

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen	IV
Genetischer Code	VI
1. Einleitung	1
2. Literaturübersicht	3
2.1 Estrogensynthese bei der Frau	3
2.2 Mammakarzinom	4
2.2.1 Allgemeine Genese	4
2.2.2 Form, Verlauf und Bedeutung des Brustkrebses	6
2.3 Intrakrinologie	8
2.3.1 Estrogenrezeptoren	10
2.3.2 Steroide sulfatase (STS)	11
2.3.3 Aromatase	12
2.3.4 17 β -hydroxysteroiddehydrogenase (17 β HSD)	12
2.3.5 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase	13
2.4 Prinzipien des Membrantransports	14
2.5 Die Superfamilie der Solute Carrier (SLC)	18
2.5.1 Die Solute Carrier-Familie 10 (SLC10)	20
2.5.2 Der natriumabhängige Steroidsulfattransporter SOAT (SLC10A6)	21
2.6 Zelllinien T47D und MCF7	22
2.7 Mammatumore in der Veterinärmedizin (Hund und Katze)	23
3. Fragestellungen	25
4. Material und Methoden	26
4.1 Material	26
4.1.1 Chemikalien, Medien, Reagenzien, Enzyme und Kits sowie deren Bezugsquellen	26
4.1.2 Kommerziell erhältliche Kits	28
4.1.3 Radioaktiv-markierte Chemikalien	28
4.1.4 Geräte	29
4.1.5 Prokaryotische und eukaryotische Zellstämme	30
4.1.6 Enzyme	30
4.1.7 Oligonukleotide	31
4.1.8 Plasmide	31
4.2 Methoden	33

4.2.1 Molekularbiologische Methoden _____	34
4.2.1.1 Agarose-Gelelektrophorese von DNA-Fragmenten _____	34
4.2.1.2 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen _____	35
4.2.1.3 Trennung von DNA-Fragmenten durch Gel Extraktion _____	35
4.2.1.4 Ligation von DNA _____	35
4.2.1.5 Die Herstellung chemokompetenter Bakterien (XL10Gold) _	35
4.2.1.6. Die Herstellung elektrokompeter Bakterien (HB101) ____	36
4.2.1.7 Klonierung der Vektoren _____	36
4.2.1.8 Transformation von Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation _____	39
4.2.1.9 Isolieren der Kolonien und Animpfen von Kulturen _____	40
4.2.1.10 Einfrieren von transformierten Bakterien _____	41
4.2.1.11 Plasmid-Präparationen im Mini- und Midi-Maßstab _____	41
4.2.1.12 Ethanol-Fällung von DNA _____	43
4.2.1.13 Bestimmung der DNA-Konzentration _____	44
4.2.1.14 Analytischer Verdau gewonnenen Plasmid-DNA zur Kontrolle der Schnittmuster _____	44
4.2.1.15 Analyse des Restriktionsverdaus mittels Elektrophorese _	46
4.2.1.16 Linearisierung des Plasmids _____	46
4.2.1.17 Phenolextraktion _____	46
4.2.2 Zellbiologische Methoden _____	47
4.2.2.1 Kultivierung von Zellen _____	47
4.2.2.2 Passagierung _____	47
4.2.2.3 Bestimmung der Zellzahl _____	48
4.2.2.4 Einfrieren der Zellen _____	48
4.2.2.5 Auftauen von Zellen _____	48
4.2.3 Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D mit den konstruierten Plasmiden _____	49
4.2.4 Stabile Transfektion _____	50
4.2.5 Nachweis der Integration der Vektoren in das Genom _____	52
4.2.6 Präparation genomischer DNA und die Polymerasekettenreaktion (PCR) _____	53
4.2.7 Nachweis des Expression von SOAT _____	55
4.2.8 RNA Präparation aus Zellen _____	55
4.2.9 cDNA Synthese Reverse Transkription; von RNA zu cDNA Synthese	56
4.2.10 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) _____	57
4.2.11 Quantitative RT-PCR _____	58

4.2.12	Transportassay in SOAT transfizierten MCF7 und T47D mit radioaktiv markierter Substanzen	59
4.2.13	Proliferationsassay bei SOAT-transfizierten MCF7 und T47D durch den Einbau von [³ H]Thymidin	62
4.2.14	Hemmung der SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung	64
5.	Ergebnisse	66
5.1	Klonierung der Vektoren	66
5.1.1	hSOATF3	66
5.1.2	SOATi2Neo4 und SOATiKontrolle1Neo4	67
5.2	Stabile Transfektion der Zelllinien MCF7 und T47D	70
5.3	Nachweise der Integration der Vektoren in das Genom	71
5.3.1	Ergebnis der Polymerasekettenreaktion (PCR)	71
5.3.2	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)	74
5.3.3	Quantitative Analyse der SOAT mRNA-Expression	75
5.4	Transportassay	77
5.4.1	Steroidsulfat-Aufnahme in SOAT transfizierten MCF7 und T47D Zellen	77
5.5	Etablierung des Proliferationsassays: Bestimmung der optimalen Bedingungen	83
5.5.1	Bestimmung des Proliferationsverhaltens der Zelllinien unter Steroidsulfaten	85
5.5.2	Hemmung des SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung bei transfizierten Zellen	91
6	Diskussion	98
7	Zusammenfassung	106
8	Summary	107
9	Literaturverzeichnis	108
10	Anhang	119
11	Danksagungen	122