

**Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel**

**Der Einfluss von Testosteron auf die  
E1S-Sulfataseaktivität in nicht-malignen und  
malignen Brustzellen *in vitro***

**INAUGURAL – DISSERTATION**

**zur**

**Erlangung des doctor medicinae**

**der Medizinischen Fakultät**

**der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster**

**vorgelegt von Sebastian Plöger**

**aus Paderborn**

**2015**

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen Wilhelms-  
Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. h.c. Wilhelm Schmitz

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Petra Stute

2. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael Zitzmann

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2015

Aus dem Universitätsklinikum Münster  
Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel  
Referent: PD Dr. med. Petra Stute  
Koreferent: Prof. Dr. med. Michael Zitzmann

**Der Einfluss von Testosteron auf die E1S-Sulfataseaktivität in nicht-malignen und malignen Brustzellen in vitro von Sebastian Plöger**

Testosteron (T) stellt eine therapeutische Option in der Behandlung von Frauen mit verringertem sexuellem Verlangen dar. Ziel dieser Arbeit ist es, den möglichen Effekt von T auf die lokale Östrogensynthese zu messen. Dabei wurde der Effekt auf die Sulfatase (STS)-Expression und -Aktivität in hormonabhängigen Brustkrebszelllinien mit hohem (BT-474) und niedrigem (MCF-7) aggressivem Potential und nicht-malignen Brustzellen (HBL-100) festgestellt. Die Zellen wurden jeweils mit Testosteron in den Konzentrationen  $10^{-8}$  M und  $10^{-6}$  M bei 37°C inkubiert, und es erfolgte die direkte Messung oder nach 24 Stunden. Zur Bestimmung einer möglichen intrazellulären Aromatisierung von T zu Östrogen erfolgte zusätzlich die Inkubation der Zellen mit dem Aromataseinhibitor Anastrozol (A) alleine und in Kombination mit T. Die Messung der STS Proteinexpression wurde mit Hilfe einer dot-blot Analyse der Zelllysate durchgeführt. Die mRNA Level der STS wurden mittels quantitativer real-time PCR erhoben. Durch eine Dünnschichtchromatographie wurde die STS Aktivität evaluiert durch eine Inkubation der Zellen mit radioaktivem markiertem Östronsulfat ( $[^3\text{H}]$ -E1S mit anschließender Trennung von Östron (E1) und Östradiol (E2). Als Resultat zeigte sich, dass die die STS Proteinexpression signifikant höher war in den hochmalignen Zellen im Vergleich zu den weniger bzw. nicht malignen Zellen unabhängig von der Inkubation. Des Weiteren ergeben sich für STS Proteinexpression innerhalb der Zelllinien nach der Inkubation keine signifikanten Unterschiede. Unabhängig von der Zelllinie zeigte sich ein Absinken der STS Aktivität nach direkter und eine Steigerung nach 24-stündiger Inkubation, was zum Teil durch A abgemildert bzw. umgekehrt wurde. Insgesamt lässt sich folgern: je höher die Aggressivität der Zelllinie ist, desto höher ist die lokale Östrogensynthese. Der Übergang einer normalen in eine maligne Zelle scheint verbunden zu sein mit einer gestörten Autoregulation. Das lokal vorherrschende endokrine Milieu ist offenbar entscheidend für die Reaktion der Zellen auf T.

Tag der mündlichen Prüfung: 08.05.2015

## ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:  
Der Einfluss von Testosteron auf die E1S-Sulfataseaktivität in  
nicht-malignen und malignen Brustzellen in vitro

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. Ludwig Kiesel

unter der Anleitung von:

PD Dr. med. Petra Stute

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Münster, 28.01.2014

Ort, Datum

Name:  
(in Druckbuchstaben)

Unterschrift

# Inhaltsverzeichnis

---

1	Einleitung	1
1.1	Das Mammakarzinom	1
1.2	Die Menopause und ihre Symptome, Folgen und Behandlung	3
1.3	Androgene der Frau	5
1.4	Transdermale Testosteronersatztherapie	6
1.5	Die lokale Östrogensynthese der Brust	8
1.5.1	Aromatase	10
1.5.2	E1S-Sulfatase (STS)	15
1.5.3	17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ HSD)	20
1.6	Zellen	22
1.6.1	HBL-100-Zellen	22
1.6.2	MCF-7-Zellen	23
1.6.3	BT-474-Zellen	23
1.7	Aromataseinhibitoren	24
1.8	Ziel der Studie	29
2	Material und Methoden	30
2.1	Studiendesignübersicht	30
2.2	Chemikalien, Reagenzien und Steroide	30
2.3	Zellkultivierung der humanen Brustkrebszelllinien	31
2.4	Hormonbehandlung	31
2.5	Immunzytochemie	32
2.6	Dünnschichtchromatographie - STS Enzymaktivität	32
2.7	Dot blot-Analyse - STS Enzymexpression	34
2.8	Quantitative TaqMan® real-time PCR - STS mRNA Expression	35
2.9	Statistische Methoden	36
3	Ergebnisse	37
3.1	Immunzytochemische STS-Lokalisation in HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen	37
3.2	Lokale Formation von E1 und E2 als Indikator für die STS-Aktivität	39
3.2.1	Auswirkung der Konzentrationsunterschiede auf die Östrogensynthese	39
3.2.1.1	Östronformation (E1) nach direkter Inkubation	40
3.2.1.2	Graphische Darstellung der Östronformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien bei direkter Inkubation	43
3.2.1.3	Östradiolformation (E2) nach direkter Inkubation	44
3.2.1.4	Graphische Darstellung der Östradiolformation bei verschiedenen Konzentration der Inkubationsmedien bei direkter Inkubation	47
3.2.1.5	Östronformation (E1) nach 24-stündiger Inkubation	48

3.2.1.6	Graphische Darstellung der Östronformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien und 24-stündiger Inkubation	51
3.2.1.7	Östradiolformation (E2) nach 24-stündiger Inkubation	52
3.2.1.8	Graphische Darstellung der Östradiolformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien und 24-stündiger Inkubation	55
3.2.2	Dauer der Inkubation	56
3.2.2.1	Direkte Inkubation mit Testosteron	56
3.2.2.2	Graphische Darstellung der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei direkter Inkubation	58
3.2.2.3	Verhältnis der gesamten Östrogenformation bei direkter Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen	59
3.2.2.4	Graphische Darstellung des Verhältnisses der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei direkter Inkubation	60
3.2.2.5	24-stündige Inkubation mit Testosteron	61
3.2.2.6	Graphische Darstellung der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei 24-stündiger Inkubation	62
3.2.2.7	Verhältnis der gesamten Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen	63
3.2.2.8	Graphische Darstellung des Verhältnisses der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei 24-stündiger Inkubation	65
3.2.3	Auswirkung der Anastrozolininkubation	66
3.2.3.1	Wirkung der Inkubation mit Testosteron versus Anastrozolininkubation auf die lokale Östrogenformation	66
3.2.3.2	Graphische Darstellung der Östrogenformation im Vergleich zwischen Testosteron- und Anastrozolbehandlung nach direkter und 24-stündiger Inkubation	70
3.2.3.3	Vergleich der Inkubation mit Anastrozol im Vergleich zur Kombination aus Anastrozol und Testosteron auf die lokale Östrogenformation	71
3.2.3.4	Graphische Darstellung der Östrogenformation im Vergleich von Testosteron- zur kombinierten Testosteron - / Anastrozolbehandlung nach direkter und 24-stündiger Inkubation	75
3.3	Quantitative TaqMan® real-time PCR - STS mRNA Expression	76
3.4	Analyse der STS Proteinexpression nach Testosteronbehandlung	78

4 Diskussion	80
5 Zusammenfassung	90
6 Literaturverzeichnis	92

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das Mammakarzinom

Das Mammakarzinom ist bei Frauen mit einer Inzidenz von 28% das mit Abstand häufigste Karzinom in Deutschland. Etwa jede zehnte Frau erkrankt in ihrem Leben an einem Mammakarzinom, wobei der Höhepunkt des Erkrankungsalters zwischen 65 und 69 Jahren liegt. Im Jahre 2010 erkrankten ca. 58.000 Frauen neu an Brustkrebs (RKI 2010) in Deutschland. Im Vergleich zu Männern sind Frauen ungefähr 100 Mal häufiger betroffen weltweit (Jemal, Siegel et al.). Langfristig gesehen ist die altersstandardisierte Brustkrebsinzidenz bei deutschen Frauen zwischen 1980 und 2004 um insgesamt ca. 50% gestiegen. Im europäischen Vergleich nehmen diese deutschen Frauen einen unteren Mittelfeldplatz in den altersstandardisierten Neuerkrankungsraten ein (Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V., 7. Ausgabe).

Für die Entstehung des Mammakarzinoms sind im Wesentlichen drei Einflussfaktoren maßgeblich: ethnische, soziale und genetische. Insbesondere die ethnischen und sozialen Faktoren stehen oft in einem Zusammenhang.

In ethnischer Hinsicht zeigt sich z.B. bei weißen Frauen die höchste Erkrankungsrate im Vergleich zu schwarzen Frauen oder weiteren ethnischen Gruppen (American Cancer Society 2009-2010). Als sozialer Einflussfaktor auf die Inzidenz des Mammakarzinoms gilt etwa der Reproduktionsstatus. Eine verlängerte endogene Östrogenproduktion erhöht die Wahrscheinlichkeit, an einem Mammakarzinom zu erkranken. Ein geringes Alter beim Eintritt der Menarche sowie ein späte Menopause lassen das Risiko wachsen (Hsieh, Trichopoulos et al. 1990; Cancer 1997; Colditz and Rosner 2000), bei einer zweijährigen Verzögerung der Menarche ergibt sich dagegen ein Sinken des Risikos um ca. 10% (Hsieh, Trichopoulos et al. 1990). Nullipara haben im Vergleich zu Frauen, die ein Kind bekommen, ein gesteigertes Risiko (Colditz and Rosner 2000). Je jünger die Frau bei der Geburt des ersten Kindes ist, desto geringer fällt das Risiko für ein Mammakarzinom aus (Rosner, Colditz et al. 1994). Ein weiterer, durch den

Lifestyle geprägter Faktor, ist der Body-Mass-Index (BMI), der unterschiedliche Auswirkungen bei prämenopausalen und postmenopausalen Frauen bewirkt. Prämenopausale Frauen mit einem BMI über 31 scheinen ein deutlich erniedrigtes Risiko (ca. 46%) im Gegensatz zu Frauen mit einem BMI unter 21 zu haben (van den Brandt, Spiegelman et al. 2000). Eine postmenopausale Gewichtszunahme ist mit einem gesteigerten Risiko für Brustkrebs assoziiert (van den Brandt, Spiegelman et al. 2000; Lahmann, Hoffmann et al. 2004; Eliassen, Colditz et al. 2006). Genetisch gesehen sind benigne Veränderungen der Brust, wie einfache Fibroadenome, fibrozystische Veränderungen oder solitäre Papillome, nicht mit einem gesteigerten Risiko für die Entstehung eines Mammakarzinoms verbunden. Treten mehrere dieser benignen Veränderungen auf, kommt es allerdings zu einem geringen Anstieg des Brustkrebsrisikos (Worsham, Raju et al. 2007). Zeigen nichtinvasive Veränderungen zelluläre Atypien, erhöht sich das Mammakarzinomrisiko. Proliferative Veränderungen wie komplexe Fibroadenome, sklerosierende Adenome und intraduktale Papillome ohne Atypien bewirken nur einen leichten Anstieg des Risikos, proliferative Veränderungen mit zellulären Atypien, wie die atypische lobuläre und duktales Hyperplasie, hingegen einen deutlichen. Sind diese Veränderungen multifokal in der Brust nachweisbar, steigt das Risiko sogar noch weiter (Degnim, Visscher et al. 2007). Wenn bereits in der Anamnese ein Karzinom in situ (K.i.s.) oder ein invasives Mammakarzinom vorhanden sind, liegt das Risiko, auf der Gegenseite ein K.i.s. oder ein Mammakarzinom zu entwickeln, bei ca. 5% (Fisher, Dignam et al. 1999).

## **1.2 Die Menopause: Symptome, Folgen und Behandlung**

Die Menopause wird von der Weltgesundheitsorganisation (WHO) als das natürliche, dauerhafte Ausbleiben der Menstruation und somit als Endpunkt der reproduktiven Kapazität bezeichnet (WHO 1994). Sie umfasst eine Zeitspanne von 12 hintereinander folgenden Monaten der Amenorrhoe, so dass ihr Beginn nur retrospektiv festgestellt werden kann.

Die Menopause ist Teil eines dreistufigen Prozesses. Ihr voran geht zunächst die Prämenopause, welche sich durch beginnende Zyklusunregelmäßigkeiten aufgrund einer abnehmenden ovariellen Hormonproduktion äußert. Die Menopause ist gekennzeichnet durch die ovarielle Minderfunktion, die im Resultat zu einer erloschenen follikulären Funktion führt. Prämenopause und Menopause werden zusammenfassend als Perimenopause (Klimakterium) bezeichnet. Die Postmenopause bezieht sich auf einen Zeitraum nach der Menopause. Zu unterscheiden sind die natürliche und eine iatrogene Menopause. Letztere ist zum Beispiel Folge einer bilateralen Ovarektomie und bedeutet somit die Beendigung der ovariellen Hormonproduktion (WHO 1994).

Der Alterseintritt von Frauen in die Menopause beträgt im Schnitt 51 Jahre. Bis zu 95% der Frauen erleben die Menopause im Alter zwischen 45 und 55 Jahren (Belchetz 1994). Aufgrund der im letzten Jahrhundert stark gestiegenen Lebenserwartung verbringen sie ca. ein Drittel Ihrer Lebenszeit in der Postmenopause. Am Anfang der Wende zum 20. Jahrhundert lag die Lebenserwartung bei 48 Jahren. 1990, 2000 und 2009 stieg sie für das weibliche Geschlecht von 78 über 81 bis auf 83 Jahre an (WHO 2009).

Die aus der erhöhten Lebenserwartung resultierende Verlängerung der Postmenopause muss im Zusammenhang mit den damit einhergehenden belastenden Symptomen gesehen werden. In der Menopause bzw. danach kommt es unter Anderem zu Hitzewallungen, nächtlichen Schweißausbrüchen, Scheidentrockenheit, depressiver Verstimmung, Osteoporose mit gesteigertem Frakturrisiko, urologischen Problemen und verminderter Libido (Belchetz 1994; Langer 2009).

Zur Behandlung solcher postmenopausalen Symptome hielt man Östrogene zunächst für das effektivste Mittel und setzte es daher auch besonders häufig ein (Belchetz 1994). So stieg in den USA der Anteil der Frauen, die eine postmenopausale Hormonersatztherapie (Östrogen alleine oder in Kombination mit Gestagenen) erhielten, zwischen den Jahren 1995 bis 2001 von 33 auf 42%. Nach dem Juli 2002 kam es jedoch zu einem Absinken der Rate auf 28% (Hersh, Stefanick et al. 2004). Dieser schnelle Wandel in der Hormonsubstitutionstherapie ist auf Studien der WHI (Women's Health Initiative) zurückzuführen.

In einer ersten WHI-Studie, in die insgesamt 16608 Frauen eingeschlossen wurden, erhielt die gegen eine Placebogruppe verglichene Verumgruppe Östrogen kombiniert mit Medroxyprogesteronazetat (Gestagen). Ziel der Studie war es herauszufinden, ob Östrogen mit einem Placebo oder in Kombination mit einem Gestagen eine Senkung des Risikos von kardiovaskulären Erkrankungen zeigt. Ein Nachweis der Auswirkung auf die menopausalen Symptome war nicht das Ziel der Studie. Die Studie, deren Ende für 2005 vorgesehen war, wurde bereits vorzeitig im Juli 2002, nach 5,2 Jahren, abgebrochen.

Die Gründe für den Abbruch lagen im vermehrten Auftreten von Mammakarzinomen, koronaren Herzkrankheiten, Schlaganfällen und venösen Thromboembolien im Östrogen-Gestagen-Arm. Dagegen erwiesen sich als signifikante Vorteile eine verminderte Anzahl kolorektaler Karzinome als auch eine Senkung des Risikos einer osteoporotischen Fraktur. Die erwiesenen Nachteile überwogen also deutlich die Vorteile (Rossouw, Anderson et al. 2002).

In einer weiteren WHI-Studie mit ca. 11.000 hysterektomierten Frauen wurde eine kontinuierliche, alleinige Östrogengabe gegen eine Placebogabe verglichen. Diese Studie wurde ebenfalls vorzeitig aufgrund vermehrten Auftretens von Schlaganfällen in der Östrogengruppe abgebrochen (Anderson, Limacher et al. 2004).

Im Vergleich zu den Ergebnissen der ersten WHI-Studien ist allerdings eine Kombination aus Östrogen mit Gestagen, im Gegensatz zu einer alleinigen Östrogengabe, bei nicht hysterektomierten Frauen vorteilhaft, weil sich verminderte Raten von endometrialen Hyperplasien und als Folge davon auch eine gesunkene Inzidenz von

Endo-metriumkarzinomen zeigten (Woodruff and Pickar 1994; Anderson, Judd et al. 2003).

Der Nachweis solcher nachteiliger Wirkungen einer postmenopausalen Hormonersatztherapie wird durch eine Reanalyse von insgesamt 51 epidemiologischen Studien ebenfalls gestützt, in der insgesamt 52705 Frauen mit und 108411 Frauen ohne Mammakarzinom untersucht wurden: Für jedes Jahr, in dem eine postmenopausale Hormonersatztherapie durchgeführt wird, kommt es zu einer Steigerung des Brustkrebsrisikos um 2,3% (Cancer 1997). Diese Steigerung des Brustkrebsrisikos war auf eine Kombination von Östrogen mit Progesteron zurückzuführen. Eine Östrogenmonotherapie zeigte dagegen keine Steigerung (Cancer 1997).

Weitere Studien konnten die nachteilige Kombination von Östrogen und Progesteron auf die mammographische Brustdichte mit einer Steigerung von 3-5% nachweisen (Greendale, Reboussin et al. 2003). Hinsichtlich der Vergabe von alleinigem Östrogen zeigte sich für die Wirkung auf die mammographische Brustdichte kein einheitliches Bild. In einer Studie konnte eine geringe, jedoch signifikante Steigerung im Vergleich zum Placebo nachgewiesen werden (Freedman, San Martin et al. 2001), in einer anderen zeigte sich dagegen keine (Greendale, Reboussin et al. 2003).

### **1.3 Androgene der Frau**

Die wichtigsten Androgene der prämenopausalen Frau im Serum sind nach absteigender Konzentration: Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S), Dehydroepiandrosteron (DHEA), Androstendion (A), Testosteron (T) und Dihydrotestosteron (DHT) (Burger 2002). DHEA-S, DHEA und Androstendion sind Prohormone, die eine Konversion in Testosteron oder Dihydrotestosteron benötigen, um androgen effektiv zu sein.

Das potenteste Serumandrogen ist Testosteron. Testosteron wird zu 25% in der Zona fasciculata der Nebennierenrinde und zu 25% im Stroma des Ovars gebildet. Die übrigen 50% entstehen über eine Konversion von Androstendion (Judd, Judd et al. 1974). Die Testosteronkonzentration im Serum zeigt keinen signifikanten Abfall im Zusammenhang mit der Menopause. Jedoch ergibt sich mit zunehmendem Alter ein allmählicher Rückgang der Serumandrogenkonzentration bei Frauen (Burger, Dudley et

al. 2000). In der Postmenopause ist das Ovar die Hauptproduktionsstelle für Androgene. (Laughlin, Barrett-Connor et al. 2000) Der Unterschied der Konzentration von Testosteron im Ovar im Vergleich zur Konzentration im Serum ist größer bei postmenopausalen Frauen als bei prämenopausalen Frauen. Nach einer bilateralen Ovariectomie kommt es zu einem Absinken der Serumkonzentration von Testosteron zwischen 40 und 50% (Judd, Judd et al. 1974).

### **1.4 Transdermale Testosteronersatztherapie**

Vermindertes sexuelles Verlangen gilt als die häufigste weibliche sexuelle Funktionsstörung (Laumann, Paik et al. 1999). Es wird geschätzt, dass 40% aller Frauen, die sich in der Postmenopause befinden, an einer verminderten Libido leiden (Simon, Klaiber et al. 1999) und ca. 12% von belastenden sexuellen Problemen berichten. (Shifren, Monz et al. 2008).

Ungefähr 50% derjenigen Frauen, die eine verringertes sexuelles Verlangen (hypoactive sexual desire disorder [HSDD]) zeigen, bewerten diesen Sachverhalt als umfangreichen Verlust der gesundheitsbezogenen Lebensqualität (Leiblum, Koochaki et al. 2006; Biddle, West et al. 2009).

Zur Steigerung des sexuellen Verlangens bei postmenopausalen Frauen gab es bis Oktober 2012 die Möglichkeit der „in-label“-Testosteronersatztherapie. Diese zeigt mit und ohne parallele Östrogentherapie bei postmenopausalen Frauen eine verbesserte sexuelle Funktion in vielen Studien, und zwar unabhängig davon, ob die Menopause natürlich eingetreten ist oder durch eine medizinisch notwendige bilaterale Ovariectomie erzeugt wurde (Modelska and Cummings 2003; Braunstein, Sundwall et al. 2005; Somboonporn, Davis et al. 2005; Shifren, Davis et al. 2006). Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Anhebung der Testosteronserumkonzentration über den normalen Grenzwert konstant eine Verbesserung der weiblichen sexuellen Funktion in postmenopausalen Frauen zeigt (Society 2005).

Seit 2006 bis 2012 bestand in Deutschland die Option des transdermalen Testosteronersatzes bei der Therapie von Frauen mit HSDD. In dieser Hinsicht liegen allerdings nur wenige Daten und Studien zu Risiken und Nebenwirkungen vor.

Vorhergehende Beobachtungsstudien über die Verwendung von Androgenen in verschiedenen Dosen, Applikationsformen und in Kombination mit Östrogenen erbrachten zum Teil gegensätzliche Resultate (Dimitrakakis, Zhou et al. 2003; Tamimi, Hankinson et al. 2006; Jick, Hagberg et al. 2009; Panzer and Guay 2009; van Staa and Sprafka 2009).

In einer Studie aus dem Jahre 2008 wurde die Wirkung von transdermalem Testosteron bei 814 Frauen in der natürlichen oder chirurgischen Menopause untersucht; diese Frauen erhielten keine zusätzliche Hormontherapie. Die Frauen in der Testosterongruppe bekamen entweder 150 oder 300 Mikrogramm/Tag oder ein Placebopflaster. Die Testosterongruppe mit der 300 Mikrogramm/Tag-Dosis zeigte eine deutliche, signifikante Verbesserung der sexuellen Funktion gegenüber der Placebogruppe. Auch in der Gruppe mit der 150 Mikrogramm/Tag-Dosis ließ sich eine leichte signifikante Verbesserung nachweisen (Davis, Moreau et al. 2008; Davis 2009). Die Ergebnisse dieser Testosteronsubstitution sind unabhängig davon, ob die Frauen auf natürlichem oder chirurgischem Weg die Menopause erreichten. In der Behandlungsgruppe zeigten sich vier Fälle von neu aufgetretenem Brustkrebs, im Vergleich dazu war in der Placebogruppe kein solcher Fall zu registrieren (Davis, Moreau et al. 2008; Davis 2009). Dabei konnte nicht geklärt werden, ob dieser Sachverhalt zufällig oder aufgrund der alleinigen Testosterongabe eingetreten ist.

In Ergänzung dazu zeigen andere Studien über einen Zeitraum von 6 Monaten bei einer Dosis von 300 Mikrogramm/Tag, mit oder ohne begleitende Östrogenersatztherapie, eine effektive und sichere Therapie zur Steigerung der sexuellen Funktion (Buster, Kingsberg et al. 2005; Simon, Braunstein et al. 2005; Shifren, Davis et al. 2006).

Kritik an derartigen Studien bezieht sich auf den zentralen Sachverhalt, dass ein beobachteter Testosteroneffekt aufgrund einer möglichen Metabolisierung von Testosteron zu Östrogenen dementsprechende unerwünschte Östrogenwirkungen nach sich ziehen könnte.

Erfolgt eine Zugabe von Testosteron während einer kombinierten Hormontherapie bei postmenopausalen Frauen, zeigte sich kein Einfluss auf die in der Mammographie festgestellte Dichte der Brust in einem Zeitraum von 6 Monaten (Hofling, Lundstrom et al. 2007).

Bei Gabe von anderen Androgenen, wie beispielsweise Dehydroepiandrosteron (DHEA), zeigte in sich in Studien eine Steigerung des sexuellen Interesses sowie der sexuellen Befriedigung bei Frauen mit einer Nebenniereninsuffizienz. DHEA zeigt jedoch keinen Effekt bei Frauen prämenopausal oder in der natürlichen Menopause (Morales, Nolan et al. 1994; Barnhart, Freeman et al. 1999).

Nur wenige Studien untersuchten den Effekt der Testosteronsubstitution auf die weibliche sexuelle Funktion bei prämenopausalen Frauen. In einer Studie mit 261 Frauen im Alter zwischen 35 und 46 Jahren, die eine verringerte sexuelle Zufriedenheit zeigten, ergab sich nach Applikation von transdermal aufgebrachtem Testosteronspray eine Verbesserung der sexuellen Zufriedenheit bei einer Dosis von 90 µl/Tag (Davis, Papalia et al. 2008).

Des Weiteren hat sich gezeigt, dass Testosteron die Fähigkeit besitzt, die Östrogen- bzw. Progesteron-induzierte Proliferation von humanen Brustzellen zu inhibieren (Hofling, Hirschberg et al. 2007).

### **1.5 Die lokale Östrogensynthese der Brust**

Die bedeutende Rolle von Östrogenen in der Genese von Brustkrebs ist anerkannt (Russo J 2004). Das hauptsächlich aktive und für die Brusttumorentstehung verantwortliche Östrogen im Brustgewebe ist Östradiol (E2). Der größte Anteil der Frauen, die an Brustkrebs erkranken, befindet sich in der Postmenopause, in der der Plasmalevel von E2 um 90% vermindert ist. Das bei postmenopausalen Frauen überwiegend im Kreislauf zirkulierende Östrogen ist Östronsulfat (E1S). Deshalb muss das für die Brusttumorentstehung hauptsächlich verantwortliche E2 lokal synthetisiert werden.

Diese lokale Synthese erfolgt in Brust- und Brusttumorzellen, die in der Lage sind, mit dem zelleigenen enzymatischen System Östrogene aus im Plasma zirkulierenden Vorläufermolekülen herzustellen.

Einbezogen in die Hauptwege dieses enzymatischen Prozesses sind 3 Enzyme (siehe Abbildung 1):

1. Aromatase -> Konvertierung von Androgenen in Östrogene (Abul-Hajj, Iverson et al. 1979; Harichand-Herdt, Zelnak et al. 2009),
2. E1S-Sulfatase -> Hydrolyse von Östronsulfat zu Östron (E1) (Dao, Hayes et al. 1974; Prost, Turrel et al. 1984; Pasqualini, Caubel et al. 2003),
3. 17 $\beta$ HydroxysteroidDehydrogenase Typ 1 (17 $\beta$ HSD-1) -> Reduktion von E1 zu E2 und Reduktion von DHEA zu Androstendiol (Luu The, Labrie et al. 1989; Suzuki, Miki et al. 2005).

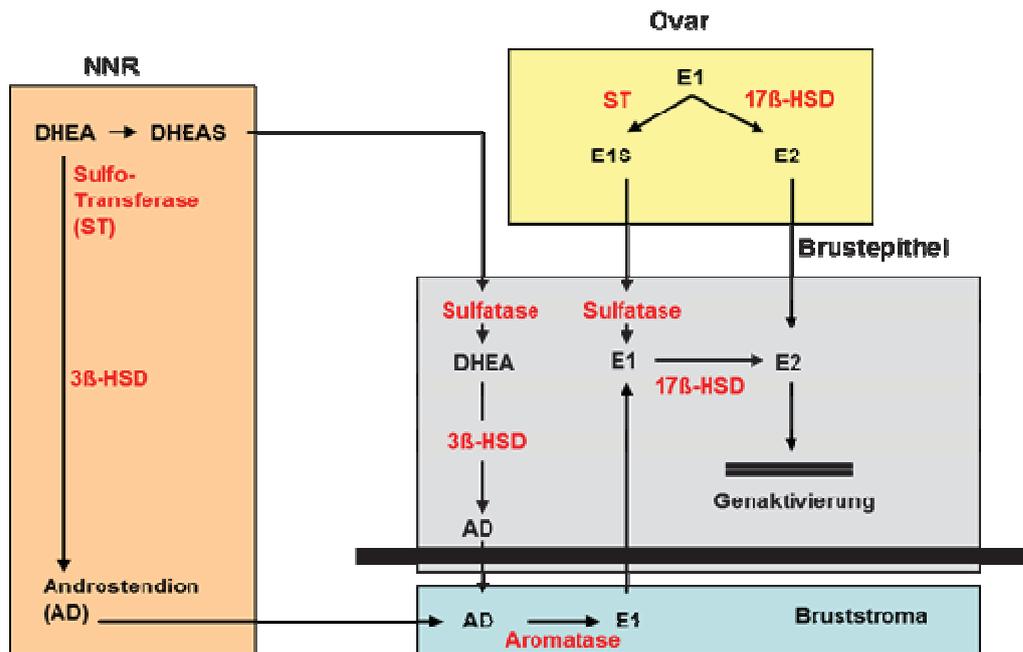


Abbildung 1: Lokale Östrogensynthese modifiziert nach Russo et al (Russo J 2004). Abkürzungen: NNR=Nebennierenrinde; DHEA(S) = Dehydroepiandrosteron(-sulfat); E1= Östron; E2 = Östradiol; E1S = Östronsulfat; 3 $\beta$ HSD = 3 $\beta$ -Dehydrogenase; 17 $\beta$ HSD = 17 $\beta$ -Dehydrogenase

Im Tiermodell konnte gezeigt werden, dass bis zu 50% der im Brust(tumor)gewebe gemessenen Östrogenkonzentration lokal synthetisiert wird (Masamura, Santner et al.

1996). Tatsächlich besitzen sowohl Mammakarzinomzellen *in vitro* als auch normales und malignes Brustgewebe von Mensch und Tier (z.B. Nagetiere, Primaten) alle notwendigen Enzyme, um aus Vorläufermolekülen im Plasma lokal Östrogene zu bilden (Abul-Hajj, Thijssen et al. 1988; Henderson, Ross et al. 1988; Martel, Melner et al. 1994).

### **1.5.1 Aromatase**

Das Enzym Aromatase ist ein Produkt des CYP19-Gens, das auf dem Chromosom 15q21.1 lokalisiert ist. Die codierende Region umfasst eine Größe von ungefähr 30 kb, wobei die regulatorische Komponente eine Region von 93 kb umfasst (Simpson, Mahendroo et al. 1993; Bulun, Takayama et al. 2004).

Insgesamt besteht das Aromatasegen aus zehn Exons, wobei die Exons 2 bis 10 die codierende Region enthalten. Das entstehende Protein umfasst insgesamt 503 Aminosäuren, wobei die Molekularmasse des glykosylierten Cytochrom P450 Proteins 58,000 Dalton beträgt (Gartner, Thompson et al. 2001). Im Östrogenstoffwechsel ist die Aromatase ein Schlüsselenzym, da es verantwortlich ist für den letzten Schritt der Konversion von Androgenen zu Östrogenen (Santen and Harvey 1999), so dass aus Androstendion (AD) E1 und aus Testosteron (T) E2 entsteht (Milani, Jha et al. 2009).

In der Postmenopause sind Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEA-S) die wichtigsten Androgenquellen im peripheren Gewebe zur Synthese von Östrogenen. Das in der Blutbahn zirkulierende DHEA wird vom Brustgewebe aufgenommen. Über das Enzym 17 $\beta$ -HSD und die Aromatase entstehen Androstendion und in Folge davon E1 (siehe Abbildung 2) (Milani, Jha et al. 2009).

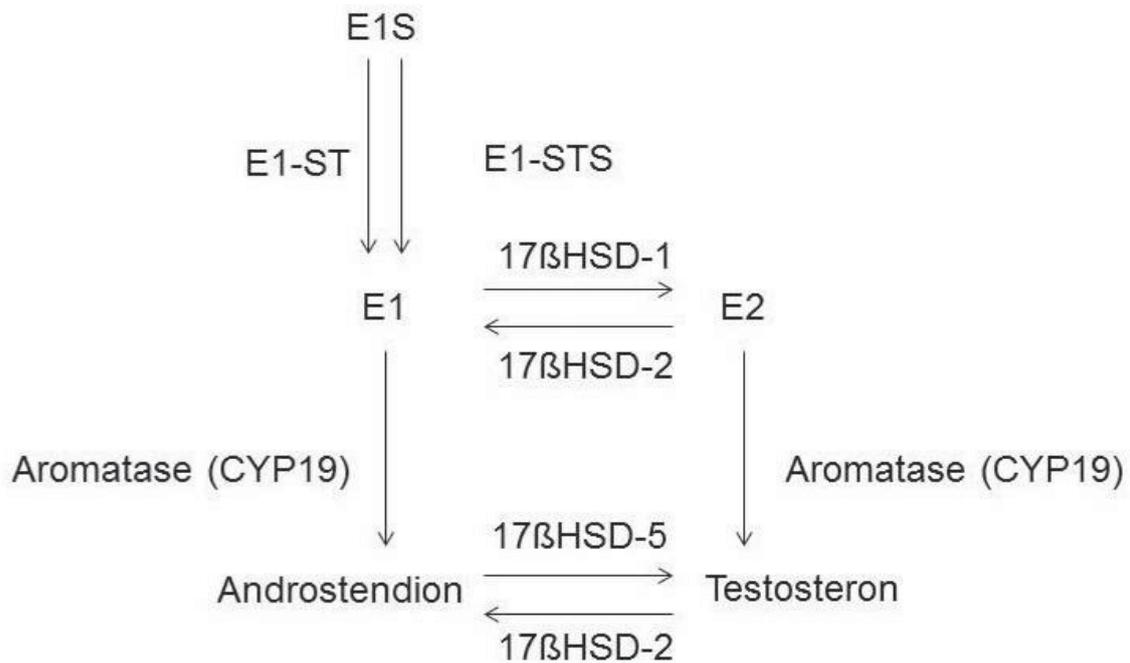


Abbildung 2 modifiziert nach (Milani, Jha et al. 2009): Darstellung der Rolle des Enzyms Aromatase (CYP19) in der Östrogensynthese. Androstendion wird durch CYP19 in E1 und Testosteron in E2 umgewandelt. Über  $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen kann wiederum eine Umwandlung von E1 in E2 und von Androstendion in Testosteron und umgekehrt erfolgen.

Die Lokalisation der Aromatase und der Reaktionsweg sind bereits in der Literatur beschrieben worden: Der Enzymkomplex ist an das endoplasmatische Retikulum gebunden und besteht aus zwei Proteinen (Simpson, Mahendroo et al. 1993; Simpson, Mahendroo et al. 1994), dem Cytochrom P450-Aromatase, einem Häm-Protein, und aus einer NADPH-Cytochrom P450-Reduktase. Cytochrom P450arom konvertiert C19-Steroide (Androgene) in C18-Steroide (Östrogene). Das zweite Protein ist verantwortlich für die Übertragung von H<sup>+</sup>-Ionen von NADPH auf die Cytochrom P450-Aromatase. Die Aromatisierung läuft in mehreren Schritten ab: Zunächst erfolgt eine Hydroxylierung der Methylgruppe des Ausgangssubstrats Androstendion an C19 zum C19-Hydroxy-Androstendion. Aus Letzterem bildet sich 19,19-Dihydroxyandrostendion, welches in einer weiteren Hydroxylierungsreaktion in 19-Oxoandrostendion überführt wird. Der abschließende Oxidationsprozess und die Bildung von E1 sind nicht eindeutig geklärt. Bei den Reaktionen werden insgesamt

3 Mol NADPH und drei Mol Sauerstoff benötigt, um ein Mol Substrat in ein Mol Östrogen umzuwandeln (siehe Abbildung 3) (Brueggemeier, Hackett et al. 2005).

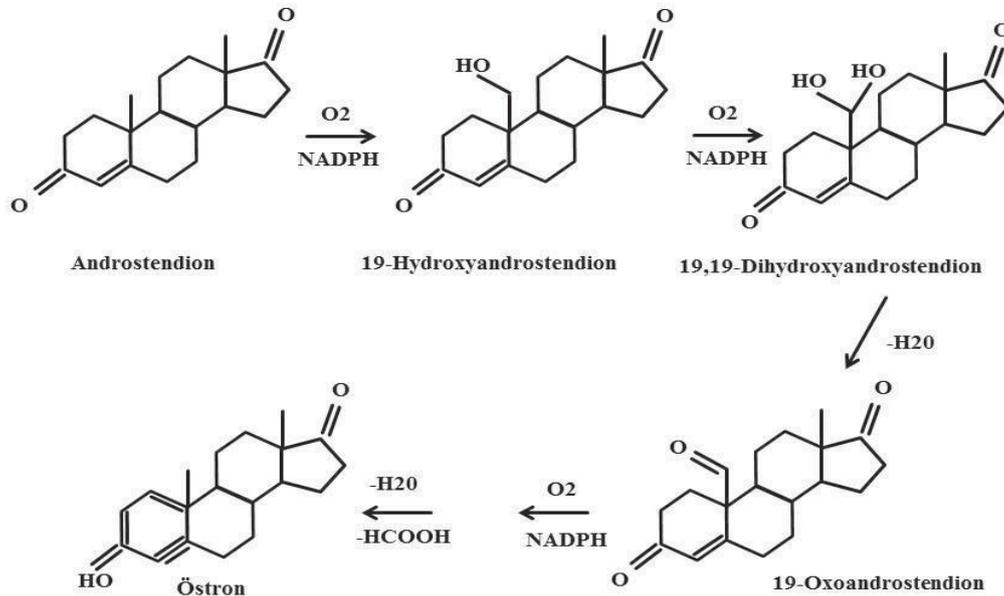


Abbildung 3 modifiziert nach (Brueggemeier, Hackett et al. 2005): schematische Darstellung des Reaktionsweges von Androstendion zu E1 über die verschiedenen Zwischenprodukte

Ein Nachweis der Aromataseaktivität erfolgte in verschiedenen Geweben, denn sie wurde nicht nur in den Gonaden und der Plazenta nachgewiesen (de Ronde and de Jong 2011), sondern auch in menschlichen Haaren (Schweikert, Milewich et al. 1975), im Gehirn (Stoffel-Wagner, Watzka et al. 1999), im Fettgewebe (Schindler, Ebert et al. 1972), in der Muskulatur, im Knochen (Schweikert, Wolf et al. 1995) und im vaskulären Gewebe (Harada, Sasano et al. 1999). Die höchsten Aromatasevorkommen finden sich in den Ovarien prämenopausaler Frauen, der Plazenta schwangerer Frauen und im peripheren Fettgewebe von Frauen und Männern.

Der in vitro Nachweis einer Aromataseaktivität im Brustgewebe konnte geführt werden (James, McNeill et al. 1987; Miller and O'Neill 1987; Reed, Owen et al. 1989). Sasano et al. konnten immunhistochemisch zeigen, dass die Aromatase in interstitiellen Zellen oder in Stromazellen im Brusttumorgewebe vorhanden ist (Sasano, Nagura et al. 1994). Demgegenüber haben Lu et al. mit Hilfe eines monoklonalen Antikörpers in malignem humanem Brustgewebe nachgewiesen, dass die Aromatase hauptsächlich in Epithelzel-

len zu finden ist (Lu, Nakmura et al. 1996). Es ist daher von einer auto- bzw. parakrinen Stimulation der Epithelproliferation in malignem Brustgewebe und einer rein parakrin stimulierten Epithelproliferation in nicht malignem Gewebe auszugehen.

Die Bedeutung der Aromatase in der Brusttumorentstehung ergibt sich aus der Feststellung, dass die Aromataseexpression am höchsten im Brusttumorgewebe oder in dessen Umgebung ist (Miller and O'Neill 1987; Bulun, Price et al. 1993). In 70% aller Mammakarzinome ist die Aromataseaktivität nachweisbar, wobei die Aktivität im Tumorgewebe höher ist als im benachbarten und normalen Brustgewebe (James, McNeill et al. 1987). Klinische Studie konnten jedoch keine Korrelation zwischen Aromataseaktivität und prognostischen Faktoren wie Alter, Menopausenstatus, Tumorgroße, Nodalstatus, Hormonrezeptorstatus, Differenzierungsgrad und Überlebensdauer zeigen (de Jong, Blankenstein et al. 2001). Ebenfalls scheint der Expressionslevel der Aromatase mRNA keinen prognostischen Faktor darzustellen (Silva, Rowlands et al. 1989; Lipton, Santen et al. 1992).

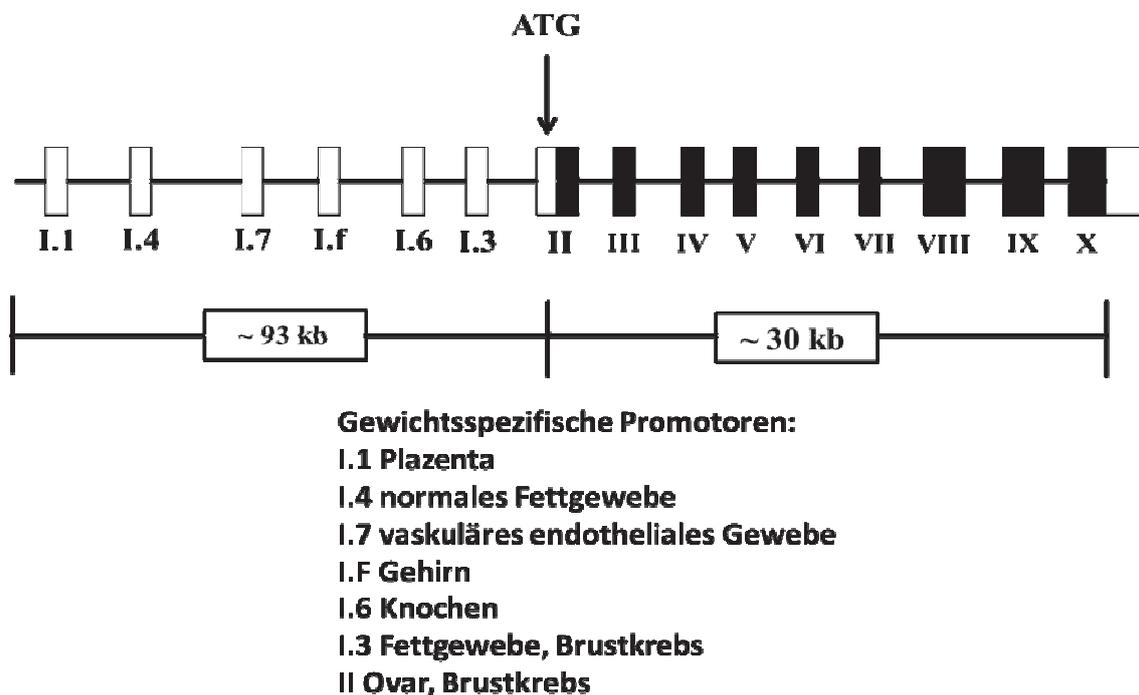


Abbildung 4: graphische Darstellung der verschiedenen Promotoren, modifiziert nach Brueggemeier et al. (Brueggemeier, Hackett et al. 2005)

Die Regulation des Aromatasegens und somit der Aromataseexpression erfolgt gewebspezifisch durch Promotoren, die in Art und Lokalisation variieren. Beim Übergang von normalem zu malignem Brustgewebe findet ein sog. Switch in der Promotorregion des CYP19-Gens statt.

In normalem Fettgewebe ist der Hauptpromotor I.4, der über Glukokortikoide sowie über die Zytokine Interleukin-1, Interleukin-6 und den Tumornekrosefaktor alpha reguliert wird (Brueggemeier, Hackett et al. 2005). In malignem Brustgewebe dominieren dagegen die Promotoren I.3 und II, wobei der Promotor II überwiegt (siehe Abbildung 5) (Zhao, Agarwal et al. 1996).

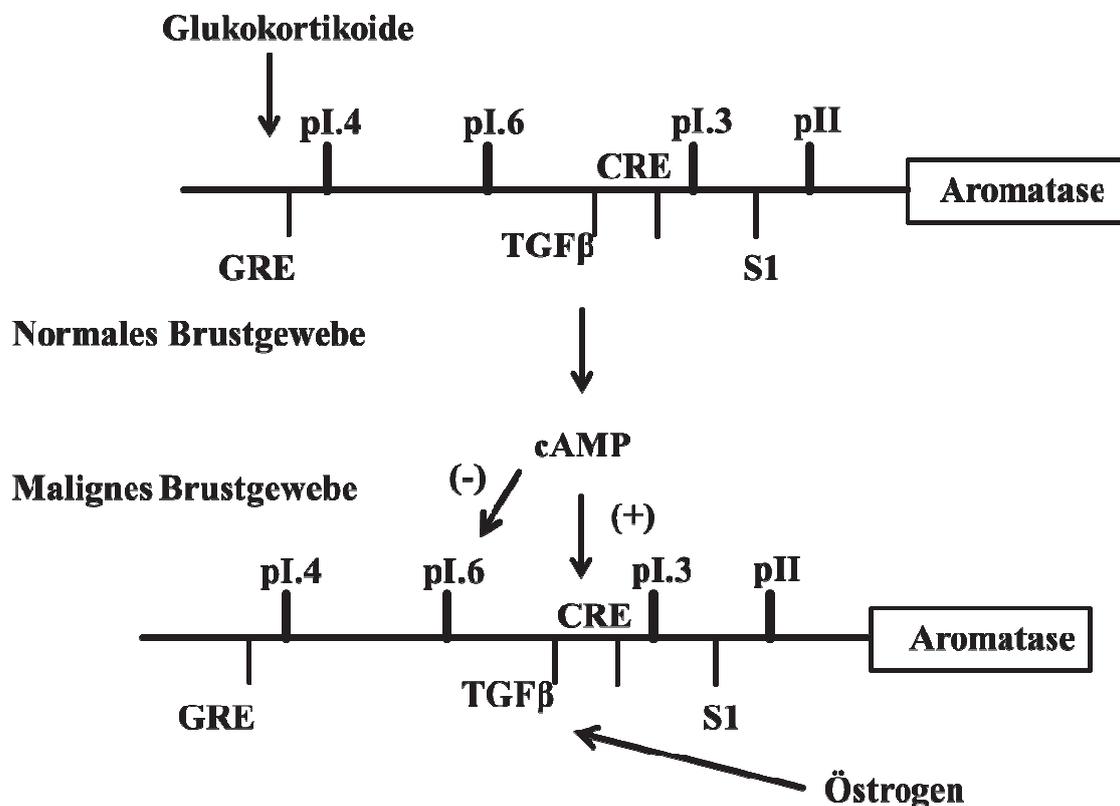


Abbildung 5: Hypothese der Regulation der Aromataseexpression in normalem (a) und malignem (b) Brustgewebe, modifiziert nach Chen et al. [85] Abkürzungen: p = Promoter; GRE= Glukokortikoid-responsive Element; CRE= cAMP responsive Element; S1 = Silencer Element, (+) = stimulierender Einfluss, (-) hemmender Einfluss

In malignen Brusttumoren ist die Stimulierung des eigentlichen Promotors I.4 über Glukokortikoide bzw. über Zytokine nicht mehr vorhanden. Zhao et al. konnten nachweisen, dass Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), indirekt über eine Anhebung der intrazellulären cAMP-Level, zu einer Erhöhung der lokalen Östrogensynthese führt. In malignem Brustgewebe kommt es über einen gesteigerten cAMP-Level zu einer Stimulation der Promotoren I.3 und II (Zhao, Agarwal et al. 1996).

Die lokale Bildung von PGE<sub>2</sub> über die Enzyme Cyclooxygenase 1 und 2 findet vor allem in Epithelzellen von Brusttumoren und umgebenden Fibroblasten statt (Zhao, Agarwal et al. 1996). Einige Studien haben gezeigt, dass dieser biochemische Mechanismus eine Erklärung dafür liefern kann, dass sich die Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika (NSAP) günstig auf die Prognose eines Mammakarzinoms auswirkt (Harris, Namboodiri et al. 1996; Harris, Robertson et al. 1999; Arun and Goss 2004).

### **1.5.2 E1S-Sulfatase (STS)**

Sulfatase (STS) bzw. Arylsulfatase C ist verantwortlich für die Hydrolyse von Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) und Östronsulfat (E1S) zu den jeweils unkonjugierten Formen (Reed, Purohit et al. 2005).

Die Sulfatierung von Östrogenen führt von hydrophoben zu hydrophilen Molekülen. Sulfatierte Östrogene können nicht an den Östrogenrezeptor binden und sind deshalb biologisch inaktiv. Die Konzentration von konjugiertem, sulfatiertem E1 ist deutlich höher als die der unkonjugierten Östrogene (Noel, Reed et al. 1981; Pasqualini, Gelly et al. 1989). Sulfatierte Östrogene werden im Blut an Albumin gebunden und haben eine Halbwertszeit von ca. 9 Stunden, welche damit deutlich länger ist als die der unkonjugierten Formen (Ruder, Loriaux et al. 1972). Die verlängerte Halbwertszeit und die generell höhere Konzentration von E1S könnten dafür sprechen, dass E1S das Reservoir bildet für die Synthese von biologisch aktiven Östrogenen (E1 und E2) über die Sulfatase (Reed, Purohit et al. 2005).

Die STS ist Mitglied einer Superfamilie von insgesamt 16 verschiedenen Sulfatasen beim Säugetier (Obaya 2006). Das kodierende Gen für die STS, welches 10 Exons

umfasst, ist auf dem distalen, kurzen Arm des X-Chromosoms lokalisiert. Daraus resultiert ein Genprodukt von 583 Aminosäuren (Reed, Purohit et al. 2005), wobei die Masse des entstehenden STS Proteins 65k Dalton beträgt (Stein, Hille et al. 1989). Auf dem Y-Chromosom hingegen befindet sich ein transkriptionell inaktives Pseudogen.

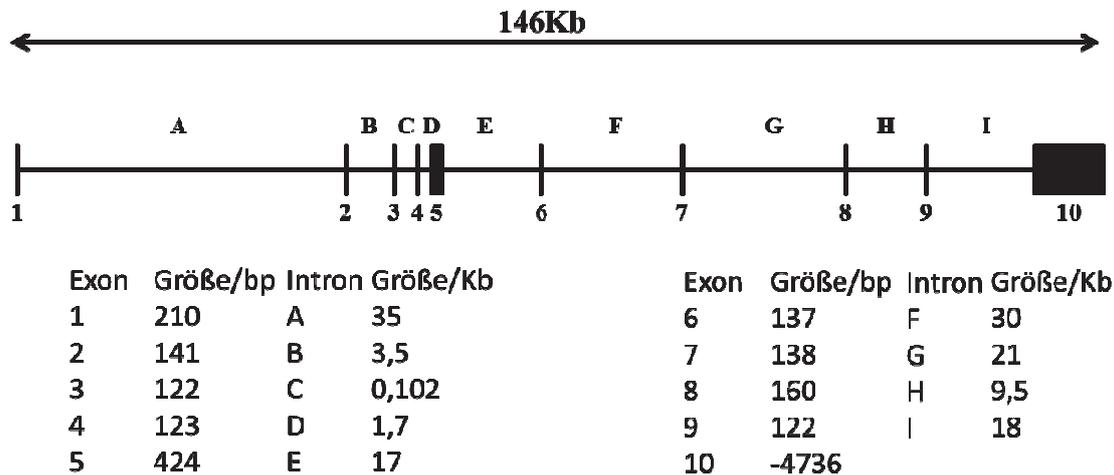


Abbildung 6: graphische Darstellung der Exon-Intron-Struktur des STS Gens, modifiziert nach Reed et al. (Reed, Purohit et al. 2005), bp = Basenpaare, Kb = Kilobasenpaare

Für die Sulfatasecodierung steht nur ein Gen zur Verfügung, es gibt jedoch verschiedene Isoformen des Enzyms. In Fibroblasten konnte eine schnelle und eine langsame Isoform entdeckt werden (Simard, Ameen et al. 1985) und in der Plazenta eine nukleäre und eine mikrosomale (Gniot-Szulzycka and Januszewska 1986).

Der erste Beleg für eine Sulfataseaktivität erfolgte durch Dodgson et al. in den Mikrosomen der Rattenleber (Dodgson, Melville et al. 1954). Später wurde das Enzym auch in Hoden (Payne, Mason et al. 1969), den Ovarien (Clemens, Kabler et al. 2000) und peripheren Leukozyten (Han, Fencl et al. 1987) nachgewiesen.

Es folgten als weitere Fundstellen die Nebenniere, die Prostata, die Plazenta, die Haut, die Niere, die fetale Lunge (Hobkirk, Cardy et al. 1982), die Viszera, das Endometrium, die Aorta, der Knochen und das Gehirn. Die somit nahezu ubiquitär vorhandene Sulfatase zeigt sich allerdings nicht in Erythrozyten (Reed, Purohit et al. 2005).

Das subzelluläre Vorkommen der STS konnte von Willemsen et al. in kultivierten humanen Fibroblasten hauptsächlich im rauen endoplasmatischen Retikulum belegt

werden. Des Weiteren ist ein STS-Nachweis in den Zisternen des Golgiapparates, dem trans-Netzwerk des Golgiapparates, erfolgt, wo es über die Mannose-6-phosphat-Rezeptoren transportiert wird (Willemsen, Kroos et al. 1988). Zusätzlich wurden geringe Vorkommen der STS in der Plasmamembran und den Komponenten des endozytischen Signalwegs (z.B. coated pits, Endosomen) gefunden (Willemsen, Kroos et al. 1988).

Andere immunhistochemische Studien zeigten bei Ratten einen Sulfatasenachweis in der Zellkernmembran von Hepatozyten, im proximalen Tubulus der Niere, dem Plexus choroideus, der Adenohypophyse und der Glandula pinealis des Rattenhirns (Kawano, Kotani et al. 1989). Des Weiteren erfolgte der Nachweis im Zytoplasma von Zellen eines ovariellen Adenokarzinoms (Okuda, Saito et al. 2001) und in glandulären Epithelzellen des Endometriums bei Frauen (Ezaki, Motoyama et al. 2001) und der glatten Muskulatur der menschlichen Aorta (Nakamura, Miki et al. 2003).

Über die Regulierung der STS Aktivität oder der STS Expression ist wenig bekannt. Aufgrund der Tatsache, dass die Expression von anderen Enzymen der Östrogenbiosynthese durch Zytokine, Wachstumsfaktoren und Steroidhormonen beeinflussbar ist, erfolgten Studien mit den gleichen Substanzen zur STS-Steuerung.

Die Zytokine IL-6 und TNF-alpha erhöhen die STS Aktivität in Brustkrebszellen (Purohit, Reed et al. 1996; Purohit A and MJ 1997) und steigern die Aktivität der Sulfatase ohne Einflussnahme auf die Promotorregion des STS-Gens. Dies lässt vermuten, dass IL-6 und TNF-alpha die STS Aktivität mittels einer posttranslationalen Modifikation des aktiven Zentrums des Enzyms oder über eine vermehrte Substratverfügbarkeit beeinflussen (Newman, Purohit et al. 2000).

Der Fibroblastenwachstumsfaktor und IGF-1 zeigen ebenfalls einen steigenden Einfluss auf die STS Aktivität in humanen Brustkrebszelllinien (MCF-7 und MDA-MB-231). Man nimmt an, dass die Sekretion dieser Wachstumsfaktoren durch Brusttumore die lokale Östrogenproduktion steigert (Purohit and Reed 1992).

In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass sowohl Androgene als auch Östrogene die STS Aktivität steigern (Moutaouakkil, Prost et al. 1984; Lam and Polani 1985).

Die Inkubation von humanen Brustkrebszelllinien mit dem Gestagen Medroxyprogesteronacetat ergab einen Anstieg der STS Aktivität. Die Wirkung erklärt man sich über

eine veränderte Membranfluidität, die zu einer möglichen gesteigerten Verfügbarkeit von Substrat führt (Purohit and Reed 1992).

Die Regulation der Aufnahme von sulfatierten Steroiden wird über membranständige Anionentransporterproteine vorgenommen (OATP) und kann somit zu einem vermehrten intrazellulären Steroidhormonspiegel führen (Hagenbuch and Meier 2003).

Bisher konnten zahlreiche Subtypen von OATP's identifiziert werden. Der dominante Anionentransporter in der Brust ist OATP-B (Pizzagalli, Varga et al. 2003). OATP-B wird in gesundem Gewebe nur von myoepithelialen, in malignem jedoch auch von Epithelzellen exprimiert (Reed, Purohit et al. 2005). Die Expression von OATP-B wird *in vitro* von den Prostaglandinen A1 und A2 stimuliert. Dieser Sachverhalt lässt vermuten, dass die Steroidaufnahme in die Zelle lokal an der Plasmamembran geregelt werden kann (Reed, Purohit et al. 2005).

Im Gegensatz zu den bisher genannten Substanzen verringert das inflammatorische Zytokin IL-1beta die Aktivität der Sulfatase und die Expression der Sulfatase mRNA dosisabhängig in humanen Stromazellen des Endometriums (Matsuoka, Yanaihara et al. 2002) sowie in glatten Muskelzellen der menschlichen Aorta (Nakamura, Miki et al. 2003). Die Regulation auf molekulargenetischer Ebene ist weitestgehend unbekannt.

Dahingegen erfolgte eine intensive Untersuchung der Rolle der STS in der Brusttumorentstehung, insbesondere im Vergleich zu anderen Enzymen der Östrogensynthese.

Die Aktivität der Aromatase lässt sich in nur 40-60% in Brusttumoren feststellen, im Gegensatz dazu ist in fast allen Brusttumoren eine STS Aktivität nachzuweisen (Tilson-Mallett, Santner et al. 1983; James, McNeill et al. 1987). Des Weiteren ist die Aktivität der STS höher als die des Enzyms Aromatase in Brusttumoren (James, McNeill et al. 1987). Dies führt dazu, dass über den STS-Weg mehr E1 als durch den Aromataseweg über Androstendion entsteht (Santner, Feil et al. 1984). In malignem Brustgewebe kann die Konzentration von gemessenem E1 und E2 bis zu zehnmal höher liegen als die Plasmawerte für die unkonjugierten Östrogene. In postmenopausalen Frauen sind die Plasmaöstrogenlevel logischerweise niedriger im Vergleich zu prämenopausalen Frauen, jedoch zeigen sich ähnliche Konzentrationswerte in malignem Brustgewebe in beiden Frauengruppen (Thijssen, Blankenstein et al. 1987; Thijssen and Blankenstein 1989).

Die Expression der STS mRNA ist in malignem Brustgewebe signifikant höher als in normalem (Utsumi, Yoshimura et al. 2000). Dieser Sachverhalt passt zu den Ergebnissen, dass die enzymatische Aktivität in malignen Brusttumoren gesteigert ist (Pasqualini, Chetrite et al. 1996). In weiteren Studien hat sich gezeigt, dass eine hohe Expression von Sulfatase mRNA ein unabhängiger Faktor für das rezidivfreie Überleben ist. Somit geht ein hoher Expressionsgrad mit einer schlechten Prognose einher (Utsumi, Yoshimura et al. 1999). Die Expression der mRNA der Sulfatase zeigt darüber hinaus eine Korrelation mit der Primärtumorgroße. Tumoren mit Lymphknotenmetastasen zeigen eine signifikant höhere STS mRNA Expression als Tumore ohne Lymphknotenmetastasen (Miyoshi, Ando et al. 2003).

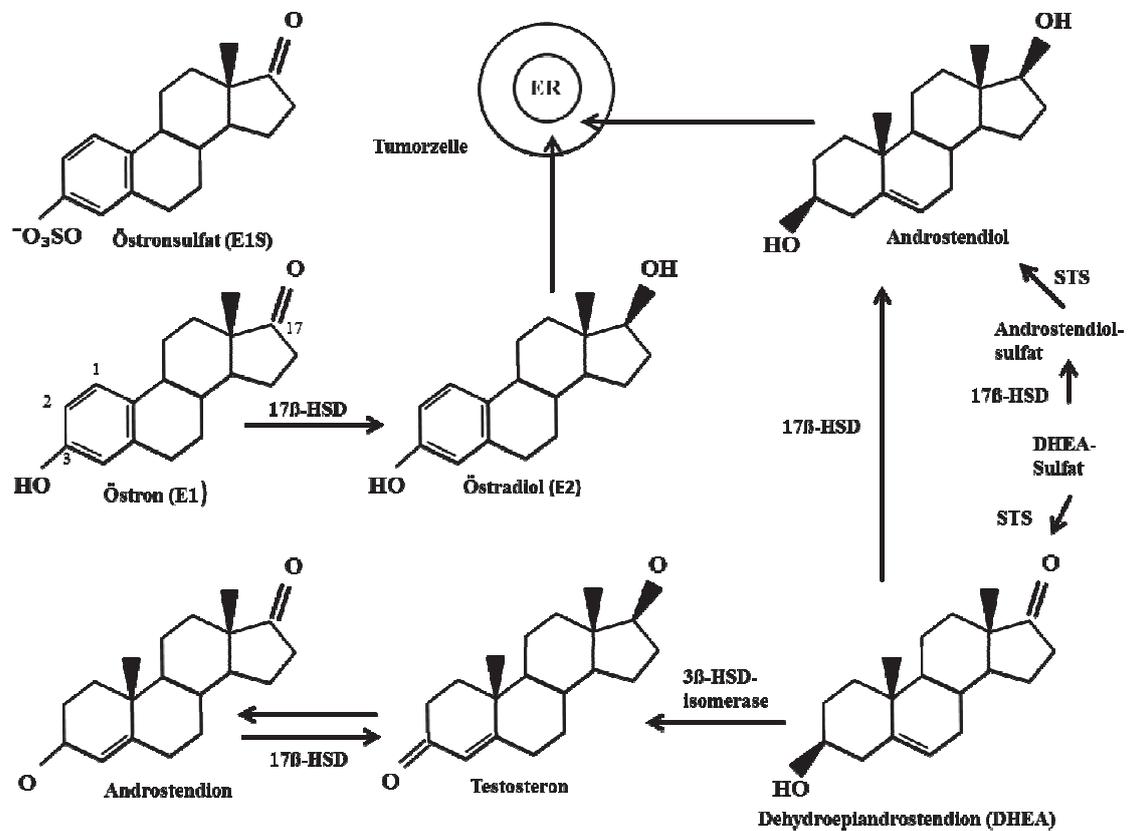


Abbildung 7: modifiziert nach (Reed, Purohit et al. 2005): graphische Darstellung der Entstehung von östrogenen Steroiden in postmenopausalen Frauen und die Wirkung auf eine Tumorzelle, STS: Steroidsulfatase 17β-HSD: 17β-Steroiddehydrogenase 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase (17βHSD)

### 1.5.3 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ HSD)

17 $\beta$ HSDs sind Enzyme, die Oxyreduktionen katalysieren. Bisher wurden mindestens 15 verschiedene Isoformen isoliert, wobei mindestens 12 beim Menschen vorkommen. Bis auf eine Ausnahme, die 17 $\beta$ HSD Typ 5 (eine Aldo-Keto-Reduktase), sind alle weiteren 17 $\beta$ HSD Dehydrogenasen bzw. Reduktasen (Day, Tutill et al. 2008). Die am häufigsten untersuchten Isoformen sind der Typ 1 und Typ 2 (Nagasaki, Miki et al. 2009). In normalem Brustgewebe sind die Enzyme 17 $\beta$ HSD Typ 1 und 2 von hauptsächlicher Bedeutung (Vihko, Harkonen et al. 2004; Vihko, Herrala et al. 2006), daneben wurden in malignem Gewebe die Typen 7, 12 und 14 nachgewiesen (Jansson, Gunnarsson et al. 2006; Song, Liu et al. 2006).

Das als Erstes strukturell untersuchte Enzym 17 $\beta$ HSD Typ 1 katalysiert die Reduktion von E1 zu E2 und die Reduktion von DHEA zu Androstendiol. (Miettinen MM 1996; Peltoketo, Isomaa et al. 1996; Lin, Shi et al. 2006), wobei als Kofaktor der NAD(H) oder NADP(H) genutzt wird (Dumont, Luu-The et al. 1992).

Die 17 $\beta$ HSD Typ 1 ist im Zytosol lokalisiert und wird vorrangig in den Granuloazellen des Ovars und im Synzytiotrophoblasten der Plazenta gebildet (Lukacik, Kavanagh et al. 2006; Vihko, Herrala et al. 2006). Die cDNA von der 17 $\beta$ HSD Typ 1 kodiert für ein Protein aus 327 Aminosäuren (Peltoketo, Isomaa et al. 1988).

17 $\beta$ HSD-2 inaktiviert im Gegensatz zur 17 $\beta$ HSD-1 mittels Oxidation die potenteren Steroide Androstendiol zu DHEA, Testosteron zu Androstendion und die Hormone E2 zu E1 (Zhongyi, Rantakari et al. 2007) mit dem Kofaktor NAD (H) (Wu, Einstein et al. 1993). Die cDNA der 17 $\beta$ HSD-2 kodiert für ein Protein aus insgesamt 387 Aminosäuren (Wu, Einstein et al. 1993). Gebunden ist das Enzym an die Membran des endoplasmatischen Retikulums (Labrie, Luu-The et al. 2000).

Da die intrazelluläre Konzentration der Kofaktoren NADPH und NAD<sup>+</sup> in normalem, nicht tumorösem Brustgewebe deutlich über der Konzentration der Kofaktoren NADP<sup>+</sup> und NADH liegt, ist der oxidative Weg der (bis zu 50fach) dominierende (Labrie, Luu-The et al. 1997). Der reduktive Reaktionsweg ist dominierend in malignen Brustgeweben und -zellen (Speirs, Green et al. 1998).

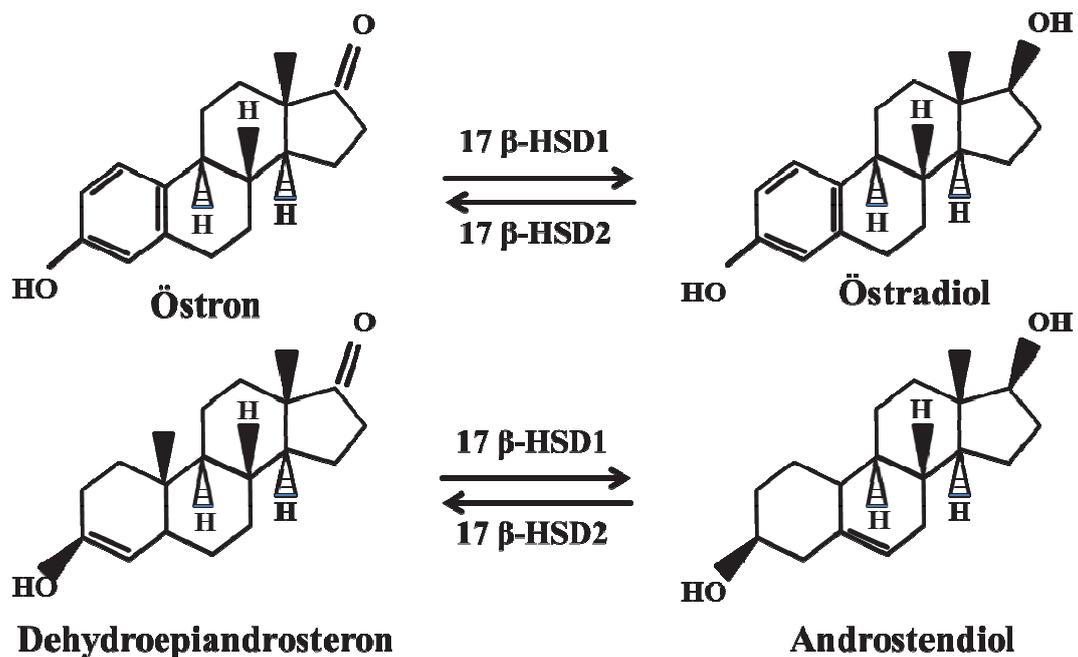


Abbildung 8 modifiziert nach (Day, Tutill et al. 2008): graphische Darstellung der Wirkung der 17βHSD 1 und 2

Die Rolle der 17βHSD Typ 1 und 2 in der Brustkrebsentwicklung wurden in verschiedenen Untersuchungen charakterisiert. In Mammakarzinomen konnte häufig eine Veränderung der für die 17βHSD-1 und -2 kodierenden Genloci festgestellt werden (Gunnarsson, Hellqvist et al. 2005).

Bei prämenopausalen Frauen werden die Typen 1 und 2 der 17βHSD in normalem, gesundem Brustepithel exprimiert. Postmenopausal konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte 17βHSD-1/17βHSD-2-Ratio in Mammatumoren vorkommt (Suzuki T 2000; Miyoshi, Ando et al. 2001). Dieser Sachverhalt führt zu einer höheren intratumoralen E2-Konzentration und damit zu einem Wachstumsstimulus des Brusttumors, welcher über die Östrogenrezeptoren vermittelt wird. Analog dazu ist eine niedrige 17βHSD-2/17βHSD-1-Ratio in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen mit einem erhöhten Rezidivrisiko assoziiert (Gunnarsson, Hellqvist et al. 2005). Das vermehrte Vorkommen von 17βHSD-1 im Vergleich zu Typ 2 in tumoralem Brustgewebe in der Postmenopause bewirkt ein vermehrtes Angebot von E2. Dieses E2 stimuliert das Tumorstadium und könnte ein therapeutischer Ansatzpunkt in der

Behandlung der hormonabhängigen Brusttumore in der Postmenopause sein (Purohit, Tutill et al. 2006; Sasano, Suzuki et al. 2006).

Molekulargenetische Untersuchungen der 17 $\beta$ HSD zeigen Unterschiede der Expression in normalem und malignem Brustgewebe unter Berücksichtigung des Menopausenstatus. 17 $\beta$ HSD Typ 1 Protein und mRNA sind während der Follikel- und Lutealphase gleichermaßen im duktalem und lobuloalveolärem Epithel nachweisbar. In der Postmenopause jedoch werden weder 17 $\beta$ HSD Typ 1 noch 17 $\beta$ HSD Typ 2 mRNA im normalen Brustepithel exprimiert (Miettinen, Mustonen et al. 1999). Dem stehen unabhängig vom Menopausenstatus variable mRNA Expressionen beider Typen in Mammakarzinomgeweben gegenüber. In ungefähr 50% von maligne verändertem Brustgewebe lassen sich positiv immunhistochemische Nachweise für 17 $\beta$ HSD-1 finden (Vihko, Harkonen et al. 2004).

Exogene Hormone wie orale Kontrazeptiva können die Expression von 17 $\beta$ HSD-1 und -2 in normalem, prämenopausalem Brustgewebe modifizieren. Es konnte in einer Studie nachgewiesen werden, dass die 17 $\beta$ HSD-1 Expressionsrate als auch die Intensität der Färbung in der Immunhistochemie im duktalem und lobuloalveolärem Epithel höher bzw. stärker als in der unbehandelten Vergleichsgruppe waren (Soderqvist, Poutanen et al. 1998).

## **1.6 Zellen**

### **1.6.1 HBL-100-Zellen**

Die humane, epitheliale Brustzelllinie HBL-100 wurde erstmals aus der Milch einer stillenden Mutter gewonnen, bei der keine Brustveränderung feststellbar war (Gaffney 1982). Die Zellen sind unsterblich, jedoch nicht tumorbildend. Der Nachweis von Aromatasevorkommen in HBL-100-Zellen konnte erbracht werden (MacIndoe 1979). Eine Infektion mit dem Simian Virus 40 bzw. mit dem großen T-Antigen des Simian Virus 40 (SV40) führt zu einer Umwandlung der Zellen in eine Tumorzelle (Caron de Fromental, Nardeux et al. 1985; Madsen and Briand 1990). Das große T-Antigen des SV40 führt zu einer veränderten Funktion von zellregulatorischen Proteinen. Weitere

Studien zeigen, dass zusätzlich dazu noch weitere Onkogene, wie z. B. Ki-ras, verändert werden müssen, um eine Tumorentstehung zu erzeugen (Saint-Ruf, Nardeux et al. 1988).

### **1.6.2 MCF-7-Zellen**

Die humane Brustkrebszelllinie MCF-7 wurde ursprünglich aus dem Pleuraerguss einer Brustkrebspatientin gewonnen (Brooks, Locke et al. 1973). MCF-7-Zellen sind Gegenstand vieler Untersuchungen zum Nachweis des östrogenabhängigen Wachstums von Brustkrebs (Lacroix and Leclercq 2004). Ein Aromatasenachweis in den MCF-7-Zellen ist erfolgt (MacIndoe 1979).

Die MCF-7-Zellen stellen sich phänotypisch als luminal epithelial dar, in vitro zeigen sich die Zellen als schwach invasiv und als abhängig von einer Östrogensupplementati-on. Nach Injektion einer hohen Zellzahl kommt es in Nacktmäusen zu einer Tumorentwicklung (Osborne, Hobbs et al. 1985; Clarke 1996).

### **1.6.3 BT-474-Zellen**

BT-474-Zellen wurden erstmalig von Lasfargues et al. aus einem soliden, invasiv wachsenden duktalem Brustkrebs einer Frau isoliert (Lasfargues, Coutinho et al. 1979). Histopathologisch zeigt sich ein Differenzierungsgrad von G2 bis G3. Im Vergleich zu den MCF-7-Zellen zeigen die BT-474-Zellen eine stärkere Tumorprogression (Lacroix and Leclercq 2004). Bei Nacktmäusen konnte gezeigt werden, dass BT-474-Zellen eine kanzerogene Wirkung haben und die Tendenz zur Bildung von regionalen Lymphknotenmetastasen besitzen. Des Weiteren sind die BT-474-Zellen in der Lage, unabhängig von einer Östrogensupplementati-on, Mikrometastasen in der Lunge zu entwickeln (van Slooten, Bonsing et al. 1995). Wie die bereits genannten Zelllinien besitzen auch die BT-474-Zellen eine Aromataseaktivität (Sikora, Cordero et al. 2009).

## 1.7 Aromataseinhibitoren

Aromataseinhibitoren werden nach der chronologischen Reihenfolge ihrer Entwicklung eingeteilt. Dabei wird Anastrozol zu den Inhibitoren der dritten Generation gezählt.

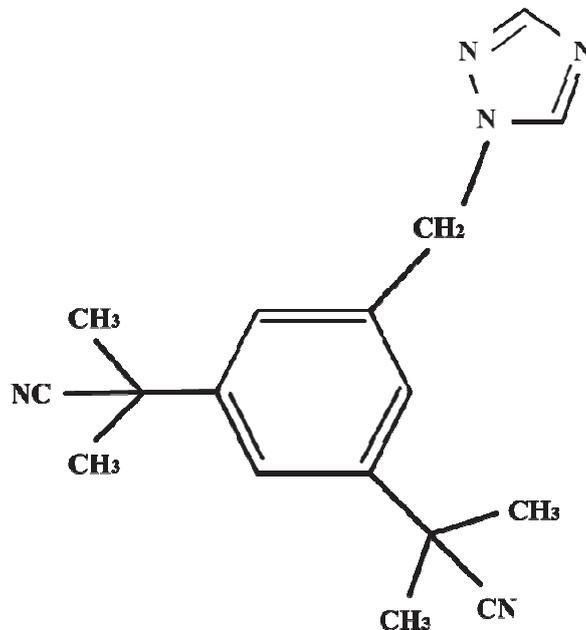


Abbildung 9: modifiziert nach (Geisler, King et al. 1996): Chemische Struktur von Anastrozol 2,2-[5-(1,2,4-Triazol-1-ylmethyl)-1,3-phenylen]bis(2-methylpropionitril)

Aromataseinhibitoren werden, je nach ihrem Wirkmechanismus bzw. ihrer chemischen Struktur, in die Typen 1 bzw. Typ 2 eingeteilt. Typ 1 Inhibitoren sind steroidale Verbindungen (Exemestan), wohingegen Typ 2 Inhibitoren nicht steroidaler Art sind (Letrozol und Anastrozol). Die steroidalen Aromataseinhibitoren Typ 1 sind Derivate des Androstendions, die eine kovalente Bindung mit der Aromatase eingehen und zu einer permanenten, irreversiblen Inhibition des Enzyms führen. Die Wiederherstellung der Enzymaktivität ist nur möglich durch eine Neusynthese des Enzyms (Buzdar 2003). Die nicht-steroidalen Aromataseinhibitoren des Typs 2 sind kompetitive Inhibitoren. Anastrozol bindet reversibel an das Häm-Eisen des Aromatasekomplexes und führt so zu einer Inhibierung der Enzymaktivität. Aufgrund der Reversibilität der Bindung ist eine ständige Präsenz von Anastrozol notwendig, um eine Aromataseinhibition dauerhaft zu gewährleisten (Buzdar 2003).

Die Metabolisierung von Anastrozol geschieht zu 85% über die Leber, jedoch zeigen Patienten mit einer milden bis moderaten eingeschränkten Leberfunktion einen gleich hohen Plasmaspiegel des Medikaments wie Patienten mit einer regelrechten Leberfunktion (Wellington and Faulds 2002). Die Metabolisierung erfolgt über N-Dealkylierung, Glukuronidierung und Hydroxylierung. Die Halbwertszeit beträgt in etwa 50 Stunden (Higa and alKhoury 1998). Nach 72 Stunden sind ca. 10% des Anastrozols unverändert und 60% als Metabolit über den Urin ausgeschieden (Wilkinson 2004).

Die Gabe von Anastrozol ist zur Behandlung des Mammakarzinoms in Abhängigkeit vom Menopausenstatus zugelassen: Bei postmenopausalen Patientinnen mit fortgeschrittenem Mammakarzinom ist eine Behandlung in Deutschland indiziert. Für Aromataseinhibitoren besteht keine Indikation bei Patientinnen, die sich in der Prämenopause befinden (Nabholtz 2008).

In der Prämenopause ist hauptsächlich das Ovar für die Östrogensynthese verantwortlich. Aromataseinhibitoren induzieren durch einen verminderten Östrogenspiegel einen Anstieg der Gonadotropinsekretion. Daraus resultiert eine Verminderung des negativen Feedbacks von Östrogen auf die Hypophyse wodurch es zu einer ovariellen Stimulation kommt. Potenzielle Größenzunahme des Ovars bis hin zur ovariellen Zystenbildung kann die Folge sein. Durch das verminderte negative Feedback und durch die darauf folgenden erhöhten Sekretion von Gonadotropinen kommt es zu einer vermehrten ovariellen Östrogenproduktion, die der antiöstrogenen Therapie entgegenwirken würde (Nabholtz 2008). Anastrozol hat keine Auswirkung auf die Plasmakonzentration des luteinisierenden bzw. des follikelstimulierenden Hormons bei postmenopausalen Frauen (Yates, Dowsett et al. 1996).

Besonders in der adjuvanten Therapie postmenopausaler Frauen mit hormonrezeptorpositivem, nicht fortgeschrittenem Mammakarzinom hat sich Anastrozol bewährt. Bei Frauen, die bereits für 2-3 Jahre eine antihormonelle Therapie mit Tamoxifen erhalten haben, ist eine Umstellung der Tamoxifenmedikation auf Anastrozol zulässig. Die Behandlung von Frauen mit hormonrezeptornegativem Mammakarzinom ist nur indiziert, wenn die Patientinnen zuvor bereits auf eine Therapie mit Tamoxifen angesprochen haben (Rote Liste 2009).

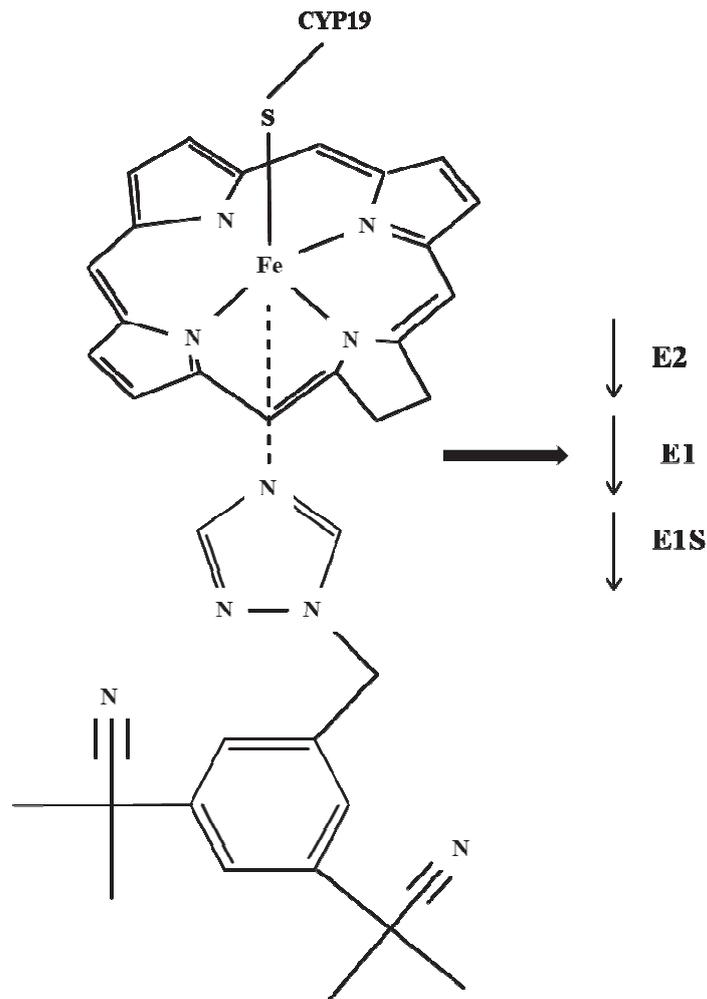


Abbildung 10 modifiziert nach [67]: Graphische Darstellung der Bindung von Anastrozol an das Enzym Aromatase (CYP19): Durch die inhibierende Wirkung von Anastrozol auf die Aromatase sinken die E2-, E1- und E1S-Level.

Die Wirkung und Wirksamkeit von Anastrozol wurde in vielen Studien untersucht. Die Aktivität von Anastrozol ist hochselektiv. Es zeigt dabei keine Effekte auf androgene Vorläufermoleküle. Des Weiteren führt Anastrozol nicht zu einer Verringerung der Aldosteron- oder Cortisolsekretion vor oder nach einer Stimulation mit Adrenocorticotropem Hormon (Plourde, Dyroff et al. 1995).

Die in vivo Potenz der Aromataseinhibitoren wird traditionell an dem Ausmaß der Reduktion des Plasmaöstrogenspiegels im Blut gemessen. In Studien konnte nachgewiesen werden, dass nach Einnahme von Anastrozol (1 mg oder 10 mg für 28 Tage) eine Verminderung der Plasmaöstrogenlevel zwischen 86,5% und 93,5%

erreicht wird, unabhängig von der gewählten Dosis (Geisler, King et al. 1996). Dies bedeutet nicht automatisch auch ein Absinken des intratumoralen Östrogenspiegels, da das intratumorale Enzym Sulfatase für eine weitere Östrogenproduktion verantwortlich ist (Santner, Feil et al. 1984).

Die Suppression der Plasmaöstrogenspiegel sowie der intratumoralen Östrogenspiegel bei Patientinnen mit Mammakarzinom in der Postmenopause wurde in einer weiteren Studie untersucht. Dabei zeigte sich bei 12 postmenopausalen Patientinnen mit Östrogenrezeptor-positivem Mammakarzinom (T3 bis T4, und/oder N2) bei einer Dosis von 1 mg Anastrozol über 15 Wochen ein deutliches Absinken des Plasma- wie auch des Tumoröstrogenspiegels (Geisler, Detre et al. 2001). Die Reduktion der Plasmaspiegel betrug bei E2 86,1%, bei E1 83,9% und für Östronsulfat 94,2%. Die intratumoralen Östrogenspiegel wurden durch Anastrozol dabei für E2 um 89%, für E1 um 83,4% und für Östronsulfat um 72,9% gesenkt. Dies zeigt, dass Anastrozol potent genug ist, die Aromataseaktivität und damit die Östrogenspiegel peripher und, was viel wichtiger ist, intratumoral zu senken (Geisler, Detre et al. 2001).

Die Therapie des hormonrezeptorpositiven Mammakarzinoms hat sich in der Vergangenheit gegen die adjuvante, endokrine Therapie mit dem selektiven Östrogenrezeptormodulator Tamoxifen durchgesetzt. Studien zur Wirkung von Aromataseinhibitoren im Vergleich zu Tamoxifen wurden in drei unterschiedlichen klinischen Designs durchgeführt:

1. Upfront-Therapie: Die Patientin erhielt ab Beginn der endokrinen Therapie den Aromataseinhibitor.
2. Switch-/Sequenz-Therapie: Die Patientin erhielt zunächst Tamoxifen, nach 2-3 Jahren erfolgt der Switch auf den Aromataseinhibitor.
3. Erweiterte Adjuvanztherapie: Die Patientin erhielt zunächst für 5 Jahre Tamoxifen und anschließend für weitere 5 Jahre einen Aromataseinhibitor.

Weitere Unterschiede in den endokrinen Therapiesettings bestehen zwischen einem neoadjuvanten und adjuvanten Therapieeinsatz. Zu allen Studiendesigns finden sich mehrere Studien:

Zum neoadjuvanten Therapiesetting finden sich v.a. zwei Studien. Die IMPACT Studie (Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined With Tamoxifen) untersuchte insgesamt 330 Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Brustkrebs. Die Probandinnen erhielten für 3 Monate neoadjuvant Anastrozol, Tamoxifen oder beide Präparate. Nach 3 Monaten ergab sich kein signifikanter Unterschied innerhalb der Gruppen. In einer Subgruppe von 124 Patientinnen, die eine Mastektomie benötigten, konnte in der Anastrozolgruppe, im Gegensatz zur Tamoxifengruppe, statt einer Mastektomie häufiger ein brusterhaltendes Operationsvorgehen gewählt werden (44 versus 31%) (Smith, Dowsett et al. 2005).

Eine Gabe von Anastrozol oder Tamoxifen für 3 Monate neoadjuvant wurde in der PROACT-Studie (Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen) untersucht. Insgesamt wurden 451 Patientinnen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom in die Studie eingeschlossen. Begleitende Chemotherapie wurde bei 29 bzw. 32% der Patientinnen gegeben. Wie in der IMPACT-Studie konnte kein signifikanter Unterschied in der klinischen Ansprechquote gezeigt werden (Cataliotti, Buzdar et al. 2006).

Eine Studie, die den adjuvanten Therapieansatz mit Anastrozol untersucht hat, ist die ATAC Studie (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination). 9366 Frauen mit hormonrezeptorpositivem Mammakarzinom erhielten entweder 1 mg Anastrozol, 10 mg Tamoxifen oder eine Kombination aus beiden Medikamenten (Baum, Budzar et al. 2002; Howell, Cuzick et al. 2005; Forbes JF 2008). Nach einem medianen Follow-up von 120 Monaten zeigte sich eine signifikante Verbesserung des krankheitsfreien Überlebens in der Anastrozolgruppe gegenüber der Tamoxifengruppe (Cuzick, Sestak et al. 2010).

Des Weiteren zeigte sich, dass Anastrozol assoziiert war mit einer verlängerten Zeitspanne bis zum Auftreten eines Rezidivs und einer geringeren Rezidivrate sowie mit weniger kontralateral auftretenden Mammakarzinomen. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in der Sterberate nach Auftreten eines Rezidivs. Deshalb ergab sich kein Vorteil für die Kombinationstherapie oder für eine alleinige Tamoxifengabe (Howell, Cuzick et al. 2005).

Die Frage, ob ein Switch bei begonnener Tamoxifentherapie auf Anastrozol sinnvoll ist, war Gegenstand der ARNO95- (German Adjuvant Breast Cancer Group) (Kaufmann, Jonat et al. 2007), der ITA- (Italian Tamoxifen-Anastrozole trial) (Boccardo, Rubagotti et al. 2005; Boccardo, Rubagotti et al. 2006) und der ABCSG8-Studie (Austrian Breast & Colorectal Cancer Study Group) (Jakesz, Jonat et al. 2005; Jonat, Gnant et al. 2006).

Eine Metaanalyse aller drei Studien zeigte, dass ein Wechsel von Tamoxifen zu Anastrozol nach zwei bis drei Jahren vorheriger Tamoxifengabe bei postmenopausalen Frauen mit hormonsensitiven Karzinomen einen Vorteil hinsichtlich des krankheitsfreien Überlebens und des Gesamtüberlebens hat und einen signifikanten Rückgang der Inzidenz kontralateraler Rezidive und Fernmetastasen bewirkt (Jonat, Gnant et al. 2006).

Die Auswirkungen einer erweiterten adjuvanten Therapie untersuchte die ABCSG 6a-Studie. Ziel war es nachzuweisen, ob nach fünfjähriger Tamoxifentherapie eine anschließende dreijährige Therapie mit Anastrozol einen signifikanten Vorteil zeigte. Nach 60 Monaten zeigte sich eine geringere Rückfallrate in der Gruppe, die Anastrozol erhielt, jedoch zeigte sich kein Unterschied in der Gesamtüberlebensrate (Jakesz, Greil et al. 2007).

### **1.8 Ziel der Studie**

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, den Effekt von Testosteron auf die lokale Östrogenformation in malignen und nicht-malignen Brustzellen *in vitro* zu bestimmen und insbesondere eine Aussage über die Differenzierung zwischen einem posttranskriptionellen bzw. posttranslationalen Effekt von Testosteron zu treffen.

Zu diesem Zweck erfolgte die Bestimmung der STS Aktivität und -Expression in nicht-malignen Brustzelllinien und in Brustkrebszellen mit hohem und niedrigem aggressivem Potenzial.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Studiendesignübersicht

In der nachfolgenden Übersicht (Abbildung 11) ist das Design der vorgelegten Arbeit schematisch dargestellt:

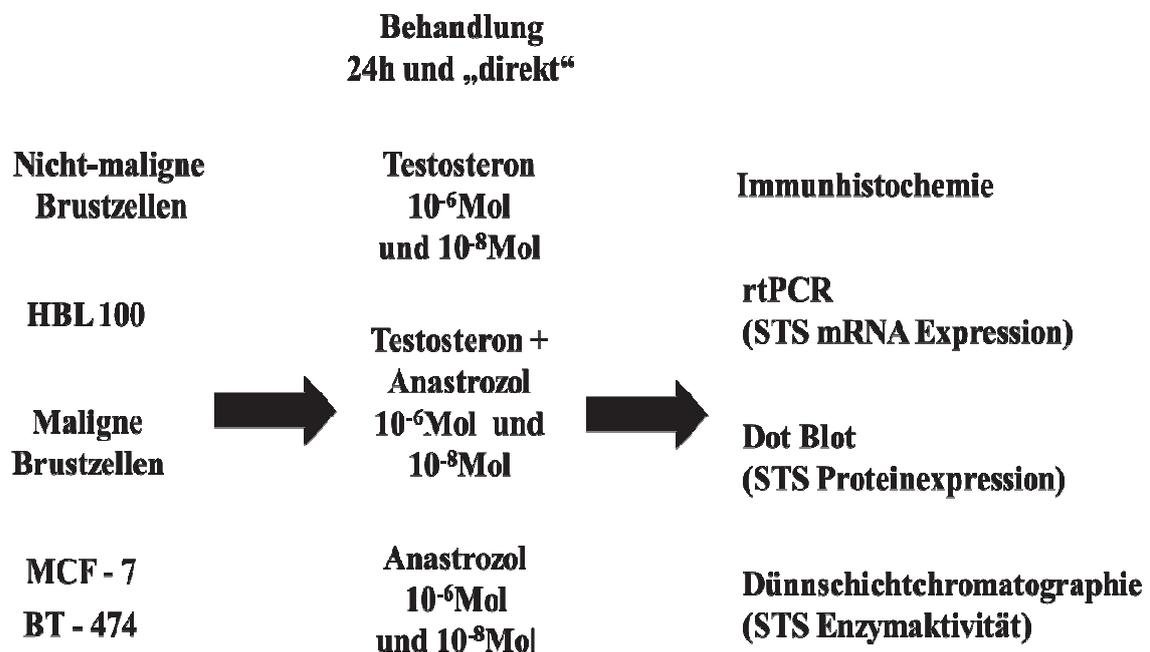


Abbildung 11: graphische Darstellung des Studiendesigns

### 2.2 Chemikalien, Reagenzien und Steroide

Radioaktiv markiertes Östronsulfat [<sup>3</sup>H]-E1S (spezifische Aktivität, 57.30 Ci/mmol) wurde von Perkin Elmer Life and Analytical Sciences (Boston, MA, USA) bezogen. Unmarkiertes Testosteron, E1 und E2 wurden von der Firma Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany) verwendet. Anastrozol wurde von der Firma AstraZeneca

(London, UK) geliefert. Alle weiteren Chemikalien wurden, wenn nicht anderes im Folgenden vermerkt, von der Firma Sigma Aldrich (Deisenhofen, Germany) bezogen.

### **2.3 Zellkultivierung der humanen Brustkrebszelllinien**

Für die folgenden Versuche wurden die Zelllinien MCF-7, HBL-100 und BT-474 verwendet. Die Zellen wurden von Dr. C. Poremba (Düsseldorf, Germany) bereitgestellt. Die Zellkultivierung erfolgte in RPMI 1640 Medium (Gibco, Karlsruhe, Germany). Das Kulturmedium enthielt 10% Kalbsserum (FCS; PAA, Cölbe, Germany), 2 mM L-Glutamin und zusätzlich Penicillin-Streptomycin. Die Zellen wurden bei 37°C in einer Atmosphäre von 5% CO<sub>2</sub> und 95% O<sub>2</sub> kultiviert. Vor und während der Hormonbehandlung der Zelllinien wurde phenolrot-freies Kulturmedium verwendet, dass vorher mit Dextran-beschichteter Aktivkohle gereinigt worden war.

### **2.4 Hormonbehandlung**

Vor Zugabe der Hormone wurde das Kulturmedium nach 72 Stunden ersetzt durch ein Medium, das 5%iges Steroid-gereinigtes Kälberserum enthielt. Die Hormonbehandlung erfolgte entweder als alleinige Testosterongabe bzw. alleinige Gabe des nichtsteroidalen Aromataseinhibitors Anastrozol oder durch eine Kombination der beiden. Die Hormone wurden dem Kulturmedium mit einer endgültigen Konzentration von unter 0,1% Ethanol hinzugefügt.

Das Medium mit Testosteronzusatz wurde alle 48 Stunden erneuert. Testosteron wurde in den Konzentrationen von 10<sup>-8</sup>M und 10<sup>-6</sup>M verwendet. Die Inkubation mit Testosteron erfolgte entweder für 24 Stunden (indirekt), oder die Enzymaktivität wurde unmittelbar nach der Inkubation bestimmt (direkt).

Zur Bestimmung des Ausmaßes der intrazellulären Aromatisierung von Testosteron zu E2 wurden die Zellen alleinig mit Anastrozol und kombiniert mit Testosteron in den Konzentrationen 10<sup>-8</sup>M und 10<sup>-6</sup>M inkubiert.

## 2.5 Immunzytochemie

Mit Hilfe der Immunzytochemie lassen sich spezifische Proteine mittels einer Antigen-Antikörper-Reaktion nachweisen. Dabei verwendet man Antikörper, die eine spezifische Affinität zu bestimmten Epitopen auf Antigenen besitzen, welche eine feste Bindung mit dem Antigen eingehen. Für die Immunzytochemie wuchsen die Zellen bis zu einer Konfluenz von 80% auf einer 8er-Kammer-Mikropipettierplatte („Chamber Slide“).

Zunächst wurden die Zellen mittels  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  kaltem Methanol fixiert, anschließend gewaschen und mit PBS/2% Ziegen Serum für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Für die konventionelle Immunzytochemie wurden die Zellen mit einem monospezifischem Kaninchen anti-human-STS-Antiserum inkubiert, das von Prof. Dr. K. von Figura, Göttingen, zur Verfügung gestellt wurde. Das Antiserum wurde im Verhältnis von 1:1000 mit einer Phosphat-gepufferten Salzlösung („phosphate buffered saline“, PBS) verdünnt. Dem PBS wurden 1% Serumalbumin vom Rind oder ein Kaninchenkontrollserum zugesetzt. Die Inkubation fand über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  statt. Da die Peroxidase zur enzymatischen Entwicklung des Chromogens verwendet wurde, musste zur Vermeidung falsch-positiver Ergebnisse die endogene Peroxidase-Aktivität geblockt werden. Dies erfolgte mit Methanol/0.6%  $\text{H}_2\text{O}_2$  und anschließender dreimaliger Waschung mit PBS. Die Erfassung der STS erfolgt durch die Verwendung des Sekundärantikörpers DAKO cytation rabbit-EnVision plus-horseradish peroxidase (HRP) System und durch das AEC+ Substrat (DAKO, Glostrup, Denmark), gefolgt von einer Gegenfärbung mit Mayer's Hemalum (Merck, Darmstadt, Germany). Die Zellabschnitte wurden mittels eines Zeiss Axiovert 100 Mikroskops untersucht und durch eine Axiophot Mrc Kamera fotografiert und dokumentiert.

## 2.6 Dünnschichtchromatographie – STS Enzymaktivität

Zunächst erfolgte die Homogenisierung des Brustgewebes auf Eis in 0,006 M Tris-HCl-Puffer pH 7,0 durch einen Polytron Homogenisierer bei maximaler Geschwindigkeit für eine Minute. Jede Probe wurde in doppelter Ausführung gemessen.

Eine Probe bestand aus 200  $\mu\text{l}$  Homogenat und 19.39 pmol [ $^3\text{H}$ ]-E1S (specific activity 57.30 Ci/mmol, Perkin Elmer Life, and Analytical Sciences, Boston, MA, USA) in 100  $\mu\text{l}$  0.06 Mol Tris-HCl-Puffer (beinhaltet 100  $\mu\text{g}$  NADH und NADPH in 100  $\mu\text{l}$  des Puffers). Parallel dazu wurde eine Gegenprobe angesetzt, die anstatt des Homogenates 200  $\mu\text{l}$  0.06 Mol Tris-HCl-Puffer enthielt, um eine eventuelle nichtenzymatische Umwandlung des Substrats nachzuweisen. Jede Probe wurde für 15 Minuten in 37°C warmem Wasserbad inkubiert. Nach Ablauf der 15 Minuten erfolgte die Zugabe von jeweils nicht radioaktivem 100  $\mu\text{l}$  E1 und E2 gelöst in 100  $\mu\text{l}$  Ethanol und 0,5 ml 0,5 Mol Natriumphosphatpuffer (pH 7,0) in jeder Probe, um die spätere Visualisierung der Banden in der Dünnschichtchromatographie zu ermöglichen. Zum anschließenden Lösen der unkonjugierten Hormone erfolgte die Zugabe von 2 ml Toluol. Nach hundertmaligem Umdrehen der Proben wurden sie mit 1.500 U/min für zehn Minuten zentrifugiert. Die untere wässrige Phase wurde in flüssigem Stickstoff gefroren. Von der oberen toluol-haltigen Phase wurden 100  $\mu\text{l}$  abpipettiert und zu 100  $\mu\text{l}$  Tris-HCl-Puffer und 3 ml Szintillationsflüssigkeit (Riafluor Perkin Elmer Life, and Analytical Sciences Boston, MA, USA) hinzugegeben. Die restliche obere Toluol-Phase wurde vollständig evaporiert und mit 100  $\mu\text{l}$  Folch-Lösung (Eigenherstellung, 2 : 1 Chloroform : Methanol) wieder gelöst. Für die folgende Dünnschichtchromatographie auf Silikagel G/UV 254-Alugram (Fa. Roth; Macherey-Nagel Düren GmbH) wurde als Lösungsmittel 13% Ethanol in Toluol verwendet (13% Ethanol, 87% Toluol). Die Dünnschichtchromatographie wurde so lange ausgeführt, bis die vordere Bande ca. 1-2 cm vom oberen Rand der Platten entfernt war. Nach 60 minütiger Trocknung der Platten erfolgte die Beurteilung der Banden unter UV-Licht (254 nm), um eine eindeutige Trennung der Banden sicherzustellen (E1 und E2). Die entstandenen Banden wurden mit einem Skalpell abgekratzt und zur Bestimmung der [ $^3\text{H}$ ]-Aktivität separat mit 3 ml Ethanol und 6 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt. Die radioaktive Aktivität wurde mittels eines Wallac 1409 ( $\beta$ -counter) liquid scintillation Spektrometers ermittelt. Die Enzymaktivität wurde ausgedrückt als mg Protein, das pro Minute gebildet wurde. Nach der Methode von Bradford et al. wurde die totale Menge an entstandenem Protein gemessen (Bradford 1976).

## 2.7 Dot blot-Analyse – STS Enzymexpression

Zur Vorbereitung auf den Dot blot erfolgte die Lyse der Zellen mittels RIPA Puffer (20 mM Tris/HCl pH 7.4, 137 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 1% (v/v) Triton X-100, 2 mM EDTA) mit Zusatz von Proteaseinhibitoren auf einer schwenkenden Plattform für 30 Minuten unter durchgehender Eiskühlung. Das Lysat wurde bei 10.000 U/min und 4 °C für zehn Minuten zentrifugiert. Aus dem Überstand wurde mittels BCA assay (Pierce) der Proteingehalt quantifiziert. Jeweils 30 µg Protein/Kammer/600 µl Tris-gepufferte Salzlösung (TPS) wurde für die folgende Dot-blot-Analyse verwendet.

Zu Beginn wurde eine Nitrozellulosemembran mit ddH<sub>2</sub>O aktiviert, welche bei einem pH-Wert von 7,4 für zehn Minuten in Tris-gepuffertes Salzlösung vorinkubiert war. Die Membran wurde auf zuvor mit Tris-gepuffertes Salzlösung getränktes 3 mm Whatman-Filterpapier platziert. Danach wurde die Membran in eine Bio-Dot-Mikrofiltrationsapparatur eingebracht (Bio-Rad). Die Apparatur wurde vorher jeweils mit 200 µl Tris-gepuffertes Salzlösung (TPS)/Kammer gewaschen und anschließend mit 200 µl der in TPS gelösten Probe in dreifacher Ausführung bestückt. Anschließend erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur die Blockung der Membran mit 5% Magermilchpulver in TPS, welches 1% (v/v) Tween 20 beinhaltet. Nach einer dreifachen Waschung für jeweils fünf Minuten mit TPS folgte bei 4 °C für 16 Stunden die Inkubation mit anti-STs Antiserum, verdünnt mit 1:1,500 in TPS, 5% Rinderserumalbumin und 1% (v/v) Tween. Nach Inkubation wurde die Membran erneut dreimal mit TPS (1% Tween) für jeweils 5 Minuten gewaschen und mit einem Peroxidase-konjugiertem Ziegen-anti-Kaninchen IgG-Antikörper (Calbiochem) inkubiert, der mit 1:2000 in TPS, 5% Rinderserumalbumin und 1% (v/v) Tween verdünnt war. Nach einer Stunde bei Raumtemperatur wurde der Blot erneut dreifach gewaschen für je fünf Minuten. Die verschiedenen Proteinbanden wurden über ein Chemilumineszenz-System (Super Signal, Pierce, Rockford, MA) auf ECL-Filmen (ECL®, Amersham, Braunschweig, Deutschland) detektiert. Zur Normalisierung wurde die Blotmembran vor der Dotblot-Analyse mit 0.2 M Glycin und 150 mM NaCl bei einem pH-Wert von 2,5 für zweimal zehn Minuten behandelt. Darauf folgte eine Neutralisierung mit TPS. Als primärer Antikörper wurden Maus-Anti-Tubulin Antikörper (Sigma,

1:4,000) und als sekundärer Antikörper Ziege-Anti-Maus IgG (Calbiochem, diluted 1:10,000) zugegeben.

Die gemessenen Proteinexpressionen auf den ECL-Filmen wurden durch ein BioDoc Analyse System (Biometra, Göttingen, Germany) digitalisiert und mittels der Software Image J software (NIH, Bethesda, USA) quantifiziert.

## **2.8 Quantitative TaqMan® real-time PCR – STS mRNA Expression**

Mittels der PCR lassen sich kleinste Mengen DNA exponentiell mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase vervielfältigen. Die in vitro Amplifikation der DNA erfolgte deshalb durch zyklische Wiederholungen von drei Schritten:

1. Denaturierung der DANN-Doppelstränge,
2. Anlagerung von Oligonukleotiden (Primer) an den flankierenden Enden des zu amplifizierenden Genbereichs bei Erreichen der spezifischen Temperatur,
3. Polymerisierung der doppelsträngigen DNA durch die DNA-Polymerase und die vier Nukleotiden dATP, dTTP, dCTP und dGTP ausgehend von den Primern.

Bei der hier verwendeten Methodik kommen darüber hinaus fluoreszenzmarkierte sogenannte TaqMan-Sonden zum Einsatz, welche eine sehr genaue und spezifische quantitative Bestimmung des entstehenden Produktes in Echtzeit („real-time-PCR“) ermöglichen. Zur quantitativen Bestimmung der STS mRNA Expression wurde zunächst das RNeasy reagent system (Qiagen Inc., Hilden, Germany) verwendet, um die zelluläre RNA zu isolieren. Aufgrund der größeren Instabilität von RNA im Vergleich zur DNA erfolgte zunächst die Umwandlung von RNA in die komplementäre cDNA. Die RNA wurde dazu unter Verwendung von „random hexamer“-Primern revers-transkribiert mittels des RT-for-PCR Kit (BD Clontech, Heidelberg, Germany). Die komplementäre entstehende DNA (cDNA) diente als Vorlage für die PCR. Die PCR bestand aus dem ABI MasterMix (Applied Biosystems, Darmstadt, Germany) und dem vorgefertigtem TaqMan gene expression systems (Applied Biosystems), das den Herstellerangaben entsprechend verwendet wurde. Als STS-Primer wurde

Hs00165853\_m1 verwendet. Als Referenzgen zur relativen Quantifizierung wurden 18S-rRNA-Sonden (Hs99999901\_s1) verwendet (alle Primer wurden von Applied Biosystems bezogen).

Die quantitative real-time PCR erfolgte durch das ABI PRISM 7300 Sequence Detection System (Applied Biosystems) unter Gebrauch der standardmäßigen Temperaturzyklen (zehn Minuten bei 95°C, 40 Zyklen für jeweils 15 Sekunden bei 95°C und eine Minute bei 60°C). Bei der vom Hersteller voroptimierten Methode erfolgen Annealing und Elongation bei der gleichen Temperatur (60°C). Die relative Quantifizierung erfolgte mit Hilfe der comparative cycle threshold (Ct) Methode. Zu jedem Inkubationszeitpunkt wurden drei biologische Replikate angelegt.

## **2.9 Statistische Methoden**

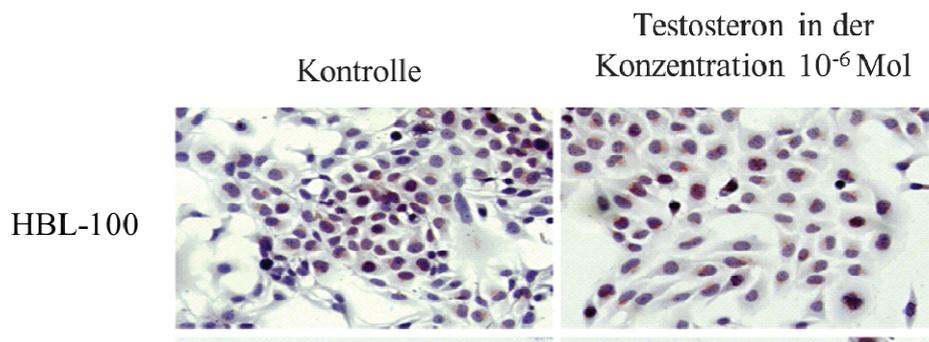
Die statistische Analyse wurden von "Services in Statistics" (Würzburg, Germany) durchgeführt mittels exakten, nicht-parametrischen statistischen Methoden (SPSS module „Exact Tests“, SPSS 2003). Für die paarweisen Gruppenvergleiche wurde der Mann-Whitney-U-Test angewandt. Alle p-Werte wurden mittels eines zweiseitigen t-Testes ermittelt, dabei werden p-Werte < 0,05 als signifikant angesehen. Alle Experimente wurden unabhängig voneinander wiederholt, wobei jeweils 3 Wiederholungen bei der Immunzytochemie, Dot-blot und rtPCR und 5 Wiederholungen bei der Dünnschichtchromatographie durchgeführt wurden.

### 3 Ergebnisse

---

#### 3.1 Immunzytochemische STS-Lokalisation in HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen

Die immunhistochemische Lokalisation der STS erfolgte durch ein monospezifisches Antiserum gegen die humane STS (Stein, Hille et al. 1989). Die Anfärbung der STS fand vor allem in den HBL-100- und MCF-7-Zellen perinukleär statt. Ohne eine Hormonbehandlung zeigten die HBL-100- und MCF-7-Zellen eine verringerte STS Expression im Gegensatz zu den BT-474-Zellen (siehe Abbildung 12).



Im nächsten Schritt wurde die Immunhistochemie zur Immunlokalisation der STS in den HBL-100-, MCF-7-, und BT-474-Zellen nach der Hormonbehandlung mit Testosteron durchgeführt. Es zeigte sich nach der Hormonbehandlung ebenfalls eine verminderte STS Expression der HBL-100- und MCF-7-Zellen im Vergleich zu den BT-474-Zellen. Konzentrationsunterschiede in der Hormonbehandlung (Testosteron  $10^{-6}$ M bzw.  $10^{-8}$ M) zeigten keine Veränderungen in der STS Expression.

## **3.2 Lokale Formation von E1 und E2 als Indikator für die STS Aktivität**

Im Folgenden Abschnitt 4.2. wird die lokal gemessene Formation von E1 und E2 dargestellt. Untergliedert werden die Ergebnisse hinsichtlich der Unterschiede der verwendeten Konzentrationen der Inkubationsmittel, der Dauer der Inkubation sowie der Auswirkung einer Inkubation der Zellen mit Anastrozol auf die Östrogensynthese.

### **3.2.1 Auswirkung der Konzentrationsunterschiede auf die Östrogensynthese**

Als nächster Schritt erfolgte die Ermittlung des Effektes von Testosteron auf die lokale STS-Enzymaktivität. Differenziert wurde hierbei zwischen der direkten Inkubation der Zellextrakte, mit sofortiger Messung der Östrogensynthese nach Inkubation, und einer 24 Stunden dauernden Inkubation der kultivierten Zellen mit Testosteron.

Zur Verhinderung einer intrazellulären Aromatisierung von Testosteron zu E2 durch das Enzym Aromatase und einem daraus resultierendem zu hohen Östradiolwert erfolgte eine weitere Inkubation der Zellen mit Anastrozol (A) allein und mit Testosteron in Kombination mit Anastrozol (T+A).

Dieses Vorgehen sicherte, dass die Effekte die durch Testosteron beobachtet wurden nicht indirekt durch die Aromatisierung von Testosteron, sondern durch das Enzym Aromatase verursacht wurden. Die Unterschiede der ermittelten E1- und E2-Werte nach Inkubation mit Testosteron und Testosteron plus Anastrozol bei unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$  Mol) waren vernachlässigbar klein (siehe nachfolgende Abb. 13 und 14), so dass die Ergebnisse für die unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert wurden.

### 3.2.1.1 Östronformation (E1) nach direkter Inkubation

#### BT-474-Zellen

Die direkte Inkubation der BT-474-Zellen zeigte bei allen drei gewählten Inkubationsmedien eine signifikante ( $p = 0,05$ ) Steigerung der Östronformation (E1) im Falle beider Konzentrationen  $10^{-6}$  Mol und  $10^{-8}$  Mol.

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>435 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>557 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>346 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>42</b>	<b>57</b>	<b>27</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>769 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>772 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>728 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>39</b>	<b>50</b>	<b>53</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b><u>0,05</u></b>	<b><u>0,05</u></b>	<b><u>0,05</u></b>

Tabelle 1: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$  Mol bzw.  $10^{-8}$  Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**HBL-100-Zellen**

Eine signifikante Steigerung der Östronformation (E1) bei unterschiedlichen Konzentrationen ( $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol) konnte für die HBL-100-Zellen nur für die direkte Testosteronbehandlung nachgewiesen werden ( $p = 0,05$ ). Eine alleinige Anastrozolbehandlung bzw. eine kombinierte Anastrozol- und Testosteroninkubation zeigte keinen signifikanten Unterschied ( $p = 0,827$  bzw.  $0,077$ ).

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>75 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>157 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>107 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>7</b>	<b>19</b>	<b>13</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>141 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>160 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>132 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>4</b>	<b>15</b>	<b>11</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b><u>0,05</u></b>	<b>0,827</b>	<b>0,077</b>

Tabelle 2: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## MCF-7-Zellen

Die direkte Behandlung der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Anastrozol bzw. die Kombinationsbehandlung mit Testosteron plus Anastrozol konnten keinen signifikanten Unterschied zwischen den Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ M zeigen.

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>89 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>196 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>81 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>23</b>	<b>36</b>	<b>8</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>263 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>226 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>167 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>13</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b><u>0,05</u></b>	<b>0,275</b>	<b><u>0,05</u></b>

Tabelle 3: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

3.2.1.2 Graphische Darstellung der Östronformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien bei direkter Inkubation

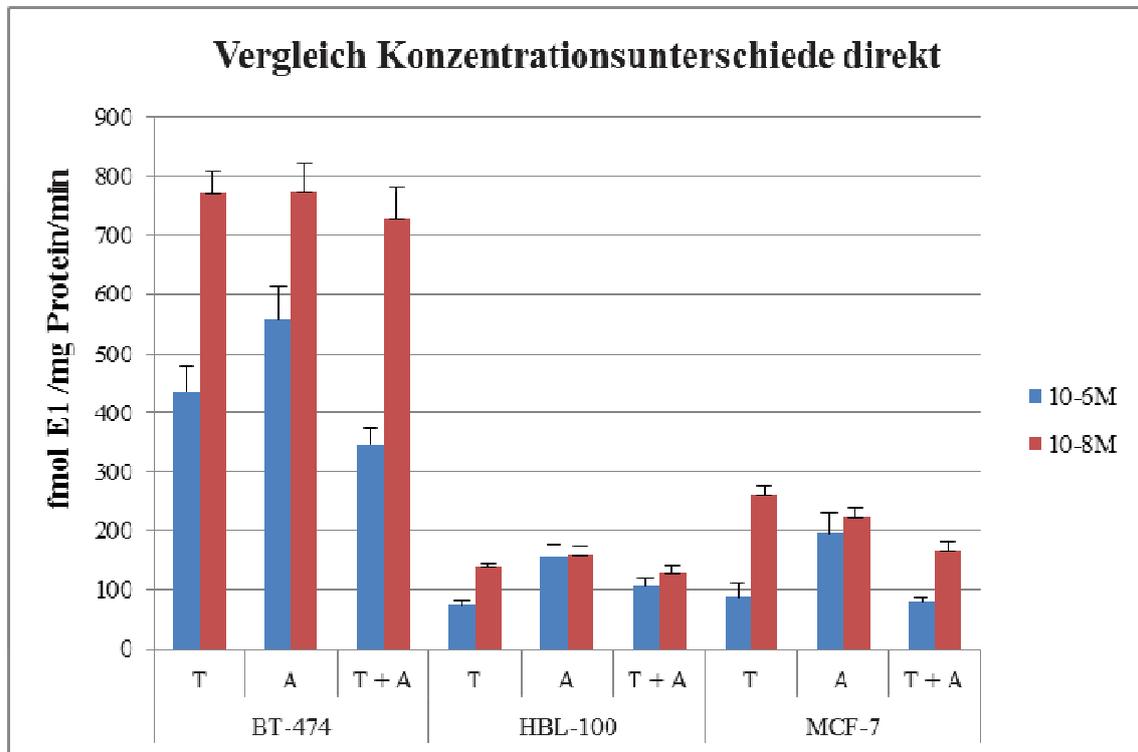


Abbildung 13: y-Achse: Östronformation fmol E1/mg Protein/min nach direkter Inkubation; x-Achse: T = Testosteron, A = Anastrozol, T+A = Kombination aus Testosteron und Anastrozol, verschiedene Zelllinien

## 3.2.1.3 Östradiolformation (E2) nach direkter Inkubation

## BT-474-Zellen

Die Östradiolformation in den BT-474-Zellen zeigte nur bei Kombination von Testosteron und Anastrozol einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Konzentrationen zugunsten der niedrigeren ( $10^{-8}$ Mol,  $p = 0,046$ ). Für die Testosteroninkubation ergab sich ein p-Wert von 0,121 bzw. für Anastrozolbehandlung ein p-Wert von 0,827.

Inkubationsmittel Konzentrationen	Testosteron	Anastrozol	Testosteron plus Anastrozol
$10^{-6}$ M	3,3 (E2) fmol/mg Protein/min	6 (E2) fmol/mg Protein/min	1,3 (E2) fmol/mg Protein/min
SD	4	2,6	1,5
$10^{-8}$ M	9,7 (E2) fmol/mg Protein/min	7 (E2) fmol/mg Protein/min	10,3 (E2) fmol/mg Protein/min
SD	7	3,6	2,3
p-Werte ( $10^{-6}$ M vs. $10^{-8}$ M)	0,121	0,827	<u>0,046</u>

Tabelle 4: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**HBL-100-Zellen**

Für die gesamte Behandlung der HBL-100-Zellen in der direkten Inkubation ergab sich keine signifikante Veränderung ( $p = 0,827, 0,376$  und  $0,513$ ).

<b>Inkubationsmittel</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b>Konzentrationen</b>			
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>6 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>2,3 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>5 (E2) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>2,6</b>	<b>2,5</b>	<b>1</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>6,7 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>4,3 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>7,7 (E2) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>6,5</b>	<b>3,1</b>	<b>4,5</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b>0,827</b>	<b>0,376</b>	<b>0,513</b>

Tabelle 5: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## MCF-7-Zellen

Für die gesamte Behandlung der HBL-100-Zellen in der direkten Inkubation ergab sich ebenfalls keine signifikante Veränderung ( $p = 0,317, 0,317$  und  $1$ ).

<b>Inkubationsmittel</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b>Konzentrationen</b>			
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>0,3 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>5,7 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>0</b>	<b>9,8</b>	<b>0</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b>0,317</b>	<b>0,317</b>	<b>1</b>

Tabelle 6: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min bei direkter Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

3.2.1.4 Graphische Darstellung der Östradiolformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien bei direkter Inkubation

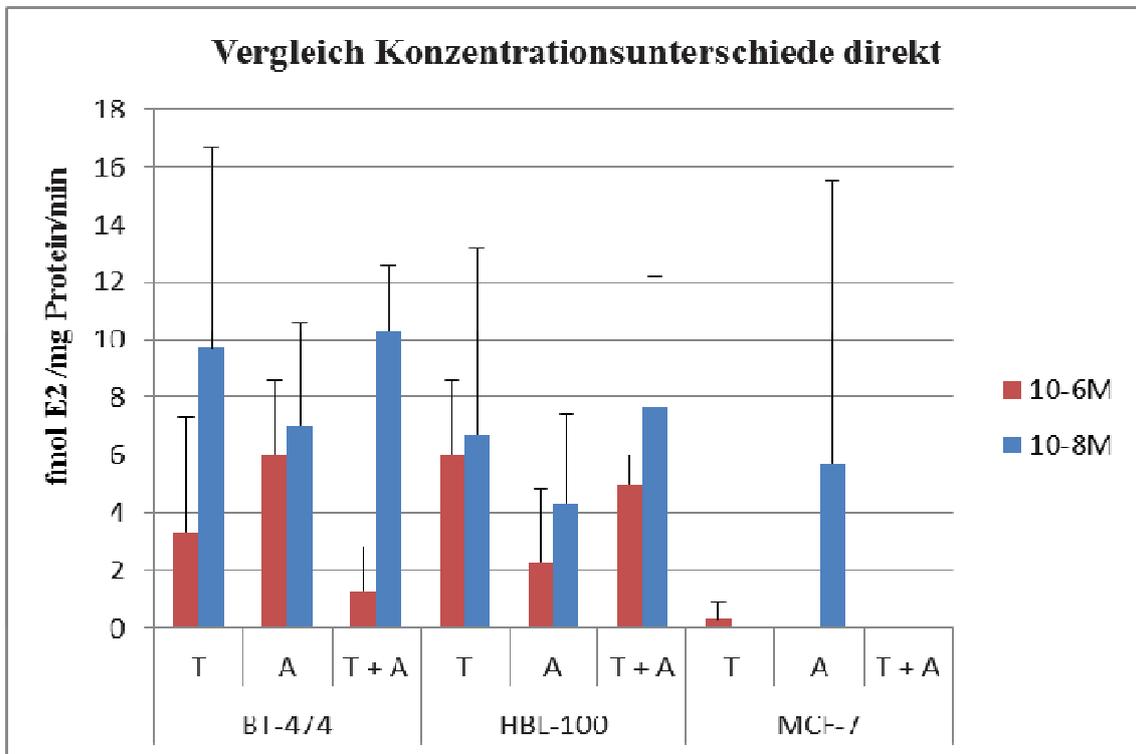


Abbildung 14: y-Achse: Östradiolformation fmol E2/mg Protein/min nach direkter Inkubation; x-Achse: T = Testosteron, A = Anastrozol, T+A = Kombination aus Testosteron und Anastrozol, verschiedene Zelllinien

### 3.2.1.5 Östronformation (E1) nach 24-stündiger Inkubation

#### BT-474-Zellen

Die 24-stündige Inkubation der BT-474-Zellen ergab für die alleinige Behandlung mit Testosteron eine signifikante Steigerung ( $p = 0,05$ ) der Östronformation für die Konzentration von  $10^{-8}$ Mol im Vergleich zur Konzentration von  $10^{-6}$ Mol. Die Inkubationen mit Anastrozol oder Testosteron plus Anastrozol zeigten mit den p-Werten 0,376 und 0,827 keinen signifikanten Unterschied.

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>678 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>234 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>174 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>26</b>	<b>17</b>	<b>10</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>486 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>220 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>180 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>8</b>	<b>5</b>	<b>36</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b><u>0,05</u></b>	<b>0,376</b>	<b>0,827</b>

Tabelle 7: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min nach 24stündiger Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung)

chung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

### HBL-100-Zellen

Eine 24-stündige Anastrozolbehandlung der HBL-100-Zellen ergab für die gemessene Östronformation im Konzentrationsvergleich ( $10^{-6}$ Mol,  $10^{-8}$ Mol) eine signifikante Steigerung nach Inkubation mit der  $10^{-8}$ Mol-Konzentration im Vergleich zur  $10^{-6}$ Mol-Konzentration ( $p = 0,05$ ). Testosteron und die Kombinationsinkubation mit Anastrozol ergaben keine signifikanten Unterschiede ( $p = 0,275$  und  $0,827$ ).

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>476 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>93 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>190 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>20</b>	<b>32</b>	<b>39</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>461(E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>209 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>185(E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>23</b>	<b>26</b>	<b>56</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b>0,275</b>	<b><u>0,05</u></b>	<b>0,827</b>

Tabelle 8: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol

## Ergebnisse

(SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

### MCF-7-Zellen

Für alle drei Inkubationsvarianten (Testosteron, Anastrozol, Testosteron plus Anastrozol) ergaben sich signifikante Steigerungen der Östronformation nach 24 Stunden Behandlung für die verschiedenen Konzentrationen ( $p = 0,046$ ,  $p = 0,05$ ,  $p = 0,05$ ).

Inkubationsmittel  Konzentrationen	Testosteron	Anastrozol	Testosteron plus Anastrozol
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>22 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>25 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>9 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>3</b>	<b>2</b>	<b>3</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>15 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>42 (E1) fmol/mg Protein/min</b>	<b>25 (E1) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>2</b>	<b>7</b>	<b>11</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b><u>0,046</u></b>	<b><u>0,05</u></b>	<b><u>0,05</u></b>

Tabelle 9: Östronformation (E1) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**3.2.1.6 Graphische Darstellung der Östronformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien und 24-stündiger Inkubation**

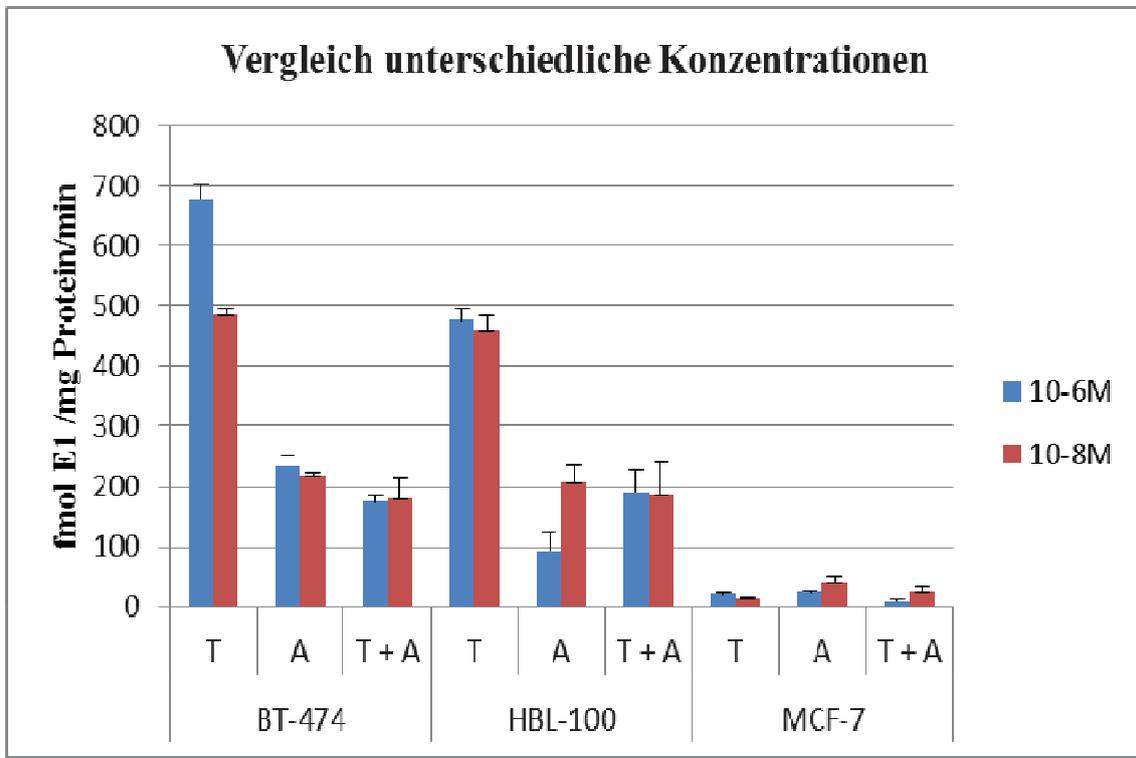


Abbildung 15: y-Achse: Östronformation fmol E1 /mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation, x-Achse: T = Testosteron, A = Anastrozol, T+A = Kombination aus Testosteron und Anastrozol, verschiedene Zelllinien

## 3.2.1.7 Östradiolformation (E2) nach 24-stündiger Inkubation

## BT-474-Zellen

Eine signifikante Steigerung der Östradiolformation (E2) in den BT-474-Zellen im Vergleich der Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol konnte nur für die 24-stündige Testosteronbehandlung nachgewiesen werden ( $p = 0,05$ ). Keine signifikanten Unterschiede konnten für die alleinige Anastrozolbehandlung ( $p = 1$ ) und für eine kombinierte Anastrozol- und Testosteroninkubation gemessen werden ( $p = 0,487$ ).

Inkubationsmittel Konzentrationen	Testosteron	Anastrozol	Testosteron plus Anastrozol
$10^{-6}$ M	24,7 (E2) fmol/mg Protein/min	2,7 (E2) fmol/mg Protein/min	2,7 (E2) fmol/mg Protein/min
SD	3,2	1,5	1,5
$10^{-8}$ M	6 (E2) fmol/mg Protein/min	2,7 (E2) fmol/mg Protein/min	4,3 (E2) fmol/mg Protein/min
SD	2,6	2,1	2,3
p-Werte ( $10^{-6}$ M vs. $10^{-8}$ M)	<u>0,05</u>	1	0,487

Tabelle 10: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**HBL-100-Zellen**

Nach Behandlung der HBL-100-Zellen konnte für die Testosteroninkubation ein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Konzentrationsunterschiede ( $p = 0,046$ ) festgestellt werden. Keine signifikanten Änderungen ergaben die weitere Behandlung mit Anastrozol ( $p = 0,317$ ) und Testosteron plus Anastrozol ( $p = 1$ ).

<b>Inkubationsmittel Konzentrationen</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b><math>10^{-6}\text{M}</math></b>	<b>3 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0 (E2) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b><math>10^{-8}\text{M}</math></b>	<b>0,3 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,3 (E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0 (E2) fmol/mg Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>0,6</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}\text{M}</math> vs. <math>10^{-8}\text{M}</math>)</b>	<b><u>0,046</u></b>	<b>0,317</b>	<b>1</b>

Tabelle 11: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}\text{Mol}$  bzw.  $10^{-8}\text{Mol}$  = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## MCF-7-Zellen

Nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen konnten für alle drei Inkubationsvarianten keine signifikanten Unterschiede ( $p = 1$ ) festgestellt werden.

<b>Inkubationsmittel</b>	<b>Testosteron</b>	<b>Anastrozol</b>	<b>Testosteron plus Anastrozol</b>
<b>Konzentrationen</b>			
<b><math>10^{-6}</math>M</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0,3 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,6</b>
<b><math>10^{-8}</math>M</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>	<b>0,3 (E2)</b> <b>fmol/mg</b> <b>Protein/min</b>
<b>SD</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0,6</b>
<b>p-Werte (<math>10^{-6}</math>M vs. <math>10^{-8}</math>M)</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Tabelle 12: Östradiolformation (E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Anastrozol und der Kombination aus Testosteron und Anastrozol (SD = Standardabweichung,  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol = Konzentration des verwendeten Inkubationsmittels, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**3.2.1.8 Graphische Darstellung der Östradiolformation bei verschiedenen Konzentrationen der Inkubationsmedien und 24-stündiger Inkubation**

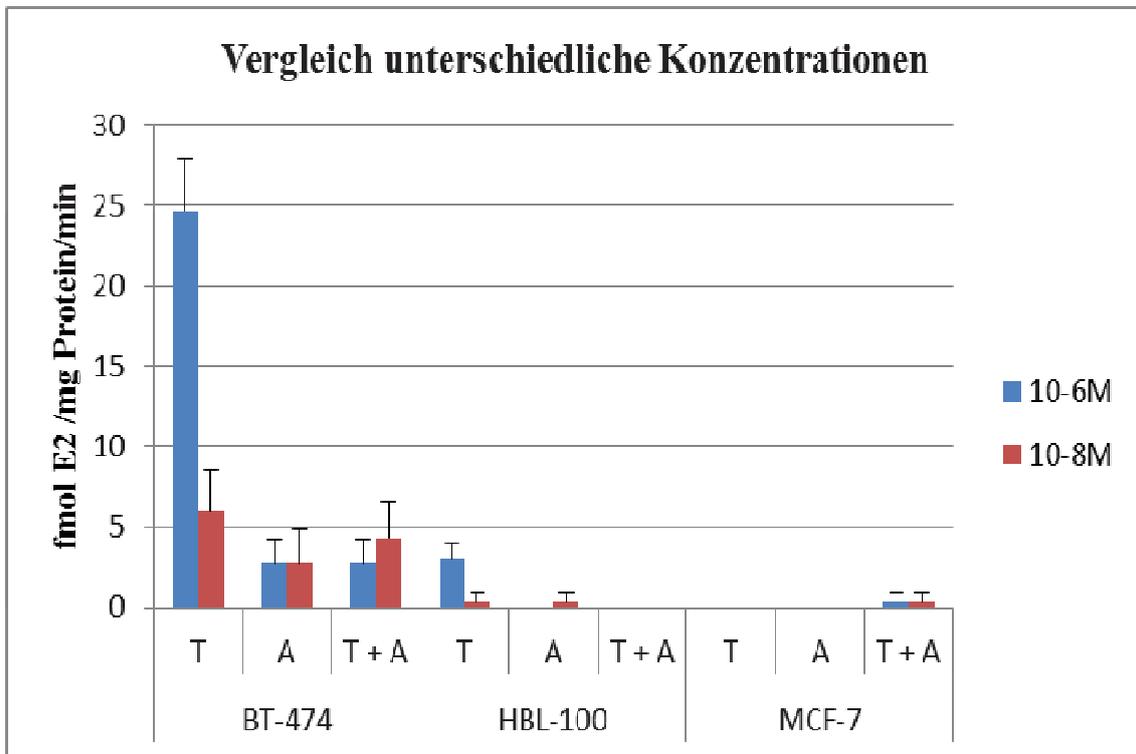


Abbildung 16: y-Achse: Östradiolformation fmol E2 /mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation, x-Achse: T = Testosteron, A = Anastrozol, T+A = Kombination aus Testosteron und Anastrozol, verschiedene Zelllinien

### 3.2.2 Dauer der Inkubation

Die totale lokale Östrogensynthese in der aggressiven Zelllinie BT-474 war zu jedem Zeitpunkt höher als die in den MCF-7-Zellen (basal „direkt“ und 24h p = 0.05; „direkt“ und 24h T p = 0.04; „direkt“ und 24h A+T p = 0.04) und in den HBL-100-Zellen (basal „direkt“ und 24h p = 0.05; „direkt“ T p = 0.004 und 24h T p = 0.016; „direkt“ A+T p = 0.004 und 24h A+T p = 0,873).

#### 3.2.2.1 Direkte Inkubation mit Testosteron

Die direkte Inkubation mit Testosteron zeigte einen leichten, nicht signifikanten Rückgang (p = 0,606, 0,439 und 0,121) der totalen lokalen Östrogensynthese (E1+E2) in allen drei Zelllinien (BT-474-, HBL-100- und MCF-7-Zellen). Die verschiedenen Konzentrationen ( $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol) wurden kombiniert.

#### BT-474-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	746 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	609 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	0,606
SD	22	191	

Tabelle 13: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**HBL-100-Zellen**

<b>Inkubationsmittel/Behandlung</b>	<b>Keine</b>	<b>Testosteron</b>	<b>p-Werte</b>
<b>gesamte Östrogenformation</b>	<b>137 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>114 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,439</b>
<b>SD</b>	<b>21</b>	<b>36</b>	

Tabelle 14: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**MCF-7-Zellen**

<b>Inkubationsmittel/Behandlung</b>	<b>Keine</b>	<b>Testosteron</b>	<b>p-Werte</b>
<b>gesamte Östrogenformation</b>	<b>264 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>176 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,121</b>
<b>SD</b>	<b>13</b>	<b>100</b>	

Tabelle 15: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

### 3.2.2.2 Graphische Darstellung der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei direkter Inkubation

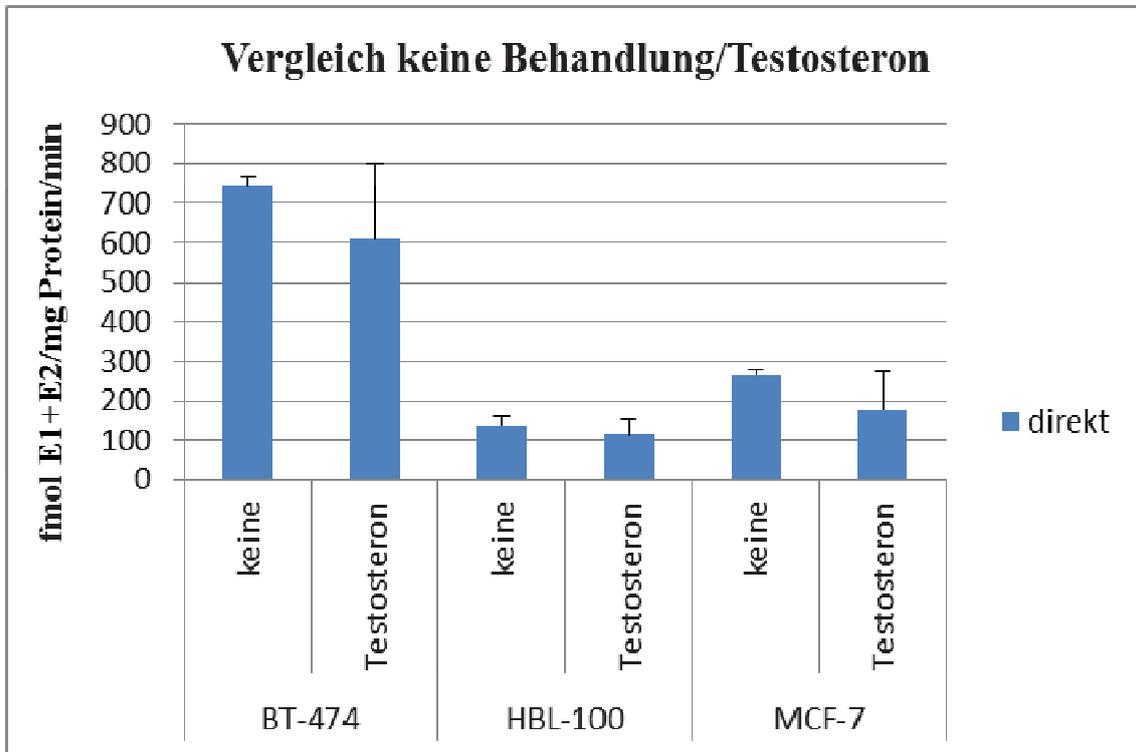


Abbildung 17: y-Achse: Östrogenformation fmol E1+E2/mg Protein/min direkter Inkubation, x-Achse keine = keine Behandlung, T = Testosteroninkubation, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol bzw.  $10^{-8}$ Mol kombiniert, verschiedene Zelllinien

### 3.2.2.3 Verhältnis der gesamten Östrogenformation bei direkter Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen

Die folgenden drei Tabellen zeigen das Verhältnis der entstandenen gesamten Östrogenformation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Östrogenformation in den unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt.

#### BT-474-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	1	0,82	0,606
SD	0,03	0,26	

Tabelle 16: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$  Mol und  $10^{-8}$  Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

#### HBL-100-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	1	0,83	0,439
SD	0,15	0,27	

Tabelle 17: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$  Mol und  $10^{-8}$  Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

MCF-7-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	1	0,67	0,121
SD	0,05	0,38	

Tabelle 18: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach direkter Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$  Mol und  $10^{-8}$  Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**3.2.2.4 Graphische Darstellung des Verhältnisses der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei direkter Inkubation**

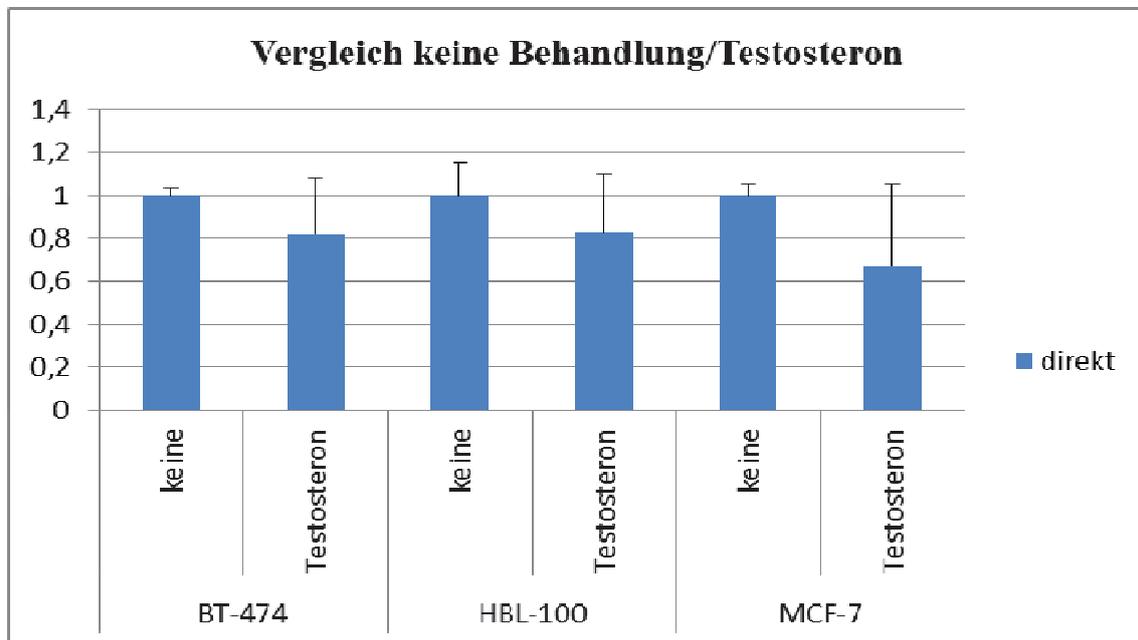


Abbildung 18: y-Achse: Verhältnis der Östrogenformation nach direkter Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, x-Achse: keine = keine Behandlung, Testosteron = Testosteroninkubation, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$  Mol und  $10^{-8}$  Mol kombiniert verschiedene Zelllinien

### 3.2.2.5 24-stündige Inkubation mit Testosteron

Die 24-stündige Inkubation mit Testosteron zeigte einen signifikanten Anstieg von E1 bzw. der totalen Östrogenformation (E1+E2) unabhängig von der Zelllinie ( $p = 0,02$ ).

#### BT-474-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	377 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	597 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	<u>0,02</u>
SD	18	116	

Tabelle 19: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

#### HBL-100-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	85 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	470 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	<u>0,02</u>
SD	5	21	

Tabelle 20: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

MCF-7-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	9 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	19 (E1+E2) fmol/mg Protein/min	<u>0,02</u>
SD	2	4	

Tabelle 21: gesamte Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

3.2.2.6 Graphische Darstellung der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei 24-stündiger Inkubation

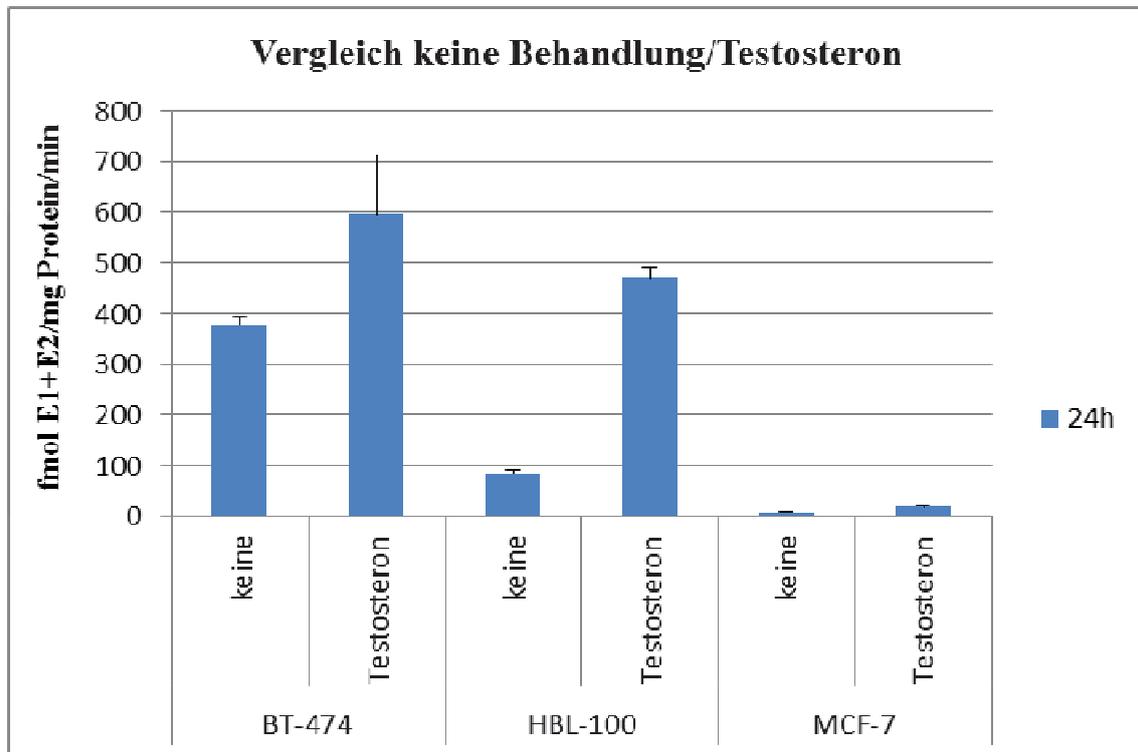


Abbildung 19: Östrogenformation fmol E1+E2/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation, x-Achse keine = keine Behandlung, Testosteron = Testosteroninkubation, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert, verschiedene Zelllinien

### 3.2.2.7 Verhältnis der gesamten Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen

Die drei folgenden Tabellen zeigen das Verhältnis der entstandenen gesamten Östrogenformation im Vergleich zu unbehandelten Zellen. Die Östrogenformation in den unbehandelten Zellen wurde auf 1 gesetzt. Eine signifikante Steigerung der Östrogenformation ergab sich unabhängig von der Zelllinie ( $p = 0,02$ ).

#### BT-474-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	1	1,59	<u>0,02</u>
SD	0,05	0,31	

Tabelle 22: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der BT-474-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

#### HBL-100-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
gesamte Östrogenformation	1	5,53	<u>0,02</u>
SD	0,06	0,25	

Tabelle 23: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der HBL-100-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkon-

## Ergebnisse

---

zentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

### MCF-7-Zellen

Inkubationsmittel/Behandlung	Keine	Testosteron	p-Werte
<b>gesamte Östrogenformation</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b><u>0,02</u></b>
<b>SD</b>	<b>0,26</b>	<b>0,49</b>	

Tabelle 24: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min nach 24-stündiger Inkubation der MCF-7-Zellen mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**3.2.2.8 Graphische Darstellung des Verhältnisses der Östrogenformation: unbehandelte Zellen versus Testosteronbehandlung bei 24-stündiger Inkubation**

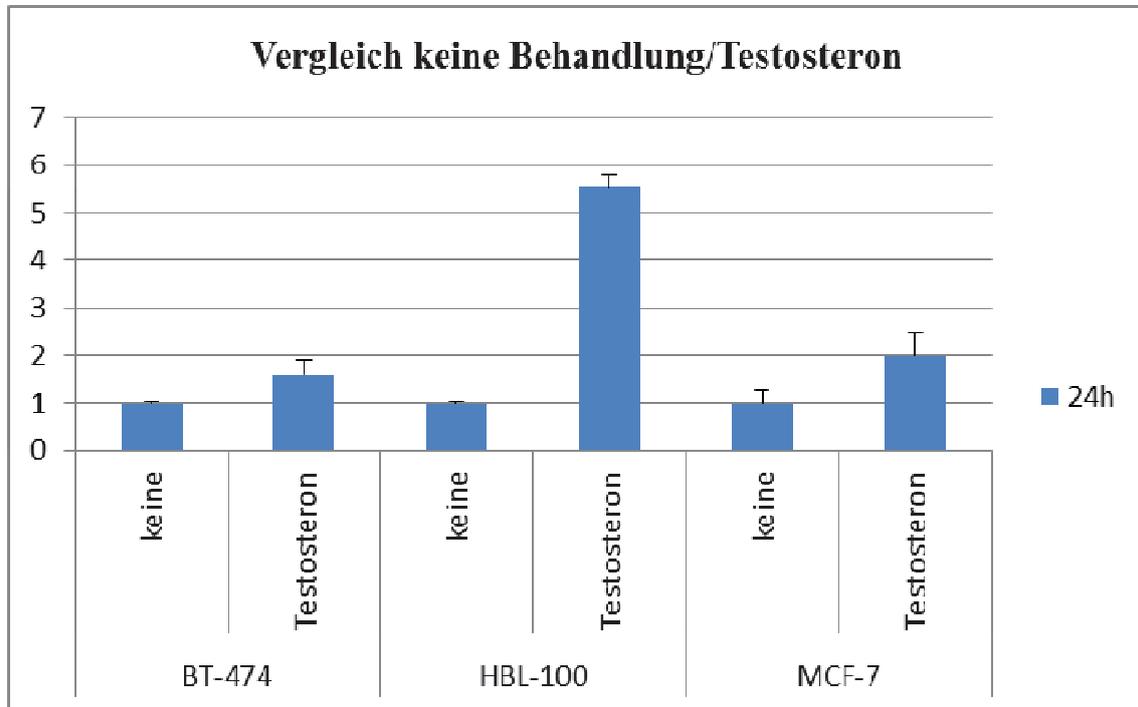


Abbildung 20: y-Achse: Verhältnis der Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron im Vergleich zu unbehandelten Zellen, x-Achse: keine = keine Behandlung, T = Testosteroninkubation, Testosteronkonzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert verschiedene Zelllinien

### **3.2.3 Auswirkung der Anastrozolinkubation**

#### **3.2.3.1 Wirkung der Inkubation mit Testosteron versus Anastrozolinkubation auf die lokale Östrogenformation**

Die Inkubation der Zellen mit Anastrozol im Vergleich von direkter zu 24-stündiger Behandlung ergab für die BT-474-Zellen ( $p = 0,004$ ) einen signifikanten Abfall der Östrogenformation. In den HBL-100- und den MCF-7-Zellen kam es hingegen zu einem Anstieg der Östrogenformation, wobei der Anstieg nur in den MCF-7-Zellen als signifikant ( $p = 0,004$ ) ausfällt.

Der Vergleich der direkten zur 24-stündigen Inkubation mit Testosteron ergab unabhängig von der Zellreihe einen signifikanten Anstieg der Östrogenformation ( $p = 0,004$ ).

Die direkte Inkubation mit Testosteron im Vergleich zur direkten Anastrozolinkubation zeigte in den BT-474- und MCF-7-Zellen eine nicht signifikante Steigerung der gesamten Östrogenformation ( $p = 0,522$  und  $0,749$ ). In den HBL-100-Zellen ergab sich hingegen ein signifikanter Anstieg ( $p = 0,037$ ).

Nach 24-stündiger Inkubation ergab sich im Vergleich Testosteron mit Anastrozol in den BT-474- ( $p = 0,004$ ) und HBL-100-Zellen ( $p = 0,004$ ) ein signifikanter Abfall der gesamten Östrogenformation. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den MCF-7-Zellen ein signifikanter Anstieg der Östrogenformation nach 24-stündiger Behandlung mit Anastrozol im Vergleich zur 24-stündigen Testosteronbehandlung ( $p = 0,016$ ).

## BT-474-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<b>direkt</b>	<b>0,82 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,9 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,522</b>
<b>SD</b>	<b>0,26</b>	<b>0,17</b>	
<b>24 Stunden</b>	<b>1,59 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,61 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b><u>0,004</u></b>
<b>SD</b>	<b>0,31</b>	<b>0,04</b>	
<b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b>	<b><u>0,004</u></b>	<b><u>0,004</u></b>	

Tabelle 25: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei BT-474-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zu Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## HBL-100-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<p><b>direkt</b></p> <p><b>SD</b></p>	<p><b>0,83 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b></p> <p><b>0,27</b></p>	<p><b>1,18 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b></p> <p><b>0,12</b></p>	<p><b><u>0,037</u></b></p>
<p><b>24 Stunden</b></p> <p><b>SD</b></p>	<p><b>5,53 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b></p> <p><b>0,25</b></p>	<p><b>1,78 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b></p> <p><b>0,82</b></p>	<p><b><u>0,004</u></b></p>
<p><b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b></p>	<p><b><u>0,004</u></b></p>	<p><b>0,337</b></p>	

Tabelle 26: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei HBL-100-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zu Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## MCF-7-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<b>direkt</b>	<b>0,67 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,81 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,749</b>
<b>SD</b>	<b>0,38</b>	<b>0,12</b>	
<b>24 Stunden</b>	<b>2 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>3,57 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b><u>0,016</u></b>
<b>SD</b>	<b>0,49</b>	<b>1,09</b>	
<b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b>	<b><u>0,004</u></b>	<b><u>0,004</u></b>	

Tabelle 27: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei MCF-7-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zu Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

**3.2.3.2 Graphische Darstellung der Östrogenformation im Vergleich zwischen Testosteron- und Anastrozolbehandlung nach direkter und 24-stündiger Inkubation**

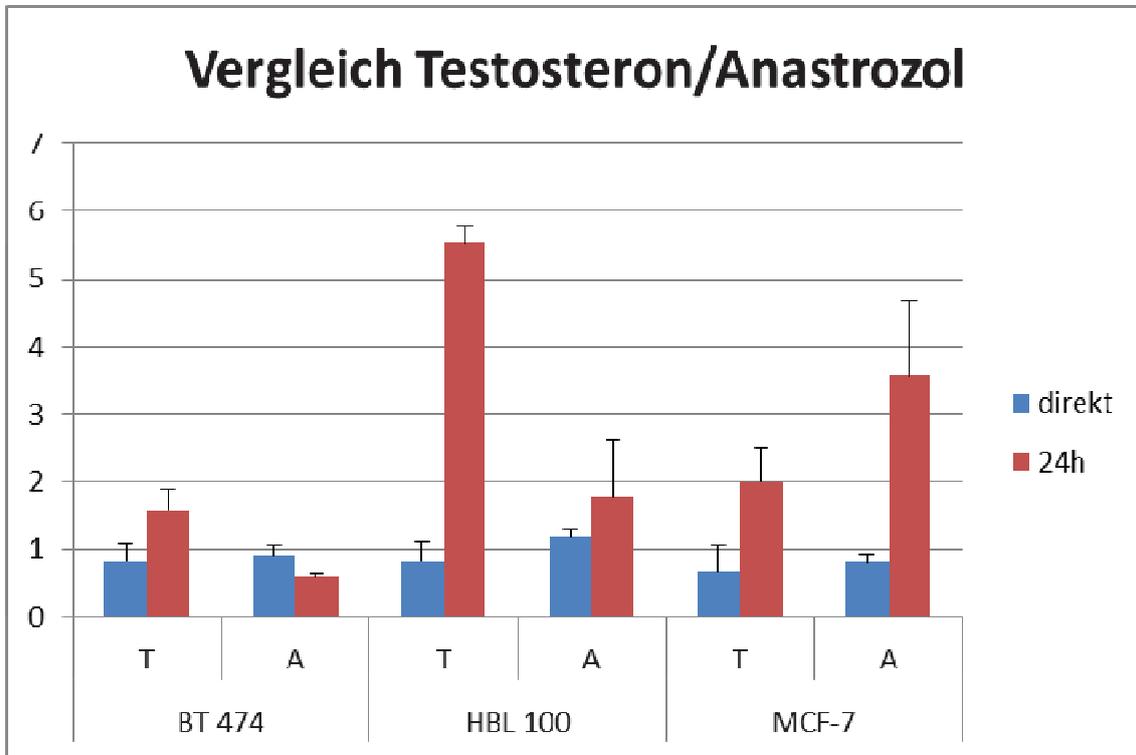


Abbildung 21: y-Achse: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) nach direkter bzw. 24-stündiger Inkubation, x-Achse: Inkubation mit Testosteron im Vergleich zur Anastrozolbehandlung, T = Testosteron, A = Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert verschiedene Zelllinien

### **3.2.3.3 Vergleich der Inkubation mit Anastrozol im Vergleich zur Kombination aus Anastrozol und Testosteron auf die lokale Östrogenformation**

Wie bereits in Abschnitt (4.2.2) erwähnt, ergab der Vergleich der direkten zur 24-stündigen Inkubation mit Testosteron unabhängig von der Zellreihe einen signifikanten Anstieg der Östrogenformation ( $p = 0,004$ ).

Der Vergleich der direkten mit der 24-stündigen Inkubation bei Kombination von Testosteron und Anastrozol zeigte einen signifikanten Anstieg der Östrogenformation in den HBL-100- ( $p = 0,001$ ) und den MCF-7-Zellen ( $p = 0,01$ ). Im Gegensatz dazu ergab sich für die BT-474-Zellen ein Absinken der Östrogenformation nach 24 Stunden Behandlung, die jedoch nicht signifikant war ( $p = 0,02$ ).

Die direkte Inkubation mit Testosteron im Vergleich zur direkten Testosteron- / Anastrozolinkubation zeigte in den BT-474- und MCF-7-Zellen einen nicht signifikanten Abfall der gesamten Östrogenformation ( $p = 0,262$  und  $0,337$ ). In den HBL-100-Zellen ergab sich hingegen ein nicht signifikanter Anstieg ( $p = 0,631$ ).

Nach 24-stündiger Inkubation ergab sich im Vergleich Testosteron zu Testosteron plus Anastrozol in den BT-474- ( $p = 0,004$ ) und HBL-100- ( $p = 0,004$ ) Zellen ein signifikanter Abfall der gesamten Östrogenformation. In den MCF-7-Zellen zeigte sich ein nahezu unveränderter Wert für die Östrogenformation und somit ein nicht signifikantes Ergebnis ( $p = 0,337$ ).

## BT-474-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Testosteron plus Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<b>direkt</b>	<b>0,82 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,73 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,262</b>
<b>SD</b>	<b>0,26</b>	<b>0,29</b>	
<b>24 Stunden</b>	<b>1,59 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,48 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b><u>0,004</u></b>
<b>SD</b>	<b>0,31</b>	<b>0,07</b>	
<b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b>	<b><u>0,004</u></b>	<b>0,2</b>	

Tabelle 28: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei BT-474-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zur Kombinationsbehandlung von Testosteron und Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## HBL-100-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Testosteron plus Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<b>direkt</b>	<b>0,83 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,92 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,631</b>
<b>SD</b>	<b>0,7</b>	<b>0,14</b>	
<b>24 Stunden</b>	<b>5,53 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>2,21 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b><u>0,004</u></b>
<b>SD</b>	<b>0,25</b>	<b>0,51</b>	
<b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b>	<b><u>0,004</u></b>	<b><u>0,01</u></b>	

Tabelle 29: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei HBL-100-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zur Kombinationsbehandlung von Testosteron und Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

## MCF-7-Zellen

Inkubationsmittel	Testosteron	Testosteron plus Anastrozol	p-Werte (direkt vs. direkt und 24h vs. 24h)
<b>direkt</b>	<b>0,67 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,47 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,337</b>
<b>SD</b>	<b>0,38</b>	<b>0,18</b>	
<b>24 Stunden</b>	<b>2 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>1,83 (E1+E2) fmol/mg Protein/min</b>	<b>0,337</b>
<b>SD</b>	<b>0,49</b>	<b>1,24</b>	
<b>p-Werte (direkt vs. 24h)</b>	<b><u>0,004</u></b>	<b><u>0,01</u></b>	

Tabelle 30: Verhältnis der Östrogenformation (E1+E2) fmol/mg Protein/min bei MCF-7-Zellen zu beiden Inkubationszeitpunkten (direkt, 24 stündig) mit Testosteron im Vergleich zur Kombinationsbehandlung von Testosteron und Anastrozol, Konzentrationen  $10^{-6}$ Mol und  $10^{-8}$ Mol kombiniert (SD = Standardabweichung, unterstrichene p-Werte zeigen signifikante Unterschiede an)

### 3.2.3.4 Graphische Darstellung der Östrogenformation im Vergleich von Testosteron- zur kombinierten Testosteron - / Anastrozolbehandlung nach direkter und 24-stündiger Inkubation

Durch die Zugabe von Anastrozol zu Testosteron erfolgte eine Verminderung des beobachteten Testosteroneffekts in HBL-100- und MCF-7-Zellen auf die lokale Östrogensynthese. Im Falle der BT-474-Zellen zeigte sich eine Umkehr der bei den anderen Zelllinien festgestellten erhöhten Östrogenproduktion nach 24 Stunden Inkubation im Vergleich zu der direkten Inkubation.

Die individuelle Fähigkeit der verschiedenen Zelllinien der Östrogenbildung blieb – unabhängig von der Behandlung – unverändert.

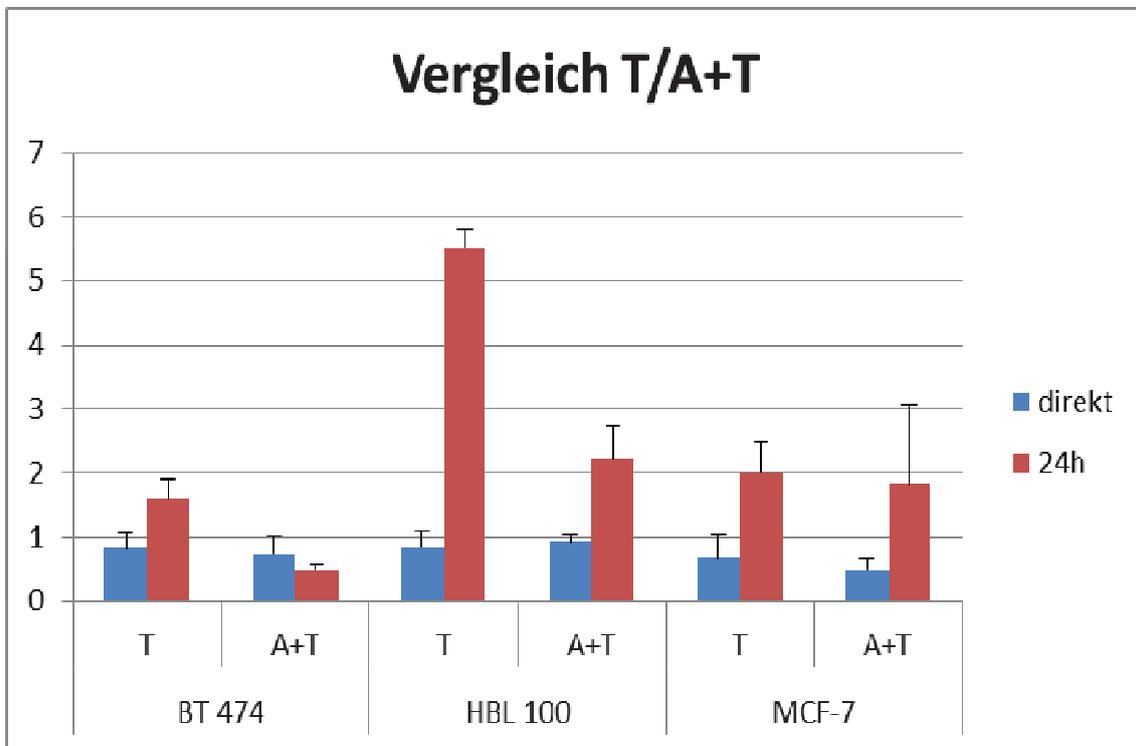


Abbildung 22: y-Achse: Verhältnis der Östrogenformation (E1 + E2) nach direkter bzw. 24-stündiger Inkubation, x-Achse: Testosteron (T) im Vergleich zur kombinierten Testosteron - / Anastrozolbehandlung (A + T)

### 3.3 Quantitative TaqMan® real-time PCR – STS mRNA Expression

Um festzustellen, ob die beobachteten Unterschiede der STS Aktivität auch auf mRNA Ebene zu einer veränderten Expression führen, erfolgte die quantitative TaqMan® real-time PCR. Die Hormonbehandlung der HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen mit Testosteron zeigte keine signifikanten Unterschiede der basalen mRNA Expression in den malignen und nicht-malignen Zelllinien. Des Weiteren ergab eine Behandlung mit Testosteron in den Konzentrationen  $10^{-8}\text{M}$  oder  $10^{-6}\text{M}$  für 24 Stunden keine Veränderungen der mRNA Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben. Die Werte wurden nach der comparative cycle threshold (Ct) Methode erhoben.

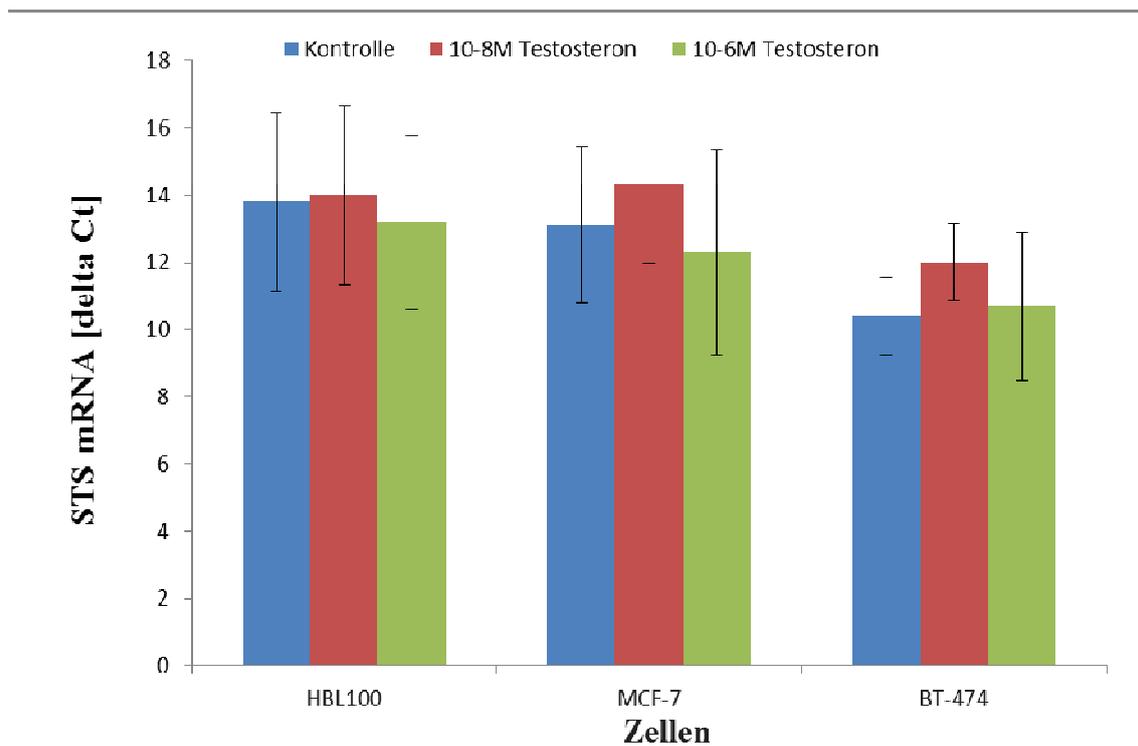


Abbildung 23: y-Achse: gemessene STS mRNA (in delta CT), x-Achse: verschiedene Zellreihen

<b>Inkubationsmittel</b>	<b>Kontrolle</b>	<b>10<sup>-8</sup>M Testosteron</b>	<b>10<sup>-6</sup>M Testosteron</b>
<b>Zellen</b>			
<b>HBL-100</b>	13,8	14	13,2
<b>SD</b>	4,5	4,6	4,5
<b>MCF-7</b>	13,1	14,3	12,3
<b>SD</b>	4,3	4	5,3
<b>BT-474</b>	10,4	12	10,7
<b>SD</b>	4,2	2	3,8

Tabelle 31: gemessene STS mRNA (in delta CT) in den verschiedenen Zelllinien bei der Inkubation mit Testosteron in den Konzentrationen 10<sup>-6</sup> Mol und 10<sup>-8</sup> Mol

	<b>Kontrolle vs Kontrolle</b>	<b>10<sup>-8</sup>M vs 10<sup>-8</sup>M</b>	<b>10<sup>-6</sup>M vs 10<sup>-6</sup>M</b>
<b>MCF-7 vs. HBL-100</b>	0,729	0,513	0,907
<b>MCF-7 vs. BT-474</b>	0,33	0,437	0,685
<b>HBL-100 vs BT-474</b>	0,518	0,542	0,504

Tabelle 32: tabellarische Darstellung der p-Werte der quantitativen TaqMan® real-time PCR – STS mRNA Expression, alle p-Werte nicht signifikant

### 3.4 Analyse der STS Proteinexpression nach Testosteronbehandlung

Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die beobachteten Unterschiede der STS Aktivität infolge posttranskriptioneller Regulation und Modifikation zustande gekommen sind, erfolgte eine semiquantitative Analyse der STS Proteinexpression. Hierzu führte ich eine dot-blot Analyse der Zelllysate der mit Testosteron behandelten HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen durch. Die BT-474-Zellen zeigten eine signifikant gesteigerte, ungefähr doppelt so hohe STS Proteinexpression verglichen mit den HBL-100-, MCF-7-Zellen (siehe Abb. 24). Die Testosteronbehandlung zeigte hingegen innerhalb einer Zelllinie keine signifikante Veränderung in der STS Proteinexpression.

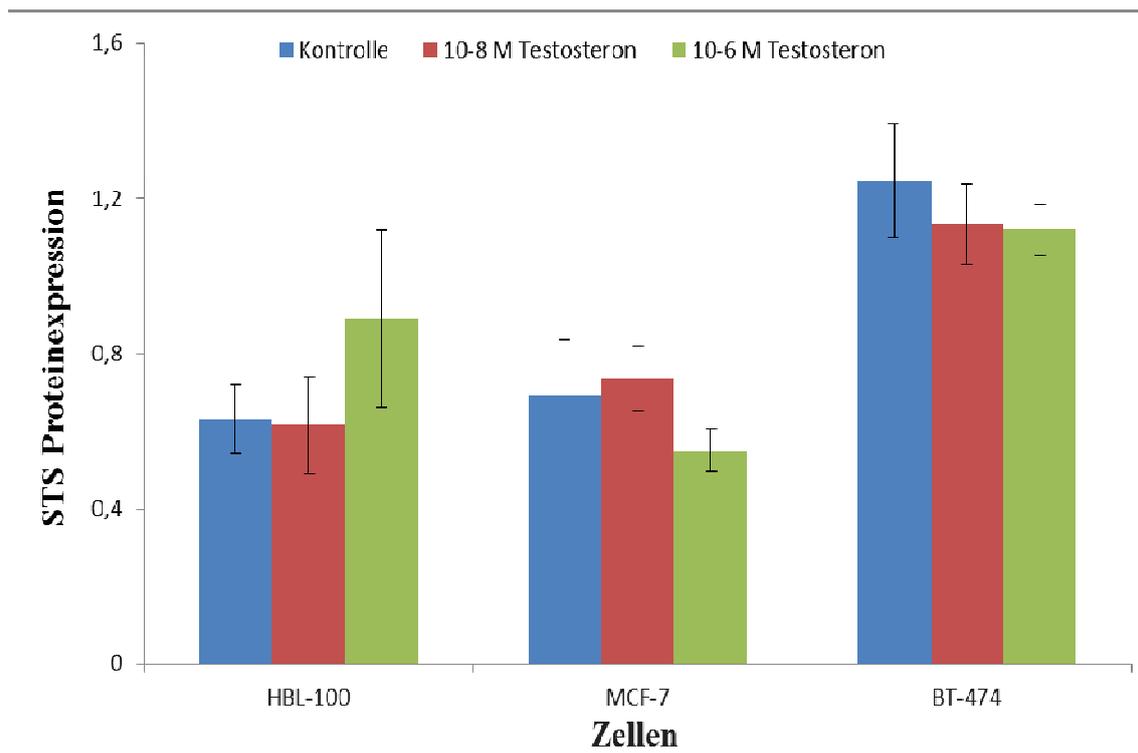


Abbildung 24: y-Achse: gemessene STS Proteinexpression als unskalierte Einheiten, x-Achse: verschiedene Zellreihen

Ergebnisse

Inkubationsmittel	Kontrolle	10 <sup>-8</sup> M Testosteron	10 <sup>-6</sup> M Testosteron
<b>Zellen</b>			
<b>HBL-100</b>	0,632	0,615	0,890
<b>SD</b>	0,156	0,217	0,396
<b>MCF-7</b>	0,691	0,736	0,550
<b>SD</b>	0,251	0,145	0,093
<b>BT-474</b>	1,245	1,134	1,119
<b>SD</b>	0,254	0,178	0,112

Tabelle 33: STS Proteinexpression als unskalierte Einheiten in den verschiedenen Zelllinien bei der Inkubation mit Testosteron in den Konzentrationen 10<sup>-6</sup> Mol und 10<sup>-8</sup> Mol

	Kontrolle vs Kontrolle	10 <sup>-8</sup> M vs 10 <sup>-8</sup> M	10 <sup>-6</sup> M vs 10 <sup>-6</sup> M
<b>MCF-7 vs. HBL-100</b>	0,753	0,474	0,273
<b>MCF-7 vs. BT-474</b>	0,055	<u>0,042</u>	<u>0,003</u>
<b>HBL-100 vs BT-474</b>	0,0321	<u>0,0349</u>	0,424

Tabelle 34: tabellarische Darstellungen der P-Werte der STS Proteinexpression nach Testosteronbehandlung, signifikante P-Werte sind unterstrichen

## 4 Diskussion

---

Vermindertes sexuelles Verlangen gilt bei Frauen in der Postmenopause als die häufigste sexuelle Funktionsstörung (Laumann, Paik et al. 1999). Die verbreitetste Behandlungsoption dieser Störung besteht in der Androtherapie (Braunstein 2006), die über die Anhebung des Serumspiegels bis an die obere Grenze des Normalwertes zu einer Verbesserung der sexuellen Funktion führt.

Zur Erreichung dieses Effektes wird besonders oft die transdermale Testosterongabe angewandt. Entsprechende Serien klinisch kontrollierter Studien zeigen bei einer Dosierung von 300 µg/Tag für einen relativ kurzen Zeitraum von sechs Monaten der Behandlung einen sicheren und effektiven Nutzen [34, 44].

Aussagen innerhalb solcher Zeiträume erlauben allerdings nicht die Schlussfolgerung, dass die dauerhafte Anwendung von Testosteron gefahrlos ist. Abgesehen von den mittel- bis langfristigen möglichen negativen Folgen *in vivo* sind zudem die Auswirkungen der Androtherapie auf zellulärer Ebene wenig erforscht. Aufgrund dieser Sachlage und der bisher ausstehenden genauen Definition der klinischen Symptomatik ist die Androtherapie keine Routinebehandlung.

Hinzu kommt, dass aus Testosteron *in vivo* über das Enzym Aromatase E<sub>2</sub> entstehen kann und Östrogene mitverantwortlich für die Brusttumorentstehung sind (Russo J 2004), so dass die Notwendigkeit der genauen Untersuchung der Auswirkung einer Androtherapie auf den Östrogenhaushalt besteht.

Hier setzt das Ziel der vorliegenden Studie an: Sie untersucht erstmals den Einfluss von Testosteron auf die E<sub>1</sub>S-Sulfataseaktivität in nicht-malignen und malignen Brustzellen *in vitro*. Zur Realisierung dieses Vorhabens waren folgende Schritte notwendig:

1. Nachweis einer STS Enzymexpression in allen Zelllinien,
2. Messung der Östrogenformation (E<sub>1</sub> + E<sub>2</sub>) als Ausdruck der STS Aktivität,
3. Feststellung des Beitrages der intrazellulären Aromatisierung zur Östrogenformation,
4. Messung der STS mRNA,
5. Analyse der STS Proteinexpression.

Der Ablauf dieser Schritte und die dadurch erzielten Ergebnisse lassen sich im Wesentlichen folgendermaßen beschreiben bzw. zusammenfassen:

1. Um sicherzustellen, dass alle untersuchten Zelllinien eine STS Expression zeigen, wurde zu Beginn der Zellversuche die STS Enzymexpression in den jeweiligen Zellen (HBL-100-, MCF-7-, und BT-474-Zellen) ohne vorherige Testosteronbehandlung (basale Aktivität) durch die Immunzytochemie nachgewiesen (siehe Abbildung 12). Dabei konnte für alle drei Zelllinien ein positives Ergebnis erzielt werden: Die basale Aktivität der STS in den aggressiven BT-474-Zellen war signifikant höher als in der HBL-100- und der MCF-7-Zellreihe. Die MCF-7-Zellen zeigten eine gering höhere basale Aktivität im Vergleich zu den HBL-100-Zellen *in vitro*.

Daran anschließend wurde die STS Enzymexpression nach der Behandlung mit Testosteron in der Konzentration von  $10^{-6}$ M erneut gemessen, und zwar direkt nach der Inkubation und nach 24 Stunden.

Unabhängig von der vorausgegangenen Behandlung wurde die höchste STS Expression in der aggressiveren BT-474-Brustkrebszelllinie gemessen. Die Behandlung mit oder ohne Testosteron zeigte keine signifikante Änderung der STS Expression in allen Zellreihen. Somit hat Testosteron keine signifikante Auswirkung auf die STS Expression in den in dieser Arbeit untersuchten Zellen.

2. In der totalen Östrogenformation zeigten sich im Gegensatz zur nicht gesteigerten STS Expression der Zellen – nach Inkubation mit Testosteron – signifikante Unterschiede innerhalb der Zellreihen. Zur Messung der totalen Östrogenformation wurden die Zellreihen mit Testosteron in den Konzentrationen  $10^{-6}$ M und  $10^{-8}$ M inkubiert. Zwischen diesen Konzentrationen konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden, so dass die Östrogenwerte der unterschiedlichen Konzentrationen kombiniert wurden.

Aufgrund der verhältnismäßig deutlich höheren Östrogenwerte im Vergleich zu den Östradiolwerten zeigten sich die Signifikanzverteilungen nach Kombination der E1- und E2-Werte ähnlich verteilt wie die der alleinigen Östrogenwerte.

Differenziert wurde hierbei zwischen der Messung der Zellextrakte direkt nach Inkubation mit Testosteron und der Messung nach 24 Stunden. Im Einzelnen zeigte sich dabei:

- Die direkte Inkubation mit Testosteron verminderte den Effekt der zellulären Regulation des Metabolismus. Es konnte ein leichter, nicht signifikanter Rückgang ( $p = 0,606, 0,439$  und  $0,121$ ) der totalen lokalen Östrogensynthese (E1+E2) in allen drei Zelllinien (BT-474-, HBL-100- und MCF-7-Zellen) nachgewiesen werden im Vergleich zur Baseline.
- Nach 24-stündiger Inkubation der Brustzellen mit Testosteron zeigte sich eine Veränderung der STS Aktivität im Vergleich zu der direkten Inkubation und Messung. Unabhängig von der gemessenen Zellreihe ergab sich eine signifikante Steigerung der Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron. Der p-Wert betrug dabei über alle Zelllinien  $0,02$ . Mit zunehmender Inkubationsdauer ist somit eine signifikante Steigerung der Östrogenkonzentration zu beobachten.

Dieses Ergebnis ist bei einer Testosterontherapie wichtig, da möglicherweise so eine gesteigerte Östrogenkonzentration in vivo auftreten könnte mit dem erhöhten Risiko für eine Brustkrebsentstehung.

3. Höchstwahrscheinlich zeigt sich die signifikante Steigerung der Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation zu einem gewissen Anteil aufgrund der intrazellulären Aromatisierung von Testosteron zu E2.

Insbesondere durch das Vorhandensein des Enzyms Aromatase kann durch eine Behandlung der Zellen mit Testosteron eine intrazelluläre Aromatisierung von Testosteron zu E2 entstehen bzw. über den enzymatischen Umweg über die  $17\beta$ Hydroxysteroid Dehydrogenase E1 aus Androstendion. Für die in dieser Studie verwendeten Zelllinien konnte eine Aromataseaktivität nachgewiesen werden (MacIndoe 1979; Sikora, Cordero et al. 2009).

Zur Bestimmung des Ausmaßes der intrazellulären Aromatisierung wurden die Zellen einmal mit Anastrozol oder mit Testosteron in Kombination mit Anastrozol inkubiert und die daraus resultierende Östrogenformation gemessen.

- Die Inkubation der Zellen mit Anastrozol ergab im Vergleich von direkter zu 24-stündiger Messung für die BT-474-Zellen ( $p = 0,004$ ) einen signifikanten Abfall der Östrogenformation. In den HBL-100- und den MCF-7-Zellen kam es hingegen zu einem Anstieg der Östrogenformation, wobei der Anstieg nur in den MCF-7-Zellen signifikant ( $p = 0,004$ ) war.
- Der Vergleich zwischen der direkten Testosteroninkubation einerseits und Anastrozolinkubation andererseits zeigte in den BT-474- und MCF-7-Zellen eine nicht signifikante Steigerung ( $p = 0,522, 0,749$ ), in den HBL-100-Zellen hingegen einen signifikanten Anstieg ( $p = 0,037$ ) der gesamten Östrogenformation.
- Nach 24-stündiger Inkubation ergab sich im Vergleich Testosteron gegen Anastrozol in den BT-474- ( $p = 0,004$ ) und HBL-100-Zellen ( $p = 0,004$ ) ein signifikanter Abfall der gesamten Östrogenformation. Im Gegensatz dazu war in den MCF-7-Zellen ein signifikanter Anstieg der Östrogenformation nach 24-stündiger Behandlung mit Anastrozol im Vergleich zur 24-stündigen Testosteronbehandlung ( $p = 0,016$ ) festzustellen.
- Die direkte Inkubation mit Testosteron im Vergleich zur direkten kombinierten Testosteron- / Anastrozolinkubation führte zu nicht signifikanten Veränderungen der Östrogenformation. In den BT-474- und MCF-7-Zellen kam es zu einem Abfall der gesamten Östrogenformation ( $p = 0,262, 0,337$ ), hingegen in den HBL-100-Zellen zu einem Anstieg ( $p = 0,631$ ) der gesamten Östrogenformation.
- Nach 24-stündiger Inkubation ergab sich im Vergleich der Testosteroninkubation und der kombinierten Testosteron- / Anastrozolinkubation in den BT-474- ( $p = 0,004$ ) und HBL-100-Zellen ( $p = 0,004$ ) ein signifikanter Abfall der gesamten Östrogenformation. In den MCF-7-Zellen war der Wert für die Östrogenformation nicht signifikant ( $p = 0,337$ ).

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass die 24-stündige Behandlung der Zellen mit Testosteron und Anastrozol ein Absinken der Östrogenformation über eine Vermin-

derung der intrazellulären Aromatisierung von Östrogenen zu Testosteron bewirkte. Dies legt den vorsichtigen Schluss nahe, dass eine Testosterontherapie mit einer zusätzlichen Aromataseinhibitortherapie eine Möglichkeit bietet, ein erhöhtes Brustkrebsrisiko zu senken. Die Wirksamkeit der Aromataseinhibitoren konnte in einer Studie nachgewiesen werden, in der sich eine Reduktion der peripheren Östrogensynthese und der Östrogensynthese in der Brust zeigte (Miller, Stuart et al. 2002).

Die in der Immunzytochemie gemessene leicht erhöhte Aktivität der STS Expression in den MCF-7-Zellen im Vergleich zu den HBL-100-Zellen *in vitro* führt überraschenderweise zu keiner vermehrten Östrogenformation der MCF-7-Zellen. Die 24-stündige Inkubation mit Testosteron und Testosteron mit Anastrozol kombiniert resultierte jeweils in einer höheren Östrogenformation in den HBL-100-Zellen im Vergleich zu der in den MCF-7-Zellen. BT-474-Zellen zeigen die höchste STS Expression und im Vergleich mit den MCF-7- und den HBL-100-Zellen eine verringerte Östrogenformation nach 24 Stunden.

4. Zur Feststellung, ob die beobachteten Unterschiede der STS Aktivität auch auf mRNA Ebene zu einer vermehrten Expression führen, erfolgte die quantitative TaqMan® real-time PCR. Die Testosteronbehandlung der HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen zeigte keine signifikanten Unterschiede der basalen mRNA Expression in den malignen und nicht-malignen Zelllinien. Des Weiteren resultierten aus einer Behandlung mit Testosteron in den Konzentrationen  $10^{-8}$  und  $10^{-6}$ M für 24 Stunden keine Veränderungen der mRNA Expression im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollproben. Die festgestellte Steigerung der Östrogenformation in allen Zellreihen nach 24-stündiger Inkubation lässt sich also nicht auf eine Änderung der mRNA Expression zurückführen. Insofern könnte sich die gesteigerte Östrogensynthese dadurch erklären, dass auf enzymatischer Ebene innerhalb der Zellen eine posttranslationale Veränderung stattgefunden hat.
5. Um zu klären, ob die beobachteten Unterschiede der STS Aktivität infolge posttranskriptioneller Modifikationen zustande gekommen sind, erfolgte die semiquantitative Analyse der STS Proteinexpression. Dazu führte ich eine dot-blot

Analyse der Zelllysate der mit Testosteron behandelten HBL-100-, MCF-7- und BT-474-Zellen durch. Die BT-474-Zellen zeigten eine signifikant gesteigerte, ungefähr doppelt so hohe STS Proteinexpression verglichen mit den MCF-7- und den HBL-100-Zellen. Für die Testosteronbehandlung konnte hingegen innerhalb einer Zelllinie keine signifikante Veränderung in der STS Proteinexpression in allen getesteten Zelllinien registriert werden. Diese Feststellung lässt vermuten, dass die lokale Synthese von Östrogenen in Brustkrebszellen vermehrt über sulfatierte Vorläufermoleküle stattfindet und es in der Folge zu einer Förderung des Tumorstwachstums kommt.

Zusammenfassend zeigt sich somit kein Einfluss von Testosteron auf die STS mRNA- und die STS Proteinexpression.

Möglicherweise lassen sich die hier berichteten Effekte der Regulation der STS durch die Wahl des direkten und 24-stündigen Versuchsansatzes erklären. Die direkte Inkubation könnte vor allem verlässlichere Informationen über die Regulierung von Testosteron auf der Ebene der enzymatischen, katalytischen Aktivität liefern. Im Vergleich dazu könnte die längere Inkubation (24 Stunden) mit Testosteron die komplexen Effekte auf die STS Expression sowie auf die Veränderung der Metaboliten in der Östrogenformation bewirkt haben.

Der stimulierende Effekt der Testosteroninkubation für 24 Stunden auf die STS Aktivität könnte zusätzlich durch weitere sekundäre Faktoren beeinflusst werden, wie etwa durch den transmembranösen Transport von Östronsulfat (E1S) in humanes Brustzellgewebe über die sog. Organic anion transporting polypeptides (OATPs). Diese Peptide wurden in einer Vielzahl von humanen Brustkrebszelllinien nachgewiesen (Pizzagalli, Varga et al. 2003; Nozawa, Suzuki et al. 2005; Miki, Suzuki et al. 2006). Aufgrund der Lipophilie von E1 und E2 ist eine Diffusion durch die Plasmamembran möglich. Im Gegensatz dazu können sulfatierte Östrogene wegen ihrer Hydrophilie und negativen Ladung nicht durch die Plasmamembran ins Zellinnere diffundieren (Purohit, Woo et al. 2011).

Bis zum heutigen Tage wurden insgesamt 11 humane OATPs gefunden, die sich in 6 Subgruppen unterteilen lassen (OATP1 – OATP6) (Kindla, Rau et al. 2011). In malignem Brustgewebe konnte der Transporter OATP1A2 mit einer 10fach höheren Expressionsrate nachgewiesen werden als in normalem Brustgewebe (Banerjee, Allen et al. 2012). Eine erhöhte Expression der Transporter OATP3A1 und OATP5A1 konnte auch in der Plasmamembran und im Zytoplasma von humanem Brustkrebsgewebe festgestellt werden (Kindla, Rau et al. 2011). Pizzagalli et al. fanden OATP2B1 in invasivem duktalem Karzinomgewebe (Pizzagalli, Varga et al. 2003).

Bei der von mir durchgeführten 24-stündigen Inkubation könnten OATPs die Verfügbarkeit von Östronsulfat in der Zelle erhöhen und somit zu einer größeren Östrogenformation über ein vermehrtes Angebot von intrazellulärem Substrat beitragen. Somit stützen meine Ergebnisse die mehrfach belegte Hypothese, dass eine Modifikation des Östrogenmetabolismus mit einem tumorösen Prozess in der Brust einhergeht (Nguyen, Chetrite et al. 1995; Pasqualini, Chetrite et al. 1995; Chetrite, Kloosterboer et al. 1999). Dies würde auch die von mir beobachteten verschiedenen Effekte von Steroiden auf maligne und normale Brustzelllinien erklären.

In Ergänzung zu den zuvor dargestellten Ergebnissen und möglichen Erklärungen, die sich auf die enzymatische Ebene der Östrogensynthese beziehen, werden im Folgenden Resultate berichtet und diskutiert, die sich auf die Ebene der mRNA und der STS Proteinexpression beziehen.

In dieser Hinsicht wird zum Beispiel berichtet (Miyoshi, Ando et al. 2003), dass eine gesteigerte STS mRNA Expression und die dadurch erhöhte STS Proteinexpression zu einem erhöhten intratumoralen Vorkommen von Östrogenen führen können. Intratumorale mRNA STS Level zeigen in humanen Brustkrebszellen einen signifikanten prognostischen Faktor in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen. Für die Aromatase und die 17- $\beta$ -HSD konnte dieser Zusammenhang nicht gefunden werden (Miyoshi, Ando et al. 2003).

Es ist bekannt, dass eine veränderte mRNA STS Expression bei Brustkrebspatienten ein unabhängiger prognostischer Vorhersagefaktor für das rezidivfreie Überleben ist. Hohe Expressionslevel der STS mRNA sind verbunden mit einer schlechteren Prognose (Utsumi, Yoshimura et al. 1999; Miyoshi, Ando et al. 2003; Suzuki, Nakata et al. 2003).

Die Hochregulierung der STS mRNA führt in Östrogenrezeptor-positiven Mammakarzinomen zu einer intratumoral gesteigerten Östrogenkonzentration und in der Folge zu einem gesteigerten Tumorwachstum über die Östrogenrezeptoren (Miyoshi, Ando et al. 2003).

In einer anderen Studie wurde nachgewiesen, dass es zu einer Hochregulierung der mRNA STS Expressionslevel in Weichgewebismetastasen von Brustkrebstumoren im Vergleich zu geringeren Leveln im primären Tumor kommt. Dies lässt die Annahme zu, dass die intratumorale Östrogensynthese vor allem das Entstehen von Metastasen begünstigt (Irahara, Miyoshi et al. 2006).

Andere Studien in malignen Mammakarzinomzellen zeigten beim Vorliegen eines gesteigerten, intrazellulären mRNA Levels der STS bzw. der Aromatase eine erhöhte enzymatische Aktivität der STS und der Aromatase (Pasqualini, Chetrite et al. 1996; Santner, Pauley et al. 1997).

Im Unterschied dazu zeigte sich in meiner Studie, dass trotz unveränderter STS mRNA Expression sowie unveränderter STS Proteinexpression vor und nach Inkubation eine gesteigerte Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation festzustellen war. Eine solche gleichbleibende STS Expression konnte auch in einer anderen Studie (HBL-100- und MCF-7-Zellen) nach einer Hormonbehandlung mit E2, Tibolon (OrgOD14) und dessen Metabolit Org4094 nachgewiesen werden (Stute, Gotte et al. 2008).

In Übereinstimmung mit den von mir berichteten Ergebnissen zeigen weitere Studien bei unveränderten mRNA Expressionsleveln eine gesteigerte STS Aktivität. Darin wurde deutlich, dass Medroxyprogesteronazetat (Purohit and Reed 1992), E1-3-sulfamat (EMATE) (Raobaikady, Purohit et al. 2003) und Interleukin-6 (Newman, Purohit et al. 2000) einen modulierenden Effekt auf die STS Aktivität haben, ohne die mRNA Level der STS zu verändern.

Mit Blick auf solche Studien lassen die hier berichteten Ergebnisse also die Annahme einer posttranslationalen Veränderung der STS Aktivität zu. Diese Veränderung könnte zum Beispiel über das aktive Zentrum des Enzyms erfolgen. Zur genaueren Charakterisierung der posttranslationalen Veränderung der STS wären allerdings weitere Untersuchungen notwendig.

Der stimulierende Effekt der 24-stündigen Behandlung mit Testosteron auf die lokale Östrogenformation, der in den von uns untersuchten Brustzelllinien vermutlich aufgrund von posttranslationalen Modifikationen auftritt, steht im Gegensatz zur Beobachtung in anderen Studien. Dort konnte ein inhibitorischer bzw. negativer Effekt auf die Brustzellproliferation von Brustkrebszelllinien *in vitro* (Szelei, Jimenez et al. 1997; Ortmann, Prifti et al. 2002), auf normales Brustgewebe *in vitro* (Hofling, Hirschberg et al. 2007) und auf die mammographische Dichte der Brust (Hofling, Lundstrom et al. 2007) nachgewiesen werden.

Über solche Ergebnisdifferenzen hinaus besteht im Vergleich mit anderen Studien auch ein zentraler Unterschied zu meiner Arbeit im Hinblick auf das Studiendesign, weil sie sich auf die alleinige Testosterongabe konzentriert, während verschiedene Autoren über eine in der Postmenopause durchgeführte konventionelle Hormontherapie mit Östrogenen in Kombination mit einer zusätzlichen Testosterongabe berichten (Cancer 1997; Shifren, Braunstein et al. 2000; Braunstein, Sundwall et al. 2005; Simon, Braunstein et al. 2005; Davis, van der Mooren et al. 2006; Hofling, Lundstrom et al. 2007).

Insofern ist meine Arbeit eher mit der von Davis et. al. zu vergleichen. Darin erfolgte die Testosterongabe in 2 Dosen (150 und 300 Mikrogramm) an postmenopausalen Frauen im Vergleich zu einer Placebogabe für insgesamt 52 Wochen. Alle Frauen litten unter einer verringerten, postmenopausalen Libido (hypoactive sexual desire disorder [HSDD]). Im Studienverlauf wurden in der Testosterongruppe bei zwei Frauen ein invasives Mammakarzinom und bei einer weiteren Probandin ein duktales Karzinom diagnostiziert. In der Placebokontrollgruppe trat dagegen kein Mammakarzinom auf. Ergänzend sei allerdings darauf hinzuweisen, dass nach erfolgter Randomisierung in der Retrospektive eine dieser drei Frauen bereits vor Studienbeginn über eine blutige Sekretion aus der Mamille berichtete. (Davis, Moreau et al. 2008) Eine vorher nicht erkannte oder weiter diagnostizierte blutige Mamillensekretion hätte zu einem Ausschluss aus der Studie führen müssen, da ggf. schon ein Karzinom zu Studienbeginn bestanden haben könnte.

Das in dieser Studie beobachtete gehäufte Auftreten von Mammakarzinomen *in vivo* korrespondiert mit den Ergebnissen meiner Arbeit hinsichtlich der signifikant vermehrten Östrogenformation nach 24-stündiger Inkubation mit Testosteron.

Klare Grenzen meiner Studie zeigen sich in prinzipieller Hinsicht insbesondere wegen der Vielfalt der möglichen Einflussfaktoren. So könnte zum Beispiel die Länge der Dauer der Inkubation (24 Stunden) zu unterschiedlichen Resultaten führen, da eine zu lange Latenz von der Inkubation bis zum Messzeitpunkt besteht und intrazelluläre Anpassungen stattfinden können. Außerdem könnten weitere Steroide die STS Aktivität durch eine Beeinflussung der transkriptionellen und / oder der translationalen Veränderungen absenken. Dies wurde bereits für verschiedene Zytokine nachgewiesen (Purohit and Reed 1992; Newman, Purohit et al. 2000). In anderen Zusammenhängen konnte gezeigt werden, dass in der Brustdrüse von postmenopausalen Affen die STS Aktivität abhängig ist von der Art der Behandlung und dem Fettanteil der Brust. (Stute, Register et al. 2006) Zudem wäre in Betracht zu ziehen, dass eine vermehrte STS Aktivität in Brustgewebeproben positiv mit der Größe des epithelialen Anteils korreliert.

Des Weiteren müssten auch auf molekularer Ebene die STS Expression und deren Regulation genauer charakterisiert werden, denn die Komplexität der Promotorregion des STS Gens ermöglicht keine einfache Vorhersage über solche Faktoren, die eine Hoch- oder Herunterregulierung des Gens zur Folge haben (Li, Alperin et al. 1996; Reed, Purohit et al. 2005).

## 5 Zusammenfassung

---

Als wesentliches Ergebnis meiner Arbeit lässt sich feststellen, dass die direkte Testosteroninkubation die katalytische Aktivität der STS *in vitro* nicht signifikant senkt. Im Gegensatz dazu steigt nach 24 Stunden Behandlung mit Testosteron die Östrogenformation signifikant an. Diese Ergebnisse gelten für alle drei untersuchten Zelllinien.

Zusätzlich zu diesem modulierenden Effekt von Testosteron auf die STS Aktivität nach 24 Stunden ergab sich jedoch keine Veränderung der STS mRNA Expression bzw. der STS Proteinexpression. Dies lässt einen posttranslationalen Effekt von Testosteron auf die STS vermuten. Dies gilt wiederum für alle drei Zelllinien. Dies legt zusätzlich nahe, dass die STS Aktivität und die STS Proteinexpression vorrangig eher abhängig vom „Zellcharakter“ der verwendeten Zelle als von der hormonellen Behandlung zu sein scheinen.

Im Gegensatz dazu ergaben sich jedoch wichtige Unterschiede zwischen den verwendeten Zellen hinsichtlich der Aggressivität der Brustkrebszelllinie. Die in dieser Arbeit verwendeten aggressiven BT-474-Zellen zeigten nämlich, im Vergleich zu den MCF-7- und den HBL-100-Zellen, eine erhöhte STS-Enzymaktivität und Proteinexpression vor und nach Behandlung. Daher scheint es so zu sein, dass eine Transformation von einer nicht-malignen Brustzelle in eine aggressive maligne Brustkrebszelle durch eine veränderte Autoregulation begünstigt wird. Das Ausmaß der veränderten Autoregulation sowie die genaue Untersuchung der posttranslationalen Veränderung der STS müssen Gegenstand weiterer Forschung sein.

Des Weiteren stellt sich die Frage, ob das präexistente endokrine Milieu, in der sich die Zelle befindet, eine Auswirkung auf die Zellantwort und die Östrogenformation haben könnte (Sasano, Suzuki et al. 2008). Ist das präexistente endokrine Milieu östrogenarm, wie in der Postmenopause, erfolgt eine vermehrte Expression des Östrogenrezeptors im normalen Brustgewebe im Gegensatz zu prämenopausalem Brustgewebe. (Lofgren, Sahlin et al. 2006) Dadurch erfolgt eine schnellere Aromatisierung von Testosteron zu E<sub>2</sub>, welches in der vorliegenden Arbeit pharmakologisch durch Anastrozol verhindert wurde. Im Gegensatz dazu reagiert Brustgewebe, das mit einer konventionellen Hormontherapie behandelt worden ist, auf eine anschließende Behandlung mit Testosteron in bestimmter Weise: Es kommt zu einer vermehrten Östrogenformation (Stute, Register et al. 2006; Stute, Szuwart et al. 2008); das zusätzlich gegebene Testosteron wird nicht aromatisiert zu E<sub>2</sub>, da es zu einer Produkthemmung kommt. Somit zeigt sich, dass das präexistente Milieu von entscheidender Bedeutung

für die STS Aktivität der Brustzellen in vitro ist. Diese Hypothese wird gestützt durch Sikora et al., die eine Hochregulierung von steroidproduzierenden Enzymen in vitro in ausgeprägt östrogenarmer Umgebung zeigten (Sikora, Cordero et al. 2009). Das präexistente Milieu des Studiendesigns ist somit entscheidend für die STS Aktivität. Daher müsste bei der Beurteilung von Studien beachtet werden, ob eine Testosterontherapie in Kombination mit einer Östrogengabe alleinig oder mit Östrogen und Gestagen in Kombination verwendet wird.

---

## 6 Literaturverzeichnis

---

- Abul-Hajj, Y. J., R. Iverson, et al. (1979). "Aromatization of androgens by human breast cancer." *Steroids* 33(2): 205-22.
- Abul-Hajj, Y. J., J. H. Thijssen, et al. (1988). "Metabolism of estradiol by human breast cancer." *Eur J Cancer Clin Oncol* 24(7): 1171-8.
- American Cancer Society, I. A. (2009-2010). American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures*.
- Anderson, G. L., H. L. Judd, et al. (2003). "Effects of estrogen plus progestin on gynecologic cancers and associated diagnostic procedures: the Women's Health Initiative randomized trial." *JAMA* 290(13): 1739-48.
- Anderson, G. L., M. Limacher, et al. (2004). "Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* 291(14): 1701-12.
- Arun, B. and P. Goss (2004). "The role of COX-2 inhibition in breast cancer treatment and prevention." *Semin Oncol* 31(2 Suppl 7): 22-9.
- Banerjee, N., C. Allen, et al. (2012). "Differential Role of OATPs in Estrone-3-Sulphate Uptake by Breast Epithelial Cells and Breast Cancer Cells." *J Pharmacol Exp Ther*.
- Barnhart, K. T., E. Freeman, et al. (1999). "The effect of dehydroepiandrosterone supplementation to symptomatic perimenopausal women on serum endocrine profiles, lipid parameters, and health-related quality of life." *J Clin Endocrinol Metab* 84(11): 3896-902.
- Baum, M., A. U. Budzar, et al. (2002). "Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial." *Lancet* 359(9324): 2131-9.
- Belchetz, P. E. (1994). "Hormonal treatment of postmenopausal women." *N Engl J Med* 330(15): 1062-71.
- Biddle, A. K., S. L. West, et al. (2009). "Hypoactive Sexual Desire Disorder in Postmenopausal Women: Quality of Life and Health Burden." *Value Health*.
- Boccardo, F., A. Rubagotti, et al. (2006). "Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial." *Ann Oncol* 17 Suppl 7: vii10-4.
- Boccardo, F., A. Rubagotti, et al. (2005). "Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer: preliminary results of the Italian Tamoxifen Anastrozole Trial." *J Clin Oncol* 23(22): 5138-47.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." *Anal Biochem* 72: 248-54.
- Braunstein, G. D. (2006). "Androgen insufficiency in women." *Growth Horm IGF Res* 16 Suppl A: S109-17.
- Braunstein, G. D., D. A. Sundwall, et al. (2005). "Safety and efficacy of a testosterone patch for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in surgically menopausal women: a randomized, placebo-controlled trial." *Arch Intern Med* 165(14): 1582-9.
- Brooks, S. C., E. R. Locke, et al. (1973). "Estrogen receptor in a human cell line (MCF-7) from breast carcinoma." *J Biol Chem* 248(17): 6251-3.
- Brueggemeier, R. W., J. C. Hackett, et al. (2005). "Aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer." *Endocr Rev* 26(3): 331-45.

- Bulun, S. E., T. M. Price, et al. (1993). "A link between breast cancer and local estrogen biosynthesis suggested by quantification of breast adipose tissue aromatase cytochrome P450 transcripts using competitive polymerase chain reaction after reverse transcription." *J Clin Endocrinol Metab* 77(6): 1622-8.
- Bulun, S. E., K. Takayama, et al. (2004). "Organization of the human aromatase p450 (CYP19) gene." *Semin Reprod Med* 22(1): 5-9.
- Burger, H. G. (2002). "Androgen production in women." *Fertil Steril* 77 Suppl 4: S3-5.
- Burger, H. G., E. C. Dudley, et al. (2000). "A prospective longitudinal study of serum testosterone, dehydroepiandrosterone sulfate, and sex hormone-binding globulin levels through the menopause transition." *J Clin Endocrinol Metab* 85(8): 2832-8.
- Buster, J. E., S. A. Kingsberg, et al. (2005). "Testosterone patch for low sexual desire in surgically menopausal women: a randomized trial." *Obstet Gynecol* 105(5 Pt 1): 944-52.
- Buzdar, A. U. (2003). "Pharmacology and pharmacokinetics of the newer generation aromatase inhibitors." *Clin Cancer Res* 9(1 Pt 2): 468S-72S.
- Cancer, C. G. o. H. F. i. B. (1997). "Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer." *Lancet* 350(9084): 1047-59.
- Caron de Fromentel, C., P. C. Nardeux, et al. (1985). "Epithelial HBL-100 cell line derived from milk of an apparently healthy woman harbours SV40 genetic information." *Exp Cell Res* 160(1): 83-94.
- Cataliotti, L., A. U. Buzdar, et al. (2006). "Comparison of anastrozole versus tamoxifen as preoperative therapy in postmenopausal women with hormone receptor-positive breast cancer: the Pre-Operative "Arimidex" Compared to Tamoxifen (PROACT) trial." *Cancer* 106(10): 2095-103.
- Chetrite, G. S., H. J. Kloosterboer, et al. (1999). "Effects of Org OD14 (Livial) and its metabolites on 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activity in hormone-dependent MCF-7 and T-47D breast cancer cells." *Anticancer Res* 19(1A): 261-7.
- Clarke, R. (1996). "Human breast cancer cell line xenografts as models of breast cancer. The immunobiologies of recipient mice and the characteristics of several tumorigenic cell lines." *Breast Cancer Res Treat* 39(1): 69-86.
- Clemens, J. W., H. L. Kabler, et al. (2000). "Steroid sulfatase activity in the rat ovary, cultured granulosa cells, and a granulosa cell line." *J Steroid Biochem Mol Biol* 75(4-5): 245-52.
- Colditz, G. A. and B. Rosner (2000). "Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses' Health Study." *Am J Epidemiol* 152(10): 950-64.
- Cuzick, J., I. Sestak, et al. (2010). "Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 10-year analysis of the ATAC trial." *Lancet Oncol* 11(12): 1135-41.
- Dao, T. L., C. Hayes, et al. (1974). "Steroid sulfatase activities in human breast tumors." *Proc Soc Exp Biol Med* 146(2): 381-4.
- Davis, S., M. A. Papalia, et al. (2008). "Safety and efficacy of a testosterone metered-dose transdermal spray for treating decreased sexual satisfaction in premenopausal women: a randomized trial." *Ann Intern Med* 148(8): 569-77.
- Davis, S. R. (2009). "Testosterone for low libido in postmenopausal women not using systemic oestrogen therapy." *Med J Aust* 191(3): 134-5.

- Davis, S. R., M. Moreau, et al. (2008). "Testosterone for low libido in postmenopausal women not taking estrogen." *N Engl J Med* 359(19): 2005-17.
- Davis, S. R., M. J. van der Mooren, et al. (2006). "Efficacy and safety of a testosterone patch for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in surgically menopausal women: a randomized, placebo-controlled trial." *Menopause* 13(3): 387-96.
- Day, J. M., H. J. Tutill, et al. (2008). "Design and validation of specific inhibitors of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases for therapeutic application in breast and prostate cancer, and in endometriosis." *Endocr Relat Cancer* 15(3): 665-92.
- de Jong, P. C., M. A. Blankenstein, et al. (2001). "Importance of local aromatase activity in hormone-dependent breast cancer: a review." *Breast* 10(2): 91-9.
- de Ronde, W. and F. H. de Jong (2011). "Aromatase inhibitors in men: effects and therapeutic options." *Reprod Biol Endocrinol* 9: 93.
- Degnim, A. C., D. W. Visscher, et al. (2007). "Stratification of breast cancer risk in women with atypia: a Mayo cohort study." *J Clin Oncol* 25(19): 2671-7.
- Dimitrakakis, C., J. Zhou, et al. (2003). "A physiologic role for testosterone in limiting estrogenic stimulation of the breast." *Menopause* 10(4): 292-8.
- Dodgson, K. S., T. H. Melville, et al. (1954). "Studies on sulphatases. VIII. The arylsulphatase of a strain of *Alcaligenes metalcaligenes* isolated from intertidal mud." *Biochem J* 58(2): 182-7.
- Dumont, M., V. Luu-The, et al. (1992). "Expression of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in mammalian cells." *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8): 605-8.
- Eliassen, A. H., G. A. Colditz, et al. (2006). "Adult weight change and risk of postmenopausal breast cancer." *JAMA* 296(2): 193-201.
- Ezaki, K., H. Motoyama, et al. (2001). "Immunohistologic localization of estrone sulfatase in uterine endometrium and adenomyosis." *Obstet Gynecol* 98(5 Pt 1): 815-9.
- Fisher, B., J. Dignam, et al. (1999). "Tamoxifen in treatment of intraductal breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-24 randomised controlled trial." *Lancet* 353(9169): 1993-2000.
- Forbes JF, C. J., et al. (2008). "Effect of anastrozole and tamoxifen as adjuvant treatment for early-stage breast cancer: 100-month analysis of the ATAC trial." *Lancet Oncol* 9:45.
- Freedman, M., J. San Martin, et al. (2001). "Digitized mammography: a clinical trial of postmenopausal women randomly assigned to receive raloxifene, estrogen, or placebo." *J Natl Cancer Inst* 93(1): 51-6.
- Gaffney, E. V. (1982). "A cell line (HBL-100) established from human breast milk." *Cell Tissue Res* 227(3): 563-8.
- Gartner, C. A., S. J. Thompson, et al. (2001). "Human aromatase in high yield and purity by perfusion chromatography and its characterization by difference spectroscopy and mass spectrometry." *Protein Expr Purif* 22(3): 443-54.
- Geisler, J., S. Detre, et al. (2001). "Influence of neoadjuvant anastrozole (Arimidex) on intratumoral estrogen levels and proliferation markers in patients with locally advanced breast cancer." *Clin Cancer Res* 7(5): 1230-6.
- Geisler, J., N. King, et al. (1996). "Influence of anastrozole (Arimidex), a selective, non-steroidal aromatase inhibitor, on in vivo aromatisation and plasma oestrogen levels in postmenopausal women with breast cancer." *Br J Cancer* 74(8): 1286-91.
- Gniot-Szulzycka, J. and B. Januszevska (1986). "Purification of steroid sulphohydrolase from human placenta microsomes." *Acta Biochim Pol* 33(3): 203-15.
- Greendale, G. A., B. A. Reboussin, et al. (2003). "Postmenopausal hormone therapy and change in mammographic density." *J Natl Cancer Inst* 95(1): 30-7.

- Gunnarsson, C., E. Hellqvist, et al. (2005). "17beta-Hydroxysteroid dehydrogenases involved in local oestrogen synthesis have prognostic significance in breast cancer." *Br J Cancer* 92(3): 547-52.
- Hagenbuch, B. and P. J. Meier (2003). "The superfamily of organic anion transporting polypeptides." *Biochim Biophys Acta* 1609(1): 1-18.
- Han, H. D., M. M. Fencl, et al. (1987). "Variations in estrone sulfatase activity in human leukocytes." *J Clin Endocrinol Metab* 65(5): 1026-30.
- Harada, N., H. Sasano, et al. (1999). "Localized expression of aromatase in human vascular tissues." *Circ Res* 84(11): 1285-91.
- Harichand-Herdt, S., A. Zelnak, et al. (2009). "Endocrine therapy for the treatment of postmenopausal women with breast cancer." *Expert Rev Anticancer Ther* 9(2): 187-98.
- Harris, R. E., K. K. Namboodiri, et al. (1996). "Nonsteroidal antiinflammatory drugs and breast cancer." *Epidemiology* 7(2): 203-5.
- Harris, R. E., F. M. Robertson, et al. (1999). "Genetic induction and upregulation of cyclooxygenase (COX) and aromatase (CYP19): an extension of the dietary fat hypothesis of breast cancer." *Med Hypotheses* 52(4): 291-2.
- Henderson, B. E., R. Ross, et al. (1988). "Estrogens as a cause of human cancer: the Richard and Hinda Rosenthal Foundation award lecture." *Cancer Res* 48(2): 246-53.
- Hersh, A. L., M. L. Stefanick, et al. (2004). "National use of postmenopausal hormone therapy: annual trends and response to recent evidence." *JAMA* 291(1): 47-53.
- Higa, G. M. and N. alKhouri (1998). "Anastrozole: a selective aromatase inhibitor for the treatment of breast cancer." *Am J Health Syst Pharm* 55(5): 445-52.
- Hobkirk, R., C. Cardy, et al. (1982). "Estrone sulfatase activity in guinea pig tissues." *J Steroid Biochem* 17(1): 71-6.
- Hofling, M., A. L. Hirschberg, et al. (2007). "Testosterone inhibits estrogen/progestogen-induced breast cell proliferation in postmenopausal women." *Menopause* 14(2): 183-90.
- Hofling, M., E. Lundstrom, et al. (2007). "Testosterone addition during menopausal hormone therapy: effects on mammographic breast density." *Climacteric* 10(2): 155-63.
- Howell, A., J. Cuzick, et al. (2005). "Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial after completion of 5 years' adjuvant treatment for breast cancer." *Lancet* 365(9453): 60-2.
- Hsieh, C. C., D. Trichopoulos, et al. (1990). "Age at menarche, age at menopause, height and obesity as risk factors for breast cancer: associations and interactions in an international case-control study." *Int J Cancer* 46(5): 796-800.
- Irahara, N., Y. Miyoshi, et al. (2006). "Quantitative analysis of aromatase, sulfatase and 17beta-HSD(1) mRNA expression in soft tissue metastases of breast cancer." *Cancer Lett* 243(1): 23-31.
- Jakesz, R., R. Greil, et al. (2007). "Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a." *J Natl Cancer Inst* 99(24): 1845-53.
- Jakesz, R., W. Jonat, et al. (2005). "Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozole after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial." *Lancet* 366(9484): 455-62.
- James, V. H., J. M. McNeill, et al. (1987). "Aromatase activity in normal breast and breast tumor tissues: in vivo and in vitro studies." *Steroids* 50(1-3): 269-79.

- Jansson, A. K., C. Gunnarsson, et al. (2006). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenase 14 affects estradiol levels in breast cancer cells and is a prognostic marker in estrogen receptor-positive breast cancer." *Cancer Res* 66(23): 11471-7.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. "Cancer statistics, 2010." *CA Cancer J Clin* 60(5): 277-300.
- Jick, S. S., K. W. Hagberg, et al. (2009). "Postmenopausal estrogen-containing hormone therapy and the risk of breast cancer." *Obstet Gynecol* 113(1): 74-80.
- Jonat, W., M. Gnant, et al. (2006). "Effectiveness of switching from adjuvant tamoxifen to anastrozole in postmenopausal women with hormone-sensitive early-stage breast cancer: a meta-analysis." *Lancet Oncol* 7(12): 991-6.
- Judd, H. L., G. E. Judd, et al. (1974). "Endocrine function of the postmenopausal ovary: concentration of androgens and estrogens in ovarian and peripheral vein blood." *J Clin Endocrinol Metab* 39(6): 1020-4.
- Kaufmann, M., W. Jonat, et al. (2007). "Improved overall survival in postmenopausal women with early breast cancer after anastrozole initiated after treatment with tamoxifen compared with continued tamoxifen: the ARNO 95 Study." *J Clin Oncol* 25(19): 2664-70.
- Kawano, J., T. Kotani, et al. (1989). "A monoclonal antibody to rat liver arylsulfatase C and its application in immunohistochemistry." *J Histochem Cytochem* 37(5): 683-90.
- Kindla, J., T. T. Rau, et al. (2011). "Expression and localization of the uptake transporters OATP2B1, OATP3A1 and OATP5A1 in non-malignant and malignant breast tissue." *Cancer Biol Ther* 11(6): 584-91.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (1997). "The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology." *Steroids* 62(1): 148-58.
- Labrie, F., V. Luu-The, et al. (2000). "Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease." *J Mol Endocrinol* 25(1): 1-16.
- Lacroix, M. and G. Leclercq (2004). "Relevance of breast cancer cell lines as models for breast tumours: an update." *Breast Cancer Res Treat* 83(3): 249-89.
- Lahmann, P. H., K. Hoffmann, et al. (2004). "Body size and breast cancer risk: findings from the European Prospective Investigation into Cancer And Nutrition (EPIC)." *Int J Cancer* 111(5): 762-71.
- Lam, S. T. and P. E. Polani (1985). "Hormonal induction of steroid sulphatase in the mouse." *Experientia* 41(2): 276-8.
- Langer, R. D. (2009). "Efficacy, safety, and tolerability of low-dose hormone therapy in managing menopausal symptoms." *J Am Board Fam Med* 22(5): 563-73.
- Lasfargues, E. Y., W. G. Coutinho, et al. (1979). "A human breast tumor cell line (BT-474) that supports mouse mammary tumor virus replication." *In Vitro* 15(9): 723-9.
- Laughlin, G. A., E. Barrett-Connor, et al. (2000). "Hysterectomy, oophorectomy, and endogenous sex hormone levels in older women: the Rancho Bernardo Study." *J Clin Endocrinol Metab* 85(2): 645-51.
- Laumann, E. O., A. Paik, et al. (1999). "Sexual dysfunction in the United States: prevalence and predictors." *JAMA* 281(6): 537-44.
- Leiblum, S. R., P. E. Koochaki, et al. (2006). "Hypoactive sexual desire disorder in postmenopausal women: US results from the Women's International Study of Health and Sexuality (WISHeS)." *Menopause* 13(1): 46-56.
- Li, X. M., E. S. Alperin, et al. (1996). "Characterization of the promoter region of human steroid sulfatase: a gene which escapes X inactivation." *Somat Cell Mol Genet* 22(2): 105-17.

- Lin, S. X., R. Shi, et al. (2006). "Structural basis of the multispecificity demonstrated by 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 5." *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 38-46.
- Lipton, A., R. J. Santen, et al. (1992). "Prognostic value of breast cancer aromatase." *Cancer* 70(7): 1951-5.
- Lofgren, L., L. Sahlin, et al. (2006). "Expression of sex steroid receptor subtypes in normal and malignant breast tissue - a pilot study in postmenopausal women." *Acta Oncol* 45(1): 54-60.
- Lu, Q., J. Nakamura, et al. (1996). "Expression of aromatase protein and messenger ribonucleic acid in tumor epithelial cells and evidence of functional significance of locally produced estrogen in human breast cancers." *Endocrinology* 137(7): 3061-8.
- Lukacik, P., K. L. Kavanagh, et al. (2006). "Structure and function of human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases." *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 61-71.
- Luu The, V., C. Labrie, et al. (1989). "Characterization of cDNAs for human estradiol 17 beta-dehydrogenase and assignment of the gene to chromosome 17: evidence of two mRNA species with distinct 5'-termini in human placenta." *Mol Endocrinol* 3(8): 1301-9.
- MacIndoe, J. H. (1979). "Estradiol formation from testosterone by continuously cultured human breast cancer cells." *J Clin Endocrinol Metab* 49(2): 272-7.
- Madsen, M. W. and P. Briand (1990). "Relationship between tumorigenicity, in vitro invasiveness, and plasminogen activator production of human breast cell lines." *Eur J Cancer* 26(7): 793-7.
- Martel, C., M. H. Melner, et al. (1994). "Widespread tissue distribution of steroid sulfatase, 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta 5-delta 4 isomerase (3 beta-HSD), 17 beta-HSD 5 alpha-reductase and aromatase activities in the rhesus monkey." *Mol Cell Endocrinol* 104(1): 103-11.
- Masamura, S., S. J. Santner, et al. (1996). "Evidence of in situ estrogen synthesis in nitrosomethylurea-induced rat mammary tumors via the enzyme estrone sulfatase." *J Steroid Biochem Mol Biol* 58(4): 425-9.
- Matsuoka, R., A. Yanaihara, et al. (2002). "Regulation of estrogen activity in human endometrium: effect of IL-1beta on steroid sulfatase activity in human endometrial stromal cells." *Steroids* 67(7): 655-9.
- Miettinen, M., M. Mustonen, et al. (1999). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenases in normal human mammary epithelial cells and breast tissue." *Breast Cancer Res Treat* 57(2): 175-82.
- Miettinen MM, M. M., Poutanen MH, Isomaa VV, Vihko RK. (1996). "Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression." *Biochem J* 15;314 ( Pt 3):839-45.
- Miki, Y., T. Suzuki, et al. (2006). "Expression of the steroid and xenobiotic receptor and its possible target gene, organic anion transporting polypeptide-A, in human breast carcinoma." *Cancer Res* 66(1): 535-42.
- Milani, M., G. Jha, et al. (2009). "Anastrozole Use in Early Stage Breast Cancer of Post-Menopausal Women." *Clin Med Ther* 1: 141-156.
- Miller, W. R. and J. O'Neill (1987). "The importance of local synthesis of estrogen within the breast." *Steroids* 50(4-6): 537-48.

- Miller, W. R., M. Stuart, et al. (2002). "Anastrozole ('Arimidex') blocks oestrogen synthesis both peripherally and within the breast in postmenopausal women with large operable breast cancer." *Br J Cancer* 87(9): 950-5.
- Miyoshi, Y., A. Ando, et al. (2003). "High expression of steroid sulfatase mRNA predicts poor prognosis in patients with estrogen receptor-positive breast cancer." *Clin Cancer Res* 9(6): 2288-93.
- Miyoshi, Y., A. Ando, et al. (2001). "Involvement of up-regulation of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in maintenance of intratumoral high estradiol levels in postmenopausal breast cancers." *Int J Cancer* 94(5): 685-9.
- Modelska, K. and S. Cummings (2003). "Female sexual dysfunction in postmenopausal women: systematic review of placebo-controlled trials." *Am J Obstet Gynecol* 188(1): 286-93.
- Morales, A. J., J. J. Nolan, et al. (1994). "Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age." *J Clin Endocrinol Metab* 78(6): 1360-7.
- Moutaouakkil, M., O. Prost, et al. (1984). "Estrone and dehydroepiandrosterone sulfatase activities in guinea-pig uterus and liver: estrogenic effect of estrone sulfate." *J Steroid Biochem* 21(3): 321-8.
- Nabholtz, J. M. (2008). "Long-term safety of aromatase inhibitors in the treatment of breast cancer." *Ther Clin Risk Manag* 4(1): 189-204.
- Nagasaki, S., Y. Miki, et al. (2009). "17beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human breast cancer." *Ann N Y Acad Sci* 1155: 25-32.
- Nakamura, Y., Y. Miki, et al. (2003). "Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta." *Am J Pathol* 163(4): 1329-39.
- Newman, S. P., A. Purohit, et al. (2000). "Regulation of steroid sulphatase expression and activity in breast cancer." *J Steroid Biochem Mol Biol* 75(4-5): 259-64.
- Nguyen, B. L., G. Chetrite, et al. (1995). "Transformation of estrone and estradiol in hormone-dependent and hormone-independent human breast cancer cells. Effects of the antiestrogen ICI 164,384, danazol, and promegestone (R-5020)." *Breast Cancer Res Treat* 34(2): 139-46.
- Noel, C. T., M. J. Reed, et al. (1981). "The plasma concentration of oestrone sulphate in postmenopausal women: lack of diurnal variation, effect of ovariectomy, age and weight." *J Steroid Biochem* 14(11): 1101-5.
- Nozawa, T., M. Suzuki, et al. (2005). "Suppression of cell proliferation by inhibition of estrone-3-sulfate transporter in estrogen-dependent breast cancer cells." *Pharm Res* 22(10): 1634-41.
- Obaya, A. J. (2006). "Molecular cloning and initial characterization of three novel human sulfatases." *Gene* 372: 110-7.
- Okuda, T., H. Saito, et al. (2001). "Steroid sulfatase expression in ovarian clear cell adenocarcinoma: immunohistochemical study." *Gynecol Oncol* 82(3): 427-34.
- Ortmann, J., S. Prifti, et al. (2002). "Testosterone and 5 alpha-dihydrotestosterone inhibit in vitro growth of human breast cancer cell lines." *Gynecol Endocrinol* 16(2): 113-20.
- Osborne, C. K., K. Hobbs, et al. (1985). "Effect of estrogens and antiestrogens on growth of human breast cancer cells in athymic nude mice." *Cancer Res* 45(2): 584-90.
- Panzer, C. and A. Guay (2009). "Testosterone replacement therapy in naturally and surgically menopausal women." *J Sex Med* 6(1): 8-18; quiz 19-20.
- Pasqualini, J. R., P. Caubel, et al. (2003). "Norelgestromin as selective estrogen enzyme modulator in human breast cancer cell lines. Effect on sulfatase activity in comparison to medroxyprogesterone acetate." *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(2-3): 193-8.

- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, et al. (1996). "Concentrations of estrone, estradiol, and estrone sulfate and evaluation of sulfatase and aromatase activities in pre- and postmenopausal breast cancer patients." *J Clin Endocrinol Metab* 81(4): 1460-4.
- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, et al. (1996). "Control and expression of oestrone sulphatase activities in human breast cancer." *J Endocrinol* 150 Suppl: S99-105.
- Pasqualini, J. R., G. Chetrite, et al. (1995). "Estrone sulfate-sulfatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities: a hypothesis for their role in the evolution of human breast cancer from hormone-dependence to hormone-independence." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 407-12.
- Pasqualini, J. R., C. Gelly, et al. (1989). "Importance of estrogen sulfates in breast cancer." *J Steroid Biochem* 34(1-6): 155-63.
- Payne, A. H., M. Mason, et al. (1969). "Testicular steroid sulfatase. Substrate specificity and inhibition." *Steroids* 14(6): 685-704.
- Peltoketo, H., V. Isomaa, et al. (1988). "Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA." *FEBS Lett* 239(1): 73-7.
- Peltoketo, H., V. Isomaa, et al. (1996). "Expression and regulation of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1." *J Endocrinol* 150 Suppl: S21-30.
- Pizzagalli, F., Z. Varga, et al. (2003). "Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland." *J Clin Endocrinol Metab* 88(8): 3902-12.
- Plourde, P. V., M. Dyroff, et al. (1995). "ARIMIDEX: a new oral, once-a-day aromatase inhibitor." *J Steroid Biochem Mol Biol* 53(1-6): 175-9.
- Prost, O., M. O. Turrel, et al. (1984). "Estrone and dehydroepiandrosterone sulfatase activities and plasma estrone sulfate levels in human breast carcinoma." *Cancer Res* 44(2): 661-4.
- Purohit A, D. L., Wang DY, Coldham NG, Ghilchik MW, and R. MJ (1997). "Paracrine control of oestrogen production in breast cancer." *Endocr Rel Cancer* 4: 323-330.
- Purohit, A. and M. J. Reed (1992). "Oestrogen sulphatase activity in hormone-dependent and hormone-independent breast-cancer cells: modulation by steroidal and non-steroidal therapeutic agents." *Int J Cancer* 50(6): 901-5.
- Purohit, A., M. J. Reed, et al. (1996). "Regulation and inhibition of steroid sulfatase activity in breast cancer." *Ann N Y Acad Sci* 784: 40-9.
- Purohit, A., H. J. Tutill, et al. (2006). "The regulation and inhibition of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in breast cancer." *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 199-203.
- Purohit, A., L. W. Woo, et al. (2011). "Steroid sulfatase: a pivotal player in estrogen synthesis and metabolism." *Mol Cell Endocrinol* 340(2): 154-60.
- Raobaikady, B., A. Purohit, et al. (2003). "Inhibition of MCF-7 breast cancer cell proliferation and in vivo steroid sulphatase activity by 2-methoxyoestradiol-bis-sulphamate." *J Steroid Biochem Mol Biol* 84(2-3): 351-8.
- Reed, M. J., A. M. Owen, et al. (1989). "In situ oestrone synthesis in normal breast and breast tumour tissues: effect of treatment with 4-hydroxyandrostenedione." *Int J Cancer* 44(2): 233-7.
- Reed, M. J., A. Purohit, et al. (2005). "Steroid sulfatase: molecular biology, regulation, and inhibition." *Endocr Rev* 26(2): 171-202.
- Rosner, B., G. A. Colditz, et al. (1994). "Reproductive risk factors in a prospective study of breast cancer: the Nurses' Health Study." *Am J Epidemiol* 139(8): 819-35.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* 288(3): 321-33.

- Ruder, H. J., L. Loriaux, et al. (1972). "Estrone sulfate: production rate and metabolism in man." *J Clin Invest* 51(4): 1020-33.
- Russo J, R. I. (2004). "Molecular basis of breast cancer. Prevention and treatment." Heidelberg: Springer-Verlag.
- Saint-Ruf, C., P. Nardeux, et al. (1988). "Accelerated malignant conversion of human HBL-100 cells by the v-Ki-ras oncogene." *Exp Cell Res* 176(1): 60-7.
- Santen, R. J. and H. A. Harvey (1999). "Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma." *Endocr Relat Cancer* 6(1): 75-92.
- Santner, S. J., P. D. Feil, et al. (1984). "In situ estrogen production via the estrone sulfatase pathway in breast tumors: relative importance versus the aromatase pathway." *J Clin Endocrinol Metab* 59(1): 29-33.
- Santner, S. J., R. J. Pauley, et al. (1997). "Aromatase activity and expression in breast cancer and benign breast tissue stromal cells." *J Clin Endocrinol Metab* 82(1): 200-8.
- Sasano, H., H. Nagura, et al. (1994). "Immunolocalization of aromatase and other steroidogenic enzymes in human breast disorders." *Hum Pathol* 25(5): 530-5.
- Sasano, H., T. Suzuki, et al. (2008). "Intracrinology of estrogens and androgens in breast carcinoma." *J Steroid Biochem Mol Biol* 108(3-5): 181-5.
- Sasano, H., T. Suzuki, et al. (2006). "New development in intracrinology of breast carcinoma." *Breast Cancer* 13(2): 129-36.
- Schindler, A. E., A. Ebert, et al. (1972). "Conversion of androstenedione to estrone by human tissue." *J Clin Endocrinol Metab* 35(4): 627-30.
- Schweikert, H. U., L. Milewich, et al. (1975). "Aromatization of androstenedione by isolated human hairs." *J Clin Endocrinol Metab* 40(3): 413-7.
- Schweikert, H. U., L. Wolf, et al. (1995). "Oestrogen formation from androstenedione in human bone." *Clin Endocrinol (Oxf)* 43(1): 37-42.
- Shifren, J. L., G. D. Braunstein, et al. (2000). "Transdermal testosterone treatment in women with impaired sexual function after oophorectomy." *N Engl J Med* 343(10): 682-8.
- Shifren, J. L., S. R. Davis, et al. (2006). "Testosterone patch for the treatment of hypoactive sexual desire disorder in naturally menopausal women: results from the INTIMATE NM1 Study." *Menopause* 13(5): 770-9.
- Shifren, J. L., B. U. Monz, et al. (2008). "Sexual problems and distress in United States women: prevalence and correlates." *Obstet Gynecol* 112(5): 970-8.
- Sikora, M. J., K. E. Cordero, et al. (2009). "The androgen metabolite 5alpha-androstane-3beta,17beta-diol (3betaAdiol) induces breast cancer growth via estrogen receptor: implications for aromatase inhibitor resistance." *Breast Cancer Res Treat* 115(2): 289-96.
- Silva, M. C., M. G. Rowlands, et al. (1989). "Intratumoral aromatase as a prognostic factor in human breast carcinoma." *Cancer Res* 49(10): 2588-91.
- Simard, J. P., M. Ameen, et al. (1985). "Biochemical characterization of arylsulfatase-C isozymes in human fibroblasts." *Biochem Biophys Res Commun* 128(3): 1388-94.
- Simon, J., G. Braunstein, et al. (2005). "Testosterone patch increases sexual activity and desire in surgically menopausal women with hypoactive sexual desire disorder." *J Clin Endocrinol Metab* 90(9): 5226-33.
- Simon, J., E. Klaiber, et al. (1999). "Differential effects of estrogen-androgen and estrogen-only therapy on vasomotor symptoms, gonadotropin secretion, and endogenous androgen bioavailability in postmenopausal women." *Menopause* 6(2): 138-46.
- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, et al. (1993). "Tissue-specific promoters regulate aromatase cytochrome P450 expression." *J Steroid Biochem Mol Biol* 44(4-6): 321-30.

- Simpson, E. R., M. S. Mahendroo, et al. (1994). "Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis." *Endocr Rev* 15(3): 342-55.
- Smith, I. E., M. Dowsett, et al. (2005). "Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial." *J Clin Oncol* 23(22): 5108-16.
- Society, T. N. A. M. (2005). "The role of testosterone therapy in postmenopausal women: position statement of The North American Menopause Society." *Menopause* 12(5): 496-511; quiz 649.
- Soderqvist, G., M. Poutanen, et al. (1998). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in normal breast tissue during the menstrual cycle and hormonal contraception." *J Clin Endocrinol Metab* 83(4): 1190-3.
- Somboonporn, W., S. Davis, et al. (2005). "Testosterone for peri- and postmenopausal women." *Cochrane Database Syst Rev*(4): CD004509.
- Song, D., G. Liu, et al. (2006). "Expression of aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase types 1, 7 and 12 in breast cancer. An immunocytochemical study." *J Steroid Biochem Mol Biol* 101(2-3): 136-44.
- Speirs, V., A. R. Green, et al. (1998). "Activity and gene expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type I in primary cultures of epithelial and stromal cells derived from normal and tumorous human breast tissue: the role of IL-8." *J Steroid Biochem Mol Biol* 67(3): 267-74.
- Stein, C., A. Hille, et al. (1989). "Cloning and expression of human steroid-sulfatase. Membrane topology, glycosylation, and subcellular distribution in BHK-21 cells." *J Biol Chem* 264(23): 13865-72.
- Stoffel-Wagner, B., M. Watzka, et al. (1999). "Expression of CYP19 (aromatase) mRNA in different areas of the human brain." *J Steroid Biochem Mol Biol* 70(4-6): 237-41.
- Stute, P., M. Gotte, et al. (2008). "Differential effect of hormone therapy on E1S-sulfatase activity in non-malignant and cancerous breast cells in vitro." *Breast Cancer Res Treat* 108(3): 363-74.
- Stute, P., T. C. Register, et al. (2006). "Effects of tibolone on estrogen biosynthesis in the mammary tissue of postmenopausal monkeys." *Menopause* 13(2): 232-40.
- Stute, P., T. Szuwart, et al. (2008). "Effects of hormone therapy on estrogen synthesis from E1S in the mammary gland of postmenopausal women." *Maturitas* 59(2): 163-73.
- Suzuki, T., Y. Miki, et al. (2005). "Sex steroid-producing enzymes in human breast cancer." *Endocr Relat Cancer* 12(4): 701-20.
- Suzuki T, M. T., Ariga N, Kaneko C, Kanazawa M, Sasano H. (2000). "17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 in human breast carcinoma: a correlation to clinicopathological parameters." *Br J Cancer*. Feb;82(3): 518-23.
- Suzuki, T., T. Nakata, et al. (2003). "Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma." *Cancer Res* 63(11): 2762-70.
- Szelei, J., J. Jimenez, et al. (1997). "Androgen-induced inhibition of proliferation in human breast cancer MCF7 cells transfected with androgen receptor." *Endocrinology* 138(4): 1406-12.
- Tamimi, R. M., S. E. Hankinson, et al. (2006). "Combined estrogen and testosterone use and risk of breast cancer in postmenopausal women." *Arch Intern Med* 166(14): 1483-9.
- Thijssen, J. H. and M. A. Blankenstein (1989). "Endogenous oestrogens and androgens in normal and malignant endometrial and mammary tissues." *Eur J Cancer Clin Oncol* 25(12): 1953-9.

- Thijssen, J. H., M. A. Blankenstein, et al. (1987). "Estrogens in tissues: uptake from the peripheral circulation or local production." *Steroids* 50(1-3): 297-306.
- Tilson-Mallett, N., S. J. Santner, et al. (1983). "Biological significance of aromatase activity in human breast tumors." *J Clin Endocrinol Metab* 57(6): 1125-8.
- Utsumi, T., N. Yoshimura, et al. (1999). "Steroid sulfatase expression is an independent predictor of recurrence in human breast cancer." *Cancer Res* 59(2): 377-81.
- Utsumi, T., N. Yoshimura, et al. (2000). "Elevated steroid sulfatase expression in breast cancers." *J Steroid Biochem Mol Biol* 73(3-4): 141-5.
- van den Brandt, P. A., D. Spiegelman, et al. (2000). "Pooled analysis of prospective cohort studies on height, weight, and breast cancer risk." *Am J Epidemiol* 152(6): 514-27.
- van Slooten, H. J., B. A. Bonsing, et al. (1995). "Outgrowth of BT-474 human breast cancer cells in immune-deficient mice: a new in vivo model for hormone-dependent breast cancer." *Br J Cancer* 72(1): 22-30.
- van Staa, T. P. and J. M. Sprafka (2009). "Study of adverse outcomes in women using testosterone therapy." *Maturitas* 62(1): 76-80.
- Vihko, P., P. Harkonen, et al. (2004). "17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases--their role in pathophysiology." *Mol Cell Endocrinol* 215(1-2): 83-8.
- Vihko, P., A. Herrala, et al. (2006). "Control of cell proliferation by steroids: the role of 17HSDs." *Mol Cell Endocrinol* 248(1-2): 141-8.
- Wellington, K. and D. M. Faulds (2002). "Anastrozole: in early breast cancer." *Drugs* 62(17): 2483-90; discussion 2491-2.
- WHO (1994). "Research on the menopause in the 1990's."
- Wilkinson, K. (2004). "Anastrozole (Arimidex)." *Clin J Oncol Nurs* 8(1): 87-8.
- Willemsen, R., M. Kroos, et al. (1988). "Ultrastructural localization of steroid sulphatase in cultured human fibroblasts by immunocytochemistry: a comparative study with lysosomal enzymes and the mannose 6-phosphate receptor." *Histochem J* 20(1): 41-51.
- Woodruff, J. D. and J. H. Pickar (1994). "Incidence of endometrial hyperplasia in postmenopausal women taking conjugated estrogens (Premarin) with medroxyprogesterone acetate or conjugated estrogens alone. The Menopause Study Group." *Am J Obstet Gynecol* 170(5 Pt 1): 1213-23.
- Worsham, M. J., U. Raju, et al. (2007). "Multiplicity of benign breast lesions is a risk factor for progression to breast cancer." *Clin Cancer Res* 13(18 Pt 1): 5474-9.
- Wu, L., M. Einstein, et al. (1993). "Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity." *J Biol Chem* 268(17): 12964-9.
- Yates, R. A., M. Dowsett, et al. (1996). "Arimidex (ZD1033): a selective, potent inhibitor of aromatase in postmenopausal female volunteers." *Br J Cancer* 73(4): 543-8.
- Zhao, Y., V. R. Agarwal, et al. (1996). "Estrogen biosynthesis proximal to a breast tumor is stimulated by PGE2 via cyclic AMP, leading to activation of promoter II of the CYP19 (aromatase) gene." *Endocrinology* 137(12): 5739-42.
- Zhongyi, S., P. Rantakari, et al. (2007). "Transgenic male mice expressing human hydroxysteroid dehydrogenase 2 indicate a role for the enzyme independent of its action on sex steroids." *Endocrinology* 148(8): 3827-36.

