführung der praktischen Arbeiten zu dieser Diplomarbeit, die für mich doch ein neues Themengebiet darstellten.

Meiner Familie danke ich für die große Geduld und finanzielle Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit und möchte ihr an dieser Stelle diese Diplomarbeit widmen, speziell meinem Vater.

Diese Gelegenheit möchte ich auch nutzen um mich von ganzem Herzen für die großartige Unterstützung, den Beistand und die Geduld meiner Studienkollegen und Freunde zu bedanken. Insbesondere meine „Wiener Familie“ und mein gesamter Linzer Freundeskreis seien hier erwähnt. Ohne sie alle wäre mir die Studienzeit unvorstellbar gewesen.

Zuletzt noch ein „Danke“ für die freundliche Assistenz von Frau Mag. Magdalena Krenn in computertechnischen Fragen.

INHALTSVERZEICHNIS

1. PROBLEMSTELLUNG	5
2. EINFÜHRUNG.....	6
2.1 Krebs: Eine Einführung.....	6
2.2 Ovarialkarzinom: Zahlen und Fakten.....	6
2.2.1 Epidemiologie	6
2.2.2 Risikofaktoren	7
2.3 Osteosarkom.....	8
2.4 Estrogene.....	8
2.4.1 Wirkung der Estrogene.....	10
2.4.2 Estrogene als Risikofaktoren für Brustkrebs.....	11
2.4.3 Estron-3-sulfat (E1S).....	12
2.5 Estrogenrezeptoren (ER).....	12
2.5.1 Estrogenezeptor α :	14
2.5.2 Estrogenrezeptor β :	15
2.6 Estrogenbildung	15
2.7 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase	16
2.7.1 Enzymatische Charakteristika und Funktion der 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2 ..	17
2.8 Estrogensulfatase.....	18
2.9 Sulfotransferase.....	19
 3. METHODEN UND MATERIALIEN:	 21
3.1 Zellkultur.....	21
3.1.1 Verwendete Zelllinien:	21
3.1.2 Behandlung der Zelllinien:	22
3.2 Test auf Verunreinigung der Zellen mit Mycoplasmen:	25
3.3 Isolierung der RNA	27
3.4 Reverse Transkription der mRNA:	30
3.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR):	31
3.6 Detektion von PCR Produkten:	35
3.7 Wachstumstests:	36

4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	40
4.1	mRNA Expressionsstudie:	41
4.1.1.	Expression von β -Actin:.....	41
4.1.2	Expression von ER α :.....	42
4.1.3	Expression von ER β :.....	43
4.1.4	Expression von SULT 1A1:	44
4.1.5	Expression von SULT 2A1	45
4.1.7	Expression von 17 β -HSD-1	47
4.1.8	Expression von 17 β -HSD-2	48
4.1.9	Expression von STS	49
4.2	Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in Ovarialkarzinomzelllinien	53
4.3	Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in der MCF7 Brustkrebszelllinie	55
4.4	Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in Osteosarkomzelllinie	56
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	59
6.	ABBILDUNGS- UND TABELLENVERZEICHNIS	61
7.	LITERATURVERZEICHNIS	63
8.	LEBENS LAUF	68

1. PROBLEMSTELLUNG

Estrogen, wie das am besten wirksame 17β -Estradiol (E2), binden an die nukleäre Rezeptoren, den Estrogenrezeptor (ER) α und ER β . Diese Rezeptoren finden sich an vielen Zellen, nicht nur in den klassischen endokrinen Organen (Uterus, Ovar, Mamma), sondern auch in Zellen der Knochen, Blutgefäßen etc. Estrogene spielen in der Entwicklung, z.B. der Ovarien, eine wichtige Rolle. Weiters kommt Estrogenen eine wichtige Rolle in der Karzinogenese und Tumorprogression zu. Ihre fördernde Rolle auf die Entwicklung und den Verlauf von Brustkrebs ist von entscheidender Bedeutung, auch für eine therapeutische Behandlung dieser Tumorerkrankung.

Estrogene werden als Sulfat oder Glukuronid inaktiviert und können in der Folge nicht mehr an den Estrogenrezeptor binden. Dabei ist besonders Estron-3-sulfat (E1S) wichtig, welches im Blut in 10-15 facher höherer Konzentration als 17β -Estradiol (E2) vorkommt und eine Speicherform für Estrogene darstellt. Durch Desulfatierung bei spezifischen Sulfatasen und 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 1 (17β -HSD-1) kann E1S wieder in E2 umgewandelt werden. Umgekehrt kann E2 durch Sulfotransferasen und 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase 2 (17β -HSD-2) wieder in die Speicherform übergeführt werden. In manchen Zellen (z.B. den Mammakarzinomzellen), bildet E1S daher mit Hilfe dieser Enzyme ein Depotsystem für Estrogene, aus dem E2 jederzeit bei Bedarf freigesetzt werden kann.

Um zu untersuchen, ob dieses System auch in anderen Krebszellen aktiv ist, wurden daher im Rahmen dieser Diplomarbeit sowohl die Ovarialkarzinomzelllinien A2780, A2780ADR, OVCAR und SKOV3, als auch die Osteosarkomzelllinien HOS, MG63 und SAOS auf dieses Estrogen-metabolisierende System untersucht.

Dafür sollte zunächst untersucht werden, ob sie die Enzyme 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 und 2, Estrogensulfatase (STS), Sulfotransferase 1A1, SULT2A1 und SULT1E1 exprimieren. Dann sollte untersucht werden, ob diese Zelllinien ER α und ER β besitzen und ob das Wachstum dieser Zellen durch E1S beeinflusst wird.

Da diese Estrogen metabolisierenden Enzyme grundlegende Bausteine in der Aktivierung und Deaktivierung von E1S darstellen, könnte ein Zusammenspiel dieser Enzyme einen möglichen Einfluss von E1S auf das Wachstum der Krebszellen erklären.

2. EINFÜHRUNG

2.1 Krebs: Eine Einführung

„Krebs“, „maligner Tumor“ oder „Neoplasie“ steht für eine Gruppe von mehr als 100 Erkrankungen, die jedes Organ und alle Zellen z.B. Blutzellen, Bindegewebszellen etc. befallen können. Eine Eigenschaft, die alle Krebserkrankungen teilen ist, die unbegrenzte Teilung und das unbegrenzte Wachstum von abnormen Zellen zu Zellverbänden. Diese Tumore breiten sich über die Organgrenzen hinweg aus, und führen zur Organzerstörung. In den Tumoren ist das Gleichgewicht zwischen Zellwachstum und Zelltod erheblich gestört.

Krebszellen breiten sich über den Blut- und Lymphweg auch in andere, entfernte Organe aus, und bilden dort Tumorabsiedlungen. Dieser Prozess wird als Metastasierung bezeichnet. Metastasen in lebenswichtigen Organen wie z.B. Leber, Lunge, Gehirn etc. sind die Hauptursache von krebsbedingten Todesfällen.

Krebs kann aus einer einzigen, genetisch veränderten Zelle entstehen, wobei der Übergang von der normalen Zelle in die Tumorzelle ein mehrstufiger Prozess ist. Die Krebsentwicklung kann durch Vererbung, stoffwechselbedingte Mutationen oder Hormone, wie z.B. Estrogene, aber auch durch äußere Faktoren, wie etwa Tabakkonsum, Chemikalien, Strahlung und Infektionen initiiert werden.

Eine weitere fundamentale Rolle in der Krebsentstehung hat der Alterungsprozess. Die Zahl der Krebsfälle nimmt mit dem Alter stetig zu, was einerseits mit der Akkumulation von Risikofaktoren über den Lebenszeitraum, und andererseits mit der Tendenz zu weniger effizienten Reparaturmechanismen in den Zellen der älteren Menschen zusammenhängt. [World Health Organisation, 2006]

2.2 Ovarialkarzinom: Zahlen und Fakten

2.2.1 Epidemiologie

Im Jahre 2008 liegt die geschätzte Anzahl von Neuerkrankungen an Ovarialkrebs in den USA bei 21650 Fällen. Bei 15520 Betroffenen ist das Ovarialkarzinom die Todesursache. [National Cancer Institute, 2008]

Etwa 3% der bei Frauen diagnostizierten Krebserkrankungen sind Ovarialkarzinome. Damit ist das Ovarialkarzinom die 5-häufigste Todesursache und liegt bei den gynäkologischen Krebserkrankungen auf Rang 2, wobei Gebärmutterhalskrebs die häufigste Todesursache ist. Während der Jahre 1987 bis 2004 ist die Inzidenz von Ovarialkarzinomen jährlich um 0,9% angestiegen.

Es gibt zahlreiche bösartige Tumore, die von den Eierstöcken ausgehen können, wobei der epitheliale Eierstockkrebs zu den am häufigsten vorkommenden Tumoren in den Ovarien zählt. Etwa 50% aller Fälle betreffen Frauen, die 65 Jahre oder älter sind. Das Risiko an einem Ovarialkarzinom zu erkranken, nimmt mit dem Alter zu und erreicht um das 80. Lebensjahr das Maximum. [American Cancer Society, 2008]

Im Durchschnitt sind 5-10% der Ovarialkrebsfälle erblich bedingt und 95% der Krebserkrankungen treten spontan auf. Es lassen sich 3 verschiedene Muster des erblichen Ovarialkarzinoms unterscheiden, die durch spezifische Mutationen in Markergenen bedingt sind: i) Ovarialkarzinom alleine, ii) Ovarial- und Brustkrebs und iii) Ovarial- und Dickdarmkrebs. [National Cancer Institute, 2008]

In westlichen Industrieländern sind mehr Frauen von der Erkrankung betroffen als in Asien und Afrika.

2.2.2 Risikofaktoren

Bei Frauen, die bereits Brustkrebs hatten oder bei denen es in der Familie bereits Fälle von Brust- oder Ovarialkarzinom gab, ist die Wahrscheinlichkeit einer Erkrankung erhöht. [American Cancer Society, 2008]

Das höchste Risiko für ein Ovarialkarzinom ist jedoch bei jenen Frauen, bei denen in erster Generation (also bei Mutter, Tochter oder Schwester) bereits ein Fall vorliegt. Frauen in erster Generation mit zwei oder mehr betroffenen Verwandten, haben ein bis zu 50%-iges Risiko an dieser Form des Krebses zu erkranken. [Piver, 1996]

Mutationen in den Brustkrebsgenen, BRCA1 oder BRCA2, werden mit einem erhöhten Risiko einer Erkrankung in Verbindung gebracht. Studien empfehlen die präventive Entfernung der Ovarien und der Eileiter bei Frauen, bei denen diese Mutationen diagnostiziert wurden. Dadurch ist es möglich die Ovarialkarzinomrate zu senken.

Schwangerschaft und die Langzeitanwendung von oralen Kontrazeptiva reduziert das Risiko eines Ovarialkarzinoms. In mehreren umfangreichen Studien hat es sich aber gezeigt, dass die Einnahme von Estrogenen zur postmenopausalen Hormontherapie das Risiko für das

Ovarialkarzinom erhöht. Ein weiterer Risikofaktor ist das Übergewicht [American Cancer Society, 2008]

2.3 Osteosarkom

Von den primären malignen Tumoren, die vom Knochen ausgehen, ist das Osteosarkom die weit verbreitetste Form. Es betrifft hauptsächlich junge Patienten in der Pubertät oder junge Erwachsene. Ein weiterer Häufigkeitsgipfel liegt um das 60. Lebensjahr. Wie Osteoblasten im gesunden Knochen, so produzieren die Osteosarkomzellen Knochenmatrix (osteoblastische Tumore). Jedoch ist dieses neoplastische Gewebe nicht so robust wie ein normaler Knochen. Wie auch andere maligne Tumoren, kann sich auch das Osteosarkom über den Knochen hinaus ins anliegende Gewebe, wie etwa Muskeln und Sehnen, ausbreiten. Am häufigsten findet man das Osteosarkom nahe dem Ende der großen Röhrenknochen. Etwa 80% der Osteosarkome befinden sich in den Knochen, die im Kniebereich liegen. Die zweithäufigste Osteosarkomlokalisation ist im proximalen Humerus, d.h. in dem Teil des Oberarms, der nahe der Schulter liegt (Häufigkeit von etwa 10%). Osteosarkome an diesen Stellen haben relativ gute Heilungschancen, wobei eine chirurgische Entfernung und eine entsprechende neoadjuvante Chemotherapie durchgeführt werden muss.

Das Osteosarkom kann jedoch in jedem Knochen auftreten, also auch in den Becken-, Schulter- und Kieferknochen. Dort kann bei diesen Knochen ein operativer Eingriff schwierig werden. Nachdem hier die Tumore oft nicht vollständig entfernt werden können, sind auch die Heilungschancen geringer. [American Cancer Society, 2007]

In den USA liegt die Rate an Osteosarkom-Neuerkrankungen bei 2380 Fällen pro Jahr und die Zahl der Todesfälle pro Jahr bei 1470 Patienten. [National Cancer Institute, 2008]

2.4 Estrogene

Natürlich vorkommenden Estrogene haben einen, ungesättigten, also aromatischen Ring, der als Ring A bezeichnet wird. Dieser trägt in Position 3 eine phenolische Hydroxylgruppe, wodurch eine Salzbildung, und damit die chemische Abtrennung der Estrogene von den übrigen Sexualhormonen möglich ist. Eine weitere strukturelle Gemeinsamkeit der Estrogene ist die Methylgruppe am C-13. Durch den phenolischen A-Ring binden sie mit hoher Affinität

an den Estrogenrezeptor. Das Estrogen mit der höchsten Wirksamkeit ist das 17 β -Estradiol (E₂), gefolgt von Estron, welches wiederum wirksamer ist als Estriol (E₃). [Parl, 2000]

Andere nicht-steroidale Verbindungen, die estrogenartige Aktivität aufweisen, besitzen ebenfalls an dieser Stelle einen phenolischen Ring, der an den ER-Rezeptor bindet. [Mutschler et al., 2001]

Jede Substitution an dieser Struktur kann die Bindung an den ER beeinträchtigen. Einige dieser Verbindungen wie z.B. Diethylstilbestrol, werden synthetisch hergestellt, andere kommen natürlich in Pflanzen vor. Natürlich vorkommende estrogenartige Substanzen in Pflanzen sind die sogenannten Phytoestrogene. Dazu gehören zahlreiche Flavonoid- und Coumestan Derivate. [Verschraegen et al., 1998]

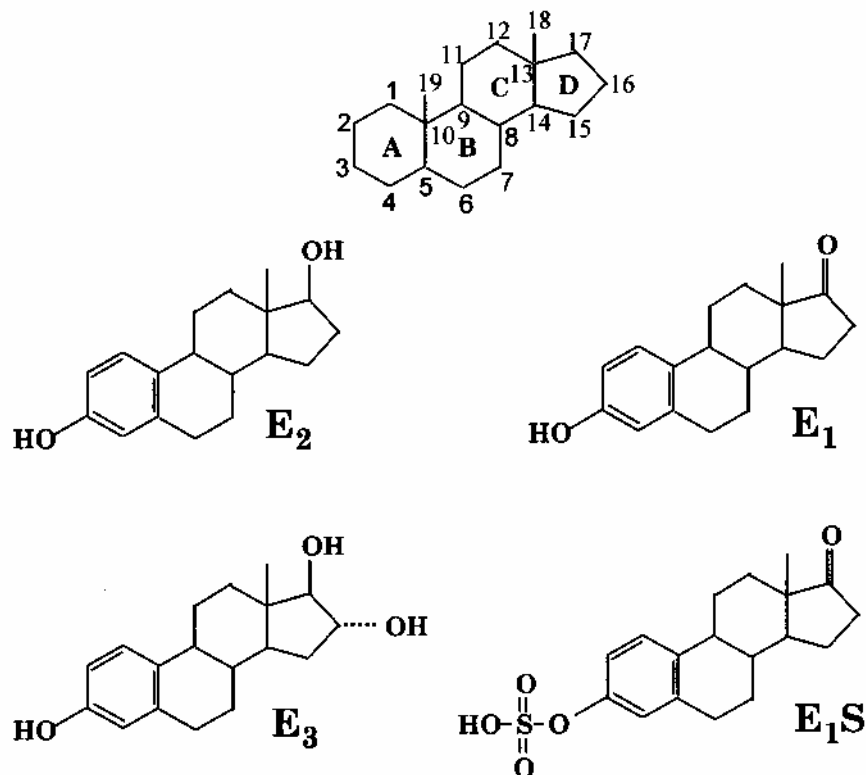


Abbildung 1: Struktur von 17 β -Estradiol (E₂), Estron (E₁) und Estronsulfat (E₁S) [Parl, 2000]

Steroidale Estrogene sind wasserunlöslich. Sie werden sowohl durch die Haut, als auch in den Gastrointestinaltrakt gut aufgenommen. Nach oraler Aufnahme werden sie jedoch durch die Leber schnell abgebaut. Es kommt zu einer Hydroxlierung durch Enzyme des Cytochrom-P450 Systems, und damit einer Umwandlung in weniger aktive Produkte. Die hydroxlierten Produkte können anschließend mit Schwefelsäure und Glucuronsäure konjugiert werden. Ein

Teil der durch die Leber ausgeschiedenen Estrogene wird im enterohepatischen Kreislauf wieder reabsorbiert. Der Rest wird in konjugierter Form über die Niere ausgeschieden. [Verschraegen et al., 1998]

Die Synthese der Estrogene findet hauptsächlich in den Ovarien und den Hoden statt, aber auch in peripheren Geweben (z.B. der weiblichen Brust) können Estrogene durch die Aromatisierung von Androgenen gebildet werden [Bulun SE and Simpson ER, 2008]

Die Estrogensekretion liegt bei Frauen im gebärfähigen Alter in Abhängigkeit von der Zyklusphase bei 25-100 µg pro Tag, während sie bei Frauen im Klimakterium auf 5-10 µg täglich absinkt. [Mutschler et al., 2001]

2.4.1 Wirkung der Estrogene

Estrogene, vor allem E₂, sind Wachstumsfaktoren, deren Wirkung sich vorwiegend auf die Geschlechtsorgane auswirkt. Sie beeinflussen aber auch andere Organe und beeinflussen die Signaltransduktion in vielen Zellen.

Folgende Wirkungen sind Estrogenen zuzuschreiben:

- Förderung des Wachstums der weiblichen Sexualorgane und Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale
- Vergrößerung des subkutanen Fettdepots und damit Ausbildung der typisch weiblichen Körperformen
- Zyklische Veränderungen der Uterusschleimhaut und Erhöhung der Viskosität des Zervikalsekrets
- Beeinflussung von Stoffwechselvorgängen in der Leber (insbesondere die Synthese von Transportproteinen und Lipoproteinen)
 - Vermehrte Bildung von Gerinnungsfaktoren, in höheren Dosen somit verstärkte Blutgerinnung
 - Vermehrte Bildung von HDL und Abnahme von LDL
- Hemmung des Knochenabbaus
- Schließen der Epiphysenfugen und Beendigung des Längenwachstums in der Pubertät
- Hemmung des Wachstums und der Talgproduktion der Talgdrüsen
- Senkung des peripheren Gefäßwiderstandes

- In hohen Dosen Retention von Natriumchlorid und Wasser (Mineralcorticoid-Wirkung) und vermehrte Angiotensinogenbildung
- Verstärkung der Bildung von Serotonin-Rezeptoren

Durch die vermehrte Synthese von Transportproteinen, wie z.B. dem Sexual-Steroidhormen-bindenden Globulin und Transcortin kommt es zu einer stärkeren Bindung von Sexualsteroiden an diese Proteine. Dadurch werden andere Steroide aus der Bindung verdrängt z.B. Androgenen und Glucocorticoide. [Mutschler et al., 2001]

Therapeutisch werden Estrogene zur Prävention und Behandlung von postmenopausalen Symptomen, als auch zur Kontrazeption eingesetzt. Estrogenrezeptor-Antagonisten finden Verwendung in der Therapie bei hormonabhängigem Brustkrebs. Fallweise werden sie auch zur Behandlung des Prostatakarzinoms eingesetzt. [Berger, 1999]

2.4.2 Estrogene als Risikofaktoren für Brustkrebs

Das Brustkrebsverhältnis zwischen Frauen und Männern liegt bei 100:1. Somit sind von der Brustkrebserkrankung beinahe nur Frauen betroffen. Beim Vergleich von Brustkrebspatienten mit Kontrollgruppen wurden höhere Plasmaspiegel an bioverfügbaren Estrogenen vermerkt. Dazu tragen auch Lifestylefaktoren bei, die zu einer erhöhten Konzentration an Estrogenen in der Umwelt und damit auch in der Nahrungskette führen. Ein Beispiel wäre die weitverbreitete Einnahme von Estrogenen (orale Antikonzeptiva, Hormonersatztherapie Hormongabe an Nutztiere), die zu einer vermehrten Ausscheidung von Estrogenen und ihrer Metabolite in den Abwässern führt. Dadurch gelangen erhöhte Konzentrationen von Estrogen in die Umwelt und in die Nahrungskette. Dass durch diese Vorgänge das Brustepithel vermehrt den zellwachstumsfördernden Estrogenen ausgesetzt ist, wird mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko in Verbindung gebracht. Tatsache ist, dass das Brustkrebsrisiko in den Industriestaaten kontinuierlich ansteigt [Verschraegen et al., 1998]

Es gibt umfangreiche experimentelle, epidemiologische und klinische Beweise, dass das Brustkrebsrisiko auch durch endogene Hormonkonzentrationen beeinflusst ist. Die Ausschüttung endogener Estrogene steht unter dem Einfluss mehrerer Variablen, wie dem

Eintreten der Menarche, dem Zeitpunkt der ersten Schwangerschaft, dem Eintrittsalter der Menopause, Fettleibigkeit, Diät und genetische Faktoren. [Parl, 2000]

Brustkrebs ist das Resultat eines mehrstufigen Prozesses, der von mehreren unabhängigen Mutationsereignissen abhängt. Eines dieser kritischen Ereignisse ist der Verlust der Zellzykluskontrolle. In normalen Brustzellen stellt das initiale Signal für den Eintritt in den Zellzyklus die Interaktion von E2 mit seinem Rezeptor dar [McCarty and McCarty, 1991]

Neben der wachstumsfördernden Wirkung von Estrogen auf Brustkrebszellen zeigen weitere Untersuchungen, dass Estrogene auch direkte DNA-Schäden bewirken. Durch Cytochrom P-450 Isoenzyme (CYP)1A2 und 1B1 erfolgt eine Hydroxlierung von E2 in Position 2 und 4. Aus diesen hydroxlierten Produkten bilden sich sehr leicht instabile Epoxide. Die in weiterer Folge gebildeten freien Radikale können Strukturen in der Zelle, aber auch DNA und Proteine schädigen und damit direkt zur Krebsentstehung beitragen [Raftogianis et al., 2000]

2.4.3 Estron-3-sulfat (E1S)

E1S ist eine polare Steroidverbindung mit einer Molekularmasse von 350. Bei dieser Verbindung handelt es sich um den Hauptmetabolit der Estrogene und sie wird als Depotform von E2 angesehen. E1S weist eine starke Plasmaproteinbindung auf und hat eine lange Halbwertszeit. Vor allem an Albumin gebunden, ist die Plasma Clearance, die mittels Radioimmunassay bestimmt wird, sehr langsam.

Estronsulfat kommt in der Nebennierenrinde, den Keimdrüsen als auch im peripheren Gewebe vor. Sowohl vor, als auch nach der Menopause ist es das quantitativ wichtigste Estrogen im weiblichen Organismus. Bedingt durch den weiblichen Zyklus weist der Plasmaspiegel hohe Schwankungen auf, wobei diese Schwankungen bei allen Estrogenen (E1, E2 und E1S) ähnlich sind. [Kaminitschek, 1998]

2.5 Estrogenrezeptoren (ER)

Estrogene binden an spezifische Estrogen-Rezeptoren, den ER α , und den ER β . Beide ERs binden nicht nur Estrogene und Antiestrogene, sondern auch weitere Verbindungen wie z.B. Phytoestrogene. Daher werden beide Isoformen mit der Entstehung und dem Fortschreiten

des Brustkrebses in Verbindung gebracht. Der nukleäre ER ist ein Transkriptionsfaktor, welcher nach Bindung des Estrogens die Genexpression der Estrogen-responsiven Gene reguliert. [Parl, 2000]

Brustkrebszellen exprimieren im Frühstadium ER α und ihre Proliferation und ihr Überleben ist in diesem Stadium von Estrogenen abhängig. Deshalb stellt die Begrenzung der ER α Aktivität eine der Hauptstrategien in der Prävention und Behandlung von ER α positivem Brustkrebs dar. Für Patienten mit ER α positivem Brustkrebs werden deshalb Substanzen, welche die ER Aktivität antagonisieren, wie etwa selektive Estrogen-Rezeptor-Modulatoren, sogenannte SERM's - eingesetzt. Beispiele hierfür wären Tamoxifen und Raloxifen. [Hess-Wilson et al., 2006]

Estrogenrezeptoren zählen zur Gruppe der Steroidrezeptoren und sind Proteine welche in struktureller als auch in funktioneller Hinsicht viele Gemeinsamkeiten mit anderen Mitgliedern dieser Familie teilen. Ebenfalls dieser Gruppe angehörend, sind die Rezeptoren für Progesteron, Corticoide und Schilddrüsenhormone, sowie für Retinoide und Vitamin D. Zunächst bildet sich ein Komplex zwischen den ER und dessen Liganden Estrogen. In Folge kommt es zur Bindung an spezifische DNA-Sequenzen den sogenannten ERE's. (Estrogen-Responsive-Elements). Durch diese Interaktion kommt es zur Aktivierung der Transkription von Genen, die durch Estrogene induziert werden. Diese wiederum vermitteln die Effekte von Estrogenen.

Estrogenrezeptoren besitzen mehrere funktionelle Bereiche. Das C-terminale Ende, welche die AF-2 Domäne („Activation function 2“) enthält, stellt die ligandenbindende Domäne des Rezeptors dar und ist für die Dimerisierung und Aktivierung der Transkription von Bedeutung. In der mittleren zentralen Region liegen zwei sogenannte Zinkfinger, welche für die Bindung an die ERE's eine Rolle spielen. Unter Zinkfinger versteht man fingerförmige Strukturen, die im Inneren jeweils zwei Cystein- und zwei Histidinreste (oder vier Cysteinreste) um das zentrale Zinkion enthalten, und an die DNA binden um die Genexpression zu bewirken. Die Amino-terminale Region mit der AF-1 Domäne, ist für die Aktivierung der Transkription verantwortlich. [Verschraegen et al., 1998]

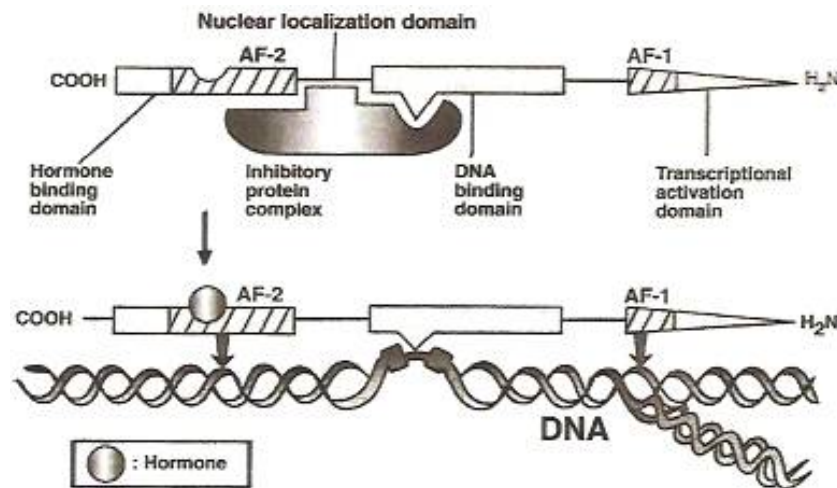


Abbildung 2: Struktur der nukleären Steroidhormonrezeptoren und ihre Bindung an die DNA
[Verschraegen et al., 1998]

Die Estrogenrezeptoren sind im Zytoplasma und im Zellkern lokalisiert. Nach Ligandenbindung und Aktivierung, wandert der Ligand-Rezeptorkomplex in den Zellkern. Bei der Ligandenbindung dockt der Ligand an das C-terminale Ende, welches die ligandenbindende Domäne des Rezeptors ist, an. Hitze-Schock-Proteine, die mit den Rezeptoren einen Komplex bilden, dissoziieren und der aktivierte Liganden-Rezeptorkomplex wandert in den Kern. Dort kann der Komplex über die Zinkfinger an die DNA binden. [Mutschler et al., 2001]

2.5.1 Estrogenrezeptor α :

Der klassische Estrogenrezeptor wurde 1958 von Elwood Jensen im Uterus entdeckt und 10 Jahre später in seiner Struktur aufgeklärt. Ein relevanter Übersichtsartikel wurde von Jensen 2005 publiziert. [Jensen, 2005]

Der Nutzen dieser Entdeckung wird wie folgt beschrieben: „The identification of the estrogen receptor (ER) in the laboratory provided a mechanism to describe the target site specificity of estrogen action in uterus, vagina, pituitary gland, and breast cancer.“ [Jensen, 2003]

Zunächst wurde angenommen, dass ER α eine lebenswichtige Rolle spielt, denn es waren zunächst weder bei Mensch oder Tier Fälle bekannt, bei denen ER α durch natürlich vorkommende Mutationen überhaupt nicht vorkam oder komplett inaktiviert war. Die

Annahme, dass ein fehlender ER α zum Tod führe, konnte jedoch durch eine Studie aus dem Jahre 1996 [Korach et al., 1996] in der über eine Person berichtet wurde, welcher ein funktioneller ER α fehlte, widerlegt werden. Diese Person hatte schwere Osteoporose und die Fortpflanzungsfähigkeit war eingeschränkt. Heute sind sehr viele Mutationen in beiden Rezeptoren bekannt, die zu einer Veränderung der Aktivität der Estrogene führen. [Korach et al., 1996]

2.5.2 Estrogenrezeptor β :

1996 wurde ein weiterer Estrogenrezeptor im Labor von Gustafsson am Karolinska Institut in Stockholm identifiziert. [Kuiper et al., 1996] Er wurde als ER β bezeichnet. Damit wurde ein neues Signaltransduktionssystem für die Estrogenwirkungen bestimmt. [Zhao et al., 2008]. Die DNA-bindende Domäne des ER β weist eine große Ähnlichkeit (97% Homologie) zu jener des ER α auf. Der Unterschied beruht lediglich auf 2 Aminosäuren. [Parl, 2000], trotzdem sind die Wirkungen oft gegensätzlich. Z. B. ist eine erhöhte Expression von ER α mit der Tumorprogression bei zahlreichen Tumoren korreliert, während ER β Expression auf eine gute Prognose hinweist.

2.6 Estrogenbildung

Zwei unterschiedliche Stoffwechselwege spielen bei der Bildung von E2 im Brustkrebsgewebe eine Rolle. [Weinshilboum, 2008] Der „Aromataseweg“, welcher Androgene in Estrogene umwandelt und der „Sulfataseweg“ welcher E2S mittels Estronsulfatase in E1 konvertiert. Im letzten Schritt der steroidalen Entstehung kommt es zur Umwandlung von E1 durch die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 in das biologisch hochwirksame E2. [Pasqualini and Chetrite, 2005]

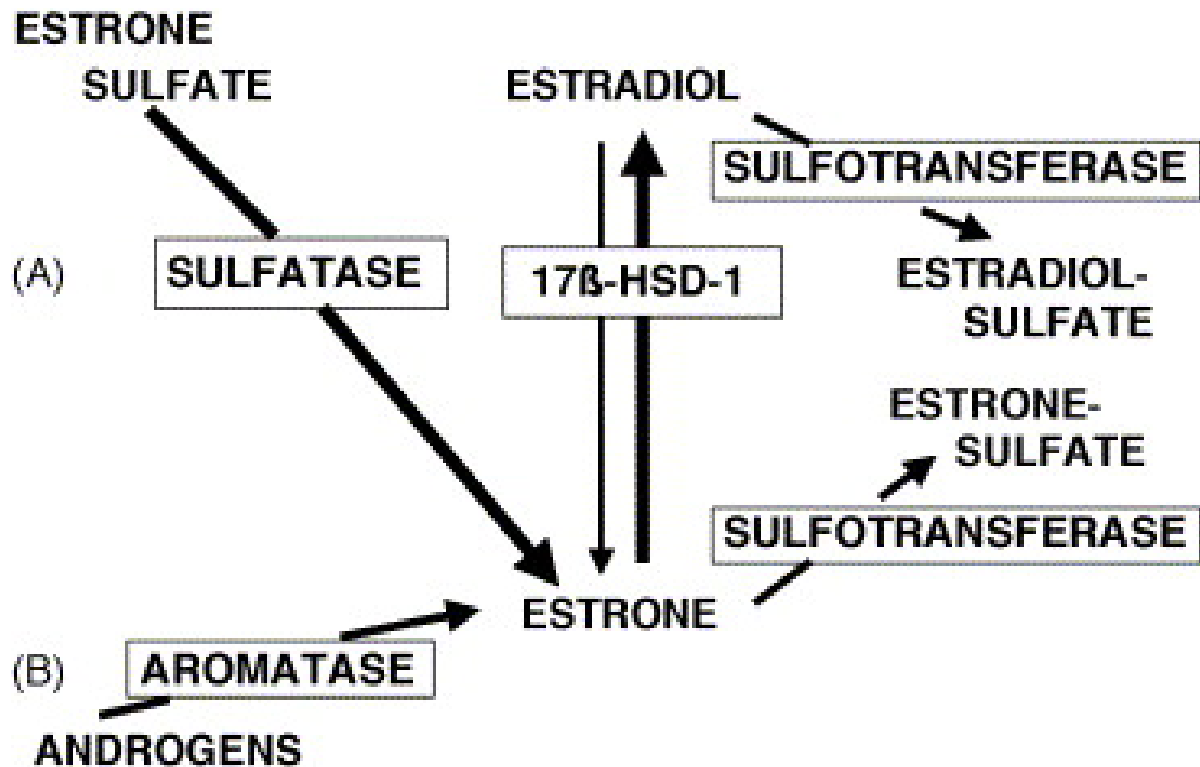


Abbildung 3: Übersicht über Estrogen Bildung und Umwandlung der von E1 in E2 und vice versa in humanen Brustkrebszellen. [Pasqualini and Chetrite, 2005]

2.7 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase

In der Familie der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenasen (HSDs) sind 13 Mitglieder bekannt und bei einigen Isoenzymen wurde festgestellt, dass sie wichtig für das Wachstum verschiedener hormonabhängiger Zellen sind. Im Brustgewebe werden zwar mehrere HSDs exprimiert, aber es scheint, als ob nur der 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 und Typ 2 eine tragende Rolle beim Brustkrebs zukommt. [Jansson et al, 2006]

Humane 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2 gehören zur Steroid-Dehydrogenase/Reductase-Proteinfamilie (SDR). Sie unterscheiden sich in vielerlei Hinsicht, wobei der Hauptunterschied dieser Enzyme in der Richtung der enzymatischen Aktivität liegt. [Vihko et al., 2004]

Strukturell gesehen liegt die hervorstechendste Differenz in der Aminosäuresequenz, wobei 17 β -HSD-2 ein verlängertes, hydrophobes Aminoende aufweist. Es wird vermutet, dass es der transmembranen Induktion von Signaltransduktionsmechanismen dient.

17 β -HSD-1 liegt auf dem Chromosom 17, während das Gen für 17 β -HSD-2 am Chromosom 16 liegt. [Casey et al., 1994]

HSTs sind Enzyme, die Einfluss auf die Verfügbarkeit von biologisch aktiven Estrogen haben. HSD Isoenzyme katalysieren die wechselseitige Umwandlung von hoch aktiven 17 β -Hxdroxy- und den weniger aktiven 17-Keto-Steroiden. [Miettinen et al., 1996]

Da sowohl Estrogene, als auch Androgene die höchste Affinität zu ihren Rezeptoren aufweisen, wenn sie in der Ketoform vorliegen, regeln HSD Enzyme die biologische Aktivität dieser Sexualhormone. Die reduzierende Aktivität von HSD ist Teil des steroidalen Stoffwechselweges, welcher zur Biosynthese von Estradiol und Testostosteron in den Gonaden führt. Aber auch extragonadische Organe, wie z.B. Brust und Prostata, produzieren die reduzierende HSD.

Deshalb werden die weniger aktiven zirkulierenden Vorstufen in die für die Zielorgane potenteren umgewandelt. HSTs, die hauptsächlich oxidativ wirken, reduzieren im Gegensatz die Aktivität der Estrogene und Androgene. Diese Mechanismen könnten die Organe vor exzessiver Hormonaktivität schützen. [Vihko et al., 2002]

2.7.1 Enzymatische Charakteristika und Funktion der 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2

Human 17 β -HSD-1 katalysiert hauptsächlich die Reduktion von Estron zu Estradiol, wobei die phosphorylierte Form des Nicotinamid-Adenin-Dinucleotids (NADPH) als Co-Faktor dient.

17 β -HSD-1 spielt eine entscheidende Rolle im Mechanismus der Estradiolproduktion und wird in Granulosazellen des Ovars, und den Synzytiotrophoblasten der Plazenta hoch exprimiert. Dies sind Organe, die E2 in den Blutkreislauf sezernieren. Zusätzlich reguliert 17 β -HSD-1 die Wirkung von Estrogenen, da es wie z.B. im Brustgewebe E1 lokal in E2 umwandelt. [Vihko et al., 2004]

17 β -HSD-2 katalysiert die entgegengesetzten Reaktionen, also Umwandlung von E2 in E1. [Vihko et al., 2004] Dabei agiert das Substrat E2 als Wasserstoffdonator am C17 und wird zum Estron oxidiert. [Castagnetta et al., 1995] 17 β -HSD-2 benötigt die phosphorylierten

Form des Co-Faktors NAD⁺, NADPH als Co-factor. Auch Testosteron wird durch 17 β -HSD-2 in Androstendion, und 5 α -Dihydrotestosteron zu 5 α -Androstandion, umgewandelt [Vihko et al., 2004]

17 β -HSD-2 ist weit verbreitet und kommt in Estradiol-metabolisierenden Organen und in Zellen, die auf Sexualsteroiden ansprechen, vor. [Miettinen et al., 1996] Dazu zählen die Brust, der Uterus, die Prostata, die Plazenta, aber auch nicht-klassische hormonsensitive Gewebe, wie Leber und Niere. In der Plazenta könnte HSD als Barriere zwischen Fötus und Mutter fungieren, da es den Zugang fötaler Androgene zu mütterlichen Geweben und die Bereitstellung mütterlicher Estrogene für den Fötus einschränkt [Vihko et al., 2004] 17 β -HSD-2 ist im normalen Brustepithel gegenüber dem Typ1 Enzym die dominante Form. Es regelt das Gleichgewicht zwischen E1 und E2. Bei Brustkrebs spielen 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2 eine Rolle. Eine hohe Expressionsrate von 17 β -HSD-1 und eine niedrige 17 β -HSD-2 Rate sind mit sinkenden Überlebensraten bei ER α -positivem Brustkrebs assoziiert. Die Frage, ob 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2 bei der Tumorentstehung eine Rolle spielt, ist allerdings noch nicht klar. Es wurde jedoch festgestellt, dass die Enzymaktivität der oxidativen 17 β -HSD-2 in Brustkrebszellen, jener des Typ 1 um das 50 fache übersteigt. [Jansson et al., 2006]

2.8 Estrogensulfatase

Im Sulfatase-Stoffwechselweg wird die Sulfatgruppe von konjugierten Estrogenen durch das Enzym Estronsulfatase entfernt. Eine Aktivität des Enzyms ist sowohl in normalem als auch in malignem Brustgewebe gleich. Es liegt sowohl in ER-positiven (MCF7), als auch in ER-negativen Brustkrebszelllinien vor. Weiters ist es unabhängig davon, ob ein Tumor in prä-, oder postmenopausaler Patientinnen vorliegt. Daher scheint es unwahrscheinlich, dass die Sulfataseaktivität hormonell durch Estrogene reguliert wird. [Parl, 2000] Mehrere Isoenzyme der Sulfatasefamilie sind bekannt.

Die Estron- oder Steroidsulfatase ist an verschiedenartigen physiologischen Prozessen, wie z.B. der Schwangerschaft, Erregungsübertragungen zwischen den Nervenzellen und Denkprozessen, vererbten Hauterkrankungen, immunologischen Abwehrreaktionen, als auch

an pathologischen Prozessen, beteiligt. Hier wären hormonabhängige Krebsarten wie Brust-, Prostata- oder Endometriumkrebs zu nennen. [Pasqualini and Chetrite, 2005]

Bei den Sulfatasen handelt es sich um mikrosomale Enzyme, welche in der Leber in der höchsten Aktivität vorliegen. Weiters wurde auch relativ hohe Aktivität in der Plazenta, der Niere, den Nebennieren, der Prostata, den Hoden und endokrinen Organen festgestellt. Dies ist ein Anzeichen dafür, dass in endokrinen Organen und Geweben, die durch Estrogen stimulierbar sind, hohe Estrogensulfatase Aktivitäten vorliegen müssen. [Iwamori, 2005]

2.9 Sulfotransferase

Estrogene und deren Metabolite werden durch Konjugationen mit Methyl-, Sulfat- oder Glucuronidresten inaktiviert. Dadurch sollten die Zellen vor einem Hormonüberschuss geschützt werden. [Shatalova et al., 2005] Die durch die zytosolische Sulfotransferase entstandenen Sulfokonjugate weisen eine bessere Löslichkeit in wässrigem Medium auf, als die nicht-konjugierten Steroide. Dies erleichtert die Ausscheidung und den Transport im Blutkreislauf und ist für die Bereitstellung von Hormon-Zwischenprodukten von hoher Notwendigkeit.

Da aus Estrogensulfat, welches quantitativ das wichtigste zirkulierende Estrogen beim Menschen ist, bei Dekonjugationen durch die Sulfatasen 17 β -Estradiol entsteht, muß auch umgekehrt durch Sulfatkonjugation (Sulfotransferasen, SULTs) wieder Estrogensulfat aus 17 β -Estradiol entstehen.

Sulfotransferasen (SULTs) katalysieren den Transfer der Sulfonatgruppe zur Sulfatierung von vielen endogenen und exogenen Substanzen. [Iwamori, 2005] Dabei wird die Sulfonatgruppe des 3'-Phosphoadenosin-5'-Phosphosulfat (PAPS) auf Moleküle, welche Phenol-, Alkohol-, oder Aminogruppen besitzen, übertragen. [Tamura et al., 2001] Zu den Substraten zählen auch Estrogene, welche in biologisch inaktive sulfatierte Moleküle umgewandelt werden. Zum Beispiel ist die Isoform SULT1A1 für den Estrogenstoffwechsel wichtig.

Darüber hinaus gehören auch SULT1E1 und SULT2A1 zur Übergruppe der zytosolischen Proteine, welche Estron, 17 β -Estradiol und Katecholestrogene metabolisieren. Die Affinität dieser Enzyme für Estrogene variiert jedoch. SULT1E1 hat die höchste Affinität zu Estron,

17 β -Estradiol und Katecholestrogen. Es wird in vielen menschlichen Organen, wie der Leber und der Brust, exprimiert. Allerdings kommt es in Brustkrebszellen nicht vor.

SULT1A1 und im geringeren Ausmaß SULT2A1 scheinen die Isoformen zu sein, die für Estrogen Sulfatierung in Brusttumoren verantwortlich sind. Weiters katalysiert SULT1A1 die Sulfation des 2-Methoxyestradiol, eines endogenen, potenten Antiestrogens. Deshalb nimmt man an, dass SULT1A1 wichtig für die Sulfation der Estrogene in Brusttumoren ist. [Shatalova et al., 2005].

3. METHODEN UND MATERIALIEN:

3.1 Zellkultur

3.1.1 Verwendete Zelllinien:

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wird mit 8 verschiedenen humanen Karzinomzelllinien gearbeitet, die im folgenden kurz charakterisiert werden.

A2780-Zellen (ECACC-Nr.: 93112519)

Diese Ovarialzelllinie wurde aus Tumorgewebe einer unbehandelten Frau gewonnen. Die Zellen wachsen einschichtig und weisen epitheliale Morphologie auf. Von den A2780-Zellen wurde auch die gegen Adriamycin resistent gemachte A2780ADR Zelllinie gewonnen.

A2780ADR-Zellen (ECACC-Nr.: 93112520)

Die Adriamycin Resistenz dieser Ovarialzelllinie wurde durch Behandlung der A2780 Zelllinie mit Adriamycin erreicht. Damit die Resistenz bestehen bleibt, wurde das Medium der Zellen mindestens 1 Monat mit Adriamycin behandelt. Die A2780ADR-Zelllinie sind kreuzresistent gegenüber Melphalan und Vinblastine.

HOS-Zellen (ATCC®-Nr.: CRL-1543™)

HOS ist eine Osteosarcom Zelllinie die einer 13-jährigen weiblichen Europäerin entnommen wurde und die flache epitheliale Morphologie aufweist.

MCF7-Zellen (ATCC®-Nr.: HTB 22™)

Diese Zellen wurden aus der Brustdrüse einer an Adenocarcinom erkrankten, 69-jährigen Europäerin entnommen und weisen epitheliale Morphologie auf. Die Zeit bis zur Verdoppelung dieser Zellen beträgt 29 Stunden. MCF7-Zellen exprimieren Estrogen Rezeptoren. Als zelluläre Produkte werden insulinartige Wachstumsfaktor bindende Proteine (IGFBP) angegeben. Dieses Wachstum kann mit Anti-Estrogenen reguliert werden. Das Wachstum dieser Zellen kann mittels Tumor Nekrose Faktor alpha inhibiert werden.

MG63-Zellen (ATCC®-Nr.: CRL-1427™)

Die Quelle dieser Zellen ist das Osteosarcom eines männlichen 14-jährigen, europäischer Abstammung. Interferon ist ein Produkt dieser Zellen.

OVCAR-Zellen (ATCC®-Nr.: HTB-161™)

Die OVCAR Zelllinie wurde 1982 isoliert und stammt aus dem Adenocarcinom einer 60-jährigen Europäerin. Es handelt sich um epitheliale Zellen. Laut Angabe der Bezugsfirma ist diese Zelllinie Estrogen-, Androgen-, als auch Progesteronrezeptor positiv. Gegenüber klinisch relevanten Dosen von Adriamycin, Melphalan und Cisplatin ist sie resistent.

SAOS-Zellen (ECACC-Nr.: 89050205)

Hierbei handelt es sich um primäre humane Osteosarcom Zellen mit epithelialer Morphologie. Sie stammen von einer 11-jährigen weiblichen Europäerin.

SKOV3-Zellen (ATCC®-Nr.: HTB-77™)

Diese epithelialen Ovarialzellen wurden 1973 aus der Aszitesflüssigkeit einer an Adenocarcinom erkrankten 64jährigen weiblichen Europäerin isoliert. SKOV3-Zellen sind gegenüber Tumor Nekrose Faktoren sowie mehreren cytotoxisch wirksamen Substanzen wie cis-Platin, und Adriamycin resistent.

Die Zellen wurden von der ECACC (European Collection of Cell Cultures) bzw. ATCC (American Tissue Culture Collection) im gefrorenen Zustand bezogen.

[European Collection of Cell Cultures; 2008][American Tissue Culture Collection; 2008]

3.1.2 Behandlung der Zelllinien:

Benötigtes Material:

- Roswell Park Memorial Institute (RPMI)-1640 Medium (PAN™ Biotech GmbH, Aidenbach, DE)
- FBS (Fetal Bovine Serum), (PAN™ Biotech GmbH)
- Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung (P/S), (Gibco®, Invitrogen, Carlsbad, CA)

- 10xPBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4:

KCl*	2,0 g
NaCl*	80,0 g
KH ₂ PO ₄ *	2,0 g
Na ₂ HPO ₄ *	14,4 g
Bidestilliertes Wasser	ad 1 Liter

*Merck (Darmstadt, DE)

Nach der Herstellung einer 1xPBS Verdünnung wurde der pH-Wert auf 7,4 eingestellt und die Lösung autoklaviert.

- Trypsin/EDTA-Lösung (10x), (Gibco[®])
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO), (SIGMA[®], SIGMA-ALDRICH CHEMIE GmbH P.O, Steinheim, DE)
- Zellkulturflaschen (25 cm²), (Iwaki, Asahi Technoglass Co., Ltd., Tokyo, JP)
- Pasteurpipetten
- Sterile Pipetten (1 ml und 10 ml), (Sterilin[®], Bibby-Sterilin, Staffordshire, UK)
- Greiner-Röhrchen (Techno Plast Products AG, Trasadingen, CH)
- Kryo-Röhrchen (Sterilin[®])

Benötigte Geräte:

- Inkubator (Kendro Laboratories GmbH, Vienna, AT)
- Zentrifuge (Hettich AG, Bäch, CH)

Zellkultivierung:

Alle verwendeten Zelllinien werden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, d.h. bei 37° und einem CO₂-Gehalt von 5%. Die Arbeit mit den Zellen findet in einem sterilen Bereich für Gewebekulturen, unter Benutzung eines „Laminar Air Flow“ (Sterilwerkbank) statt. Im Speziellen wird darauf geachtet, dass sowohl die Arbeitsfläche im „Laminar Air Flow“ als auch alle verwendeten Geräte, vor und nach der Benutzung mit 70% Ethanol desinfiziert werden. Insbesondere beim Wechseln der Zelllinien ist dies von erheblicher

Bedeutung um Kontaminationen zu vermeiden. Als Standardmedium wird (RPMI)-1640, welches zusätzlich zu 10% mit FBS und zu 1% mit P/S versetzt wurde, verwendet. Dieses wird jeden 2. Tag gewechselt. Zur Beurteilung der Konfluenz und ausreichenden Ablösung der Zellen bei der Behandlung mit Trypsin wird eine mikroskopische Beurteilung durchgeführt.

Auftauen der Zellen:

Die Kryo-Röhrchen werden zum Auftauen der enthaltenen Zellsuspension, in ein genau auf 37° temperiertes Wasserbad gehalten. Sobald die Zellen aufgetaut sind, werden sie in ein Greiner-Röhrchen, welches man mit 4 ml Medium befüllt, übergeführt. Bei 1000 rpm wird dann 3 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird mittels Pasteurpipette abgesaugt und in 4 ml frischem Medium resuspendiert. Nun wird die Suspension in eine Zellkulturflasche übergeführt und in den Inkubator gegeben.

Einfrieren der Zellen:

Um sich einen Vorrat an Zellen anzulegen können diese bei -180° mittels flüssigem Stickstoff (Stickstoffturm) eingefroren werden. Dabei wird zunächst das alte Medium mittels Pasteurpipette abgesaugt. Im Weiteren werden die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen, welches nach einer Einwirkzeit von etwa 30 Sekunden ebenfalls abgesaugt wird. Nun wird zur Ablösung der Zellen vom Zellkulturflaschenboden 1 ml 0,5% Trypsin/EDTA-Lösung zugefügt. Um eine gute Ablösung zu gewährleisten, ist eine Inkubationszeit von ca. 3 Minuten erforderlich. Die Trypsin Reaktion wird mittels Zugabe von 4 ml Medium gestoppt und die Zellsuspension in ein Greiner Röhrchen übergeführt. Nach 3 minütiger Zentrifugation bei 1000 rpm wird das überstehende Medium abgesaugt und das verbleibende Zellpellet wird im Einfriermedium (RPMI 1640, FBS, DMSO im Mischungsverhältnis 8:1:1) resuspendiert. Die Suspension wird in ein beschriftetes „Kryo-Röhrchen“ überführt und in der Tiefkühltruhe bei -80° bis zum nächsten Tag gelagert, bevor die entgültige Lagerung bei -180° im Stickstoffturm erfolgt, da eine Schockgefrierung zu vermeiden ist.

Splitten der Zellen:

Wenn eine Konfluenz von ca. 80% vorliegt, d.h. der Boden der Zellkulturflasche nahezu vollständig bedeckt ist, ist es nötig die Zellen zu splitten. Dieser Vorgang ist der Vorbereitung des Einfrierens der Zellen gleich. D.h. das alte Medium wird abgesaugt und es wird mit 4 ml PBS gewaschen, welches wiederum entfernt wird. Hernach fügt man 1 ml Trypsin zu.

Während der Inkubationszeit werden die neuen Zellkulturflaschen vorbereitet und beschriftet (Name der Zelllinie, Datum, Passagenzahl). Die neuen, als auch die alte trypsinhaltige Flasche wird mit 4 ml frischem Medium versetzt. Infolge versetzt man die neuen Zellkulturflaschen mit 3 Tropfen bis zu 1 ml (je nachdem wie schnell das weitere Wachstum erwünscht ist) der Suspension aus der alten Flasche. Die alten Flaschen werden anschließend entsorgt, die neuen in den Inkubator gelegt.

3.2 Test auf Verunreinigung der Zellen mit Mycoplasmen:

Da im Rahmen dieser Diplomarbeit die Zelllinien neu aufgetaut wurden, war es notwendig diese auf eventuelle Verunreinigungen mit Mycoplasmen zu testen.

Benötigte Geräte und Materialien:

- VENOR®GeM Mycoplasmen-Detektionskit für konventionelle PCR (Minerva Biolabs, Berlin, DE)
- Ethidium Bromid (1% Lösung in Wasser) (Merck KGaA)
- 10x TAE Puffer (TRIS Acetat EDTA) pH 7,2:

TRIS*	48,4 g
Natriumacetat	27,2 g
EDTA	3,8 g
Bidestilliertes Wasser	ad 1 Liter

*Merck (Darmstadt, DE)

- DNA-Polymerase (DyNAzyme™ II, 2.0 U/μl, Finnzymes Oy, Espoo, Finnland)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf AG, Wesseling-Berzdorf, DE)
- Biometra Personal Cycler, (Glatt-Koller, Innsbruck, AT)
- peqGOLD Universal Agarose, (peqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen, DE)
- 100 bp DNA-Marker (MBI Fermentas, St.Leon-Rot, DE)
- 6x Loading Dye Solution (Fermentas)
- Mikrowelle MIK 4600 (Elin, Wien, AT)
- Horizontale Elektrophoreseapparatur, (Hoefer HE 133, San Francisco, CA)

- Electrophoresis Power Supply, (Amersham Pharmacia Biotech, Wien, AT)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml, (Biozym Biotech Trading GmbH, Wien, AT)
- PCR- Reaktionsgefäß und Kappen, (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Mikrozentrifuge MicroCen 13, (Herolab, Molekulare Trenntechnik, Wiesloch, DE))
- Mikroliterpipetten, (Eppendorf AG)
- Filterspitzen, (Biozym Biotech Trading GmbH)
- UV-Detektor (Herolab)

Durchführung:

Alle benutzten Zelllinien werden mittels des VENOR® GeM Mykoplasmen-Detektionskits auf Verunreinigungen mit Mykoplasmen getestet. Dies ist ein Amplifikationstest für Nukleinsäuren, dessen Basis die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) darstellt. Die PCR erlaubt eine rasche Detektion von Kontaminationen mit Mykoplasmen in biologischen Proben, da es sich hierbei um eine sehr sensitive Methode handelt. Im Agarosegel kann das amplifizierte PCR-Produkt direkt sichtbar gemacht werden. Mykoplasmen-Kontaminationen, die in Zellkulturen auftreten, sind: *M. orale*, *M. hyorhina*, *M. arginini*, *M. fermentans*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *M. pneumoniae* und *M. synoviae*. All diese können nachgewiesen werden, da die mitgelieferten Primer der DNA-Polymerase die Vervielfältigung eines Abschnitts der 16S rRNA-Region des Mykoplasmen-genoms erlauben. Weiters sind deutliche Sequenzhomologien zum Genom von *Acholeplasma laidlawii* und verschiedenen Ureaplasma- Spezies vorhanden, weshalb auch diese detektiert werden. [VENOR®GeM Mycoplasmen-Detektionskit, 2007]

Für die Testung arbeitet man mit Zellkulturüberständen, wobei der Test bei einer Konfluenz von 90% bis 100% durchgeführt wird. Zuerst werden 100 µl des Zellkulturüberstandes in ein steriles, dicht verschließendes Reaktionsgefäß gegeben. Dieses wird für 5 Minuten bei 95°C gekocht, wobei der Thermocycler verwendet wird. Dann wird die Probe für 5 Sekunden bei 13000 rpm zentrifugiert. Der sogenannte Master Mix wird aus unten angeführten Komponenten hergestellt. In jedes PCR Probenröhrchen werden 23 µl des Master Mix vorgelegt und mit 2 µl des Überstandes aus dem Zentrifugat versetzt. Ferner kommt in eines der Proberöhrchen statt der Probe, 2 µl einer Positivkontrolle, und in ein weiteres 2 µl einer Negativkontrolle (PCR grade water). Die Proben werden vorsichtig gemischt und

anschließend in den Block des PCR Cyclers gestellt, welcher das dafür einprogrammierte Programm ausführt. (Tab.1)

Mastermix pro Reaktion

Polymerase (2 U/μl)	0,5 μl
Interne Kontroll DNA	2,5 μl
Primer/Nukleotid Mix	2,5 μl
10x Reaktionspuffer	2,5 μl
Hochgereinigtes Wasser	15 μl
PCR Qualität (PCR grade water)	
Gesamtvolumen/Reaktion	23 μl

Tabelle 1: Programmdaten für den PCR Cycler

1 Zyklus	94°C für 2 Minuten
39 Zyklen	94°C für 30 Sekunden 55°C für 30 Sekunden 72°C für 30 Sekunden
Auf 4°C bis 8°C abkühlen	

Die Auswertung des Mykoplasmentests erfolgt, mittels Gelelektrophorese und anschließende UV Detektion (siehe Detektion von PCR Produkten), wobei bei diesem Test keine der Proben der Positivkontrolle, welche bei ca. 270 Basenpaaren aufscheint, entsprechen darf.

3.3 Isolierung der RNA

Benötigte Reagenzien und Materialien:

- PqGOLD TriFast™ Reagenzlösung (peqLab Biotechnologie GmbH)
- DEPC Wasser (SIGMA®)
- Chloroform (Merck KGaA)

- Isopropanol (Merck KGaA)
- Ethanol (Merck KGaA)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Mikroliterpipetten (Eppendorf AG)
- Filterspitzen (Biozym Biotech Trading GmbH)

Benötigte Geräte:

- Zellkulturschaber (Techno Plastic Products AG)
- Zentrifuge (Hettich AG)
- Thermomixer Comfort (Eppendorf AG)
- Mikrozentrifuge (Eppendorf AG)
- Mikroliterpipetten, (Eppendorf AG)
- Filterspitzen (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Spektrophotometer U-2000 (Hitachi, Tokyo, JP)

Durchführung:

Von einer voll bewachsenen Zellkulturflasche wird das Medium abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Erneut wird 1 ml PBS zugesetzt und nun mittels eines Zellschabers die Zellen vollständig in der Flasche abgekratzt. Diese Zellsuspension wird in ein Reagenzröhrchen übergeführt. Nach zentrifugieren von 5 Minuten bei 400 g, welches bei der RNA- Isolierung immer im Kühlraum bei minus 4 C° vorgenommen werden muss, wurde der Überstand entfernt und die sedimentierten Zellen direkt im Reagenzröhrchen mit 1 ml der peqGOLD TriFast™ Reagenzlösung versetzt. Bei diesem Vorgang wird RNA, welche nicht-degradiert und frei von DNA und Proteinen ist, extrahiert. Um eine gute Homogenisierung sicherzustellen ist es nötig mehrmalig zu pipettieren.

Phasentrennung

Um eine hohe Ausbeute zu erhalten und die Dissoziation der Nukleotidkomplexe sicherzustellen werden die Proben bei Raumtemperatur 5 Minuten stehengelassen. Anschließend werden 200 µl Chloroform zugesetzt und die Proben etwa 15 Sekunden stark geschüttelt und anschließend 3-10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 5 minütigem

Zentrifugieren bei 12000 g kommt es zur Bildung von 3 Phasen: Die obere wässrige Phase ist farblos und beinhaltet die RNA, die untere Phase ist rot und besteht aus Phenol und Chloroform. Weiters erscheint eine milchig-trübe Zwischenphase. DNA und Proteine sind in der Interphase und der unteren Phase enthalten, während sich die RNA ausschließlich in der wässrigen Phase ansammelt, welche auch etwas mehr als die Hälfte des Gesamtvolumens ausmacht.

Präzipitation der RNA

Die Wasserphase wird vorsichtig mittels Pipette aufgesaugt und in ein steriles Reagenzgefäß übergeführt. Durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol kommt es zur Präzipitation der RNA. Nachdem man die Probe gut mischt wird sie 15 Minuten auf Eis inkubiert und in Folge 10 Minuten bei 12000 g zentrifugiert. Die RNA erscheint gelartig im unteren Teil des Reaktionsgefäßes.

Waschen der RNA

Der Isopropanolüberstand wird entfernt und das Pellet mit 1 ml 75%igen Ethanol gewaschen. Daraufhin wird erneut 10 Minuten zentrifugiert (10 min/ 12000 g/4°C°). Dieser Waschvorgang wird hierauf noch ein zweites Mal ausgeführt.

Lösen des RNA Pellets

Der Alkohol wird vorsichtig mit der Pipette entfernt. Es sollte so wenig Ethanol wie möglich im Röhrchen bleiben um das anschließende Trocknen am Heizblock bei 55 °C so kurz wie möglich (maximal 3 Minuten) zu halten. Ist die Probe zu trocken, wird die Löslichkeit beeinträchtigt. Nach dem Erwärmen sollte die Probe sofort wieder auf Eis gestellt werden. Nun wird das Pellet in mindestens 20 µl PCR Wasser gelöst. Es folgt ein 10 minütiges Erwärmen bei 55 °C und geschlossenem Deckel am Heizblock, um die vollständige Lösung zu gewährleisten.

Spektrophotometrische Gehaltsbestimmung

Zur Feststellung ob die Probe in Gehalt und Reinheit entspricht wird in Folge eine Vermessung am Spektrophotometer durchgeführt. 398 µl PCR Wasser werden mit 2 µl der Probe versetzt und hiervon die optische Dichte bei 260 sowie bei 280 nm gemessen. Der Quotient des Wertes bei 260 nm und des Wertes bei 280 nm sollte zwischen 1,6 und 2 liegen.

[PeqGOLD TriFast™,2007] Den Gehalt von $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ erhält man durch Multiplikation der Absorption bei 260 nm mit dem Faktor 8.

Berechnungsformel: $c(\mu\text{g}/\text{ml}) = A_{260} / 0,025$ [Gallagher Sean R., 2006]

Um zu überprüfen, ob eine mögliche Degradierung der RNA stattgefunden hat, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt.

3.4 Reverse Transkription der mRNA:

Prinzip:

Nach erfolgter RNA-Isolierung wird die reverse Transkription durchgeführt. Bei diesem Vorgang wird die mRNA umgeschrieben und man erhält den, der mRNA komplementären DNA-Strang, der als cDNA bezeichnet wird. Dabei wird die mRNA mit einem Random Primer hybridisiert. Die reverse Transkriptase dient als Enzym, welches die Synthese der Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) an den mRNA Strang katalysiert.

Benötigte Reagenzien und Materialien:

- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)
- Reaktionsgefäße 1,5 ml (Biozym Biotech Trading GmbH)
- Mikroliterpipetten Eppendorf Research, (Eppendorf AG)
- Filterspitzen, (Biozym Biotech Trading GmbH)
- RNase Inhibitor (Invitrogen)

Benötigte Geräte:

- Biometra Personal Cycler, (Glatt-Koller, Innsbruck, AT)
- Mikrozentrifuge (Herolab)

Die Reagenzien des Master Mix welche im High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit enthalten sind, werden in unten angeführter Zusammensetzung mittels Pipette in ein geeignetes Reaktionsgefäß zusammengefügt und gemixt indem man auf und ab pipettiert.

Master Mix:

10X RT Buffer	2,0 µl
25X dNTP Mix (100mM)	0,8 µl
10X RT Random Primers	2,0 µl
MultiScribe™ Reverse Transcriptase	1,0 µl
RNAse Inhibitor	1,0 µl
Nuclease freies Wasser	3,2 µl
Gesamtvolumen/Reaktion	10,0 µl

Um eventuell vorhandene Luftblasen zu beseitigen und Reagenzienreste von der oberen Gefäßwand zu entfernen, wird kurz abzentrifugiert. Während die Proben auf Eis gelagert werden, wird der Thermocycler programmiert (siehe Tabelle 2) und anschließend gestartet.

[High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, 2006]

Tabelle 2: Programmdaten für den Thermocycler

	Schritt 1	Schritt 2	Schritt 3	Schritt 4
Temperatur	25°C	37°C	85°C	4°C
Zeit	10 Minuten	120 Minuten	5 Sekunden	∞

3.5 Die Polymerasekettenreaktion (PCR):

Bei der PCR handelt es sich um eine Technik, die in vitro angewendet wird, mit deren Hilfe es möglich ist, DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt sind zu amplifizieren. Da die DNA in ihrem natürlichen Zustand als Doppelhelix vorliegt, trennt man diesen Doppelstrang durch Erhitzen auf. Neben dieser einzelsträngigen vorliegenden DNA Sequenz benötigt man, damit die DNA Vervielfältigung gestartet werden kann, Primer. Das sind einzelsträngige DNA Moleküle, welche komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Unter der Voraussetzung, dass die Reaktionsbedingungen geeignet sind, verlängert die DNA Polymerase in der Gegenwart von dNTPs die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize. So entstehen neue DNA-Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist, wobei all diese doppelsträngig sind. Um diese

Synthese zu wiederholen ist es deshalb nötig diese DNA erneut durch Hitze zu denaturieren, sie abzukühlen und die Primer wieder binden zu lassen. Wenn die richtige Temperatur für die Enzymreaktion erreicht ist, verlängert die Polymerase erneut die Primer. Dieser gesamte Vorgang wird 25-40 mal wiederholt und die Anzahl der Kopien an Startsequenz wächst dabei exponentiell, da jede DNA Kopie selbst wieder als Matrize fungieren kann.

[Desmond S.T., 2002] [Newton and Graham, 1994]

Benötigtes Material:

- PCR-Wasser, (Baxter, Wien, AT)
- 10xTaqBuffer with KCl (Fermentas GmbH)
- $MgCl_2$, 25mM (Fermentas GmbH)
- dNTP mix, 10 mM each 500 μ l, (Finnzymes Oy)
- Primer sense (Ingenetix, Wien, AT)
- Primer antisense (Ingenetix)
- Taq DNA Polymerase LC (recombinant) 1 u/ μ l (Fermentas)

Tabelle 3: Primärsequenzen

Zielgen	Primer sense (5'-3')
Accessionnumber	Primer antisense (5'-3')
β -Actin ^{*1}	ATCTGGCACCACACCTTCTACAATGAGCTGCG
	CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCACATCTGC
ER α	TACTGACCAACCTGGCAGACAG
NM_000125	ACCACGTTCTTGCACTTCATGC
ER β	CAAGAAGATTCCCGGCTTTG
NM_001437	TCGAAACCTTGAAGTAGTTGCC
SULT 1A1 ^{*2}	ATGGAGCTGATCCAGGACAC
	TGACCTACCGTCCCAGGCC
SULT 2A1	CCCAAATCAGGAACAACTGG
NM_003167	AGCACAGTTCCTTGACAAAACC
SULT 1E1 ^{*3}	ATGAATTCTGAACTTGAC
	TTAGACCTCAGTTCGAAAC
17 β -HSD-1	GGGTCCACTTGAGCCTGAT
NM_000413	GTGGGCGAGGTATTGGTAG
17 β -HSD-2	ATTGCGAAGAACCTGCTCTCC
NM_002153	GGTGCCTGCGATATTTGTTAGG
STS	CTCTTCCTAGCAGCCCTAATCC
NM_000351	AAAGCATCCGTTGGAACCC

*¹ [NEUCHRIST et al, 2001]

*²/^{*3} [TAMURA et al, 2001]

- Mikroliterpipetten Eppendorf Research, (Eppendorf AG)
- Filterspitzen, (Biozym Biotech Trading GmbH)

Primärsequenzen ohne Literaturangabe wurden mit der Software Primer Express (Applied Biosystems) selbst gestaltet.

Benötigte Geräte:

- Biometra Personal Cycler, (Glatt-Koller)

Zuerst wird der Thermocycler laut Tabelle 8 dem jeweiligen Zielgen entsprechend programmiert.

Tabelle 4: PCR Programme der durchgeführten Proben

SCHRITT 1:		2 Minuten bei 94 °C
SCHRITT 2:	*	
Schritt 2a:	β-Actin:	30 Sekunden bei 94 °C
	Rest:	15 Sekunden bei 94 °C
Schritt 2b:	β-Actin:	1 Minute bei 61 °C
	ERα:	30 Sekunden bei 60 °C
	ERβ:	30 Sekunden bei 60 °C
	SULT 1A1:	30 Sekunden bei 62 °C
	SULT 2A1:	30 Sekunden bei 60 °C
	SULT 1E1:	30 Sekunden bei 45 °C
	17β-HSD-1:	30 Sekunden bei 55 °C
	17β-HSD-2:	30 Sekunden bei 64 °C
	STS:	30 Sekunden bei 60 °C
Schritt 2c:		1 Minute bei 72 °C
SCHRITT 3:		5 Minuten bei 72 °C
SCHRITT 4:		Verweilung auf 4 °C

*Wiederholung des Schrittes 2 (2a-2c)

Bei β-Actin wurde der in Tabelle 4 angeführte Zyklus 25 mal durchgeführt, bei allen anderen Proben jeweils 40 mal.

Dann wird der Mastermix unter dem Abzug in der folgenden Zusammensetzung in die Reaktionsgefäße für den Thermocycler pipettiert:

PCR-Wasser	16,5 µl
10xBuffer	2,5 µl
Mg ₂ Cl	2,0 µl
dNTPs	0,5 µl
Primer F	0,25 µl
Primer R	0,25 µl
Taq-DNA-Polymerase	1,0 µl
Gesamtvolumen/Reaktion	23,0 µl

Dabei sollte darauf geachtet werden, dass die Taq-DNA-Polymerase zuletzt zugesetzt wird, um die Bildung von unerwünschten Nebenprodukten zu vermeiden. Mit Ausnahme der PCR des β -Actins, bei der mit einer Menge von 50 ng/Reaktion gearbeitet wird, werden bei allen anderen PCRs jeweils 100 ng an cDNA eingesetzt. Die Gefäße werden dicht verschlossen und das einprogrammierte Programm gestartet. Hat der Thermocycler eine Temperatur von etwa 90° erreicht werden die Gefäße eingesetzt.

3.6 Detektion von PCR Produkten:

Das PCR Endprodukt wird mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Dazu wird ein 2 %iges Agarosegel verwendet.

Benötigte Materialien:

- peqGOLD Universal Agarose, (peqLab Biotechnologie GmbH)
- 10x TAE Puffer (TRIS Acetat EDTA) pH 7,2:

TRIS*	48,4 g
Natriumacetat	27,2 g
EDTA	3,8 g
Bidestilliertes Wasser	ad 1 Liter

*Merck

- Ethidium Bromid (1% Lösung in Wasser) (Merck KGaA)
- 6x Loading Dye Solution (Fermentas)
- PCR Längenmarker Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder 0,5 µg/µl (Fermentas)
- Mikrotiterplatten (Greiner, Frickenhausen, DE)
- Mikroliterpipetten und Filterspitzen

Benötigte Geräte:

- UV-Detektor (Herolab, Molekulare Trenntechnik)
- Mikrowelle (Elin, MIK 4600)

- Horizontale Elektrophoreseapparatur (Hoefler HE 33)
- Electrophoresis Power Supply-EPS 301 (Amersham Pharmacia Biotech)

Herstellung des Agarosegels:

Um das 2%-ige Agarose Gel herzustellen werden zuerst 0,6 g Agarose in 30 ml 1xTAE Puffer gelöst. Um eine vollständige Löslichkeit der Agarose zu erreichen, ist ein mehrmaliges kurzes Erhitzen mittels Mikrowelle und Schwenken nötig. Danach wird die nun klare Lösung unter ständigem Schütteln auf ca. 60°C abgekühlt, und hierauf wird 1,5 µl Ethidiumbromid zugesetzt. Diese Mischung wird in den sogenannten Schlitten gegossen. Um die Probe später in das Gel applizieren zu können, sind kleine Kammern, sogenannte „Slots“, nötig. Diese erhält man durch Stecken von Kämmen, welche als Platzhalter dienen, in das noch flüssige Gel. Nachdem das Gel etwa 15 Minuten bei Raumtemperatur und anschließend mindestens 15 Minuten im Kühlschrank abkühlt, ist es gehärtet und die Kämmen werden entfernt.

Gelelektrophorese und Auswertung:

Nun wird der Schlitten in die Elektrophoreseapparatur eingelegt. Dabei sollte das Gel immer vollständig mit TAE Puffer überschichtet sein, ansonsten muss dieser ergänzt werden. Jeweils 2 µl Loading Dye Solution werden pro Probe in einer Mikrotiterplatte vorgelegt und mit jeweils 10 µl der PCR Produkte gemischt. Von dieser 12 µl Mischung werden 10 µl in die jeweils der Probe zugeordneten Geltasche pipettiert. Die Apparatur wird verschlossen, wobei darauf geachtet werden muss, dass die Elektrophorese immer vom negativen zum positiven Pol verläuft. Das Gerät wird gestartet, die Dauer beträgt 30 Minuten und der Vorgang wird bei 90 Volt durchgeführt. Anschließend werden die Gelplatten unter UV Licht analysiert und mittels Gel Scanner photographiert.

3.7 Wachstumstests:

Benötigte Materialien:

- (RPMI)-1640 Medium (PANTM Biotech GmbH)
- FBS (Fetal Bovine Serum), (PANTM Biotech GmbH)
- Charcoal treated FBS (PANTM Biotech GmbH)

- Penicillin (10.000 U/ml)-Streptomycin (10.000 µg/ml)-Lösung (P/S), (Gibco®)
- 10xPBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,4, (Merck KGaA, Darmstadt, DE)
(genaue Zusammensetzung siehe Tabelle 1)
- Trypsin/EDTA-Lösung (10x), (Gibco®)
- Dimethyl Sulfoxid (DMSO), (SIGMA®)
- 50 ml Zentrifugenröhrchen, (Sterilin®)
- Zellsieb 70 µm (Falcon, Fort Worth, Texas, USA)
- ISOTON II (Beckman Coulter, Inc., Fullerton, CA, USA)
- 24-well Platte (Iwaki)
- Estronsulfat-Kaliumsalz (SIGMA®)
- Sterile Pipetten (1 ml und 10 ml), (Sterilin®)
- 1,5 ml Eppendorfreaktionsgefäße (Eppendorf AG)

Benötigte Geräte:

- Coulter Counter (Coulter Electronics Ltd., Luton, Beds., UK)
- Inkubator (Kendro Laboratories GmbH)
- Zentrifuge (Hettich AG)
- Stepper (Eppendorf AG)
- Vortexer (VF2, Janke&Kunkel IKA®-Labortechnik, Staufen,DE)

Da in dieser Versuchsreihe auf den Einfluß von Estronsulfat auf die Zellen getestet wird, sollte ausgeschlossen werden, dass das Medium in dem sich die Zellen befinden Estrogen enthält. Deshalb sollte das Medium der verwendeten Zellen bereits während der Wachstumsphase zweimal auf estrogenfreies Medium gewechselt worden sein. Dazu verwendet man wie beim gewöhnlichen Arbeiten mit diesen Zellen das (RPMI)-1640 Medium versetzt mit 1% P/S und fügt statt des üblichen FBS 10% einer über Aktivkohle gereinigten FBS Lösung bei. Als Ausgangspunkt für diesen Test benötigt man eine Zellkulturflasche deren Boden möglichst vollständig mit Zellen bewuchert ist. Der Überstand wird abgesaugt und die Zellen mit 4 ml PBS gewaschen. Danach werden die Zellen durch Zugabe von 1 ml Trypsin abgelöst und im Inkubator mindestens 5 Minuten gestellt. Sind die Zellen nicht allzu sensibel kann die Einwirkzeit erhöht werden. Ziel ist, möglichst alle Zellen gelöst und getrennt vorliegen zu haben, jedoch so, dass diese selbst nicht durch das Trypsin angegriffen werden. Man mischt anschließend mit 6 ml Medium und kontrolliert das vereinzelte vorliegen

unter dem Mikroskop. Im Anschluss wird die Suspension durch ein Zellsieb filtriert. Um den Coulter Counter nicht zu verstopfen und die Zählung möglichst genau zu halten, sollten keine Zellagglomerate vorliegen. Nach dem Zentrifugieren von 3 Minuten bei 1000 rpm setzt sich ein Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens ab. Der Überstand wird abgesaugt und das Pellet in 1 ml frischen Medium resuspendiert. 100 µl werden in ein Coulter Counter Gefäß transferiert und mit 9,9 ml einer isotonen Kochsalzlösung auf 10 ml aufgefüllt. Mittels des Coulter Counters zählt man nun die Zellzahl pro Milliliter aus. Die Messung sollte erst gestartet werden, wenn das Gerät ausreichend mit der Waschlösung und isotoner Lösung gespült wurde. Die Messelektrode sollte langsam in die Lösung eingetaucht werden, damit die Entstehung von Luftblasen vermieden wird. Je nach Anzahl der ausgezählten Zellen und deren Wachstumsgeschwindigkeit und Größe stellt man eine sinnvolle Überlegung auf wie viel pro Loch (Well) ausgesät werden sollen, da sich die Zellen während des Versuches möglichst in der logarithmischen Wachstumsphase befinden sollten. Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden bei Versuchen mit den Zelllinien HOS und MG63 3000 Zellen bei allen anderen 20000 Zellen pro Well ausgesät. Dazu wird ein entsprechender aliquoter Teil der Zellkonzentration mit ausreichenden serumfreien Medium (pro 24 well Platte benötigt man etwas mehr als 12 ml) versetzt und gevortext. In jede Vertiefung werden nun mittels eines Steppers 500 µl der Zellsuspension pipettiert. Nach etwa 24 Stunden im Inkubator sind die Zellen am Boden der Platten angewachsen. Es wird das Medium abgesaugt und die Konzentrationen der DMSO Verdünnungsreihe mit estrogenfreien Medium zu je 500 µl aufgetragen. In Rahmen der Versuche dieser Diplomarbeit wurden mit den Konzentrationen von 10^{-10} bis 10^{-6} M Estronsulfat gearbeitet. Pro Zelllinie wurde diese Versuchsreihe 2-mal durchgeführt. Zur Kontrolle, wie sich die Zellen ohne Einwirkung des Estronsulfats verhalten, wird eine Reihe der 24 Well Platte nur mit mit DMSO behandelt. Diese 4 Löcher dienen der Kontrolle und entsprechen je dem Zellwachstum von 100%. Am 2. oder 3. Tag, je nach deren Wachstum, wurde das Medium in der Platte gewechselt. Die Zellen werden in unserem Fall am 6. Tag ausgewertet, wobei Tag 0 dem Tag des Auftragens des Estronsulfats entspricht.

Bestimmung der Zellzahl mittels Coulter Counter:

Das Medium wird aus den einzelnen Wells abgesaugt und infolge wird jedes Well mit 0,5 ml PBS gewaschen. Danach werden die Zellen mit 100 µl Trypsin abgelöst, wobei etwa 15 min inkubiert wird. Die Trypsin Wirkung wird durch Zugabe von 500 ml Medium abgestoppt. Pro Platte werden 24 Eppendorf Gefäße genau beschriftet, damit eine anschließende

Verwechslung vermieden werden kann. (Konzentrationsangabe und Reihennummer)
Vorsichtig werden die Inhalte der einzelnen Wells in das jeweils vorgesehene Eppendorf Gefäß transferiert. Dabei sollte etwa 20-mal auf und ab pipettiert werden. Daraufhin werden die Gefäße 5 Minuten bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird entfernt und das Pellet in 1 ml PBS resuspendiert. 100 µl dieser Suspension werden in ein Coulter Counter Gefäß übergeführt, das zuvor mit 9,9 ml isotoner Lösung befüllt wurde. Hierauf wird mit dem Coulter Counter mittels 3 Durchläufe vermessen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Zahlreiche Studien zeigten, dass Estrogene eine wichtige Rolle in der Entwicklung und im Wachstum des Ovarialkarzinoms haben. Ähnlich wie in Brustkrebszellen beschrieben, könnten daher aktive Estrogene (17 β -Estradiol und Estron) aus dem inaktiven Biotransformationsprodukten Estronsulfat durch Desulfatierung durch spezifische Sulfatasen gebildet werden. Weiteres könnte die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Estron in 17 β -Estradiol umwandeln. Wenn diese Enzyme in den Ovarialkarzinomzelllinien aktiv sind, so sollte die Behandlung der Zellen mit Estronsulfat zu einer Bildung von aktiven Estrogenen führen. Diese könnten an den Estrogenrezeptor binden, und damit das Wachstum der Tumorzellen stimulieren.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurde zunächst die Expression der Enzyme des Estrogen-metabolisierenden System 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase Typ1 und 2, Estrogensulfatase (STS), Sulfotransferase 1A1, SULT2A1 und SULT1E1 und der beiden Estrogenrezeptoren (Estrogenrezeptor α und β) auf mRNA-Ebene bestimmt. Wie im Methodenteil beschrieben, wurde dazu aus den Zellen RNA isoliert. Nach reverser Transkription der mRNA wurden semiquantitative PCR-Analysen mit den jeweils für die Rezeptoren und für die Enzyme spezifischen Primerproben durchgeführt.

Im Anschluß an die Expressionsstudien wurde die Wirkung von konjugierten Estrogenderivaten in A2780, Zytostatika-resistenten A2780ADR, OVCAR und SKOV3 Ovarialkarzinomzelllinien untersucht. Es wurde die Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum bestimmt. In vergleichenden Studien wurde auch die Wirkung von Estronsulfat auf das Wachstum der Osteosarkomzelllinien HOS, MG63 und SAOS bestimmt.

4.1 mRNA Expressionsstudie:

4.1.1. Expression von β -Actin:

Zuerst wurde überprüft ob die Effizienz der reversen Transkriptase ausreichend war. Dazu wurde β -Actin gewählt, da es sich hierbei um ein Enzym handelt, welches in jeder Zelle vorkommt, ein sogenanntes „house keeping gene“.

Eine β -Actin Bande erscheint bei 838 Basenpaaren. Aus der Abb.4 ist deutlich ersichtlich, dass dies bei allen Proben der Fall ist. Dieses Ergebnis besagt, dass der Gehalt an β -Actin mRNA in allen untersuchten Proben gleich ist.

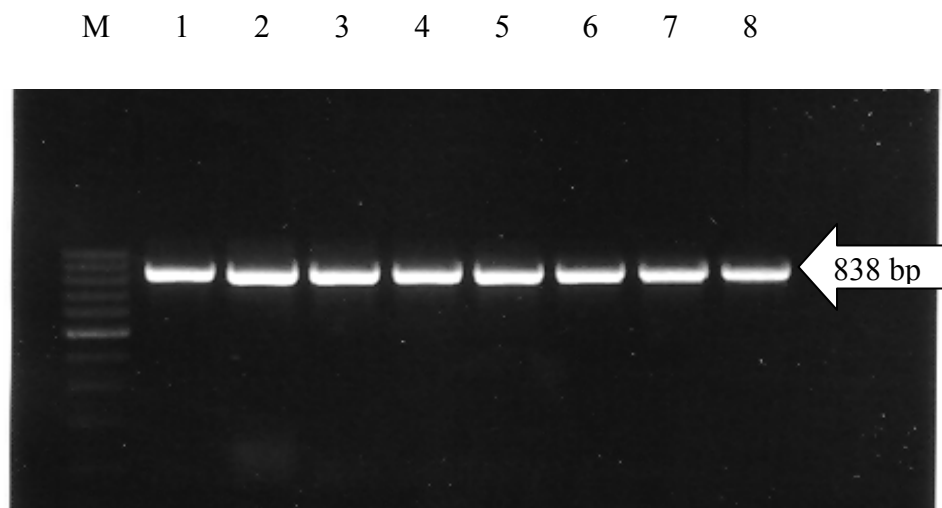


Abbildung 4: Nachweis der β -Actin mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF-7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 50 μ g DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3

4.1.2 Expression von ER α :

Im nächsten Schritt wurde die Expression des ER α in den Osteosarkom- und in den Ovarialkarzinomzelllinien bestimmt.

Wie aus Abb.5 ersichtlich, wird ER α mRNA in der MCF7, SAOS und SKOV3 Zelllinien exprimiert. Dabei werden drei ER α Isoformen, die eine unterschiedliche Aktivität besitzen, exprimiert. Obwohl die Expression dieses Rezeptors auch in der Ovarialkarzinomzelllinie OVCAR beschrieben wurde, konnte in diesem Experiment der Rezeptor in diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Es ist daher anzunehmen, dass der Rezeptor während der vielfachen Passage, die diese Zellen in der Zellkultur durchmachten, die Rezeptorexpression verloren haben.

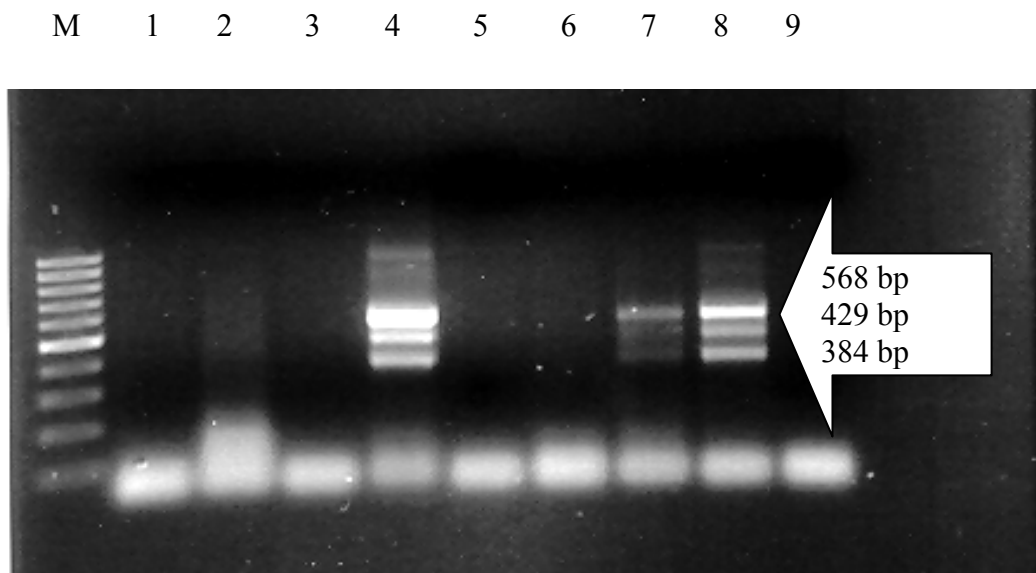


Abbildung 5: Nachweis der ER α Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 μ g DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser;

4.1.3 Expression von ER β :

Im Anschluss wurde die Expression von ER β in den Ovarial- und Osteosarkomzelllinien untersucht.

Wie Abb.6 zeigt, wird ER β in A2780ADR, MCF7, OVCAR und SAOS Zelllinien exprimiert. Das Amplifikationsprodukt bei 226 Basenpaaren lässt zwar die Banden in den Zelllinien MCF7 und OVCAR eindeutig erscheinen, jedoch sind die Banden wesentlich schwächer als in der A2780ADR oder SAOS Zelllinie. Dies weist darauf hin, dass der Gehalt an ER β in den Zellen MCF7 und OVCAR wesentlich geringer ist.

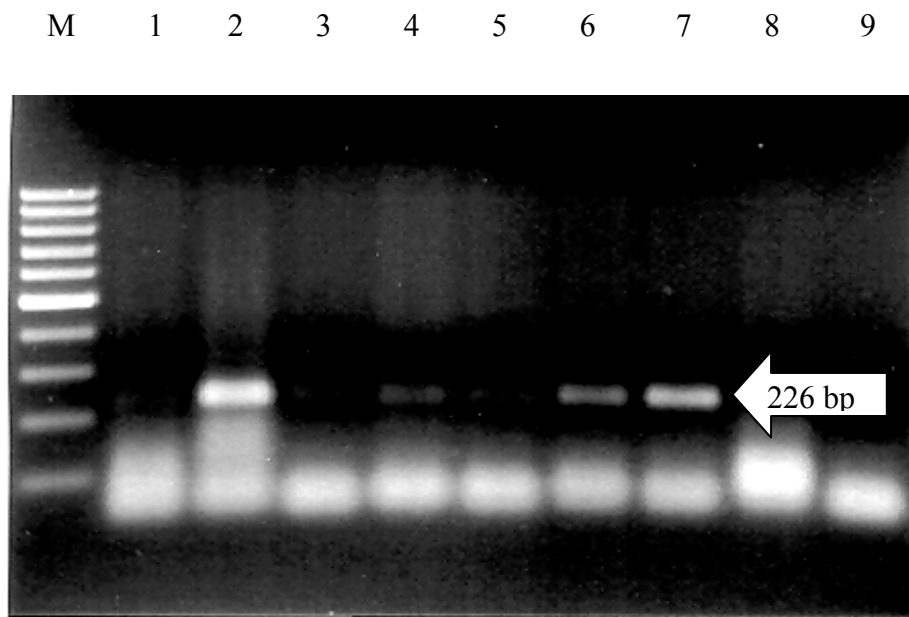


Abbildung 6: Nachweis der ER β mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 μ g DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser;

In den nachfolgenden Experimenten wurde die Expression von Sulfatierungsenzymen, die für die Estrogenhomeostase wichtig sein können, untersucht. Aus der Familie der Sulfotransferasen, die durch die Sulfatierung von Estrogenen deren Inaktivierung bewirken könnten, wurde zunächst SULT1A1 mRNA Expression untersucht.

4.1.4 Expression von SULT 1A1:

Bis auf die Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 und die Osteosarkomzelllinie SAOS wird SULT 1A1 mRNA in allen untersuchten Zelllinien etwa in gleiche Menge exprimiert. Eine etwas höhere Expressionsrate scheint in der Osteosarkomzelllinie HOS vorzuliegen. Die Größe des Amplifikationsproduktes beträgt 987 bp.

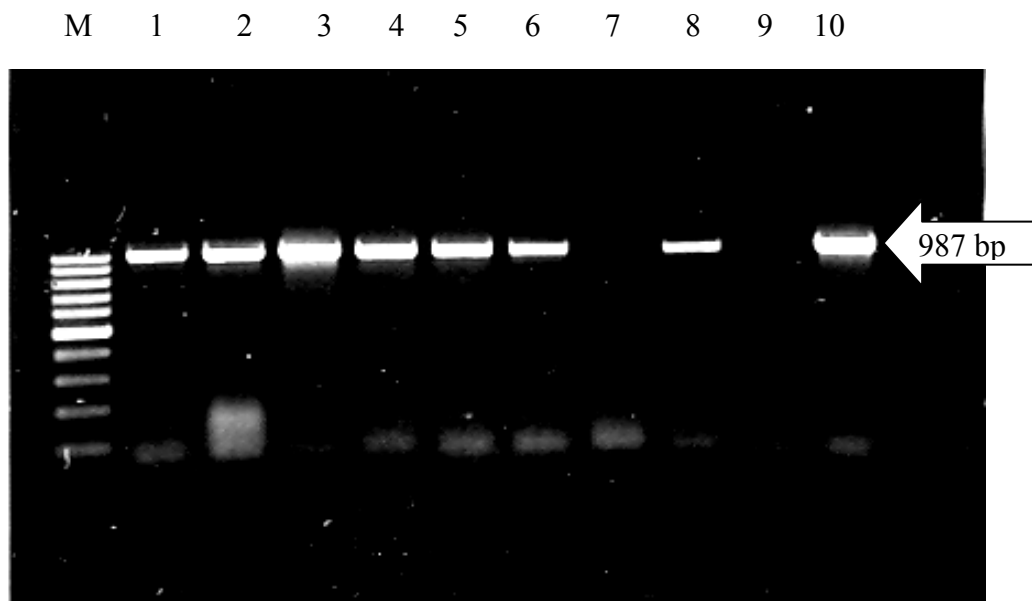


Abbildung 7: Nachweis der SULT 1A1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR, wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 µg DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: M: Marker; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser; Probe 10: Positivkontrolle mit ZR 75-1;

4.1.5 Expression von SULT 2A1

Die Expression von SULT2A1, die aber, wie in der Leber gezeigt wurde, vor allem DHEA und Pregnenolone sulfatiert und für Estrogene nur eine geringere Affinität hat, war sehr limitiert. Hier weisen nur die Zelllinien A2780 und A2780 ADR ein positives Ergebnis auf. Da sich diese Zelllinien lediglich in der Resistenz gegen Adriamycin und andere MDR-Zytostatika unterscheiden, sollte das Expressionsmuster der Metabolisierungsenzyme gleich bleiben. Jedoch ist in Abb. 8 deutlich ersichtlich, dass die P-Glycoprotein-überexprimierende A2780 ADR Zelllinie erheblich mehr SULT 2A1 exprimiert als die ihre Ausgangs-Zelllinie A2780, welche keine Resistenz gegen Adriamycin aufweist. Dies würde bedeuten, dass mit der Induktion der P-Glycoprotein Expression auch SULT2A1 induziert wird.

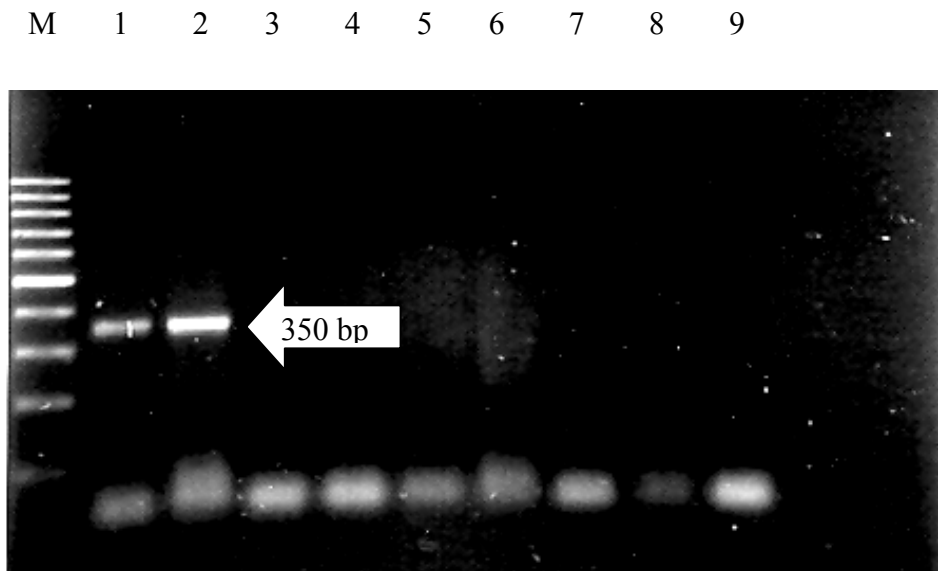


Abbildung 8: Nachweis der SULT 2A1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 µg DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser;

4.1.6 Expression von SULT 1E1

Abb.9 zeigt, dass das Amplifikationsprodukt bei 885 bp nur in wenigen Zelllinien (OVCAR und SKOV3) nachgewiesen werden konnte. Deshalb konnte nur in diesen Zelllinien ein Nachweis für die mRNA Expression von SULT 1E1 erbracht werden. Es scheint, dass SULT1A1 in der OVCAR-Zelllinie in einer etwas größeren Menge exprimiert wird.

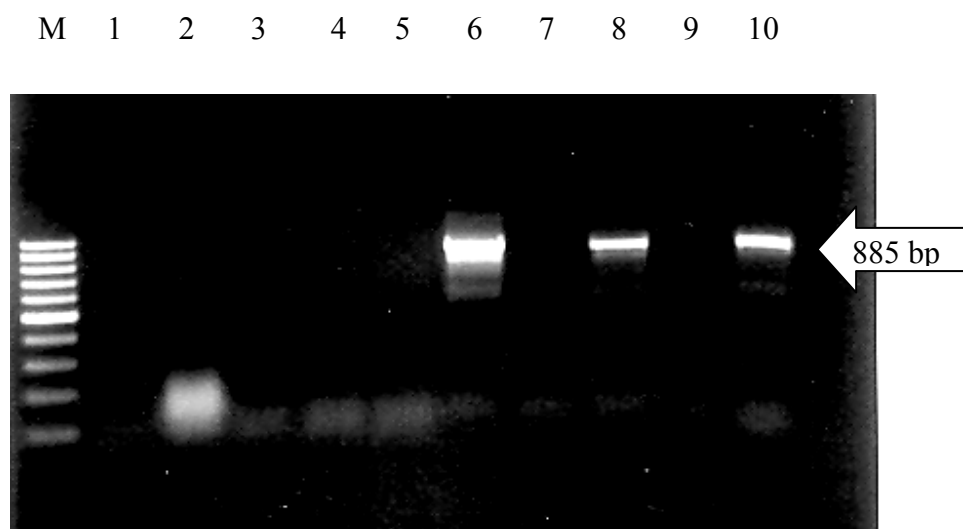


Abbildung 9: Nachweis der SULT 1E1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 µg DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser; Probe 10: Positivkontrolle mit CACO-2 cDNA;

In den nächsten Experimenten wurde die Expression von 17 β -HSD-1 und 17 β -HSD-2, die E1 in E2 und vice versa umwandeln, untersucht.

4.1.7 Expression von 17 β -HSD-1

Wie die Abb.10 zeigt, wird 17 β -HSD-1 mRNA in allen Zelllinien außer in der Osteosarkomzelllinie MG63 exprimiert. Das Amplifikationsprodukt zeigt deutliche Banden bei 134bp. In den Ovarialkarzinomzelllinien A2780 und hier vor allem in der A2780ADR Zelllinie scheint die Expression dieses Enzyms wieder höher zu sein.

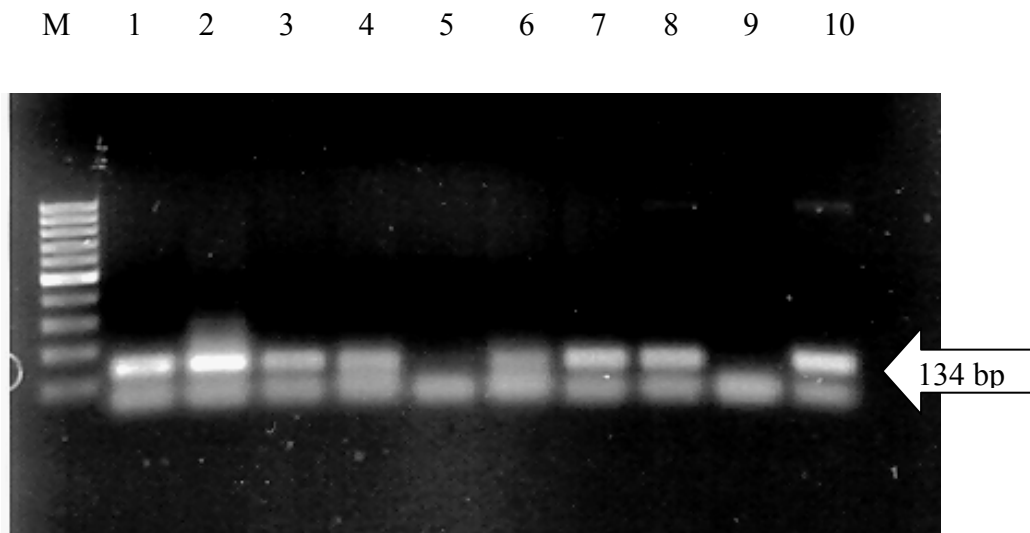


Abbildung 10: Nachweis der 17 β -HSD-1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 μ g DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser; Probe 10: Positivkontrolle mit Mischung von je 1 μ l MCF7 und MCF10 cDNA;

4.1.8 Expression von 17 β -HSD-2

Wie Abb.11 zeigt, konnte die mRNA Expression der 17 β -HSD-2 in den Ovarialkarzinomzelllinien nicht nachgewiesen werden, sodass diese Zellen nicht befähigt scheinen, E2 wieder in E1 umzuwandeln. Die Expression von 17 β -HSD-2 in den Knochentumorzellen HOS und MG63 ist aufgrund der deutlich ersichtlichen Bande des Amplifikationsproduktes bei 448bp als positiv zu werten.

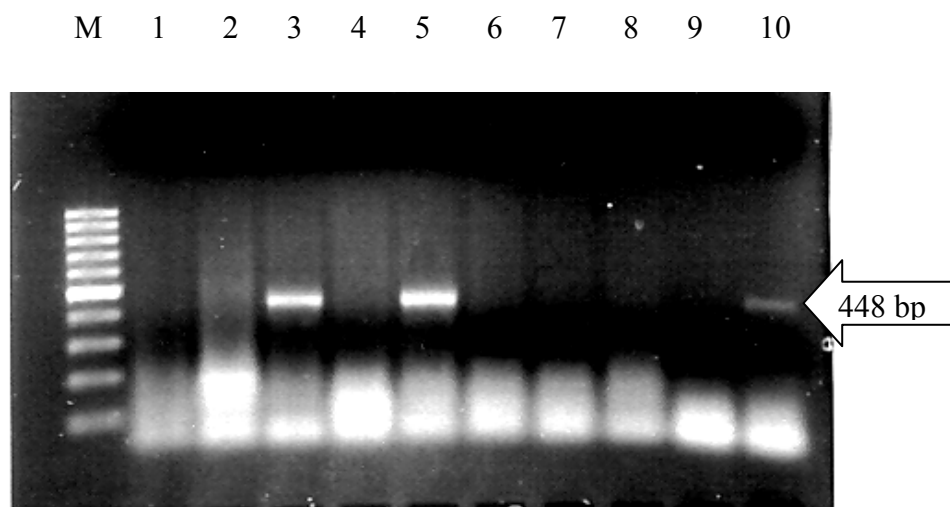


Abbildung 11: Nachweis der 17 β -HSD-2 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 μ g DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser; Probe 10: Positivkontrolle mit Mischung von je 1 μ l MCF7 und MCF10 cDNA;

Im nächsten Experiment wurde überprüft, ob in den Zelllinien desulfonierende Sulfotransferase STS, die E1S in E1 umwandelt, nachweisbar sind.

4.1.9 Expression von STS

Wie Abb.12 zeigt, ist die Expression von STS mRNA in allen Zelllinien nachweisbar. Das Amplifikationsprodukt zeigt in allen Zellen deutliche Banden bei 789 bp, was darauf hinweist, dass alle Zelllinien STS in annähernd derselben Konzentration exprimieren.

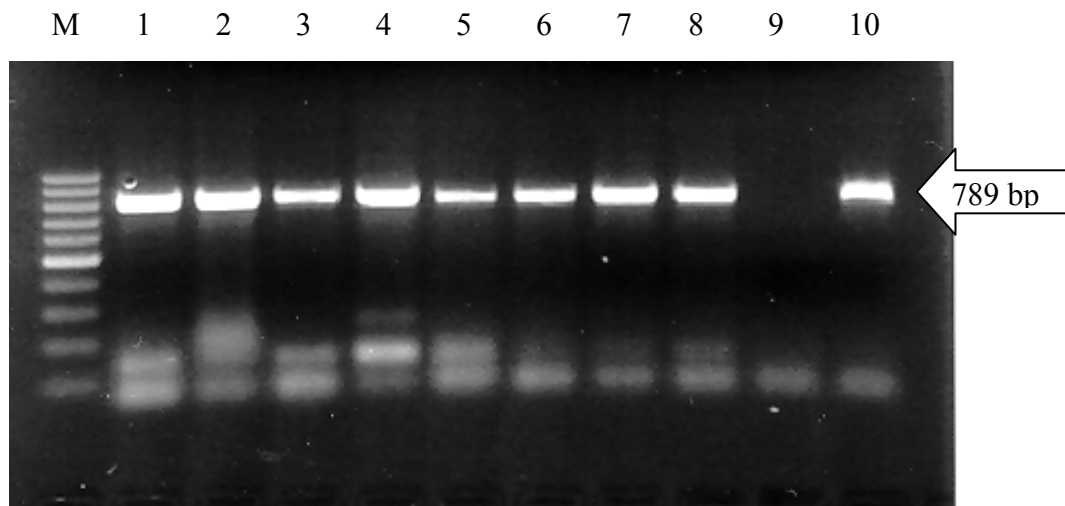


Abbildung 12: Nachweis der STS mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7. Die Isolierung, reverse Transkription und anschließende PCR wurde wie im Methodenteil beschrieben durchgeführt. Die Auswertung erfolgte auf einem 2%-igen mit Ethidiumbromid versetzten Agarosegel. Von den einzelnen Proben wurden je 100 µg DNA auf dem Gel analysiert. M: Marker; Probe 1: A2780; Probe 2: A2780 ADR; Probe 3: HOS; Probe 4: MCF7; Probe 5: MG63; Probe 6: OVCAR; Probe 7: SAOS; Probe 8: SKOV3; Probe 9: Negativkontrolle mit PCR-Wasser; Probe 10: Positivkontrolle mit Mischung aus Placenta- und BeWo-cDNA;

Die Gesamtübersicht der Ergebnisse der Expressionsstudien in den Tab.5 und 6 zeigt, dass alle untersuchten Zelllinien STS exprimieren. Somit ist es allen Zelllinien möglich, die Depotform Estronsulfat in Estron, das an den Estrogenrezeptor, wenn auch mit geringerer Affinität als 17 β -Estradiol, binden kann, umzuwandeln. Wie ersichtlich, exprimieren mit Ausnahme der MG63-Zelllinie alle Zelllinien 17 β -HSD-1. Dieses ermöglicht in weiterer Folge eine Umwandlung des Estrons in 17 β -Estradiol, dem potentesten Estrogen. Somit wäre es nach Zugabe von E1S zu den Zellen möglich, dass dieses E1S in das potente E2 umzuwandeln. E2 könnte dann durch ER Aktivierung, das Zellwachstum stimulieren.

Da es sich bei den behandelten Zelllinien um Krebszellen aus Brust-, Ovarien- und Knochengewebe handelt und diese Organe von Estrogenen beeinflusst werden, wird zumindest eine der Isoformen des ER in allen diesen Zellen exprimiert. Da allerdings neben der Brustkrebszelllinie MCF7, von den Ovarialkarzinomzelllinien nur SKOV3 Zelllinien ER α exprimieren, sollte die Wirkung von E1S auf das Zellwachstum nur in dieser Zelllinie, nicht aber in den A2780, A2780ADR und OVCAR Zelllinien, nachzuweisen sein. Dies würde auch für SAOS Zellen gelten, die so wie die OVCAR Zelllinie ER β exprimieren.

Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass alle Zelllinien mit Ausnahme der SAOS Zellen zumindest eine SULT-Isoform, die für die Estrogen-Sulfatierung wichtig ist, in ausreichender Menge exprimieren, sodass auch das Gleichgewicht zwischen den sulfatierten und nicht-sulfatierten Estrogenen auf der Seite der sulfatierten und daher unwirksamen Produkte sein könnte. Interessant war auch, dass in der vielfach resistenten A2780ADR Zelllinie im Vergleich zur A2780 Ausgangszelllinie mehr SULT2A1 exprimiert wurde, sonst aber ein identes Profil der exprimierten Gene nachzuweisen war.

Da 17 β -HSD-2 nur in den Osteosarkomzelllinien HOS und MG63 exprimiert wird, sollte in den übrigen Zelllinien die Umwandlung von E2 in das weniger wirksame E1 nicht erfolgen.

Dies wurde in den nachfolgenden Studien in den Ovarialkarzinomzelllinien und der MCF-7 Brustkrebszelllinie untersucht.

Wenn man davon ausgeht, dass ein verstärktes Wachstum dieser Zellen unter Einfluss von Estronsulfat nur möglich ist wenn dieses in die potente Form Estradiol umgewandelt wird, so könnte in den SKOV3 und MCF7, wenn die Desulfonierung durch STS stärker als die Inaktivierung durch SULTs ist, E1S wirksam sein.

Tabelle 5: Übersicht über die Expressionsergebnisse in den Ovarialkarzinomzelllinien

	A2780 (Spalte 1)	A2780ADR (Spalte 2)	OVCAR (Spalte 6)	SKOV3 (Spalte 8)
ERα (568bp) (429bp) (384bp)				+
				+
				+
ERβ (226bp)		++	+	
<i>SULT 1A1</i> <i>(987bp)</i>	++	++	++	++
<i>SULT 2A1</i> <i>(350bp)</i>	+	+		
<i>SULT 1E1</i> <i>(885bp)</i>			++	+
17β-HSD-1 (134bp)	++	++	+	+
17β-HSD-2 (448bp)				
STS (789bp)	++	++	++	++

Tabelle 6: Übersicht über die Expressionsergebnisse in den Osteosarkomzelllinien und der Mammarkarzinomzelllinie MCF7

	MCF7 (Spalte 4)	HOS (Spalte 3)	MG63 (Spalte 5)	SAOS (Spalte 7)
ERα (568bp) (429bp) (384bp)	++ + +			+ (+) (+)
ERβ (226bp)	(+)			+
<i>SULT 1A1</i> (987bp)	++	++	++	
<i>SULT 2A1</i> (350bp)				
<i>SULT 1E1</i> (885bp)				
17β-HSD-1 (134bp)	+	+		+
17β-HSD-2 (448bp)		+	+	
STS (789bp)	++	++	++	++

+: positive mRNA-Expression

++: auffallend starke Expression

(+) : schwach ausgeprägte Expression

4.2 Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in Ovarialkarzinomzelllinien

Bei den 3 untersuchten Ovarialkarzinomzelllinien kommt es bei der SKOV3-Zelllinie (Abb. 15) bei Experiment 1 zu einer Stimulation des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle. Weiters kommt es, gleichfalls bei der Zelllinie SKOV3, bei Experiment 2 zu einer Hemmung des Wachstums. Die Untersuchungen der A2780 ADR (Abb. 13) sowie der OVCAR Zelllinie (Abb. 14) bezüglich eines Einflusses von Estronsulfat auf das Wachstum der Zellen, lieferten keine signifikanten Ergebnisse.

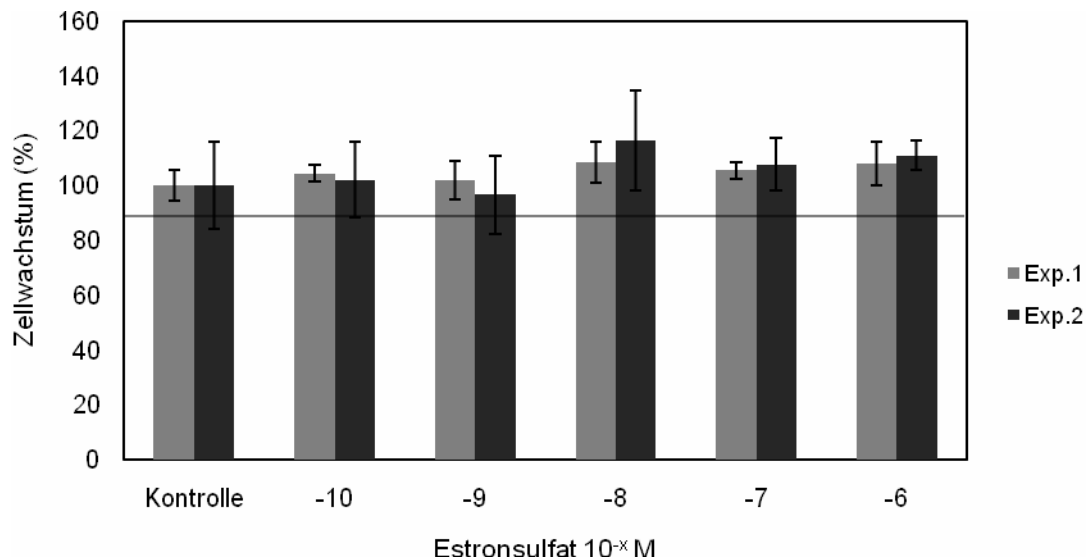


Abbildung 13: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der A2780ADR Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁶ molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

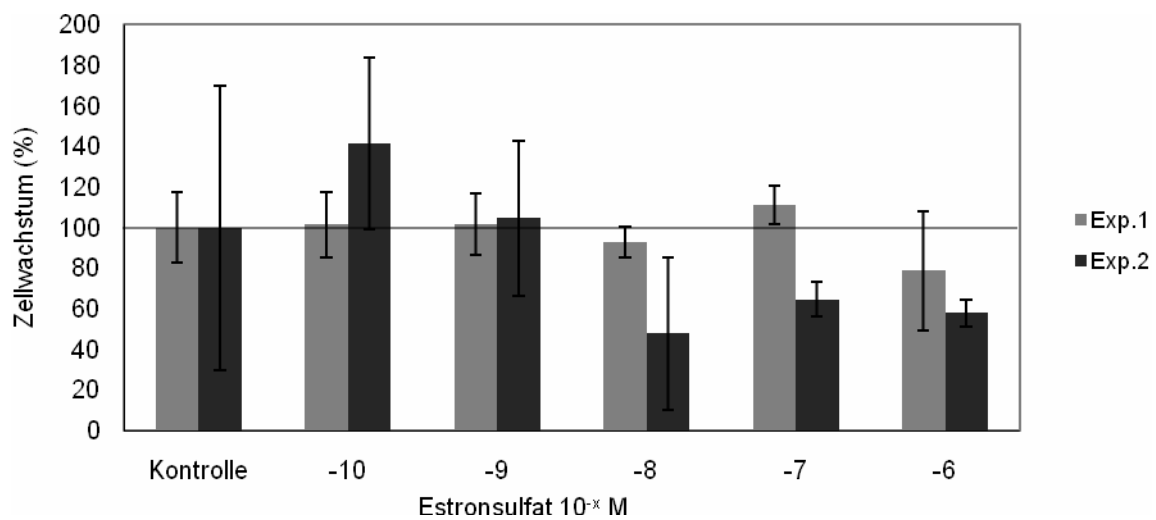


Abbildung 14: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der OVCAR Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

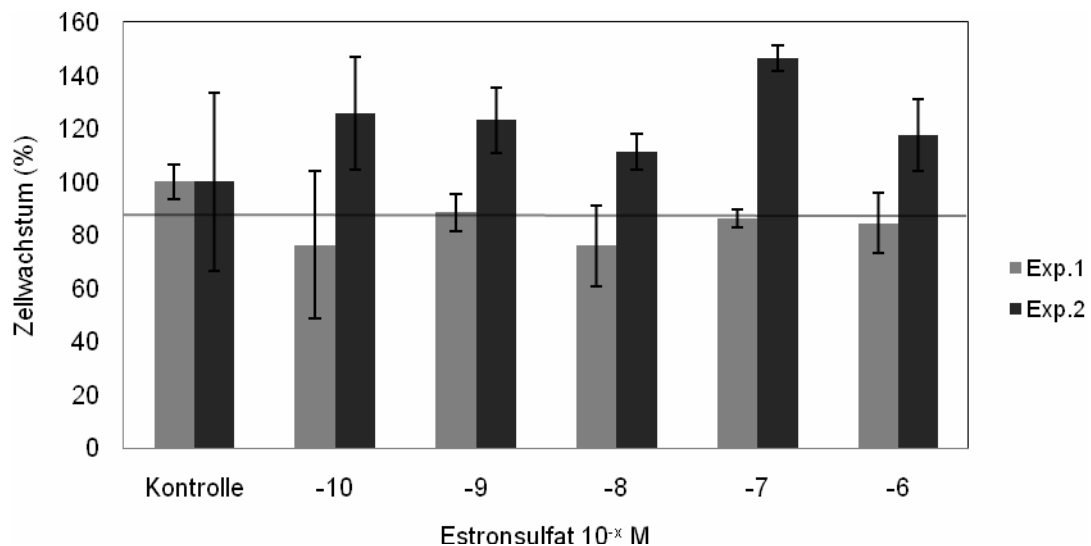


Abbildung 15: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der SKOV3 Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

4.3 Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in der MCF7 Brustkrebszelllinie

Wie aus Abbildung 16 hervorgeht kam es bei der Behandlung der MCF7 Brustkrebszelllinie mit Estronsulfat bei keinem der durchgeführten Experimente zu einer Wachstumssteigerung. Unter der Behandlung mit Estronsulfat in 10^{-8} molarer Konzentration und niedrigeren Konzentrationen (10^{-7} und 10^{-6}) kommt es allerdings in beiden Experimenten zu einer Wachstumshemmung.

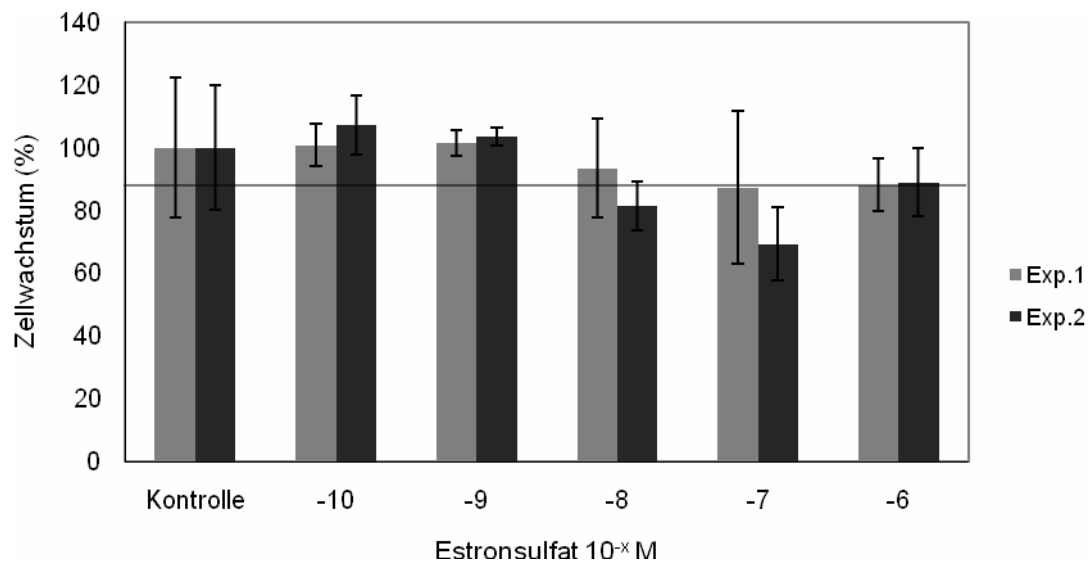


Abbildung 16: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der MCF7 Zellen Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

4.4 Wirkung von Estronsulfat auf das Zellwachstum in Osteosarkomzelllinie

In der Osteosarkomzelllinie MG63 kommt es, wie in Abb. 18 ersichtlich beim 1. Experiment zu einer kontinuierlichen Wachstumssteigerung. Bei der SAOS Zelllinie (Abb. 19) wird das Wachstum, vergleicht man es mit der Kontrolle, in beiden Experimenten gehemmt.

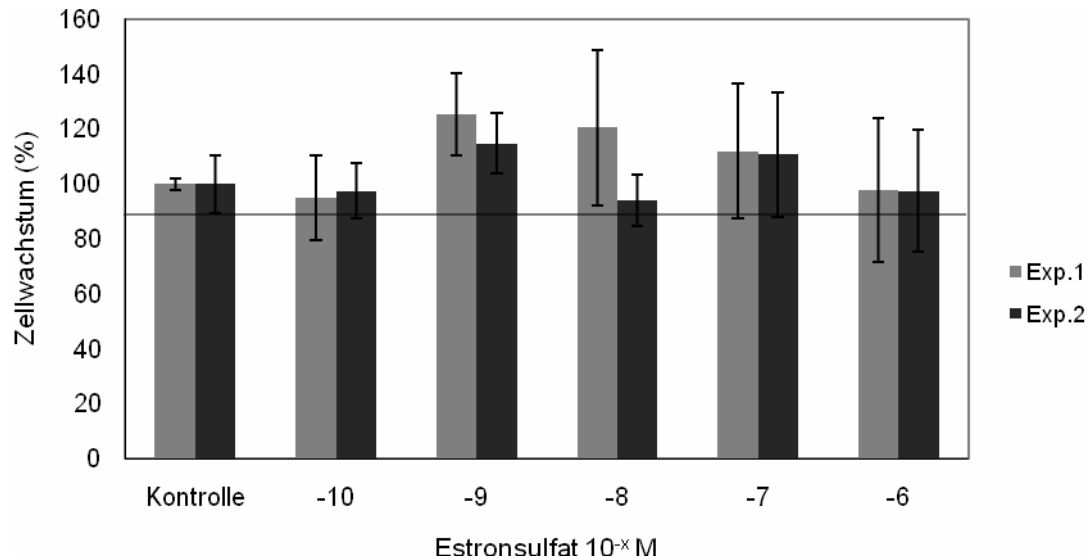


Abbildung 17: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der HOS Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10⁻¹⁰ bis 10⁻⁶ molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

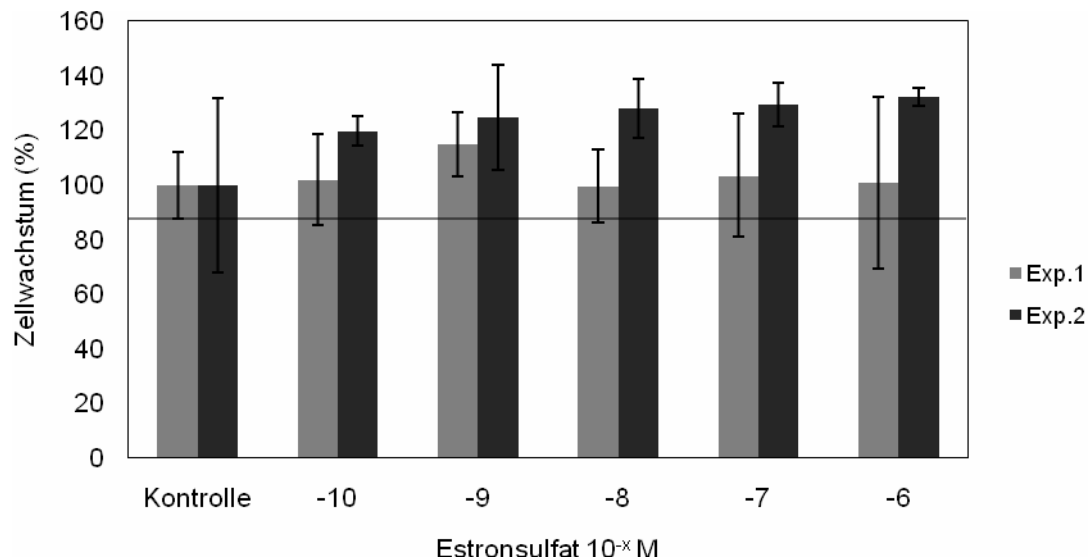


Abbildung 18: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der MG63 Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

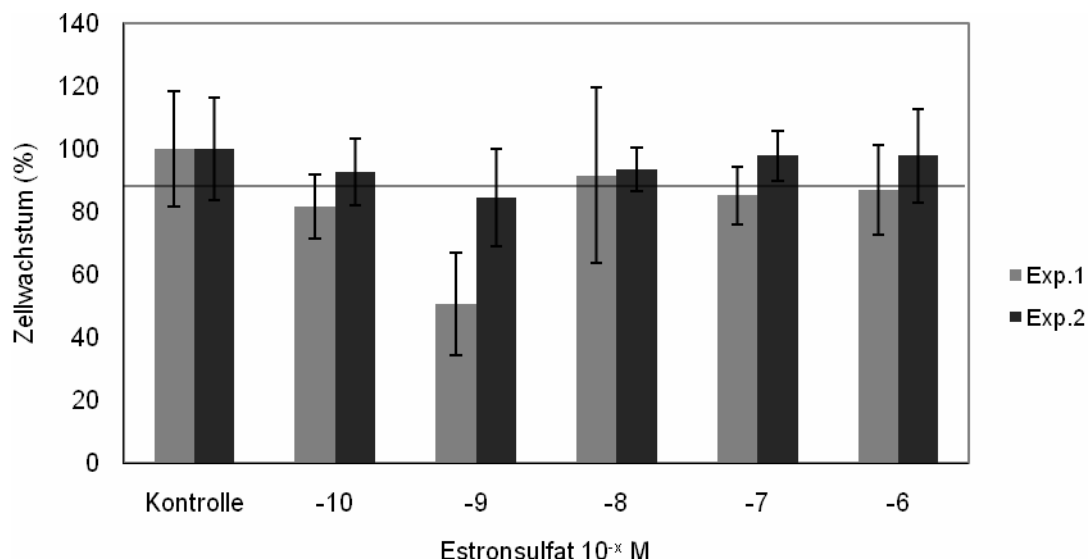


Abbildung 19: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der SAOS Zellen. Estronsulfat wurde in den Konzentrationen 10^{-10} bis 10^{-6} molar gelöst in DMSO verwendet. Estronsulfat oder das Lösungsmittel DMSO (Kontrolle = 100%) wurde dem Zellkulturmedium beigegeben und nach 6-tägiger Behandlung wurde das Zellwachstum bestimmt. Die Werte sind in % zur Zellzahl unter Kontrollbedingungen ausgedrückt. Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt, wobei innerhalb einer Bestimmung jeweils 4 Werte bestimmt wurden. In der Grafik sind die Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung dargestellt.

In der Ovarialkarzinomzelllinie SKOV3 und der Osteosarkomzelllinie MG63 kommt es jeweils in einem Experiment zu einer Stimulation des Wachstums im Vergleich zur Kontrolle. Zu einem hemmenden Einfluss auf das Wachstum kommt es in einem Experiment bei der Zelllinie SKOV3. Bei den SAOS Zellen erfolgt die Hemmung in beiden Experimenten. Allerdings waren, wie aus den Abbildung 13 bis 19 ersichtlich, die Ergebnisse in Bezug auf ein vermehrtes oder vermindertes Wachstum unter Einfluss von Estronsulfat in 10^{-10} bis 10^{-6} molaren Konzentrationen nicht reproduzierbar. Da alle Zelllinien aktivierende STS und inaktivierende SULTs exprimieren, sollte das Gleichgewicht zwischen den aktiven E1 und E2 und den inaktivierten, sulfatierten E1S und E2S für die Wirkung eine kritische Komponente darstellen. Außerdem ist zu berücksichtigen, dass Kulturbedingungen, wie Vorbehandlung der Zellen mit serum- und damit estrogenfreiem Medium für das Wachstumsverhalten der Zellen von großer Bedeutung sind. Dies wird in nachfolgenden Studien untersucht werden. Daher stellen die Ergebnisse dieser Diplomarbeit eine wichtige Grundlage für die Untersuchung der Bedeutung der konjugierten Estrogene für Ovarial- und Osteosarkomzellen dar.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Sowohl beim Ovarialkarzinom, einer der häufigsten Todesursachen bei gynäkologischen Krebserkrankungen, als auch beim Osteosarkom handelt es sich um Krebsarten, die aus Organen stammen, welche gegenüber dem Einfluss von Estrogen empfindlich sind.

Im Rahmen dieser Diplomarbeit sollte zunächst die mRNA Expression eines Estrogen-Estronsulfat regulierenden Systems untersucht werden.

In diesem System sind die Enzyme Sulfatase, die 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase 1 und 2 sowie Sulfotransferase und ihre Isoformen wesentlich. Zunächst wird die Sulfatgruppe von konjugierten Estrogenen durch das Enzym Sulfatase (STS) entfernt. Humane 17 β -HSD-1 katalysiert die Reduktion von Estron (E1) zu Estradiol (E2). 17 β -HSD-2 hingegen bewirkt die entgegengesetzte Reaktion, also die Umwandlung von E2 in E1. Sulfotransferasen katalysieren den Transfer der Sulfonatgruppe zur Sulfatierung von Estron bzw. Estradiol und inaktivieren damit die Verbindungen. Die Ovarialkarzinomzelllinien A2780ADR, A2780, OVCAR und SKOV3, die Mammakarzinomzelllinie MCF7, sowie die Osteosarkomzelllinien HOS, MG63 und SAOS wurden im Rahmen dieser Diplomarbeit auf die Expression all dieser im Estrogenstoffwechsel wichtigen Proteine untersucht. Dabei zeigte sich, dass alle untersuchten Zelllinien zumindest eine der Isoformen des ER, sowie STS exprimieren. Die Expression von 17 β -HSD-1 ist allen Zelllinien mit Ausnahme der MG63 Zelllinie möglich. 17 β -HSD-2 wird hingegen nur von HOS und MG63 exprimiert.

Es konnte auch gezeigt werden, dass alle Zelllinien mit Ausnahme der SAOS Zellen zumindest eine SULT-Isoform, die für die Estrogen-Sulfatierung wichtig ist, in ausreichender Menge exprimieren.

Um weitere Informationen über das Estrogen-Homeostasesystem in den untersuchten Zelllinien zu bekommen, sollte die Wirkung von Estronsulfat auf das Wachstum dieser Zelllinien untersucht werden. Es wurden die Ovarialkarzinomzelllinien A2780ADR, OVCAR und SKOV3, die Brustkrebszelllinie MCF7, sowie die Osteosarkomzelllinien HOS, MG63 und SAOS mit E1S behandelt und das Zellwachstum wurde untersucht. Nach 6-tägiger Behandlung mit Estronsulfat führte dies jedoch zu keiner reproduzierbaren, signifikanten Wachstumssteigerung. Eine Erklärung für diese Ergebnisse wäre, dass die Verfügbarkeit von biologisch aktiven E2, das aus E1S durch den Sulfataseweg gebildet wurde, durch STS wieder inaktiviert worden war.

Zusammenfassend könnten die im Rahmen dieser Diplomarbeit durchgeführten Versuchsreihen eine Grundlage für weiterführende Studien darstellen, bei denen experimentelle Bedingungen im Sulfataseweg variiert werden.

6. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis:

Abbildung 1: Struktur von 17 β -Estradiol (E2), Estron (E1) und Estronsulfat (E1S).....	9
Abbildung 2: Struktur der nukleären Steroidhormonrezeptoren und ihre Bildung an die DNA	14
Abbildung 3: Übersicht über Estrogen Bildung und Umwandlung der von E1 in E2 und vice versa in humanen Brustkrebszellen	16
Abbildung 4: Nachweis der β -Actin mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF-7	41
Abbildung 5: Nachweis der ER α Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7	42
Abbildung 6: Nachweis der ER β mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7	43
Abbildung 7: Nachweis der SULT 1A1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7.....	44
Abbildung 8: Nachweis der SULT 2A1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7.....	45
Abbildung 9: Nachweis der SULT 1E1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7.....	46
Abbildung 10: Nachweis der 17 β -HSD-1 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7.....	47
Abbildung 11: Nachweis der 17 β -HSD-2 mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7.....	48
Abbildung 12: Nachweis der STS mRNA Expression in Ovarial- und Osteosarkomzelllinien sowie der Brustkrebszelllinie MCF7	49
Abbildung 13: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der A2780ADR Zellen	53
Abbildung 14: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der OVCAR Zellen.....	54
Abbildung 15: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der SKOV3 Zellen.....	54
Abbildung 16: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der MCF7 Zellen	55
Abbildung 17: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der HOS Zellen.....	56
Abbildung 18: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der MG63 Zellen	57
Abbildung 19: Einfluss von Estronsulfat auf das Wachstum der SAOS Zellen.....	57

Tabelle 1: Programmdateien für den PCR Cycler.....	27
Tabelle 2: Programmdateien für den Thermocycler.....	31
Tabelle 3: Primärsequenzen	33
Tabelle 4: PCR Programme der durchgeführten Proben.....	34
Tabelle 5: Übersicht über die Expressionsergebnisse in den Ovarialkarzinomzelllinien.....	50
Tabelle 6: Übersicht über die Expressionsergebnisse in den Osteosarkomzelllinien und der Mammakarzinomzelllinie MCF7	52

7. Literaturverzeichnis:

American Cancer Society: What is Osteosarcoma? 2007:

http://www.cancer.org/docroot/cric/content/cric_2_4_1x_what_is_osteosarcoma_cancer_52.ap

letzter Zugriff, am 24.Mai 2008

American Cancer Society: Cancer: Facts & Figures 2008:

<http://www.cancer.org/downloads/STT/2008CAFFfinalsecured.pdf> letzter Zugriff, am 24.Mai 2008

American Tissue Culture Collection:

<http://www.lgcpromochem-atcc.com> letzter Zugriff, am 26.April 2008

Suchmaschine:<http://www.lgcpromochem-atcc.com/common/catalog/cellBiology/cellBiologyIndex.cfm>

Berger T: Therapeutic aspects of Estrogens and Phytoestrogens in colorectal cancer: Relevance of the Vitamin D System. (Dissertation), Universität Wien, 1999

Bulun SE, Simpson ER: Aromatase expression in women's cancers; Adv. Exp. Med. Biol. 2008; 630:112-32

Casey ML, MacDonald PC, Andersson S: 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium; Journal of Clinical Investigation 1994; 94: 2135-41

Castagnetta LA, Montesanti AM, Granata OM, Oliveri G, Sorci CM, Amodio R, Liquori M, Carruba G: 17 beta-Hydroxysteroid dehydrogenase activity in endometrial cancer cells: different metabolic pathways of estradiol in hormone-responsive and non-responsive intact cells; J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 1995; 55: 573-9

Desmond S.T.: Genetische Methoden. 2. Auflage, Spektrum, Akademischer Verlag, Berlin, 2002; 119-127

European Collection of Cell Cultures:

<http://www.ecacc.org.uk> letzter Zugriff, am 26. April 2008

Suchmaschine: siehe „General Cell Collection“ auf <http://www.ecacc.org.uk>

Gallagher SR, Desjardins PR: Quantitation of DNA and RNA with absorption and fluorescence spectroscopy; Curr Protoc Mol Biol. 2006; Appendix 3:Appendix 3D

Hess-Wilson JK, Boldison J, Weaver KE, Knudsen KE: Xenoestrogen action in breast cancer: impact on ER-dependent transcription and mitogenesis; Breast Cancer Res. Treat. 2006; 96: 279-92

High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit für 200 und 1000 Reaktionen, Applied Biosystems, Arbeitsanleitung 2006

Iwamori M: Estrogen sulfatase; Methods Enzymol. 2005; 400: 293-302

Jansson A, Gunnarsson C, Stål O: Proliferative responses to altered 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase (17HSD) type 2 expression in human breast cancer cells are dependent on endogenous expression of 17HSD type 1 and the oestradiol receptors; Endocr. Relat. Cancer 2006; 13: 875-84

Jensen EV, Jordan VC: The estrogen receptor: a model for molecular medicine; Clin. Cancer Res. 2003; 9: 1980-9

Jensen EV: The contribution of "alternative approaches" to understanding steroid hormone action; Mol. Endocrinol. 2005;19:1439-42

Kaminitschek N: Die Erfassung des östrogenen Status von Frauen durch Bestimmung ihres Östron-Östronsulfatpuffers. (Dissertation), Universität Wien, 1998

Korach KS, Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Kimbro KS, Eddy EM, Migliaccio S, Snedeker SM, Lubahn DB, Schomberg DW, Smith EP: Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes; Recent Prog. Horm. Res. 1996; 51:159-86

Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary; Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 1996; 93:5925-30

McCarty KS Jr, McCarty KS Sr: Steroid modulation of the expression of growth factors and oncogenes in breast cancer; Cancer Treat. Res. 1991; 53: 197-220

Miettinen MM, Mustonen MV, Poutanen MH, Isomaa VV, Vihko RK: Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression; Biochem. J. 1996; 314: 839-45

Mutschler E, Geisslinger G, Kroemer HK, Schäfer-Korting M: Mutschler Arzneimittelwirkungen – Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. 8. Auflage, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart, 2001; 62-65; 433-438

National Cancer Institute: Bone Cancer

<http://www.cancer.gov/cancertopics/types/bone> letzter Zugriff, am 24. Mai 2008

National Cancer Institute: Ovarian Epithelial Cancer (PDQ®): Treatment Health Professional Version.

<http://www.cancer.gov/cancertopics/pdq/treatment/ovarianepithelial/HealthProfessional/page2> letzter Zugriff, am 30. April 2008

Newton C.R. und Graham A.: PCR Spektrum, Akademischer Verlag GmbH, Berlin, 1994; 19-25

Neuchrist C, Erovic BM, Handisurya A, Steiner GE, Rockwell P, Gedlicka C, Burian M: Vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) expression in squamous cell carcinomas of the head and neck; Laryngoscope. 2001; 111: 1834-41

Parl FF: Estrogens, Estrogen Receptor and Breast Cancer. IOS Press, Amsterdam, 2000; 21-58

Pasqualini JR, Chetrite GS: Recent insight on the control of enzymes involved in estrogen formation and transformation in human breast cancer; J. Steroid. Biochem. Mol. Biol. 2005; 93: 221-36

PeqGOLD TriFast™, peqLab Biotechnologie GmbH, Arbeitsanleitung, 2007

Piver MS: Prophylactic Oophorectomy: Reducing the U.S. Death Rate from Epithelial Ovaria Cancer. A Continuing Debate; Oncologist. 1996; 1: 326-330

Raftogianis R, Creveling C, Weinshilboum R, Weisz J: Estrogen metabolism by conjugation; J. Natl. Cancer Inst. Monogr. 2000; 27: 113-24

Rhim JS, Cho HY, Vernon ML, Arnstein P, Huebner RJ, Gilden RV: Characterization of non-producer human cells induced by Kirsten sarcoma virus; Int. J. Cancer. 1975; 16: 840-9

Rhim JS, Ro HS, Kim EB, Gilden RV, Huebner RJ: Transformation of horse skin cells by type-C sarcoma viruses; Int. J. Cancer. 1975; 15: 171-9

Shatalova EG, Walther SE, Favorova OO, Rebbeck TR, Blanchard RL: Genetic polymorphisms in human SULT1A1 and UGT1A1 genes associate with breast tumor characteristics: a case-series study; Breast Cancer Res. 2005; 7: R909-21

Tamura HO, Taniguchi K, Hayashi E, Hiyoshi Y, Nagai F: Expression profiling of sulfotransferases in human cell lines derived from extra-hepatic tissues; Biol. Pharm. Bull. 2001; 24: 1258-62

VENOR®GeM Mycoplasmen-Detektionskit, MINERVA BIOLABS, Arbeitsanleitung 2007

Verschraegen CF, Kapil D, Jones LA.: Biology of Gynecologic Cancers. in: Kavanagh JJ, Singletary SE, Einhorn N, Deptrillo AD: Cancer in Women. Blackwell Science Inc., Malden, Massachusetts, 1998; 10-21

- Vihko P, Härkönen P, Oduwale O, Törn S, Kurkela R, Porvari K, Pulkka A, Isomaa V: 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases and cancers; J. Steroid Biochem. Mol. Biol. 2002; 83: 119-22
- Vihko P, Härkönen P, Soronen P, Törn S, Herrala A, Kurkela R, Pulkka A, Oduwale O, Isomaa V: 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases-their role in pathophysiology; Mol Cell Endocrinol. 2004; 215: 83-8
- Weinshilboum R: Pharmacogenomics of endocrine therapy in breast cancer; Adv. Exp. Med. Biol. 2008; 630:220-31
- World Health Organisation (WHO), 2006
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/index.html> letzter Zugriff, am 28.April 2008
- Zhao C, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA: Estrogen receptor beta: an overview and update; Nucl. Recept. Signal. 2008;6:e003

8. LEBENS LAUF

PERSÖNLICHE DATEN:

Name: Susanne Maria Elisabeth Linkesch

Geburtsdatum: 3.Dezember 1982

Geburtsort: Linz

Staatsangehörigkeit: Österreich

Eltern:

Vater: Dr. iur. Hans Linkesch

Mutter: Mag. Pharm. Brigitte Linkesch

SCHULISCHE AUSBILDUNG:

1989-1993: Volksschule der Schulschwestern;

Brucknerstraße 8, 4020 Linz

1993-2001: Wirtschaftskundliches Realgymnasium;

Körnerstraße 9, 4020 Linz

ab WS 2001: Studium der Pharmazie an der Universität Wien