

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungen</b>	IV
<b>Genetischer Code</b>	VI
<b>1. Einleitung</b>	1
<b>2. Literaturübersicht</b>	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 Intrakinologie	8
2.3.1 Estrogenrezeptoren	10
2.3.2 Steroide sulfatase (STS)	11
2.3.3 Aromatase	12
2.3.4 17 $\beta$ -hydroxysteroiddehydrogenase (17 $\beta$ HSD)	12
2.3.5 3 $\beta$ -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
<b>3. Fragestellungen</b>	25
<b>4. Material und Methoden</b>	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 elektrokompetenter 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 genommischer 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 [ <sup>3</sup> H]Thymidin	62
4.2.14 Hemmung der SOAT-vermittelten Proliferationssteigerung	64
<b>5. Ergebnisse</b>	<b>66</b>
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
<b>6 Diskussion</b>	<b>98</b>
<b>7 Zusammenfassung</b>	<b>106</b>
<b>8 Summary</b>	<b>107</b>
<b>9 Literaturverzeichnis</b>	<b>108</b>
<b>10 Anhang</b>	<b>119</b>
<b>11 Danksagungen</b>	<b>122</b>