

**Analyse der (anti-)östrogenen Wirkmechanismen von
Raloxifen und Tamoxifen in Endometrium- und
Mammakarzinomen**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michael Gläser

aus

Düsseldorf

Düsseldorf

2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Referent(in): Prof. Dr. M.W. Beckmann
Korreferent(in): Prof. Dr. E. Knust
Tag der mündlichen Prüfung: 13.06.2001

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Einleitung	1-16
2. Material und Methoden	17-40
2.1. Chemikalien und Lösungen.....	17
2.1.1. Chemikalien	
2.1.2. Häufig genannte Lösungen	
2.1.3. Plasmide	
2.2. Biologisches Material.....	18
2.2.1. Tumormaterial, Normalgewebe und Patientinnendaten	
2.2.2. Zelllinien	
2.2.3. <i>Escherichia coli</i> - Stämme	
2.3. Zellkultur.....	20
2.3.1. Kulturmedien und Zusätze	
2.3.2. Aktivkohlebehandlung von fetalem Kälberserum	
2.3.3. Kultivierung der Zelllinien	
2.3.4. Passagierung von Zelllinien	
2.3.5. Kryokonservierung	
2.3.6. Inkubation mit (Anti-)Hormonen	
2.3.6.1. Herstellung der (Anti-)Hormonlösungen	
2.3.6.2. Spezielle Kultivierungen und (Anti-)Hormonbehandlung	
2.3.6.3. Zellkinetiken	
2.4. RNA/DNA-Isolierung.....	24
2.4.1. DNA-Isolierung aus Gewebe	
2.4.2. DNA-Isolierung aus Blut	
2.4.3. DNA-Isolierung aus Zelllinien	
2.4.4. RNA-Isolierung aus Gewebe	
2.4.5. RNA-Isolierung aus Zelllinien	
2.5. cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA.....	25
2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	26
2.6.1. β -Actin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Qualität	
2.6.2. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)	
2.6.3. Quantitative differentielle PCR (pdPCR)	
2.7. Sequenzierung.....	29
2.8. Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten.....	30
2.8.1. Agarosegelelektrophorese	
2.8.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese	
2.9. Reporter-gen-Assays.....	32
2.9.1. Klonierung von DNA-Fragmenten	
2.9.1.1. Restriktionsverdau	
2.9.1.2. Ligation	
2.9.2. Plasmidpräparation	
2.9.3. Transfektionen und Hormonbehandlungen	
2.9.4. Ernte der transfizierten Zellen	
2.9.5. Messung der Chemilumineszenz	
2.10. Immunhistologie.....	35
2.10.1. Vorbereitung der Gewebe und Zellen	
2.10.2. HE-Färbung	
2.10.3. Immunhistochemische Färbung	

2.11.	Mikroskopie.....	39
2.11.1.	Lichtmikroskopie	
2.11.2.	Elektronen- und Rasterelektronenmikroskopie	
2.12.	Statistik.....	40
3.	Ergebnisse.....	41-112
3.1.	(Anti-)Östrogene Effekte auf die mRNA-Expression von SRs und SRCs in Karzinomzelllinien.....	41
3.1.1.	Etablierung der quantitativen RT-PCR	
3.1.2.	Expressionskinetiken in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa	
3.1.3.	Expressionskinetiken in der Mammakarzinomzelllinie MCF7	
3.1.4.	Vergleich der (anti-)östrogenen Effekte	
3.1.5.	Rolle der Steroidrezeptor-Koaktivatoren bei der Inhibition der ER α -abhängigen Transaktivierung durch BRCA1	
3.2.	Expressionen der Komponenten der ER-Transaktivierungsmaschinerie in Endometriumgewebe und -karzinomen.....	70
3.2.1.	Zyklusabhängige Protein-Expression	
3.2.1.1.	Etablierung der Bestimmung der Phase des menstruellen Zyklus	
3.2.1.2.	SR- und SRC-Proteinlevels im menstruellen Zyklus	
3.2.2.	mRNA-Expression von SRs und SRCs in Endometriumkarzinomen	
3.2.3.	Korrelation der mRNA-Expressionslevels in Karzinomen mit klinischen Parametern	
3.2.4.	Einfluß einer AIB1-Genamplifikation auf die AIB1-mRNA-Expression in Mamma- und Endometriumkarzinomen	
3.2.4.1.	Etablierung der quantitativen differentiellen PCR	
3.2.4.2.	AIB1-Genamplifikation in Mamma- und Endometriumkarzinomen	
3.2.4.3.	AIB1-Genamplifikation in Karzinomzelllinien	
3.2.4.4.	AIB1-mRNA-Expression in Mammakarzinomen	
3.2.4.5.	AIB1-mRNA-Expression in Karzinomzelllinien	
3.3.	Zelluläre Effekte von Raloxifen.....	95
3.3.1.	Effekte von Raloxifen auf den zellulären Level von Markerproteinen	
3.3.1.1.	ER-Transaktivierungsmechanismus	
3.3.1.2.	Apoptose	
3.3.1.3.	Zellproliferation	
3.3.1.4.	Differenzierungsgrad	
3.3.2.	Zellmorphologische Veränderungen	
3.3.2.1.	Elektronenmikroskopie	
3.3.2.2.	Rasterelektronenmikroskopie	
3.3.3.	Zusammenfassung der zellulären Effekte von Raloxifen	
4.	Diskussion.....	113-136
5.	Literaturverzeichnis.....	137-164
6.	Abkürzungen und medizinische Fachbegriffe.....	165-166
7.	Anhang.....	167

1. Einleitung

Östrogen ist ein Sammelbegriff für Stoffe, die sich chemisch voneinander unterscheiden, jedoch biologisch die gleiche Wirkung ausüben und speziell die Brunft, d.h. den Oestrus, auslösen (Strauss, 1986). Die auffälligsten Aufgaben von Östrogen bestehen darin, den weiblichen Körper auf Fortpflanzung zu programmieren, insbesondere dafür zu sorgen, daß sich Brust (Topper, 1980) und Gebärmutter ausbilden und bestimmte Gehirnstrukturen entsprechend angelegt werden. Östrogen beeinflusst aber auch andere Organe: Es wirkt auf Gehirnzentren, die die Körpertemperatur regulieren. Es schützt das Herz, indem es arteriosklerotischen Ablagerungen an den Wänden der Herzkranzgefäße entgegenwirkt. Die Leber bildet unter dem Einfluß von Östrogen weniger des Arteriosklerose fördernden „leichten“ (LDL oder *low density lipoprotein*) Cholesterins und mehr der schützenden „schweren“ (HDL oder *high density lipoprotein*) Variante. Außerdem erhält Östrogen die Knochensubstanz, weil es ein Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau herstellt. Zusätzlich reguliert es die zyklischen Veränderungen der Vaginalschleimhaut.

Was es bedeutet, wenn Östrogen fehlt, erfahren Frauen besonders deutlich in und nach den Wechseljahren, wenn die Eierstöcke (= Ovarien) ihre Hormonproduktion einstellen. Viele postmenopausale (Menopause = letzte Regelblutung) Frauen leiden unter Hitzewallungen und nächtlichen Schweißausbrüchen. Zugleich steigt der LDL-Cholesterinspiegel im Blut, wodurch sich das Risiko für Arteriosklerose und Herzinfarkt erhöht. Auch die Knochensubstanz baut sich schneller ab, wodurch die Knochendichte abnimmt und Osteoporose entstehen kann (Hammond, 1995). Diese Symptome werden heutzutage verstärkt durch Gabe von Sexualhormonen in einer Hormonersatztherapie unterdrückt. Eine Östrogenmonotherapie ist mit einem erhöhten Risiko für ein Endometriumkarzinom (Beresford, 1997), daß durch zusätzliche Gabe eines Gestagens deutlich reduziert werden kann. Zusätzlich besteht ein erhöhtes Brustkrebsrisiko (Beckmann, 2000a und b), verbunden.

Im Uterus regeln Sexualsteroidhormone, besonders Östrogen und Progesteron, den Ablauf des menstruellen Zyklus (Cornillie, 1985). Der Uterus ist ein dickwandiges, birnenförmiges Hohlorgan. Die Uteruswand besteht aus einer dicken Muskelschicht (Myometrium), die innen von einer Schleimhaut (Endometrium) und außen von einer Serosa (Perimetrium) überzogen ist. Hiervon wird lediglich ein Teil des Endometriums (= Gebärmutter Schleimhaut) von den Konzentrationsschwankungen der Sexualhormone beeinflusst. Während die Basalis (= Zona basalis), die direkt an das Myometrium anschließt, nicht die zyklischen Veränderungen

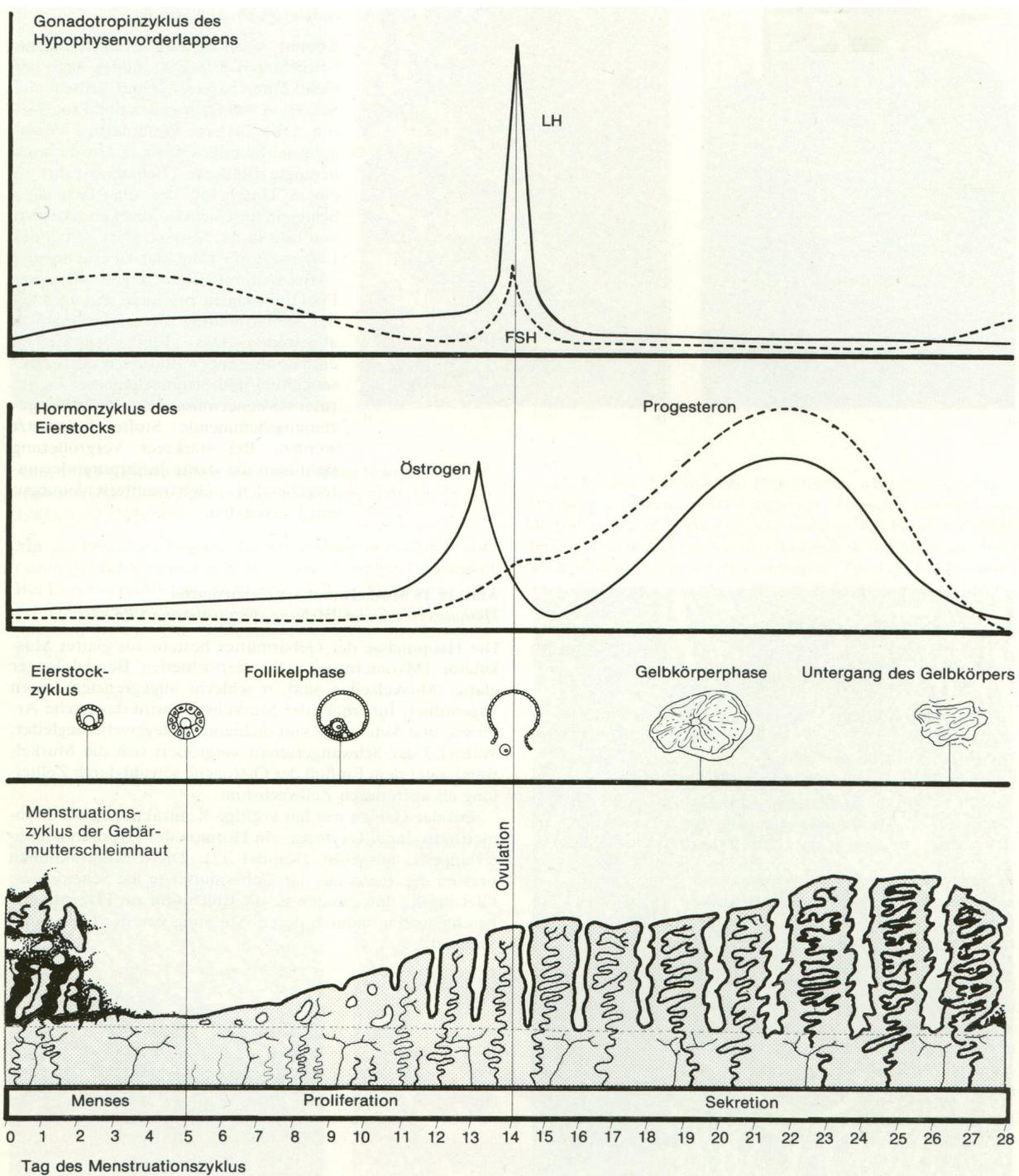


Abb.1.1.: Schema des menstruellen Zyklus im Vergleich mit den Eierstockveränderungen und den zyklischen Schwankungen von Östrogen, Progesteron, LH und FSH (nach Wheeler, 1987).

durchläuft, ist die Funktionalis (= Zona funktionalis) der Teil, der im Verlauf des Zyklus aufgebaut und schließlich, wenn keine Befruchtung eintritt, wieder abgestoßen wird. Während der fortpflanzungsfähigen Lebensjahre wechselt das Erscheinungsbild der oberflächlichen Funktionalis des Endometriums von Tag zu Tag aufgrund des regelmäßigen Menstruationszyklus. Die zyklischen Veränderungen am Endometrium werden vom Wechsel der ovariellen Hormonproduktion beherrscht, die ihrerseits den zyklischen Veränderungen der FSH (follikelstimulierendes Hormon)- und LH(luteinisierendes Hormon)-Produktion in der

Hypophyse unterworfen sind. Die Sekretion dieser gonadotropen Hormone wird wiederum durch die Freisetzung der *Gonadotropin-releasing-hormone* (GnRH) im Hypothalamus gesteuert.

Der Menstruationszyklus dauert durchschnittlich 28 Tage und beginnt mit der Menstruation, bei der die im vorhergehenden Zyklus aufgebaute Funktionalis abgestoßen wird. Die Menstruationsblutungen dauern im Durchschnitt vier Tage (= Desquamationsphase). Nach der Menstruation beginnt die Proliferationsphase, in der die Funktionalis aus der Basalis neu gebildet wird. Die Proliferationsphase wird auch Follikel- oder Östrogenphase bezeichnet, da die Proliferation der Funktionaliszellen durch die im heranreifenden Follikel gebildeten Östrogene stimuliert wird. Durch die im reifen Follikel (= Tertiärfollikel) vermehrte Östrogensynthese kommt es durch positive Rückkopplung zu einem gipfelartigen Anstieg der FSH- und LH-Freisetzung. Der LH-Gipfel löst den Eisprung (= Ovulation) aus. Beim 28-tägigen Zyklus geschieht dies am 14. Tag. Der durch die Ovulation entstehende Gelbkörper (= Corpus luteum) wirkt fortan als Progesteronquelle, welche sich bei nicht erfolgter Befruchtung erschöpft. Der Anstieg der Progesteronkonzentration bewirkt in der Funktionalis den Übergang in die Sekretionsphase (= Gelbkörper-, Luteal- oder Progesteronphase). Hierbei inhibiert Progesteron die östrogenabhängige Proliferation und induziert die sekretorische Funktion des Gewebes. Der Beginn der Sekretionsphase ist durch das Auftreten basaler Sekretvakuolen in den Drüsenzellen charakterisiert. Das glykogenhaltige Sekret wird in der folgenden Zeit durch apokrine Sekretion ins Drüsenlumen sezerniert. Die Sekretionsaktivität geht nach dem 22. Tag langsam zurück. Durch die Rückbildung des Gelbkörpers (ca. am 25. Tag) kommt es in der späten Sekretionsphase zu einem Abfall der Progesteron- und Östrogenbildung. In der Praemenstruationsphase kontrahieren die Schleimhautgefäße (Spiralarterien), wobei der entstehende Blutstau zu einem Sauerstoffmangel (Ischämie) führt (Markee, 1940). Durch die Ischämie kommt es zu einer Beschädigung der Gefäßwände, sowie zu einer Nekrose der Funktionaliszellen (Speroff, 1971). Löst sich schließlich die krampfartige Kontraktion der Spiralarterien, kommt es unter dem Druck reichlich einströmenden Blutes zur Ruptur des Funktionalisgewebes (Nogales-Ortis, 1978). Neben der physiologischen Auslösung des Absterbens der Funktionalis tritt zudem ein auf molekularer Ebene programmiertes Absterben durch apoptotische Prozesse auf. Dieses wurde morphologisch durch das Auftreten von *apoptotic bodies* (Hopwood, 1975) und molekularbiologisch durch das Auftreten bestimmter Apoptose-spezifischer Marker vor allem in den Drüsenepithelzellen nachgewiesen (Kokawa, 1996; Konno, 2000). Neben dem Endometrium ist Apoptose auch in anderen Geweben ein wichtiger Regulationsmechanismus der

Zelldynamik (Williams, 1991; Singh, 1994). Aufgrund der morphologischen Veränderungen des Endometriums läßt sich bei Endometriumbiopsien die Zyklusphase genau bestimmen. Die physiologischen Vorgänge können somit den bestimmten zyklischen Phasen zugeordnet und Zusammenhänge mit dem jeweiligen hormonellen Milieu untersucht werden.

Für die Regulation des menstruellen Zyklus ist 17β -Östradiol das entscheidende Östrogen (Breckwoldt, 1994). Auf molekularer Ebene wird seine Wirkung, genauso wie beim Progesteron, über spezifische Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren α und β (*estrogen receptor* α = ER α , *estrogen receptor* β = ER β) vermittelt, die zur Superfamilie der Steroidrezeptoren gehören. Dieses ist eine Klasse von liganden-abhängigen Transkriptionsfaktoren (Parker, 1993; Beato, 1995), die Gene regulieren, die in einer großen Reihe von biologischen Prozessen, wie z.B. die Entwicklung, die Reproduktion und die Homöostase (Mangelsdorf, 1995), involviert sind. Die Familie der Steroidrezeptoren umfaßt die für Östrogen (ER), Progesteron (PR), Androgene (AR), Glucocorticoide (GR) und Mineralcorticoide (MR).

Die Effekte von Östrogenen und Antiöstrogenen werden hauptsächlich über spezifische nukleäre Rezeptoren, die Östrogenrezeptoren α (ER α) und β (ER β), vermittelt (Katzenellenbogen, 1997a). 1986 wurde der erste Östrogenrezeptor, später als ER α bezeichnet, kloniert (Green, 1986; Greene, 1986). 1996 wurde durch Mosselmann *et al.* ein zweiter humaner ER, der ER β , erstmals beschrieben (Kuiper *et al.* entdeckten den ER β 1996, beschrieben ihn aber nur bei der Ratte). Wie die anderen Mitglieder der Superfamilie der nukleären Rezeptoren besitzen beide eine gemeinsame Domänenstruktur (Gronemeyer, 1991).

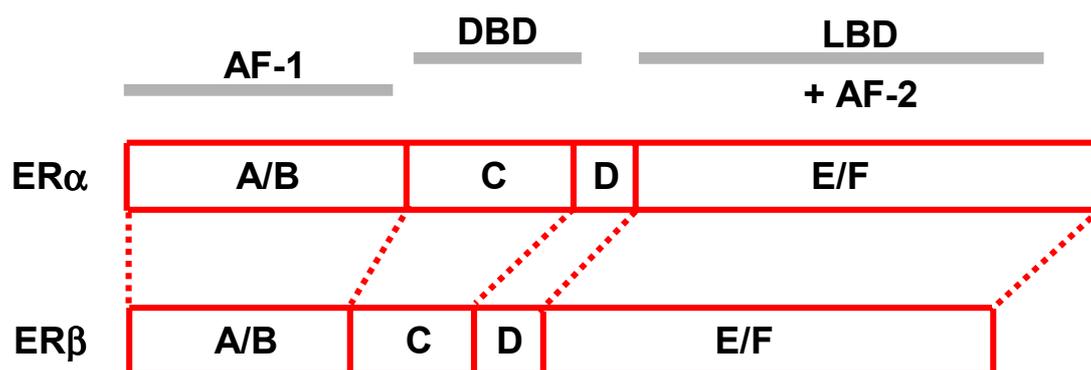


Abb.1.2.: Schema des modulären Aufbau der Östrogenrezeptoren α und β . Die Domänen A–F enthalten unterschiedliche Funktionalitäten : AF-1 = Aktivierungsfunktion-1, DBD = DNA-Bindungsdomäne, LBD = Ligandenbindungsdomäne, AF-2 = Aktivierungsfunktion-2 (nach Ogawa, 1998).

Der N-Terminus erhält die variable A/B-Domäne, die die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion-1 (AF-1) enthält. Die C-Domäne besteht aus der DNA-Bindungsdomäne (DBD) und wird gefolgt von der Scharnier-Domäne (D-Domäne). C-terminal liegen die Liganden-Bindungsdomäne (LBD), die die Aktivierungsfunktion-2 (AF-2) und die

Dimerisierungsregion beinhaltet, und die F-Domäne, deren Funktion noch nicht vollständig aufgeklärt ist (Kumar, 1987; Beato, 1991; Hyder, 1994). Die DNA-Bindungsdomäne von ER α und ER β ist zu 96% homolog, die Ligandenbindungsdomäne zu 58% (Abb.1.2.). Die anderen Domänen sind nicht konserviert (Mosselman, 1996). ER β und ER α binden Östradiol mit ähnlicher Affinität (Kuiper, 1997).

Die Transkriptionsaktivierung durch den ER α verläuft über die beiden Aktivierungsfunktionen, AF-1 und AF-2. Während AF-1 konstitutiv aktiv ist, ist AF-2 ligandenabhängig (Webster, 1988; Kumar, 1987) und kann durch Antiöstrogene blockiert werden (Katzellenbogen, 1997b als Überblick). AF1 und AF2 können unabhängig voneinander oder synergistisch die Transkription aktivieren (McInerney, 1996; Webb, 1998), wobei ihre Aktivität vom Promoter und Zelltypus abhängen (Tora, 1989; Metzger, 1995). Die Aktivität der AF-1 des ER β ist vernachlässigbar im Vergleich zu der des ER α (Cowley, 1999; Hall, 1999). Im Bereich der AF-1 enthält ER β eher eine Repressordomäne, deren Entfernung die Transaktivierung durch den Rezeptor deutlich erhöht (Hall, 1999). Die Expression von Genen, deren Transaktivierung die AF-2 und die AF-1 benötigt, wird durch den ER α wesentlich stärker erhöht, als durch den ER β . Gene, die durch eine AF-2-Aktivität reguliert werden, werden durch beide ERs gleichstark transaktiviert (Cowley, 1999). Die Expressionshöhen von ER α und ER β beeinflussen das Transaktivierungsmuster u.a. durch die davon abhängige Bildung von Homo- oder Heterodimeren (Cowley, 1997). Der ER β ist in vielen Geweben exprimiert, so z.B. im Zentralnervensystem, im Kardiovaskularsystem, im Gastrointestinaltrakt, den Nieren und den Lungen (Arts, 1997; Enmark, 1997; Kuiper, 1997; Lindner, 1998; Österlund, 1998) und wird häufig mit dem ER α coexprimiert (Kuiper, 1996; Mosselmann, 1996; Couse, 1997). Im Endometrium ist ER α der wesentlich stärker exprimierte der beiden Rezeptoren (Matsuzaki, 1999; Gustafsson, 1999; Weihua, 2000). Obwohl der ER β auch in den Drüsen des Brustgewebes exprimiert wird, scheint hier der ER α der bestimmende Rezeptor zu sein, was durch den Phänotyp von ER α -*Knock out*-Mäuse deutlich wurde (Krege, 1998; Couse, 1999). Die physiologischen Bedeutungen von ER α und ER β wurden bei der Untersuchung der entsprechenden *Knock-out*(KO)-Mäusen, denen das jeweilige Gen fehlt, deutlich. Die ER α -KO-Mäuse zeigten schwere Störungen bei der Reproduktion und im Sexualverhalten, so waren Männchen und Weibchen infertil und es entwickelte sich kein Brustgewebe (Couse, 1999). Die ER β -KO-Mäuse zeigten normale Fertilität und normales Sexualverhalten. Bei den Weibchen wurde eine verringerte Ausbildung des Brustgewebes und eine verminderte Aktivität der Ovarien festgestellt (Krege,

1998), bei den Männchen lag eine Tendenz zu Prostata- und Blasenhyperplasien vor (Ogawa, 1999).

Der klassische Weg der Transaktivierung durch die Östrogenrezeptoren verläuft wie folgt: die Rezeptoren liegen bei Abwesenheit von Liganden gebunden an *heat-shock*-Proteine, u.a. hsp90 (Beato, 1989; Tsai, 1994; Yamashita, 1999), und Korepressoren, wie SMRT und N-CoR, vor (Chen, 1998). Hierbei können sie die basale Transkription über die Rekrutierung der Korepressoren reprimieren (Horlein, 1995; Chen, 1997). SMRT und N-CoR wurden in Komplexen mit dem Korepressor mSin3 und Histondeacetylasen nachgewiesen, was darauf hindeutet, daß die Transkriptionsrepression durch nukleäre Rezeptoren Histondeacetylierung beinhaltet (Nagy, 1997; Heinzel, 1997; Alland, 1997). Bei Ligandenbindung lösen sich die Korepressoren und, aufgrund einer drastischen Konformationsänderung in der AF-2-Region der Rezeptoren können Koaktivatoren gebunden werden. Die Rezeptoren bilden ligandenabhängig Homo- oder Heterodimere (Hall, 1999), welche an spezifische DNA-Elemente in der Promoterregion östrogenregulierter Gene binden (Kumar, 1988; Pace, 1997). Diese DNA-Abschnitte werden als östrogen-responsive Elemente (ERE = *estrogen responsive elements*) bezeichnet (Kumar, 1988; Tsai, 1994), bestehen aus der Konsensussequenz 5'-GGTCAXXTGACC-3' und wurde u.a. bei den Genen c-fos, c-jun und Vitellogenin (*Xenopus*) nachgewiesen (Hyder, 1992; Yamashita, 1998). Mehrere EREs im Promoterbereich eines Gens wirken synergistisch, abhängig vom gegenseitigen Abstand, der Entfernung vom Promoter und ihrer Anzahl (Sathya, 1997). Neben steroidrezeptorspezifischen Koaktivatoren (SRC = *steroid receptor coactivator*) werden allgemeine Koaktivatoren, wie p/CAF und CBP/p300, rekrutiert und durch Bindung an die basale Transkriptionsmaschinerie (Henttu, 1997) eine Art Transaktivierungskomplex gebildet (Abb.1.3.). Von beiden Rezeptoren sind Spleißvarianten beschrieben, die teilweise eine andere Funktionalität als der Wildtyp-Rezeptor aufweisen. Ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten von verschiedenen Spleißvarianten des ER α und der Pathogenese von z.B. Brusttumoren wird vermutet (Roodi, 1995), obwohl die Varianten auch in normalem Brustgewebe nachgewiesen wurden (Leygue, 1996a; Yang 2000). Von den beschriebenen Spleißvarianten, in denen z.B. Exon 2, 4, 5, 7 oder 8 fehlen, ist besonders die Exon5-Spleißvariante von Interesse, da ihr ein Bereich in der Ligandenbindungsdomäne fehlt. Dieser Verlust bewirkt, daß diese Variante ohne Ligandenbindung konstitutiv transaktivierend wirkt (Fuqua, 1991; Fujimoto, 1997b). Sie ist dominant positiv gegenüber dem ER α -Wildtyprezeptor (Desai, 1997; Chaidrun, 1998) und hemmt die Transaktivierung durch den wtER α (Wang, 1999).

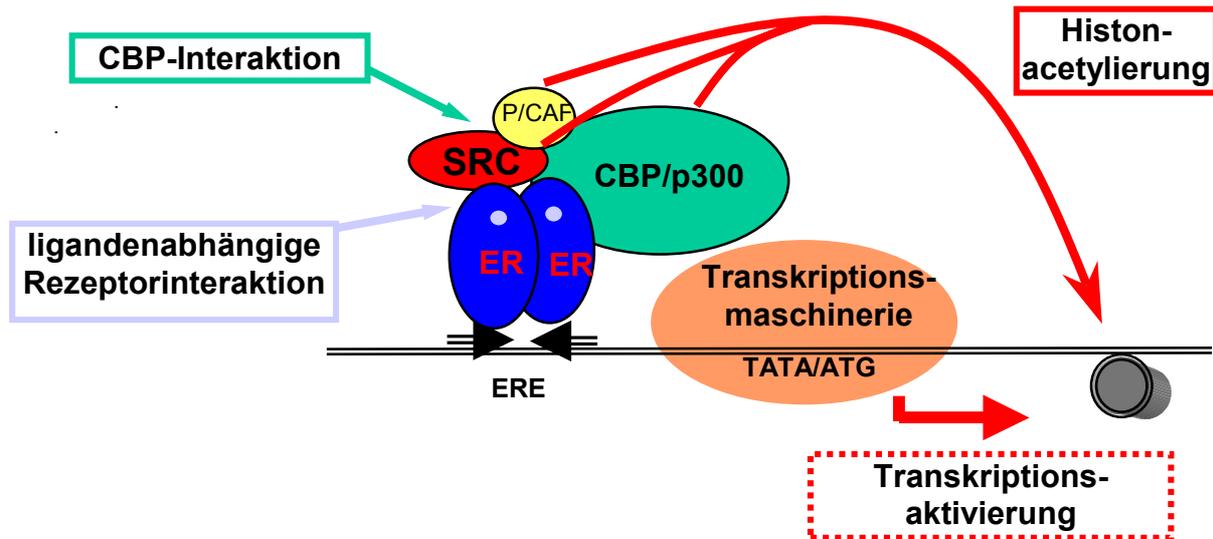


Abb. 1.3 : Schema des Transaktivierungsmechanismus der Östrogenrezeptoren (ER)

Während das Verhältnis der Expressionslevel von ER α -Wildtyp zur Exon5-Spleißvariante, z.B. im Verlauf des menstruellen Zyklus, konstant ist (Fujimoto, 1997a), wurde für die Exon5-Variante eine erhöhte Expression in metastatischen Tumoren (Fujimoto, 1998) und Brusttumoren (Leygue, 1996a und b) aufgezeigt. Die Exon5-Spleißvariante wurde auf mRNA-Ebene nicht nur in Tumoren, sondern auch in Normalgeweben nachgewiesen (Fujimoto, 1997a; Daffada, 1995, Yang, 2000). Für das prä- und postmenopausale Endometrium zeigte sich, daß auf mRNA-Ebene die Exon5-Spleißvariante in Normalgewebe, sowie in Adenokarzinomen auftrat (Rice, 1996), auf Proteinebene diese aber nur in den Karzinomen nachzuweisen war (Jazaeri, 1999). Zudem wird dieser Variante eine entscheidende Rolle bei Resistenz gegen Tamoxifen zugeordnet (Fuqua, 1993), da ihre Transaktivierung durch Antiöstrogene nicht beeinflusst wird (Jazaeri, 1999).

Neben den klassischen östrogenresponsiven Elementen werden noch andere DNA-Elemente durch die Östrogenrezeptoren reguliert. Hierzu gehört das AP1-Element, das beide ERs durch Interaktion mit dem *activation protein 1* (AP1) regulieren. Während ER α und ER β für das ERE die gleiche Bindungsaffinität haben (Pace, 1997), unterscheiden sie sich bei den Aktivitäten über alternative responsive Elemente (SFRE, SP1-Element) (Vanacker, 1999; Saville, 2000). Der Mechanismus, durch den die genaue Steuerung verläuft, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Desweiteren können ER α und β über andere Einflüsse ligandenunabhängig zur Transaktivierung angeregt werden, z.B. durch Interaktion mit Wachstumsfaktoren oder einen erhöhten cAMP-Level (Aronica, 1993; Ignar-Trowbridge, 1993).

Als Koaktivatoren sind Proteine definiert, die mit DNA-gebundenen nukleären Rezeptoren interagieren und für deren Transkriptionsaktivierungsfunktion notwendig sind (Webb, 1998). Obwohl in den letzten Jahren mehrere Koaktivatoren für nukleäre Rezeptoren identifiziert wurde (McKenna, 1999), lag das Hauptinteresse in der Studie der Familie der Steroidrezeptor-Koaktivatoren (SRCs). Die Mitglieder der SRC-Familie, *amplified in breast cancer 1* (AIB1 = SRC-3/RAC3/pCIP/TRAM-1/NCoA-3/ACTR) (Anzick, 1997; Li, 1997; Torchia, 1997; Chen, 1997; Takeshita, 1997), *transcription intermediary factor 2* (TIF2 = SRC-2/NCoA-2/GRIP1) (Voegel, 1996; Hong, 1996) und *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1 = NCoA-1) (Onate, 1995), haben eine gemeinsame Domänenstruktur. Hierbei ist die bHLH(*basic-helix-loop-helix*)-PAS(Per-AhR-sim)-Domäne am stärksten zwischen den drei Koaktivatoren konserviert. Bei einigen Transkriptionsfaktoren hat die bHLH-Region eine DNA-Bindungs- oder Dimerisierungsfunktion (Murre, 1989a, b). Das PAS-Motiv wurde bisher bei verschiedenen Transkriptionsregulatoren, nämlich Period (Per), dem Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) und *singel-minded* (sim), gefunden und spielt auch hier eine Rolle bei der Protein-Protein-Interaktion. Die genaue Funktion der bHLH-PAS-Domäne der SRCs ist noch ungeklärt. Weitere Domänen sind die zentrale rezeptorinteragierende Domäne (RID) und die Transkriptionsaktivierungs-Domäne (AD). Die RID vermittelt ligandenabhängig die Interaktion der Koaktivatoren mit nukleären Rezeptoren (Li, 1998; Onate, 1998; Voegel, 1998; Parker, 1998). Durch eine genaue Sequenzanalyse der RID wurde ein konserviertes Motif identifiziert, LLXXL, wobei L für Leucin und X für jede andere Aminosäure steht. Dieses LLXXL-Motif wurde NR-Box genannt (Heery, 1997). Die NR-Boxen sind für die Koaktivator-Rezeptor-Interaktion notwendig (Heery, 1997; Torchia, 1997; Ding, 1998; Voegel, 1998), wobei unterschiedliche Steroidrezeptoren mit unterschiedlichen NR-Motiven interagieren können (Leo, 2000). Durch die LLXXL-Motive wird u.a. der Östrogengebundene ER α gebunden, wohingegen der Tamoxifen-gebundene ER α weniger stark mit diesen interagiert (Norris, 1999). Die Rekrutierung von SRC-1 durch ER α im Komplex mit E2 oder TAM führt nur im ersten Fall zu einer Transaktivierung und einem Synergismus zwischen den Aktivierungsfunktionen, AF-1 und AF-2 (McInerney, 1996). Die Rekrutierung von SRCs durch ER α und ER β ist in besonderem Maße von der ligandenspezifischen Konformation des ER-Liganden-Komplexes abhängig (Kraichely, 2000).

SRC-1 tritt in verschiedenen Spleißvarianten auf, von denen SRC-1a und SRC-1e die wichtigsten sind (Hayashi, 1997). SRC-1e fehlen C-terminal 54 Aminosäuren von der SRC-1a-Sequenz und hat statt dessen 14 andere C-terminale Aminosäuren (Kamei, 1996). SRC-1a hat in den 54 eigenen Aminosäuren ein zusätzliches LLXXL-Motif, was zwar zu einer stärkeren

Bindung an den Östrogenrezeptor α führt, aber die ER-vermittelte Transaktivierung wesentlich schwächer als SRC-1e vermittelt (Kalkhoven, 1998). Die Ratio zwischen SRC-1a und SRC-1e scheint somit eine Rolle für das Ausmaß der SRC1-verstärkten Transaktivierung zu spielen.

Für alle drei SRCs wurde nachgewiesen, daß sie die Transaktivierung durch den ER α verstärken. Für SRC-1 wurde gezeigt, daß es bei der ligandenabhängigen Bindung der beiden Aktivierungsfunktionen des ER α als Adapter dient und die synergistische Wirkung der AFs stabilisiert (McInerney, 1996). Gleichzeitig wird die Stabilität des ER-Liganden-Komplexes erhöht (Gee, 1999) und weitere Kofaktoren, z.B. CBP und p300, werden durch die SRCs in den Komplex integriert (Voegel, 1998). Zusätzlich besitzen die SRCs, wie auch andere Koaktivatoren, eine Histonacetylierungsfunktion (Ogryzko, 1996; Spencer, 1997), deren Aktivität die Transkriptionsinitiation erleichtert.

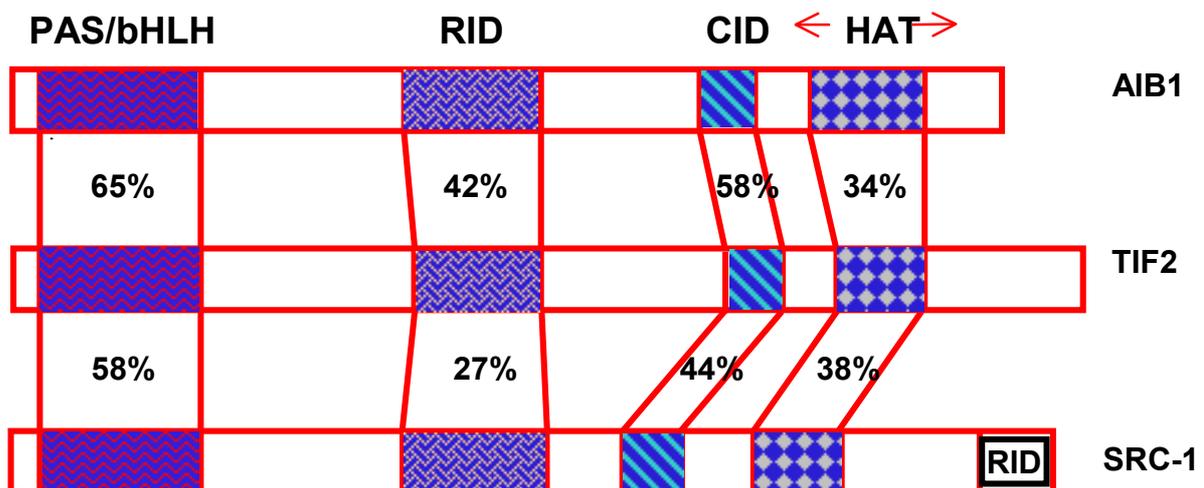


Abb.1.4.: Schematischer Vergleich der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1, SRC-1 und TIF2. Die Prozentzahlen geben die Homologie zwischen den Domänen der SRCs an. (CID = CBP interacting domain).

Die beiden Hauptfunktionen der SRCs sind also (1) *Chromatin-remodelling* durch Histonacetylierung und (2) Stabilisierung des Transaktivierungskomplexes und - auf höherer Ebene - auch des Präinitiationskomplexes (Liu, 1999).

In Geweben sind die SRCs ubiquitär exprimiert. Ihre Expressionshöhe scheint eine wichtige Rolle bei hormonabhängiger Tumorentwicklung und -progression zu spielen. Für SRC-1 ist aufgezeigt worden, daß es ein limitierender Faktor für die Transaktivierung verschiedener Transaktivatoren ist, die um den Koaktivator-Pool konkurrieren, was zu einem gegenseitigen Squelching führt (Onate, 1995; Lopez, 1999; Newman, 2000). AIB1- und SRC-1-Überexpression führen zu einer Verstärkung der ER-vermittelten Transaktivierung (Anzick, 1997; Onate, 1995), was die Zellproliferation, z.B. von Brustkrebszelllinien, stimuliert (Tai,

2000). Nach Anzick *et al.* (1997) ist die Überexpression von AIB1 in Brustkrebs häufig eine Folge einer Amplifikation des AIB1-Gens. Für SRC-1 ergaben klinische Untersuchungen, daß die SRC-1-Expression relativ zueinander in Brustnormalgewebe hoch, in Brusttumoren mittel und in Brustkrebszelllinien niedrig ist (Berns, 1998). Auf der anderen Seite wurde gezeigt, daß im Brustepithel von Ratten SRC-1 und ER α nicht, im Uterusepithel aber kolokalisieren (Shim, 1999). Die besondere Bedeutung der SRCs bei der Vermittlung entwicklungsbiologischer hormoneller Effekte zeigten Disruptionsexperimente für das AIB1-Gen bei der Maus. Die AIB1-Gen disruption führte zu einem pleiotropen Phänotyp, der sich durch Zwergwuchs, verspätete Pubertät, Verminderung der weiblichen Reproduktionsfunktionen und verkümmerte Entwicklung der Brüstdrüsen zeigte (Xu, 2000). Die SRCs stehen mit den Korepressoren in Konkurrenz bei der ER-Bindung, wobei das Verhältnis der Expressionshöhen über Induktion oder Repression der Transaktivierung entscheidet (Treuter, 1998). Die genaue Rolle der SRCs und ihres Zusammenspiels mit den Rezeptoren in verschiedenen Geweben und bei der Karzinogenese darin ist trotz vieler unterschiedlicher Ansätze noch weitestgehend ungeklärt.

Neben den Steroidrezeptor-Koaktivatoren sind weitere Proteine bekannt, die die Transaktivierung durch die Östrogenrezeptoren beeinflussen. Auch für das Brustkrebsgen BRCA1 ist eine Inhibition der ER α -vermittelten Transaktivierung durch Blockade der Aktivierungsfunktion-2 (AF-2) beschrieben (Fan, 1999). BRCA1 ist ein nukleäres Phosphoprotein (Chen, 1996) und spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation, der Progression des Zellzyklus (Hakem, 1996; Holt, 1996; Somasundaram, 1997) und der Apoptoseinduktion (Shao, 1996; Fan, 1998), sowie der DNA-Reparatur und der Rekombination (Fan, 1998; Scully, 1997; Gowen, 1998). Keimbahnmutationen von BRCA1 sind mit einem erhöhten Risiko von Brust-, Prostata- und Eierstockkrebs verbunden (Ford, 1994; Struewing, 1997). Der Verlust der Fähigkeit von BRCA1, die ER-vermittelte Transaktivierung zu supprimieren, könnte die Zellproliferation anregen und zur Tumorgenese beitragen (Fan, 1999).

Zwei Krebsarten, bei denen östrogene Wirkmechanismen eine besondere Rolle spielen, sind Brustkrebs (\rightarrow Mammakarzinom) (Dickson, 1988) und Gebärmutter schleimhautkrebs (\rightarrow Endometriumkarzinom).

Das Endometriumkarzinom ist das häufigste weibliche Genitalkarzinom in der westlichen Welt. Es stellt 10% aller Malignome dar und betrifft 25-35 Frauen / 100 000 pro Jahr (Senn, 1998). Es tritt hauptsächlich bei postmenopausalen Frauen auf (80%). Der Altersgipfel liegt bei 65-75 Jahren (Pfleiderer, 1994). Neben dem Alter sind besonders Fettleibigkeit

(Adipositas), Diabetes und Hypertonie Risikofaktoren. Ein exogener Faktor ist die Einnahme von Östrogenen ohne gleichzeitige Verabreichung zyklischer Progestagene. Ein weiterer Risikofaktor ist die Therapie von Mammakarzinomen mit Tamoxifen, dessen östrogene Teilwirkung ausreicht, um eine adenomatöse Hyperplasie im Endometrium oder Endometriumkarzinome zu erzeugen. Das Hauptsymptom für ein Endometriumkarzinom ist die postmenopausale Gebärmutterblutung bzw. Blutung außerhalb der Menstruation (Metrorrhagie). Etwa 85% der Endometriumkarzinome sind Adenokarzinome. Viele Karzinome entwickeln sich aus einer s.g. adenomatösen Hyperplasie. Das durch Östrogene geförderte Wachstum der Gebärmutterschleimhaut wird im normalen Zyklus durch Progesteron inhibiert. Wird die Proliferation nicht gebremst, entsteht eine hoch aufgebaute Schleimhaut, die zwar gelegentlich blutet, aber zumeist nicht vollständig abgestoßen wird (→ adenomatöse Hyperplasie). Bei längerer Persistenz entstehen aus den Arealen mit adenomatöser Hyperplasie Zellen mit Atypien (atypische Hyperplasie) unterschiedlichen Grades. Der Übergang zu einem Adenokarzinom ist gegeben, wenn die Proliferation auch ohne Östrogene anhält, also autonom geworden ist. Die Stadieneinteilung des Endometriumkarzinoms geschieht seit 1987 nach der TNM-Klassifikation, wobei sie klinisch häufig nach der FIGO-Klassifikation (Pettersson, 1991) eingeteilt werden.

Epidemiologische und zellbiologische Studien zeigten eine Rolle von Östrogenen bei der Entstehung von Brustkrebs (Dickson, 1988; Colditz, 1995; Beckmann, 2000a). Sie sind u.a. wichtig für das Wachstum und die Entwicklung von normalen Brustdrüsen (Topper, 1980). Die Bedeutung der Östrogenrezeptoren ist häufig untersucht worden. Der ER α ist während der Tumorgenese in der Brust hochreguliert, wird aber während der Tumorprogression wieder herunterreguliert (Clarke, 1994). Aufgrund der Bedeutung bei der Tumorbildung gilt der Nachweis der Steroidrezeptoren als ein wichtiger Punkt bei der klinischen Diagnostik. Der Nachweis der Östrogenrezeptoren ist entscheidend, ob als adjuvante Therapie Östrogenantagonisten eingesetzt werden können. Die endokrine Therapie mit Antagonisten, die östrogene Wirkungen blockieren, hat sich in den letzten Jahren vielfältig entwickelt. Das am häufigsten in der Brustkrebstherapie eingesetzte Antiöstrogen ist das nicht-steroidale Triphenylethylen-Derivat Tamoxifen (Jordan, 1990). Es wird seit 1973 für die Therapie des Mammakarzinoms (Early breast cancer trialists' collaboration group, 1992; Jordan, 1994) und seit 1986 auch zu seiner Chemoprävention eingesetzt (Beckmann, 1999). Es wirkt dadurch, daß es die Aktivität der Östrogenrezeptoren blockiert, indem es an diese kompetitiv bindet und dabei die Östrogenanlagerung an die Rezeptoren verhindert (Grainger, 1996). Die Antihormontherapie von Brustkrebs mit Tamoxifen ist mit einem erhöhten Risiko eines

Endometriumkarzinoms assoziiert (Fornander, 1989; Fisher, 1994; Kedar, 1994; van Leeuwen, 1994; Assikis, 1996). Die östrogene und antiöstrogene Aktivität von Tamoxifen ist von der Spezies, dem Gewebe, dem Zell-Typus und dem Promoter abhängig (Berry, 1990; Tzukerman, 1994). Agonistische Effekte von Tamoxifen wurden in humanen Endometriumkarzinomzelllinien sowohl auf der Ebene der Genexpression (Jamil, 1991; Simard, 1997, Barsalou, 1998), als auch der Zellproliferation (Satyaswaroop, 1984; Gottardis, 1988; Anzai, 1989; Jamil, 1991) nachgewiesen. Antiöstrogene, die sowohl agonistische als auch antagonistische Wirkungen haben, werden als „gemischte“ (*mixed*) Antiöstrogene bezeichnet. Im Gegensatz zu „reinen“ (*pure*) Antiöstrogenen, wie z.B. ICI 182,780, die die Dimerisierung der Rezeptoren verhindern (Fawell, 1990), kommt es bei der Bindung von gemischten Antiöstrogenen zur Dimerisierung, DNA-Bindung und zur Rekrutierung von Koaktivatoren. Für Tamoxifen und Hydroxy-Tamoxifen wurde gezeigt, daß es die AF-2 des ER α inhibiert (Danielian, 1992), die AF-1 aber dennoch aktiv ist (Gronemeyer, 1992; Tzukerman, 1994; Katzenellenbogen, 1996). Strukturanalysen haben gezeigt, daß in der nicht-ligandengebundenen Konformation die α -Helix 12 von der Ligandenbindungsdomäne absteht (Renaud, 1995; Wagner, 1995; Bourget, 1995; Brzozowski, 1997). Durch eine 180°-Drehung bei Bindung von E2 wird die Helix dicht neben die Ligandenbindungsdomäne verlagert, was neben dem ER auch beim RAR und dem TR gezeigt wurde. Zusammen mit ligandeninduzierten Veränderungen in den Helices 3-5 ermöglicht diese Umlagerung die Interaktion des Rezeptors mit Koaktivatoren (Shibata, 1997; Shiau, 1998; Darimount, 1998, Feng, 1998; Nolte, 1998). SRCs stabilisieren den ER-Agonisten-Komplex deutlich stärker, als den ER-Antagonisten-Komplex (Gee, 1999). Dies läßt einen unterschiedlichen Mechanismus im Agonismus von E2 und TAM aufgrund einer veränderten Zusammensetzung und Stabilität des Transaktivierungskomplexes vermuten. Die deutlich schwächere östrogene Wirkung durch die AF-1 scheint jedoch ausreichend zu sein, um im Endometrium einen östrogenen Effekt zu bewirken. Der Agonismus von Tamoxifen ist abhängig vom Zelltyp, dem Aufbau des Promoters und dem ER-Subtyp (Webb, 1995; Watanabe, 1997)

Diese Eigenschaft als gewebespezifischer Östrogen-Agonist/Antagonist kann von Vorteil sein. Für den klinischen Einsatz gibt es erwünschte und nicht erwünschte östrogene Wirkungen. Der Wunsch, ein Molekül zu schaffen, daß genau die positive östrogene Wirkung ausübt und die negative blockiert, führte zur Weiterentwicklung der SERMs (*selective estrogen receptor modulators*). Tamoxifen gilt als SERM der 1. Generation. Es steigert die Knochendichte BMD (= *bone mineral density*) (Love, 1992; Marttunen, 1995), senkt LDL-Cholesterin ohne HDL-Cholesterin zu steigern (Bagdade, 1990) und reduziert letale

Koronarinfarkte (Kauffman, 1997). Neben der östrogen-agonistischen Steigerung des Risikos für Endometriumkarzinome sind weitere unerwünschte Wirkungen vasomotorische Symptome und venöse Thromboembolien (Fritsch, 1994). Eine Serie von „SERMs der 2. Generation“ wird zur Zeit experimentell, präklinisch oder bereits klinisch geprüft. Das bedeutendste ist Raloxifen (LY-139.481) bzw. Raloxifen-HCl (LY-156.785).

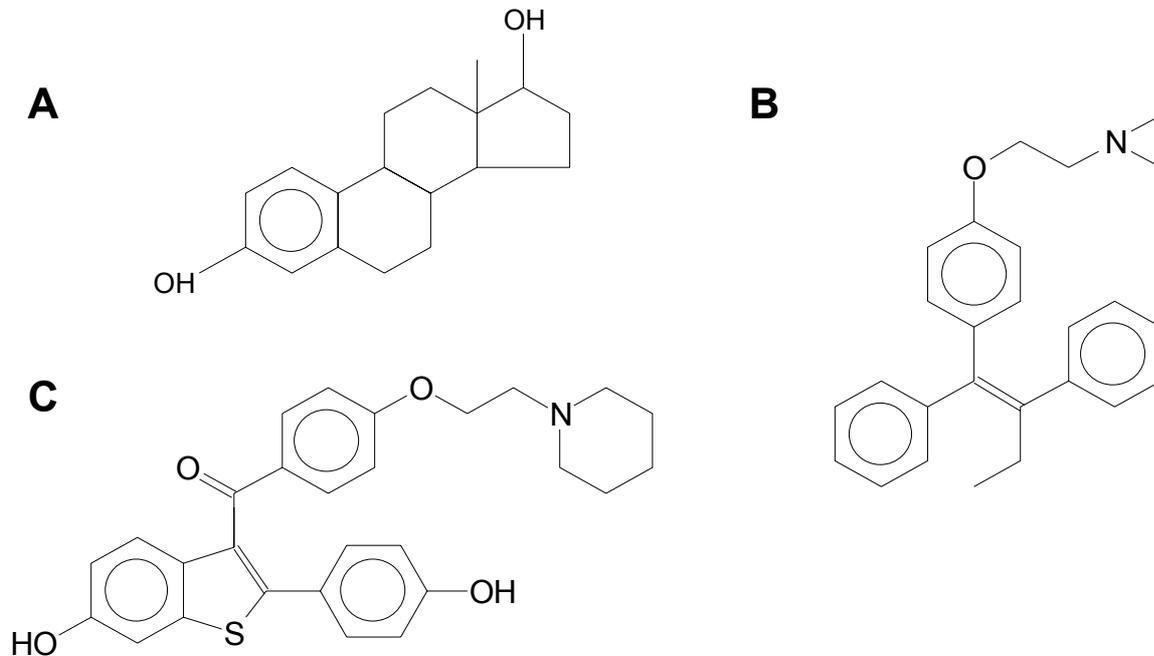


Abb.1.5.: Strukturen von (A) 17β-Östradiol, (B) Tamoxifen und (C) Raloxifen.

Das nichtsteroidale Benzothiophen Raloxifen (RLX) ist als SERM zur Osteoporoseprophylaxe vom Pharmaunternehmen Eli Lilly entwickelt worden (→ EVISTA™; Wirkstoff: RLX-HCl). Es zeigt positive östrogen-agonistische Effekte in dem es die Serumkonzentrationen von Gesamtcholesterin und LDL-Cholesterin, nicht aber die von HDL-Cholesterin, senkt und die Knochendichte im Gesamtskelett erhöht (Draper, 1996; Delmas, 1997). Östrogen-antagonistische Wirkungen übt es auf Gebärmutter Schleimhaut und Brust aus (Black, 1994; Nocke, 2000). In der MORE-Studie wurden bei vierjähriger Therapie mit Raloxifen diese Effekte bei postmenopausalen Frauen bestätigt (Cummings, 1999). Heutzutage findet Raloxifen daher hauptsächlich Einsatz bei der Prävention und Behandlung von Osteoporose (Gustafsson, 1998). Die Langzeitwirkungen von Raloxifen werden zur Zeit bezüglich einer Herzinfarktprävention (RUTH-Studie = Raloxifene use for the heart) und der Brustkrebsprävention im Vergleich zu Tamoxifen (STAR-Studie = *Study of Tamoxifen and Raloxifene*) untersucht (Goldstein, 2000). Große Unterschiede zwischen Raloxifen und Tamoxifen gibt auf molekularer Ebene. Raloxifen fungiert weder über die AF-

1, noch über die AF-2 des ER α als Agonist (McDonnell, 1995). Im Vergleich zu Tamoxifen führt Bindung von RLX in einen Komplex mit ER α zu einer anderen Konformation (Wijayarathne, 1999), worauf die unterschiedlichen gewebespezifischen Wirkungen der beiden SERMs zurückgeführt werden (Grese, 1997). RLX bewirkt eine andere Umlagerung der α -Helix12 als E2 und TAM (Brzozowski, 1997), was zu einer veränderten Rekrutierung von Koaktivatoren führt (Gustafsson, 1998). Solch ein RLX-ER-Komplex ist allerdings nicht in der Lage mit einem ERE zu interagieren. Stattdessen bindet er an eine Nukleotid-Sequenz aus vorwiegend Purinbasen, die die Bezeichnung *raloxifene-response-element* (RRE) erhalten hat (Yang, 1996). Derartige Nukleotid-Sequenzen sind in den Östrogen-regulierten Genen der reproduktiven Organe nicht nachgewiesen worden. Hierin könnte ein Grund für deren inertes Verhalten gegenüber Raloxifen bestehen. Ein Gen, das eine RRE-artige Nukleotid-Sequenz in ihrer Promoterregion enthält, ist der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β_3 (Yang, 1996 und 1997). Einen neuen Aspekt bezüglich der molekularen Wirkmechanismen der SERMs brachte die Entdeckung des ER β . Während 17 β -Östradiol mit ER α als Aktivator und mit ER β als Inhibitor am AP1-Element wirkt, fungieren Tamoxifen und Raloxifen über ER β als Aktivatoren und über ER α als Inhibitoren. Die ER β -abhängige Transkriptionaktivierung durch Antiöstrogenen wurde *in vitro* auch in Endometrium- und Mammakarzinomzellen gezeigt (Paech, 1997).

Ziel der Entwicklung der SERMs ist eine Art „Super-Östrogen“, welches als Östrogen-Ersatz bei Frauen nach den Wechseljahren die postmenopausalen Symptome verhindert. Idealerweise werden hierbei die durch den Östrogenmangel hervorgerufenen Beschwerden durch gewebespezifischen Agonismus des SERM unterdrückt und durch Antagonistische Wirkung in Uterus und Brust Karzinomen hier vorgebeugt. Neben den Wirkungsmechanismen über die ER-vermittelte Transaktivierung ist zur Bestimmung der Wirkung eines SERM wichtig, diese auf zellulärer Ebene zu betrachten. Entscheidende Punkte sind hierbei, ob das SERM einen Einfluß auf die Proliferation und den Differenzierungsgrad einer Zelle hat oder möglicherweise andere Mechanismen, wie z.B. Apoptose, den programmierten Zelltod, auslöst. Diese Wirkungen lassen sich auf der einen Seite durch morphologische Betrachtung der behandelten Zellen, aber auch durch Nachweis spezieller Markerproteine untersuchen.

Für die genaue Charakterisierung des Einflusses eines bestimmten Reagens auf Tumorzellen sind drei Fragen von besonderer Bedeutung :

(1) Wie wirkt es auf die Proliferation der Tumorzelle?

(2) Welchen Einfluß hat der Differenzierungsgrad des Tumors auf die Wirkungen des Reagenz?

(3) Wird durch das Reagenz der programmierte Zelltod (Apoptose) der Tumorzellen ausgelöst ?

Diese drei Kriterien können mit Hilfe verschiedener Markerproteine immunhistologisch, sowie mit Hilfe verschiedener morphologischer Charakteristika untersucht werden:

(a) Zellproliferation: Ob Tumorzellen proliferieren, ist wichtig für das Wachstum eines Tumors. Der erste Schritt, einen Tumor zu bekämpfen, ist, die Proliferation der Tumorzellen zu stoppen. Die Proliferationsaktivität von Zellen kann mit Hilfe von Ki-67 als Marker bestimmt werden (Liu, 2000). Ki-67 ist ein nukleäres Protein, das von proliferierenden Zellen exprimiert wird (Gerdes, 1983; Endl, 2000). Es wird für die Fortsetzung der Proliferation benötigt. Es tritt in allen Phasen des Zellzyklus auf (G₁-, S-, M- und G₂-Phase), aber nicht in der G₀-Phase (Scholzen, 2000).

(b) Differenzierungsgrad: Der Differenzierungsgrad gibt einen Aufschluß darüber, wie stark eine Zelle entartet ist. Sind die Zellen in einem Tumor gut differenziert, sprechen sie besser auf verschiedene Therapien an. Als Markerprotein für den Differenzierungsgrad dient Laktoferrin (Lf). Dieses ist ein Eisen-bindendes Glycoprotein der Transferrin-Familie, das antimikrobielle und entzündungshemmende Wirkung hat (Nuijens, 1996; Vorland, 1999).

(c) Apoptose: Der programmierte Zelltod oder Apoptose (Kerr, 1972), ist ein Prozeß, durch den entwicklungsbiologische und umweltbedingte Stimuli ein genetisches Programm auslösen, in dem eine Reihe von Reaktionen den Tod und die effektive Entsorgung einer Zelle bewirken. Apoptose ist wichtig für die normale Entwicklung und Unregelmäßigkeiten können Defekte auslösen, die u.a. zu embryonaler Lethalität, organspezifischen Störungen bei der postnatalen Entwicklung und einem erhöhten Krebsrisiko führen können (Vaux, 1994; Thompson, 1995; Nagata, 1997; Müschen, 2000). Therapeutika, durch die die Regulation der Apoptose spezifisch moduliert werden kann, geben neue Möglichkeiten bei der Behandlung zahlreicher Krankheiten, wie z.B. Krebs, Autoimmun-Krankheiten oder viralen Infektionen, zur Hand. Im Fall von Krebs wäre das Auslösen von Apoptose in den Tumorzellen von Vorteil. Eine Besonderheit ist, daß es bei der Eliminierung der Zelle zu keiner Entzündungsreaktion kommt (Verhaegen, 1998). Die konventionellen Methoden der Licht- und Elektronenmikroskopie sind bestens geeignet, sterbende und tote Zellen zu erkennen und zwischen Apoptose und Nekrose zu unterscheiden (Ormerod, 1993). Die Symptome der Apoptose zeigen sich durch „cytoplasmic boiling“, Ausstülpungen der Membran („membrane blebbing“), Kondensation des Chromatins, Schrumpfung der Zelle und intranukleärer DNA-

Fragmentierung (Wyllie, 1980; Arends, 1991). Die Vorgänge resultieren in der Fragmentierung der Zelle und im Auftreten von *apoptotic bodies*. Diese werden schnell durch angrenzende Parenchymzellen oder Makrophagen phagozytiert (Verhaegen, 1998). Apoptose tritt auch in der sekretorischen Phase des menstruellen Zyklus in der Funktionalis des Endometrium auf.

Auf molekularer Ebene kann Apoptose durch verschiedene Marker aufgezeigt werden. Während der Apoptose werden intrazelluläre Proteine durch spezielle Proteasen, die s.g. Caspasen, geschnitten. Cytokeratine, speziell Cytokeratin 18, ist hiervon in der sehr frühen Apoptose betroffen. Durch spezifische Antikörper (M30) kann die Stelle, die durch das Schneiden entsteht, als Zeichen für frühe apoptotische Prozesse detektiert werden.

Die Produkte der Bcl-2-Genfamilie sind mitochondriale Transmembranproteine und lassen sich aufgrund ihres Bezugs zur Apoptose in zwei Kategorien einteilen: Inhibitoren und Induktoren der Apoptose. Zu den Apoptoseinhibitoren gehören u.a. *Bcl-2* (= *B cell lymphoma/leukemia-2*) (Vaux, 1988; Hockenbery, 1990; LeBrun, 1993) und *Bcl-xL* (Boise, 1993), zu den Apoptose-Induktoren u.a. *Bax* (Oltvai, 1993) und *Bak* (Chittenden, 1995; Farrow, 1995; Kiefer, 1995). Die Mitglieder der Bcl-2-Familie interagieren miteinander. Ein Aspekt der Apoptoseregulation ist dabei der Level dieser Protein-Protein-Interaktion. Hierbei interagieren auch Apoptoseinhibitoren mit Apoptoseinduktoren, wobei sie sich gegenseitig antagonisieren (Kroemer, 1997). Der bestimmende Faktor über Tod oder Leben der Zelle ist vermutlich das Verhältnis zwischen den Mengen der apoptoseinduzierenden Bcl-2-Familienmitgliedern und den apoptoseinhibierenden (Oltvai, 1994).

Für die Behandlung von Karzinomen ist ein Substanz wünschenswert, die die Entdifferenzierung und die Proliferation der Karzinomzellen stoppt, und durch Induktion der Apoptose die Zellen abtötet.

2. Material und Methoden

2.1. Chemikalien und Lösungen

2.1.1. Chemikalien

Soweit nicht anders vermerkt, wurden sämtliche Chemikalien von den Firmen *Merck* (Darmstadt), *Riedel de Haen* (Seelze), *Gibco BRL* (Eggenstein) oder *Sigma* (München) in p.A.-Qualität bezogen.

2.1.2. Häufig genannte Lösungen und Medien

DEPC-dH ₂ O	1 l dH ₂ O wird mit 1 ml DEPC durch Schütteln gut vermischt, üN stehen gelassen und anschließend autoklaviert.
PBS-Puffer	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 4,3 mM Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O 1,4 mM KH ₂ PO ₄
TBE-Puffer	0,2 M TRIS 0,17 M Borsäure 2 mM EDTA, pH 8,0

2.1.3. Plasmide

Plasmide mit klonierten DNA-Fragmenten wurden hauptsächlich in Reporterassays verwendet.

Der Vektor pcDNA3.1 wurde kommerziell von der Firma Invitrogen erworben. Die folgenden Plasmide wurden freundlicherweise von Dr. Myles Brown vom *Department of Adult Medicine* am *Dana Faber Cancer Institute*, Boston (USA) zur Verfügung gestellt (Hanstein, 1999):

ER α -Plasmid: die Wildtyp-Sequenz des ER α in pcDNA3.1 kloniert;

ER β -Plasmid: die Wildtyp-Sequenz des ER β in pcDNA3.1 kloniert;

ERE₂-tk-Luc-Plasmid: 2 Vitellogenin-EREs vor einem Thymidinkinase-Promoter (Bereich –107 bis +51) und dem Luciferase-Reportergen;

β -Gal/ β -Actin-Plasmid: der Promoter des β -Actingens vor einem β -Globin *splice acceptor*-Signal und dem β -Galactosidase-Reportergen;

Von Dr. Barbara Weber, *Department of Medicine*, Universität von Pennsylvania, Philadelphia (USA) wurden folgende BRCA1-Plasmide zur Verfügung gestellt :

BRCA1-Plasmid: die BRCA1-Wildtyp-Sequenz in pGL2 (Promega) kloniert;

BRCA1 Δ Exon11-Plasmid: die Sequenz der BRCA1-Exon11-Spleißvariante in pGL2 kloniert;

2.2. Biologisches Material

2.2.1. Tumormaterial/Normalgewebe, Patientinnendaten

127 sporadische Mammakarzinome, 31 sporadische Endometriumkarzinome, 4 prämenopausale und 2 postmenopausale Endometriumnormalgewebe wurden nach chirurgischer Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Die Proben stammten von Patientinnen, bei denen in der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf operative Eingriffe vorgenommen wurden.

Die Gewebe wurden auf Tumorzellgehalt mittels Schnellschnittdiagnostik untersucht. Bei chirurgischer Entnahme der Mammakarzinome wurden zusätzlich mindestens 10 axilläre Lymphknoten entnommen. Unter den Brusttumoren waren 4 DCIS (= duktales *carcinoma in situ*), 72 IDC (= invasiv duktales Karzinom), 25 ILC (= invasiv lobuläres Karzinom), 12 Karzinome anderen Typus und 14 nicht charakterisierte Karzinome. Zudem wurde jeder Tumor routinemäßig nach dem TNM-System der UICC (Union International Contre Cancer, 1972) charakterisiert (Pfleiderer, 1994).

Den Frauen mit Endometriumproben wurden diese per Dilatation und Kürettage oder abdominaler Hysterektomie mit Ovariektomie entnommen. Die Proben wurden direkt in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Bei Frauen mit einem Endometriumkarzinom des Status T1b und höher wurde zudem eine pelvine Lymphonodektomie durchgeführt. Unter den Endometriumkarzinomen waren 27 Adenokarzinome (15 glandulär-papilläre, 4 glanduläre, 2 klarzellige, 3 sekretorische, 1 solides und 2 mit Plattenepithelmetaplasie) und 3 endometroide Karzinome, sowie 1 nicht charakterisiertes. Klinische Daten zu den Tumoren wurden routinemäßig erfaßt. Für statistische Untersuchungen wurde den Tumoren das Patientinnenalter, die Klassifikation nach FIGO 1988, die TNM-Klassifikation, sowie der Tumorgrad zugeordnet (Pfleiderer, 1994). Von 6 normalen Endometriumgefriergeweben stammten 4 von einer prämenopausalen und 2 von einer postmenopausalen Patientin.

Zusätzlich wurden 33 prämenopausale und 6 postmenopausale Endometriumnormalgewebe ebenfalls durch fraktionierte Abrasio oder abdominale Hysterektomie entnommen, Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet. Dieses wurde routinemäßig im Morphologische Labor der Frauenklinik der H.-H.-Universität zur morphologischen und immunhistochemischen Diagnostik durchgeführt. Keine der 33 prämenopausalen Patientinnen nahm zum Zeitpunkt der Gewebeentnahme orale Kontrazeptiva, eines der Gewebe wurde während einer Schwangerschaft entnommen. Bei 3 der 6 postmenopausalen Endometriumnormalgewebe nahmen die Patientinnen eine Hormonersatztherapie.

2.2.2. Zelllinien

Die in den Versuchen verwendeten Zelllinien wurden von der „American Type Culture Collection“ (ATCC) kommerziell erworben. Ihr Ursprung und ihre Charakterisierung ist wie folgt :

Endometriumkarzinomzelllinien:

- (a) AN3 CA (ATCC HBT 111): C.J. Dawe et al. gewannen 1964 diese Zelllinie aus einer metastatischen Läsion in den Lymphknoten einer 55 Jahre alten Patientin mit einem undifferenzierten, kleinzelligen Karzinom des Endometriums.
- (b) HEC-1-A (ATCC HBT 112): Diese Zelllinie wurde 1968 von H. Kuramoto et al. aus einem endometrialen Adenokarzinom (Grad IA) einer 71 Jahre alten Patientin isoliert. Die Zellen sind hypo- bis hyperdiploid.
- (c) Ishikawa: Die Zelllinie Ishikawa wurde von Nishida et al. (1985) aus einem Adenokarzinom einer 39-Jahre alten Frau etabliert. Sie hat einen positiven ER- und PR-Status, wächst aber östrogen-unabhängig.
- (d) KLE (ATCC CRL 1622): Diese Zellen sind epithel-ähnlich und entstammen einem wenig differenzierten endometrialen Adenokarzinom einer 64 Jahre alten Patientin, isoliert von G.R. Richardson. Die Zellen sind hypotriploid.
- (e) RL-95-2 (ATCC CRL 1671): D.L. Way et al. isolierte 1983 diese epithelialen Zellen aus einem mäßig differenzierten adenosquamösen Endometriumkarzinom einer 65 Jahre alten Patientin. RL-95-2-Zellen besitzen beide Östrogenrezeptortypen und sind zur Erforschung der endokrinen Regulation endometrialer Neoplasie geeignet.

Mammakarzinomzelllinien:

- (a) BT-20 (ATCC HBT 19): Diese Brustkrebszelllinie wurde 1958 von E.Y. Lasfargues und L. Ozzello etabliert, indem sie Zellen, die bei der Zerteilung eines Adenokarzinoms austraten, isolierten und kultivierten.
- (b) MCF7 (ATCC HBT 22): Diese Adenokarzinomzelllinie wurde von H.D. Soule et al. 1973 durch Punktion eines Pleuralerguß bei einer 69 Jahre alten Patientin mit Mammakarzinom isoliert.
- (c) SK-BR-3 (ATCC HBT30): G. Trempe und L.J. Old isolierten 1970 diese Adenokarzinomzellen aus dem Pleuralerguß einer 43 Jahre alten Patientin mit einem Mammakarzinom. Die Zellen sind hypertriploid bis hypotetraploid.
- (d) T-47D (ATCC HTB 133): Die T-47-Linie wurde von I. Keydar aus dem Pleuralerguß einer 54 Jahre alten postmenopausalen Patientin mit einem infiltrierenden duktalem

Mammakarzinom isoliert. Der daraus entwickelte Unterstamm (T-47D) enthält u.a. Rezeptoren für 17β -Östradiol und andere Steroide (Freake, 1981; Sher, 1981). Die Zelllinie ist hypotriploid.

Zelllinien aus anderen Karzinomtypen :

- (a) HeLa (ATCC CCL 2): Die Zelllinie HeLa wurde G.O. Gey, W.D. Coffman und M.T. Kubicek aus einem Adenokarzinom des Zervix einer 31 Jahre alten Frau isoliert.
- (b) OVCAR-3 (ATCC HTB 161): Diese Adenokarzinomzelllinie entstammt einem malignen Karzinom des Ovar (Hamilton, 1983). Sie enthält Progesteron- und Östrogenrezeptoren und ist östrogenresponsiv.
- (c) A-431 (ATCC CRL 1555): Die Zelllinie A-431 wurde 1973 von D.J. Giard *et al.* aus einem soliden epidermoiden Karzinom einer 85 Jahre alten Patientin isoliert.

2.2.4. *Escherichia coli*-Stämme

Charakterisierung der verwendeten *E. coli*-Stämme :

XL1-blue	sup E44, hsdR17 ($r_K^- m_K^+$), recA1, endA1, gyrA46, thi relA1, lac F'[proAB ⁺ lacI ^q lacZΔM15 Tn10(tet ^r)]
DH5α	sup E44, ΔlacU169(Φ80lacZΔM15), hsdR17($r_K^- m_K^+$), recA1, endA1, gyrA96, thi-1 relA1, F ⁻ , λ ⁻

Beide Stämme wurden mit Plasmiden transformiert und zu deren Vervielfältigung verwendet.

2.3. Zellkultur

2.3.1. Kulturmedien und Zusätze

Medien:

- *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) (Gibco BRL)
 - mit 110 mg/l Natriumpyruvat und 100 mg /l Glucose
 - mit und ohne Phenolrot
- DMEM Nutrient Mix (NutMix) F12 (Gibco BRL)
 - mit 15 mM HEPES, L-Glutamin und Pyridoxin-HCl
 - mit und ohne Phenolrot
- McCoy's 5 A Medium (Sigma)
 - mit L-Glutamin
 - mit Phenolrot
 - ohne Phenolrot (als Pulver; + 2,2 g Natriumbicarbonat; add. 11 dH₂O)

Zusätze :

- Fetales Kälberserum (Sigma)
- Penicillin-Streptomycin-Glutamin-Lösung (Gibco BRL)
10000 U/ml Penicillin G Natrium; 10000 U/ml Streptomycin-Sulfat; 200 mM L-Glutamin; 10 mM Natriumcitrat in 0,14% (w/v) NaCl
- MEM 100x Vitamin-Lösung (Gibco BRL)
NaCl, D-Ca Panthotenat, Cholinchlorid, Folsäure, i-Inositol, Nikotinamid, Pyridoxal-HCl, Riboflavin und Thiamin
- HEPES-Puffer, 1 M (Sigma)
- Insulin Actrapid (Novo Nordisk Pharma, Mainz)

Die Zelllinien wurden nach der Empfehlung von ATCC in folgenden Medien kultiviert :

- (a) Kulturmedium für die Zelllinien MCF7, T-47D, AN3 Ca, U2OS: *Dulbecco's modified Eagles*-Medium (DMEM) (Gibco), 10% (v/v) fetales Kälberserum (FCS) (Sigma), 1x Vitamine-Lösung (Gibco), 1x Antibiotika/Antimykotika/L-Glutamin-Lösung (Gibco);
- (b) Kulturmedium für die Zelllinie SK-BR-3: McCoy 5 A-Medium (Sigma), 10% FCS, 1x Vitamine-Lösung, 1x Antibiotika/Antimykotika/ L-Glutamin-Lösung;
- (c) Kulturmedium für die Zelllinie RL-95-2: DMEM-NutMix-Medium (Gibco), 10% FCS, 10 mM HEPES (Sigma), 1x Antibiotika/ Antimykotika/L-Glutamin-Lösung, 5 mM Insulin (Novo Nordisk);
- (d) Kulturmedium für die Zelllinien Ishikawa, KLE: DMEM-NutMix-Medium, 10% FCS, 1x Antibiotika/Antimykotika/L-Glutamin, 10 mM HEPES;

2.3.2. Aktivkohlebehandlung von fetalem Kälberserum

Für die Inkubation von Karzinom-Zelllinien mit (Anti-)Hormonen mußten aus dem fötalen Kälberserum (FCS), welches dem Nährmedium zugesetzt wurde, die Hormone vollständig entzogen werden. Dieses geschah durch Behandlung mit Dextran-beschichteter Aktivkohle. Hierzu wurden 400 ml FCS mit 1 g Aktivkohle (Sigma) und 0,1 g Dextran (Sigma) für 30 min. bei 57°C unter Schütteln inkubiert und anschließend bei 4000 rpm für 1 std. bei Raumtemperatur zentrifugiert. Dem Überstand wurden erneut 1 g Aktivkohle und 0,1 g Dextran zugegeben, worauf 30 min. bei 37°C unter Schütteln inkubiert wurde. Der Überstand wurde durch eine 0,2 µm Sterilfilterflasche (Corning™-Vakuumfiltrationssystem, Sigma) filtriert und bei -20°C gelagert (Holinka, 1986).

2.3.3. Kultivierung der Zelllinien

Die Kultivierung der Zelllinien fand in 240 ml Zellkulturflaschen (80 cm³; Nunc) in 10 ml des entsprechenden Mediums in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 5%-iger CO₂-Konzentration und 95%-iger konstanter Luftfeuchtigkeit statt. Im Abstand von drei Tagen wurde das Medium mit einer sterilen 10ml-Pipette abgenommen und durch frisches Medium ersetzt.

2.3.4. Passagierung der Zelllinien

Waren die Zellen bis zur Konfluenz gewachsen, wurden sie in eine neue Gewebekulturflasche umgesetzt (Passagierung). Hierzu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit PBS gewaschen und durch 5-minütige Inkubation mit 5–10 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Gibco BRL) bei 37°C abgelöst. Durch Zugabe des gleichen Volumens an Medium wurde das Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in einem sterilen Röhrchen 5 min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in Medium resuspendiert und die Zellen mit Hilfe einer Kanüle vereinzelt. Die Zelldichte wurde in einer Thoma-Kammer bestimmt. Zur Weiterkultivierung wurden 5x10⁶ Zellen in einer neuen Gewebekulturflasche mit frischem Medium ausgesät.

2.3.5. Kryokonservierung

Zur längerfristigen Lagerung wurden die Zelllinien kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen wie in 2.3.3. beschrieben durch Behandlung mit Trypsin/EDTA abgelöst und abzentrifugiert. Die Zellen wurden in Medium resuspendiert, die Zellzahl bestimmt und auf 5x10⁶ Zellen pro 1ml Medium eingestellt. In einem Kryoröhrchen wurden 500µl Zellsuspension mit 500µl Einfriermedium vermischt. Nach 12 Stunden bei –80°C wurden die Zellen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium: 5% DMSO in Kulturmedium

2.3.6. Inkubation mit Hormonen

2.3.6.1. Herstellung der Hormonlösungen

Die (Anti-)Hormone 17β-Östradiol (Sigma), Progesteron (Sigma), RU486 (= Mifepristone, Sigma), Tamoxifen (Sigma) und 4-Hydroxy-Tamoxifen (Sigma) wurden als Stammlösung in absolutem Ethanol zu einer Konzentration von 10⁻² mol/l gelöst. Raloxifen (Lilly) und Raloxifen-Hydrochlorid (Lilly) wurden zu einer Stammlösungskonzentration von 10⁻³ mol/l in abs. Ethanol gelöst. Zur (anti-)hormonellen Inkubation von Zelllinien wurden die

Stammlösungen in 1:10-Schritten in Kulturmedium verdünnt, um die Ethanolkonzentration und damit verbundene Nebeneffekte möglichst zu vermeiden.

2.3.6.2. Spezielle Kultivierungen und (Anti-)Hormonbehandlung

Zur Inkubation von Karzinomzelllinien mit Steroidhormonen und Antihormonen wurden diese für die verschiedenen Versuchsreihen auf unterschiedliche Art und Weise kultiviert:

- in 6- /12-Loch-Platten: Für Expressionskinetiken und Transfektionsexperimente wurden bei 6-Loch-Platten pro Loch $2,0 \times 10^5$ Zellen (in 2 ml Nährmedium) und bei 12-Loch-Platten 1×10^5 Zellen (in 1 ml Nährmedium) ausgesät.
- auf Objektträgern: Für immunhistochemische Untersuchungen der (anti-)hormonellen Effekte wurden auf Teflon-beschichtete 3-Loch-Objektträger (Menzel Gläser) pro Loch 1×10^4 Zellen in einem Tropfen von 100 μ l Medium ausgesät. Hierbei wurden nur die äußeren beiden Löcher beimpft. Insgesamt wurden die Objektträger einer Inkubationsreihe in einer Gewebekulturschale (245x245 mm) gelagert. Nachdem die Zellen adhärent waren, wurde die Schale mit 150 ml Medium gefüllt und die Zellen wurden in ihrer Gesamtheit weiterkultiviert.
- auf Glasplättchen: Für rasterelektronenmikroskopische Versuche wurden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Diese wurden hierfür in 6-Loch-Platten gelegt, mit 3 ml Medium bedeckt und mit $0,5 \times 10^4$ Zellen beimpft.
- in Einbettungskammern (20-Loch, LBK): Für elektronenmikroskopische Versuche die Zellen in 20-Loch Einbettungskammer kultiviert. Hierfür wurden $0,5 \times 10^4$ Zellen in 500ml Medium ausgesät.

Vor der Inkubation mit (Anti-)Hormonen wurden die Zellen in entsprechender Konzentration ausgesät und nach 24 Std. wurde das Kulturmedium gewechselt, wobei nun solches mit aktivkohlebehandeltem FCS verwendet wurde, um mediumbedingte östrogene Effekte zu minimieren. Für die Inkubation wurden die (Anti-)Hormone in entsprechender Konzentration dem Kulturmedium zugegeben. Auf diesem Medium verblieben die Zellen für mindestens 48 Std.. 17β -Östradiol wurde in einer Endkonzentration von 10^{-8} M und die Antiöstrogene TAM, OHT, RLX und RLX-HCl jeweils in einer Endkonzentration von 10^{-6} M eingesetzt. Bei den Zellkinetiken, die 7 Tage dauerten, wurde das Medium alle 48 Std. erneuert.

2.3.6.3. Zellkinetiken

Zur Analyse der Einflüsse von (Anti-)Hormonen auf das Expressionsmuster unterschiedlicher Gene in verschiedenen Zelllinien wurden diese in 6-Loch-Platten in entsprechendem Nährmedium mit 10% FCS ausgesät. Die Zellen wurden eine Woche vor den Kinetiken in Phenolrot-freiem Medium kultiviert, um Verfälschungen der Ergebnisse durch dessen östrogene Effekte auszuschließen. Sobald die Zellen adhärent waren, wurden sie mit PBS gewaschen und für 48 Std. in Medium mit 10% CCS-FCS kultiviert. Zum Start der Kinetik wurde das Medium erneuert und mit den Hormonen in den entsprechenden Konzentrationen (bzw. Ethanol-Verdünnungen als Kontrolle) versetzt. Das Medium mit den Hormonen wurde alle 48 Std. erneuert. Zu den gegebenen Zeitpunkten wurden die Inkubationen gestoppt, indem das Medium abgenommen und die Zellen zur RNA-Isolation in Trizol aufgenommen wurden.

2.4. RNA/DNA Isolierung

2.4.1. DNA-Isolierung aus Gewebe

Unter Trockeneiskühlung wurde von dem Gewebe ein etwa stecknadelkopfgroßes Stück mit einem Skalpell abgetrennt, zusammen mit einer Wolframkugel in eine Teflonkapsel gebracht und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach dem Einfrieren wurde das Gewebestück in einem Dismembrator (Mikrodismembrator S, Fa. Braun Biotech Int.) bei 2000 rpm für 1 min. zertrümmert. Das Gewebepulver wurde in 3 ml Verdaupuffer aufgenommen und über Nacht (ü.N.) bei 50°C mit Proteinase K (0,1 mg Proteinase K / ml Verdaupuffer) inkubiert. Für die anschließende Phenol-Chloroform-Extraktion wurde der Verdauansatz mit dem gleichen Volumen eines Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches (25:24:1) vermischt und zur Phasentrennung für 10 min. bei 2000 rpm zentrifugiert (Megafuge 1.0R, Heraeus). Zur vollständigen Phenolabtrennung wurde der wässrige Überstand mit dem gleichen Volumen eines Chloroform-Isoamylalkohol-Gemisches vermischt und abzentrifugiert (10 min., 2000 rpm). Der oberen Phase wurden zur DNA-Fällung mit 0,5 Volumen Ammoniumacetat und 2,5 Volumen eiskaltes Ethanol (absolut) zugegeben und diese nach Inkubation bei -20°C für 2 Std. für 15 min. bei 4000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 1ml 70% Ethanol (eiskalt) gewaschen, abzentrifugiert, (5 min., 13000 rpm) und nach Lufttrocknung in Aqua dest. gelöst.

Verdaupuffer	100 mM NaCl
	10 mM TRIS-HCl, pH 8,0
	25 mM EDTA, pH 8,0
	0,5% SDS

2.4.2. DNA-Isolierung aus Blut

Die Blutentnahme bei den Patientinnen erfolgte in 2x4 ml-Standardröhrchen mit EDTA-Lösung. Die DNA-Isolierung aus den Lymphozyten erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Blood Midi Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.4.3. DNA-Isolierung aus Zelllinien

Die DNA-Isolierung aus Zelllinien wurde mit Hilfe des QIAamp Blood - Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.4.4. RNA-Isolierung aus Gewebe

Das Gewebe wurde wie in 2.4.1. beschrieben aufgeschlossen, wobei die Gewebefragmente sofort in 1 ml Trizol (Gibco BRL) aufgenommen und suspendiert wurden. Nach Inkubation für 5 min. bei Raumtemperatur wurden die Proben mit 200 µl Chloroform durch 15 sec. Schütteln vermischt, 2 bis 3 min. bei RT inkubiert und zur Phasentrennung abzentrifugiert (12000 g, 4°C, 15 min.). Die obere RNA-haltige Phase wurde abgenommen, mit einem Volumen Isopropanol versetzt und 10 min. bei RT inkubiert. Durch Zentrifugation wurde die präzipitierte RNA pelletiert (12000 g, 4°C, 10 min.). Das Pellet wurde mit 1 ml 75% Ethanol gewaschen, bei 9500 g und 4°C für 5 min. abzentrifugiert und für 5 bis 10 min. bei 55°C im Heizblock getrocknet. Das aufgereinigte Pellet wurde je nach Ausbeute in 20 – 100 µl DEPC-dH₂O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte spektrophotometrisch.

2.4.5. RNA-Isolierung aus Zelllinien

Bei normaler Kultivierung wurden die Zellen, wie bei der Passagierung durch Trypsin-Behandlung, abgelöst und dann durch Zentrifugation pelletiert. Zur RNA-Isolation wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol suspendiert. Die Isolation wurde wie unter 2.4.4. beschrieben fortgeführt. Bei der Kultivierung in 6-Loch-Platten während der Kinetiken wurden zum entsprechenden Zeitpunkt das Medium von den Zellen abgenommen, diese mit PBS gewaschen und in 1 ml Trizol suspendiert. Die weiteren Schritte erfolgten wiederum wie unter 2.4.4. beschrieben.

2.5. cDNA-Synthese aus Gesamt-RNA

Zur genaueren Expressionsanalyse wurde die RNA durch reverse Transkription in cDNA-Primärstränge übersetzt. Hierbei wurden unspezifische Hexanukleotide eingesetzt, um die

gesamte RNA-Population zu erfassen. Dieses ist für eine spätere Quantifizierung der Transkripte von besonderer Bedeutung.

Es wurden 5 µg RNA 5 min. bei 95°C denaturiert und auf Eis abgekühlt. Der 20 µl-Reaktionsansatz wurde in einem *Thermo-Cycler* für 10 min. bei 26°C und 45 min. bei 42°C inkubiert. Durch einen abschließenden Schritt für 5 min. bei 95°C wurde die Reverse Transkriptase inaktiviert. Die cDNA wurde auf Eis abgekühlt und bei -20°C gelagert. Sie wurde mittels einer „β-Actin-PCR“ auf ihre Qualität und Kontaminationen mit genomischer DNA überprüft.

Reaktionsansatz für Reverse Transkription (Endkonzentrationen im Ansatz):

- 1x PCR-Puffer (Pharmacia)
- 7,5 mM MgCl
- 0,1 mg/ml BSA (Pharmacia, DNase- und RNase-frei)
- 15 mM DTT
- je 1 mM Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 1 U/µl RNasin (Promega)
- 1000 pmol *random*-Primer
- 9,5 U MMLV-Reverse Transkriptase (Pharmacia)

2.6. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation bestimmter Sequenzen wurde mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. Die Ansätze hatten ein Reaktionsvolumen von 50 µl und enthielten anfangs DNA bzw. cDNA als Matrize, PCR-Reaktionspuffer (Pharmacia), dNTP-Mix (Pharmacia), Primer und dH₂O. Überschichtung mit Mineralöl diente als Verdunstungsschutz. Nach einer den Zyklen vorgeschalteten Denaturierungsphase bei 94°C („hot start“) wurde dem Reaktionsansatz *Taq*-Polymerase (Pharmacia) zugegeben. Den Zyklen folgte eine abschließende Synthesephase für 8 min. bei 72°C.

Die Bedingungen und die Zusammensetzung der Reaktionsansätze für die quantitative differentielle PCR zur Quantifizierung der Expressionshöhe bestimmter Gene wurden bezüglich der Primer-Konzentration, der Zyklenzahl, der Enzym-Menge, der *template*-Menge (DNA, cDNA) und Nukleotid-Konzentration optimiert (s. Ergebnisteil).

Bei der quantitativen differentiellen PCR wird neben dem Zielgen ein Referenzgen als interner Standard in demselben Reaktionsansatz mitamplifiziert (multiplex PCR). Da für die

optimale Amplifikation der Sequenzen von Ziel- und Referenzgen die Zyklusanzahlen unterschiedlich waren, wurde mit der *primer dropping*-Methode gearbeitet. Hierbei wurden den laufenden Reaktionen mit den Primern für die Sequenz mit der optimal höheren Zykluszahl die Primer für die Sequenz mit der optimal niedrigeren Zykluszahl erst zu dem entsprechend späteren Zeitpunkt zugegeben. Als Referenzgene wurden β -Actin verwendet (Kalkhoven, 1998)

2.6.1. β -Actin-PCR zur Kontrolle der cDNA-Qualität

Bei der β -Actin-Kontroll-PCR sind die Primer (β -Actin-5' und -3') im β -Actin-Gen so gelegt, daß die amplifizierte Sequenz die Grenze zwischen zwei Exons beinhaltet. Bei der Amplifikation von genomischer DNA, welche hier als Kontamination anzusehen ist, wird das Intron zwischen den Exons mitamplifiziert. Dieses ist bei der Amplifikation von cDNA nicht der Fall. Bei entsprechender Größe des Introns können die Amplifikate der genomischen und der cDNA aufgrund der unterschiedlichen Länge in einem Agarosegel gut aufgetrennt werden. Bei sauber isolierter RNA ist nach der reversen Transkription bei der β -Actin-Kontroll-PCR keine Bande zu sehen, die der genomischen Sequenz entspricht.

Die Bedingungen für die β -Actin-PCR waren :

Gen	PCR-Ansatz	Zyklen
β -Actin genomische Bande: 625 bp	1x PCR-Puffer	1x 10 min. 94°C
	150 μ M dNTPs	30x 1 min. 94°C
cDNA-Bande: 446 bp	40 pmol Primer	1 min. 62°C
	2,5 U <i>Taq</i> -Polymerase	1 min. 72°C
	Reaktionsvolumen : 50 μ l	1x 8 min. 72°C

2.6.2. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Zur relativen Messung von Expressionen wurde die quantitative RT-PCR verwendet. Die Expression eines Zielgens wurde dabei in Relation zu der eines Referenzgens gemessen (Niederacher, 1999b). Als Referenzgen diente hier β -Actin. Durch die Messungen gegen ein stabil exprimiertes Standardgen können Expressionsunterschiede in einem Kollektiv verschiedener Gewebeproben oder unter hormoneller Stimulation bestimmt werden. Referenz- und Zielgen wurden in einem Reaktionsansatz koamplifiziert.

Durch Verwendung fluoreszenzmarkierter Primer konnten die PCR-Produkte mit Hilfe eines A.L.F. DNA Sequenzierers aufgetrennt und quantifiziert werden. Die Auswertung wurde mit

Hilfe der Allel Link Software (Pharmacia) durchgeführt. Die Fläche (A) unter den Signalen galt hierbei als Maß der Signalstärke. Der relative Expressionswert (relative expression value = REV) des Zielgens ergab sich aus dem Verhältnis der Signalstärke des Zielgens zu der des Referenzgens : $REV = A(\text{Zielgen}) / A(\text{Referenzgen})$.

Die Bedingungen der PCR mußten so optimiert werden, daß die Reaktionskinetik allein von der Menge der template DNA abhängig war (s. 2.6.3.).

2.6.3. Quantitative differentielle PCR (qdPCR)

Die quantitative differentielle PCR ist eine Methode zur Bestimmung der Kopienzahl eines Gens und somit einer möglichen Genamplifikation. Zur Quantifizierung wurde neben dem Zielgen (AIB1) in den PCR-Ansätzen ein interner Standard koamplifiziert. Als Referenzgen wurde das *single-copy* Gen γ -Interferon herangezogen (Niederacher, 1999). Die PCR-Bedingungen mußten (wie unter 2.6.2.) so optimiert sein, daß die Reaktionskinetik nur von der Kopienmenge der *template*-Sequenz abhängig war. Die Reaktion durfte nicht durch Polymerasemenge, die Primer- oder die Nukleotidkonzentration limitiert sein. Außerdem mußte ihre Kinetik im logarithmischen Bereich ablaufen. Die Amplifikationsbestimmung erfolgte im Vergleich zu einem Normalgewebe, in dem das Gen nicht amplifiziert war. Hier wurde zum Vergleich mit der Tumor-DNA Lymphozyten-DNA verwendet.

Liu et al. (1993) entwickelten die mathematischen Grundlagen für die Amplifikationsbestimmung, welche in folgender Gleichung resultierten :

$$\log (sz/sr) = \log \frac{Pz / Pr}{[Pz(\text{normal}) / Pr (\text{normal})]}$$

sz = Kopienzahl des Zielgens vor der PCR

sr = Kopienzahl des Referenzgens vor der PCR

Pz = Kopienzahl des Zielgens nach der PCR

Pr = Kopienzahl des Referenzgens nach der PCR

(normal) = in Normalgewebe

Die PCR-Bedingungen wurden hinsichtlich der *annealing*-Temperatur, der Zyklenzahl, der Primerkonzentration, der Nukleotidkonzentration, der Enzymmenge und der *template*-Menge optimiert (s. Ergebnisteil). Die Auftrennung und Detektion der fluoreszenz-markierten PCR-

Produkte erfolgte ebenfalls im A.L.F. DNA Sequenzierer und die Auswertung der Rohdaten mit Hilfe der Allel Link Software.

2.7. Sequenzierung

Die zu sequenzierenden DNA-Fragmente wurden zuerst in einer PCR-Reaktion (s. 2.6.) amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden vor der Sequenzierungsreaktion mit Hilfe von MicroSpin-Säulen (S-300 für PCR-Produkte < 200 bp; S-400 für PCR-Produkte ≥ 200 bp; Amersham) von den Komponenten der PCR-Reaktion aufgereinigt (nach Anweisung des Herstellers). Die Qualität der PCR-Produkte wurde auf 1%-igen Agarosegelen kontrolliert. Zur Strategie der Sequenzierung gehörte es, daß bei dieser PCR-Reaktion Primer eingesetzt wurden, an deren fragment-spezifische Sequenz eine nicht-humane M13-spezifische Sequenz (5'-CGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT-3') 5'-wärts vorgeschaltet war. An diese M13-Sequenz lagerten bei der Sequenzierungsreaktion M13-spezifische Sequenzier-Primer an. Hierbei waren die Sequenzier-Primer fluoreszenz(Cy5)-markiert, welches durch Laserbestrahlung zur Fluoreszenz angeregt werden kann und somit die PCR-Produkte bei ihrer Auftrennung im A.L.F. DNA Sequenzer detektierbar wurden. Die Sequenzierungsreaktion wurde mit Hilfe des *Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing* – Kit (Amersham) durchgeführt.

Die Zusammensetzung des Ansatzes der Sequenzierungsreaktion war wie folgt:

- 5 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- + 1 µl M13-Sequenzier-Primer (1 pmol/µl)
- + 2 µl Reaktionsmix (mit ddATP, ddCTP, ddGTP oder ddTTP)
- 8 µl Gesamtvolumen

Die Zyklen der Sequenzierungsreaktion waren:

1x	95°C	5 min.
30x	60°C	30 sec.
	95°C	30 sec.

Der Ansatz wurde nach Zugabe von 5 µl Stop-Lösung (Pharmacia) für 5 min. auf 95°C erhitzt und die Reaktion danach durch 5 min. auf Eis abgebrochen. Die Sequenz der amplifizierten DNA-Fragmente wurde durch Sequenzanalyse im A.L.F. Express DNA Sequenzer bestimmt. Die Rohdaten der Sequenzanalyse wurden mit Hilfe der A.L.F.win Sequence Analyser 2.00-Software (Pharmacia) ausgewertet.

2.8. Auftrennung von Nukleinsäurefragmenten

2.8.1. Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA-Fragmenten und PCR-Produkten wurden 1,0%-ige (w/v in TBE-Puffer) Agarosegele verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 2:1 mit Probenpuffer versetzt. Die Fragmentgrößenbestimmung wurde im Vergleich mit einer 1kb DNA-Leiter (Gibco BRL), die parallel zu den Proben aufgetragen wurde, durchgeführt. Die Gelelektrophorese erfolgte abhängig von der Größe der aufzutrennenden Fragmente bei 80 bis 100 V für 60 bis 90 min.. Zur Detektion der Fragmente wurde das Gel nach dem Lauf in einer Ethidiumbromid-Lösung (10 µg/ml) für 30 min. gefärbt. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 312 \text{ nm}$) wurde das interkalierte Ethidiumbromid zur Fluoreszenz angeregt und die Banden konnten so nachgewiesen werden.

Probenpuffer: 7 M Harnstoff
 40 % Glycerin
 50 mM EDTA, pH 8,0
 10 mM TRIS, pH 8,0
 0,1 % Bromphenolblau

2.8.2. Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf einem A.L.F. bzw. A.L.F. Express DNA Sequenzer (Pharmacia) fand bei der Quantifizierung von DNA-Fragmenten, sowie der Sequenzbestimmung von DNA-Abschnitten ihren Einsatz.

2.8.2.1. Aufbau und Lauf der Polyacrylamid-Gele

Zur gelelektrophoretischen Fragmentauftrennung mit Hilfe des A.L.F. (Express) DNA Sequenzierers wurde die Glasplattenvorrichtung des Gerätes gesäubert (mit dH₂O und Ethanol), wobei die Thermoplatte im oberen Viertel mit Bind-Silan-Lösung behandelt wurde, und zusammengesetzt (0,5 mm „Spacer“). Die 6%-ige Polyacrylamid-Lösung mit 7 M Harnstoff wurde hergestellt, indem die Polyacrylamid-Stammlösung mit 25 ml dH₂O und 5 g Amberlite (Pharmacia) für 10 min. verrührt, danach in vorfiltriertes TBE filtriert und für 5 min. entgast wurden. Schließlich wurden 10%-iges APS und TEMED zugegeben. Nach dem Giessen in die Glasplattenvorrichtung polymerisierte die Gellösung für 2 Std. aus. Für die Gele zur Quantifizierung wurde eine Polyacrylamid-Stammlösung mit einem (N,N-Methylen-) Bisacrylamid/Acrylamid-Verhältnis von 1:29, für die Sequenzanalyse eine Stammlösung mit einem Verhältnis von 1:19 verwendet.

Bind-Silan-Lösung	4 ml abs. Ethanol 15 µl Bind-Silan (Pharmacia) 1 ml 10% Essigsäure
Polyacrylamid-Lösung	25,2 g Harnstoff (Sigma) 9 ml Polyacrylamid-Stammlösung (40%) (Sigma) 25,5 ml d H ₂ O 6 ml 6 x TBE-Puffer 0,2 ml 10% APS (Pharmacia) 40 µl TEMED (BioRad)
Probenauftragungspuffer	100 ml Formamid (durch 2 Std. Rühren mit 5 g Amberlite deionisiert) 600 µg Dextranblau 4 ml 20 mM EDTA, pH 8,3

Für die Auftrennung wurden die DNA-Fragmente in dH₂O verdünnt (1:2 bis 1:50). 5,5 µl der verdünnten Fragment-Lösungen wurden mit 5,5 µl Auftragungspuffer gemischt. Vor dem Lauf wurden die Proben für 5 min. bei 95°C denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Als Laufpuffer wurde 0,6 x TBE verwendet.

Die Laufbedingungen waren:

	Fragmentanalyse	Sequenzanalyse
max. Spannung	1500 V	1500 V
max. Stromstärke	34 mA	34 mA
max. Leistung	38 W	30 W
Temperatur	40°C	50°C
Laufzeit	200 – 300 min.	180 – 360 min.

Die Fragmentanalysen fanden auf dem A.L.F. DNA Sequenzierer, die Sequenzanalysen auf dem A.L.F. Express DNA Sequenzierer statt. Zur Detektion mittels Fluoreszenzanregung durch einen Laser waren die aufzutrennenden Fragmente fluoreszenz(Cy5)-markiert.

2.9. Reportergen-Assays

Die Reportergenassays dienen dazu, die Wirkungen verschiedener Faktoren auf einen Promoter, durch den die Transkription des Reportergens gesteuert wird, zu verdeutlichen.

2.9.1. Klonierung von DNA-Fragmenten

Diese Technik wurde dazu eingesetzt, um DNA-Fragmente (z.B. PCR-Produkte) in Plasmid-Vektoren einzubauen. Der Restriktionsverdau wurde zusätzlich dazu verwendet, DNA-Fragmente aufgrund ihres Restriktionsstellenmusters zu überprüfen.

2.9.1.1. Restriktionsverdau

Bei der Restriktion wurden 1–5 µg Nukleinsäure durch 10 U eines bestimmten Restriktionsenzym verdaut. Die Reaktion fand unter den für das jeweilige Enzym spezifischen Pufferbedingungen und bei 37°C für 1 Std. statt. Bei Restriktionen mit mehreren Enzymen wurden die Reaktionen parallel unter den für alle Enzyme idealen Pufferbedingungen vollzogen.

2.9.1.2. Ligation

Bei der Ligation von DNA-Fragmenten in Vektoren wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1 : 3 verwendet. Die einzusetzende Menge Insert-DNA errechnete sich aus der Gleichung :
[(a ng Vektor-DNA x b kb Insert-Größe) / c kb Vektor-Größe] x Insert-Vektor-Verhältnis = y ng Insert-DNA.

Der Ligationsansatz war:

1 µl 10x T4 DNA Ligase Puffer (Gibco)
x µl Vektor-DNA
y µl Insert-DNA
1 µl T4 DNA Ligase (Gibco)
add. 10 µl dH₂O

Die Reaktion verlief über Nacht (ü.N.) bei 4°C. Der Ligationsansatz konnte direkt in einer Transformation eingesetzt werden.

2.9.2. Plasmidpräparation

(a) Herstellung kompetetiver Zellen (*E. coli*)

E. coli-Zellen wurden über Nacht bei 37°C in 10 ml LB-Medium vorkultiviert. 500 ml LB-Medium wurden mit diesen 10 ml angeimpft, bis zu einer OD von 0,6 bei 37°C wachsen ge-

lassen und auf Eis für 10 min. abgekühlt. Die Zellen wurden bei 4000 xg für 10 min. bei 4°C abzentrifugiert, in 500 ml eiskaltem H₂O gewaschen, erneut abzentrifugiert, in 250 ml H₂O gewaschen und wiederum abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in dem 1,5-fachen Volumen 15% Glycerin resuspendiert und 50 µl Aliquots der Zellsuspension wurden mit -80°C-kaltem Isopropanol schockgefroren und bei -80°C gelagert.

LB-Medium: 1% Trypton
 0,5% Hefeextrakt
 0,5% NaCl

(b) Transformation durch Elektroporation

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden diese in kompetente *E. coli*-Zellen des Stammes XL1-blue durch Elektroporation eingeschleust. Für die Elektroporation wurden 1–2 µl Plasmid-DNA-Lösung mit 50 µl Zellsuspension vermischt und in eine eisgekühlte 0,2 cm-Elektroporationsküvette (BioRad) gegeben. Die Elektroporationsküvetten wurden zuvor mit dH₂O gespült und 20 min. mit UV-Licht bestrahlt, um eventuelle DNA-Reste zu inaktivieren. Nach kurzer Zeit auf Eis wurde die Küvette in den Elektroporator (BioRad Gene Pulser) eingesetzt. Die Einstellungen des Pulsgebers waren 25 µF, 200 Ω und 2,50 kV. Nach dem elektrischen Puls wurde direkt 1 ml SOC-Medium zugegeben, die Zellen kurz suspendiert und die Suspension auf Eis kurz abgekühlt. Es folgte eine Regenerationsphase bei 37°C für 1 Std.. Verschiedene Mengen der Zellsuspension wurden auf LB-Platten mit Ampicillin ausgesät und ü.N. bei 37°C inkubiert. Einzelne Kolonien wurden gepickt und 10 ml LB_{Amp}-Medium damit beimpft. Nach Inkubation ü.N. bei 37°C wurde 1 l LB_{Amp}-Medium mit 1 ml der Über-Nacht-Kultur beimpft. Die Zellen wurden bis zu einer OD von 0,6 bei 37°C wachsen gelassen.

SOC-Medium: 2% Trypton 10 mM MgCl₂
 0,5% Hefeextrakt 10 mM MgSO₄
 10 mM NaCl 20 mM Glucose
 2,5 mM KCl

LB-Medium mit Ampicillin 100 mg Ampicillin / 1 l LB-Medium

(c) Plasmidisolierung

Die Plasmidpräparation aus der Bakterienkultur erfolgte mit Hilfe des QIAfilter Plasmid Midi-Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers.

2.9.3. Transfektionen und Hormonbehandlung

(a) mit Fugene 6-Transfektionsreagenz (Roche)

Die zu transfizierenden Zellen wurden nach Kultivierung in Nährmedium mit 10% CCS-FCS (mind. 24 Std.) wie unter 2.3.6.2. beschrieben ausgesät. Mind. 24 Std. vor der Transfektion wurde das Medium in den 6-Loch-Platten erneuert. Der Transfektionsansatz wurde separat angesetzt (einer für jedes Loch): 1-3 μl Fugene 6-Reagenz wurden direkt in ein Eppendorfgefäß mit 60–100 μl serum-freiem Medium (OPTI-MEM I, Gibco) gegeben und 5 min. bei Raumtemperatur inkubiert. 0,5–2 μg Gesamt-(Plasmid-)DNA-Lösung wurden in ein zweites Eppendorf-Gefäß gegeben, das verdünnte Fugene 6-Reagenz tropfenweise hinzugefügt, beides vermischt und für 15 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Das genaue Mengenverhältnis von DNA zu *Fugene*-Reagenz mußte für jede Zelllinie einzeln optimiert werden. Das DNA-*Fugene*-Gemisch wurde tropfenweise zu den Zellen in das Kulturmedium gegeben. Nach 24 Std. Inkubation wurde das Medium mit unterschiedlichen Hormonlösungen (oder EtOH zur Kontrolle) zu unterschiedlichen Endkonzentrationen versetzt. Wiederum wurde für 24 Std. inkubiert und die Zellen dann geerntet.

(b) mit Lipofectamine (Promega)

Die Zellen wurden wie unter (a) beschrieben herangezogen. Vom Lipofectamine-Transfektionsagens 2-25 μl in 100 μl serum-freies Medium (MEM I, Gibco) verdünnt. Parallel dazu wurden 1-2 μg DNA in 100 μl des serum-freien Mediums gegeben. Beide Verdünnungen wurden vermischt und für 15-45 min. bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurden das Medium von den zu transfizierenden Zellen entfernt und diese mit PBS gespült. Nach Zugabe von 800 μl serum-freien Mediums zu der DNA-Lipofectamine-Lösung wurde diese auf die gespülten Zellen gegeben. Nach 6 Std. Inkubation wurde 1 ml Medium mit zweifacher Serumkonzentration (20%) oder serum-freies Medium zugegeben und ü.N. inkubiert. Nach Entfernen des Mediums mit dem Transfektionsagens wurden die Zellen gespült und mit Medium versetzt, welches Hormone (oder EtOH zur Kontrolle) in entsprechenden Konzentrationen enthielt. Nach 24 Std. Inkubation wurden die Zellen geerntet.

2.9.4. Ernte der transfizierten Zellen

Das Kulturmedium wurde von den Zellen abgenommen und diese zweimal mit PBS gespült. Nach Zugabe von 100 μl Lysispuffer (Promega) und Inkubation für 10 min. wurden die Zellen mit Hilfe eines Zellschabers vom Boden der 6-Loch-Platte abgekratzt. Die

Zellsuspension wurde in ein Eppendorf-Gefäß überführt, kurz geschüttelt und konnte bei –80°C gelagert werden.

Lysispuffer: unmittelbar vor dem Einsatz wurde der Lysispuffer mit 1 µl pro ml Gesamtvolumen 1 M DTT versetzt.

2.9.5. Messungen der Chemolumineszenz

Die Aktivität der Luciferase diente als Reporter für die Stärke des vorgeschalteten Promoters, die der β-Galactosidase als Referenz für die Transfektionseffizienz. Beide Messungen wurden in einem Luminometer (Lumat LB 9507; EG&G Berhold) durchgeführt.

(a) Messung der Luciferase-Aktivität

In ein Messröhrchen (75x12 mm, Sarstedt) wurden 20 µl Zellysat vorgelegt und das Röhrchen in das Luminometer gestellt. Durch automatische Injektion wurden 100 µl Luciferase Assay – Reagenz (Promega) zu dem Lysat gegeben. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte 30 sec. nach der Injektion.

Luciferase Assay – Reagenz: Das lyophilisierte Substrat wurde in 10 ml Luciferase Assay-Puffer gelöst, in 1 ml Aliquots aufgeteilt und bei –80°C gelagert.

(b) Messung der β-Galactosidase-Aktivität

In einem anderen Meßröhrchen wurden 10 µl Zellysat vorgelegt und 100 µl Galactolight Assay–Reaktionspuffer (Tropix) hinzupipettiert. Die Mischung wurde für 1 Std. bei RT in einem Meßröhrchen inkubiert und dieses zur Messung in das Luminometer gestellt. Durch automatische Injektion wurden 100 µl Light Emission Accelerator II (Tropix) zugegeben. Die Messung der Chemilumineszenz erfolgte nach 10 sec..

2.10. Immunhistologie

Immunhistologische Untersuchungen wurden an Zelllinien, an Paraffin-eingebettetem oder an schockgefrorenem, gefriereschnittenem Gewebe durchgeführt.

2.10.1. Vorbereitung der Gewebe und Zellen

(a) Zellen aus Stimulationskinetiken

Die immunhistologisch zu untersuchenden Zellen waren aufgrund ihres Wachstums an den Objektträgern nur locker adhärent. Nach Entfernen des Kulturmediums wurden die

Objektträger mit den Zellen kurz in einer Glasküvette mit PBS gespült. Danach wurden die Zellen für 1 std. in 4% Paraformaldehyd-Lösung fixiert. Nach kurzem Spülen mit PBS wurden sie direkt immunhistologisch untersucht oder in Aufbewahrungsmedium bei -20°C (bis zu drei Monate) gelagert.

4% Paraformaldehyd-Lösung: in 0,1M PBS,
üN bei $60-63^{\circ}\text{C}$ im Brutschrank depolymerisieren;

Aufbewahrungsmedium: 42,8 g Sucrose
0,33 g $\text{MgCl}_2 (6x\text{H}_2\text{O})$
→ in 250 ml PBS lösen
+ 250 ml Glycerin, gut vermischen bis keine
Phasentrennung mehr zu erkennen ist;

(b) Schnitte vom Paraffin-eingebetteten Gewebe

Das chirurgisch entnommene Gewebe wurde direkt in gepuffertes Formalin gegeben und in Paraffin eingebettet. Von den paraffin-eingebetteten Geweben wurden mit einem Mikrotom (Leica Jung RM 2045) $2\ \mu\text{m}$ -Schnitte angefertigt, welche zuerst auf der Oberfläche eines kalten Wasserbades gesammelt wurden. Dann wurden sie auf Adhäsions-Objektträger (Histobond) aufgezogen, durch kurzes Eintauchen in ein 55°C -warmes Wasserbad geglättet und nach 2 min auf einer 55°C -warmen Heizplatte getrocknet. In dieser Form sind die Schnitte bei Raumtemperatur haltbar.

(c) Gefrierschnitte vom schockgefrorenen Gewebe

Gefrierschnitte wurden von Geweben angefertigt, die direkt nach ihrer operativen Entnahme in flüssigem Stickstoff schockgefroren und dann bei -80°C gelagert wurden. Die Gewebe wurden in einem Tropfen Leitungswasser auf einer Gewebehalterung festgefroren. Die Halterung wurde in ein Mikrotom mit Kühlkammer (Leitz, Kryostat 1720) eingespannt und dann $3\ \mu\text{m}$ -Schnitte davon angefertigt. Die Schnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und durch kurzes Schwenken in Methanol fixiert. Danach wurden die Schnitte kurz luftgetrocknet und bei -20°C gelagert.

2.10.2. HE-Färbung

Zur genauen Bestimmung der Histologie der Schnitte und zur Charakterisierung der Zyklusphase des endometrialen Gewebes wurden von den Gewebeschnitten Hämalaun-Eosin-

Färbungen angefertigt. Das Hämalaun bewirkte dabei eine Kernfärbung, das Eosin eine Färbung des Cytoplasmas.

Die Schnitte wurden für mindestens 25 min. in Xylol entparaffinisiert und ihnen dann durch eine absteigende Alkoholreihe Wasser zugeführt [99% → 95% → 80% → Leitungswasser (LW)]. Nach 7 min. in Hämalaun-Lösung (nach Mayer) wurden die Schnitte mit LW gespült, in einem Differenzierungsbad (70%Ethanol : HCl-Ethanol 4:1) für 5 min. inkubiert, zweimal mit LW gespült und für 10 min. in LW „gebläut“. Nach 60 sec. Inkubation in Eosin-Lösung wurden die Schnitte mit LW gespült, und durch eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert. Sie wurden kurz in Karboxylol getaucht und dann bis zum Eindecken in Xylol gelagert. Abschließend wurden die gefärbten Schnitte mit dem wasserunlöslichen Eindeckmedium Eukitt (O. Kindler GmbH) unter einem Deckglas eingedeckt und ü.N. getrocknet.

Eosin-Lösung: 1% Eosin (w/v) in abs. EtOH, Zugabe von wenigen Tropfen 96% Essigsäure (bis zur Klärung der Lösung)

2.10.3. Immunhistochemische Färbung

Die immunhistochemische Färbung wurde zum Nachweis von Proteinen in bestimmten Geweben oder Zellen durchgeführt. Dem Nachweissystem lag die LSAB-Methode (*Labeled StreptAvidin-Biotin Staining*) zugrunde. Hierbei wird ein Protein-spezifischer Primärantikörper durch einen Biotin-gekoppelten Sekundärantikörper gebunden, an den ein Streptavidin-alkalische Phosphatase(AP)-Konjugat anlagert. Durch die Aktivität der alkalischen Phosphatase wird das Substrat Neufuchsin zu einem unlöslichen Farbstoff umgesetzt.

Zum Nachweis von Steroidrezeptoren und Steroidrezeptorkoaktivatoren, sowie den Markern für Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose wurden die in Tabelle 2.1. aufgelisteten Primärantikörper verwendet.

(a) von Schnitten aus paraffin-eingebettetem Gewebe

Die Gewebeschnitte wurden für mind. 25 min. in Xylol entparaffinisiert und in einer absteigenden Alkoholreihe (je 2 min. 99%, 96%, 80%EtOH, 1xPBS) rehydriert. Da die Fixierung mit Formalin zu einer Maskierung der Antigene aufgrund intermolekularer Vernetzungen führen kann, wurde eine Antigendemaskierung im Mikrowellenofen durchgeführt. Hierbei wurden die Objektträger in ein Plastikkuvette gestellt und diese vollständig mit Antigen-Demaskierungs-Puffer (*antigene retrieval buffer*, Biogenex) aufgefüllt. Die Küvetten wurden in eine halb mit Wasser gefüllte Plastikbox gestellt, deren Deckel Luftlöcher enthielt.

Antikörper	Antigen	Spezies	Verdünnung	Hersteller
ER88	ER α	Maus-anti-Human	1 : 80	BioGenex
PR88	PR	Maus-anti-Human	1 : 80	BioGenex
sc-6820	ER β	Ziege-anti-Human	1 : 500	Santa Cruz Biotech
sc-6097	SRC-1	Ziege-anti-Human	1 : 800	Santa Cruz Biotech
sc-7217	AIB1 (RAC3)	Ziege-anti-Human	1 : 800	Santa Cruz Biotech
sc-6976	TIF2 (GRIP1)	Ziege-anti-Human	1 : 800	Santa Cruz Biotech
PC10	PCNA	Maus-anti-Human	1 : 30	BioGenex
S5	ki-67	Schaf-anti-Human	1 : 50	Biozol
bcl-2(100)	bcl-2	Maus-anti-Human	1 : 5	BioGenex
A35-10	bcl-x	Maus-anti-Human	1 : 200	DAKO
BH1-3	bak	Kaninchen-anti-Human	1 : 400	DAKO
-	Laktoferrin	Kaninchen-anti-Human	1 : 10	DAKO
M30	CK18	Maus-anti-Human	1 : 20	Roche

Tabelle 2.1.: Die in den immunhistologischen Untersuchungen verwendeten Primärantikörper mit ihren Charakteristika.

Es wurde 3x für 7 min. aufgekocht, wobei zwischendurch das verkochte Volumen durch Zugabe von dH₂O aufgefüllt wurde. Danach wurden die Schnitte langsam abgekühlt. Die Objektträger wurden dann in eine Haltevorrichtung (*coverplate cassette*) eingespannt. Nach Spülen mit PBS wurden 100 μ l Primärantikörper-Verdünnung zugegeben und ü.N. bei 4°C inkubiert. Der weitere Nachweis wurde mit Hilfe des LSAB+-Kit, Alkalische Phosphatase/Neufuchsin (DAKO) durchgeführt, wobei die Methode aufgrund der Verwendung der Objektträgerkassette abgeändert wurde. Nach der Primärantikörper-Inkubation wurde mit PBS gespült, 20 min. mit dem Brückenantikörper inkubiert, erneut mit PBS gespült, mit Streptavidin-AP-Konjugat für 20 min. inkubiert und wiederum mit PBS gespült. Danach wurden die Schnitte mit 100 μ l 1M Levamisol-HCl (Serva) behandelt, um endogene AP-Aktivität zu inhibieren. Nach Spülung mit PBS wurden die Objektträger aus der Vorrichtung gelöst und in Feuchtkammern gelegt. Die Gewebe wurden nun mit Substrat-Chromogen-Lösung (vorbereitet nach Anweisung des Herstellers) für 10 min. inkubiert, mit dH₂O gespült und mit Hämalaun-Lösung gegengefärbt (s. 2.10.2.). Abschließend wurden die Gewebe mit dem wässrigen Eindeckmedium Aquamount (verbessert, Gurr BDH) eingedeckt und ü.N. getrocknet.

(b) von Gefrierschnitten und kultivierten Zellen

Die immunhistochemische Analyse von Gefrierschnitten und auf Objektträgern kultivierten Zellen wurde ebenfalls mit Hilfe des LSAB+ -Kit, AP/Neufuchsin (Dako) durchgeführt. Der Nachweis wurde in Feuchtkammern nach Anweisungen des Kit-Herstellers durchgeführt. Von dem Protokoll abgewichen wurde in drei Punkten: (1) Die Inkubation mit dem Primärantikörper fand [wie unter (a)] über Nacht bei 4°C statt; (2) Die Schnitte/Zellen wurde mit Levamisol behandelt [s. (a)]; (3) Gegenfärbung und Eindecken wurde wie unter (a) beschrieben durchgeführt.

(c) Auswertung der immunhistochemischen Färbungen

In die Wertung der immunhistochemischen Färbung gingen zwei Faktoren ein: die Verbreitung und die Intensität der Färbung. Die Verbreitung der Färbung wurde durch Auszählen der positiven Zellen bestimmt. Hierbei wurden an drei verschiedenen Stellen der Schnitte je nach Größe des Präparats 100 oder 300 Zellen ausgezählt. Der prozentuale Anteil positiver Zellen (P) wurde folgendermaßen gewertet: 0% positive Zellen = 0; <50% positive Zellen = 1; >50% positive Zellen = 2 (Koshiyama, 1996). Die Intensität der Färbung (I) wurde subjektiv an drei verschiedenen Stellen des Präparates bestimmt und wie folgt gewertet: keine Färbung = 0; schwache Färbung = 1; mittelstarke bis starke Färbung = 2 (Lessey, 1988; Göhring, 1993). Die Art des Signals (diffus, feingranulär oder punktförmig) wurde hier nicht gewertet. Für jedes Präparat wurde durch folgende Gleichung die Färbungsstärke (FS) bestimmt $FS_{\text{Präparat}} = P + I$. Die durchschnittliche Färbung, als Ausdruck des Vorkommens des spezifisch nachgewiesenen Proteins, wurde für die einzelnen Phasen des menstruellen Zyklus durch folgende Gleichung bestimmt: $FS_{\text{Phase}} = \sum FS_{\text{Präparat}} / \text{Anzahl der Präparate}$.

2.11. Mikroskopie

2.11.1. Lichtmikroskopie

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen wurden an einem Axiophote-Mikroskop (Axioplane2, Zeiss) durchgeführt. Über eine 3CCD Color Video Kamera (Sony) mit Computeranschluß wurden in Adobe Photoshop Software Fotodateien erstellt. Die Dateien stellten Vergrößerungen von 50-fach bis 1000-fach dar.

2.11.2. Elektronenmikroskopie und Rasterelektronenmikroskopie

Für die elektronen- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde die Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 für 7 Tage mit E2 (10^{-8}M) und RLX (10^{-6}M) inkubiert. Die Elektronenmikroskopie der behandelten Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Staneva-Dobrowski, Institut für Neuroanatomie, Zentrum für Anatomie und Hirnforschung, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf durchgeführt. Die rasterelektronenmikroskopischen Analysen wurden von Dr. Ivo Christov, Institut für experimentelle Morphologie, Bulgarische Akademie der Wissenschaften, Sofia (Bulgarien) durchgeführt.

2.12. Statistik

Die statistischen Auswertungen und Vergleiche von Meßdaten und klinischen Parametern wurden mit Hilfe der SPSS 10.0 durchgeführt.

Zur Bestimmung der Zusammenhänge zwischen zwei Reihen von nicht-normalverteilten Variablen wurde die Spearman Rangkorrelation verwendet. Der Korrelationskoeffizient hat einen Wert zwischen +1 und -1, wobei Werte nahe 1 einen starken und nahe 0 einen schwachen Zusammenhang bedeuten. Ist der Wert negativ bedeutet das einen gegenläufigen Zusammenhang.

Während die Korrelationsrechnung die Stärke des Zusammenhangs zwischen zwei Variablen ermittelt, dient die Regressionsanalyse dazu, die Art des Zusammenhangs aufzudecken bzw. Möglichkeiten an die Hand zu geben, den Wert einer Variablen aus den Werten anderer Variablen vorherzusagen.

Die Signifikanz einer Aussage wird durch die Irrtumswahrscheinlichkeit p ausgedrückt, wobei $0 \leq p \leq 1$ gilt. Nach einheitlichem Sprachgebrauch werden Aussagen, die mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,05$ behaftet sind, als signifikant bezeichnet. Solche mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit $p \leq 0,01$ heißen sehr signifikant und solche mit $p \leq 0,001$ höchst signifikant.

3. Ergebnisse

3.1 (Anti-)Östrogene Effekte auf die Expression von SRs und SRCs in Karzinomzelllinien

Als Hauptwirkmechanismus von Östrogenen gilt der Östrogenrezeptor-vermittelte Weg. Neben Genen, die ein ERE in ihrem Promoter enthalten, werden weitere Gene über andere regulatorische Elemente (z.B. AP-1-Elemente) oder über Protein-Protein-Interaktionen beeinflusst. Bei gemischten Antiöstrogenen spielt die Zusammensetzung der ER-Transaktivierungsmaschinerie eine entscheidende Rolle hinsichtlich einer östrogenen oder antiöstrogenen Wirkung. Hierbei spielt die Rekrutierung der Koaktivatoren eine entscheidende Rolle. Für die Koaktivatoren AIB1 und SRC-1 sind diesbezüglich dosisabhängige Wirkungen auf die Transaktivierung beschrieben (Anzick, 1997; Onate, 1995). Aufgrund dieser Dosisabhängigkeit wurde untersucht, in wie weit Tamoxifen und Raloxifen bzw. deren Derivate 4-Hydroxy-Tamoxifen und Raloxifen-Hydrochlorid einen Einfluß auf die Expression einzelner Komponenten der ER-Transaktivierungsmaschinerie, nämlich ER α , ER β , sowie der Koaktivatoren SRC-1, AIB1 und TIF2, und somit auf einen östrogenen oder antiöstrogenen Wirkmechanismus haben. Anhand der Expression des Progesteronrezeptors wurde eine Wirkung der Antiöstrogene auf ein östrogenreguliertes Gen untersucht.

3.1.1 Etablierung der quantitativen RT-PCR

Zur relativen Quantifizierung der RNA-Kopien der Zielgene und somit deren Expressionshöhe dient die quantitative RT-PCR (Niederacher, 1999b). Die Grundlage der Quantifizierung stellte die s.g. Multiplex-PCR dar, bei der ein Zielgen und ein Referenzgen in einer Reaktion koamplifiziert werden. Als Referenzgen wurde hierbei β -Actin verwendet (Kalkhoven, 1998). Die reverse Transkription wurde nach einem Standardprotokoll durchgeführt. Bei der folgenden Quantifizierung der PCR-Produkte mit Hilfe eines A.L.F. DNA Sequenzierers wurden die Signale der in der Reaktion amplifizierten Sequenzen nebeneinander detektiert. Da die Signale, und somit auch die damit verbundene Endmenge des Amplifikates, dabei in einem bestimmten Größen- bzw. Detektionsbereich liegen müssen, können zu große Expressionsunterschiede, also zu unterschiedliche Mengen an *template*-cDNA, dadurch ausgeglichen werden, daß bei der PCR-Reaktion ein Primerpaar zu einem späteren Zeitpunkt zugegeben wird und dieses somit mit einer geringeren Zyklenzahl amplifiziert wird, als das andere in der Reaktion eingesetzte Primerpaar. Dieses Vorgehen

wurde nach der *primer dropping*-Methode (Wong, 1994) durchgeführt. Die Kinetik der PCR-Reaktion und die davon abhängende Quantität des PCR-Produktes durfte hierbei lediglich durch die Anzahl der Kopien des Ziel-Gens vor der Reaktion limitiert sein, nicht aber durch andere Reaktionsparameter. Die Reaktionsbedingungen mußten daher für die PCR jedes Ziel-Gens so optimiert werden, daß sie die Reaktion in keiner Weise beeinflussten.

Die Optimierung der PCR-Reaktion wurde für die Expressionsmessung von ER α , ER β , PR, SRC-1, TIF2 und AIB1 durchgeführt. Hierfür wurde mRNA der Mammakarzinomzelllinie MCF7 verwendet. Der Ablauf der Optimierung wird im Folgenden exemplarisch für die Expressionsmessung von ER α verdeutlicht.

(1) Konstruktion der Primer

A. Östrogenrezeptor α (nach Greene, 1986/ Acc.Nr. M12674)

Die Primer wurden in Exon 4 und Exon 6 gelegt. Durch diese spezielle Lage kann eine Deletion des Exon 5 durch das Auftreten einer verkürzten Bande nachgewiesen werden. Zusätzlich konnte so die Qualität der Exon 5-Deletionsvariante mit der der Wildtyp-Sequenz in diesem Bereich direkt verglichen werden.

B. Östrogenrezeptor β (nach Mosselmann; 1996/ AccNr. X99101)

Die Primer für die ER β -Quantifizierung wurden in die F-Domäne gelegt, da hier der Unterschied zum ER α und somit die Spezifität am größten ist. Nach Moore *et al.* (1998) treten neben der Wildtypsequenz in diesem Bereich verschiedene variante Sequenzen auf. Die durch das gegebene Primerpaar amplifizierte Sequenz tritt nur in der von Mosselman *et al.* (1996) beschriebenen Sequenz (nach Moore: ER β 1) auf. Aufgrund unterschiedlicher Einbeziehung der Varianten können Unterschiede der Quantitäten zu Meßergebnissen anderer Arbeitsgruppen auftreten.

C. Progesteronrezeptor (Misrahi, 1987/ Acc.Nr. M15716)

Die PR-spezifischen Primer wurden so gelegt, daß die Gesamtexpression der mRNAs der Varianten PR-A und PR-B bestimmt wurde.

D. *amplified in breast cancer* (Anzick, 1997/ Acc. Nr. AF012108)

Durch das AIB1-spezifische Primerpaar wurde ein Sequenzbereich aus der Serin- und Threonin-reichen Region amplifiziert, der die Rezeptorinteraktionsdomäne I, das erste

LLXXL-Motiv, enthält. Dieses Motiv ist für die Verstärkung der ER-vermittelten Transaktivierung von besonderer Bedeutung (Heery, 1997).

E. steroid receptor coactivator-1 (nach Kalkhoven, 1998/ Acc.Nr. AJ000881 und AJ000882)

Die Primer für die SRC-1-Bestimmungen lagen C-terminal und wurden von Hayashi et al. (1997) konstruiert, um die funktionell unterschiedlichen SRC-1-Spleißvarianten a und e unterscheiden zu können.

F. transcriptional intermediary factor (nach Voegel, 1996/ Acc.Nr. X97674)

Die TIF2-Primer wurden in einen Bereich mit nur geringer Homologie zu den Sequenzen der anderen SRCs, AIB1 und SRC-1, gelegt. Der amplifizierte Bereich beginnt 5'-wärts in der PAS-Domäne B und verläuft weiter in einen Bereich ohne bisher bekannte Funktionalität.

Name	Primersequenz (5' -> 3')	Position	Größe (bp)
β-Actin-5'	Cy5-ATTTGCGGTGGACGATGGAG	1193-1174	446
β-Actin-3'	AGAGATGGCCACGGCTGCTT	748-767	
β-Actin 321-A	GAAGTCCAGGGCGACGTAGCAC	742-721	321
β-Actin 321-S	Cy5-AGGCCAACCGCGAGAAGATGACC	411-433	
AIB1-rev	GTCACTGAGGTGATCTCTGC	1966-1985	169
AIB1-uni2	Cy5-TACTCTGTCATCACCAGGCC	1817-1836	
ERα-5'	Cy5-GGAGACATGAGAGCTGCCAAC	1142-1162	250
ERα-3'	CCAGCAGCATGTCTGAAGATC	1561-1580	
ERβ-uni	TGCTTTGGTTTGGGTGATTGC	1164-1184	259
ERβ-rev	Cy5-TTTGCTTTTACTGTCCTCTGC	1402-1422	
GAPDH-195-A	CAAAGTTGTCATGGATGACC	565-546	195
GAPDH-195-S	Cy5-CCATGGAGAAGGCTGGGG	371-388	
γ-IFN-5'	Cy5-AGTGATGGCTGAACTGTCCG	4647-4666	85
γ-IFN-3'	CTGGGATGCTCTTCGACCT	4731-4713	
PgR-5'	AAAGTGCTGTCAGGCTGGC	2050-2068	222
PgR-3'	Cy5-ATCACATCTGGTTCAATGCTC	2271-2251	
SRC1-S2	Cy5-CTCTCATCCACTGACCTTCTC	4312-4332	274 (1e)
SRC1-A	TTGTTATTCAGTCAGTAGCTG	4564-4585(1e)	217 (1a)
		4510-4528(1a)	
TIF2-5'	Cy5-GTATTCAGAAGTTCCATGCGC	1070-1090	262
TIF2-3'	GTTTGTCCAGTCAGATCCGG	1312-1331	

Tabelle 3.1.: Namen, Sequenzen, Positionen und Größen der Amplifikationsprodukte für die bei der quantitativen RT-PCR bzw. bei der quantitativen differentiellen PCR eingesetzten Primerpaare.

Die Korrektheit der durch die jeweiligen Primerpaare amplifizierten Sequenzen wurde durch Sequenzierung des Amplifikates bestimmt. Bei allen Primerpaaren wurde die gewünschte Sequenz als einziges PCR-Produkt detektiert.

(2) Zyklenzahl

Die Anzahl der Zyklen, die die PCR durchlaufen soll, muß so gewählt sein, daß sie bei logarithmischer Auftragung im linearen Bereich liegt. In diesem Bereich ist die Kinetik der Reaktion so, daß von der Anzahl der Kopien am Ende der Reaktion auf die Anzahl der Kopien vor der Reaktion geschlossen werden kann.

(3) Primerkonzentration

Die Menge an Primern, die der Reaktion zugefügt sind, darf nicht zu gering sein, da hierdurch die Reaktion limitiert werden würde. Bei zu großer Primermenge würde es zu unspezifischen Bindungen und fehlerhafter Amplifikation kommen und die Primer sich gegenseitig bei der Bindung behindern.

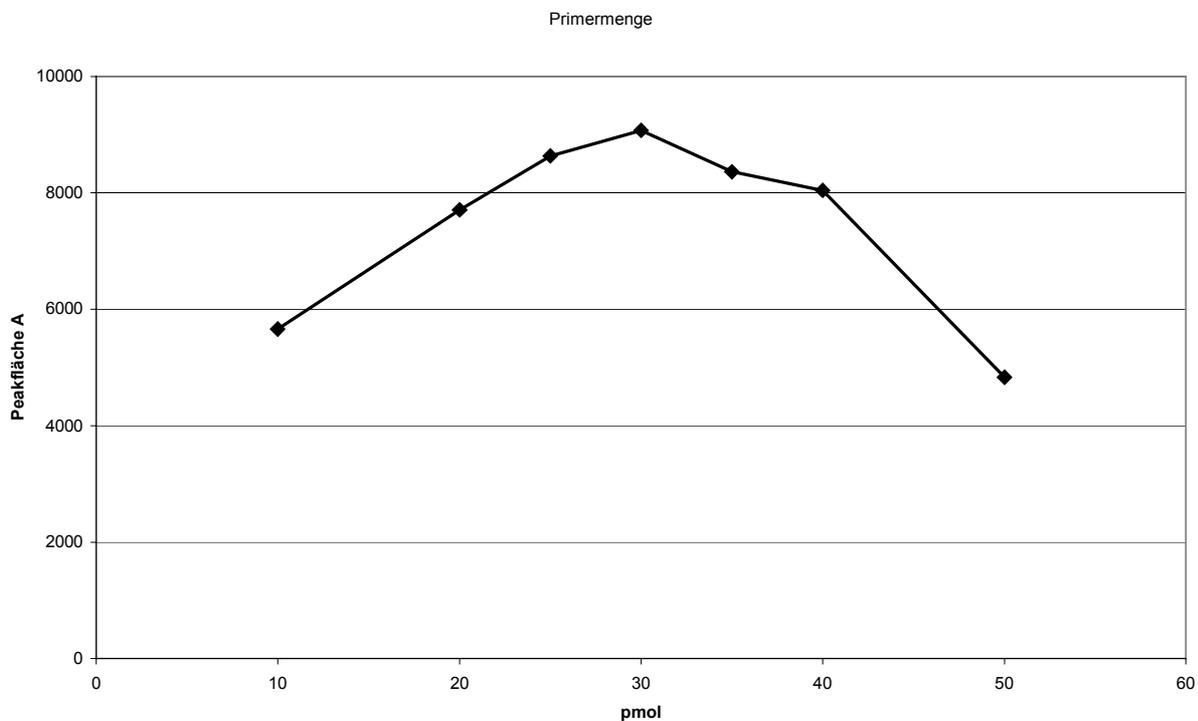


Abb.3.1.: Abhängigkeit der PCR-Produktmenge von der Primermenge. Die Primermenge (x-Achse) ist gegen die Signalfläche (y-Achse) aufgetragen. Im Bereich 25 bis 40 pmol ist die Menge gebildeten PCR-Produkts unabhängig von der eingesetzten Primermenge.

(4) dNTP-Menge

Eine zu geringe Konzentration an Nukleotiden inhibiert die Reaktion und eine zu große würde zu häufigen Fehlpaarungen führen und so die Reaktion wiederum inhibieren.

(5) *template*-Menge

Die Menge an eingesetzter *template*-DNA muß so gewählt sein, daß eine Amplifizierung der Zielsequenz im gegebenen Volumen gut möglich ist.

(6) *annealing*-Temperatur

Die *annealing*-Temperatur muß so gewählt sein, daß alle Primer spezifisch binden. Die *annealing*-Temperatur kann von vornherein bei der Konstruktion der Primer für alle Primer in den gleichen Bereich gelegt werden (hier : 58°C).

(7) Enzym-Menge

Eine zu geringe Enzymmenge würde die Linearität des Reaktionsablaufes verhindern, da ab einer bestimmten Menge an *template* –Sequenzen das Limit der Reaktionskinetik erreicht ist und nicht mehr jedes *template* weiteramplifiziert würde. Eine zu große Menge an *Taq*-Polymerase würde zu unspezifischen Reaktionen führen, die ebenfalls die Kinetik der Reaktion negativ beeinflussen würden.

(8) Optimierte PCR-Bedingungen

Durch die Optimierung ergaben sich für die einzelnen Zielgene folgende PCR-Ansätze und –bedingungen (Bei den Zyklenzahlen gibt die erste Zahl die Zyklen des Zielgens und die zweite die Zyklen des Referenzgens an.):

Zielgen	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
Östrogenrezeptor α	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 30 pmol ER α -Primer je 25 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 35/27x 45 sec. 94°C 1 min. 58°C 1 min. 72°C 1x 8 min. 72°C
Östrogenrezeptor β	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 35 pmol ER β -Primer je 20 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 40/27x 1 min. 94°C 1 min. 58°C 1 min. 72°C 1x 8 min. 72°C
Progesteronrezeptor	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 30 pmol PR-Primer je 30 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 32/27x 45 sec. 94°C 1 min. 58°C 1 min. 72°C 1x 8 min. 72°C
SRC-1	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 35 pmol SRC-1-Primer je 30 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 34/27x 1 min. 94°C 1 min. 58°C 1m.30s. 72°C 1x 8 min. 72°C
TIF2	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 30 pmol TIF2-Primer je 30 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 29x 45 sec. 94°C 1 min. 58°C 1m.15s. 72°C 1x 8 min. 72°C
AIB1	150 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 30 pmol AIB1-Primer je 20 pmol β -Actin-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 32x 1 min. 94°C 1 min. 58°C 1 min. 72°C 1x 8 min. 72°C

Tabelle 3.2.: Optimierte PCR-Bedingungen für die quantitative Bestimmung mittels pRT-PCR.

3.1.2 Expressionskinetiken in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa

Zur Bestimmung der Effekte von (Anti-)Östrogenen auf die Expression von Steroidrezeptoren und Steroidrezeptor-Koaktivatoren in Endometriumkarzinomen wurden die Expressionshöhen in der EC-Zelllinie Ishikawa unter hormonellem Einfluß untersucht. Die relativen Expressionswerte (RE) wurden nach 4, 8, 12, 24 und 48 Stunden Inkubation mit E2 (10^{-8} M), TAM, OHT, RLX und RLX-HCl (jeweils 10^{-6} M) bestimmt. Über Expressionsveränderungen sollten die Verhältnisse (REV) zwischen den REs der behandelten und der nicht-behandelten Proben Aufschluß geben : $REV = RE_{\text{behandelt}} / RE_{\text{unbehandelt}}$. Als Veränderung der Expression wurden REVs eingestuft, die um die 2-fache Standardabweichung des RE der unbehandelten Kontrollprobe zum jeweiligen Zeitpunkt abwichen. REVs innerhalb eines Schwankungsintervalls von $1 \pm (2 \times SA)$ stellten keine Veränderung dar.

In den folgenden Tabellen (Tab. 3.3 bis 3.22) werden REVs, die um die 2- bis 4-fache Standardabweichung über- oder unterschreiten, **gelb** gekennzeichnet. Bei größerer Abweichung als der 4-fachen Standardabweichung sind die REVs **rot** hervorgehoben.

(A) Progesteronrezeptor

Durch die Bestimmung der PR-Expression sollte die hormonelle Stimulation eines östrogenresponsiven Gens aufgezeigt werden. Die Kontrollexpressionswerte des nicht-inkubierten Ansatzes wurden als „1“ definiert. Die Standardabweichung war 0,15. Es ergaben sich folgende Expressionsverhältnisse (Tab.3.3.):

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,84	1,21	0,95	1,11	1,05
8	1,00	1,11	0,94	1,22	1,17
12	1,33	1,06	0,94	1,17	1,00
24	1,23	1,23	1,14	1,14	0,86
48	1,46	1,08	1,08	1,00	0,92

Tabelle 3.3.: Die Verhältnisse (REV) der Expressionen des Progesteronrezeptors in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in std.) zwischen (anti-)östrogen behandelten und unbehandelten Zellen.

Es zeigt sich eine schwache Stimulation der PR-Expression durch E2 nach 12 und 24 Stunden Inkubationsdauer (Abb.3.2a). Die Antiöstrogene TAM und OHT (Abb.3.2b/c), sowie RLX und RLX-HCl (Abb.3.2d/e) bewirken keine Unterschiede von der Expressionen in den Kontrollproben.

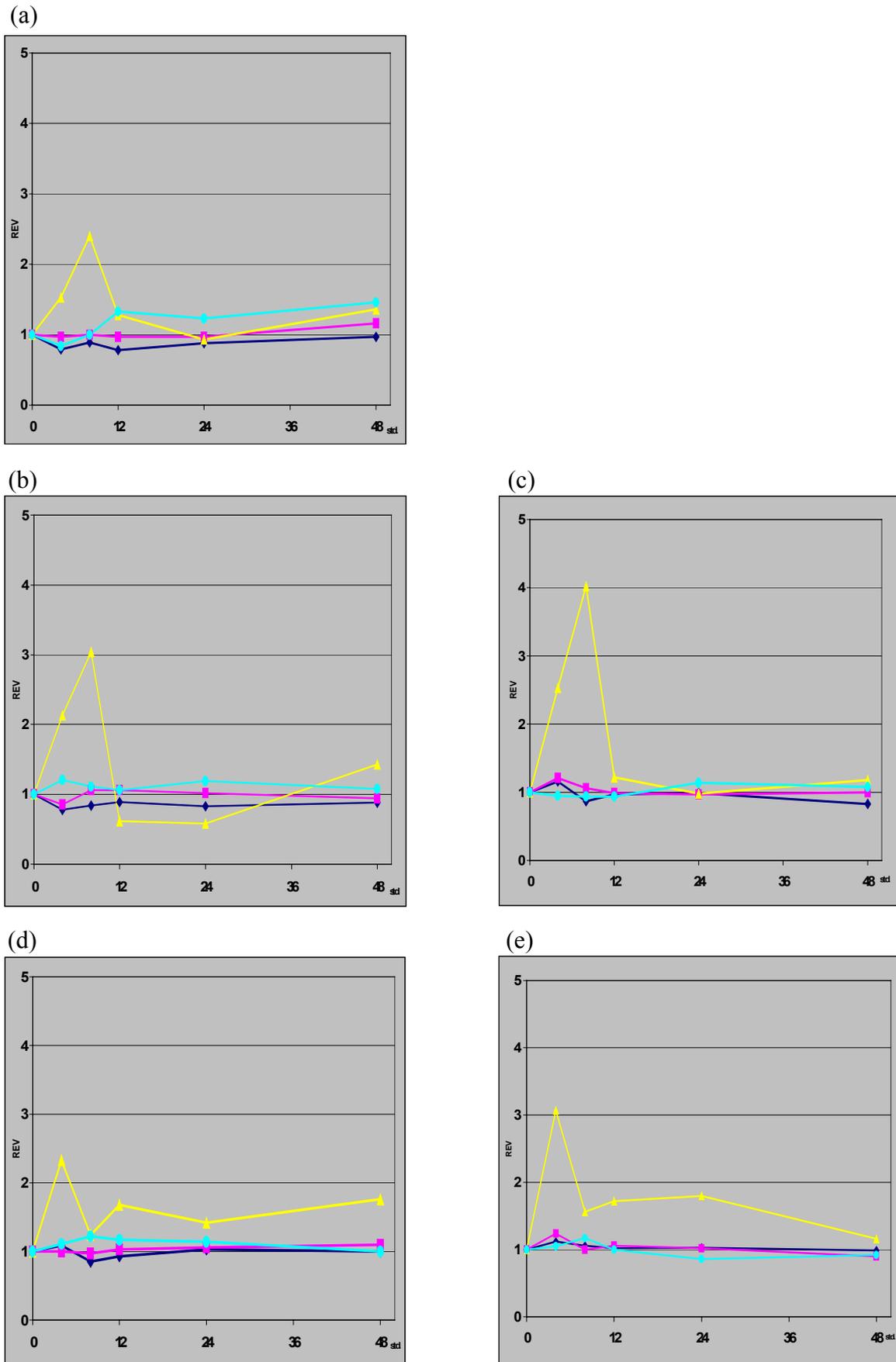


Abb. 3.2. (a) – (e) : Expressionskinetiken der Steroidrezeptoren ER α (- \blacklozenge -), ER α Δ Exon5 (- \blacksquare -), ER β (- \blacktriangle -) und PR (- \bullet -) in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa unter Inkubation mit (a) E2, (b) TAM, (c) OHT, (d) RLX und (e) RLX-HCl.

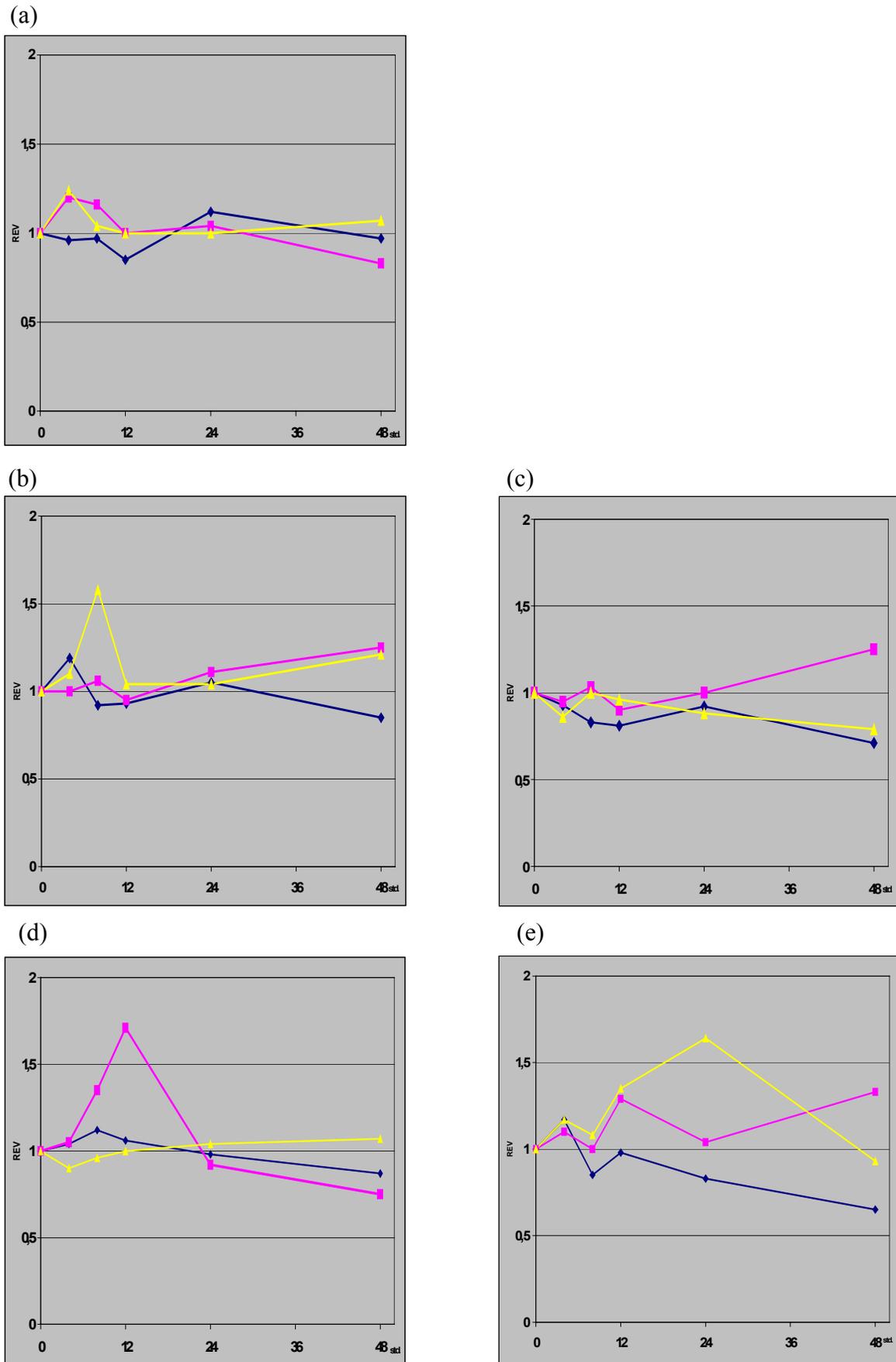


Abb.3.3.(a)-(e): Expressionskinetiken der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1 (◆), SRC-1e (■) und SRC-1a (▲) in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa unter Inkubation mit (a) E2, (b) TAM, (c) OHT, (d) RLX und (e) RLX-HCl.

(B) Östrogenrezeptor α

Der Östrogenrezeptor α ist von beiden ER-Subtypen der im Endometrium stärker exprimierte (Matsuzaki, 1999). Die Standardabweichung der ER α -Meßreihe (Tab.3.4.) lag bei 0,12. Somit wurden REVs größer 1,24 und kleiner als 0,76 als Expressionsveränderung eingestuft.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,97	0,78	1,16	1,09	1,12
8	0,89	0,84	0,87	0,85	1,06
12	0,78	0,89	0,97	0,93	1,02
24	0,88	0,83	0,99	1,03	1,03
48	0,97	0,88	0,83	1,00	0,99

Tabelle 3.4.: Die Verhältnisse (REV) der Expressionen des Östrogenrezeptor α in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in Std.) zwischen (anti-)östrogen behandelten und unbehandelten Zellen.

Bei keiner der Kinetiken zeigt sich eine Beeinflussung der ER α -Expression durch Inkubation mit (Anti-)Hormonen. Bei den Behandlungen mit E2 und TAM zeigt sich lediglich jeweils eine leicht Tendenz zur Inhibition der Expression (Abb.3.2a/b).

Durch die spezielle Lage der Primer (in den Exons 4 und 6) wurde die Expression der Exon5-Deletionsvariante gesondert detektiert. Aufgrund der veränderten Aktivität dieser Varianten, könnte eine Veränderung des Verhältnisses zwischen den Mengen der Wildtyp-RNA und der Exon5-Spleißvariante auf eine Steigerung des karzinogenen Potentials hinweisen (Fujimoto, 1997b). Die Standardabweichung der ER α Δ Ex5-Spleißvarianten-Meßreihe (Tab.3.5.) war $\pm 0,13$. REVs niedriger als 0,74 und größer als 1,26 wurden als Beeinflussung des Expressionslevels gewertet.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,97	0,86	1,21	1,00	1,24
8	1,00	1,06	1,06	0,97	1,00
12	0,97	1,06	0,99	1,03	1,06
24	0,97	1,02	0,97	1,06	1,02
48	1,16	0,94	1,00	1,10	0,90

Tabelle 3.5.: Die Verhältnisse (REV) der Expressionen der Exon 5-Spleißvariante des Östrogenrezeptors in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa zu unterschiedlichen Zeitpunkten (in Std.) zwischen (anti-)östrogen behandelten und unbehandelten Zellen.

Aus den Messungen ergab sich, daß die Inkubation mit (Anti-)Östrogenen keinen Einfluß auf die Expression der ER α -Exon5-Spleißvariante hat (Abb.3.2a-e). Das Verhältnis zwischen der Expression des ER α -Wildtyp zu der der ER α -Exon5-Spleißvariante ($Q_{wt/\Delta Ex.5} = RE[ER\alpha-wt]/RE[ER\alpha \Delta Exon5]$) zeigte sich hierbei konstant gegenüber dem Verhältnis in den nicht-behandelten Kontrollproben.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,00	0,91	0,96	1,00	0,90
8	0,89	0,79	0,82	0,88	1,06
12	0,80	0,84	0,98	0,90	0,96
24	0,91	0,81	1,02	0,97	1,01
48	0,84	0,94	0,83	0,91	1,10

Tabelle 3.6.: Quotienten der relativen Expressionen (RE) von ER α und der ER α -Exon5-Deletionsvariante in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa im zeitlichen Verlauf (in Std.) nach Inkubation mit (Anti-) Östrogenen.

Für den Quotient der REs konnte bei allen Inkubationsreihen kein hormoneller Einfluß aufgezeigt werden (Tab.3.6.). In der Meßreihe mit nicht-behandelten Ishikawa-Zellen zeigte sich ein durchschnittlicher Quotient von ER α -wt/ER α Δ Exon5-Variante von 2,36. Dieses bedeutet, daß der ER α -Wildtyp etwa doppelt so hoch exprimiert wird, wie seine Exon5-Spleißvariante und sich dieses Verhältnis nicht durch (Anti-)Östrogene beeinflussen läßt.

(C) Östrogenrezeptor β

Der Östrogenrezeptor β ist allgemein im Endometrium nur schwach exprimiert (Matsutsaki, 1999). Hierdurch würde einer Veränderung der Expression, die durch (Anti-)Östrogene hervorgerufen wird, eine besondere Bedeutung im Gleichgewicht zwischen den beiden ER-Subtypen und bei der gewebespezifischen Antwort auf (Anti-)Östrogene zukommen. Die Standardabweichung der ER β -Meßreihe (Tab.3.7.) lag bei $\pm 0,23$, der Schwankungsbereich zwischen 0,54 und 1,46.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,53	2,13	2,53	2,33	3,07
8	2,40	3,04	4,02	1,24	1,56
12	1,28	0,62	1,22	1,68	1,72
24	0,93	0,58	0,98	1,42	1,80
48	1,36	1,43	1,18	1,76	1,16

Tabelle 3.7.: Verhältnisse der Expressionen (REVs) des Östrogenrezeptor β in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach unterschiedlicher Dauer (in Std.) der Inkubation mit (Anti-)Östrogenen.

Durch alle fünf Substanzen wurde die Expression des ER β nach 4 Stunden stimuliert. Hierbei zeigt sich für TAM und OHT (Abb.3.2b/c) ein ähnlicher Stimulationsverlauf, wie für E2 (Abb.3.2a), nämlich ein früher stimulativer Effekt (nach 4 und 8 Stunden), der nach 12 Stunden auf den Basallevel zurückgeht. Bei Inkubation mit TAM wird die Stimulationsphase sogar von einer tendenziellen Inhibitionsphase gefolgt. RLX und RLX-HCl (Abb.3.2.d/e) zeigen ebenfalls die Stimulation der Expression nach 4 Stunden, wie bei der E2-Inkubation, wobei der Expressionslevel im weiteren Zeitverlauf wieder absinkt, aber nach 12, 24 und 48 Stunden auf einem leicht erhöhten Niveau verbleibt. Die ER β -Expression wurde sowohl durch E2 also auch die Antiöstrogene TAM und OHT, sowie die SERMs RLX und RLX-HCl stimuliert. Auffallend war hierbei die unterschiedliche Dauer der stimulativen Effekte und die zeitliche Begrenzung der Expressionserhöhungen.

(D) AIB1

AIB1 ist ein ubiquitär exprimierter Koaktivator von Steroidrezeptoren. Zwischen einzelnen Geweben liegen unterschiedliche Expressionsstärken. Eine Überexpression von AIB1 wurde in Ovarial- und Mammakarzinomen nachgewiesen, was auf ein karzinogenes Potential hinweisen könnte (Anzick, 1997). Die Regulationsmechanismen der AIB1-Expression sind dennoch bisher unklar. Ein möglicher Einfluß von (Anti-)Östrogenen auf die AIB1-Expression soll hier analysiert werden. Die Standardabweichung der AIB1-Meßreihe (Tab.3.8.) war $\pm 0,20$ und das Schwankungsintervall somit 0,60 – 1,40.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,96	1,19	0,93	1,04	1,17
8	0,97	0,92	0,83	1,12	0,85
12	0,85	0,93	0,81	1,06	0,98
24	1,12	1,05	0,92	0,98	0,83
48	0,97	0,85	0,71	0,87	0,65

Tabelle 3.8.: REVs des Steroidrezeptor-Koaktivators AIB1 in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach unterschiedlicher Dauer (in Std.) der Inkubation mit (Anti-)Östrogenen.

Keiner der gemessenen REVs lag außerhalb des Schwankungsbereichs der doppelten Standardabweichung. Dieses zeigt, daß die AIB1-Expression in der Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa durch (Anti-)Östrogene nicht beeinflusst wurde (Abb. 3.3a-e).

(E) SRC-1

SRC-1 ist ebenfalls ein ubiquitär exprimierter Koaktivator (Onate, 1995). Er dient als Koaktivator verschiedener Transaktivierungsmechanismen und aufgrund seiner begrenzten Verfügbarkeit limitiert er die Aktivität der miteinander konkurrierenden Transaktivatoren (Onate, 1995). Eine Regulation der SRC-1-Expression durch (Anti-)Östrogene würde also die Stärke der Transaktivierung durch Steroidrezeptoren und andere Transaktivatoren durch verstärkte oder verminderte Verfügbarkeit beeinflussen. Die Primer für die Expressionsmessung waren dabei so konstruiert worden, daß sie eine Unterscheidung der beiden, funktionell unterschiedlichen Spleißvarianten SRC-1a und SRC-1e ermöglichten. Die Standardabweichung dieser Meßreihe war $\pm 0,27$ für SRC-1e-Signale (Tab.3.10.) und $\pm 0,29$ für die SRC-1a-Signale (Tab.3.9.). Die Intervalle nicht beeinflusster Expressionswerte lagen bei 0,46 und 1,54 für SRC-1e und 0,42 und 1,58 bei SRC-1a.

SRC-1a	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,24	1,10	0,86	0,90	1,17
8	1,04	1,57	1,00	0,96	1,08
12	1,00	1,04	0,96	1,00	1,35
24	1,00	1,04	0,88	1,04	1,64
48	1,07	1,21	0,79	1,07	0,93

Tabelle 3.9.: REVs der SRC-1-Spleißvariante 1a in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach unterschiedlicher Dauer der Inkubation mit (Anti-)Östrogenen (in Std.).

Durch RLX-HCl wurde die Expression von SRC-1a nach 24 Stunden leicht um das 1,6-fache stimuliert, wobei die Expressionshöhe nach 48 Stunden wieder auf den basalen Wert absank (Abb.3.3e). Raloxifen hatte hingegen keinen Effekt auf die SRC-1a-Expression. Bei Inkubation mit TAM zeigte sich eine Tendenz zur Stimulation nach 8 Stunden. Die unter OHT-Inkubation gemessenen REVs lagen dagegen tendenziell niedriger als die nicht-stimulierten Kontrollwerte (Abb.3.3b/c). 17β -Östradiol beeinflusste die SRC-1a-Expression nicht (Abb.3.3a).

SRC-1e	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,20	1,00	0,95	1,05	1,10
8	1,16	1,06	1,03	1,35	1,00
12	1,00	0,95	0,90	1,71	1,29
24	1,04	1,11	1,00	0,92	1,04
48	0,83	1,25	1,25	0,75	1,33

Tabelle 3.10.: Relative Expressionswerte (REVs) der SRC-1-Spleißvariante 1e in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa nach unterschiedlicher Dauer der Inkubation mit (Anti-)Östrogenen (in Std.).

Während E2, TAM, OHT und RLX-HCl keinen Effekt auf die SRC-1e-Expression zeigten, erhöht sich diese nach 12-stündiger Behandlung der Ishikawa-Zellen mit RLX leicht um das 1,7-fache (Abb.3.3d). Bei Behandlung mit RLX-HCl zeigte sich ebenfalls eine schwache stimulative Tendenz (Abb.3.3e).

Das Verhältnis zwischen den beiden Varianten kann ausschlaggebend dafür sein, welcher Effekt durch den SRC-1-Expressionslevel vermittelt wird. Ein verändertes Gleichgewicht zwischen den beiden Varianten führt zu einem veränderten Effekt z.B. auf die Aktivität der Steroidrezeptoren. Der durchschnittliche Quotient der relativen Expressionen $RE(SRC-1e)/RE(SRC-1a)$ lag bei 0,92, beide Varianten werden also in Ishikawa-Zellen in etwa gleichstark exprimiert (Tab.3.11.).

SRC-1e/1a	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,97	0,91	1,10	1,17	0,94
8	1,11	0,67	1,03	1,41	0,93
12	1,00	0,91	0,94	1,71	0,96
24	1,04	1,07	1,14	0,88	0,63
48	0,78	1,03	1,52	0,70	1,43

Tabelle 3.11.: Quotienten der relative Expressionswerte (REs) der Spleißvarianten SRC-1e und SRC-1a in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa im zeitlichen Verlauf (in Std.) nach Inkubation mit (Anti-) Östrogenen.

Nach Kalkhoven et al. (1998) variiert das SRC1e:SRC1a-Verhältnis in unterschiedlichen Karzinomzelllinien stark, wobei das Verhältnis in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa mit 1,11 mit unseren Messungen in etwa übereinstimmte. Es zeigte sich, daß keine der beiden Koaktivator-Varianten durch die (anti-)hormonelle Behandlung bevorzugt exprimiert wurde. Wenn eine Variante leicht erhöht exprimiert wurde, behielt die andere jeweils den basalen Expressionslevel bei. Eine unterschiedliche Regulation der beiden SRC-1-Varianten ist eher unwahrscheinlich.

(F) TIF2

In der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa konnte ein TIF2-Signal detektiert werden. Unter hormoneller Stimulation, sowie bei den nicht-stimulierten Kontrollproben schwankten die Expressionswerte aber so stark, daß keine Interpretation möglich war.

3.1.3. Expressionskinetiken in der Mammakarzinomzelllinie MCF7

Die hormonresponsive Mammakarzinomzelllinie MCF7 (Levenson, 1997) wurde in der selben Weise mit E2, TAM, OHT, RLX und RLX-HCl behandelt, wie die EC-Zelllinie Ishikawa. Auch die RNA-Isolation, die reverse Transkription und die Expressionsmessungen wurden nach denselben Methodiken durchgeführt. Es sollten mögliche regulatorische Effekte der (Anti-)Östrogene und Unterschiede dieser zu den in der Endometriumkarzinom-Zelllinie Ishikawa beobachteten Effekte untersucht werden.

(A) Progesteronrezeptor

Auch in dieser Expressionskinetik sollte der Progesteronrezeptor als Beispiel für östrogen-stimulierte Genexpression dienen. Die Standardabweichung war $\pm 0,26$ und somit ging das Intervall unveränderter Expression von 0,48 bis 1,52 (Tab.3.12.).

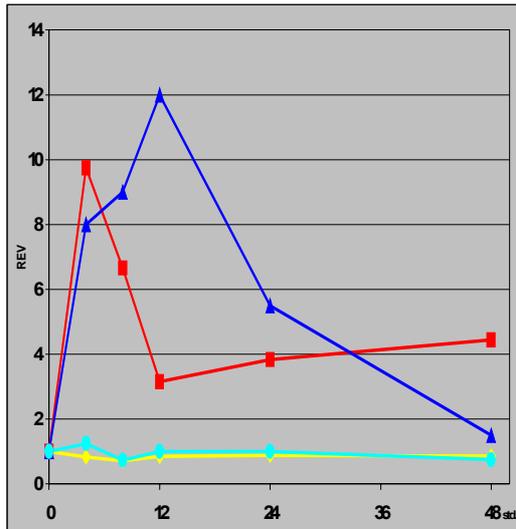
	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	8,0	3,0	3,0	2,0	1,5
8	9,5	5,5	2,5	1,0	2,0
12	12,0	2,5	2,0	2,0	1,5
24	5,5	1,0	1,0	1,5	1,0
48	1,5	0,5	0,5	1,0	1,0

Tabelle 3.12.: REVs des PR-Progesteronrezeptors im zeitlichen Verlauf (in Std.) bei Inkubation mit (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

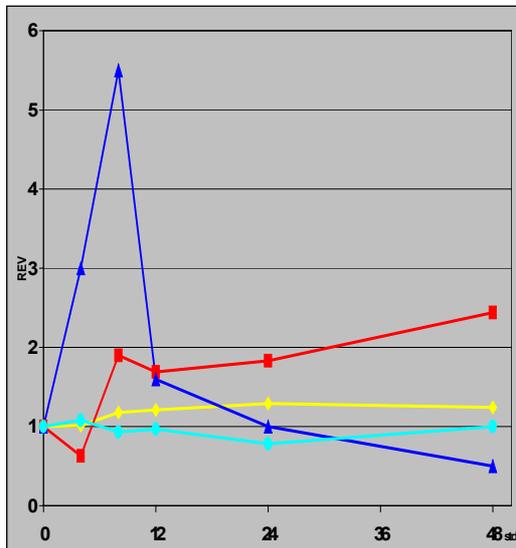
Die Expression des Progesteronrezeptor wurde in MCF7-Zellen durch Inkubation mit 10^{-8} M E2 um bis zum 12-fachen der basalen Expression erhöht (Abb.3.4a). Die Expression zeigte schon nach 4 Stunden eine deutliche Erhöhung, erreichte nach 12 Stunden den höchsten Wert und ging nach 48 Stunden auf annähernd den basalen Expressionswert zurück.

Inkubation mit TAM und OHT stimulierte ebenfalls deutlich die PR-Expression, wenn auch in geringerem Maße (bis zu 5,5- bzw. 3-fach) (Abb.3.4b/c). Es zeigte sich, wie bei E2, ein stimulativer Effekt nach 4 und 8 Stunden, der mit steigender Inkubationsdauer absank. Nach 48 Stunden Inkubation unterschritt der PR-Expressionslevel den basalen Expressionswert.

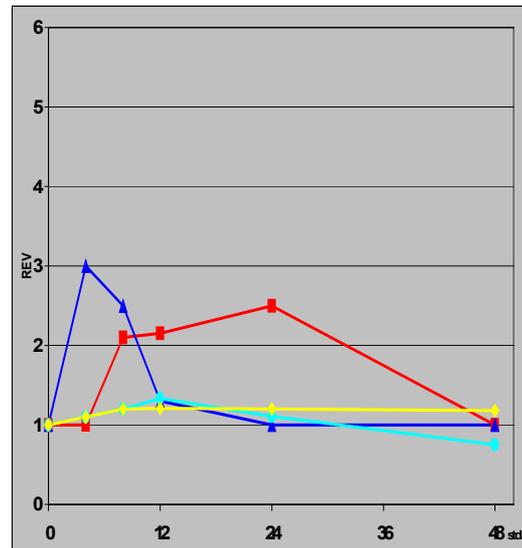
(a)



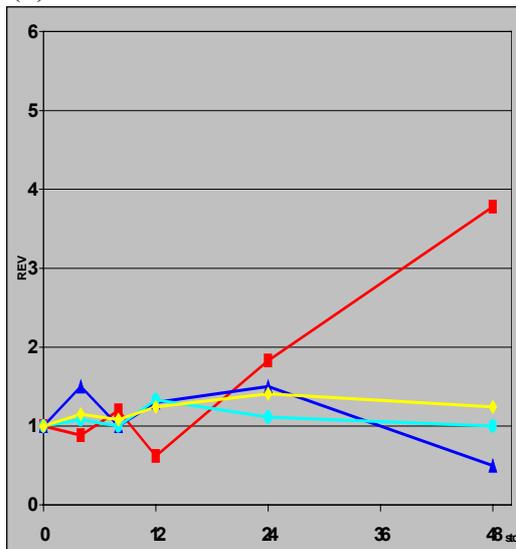
(b)



(c)



(d)



(e)

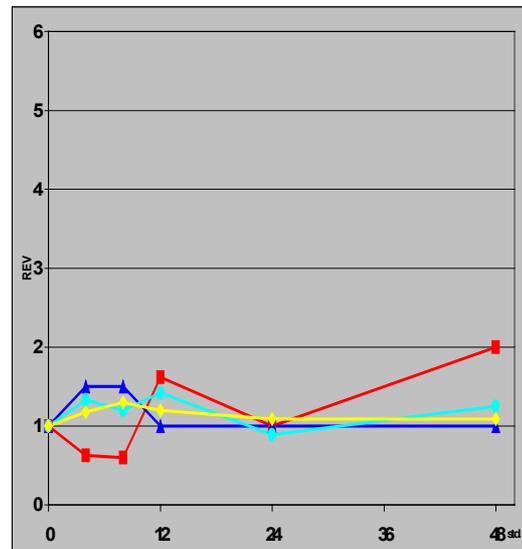


Abb.3.4.(a) - (e): Expressionskinetiken der Steroidrezeptoren ER α (♦), ER α ΔExon5 (●), ER β (■) und PR (▲) in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 unter Inkubation mit (a) E2, (b) TAM, (c) OHT, (d) RLX und (e) RLX-HCl.

Bei Inkubation mit RLX und RLX-HCl war ebenfalls eine Stimulation der PR-Expression zu beobachten, die aber wesentlich geringer war als bei E2- und TAM- bzw. OHT-Inkubation (bis zu 2-fach) (Abb.3.4d/e). Die PR-Expression ist nach 4 bis 12 Stunden erhöht und sinkt dann auf den Level der nicht-behandelten Kontrollprobe ab. Für TAM und OHT ist ein deutliches östrogenes Potential aufgezeigt worden, daß bei RLX und RLX-HCl zwar ebenfalls zu beobachten ist, aber wesentlich schwächer (18% bzw. 36 % der Tamoxifen-Stimulation nach 8 std.) ausfiel.

Um die Bedeutung der östrogenen Effekte genauer zu bestimmen, wurden MCF7-Zellen mit E2 und TAM, RLX oder RLX-HCl kokubiert (Tab.3.13.). Hierdurch sollte verdeutlicht werden, ob sich das östrogene Potential der Antiöstrogene synergistisch zu dem des Östradiol bezüglich der Stärke der Transaktivierung addiert oder, ob in diesem Verhältnis das agonistische Potential von E2 durch die antiöstrogenen Wirkmechanismen blockiert wird.

	E2	E2 + TAM	E2 + RLX	E2 + RLX-HCl
4	8	4	2,5	2,5
8	9	4,5	3	2
12	12	4,3	2,7	2,3
24	5,5	4,5	3	3,5
48	1,5	3,5	2,5	3

Tab. 3.13.: Verhältnisse der relativen Expressionswerte des Progesteronrezeptors bei Inkubation mit Östradiol alleine oder in Kombination mit TAM, RLX oder RLX-HCl zu verschiedenen Zeitpunkten (in Std.) in MCF7-Zellen.

Durch den Zusatz von TAM, RLX oder RLX-HCl wurde der stimulative Effekt von E2 deutlich abgeschwächt. Besonders die Expressionssteigerung nach 4 bis 12 Stunden wird um die Hälfte reduziert. Dieses zeigt deutlich, daß der primäre Effekt der Antiöstrogene eine Blockade des agonistischen Effekts von E2 ist. Das eigene östrogene Potential der Antiöstrogene ist von sekundärer Bedeutung und dem antiöstrogenen Wirkmechanismus untergeordnet.

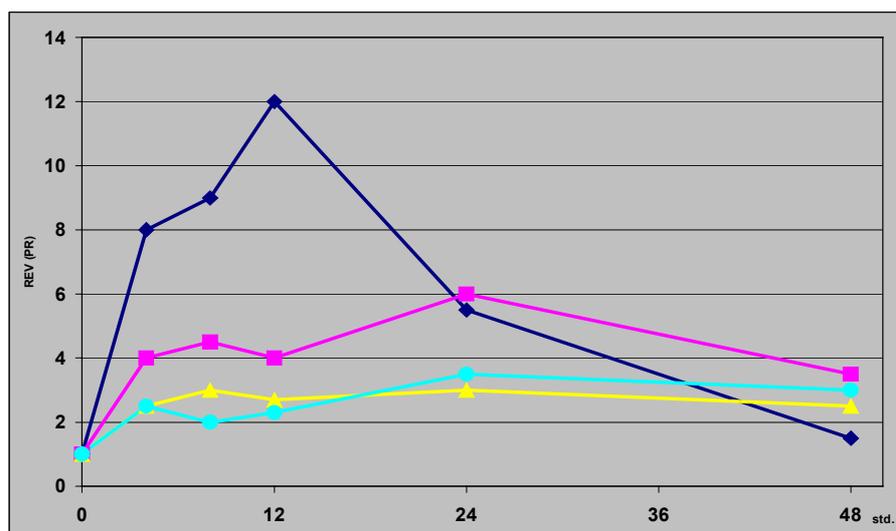


Abb. 3.5.: Expressionskinetiken (in std.) des Progesteronrezeptors in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 bei Koinkubation mit E2 (-♦-), E2+TAM (-■-), E2+RLX (-▲-) und E2+RLX-HCl (-●-).

(B) Östrogenrezeptor α

Die Expression des ER α in den MCF7-Zellen wurde durch die (Anti-)Östrogene wie folgt beeinflusst (Tab.3.14). Bei einer SA von $\pm 0,21$ ergibt sich ein Schwankungsintervall von 0,58 bis 1,42.

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,83	1,01	1,1	1,15	1,18
8	0,71	1,18	1,2	1,08	1,3
12	0,85	1,21	1,21	1,24	1,2
24	0,88	1,29	1,2	1,41	1,09
48	0,86	1,24	1,18	1,24	1,09

Tabelle 3.14.: Relative Expressionswerte des Östrogenrezeptor α im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Die ER α -Expression wurde nicht direkt durch die (Anti-)Östrogene reguliert (Abb.3.4a-e). Bei Inkubation der Zellen mit E2 war eine Tendenz zur Hemmung der Expression zu erkennen, während sich unter Inkubation mit den vier Antiöstrogenen eher eine Tendenz zur Expressionssteigerung andeutet.

Wiederum wurde neben der Expression der Wildtyp-RNA zusätzlich die Expressionshöhe der Exon5-Deletionsvarianten bestimmt (Standardabweichung: $\pm 0,38$; Schwankungsintervall (SI): 0,24 – 1,76) (Tab.3.15).

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,25	1,08	1,00	1,08	1,33
8	0,73	0,93	1,20	1,00	1,20
12	1,00	0,97	1,33	1,33	1,42
24	1,00	0,78	1,11	1,11	0,89
48	0,75	1,00	0,75	1,00	1,25

Tabelle 3.15.: Relative Expressionswerte der Östrogenrezeptor α -Exon5-Spleißvariante im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Wie bei der Expression der ER α -Wildtyp-RNA wurde auch die Expression der Varianten-RNA durch die (Anti-)Hormonbehandlung nicht beeinflusst (Abb.3.4a-e).

Der Quotient aus RE(ER α -wt)/RE(ER α Δ Exon5) sollte zeigen, ob eine Veränderung des Spleißmusters unter der (Anti-)Hormonbehandlung gegeben war (SA = $\pm 0,59$) (Tab.3.16).

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,66	0,93	1,10	1,06	0,89
8	0,97	1,27	1,00	1,08	1,08
12	0,85	1,25	0,91	0,93	0,85
24	0,88	1,65	1,08	1,27	1,22
48	1,32	1,24	1,57	1,24	0,87

Tabelle 3.16.: Quotienten der relativen Expressionen (RE) des ER α und der ER α -Exon5-Deletionsvariante in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 im zeitlichen Verlauf (in Std.) nach Inkubation mit (Anti-)Östrogenen.

Für den Quotient der REs konnte bei allen Inkubationsreihen kein hormoneller Einfluß aufgezeigt werden. In der Meßreihe mit nicht-behandelten MCF7-Zellen zeigte sich ein durchschnittlicher Quotient von ER α -wt/ER α Δ Exon5-Variante von 5,21. Dieses bedeutet, daß der ER α -Wildtyp um das 5-fache höher exprimiert wird, als seine Exon5-Spleißvariante und sich dieses Verhältnis nicht durch (Anti-)Östrogene beeinflussen läßt.

(B) Östrogenrezeptor β

Weder die genaue Funktion der ER β , noch die Regulation seiner Expression in Mammagewebe oder -karzinomen ist bisher bekannt. Analysen der Einflüsse der (Anti-)Östrogene auf die Expression des ER β in MCF7-Zellen sollten dieses genauer betrachten (SA = 0,16; SI = 0,68 – 1,32) (Tab.3.17).

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	9,75	0,63	1,00	0,88	0,63
8	6,66	1,90	2,10	1,20	0,60
12	3,15	1,69	1,15	0,62	1,62
24	3,83	1,83	2,50	1,83	1,00
48	4,44	2,44	1,00	3,78	2,00

Tabelle 3.17.: Relative Expressionswerte des Östrogenrezeptor β im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Die ER β -Expression unterliegt in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 einer deutlichen Regulation durch Östradiol (Abb.3.4a). Nach 4 Stunden beträgt der REV fast das 10-fache der nicht-stimulierten Expression. Danach fällt die Expressionshöhe ab, bleibt aber nach 12 Stunden auf dem Level einer etwa 4-fachen Stimulation. Durch TAM-Behandlung wird die ER β -Expression zwar ebenfalls stimuliert, wobei der Verlauf der Expressionserhöhung anders ist als unter E2-Inkubation (Abb.3.4b). Nach 4 Stunden lag erst ein erniedrigter Expressionslevel vor, der sich dann auf einen fast 2-fach-gesteigerten Expressionslevel nach 8 Stunden erhöht und für den weiteren Zeitverlauf auf diesem Level verbleibt. Durch Behandlung mit OHT ergaben sich ebenfalls Schwankungen bei den gemessenen Expressionswerten (Abb.3.4c). Der REV schwankte zwischen dem unstimulierten Basislevel und einem bis zu 2,5-fach stimulierten. Ein eindeutiger zeitlicher Verlauf war zwar nicht zu erkennen, dennoch wird die stimulative Wirkung von OHT auf die ER β -Expression deutlich.

Bei Inkubation mit RLX zeigten sich ähnliche Schwankungen wie bei OHT und ähnliche Verlaufskarakteristika wie bei TAM (Abb.3.4d). Einem nach 12 Stunden erniedrigten Level folgte nach 24 und 48 Stunden eine Erhöhung bis auf das 4-fache des Kontrollwertes. Unter RLX-HCl-Einwirkung wurde ein ähnlicher biphasischer Effekt deutlich (Abb.3.4e). Einer anfänglichen Senkung des Expressionslevels auf 60% der basalen Expression folgte eine Stimulation der Expression auf das 2-fache nach 48 Stunden.

Die ER β -Expression wurde in MCF7-Zellen durch E2 und die Antiöstrogene klar beeinflusst. Während E2 eine deutliche Hochregulation bewirkt, sind die Effekte der Antiöstrogene weniger eindeutig, letztendlich aber stimulatив. Die Stimulationen durch E2 und durch die Antiöstrogene scheinen auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen.

(C) AIB1

AIB1 ist häufig in Mammakarzinomen überexprimiert. Für die Zelllinie MCF7 ist dieses ebenfalls beschrieben (Anzick, 1997). Mit Hilfe der Stimulationskinetik soll geklärt werden,

in wie weit (Anti-)Hormone einen Einfluß auf die AIB1-Expression ausüben (SD = 0,10; SI = 0,80 – 1,20) (Tab.3.18.).

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,97	0,94	0,84	1,06	1
8	0,71	1,05	0,98	1,11	1,05
12	0,76	1	1,14	1,12	1,48
24	0,66	0,92	0,97	1,18	1,29
48	0,73	0,98	1,1	0,9	1,06

Tabelle 3.18.: Relative Expressionswerte des Koaktivators AIB1 im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Unter Inkubation mit E2 zeigt sich eine Herunterregulation der AIB1-Expression auf bis zu 66% des basalen Levels nach 24 Stunden (Abb.3.6a). TAM und OHT haben dagegen keinen Einfluß (Abb.3.6b/c). Unter Behandlung mit RLX-HCl ist dagegen eine leichte Stimulation der AIB1-Expression zu sehen (Abb.3.6e). Nach 12 Stunden wurden 148% des Expressionslevels ohne Hormonbehandlung erreicht. Unter RLX-Einfluß zeigt sich im Vergleich dazu nur eine leichte Tendenz zur Stimulation (Abb.3.6d).

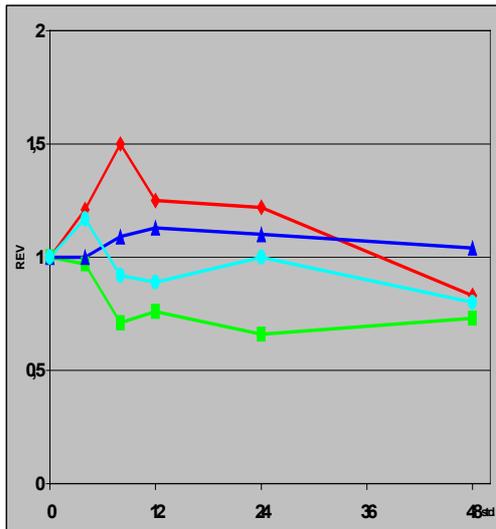
(D) SRC-1

Bei der SRC-1-Meßreihe wurden wiederum zwei Signale unterschieden: die beiden Spleiß-Varianten SRC-1a und SRC-1e. Wie für die anderen beiden Steroidrezeptor-Koaktivatoren ist auch für die SRC-1-Expression kein Regulationsmechanismus beschrieben. Effekte von (Anti-)Östrogenen könnten hierüber Aufschluß geben. Die Standardabweichungen waren $\pm 0,20$ für SRC-1-e und $\pm 0,55$ für SRC-1-a (Tab.3.19./20.).

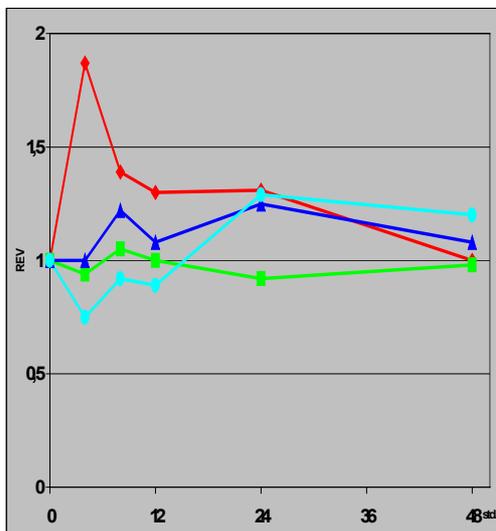
SRC-1e	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1	1	1,12	0,84	1,12
8	1,09	1,22	1,04	1,39	1,39
12	1,13	1,08	1,04	1,17	1,17
24	1,1	1,25	1,3	1,15	1,25
48	1,04	1,08	0,92	0,89	1,04

Tabelle 3.19.: Relative Expressionswerte der SRC-1-Variante SRC-1e im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

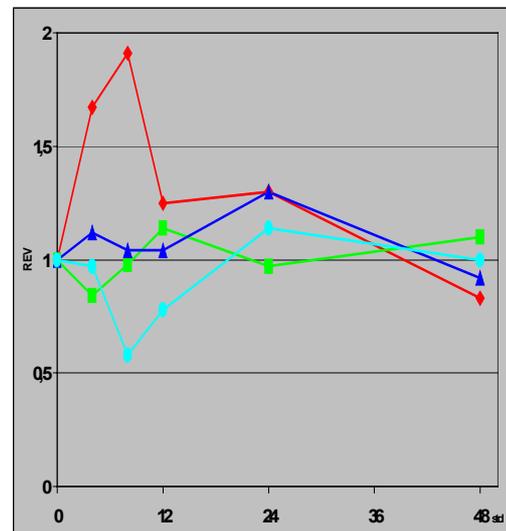
(a)



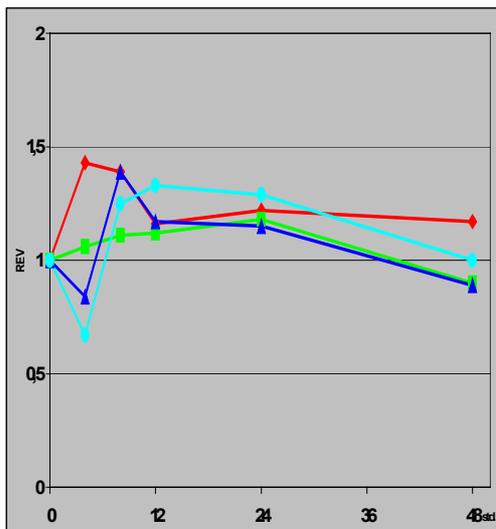
(b)



(c)



(d)



(e)

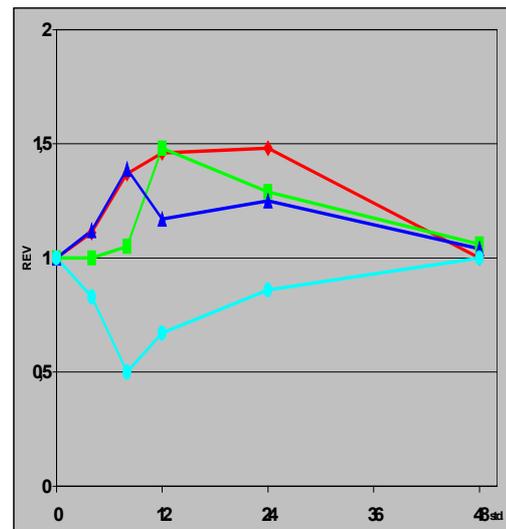


Abb. 3.6. (a) – (e): Expressionskinetiken (in std.) der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1 (■), TIF2 (◆), SRC-1a (●) und SRC-1e (▲) in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 unter Inkubation mit (a) E2, (b) TAM, (c) OHT, (d) RLX und (e) RLX-HCl.

SRC-1a	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	0,88	0,56	0,50	0,88	0,63
8	0,92	0,92	1,25	0,58	0,50
12	0,89	0,89	1,33	0,78	0,67
24	1,00	1,29	1,29	1,14	0,86
48	0,80	1,20	1,00	1,00	1,00

Tabelle 3.20.: Relative Expressionswerte der SRC-1-Variante SRC-1e im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Die Expression der SRC-1e-Variante wurde durch die (Anti-)Hormonbehandlung nicht beeinflusst, wobei allgemein von den relativen Werten her eine schwache stimulative Tendenz zu erkennen ist. Bei den SRC1a-Meßreihen lag aufgrund des großen Schwankungsbereiches keiner der Meßwerte in dem Bereich , der eine direkte Regulation ausdrückt. Es waren aber Tendenzen in Richtung einer Inhibition der Expression, besonders nach 4-stündiger Inkubation, zu erkennen. Für TAM und OHT zeigte sich eine frühe inhibitorische und eine folgende stimulierende Tendenz (Abb.3.6b/c). Durch RLX und RLX-HCl wurde die Expression bis 12 Stunden tendenziell inhibiert, danach erreichte sie wieder den basalen Expressionslevel (Abb.3.6d/e).

SRC-1e / 1a	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,14	1,79	2,24	0,95	1,78
8	1,18	1,33	0,83	2,40	2,78
12	1,27	1,21	0,78	1,50	1,87
24	1,10	0,97	1,00	1,00	1,67
48	1,30	0,90	0,92	0,89	1,04

Tabelle 3.21.: Relatives Verhältnis der SRC-1-Varianten SRC-1e und SRC-1-a im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7. Quotienten <0,5 und >2 wurden gelb, <0,25 und >4 wurden rot markiert.

Die Veränderungen des Quotienten SRC-1e/SRC-1a (Tab.3.21.) sind hauptsächlich durch die Schwankungen der SRC-1a-Expression in den Meßreihen begründet. Nach Kalkhoven *et al.* (1998) liegt der SRC-1e/SRC-1a-Quotient bei 1,0. Der Quotient bei den nicht-stimulierten MCF7-Zellen lag in den gegebenen Messungen dagegen bei 2,59. An den frühen Meßpunkten (4 bzw. 8 Std.) bei Inkubation mit OHT, RLX und RLX-HCl zeigt sich jeweils eine mehr als doppelt so starke Expressionsänderung der SRC-1e-Variante als der SRC-1a-Variante. Zu späteren Zeitpunkten zeigte sich aber auch in diesen Meßreihen ein Quotient um 1,0.

(E) TIF2

In MCF7-Zellen schwankten die Meßwerte für die Expression des Koaktivators TIF2 nicht so stark, wie in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa. Somit konnten in diesem Zelltypus die Expressionslevels und Regulationen aller drei bekannten Steroidrezeptorkoaktivatoren untersucht werden. Für die TIF2-Expression zeigten sich folgende Werte unter (anti-) östrogenen Inkubation ($SA = \pm 0,21$) (Tab.3.22):

	E2	TAM	OH-TAM	RLX	RLX-HCl
4	1,21	1,87	1,67	1,43	1,11
8	1,50	1,39	1,91	1,39	1,37
12	1,25	1,30	1,25	1,16	1,46
24	1,22	1,31	1,30	1,22	1,48
48	0,83	1,00	0,83	1,17	1,00

Tabelle 3.22.: Relative Expressionswerte des Koaktivators TIF2 im zeitlichen Verlauf (in Std.) unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Unter E2-Inkubation erhöhte sich der TIF2-Expressionslevel leicht auf das 1,5-fache nach 8 Stunden (Abb.3.6a). Unter TAM- und OHT-Einfluß zeigen sich ebenfalls frühe stimulative Effekte, die aber mit ca. 1,9-fach nach 8 bzw. 12 Stunden leicht höher ausfallen als bei E2 (Abb.3.6b/c). Unter RLX- und RLX-HCl-Behandlung ist eine Stimulation der Expression bis zum 1,5-fachen der Expression in den Kontrollzellen zu beobachten (Abb.3.d/e). Die TIF2-Expression wurde also durch alle getesteten Substanzen leicht stimuliert, wobei diese stimulativen Effekte nach 48 Stunden Inkubationsdauer nicht mehr auftraten.

3.1.4. Vergleich der (anti-)östrogenen Effekte

Bei einem zusammenfassenden Vergleich der Ergebnisse der Expressionskinetiken werden verschiedene Gegebenheiten deutlich:

- (a) Die Progesteronrezeptor-Expression wurde in MCF7-Zellen sowohl durch E2, als auch die getesteten Antiöstrogene hochreguliert. Tamoxifen und Hydroxy-Tamoxifen hatten dabei einen stärkeren Effekt als RLX und RLX-HCl. In Ishikawa-Zellen dagegen hatte E2 nur einen weniger stark stimulativen Effekt und die Antiöstrogene keinen.
- (b) Die Expression des ER α -mRNA wurde in beiden Zelllinien nicht beeinflusst, wohingegen die des ER β sowohl durch E2, als auch die Antiöstrogene in beiden Zelllinien stark stimuliert wurde.

- (c) Die Expressionen der SRCs wurden in den beiden Zelllinien ganz unterschiedlich durch die (Anti-)Östrogene beeinflusst. Am deutlichsten war hierbei die Stimulation der TIF2-Expression durch TAM und OHT in der MCF7-Zelllinie.
- (d) Es wurden keine inhibitorischen Effekte durch die (Anti-)Östrogene aufgezeigt.

Ishikawa	PR	ER α	ER α Δ Ex5	ER β	AIB1	SRC1e	SRC1a	TIF2
E2	+	o	o	++	o	o	o	/
TAM	o	o	o	++	o	o	o	/
OHT	o	o	o	++	o	o	o	/
RLX	o	o	o	++	o	+	o	/
RLX-HCl	o	o	o	++	o	o	+	/
MCF7	PR	ER α	ER α Δ Ex5	ER β	AIB1	SRC1e	SRC1a	TIF2
E2	++	o	o	++	+	o	o	+
TAM	++	o	o	++	o	o	o	++
OHT	++	o	o	++	o	o	o	++
RLX	+	o	o	++	o	o	o	+
RLX-HCl	+	o	o	++	+	o	o	+

Tabelle 3.23.: Zusammenfassung der Expressionveränderungen in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 und der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa unter Einfluß von (Anti-)Östrogenen. (-- = starke Inhibition um mehr als die 4-fache SA; - = Inhibition um die 2-4-fache SA, o = Werte lagen im Schwankungsbereich der 2-fachen SA; + = Stimulation im Bereich der 2-4-fachen SA; ++ = starke Stimulation um mehr als die 4-fache SA; / = nicht bestimmt. Gewertet wurde der in der Kinetik erreichte Höchstwert ohne Berücksichtigung des Zeitfaktors.)

3.1.5. Rolle der Steroidrezeptor-Koaktivatoren bei der Inhibition der ER α -abhängigen Transaktivierung durch BRCA1

BRCA1 inhibiert dosisabhängig die ER α -vermittelte Transaktivierung über ein ERE in Prostata- und Brustkrebszelllinien. Hierbei blockiert es die Aktivität der Aktivierungsfunktion-2 des Rezeptors (Fan, 1999). Für die Inhibition sind unterschiedliche Mechanismen vorstellbar: (a) eine direkte Interaktion zwischen BRCA1 und dem ER α , die zu einer sterischen Behinderung führt, (b) eine kompetitive DNA-Bindung mit Blockade der ER α -ERE-Interaktion und (c) eine kompetitive Bindung gemeinsamer Koaktivatoren.

BRCA1 fungiert, wie der ER α , als Transkriptionsaktivator und bindet allgemeine Koaktivatoren. Steroidrezeptor-Koaktivatoren verstärken die Transaktivierung durch den ER α dosisabhängig und, eine verminderte Verfügbarkeit der Koaktivatoren kann die Transaktivierung schwächen bzw. inhibieren. Die Rolle der SRCs bei der Inhibition der ER α -vermittelten Transaktivierung durch BRCA1 sollte durch Kotransfektion in Reporterassays untersucht werden.

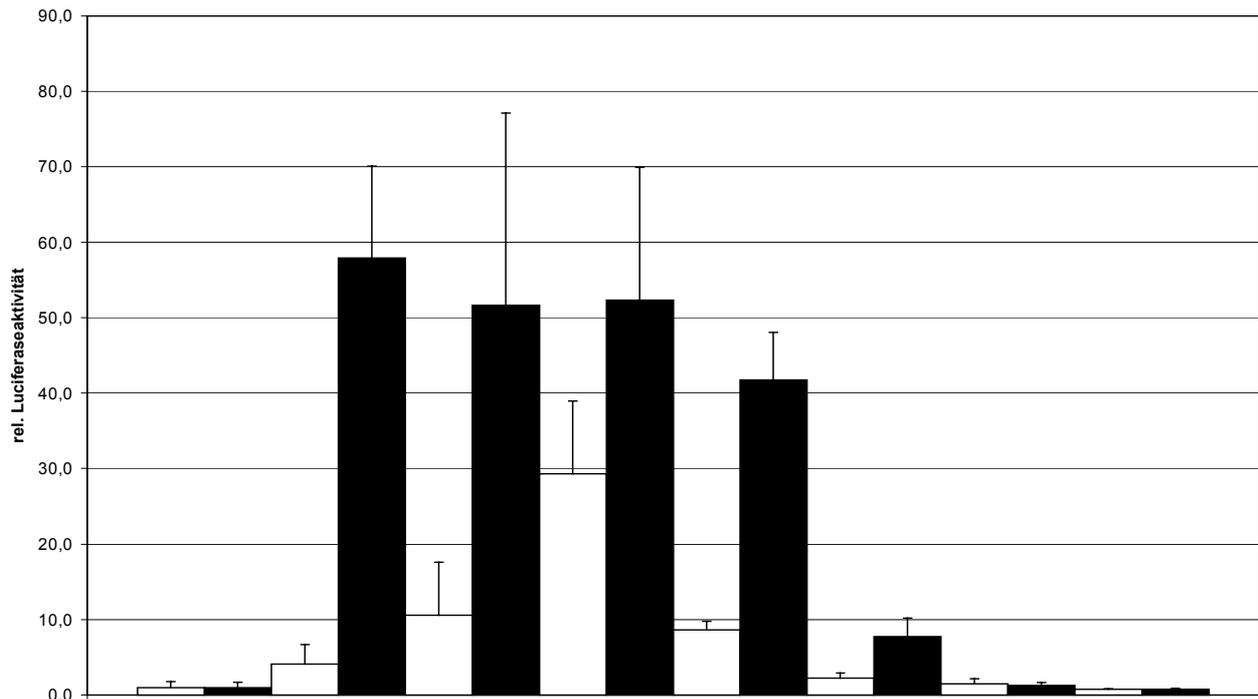
Beim Reporterassay wurden verschiedene Plasmide in die Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3, die ER α - und ER β -negativ ist, mit Hilfe des Transfektionsreagens Fugene (Roche)

kotransfiziert. Zur Stimulation der ER α -abhängigen Transaktivierung wurden die transfizierten Zellen 24 Std. mit 10^{-8} M E2 inkubiert.

Als Reporterplasmid wurde der ERE-tk-Luc-Plasmid verwendet, in dem ein ERE als Bindungsstelle für den ER α dem Luciferasegen vorgeschaltet ist. Als Standard wurde ein nicht hormonell stimulierbares Plasmid kotransfiziert, in dem ein konstitutiv aktiver β -Actin-Promoter das β -Galactosidasegen reguliert. Als optimale Mengen wurden 0,10 μ g ERE-tk-Luc-Plasmid und 0,05 μ g β -Actin/ β -Gal-Plasmid eingesetzt. Die Aktivitäten der beiden Genprodukte, Luciferase und β -Galactosidase, wurden in den Reporterassays gemessen und in Relation gesetzt. Das Verhältnis zwischen der gemessenen Luciferaseaktivität [Meßwert in RLU (*relative light units*)] und der gemessenen β -Galactosidaseaktivität (in RLU) wurde als relative Luciferaseaktivität (rLA) festgelegt. Die relative Luciferaseaktivität des nicht-stimulierten Ansatzes, in dem nur diese beiden Plasmide transfiziert wurden, stellt den Basiswert des Meßsystems dar und wurde bei den Meßreihen als „1“ definiert. Für die Transfektionen wurde die BRCA1-wt-Sequenz aus einem BRCA1-pGL2-Plasmid in den Vektor pcDNA3.1 (Stratagene) umkloniert. Das Klonierungsprodukt wurde durch Sequenzierung und Restriktionsanalyse kontrolliert. Die ER α -Sequenz lag ebenfalls in dem Vektor pcDNA3.1 vor. Da von Fan *et al.* (1999) größere BRCA1-Mengen transfiziert wurden, wurde bei der Optimierung der Transfektionsexperimente die maximale mit dem Fugene-Transfektionsreagenz effizient transfizierbare Menge Plasmid-DNA von 3 μ g eingesetzt.

(a) Optimierung der ER α -vermittelten Transaktivierung

Es wurde getestet, bei welcher Menge an ER α -Plasmid eine maximale Steigerung der relativen Luciferaseaktivität durch Inkubation der transfizierten Zellen mit 17 β -Östradiol zu erreichen war. Dieses wurde mit der ER α - und ER β -negativen Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 und mit der ER α - und ER β -positiven Mammakarzinomzelllinie MCF7 durchgeführt. Die Menge von 3 μ g Gesamt-Plasmid-DNA wurde durch Kotransfektion einer entsprechenden Menge an pcDNA3.1-Plasmid erreicht. Abbildung 3.3. zeigt die Steigerung der rLA in verschiedenen Kotransfektionsansätzen. In 3 reproduzierenden Experimenten wurden je 3 Messungen durchgeführt.



E2	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+
Menge	-	-	0,05	0,05	5 ng	5 ng	0,5	0,5	0,05	0,05	5 pg	5 pg	0,5	0,5	0,05	0,05
ER α -Plasmid			μ g	μ g			ng	ng	ng	ng			pg	pg	pg	pg
Stimulations- koeffizient	-	-	-	14,1	-	4,9	-	1,8	-	4,8	-	3,5	-	0,9	-	1,02

Abb.3.7: Die relative Luciferaseaktivität als Maß für die ER α -abhängige Transaktivierung eines ERE-regulierten Reportergens schwankt in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 deutlich zwischen den Ansätzen mit unterschiedlicher Menge an transfiziertem ER α -Plasmid. Ebenso deutlich schwankt der E2-abhängigen Stimulationskoeffizient.

Die ER α -abhängige Transaktivierung zeigte sich sehr stark von der Menge des transfizierten ER α -Plasmids beeinflusst. In der Kontrolle ohne ER α -Plasmid war keine Erhöhung der relativen Luciferaseaktivität festzustellen, woraus sich schließen ließ, daß eine Stimulation durch E2-Inkubation ER α -abhängig war. Bei Transfektion von 0,05 μ g – 5 pg ER α -Plasmid wurde relativ konstant eine rLA um die 50 gemessen (Abb. 3.3.). Auch bei Transfektion von größeren Mengen als 0,05 μ g ER α -Plasmid (bis 0,5 μ g) wurde diese Marke kaum überschritten. Bei Transfektion von weniger als 5 pg nahmen die rLA-Werte deutlich ab, was dafür sprach, daß hier die rLA durch eine zu geringe Menge an ER α (-Plasmid) limitiert wurde. Anders sah es bei den rLA-Werten der nicht-E2-inkubierten Proben aus. In dem in Abbildung 3.3. gezeigten Bereich schwankten diese sehr stark. Die rLA lag in dem Ansatz mit

0,5 ng ER α -Plasmid um das 29-fache höher als ohne ER α -Plasmid. Wie unter E2-Einfluß zeigte sich auch die Abnahme der Aktivität bei zu geringen Plasmidmengen. Bei Transfektion von mehr als 0,5 μ g veränderte sich der rLA-Wert im Vergleich zu dem bei Transfektion mit 0,5 μ g ER α -Plasmid nicht mehr. Für die Optimierung der Darstellung des inhibitorischen Effekts von BRCA1 in SK-BR-3-Zellen wurden bei den folgenden Experimenten 0,05 μ g ER α -Plasmid transfiziert.

Mit MCF7-Zellen wurde untersucht, welchen Effekt eine Menge von 0,05 μ g ER α -Plasmid auf die Luciferaseaktivität hat, um Unterschiede zu den SK-BR-3-Zellen aufzuzeigen. Hierbei stellte sich die Frage, ob die endogenen Östrogenrezeptoren möglicherweise die Aktivität der Reportergene beeinflussen.

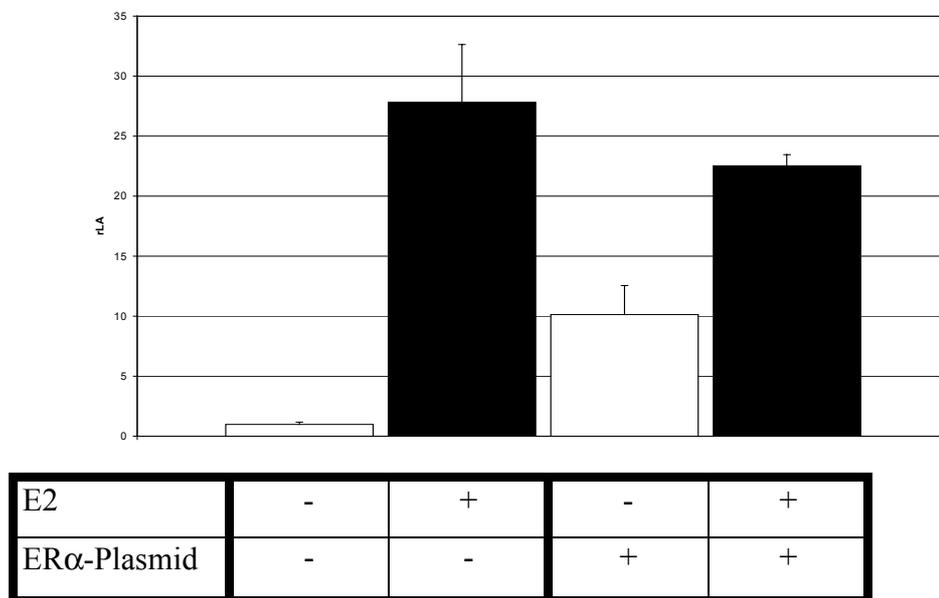


Abb.3.8.: Die relative Luciferaseaktivität als Maß für die ER α -abhängige Transaktivierung eines ERE-regulierten Reportergens in der Mammakarzinomzelllinie MCF7.

Im Gegensatz zu der Zelllinie SK-BR-3 ließ sich eine Stimulation der relativen Luciferaseaktivität (28-fach) durch E2-Zugabe in MCF7-Zellen schon ohne Transfektion des ER α -Plasmides erreichen. Die Steigerung der rLA bei Transfektion von 0,05 μ g ER α -Plasmid fiel mit einem 2,2-fachen Wert deutlich niedriger aus, wobei bei diesem Ansatz auch der basale Level (ohne E2) um das 10-fache höher lag, als beim Ansatz ohne ER α -Plasmid. Die Kotransfektion des ER α -Plasmids hatte zur Folge, daß der basale Level der rLA anstieg und der unter E2-Inkubation etwas schwächer ausfiel. Bei Tests mit ER α -Plasmid-Mengen niedriger als 0,05 μ g sank der Basallevel leicht, aber da auch die rLA des Ansatzes mit E2-

Inkubation sank, blieb der Stimulationswert ähnlich niedrig (< 3). Der mit Abstand höchste Stimulationswert wurde im Ansatz ohne ER α -Plasmid gemessen.

Aufgrund des starken Einflusses der endogenen Östrogenrezeptoren und anderer endogener Faktoren auf die Meßwerte bei der MCF7-Zelllinie wurde für die weiteren Experimente die Mammakarzinomzelllinie SK-BR3 verwendet.

(b) Optimierung des inhibitorischen Effekts durch BRCA1

Bei der Optimierung der Darstellung des inhibitorischen Effekts von BRCA1 auf die ER α -abhängige Transaktivierung eines ERE-regulierten Promoters wurden folgende Plasmide kotransfiziert : 0,05 μ g ER α -Plasmid, 0,10 μ g ERE₂-tk-Luc-Plasmid, 0,05 μ g β -Actin/ β -Galactosidase-Plasmid und 2,30-0,10 μ g BRCA1-Plasmid bzw. vergleichsweise dieselbe Menge pcDNA3.1 als Leervektor.

Bei der Kotransfektion unterschiedlicher Mengen BRCA1-Plasmid bzw. pcDNA3.1 wurden zwar Unterschiede bei den relativen Luciferaseaktivitäten festgestellt, dennoch wurde deutlich, daß sich die Stimulationskoeffizienten ($rLA_{\text{inkubiert}}/rLA_{\text{nicht-inkubiert}}$) zwischen den Ansätzen mit BRCA1 und denen mit einer entsprechenden Menge pcDNA3.1-Leervektor nicht unterschieden. Es konnte in dem hier angewandten Meßsystem, was gegenüber dem von Fan *et al.* optimiert wurde (Zellen ohne endogenen Östrogenrezeptor), kein inhibitorischer Effekt von BRCA1 auf die Transaktivierung des ER α über einen ERE-gesteuerten Promoter dargestellt werden. Aufgrund dieser Ergebnisse waren weitere Versuche zur Untersuchung dieses Effekts hinfällig.

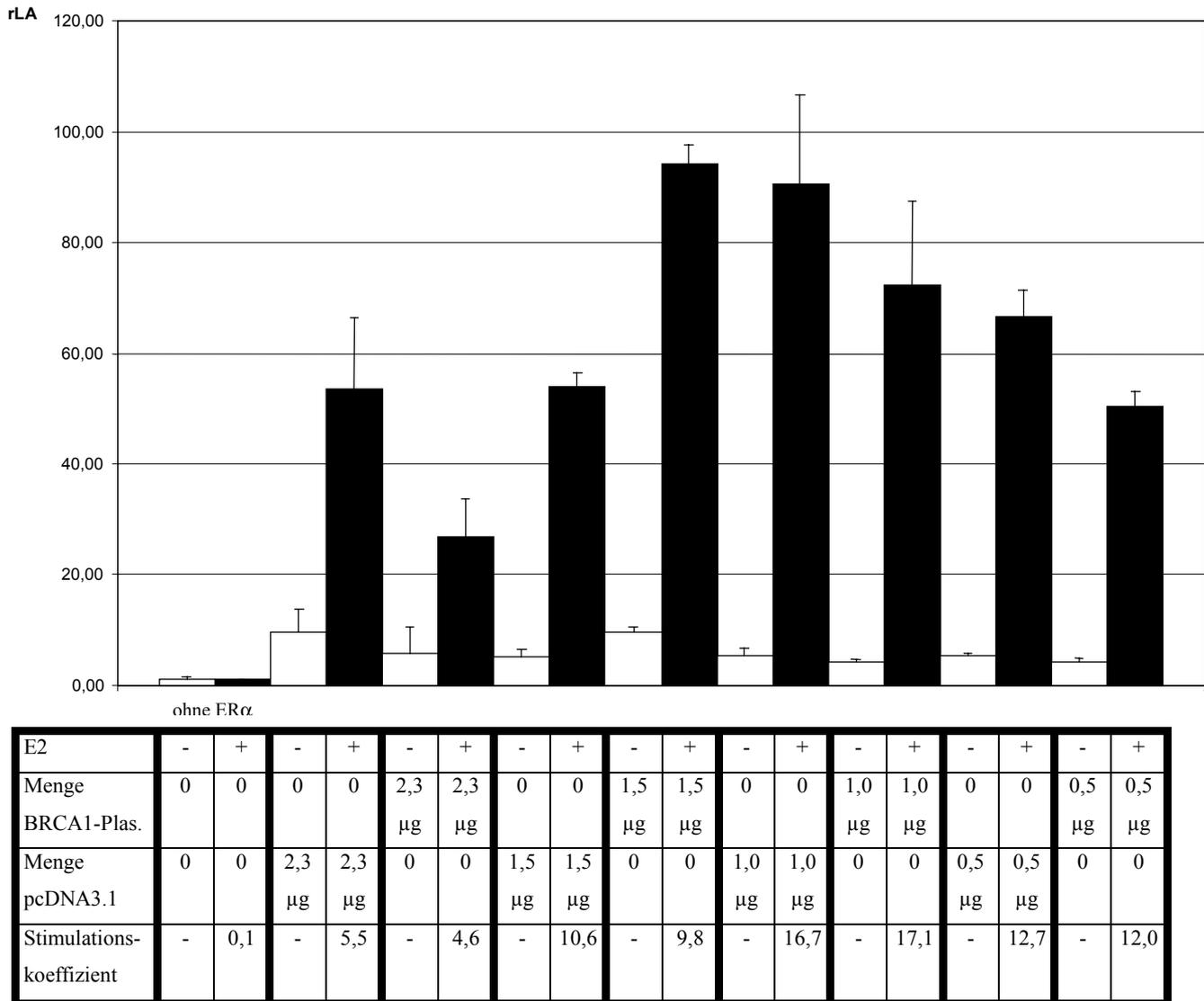


Abb.3.9.: Die relative Luciferaseaktivität als Maß für die ER α -abhängige Transaktivierung eines ERE-regulierten Reportergens unter Einfluß verschiedener Konzentrationen BRCA1(-Plasmid). Die Stimulationskoeffizienten zwischen den Ansätzen mit und ohne E2-Inkubation sind zeigen sich stark unterschiedlich.

3.2. Expressionen der Komponenten der ER-Transaktivierungsmaschinerie in Endometriumgewebe und -karzinomen

3.2.1. Zyklusabhängige Expression

Der normale menstruelle Zyklus der Frau ist ein hervorragendes Modell, um die physiologische Genregulation durch die Hormone Östrogen und Progesteron zu untersuchen. Dieses beruht auf der geregelten hormonellen Stimulation und der damit verknüpften Morphologie des Endometriums. Da bei der Behandlung gynäkologischer Beschwerden, sowie zur Empfängnisverhütung Hormonpräparate verwendet werden, muß dieses bei der Analyse der Morphologie mit einbezogen werden. Das veränderte hormonelle Milieu

entspricht zwar nicht dem normalen menstruellen Zyklus, kann aber bei genauer Kenntnis der Medikation als Positivkontrolle verwendet werden.

3.2.1.1. Etablierung der Bestimmung der Phase des menstruellen Zyklus

Die 33 Präparate des Endometriumnormalgewebes wurden aufgrund ihrer morphologischen Besonderheiten in Proliferationsphase (frühe, mittlere, späte) und Sekretionsphase (frühe, mittlere, späte) eingeteilt. Neben den Gewebeproben prämenopausaler Patientinnen mit normalem Zyklus wurde eine Gewebeprobe einer Schwangeren (40. Woche) untersucht. Zudem wurden 6 Endometriumproben von postmenopausalen Frauen analysiert, von denen 3 unter Hormonersatztherapie standen.

Die Einteilung der Zyklusphasen wurde mit Hilfe des „Atlas der Histopathologie des Endometriums“ von G. Dallenbach-Hellweg und H. Poulsen durchgeführt. Die Phasenabschnitte wurden nach folgenden Kriterien charakterisiert, wobei die roten Färbungen bei den folgenden Bildern hier keine Aussagen haben :

(a) frühe Proliferationsphase :

Das Endometrium ist niedrig aufgebaut. Die Drüsen sind eng und regelmäßig verteilt. (Abb.3.10.A) Sie verlaufen gerade und sind im spindelzelligen Stroma eingelagert. Das Drüsenepithel ist niedrigkubisch und enthält kleine, rundlich-ovale chromatinreiche Kerne (Abb.3.10.B). Die Stromazellen sind kaum differenziert, gleichmäßig groß und von einem dichten Retikulinfasernetzwerk umspinnen. Die Stromazellkerne sind klein und dicht. Das Stromazellzytoplasma ist spärlich. Das Oberflächenepithel ist flach und noch in der Regeneration begriffen.

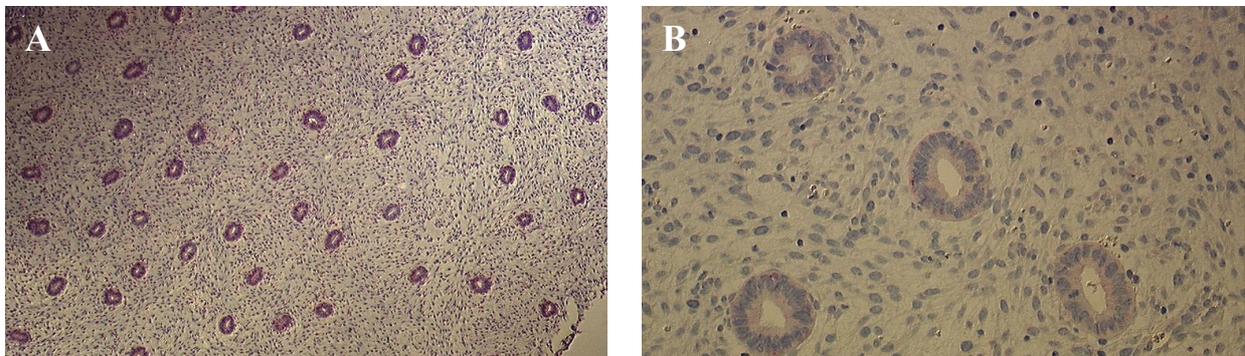


Abb.3.10.A,B: Endometriumproben aus dem Bereich der Funktionalis in der frühen Proliferationsphase: Es zeigen sich engen Drüsengänge (im Querschnitt) und spindelzelliges Stroma. (a: 50-fache, b: 200-fache Vergrößerung)

(b) mittlere Proliferationsphase :

Das Drüsenwachstum übertrifft das Höhenwachstum des Endometrium, wodurch die Drüsengänge beginnen, sich zu schlängeln (Abb.3.11.A). Die Drüsenepithelzellen sind hochzylindrisch und enthalten vergrößerte, ovale chromatinreiche Kerne in spärlichem Zytoplasma. Nukleoli sind deutlich erkennbar (Abb.3.11.B). Die Anzahl der Mitosen nimmt zu. Die spindelförmigen Stromazellen sind wenig differenziert und durch interstitielles Ödem weit auseinandergelagert.

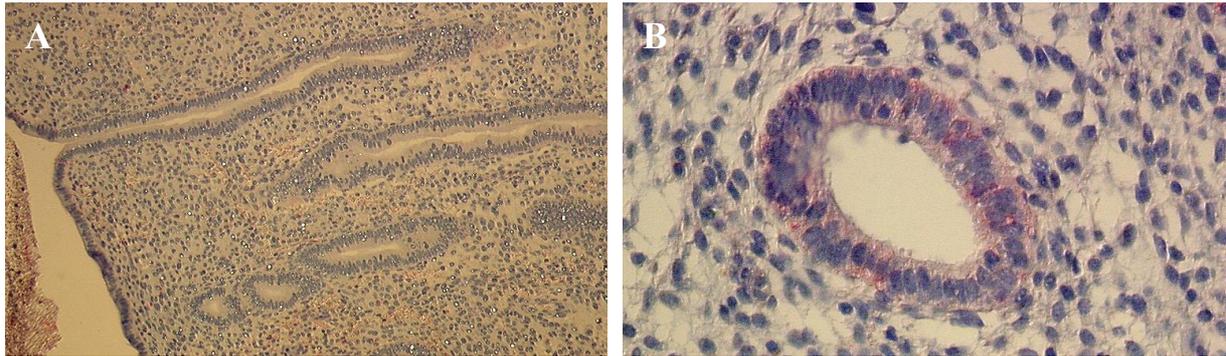


Abb.3.11.A,B: Endometriumproben aus den Bereich der Funktionalis in der mittleren Proliferationsphase. (a: 100x, b: 400x)

(c) späte Proliferationsphase :

Die Drüsengänge sind stärker geschlängelt. Das Drüsenepithel ist hochzylindrisch und teilweise mehrreihig übereinander gelagert (Abb.3.12.A). Die Zellkerne der Drüsenepithelzellen sind vergrößert, oval und reich an DNA. Ihre Nukleoli sind prominent, das Zytoplasma spärlich (Abb.3.12.B). Mitosen sind zahlreich. Die Stromazellen haben sich vergrößert und das interstitielle Ödem ist zurückgegangen. Viele Stromazellen befinden sich in der Mitose.

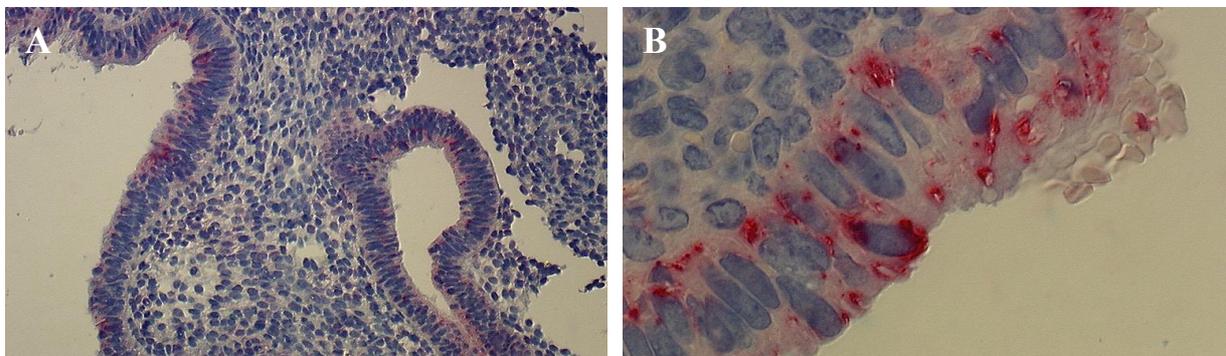


Abb.3.12.A,B: Endometriumproben aus dem Bereich der Funktionalis in der späten Proliferationsphase. (A: 200x, B: 1000x)

(d) frühe Sekretionsphase (Ovulationsphase) :

In den Drüsenepithelzellen bilden sich deutliche basale Vakuolen mit Sekret, wodurch die Kerne lumenwärts verschoben sind. Im Verlauf wandern die Kerne zur Zellbasis und supranukleär sind kleine Glykogenmengen zu erkennen (Abb.3.13.B). Durch die Vakuolenbildung haben sich die vorher mehrreihigen Epithelien wieder einreihig angeordnet. Hierdurch kommt es zu verstärkten Schlängelungen der Drüsengänge (Abb.3.13.A). Die Zellkerne sind chromatinreich, anfangs länglich-oval und runden sich dann ab (Abb.3.13.B). Das Oberflächenepithel zeigt keine Vakuolenbildung. Die Stromazellen sind unverändert.

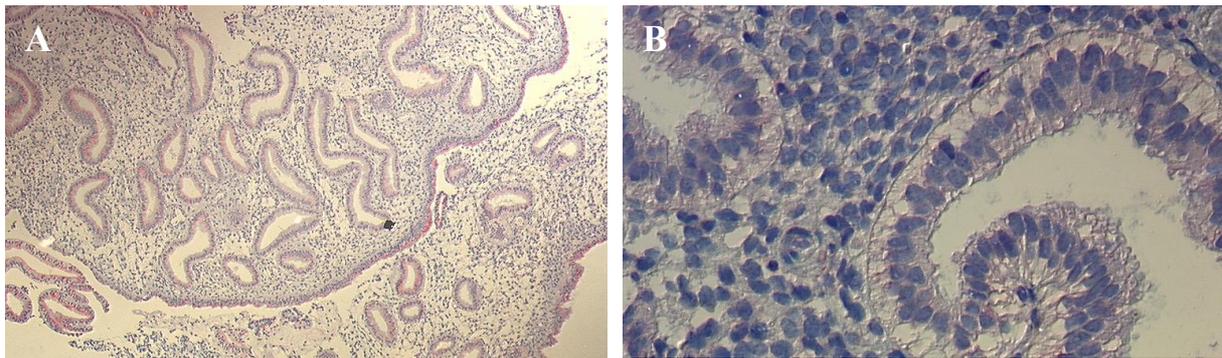


Abb. 3.13.A,B: Endometriumprouben aus dem Bereich der Funktionalis in der frühen Sekretionsphase. (A: 50x, B: 400x)

(e) mittlere Sekretionsphase :

Die apokrine Sekretion setzt ein. Die Kerne der Drüsenepithelzellen sind basal gelagert, rund und chromatinarm (Abb.3.14.A). Die apikalen Zellränder sind aufgrund der Sekretion ausgefranst (Abb.3.14.B). Die Höhe des Drüsenepithels nimmt ab. Die Drüsenlumina sind durch das glykogenhaltige Sekret erweitert. Die Stromazellen sind spindelförmig und leicht vergrößert (Abb.3.14.A). Es entsteht herdförmiges Stromaödem.

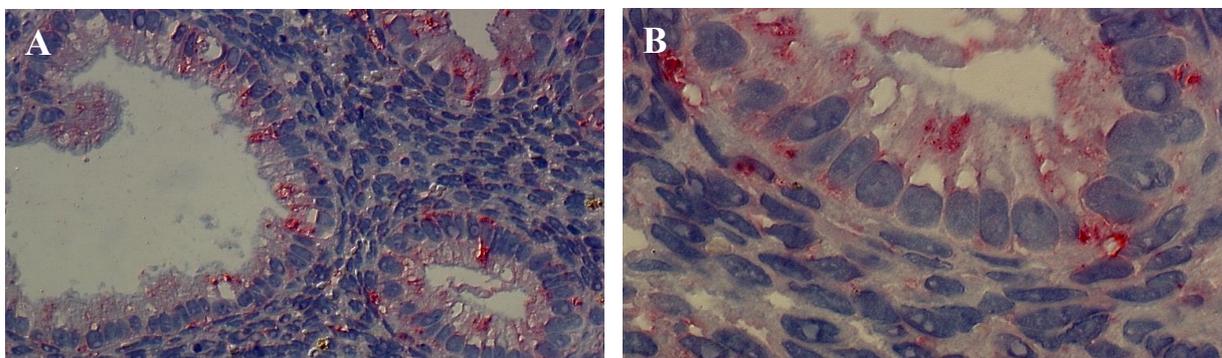


Abb.3.14.A,B: Endometriumprouben aus dem Bereich der Funktionalis in der mittleren Sekretionsphase. (A: 400x, B: 1000x)

(f) späte Sekretionsphase :

Die Sekretion ist beendet. Reste des Sekrets befinden sich in den Drüsenlumina. Das Stromaödem bildet sich zurück. Durch den Verlust des Stromaödems kommt es zum Kollaps der Drüsen. Diese sind deutlich sägeblattförmig. Es sind zwei Schichten des Endometriums unterscheidbar: die obere Spongiosa, die hauptsächlich aus Stromazellen besteht, und die Kompakta, die zum größten Teil aus geschlängelten, sägeblattförmigen dichtliegenden Drüsen besteht (Abb.3.15.A). Später sind die Spongiosa-Drüsen sägeblattförmig und ihre Epithelzellen hell, sekretorisch erschöpft und ausgefranst. Die Stromazellen differenzieren sich in zwei Zellarten aus: praedeziduale Zellen und Körnchenzellen. Die praedezidualen Zellen haben große, runde, helle Kerne und reichlich Zytoplasma. Die Körnchenzellen sind klein und rund, und ihre Kerne sind dicht, eingedellt und teilweise nierenförmig. Ihr Zytoplasma ist vakuolisiert (Abb.3.15.B).

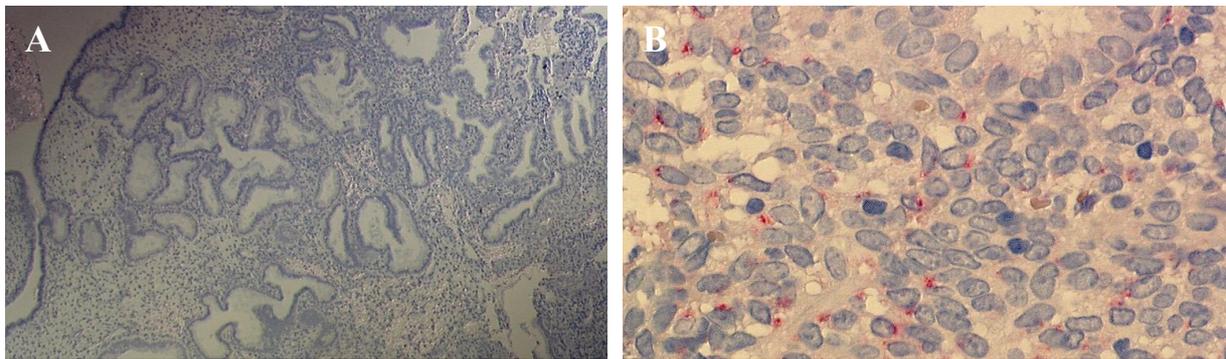


Abb.3.15.A,B: Die Funktionalis des Endometrium in der späten Sekretionsphase (A: 50x, B: 630x).

(g) postmenopausale Merkmale :

Neben den praemenopausalen Geweben, die den Zyklusphasen zugeordnet wurden, wurden 6 postmenopausale Endometriumgewebe untersucht. Von den sechs Patientinnen, denen diese Gewebe entnommen worden waren, wurden drei mit einer Hormonersatztherapie behandelt. Alle drei erhielten Östrogen-Progesteron-Kombinationspräparate. Diese Gewebe dienten zum Vergleich zu den Zyklusphasen, in denen die hormonellen Verhältnisse ähnlich waren. Die nicht hormonell beeinflussten Gewebe sollten auf folgende Merkmale der Atrophie untersucht werden: Das Endometrium ist niedrig. Die Stromazellen sind klein und spindelförmig. Es finden sich enge Basalisdrüsen mit niedrig kubischem Epithel. Die Drüsenepithelzellen enthalten kleine runde chromatindichte Kerne.

(h) Gewebe einer Schwangeren als Positivkontrolle :

Als Positivkontrolle diente neben den hormonbehandelten postmenopausalen Geweben eine Endometriumprobe einer Schwangeren (40. Woche). Hier steht das Endometrium unter dem Einfluß einer hohen Östrogen- und Progesteron-Konzentration.

3.2.1.2. SR- und SRC-Expression im menstruellen Zyklus

Die Expression von ER α , ER β , PR, AIB1 und SRC-1 wurde immunhistologisch in 33 prämenopausalen Endometriumgeweben analysiert. Kriterien für die Expressionsuntersuchung waren die Zyklusphase, die Zelltypen (Drüsenepithelzelle, Stromazelle) und die intrazelluläre Lokalisation (Kern, Zytoplasma). Bei den Drüsenepithelzellen konnte zusätzlich zwischen einer basalen und einer luminalen Lokalisation differenziert werden. Die Expressionen wurden im Bereich der Funktionalis bestimmt, da diese den hormonreponsiven Teil des Endometriums darstellt. Die immunhistologischen Signale wurden nach ihrer Stärke (relative Bestimmung), Verteilung (Prozentzahl positiver Zellen) und Art (diffus, feingranulär, punktförmig) gewertet. Problematisch war bei der genauen Bestimmung, daß sich hormonelle Wirkungen in der Funktionalis in verschiedenen Bereichen unterschiedlich schnell manifestierten, abhängig von der Entfernung zur Basalis und der Nähe zu Gefäßen. Gewertet wurden die im Gesamtbild dominanten Effekte (Tab.3.24.a und b).

Nr.	ER α				ER β				PR			
	DEZ		SZ		DEZ		SZ		DEZ		SZ	
	K	ZP	K	ZP	K	ZP	K	ZP	K	ZP	K	ZP
1309	13%		11%	35%	-	-	-	-	94%	-	37%	-
99	-		-	-	-	-	-	-	93%	-	68%	-
7469	18%	5%	-	2%	-	-	-	47%G	87%	-	76%	-
55	5%		-	36%	-	-	-	14%G	58%	-	73%	-
696	-		-	-	-	-	-	54%G	-	-	-	-
1284	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
497	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
229	-		-	-	-	-	-	15%G	-	-	-	-
963	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7629	8%		6%	28%	-	-	-	-	-	-	-	-
905	37%		16%	-	-	-	-	40%G	-	-	-	-
1337	-	87%	42%	-	-	-	-	23%G	94%	-	69%	-
681	-		-	-	-	-	-	50%G	78%	-	67%	-
722	-		-	-	-	7%P	-	45%G	8%	-	25%	-
7524	23%		-	-	-	-	-	48%G	G	-	63%	-
497	-	G	-	-	-	-	-	G	12%G	-	69%	-
406	52%		31%	-	-	58%	-	G	-	-	5%	-
7578	75%		25%	-	-	3%P	-	81%G	-	77%G	67%	-
7437	68%		14%	-	-	17%P	-	19%P	7%	G	52%	-
960	55%		5%	-	-	-	-	52%G	90%	68%	63%	-
670			2%	-	-	-	-	-	83%	-	74%	-
823		G	48%	-	-	-	-	10%G	24%	100%Cl	75%	-
890	83%		-	-	-	-	-	50%G	12%	97%G	12%	-
1057	70%		-	-	-	-	-	65%	42%			-
1160		67%	70%	-	-		-			-	93%	-
296	-		-	-	-		-		27%P	-	79%	-
1097	-	G	-	-	-	2%G	-	45%G	-	-	25%	-
254	-		-	-	-		-	5%G	-	-	51%	-
1445	-		-	-	-	-	-	-	-	-	30%	-
730	-		-	-	-	-	-	23%G	-	-		-
1218	-		-	-	-	-	-	-	-	-	51%	-
147	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7594	-		-	-	-	-	-	56%G	59%	-	65%	-
1250	-	G	-	-	-	-	-		95%	-	-	-
22	-		-	-	-	-	-	5%	20%	-	78%	-
491	10%		-	48%	-	-	-	6%	-	-	-	-
645	Punkte		72%	-	-	-	-	30%	81%	-	61%	-
189	-		-	-	-	-	-	G	-	-	50%G	61%
884				-	-	-	-		96%G	5%	40%	-
1529	20%		-	50%	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabelle 3.24.a: Immunhistologischer Nachweis der Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR in der Funktionalis von 33 praemenopausalen Geweben (Nr. 1309-7594), einer Gewebeprobe einer Schwangeren (Nr.1250) und 6 postmenopausaler Gewebe (ohne HRT: Nr.22-645; mit HRT: Nr.189-1529). Signalstärke: gelb = schwach, rot =stark; der Anteil positiver Zellen entspricht den Prozentzahlen, ausgefüllt Kästchen zeigen 100% an; Signalart: ohne Bemerkung = diffus, G = feingranulär, P = punktförmig. (DEZ = Drüsenepithelzellen, SZ = Stromazellen, K = Kern, ZP = Zytoplasma).

Nr.	SRC-1				AIB1			
	DEZ		SZ		DEZ		SZ	
	K	CP	K	CP	K	CP	K	CP
1309	-	15%G	-	-	-	G	-	-
99	-	84%G	-	5%G	-	68%G	-	-
7469	-	60%G	-	-	-	G	-	-
55	-	25%G	-	-	-	11%G	-	-
696	-	G	-	85%G	-	79%G	-	27%G
1284	-	40%P	-	60%P	-	-	-	-
497	-	17%P	-	2%P	-	78%G	-	20%G
229	-	21%G	-	12%P	-	81%G	-	-
963	-	18%G	-	10%P	-	21%G	-	-
7629	-	G	-	11%P	-	-	-	-
905	-	G	-	14%P	-	71%G	-	17%G
1337	-	70%G	-	48%G	-	78%G	-	22%G
681	-	55%G	-	35%P	-	86%G	-	5%G
722	-	G	-	70%G	-	35%P	-	47%P
7524	-	89%G	-	37%G	-	G	-	-
497	-	G	-	48%G	-	78%G	-	60%G
406	-	G	-	53%G	-	79%G	-	35%G
7578	-	G	-	42%P	-	88%G	-	-
7437	-	G	-	68%G	-	G	-	31%G
960	-	G	-	12%P	-	-	-	-
670	-	G	-	13%P	-	77%G	-	-
823	P	G	-	30%G	-	-	-	-
890	-	G	-	10%G	-	-	-	-
1057	-	G	-	60%G	-	-	-	-
1160	-	G	-	30%G	-	G	-	55%G
296	-	51%G	-	30%P	-	G	-	G
1097	-	70%G	-	35%P	-	96%	-	52%G
254	-	G	-	42%P	-	82%G	-	47%
1445	-	-	-	40%G	-	85%G	-	74%G
730	-	65%G	-	G	P	G	P	G
1218	-	-	-	-	-	69%G	-	-
147	-	G	-	45%P	-	90%G	-	54%G
7594	-	G	-	14%G	-	G	-	52%G
1250	-	G	-	60%G	-	G	-	53%G
22	-	10%G	-	30%G	-	-	-	-
491	-	4%G	-	-	-	11%G	-	32%G
645	-	20%G	-	25%G	-	12%G	-	37%G
189	-	G	-	G	-	G	-	60%G
884	-	-	-	5%P	-	91%G	-	4%G
1529	-	G	-	-	-	92%G	-	13%G

Tabelle 3.24.b: Immunhistologischer Nachweis der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1 und SRC-1 in der Funktionalis von 33 prämenopausalen Geweben (Nr. 1309-7594), einer Gewebeprobe einer Schwangeren (Nr.1250) und 6 postmenopausaler Gewebe (ohne HRT: Nr.22-645; mit HRT: Nr.189-1529). Signalstärke: gelb = schwach, rot =stark; der Anteil positiver Zellen entspricht den Prozentzahlen, ausgefüllt Kästchen zeigen 100% an; Signalart: ohne Bemerkung = diffus, G = feingranulär, P = punktförmig. (DEZ = Drüsenepithelzellen, SZ = Stromazellen, K = Kern, ZP = Zytoplasma).

(a) Progesteronrezeptor

Die Expression des PR zeigte im Verlauf des menstruellen Zyklus deutliche Schwankungen. In der sehr frühen Proliferationsphase traten in den Drüsen- und Stromazellen schwache Kernfärbungen auf, die in der mittleren Proliferationsphase nicht mehr zu sehen waren. In den Stromazellen war ab der späten Proliferationsphase eine deutliche Kern-, aber keine

Zytoplasmafärbung zu erkennen. In der frühen Sekretionsphase wurde die Expression etwas schwächer, in der mittleren Sekretionsphase wieder deutlich stärker (Abb.3.16.C). Kurz vor der Menstruation war sie nur noch sehr schwach.

In den Drüsenzellen war der PR am stärksten im Zeitraum mittlere Proliferationsphase (Abb.3.16.A) bis mittlere Sekretionsphase vertreten. Die Lokalisation in den Kernen konnte hierbei sehr unterschiedlich zwischen einzelnen Geweben eines Phasenabschnittes sein. Der PR-Nachweis im Zytoplasma der Drüsenzellen fiel besonders in der frühen sekretorischen Phase sehr stark aus (Abb.3.16.B), während in den anderen Phasenabschnitten der PR hier - wenn überhaupt - nur schwach nachweisbar war. Die zytoplasmatischen Färbungen in den Drüsenzellen waren hauptsächlich im luminalen (supranukleären) Teil der Zellen lokalisiert (Abb.3.16.B).

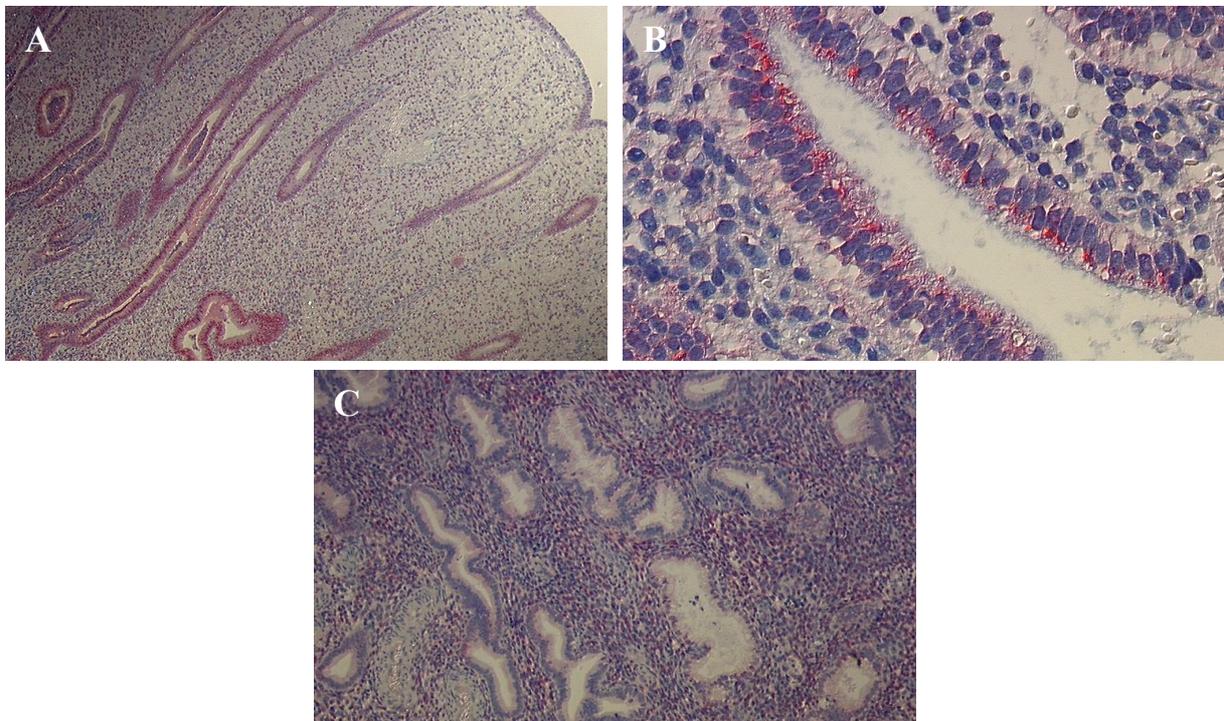


Abb.3.16.A-C: Nachweis des Progesteronrezeptors in der Funktionalis von Endometriumgewebe in der (A) mittleren Proliferationsphase (50x), (B) frühen Sekretionsphase (400x) und (C) mittleren Sekretionsphase (100x).

(b) Östrogenrezeptor α

Insgesamt war die Expression der ER α in den Drüsenepithelzellen sehr stark und in den Stromazellen wesentlich schwächer exprimiert. Das Vorkommen des ER α in den Stromazellen war durchgehend schwach und zeigte nur geringfügige zyklische Schwankungen. Auffallend war, daß er in der frühen Proliferationsphase im Zytoplasma auftrat (Abb.3.17.A), während er im weiteren Verlauf der Proliferationsphase und in der frühen Sekretionsphase

größtenteils in den Kernen nachzuweisen war. In der mittleren bis späten Sekretionsphase war dagegen in den Stromazellen der ER α nicht mehr zu detektieren.

Wesentlich stärker zeigte sich die ER α -Expression in den Drüsenzellen. In diesem Zelltypus zeigte sich sehr stark ein zyklischer Verlauf. In der frühen Proliferationsphase war die Proteinexpression des ER α nur schwach, stieg während der mittleren Proliferationsphase besonders im Zytoplasma stark an und war kurz vor der Ovulation am stärksten vorhanden (Abb.3.17.B). In der späten Proliferationsphase und der frühen Sekretionsphase verstärkte sich das Auftreten des ER α in den Zellkernen der Drüsenzellen (Abb.3.17.C). Direkt nach der Ovulation in der frühen Sekretionsphase war die Kernfärbung am stärksten, während die im Zytoplasma etwas nachließ. Hierbei zeigte sich die Zytoplasmafärbung in einigen Geweben diffus, in anderen deutlich luminal gelagert (Abb.3.17.D). Im weiteren Verlauf der Sekretionsphase nahm die Menge an ER α stark ab und war kurz vor der Menstruation fast nicht mehr vorhanden.

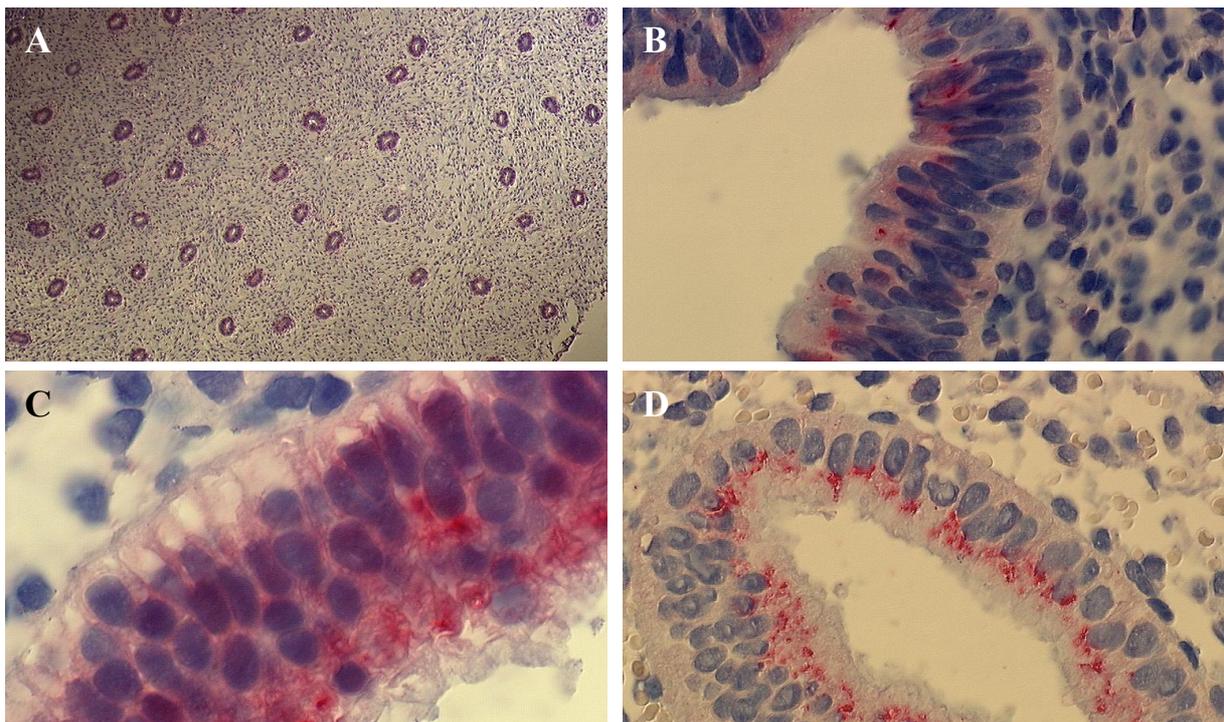


Abb.3.17.A-D: Nachweis des Östrogenrezeptor α in der Funktionalis von Endometrium aus der (A) frühen Proliferationsphase (50x), (B) mittleren Proliferationsphase (630x), (C) frühen Sekretionsphase (1000x) und (D) späten Sekretionsphase (630x).

(c) Östrogenrezeptor β

Der ER β war im Vergleich zum ER α in den untersuchten Geweben nur schwach exprimiert. Dieses zeigte sich besonders deutlich bei der Betrachtung der Drüsenepithelien. In den Drüsenepithelzellen konnte der ER β nur im Zytoplasma, aber nicht in den Zellkernen

nachgewiesen werden. Im zytoplasmatischen Zellteil war der ER β auch nur schwach und diffus während der mittleren Sekretionsphase vertreten. In 3 Geweben der mittleren bis späten Proliferationsphase wurden im Drüsenzellzytoplasma punktförmige Signale nachgewiesen, in einem stärkere (Abb.3.18.B).

In den Stromazellen war ebenfalls keine Kernexpression nachzuweisen. Im Zytoplasma dieser Zellen dagegen waren schwache, feingranuläre Signale zu sehen. Im Abschnitt von der mittleren Proliferationsphase bis zur mittleren Sekretionsphase (Abb.3.18.A,B) waren die ER β -Signale deutlich, wobei sie direkt vor der Ovulation am stärksten ausfielen (Abb.3.18.C). In der späten Sekretionsphase und der frühen Proliferationsphase waren die ER β -spezifischen Signale nur sehr schwach.

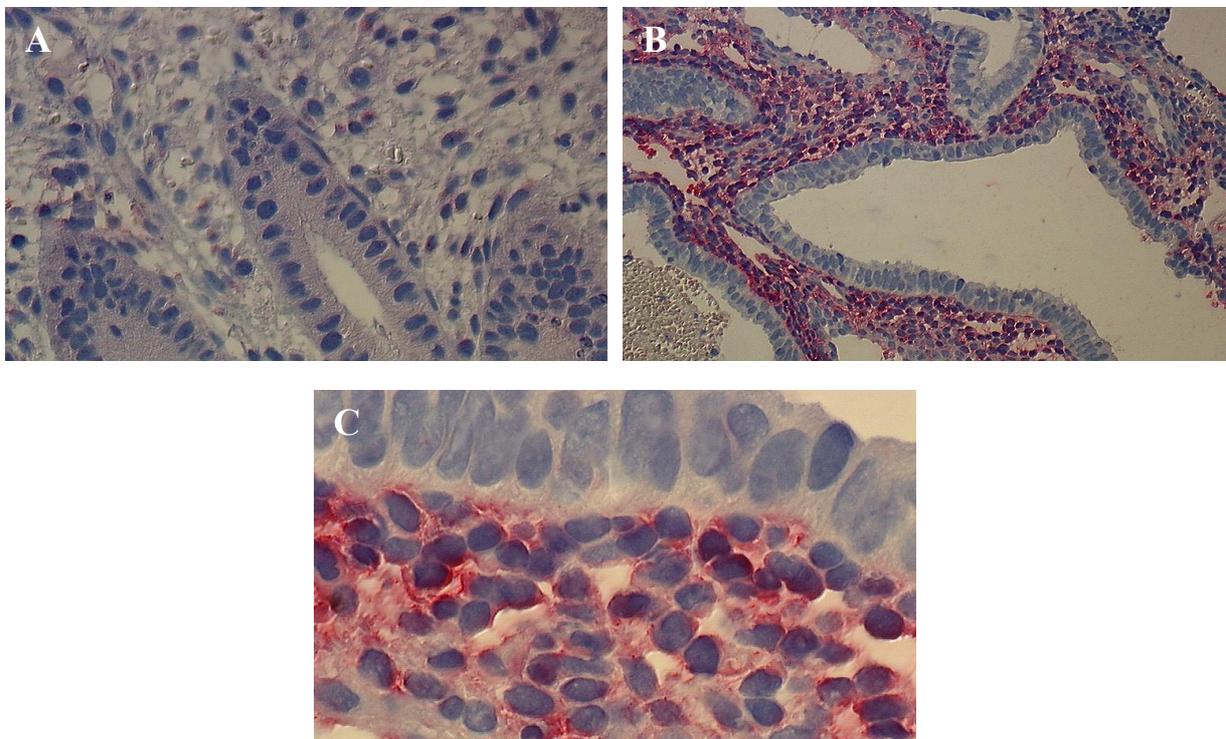


Abb.3.18.A-C: Nachweis des Östrogenrezeptor β in der Funktionalis von Endometrium in der (A) mittleren Proliferationsphase (50x) und (B,C) späten Proliferationsphase (B: 200x, C: 1000x).

(d) AIB1

Der Steroidrezeptor-Koaktivator AIB1 ließ sich in den Zellkernen beider Zelltypen nur schwach als punktförmiges Signal in einzelnen Geweben nachweisen. Wesentlich stärker war die AIB1-Expression im Zytoplasma der Stroma- und Drüsenzellen vorhanden, wobei die Signale in den Drüsenzellen deutlich stärker und häufiger waren als die in den Stromazellen (Abb.3.19.A,C). Die zytoplasmatische Färbung zeigte sich bis auf die frühe Sekretionsphase (Abb.3.19.B) durchgehend stark. In der Phase kurz nach der Ovulation waren fast keine AIB1-Signale zu detektieren, weder in den Stroma-, noch in den Drüsenzellen. In den

Stromazellen waren die AIB1-Signale besonders in der mittleren und späten Sekretionsphase deutlich (Abb.3.19.D).

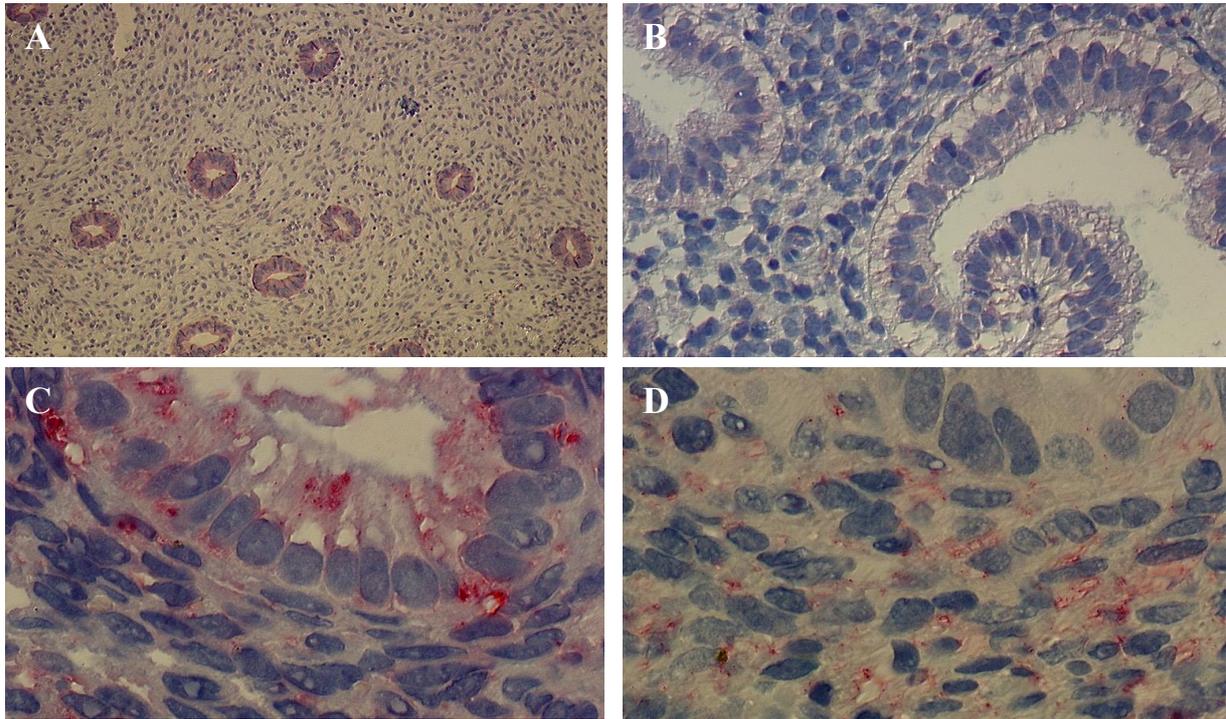


Abb.3.19.A-D: Nachweis von *amplified in breast cancer-1* (AIB1) in der Funktionalis von Endometrium aus der (A) frühen Proliferationsphase (100x), (B) frühen Sekretionsphase (400x), (C) mittleren Sekretionsphase (1000x) und (D) späten Sekretionsphase (1000x).

(e) SRC-1

Der Koaktivator SRC-1 zeigte wie AIB1 eine deutliche zytoplasmatische Expression. SRC-1-spezifische Signale wurden im Zytoplasma der Drüsenzellen im Verlauf des menstruellen Zyklus durchgehend nachgewiesen (Abb.3.20.A-D). Kernfärbungen traten hier nicht auf. Am stärksten waren die SRC-1-Signale in der frühen Sekretionsphase. Diese waren in den Drüsenzellen verstärkt basal (subnukleär) zu detektieren (Abb.3.20.B). In den Phasenabschnitten vor und nach der Menstruation fielen die SRC-1-Nachweise am schwächsten aus (Abb.3.20.A). In den Stromazellen war die SRC-1-Expression etwas schwächer als in den Drüsenzellen, trat aber auch hier nur im Zytoplasma und nicht in den Zellkernen auf. Die zyklischen Schwankungen entsprachen den in den Drüsenzellen beobachteten, fielen aber in der frühen Sekretionsphase schwächer und in der späteren stärker aus (Abb.3.20.C).

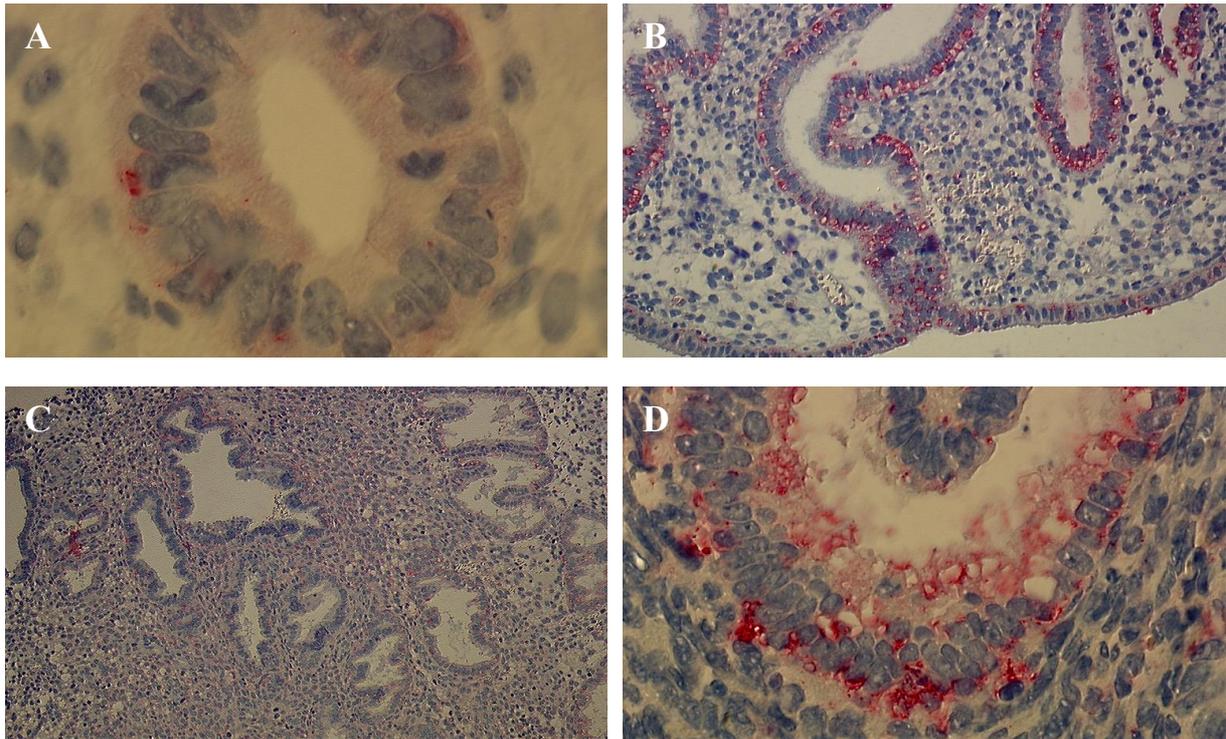


Abb.3.20.A-D: Nachweis des *steroid receptor coactivator-1* (SRC-1) in der Funktionalis von Endometrium aus der (A) frühen Proliferationsphase (1000x), (B) frühen Sekretionsphase (200x), (C) mittleren Sekretionsphase (100x) und (D) späten Sekretionsphase (630x).

(f) Zusammenfassender Vergleich

Bei direktem Vergleich der Ergebnisse waren folgende Beobachtungen auffällig (Abb. 3.21.):

- die untersuchten Proteine zeigten zyklusabhängige Expressionsschwankungen; die Expressionen der Steroidhormonrezeptoren variierten stärker, die der Koaktivatoren schwächer.
- ER α und ER β zeigen unterschiedliche Lokalisation bezüglich Zelltypus und -kompartiment.
- Der Östrogenrezeptor β trat am stärksten im Zytoplasma von Stromazellen auf und dies besonders in der Phase um die Ovulation.
- Beide SRCs zeigten verstärkt zytoplasmatische Expression und waren in den Drüsenzellen stärker vorhanden als in den Stromazellen.
- In der frühen sekretorischen Phase waren die Konzentrationen von SRC-1 (stärkstes Signal) und AIB1 (kein Signal) gegenläufig.

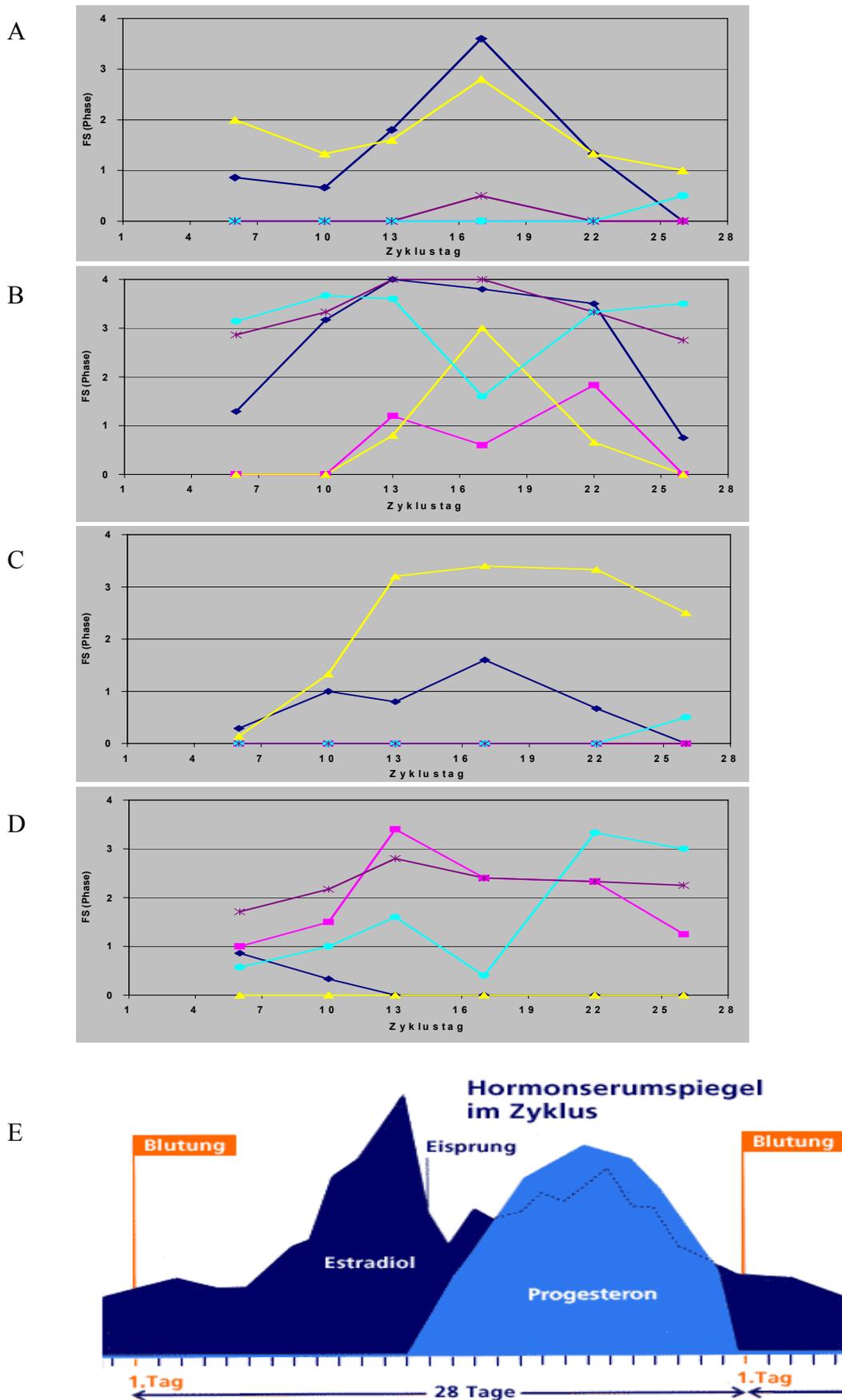


Abb. 3.21.A-D: Stärke der immunhistochemischen Nachweise von ER α (-◆-), ER β (-■-), PR (-▲-), AIB1 (-●-), SRC-1 (-*-) im Verlauf des menstruellen Zyklus in (A) den Kernen der Drüsenepithelzellen, (B) dem Zytoplasma der Drüsenepithelzellen, (C) den Kernen der Stromazellen und (D) dem Zytoplasma der Stromazellen im Vergleich zum Serumspiegel von Östradiol und Progesteron (E).

(g) SR- und SRC-Expression in postmenopausalem Endometriumgewebe

Das morphologische Erscheinungsbild der postmenopausalen Endometriumgewebe, sowohl mit als auch ohne Hormonersatztherapie (HRT), war nicht einheitlich. Die untersuchten postmenopausalen Gewebe, bei denen die Patientinnen keiner Hormonersatztherapie unterstanden, zeigten sich ebenso wenig komplett atrophisch, wie die Gewebe der Patientinnen mit Hormonersatztherapie. Stattdessen waren alle postmenopausalen Gewebe morphologisch nicht auffallend unterschiedlich zu den praemenopausalen Gewebeproben. Jeweils ein Gewebe der Proben ohne HRT entsprach morphologisch der mittleren Proliferationsphase, der mittleren und der späten Sekretionsphase. Die in diesen Geweben beobachtete Expression der Rezeptoren ähnelte denen der praemenopausalen Geweben in den entsprechenden Phasen. Unterschiede zeigten sich im Vorkommen der Koaktivatoren, die hier weniger stark exprimiert wurden als in den praemenopausalen Gewebeproben.

Die postmenopausalen Gewebe, die unter dem Einfluß einer Hormonersatztherapie standen, zeigten deutlich die hormonellen Effekte. Diese zeigten sich nicht nur bei der Expression und Lokalisation der Steroidrezeptoren, sondern auch bei dem im Vergleich zu den Geweben ohne Hormonersatztherapie stärkeren Auftreten der Koaktivatoren. Zwei der Gewebe entsprachen histologisch der mittleren Sekretionsphase und eines der mittleren Proliferationsphase. Auch die Expressionshöhen der Rezeptoren und Koaktivatoren entsprachen den phasenspezifischen Beobachtungen der praemenopausalen Gewebe. Bemerkenswert ist, daß in keinem der postmenopausalen Gewebe in den Drüsenzellen der ER β als Protein nachgewiesen werden konnte.

(h) Expressionen bei Schwangerschaft

Bei den Gewebepreparaten der schwangeren Frau zeigt sich sehr deutlich der Einfluß hoher Östrogen- und Progesteronkonzentrationen. Es zeigte die Morphologie von Endometriumgewebe der frühen Sekretionsphase. Der Östrogenrezeptor α zeigte sehr starke Signale im Drüsenepithel, während der Progesteronrezeptor weniger stark nachgewiesen wurde (Abb.3.22.A). Der ER β zeigte eine starke Zytoplasmafärbung der Stromazellen (Abb.3.22.B). Von den Koaktivatoren war SRC-1 der deutlich stärker exprimierte (Abb.3.22.E). Beide Koaktivatoren wurden hauptsächlich in den Drüsenzellen nachgewiesen, wobei AIB1 in Drüsenzellen ohne basale Sekretvakuole in größeren Mengen vorhanden war, als in solchen mit Vakuole (Abb.3.22.D).

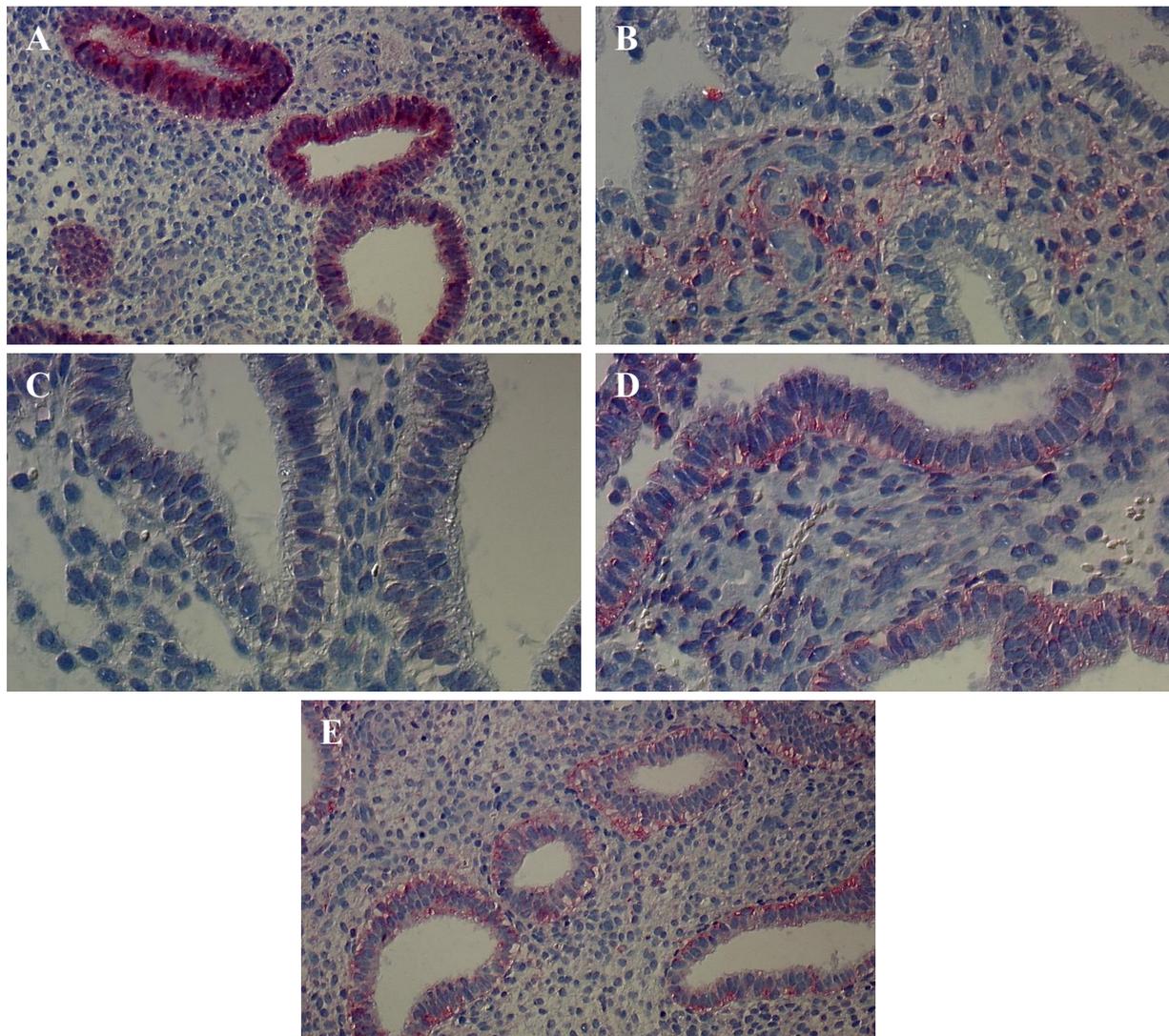


Abb.3.22.A-E: Nachweis von (A) ER α (200x), (B) ER β (400x), (C) PR (400x), (D) AIB1 (400x) und (E) SRC-1 (200x) in der Funktionalis von Endometrium während einer Schwangerschaft (40. Woche).

3.2.2. mRNA-Expression von SRs und SRCs in Endometriumkarzinomen

Die relativen Expressionshöhen der mRNAs der Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR, sowie der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1, TIF2 und SRC-1 wurden in 31 Endometriumkarzinomen mittels quantitativer RT-PCR bestimmt. Bei der SRC-1-Expression wurden die Spleißvarianten 1a und 1e und bei der ER α -Expression zusätzlich die ER α -Exon5-Deletionsvariante untersucht. Korrelationen der relativen Expressionswerte untereinander wurden mit Hilfe der *Spearman* Rangkorrelation analysiert. Histologisch wurden die 31 Karzinome wie folgt eingeteilt: 27 Adenokarzinome, 3 endometroide Karzinome und 1 nicht charakterisiertes. Alle 31 Gewebe stammten von postmenopausalen Frauen. Zum Vergleich wurden neben den Karzinomen vier normale praemenopausale Gewebe und zwei normale postmenopausale Gewebe untersucht. Von den vier praemenopausalen Geweben war eins aus

der Proliferationsphase, eins aus der frühen Sekretionsphase und zwei waren aus der späten Sekretionsphase.

Adenokarzinome								
Probe	ER α	ER α Δ Ex5	ER β	PgR	AIB1	TIF2	SRC1a	SRC1e
E1	0,86	0,08	0,01	0,79	7,77	0,21	0,53	0,66
E2	0,09	0,06	0,00	0,01	8,31	8,18	0,45	0,37
E3	0,93	0,09	0,01	0,51	2,05	1,13	0,14	0,24
E4	1,01	0,29	0,02	0,23	1,08	1,55	0,15	0,20
E5	2,32	1,23	0,00	3,87	26,24	14,22	2,15	4,38
E6	2,75	0,65	0,12	8,39	34,06	0,27	0,23	0,35
E7	0,44	0,02	0,00	0,34	4,38	2,14	2,43	3,11
E9	1,46	0,22	0,00	0,02	4,78	0,27	0,12	0,19
E10	0,65	0,11	0,00	0,81	2,85	1,44	0,11	0,12
E11	4,80	0,55	0,04	2,34	8,45	6,79	0,48	1,28
E12	1,16	0,43	0,00	1,36	4,36	1,29	0,43	0,55
E15	0,83	0,03	0,06	1,87	0,61	0,91	0,19	0,22
E16	1,36	1,31	0,27	4,58	43,84	4,44	1,53	2,25
E17	1,14	0,42	0,00	0,00	4,01	7,68	0,52	1,09
E18	0,17	0,13	0,00	4,81	4,31	0,70	0,20	0,21
E19	0,34	0,20	0,08	0,12	5,25	6,41	2,00	2,28
E20	0,04	0,02	0,01	0,02	0,21	0,15	0,04	0,06
E21	8,20	3,92	0,00	36,54	63,84	27,93	8,98	11,67
E23	0,03	0,01	0,00	0,05	1,46	1,69	0,12	0,24
E24	0,00	0,00	0,02	0,01	16,80	3,08	0,11	1,17
E25	2,69	1,48	0,00	9,51	7,19	3,95	0,90	0,75
E26	4,72	0,63	0,02	28,90	17,07	6,53	0,92	0,98
E28	7,70	0,85	0,00	6,36	34,33	8,92	0,80	1,29
E29	5,16	0,67	0,05	14,72	13,85	5,67	1,28	1,35
E31	4,18	2,13	0,03	0,04	6,68	4,19	1,09	2,30
E33	0,49	0,11	0,03	2,61	4,78	1,70	0,27	0,14
E34	0,43	0,29	0,01	0,05	7,61	1,08	0,31	0,14

Endometrioide Karzinome								
Probe	ER α	ER α Δ Ex5	ER β	PgR	AIB1	TIF2	SRC1a	SRC1e
E13	0,00	0,00	0,00	0,01	0,63	0,52	0,12	0,13
E14	7,61	2,28	0,11	0,03	8,17	5,44	1,60	1,47
E32	2,45	0,89	0,04	7,22	10,17	8,46	0,77	1,07

Endometriumgewebe-praemenopausal								
EN3	0,38	0,24	2,28	16,35	18,80	14,91	1,69	2,32
EN4	28,28	0,94	5,98	10,51	20,23	24,04	4,16	5,29
EN6	2,72	1,18	34,66	30,77	49,22	19,70	5,54	6,88
EN8	0,67	0,26	24,83	6,76	39,30	9,82	2,26	3,05

frühe SP
mittlere SP
frühe PP
späte PP

Endometriumgewebe-postmenopausal								
EN9	5,24	0,83	0,00	1,69	5,83	3,32	0,41	0,28
EN10	0,88	0,25	0,00	2,74	28,46	2,57	0,89	0,89

Tab.3.25.: Die relativen Expressionswerte (RE) der Steroidrezeptoren und Steroidrezeptor-Koaktivatoren in Endometriumkarzinomen (E) und -normalgeweben (EN). Die Werte stellen die Mittelwerte von Dreifachbestimmungen dar. (SP = Sekretionsphase, PP = Proliferationsphase).

Aus den relativen Expressionswerten lassen sich folgende Aussagen treffen (Tab.3.25):

- Die durchschnittlichen Standardabweichungen waren bei den Bestimmungen der relativen Expressionshöhen folgendermaßen: $SA(ER\alpha) = \pm 0,334$; $SA(ER\alpha\Delta Exon5) = \pm 0,088$; $SA(ER\beta) = \pm 0,041$ (in den Karzinomen) und $\pm 0,501$ (in den Normalgeweben); $SA(PR) = \pm 0,425$; $SA(AIB1) = \pm 1,000$; $SA(TIF2) = \pm 0,718$; $SA(SRC-1a) = \pm 0,081$; $SA(SRC-1e) = \pm 0,137$.
- Die Stärken der relativen Expressionswerte lassen sich unter Berücksichtigung der bei der quantitativen RT-PCR angewendeten Zyklenzahl in folgende Reihenfolge stellen:
 $TIF2 > AIB1 > PR > SRC-1 (SRC-1e > SRC-1a) > ER\alpha (wt > \Delta Exon5) > ER\beta$.
- Während in einigen Proben für einen oder mehrere Steroidrezeptoren keine mRNA nachgewiesen werden konnten ($RE = 0$), waren die Steroidrezeptor-Koaktivatoren in allen Proben nachweisbar.
- Die relativen Expressionswerte der SRCs lagen in den Karzinomen nicht höher, als in den Normalgeweben.
- Die Expressionswerte des $ER\alpha$ unterschieden sich nicht grundlegend zwischen den Karzinomen, sowie den prae- und postmenopausalen Normalgeweben.
- Die Expression des $ER\beta$ zeigte die größten Unterschiede: In den postmenopausalen Normalgeweben, sowie den Karzinomen (postmenopausal) war der $ER\beta$ deutlich niedriger exprimiert, als in den praemenopausalen Normalgeweben. Hierbei schien die $ER\beta$ -Expression in den praemenopausalen Endometriumgeweben Veränderungen durch den menstruellen Zyklus zu unterliegen.
- Die Expression der SRCs lag in den praemenopausalen Normalgeweben höher, als in den postmenopausalen. Die in den Karzinomen gemessenen Expressionshöhen schwankten in einem Bereich zwischen den prae- und postmenopausalen Expressionshöhen.

Mögliche Zusammenhänge zwischen den mRNA-Expressionswerten der Komponenten der ER-Transaktivierungsmaschinerie in den 27 Adenokarzinomen wurden mit Hilfe der *Spearman*-Rangkorrelation analysiert.

Die Expression des $ER\alpha$ korrelierte stark positiv ($P < 0,01$) mit der Expression seiner Exon5-Spleißvariante ($r = 0,860$; $P < 0,001$). Zudem korrelierte sie deutlich mit der Expression des Progesteronrezeptors ($r = 0,637$; $P < 0,001$), der von AIB1 ($r = 0,554$; $P = 0,003$) und der SRC-1-Variante a ($r = 0,529$; $P = 0,005$). Etwas schwächer ($0,01 < P < 0,05$) korrelierte sie mit der von TIF2 ($r = 0,428$; $P = 0,026$) und SRC-1e ($r = 0,480$; $P = 0,011$). Keine Beziehung

wurde zu der Expression des ER β aufgezeigt. Für die Expression der ER α -Exon5-Deletionsvariante waren die Korrelationen, die für die ER α -Wildtyp-Expression gezeigt wurden, noch deutlicher (PR: $r = 0,586$; $P = 0,001$ / AIB1: $r = 0,601$; $P = 0,001$ / TIF2: $r = 0,493$; $P = 0,009$ / SRC-1a: $r = 0,621$; $P = 0,001$ / SRC-1e: $r = 0,503$; $P = 0,007$).

Im Gegensatz zur ER α -Expression korrelierte die ER β -Expression mit keiner der anderen gemessenen Expressionen.

Die PR-Expression zeigte neben der Beziehung zur ER α -Expression eine deutliche Korrelation zu der Expression von AIB1 ($r = 0,495$; $P = 0,009$) und eine etwas schwächere zu der von SRC-1a ($r = 0,440$; $P = 0,022$). Keine Korrelation bestand zu TIF2 und SRC-1e, sowie ER β .

Neben den positiven Korrelationen zu den Steroidrezeptor-Expressionen zeigte sich für die Expressionen der SRCs auch ein starker Zusammenhang untereinander. Die Expressionswerte von AIB1 korrelierten deutlich positiv mit denen von TIF2 ($r = 0,555$; $P = 0,003$), SRC1a ($r = 0,600$; $P = 0,001$) und SRC-1e ($r = 0,626$; $P = 0,001$), die von TIF2 korrelierte zusätzlich mit denen von SRC-1a ($r = 0,667$; $P = 0,001$) und SRC-1e ($r = 0,733$; $P = 0,001$) und die Expressionshöhen von SRC-1a und SRC-1e ($r = 0,850$; $P = 0,001$) korrelierten positiv miteinander.

Bei den Expressionsbestimmungen in den drei endometroiden Karzinomen ergab sich kein klares Bild. Die Werte der gemessenen Expressionen waren unterschiedlich stark.

Bei der Analyse der vier prämenopausalen Normalgeweben zeigten sich phasenabhängige Expressionsunterschiede. Diese gingen mit den Ergebnissen der immunhistologischen Untersuchungen (Kapitel 3.1.) einher. ER α , ER β , PR und die SRCs waren deutlich exprimiert (Abb.3.25). Im Vergleich dazu wurden in zwei postmenopausalen Endometriumgeweben die Expressionen bestimmt. Hier zeigte sich eine leicht niedrigere Expression von TIF2 und der SRC-1-Varianten. Ein besonders deutlicher Unterschied lag bei der ER β -Expression, wobei die beiden postmenopausalen Gewebeproben ER β -negativ waren. Dieses Bild wurde noch deutlicher durch einen Vergleich der prämenopausalen Normalgeweben zu den postmenopausalen Karzinomen. Von den 27 Adenokarzinomen waren 12 ER β -negativ mit maximalem Expressionswert von 0,27. Im Vergleich dazu lag der REV[ER β] in den prämenopausalen zwischen 2,28 und 34,66, also um mehr als das 6,2-fache höher als der Maximalwert der postmenopausalen Karzinome.

Um einen Vergleich zwischen den Ergebnissen der Expressionsmessungen auf mRNA-Ebene und den immunhistologischen Untersuchungen der zyklusabhängigen Proteinexpressionen zu schaffen, wurden neben der RNA-Extraktion von einigen Gewebeproben Gefrierschnitte

angefertigt, die immunhistologisch untersucht wurden. Es zeigte sich, daß die Expressionswerte mit einem relativen Maß von starker, schwacher und keiner spezifischen Färbung übereinstimmten (Abb. 3.23.A).

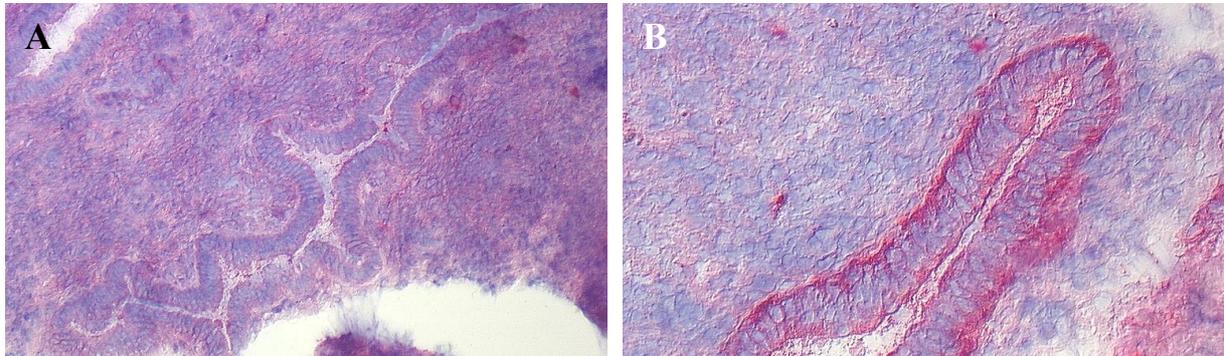


Abb.3.23.A,B: Immunhistologische Untersuchung von gefriergeschnittenen Geweben (A) zum Nachweis des ER α (20x) im Vergleich zu einem quantitativ bestimmten relativen Expressionswert (RE[ER α]) von 28,28 und (B) zum Nachweis von TIF2 (40x) im Vergleich zu einem quantitativ bestimmten relativen Expressionswert (RE[TIF2]) von 24,04.

An den Gefrierpräparaten konnte auch die Proteinexpression des dritten SRC, TIF2, untersucht werden, da an diesen Präparaten der Antikörper von TIF2 eine spezifische Färbung bewirkte (Abb.3.23.B). Es zeigt sich ein deutlicher TIF2-Nachweis im Zytoplasma der Drüsenepithelzellen. Die Färbung ist basal etwas stärker als luminal (frühe Sekretionsphase). Zusammengenommen mit den mRNA-Expressionswerten scheint TIF2, ähnlich wie AIB1 und SRC-1, durchgehend im Zyklus exprimiert zu werden und nur leichten Schwankungen im Verlauf des Zyklus zu unterliegen.

3.2.3. Korrelation der mRNA-Expressionslevel in Karzinomen zu klinischen Parametern

Für die Endometriumkarzinome wurden neben den Expressionshöhen auch klinische Parameter bestimmt und eine Korrelation zwischen den relativen Expressionswerten (Tab.3.25.) und diesen Parametern, bzw. den Parametern untereinander analysiert. Zu den Parametern gehörten das Alter, das *Grading*, die Tumorgroße, der Nodalstatus, der Metastasierungsstatus (nach der TNM-Klassifikation) und die FIGO-Klassifikation.

Für ER α , sowie seine Exon5-Spleißvariante, ER β , PR und AIB1 war keine Korrelation zwischen ihrer Expressionshöhen und den klinischen Parametern aufzuzeigen. Für die TIF2-Expression zeigte sich eine leichte positive Korrelation zum *Grading* ($r = 0,411$; $P = 0,033$). Für die beiden SRC1-Varianten ergaben sich jeweils leicht positive Korrelationen zum FIGO-Status (1a: $r = 0,410$; $P = 0,034$ / 1e: $r = 0,417$; $P = 0,030$) und der Tumorgroße (1a: $r = 0,385$; $P = 0,047$ / 1e: $r = 0,385$; $P = 0,048$).

3.2.4. Einfluß einer AIB1-Amplifikation auf die AIB1-mRNA-Expression in Endometrium- und Mammakarzinomen

Genamplifikationen können eine erhöhte Expression des amplifizierten Gens bewirken. Anzick et al. (1997) berichteten von einem vermehrten Auftreten einer Genamplifikation des AIB1-Gens (Chromosom 20q12) in Mammakarzinomen und einer damit verknüpften Überexpression der AIB1-mRNA. Als Methode für ihre Analysen verwendeten sie FISH (*fluorescence in situ hybridization*). Diese Ergebnisse sollten mit Hilfe der quantitativen differentiellen PCR an 127 Mammakarzinomen nachvollzogen und zusätzlich eine Amplifikationsbestimmung in 30 Endometriumkarzinomen durchgeführt werden. In 23 Mamma- und den 30 Endometriumkarzinomen wurde zudem die AIB1-Expression bestimmt.

(a) Etablierung der quantitativen differentiellen PCR

Die quantitative differentielle PCR (qdPCR) war in unserem Labor für die Amplifikationsmessung der Gene *erbB2*, *c-myc*, *CDK4* und *int-2* (An, 1997, 1999, Niederacher, 1999) bereits etabliert. Die gemessenen Amplifikationen dieser Gene korrelierten teilweise eindeutig mit dem Tumorwachstum. Die qdPCR ermöglichte eine genaue Bestimmung der Kopienzahl eines Gens. Dieses geschah im Vergleich mit einem internen Standard, der bei der Untersuchung in einem PCR-Ansatz koamplifiziert wurde. Die Kopienzahl des AIB1-Gens wurde im Vergleich zum γ -Interferon-Gen, ein *single copy*-Gen bestimmt (Abb. 3.24.).

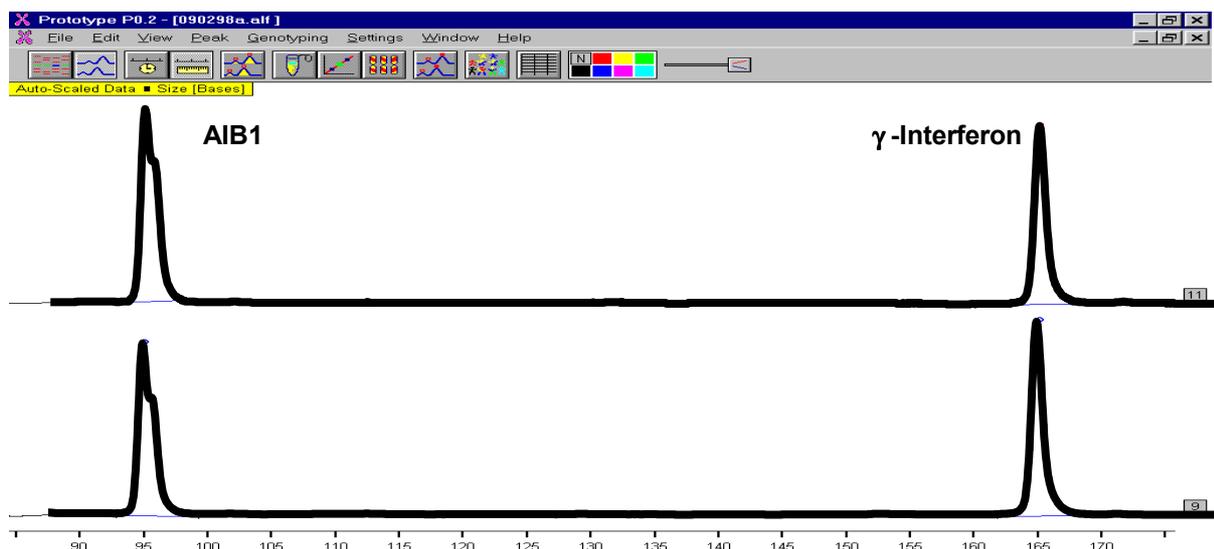


Abb.3.24.: Die Datenanalyse mit Fragment Manager V1.1 Software zeigt das Elektrophoretogramm der Produkte einer qdPCR von AIB1 und γ -Interferon. Spur 11: normale DNA aus Lymphozyten, Spur 9: Tumor-DNA. Es ist kein Unterschied und somit keine Amplifikation von AIB1 in der Tumor-DNA zu erkennen.

Die PCR-Bedingungen waren auf dieselbe Art wie bei der quantitativen RT-PCR optimiert worden. Die optimalen Bedingungen waren :

Gene	PCR-Ansatz	PCR-Bedingungen
Zielgen : AIB1 Referenzgen : γ -IFN	125 μ M dNTPs 1x PCR-Reaktionspuffer je 40 pmol AIB1-Primer je 40 pmol γ -IFN-Primer 2,5U <i>Taq</i> -Polymerase Reaktionvolumen : 50 μ l	1x 10 min. 94°C 30x 1 min. 94°C 1 min. 58°C 1 min. 72°C 1x 8 min. 72°C

Mit Hilfe eines *mixed template*-Assay (An, 1997) wurde die Genauigkeit der optimierten qdPCR überprüft. In diesem Assay wurde genomische DNA der Brustkrebszelllinie MCF7, in der eine >20-fache Amplifikation des AIB1-Gens nachgewiesen wurde (Anzick, 1997), mit Lymphozyten-DNA ohne Amplifikation in verschiedenen Verhältnissen gemischt.

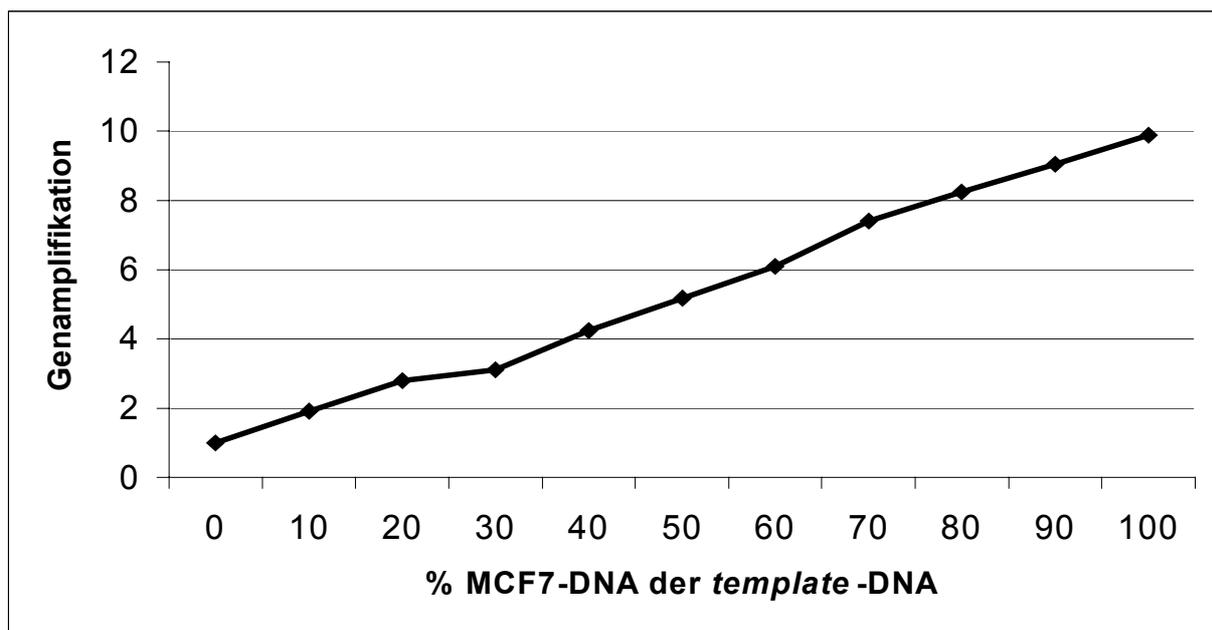


Abb.3.25.: *Mixed template* – Assay: Verdünnung von MCF7-DNA (x-fache AIB1-Amplifikation) mit Lymphozyten-DNA (ohne AIB1-Amplifikation) erzeugt artifizielle Levels einer AIB1-Genamplifikation.

Die Amplifikation des AIB1-Gens in MCF7-Zellen konnte bestätigt werden. Sie betrug nur das 10-fache, im Gegensatz zu dem mehr als 20-fachen, wie von Anzick *et al.* (1997) beschrieben (Abb.3.25.).

3.2.4.2. AIB1-Genamplifikation in Mamma- und Endometriumkarzinomen

Mit Hilfe der quantitativen differentiellen PCR wurden 127 sporadischen Mamma- und 30 sporadische Endometriumkarzinome auf eine Amplifikation des AIB1-Gens untersucht (Beschreibung des Kollektivs im Anhang). Dieses geschah im Vergleich zu Referenzwerten, die durch Messungen mit Lymphozyten-DNA (ohne AIB1-Amplifikation) derselben Patientinnen bestimmt wurden, festgelegt wurden. Der Mittelwert \pm Standardabweichung (SA) der Amplifikationsmessung in den Referenzproben war $1,06 \pm 0,19$. Amplifikationswerte (A) über 1,44 (Mittelwert [Referenzproben] + 2 * SA) zeigten somit eine signifikante Amplifikation des AIB1-Gens an. In keinem der Mamma- oder Endometriumkarzinome wurde ein Amplifikationswert $>1,44$ gemessen (Tab. 3.26a und b). Es lag somit weder in den 127 sporadischen Mamma-, noch in den 30 sporadischen Endometriumkarzinomen eine signifikante Amplifikation des AIB1-Gens vor.

Probe	A (AIR1)						
1	0,93	36	1,46	72	0,88	216	0,77
3	0,41	37	1,06	74	1,37	217	1,10
4	0,92	38	1,01	75	1,20	218	0,87
5	1,00	39	1,23	76	1,34	219	0,94
6	0,65	40	1,07	77	1,28	220	0,84
8	0,88	41	1,05	78	1,24	221	1,03
9	1,23	42	1,30	81	0,79	222	0,94
10	1,12	43	1,39	82	1,12	223	1,11
11	1,34	44	1,39	84	0,78	224	0,88
12	1,10	45	1,25	85	0,70	227	0,85
13	1,50	46	1,42	86	0,42	228	1,19
14	1,29	47	0,69	87	0,71	229	0,78
15	1,35	48	0,98	88	1,03	230	1,01
16	1,38	49	1,24	89	0,90	231	1,00
17	1,31	50	0,74	90	0,94	232	0,94
18	0,96	51	0,83	91	0,99	251	1,35
19	0,97	52	1,39	92	0,90	252	1,20
20	1,18	53	1,21	93	1,15	253	0,98
21	1,43	54	1,08	95	1,30	254	0,87
22	1,42	55	0,83	96	1,01	255	1,09
23	1,08	56	0,86	97	1,32	256	0,90
24	1,38	57	0,92	98	1,24	258	0,96
25	0,94	59	1,11	99	1,13	259	1,01
26	0,86	60	0,79	200	0,73	260	0,99
28	1,15	61	0,52	201	1,03	261	0,95
29	1,07	62	0,72	202	1,01	262	0,94
30	1,31	66	0,86	204	0,95	264	0,97
31	1,25	67	0,86	205	0,89	265	0,97
32	0,88	68	0,85	212	0,83	266	1,03
33	1,05	69	1,03	213	0,94	267	1,01
34	0,88	70	0,83	214	0,99	269	1,05
35	1,24	71	0,69	215	0,92		

Tab. 3.26a.: Amplifikationswerte des AIB1-Gens in Mammakarzinomen: Keiner der Werte liegt über 1,44, was bedeutet, daß keine Amplifikation vorliegt.

Probe	A (AIB1)						
E1	0,89	E11	0,84	E19	0,78	E27	1,09
E2	0,95	E12	0,87	E20	0,90	E28	0,85
E3	0,85	E13	0,85	E21	0,99	E29	1,11
E4	0,88	E14	0,76	E22	1,06	E31	0,99
E5	0,71	E15	0,82	E23	1,41	E33	0,98
E6	0,83	E16	1,10	E24	1,08	E34	1,07
E8	0,76	E17	0,84	E25	0,98		
E9	0,81	E18	0,87	E26	1,07		

Tab. 3.26b.: Amplifikationswerte des AIB1-Gens in Endometriumkarzinomen (E): Keiner der Werte liegt über 1,44, was bedeutet, daß keine Amplifikation vorliegt.

3.2.4.3. AIB1-Amplifikation in Karzinomzelllinien

Verschiedene Karzinomzelllinien wurden auf eine mögliche AIB1-Amplifikation untersucht. Hierzu gehörten die ER- und PR-positiven Brustkrebszelllinien MCF7 und T47D, die ER/PR-negativen Brustkrebszelllinien SK-BR-3 und BT-20, die Endometrium-karzinomzelllinien RL 95-2, Ishikawa (beide ER/PR-positiv) und HEC-1a (ER/PR-negativ), sowie die Zelllinien HeLa (ER/PR-positiv), OVCAR3 (ER/PR-negativ) und A-431 (ER/PR-negativ). Von diesen Zelllinien zeigten sich nur für MCF7 und HeLa erhöhte AIB1-Amplifikationswerte im Vergleich zu dem vom Lymphozyten-DNA, die als Referenz-DNA keine AIB1-Amplifikation enthielt. Es lag in MCF7-Zellen eine 10-fache und in HeLa-Zellen eine 3-fache Amplifikation des AIB1-Gens vor. Die durchschnittliche Standardabweichung lag bei $\pm 0,24$.

Zelllinie	A (AIB1)
MCF7	9,89
T47D	1,30
SK-BR-3	1,26
BT-20	1,18
RL-95-2	0,91
AN3Ca	1,22
Ishikawa	1,14
HEC-1a	1,01
HeLa	2,93
OVCAR3	1,10
A-431	1,17

Tab.3.27.: Amplifikationswerte (A) des AIB1-Gens in Karzinomzelllinien.

3.2.4.4. AIB1-mRNA-Expression in Mammakarzinomen

In 23 Mammakarzinomen und 3 normalen Mammagewebe wurde die AIB1-Expression im Vergleich zur Expression von GAPDH als internem Standard gemessen. Der Mittelwert des relativen AIB1-Expressionswertes in den Normalgeweben lag bei $0,55 \pm 0,10$, der in den Karzinomen lag bei $0,56 \pm 0,15$. Expressionswerte größer als 0,75 (Mittelwert + $2 * SA_{\text{normal}}$) wurden als Überexpression gewertet. Drei der 23 Mammakarzinome (13%) wiesen erhöhte AIB1-Expressionslevel auf (3,7-, 4,7- und 4,9-fach).

Probe	A (AIB1)	Probe	A (AIB1)	Probe	A (AIB1)
1	0,62	24	0,60	48	0,38
4	0,29	26	0,77	49	0,47
5	0,29	30	0,60	74	0,68
8	1,16	31	0,49	81	2,60
14	0,22	34	2,03	82	2,67
15	0,40	38	0,47	N258	0,33
19	0,60	40	0,75	N261	0,63
21	0,71	45	0,55	N259	0,69
23	0,33	47	0,81		

Tab.3.28.: Relative Expressionswerte von AIB1 in 23 Mammakarzinomen und 3 normalen Mammagewebe (N).

Die gemessenen Expressionshöhen wurden mit Hilfe der *Spearman*-Rangkorrelation mit klinischen Daten, wie Alter, Tumorgröße, Nodalstatus, Metastasierung und Grading, ER α - und PR-Gehalt verglichen. Die Stadieneinteilung der Mammakarzinome bezüglich der Größe des Primärtumors, dem Auftreten regionärer Lymphknotenmetastasen und Fernmetastasen wurde im Morphologischen Labor der Universitätsfrauenklinik routinemäßig nach dem TNM-System (Pfleiderer, 1994), entsprechend der Richtlinien der UICC (Union International Contre Cancer, 1972), durchgeführt. In den untersuchten Mammakarzinomen wurde eine positive Korrelation mit dem Nodalstatus aufgezeigt ($r = 0,530$; $P = 0,011$). Keine Beziehung wurde festgestellt zum Alter ($r = 0,271$; $P = 0,223$), der Tumorgröße ($r = -0,002$; $P = 0,995$), dem Metastasierungsstatus ($r = 0,225$; $P = 0,315$), dem Grading ($r = 0,113$; $P = 0,615$), dem ER α -Gehalt ($r = 0,295$; $P = 0,235$) und dem PR-Gehalt ($r = -0,055$; $P = 0,832$). Die Signifikanz der positiven Korrelation zwischen relativem AIB1-Expressionlevel und dem Auftreten regionärer Lymphknotenmetastasen ist bei einem Wert von 0,011 als stark einzuordnen.

3.2.4.5. AIB1-mRNA-Expression in Karzinomzelllinien

Die AIB1-mRNA-Expression wurde in Mamma- und Endometriumkarzinomzelllinien und der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, die eine AIB1-Genamplifikation aufwies, bestimmt.

Zelllinie	RE (AIB1)	Zelllinie	RE (AIB1)
SK-BR-3	0,80	Ishikawa	0,51
BT-20	0,45	AN3Ca	0,17
MCF7	1,63	RL-95-2	0,49
T47D	0,52	HEC-1a	0,33
HeLa	1,11		

Tab.3.29.: Relative Expression von AIB1 in Mamma- und Endometriumkarzinomzelllinien, sowie der Zervixkarzinomzelllinie HeLa.

Im Vergleich zu den relativen Expressionswerten der Mammanormalgewebe liegt die Expression der Mammakarzinomzelllinie MCF7 um das etwa 3-fache erhöht vor. Die REs der Mammakarzinomzelllinien weichen von diesem Mittelwert der Normalgewebe (0,55) kaum ab. Bezieht man die in der Zelllinie HeLa gemessene Expression auf diesen Wert, findet sich hier eine Erhöhung um das 2-fache. Die Expressionshöhen in den Endometriumkarzinomzelllinien liegen, verglichen mit den REs der Endometriumkarzinome und -normalgewebe (Tab.3.25), deutlich unter diesen Werten.

3.3. Zelluläre Effekte von Raloxifen in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2

Neben den bisher getesteten ER-vermittelten Regulationsmechanismen könnte Raloxifen andere Effekte auf Endometriumkarzinomzellen ausüben, welche direkt oder sekundär über andere Mechanismen Einfluß auf die Regulation bestimmter Gene und zellulärer Systeme haben könnten. Von besonderem Interesse war hierbei, ob Raloxifen den Zellzyklus oder die Morphologie der Zellen beeinflusst.

3.3.1. Raloxifen : Effekte auf zelluläre Markerproteine

Effekte von Raloxifen auf die Differenzierung, Proliferation und Apoptose der EC-Zelllinie RL-95-2 wurden durch die Analyse bestimmter Markerproteine untersucht. Zudem wurden Veränderungen der Proteinlevels der Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR, sowie des Steroidrezeptor-Koaktivators SRC-1 untersucht. Das antiöstrogene bzw. östrogene Potential von Raloxifen wurde neben den Messungen auf mRNA-Ebene somit zusätzlich durch Untersuchungen auf Protein-Ebene analysiert. Die Effekte von RLX wurden dabei mit denen von 17 β -Östradiol verglichen.

Die Ergebnisse der Färbungen der Immunreaktionen wurden folgendermaßen ausgewertet:

- Gezählt wurden Zellen mit starker Kern- oder Zytoplasmafärbung;

- Durch starkes Wachstum der Zellen entstanden bei einigen Proben zu späteren Zeitpunkten (Tage 4 und 7) zwei Zellschichten. Hiervon wurde in den doppelschichtigen Bereichen nur die obere gewertet. Auffälligkeiten in den unteren Schichten wurden vermerkt und mit in die Auswertung einbezogen.
- Bei zu starken Färbungen wurden keine Zählungen durchgeführt, sondern die Färbungen subjektiv (von zwei verschiedenen Personen) miteinander verglichen und die allgemeine Stärke der Signale gewertet.
- Bei den prozentualen Auszählungen wurden jeweils 4 verschiedene Areale à 100 Zellen ausgezählt und der Mittelwert bestimmt.

3.3.1.1. ER-Transaktivierungsmechanismus

(a) Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor war in fast allen Kontrollzellen nachzuweisen, wobei sich aber die Signale in den einzelnen Proben stark in ihrer Intensität unterschieden.

	1	2	4
Ktrl.	7	8	9
E2	12	14	18
RLX	8	11	27

Tabelle 3.30.: Prozentualer Anteil von PR-positiven Zellen (mit deutlichen Kernfärbungen) bei Inkubation mit EtOH (Vehikel), E2 oder RLX nach einer unterschiedlichen Anzahl an Tagen.

In den unbehandelten Kontrollzellen zeigte sich eine stabile PR-Expression, wobei an diesen Proben gut die Signalunterschiede aufgrund der steigenden Zellzahl und des damit verbundenen dichteren Wachstums auszumachen waren. Nach 7 Tagen waren wegen des dichten Wachstums keine genaue Zählungen mehr möglich, dafür wurde hierdurch aber eine subjektive Abschätzung der Expressionsstärke deutlich leichter. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich für den Progesteronrezeptor in der oberen Zellschicht eine durchgehend starke granuläre Färbung vorwiegend im Zytoplasma und teilweise in den Zellkernen. Die untere Zellschicht wies ähnliche Signale in schwächerer Form auf. Durch Inkubation mit E2 wurde die Expression des PR nach einem Tag deutlich erhöht. Neben der vermehrten Kernfärbung zeigte sich auch eine Verstärkung der granulären Zytoplasmafärbung. Diese Stimulation war auch nach 2 und 4 Tagen zu detektieren. Im Verlauf des Experiments wurden allgemein die Färbungen zwar schwächer, aber die Tendenz zu einer Stimulation hielt an (Abb.3.26.A). Unter Einfluß von Raloxifen wurde die PR-Expression nach einem Tag nicht beeinflusst. Die

Signale im Zytoplasma waren etwas schwächer als in den Kontrollzellen und der prozentuale Anteil lag auch unter dem Wert der Kontrolle (23% zu 27%). Dieses Bild änderte sich nach Tag 2. Ab diesem Zeitpunkt zeigte sich die PR-Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen erhöht. Dieses zeigt sich durch den erhöhten Prozentanteil der Kernfärbungen, sowie die allgemeine Stärke der Zytoplasmasignale. Nach 7 Tagen wurde diese Steigerung besonders in den oberen Zellschichten deutlich (Abb.3.26.B).

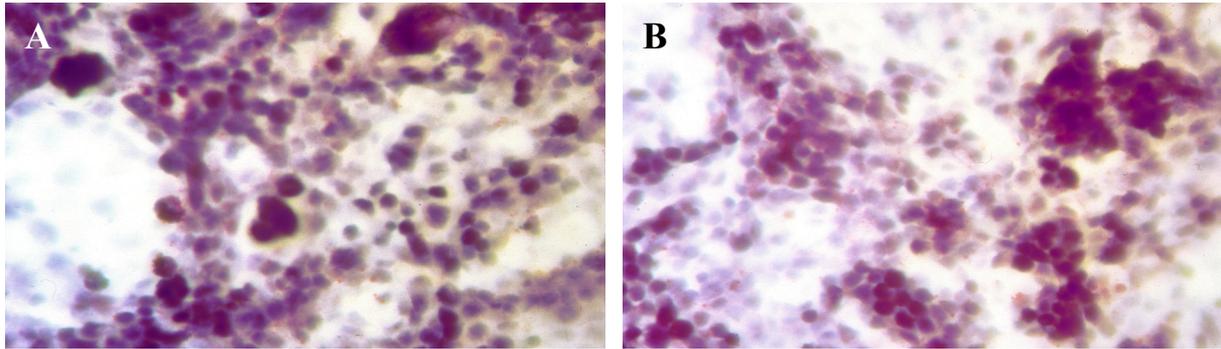


Abb.3.26.A,B: Nachweis des Progesteronrezeptors in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach 7 Tagen E2-Inkubation (400x) und (B) nach 7 Tagen RLX-Inkubation (400x).

(b) Östrogenrezeptor α

Die Auswertung wurde wie beim PR durchgeführt. Hierbei zeigte sich, im Gegensatz zum PR, nicht in jeder Zelle ein ER α -Signal. Besonders in den unteren Zellschichten wurden vorwiegend granuläre, zytoplasmatische Expressionssignale und weniger Signale in den Zellkernen detektiert. Die Zählungen wurden in Bereichen durchgeführt, in denen eine einzelne Zellschicht vorlag. Es wurden nur Zellen gewertet, die eine Kernfärbung aufwiesen (Tab.3.31.).

	1	2	4
Ktrl.	15	14	10
E2	44	42	37
RLX	16	13	13

Tabelle 3.31.: Prozentualer Anteil von ER α -positiven Zellen bei Inkubation mit E2 oder RLX bzw. in der nicht behandelten Kontrolle nach einer unterschiedlichen Anzahl an Tagen.

Die Expression des ER α in den Kontrollzellen verhielt sich im Verlauf des Experiments stabil, was daraufhin deutet, daß die Expression des ER α durch die experimentellen Gegebenheiten nicht beeinflusst wurde. Am Tag 7 zeigte sich in den unteren Zellebenen eine durchgehende granuläre Zytoplasmafärbung und in den oberen Ebenen neben einer starken

Zytoplasmafärbung eine fast durchgehende Kernfärbung (Abb.3.27.A). Unter E2-Einfluß stieg der ER α -Level leicht an und blieb auf diesem Level (Abb.3.27.B). Am Tag 7 zeigt sich in der unteren Zellschicht nur in ~5% der Zellen eine schwache granuläre, zytoplasmatische Färbung. In der oberen Zellebene wurde eine schwächere Kern- und Zytoplasmafärbung detektiert. Durch RLX wurde der ER α -Proteinlevel bis zum Tag 4 nicht beeinflusst. Signalstärken und prozentualer Anteil der ER α -positiven Zellen waren wie bei den Kontrollwerten. Nach sieben Tagen Inkubation mit RLX zeigte sich ein etwas höherer ER α -Proteingehalt als in den nicht-behandelten Zellen (Abb.3.27.C).

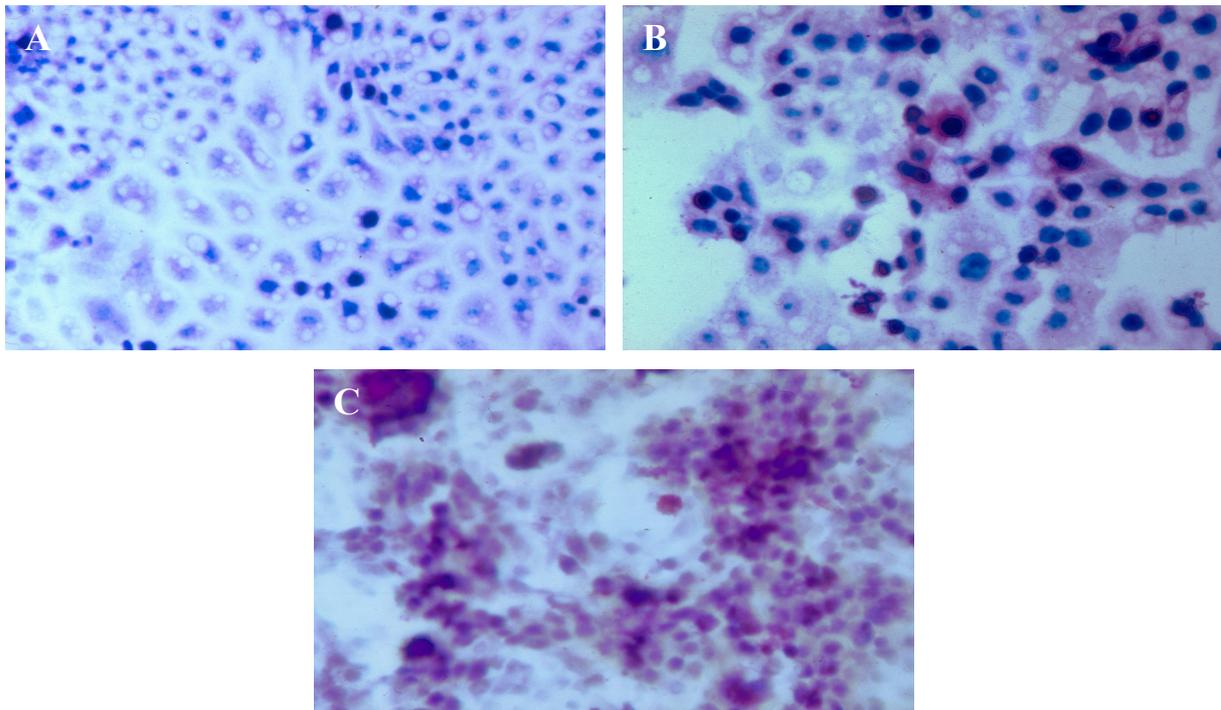


Abb.3.27.A-C: Nachweis des Östrogenrezeptor α in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach 7 Tagen ohne Hormonbehandlung (250x), (B) nach einem Tag E2-Inkubation (400x) und (C) nach 7 Tagen RLX-Inkubation (400x).

(c) Östrogenrezeptor β

Die Expression des ER β zeigte einen deutlichen Unterschied bezüglich Signalen mit Kern- bzw. Zytoplasmalokalisation zwischen inkubierten und nicht-inkubierten Zellen.

	1	2	4
Ktrl.	27	23	17
E2	32	36	24
RLX	29	21	31

Tabelle 3.32: Der durchschnittliche prozentualer Anteil von ER β -positiven Zellen bei Inkubation mit Östradiol, Raloxifen oder Vehikel (EtOH) nach einer unterschiedlichen Anzahl an Tagen.

In den unbehandelten Zellen war hauptsächlich eine zytoplasmatische Expression zu erkennen. Diese war granulär und trat in nahezu allen Zellen auf. In den Zellkernen wurde der ER β an den Tagen 1 und 2 stärker nachgewiesen als zu den späteren Meßpunkten (Abb.3.28.A). Nach 4 und 7 Tagen waren bei mehrschichtigen Kulturen besonders die oberen Schichten stark positiv. Unter Einfluß von E2 nahm die Häufigkeit der ER β -positiven Zellkerne stark zu. Bei einer Inkubationsdauer von 4 bzw. 7 Tagen war der ER β in der oberen Zelllage verstärkt nachzuweisen (Abb.3.28.B). In der oberen Zellschicht waren nach vier Tagen deutliche ER β -Signale in den Zellkernen zu sehen, wohingegen eine Zytoplasmafärbung seltener auftrat als in den Kontrollzellen. Ein ähnliches Resultat ergab sich bei Behandlung mit RLX. Der ER β -Level war nach vier Tagen höher als in den Kontrollzellen (Abb.3.28.C). Der hauptsächliche Unterschied bestand darin, daß wie bei der E2-Behandlung, der ER β hauptsächlich in den Zellkernen und weniger im Zytoplasma detektiert wurde.

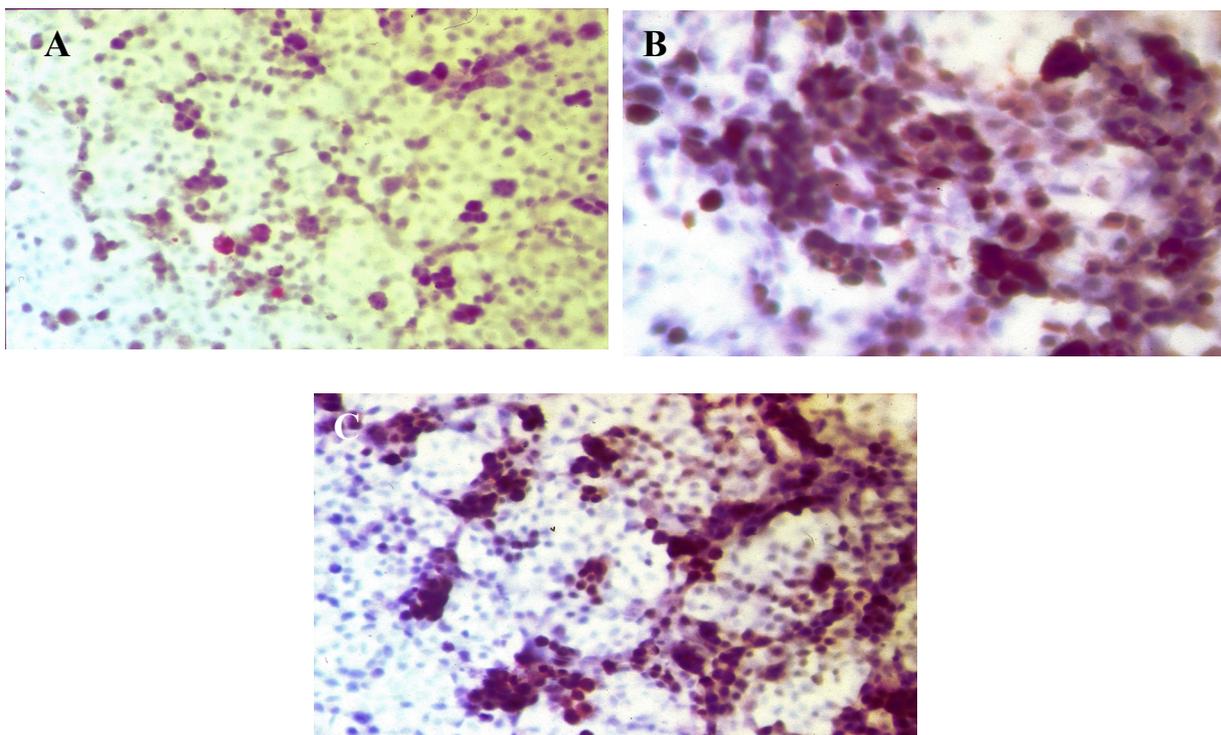


Abb.3.28.A-C: Nachweis des Östrogenrezeptor α in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach 4 Tagen ohne Hormonbehandlung (400x), (B) nach einem Tag E2-Inkubation (400x) und (C) nach 7 Tagen RLX-Inkubation (250x).

(d) SRC-1

Der Steroidrezeptor-Koaktivator SRC-1 zeigte sich primär in zytoplasmatischen Signalen.

	1	2	4
Ktrl.	13	16	15
E2	42	27	31
RLX	10	15	35

Tabelle 3.33.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil SRC1-positiver Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Die SRC-1-Expressionen schwankten in den Kontrollzellen im zeitlichen Verlauf leicht bezüglich der Stärke der zytoplasmatischen Signale. Am Tag 1 wurde unter E2-Wirkung ein erhöhter SRC-1-Level deutlich, der im weiteren Verlauf leicht erhöht blieb (Abb.3.29.A). Dagegen wurde die SRC-1-Proteinmenge durch RLX-Einwirkung für 1 und 2 Tage erst nicht verändert (Abb.3.29.B), erreichte nach 4 und 7 Tagen aber den erhöhten Level (Abb.3.29.C), der bei der E2-Inkubationsreihe offenbar wurde.

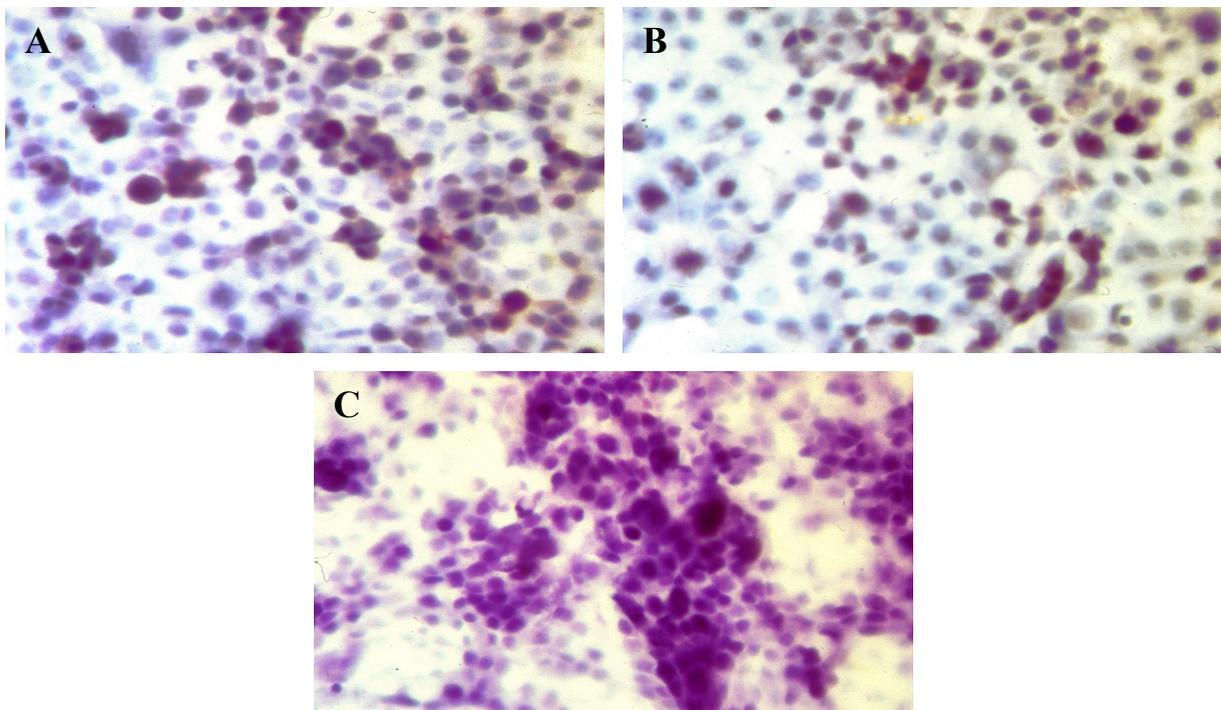


Abb.3.29.A-C: Nachweis von SRC-1 in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach einem Tag E2-Inkubation (400x), (B) nach einem Tag RLX-Inkubation (400x) und (C) nach 7 Tagen RLX-Inkubation (250x).

3.3.1.2. Apoptosemarker

Zur Analyse apoptotischer Prozesse in den hormonbehandelten Zellen wurden das Vorkommen und dessen Veränderungen pro- und antiapoptotischer Markerproteine überprüft. Zum Vergleich wurden Zellen herangezogen, die mit 10^{-6} M RU486, von dem angenommen wird, daß es im Endometrium apoptotische Effekte hervorruft (Critchley, 1999), inkubiert wurden. Die RU486-behandelten Zellen wurden auf ihren bcl-xL- (antiapoptotisch) und ihren bak-Proteinlevel (proapoptotisch) untersucht.

(a) Cytokeratin 18 (CK18)

Durch den M30-Antikörper können Abbauprodukte des proteolytischen Schneidens von Cytokeratin 18 als Signal für frühe apoptotische Prozesse aufgezeigt.

	1	2	4	7
Ktrl.	1 – 2	2 – 3	4	2
E2	2 – 3	2 – 3	2 – 3	2 – 3
RLX	1 – 2	2	2	1 – 2

Tabelle 3.34.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil M30-positiver Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Der Nachweis frühapoptotischer Prozesse durch M30 fiel insgesamt sehr schwach aus (Tab.3.34.). Im zeitlichen Verlauf war die Anzahl der M30-positiven Zellen relativ konstant. Die Signale beschränkten sich hierbei auf das Zytoplasma (Abb.3.30.A). Durch E2 wurde kein Unterschied zu dem in der Kontrollreihe festgestellten Bild bewirkt (Abb.3.30.B). Es waren, wie in der Meßreihe ohne hormonellen Einfluß, durchgehend 2-3% der Zellen M30-positiv. Auch unter RLX-Einwirkung wurde keine Abweichung von diesem Bild deutlich. In dieser Inkubationsreihe wurden zu allen Zeitpunkten in ca. 2% der Zellen dieser frühapoptotische Prozeß detektiert (Abb.3.30.C).

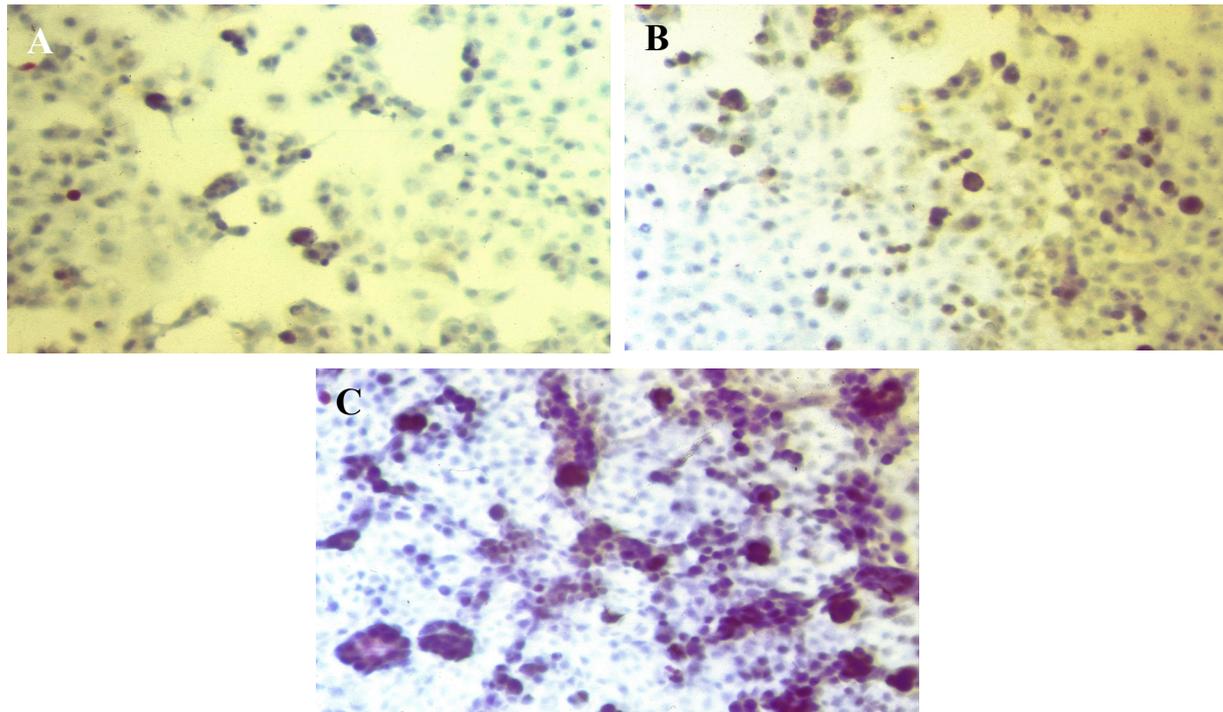


Abb.3.30.A-C: Nachweis von CK18 in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach einem Tag ohne Hormonbehandlung (250x), (B) nach zwei Tagen E2-Inkubation (250x) und (C) nach vier Tagen RLX-Inkubation (250x).

(b) bcl-2

bcl-2 wirkt antiapoptotisch und ein Verlust der bcl-2-Expression weist auf ein apoptotisches Potential in einer Zelle hin.

	1	2	4	7
Ktrl.	55	53	16	5 – 7
E2	50	38	15	20 – 25
RLX	52	51	9	4

Tabelle 3.35.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der bcl-2-positiven Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Das bcl-2-Protein ließ sich als feine, zytoplasmatische Granula nachweisen (Abb.3.31.). Alle drei Inkubationsexperimenten führten zu einer starken Abnahme der bcl-2-Signale im zeitlichen Verlauf. In den Kontrollproben zeigte sich an den ersten beiden Tagen in etwa der Hälfte der Zellen eine bcl-2-spezifische Färbung, während nach 7 Tagen nur noch ca. 7% der Zellen bcl-2-positiv waren. Unter Einfluß von Östradiol war nach einem Tag etwa die gleiche Anzahl Zellen bcl-2-positiv, wobei die Signale aber deutlich stärker ausfielen. Am 2. Tag der E2-Inkubationsreihe traten dann wesentlich weniger und schwächere bcl-2-Signale auf als in den Kontrollzellen. Nach 7 Tagen war das Verhältnis genau umgekehrt. Mehr Zellen zeigten

ein deutlich stärkeres bcl-2-Signal. Raloxifen hatte zu den ersten beiden Zeitpunkten keinen Effekt auf die Häufigkeit und die Stärke der bcl-2-Signale. Nach 4 bzw. 7 Tagen waren etwas weniger Zellen bcl-2-positiv als in der Kontrollreihe und deutlich weniger als unter E2-Einfluß.

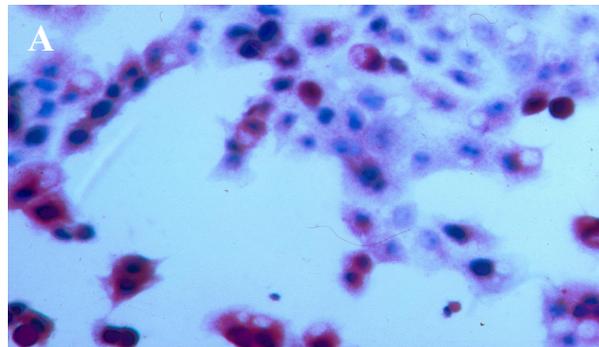


Abb.3.31.: Nachweis von bcl-2 in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 nach einem Tag ohne Hormonbehandlung (400x). Abbildungen der E2- und RLX-behandelten Zellen wurden aufgrund der starken Hintergrundfärbung nicht angefertigt.

(c) bcl-xL

Neben bcl-2 wurde mit bcl-xL ein weiteres Mitglied der bcl-2-Familie auf seine Responsivität gegenüber hormonellen Einflüssen untersucht.

	1	2	4	7
Ktrl.	12	10	10	1
E2	55	20	15	12
RLX	15	12	3 – 5	1
RU486	8	23	21	14

Tabelle 3.36.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der bcl-xL-positiven Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

In den Kontrollzellen wurde bis zum 4. Tag eine schwache bcl-xL-Färbung in durchschnittlich 10% der Zellen (Abb.3.32.A) detektiert. Die beobachteten Signale waren feingranulär und wurden im Zytoplasma lokalisiert. Nach 7 Tagen wurden schließlich fast keine Signale mehr detektiert. Unter Behandlung mit Östradiol war der bcl-xL-Level stark erhöht (Abb.3.32.B). Nach einem Tag waren starke, ebenso feingranulär und zytoplasmatische Färbungen zu sehen. Im weiteren Verlauf nahm die bcl-xL-Menge zwar ab, blieb aber zu allen Zeitpunkten deutlich über der in den Kontrollzellen beobachteten. Dabei wurden die Signale nicht nur seltener, sondern auch schwächer. Unter RLX-Einwirkungen zeigte sich in den Zellen ein ähnlicher Level wie in den Kontrollzellen. Nur nach 4 Tagen

zeigt sich in der RLX-inkubierten Probe ein geringerer prozentualer Anteil der bcl-xL-positiven Zellen als in der Kontrollprobe zu diesem Zeitpunkt (Abb.3.32.C). Durch Inkubation der RL-95-2-Zellen mit RU486 wurde die bcl-xL-Menge deutlich erhöht (Abb.3.32.D). Während an Tag 1 fast keine bcl-xL-Färbung zu sehen war, zeigte sich diese deutlich nach 2, 4 und 7 Tagen.

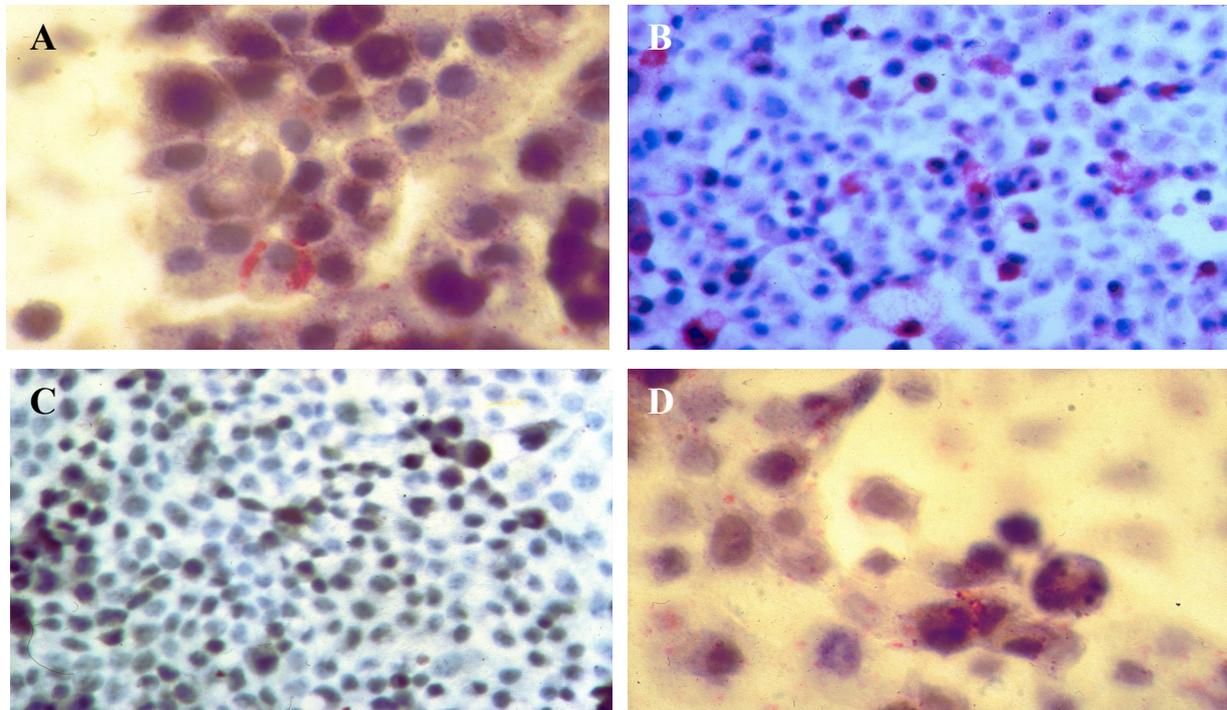


Abb.3.32.A-D: Nachweis von bcl-xL in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach zwei Tagen ohne Hormonbehandlung (1000x), (B) nach einem Tag E2-Inkubation (400x), (C) nach 4 Tagen RLX-Inkubation (400x) und (D) zwei Tagen RU486-Inkubation (1000x).

(d) bak

Bak wirkt anders als bcl-2 und bcl-xL proapoptotisch und wurde als Indikator für das apoptotische Potential einer Zelle verwendet.

	1	2	4	7
Ktrl.	10	7	5	2
E2	13	8	7	5
RLX	10	10	13	25
RU486	40	26	25	20

Tabelle 3.37.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der bak-positiven Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Bak wurde als feingranuläre Färbung im Zytoplasma der RL-95-2-Zellen detektiert (Abb.3.33.A). Die Häufigkeit positiver Zellen nahm im zeitlichen Verlauf in den nicht-hormonbehandelten Zellen leicht ab. Durch Zugabe von 10^{-8} M Östradiol zum Kulturmedium

wurde die bak-Expression leicht erhöht, nahm aber ebenso im zeitlichen Verlauf ab (Abb.3.33.B). Eine Inkubation der Zellen mit Raloxifen führte zu entgegengesetzten Effekten als sie bei den anderen beiden Analysen aufgezeigt wurde. Ab Tag 2 lag der bak-Level höher als in den Kontrollzellen bzw. bei der E2-Inkubationsreihe. Besonders deutlich zeigte sich der höhere bak-Level nach 7 Tagen (Abb.3.33.C). Hierbei waren die Signale nicht nur häufiger, sondern im Vergleich auch stärker. Unter RU486-Einfluß wurde die proapoptotische Funktion von bak sehr deutlich. Schon nach 1 Tag war die bak-Proteinmenge im Zytoplasma der Zellen stark erhöht (Abb.3.33.D).

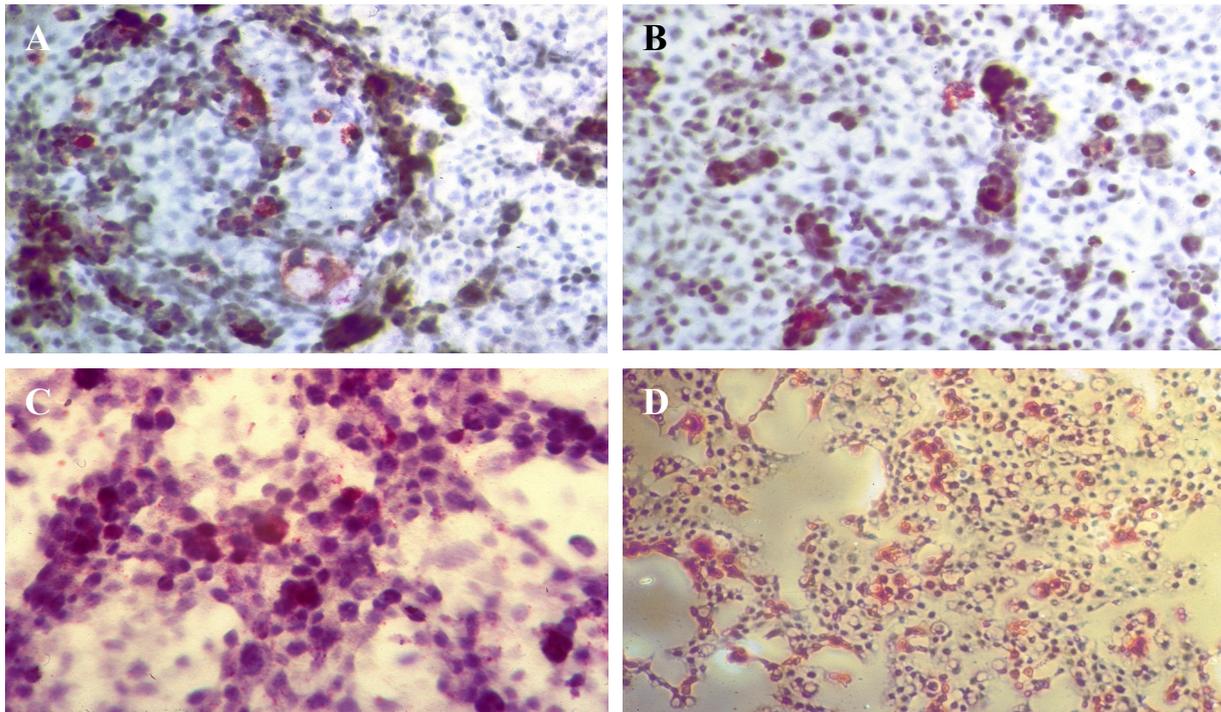


Abb.3.33.A-D: Nachweis von bak in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach sieben Tagen ohne Hormonbehandlung (250x), (B) nach vier Tagen E2-Inkubation (250x), (C) nach sieben Tagen RLX-Inkubation (400x) and (D) nach einem Tag RU486-Inkubation (160x).

3.3.1.3. Zellproliferation

(a) Ki-67

Ki-67 ist ein Marker für die Proliferation einer Zelle und wird in allen Phasen des Zellzyklus (späte G₁-, S-, M- und G₂-Phase) exprimiert, nicht aber in der G₀-Phase exprimiert.

	1	2	4	7
Ktrl.	18	17	20	15
E2	22	27	43	?
RLX	21	23	22	14

Tabelle 3.38.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Ki-67-positiven Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Der Ki-67-Nachweis geschieht in der Mehrheit der Zellen als Zytoplasma- und Kernfärbung (Abb.3.34.A). In den Kontrollzellen war der Ki-67-Level weitestgehend konstant im zeitlichen Verlauf. Bei Inkubation der Zellen mit E2 stieg der Ki-67-Level stark an, wobei sich auch die Intensität der Signale verstärkte. Besonders deutlich stellte sich dieser Unterschied nach 4 Tagen dar (Abb.3.34.B). Unter der Wirkung von Raloxifen lag der prozentuale Anteil der Ki-67-positiven Zellen nur geringfügig über dem bei den Kontrollproben. Dennoch waren auch hier die Signale wesentlich intensiver im Vergleich zu den Kontrollen (Abb.3.34.C).

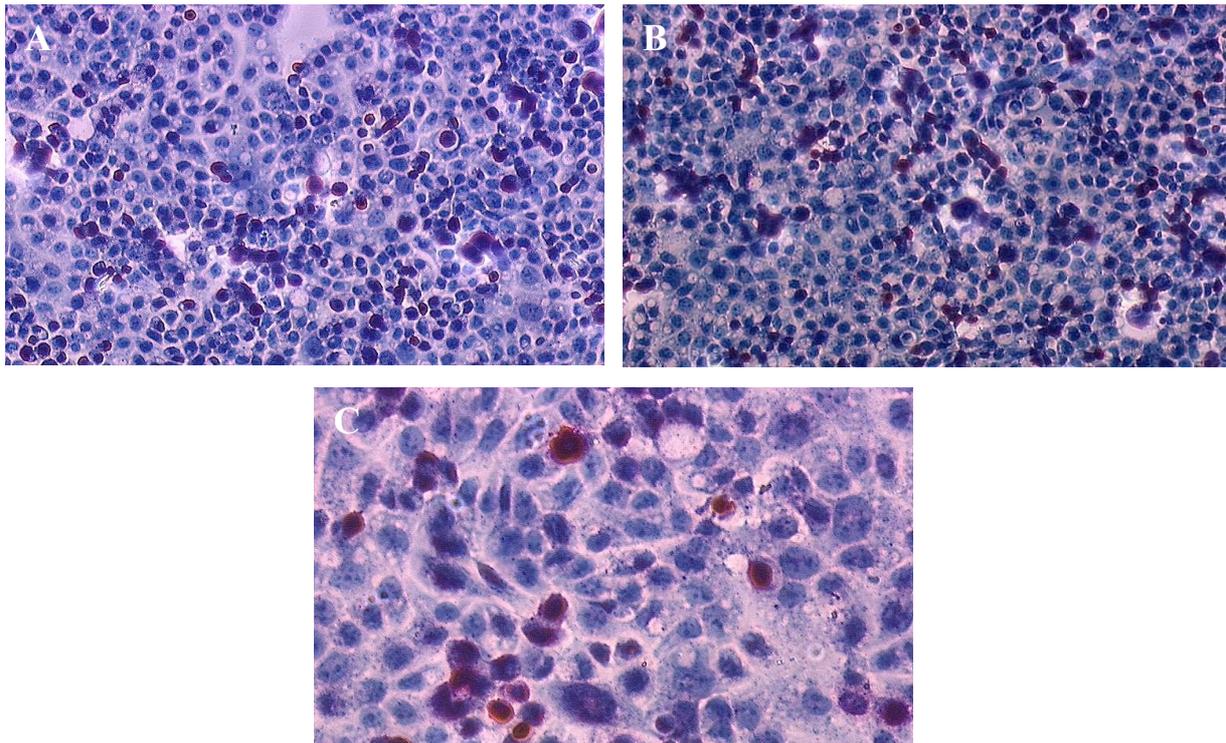


Abb.3.34.A-C: Nachweis von Ki-67 in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach zwei Tagen ohne Hormonbehandlung (200x), (B) nach vier Tagen E2-Inkubation (200x) und (C) nach zwei Tagen RLX-Inkubation (400x).

3.3.1.4. Differenzierungsgrad

(a) Laktoferrin

Laktoferrin dient als Marker für den Differenzierungsgrad von Tumorzellen. Ein Verlust von Laktoferrin spricht für eine Entdifferenzierung der Zellen.

	1	2	4	7
Ktrl.	58	56	46	44
E2	79	80	80	78
RLX	81	79	74	75

Tabelle 3.39.: Durchschnittlicher prozentualer Anteil der Laktoferrin-positiven Zellen bei Inkubation der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 mit verschiedenen Substanzen bei unterschiedlicher Inkubationsdauer (in Tagen).

Der Nachweis von Laktoferrin in den RL-95-2-Zellen zeigte sich als sehr starke granuläre Zytoplasmafärbung. In den unbehandelten Kontrollzellen war etwa die Hälfte der Zellen Lf-positiv (Abb.3.35.A). Im Lauf des Experiments nahm der prozentuale Anteil der positiven Zellen leicht ab. Unter Inkubation mit E2 zeigte sich ein wesentlich höherer Anteil der Zellen Lf-positiv (Abb.3.35.B). Der Anteil der positiven Zellen änderte sich im zeitlichen Verlauf nur schwach. Bei Inkubation mit RLX wurde ein ähnlicher Effekt, wie unter Inkubation mit E2, beobachtet (Abb.3.35.C). Auch hier lag der Anteil Lf-positiver Zellen deutlich höher als in den Kontrollzellen.

In allen drei Inkubationsreihen zeigte sich ein charakteristisches Bild: Es war ein mosaikartiges Muster zwischen stark positiven und schwach positiven bzw. negativen Zellen zu sehen. Hierbei waren die stark positiven Zellen meist deutlich größer als die negativen/schwach positiven.

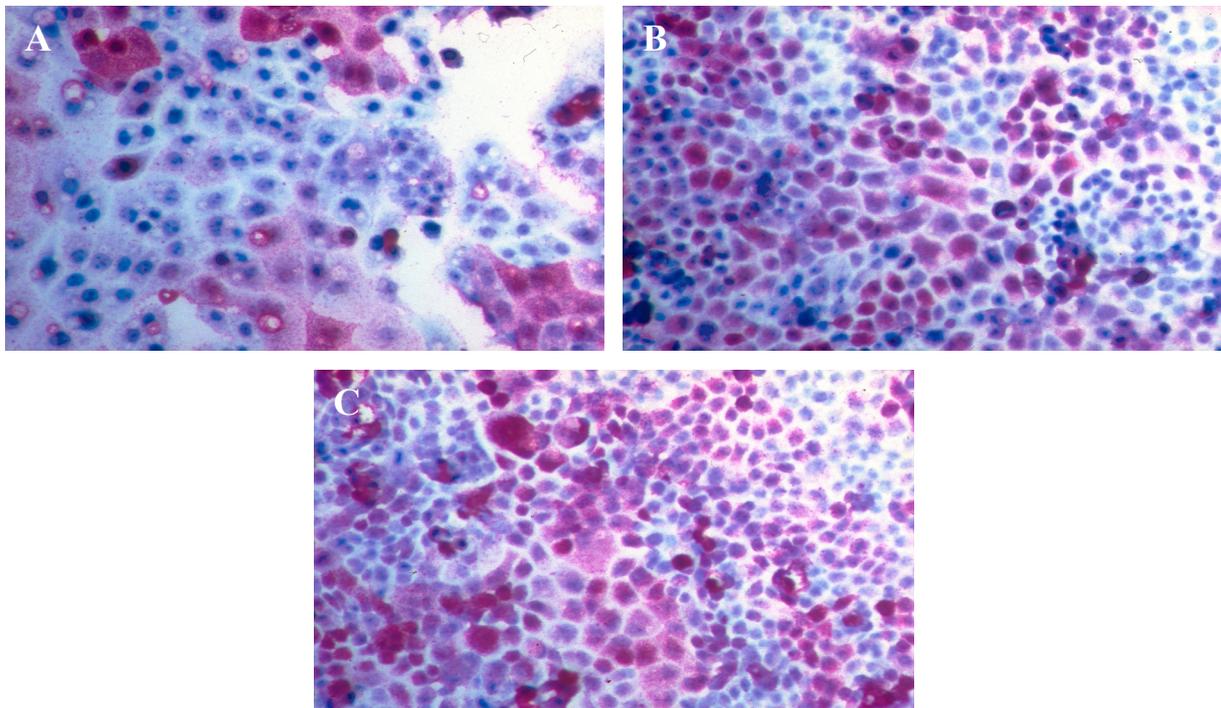


Abb.3.35.A-C: Nachweis von Laktoferrin in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (A) nach vier Tagen ohne Hormonbehandlung (250x), (B) nach vier Tagen E2-Inkubation (250x) und (C) nach vier Tagen RLX-Inkubation (250x).

4. Zusammenfassung der Ergebnisse der immunhistochemischen Untersuchungen

Bei Betrachtung der Ergebnisse der immunhistochemischen Analysen der Einflüsse von 17 β -Östradiol und Raloxifen auf die Proliferation, den Differenzierungsgrad und die Tendenz zur Apoptose lassen sich folgende Aussagen treffen (Tab.3.40.):

- Die Proteinkonzentrationen von ER β , PR und SRC-1 wurden durch E2 und RLX erhöht, die des ER α nur durch E2.
- Die Konzentrationen von bcl-2 und bcl-xL wurden durch E2 erhöht, die von bak durch RLX und die von bak und bcl-xL durch RU486. Die Proteinkonzentration von CK18 blieb durch beide Substanzen unbeeinflusst.
- Die Ki-67-Konzentration als Marker für Proliferationsaktivität wurde durch E2 erhöht, nicht aber durch RLX.
- Die Laktoferrin-Konzentration als Marker für den Differenzierungsgrad wurde durch E2 und RLX gesteigert.

Marker	17 β -Östradiol	Raloxifen
ER α	+	o
ER β	+	+
SRC-1	+	+
PR	+	+
bcl-2	- / +	o
bcl-xL	+	o
bak	o	+
CK18	o	o
Laktoferrin	+	+
Ki-67	+	o

Tab.3.40.: Einflüsse von E2 und RLX auf das Vorkommen verschiedener Markerproteine in der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 (ohne Beachtung zeitlicher Faktoren).

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse für Raloxifen ein proapoptotisches Potential durch die Hochregulation des Apoptose-Induktors Bak, bei gleichzeitigem Unterbleiben einer bcl-2- oder bcl-xL-Hochregulation. Eine direkte Apoptose-Induktion durch RLX konnte durch den Nachweis eines CK18-Abbauproduktes nicht verdeutlicht werden. Zusätzlich hatte RLX einen positiven Effekt auf den Differenzierungsgrad der Karzinomzellen. Eine proliferationsfördernde Wirkung von RLX wurde nicht detektiert. Die Einflüsse von Raloxifen

auf die Proteinlevel der drei Mitglieder der bcl2-Proteinfamilie und des Proliferationsmarkers Ki67 waren konträr zu den unter E2-Einfluß (proliferationsfördernd, antiapoptotisch) detektierten.

3.3.2. Zellmorphologische Veränderungen durch Raloxifen

Die Morphologie der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 unter Einwirkung von E2 und RLX für 7 Tage, sowie ohne (anti-)östrogene Behandlung, wurde elektronen- und raster-elektronenmikroskopisch untersucht. Von Interesse war das Auftreten von Mitosen als Merkmal für Proliferation und der Merkmale für Apoptose. Bei den elektronenmikroskopischen Analysen zeigten sich kaum Unterschiede zwischen den Zellen der verschiedenen Inkubationsreihen. Unter E2-Einfluß wurden etwas häufiger Mitosen (M) nachgewiesen (10% aller Zellen) (Abb.3.36.B), als unter RLX-Einfluß (4%) und in den Kontrollzellen (5%) (Abb.3.36.C). Unter Einwirkung von RLX (15%) wurden etwas mehr apoptotische Zellen detektiert, als unter E2-Einwirkung (8%), und etwas gleichviel, wie in den Kontrollzellen (17%). Die apoptotischen Zellen wurden hauptsächlich durch folgende Charakteristika detektiert, die an den folgenden Abbildungen erläutert werden:

- (1) Hyperkondensation des Chromatins in den Zellkernen (K);
- (2) Schrumpfung und Abrundung der Zellen;
- (3) Auftreten von apoptotischen Körperchen (*apoptotic bodies*) (ab);
- (4) Auftreten von Zellkernfragmenten mit typischen Chromatinkappen;
- (5) Vakuolisierung des Zytoplasmas;

(A) ohne östrogenen Einfluß (Abb.3.36.A):

Durch das Wachstum unter Entzug von Östrogen traten in den Kontrollzellen verstärkt apoptotische Zellen (aZ) auf. Als Zeichen für Apoptosen sind apoptotische Körper (*apoptotic bodies*) sichtbar, die sowohl freiliegend (faK), als auch in den vergrößerten Vakuolen als schwarze Punkte (vaK) auftreten. Zudem sind mehrere Zellen zu sehen, die Merkmale einer bevorstehenden Apoptose aufweisen. Die kleineren Zellkerne (Zk) dieser Zellen zeichnen sich durch ein hyperkondensiertes Chromatin aus und sind teilweise fragmentiert (fZk). Das Chromatin in diesen Zellkernfragmenten ist vor allem peripher hyperkondensiert, was als typische Chromatinkappe (Ck) sichtbar wird. Mitotische Zellen wurden nur selten nachgewiesen.

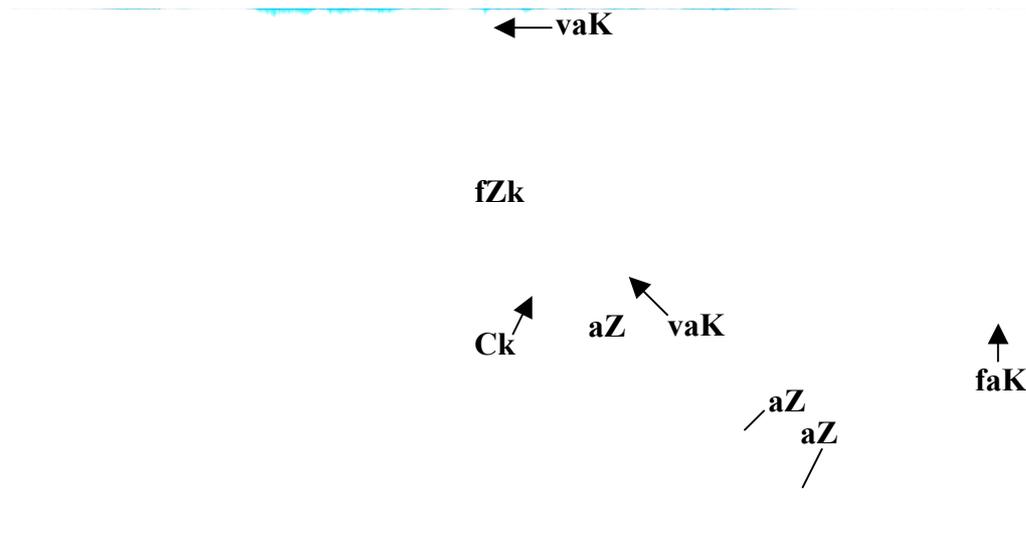


Abb.3.36.A: Elektronenmikroskopische Analyse der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 bei 7 Tagen ohne östrogenen Einfluß (500x).

(B) unter Östradiol-Einfluß (Abb.3.36.B):

Unter Einfluß von 17β -Östradiol traten mehr mitotische Zellen (M) auf, als ohne östrogenen Einfluß. Die Anzahl der apoptotischen Zellen dagegen war geringer unter E₂-Einfluß. Die apoptotischen Zellen zeigen sich auch hier durch ihre sehr dunklen Kerne mit dem hyperkondensierten Chromatin. Teilweise sind extrazelluläre apoptotische Körper zu sehen, die frei, zusammen mit membranumgebenen Zytoplasmaresten zwischen den Zellgruppen liegen. Die normalen Zellen zeigen Mikrovilli (Mv) an ihren Oberflächen und haben weniger dichte, ovale bis runde Kerne mit deutlichen Nukleoli. Im Gegensatz zu den großen Vakuolen der apoptotischen Zellen ist in diesen Zellen nur eine feine Vakuolisierung des Cytoplasmas zu sehen.

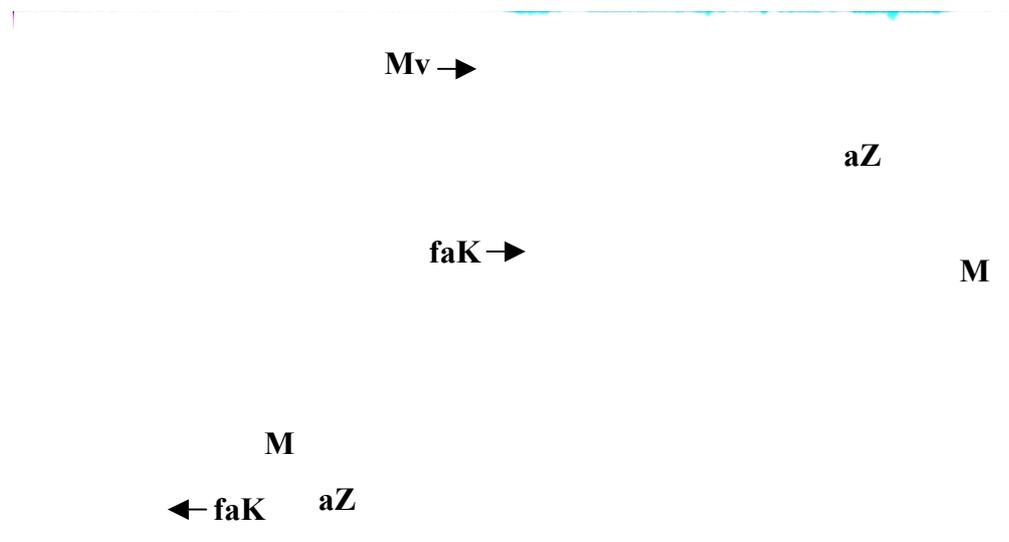


Abb.3.36.B: Elektronenmikroskopische Analyse der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 bei 7 Tagen unter Einfluß von 17β -Östradiol (700x).

(C) unter Raloxifen-Einfluß (Abb.3.36.C):

Insgesamt wurden nach 7 Tagen Inkubation mit RLX etwas weniger apoptotische Zellen detektiert als in der Kontrolle ohne östrogenen Einfluß und mehr als unter Inkubation mit E2. Als Zeichen von apoptotischen Vorgängen sind extra- und intrazelluläre apoptotische Körper zu erkennen. Die intrazellulären apoptotischen Körper (iaK) zeigen sich in verschiedener Größe und Anzahl in stark vakuolisierten Zellen mit oft sehr stark kondensiertem Chromatin in den meist kleinen, eckigen Zellkernen. Zu sind einzelne Zellen sichtbar, deren Kerne hyperkondensiertes Chromatin enthalten, und die wahrscheinlich in die Apoptose eintreten werden. Das Gesamtbild läßt spekulieren, daß die hohe Anzahl apoptotischer Körperchen auf einer ersten, bereits durchlaufenen Welle apoptotischer Prozesse beruht. Die Zellen, die ein Teil der Merkmale für apoptotische Prozesse aufweisen (stark kondensiertes Chromatin, starke Vakuolisierung des Zytoplasmas), deuten auf eine zweite Welle von Apoptosen hin. Neben den apoptotischen Zellen wurden auch wenige mitotische (M) nachgewiesen. Die normalen Zellen zeigen auch hier lange Mikrovilli (Mv) an ihrer Zelloberfläche und besitzen große Zellkerne mit deutlichen Nukleoli.

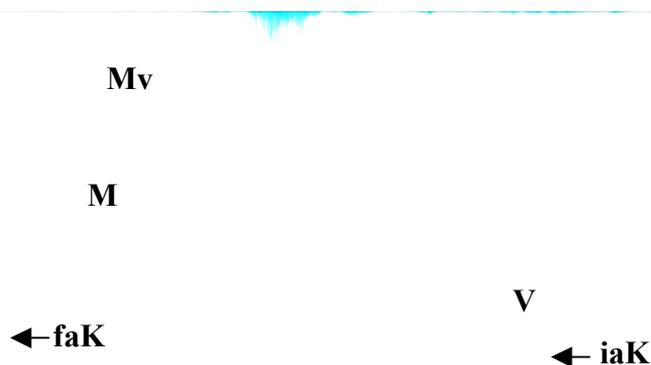


Abb.3.36.C: Elektronenmikroskopische Analysen der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 nach 7 Tagen Inkubation mit RLX (700x).

Durch die rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen wurde das allgemeine morphologische Erscheinungsbild der RL-95-2-Zellen nach siebentägiger Inkubation mit E2 oder RLX bestimmt. Im Vergleich wurde in den Übersichtsbildern besonders der Unterschied bezüglich der Einflüsse von E2 und RLX auf das Zellwachstum und die Zellproliferation deutlich. Die E2-behandelten Zellen waren rundlich und hatten eine wesentlich höhere Zelldichte (Abb.3.37.A). Sie zeigten ein starkes Wachstum in mehreren Zellschichten, wobei besonders größere Zellgruppen von in Trauben wachsenden Zellen (TwZ) auffielen.

Unter Einfluß von RLX waren die RL-95-2-Zellen abgeflacht, was auf ein schwaches Wachstum der Zellen hinweist. Zudem war ihre Zelldichte deutlich geringer und die Zellschicht bedeckt auch nach siebentägiger Kultivierung die Oberfläche der Deckgläschen nicht vollständig (Abb.3.37.B). Es waren nur einzelne kleinere Gruppen wachsender Zellen zu erkennen (wZ). Apoptotische Zellen wurden durch diese Untersuchungsform nicht deutlich.

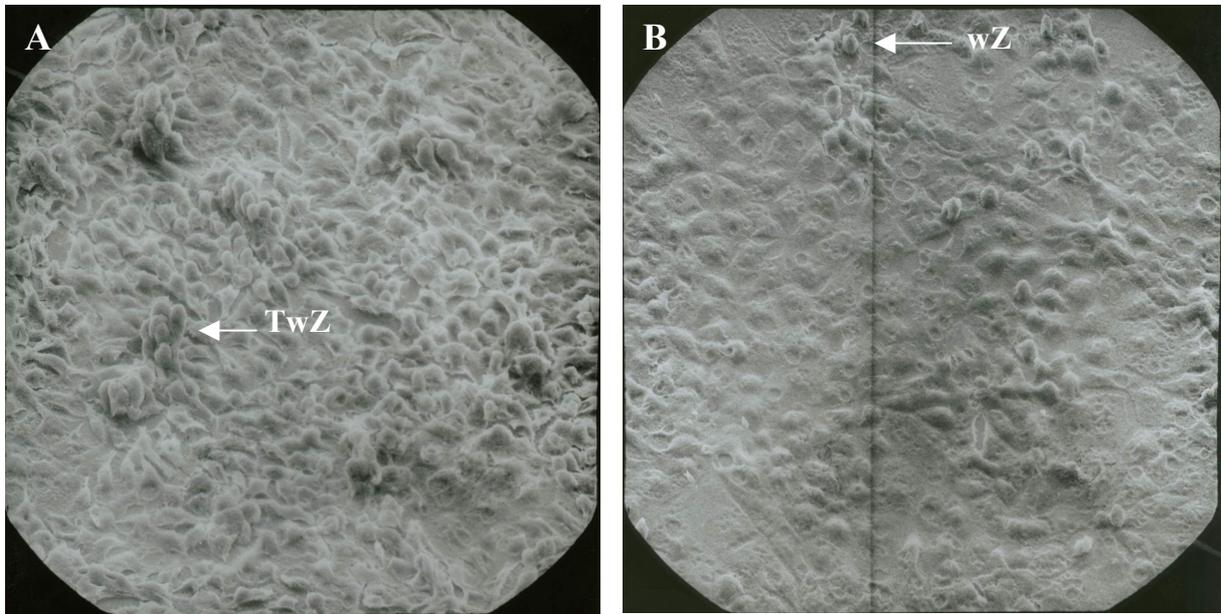


Abb.3.37.: Rasterelektronenmikroskopische Analysen der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 nach 7 Tagen Inkubation mit (A) E2 (400x) und (B) RLX (400x).

Insgesamt zeigte sich durch die beiden elektronen- und rasterelektronenmikroskopischen Untersuchungen im Vergleich eine proliferationsfördernde, antiapoptotische Wirkung für E2 und ein antiproliferatives, schwach apoptisches Potential für RLX.

4. Diskussion

Während der zyklischen Veränderungen des Endometriums werden Zellproliferation, Zellwachstum und Differenzierung vom programmierten Zelltod (Apoptose) gefolgt (Kokawa, 1996). Das Gleichgewicht zwischen Zellproliferation und Apoptose ist bedeutend für die Homöostase der besonderen Dynamik des Endometriums. Fehlregulationen in diesem Gleichgewicht durch hormonelle, genetische oder andere Faktoren können eine Rolle bei der Karzinogenese in diesem Gewebe spielen. Die genaue Klärung der Frage, welche Mechanismen die Vorgänge von Proliferationsaktivierung, Proliferationsinhibition und Apoptoseinduktion bewirken und wie diese hormonell reguliert sind, gibt einem die Möglichkeit zur Hand, sich diese Mechanismen durch spezifische Regulation nutzbar zu machen. SERMs (*selective estrogen receptor modulators*) sind Substanzen, die selektiv einen ER-vermittelten Mechanismus agonistisch aktivieren und einen anderen antagonistisch inhibieren. Die Vielschichtigkeit der östrogenen Wirkungen im Körper einer Frau resultiert in einem komplexen Bild von erwünschten und unerwünschten östrogenen Effekten. Die zwei schwerwiegendsten Punkte in klinischer Hinsicht sind die Therapie von östrogenabhängigen Tumoren und die Behandlung postmenopausaler Beschwerden, die auf den Östrogenmangel zurückzuführen sind (Beckmann, 2000a). Die zwei wichtigsten SERMs, Tamoxifen und Raloxifen, greifen genau an diesen Punkten an. Während Tamoxifen als adjuvante Therapie gegen östrogenabhängige Brusttumore eingesetzt wird (Beckmann, 1998), findet Raloxifen bei der Osteoporosebehandlung und -prävention Verwendung (Cummings, 2000). Raloxifen hat, wie Tamoxifen, eine inhibierende Wirkung auf das Wachstum hormonabhängiger Brusttumore. Ein gravierender Unterschied zwischen den beiden Substanzen besteht in ihrer Wirkung im Endometrium. In klinischen Studien zeigte sich, daß sich bei einer Behandlung von Brusttumoren mit Tamoxifen das Risiko eines Karzinoms im Endometrium erhöht. Für Raloxifen wurde durch die bisherigen Studien ein solcher Effekt nicht aufgezeigt. Die unterschiedlichen Mechanismen, die diesen Effekten zugrunde liegen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Bei der Brustkrebstherapie mit Raloxifen treten Resistenzen gegen dieses Antiöstrogen auf (Murphy, 1998b). Die genauen Mechanismen, die diese Resistenz verursachen, sind bisher ungeklärt. Klinisch findet Raloxifen im Falle einer Resistenz gegen Tamoxifen Einsatz als Antiöstrogen gegen Brustkrebs.

Zur Untersuchung von (anti-)östrogenen Regulationsmechanismen in Karzinomzellen eignen sich Karzinomzelllinien aus entsprechenden Karzinomtypen als Modellsystem. Die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa und die Mammakarzinomzelllinie MCF7 sind Zelllinien, die über eine intakte ER-Transaktivierungsmaschinerie (ER α -, ER β -, PR-positiv)

verfügen und deren Proliferationsrate durch Inkubation mit Östradiol gesteigert werden kann (Edwards, 1982; Holinka, 1986). Sie sind also responsiv gegenüber Östradiol. Aufgrund dieser Responsivität gegenüber Steroidhormonen wurden die Regulationsmechanismen mit Hilfe von Expressionskinetiken an diesen beiden für die zwei östrogenregulierte Karzinomtypen repräsentativen Zelllinien analysiert.

Der Hauptmechanismus der östrogenen Wirkung verläuft über die Östrogenrezeptoren α und β und ER-regulierte Gene, mit spezifischen östrogen-responsiven DNA-Elementen in ihren Promoterregionen. Die Transkriptionsaktivierung durch ER α und ER β ist nicht nur von dem Liganden, sondern auch von den Koaktivatoren, mit denen sie assoziiert sind, abhängig (Katzellenbogen, 1996; McKenna, 1999; Xu, 1999). Die Steroidrezeptor-Koaktivatoren sind eine entscheidende Komponente der ER-Transaktivierungsmaschinerie. Die Zusammensetzung der Maschinerie ist von der Verfügbarkeit der Koaktivatoren abhängig. Die Transkriptions-Koaktivatoren AIB1 und SRC-1 z.B. sind jeweils in einem „Pool“ vorhanden, um den verschiedene Transkriptions-Aktivatoren, wie ER α und ER β , konkurrieren. Zusätzlich bewirken die SRCs agonistische und antagonistische Effekte, da sie an ER-Agonisten-Komplexe gebunden werden, nicht aber an ER-Antagonisten-Komplexe (Gee, 1999; Norris, 1999). Zudem wird die Aktivität der Transaktivatoren durch das relative Mengenverhältnis von Koaktivatoren zu Korepressoren in einer Zelle mitbestimmt. Steigerung und Senkung der Expressionslevel führen so zu einem veränderten Expressionsmuster aufgrund einer Verschiebung dieses Verhältnisses. Einflüsse von (Anti-)Östrogenen auf die Expression der Östrogenrezeptoren und der Steroidrezeptor-Koaktivatoren würden die Zusammensetzung der Transaktivierungsmaschinerie aufgrund dieser Dosisabhängigkeit verändern und die Transaktivierung verschiedener Gene verstärken oder inhibieren.

In den gegebenen Studien wurden am Modell der Karzinomzelllinien die Einflüsse der (Anti-) Östrogene auf die Expressionen von Östrogenrezeptoren und SRCs untersucht. Zur genauen Quantifizierung der Transkriptmengen wurde die quantitative RT-PCR angewendet, die für die mRNA-Expressionsanalyse in unserer Arbeitsgruppe etabliert war (Niederacher, 1999b), aber für die in dieser Arbeit zu untersuchenden mRNAs optimiert werden mußte. Bei der Optimierung der Reaktionsbedingungen zeigte sich, daß aufgrund der unterschiedlich hohen Expressionsniveaus stark unterschiedliche PCR-Bedingungen gewählt werden mußten. Die Zyklenzahlen der Zielgene lagen im Vergleich zu der des Referenzgens in unterschiedlichen Bereichen.

Die Expression des Progesteronrezeptor gilt als guter Indikator für die agonistische Wirkung einer Substanz auf die Regulation eines östrogenregulierten Gens (Horwitz, 1978). In der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa wurde sie leicht durch 17β -Östradiol, nicht aber durch die SERMs Tamoxifen, Hydroxytamoxifen, Raloxifen und Raloxifen-Hydrochlorid stimuliert. Die schwache Stimulation durch E2 wurde dabei erst nach 12 Std. detektiert. Nach vorherigen Beobachtungen (Kreitman-Gimbal, 1979 und 1980; Kreitman 1979; Holinka, 1986) war eine stärkere Stimulation der PR-Expression erwartet anders erwartet worden. Bei der Beobachtung, daß die Stimulation der Expression des PR durch E2 nur schwach detektiert wurde und durch die SERMs kein Effekt in der Zelllinie Ishikawa auftrat, muß ein Einschränkung dieser Ergebnisse verdeutlicht werden. Nachdem die Analysen der Expressionskinetiken abgeschlossen waren, wurde durch genauere Untersuchungen der Progesteronrezeptorexpression in den Ishikawa-Zellen die Besonderheit festgestellt. Daß diese Zellen nur die Variante A des PR, nicht aber seine Variante B exprimierten. Dieses wurde zwar an einer späteren Passage der Zelllinie gezeigt, stellt aber eine mögliche Erklärung für die Abweichung der gezeigten Ergebnisse von bisherigen Beobachtungen dar. Hierbei sind die Charakteristika dieser Varianten zu beachten. Die Variante A des PR fungiert als Transkriptionsrepressor und die Variante B als Transkriptionsaktivator von progesteronresponsiven Genen (Giangrande, 1997). Der PR-A wirkt auch auf die Transaktivierung durch den $ER\alpha$ reprimierend (Vegeto, 1993; McDonnell, 1994). Beide PR-Varianten stammen zwar von demselben Gen, werden aber durch unterschiedliche, östrogeninduzierbare Promotoren reguliert (Kastner, 1990). Die schwache Hochregulation der PR-Regulation in den Ishikawa-Zellen könnte auf dieser Gegebenheit beruhen. Bei den vorliegenden Ergebnissen ist zu beachten, daß nur die PR-Variante mit reprimierender Wirkung, Variante A, exprimiert wurde. Da aber in dem Kulturmedium kein Progesteron vorhanden war, ist eine Aktivität der reprimierenden PR-Variante unwahrscheinlich, so daß die anderen Expressionskinetiken von dieser Tatsache unberührt sein sollten.

Die Expression des Östrogenrezeptor α und seiner Δ Exon5-Spleißvariante, wurde durch Östradiol und die SERMs nicht beeinflusst. Das Verhältnis zwischen wt $ER\alpha$ und $ER\alpha\Delta$ Exon5 blieb ebenfalls konstant. Frühere Beobachtungen, daß generell diese Verhältnis während des menstruellen Zyklus unverändert bleibt (Fujimoto, 1997a), unterstützt die Aussage, daß im Endometrium dieses Verhältnis durch Hormone unbeeinflusst bleibt.

Die Expression des Östrogenrezeptor β dagegen wurde sowohl durch Östradiol, als auch alle vier getesteten SERMs deutlich stimuliert. Die Stimulationsstärken und zeitlichen Verläufe unterschieden sich zwischen E2 und den SERMs kaum, was auf ähnliche Regulations-

mechanismen hindeutet. Das frühe Auftreten der Expressionssteigerung (nach 4 Std.) deutet eher auf eine direkte Regulation, als auf einen sekundären, zellulären Effekt (z.B. stimulierte Zellproliferation) hin. Die SERMs wirken also an potentiellen Regulationselementen im ER β -Promoter agonistisch. Hierbei sind verschiedene Mechanismen denkbar. Für Tamoxifen und Raloxifen ist eine agonistische Wirkung über den ER β am AP1-Element nachgewiesen (Paech, 1997). Auch ein Agonismus über den ER α wäre denkbar, wobei Tamoxifen über eine Aktivität der AF-1 des ER α an einem ERE (Katzenellenbogen, 1997b) und Raloxifen über ER α -Aktivität an einem RRE (Yang, 1996) wirken könnten. Aufschlüsse über den genauen Mechanismus würden Analysen des Promoters des ER β -Gens geben. Der späterer Abfall der zu den frühen Meßzeitpunkten (bis 8 Std.) stimulierten ER β -Expression war bei der E2-, TAM- und OHT-Kinetik deutlicher zu erkennen als bei der RLX- und RLX-HCl-Kinetik. Es ist denkbar, daß der ER β eine ER α -vermittelte Stimulation seiner eigene Expression autoregulativ reprimiert. Durch eine gesteigerte Expression des ER β würde es zu einer verstärkten ER β :ER α -Heterodimerisierung kommen, die zu einer Modulation der ER α -abhängigen Transaktivierung führt (Hall, 1999). Die Aktivität von ER α -Homodimeren am ER β -Promoter könnte abgeschwächt werden. Ein solcher Mechanismus, in dem der ER α die Stärke seiner eigenen Transaktivierung durch die Stimulation der ER β -Expression selber reguliert, würde die ER α -vermittelten östrogenen Effekte in einem bestimmten Rahmen halten und somit einen limitierenden Kontrollmechanismus darstellen.

In der Brustkrebszelllinie MCF7 wurden ähnliche östrogene Effekte für die Expression einzelner Steroidrezeptoren deutlich. Die Expression des Progesteronrezeptors wurde durch E2, TAM und OHT deutlich stimuliert; RLX und RLX-HCl hatten dagegen nur einen schwach stimulativen Effekt. Die Steigerung der PR-Expression durch E2 bestätigte bisherige Beobachtungen (Swanek, 1991). Die unterschiedlichen Stärken der PR-Expressionssteigerung durch E2 und TAM/OHT ließen sich folgendermaßen erklären. Die Transaktivierung durch E2 ist ER α -vermittelt, wobei die AF-1 und die AF-2 synergistisch wirken. Die schwächere Stimulation durch TAM und OHT wäre durch eine Aktivität der AF-1 zu erklären, wobei die AF-2 antagonistisch inhibiert wäre (Katzenellenbogen, 1997b). Bezüglich der schwachen Expressionsstimulation durch RLX und RLX-HCl wären verschiedene Mechanismen denkbar. Die entscheidende Frage ist auch hier, über welche regulativen DNA-Elemente in der PR-Promoterregion der Transaktivierungsmechanismen verläuft. Im Vergleich zu Tamoxifen führt die Bindung von RLX in einen Komplex mit ER α zu einer anderen Konformation (Wijayarathne, 1999). RLX bewirkt eine andere Umlagerung der α -

Helix12 als E2 und TAM (Brzozowski, 1997), was zu einer veränderten Rekrutierung von Koaktivatoren führt (Gustafsson, 1998). Solch ein RLX-ER-Komplex ist allerdings nicht in der Lage mit einem ERE zu interagieren (Yang, 1996). Stattdessen bindet er an eine Nukleotid-Sequenz aus vorwiegend Purinbasen, die die Bezeichnung *raloxifen-response-element* (RRE) erhalten hat. Ein Gen, das eine RRE-artige Nukleotid-Sequenz in ihrer Promoterregion enthält, ist der transformierende Wachstumsfaktor TGF- β_3 (Yang, 1996). Auch hier würden genauere Promoteranalysen über den Transaktivierungsmechanismus durch RLX Aufschluß geben.

Das antagonistische Potential der SERMs wurde in Koinkubationsexperimenten mit E2 aufgezeigt. In Gegenwart von E2 wirkte sowohl TAM, als auch RLX und RLX-HCl antagonistisch auf die E2-stimulierte PR-Expression. Hierbei wurde deutlich, daß die SERMs in Anwesenheit von Östrogen antagonistisch wirken, wohingegen sich bei Abwesenheit von Östrogen ein agonistisches Potential der SERMs zeigt, daß bei Anwesenheit von E2 möglicherweise vorhanden ist, aber nicht gemessen werden kann.

Die mRNA-Expression des ER α wurde in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 weder durch E2, noch durch die SERMs beeinflusst. Zu der Regulation der ER α -Expression in MCF7 gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Read *et al.* (1989) beschrieben, daß in MCF7-Zellen, die in Phenolrot-freiem Medium mit östrogen-freiem (dextran-beschichteter Aktivkohle behandeltem) FCS wuchsen, E2 auf den mRNA- und den Proteinlevel des ER α keinen Effekt hat, was die gegebenen Ergebnisse unterstützt. Andere Arbeitgruppen beschrieben eine Inhibition (Saceda, 1989; Berthois, 1990; Martin, 1993; Gierty, 1996) oder eine Stimulation (Swaneck, 1991). Die Beobachtungen scheinen sehr stark von den Kulturbedingungen (Medium, Anzahl der Passagen der Zelllinie, Behandlung der Zellen vor der Inkubation) und der Meßmethodik (quantitativ gegen semi-quantitativ) abzuhängen. Auch bisher beschriebene Effekte von Tamoxifen auf die ER α -Expression (Koibuchi, 2000) konnten nicht bestätigt werden. Eine antiproliferative Wirkung von Tamoxifen auf MCF7-Zellen (Bardon, 1984) wäre somit nicht auf eine Inhibition der ER α -Expression, sondern eher auf eine Inhibition dessen Aktivität zurückzuführen.

Die Expression der ER α Δ Exon5-Deletionsvariante war unter Inkubation mit den (Anti-) östrogenen stabil, wodurch sich auch die wtER α :ER α Δ Exon5-Ratio nicht veränderte. Die ER α Δ Exon5-Spleißvariante wird als möglicher Vermittler einer Tamoxifen-Resistenz angesehen (Murphy, 1998a), wobei sie dominant negativ gegenüber dem wtER α (Fuqua, 1991) und schwach transaktivierend am ERE (Bollig, 2000) wirkt. Auf der einen Seite ist die

Expression der Varianten-mRNA zwar in beiden Karzinomzelllinien deutlich aufgezeigt worden, (anti-)östrogene Effekte hatten darauf aber keinen Einfluß.

Anders als für den ER α zeigte sich in den MCF7-Zellen, wie schon in der Zelllinie Ishikawa beobachtet, eine Stimulation der ER β -Expression, sowohl durch E2, als auch durch Tamoxifen und Raloxifen. Die Stimulation durch E2 (~10-fach) fiel dabei in dieser Zelllinie am stärksten aus. Die Expressionssteigerung durch die SERMs erreichte in allen vier Fällen etwa das gleiche Niveau. Während der Kinetikverlauf der ER β -Expression unter E2-Inkubation dem in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa detektierten ähnelte, zeigten sich unter Inkubation mit den SERMs Unterschiede. Unter TAM/OHT-Einfluß wurde in den Ishikawa-Zellen eine Stimulation zu den frühen Meßzeitpunkten (4-8 Std.) deutlich, während in den MCF7-Zellen die Stimulation erst zu den späten Meßzeitpunkten (24 Std.) auftrat. Unter TAM-Wirkung wurde sogar nach vierständiger Inkubation erst eine Expressionsinhibition festgestellt. Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich bei der Inkubation mit RLX und RLX-HCl: In den Ishikawa-Zellen stimulierten RLX und RLX-HCl schon an den frühen Meßpunkten die ER β -Expression, wobei sich die Stimulation - im Gegensatz zu der unter TAM/OHT-Wirkung - schwach auch zu den späteren Meßpunkten fortsetzte. In den MCF7-Zellen trat, wie unter TAM/OHT-Einfluß, erst eine schwache Expressionsinhibition und zu den späteren Meßpunkten eine Expressionsstimulation auf. Entscheidende Unterschiede zwischen TAM und OHT bzw. RLX und RLX-HCl wurden bei diesen Expressionskinetiken nicht deutlich. Neben den hier gezeigten E2-abhängigen Steigerungen der ER β -Expression in MCF7- und Ishikawa-Zellen ist dieses auch für die Hypophysenzelllinie GH3 (Mitchner, 1999) und die Mammakarzinomzelllinie T47D (Vladusic, 2000) nachgewiesen worden. Beobachtungen von Dotzlaw *et al.* (1996), daß die ER β -Expression in der Zelllinie T47D (ER α -, ER β - und PR-positiv) durch Progesteron herunterreguliert wird, könnten auf einer ER α -vermittelten Regulation basieren, wobei eine Pg-induzierte, PR-vermittelte Inhibition der ER α -Expression die ER α -Transaktivierung und somit möglicherweise die ER β -Expression hemmt. Für Mammakarzinome wurde bereits gezeigt, daß eine Expression des ER β mit einer Expression des ER α assoziiert ist (Jarvinen, 2000). Sollte die Expression des ER β durch den ER α und über ein ERE vermittelt werden, würde die Stärke der Stimulation der ER β -Expression von der Konzentration des ER α abhängen.

Zusammengenommen werden die Expressionen des Östrogenrezeptor β und des Progesteronrezeptors in beiden Karzinomzelllinien durch östrogene Effekte sowohl von E2 als

auch von den SERMs beeinflusst, wohingegen die Expression des ER α durch die (Anti-) Östrogene nicht verändert wurde.

Die Steroidrezeptor-Koaktivatoren sind ein entscheidender Faktor für die Art und Stärke der ER-vermittelten Transkriptionsaktivierung. Ihre Bindung in den Rezeptor-Liganden-Komplex ist für eine Funktion der AF-1 und der AF-2 essentiell (McInerney, 1996). Agonistisches und antagonistisches Potential eines SERMs hängen u.a. davon ab, ob und welche Koaktivatoren aufgrund der veränderten Konformation des Rezeptor-Liganden-Komplexes rekrutiert werden können. Zusätzlich ist der Expressionlevel der SRCs über mindestens zwei Mechanismen eine Determinante der Aktivität von Steroidhormonrezeptoren: (1) Die SRCs liegen in einem Pool vor, um den Transkriptionsaktivatoren konkurrieren (Newman, 2000), was als limitierender Faktor zu einem gegenseitigen Squelching führt (Voegel, 1996; McInerney, 1996). SRC-Expressionsveränderungen würden in einem veränderten Transaktivierungs- und Genexpressionsmuster resultieren. (2) Die SRCs konkurrieren mit Korepressoren um die Bindung der Rezeptoren (Jackson, 1997; Smith, 1997; Teuter, 1998). Hierbei ist das Mengenverhältnis zwischen den Koaktivatoren und Korepressoren bestimmend. Die Überexpression eines SRC würde in einer verstärkten Transaktivierung resultieren, was z.B. im Fall des ER α karzinogenes Potential haben könnte.

Bei den mRNA-Expressionsanalyse der Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1, TIF2 und SRC-1 (1a und 1e) zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse zwischen den einzelnen SRCs und den beiden Zelllinien. Die Expression der mRNA des Koaktivators AIB1 wurde in der Zelllinie Ishikawa nicht beeinflusst, während in der Mammakarzinomzelllinie MCF7 verschiedene Einflüsse beobachtet wurden. Durch 17 β -Östradiol wurde die AIB1-Expression leicht abgeschwächt und durch RLX-HCl leicht erhöht. RLX hatte im Gegensatz zu seinem Derivat keinen Effekt. Im Vergleich zu den gezeigten Expressionssteigerungen von ER β und PR fallen die bei der AIB1-Expression detektierten Effekte nur gering aus. Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen, daß die Expression von AIB1 (RAC3/TRAM1) durch Östrogenbehandlung hochreguliert wird (Li, 1998; Misiti, 1998), konnten in den beiden Karzinomzelllinien nicht nachvollzogen werden. Hierbei ist zu beachten, daß in der Brustkrebszelllinie MCF7 das AIB1-Gen amplifiziert ist und eine Überexpression der AIB1-mRNA aufgezeigt wurde (Anzick, 1997; Suen, 1998). Es ist fraglich, ob es sich bei diesen Effekten um direkte Regulation oder um sekundäre Einflüsse handelt, die z.B. durch eine veränderte Zellproliferation oder die Regulation anderer östrogen-responsiver Gene verursacht werden. Die Expression der Varianten des Koaktivators SRC-1 wurde in MCF7-Zellen nicht und in

Ishikawa-Zellen nur schwach beeinflusst. Die Expressionslevels unterschieden sich zwischen beiden Zelllinien nur geringfügig. In Ishikawa-Zellen wurde die Expression der Spleißvariante SRC-1a durch RLX-HCl und die der Variante SRC-1e durch RLX leicht stimuliert. Daß die SRC-1-Expressionen in MCF7 durch E2 und die SERMs nicht beeinflusst wurden, bestätigt vorherige Aussagen bezüglich der E2-Wirkung (Thenot, 1999). Das Verhältnis zwischen den SRC-1-Varianten e und a dagegen war in den Ishikawa-Zellen konstant, wohingegen es sich in den MCF7-Zellen und OHT-, RLX- und RLX-HCl-Einfluß leicht steigerte. Der Wert von 2,59 lag in MCF7 höher als das vorher beschriebene von 1,00 (Kalkhoven, 1998). Die Variante SRC-1e wird als Hauptvariante angesehen, da sie höher exprimiert ist (Hayashi, 1997) und am ERE der potentere Koaktivator ist (Kalkhoven 1998). Beide Varianten binden nicht an den Tamoxifen-gebundenen ER α (Kalkhoven, 1998), so daß die Tendenzen zur SRC-1e-Variante hin keinen Einfluß auf agonistische/antagonistische Effekte der SERMs haben sollten. Insgesamt wurden aber, wie bei der AIB1-Expression nur schwache Veränderungen deutlich, was auch hier auf keine direkte hormonelle Regulation hinweist. Das relativ stabile Auftreten von Spleißvarianten, was auch schon bei der ER α Δ Exon5-Deletionsvariante deutlich wurde, zeigt, daß die getesteten Substanzen durch direkte Regulation oder sekundäre Effekte, wie z.B. eine veränderte Zellproliferationsrate, keinen Effekt auf die Aktivität und Effektivität der Spleißmaschinerie haben. Anders als die Expression von AIB1 und SRC-1 wurde die des Koaktivators TIF2 in der Brustkrebszelllinie deutlicher beeinflusst. Eine Stimulation der TIF2-Expression wurde sowohl bei Inkubation der Zellen mit E2, als auch unter Inkubation mit den SERMs beobachtet. Hierbei traten die Steigerungen nur an den frühen Meßpunkten auf und nicht zu den späten Meßpunkten. Im Vergleich zu den Stimulationen der ER β - oder der PR-Expression waren die Stimulationen der TIF2-Expressionen in den MCF7-Zellen nur schwach. Eine direkte Regulation über ein ERE-Element ist auszuschließen. Eine mögliche Regulation über ein anderes, schwächer responsives DNA-Element in der Promoterregion des TIF2-Gens ist denkbar. Hierbei bedarf es einer genauen Sequenzanalyse dieses Bereiches. In der Zelllinie Ishikawa war bei der Expressionsanalyse für TIF2 kein einheitliches Bild zu erkennen. Die Schwankungen innerhalb einzelner Meßanalysen variierten sehr stark, so daß hier keine Aussagen getroffen wurden. Diese Schwankungen können verschiedene Ursachen haben. Sie können durch die allgemein für Zelllinien beschriebene genomische Instabilität hervorgerufen sein, oder durch eine andersartige Veränderung des Transkripts auf der Ebene seiner Sequenz oder Stabilität, so daß bei verschiedenen Experimenten unterschiedliche mRNA-Mengen detektiert werden.

Zusammengenommen zeigten sich die Expression der Steroidrezeptor-Koaktivatoren in beiden Zelllinien kaum durch Östradiol und die SERMs beeinflusst. Die aufgezeigten stimulativen Effekte könnten durch sekundäre Einflüsse (z.B. Proliferationsstimulation durch andere E2-abhängige Regulationsmechanismen) hervorgerufen und unterliegen weniger einer direkten Regulation über putative responsive DNA-Elemente in den entsprechenden Promoterregionen. Eine positive oder negative „Rückkopplung“ über ER α -regulierte Gene wäre denkbar. Im Vergleich zu den Expressionssteigerungen von ER β und PR, die eine direkte Regulation darstellen, scheinen die hier aufgetretenen Effekte ebenfalls, eher durch sekundäre Effekte hervorgerufen worden sein. Ebenso scheinen die Unterschiede zwischen den Varianten 1a und 1e eher sekundär verursacht zu sein, als auf unterschiedlichen Regulationsmechanismen bzw. einer Selektion beim alternativen Spleißen zu beruhen.

Bei den gemessenen Effekten ist wichtig, zu beachten, daß die Zelllinien Zellen repräsentieren, die Tumoren postmenopausaler Patientinnen entstammen. Im postmenopausalen Gewebe treten die normale hormonellen Schwankungen der Frau nicht mehr auf, obwohl Steroidhormonrezeptoren exprimiert werden. Außerdem muß überlegt werden, inwieweit die normalen hormonellen Regulationsmechanismen in diesen Zellen intakt sind. Der Verlust der Progesteronrezeptor-Variante B in den Ishikawa-Zellen ist ein Beispiel hierfür. Dennoch können die in diesem System gezeigten Wirkungen von Östradiol und den SERMs als Grundlagen für die Erforschung der genauen Regulationsmechanismen *in vivo* dienen. Dabei stellen die Zelllinien das zur Zeit gebräuchlichste System zur Untersuchung genetischer Mechanismen in Tumorzellen dar.

Der Einfluß anderer Faktoren auf die Aktivität der ER α -abhängigen Transkriptionsaktivierung sollte mit Hilfe von Reporterassays untersucht werden. BRCA1 inhibiert diese Transaktivierung durch die AF-2 des ER α in Brust- und Ovarialkarzinomen (Fan, 1999). Der Mechanismus dieser Inhibition ist noch unklar, wobei verschiedene Möglichkeiten denkbar sind. Direkte Protein-Protein-Interaktion, kompetitive DNA- oder Koaktivatoren-Bindung sind u.a. vorstellbar. Genauer untersucht werden sollte, ob die Inhibition durch BRCA1 von der Konzentration der vorhandenen Steroidrezeptor-Koaktivatoren abhängt. Die Inhibition durch BRCA1 sollte in den Mammakarzinomzelllinien MCF7 und SK-BR-3 untersucht werden. Hierbei repräsentiert MCF7 eine Zelllinie, die einen positiven Status für ER α , ER β und den PR hat, wohingegen SK-BR-3 bezüglich der Steroidrezeptoren einen negativen Status hat. Für die MCF7-Zelllinie wurde dosisabhängige ER α -Inhibition durch BRCA1 von Fan *et al.* (1999) aufgezeigt. Diese beruht auf einer Inhibition der hormonabhängigen

Aktivität der AF-2 des ER α . In den gegebenen Reporterassays konnte diese Inhibition aufgrund einer anderen Problematik nicht gezeigt werden. Bei der Etablierung der E2-abhängigen Transaktivierung durch den ER α ergab sich die höchste Steigerungsrate ohne Zugabe eines exogenen ER α (-Plasmid). Besonders deutlich ist der Unterschied bei Betrachtung der Basisaktivitäten ohne Zugabe von E2 zu sehen. Bei Zugabe von exogenem ER α (-Plasmid) liegt diese 10-fach höher, als ohne exogenem ER α . Unter Zugabe von E2 dagegen liegt die rLA bei Anwesenheit von exogenem ER α niedriger als ohne. Die E2-abhängige rLA wurde also durch endogene Faktoren, wahrscheinlich endogenen ER α , stärker stimuliert, als bei Zugabe von exogenem ER α . Der Versuch zeigte deutlich, daß bei dem beschriebenen Aufbau eines Reporterassays – abgeleitet von Fan *et al.* (1999) – in MCF7-Zellen endogene Faktoren das Ergebnis so stark beeinflussen, daß die Aussagen nicht allein auf die Aktivität des transfizierten Systems zurückzuführen sind. Bei Etablierung der ER α -vermittelten Transaktivierung in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 zeigte sich dagegen das postulierte Bild. Ohne Zugabe vom exogenen ER α (-Plasmid) wurde keine Steigerung der rLA detektiert. Während die rLA-Werte bei Zugabe von ER α -Plasmid-Mengen über 0,05 ng unter E2-Einfluß sich relativ konstant verhielten, schwankte die Basisaktivität ohne Einfluß von E2 unter Transfektion von 0,05 μ g bis 5 pg ER α -Plasmid deutlich. Dieser Effekt (Abb.3.3.) scheint auf einem E2-unabhängigen Transaktivierungsmechanismus zu beruhen und ist ER α -dosisabhängig. Welche Rolle dabei ligandenunabhängige Transaktivierungsmechanismen spielen, ist unklar. An dem in der Mammakarzinomzelllinie SK-BR-3 etablierten System sollte die Inhibition durch BRCA1 analysiert werden. Die von Fan *et al.* (1999) beschriebene BRCA1-dosisabhängige Inhibition der ER α -vermittelten Transaktivierung eines ERE-regulierten Gens konnte hier nicht nachvollzogen werden, obwohl gleiche Plasmidkonstrukte und -konzentrationen, sowie die gleiche Hormonkonzentration verwendet wurde. Der entscheidende Unterschied scheint hier die Wahl der Zelllinien für die Untersuchungen zu sein. In den gegebenen Experimenten wurde gezeigt, daß in Zelllinien mit endogenen Steroidrezeptoren diese endogenen Faktoren die ERE-gesteuerte Transaktivierung beeinflussen, wohingegen eine Zelllinie ohne endogene Steroidrezeptoren diese Beeinflussung nicht zeigte. Die Zelllinie SK-BR-3 ist für diese Untersuchungen der Zelllinie MCF7 vorzuziehen. Bezüglich den Ergebnissen von Fan *et al.* (1999) ist fraglich, ob diese auf einer direkten Inhibition der ER α -Transaktivierung basieren und inwieweit endogenen Faktoren diese Ergebnisse beeinflussen. Bei den Experimenten von Fan *et al.* (1999) werden sehr große Mengen Plasmid-DNA (bis 11,5 μ g) transfiziert. Nach

eigenen Erfahrungen ist dies mit dem gegebenen Transfektionsreagenz sehr schwierig, da hiervon für eine optimale Transfektionseffizienz große Mengen eingesetzt werden müßten, die sich auf die Zellen zytotoxisch auswirken würden. Denkbar wäre zwar theoretisch auch, daß die Inhibition durch BRCA1 auf einem Regulationsmechanismus beruht, der nur in SR-positiven Zelllinien aktiv ist und in SR-negativen Zelllinien dagegen selektiert wurde. Die gezeigte Inhibition ist eher als experimentelle Effekt einzuordnen und konnte hier nicht nachvollzogen werden. Ein Einfluß von BRCA1 auf die ER α -Aktivität ist zwar denkbar, konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Der menstruelle Zyklus der Frau ist ein ideales System, hormonelle Regulationsmechanismen in einem hormonresponsiven Gewebe zu untersuchen. Beziehungen zwischen der Expression von Steroidrezeptoren und Steroidrezeptor-Koaktivatoren und dem hormonellen Milieu während einer bestimmten Zyklusphase, sowie dem Zelltypus, können Aufschluß über mögliche Regulationsmechanismen geben. Besonders interessant ist, daß in verschiedenen Zyklusphase in den Zelltypen unterschiedliche zelluläre Mechanismen, wie Proliferation, Differenzierung oder Apoptose, ablaufen. In onkologischer Hinsicht sind die Mechanismen von besonderem Interesse, die Zellproliferation stoppen und solche, die Apoptose induzieren. In physiologischer Hinsicht bewirkt E2 die Proliferation von Stroma- und Drüsenzellen in der Proliferationsphase. Im Zeitraum um die Ovulation führen die Steigerung der Pg-Konzentration durch die Aktivität des Gelbkörpers und das Absinken der E2-Konzentration zu einem Proliferationsstop und leiten die Sekretionstätigkeit und die Differenzierung der Zellen ein (Ferenzy, 1983; Clarke, 1990). Östrogen wirkt im Zyklus mitogen, wohingegen Progesteron als Differenzierungsfaktor anzusehen ist (Moutsatsou, 1997). Das Absinken der E2- und der Pg-Konzentration bewirkt die Induktion von Apoptose zum Ende der Sekretionsphase (Nawaz, 1987; Rotello, 1992; Tenniswood, 1992; Slayden, 1993). Im Allgemeinen gelten die menstruellen Blutungen als Progesteronentzugsblutungen (Nawaz, 1987; Pollard, 1987; Rotello, 1992; Dahmoun, 1999). Der Einfluß der Sexualhormone wird hierbei hauptsächlich durch deren Rezeptoren vermittelt. Das Auftreten der Rezeptoren in den einzelnen Zyklusabschnitten und die gegenseitige Regulation ihrer Expression in Antwort auf das phasenspezifische hormonelle Milieu sind ein wichtiger Bestandteil der Zyklusregulation (Flickinger, 1977; Katzenellenbogen, 1980). Durch die Konzentrationen von E2 und Pg werden u.a. auch die Konzentrationen der Steroidhormonrezeptoren ER α und PR beeinflusst (Kraus, 1993; Iwai, 1995; Graham, 1997).

Die Proteinkonzentration des Östrogenrezeptor α nimmt im Lauf der Proliferationsphase deutlich zu und erreicht Ende der Proliferationsphase bzw. Anfang der Sekretionsphase sein Maximum. Hierbei zeigte sich eine fast durchgehende ER α -Lokalisation im Zytoplasma der Drüsenzellen, wohingegen eine Lokalisation in den Zellkernen besonders im Zeitraum kurz vor bzw. nach der Ovulation, also der höchsten E₂-Konzentration, beobachtet wurde. In der mittleren Sekretionsphase wurde der ER α stark im Zytoplasma nachgewiesen, vor allem im luminalen Anteil der Zellen. Während dieser Phase hatte es den Anschein, als ob der ER α sezerniert würde. Dieses wäre eine besondere Art, wie Zellen die eigene Hormonresponsivität regulierten. Danach sinkt die ER α -Konzentration bis Ende der Sekretionsphase in den Stromazellen stark und in den Drüsenzellen etwas langsamer ab. Die Beobachtung der zyklischen Schwankung der Proteinkonzentration des ER α in den Zellkernen bestätigt bereits gezeigte Ergebnisse (Garcia, 1988; Snijders, 1992; Shiozawa, 1996; Felix, 1997, Dahmoun, 1999; Noe, 1999), während die zytoplasmatische Lokalisation des ER α bisher weniger aufgezeigt wurde. Das Vorkommen des ER α im Zytoplasma beruht auf der Synthese des Rezeptors in diesem Zellkompartiment (Anderson, 1974; Guiochon-Mantel, 1996), wobei eine Translokation des ER α in den Zellkern östrogenabhängig ist. Die Diskrepanz zu den bisherigen Beobachtungen kann nicht eindeutig erklärt werden, könnte aber durch methodische Unterschiede (Behandlung des Gewebes vor und nach der Paraffin-Einbettung, Demaskierung der Proteine, Art des Antikörpers, falsche Methodik) bedingt sein.

Die Progesteronrezeptor-Proteinkonzentration war kurz nach der Ovulation am stärksten nachzuweisen. Der PR wurde in den Drüsenzellen sowohl in den Zellkernen, als auch im Zytoplasma nachgewiesen. In den Drüsenzellen ist der PR durchgehend, aber in schwankender Stärke detektiert worden. Im Zytoplasma der Drüsenzellen war er ab Beginn der Sekretionsphase besonders im luminalen Teil der Zellen lokalisiert und scheint, wie der ER α , sekretiert zu werden. In den Kernen der Drüsenzellen wurde er durchgehend und besonders in der frühen Sekretionsphase nachgewiesen. In den Stromazellen zeigt der PR eine starke Kernlokalisation, ein Auftreten im Zytoplasma konnte nicht gezeigt werden. In den Stromazellen reguliert der PR besonders die Differenzierung in praedezidualisierte und Körnchenzellen (Moutsatsou, 1997). Teilweise deutete sich eine etwas stärkere PR-Konzentration in den Körnchenzellen an, was aber nicht eindeutig war. Während die PR-Menge in den Drüsenzellen deutlich während der Sekretionsphase abnahm, sank sie in den Stromazellen nur leicht ab. Auch die Ergebnisse für den PR gingen mit bisherigen Beobachtungen einher (Garcia, 1988; Lessey, 1988; Snijders, 1992; Shiozawa, 1996; Dahmoun, 1999; Noe, 1999).

Die zyklischen Konzentrationsschwankungen des ER β zeigten große Unterschiede zu denen des ER α . Besonders auffallend war, daß er in beiden Zelltypen wesentlich schwächer und hauptsächlich im Zytoplasma nachzuweisen war. In den Drüsenzellen war der ER β am stärksten in der späten Proliferationsphase und der mittleren Sekretionsphase zu detektieren. In den Stromazellen wurde er durchgehend und besonders in der späten Proliferationsphase dargestellt. Das verstärkte Auftreten des ER β zu der Zeit der höchsten E2-Konzentrationen deutet, wie schon in den Expressionskinetiken in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa aufgezeigt, auf eine positive Regulation der ER β -Expression durch Östradiol hin. Die Tatsache, daß eine ER β -Expression im Endometrium mit einem praemenopausalem Status assoziiert ist (Jarvinen, 2000), unterstützt diese Annahme. Die vorwiegende Lokalisation im Zytoplasma weist auf eine andere Funktionalität als der ER α hin und stellt ein nukleäre Transaktivierungsfunktion in Frage. In Brusttumoren und Normalgeweben wurde eine nukleäre Lokalisation des ER β nachgewiesen (Jarvinen, 2000). Eine ER β -vermittelte Transaktivierung könnte insofern ein gewebespezifischer Unterschied zwischen Endometrium- und Brustgewebe sein. Auch das starke Auftreten des ER β in den Stromazellen im Vergleich zum ER α deutet hier auf eine unterschiedliche Rolle hin. Bei nicht-absättigenden Hormonkonzentrationen agiert der ER β als dominanter Inhibitor des ER α und senkt insgesamt die Sensitivität der Zellen gegenüber Östradiol (Hall, 1999). Hier könnte der ER β eine Funktion als Kontrolleur der ER α -vermittelten Transaktivierung haben, um im Verlauf der Sekretionsphase das proliferationsfördernde Potential des ER α in Verbindung mit E2 abzupuffern. In den Stromazellen wäre eine proapoptotische Wirkung des ER β denkbar, in dem er die ER α -regulierte Transaktivierung antiapoptotischer Proteine, wie bcl-2 (Zhang, 1999) inhibiert.

Insgesamt zeigt der Verlauf der ER β -Konzentration im menstruellen Zyklus individuelle Merkmale, die auf besondere Funktionen, die sich von denen des ER α stark unterscheiden, schließen lassen. Die Lokalisationen des ER α und des PR dagegen deuten darauf hin, daß sie die Hauptvermittler der phasenspezifischen Effekte von Östrogen und Progesteron in der Funktionalis des Endometrium sind. Der ER α läßt sich am stärksten im Zeitraum E2-induzierter Zellproliferation nachweisen (Felix, 1997). Der PR ist dann am stärksten vertreten, wenn kurz nach der Ovulation die Pg-regulierten Veränderungen vermittelt werden (Dahmoun, 1999).

Die Konzentrationen der Steroidrezeptor-Koaktivatoren zeigten im Vergleich zu denen der Steroidrezeptoren deutlich geringere Schwankungen während des menstruellen Zyklus. So

fanden sich SRC-1 und AIB1 in gleicher Weise vor allem in den Drüsenzellen. Verstärkt traten in der mittleren Sekretionsphase beide im basalen Bereich der Zellen auf. Für TIF2 deutete sich eine ähnliche Lokalisation bei der Untersuchung der gefrier-geschnittenen Präparate an. Erstaunlich an diesen Ergebnissen ist die Diskrepanz zu den Erwartungen, die aus der Funktion der Steroidrezeptoren abgeleitet wurden. Während die SRCs in der frühen und mittleren Sekretionsphase hauptsächlich im basalen Teil der Drüsenzellen, vornehmlich im Bereich um die Vakuolen herum, nachgewiesen wurden, traten sowohl der ER α , als auch der PR vorwiegend im apikalen/luminalen Teil der Zellen auf. Eine direkte Interaktion der Proteine scheint hier nicht aufzutreten. Dieses wäre aber zu erwarten gewesen, da man davon ausgeht, daß die Koaktivatoren die Transaktivierung durch nukleäre Rezeptoren in den Zellkernen verstärken. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis läge in der Methode. Die SRCs könnten in den Zellkernen in Komplexen mit anderen Proteinen vorliegen und so für die Antikörperbindung maskiert sein. Kommen sie jedoch wirklich nur zytoplasmatisch in diesen Zellen vor, scheinen sie hier eine andere Aufgabe auszuüben, als die bisher postulierte. Eine Kernlokalisation, wie sie von Chen et al. (1998) berichtet wurde, konnte in den untersuchten Endometriumgeweben nicht gezeigt werden. Die zytoplasmatischen Konzentrationen der beiden SRCs könnte in dem Mengenverhältnis zu den Korepressoren (Webb, 1998; Szapary, 1999) und somit für die Aktivität der Steroidrezeptoren entscheidend sein. Ein gravierender Unterschied zwischen AIB1 und SRC-1 wurde bei der Untersuchung der Gewebe aus der frühen Sekretionsphase offensichtlich. Während AIB1 in diesem Phasenabschnitt am schwächsten zu detektieren war und herunterreguliert zu sein schien, war in diesem Zeitraum die SRC-1 am stärksten nachzuweisen. Eine Erklärung für diese Beobachtung ist nicht eindeutig zu finden. Eine verstärkte Einbindung in einem maskierenden Komplex oder eine Regulation durch die veränderten Hormonkonzentrationen sind nur zwei Möglichkeiten. Ein hormonelle Hochregulation von AIB1, die die hormonellen Effekte zusätzlich verstärken würde (Li, 1998; Misiti, 1998), war nicht zu beobachten.

Zusammengenommen zeigten sich die Konzentrationen von AIB1 und SRC-1 in deutlich geringerem Maße den hormonellen Schwankungen im Laufe des Zyklus ausgesetzt, als die der Steroidrezeptoren. Eine spezifische regulative Bedeutung der SRCs für Proliferation, Differenzierung oder Apoptose scheint eher unwahrscheinlich. Die Diskrepanz zwischen den Lokalisationen der SRCs und der drei Steroidrezeptoren wirft verschiedene Fragen auf, die durch die gezeigten Ergebnisse nicht eindeutig beantwortet werden können.

Die in dem Endometriumgewebe einer Schwangeren detektierten Lokalisationen und Konzentrationen der SR und SRCs geben ein gutes Bild vom Einfluß hoher Konzentrationen

von Östradiol und Progesteron darauf. Diese Ergebnisse unterstützen die Erkenntnisse über die hormonellen Effekte, die durch die Analysen der Gewebe aus dem Verlauf des menstruellen Zyklus gewonnen wurden.

Bei der immunhistologischen Untersuchung der Endometriumgewebe postmenopausaler Frauen zeigten sich diese nur leicht unterschiedlich gegenüber den Ergebnissen bei prämenopausalen Geweben. Besonders der Östrogenrezeptor α und der Progesteronrezeptor wurden auf ähnliche Art und Weise nachgewiesen, was bisherige Beobachtungen bestätigte (Koshiyama, 1996; Noe, 1999). Auch die Morphologie der postmenopausalen Gewebe war einzelnen Phasen des menstruellen Zyklus sehr ähnlich. Vor allem bei den Geweben hormonsubstituierter Patientinnen wurde dieses deutlich. Der Nachweis des ER β dagegen gestaltete sich in den postmenopausalen Geweben anders. Zwar wurde in den Stromazellen ein ähnliches Auftreten wie prämenopausal zu sehen, in den Drüsenzellen war der ER β in allen untersuchten postmenopausalen Geweben nicht nachzuweisen. Eine Herunterregulation des ER β könnte hier auf dem Mangel an endogenen Hormonen, in erster Linie Östradiol, basieren oder allgemein ein Resultat postmenopausaler Effekte im Endometrium sein. Ob einer postmenopausaler Verlust des ER β an der Ruhigstellung des endometrialen Drüsengewebes beteiligt ist, ist nicht zu klären. Weitere Unterschiede wurden durch die immunhistologische Untersuchung der SRCs AIB1 und SRC-1 deutlich. In den postmenopausalen Geweben ohne Hormonsubstitution war sowohl AIB1, als auch SRC-1 in Stroma- und Drüsenzellen nur schwach exprimiert, was in den Geweben mit Hormonsubstitution nicht zu beobachten war. Besonders deutlich war dieses in den Drüsenzellen zu sehen. Möglicherweise ist die Herunterregulation der SRCs in postmenopausalen Geweben ein Mechanismus, die Aktivität noch vorhandener Steroidrezeptoren zu unterdrücken.

Endometriumkarzinome sind größtenteils Adenokarzinome, stammen also von Drüsenzellen ab, und treten hauptsächlich bei postmenopausalen Frauen auf. Die Analyse der Expressionen der Steroidrezeptoren und der Steroidrezeptor-Koaktivatoren sollte Aufschluß über die Bedeutung der ER-Transaktivierungsmaschinerie in diesem Karzinomtypus geben. Zum Vergleich wurden die Expressionen zusätzlich in endometroiden Karzinomen, prämenopausalen Normalgeweben und postmenopausalen Normalgeweben bestimmt.

Die Expression des Östrogenrezeptor α schwankte interindividuell zwischen den einzelnen Adenokarzinomen, genauso, wie den endometroiden Karzinomen und den Normalgeweben, sehr stark. Eine Spezifität der ER α -Expression für einen der Gewebetypen konnte nicht

aufgezeigt werden. ER α -negativ waren nur sechs der 30 getesteten Adenokarzinome. Die Expression der ER α ΔExon5-Deletionsvariante korrelierte mit der des Wildtyp-ER α , wobei sie deutlich schwächer ausfiel. Ein ähnliches Verhältnis war auch in Mammakarzinomen gezeigt worden (Balleine, 1999). Der relative Expressionslevel dieser Variante ist nach Murphy *et al.* (1998) bei der Tumorgenese und -progression verändert. Eine besondere Rolle der ER α ΔExon5-Spleißvariante ließ sich in den untersuchten Tumoren nicht zeigen. Da diese Variante auch beim ER β nachgewiesen wurde (Vladusic, 1997), scheint ihr Auftreten eher auf einem normalen alternativen Spleißmechanismus zu beruhen und eine untergeordnete Rolle bei der Tumorgenese bzw. -progression zu spielen. Die Expression des Progesteronrezeptors war ebenso uneinheitlich, wie die des ER α . Die positive Korrelation zwischen den Expressionswerten der beiden Steroidrezeptoren unterstützt eine hormonell bedingte Abhängigkeit voneinander. Anders zeigte sich die Expression des ER β . Während sie den praemenopausalen Schwankungen unterlag und deutlich nachzuweisen war, konnte sie sowohl in den postmenopausalen Karzinomen, als auch den postmenopausalen Normalgeweben gar nicht oder nur sehr schwach nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis unterstützt die Aussagen der gezeigten immunhistologischen Analysen. Die Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen der Immunhistologie und der qRT-PCR wurden mit Hilfe der parallelen Untersuchung schockgefrorener, gefriereschnittener Präparate bestätigt. Die Expression des ER β korrelierte nicht mit der des ER α und des PR, was zuvor auch für Mammakarzinome gezeigt wurde (Dotzlaw, 1996). Ein durch die Menopause bedingtes Fehlen des ER β scheint eine Tumorgenese zu fördern. Eine Herunterregulation oder ein Fehlen der ER β -Expression oder des ER β -Proteins wurde ebenso in Mammakarzinomen (Leygue, 1998; Speirs, 1999; Cullen, 2000), Ovarialkarzinomen (Brandenberger, 1998; Pujol, 1999) und Kolonkarzinomen (Foley, 2000) aufgezeigt. Berichte, daß in Mammakarzinomen eine Expression des ER β mit einem negativen Nodalstatus, einem niedrigen Grading, einer geringen Mitoserate und einem praemenopausalem Status assoziiert ist (Jarvinen, 2000), unterstützt die Theorie einer antikarzinogenen Wirkung des ER β .

Die Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1, SRC-1 und TIF2 erwiesen sich in ihrer Expression genauso uneinheitlich, wie der ER α oder der PR. Innerhalb der einzelnen Tumore, sowie den Normalgeweben korrelieren die Expressionshöhen der SRCs positiv untereinander und mit denen des ER α und des PR. Keine Korrelation gab es mit der Expression des ER β . Die Analyse der Expressionen der SRC-1-Varianten SRC-1a und -1e zeigte weder in den Tumoren, noch in den Normalgeweben, eine Selektion einer der Varianten. Eine

Überexpression eines der SRCs in den Karzinomen wurde nicht detektiert, da die Expressionswerte in den prämenopausalen Normalgeweben ähnliche Maxima hatten, wie die Tumorgewebe. Eine Rolle einer möglichen Überexpression eines der SRCs, wie sie vorher berichtet wurden (McInerney, 1998; Anzick, 1997), trat in den Endometriumkarzinomen nicht auf. Ebenso konnte eine gemeinsame Poolwirkung der SRCs (Oñate, 1995; Lopez, 1999; Newman, 2000), wobei ein SRC eine verminderte Expression eines anderen durch Steigerung der eigenen Expression ausgleicht, hier nicht gezeigt werden. Eine zusammenhängende Expression der Komponenten der ER α -Transaktivierungsmaschinerie, die auch in Mammakarzinomen auftrat (Kurebayashi, 2000), spricht für eine Östrogenabhängigkeit des Wachstums von Endometriumkarzinomen, was für ein besseres Ansprechen auf eine Antiöstrogentherapie mit Tamoxifen oder Raloxifen sprechen würde (Berns, 1998). Der Vergleich der Expressionsdaten mit klinischen Parametern zeigte keine Korrelation zu den Steroidrezeptor-Expressionen. Dieses steht in Kontrast zu bisherigen Beobachtungen beim Mammakarzinom (Yokota, 1999; Jarvinen, 2000), wo Korrelationen nachgewiesen wurden. Höhere Expressionen der Koaktivatoren TIF2 und SRC-1 (Varianten 1a und 1e) korrelierten mit einem fortgeschrittenem Tumorwachstum (TIF2: Grading; SRC-1: FIGO-Klasse und Tumorgroße), was auf eine Förderung eines E2-abhängigen Tumorwachstums durch die vermehrte SRC-Expression zurückzuführen sein könnte.

Eine putative Überexpression eines Koaktivators würde zu einer verstärkten Transaktivierung über den ER-Weg in hormonresponsiven Zellen führen. Dieser Mechanismus könnte zu Zellwachstum bis hin zur Karzinogenese führen. Ein allgemeiner Mechanismus, der die Überexpression eines Gens hervorrufen kann, ist eine Genamplifikation. In Brusttumoren ist dieses für Onkogene, wie *c-erbB2*, *c-myc* und *int-2* beschrieben (An, 1995; An, 1997; Beckmann, 1997). AIB1-Genamplifikationen wurden in Brust- und Ovarialtumoren assoziiert mit einer AIB1-Überexpression mit Hilfe von FISH-Analysen aufgezeigt (Anzick, 1997; Bautista, 1998). Die AIB1-Genamplifikation korrelierte dabei mit einem positiven ER α /PR-Status (Tanner, 2000) und einer Tumorgroße über 2 cm. In sechs von neun Pankreas-karzinomzelllinien wurde ebenfalls eine AIB1-Genamplifikation und eine assoziierte Überexpression nachgewiesen (Ghadimi, 1999). Durch die Untersuchung der genomischen DNA von 127 Mammakarzinomen und 30 Endometriumkarzinomen sollte eine mögliche AIB1-Genamplifikation nachgewiesen werden. Hierfür wurde mit der quantitativen differentiellen PCR eine Methode gewählt, durch die zuvor klinisch relevante Genamplifikationen nachgewiesen wurden und die in unserer Arbeitsgruppe etabliert war (Niederacher, 1999; An, 1999). Weder in den Mammakarzinomen, noch in den

Endometriumkarzinomen konnte eine AIB1-Genamplifikation nachgewiesen werden. Ebenso konnte für die Endometriumkarzinome aufgrund des Vergleichs mit praemenopausalen Normalgeweben keine Überexpression von AIB1 detektiert werden. In den Mammakarzinomen wurde in 17% eine AIB1-Überexpression aufgezeigt, die somit aber nicht durch AIB1-Amplifikationen verursacht wurden. Die Diskrepanz zu den Ergebnissen von Anzick et al. (1997) beruht wahrscheinlich auf der Methodik und der allgemeinen Heterogenität innerhalb der Tumore. Durch die FISH-Methode werden einzelne Zellen in bestimmten Bereichen der Tumore untersucht (Tanner, 1995). Im Kontrast dazu erlaubt die qdPCR-Technik eine Bestimmung der durchschnittlichen Genkopienzahl innerhalb des ganzen Tumors. Genamplifikationen in einzelnen Zellen eines kleinen Bereiches des Tumors, würden hierbei nicht detektiert werden. Klinisch relevante Genamplifikationen der Onkogene *c-erbB2*, *int-2* und *c-myc* wurden mit Hilfe der qdPCR in akkurater Art und Weise nachgewiesen (Schulte, 1996; An, 1997). Eine mögliche AIB1-Genamplifikation in einzelnen Tumorzellen hat eine eher untergeordnete Bedeutung für den Gesamttumor und bei der Tumorgenese und in klinischer Hinsicht keine Relevanz. Denkbar wäre, daß einzelne Zellen mit einer AIB1-Genamplifikation unter östrogenabhängigem Tumorwachstum einen selektiven Vorteil aufgrund einer erhöhten AIB1-Expression haben könnten. Dieses könnte eine Bedeutung bei der weiteren Tumorprogression haben. Bautista et al. (1998) beschrieben eine positive Korrelation der gefundenen AIB1-Genamplifikationen mit einem Tumorgrad 2 oder 3, aber nicht mit einem Grad 1. Auch die Korrelation mit einer Tumorgröße von über 2 cm deutet darauf hin, daß eine AIB1-Genamplifikation bei der Induktion von Tumorwachstum eher keine Rolle spielt. Aufgrund der Korrelation mit einem späten Tumorstadium ist eine mögliche AIB1-Genamplifikation in einzelnen Tumorzellen eher als ein sekundärer Effekt genomischer Instabilität im Laufe der Tumorprogression anzusehen. Die in den Zelllinien MCF7 und HeLa beobachtete AIB1-Genamplifikation ist wahrscheinlich auch auf eine solche genomische Instabilität zurückzuführen. Die in diesen Zelllinien gezeigte AIB1-Überexpression könnte auf dieser Amplifikation beruhen. Außer in MCF7 wurde auch von anderen Arbeitsgruppen keine AIB1-Überexpression in Mamma- oder Endometriumkarzinomzelllinien nachgewiesen (Thenot, 1999). Eine Überexpression war in den Endometriumkarzinomen nicht zu zeigen. Bei dem Vergleich mit den Expressionshöhen in den praemenopausalen Normalgeweben muß aber beachtet werden, daß die Karzinome postmenopausal sind. Eine hohe AIB1-Expression kann darauf hindeuten, daß in den postmenopausalen Karzinomen praemenopausale Transaktivierungsmechanismen aktiv sind. Die in den Mammakarzinom gezeigten AIB1-Überexpressionen könnte in diesen Tumoren

ein karzinogenes Potential haben, da die limitierende Wirkung des Koaktivators aufgehoben und normalerweise inhibierte Transaktivierungsmechanismen aktiviert werden würden. Ein östrogenabhängiges Tumorwachstum würde auf diesem Wege gefördert werden. Eine Überexpression eines Koaktivators in einem Tumor würde zudem auch die Sensitivität gegenüber einer Antiöstrogen-Therapie beeinflussen.

Die physiologischen Effekte einer Raloxifen-Therapie auf Endometriumkarzinomzellen wurden durch die Untersuchung von drei zellmorphologischen Mechanismen bestimmt: Die Zellproliferation, der Differenzierungsgrad der Zellen und apoptotische Vorgänge. Von besonderem Interesse war der Vergleich zu den durch Östradiol regulierten zellulären Mechanismen, da dieses die Zellproliferation fördert und antiapoptotisch wirkt (Dahmoun, 1999).

Als Modellorganismus wurde für die immunhistochemischen Kinetiken die Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 verwendet, die die Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR, sowie die Steroidrezeptor-Koaktivatoren AIB1, TIF2 und SRC-1 exprimiert und als östrogenresponsiv gilt (ATCC). In den immunhistochemischen Analysen wurden semiquantitativ neben den Markerproteinen auch die Proteine der putativen Vermittler (anti-) östrogenener Effekte, ER α und ER β , sowie des Koaktivator SRC-1, und des östrogenregulierten PR bestimmt. Die Proliferation der RL-95-2-Zellen wurde anhand des Auftretens von Ki-67 analysiert, das sich beispielsweise im menstruellen Zyklus hormonell beeinflusst zeigt, da es in der Proliferationsphase deutlich vorhanden ist und sein Level während der Sekretionsphase stark abfällt (Kokeguchi, 1992; Gompel, 1994; Shiozawa, 1996). Die Abhängigkeit der Ki-67-Konzentration von einer ER α -Aktivität wurde in Endometriumnormalgewebe durch eine direkte Korrelation deutlich (Salmi, 1999). Eine E2-abhängige Steigerung der Proliferationsaktivität zeigte sich auch in den RL-95-2-Zellen durch den vermehrten Nachweis von Ki-67. Unter Raloxifen-Einfluß dagegen zeigte sich diese Steigerung und damit eine proliferationsfördernde agonistische Wirkung nicht. Eine Inhibition der Proliferation durch RLX nicht beobachtet, was dafür spricht, daß eine möglicherweise E2-unabhängige basale Proliferationsrate durch RLX nicht inhibiert werden kann. Aussagen über Tamoxifen, daß dieses einen Block im Zellzyklus induziert (Sutherland, 1983) und den Ki-67Level reduziert (Clarke, 1993), läßt ein vorheriges E2-abhängiges Zellwachstum vermuten. Bei den immunhistochemischen Untersuchungen des zellulären Vorkommens von ER α , ER β , PR und SRC-1 zeigten sich alle vier Proteinlevel durch Östrogeneinfluß erhöht, während unter Raloxifen zwar die von ER β , PR und SRC-1 agonistisch leicht gesteigert wurden, nicht

aber der von ER α . Diese Ergebnisse gehen mit denen der Expressionskinetiken in der Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa einher. Die stimulativen Effekte von E2 und RLX wurden in beiden Zelllinien deutlich. Im Vergleich zu den Ishikawa-Zellen, die nur die PR-Variante A exprimierten, konnte in den RL-95-2-Zellen eine deutlichere Steigerung des PR-Proteinlevels (ohne Unterscheidung der Varianten) sowohl durch E2, als auch durch RLX, gezeigt werden. Nur in der Wirkung auf den ER α -Level hatte RLX im Gegensatz zu E2 keinen Effekt. Daß Raloxifen keinen agonistischen Effekt auf die Proliferationsrate der RL-95-2-Zellen hat, läßt sich möglicherweise auf eine fehlende Steigerung des ER α -Levels zurückführen.

Bei der Untersuchung des Differenzierungsgrades der RL-95-2-Zellen anhand des Nachweises von Laktoferrin zeigten Östradiol und Raloxifen einen stabilisierenden Effekt. Im Vergleich zu den nicht-behandelten Kontrollzellen wurde Laktoferrin in den behandelten Zellen deutlich stärker nachgewiesen. Der genaue Mechanismus dieses positiven östrogenen Effektes auf den Differenzierungsgrad der Zellen ist bisher ungeklärt.

In Hinsicht auf ein tumorinhibierendes Potential waren die Effekte von Raloxifen auf apoptotische Mechanismen von besonderem Interesse. Als Indikatoren für apoptotische Prozesse gelten die Mitglieder der bcl-2-Familie. Die Expression des Apoptoseinhibitors bcl-2 in Endometriumkarzinomen korrelierte positiv mit dem Grading, der Tumorklasse und dem PR-Status (Taskin, 1997), sowie einem niedrigen Apoptose-Index (Saegusa, 1996). Eine in der Brustkrebszelllinie MCF7 bereits gezeigte Regulation der bcl-2-Expression (Teixerira, 1995; Zhang, 1999) durch E2, konnte hier auch in der Endometriumkarzinom-zelllinie RL-95-2 nachgewiesen werden. Eine apoptoseinhibierende Wirkung von Östradiol (Razandi, 2000), drückt sich auch in dessen Einfluß auf die Proteinlevel von bcl-xL und bak aus. Während die Proteinmengen des Apoptoseinhibitors bcl-xL gesteigert wurde, wurde die des Apoptoseinduktors bak reduziert. Die Bedeutung dieser Proteinfamilie und ihrer Regulation durch Östradiol spielt auch im menstruellen Zyklus eine Rolle. Während der Proliferationsphase sind unter E2-Einfluß die Apoptoseinhibitoren bcl-2 und bcl-xL nachweisbar, nicht aber der Apoptosemarker bak. In der späteren Sekretionsphase, in der apoptotische Prozesse ablaufen (Verma, 1983; Tabizadeh, 1994; Kokawa, 1996; Spencer, 1996; Dahmoun, 1999), dagegen sind die bcl-2- und die bcl-xL-Level erniedrigt, wohingegen der von bak gesteigert ist (Gompel, 1994; Otsuki, 1994; Koh, 1995; Tao, 1998; Konno, 2000). Raloxifen hatte genau die gegenteiligen Effekte von Östradiol, denn es reduzierte die Proteinlevel von bcl-2 und bcl-xL und steigerte den von bak. Das so gezeigte proapoptotische Potential von Raloxifen ähnelt dem für Tamoxifen in ER-positiven Brusttumoren

beschriebenen (Dowsett, 1995; Ellis, 1997; Zhang, 1999; Swiatecka, 2000). Die apoptotische Wirkung von Raloxifen könnte dabei aufgrund seines antiöstrogenen Potentials mit einer Apoptoseinduktion durch E2-Entzug (Nawaz, 1987; Pollard, 1987; Rotello, 1992) zu vergleichen sein. Die Tatsache, daß diese Beobachtungen in Zellen aus einem postmenopausalen Tumor gemacht wurde, zeigt, daß dieses System auch hier noch intakt zu sein scheint und somit einen therapeutischen Ansatzpunkt für ER-positive Endometriumkarzinome darstellt. Der Nachweis von apoptotischen Prozessen in Form von Abbauprodukten von Cytokeratin 18 konnte aber weder unter E2-Behandlung, noch unter RLX-Behandlung gezeigt werden. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß Raloxifen zwar proapoptotische Mechanismen durch E2-Antagonismus induziert, eine direkte Apoptose aber nicht ausgelöst wird. Das Antiprogestin RU486 wird klinisch eingesetzt, um durch die antiprogestine Wirkung eine Pg-Entzugsblutung und einen Schwangerschaftsabbruch hervorzurufen. Auf der anderen Seite wurde für RU486 ein schwacher östrogen Agonismus in Form einer Steigerung der Proliferationsrate (Jeng, 1993) und der ER α - und PR-Expression (Maentausta, 1993; Hurd, 1999; Savoldi, 1995) aufgezeigt. Hierbei inhibierte RU486 die Herunterregulation der ER α -Expression durch Progesteron und führte zu einer Kontinuität der Proliferation und einer erhöhten bcl-2-Expression. In der Endometriumkarzinomzelllinie RL-95-2 wurde durch RU486 die Expression von bcl-xL gesteigert, was höchstwahrscheinlich auf eben dieses östrogene Potential zurückzuführen ist. Andererseits steigerte der RU486-Einfluß aber auch die Expression von bak, was wiederum auf ein apoptoseinduzierendes Potential hinwies.

Durch die morphologischen Untersuchungen mit Hilfe der Elektronen- und Rasterelektronenmikroskopie ließen sich unter E2-Einfluß gut proliferierende Zellen darstellen. Unter RLX-Einfluß wurden eine antiproliferative und proapoptotische Wirkung deutlich, wobei aber keine quantitative Aussage über das Auftreten apoptotischer Zellen gemacht werden konnte. Die Apoptose der Endometriumkarzinomzellen wurde durch das Vorkommen von *apoptotic bodies* (Hopwood, 1996), einer Schrumpfung der Zellen und einer Kondensation des Chromatins detektiert.

Zusammenfassend ergeben sich folgende Schlußfolgerungen für die Rolle der ER α -Transaktivierungsmaschinerie in der Tumorgenese und –progression im Endometrium, sowie für die Bedeutung in einer Therapie mit Raloxifen: Sowohl im menstruellen Zyklus, als auch in ER-positiven Endometriumkarzinomzellen scheint der ER α der Hauptvermittler östrogen Effekte, wie Proliferationsstimulation und die Stimulation der Expression östrogenregulierter

Gene, zu sein. Der ER β dagegen scheint eine viel komplexere Bedeutung zu haben. Die Expression des ER β wird durch Östrogen stimuliert. Im Zyklus ist der relative Level von ER α und ER β für die Sensitivität des Gewebes gegenüber Östradiol entscheidend (McDonnell, 1995). Die Steigerung der ER β -Expression könnte also hier zu einer Verminderung der östrogenen Effekte, besonders der östrogenabhängigen Proliferation führen. In den gegebenen Zyklusanalysen zeigte sich der ER β vermehrt in den Zelltypen und zu den Zeitpunkten, wenn eine östrogene Wirkung zu unterdrücken ist. Ein Mechanismus, der für diese Pufferfunktion denkbar ist, liegt in der Bildung von ER α -ER β -Heterodimeren. Normalerweise ist im Endometrium der ER α wesentlich höher exprimiert, als der ER β . Durch die östrogeninduzierte Steigerung des ER β -Levels würden mehr Heterodimere, die zwischen ER α und ER β bevorzugt gebildet werden (Pettersson, 1997), entstehen und die Quantität der ER α -Homodimere sinken. Eine geringere Transaktivierungsaktivität durch die Heterodimere führt zu einer Reduktion der östrogenen Wirkung. Die Homo- und Heterodimere unterscheiden sich dabei in ihrer Ligandenbindung, Koaktivatorenrekrutierung, Bindungsaffinität verschiedener DNA-Elemente und der Aktivitäten der AF-1 und AF-2 (Giguere, 1998). Über diesen Mechanismus würde der ER α seine eigene Aktivität regulieren und der ER β würde eine limitierende Pufferfunktion für die Wirkung von Östrogen ausüben. Außerdem haben ER β - und ER α -Homodimere unterschiedliche Wirkungen an verschiedenen DNA-Elementen, wobei über ER β -Dimere Antiöstrogene agonistische Effekte haben (Gustafsson, 2000). Die relative Menge von Homo- und Heterodimeren scheint also einen Effekt auf das östrogenabhängige Transaktivierungsmuster und das agonistische Potential von Antiöstrogenen zu haben. Die Wirkung von SERMs, die über den ER α einen agonistischen/antagonistischen Effekt am ERE haben, während sie über den ER β rein agonistisch wirken (Barkhem, 1998), wäre von dem Vorkommen von Homo- und Heterodimeren stark beeinflusst. In Tumoren scheint eine mögliche Pufferfunktion für die Aktivität des ER α eine bedeutende Rolle zu spielen. Wie in Endometriumkarzinomen gezeigt, ist der ER β auch in den Tumoren anderer östrogenabhängiger Gewebe, wie Brust und Ovar, nur schwach oder gar nicht exprimiert. Ein durch die Menopause bedingter Östrogenmangel führt im postmenopausalem Endometrium zu einer Reduktion des ER β -Levels, was möglicherweise eine Tumorgenese - induziert, z.B. durch ligandenunabhängige Aktivität des ER α - unterstützt.

Eine wichtige Rolle in der ER α -Transaktivierungsmaschinerie spielen die Steroidrezeptor-Koaktivatoren. Ihre Poolwirkung limitiert ihre Verfügbarkeit für die Rekrutierung in den ER-

Liganden-Komplex. Insgesamt zeigten sich die SRC-Level bei den Expressionskinetiken und im menstruellen Zyklus relativ konstant und scheinen im Gegensatz zu den Steroidrezeptoren verhältnismäßig inert gegen direkte hormonelle Einflüsse zu sein. Die Bedeutung der SRCs bei der ER α -Transaktivierung besteht darin, ob und welche von ihnen in den Transaktivierungskomplex gebunden werden. Dieses hängt von deren Verfügbarkeit ab, auf die E2 aber selber keinen Einfluß hat. Die Korrelation der Expression der SRCs mit der des ER α und des PR in den Endometriumkarzinomen deutet darauf hin, daß für die Entwicklung östrogenabhängiger Tumore, wie Endometriumkarzinome es größtenteils sind, alle Komponenten der ER α -Transaktivierungsmaschinerie vorhanden sein müssen und deren Vorkommen durch allgemeine östrogene Effekte bedingt ist. Die SRCs binden unterschiedlich an Komplexe des ER α mit Tamoxifen und Raloxifen. Ihre Rekrutierung ist eine entscheidende Determinante für eine antiöstrogene oder östrogene Wirkung der beiden SERMs. Für SRC-1 ist beschrieben, daß sein Level in Tamoxifen-resistenten Brusttumoren erniedrigt ist und ein höherer SRC-1-Level ein besseres Ansprechen auf eine Tamoxifen-Therapie indiziert (Berns, 1998). Der SRC-Level eines Tumors könnte also bedeutend für ein Therapiekonzept von östrogenabhängigen Tumoren sein. Diagnostisch wäre also neben dem ER α auch eine Bestimmung des ER β und der SRCs von Bedeutung.

Auch für den Einsatz von Raloxifen spielen die gezeigten Mechanismen eine Rolle. Die für die Tamoxifen-Therapie von Mammakarzinomen gezeigte Steigerung des Risikos eines Endometriumkarzinoms wurde für Raloxifen bei Einsatz als Antiosteoporosemittel nicht deutlich (Osborne, 1999). In den Endometriumkarzinomzelllinien zeigten Tamoxifen und Raloxifen östrogenen Agonismus auf die Expression E2-regulierter Gene, der im direkten Vergleich für Raloxifen deutlich schwächer ausfiel. In Abwesenheit von E2 haben also beide SERMs agonistisches Potential. In Gegenwart von Östrogen aber wirkt Raloxifen, wie Tamoxifen, klar antagonistisch. Bei Betrachtung der zellulären Wirkungen von Raloxifen in den Endometriumkarzinomzelllinien scheint das antagonistische Potential in Form der proapoptischen und antiproliferativen Wirkung dem agonistischen übergeordnet zu sein. Die Tatsache, daß Raloxifen in verschiedenen östrogenbeeinflussten Geweben agonistische oder antagonistische Wirkung hat, wirft die Frage auf, welcher Mechanismus diese Gewebespezifität bedingt. Eine genaue Klärung würde eine Weiterentwicklung der SERMs deutlich vorantreiben. Für das Endometrium wurde hier für Raloxifen eine antiproliferative und proapoptische Wirkung gezeigt und, daß sein agonistische Potential geringer ist als das von Tamoxifen. Das Risiko eines Endometriumkarzinoms unter Raloxifen-Einwirkung scheint nach diesen Ergebnissen und den bisherigen Erkenntnissen unwahrscheinlich. Die

Ergebnisse dieser Arbeit unterstützen zusammengekommen den Einsatz von Raloxifen in der Therapie von östrogenabhängigen Tumoren und postmenopausalen Beschwerden.

5. Literaturverzeichnis

Alland, L., Muhle, R., Hou Jr., H., Potes, J., Chin, L., Schreiber, N., DePinho, R.A.: Role for N-CoR and histone deacetylase in mSin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, 387, 49-55 (1997).

An, H.-X., Niederacher, D., Beckmann, M.W., Göhring, U.-J., Scharl, A., Picard, F., van Roeyen, C., Schnürch, H.-G., Bender, H.G.: *ERBB2* gene amplification detected by fluorescent differential polymerase chain reaction in paraffin-embedded breast carcinoma tissues. *International Journal of Cancer (Pred. Oncol.)*, 64, 291-297 (1995).

An, H.-X., Niederacher, D., Dominik, S.I., Kuschel, B., Yan, H., Dall, P., Schnürch, H.-G., Bender, H.G., Beckmann, M.W.: int-2 and c-erbB2 gene amplification detected in 70 frozen human breast carcinomas by quantitative polymerase chain reaction. *Anticancer Research*, 17, 3133-3136 (1997).

An, H.-X., Beckmann, M.W., Reifenberger, G., Bender, H.G., Niederacher, D.: Gene amplification and overexpression of CDK4 in sporadic breast carcinomas is associated with high tumor cell proliferation. *American Journal of Pathology*, 154, 113-118 (1999).

Anderson, J.N., Peck, E.J., Clark, J.H.: Nuclear receptor estradiol complex: a requirement for uterotrophic response. *Endocrinology*, 95, 174-178 (1974).

Anzai, Y., Holinka, C.F., Kuramoto, H., Gurpide, E.: Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *Cancer Research*, 49, 2362-2365 (1989).

Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., Meltzer, P.S.: AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science*, 277, 965-968 (1997).

Arends, M.J., Wyllie, A.H.: Apoptosis: Mechanism and role in pathology. *International Reviews of Experimental Pathology*, 32, 223-254 (1991).

Aronica, S.M., Katzenellenbogen, B.S.: Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I. *Molecular Endocrinology*, 7, 743-752 (1993).

Arts, J., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-A., Löwik, C.W.G.M., Pols, H.A.P., van Leeuwen, J.P.T.M.: Differential expression of estrogen receptor α and β mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology*, 138, 5067-5070 (1997).

Assikis, V.J., Bilimoria, M.M., Muenzner, H.D., Lurain, J.R., Jordan, V.C.: Mutations of the estrogen receptor in endometrial carcinoma: Evidence of an association with high tumor grade. *Gynecological Oncology*, 63, 192-199 (1996).

Athanassiadou, P., Petrakakou, E., Lioffi, A., Nakopoulou, L., Zerva, C., Dimopoulos, A., Athanassiades, P.: Prognostic significance of p53, bcl-2 and EGFR in carcinoma of the endometrium. *Acta Cytologica*, 43, 1039-1044 (1999).

- Bagdade, J.D., Wolter, J., Subbaiah, P.V., Ryan, W.: Effects of tamoxifen on plasma lipids and lipoprotein lipid composition. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 70, 1132-1135 (1990).
- Balleine, R.L., Hunt, S.M., Clarke, C.L.: Coexpression of alternatively spliced estrogen and progesterone receptor transcripts in human breast cancer. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84, 1370-1377 (1999).
- Bannister, A.J., Kouzarides, T.: The CBP co-activator is a histone acetyltransferase. *Nature*, 384, 641-643 (1996).
- Bardon, S., Vignon, F., Derocq, D., Rochefort, H.: The antiproliferative effect of tamoxifen in breast cancer cells: mediation by the estrogen receptor. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 35, 89-96 (1984).
- Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J.-A., Nilsson, S.: Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology*, 54, 105-112 (1998).
- Barsalou, A., Gao, W., Anghel, S.I., Carriere, J., Mader, S.: Estrogen response elements can mediate agonist activity of antiestrogens in human endometrial Ishikawa cells. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 17138-17146 (1998).
- Bautista, S., Valles, H., Walker, R.L., Anzick, S., Zeilinger, R., Meltzer, P., Theillet, C.: In breast cancer, amplification of the steroid receptor coactivator gene AIB1 is correlated with estrogen and progesterone receptor positivity. *Clinical Cancer Research*, 4, 2925-2929 (1998).
- Beato, M.: Gene regulation by steroid hormones. *Cell*, 56, 335-344 (1989).
- Beato, M.: Transcriptional control by nuclear receptors. *FASEB Journal*, 5, 2044-2051 (1991).
- Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G.: Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell*, 83, 851-857 (1995).
- Beckmann, M.W., Niederacher, D., Schnürch, H.-G., Gusterson, B.A., Bender, H.G.: Multistep carcinogenesis of breast cancer and tumour heterogeneity. *Journal of Molecular Medicine*, 75, 429-439 (1997).
- Beckmann, M.W., Bender, H.G.: Internationale Konsensuskonferenz zur primären Behandlung des Mammakarzinoms: Vorläufiges Update 1998, St. Gallen, Schweiz. *Frauenarzt*, 39, 907-910 (1998).
- Beckmann, M.W., Untch, M., Rabe, T., Schulz, K.-D., Bender, H.G.: (Chemo-)Prävention des Mammakarzinoms. *Der Gynäkologe*, 2, 150-157 (1999).
- Beckmann, M.W., Hanstein, B., Niederacher, D., Jap, D., Kuschel, B., Bender, H.G.: Mechanisms of ovarian steroid hormones and antioestrogens in the development of carcinomas of the breast and endometrium. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 60, 71-76 (2000a).

- Beckmann, M.W., Jap, D., Kuschel, B., Dall, P., Lux, M.P., Hanstein, B., Bender, H.G.: Ovarian steroid hormones and anti-estrogens: Risks for and prevention of cancers of the breast and endometrium in the menopause. *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 60, 77-85 (2000b).
- Beresford, S.A., Weiss, N.S., Voigt, L.F., McKnight, B.: Risk of endometrial cancer in relation to use of estrogen combined with cyclic progestin therapy in postmenopausal women. *Lancet*, 349, 458-461 (1997).
- Berns, E.M.J.J., van Staveren, I.L., Klijn, J.G.M., Foekens, J.A.: Predictive value of SRC-1 for tamoxifen response of recurrent breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 48, 87-92 (1998).
- Berry, M., Metzger, D., Chambon, P.: Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO Journal*, 9, 2811-2818 (1990).
- Berthois, Y., Dong, X.-F., Roux-Dossetto, M., Martin, P.-M.: Expression of estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid in the MCF-7 cell line: multiparametric analysis of its processing and regulation by estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 74, 11-20 (1990).
- Black, L.J., Sato, M., Rowley, E.R., Magee, D.E., Bekele, A., Williams, D.C., Cullinan, G.J., Bendele, R., Kauffman, R.F., Bensch, W.R.: Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *Journal of Clinical Investigation*, 93, 63-69 (1994).
- Boise, L.H., Gonzalez-Garcia, M., Postema, C.E., Ding, L., Lindsten, T., Turka, L.A., Mao, X., Nunez, G., Thompson, C.: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic death. *Cell*, 74, 597-608 (1993).
- Bollig, A., Miksicek, R.J.: An estrogen receptor-alpha splicing variant mediates both positive and negative effects on gene transcription. *Molecular Endocrinology*, 14, 634-649 (2000).
- Bourget, W., Ruff, M., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D., Crystal structure of the ligand-binding domain of the human nuclear receptor RXR-alpha (see comments). *Nature*, 375, 377-382 (1995).
- Brandenberger, A.W., Tee, M.K., Jaffe, R.B.: Estrogen receptor alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNAs in normal ovary, ovarian serous cystadenocarcinoma and ovarian cancer cell lines: down-regulation of ER-beta in neoplastic tissues. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 1025-1028 (1998).
- Brandenberger, A.W., Lebovic, D.I., Tee, M.K., Ryan, I.P., Tseng, J.F., Jaffe, R.B., Taylor, R.N.: Oestrogen receptor (ER)-alpha and ER-beta isoforms in normal endometrial and endometriosis-derived stromal cells. *Molecular Human Reproduction*, 5, 651-655 (1999).
- Breckwoldt, M.: Geschlechtsspezifische Funktionen und ihre Störungen. In : Martius, G., Breckwoldt, M., Pfleiderer, A.: *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe* (1994).

Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G.L., Gustafsson, J.-A., Carlquist, M.: Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature*, 389, 753-758 (1997).

Carson, D.A., Ribeiro, J.M.: Apoptosis and disease. *Lancet*, 341, 1251-1254 (1993)

Castano, E., Chen, C.W., Vorojeikina, D.P., Notides, A.C.: The role of phosphorylation in human estrogen receptor function. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65, 101-110 (1998).

Castro-Rivera, E. Safe, S.: Estrogen- and antiestrogen-responsivness of HEC1A endometrial adenocarcinoma cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 64, 287-295 (1998).

Chaidrun, S. S., Alexander. J.M.: A tumor-specific truncated estrogen receptor splice variant enhances estrogen-stimulated gene expression. *Molecular Endocrinology*, 12, 1355-1366 (1998).

Chakravarti, D., LaMorte, V.J., Nelson, M.C., Nakajima, T., Schulman, I.G., Juguilon, H., Montminy, M., Evans, R.M.: Role of CBP/p300 in nuclear receptor signalling. *Nature*, 383, 99-103 (1996).

Chen, D., Pace, P.E., Coombes, R.C., Ali, S.: Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 1002-1015 (1999).

Chen, H.; Lin, R.J.; Schiltz, R.L.; Chakravarti, D.; Nash, A.; Nagy, L.; Privalsky, M.L.; Nakatani, Y. and Evans, R.M.: Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with p/CAF and CBP/p300. *Cell*, 90, 569-580 (1997).

Chen, J.D., Evans, R.M.: A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors (see comments). *Nature*, 377, 454-457 (1995).

Chen, J.D., Li, H.: Coactivation and Corepression in transcriptional regulation by steroid/nuclear hormone receptors. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*, 8, 169-190 (1998).

Chen, Y., Farmer, A.A., Chen, C.F., Jones, D.C. Chen, P.L. Lee, W.H.: BRCA1 is a 220-kDA nuclear phosphoprotein that is expressed and phosphorylated in a cell cycle-dependent manner. *Cancer Research*, 56, 3168-3172 (1996).

Chittenden T., Flemmington, C., Houghton, A.B., Ebb, R.G., Gallo, G.J., Elangovan, B., Chinnadurai, G., Lutz, R.J.: A conserved domain in Bak, distinct from BH1 and BH2, mediates cell death and protein binding functions. *EMBO Journal*, 15, 5589-5596 (1995)

Clarke, C., Sutherland, R.: Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocrine Reviews*, 11, 266-272 (1990).

- Clarke, R.B., Laidlaw, I.J., Jones, L.J., Howell, A., Anderson, E.: Effect of tamoxifen on Ki67 labelling index in human breast tumours and its relationship to oestrogen and progesterone receptor status. *British Journal of Cancer*, 67, 606-611 (1993).
- Clarke, R., Skaar, T., Baumann, K., Leonessa, F., James, M., Lippman, J., Thompson, E.W., Freter, C., Brunner, N.: Hormonal carcinogenesis in breast cancer: cellular and molecular studies of malignant progression. *Breast Cancer Research and Treatment*, 31, 237-248 (1994).
- Colditz, G.A., Hankinson, S.E., Hunter, D.J., Willett, W.C., Manson, J.E., Stampfer, M.J., Hennekens, C., Rosner, B., Speizer, F.E.: The use of estrogens and progestins and the risk of breast cancer in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*, 332, 1589-1593 (1995).
- Coradini, D., Biffi, A., Cappelletti, V., Di Fronzo, G.: Activity of tamoxifen and new antiestrogens on estrogen receptor positive and negative breast cancer cells. *Anticancer Research*, 14, 1059-1064 (1994).
- Cornillie, F.J., Lauweryns, J.M., Broensens, I.A.: Normal human endometrium: An ultrastructural survey. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 20, 113-129 (1985).
- Couse, J.F., Lindsey, J., Grandien, K., Gustafsson, J.-A., Karach, K.S.: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- α (ER α) and estrogen receptor- β (ER β) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ER- α knockout mouse. *Endocrinology*, 138, 4613-4621 (1997).
- Couse, J.F., Korach, K.S.: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews*, 20, 358-417 (1999).
- Cowley, S.M., Hoare, S., Mosselman, S., Parker, M.G.: Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 19858-19862 (1997).
- Cowley, S.M., Parker, M.G.: A comparison of transcriptional activation by ER alpha and ER beta. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 69, 165-175 (1999).
- Critchley, H.O.D., Tong, S., Cameron, S.T., Drudy, T.A., Kelly, R.W., Baird, D.T.: Regulation of bcl-2 gene family members in human endometrium by antiprogesterin administration *in vivo*. *Journal of Reproduction and Fertility*, 115, 389-395 (1999).
- Cuenca, R.E., Giachino, J., Arredondo, M.A., Hempling, R., Edge, S.B.: Endometrial carcinoma associated with breast carcinoma: low incidence with tamoxifen use. *Cancer*, 77, 2058-2063 (1996).
- Cullen, R., Maguire, T., Diggin, P., Hill, A., McDermott, E., O'Higgins, N., Duffy, M.J.: Detection of estrogen receptor-beta mRNA in breast cancer using RT-PCR. *International Journal of Biological Markers*, 15, 114-115 (2000).
- Cummings, S.R., Eckert, S., Krueger, K.A., Grady, D., Powles, T.J., Cauley, J., Norton, L., Nickelsen, T., Bjarnason, N.H., Morrow, M., Lippman, M.E., Black, D., Glusman, J.E., Costa, A., Jordan, V.C.: The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: Results from the MORE randomized trial. *Journal of the American Medical Association*, 281, 2189-2197 (1999).

Cummings, S.R., Palermo, L., Browner, W., Marcus, R., Wallace, R., Pearson, J., Blackwell, T., Eckert, S., Black, D.: Monitoring osteoporosis therapy with bone densitometry: misleading changes and regression to the mean. Fracture Intervention Trial Research Group. *Journal of the American Medical Association*, 283, 1318-1321 (2000).

Daffada, A.A.I., Dowsell, M.: Tissue-dependent expression of a novel splice variant of the human oestrogen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 55, 413-421 (1995).

Dallenbach-Hellweg, G., Hahn, U., Schmidt, D.: Morphological changes observed in the endometrium during adjuvant therapy with tamoxifen. *Zentralblatt der Gynäkologie*, 118, 365-369 (1996).

Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., Parker, M.G.: Identification of a conserved region required for hormone dependant transcriptional activation by steroid hormone receptors. *EMBO Journal*, 11, 1025-1033 (1992).

Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., Yamamoto, K.R.: Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes and Development*, 12, 3343-3356 (1998).

Davis, M.D., VanderKuur, J.A., Brooks, S.C.: Ligand structure influences autologous downregulation of estrogen receptor-alpha messenger RNA. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 70, 27-37 (1999).

Delmas, P.D., Bjarnason, N.H., Mitlak, B.H., Ravoux, A.-C., Shah, A.S., Huster, W.J., Draper, M., Christiansen, C.: The effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *New England Journal of Medicine*, 337, 1641-1647 (1997).

Desai, A., Luqmani, Y., Coope, R., Dagg, B., Gomm, J., Pace, P., Rees, C., Thirunavukkarasu, V., Shousa, S., Groome, N., Coombes, R., Ali, S.: Presence of exon 5 deleted oestrogen receptor in human breast cancer: Functional analysis and clinical significance. *British Journal of Cancer*, 75, 1173-1184 (1997).

Dickson, R.B., Lippman, M.E.: Control of human breast cancer by estrogen, growth factors, and oncogenes. *Cancer Treatment Research*, 40, 119-165 (1988).

Ding, X.F., Anderson, C.M., Ma, H., Hong, H., Uht, R.M., Kushner, P.J., Stallcup, M.R.: Nuclear receptor-binding sites of coactivators glucocorticoid receptor interacting protein (GRIP1) and steroid receptor coactivator 1 (SRC-1): multiple motifs with different binding specificities. *Molecular Endocrinology*, 12, 303-312 (1998).

Dotzlaw, H., Leygue, E., Watson, P.H., Murphy, L.C.: Expression of estrogen receptor β in human breast tumors. *J. Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 2371-2374 (1996).

Dotzlaw, H., Leygue, E., Murphy, L., Watson, P.H.: Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: relationship to steroid receptor status and regulation by progestins. *Cancer Research*, 59, 529-532 (1999).

Dowsett, M., Johnston, S.R.D., Newby, J., Golding, M., Sacks, N., Smith, L.E.: Mechanisms of hormone response: a role for apoptosis. *Endocrine Related Cancer*, 2, 1-7 (1995).

Draper, M.W., Flowers, D.E., Huster, W.J., Neild, J.A., Hooper, K.D., Arnud, C.: A controlled trial of raloxifene (LY139481) HCl: impact on bone turnover and serum lipid profile in healthy postmenopausal women. *Journal of Bone and Mineral Research*, 11, 835-842 (1996).

Early Breast Cancer Trialists' Collaboration Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. *Lancet*, 339, 1-15, 71-85 (1992).

Edwards, D.P., Adams, D.J., McGuire, W.L.: Estrogen regulation of growth and specific protein synthesis in human breast cancer cells in tissue culture. *Hormones and Cancer*, 138, 133-149 (1982).

Ellis, P.A., Saccani-Jotti, G., Clarke, R., Johnston, S.R.D., Anderson, E., Howell, A., A'Hern, R., Salter, J., Detre, S., Nicholson, R., Robertson, J., Smith, I.E., Dowsett, M.: Induction of apoptosis by tamoxifen and ICI 182780 in primary breast cancer. *International Journal of Cancer*, 72, 608-613 (1997).

Endl, E., Gerdes, J.: The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. *Experimental Cell Research*, 257, 231-237 (2000).

Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M., Gustaffson, J.-A.: Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization and expression pattern. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 82, 4258-4265 (1997).

Fan, S., Wang, J.A., Vuan, R.Q., Ma, Y.X., Meng, Q., Erdos, M.R., Brody, L.C., Goldberg, I.D., Rosen, E.M.: BRCA1 as a potential human prostate tumor suppressor: modulation of proliferation, damage responses and expression of cell regulatory proteins. *Oncogene*, 16, 3069-3682 (1998).

Fan, S., Wang, J.-A., Yuan, R., Ma, Y., Meng, Q., Erdos, M.R., Pestell, R.G., Fang Yuan, K., Auburn, K.J., Goldberg, I.D., Rosen, E.M.: BRCA1 inhibition of estrogen receptor signaling in transfected cells. *Science*, 284, 1354-1356 (1999).

Farrow, S.N., White, J.H.M., Martinou, I., Raven, T., Pun, K.-T., Grinham, C.J., Martinou, J.-C., Brown, R.: Cloning of a bcl-2 homologue by interaction with adenovirus E1B 19K. *Nature (London)*, 374, 731-733 (1995).

Fawell, S.E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M., Parker, M.G.: Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the „pure“ antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Biochemistry*, 87, 6883-6887 (1990).

Felix, J.C., Farahmand, S.: Endometrial glandular proliferation and estrogen receptor content during the normal menstrual cycle. *Contraception*, 55, 19-22 (1997).

Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., West, B.L.: Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophilic cleft on nuclear receptors. *Science*, 280, 1747-1749 (1998).

- Ferenzy, A., Guralnic, M.: Endometrial microstructure: structure-function relationship throughout the menstrual cycle. *Seminars in Reproductive Endocrinology*, 1, 205-219 (1983).
- Flickinger, G.L., Elsner, C., Illington, D.V., Muechler, E.K., Mikhail, G.: Estrogen and progesterone receptors in the female genital tract of human and monkeys. *Annals of the NY Academy of Science*, 286, 180-189 (1977).
- Foley, E.F., Jazaeri, A.A., Shupnik, M.A., Jazaeri, O., Rice, L.W.: Selective loss of estrogen receptor beta in malignant human colon. *Cancer Research*, 60, 245-248 (2000).
- Ford, D., Easton, D.F., Bishop, D.T., Narod, S.A., Goldgar, D.E.: Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast cancer linkage consortium. *Lancet*, 343, 692-695 (1994).
- Freake, H.C., Marcocci, C., Iwasaki, J., MacIntyre, I.: 1,25-dihydroxyvitamin D₃ specifically binds to a human breast cancer cell line (T47D) and stimulates growth. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 101, 1131-1138 (1981).
- Fritsch, M., Wolf, D.M.: Symptomatic side effects of tamoxifen therapy. In: Jordan, V.C. (ed): Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, Wisc.: The University of Wisconsin Press, 235-255 (1994).
- Fujimoto, J., Ichigo, S., Hirose, R., Sakaguchi, H., Tamaya, T.: Expression of estrogen receptor wild type and exon 5 splicing variant mRNAs in normal and endometriotic endometria during the menstrual cycle. *Gynecological Endocrinology*, 11, 11-16 (1997a).
- Fujimoto, J., Ichigo, S., Hirose, R., Hori, M., Tamaya, T.: Expression of estrogen receptor Exon 5 splicing variant (ER E5SV) mRNA in gynaecological cancers. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 60, 25-30 (1997b).
- Fujimoto, J., Hirose, H., Sakaguchi, H., Tamaya, T.: Estrogen dependency in uterine endometrial cancer. *Oncology*, 55(Suppl.1), 53-59 (1998).
- Fuqua, S.A.W., Fitzgerald, S.D., Chamness, G.C., Tandon, A.K., McDonell, D.P., Nawaz, Z., O'Malley, B.W., McGuire, W.L.: Variant human breast tumor estrogen receptor with constitutive transcriptional activity. *Cancer Research*, 51, 105-109 (1991).
- Fuqua, S.A.W., Allred, D.C., Auchus, R.J.: Expression of estrogen receptor variants. *Journal of Cellular Biochemistry*, 17G, 194-197 (1993).
- Garcia, E., Bouchard, P., DeBrux, J., Berdah, J., Frydman, R., Schaison, G., Milgrom, E., Perrot-Appianat, M.: Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 67, 80-87 (1988).
- Gee, A.C., Carlson, K.E., Martini, P.G., Katzenellenbogen, B.S., Katzenellenbogen, J.A.: Coactivator peptides have a differential stabilizing effect on the binding of estrogens and antiestrogens with the estrogen receptor. *Molecular Endocrinology*, 13, 1912-1923 (1999).
- Gerdes, J., Schwab, U., Lemke, H., Stein, H.: Production of the mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International Journal of Cancer*, 31, 13-20 (1983).

Ghadimi, B.M., Schrock, E., Walker, R.L., Wangsa, D., Jauho, A., Meltzer, P.S., Ried, T.: Specific chromosomal aberrations and amplification of the *AIB1* nuclear receptor coactivator gene in pancreatic carcinomas. *American Journal of Pathology*, 154, 525-536 (1999).

Giangrande, P.H., Pollio, G., McDonnell, P.: Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 32889-32900 (1997).

Gierthy, J.F., Spink, B.C., Figge, H.L., Pentecost, B.T., Spink, D.C.: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate 20 and 17 beta-estradiol on estrogen receptor regulation in MCF-7 human breast cancer cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 60, 173-184 (1996).

Giguere, V., Tremblay, A., Tremblay, G.B.: Estrogen receptor β : Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling. *Steroids*, 63, 335-339 (1998).

Göhring, U.-J., Aslan-Schadwinkel, Y., Scharl, A.: Die Expression des p185^{neu}-Onkoproteins markiert eine ungünstige Prognose bei kleinen, nodal-negativen, nicht adjuvant systemisch behandelten Mammakarzinomen (T₁N₀). *Geburtshilfe und Frauenheilkunde*, 53, 625-629 (1993).

Goldstein, S.R.: Update on raloxifene to prevent endometrial-breast cancer. *European Journal of Cancer*, 36(Suppl.4), 54-56 (2000).

Gompel, A., Sabourin, J.C., Martin, A., Yaneva, H., Audounin, J., Decroix, Y., Poitout, P.: Bcl-2 expression in normal endometrium during the menstrual cycle. *American Journal of Pathology*, 144, 1195-1202 (1994).

Gottardis, M.M., Robinson, S.P., Satyaswaroop, P.G., Jordan, V.C.: Contrasting actions of tamoxifen on endometrial and breast tumor growth in the athymic mouse. *Cancer Research*, 48, 812-815 (1988).

Gotteland, M., Desauty, G., Delarue, J.C., Liu, L., May, E.: Human estrogen receptor messenger RNA variants in both normal and tumor breast tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 112, 1-13 (1995).

Gowen, L.C., Avrutskaya, A.V., Latour, A.M., Koller, B.H., Leadson, S.A.: BRCA1 required for transcription-coupled repair of oxidative DNA damage. *Science*, 281, 1009-1012 (1998).

Graham, J.D., Clarke, C.L.: Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocrine Reviews*, 18, 502-519 (1997).

Green, S., Walter, P., Kumar, V., Bornert, J. M., Argos, P., Chambon, P.: Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature (London)*, 320, 134-139 (1986).

Greene, G.L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y., Shine, J.: Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231, 1150-1154 (1986).

- Grese, T.A., Sluka, J.P., Bryant, H.U., Cullinan, G.J., Glasebrook, A.L., Jones, C.D., Matsumoto, K., Palkowitz, A.D., Sato, M., Termine, J.D., Winter, M.A., Yang, N.N., Dodge, J.A.: Molecular determinants of tissue selectivity in estrogen receptor modulators. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94, 14105-14110 (1997).
- Gronemeyer, H., Meyer, M.E., Bocquel, M.T., Kastner, P., Turcotte, B., Chambon, P.: Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annual Review of Genetics*, 25, 89-123 (1991).
- Gronemeyer, H., Benhamou, B., Berry, M., Bocquel, M.T., Gofflo, D., Garcia, T., Lerouge, T., Metzger, D., Meyer, M.E., Tora, L., Vergezac, A., Chambon, P.: Mechanisms of antihormone action. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 41, 217-221 (1992).
- Gu, W., Roeder, R.G.: Activation of p53 sequence-specific DNA-binding by acetylation of the p53 C-terminal domain. *Cell*, 90, 595-606 (1997).
- Guichon-Mantel, A., Delabre, K., Lescop, P., Milgrom, E.: Intracellular traffic of steroid hormone receptors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 56, 3-9 (1996).
- Gustafsson, J.-A.: Raloxifene: Magic bullet for heart and bone? *Nature Medicine*, 4, 152-153 (1998).
- Gustafsson, J.-A.: Estrogen receptor β - a new dimension in estrogen mechanism of action. *Journal of Endocrinology*, 163, 379-383 (1999).
- Hakem, R., de la Pompa, J.L., Sirard, C., Mo, R., Woo, M., Hakem, A., Wakeham, A., Potter, J., Reitmaier, A., Billia, F., Firpo, E., Hui, C.C., Roberts, J., Rossant, J., Mak, T.W.: The tumor suppressor gene BRCA1 is required for embryonic cellular proliferation in the mouse. *Cell*, 85, 1009-1023 (1996).
- Hall, J.M., McDonnell, D.P.: The estrogen receptor β -isoform (ER β) of the human estrogen receptor modulates ER α transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology*, 140, 5566-5578 (1999).
- Hamilton, T.C., Young, R.C., McKoy, W.M., Grotzinger, K.R., Green, J.A., Chu, E.W., Whang-Peng, J., Rogan, A.M., Green, W.R., Ozols, R.F.: Characterization of a ovarian carcinoma cell line (NIH: OVCAR-3) with androgen and estrogen receptors. *Cancer Research*, 43, 5379-5389 (1983).
- Hammond, G.B.: Menopause and hormone replacement therapy: An overview. *Obstetrics and Gynecology*, 87, 2-15 (1995).
- Hanstein, B., Liu, H., Yancisin, M.C., Brown, M.: Functional analysis of a novel estrogen receptor- β isoform. *Molecular Endocrinology*, 13, 129-137 (1999).
- Hayashi, Y., Ohmori, S., Ito, T., Seo, H.: A splicing variant of steroid receptor coactivator-1 (SRC-1E): The major isoform to mediate thyroid hormone action. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 83-87 (1997).

Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., Parker, M.G.: A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors. *Nature*, 387, 733-736 (1997).

Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.: A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression (see comments). *Nature*, 387, 43-48 (1997).

Henttu, P.M.A., Kalkhoven, E., Parker, M.G.: AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Molecular and Cellular Biology*, 17, 1832-1839 (1997).

Hockenbery, D., Nunez, G., Milliman, C., Schreiber, R.D., Korsmeyer, S.: Bcl-2 is an inner mitochondrial membran protein that blocks programmed cell death. *Nature (London)*, 348, 334-336 (1990).

Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H., Gurbide, E.: Responses to estradiol in a human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *Journal of Steroid Biochemistry*, 24, 85-89 (1986).

Holt, J.T., Thompson, M.E., Szabo, C., Robinson-Benion, C., Arteaga, C.L., King, M.C., Jensen, R.A.: Growth retardation and tumour inhibition by BRCA1. *Nature Genetics*, 12, 298-302 (1996).

Hong, H.; Kohli, K.; Trivedi, A.; Johnson, D.L. and Stallcup, M.R.: GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivators in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93, 4948-4952 (1996).

Hopwood, D., Levinson, D.: Atrophy and apoptosis in the cyclical human endometrium. *Journal of Pathology*, 119, 159-166 (1975).

Horlein, A.J., Naar, A.M., Heinzel, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.: Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor (see comments). *Nature*, 377, 397-404 (1995).

Horwitz, K.B., Yoseki, Y., McGuire, W.L.: Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen. *Endocrinology*, 103, 1742-1751 (1978).

Hu, C., Hyder, S.M., Needleman, D.S., Baher, V.V.: Expression of estrogen receptor variants in normal and neoplastic human uterus. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 118, 173-179 (1996).

Hurd, C., Nag, K., Khattree, N., Alban, P., Dinda, S., Moudgil, V.K.: Agonist and antagonist-induced qualitative and quantitative alterations of progesterone receptor from breast cancer cells. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 1999, 49-56 (1999).

- Hyder, S.M., Stancel, G.M., Nawaz, Z., McDonnell, D.P., Loose-Mitchell, D.S.: Identification of an estrogen response element in the 3'-flanking region of the murine c-fos protooncogene. *Journal of Biological Chemistry*, 267, 18047-18054 (1992).
- Hyder, S.M., Hu, C., Needleman, D., Sonoda, Y., Wang, X.-Y., Baker, V.V.: Improved accuracy in direct automated sequencing of small PCR products by optimizing the template concentration. *BioTechniques*, 17, 478-482 (1994).
- Ignar-Trowbridge, D.M., Teng, C.T., Ross, K.A., Parker, M.G., Korach, K.S., McLachlan, J.A.: Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation at an estrogen-responsive element. *Molecular Endocrinology*, 7, 992-998 (1993).
- Ikeda, M., Kawaguchi, A., Takeshita, A., Chin, W.W., Endo, T., Onaya, T.: CBP-dependent and independent enhancing activity of steroid receptor coactivator-1 in thyroid hormone receptor mediated transactivation. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 147, 103-112 (1999).
- Imhof, A.; Yang, X.-J.; Ogryzko, V.V.; Nakatani, Y.; Wolffe, A.P. and Ge, H.: Acetylation of general transcription factors by histone acetyltransferases. *Current Biology*, 7, 689-692 (1997).
- Iwai, M., Kanzaki, H., Fujimoto, M., Kojima, K., Hatayama, H., Inoue, T., Higuchi, T., Nakayama, H., Mori, T., Fujita, J.: Regulation of sex steroid receptor gene expression by progesterone and testosterone in cultured human endometrial stromal cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80, 450-454 (1995).
- Jackson, T.A., Richter, J.K., Bain, D.L., Takimoto, G.S., Tung, L., Horwitz, K.B.: The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressor N-CoR or SMRT. *Molecular Endocrinology*, 11, 693-705 (1997).
- Jamil, A., Croxtall, J.D., White, J.O.: The effect of anti-oestrogens on cell growth and progesterone receptor concentration in human endometrial cancer cells (Ishikawa). *Journal of Molecular Endocrinology*, 6, 215-221 (1991).
- Jarvinen, T.A., Peltö-Huikko, M., Holli, K., Isola, J.: Estrogen receptor beta coexpressed ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation rate in breast cancer. *American Journal of Pathology*, 156, 29-35 (2000).
- Jazaeri, O., Shupnik, M.A., Jazaeri, A.A., Rice, L.W.: Expression of estrogen receptor alpha mRNA and protein variants in human endometrial carcinoma. *Gynecological Oncology*, 74, 38-47 (1999).
- Jeng, M.H., Langan-Fahey, S.M., Jordan, V.C.: Estrogenic actions of RU486 in hormone-responsive MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology*, 132, 2622-2630 (1993).
- Jordan, V.C.: Long-term adjuvant tamoxifen therapy for breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 15, 125-136 (1990).

Jordan, V.C.: The development of tamoxifen for breast cancer therapy. In: Jordan, V.C. (ed): Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, Wisc.: The University of Wisconsin Press, 3-26 (1994).

Kalkhoven, E., Valentine, J.E., Heery, D.M., Parker, M.G.: Isoforms of steroid receptor co-activator 1 differ in their ability to potentiate transcription by the oestrogen receptor. *EMBO Journal*, 17, 232-243 (1998).

Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heymann, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.: A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell*, 85, 403-414, (1996).

Kastner, P., Krust, A., Turcotte, B., Stropp, U., Tora, L., Gronemeyer, H., Chambon, P.: Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO Journal*, 9, 1603-1614 (1990).

Katzenellenbogen, B.S.: Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annual Review of Physiology*, 42, 17-35 (1980).

Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., Le Goff, P., Schodin, D.J., Kraus, W.L., Bhardwaj, B., Fujimoto, N.: Antiestrogens: mechanisms and actions in target cells. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 53, 387-393 (1995).

Katzenellenbogen, J.A., O'Malley, B.W., Katzenellenbogen, B.S.: Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector sites as a basis for cell and promotor-specific action of these hormones. *Molecular Endocrinology*, 10, 119-131 (1996).

Katzenellenbogen, B.S., Korach, K.S.: A new actor in the estrogen receptor drama – enter ER-beta. *Endocrinology*, 138, 861-862 (1997a).

Katzenellenbogen, B.S., Montano, M.M., Ekena, K., Herman, M.E., McInerney, E.M.: William L. McGuire Memorial Lecture: Antiestrogens: Mechanisms of action and resistance in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, 44, 23-38 (1997b).

Kauffman, R.F., Bensch, W.R., Roudebush, R.E.: Hypocholesterolemic activity of raloxifene (LY139481): Pharmacological characterization as a selective estrogen receptor modulator. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 280, 146-153 (1997).

Kedar, R.P., Bourne, T.H., Powles, T.J., Collins, W.P., Ashley, S.E., Cosgrove, D.O., Campbell, S.: Effects of tamoxifen on uterus and ovaries of postmenopausal women in a randomised breast cancer prevention trial. *Lancet*, 343, 1318-1321 (1994).

Kerr, J.F.R., Wyllie, A.H., Currie, A.R.: Apoptosis : a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *British Journal of Cancer*, 26, 239-257 (1972).

Kiefer, M.C., Brauer, M.J., Powerds, V.C., Wu, J.J., Umansky, S.R., Tomei, L.D., Barr, P.J.: Modulation of apoptosis by the widely distributed Bcl-2 homologue Bak. *Nature (London)*, 374, 736-739 (1995).

- Koh, E.A.T., Illingworth, P.J., Duncan, W.C., Critchley, H.O.D.: Immunolocalization of Bcl-2 protein in human endometrium in the menstrual cycle and simulated early pregnancy. *Human Reproduction*, 10, 1557-1562 (1995).
- Koibuchi, Y., Iino, Y., Ichida, T., Andoh, T., Horii, Y., Nagasawa, M., Horiguchi, J., Maemura, M., Takei, H., Yokoe, T., Morishita, Y.: Regulation of estrogen receptor and epidermal growth factor receptor by tamoxifen under high and low estrogen environments in MCF7 cells grown in athymic mice. *Oncology Reports*, 7, 135-140 (2000).
- Kokawa, J., Shikone, T., Nakano, R.: Apoptosis in the human uterine endometrium during the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 81, 4111-4147 (1996).
- Kokeguchi, S., Hayase, R., Sekiba, K.: Proliferative activity in normal endometrium and endometrial carcinoma measured by immunochemistry using Ki-67 and anti-DNA polymerase alpha antibody, and flow cytometry. *Acta Medica Okayama*, 46, 113-121 (1992).
- Konno, R., Yamakawa, H., Utsonomiya, H., Ito, K., Sato, S., Yajima, A.: Expression of survivin and Bcl-2 in the normal human endometrium. *Molecular Human Reproduction*, 6, 529-540 (2000).
- Koshiyama, M., Yoshida, M., Takemura, M., Yura, Y., Matsushita, K., Hayashi, M., Tauchi, K., Konishi, I., Mori, T.: Immunohistochemical analysis of distribution of estrogen receptors and progesterone receptors in the postmenopausal endometrium. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 75, 702-706 (1996).
- Kraichely, D.M., Sun, J., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S.: Conformational changes and coactivator recruitment by novel ligands for estrogen receptor- α and estrogen receptor- β : Correlations with biological character and distinct differences among SRC coactivator family members. *Endocrinology*, 141, 3534-3545 (2000).
- Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S.: Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus: modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinology*, 132, 2371-2379 (1993).
- Kreitman, B., Bugat, R., Bayard, F.: Estrogen and progestin regulation of the progesterone receptor concentration in human endometrium. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 49, 926-929 (1979).
- Kreitman-Gimbal, B., Goodman, A.L., Bayard, F., Hodgen, G.D.: Characterization of estrogen and progesterone receptors in monkey endometrium: methodology and effects of estradiol and /or progesterone on endometrium of castrate monkeys. *Steroids*, 34, 749-770 (1979).
- Kreitman-Gimbal, B., Bayard, F., Nixon, W.E., Hodgen, G.D.: Patterns of estrogen and progesterone receptors in monkey endometrium during the normal menstrual cycle. *Steroids*, 35, 471-479 (1980).
- Krege, J.H., Hodgin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J., Smithies, O.: Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 95, 15677-15682 (1998).

- Kroemer, G.: The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nature*, 3, 614-620 (1997).
- Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A.: Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93, 5925-5930 (1996).
- Kuiper, G.G.J.M., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Häggblad, J., Nilsson, S., J.-A. Gustafsson: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*, 138, 863-870 (1997).
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., Chambon, P.: Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*, 51, 941-951 (1987).
- Kumar, V.; Chambon, P.: The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*, 55, 145-156 (1988).
- Kurebayashi, J., Otsuki, T., Kunisue, H., Tanaka, K., Yamamoto, S., Sonoo, H.: Expression levels of estrogen receptor- α , estrogen receptor- β , coactivators, and corepressors in breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 6, 512-518 (2000).
- LeBrun, D.P., Warnke, R.A., Cleary, M.L.: Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *American Journal of Pathology*, 142, 743-753 (1993).
- Lee, S.-K.; Kim, H.-J.; Na, S.-Y.; Kim, T.S.; Choi, H.-S.; Im, S.-Y.; Lee, J.W.: Steroid receptor coactivator-1 coactivates activating protein-1-mediated transactivation with the c-Jun and c-Fos subunits. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 16651-16654 (1998).
- Leo, C., Li, H., Chen, J.D.: Differential mechanisms of nuclear receptor regulation by receptor-associated coactivator 3. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 275-282 (2000).
- Lessey, B.A., Killam, A.P., Metzger, D.A., Haney, A.F., Greene, G.L., McCarty, K.S. jr.: Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 67, 334-340 (1988).
- Levenson, A.S., Jordan, V.C.: MCF-7: The first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Research*, 57, 3071-3078 (1997).
- Leygue, E.R., Watson, P.H., Murphy, L.C.: Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue. *Journal of the National Cancer Institute*, 88, 284-290 (1996a).
- Leygue, E., Murphy, L., Kuttann, F., Watson, P.: Triple primer polymerase chain reaction. A new way to quantify truncated mRNA expression. *American Journal of Pathology*, 148, 1097-1103 (1996b).
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P.H., Murphy, L.C.: Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Research*, 58, 197-201 (1998).

Li, H., Gomes, P.J., Chen, J.D.: RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC1 and TIF2. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94, 8479-8484 (1997).

Li, H., Chen, J.D.: The receptor-associated coactivator 3 activates transcription through CREB-binding protein recruitment and autoregulation. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 5948-5954 (1998).

Lilly Deutschland GmbH: Fachinformation zu Evista[®]; Stand August 1998.

Lindner, V., Kim, S.K., Karas, R.H., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-A., Mendelsohn, M.E.: Increased expression of estrogen receptor- β mRNA in male blood vessels after vascular injury. *Circulation Research*, 83, 224-229 (1998).

Liu, E.T., He, M., Rajgopal, U.: Differential polymerase chain reaction in the analysis of gene dosage. *Seminars in Cancer Biology*, 4, 47-58 (1993).

Liu, S.C., Klein-Szanto, A.J.: Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncology*, 36, 145-151 (2000).

Liu, Z., Wong, J., Tsai, M.J., O'Malley, B.W.: Steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) enhances ligand-dependent and receptor-dependent cell-free transcription of chromatin. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 96, 9485-9490 (1999).

Lopez, G.N., Webb, P., Shinsako, J.H., Baxter, J.D., Greene, G.L., Kushner, P.J.: Titration by estrogen receptor activation function-2 of targets that are downstream from coactivators. *Molecular Endocrinology*, 13, 891-909 (1999).

Love, R.R., Mazess, R.B., Barden, H.S., Epstein, S., Newcomb, P.A., Jordan, V.C., Carbone, P.P., DeMets, D.L.: Effects of tamoxifen on bone mineral density in postmenopausal women with breast cancer. *New England Journal of Medicine*, 326, 852-856 (1992).

Lu, B.; Leygue, E., Dotzlaw, H., Murphy, L.J., Murphy, L.C., Watson, P.H.: Estrogen receptor-beta mRNA variants in human and murine tissues. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 138, 199-203 (1998).

Ma, H., Hong, H., Huang, S.M., Irvine, R.A., Webb, P., Kushner, P.J., Coetzee, G.A., Stallcup, M.R.: Multiple signal input and output domains of the 160-kilodalton nuclear receptor coactivator proteins in process citation. *Molecular and Cellular Biology*, 19, 6164-6173 (1999).

Maentausta, O., Svalander, P., Danielsson, K.G., Bygdeman, M., Vihko, R.: The effects of an antiprogestin, mifepristone, and an antiestrogen, tamoxifen, on endometrial 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase and progestin and estrogen receptors during the luteal phase of the menstrual cycle: an immunohistochemical study. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 77, 913-918 (1993).

Mangelsdorf, D.J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schütz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., Chambon, P., Evans, R.M.: The nuclear receptor superfamily – the second decade. *Cell*, 83, 835-839 (1995).

- Markee, J.E.: Menstruation in intraocular endometrial implants in the rhesus monkey. *Contributions to Embryology*, 28, 219-308 (1940).
- Martin, M.B., Saceda, M., Lindsey, R.K.: Regulation of estrogen receptor expression in breast cancer. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 330, 143-153 (1993).
- Marttunen, M.B., Hietanen, P., Tiitinen, A., Ylikorkala, O.: Comparison of tamoxifen and toremifene on bone chemistry and bone mineral density in postmenopausal breast cancer patients. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 83, 1158-1162 (1998).
- Matsuzaki, S., Fukaya, T., Suzuki, T., Murakami, T., Sasano, H., Yajima, A.: Oestrogen receptor α and β mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 5, 559-564 (1999).
- McDonnell, D.P., Goldman, M.: RU486 exerts antiestrogenic activities through a novel progesterone receptor A form-mediated mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 269, 11945-11949 (1994).
- McDonnell, D.P., Dana, S.L., Hoener, P.A., Lieberman, B.A., Imhof, M.O., Stein, R.B.: Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Annals of the NY Academy of Science*, 761, 121-137 (1995).
- McInerney, E.M., Tsai, M.-J., O'Malley, B.W., Katzenellenbogen, B.S.: Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93, 10069-10073 (1996).
- McKenna, N.J., Lanz, R.B., O'Malley, B.W.: Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Reviews*, 20, 321-344 (1999).
- Metzger, D., Ali, S., Bornert, J.-M., Chambon, P.: Characterization of the amino-terminal transcriptional activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells. *Journal of Biological Chemistry*, 270, 9535-9542 (1995).
- Misiti, S., Schomburg, L., Yen, P.M., Chin, W.W.: Expression and hormonal regulation of coactivator and corepressor genes. *Endocrinology*, 139, 2493-2500 (1998).
- Mitchner, N.A., Garlick, C., Steinmetz, R.W., Ben-Jonathan, N.: Differential regulation and action of estrogen receptors alpha and beta in GH3 cells. *Endocrinology*, 140, 2651-2658 (1999).
- Montano, M.M., Jaiswal, A.K., Katzenellenbogen, B.S.: Transcriptional regulation of the human quinone reductase gene by antiestrogen-liganded estrogen receptor- α and estrogen receptor- β . *Journal of Biological Chemistry*, 273, 25443-25449 (1998).
- Moore, J.T., McKee, D.D., Slentz-Kesler, K., Moore, L.B., Jones, S.A., Horne, E.L., Su, J.-L., Kliewer, S.A., Lehmann, J.M., Willson, T.M.: Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 247, 75-78 (1998).

Morrow, M., Jordan, V.C.: The prevention of breast cancer with tamoxifen. In: Jordan, V.C. (ed): Long-term tamoxifen treatment for breast cancer. Madison, Wisc.: The University of Wisconsin Press, 257-281 (1994).

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

Moutsatsou, P., Sekeris, C.E.: Estrogen and progesterone receptors in the endometrium. Annals of the NY Academy of Science, 816, 99-115 (1997).

Müschen, M., Warskulat, U., Beckmann, M.W.: Defining CD95 as a tumor suppressor gene. Journal of Molecular Medicine, 78, 312-325 (2000).

Murphy, L.C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Coutts, A., Watson, P.: The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 65, 175-180 (1998a).

Murphy, L.C.: Mechanisms of hormone independence in human breast cancer. *In Vivo*, 12, 95-106 (1998b)

Murre, C., McCaw, P.S., Baltimore, D.: A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding daughterless, MyoD, and myc proteins. Cell, 56, 777-783 (1989a).

Murre, C., McCaw, P.S., Vaessin, H., Caudy, M., Jan, L.Y., Jan, Y.N., Cabrera, C.V., Buskin, J.N., Hauschka, S.D., Lassar, A.B., Weintraub, H., Baltimore, D.: Interactions between heterologous helix-loop-helix proteins generate complexes that bind specifically to a common DNA sequence. Cell, 58, 537-544 (1989b).

Na, S.Y., Lee, S.K., Han, S.J., Choi, H.S., Im, S.Y., Lee, J.W.: Steroid receptor coactivator-1 interacts with the p50 subunit and coactivates nuclear factor kappaB-mediated transactivations. Journal of Biological Chemistry, 273, 10831-10834 (1998).

Nagata, S.: Apoptosis by death factor. Cell, 88, 355-365 (1997).

Nagy, L., Kao, H.Y., Chakravarti, D., Lin, R.J., Hassig, C.A., Ayer, D.E., Schreiber, S.L., Evans, R.M.: Nuclear receptor repression mediated by a complex containing SMRT, mSin3, and histone deacetylase. Cell, 89, 373-380 (1997).

Nawaz, S., Lynch, M.P., Galand, P., Gerschenson, L.E.: Hormonal regulation of cell death in rabbit uterine epithelium. American Journal of Pathology, 127, 51-59 (1987).

Newman, S.P., Bates, N.P., Vernimmen, D., Parker, M.G., Hurst, H.C.: Cofactor competition between the ligand-bound oestrogen receptor and an intron 1 enhancer leads to oestrogen repression of ERBB2 expression in breast cancer. Oncogene, 19, 490-497 (2000).

Niederacher, D., An, H.-X., Cho, Y.J., Hantschmann, P., Bender, H.G., Beckmann, M.W.: Mutations and amplification of oncogenes in endometrial cancer. Oncology, 56, 59-65 (1999a).

- Niederacher, D., Yan, H.-Y., An, H.-X., Bender, H.G., Beckmann, M.W.: CDKN2A gene inactivation in epithelial sporadic ovarian cancer. *British Journal of Cancer*, 80, 1920-1926 (1999b).
- Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H., Hayashi, K.: Establishment of a new endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, 37, 1103-1111 (1985).
- Niwa, K., Imai, A., Hasimoto, M., Yokoyama, Y., Mori, H., Matsuda, Y., Tamaya, T.: A case-control study of uterine endometrial cancer of pre- and post-menopausal women. *Oncology Reports*, 7, 89-93 (2000).
- Nocke, W.: Selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren (SERM): Eine alternative zur Östrogen-Gestagen-Substitution in der Postmenopause? *Deutsches Ärzteblatt*, 97, C-143-147 (2000).
- Noe, M., Kunz, G., Herberich, M., Mall, G., Leyendecker, G.: The cyclic pattern of the immunocytochemical expression of oestrogen receptor and progesterone receptors in human myometrial and endometrial layers: characterization of the endometrial-subendometrial unit. *Human Reproduction*, 14, 190-197 (1999).
- Nogales-Ortiz, F.: Puerta, J.: The normal menstrual cycle. Chronology and mechanism of endometrial desquamation. *Obstetrics and Gynecology*, 74, 931-955 (1978).
- Nolte, R.T., Wisely, G.B., Westin, S., Cobb, J.E., Lambert, M.H., Kurokawa, R., Rosenfeld, M.G., Willson, T.M., Glass, C.K., Milburn, M.V.: Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma. *Nature*, 395, 137-143 (1998).
- Norris, J.D., Paige, L.A., Christensen, D.J., Chang, C.Y., Huacani, M.R., Fan, D., Hamilton, P.T., Fowlkes, D.M., McDonnell, D.P.: Peptide antagonists of the human estrogen receptor. *Science*, 285, 744-746 (1999).
- Nuijens, J.H.; van Berkel, P.H., Schanbacher, F.L.: Structure and biological action of lactoferrin. *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia*, 1, 285-295 (1996).
- Nuttall, M.E., Fisher, P.W., Suva, L.J., Gowen, M.: The selective oestrogen receptor modulators idoxifene und raloxifene have fundamentally different cell-specific oestrogen-response element(ERE)-dependent/independent mechanisms *in vitro*. *European Journal of Cancer*, 36 Suppl. 4, 63-64 (2000).
- Österlund, M., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-A., Hurd, Y.L.: Differential distribution and regulation of estrogen receptor α and β mRNA within the female rat brain. *Molecular Brain Research*, 54, 175-180 (1997).
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., Muramatsu, M.: The complete primary structure of human estrogen receptor β (hER β) and its heterodimerization with ER α *in vivo* and *in vitro*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243, 122-126 (1998).
- Ogawa, S., Chan, J., Chester, A.E., Gustafsson, J.A., Korach, K.S., Pfaff, D.W.: Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 96, 12887-12892 (1999).

- Ogryzko, V.V., Schiltz, R.L., Russanova, V., Howard, B.H., Nakatani, Y.: The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*, 87, 953-959 (1996).
- Oltvai, Z.N., Milliman, C.L., Korsmeyer, S.J.: Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*, 74, 609-619 (1993).
- Oltvai, Z.N., Korsmeyer, S.J.: Checkpoints of dueling dimers foil death wishes. *Cell*, 79, 189-192 (1994).
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W.: Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science*, 270, 1354-1357 (1995).
- Ormerod, M.G.: Apoptosis: Flow cytometric studies. *European Microscopy and Analysis*, March, 27-29 (1993).
- Osborne, M.P.: Breast cancer prevention by antiestrogens. *Annals of the NY Academy of Science*, 889, 146-151 (1999).
- Otsuki, Y., Misaki, O., Sugimoto, O., Ito, Y., Tsujimoto, Y., Akao, Y.: Cyclic Bcl-2 gene expression in the human endometrium during human menstrual cycle. *Lancet*, 344, 28-29 (1994).
- Pace, P., Taylor, J., Suntharalingam, S., Coombes, R.C., Ali, S.: Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α . *Journal of Biological Chemistry*, 272, 25832-25838 (1997).
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G.M.P., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A., Kushner, P.J., Scanlan, T.S.: Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*, 277, 1508-1510 (1997).
- Parker, M.G.: Steroid and related receptors. *Current Opinion in Cell Biology*, 5, 499-504 (1993).
- Parker, M.G.: Transcriptional activation by oestrogen receptors. *Biochemical Society Symposia*, 63, 45-50 (1998).
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G.G.J.M., Gustafsson, J.-A.: Mouse estrogen receptor β forms estrogen response element binding heterodimers with estrogen receptor α . *Molecular Endocrinology*, 11, 1486-1496 (1997).
- Pfleiderer, A.: Tumorartige Läsionen und Tumoren der Fortpflanzungsorgane und der Brustdrüse. In: Martius, G., Breckwoldt, M., Pfleiderer, A.: *Lehrbuch der Gynäkologie und Geburtshilfe* (1994).
- Pollard, J.W., Pacey, J., Cheng, S.V.Y., Jordan, E.G.: Estrogens and cell death in murine uterine luminal epithelium. *Cell and Tissue Research*, 249, 533-540 (1987).
- Pujol, P., Rey, J.M., Nirde, P., Roger, P., Gastaldi, M., Laffargue, F., Rochefort, H., Maudelonde, T.: Differential expression of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNAs as a marker of ovarian carcinogenesis. *Cancer Research*, 58, 5367-5373 (1998).

- Razandi, M., Pedram, A., Levin, E.R.: Plasma membrane estrogen receptors signal to antiapoptosis in breast cancer. *Molecular Endocrinology*, 14, 1434-1447 (2000).
- Read, L.D., Greene, G.L., Katzenellenbogen, B.S.: Regulation of estrogen receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in human Cancer cell lines by sex steroid hormones, their antagonists, and growth factors. *Molecular Endocrinology*, 3, 295-304 (1989).
- Renaud, J.P., Rochel, N., Ruff, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H., Moras, D.: Crystal structure of the RAR-gamma ligand-binding domain bound to all-trans retinoic acid. *Nature*, 378, 681-689 (1995).
- Rice, L.W., Jazaeri, A.A., Shupnik, M.A.: Estrogen receptor mRNA splice variants in pre- and postmenopausal human endometrium and endometrial carcinoma. *Gynecological Oncology*, 65, 149-157 (1997).
- Roodi, N., Bailey, L.R., Kao, W.-Y., Verrier, C.S., Yee, C.J., Dupont, W.D., Parl, F.F.: Estrogen receptor gene analysis in estrogen receptor positive and receptor negative primary breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 87, 446-451, 1995.
- Rotello, R.J., Lieberman, R.C., Lepoff, R.B., Gerschenson, L.E.: Characterization of uterine epithelium apoptotic cell death kinetics and regulation by progesterone and RU486. *American Journal of Anatomy*, 140, 449-456 (1992).
- Routledge, E.J., White, R., Parker, M.G., Sumpter, J.P.: Differential effects of xenoestrogens on coactivator recruitment by ERalpha and ERbeta. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 35986-35993 (2000)
- Saceda, M., Lippman, M.E., Chambon, P., Lindsey, R.L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M., Martin, M.B.: Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol. *Molecular Endocrinology*, 2, 1157-1162 (1988).
- Saceda, M., Lippman, M.E., Lindsey, R.L., Puente, M., Martin, M.B.: Role of an estrogen receptor-dependent mechanism in the regulation of estrogen receptor mRNA in MCF-7 cells. *Molecular Endocrinology*, 3, 1782-1787 (1989).
- Saegusa, M., Katama, Y., Isono, M., Okayasu, I.: Bcl-2 expression is correlated with a low apoptotic index and associated with progesterone receptor immunoreactivity in endometrial carcinomas. *Journal of Pathology*, 180, 275-282 (1996).
- Salmi, A., Carpin, O., Rutanen, E.: The association between c-fos und c-jun expression and estrogen and progesterone receptors is lost in human endometrial cancer. *Tumor Biology*, 20, 202-211 (1999).
- Sathya, G., Li, W., Klinge, C.M., Anolik, J.H., Hilf, R., Bambara, R.A.: Effects of multiple estrogen responsive elements, their spacing, and location on estrogen response of reporter genes. *Molecular Endocrinology*, 11, 1994-2003 (1997).
- Satyaswaroop, P.G., Zaino, R.J., Mortel, R.: Estrogen-like effects of tamoxifen on human endometrial carcinoma transplanted into nude mice. *Cancer Research*, 44, 4006-4010 (1984).

Saville, B., Wormke, M., Wang, F., Nguyen, T., Enmark, E., Kuiper, G., Gustafsson, J.A., Safe, S.: Ligand-, cell-, and estrogen receptor subtype (alpha/beta)-dependent activation at GC-rich (SP1) promoter elements. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 5379-5387 (2000).

Savoldi, G., Ferrari, F., Ruggeri, G., Sobek, L., Albertini, A., Di Lorenzo, D.: Progesterone agonists and antagonists induce down- and up-regulation of estrogen receptors and estrogen inducible genes in human breast cancer cell lines. *International Journal of Biological Markers*, 10, 47-54 (1995).

Scharf, M.B., McDannold, M.D., Stover, R., Zaretsky, N., Berkowitz, D.V.: Effects of estrogen replacement therapy on rates of cyclic alternating patterns and hot-flush events during sleep in postmenopausal women: a pilot study. *Clinical Therapeutics*, 19, 304-311 (1997).

Scholzen, T., Gerdes, J.: The Ki-67 protein: from the known to the unknown. *Journal of Cell Physiology*, 182, 311-322 (2000).

Schulte, K.M., Niederacher, D., An, H.X., Staudt, S., Simon, D., Beckmann, M.W., Goretzki, P.E.: *INT-2* gene amplification in differentiated human thyroid cancer. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*, 104 Suppl. 4, 101-104 (1996).

Schwartz, L.B., Krey, L., Demopoulos, R., Goldstein, S.R., Nachtigall, L.E., Mittal, K.: Alterations in steroid hormone receptors in the tamoxifen-treated endometrium. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 176, 129-137 (1997).

Scully, R., Chen, J., Ochs, R.L., Keegan, K., Hoekstra, M., Feunteun, J., Livingston, D.M.: Dynamic changes of BRCA1 subnuclear location and phosphorylation state are initiated by DNA damage. *Cell*, 90, 425-435 (1997).

Senn, H.-J., Drings, P., Glaus, A., Jungi, W.F., Pralle, H.B., Sauer, R., Schlag, P.M.: *Onkologie – Checklisten der aktuellen Medizin*, Thieme Verlag (1998).

Shao, N., Chai, Y.L., Shyam, E., Reddy, P., Rao, V.M.: Induction of apoptosis by the tumor suppressor protein BRCA1. *Oncogene*, 13, 1-7 (1996).

Sher, E., Eisman, J.A., Moseley, J.M., Martin, T.J.: Whole-cell uptake and nuclear localization of 1,25-dihydroxycholecalciferol by breast cancer cells (T47 D) in culture. *Biochemical Journal*, 200, 315-20 (1981).

Shiau, A.K., Barstad, D., Loria, P.M., Cheng, L., Kushner, P.J., Agard, D.A., Greene, G.L.: The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the agonism of this interaction by tamoxifen. *Cell*, 95, 927-937 (1998).

Shibata, H., Spancer, T.E., Onate, S.A., Jenster, G., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., O'Malley, B.W.: Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Progress in Hormone Research*, 52, 141-164 (1997).

Shim, W.-S., DiRenzo, J., DeCaprio, J.A., Santen, R.J., Brown, M., Jeng, M.-H.: Segregation of steroid receptor coactivator-1 from steroid receptors in mammary epithelium. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 96, 208-213 (1999).

- Shiozawa, T., Li, S.F., Nakayama, K., Nikaido, T., Fujii, S.: Relationship between the expression of cyclins/cyclin-dependent kinases and sex-steroid receptors/Ki67 in normal human endometrial glands and stroma during the menstrual cycle. *Molecular Human Reproduction*, 2, 745-752 (1996).
- Simard, J., Sanchez, R., Poirier, D., Gauthier, S., Singh, S.M., Merand, Y., Belanger, A., Labrie, C., Labrie, F.: Blockade of the stimulatory effect of estrogens, OH-tamoxifen, OH-toremifene, droloxifene, and raloxifene on alkaline phosphatase activity by the antiestrogen EM-800 in human endometrial adenocarcinoma Ishikawa cells. *Cancer Research*, 57, 3494-3497 (1997).
- Singh, N., Anand, S.: Cell death by apoptosis. *Indian Journal of Experimental Biology*, 32, 843-847 (1994).
- Slyden, O.D., Hirst, J.J., Brenner, R.M.: Estrogen action in the reproductive tract of rhesus monkeys during antiprogesterin treatment. *Endocrinology*, 132, 1845-1856 (1993).
- Smith, C.L., Onate, S.A., Tsai, M.-T., O'Malley, B.W.: CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 93, 8884-8888 (1996).
- Smith, C.L., Nawaz, Z., O'Malley, B.W.: Coactivator and corepressor regulation of the agonist/antagonist activity of the mixed antiestrogen, 4-hydroxytamoxifen. *Molecular Endocrinology*, 11, 657-666 (1997).
- Snijders, M.P., deGoeij, A.F., Debets-TeBaerts, M.J., Rousch, M.J., Koudstaal, J., Bosman, F.T.: Immunocytochemical analysis of estrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *Journal of Reproduction and Fertility*, 94, 363-371 (1992).
- Somasundaram, K., Zhang, H., Zeng, Y.X., Houvras, Y., Peng, Y., Zhang, H., Wu, G.S., Licht, J.D., Weber, B.L., El-Deiry, W.S.: *Nature*, 389, 187-190 (1997).
- Speirs, V., Parkes, A.T., Kerin, M.J., Walton, D.S., Carleton, P.J., Fox, J.N., Atkin, S.L.: Coexpression of estrogen receptor α and β : Poor prognostic factors in human breast cancer. *Cancer Research*, 59, 525-528 (1999a).
- Speirs, V., Malone, C., Walton, D.S., Kerin, M.J., Atkin, S.L.: Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients. *Cancer Research*, 59, 5421-5424 (1999b).
- Spencer, S.J., Cataldo, N.A., Jaffe, R.B.: Apoptosis in the human female reproductive tract. *Obstetrical and Gynecological Survey*, 51, 314-323 (1996).
- Spencer, T.E.; Jenster, G.; Burcin, M.M.; Allis, D.; Zhou, J.; Mizzen, C.A.; McKenna, N.J.; Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.-J. and O'Malley, B.W.: Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature*, 389, 194-198 (1997).
- Speroff, L., Vande Wiele, R.L.: Regulation of the human menstrual cycle. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 109, 234-247 (1971).

Strauss, F. : Handbuch der Zoologie, Band VIII, Mammalia : Der weibliche Sexualzyklus. De Gruyter Verlag, 1986

Struewing, J.P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S.M., Berlin, M., McAdams, M., Timmermann, M.M., Brody, L.C., Tucker, M.A.: The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *New England Journal of Medicine*, 336, 1401-1408 (1997).

Suen, C.S., Berrodin, T.J., Mastroeni, R., Cheskis, B.J., Lyttle, C.R., Frail, D.E.: A transcriptional coactivator, steroid receptor coactivator-3, selectively augments steroid receptor transcriptional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 27645-27653 (1998).

Sutherland, R.L., Hall, R.E., Taylor, I.W.: Cell proliferation kinetics of MCF-7 human mammary carcinoma cells in culture and effects of tamoxifen on exponentially growing and plateau-phase cells. *Cancer Research*, 43, 3998-4006 (1983).

Swaneck, G.E., Fishman, J.: Effects of estrogens on MCF-7 cells: positive or negative regulation by the nature of the ligand-receptor complex. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 174, 276-281 (1991).

Swiatecka, J., Dzieciol, J., Anchim, T., Dabrowska, M., Pietruczuk, M., Wolczynski, S.: Influence of estrogen, antiestrogen and UV-Light on the balance between proliferation and apoptosis in MCF7-breast adenocarcinoma cells culture. *Neoplasma*, 47, 15-24 (2000).

Szapary, D., Huang, Y., Simons jr., S.S.: Opposing effects of corepressor and coactivators in determining the dose-response curve of agonists, and residual agonist activity of antagonists, for glucocorticoid receptor-regulated gene expression. *Molecular Endocrinology*, 13, 2108-2121 (1999).

Tabibzadeh, S., Kong, Q.F., Satyaswaroop, P.G.: Distinct regional and menstrual cycle dependent distribution of apoptosis in human endometrium, Potential regulatory role of T cells and TNF- α . *Endocrine Journal*, 2, 87-95 (1994).

Tai, H., Kubota, N., Kato, K.: Involvement of nuclear receptor coactivator SRC-1 in estrogen-dependent cell growth of MCF-7 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 267, 311-316 (2000).

Tanner, M.M., Grenman, S., Koul, A., Johannsson, O., Meltzer, P., Pejovic, T., Borg, A., Isola, J.J.: Frequent amplification of chromosomal region 20q12-q13 in ovarian cancer. *Clinical Cancer Research*, 6, 1833-1839 (2000).

Tanner, M.M., Tirkkonen, M., Kallioniemi, A., Holli, K., Collins, C., Kowbel, D., Gray, J.W., Kallioniemi, O.-P., Isola, J.: Amplification of chromosomal region 20q13 in invasive breast cancer: Prognostic implication. *Clinical Cancer Research*, 1, 1455-1461 (1995).

Tao, X.J., Sayegh, R.A., Tilly, J.L., Isaacson, K.B.: Elevated expression of the proapoptotic BCL-2 family member, BAK, in the human endometrium coincident with apoptosis during the secretory phase of the cycle. *Fertility and Sterility*, 70, 338-343 (1998).

Taskin, M., Lallas, T.A., Barber, H.R., Shevchuk, M.M.: bcl-2 and p53 in endometrial adenocarcinoma. *Modern PatholPathology*, 10, 728-734 (1997).

- Takeshita, A., Yen, P.M., Misiti, S., Cardona, G.R., Liu, Y., Chin, W.W.: Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology*, 137, 3594-3597 (1996).
- Takeshita, A., Cardona, G., Koibuchi, N., Suen, C.S., Chin, W.W.: TRAM-1, a novel 160-kDa thyroid hormone receptor activator molecule, exhibits distinct properties from steroid receptor coactivator-1. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 27629-27634 (1997).
- Teixerira, C., Reed, J.C., Pratt, M.A.C.: Estrogen promotes chemotherapeutic drug resistance by a mechanism involving Bcl-2 protooncogene expression in human breast cancer cells. *Cancer Research*, 55, 3902-3907 (1995).
- Tenniswood, M.P., Guenette, R.S., Lakins, J., Mooibroek, M., Wong, P., Welsh, J.E.: Active cell death in hormone dependent tissue. *Cancer and Metastasis Reviews*, 11, 197-220 (1992).
- Thenot, S., Charpin, M., Bonnet, S., Cavailles, V.: Estrogen receptor cofactor expression in breast and endometrial cancer. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 156, 85-93 (1999).
- Thompson, C.B.: Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267, 1456-1462 (1995).
- Topper, Y.J., Freeman, C.S.: Multiple hormone interactions in the developmental biology of the mammary gland. *Physiological Research*, 60, 1049-1106 (1980).
- Tora, L., White, J., Brou, C., Tasset, D., Webster, N., Scheer, E., Chambon, P.: The human estrogen receptor has two independent non-acidic transcriptional activation functions. *Cell*, 59, 477-487 (1989).
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.: The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function. *Nature*, 387, 677-684 (1997).
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F., Giguere, V.: Ligand-independent activation of the estrogen receptors alpha and beta by mutation of a conserved tyrosine can be abolished by antiestrogens. *Cancer Research*, 58, 877-881 (1998).
- Treuter E., Albrechtsen, T., Johansson, L., Leers, J., Gustafsson, J.-A.: A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Molecular Endocrinology*, 12, 864-881 (1998).
- Tsai, M.-J., O'Malley, B.W.: Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor family. *Annual Review of Biochemistry*, 63, 451-486 (1994).
- Tzukerman, M.T., Esty, A., Santiso-Mere, D., Danielian, P., Parker, M.G., Stein, R.B.: Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions. *Molecular Endocrinology*, 8, 21-30 (1994).
- Vanacker, J.M., Petterson, K., Gustafsson, J.A., Laudet, V.: Transcriptional targets shared by estrogen receptor-related receptors (ERRs) and estrogen receptor (ER) alpha, but not by ERbeta. *EMBO Journal*, 18, 4270-4279 (1999).

Van Leeuwen, F.E., Benraadt, J., Coebergh, J.W.W., Kiemeney, L.A.L.M., Gimbrere, C.H.F., Otter, R., Schouten, L.J., Damhuis, R.A.M., Bontenbal, M., Diepenhorst, F.W., van den Belt-Dusebout, A.W., van Tinteren, H.: Risk of endometrial cancer after tamoxifen treatment of breast cancer. *Lancet*, 343, 448-452 (1994).

Vaux, D.L., Cory, S., Adams, T.M.: Bcl-2 promotes the survival of haemopoietic cells and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature (London)*, 335, 440-442 (1988).

Vaux, D.L., Haecker, G., Strasser, A.: An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell*, 76, 777-779 (1994).

Vegeto, E., Shahbaz, M.M., Wen, D.X., Goldman, M.E., O'Malley, B.W., McDonnell, D.P.: Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Molecular Endocrinology*, 7, 1244-1255 (1993).

Verhaegen, S.: Microscopical study of cell death via apoptosis. *European Microscopy and Analysis*, 1, 31-33 (1998).

Verma, V.: Ultrastructural changes in human endometrium at different phases of the menstrual cycle and their functional significance. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 15, 193-212 (1983).

Vladusic, E.A., Hornby, A.E., Guerra-Vladusic, F.K., Lupu, R.: Expression of estrogen receptor B messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Research*, 58, 210-214 (1998).

Vladusic, E.A., Hornby, A.E., Guerra-Vladusic, F.K., Lakins, J., Lupu, R.: Expression and regulation of estrogen receptor beta in human breast tumors and cell lines. *Oncology Reports*, 7, 157-167 (2000).

Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H.: TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO Journal*, 15, 3667-3675 (1996).

Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., Gronemeyer, H.: The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO Journal*, 17, 507-519 (1998).

Vorland, L.H.: Lactoferrin: a multifunctional glycoprotein. *APMIS*, 107, 971-981 (1999).

Wagner, R.L., Apriletti, J.W., West, B.L., Baxter, J.D., Fletterick, R.J.: A structural role for hormone in the thyroid hormone receptor ligand-binding domain. *Nature*, 378, 690-697 (1995).

Wang, H., Zeng, X., Khan, S.A.: Estrogen receptor variants ER Δ 5 and ER Δ 7 down-regulate wild-type estrogen receptor activity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 156, 159-168 (1999).

Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A., Muramatsu, M.: Agonistic effect of Tamoxifen is dependent on cell type, ERE-promoter context, and estrogen

receptor subtype: Functional difference between estrogen receptors α and β . *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 236, 140-145 (1997).

Webb, P., Lopez, G.N., Uht, R.M., Kushner, P.J.: Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP1 pathway: Potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology*, 9, 443-456 (1995).

Webb, P., Nguyen, P., Shinsako, J., Anderson, C., Feng, W., Nguyen, M.P., Chen, D., Huang, S.M., Subramanian, S., McInerney, E., Katzenellenbogen, B.S., Stallcup, M.R., Kushner, P.J.: Estrogen receptor activation function 1 works by binding p160 coactivator proteins. *Molecular Endocrinology*, 12, 1605-1618 (1998).

Webster, N.J.G., Green, S., Jin, J.R., Chambon, P.: The hormone binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activation function. *Cell*, 54, 199-207 (1988).

Weigel, N.L., Zhang, Y.: Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *Journal of Molecular Medicine*, 76, 469-479 (1998).

Weihua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E.V., Warner, M., Gustafsson, J.A.: Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 23, 5936-5941 (2000).

Westin, S., Kurokawa, R., Nolte, R.T., Wisely, G.B., McInerney, E.M., Rose, D.W., Milburn, M.V., Rosenfeld, M.G., Glass, C.K.: Interactions controlling the assembly of nuclear-receptor heterodimers and co-activators. *Nature*, 395, 199-202 (1998).

Wijayarathne, A.L., Nagel, S.C., Paige, L.A., Christensen, D.J., Norris, J.D., Fowlkes, D.M., McDonnell, D.P.: Comparative analyses of mechanistic differences among antiestrogens. *Endocrinology*, 140, 5828-5840 (1999).

Williams, G.T.: Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell*, 65, 1097-1098 (1991).

Wheater, Burkitt, Daniels: *Funktionelle Histologie*. Urban&Schwarzberger-Verlag (1987).

Wong, H., Anderson, W.D., Cheng, T., Riabowol, K.T.: Monitoring mRNA expression by polymerase chain reaction: The „primer-dropping“ method. *Analytical Biochemistry*, 223, 251-258 (1994).

Wyllie, A.H., Kerr, J.F., Currie, A.R.: Cell death: the significance of apoptosis. *International Review of Cytology*, 68, 251-305 (1980).

Xu, J., Liao, L., Ning, G., Yoshida-Komiya, H., Deng, C., O'Malley, B.W.: The steroid receptor coactivator SRC-3 (p/CIP/RAC3/AIB1/ACTR/TRAM-1) is required for normal growth, puberty, female reproductive function, and mammary gland development. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 6, 6379-6384 (2000).

Xu, L., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G.: Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Current Opinion in Genetics and Development*, 9, 140-147 (1999).

Yamashita, S.: Localization and functions of steroid hormone receptors. *Histology and Histopathology*, 13, 255-270 (1998).

Yanagisawa, J., Yanagi, Y., Masuhiro, Y., Suzawa, M., Watanabe, M., Kashiwagi, K., Toriyabe, T., Kawabata, M., Miyazono, K., Kato, S.: Convergence of transforming growth factor-beta and vitamin D signaling pathways on SMAD transcriptional coactivators. *Science*, 283, 1317-1321 (1999).

Yang, J., Liu, A., Chiou, S.-K., Guzman, R., Nandi, S.: Estrogen receptor variants are present in many normal human tissues. *International Journal of Molecular Medicine*, 5, 223-227 (2000).

Yang, N.N., Venugopalan, M., Hardikar, S., Glasebrook, A.: Element activated by metabolites of 17 β -estradiol and raloxifene. *Science*, 273, 1222-1225 (1996).

Yang, N.N., Venugopalan, M., Hardikar, S., Glasebrook, A.: Correction: Raloxifene response needs more than an element. *Science*, 275, 12498 (1997).

Yang, X.J., Ogryzko, V.V., Nishikawa, J., Howard, B.H., Nakatani, Y.: A p300/CBP-associated factor that competes with the adenoviral oncoprotein E1A. *Nature*, 382, 319-324 (1996).

Yokota, T., Imamura, M., Teshima, S., Suzuki, H., Tezuka, F., Kikuchi, S., Kunii, Y., Yamauchi, H.: c-erbB-2, p53 protein expression and steroid hormone receptors in breast carcinomas: an immunohistochemical study. *Anticancer Research*, 19, 4007-4012 (1999).

Zhang, G.J., Kimijima, I., Onda, M., Kanno, M., Sato, H., Watanabe, T., Tsuchiya, A., Abe, R., Takenoshita, S.: Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-x(L), without alteration of p53 protein levels. *Clinical Cancer Research*, 5, 2971-2977 (1999).

Zhang, Q.X., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Borg, A.: Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 59, 251-260 (1996).

6. Abkürzungen und medizinische Fachbegriffe

(A) Abkürzungen

A	Adenosintriphosphat (in Sequenzen) oder Amplifikationswert
<i>AIB1</i>	<i>amplified in breast cancer</i>
AF	Aktivierungsfunktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar
C	Cytidintriphosphat (in Sequenzen)
CBP	<i>CREB-binding protein</i>
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddATP	Didesoxyadenosintriphosphat
ddCTP	Didesoxycytosintriphosphat
ddGTP	Didesoxyguanosintriphosphat
ddTTP	Didesoxythymidintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2	17β-Östradiol
ER	Oestrogenrezeptor
ERE	<i>estrogen responsive element</i>
G	Guanosintriphosphat (in Sequenzen)
HRT	Hormonersatztherapie
min	Minuten
N-CoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
OHT	4-Hydroxy-Tamoxifen
p/CAF	<i>p300/CBP associated protein</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
Pg	Progesteron
PR	Progesteronrezeptor
RE	relativer Expressionswert
REV	RE-Verhältnis
rLA	relative Luciferaseaktivität
RLX	Raloxifen
RLX-HCl	Raloxifen-Hydrochlorid
SA	Standardabweichung
SI	Schwankungsintervall
sec	Sekunden
SMRT	silencing mediator for retinoid and thyroid hormone receptor
SR	Steroidrezeptor
SRC	<i>steroid receptor coactivator</i> = Steroidrezeptor-Koaktivator
Std.	Stunden
T	Thymidintriphosphat (in Sequenzen)
TAM	Tamoxifen
TBE	TRIS/Borat/EDTA

ü.N.	über Nacht
wt	Wildtyp

(B) Medizinische Fachbegriffe

Endometrium	Gebärmutter Schleimhaut
Hyperplasie	Größenzunahme eines Gewebes durch Vermehrung der spezifischen Parenchymzellen
Hysterektomie	operative Entfernung der Gebärmutter
Karzinom	bösartiges Geschwulst epithelialer Herkunft
Lymphonodektomie	operative Entfernung von Lymphknoten
Mamma	Brust
Menopause	letzte Regelblutung
Neoplasie	Neubildung von Körpergewebe
Ovar	Eierstock
Ovarektomie	operative Entfernung der Eierstöcke
prae-/postmenopausal	vor/nach der letzten Regelblutung

7. Anhang

7.1. Klinische Daten des Kollektivs der Mamma- und Endometriumkarzinome für die Steroidrezeptor- und SRC-mRNA-Expressionsbestimmungen (Tab.3.25; Tab.3.28) und die AIB1-Genamplifikationsanalysen (Tab.3.26).

Charakteristika	Mammakarzinome		Endometriumkarzinome
	Amplifikation (n=127)	Expression (n=23)	Amplifikation/Expression (n=31)
Alter (Jahre)			
≤50	33	5	0
>50	94	18	31
n.k.	0	0	0
Tumorgroße			
pT1	46	9	12
pT2	51	10	4
pT3/4	13	1	3
n.k.	17	3	12
Nodalstatus			
N0	52	10	17
N1	43	9	2
N2	11	1	0
n.k.	21	3	12
Grad			
I	14	0	9
II	55	11	8
III	26	5	7
n.k.	32	7	7
Östrogenrezeptorstatus			
positiv	56	11	24
negativ	43	6	7
n.k.	28	6	0
Progesteronrezeptorstatus			
positiv	65	12	25
negativ	31	7	6
n.k.	31	4	0

(n.k.= nicht klassifiziert)

Lebenslauf

Name : Michael Gläser
Geburtsdatum : Düsseldorf
Geburtsort : 24.06.1971
Staatsangehörigkeit : deutsch
Familienstand : verheiratet

Ausbildung :

08/1977 – 06/1981 Karl-Arnold-Grundschule, Ratingen
08/1981 – 06/1990 Dietrich-Bonhoeffer-Gymnasium, Ratingen
30.05.1990 Abitur
10/1990 – 09/1991 Studium der Chemie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
10/1991 – 09/1992 Wehrdienst, Stabsdienstsoldat, Reitzensteinkaserne, Düsseldorf
09/1992 – 10/1992 Studium der Chemie an der Fachhochschule, Krefeld
10/1992 – 08/1997 Studium der Biologie an der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
04.10.1994 Diplom-Vorprüfung
26.08.1997 Diplom-Prüfung in den Fächern Genetik, Mikrobiologie und Organische Chemie
10/1996 – 08/1997 Anfertigung der Diplomarbeit mit dem Thema: „Analyse der cDNA des Tex32-Gens der Maus“ in der Arbeitsgruppe von Prof. U.A.O. Heinlein am Institut für Genetik der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.
ab 09/1997 Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „Analyse der (anti-)östrogenen Wirkmechanismen von Raloxifen und Tamoxifen in Endometrium- und Mammakarzinomen“ im Molekulargenetischen Labor der Frauenklinik der Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorgelegte Dissertation selbst und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt habe. Ich habe keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt. Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Weiterhin erkläre ich, daß ich diese in der jetzigen oder einer ähnlichen Form bei noch keiner anderen Fakultät eingereicht habe.

Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.G. Bender für die Möglichkeit, im Molekulargenetischen Labor der Universitätsfrauenklinik wissenschaftlich arbeiten zu können. Frau Prof. Dr. E. Knust danke ich für die Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. M.W. Beckmann danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und wertvolle Anregungen und Diskussionen. Herrn Dr. D. Niederacher danke ich für seine wissenschaftlichen Anleitungen und Ratschläge.

Meinen Laborkollegen und –kolleginnen danke ich für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Frau Dr. L. Staneva-Dobrowski und Frau H. Maas vom Institut für Neuroanatomie am Zentrum für Anatomie und Hirnforschung der H.-H.-Universität, Düsseldorf danke ich für ihre Unterstützung bei den immunhistologischen und elektronenmikroskopischen Analysen.

Den Mitarbeitern aus dem Morphologischen Labor der Universitätsfrauenklinik danke ich für ihre Hilfe bei den morphologischen Analysen des Endometriums.

Frau A. Rong aus dem Hämatologischen Labor, sowie meinen alten Kollegen aus der Arbeitsgruppe von Prof. Heinlein danke ich für hilfreiche Diskussionen aller Art.

Den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Frau Prof. E. Knust danke ich für ihre Hilfe und Unterstützung bei der Anfertigung der Aufnahmen der immunhistologischen Präparate.

Besonders herzlich danke ich meiner Frau Katarina und meiner Familie für ihre Unterstützung und Geduld in jeglicher Hinsicht, ohne die die Erstellung dieser Arbeit nicht möglich gewesen wäre.