

**Aus der Anatomischen Anstalt Lehrstuhl Anatomie II  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Vorstand: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Ulrich Welsch**

**Die 17 $\beta$ - Hydroxysteroid Dehydrogenase 4 in der gesunden Brustdrüse -  
Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der gesunden  
Brustdrüse  
Untersuchungen im Verlauf des normalen ovariellen Zyklus und bei  
hormoneller Antikonception**

**Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München**

**vorgelegt von  
Nicole Lämmermann  
aus  
Langenau**

**2004**

für  
meine Familie  
und Adrian

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Ziel der Arbeit und Stand der Forschung	1
1.2	Die allgemeine Histologie, Morphologie und Physiologie der Brust und der Brustdrüse der erwachsenen Frau, außerhalb der Laktation und Schwangerschaft	4
1.2.1	Die Mamille und der Warzenhof	4
1.2.2	Das Gangsystem	5
1.2.3	Die sekretorischen Endstücke, Tubuloalveoli und Alveolen	7
1.2.4	Das Stroma	8
1.2.5	Durchblutung und Innervation	8
1.2.6	Hormone	9
1.3	Monatszyklische Veränderungen des Brustdrüsenepithels der erwachsenen Frau, außerhalb der Laktation und Schwangerschaft	10
1.3.1	Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Veränderungen der nicht-laktierenden Mamma während eines Monatszyklus	10
1.3.2	Sekretorische Aktivitätsunterschiede	12
1.3.3	Proliferation und Apoptose	13
1.3.4	Volumenzunahme der Brust	16
1.4	Verschiedene steroid metabolisierende 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen; ihre Lokalisation und ihre Funktionen	17
1.5	Die Regulation des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus im Brustdrüsenepithel der Mamma	22

<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>25</b>
2.1	Auswahl der Patienten	25
2.2	Methoden	26
2.2.1	Immunhistochemie mit Antikörpern gegen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4, Östrogen- und Progesteronrezeptoren	26
2.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	29
2.2.3	Messung der 17 $\beta$ -HSD 4 Enzymaktivität	30
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1	Immunhistochemie für 17 $\beta$ -HSD 4 (Abb. 4-17)	36
3.2	Immunhistochemie für Östrogen- und Progesteronrezeptoren	48
3.3	Nachweis von 17 $\beta$ -HSD 4 cDNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in weiblichem Brustdrüsengewebe (Abb.22)	53
3.4	Ergebnis der Enzymaktivitätsmessung in menschlichem Brustdrüsengewebe	56
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>57</b>
4.1	Morphologische Aspekte	57
4.2	Vergleich von Immunhistochemie mit mRNA Expression der 17 $\beta$ -HSD 4 Aktivitätsmessungen in Drüsengewebe der Brust 17 $\beta$ -HSD 4 cDNA und die Aktivitätsmessung der 17 $\beta$ -HSD 4	59
4.3	Immunhistochemie der Östrogen- und Progesteronrezeptoren	63

<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>66</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>68</b>

## 1 EINLEITUNG

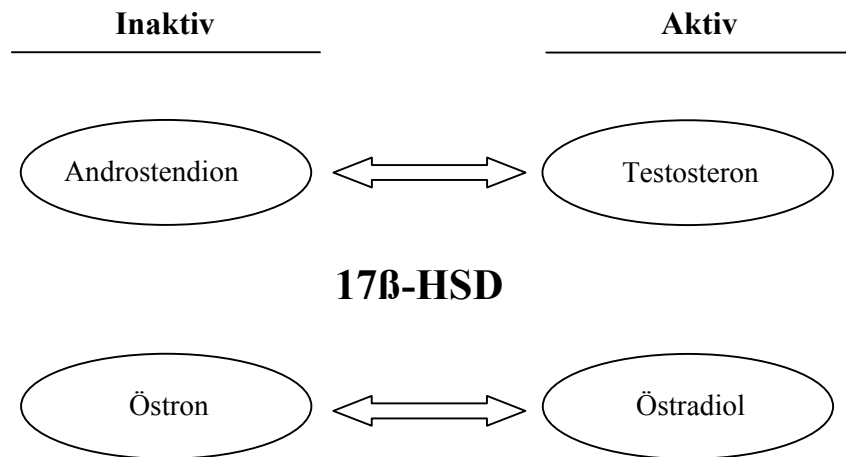
### 1.1 *Ziel der Arbeit und Stand der Forschung*

Ziel der vorliegenden Studie ist zu untersuchen, ob die Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 (17 $\beta$ -HSD 4) in gesunden, nicht laktierenden Brustdrüsenepithelzellen der Frau menstruationszyklusabhängig variiert. 17 $\beta$ -HSD 4, ein östradiol-inaktivierendes Enzym, wird in dieser Studie auf RNA-Ebene durch RT-PCR, auf Proteinebene durch Immunhistochemie und Aktivitätstest im Gewebe nachgewiesen. Weiterhin wird immunhistochemisch geprüft, ob die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Brustdrüsenepithelzellen menstruationsabhängig variiert. Es soll auch untersucht werden, ob sich im Brustgewebe Unterschiede hinsichtlich der Expression von 17 $\beta$ -HSD 4, Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren feststellen lassen zwischen Frauen, die orale hormonelle Antikonzeptiva einnehmen, und Frauen, die natürliche ovarielle Zyklen aufweisen.

Das Epithel der Brustdrüse der erwachsenen Frau unterliegt auch außerhalb der Schwangerschaft und Laktation zyklischen Veränderungen unter anderem hinsichtlich sekretorischer Aktivität [9, 50], Proliferation [45, 51] und Apoptose [10]. Diese Vorgänge werden mit den im Rahmen des ovariellen Zyklus variierenden Blutspiegeln der Hormone Östrogene (E) und Progesteron (P) in Zusammenhang gebracht [48]. Besonders große Bedeutung unter den Steroidhormonen besitzt das Östradiol, das auf das Wachstum der verschiedenen Gangstrukturen Einfluss nimmt. Auch die Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren variiert im Epithel der menschlichen Brustdrüse während des ovariellen Zyklus, wie immunhistochemisch und biochemisch gezeigt werden konnte [23, 41,

47]. In hormonabhängigen Zielgeweben ist neben dem Hormonrezeptorstatus der Metabolismus der dazugehörigen Steroidhormone ebenfalls von Bedeutung. Der lokale Abbau von Östradiol kann beispielsweise im Gewebe zu einer Wirkungsverminderung führen, obwohl hohe Spiegel des Hormons im Blut zirkulieren. Hierbei sind die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen von erheblicher Bedeutung, da sie am systemischen und lokalen Östrogenstoffwechsel im Gewebe und somit an Proliferations- und Differenzierungsvorgängen von Zellen bzw. Geweben beteiligt sind (siehe Abb. 1) [38]. Eine wichtige Rolle spielen in diesem Zusammenhang 17 $\beta$ -HSD Typ 1, 2 und 4. 17 $\beta$ -HSD Typ 1 wandelt Östron in Östadiol um, Typ 2 und Typ 4 Östradiol in Östron. 17 $\beta$ -HSD 4 nimmt in verschiedener Hinsicht, z.B. auf Lokalisation, Aminosäureaufbau, Stimulierbarkeit und Regulation ihres Gens eine Sonderstellung unter den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen ein [4, 7, 27]. Während die Zyklusabhängigkeit der an der Östradiolsynthese beteiligten 17 $\beta$ -HSD 1 in Brustepithelzellen bereits beschrieben wurde, sind Analysen für 17 $\beta$ -HSD 4 kaum vorhanden. 17 $\beta$ -HSD 4 wurde als Östradiol-inaktivierendes Enzym entdeckt und wird zusammen mit 17 $\beta$ -HSD 2 als Gegenspieler der 17 $\beta$ -HSD 1 gesehen. Inzwischen ist bekannt, dass 17 $\beta$ -HSD 4 u.a. auch in der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren eine große Bedeutung hat. Eine zyklusabhängige Schwankung der 17 $\beta$ -HSD 4 Expression könnte darauf hindeuten, dass das Enzym dennoch eine Rolle im Steroidstoffwechsel spielt. Vor dem Hintergrund gegenwärtiger Modelle zur Tumorentstehung im Epithel der Mamma ist es wichtig, über Steroidumsatz und Steroidkonzentration in gesundem Brustgewebe mehr Klarheit zu schaffen. Um Ansätze zu finden, die auf die Karzinogenese in der weiblichen Brustdrüse schließen lassen, ist es wichtig zu wissen, welche Enzyme am Steroidmetabolismus in der Brustdrüse beteiligt sind, zu welchem Zeitpunkt während des Zyklus sie aktiv sind, und ob es in den Vergleichsgruppen (mit und ohne hormonale Kontrazeption) zu Unterschieden kommt. Die Expression von Östrogenrezeptoren und Progesteronrezeptoren in Abhängigkeit vom

Zyklus soll hier nochmals untersucht werden, da bisher keine einheitlichen Ergebnisse in der Literatur zu finden sind.



*Abb. 1: Einige durch 17 $\beta$ -HSDs enzymatisch katalysierte Reaktionen [1,3]*



## *1.2 Die allgemeine Histologie, Morphologie und Physiologie der Brust und der Brustdrüse der erwachsenen Frau, außerhalb der Laktation und Schwangerschaft*

Die Brust (Mamma) und Brustdrüse (Glandula mammaria) entwickeln sich in der Embryonalzeit paarweise im vorderen Bereich der Milchleiste. Beim Menschen entsteht normalerweise nur ein pectorales Paar, doch können Brustwarzen (Mamillen) und Drüsen überall entlang der Milchleiste in Erscheinung treten. Jede Mamma besteht aus Haut, Drüsenepithel und einem Stroma aus Fettgewebe und Bindegewebe. Letzteres enthält unterschiedliche Kollagene, elastische Fasern, Oxytalanfasern und Proteoglykane [36]. Die Brustdrüse (Glandula mammaria) ist eine modifizierte apokrine Hautdrüse [20]. Ihre vollständige Entwicklung erfährt sie nur bei der erwachsenen Frau [20]. Die Gänge der Drüsenlappen münden gebündelt auf der Spitze der Mamille (Brustwarze). Zusätzlich gibt es im Warzenhof (Areola) noch die apokrinen Montgomery Drüsen (siehe Abb. 2) [20].

### *1.2.1 Die Mamille und der Warzenhof*

12 bis 20 voneinander unabhängige Ausführungsgänge (Ductus papillares) der Brustdrüse münden an der Oberfläche der Mamille. Jeder einzelne dieser Gänge entstammt einem der Drüsenlappen [36]. Die Mamille ist umgeben von einer haarlosen Zone, dem Warzenhof (Areola mammae) [20]. Dieser ist meist stärker pigmentiert als die umgebende Haut, besonders bei Frauen, die geboren haben. Diese Pigmentierung kommt durch eine erhöhte Anzahl von Melanozyten zustande [36]. In der Areola findet man verschiedene Arten von Drüsen: Talgdrüsen, Schweißdrüsen und Montgomery Drüsen [36]. Während der Laktation sezernieren letztere vermehrt; ihr Sekret verhindert, dass der Säugling beim Stillvorgang Luft verschluckt, da sie die Mamille und Lippen des Säuglings in engstem Kontakt halten [20].

Das Stratum reticulare der Haut von Mamille und Areola ist reich an elastischen Fasern und beinhaltet ein System von radiär angeordneten Bündeln glatter Muskelzellen, den sogenannten Mamillen-Muskel [20]. Unter dem Einfluß von Kälte, Berührung oder psychischer Stimulation können die Muskelbündel die Mamille erigieren, dadurch fältelt sich die Haut der Mamille (siehe Abb. 2) [20].

### *1.2.2 Das Gangsystem*

Jeder der 12-20 Drüsenlappen besitzt ein verzweigtes Gangsystem. Dieses beginnt mit dem unter 1.2.1 genannten Ausführungsgang in der Mamille (Ductus papillaris), erfährt dann eine spindelförmige, 2–4,5 cm lange Erweiterung: das Milchsäckchen (Sinus lactifer). Anschließend folgt der Milchgang (Ductus lactifer), der sich verzweigt und in interlobuläre Gänge aufspaltet. Diese treten in Drüsenläppchen ein und bilden hier intralobuläre Gänge, die schließlich als Endstücke (Tubuloalveoli) enden [20]. Das Epithel verändert sich innerhalb des Gangsystems. Die Ductus papillares sind distal von mehrschichtigem Plattenepithel und proximal von zweischichtigem kubischen oder prismatischen Epithel ausgekleidet. Im Bereich des Milchsäckchens herrscht einschichtiges prismatisches Epithel vor, das dann im Ductus lactifer zweischichtig kubisch wird und nahe den Tubuloalveoli in ein meist einschichtiges oder zweireihiges kubisches bis prismatisches Epithel übergeht, das aus Drüsenepithelzellen und Myoepithelzellen besteht (siehe Abb. 2). Wellings et al. (1975) [50a, 50b] benutzen eine andere Nomenklatur für die terminalen Gangabschnitte und die Endstücke: extralobuläre terminale Gänge, intralobuläre terminale Gänge und Ductuli (letztere entsprechen den Tubuloalveoli der Terminologie von Krstic (1991), d.h. den Endstücken)[20].

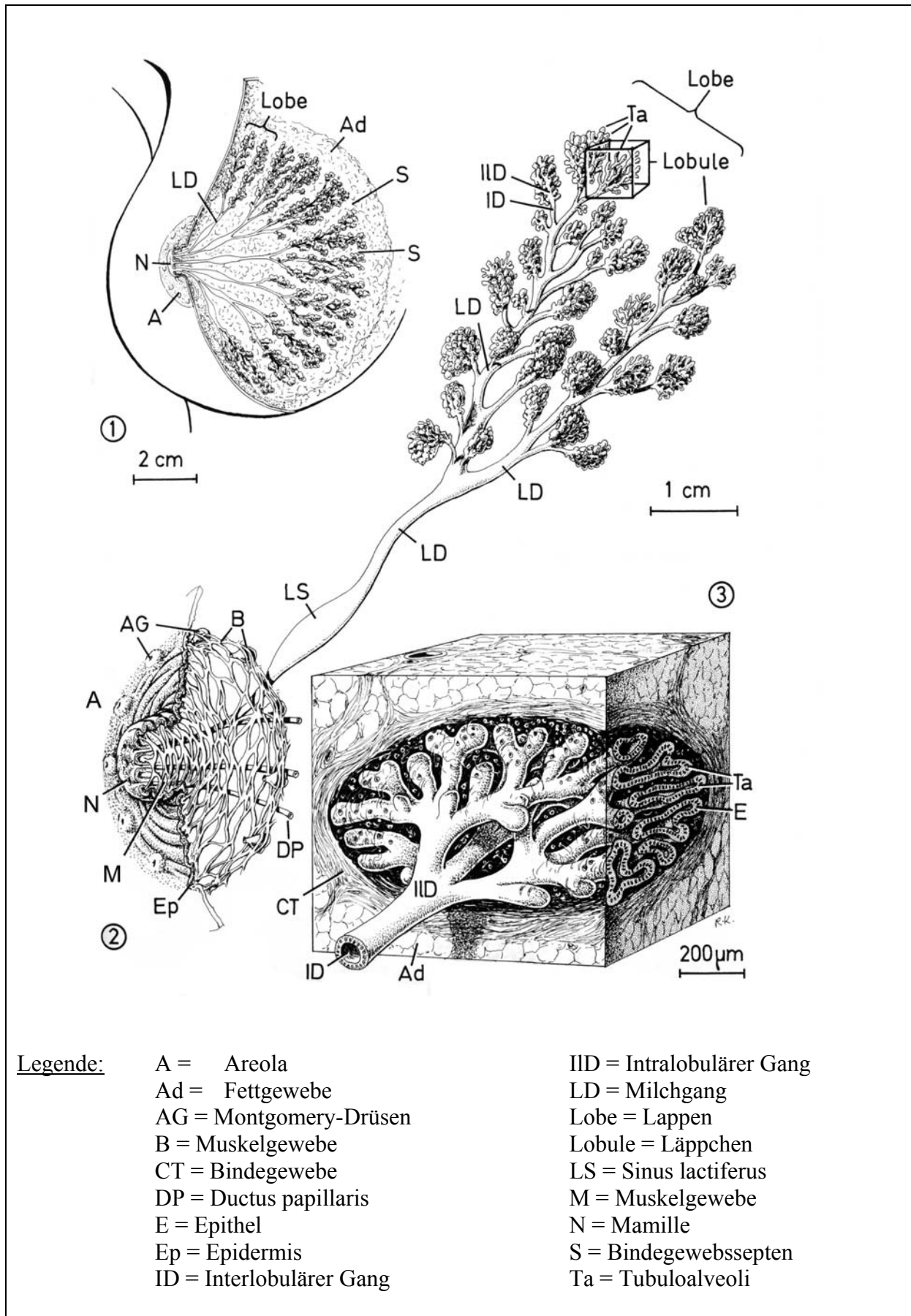


Abb. 2: Die inaktive oder ruhende weibliche Brustdrüse aus Krstic 1991 [20].

### 1.2.3 Die sekretorischen Endstücke, Tubuloalveoli und Alveolen

Die sekretorische Einheit der weiblichen Brustdrüse bilden die tubuloalveolären Endstücke, die aber nur während der Laktation klar abgrenzbar sind. Sie entwickeln sich vor allem in der Schwangerschaft und oft andeutungsweise auch postovulatorisch während des Menstruationszyklus. Endstücke und intralobuläre Gänge bilden Läppchen. Die Gliederung in Läppchen ist am deutlichsten erkennbar, wenn die Drüse nicht voll entwickelt ist, weil dann die einzelnen Läppchen durch weite Bindegewebsanteile getrennt sind. In der nicht laktierenden Drüse bilden die Endstücke tubuläre Strukturen (Tubuloalveoli) mit engem Lumen, die zumeist nicht scharf von den ähnlich strukturierten intralobulären Gängen abzugrenzen sind. Im Epithel der Tubuloalveoli herrschen wenig differenzierte kubische bis prismatische Zellen vor. Basale myoepithelzellähnliche Zellen umgeben die Tubuloalveoli und sind zumeist nur undeutlich zu erkennen. Unter spezieller hormoneller Stimulation findet in der Schwangerschaft eine sekretorische Differenzierung statt. Das zytoplasmatische Volumen der Drüsenepithelzellen wächst und die Sekretion wird histologisch sichtbar in Form von bläschenförmigen Granula im Zytoplasma und Fetttropfen in den Zellen und im Lumen. Das Ausmaß der Differenzierung der Läppchen kann zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft sehr variieren, und zwar sowohl innerhalb einer einzelnen Drüse als auch zwischen verschiedenen Individuen. Die vollständige sekretorische Aktivität ist einige Tage nach der Geburt entwickelt [36]. Die ca. 100-200 µm weiten Alveolen sind dann mit proteinreichem Sekret und mit Fetttropfen gefüllt. Die Epithelien der Drüsenendstücke sind meistens zu prismatischen Zellen mit weit vorgewölbtem Apex vergrößert [20].

#### 1.2.4 *Das Stroma*

Die Mamma besitzt zwei unterschiedliche Typen von Bindegewebe. Das straffe extralobuläre Bindegewebe schließt die Gänge und die Läppchen ein und kann in unterschiedlichem Ausmaß Fettzellen enthalten. Das zellreiche, lockere, intralobuläre und proteoglykanreiche Bindegewebe (Mantelgewebe) umrahmt die kleineren Gänge und Alveolen innerhalb eines Läppchens [36].

#### 1.2.5 *Die Durchblutung und Innervation*

Die menschliche Brust wird durch Rami mammarii mediales (aus A. thoracica interna), Rami mammarii laterales (aus A. intercostalis posterior und somit Aorta thoracica) sowie weiteren Rami mammarii laterales (aus der A. thoracica lateralis) versorgt. Das sich entwickelnde Gangsystem wächst von der Mamille ausgehend innerhalb der Bindegewebssepten des subkutanen Fettkissens. Die Gänge der weiblichen Brustdrüse und die Blutgefäße weisen ein variables Verzweigungsmuster auf. Der Lymphfluß der laktierenden Drüse ist hoch. Es gibt zwar keine Lymphkapillaren innerhalb der Läppchen, aber feine Lymphgefäße umranden sie. Große Lymphgefäße befinden sich in den Bindegewebssepten. Beim Mensch führen diese hauptsächlich zu den axillären Lymphknoten [36]. Die Innervation der Brust erfolgt über somatisch sensible und sympathische Fasern. Einzelne oder verzweigte sensible Endorgane sind häufig in der Haut der Mamillenspitze. Weniger sensible Strukturen gibt es im Mamillenhof in der Region der Montgomery Knötchen. Die glatte Muskulatur der Mamille und Areola ist durch sympathische Fasern innerviert. Der Blutfluß ist unter hormoneller und vegetativer Kontrolle und sehr labil [36]. Ab der Geburt eines Kindes erhöht er sich enorm und bleibt dann relativ konstant während der Stillzeit. Streß kann den Fluß aber wieder

verringern. Myoepithel und Drüsenepithel der weiblichen Brustdrüse sind nicht innerviert [36].

### *1.2.6 Hormone*

Unabhängig vom Menstruationszyklus und sehr allgemein kann man sagen, dass die Ovarialhormone für das Brustwachstum während der Pubertät und Schwangerschaft verantwortlich sind. Östrogen wird als Stimulator zum Wachstum des Drüsengangsystems gesehen und Östrogen in Kombination mit Progesteron führen zu lobuloalveolärer Entwicklung. Wichtig für dieses Wachstum sind auch die Hypophysenhormone Prolaktin und das Wachstumshormon Somatotropin. Die Plazenta sezerniert Östrogen, Progesteron und prolaktinähnliche Hormone; diese können während der Schwangerschaft die Effekte der Ovarialhormone und Hypophysenhormone verstärken oder ersetzen. Kortikoide, Insulin und Schilddrüsenhormone wirken ebenfalls synergistisch oder direkt mit den anderen schon erwähnten Hormonen auf die weibliche Brustdrüse [36].

### *1.3 Monatszyklische Veränderungen des Brustdrüsenepithels der erwachsenen Frau, außerhalb der Laktation und Schwangerschaft*

Wie schon bereits erwähnt, spielen sich große strukturelle Veränderungen in der Brustdrüse hauptsächlich während der Schwangerschaft und der Laktation ab. Umso interessanter ist die Entdeckung, dass es auch außerhalb dieser Zeit zu monatszyklischen Veränderungen kommt.

#### *1.3.1 Lichtmikroskopische und ultrastrukturelle Veränderungen der nicht-laktierenden Mamma während eines Monatszyklus*

Mit Hilfe des Licht- und Elektronenmikroskops können in histologisch normalem Gewebe der Brust regelmäßig Veränderungen beobachtet werden, die mit den Phasen des weiblichen Zyklus korreliert werden können. Durch genaue Betrachtung mit Hämatoxylin-Eosin (H&E) gefärbter Gewebeschnitte können 2 Haupt- und 4 Unterphasen im Zyklus unterschieden werden [9]. Phase 1 entspricht der Zeit vor dem Eisprung und Phase 2 nach dem Eisprung. Wegen deutlich histologischer sichtbarer Veränderungen innerhalb der Phasen 1 und 2 unterteilt man jede Phase noch in Subgruppen 1a und 1 sowie 2a und 2. Phase 1 fällt in die frühe präovulatorische Zeit, 1a in die späte präovulatorische Zeit, 2a in die frühe postovulatorische und 2 in die späte postovulatorische Phase. Auffällig sind in Phase 1 zahlreiche Tubuloalveoli mit wenig Zwischenabstand und beinahe obliterierten Lumina. Die Epithelzellen sind klein und aneinandergedrängt, was durch eine hohe Zellzahl pro Einheit bedingt ist. Ihre Kerne sind elliptisch oder unregelmäßig geformt und stark anfärbbar. Das Zytoplasma der Epithelzellen ist blass. In Phase 1 hat das Epithel eine relativ einfache Ultrastruktur ohne sekretorische Aktivität, Zisternen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums sind vereinzelt nachweisbar, der Golgi-Apparat ist relativ klein. Freie Ribosomen

sind zahlreich vorhanden, was auf eine auf das Zellinnere begrenzte Proteinsynthese schließen lässt. Nun folgt eine Phase der intrazellulären Wasserretention, die mit der Phase 1a übereinstimmt. Das Epithel erreicht damit eine Phase der Inaktivität, da auch eine erhöhte Anzahl an degenerierten Zellen zu beobachten ist. Diese Inaktivität kann mit dem Blutöstrogenspiegel, der in der präovulatorischen Phase erhöht ist, zusammenhängen [9]. In Phase 2a ist dann ein erheblicher Glykogengehalt in der Zelle festzustellen, was mit dem erhöhten Progesteronblutspiegel korreliert. Die relativ ruhige Phase 2a wandelt sich dann in eine aktive Sekretionsphase Phase 2 um. In Phase 2 sind größere Tubuloalveoli zu beobachten mit mehr Zwischenabstand und sichtbarem Lumen. Auch die Epithelzellen sind größer und weniger zusammengedrängt. Ihre Kerne sind breiter und heller als in Phase 1. Auch im Zellinneren gibt es morphologische Unterschiede zu sehen. Die Zisternen des RER sind vermehrt und der Golgi-Apparat ist vergrößert [9]. Die im vorhergehenden kurz dargestellten Beobachtungen von Fanger und Ree [9] stimmen weitgehend mit einer anderen Publikation überein [50], in der die Zyklusphasen jedoch noch feiner, das heißt in 5 Phasen unterteilt werden. Phase 1 (Tag 3-7), Phase 2 (Tag 8-14), Phase 3 (Tag 15-20), Phase 4 (Tag 21-27) und Phase 5 (Tag 28-2). Unterschiede bestehen in der Interpretation der präovulatorischen Phase. Fanger und Ree, 1974 [9] sehen in der Phase 1 einen relativen inaktiven physiologischen Zellstatus, begründet durch eine relativ einfache Ultrastruktur, charakterisiert durch verstreute freie Ribosomen, sowie eine helle Zellmatrix [9]. Vogel et al., 1981 [50] hingegen identifizieren in ihrer Phase 1 (Tag 3-7) mitotische Aktivität und nehmen eine Proliferation der Epithelzellen an [50]. Charakterisiert ist diese Proliferation unter anderem durch unregelmäßige Erhöhungen von Zellschichten mit epithelialen Elementen, die in das Lumen hineinragen können. Dieser Proliferationsphase folgend oder begleitend kommt es oft zu einer strahlenförmigen Organisation und zur Ausbildung von Kernreihen der Epithelzellen. Die noch nicht erwähnte Basophilie der luminalen Zellen zu dieser Zeit korreliert mit wachsendem RNA- und Ribosomenbestand, die mit Hilfe des Elektronenmikroskops



festgestellt wird. Diese erhöhte Transkriptions- und Translationsaktivität lässt sich als Folge der Östrogenstimulation erklären [50].

### *1.3.2 Sekretorische Aktivitätsunterschiede*

Die „ruhende Mamma“, also die nicht laktierende Mamma, und somit der Zustand der Mamma, welche bei der erwachsenen Frau die meiste Zeit des Lebens vorherrscht, ist in sekretorischer Hinsicht ganz und gar nicht „ruhend“. Schon 1922 beobachtete Rosenberg, dass gegen Ende der Menstruation die Tubuloalveoli mit Sekret ausgefüllt sind und dass die Epithelzellen sekretorische Aktivität zeigen [42]. Auch Bässler 1978 [6] wies sekretorische Phänomene als normale Zellprozesse der weiblichen Brustdrüse während des gesamten Lebens nach. In einer elektronenmikroskopischen Studie von 1990 [44] wurden verschiedene Phänomene beobachtet, welche zeigen, dass auch die nicht-laktierende weibliche Brustdrüse, speziell im Bereich der kleinen Gänge und Tubuloalveoli, regelmäßig Zeichen sekretorischer Aktivität aufweist. Die Epithelzellen der kleinen Gänge und Tubuloalveoli beinhalten moderate Mengen an Mitochondrien und Zisternen des Rauhen Endoplasmatischen Retikulums sowie einen aktiven Golgi-Apparat. Im apikalen Zytoplasma treten verschieden große Vesikel und Granula mit flockigem, dichtem oder hellem Inhalt auf, oft dicht unter der apikalen Plasmamembran der Epithelzellschicht der kleinen Gänge, und noch häufiger in den Tubuloalveoli. Typische Kasein-Vesikel werden nicht gesehen. Fetteinschlüsse kommen nur relativ selten vor. Innerhalb der Lumina findet man regelmäßig sekretorische Produkte mit feiner granulärer oder filamentöser Struktur, die vermutlich überwiegend Glykoproteine oder Muzine repräsentieren (Oppermann, in Vorbereitung). Intrazellulär wie auch im Lumen der Gänge sieht man verschiedene Fetttropfen und liposomenartige Partikel. Durch Lektinhistochemie kann man demonstrieren, dass die sekretorischen Produkte einen

beträchtlichen Anteil an Zuckerkomponenten haben. Sekrete der nicht-laktierenden Brustdrüse sind auch von klinischem Interesse, da in dem Sekret unter anderem Enzyme vorhanden sind, welche fähig sind, Sauerstoffradikale zu bilden, die wiederum zu pathologischen Änderungen in der weiblichen Brustdrüse führen können [44].

### *1.3.3 Proliferation und Apoptose*

Um immunhistochemisch feststellen zu können, welche Zellen im Brustdrüsengewebe gerade in einer Phase der Proliferation stehen, wurde der Antikörper Ki-67/MIB-1 verwendet, der gegen ein menschliches Kern-Antigen gerichtet ist [45]. Dieses Antigen ist nur in der G<sub>1</sub> - S - G<sub>2</sub> Phase und während der Mitose nachweisbar. Die Ki-67/MIB-1-Immunreaktion zeigte bei 47 Frauen, die sich einer Feinnadelbiopsie unterzogen, unterschiedliche Resultate hinsichtlich follikulärer und lutealer Phase [45]. In der follikulären Phase ergab sich in der Mehrheit der Fälle weniger Proliferation als in der lutealen Phase. Dieser Proliferationsanstieg korrelierte mit dem Serumprogesteronspiegel am Tag der Biopsie. Dieses Ergebnis führte zu der Annahme, dass Progesteron die Proliferation der Zellen im Brustdrüsengewebe anregt [45]. Olsson et al., [31] zeigten mit dem formalinresistenten Antikörper Ki-65, dass es eine signifikant höhere Proliferationsrate bei Frauen mit oraler Kontrazeptivaeinnahme in der lutealen Phase, im Vergleich zu Frauen in der follikulären Phase gibt. Unter diesen Frauen zeigten diejenigen, die zusätzlich noch eine positive Familienanamnese hinsichtlich Brustkrebserkrankungen hatten, die höchsten Proliferationswerte. Diese Studie konnte keine altersspezifischen Unterschiede hinsichtlich der Proliferation feststellen [31]. Einen Proliferationsanstieg in der lutealen Phase zeigte auch schon eine Studie von Potten (1988), die zudem noch eine negative Korrelation hinsichtlich des Patientenalters feststellen konnte [37] Hier kommt die Diskussion auf, dass Progesteron auch eine erhöhte Empfindlichkeit der

Epithelzellen auf wachstumsfördernde Peptidhormone bewirken könnte oder selber proliferative Effekte zeigt.

Bei der Analyse der Zellapoptose konnte Potten (1988) [37] keinen Zusammenhang hinsichtlich des Zyklus oder des Alters feststellen. Bei Frauen mit oder ohne Einnahme von oraler Kontrazeptiva, sowie bei Frauen die schon geboren hatten oder nicht, sah er keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich Apoptose und Proliferation [37]. Mit Hilfe morphologischer Veränderungen apoptotischer und mitotischer Zellen konnte in einer Studie von Ferguson et al. (1981) ein zyklusabhängiger Zellumsatz festgestellt werden. Es scheint, dass das „ruhende“ Brustdrüsengewebe mehr eine „allgemeine“ als eine „fokale“ Reaktion auf eine gegebene hormonelle Umgebung zeigt. Diese Vermutung begründet sich darauf, dass sich leichte Veränderungen in der großen Mehrzahl der Läppchen zeigten. Ergebnis dieser Studie ist ein Mitosehöhepunkt am Tag 25 des Menstruationszyklus und ein Apoptosehöhepunkt am Tag 28. Im Vergleich zum Steroidspiegel im Blut kann das bedeuten, dass fallende Östrogen- und Progesteronwerte für eine vermehrte Apoptose der Epithelzellen verantwortlich sind, und die Spitzenwerte von Progesteron und Östrogen an den Tagen 22 – 24 des Zyklus Grund für die hohe Mitoserate sind. Die erhöhte Östrogenkonzentration am Tag 14 zeigte keine erhöhte Mitoserate, so dass davon ausgegangen werden kann, dass der Mitosehöhepunkt durch einen synergistischen Effekt von Östrogen und Progesteron zustande kommt [11]. Ergebnisse von Untersuchungen mit Antikörpern gegen bcl-2 Protoonkogen (antiapoptotischer Faktor) [43] legen die Vermutung nahe, dass nicht nur die Proliferation, sondern auch die Apoptose zyklusabhängig ist und somit ebenfalls von Hormonen reguliert wird. Bcl-2 verlängert das Überleben der Zellen und verhindert ihr Absterben. Am höchsten war die Expression von bcl-2 Färbung in der Mitte des Zyklus, ca. Tag 13 - 17. Außerdem ließ sich durch die immunhistochemische bcl-2 Färbung eine Verschiebung der Lokalisation der Anfärbung innerhalb der folliculären Phase feststellen. Zu Beginn der folliculären Phase

färbten sich die basalen Zellen und am Ende die Zellen der apikalen Zellreihe. Das Mantelgewebe war weitgehend frei von bcl-2 Immunreaktion. Eine mögliche Bedeutung von bcl-2 könnte eine erhöhte Sensitivität der Epithelzellen gegenüber proliferativen Faktoren von dem in der lutealen Phase eintretenden differenzierenden Stimulator Progesteron sein. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass bcl-2 eine erhebliche Rolle in der hormonabhängigen Tumorentstehung spielt, vor allem bei Östradiol-abhängigen Brusttumoren [43]. In einer Studie, die bcl-2 (antiapoptotischer Faktor) und bax (proapoptotischer Faktor) in Bezug auf Proliferation und Apoptose in der nicht laktierenden menschlichen Brustdrüse immunhistochemisch untersuchte [12], ergaben sich folgende Erkenntnisse: Zellproliferation wurde ausschließlich in Drüsenepithelzellen mit Kontakt zum duktalem Lumen beobachtet, während Apoptose-assoziierte DNA-Fragmente hauptsächlich in basal lokalisierten Drüsenepithelzellen sowie in Myoepithelzellen gefunden wurden. Eine schwache Immunreaktion für bax und bcl-2 wurde in allen Epithelzellen gesehen, was darauf hindeutet, dass sich in den meisten Zellen pro- und antiapoptotische Vorgänge abspielen. Stark bcl-2 angefärbte Zellen waren nicht identisch mit proliferierenden Zellen, aber sie hatten die gleiche Lokalisation („luminale“ intraepitheliale Position) wie proliferierende Zellen. Stark bax angefärbte Zellen hatten im Gegenteil zu den bcl-2 angefärbten Zellen gar keine Beziehung zum duktalem Lumen. Dieses unterschiedlich starke Färbeverhalten (schwach in allen Zellen und stark in vereinzelt Zellen) lässt vermuten, dass es verschiedene Empfindlichkeitsstufen der Epithelzellen gibt, die auf apoptotische Stimuli reagieren. Die stark bcl-2 angefärbten Zellen lassen sich möglicherweise als epitheliale Stammzellen ansehen [12]. Weitere zu beobachtende zyklusabhängig exprimierte Faktoren sind c-erbB-2 und der Epidermal growth factor receptor (EGF-R). In einer Studie von Gompel et al. (1996) konnte eine verstärkte Expression dieser Faktoren in der lutealen Phase festgestellt werden [16]. Beide Faktoren sind Tyrosin-Kinase-Transmembranrezeptoren und kontrollieren wahrscheinlich Proliferation und Differenzierung der normalen Brustdrüsenepithelzellen. In malignen Zelltransformationen

wird EGF-R überexprimiert. Beide Faktoren sind in ihrer physiologischen Bedeutung noch unklar, aber es kann eine starke Zyklusabhängigkeit ihrer Expression gezeigt werden. Wie schon erwähnt, zeigten sich beide stark positiv in der lutealen Phase aber in unterschiedlicher Lokalisation. EGF-R ist in den basalen Drüsenepithelzellen der Gänge und Tubuloalveoli zu sehen, sowie in Myoepithelzellen und einigen Stromazellen. C-erbB-2 ist eher in der apikalen Reihe der Drüsenepithelzellen lokalisiert, und zwar sowohl in Gängen als auch in den Tubuloalveoli. Eine Erklärung für die erhöhte Expression in der lutealen Phase kann der Effekt des Progesterons sein, oder dessen antiöstrogene Wirkung [16].

#### *1.3.4 Volumenzunahme der Brust*

In einer radiologischen Studie wurden Veränderungen im normalen Brustdrüsengewebe mitsamt seinem umgebenden Fettgewebe unter Berücksichtigung des Alters und der Zyklusphase beobachtet [8]. Dies geschah mit Hilfe eines Ultra-Leichtfeld-0.02 T-Imager. Der einzige signifikante Trend war eine Volumenzunahme des Brustdrüsengewebes mit steigendem Alter in der T2-Gewichtung und erhöhte Werte in der T2-Gewichtung zwischen der zweiten und dritten Woche des Menstruationszyklus. Leichte Veränderungen in der T1-Gewichtung waren nicht signifikant. Diese Ergebnisse lassen sich durch eine fortschreitende Fettinfiltration im Alter erklären sowie ein steigender Wassergehalt des Brustgewebes gegen Ende des Zyklus [8].

#### *1.4 Verschiedene steroid metabolisierende 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen; ihre Lokalisation und ihre Funktionen*

Neben den auffälligen Veränderungen im Endometrium [17] unterliegt auch das Mammagewebe einem sich periodisch mit dem Zyklus ändernden Steroidgehalt und -umsatz. Meine Untersuchungen richten sich auf den Umsatz von Östrogenen in ihren verschiedenen Aktivitätsformen an dem Hydroxysteroiddehydrogenasen beteiligt sind. Der Serumöstradiolspiegel allein muss nicht mit dem Hormonspiegel im Gewebe übereinstimmen. Schon vor über 30 Jahren beschrieben Aoshima und Kochakian 17 $\beta$ -HSD Aktivität in subzellulären Fraktionen der Leber und Niere verschiedener Tierspezies [5]. Später, 1984 [39] untersuchte man die Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen in Brustdrüsenzellkulturen in Bezug zum Menstruationszyklus und erhielt ein interessantes Ergebnis. Man ging bei dieser Studie zwar noch nicht von verschiedenen Isoenzymen aus, entdeckte aber, dass die Dehydrogenase Östradiol (E2) zu Östron (E1) umwandelt, und ihre Aktivität in den Epithelzellen signifikant höher war als in den Fibroblasten der Mamma. Eine 2 – 5 -fache Steigerung dieser Aktivität konnte durch Zugabe von Progesteron zu den Epithelzellkulturen erreicht werden. Dies kann eine Einwirkung des Serumprogesteronspiegels auf die lokale Umwandlung von Östradiol in seine inaktive Form in der Mamma bedeuten [39]. Auch zur Klassifikation sozusagen als Marker hormonabhängiger Tumoren der Brust wurde 17- $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase schon 1985 vorgeschlagen [13]. Bei Unterscheidung eines hormonabhängigen Tumors von einem nicht hormonabhängigen Tumor der Brust wurde die 17 $\beta$ -HSD Aktivität als Marker herangezogen, da sie bei Progesterongabe in progesteronabhängigen Tumoren anstieg und nach der operativen Entfernung des Tumors im Tumor abfiel. Interessant für unsere Studie ist, dass Fournier et al. (1985) [13] einen zyklusabhängigen Anstieg der 17 $\beta$ -HSD Aktivität bei prämenopausalen Frauen feststellte. 17 $\beta$ HSD Aktivität war niedrig im Tumor in der

follikulären Phase, in der lutealen Phase dagegen war der Gehalt höher. Insgesamt war die 17 $\beta$ -HSD Aktivität höher bei vorheriger Behandlung mit Progesteron [13].

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 1 (17 $\beta$ -HSD 1), die Östron (E<sub>1</sub>) in das hormonell wirksame Östradiol (E<sub>2</sub>) umsetzt (Reduktion), wurde von Miettinen et al. und Peltoketo et al. untersucht [27, 28, 33, 34]. Die höchste Aktivität hat 17 $\beta$ -HSD 1 im Ovar und in der Plazenta, und zusätzlich findet man sie im Endometrium, sowie in gesunden und malignen Brustdrüsenepithelzellen [4, 28, 33, 34]. Konzentrationsunterschiede der 17 $\beta$ -HSD 1 werden in peripheren Geweben durch Progestin und Retinoidsäuren erwirkt, wogegen diese Beeinflussung der 17 $\beta$ -HSD 1 Konzentrationen in den Granulosazellen des Ovars streng durch Hypophysengonadotropine sowie Steroidhormone und Wachstumsfaktoren reguliert werden [33]. Ebenfalls interessant ist das Ergebnis, dass zwar mRNA der HSD 1 in den Brustdrüsenepithelzellen gefunden wurde, aber keine Reduktionsaktivität (Umwandlung von Östron in Östradiol) in den Brustdrüsenepithelzellen messbar war [27]. Eine oxidative Aktivität (Umwandlung von Östradiol in Östron), wahrscheinlich durch 17 $\beta$ -HSD 2, war dagegen fast durchgehend messbar [27]. Durch ihr Wirken und ihre Lokalisation kann man annehmen, dass 17 $\beta$ -HSD 1 speziell für die Östradiolproduktion der Frau verantwortlich ist [28]. Ein wichtiger Befund der Untersuchungen von Söderqvist et al. [46] ist, dass HSD 1 in beiden Phasen (follukulär und luteal) in den Brustdrüsenepithelzellen vorhanden ist, während sie im Endometrium in der follikulären Phase fehlt. Die maximale Proteinexpression wird in der frühen und mittigen lutealen Phase beobachtet und verschwindet während der späten lutealen Phase. Auffallend ist in der Immunhistochemie mit 17 $\beta$ -HSD 1 Antikörpern eine höhere Farbintensität der Präparate bei Frauen, die orale Kontrazeptiva verwenden. Bei den prämenopausalen Frauen ergibt sich eine negative Korrelation zwischen dem Serumöstradiolspiegel und der Stärke der 17 $\beta$ HSD 1 Färbung. Tendenziell ist auch eine negative Korrelation zwischen dem Serumprogesteronspiegel und 17 $\beta$ -HSD 1 zu finden. In

Brustkrebszellen ist diese Korrelation aufgehoben. Eine Unterdrückung der Konversion von Östradiol ( $E_2$ ) zu Östron ( $E_1$ ) findet nicht mehr statt. Daraus kann man schließen, dass in Geweben, in denen ein niedriger  $E_2$ -Gehalt vorliegt, eine vermehrte Konversion von  $E_1$  zu  $E_2$  stattfindet. Dies bedeutet, dass 17 $\beta$ -HSD 1 einen Regulationsmechanismus im Brustdrüsengewebe bewirkt, der die  $E_2$ -Konzentration kontrolliert [46].

In einer weiteren Studie (auch unter Mitwirken von Söderqvist) [27] wurden aber keine großen quantitativen Unterschiede der Proteinexpression von 17 $\beta$ -HSD 1 während des Menstruationszyklus mehr beobachtet.

Die 17 $\beta$ -HSD 2 katalysiert die oxidative Reaktion von Östradiol zu Östron ( $E_2$  zu  $E_1$ ) [27, 28]. Vermutet wird auch, dass sie nicht nur  $E_2$  als Substrat inaktiviert sondern auch Testosteron und 5-alpha-Dihydrotestosteron [52]. 17 $\beta$ -HSD 2 wird nicht so streng lokalisiert im Körper wie 17 $\beta$ -HSD 1 exprimiert, sondern ist sowohl in mehreren Östradiol metabolisierenden Geweben als auch in einigen Zielzellen der Sexualsteroiden vorhanden; genauer gesagt findet man 17 $\beta$ -HSD 2 vor allem in der Leber, Plazenta, Intestinum und im sekretorischen Endometrium [4, 18]. Ihre Aufgabe besteht darin, Sexualsteroiden in peripheren Geweben zu inaktivieren, bei Frauen wie bei Männern [28]. Sie vermag auch die Wirkung von Progesteron auf die Plazenta zu unterstützen [4]. Untersuchungen zu zyklusabhängigen Schwankungen sind bisher nicht beschrieben worden.

Testikuläre 17 $\beta$ -HSD 3 ist verantwortlich für die Konversion von Androstendion zu Testosteron, Dihydroepiandrosteron zu 5-Androstendiol. Wie wichtig die 17 $\beta$ -HSD 3 für den menschlichen Organismus ist sieht man bei deren Fehlen oder Mutation: Der männliche Pseudohermaphroditismus ist mit ihr vergesellschaftet [2, 3, 14].



Im Gegensatz zu den anderen 17 $\beta$ -HSDs weist 17 $\beta$ -HSD 4 einige Besonderheiten auf. Die Daten sprechen für eine Expression der 17 $\beta$ -HSD 4 in zahlreichen menschlichen Zelltypen, wie z.B. in Leber, Herz, Prostata und Hoden [1]. Tierexperimentelle Studien zeigten bei Mäusen eine ähnliche Verteilung wie beim Menschen, d.h. in Leber und Niere eine hohe 17 $\beta$ -HSD 4 Expression, in Gehirn und Milz eine niedrige Expression [30]. Beim Schwein ergab sich eine hohe Expression von 17 $\beta$ -HSD 4 in Leber und Niere sowie Uterus und Lunge [19]. Intrazellulär konnte 17 $\beta$ -HSD 4 in den Peroxisomen lokalisiert werden [24, 25]. Nicht nur in der Lokalisation, sondern auch in ihrem biochemischen Aufbau unterscheidet sich 17 $\beta$ -HSD 4 von den anderen 17 $\beta$ -HSDs. Das aus 734 Aminosäuren bestehende Enzym weist eine 3 Domänenstruktur auf. Nur die N-terminale Domäne der 17 $\beta$ -HSD 4 findet sich in anderen 17 $\beta$ -HSDs wieder und zeigt mit diesen ca. 25 % Aminosäure-Übereinstimmung [7]. Stimuliert werden kann das 17 $\beta$ -HSD 4 Gen durch Progesteron und Liganden von PPAR $\alpha$  (peroxisomal proliferator activated receptor alpha) ebenso wie durch Klofibrate. Herunterreguliert werden kann das 17 $\beta$ -HSD 4-Gen durch Phorbol ester [7]. Da für das Enzym zur Östradiolaktivierung weitere Funktionen, d.h. unter anderem die Beteiligung an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und an der Gallensäuresynthese nachgewiesen wurde, nennt man 17 $\beta$ -HSD 4 auch multifunctional enzyme type 2 (MFE-2), multifunctional protein 2 (MFP-2) oder D-bifunctional protein (D-bp; D-spezifische 3-acyl-CoA Dehydrogenase- und D-spezifische Hydratase-Aktivität) [40].

Der vor kurzem klonierte Typ 5 der HSD's transformiert ebenfalls die Hormonvorstufe Androstendion in das aktive Hormon Testosteron [32]. Immunhistochemische Untersuchungen lassen verschiedene Lokalisationen erkennen: Im Corpus luteum im Ovar prämenopausaler Frauen, in Epithelzellen des Endometriums, auch in der weiblichen Brust, dort vor allem in den Epithelzellen der Tubuloalveoli und intralobulären Gängen sowie in den umgebenden Stromazellen. Auch im Hoden in den Leydig Zellen, in der Prostata und in den

Endothelzellen der Gefäße, welche die menschlichen Reproduktionsorgane versorgen, ist die 17 $\beta$ -HSD 5 vertreten [32].

Typ 7 der 17 $\beta$ -HSD ist vor allem in den Luteinzellen des Ovars exprimiert. Sie wurde als Prolaktin-Rezeptor assoziiertes Protein bekannt [34]. Später wurde gezeigt, dass sie wie die 17 $\beta$ -HSD 1 die Umwandlung von Östron in Östradiol katalysieren kann.

### 1.5 *Die Regulation des Östrogen- und Progesteronrezeptorstatus im Brustdrüsenepithel der Mamma*

Gompel et al. (1986) [15] zeigten, dass Östradiol in Zellkulturen von Brustdrüsenepithelzellen die Zellproliferation stimuliert. Progesteron inhibiert die Zellmultiplikation und ist für die Differenzierung der Zellen zuständig. Ein interessanter Aspekt ist, dass die genannten Autoren 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase als Marker für Epitheldifferenzierung verwendeten, die progesteronabhängig zu sein scheint. Die beschriebene 17 $\beta$ -HSD (vermutlich 2 und 4) wandelte Östradiol in Östron, die inaktive Hormonform, um [15]. Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte die Östradiol- und Progesteroninteraktion in normalen und pathologischen Brustdrüsenzellen [26]. Es lässt sich feststellen, dass Östrogen einen Anstieg der Progesteronrezeptoren in den Zielzellen bewirkt. Die Erklärung ist ein Vorbereitungseffekt des Östrogens auf ein Zielgewebe, das bald mit Progesteron in Kontakt kommt. Am Ende der lutealen Phase wird eine Abnahme der Progesteronrezeptoren bemerkt, was eine Selbstlimitierung der eigenen Rezeptoren durch Progesteron bedeuten kann. Progesteron besitzt auch eine antiöstrogene Aktivität. Diese basiert auf drei Mechanismen. Es reduziert die Östrogenmenge in der systemischen Zirkulation, inaktiviert das aktive Östradiol durch Metabolisierung im Zielgewebe und vermindert die Anzahl der Östrogenrezeptoren in diesen Geweben. Die Metabolisierung betrifft die Umwandlung von E<sub>2</sub> in E<sub>1</sub>. Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase(n), die für diese Reaktion verantwortlich ist (sind), wird (werden) wiederum unter Progesteronausschüttung vermehrt gebildet. Mauvais-Jarvis et al. (1986) [26] stellen fest, dass Östradiol für das Wachstum des duktales Systems, für steigende mitotische Aktivität der basalen Zellreihen der Gänge, und Progesteron mit Östradiol zusammen für die Entwicklung der Tubuloalveoli verantwortlich sind. In anderen Worten gesagt ist die adäquate Sekretion von Östradiol und Progesteron für die gesunde Entwicklung der Mamma zuständig, und vermutet werden kann, bei verlängerten Perioden mit defekten

lutealen Phasen, ein ungebremster Östrogeneffekt, der die Karzinogenese der Brust begünstigen könnte [26]. Ähnliche Ergebnisse erzielte eine Arbeitsgruppe mit In-vitro-Versuchen [22]. Sie fanden heraus, dass der Östrogen- und Progesteronrezeptorgehalt in Brustzellkulturen hormonabhängig ist. Mit einer spezifischen Färbung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Brustdrüsenepithelzellen konnten verschiedene Hormoneinflüsse gut beobachtet werden. Die Färbung war nukleär und variierte von Zelle zu Zelle in Vorhandensein und Intensität. Unter Hormonzugabe änderte sich die Zahl der positiven Zellen. Östradiol bewirkte eine Erhöhung, und Progesteron eine Erniedrigung an positiv gefärbten Brustdrüsenepithelzellen. Daraus lässt sich schließen, dass Östrogen seinen eigenen Rezeptor sowie den Progesteronrezeptor stimuliert, während Progesteron den Gehalt an Östrogen- und Progesteronrezeptoren vermindert. Isolierte Fibroblasten aus der Mamma zeigten keine Reaktion auf externe Hormonzugaben [22]. Wie auch in unserer Studie wurde in anderen Untersuchungen die Mamma unter Berücksichtigung der Einnahme oraler Kontrazeptiva beobachtet. Eine Studie von Williams et al. (1991) [51] zeigte beispielsweise, dass es unter oraler Kontrazeptiva in der ersten Zyklushälfte eine signifikant geringere Anzahl an Östrogenrezeptoren gibt, und deshalb der Anstieg proliferierender Zellen früher im Zyklus erfolgt. Östrogenrezeptoren fallen während des normalen Zyklus ab, aber dieser Abfall erfolgt früher in Zyklen mit oralen Kontrazeptiva. Normalerweise gibt es wenige proliferierende Zellen in den ersten zwei Wochen des Zyklus und erst dann erfolgt ein signifikanter Anstieg in der dritten und vierten Woche. Auffällig sind die Unterschiede in der zweiten Woche des Zyklus. In natürlichen Zyklen sind in dieser Woche die Östrogenrezeptoren noch erhöht und die proliferierende Zellzahl ist erniedrigt. Genau umgekehrt ist dies bei den Zyklen unter Einnahme oraler Kontrazeptiva. Die Expression von Progesteronrezeptoren scheint keinen zyklusabhängigen Schwankungen unterlegen zu sein [51]. Williams et al. nehmen deshalb an, dass durch die Einnahme von oralen Kontrazeptiva Veränderungen der Brustdrüse, die normalerweise in der dritten Zykluswoche auftreten, eine Woche früher ablaufen, und nun die

Brust eine „Proliferationswoche“ dazu bekommt. Dazu kommt eine größere Suppression an Östrogenrezeptorexpression. Dies könnte ein erhöhtes Brustkrebsrisiko bedeuten [51].

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 *Auswahl der Patienten*

In der vorliegenden Studie untersuchten wir Gewebe von 47 prämenopausalen Frauen, die sich einer chirurgischen Mammareduktionsplastik unterzogen. Diese Frauen hatten regelmäßige Zyklen von 25 bis 35 Tagen und keine Brustkrebserkrankung in ihrer eigenen Anamnese. 23 Patientinnen waren in der folliculären Phase und 24 in der lutealen Phase. Ihr Alter lag zwischen 17 bis 51 Jahren, im Durchschnitt bei 32 Jahren. 28 Patientinnen waren schon einmal schwanger, 26 Patientinnen hatten Kinder, und 21 Patientinnen hatten keine Kinder. Von den Frauen mit Kindern wurde noch differenziert zwischen gestillten/nicht gestillten Kindern. In der Anamnese wurde auch festgehalten, ob in der Verwandtschaft 1. und 2. Grades Brustkrebs aufgetreten war. Dies war bei 6 Patientinnen der Fall. 35% der Frauen hatten orale Kontrazeptiva verwendet. Um die genaue Zyklusphase am Operationstag feststellen zu können, wurde die letzte Menstruation datiert und die nächste Blutung im Anschluß an die Operation. Aus der genauen Patientenanamnese bei der wir den Zyklus abfragten, konnten wir den Tag der Operation entweder der folliculären oder der lutealen Phase zuordnen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Immunhistochemie mit Antikörpern gegen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4, Östrogen- und Progesteronrezeptoren

#### Präparation der Gewebestücke für die immunhistochemische Untersuchung

Gleich nach Entnahme des Brustdrüsengewebes im Operationssaal wurden 2 x 2 cm große, stark drüsenepithelhaltige Stücke ausgewählt, und in 4 %, phosphat- gepufferte Formaldehyd- lösung für 24 h fixiert. Nach Entwässern und Einbetten in Paraffin wurden von dem Gewebe mit dem Schlittenmikrotom (Jung, HN 40 50/1962) 4  $\mu$ m dünne Schnitte angefertigt und auf Superfrost-Objektgläser (Menzel, Braunschweig, Deutschland) gezogen. Zur Beurteilung der Güte der Präparate (analysiert mit einem Olympus BH-Mikroskop) wurden repräsentative Schnitte mit Hämatoxylin- und Eosin (H & E) gefärbt. Nur Gewebe, in denen ausreichend Drüsenendstücke in der H & E -Färbung zu sehen waren, wurden dann für die immunhistologischen Untersuchungen herangezogen.

#### Doppelfärbung mit Hämalaun-Eosin nach Romeis

1. Schnitte werden entparaffiniert und in Aqua dest. gebracht
2. 3 - 8 min. Kernfärbung in Mayers Hämalaun
3. Spülung in Aqua dest. oder in 0,1 % HCL
4. 10 min. in fließendem Leitungswasser bläuen
5. Färbung in Eosin, 0,1 % in Aqua dest. Für 5 - 15 min
6. 1 - 5 min. auswaschen in Wasser
7. Differenzierung in 80 % Ethanol

8. 2 x 2 min. in 96 - 100 % Ethanol
9. 3 - 5 min. in Xylol
10. Eindecken

#### Immunhistochemie für 17 $\beta$ -HSD 4

##### Pufferlösungen:

*0,01 M Citratpufferlösung bei pH 6:*

0,1 M Zitronensäure + 0,1 M Natriumcitratlösung im Verhältnis 1:4,5 mischen

*TBS (Tris buffered saline)-Puffer-35 mM Tris-HCL, 140 mM NaCl, ph 7.6:*

Zuerst wurden die 4  $\mu$ m dicken Schnitte in Xylol- und Xylol-Ethanollösung entparaffiniert und anschließend durch eine absteigende Alkoholreihe (100 %, 80 %, 60 %, .... - 50 % Ethanol in H<sub>2</sub>O) rehydriert. Es folgte eine 5 minütige Inkubation in TBS-Pufferlösung. Daraufhin wurden die Schnitte in eine Citratpufferlösung überführt und für 10 min. in der Mikrowelle bei 650 Watt erhitzt. Nach einer Abkühlphase von 30 min. wurden sie wieder 5 min. in TBS bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz in ein 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bad getaucht (Inaktivierung der endogenen Peroxidase). Folgend wurden sie 5 min. in TBS gewaschen und danach 20 min. mit humanem Serum (Verdünnung 1 : 5 in TBS) geblockt. Nun folgte eine 24 -stündige Inkubation bei 4 °C mit den 17 $\beta$ -HSD 4 Antikörpern 2E9 und 2C7 (hergestellt von Dr. Kremmer; GSF Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Möller, Dr. Adamski). Der erste Antikörper 2C7 ist gegen die C-terminale Domäne der humanen 17 $\beta$ -HSD 4 gerichtet. Er ist ein monoklonaler Rattenantikörper und stammt aus der Immunglobulingruppe G 1 (IgG 1). Der



zweite Antikörper, 2E9, ist ebenfalls gegen die C-terminale Domäne der humanen 17 $\beta$ -HSD 4 gerichtet, ist auch ein monoklonaler Rattenantikörper, stammt aber aus der Immunglobulingruppe M (IgM). Bei den Positivkontrollversuchen wurden menschliche Nierentubuli-Epithelien angefärbt, die sich besonders intensiv mit beiden Antikörpern darstellten. Danach wurden ungebundene Antikörper durch ein 15-minütiges Waschen mit TBS- Puffer wieder gespült. Gleich danach wurde der 2. Antikörper (Peroxidase markierter Anti-Ratte AK; Verdünnung 1 : 300 in TBS, DAKO, Hamburg) aufgetragen und für 30 min. belassen. Nach 15-minütigem Waschen erfolgte eine 20-minütige Streptavidin Inkubation (Verdünnung 1 : 150 in TBS, DAKO, Hamburg) gefolgt von Waschen in TBS für 15 min. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation in verdünnter DAB-Lösung (3,3'-Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich). Die Färbung wurde durch ein Waschen der Objektträger mit H<sub>2</sub>O beendet. Die Fixierung und Konservierung der Schnitte erfolgte durch das Entwässern der Schnitte in einer aufsteigende Alkoholreihe und Xylol- Ethanolreihe samt Eindecken.

#### Immunhistochemie mit Antikörpern für Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Als erstes wurden die 4  $\mu$ m dicken Schnitte in Xylol- und Xylol-Ethanollösung entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100 % , 80 % , ...- 50 % Ethanol in H<sub>2</sub>O) rehydriert. Anschließend folgte eine 5-minütige Inkubation in TBS. Daraufhin wurden die Schnitte in eine Citratpufferlösung überführt und wieder 5 min. in TBS bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend kurz in ein 3 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Bad getaucht (Inaktivierung der endogenen Peroxidase). Folgend wurden sie 5 min. in TBS gewaschen und danach 20 min. mit humanem Serum (Verdünnung 1 : 5 in TBS) geblockt. Nun folgte eine 24 -stündige Inkubation bei 4 °C mit dem Progesteron-rezeptorantikörper (DAKO Corporation, USA,

Code No. M3529, Mouse Anti-Human) bzw. Östrogenrezeptorantikörper (DAKO A/S, Dänemark, Code No. M7047, Mouse Anti-Human), der dann durch ein 15 minütiges Waschen in TBS-Puffer wieder abgespült wurde. Gleich danach wurde der 2. Antikörper (Peroxidase markierter, Anti-Maus; Verdünnung 1 : 300 in TBS bei Progesteronrezeptorfärbung und 1 : 800 bei Östrogenrezeptorfärbung, DAKO, Hamburg) aufgetragen und für 30 min. belassen. Nach 15 minütigem Waschen mit TBS erfolgte eine 20 minütige Streptavidin Inkubation (Verdünnung 1 : 150 in TBS, DAKO, Hamburg), gefolgt von Waschen in TBS für 15 Minuten. Die Detektion der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte durch eine 10 minütige Inkubation in verdünnter DAB-Lösung (3.3'Diaminobenzidin, Sigma-Aldrich). Die Färbung wurde durch ein Waschen der Objektträger mit H<sub>2</sub>O beendet. Die Fixierung und Konservierung der Schnitte erfolgte durch das Entwässern der Schnitte in einer aufsteigende Alkoholreihe und Xylol-Ethanolreihe samt Eindecken.

### *2.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)*

Um eine Aussage machen zu können, ob und wie viel 17 $\beta$ -HSD 4-mRNA im Brustdrüsengewebe vorhanden ist, bietet sich die Methode der PCR an. Die wie unten beschrieben gewonnene cDNA wurde durch die PCR vervielfacht und konnte dann durch Gelauftragung sichtbar gemacht werden.

#### Die Ansatzlösung bestand aus:

9 - 10  $\mu$ l Wasser,

2  $\mu$ l Pufferlösung (10 x Reaktionspuffer von MB I),

1,2  $\mu$ l MgCl<sub>2</sub> (25 mM),

2  $\mu$ l dNTP (2 mM),

1  $\mu$ l Primer (jeweils forward and reverse) (10  $\mu$ M),

1  $\mu$ l Taq-Polymerase (1 IU/ $\mu$ l, MB I) sowie 1 - 2  $\mu$ l cDNA aus Brustdrüsengewebe

Die Primer für 17 $\beta$ -HSD 4 hatten folgende Basenabfolge:

5`-GCTCACCGCTGAGGTTTCGACG-3`

5`-GGACAAGAGGTGCCACATACTCTGG-3`

Die Primer für 26S-Protein („housekeeping gene“) hatten folgende Basenabfolge:

5`-AATGGTCGTGCCAAAAAGGGC-3`

5`-TTACATGGGCTTTGGTGGGGG-3`

Wir wählten folgendes Amplifikations-Programm:

5 min 95 °C	1x (Schmelzen)
30 sec 95 °C, 30 sec 60 °C, 1 min 72 °C	35x (Schmelzen, Annealen, Verlängerung)
7 min 72 °C	1x (Verlängerung)

Die entstandene vervielfältigte DNA pipettierten wir auf ein 1 % Agarosegel, versetzt mit Ethidiumbromid. Nach einer Laufdauer von ca. 1 h bei 100 V konnte man die Banden unter UV-Licht detektierten, fotografieren und auswerten. Signal-Detektion und -Quantifizierung erfolgte mit dem Programm Quantity One (Biorad).

### *2.2.3 Messung der 17 $\beta$ -HSD Enzymaktivität*

#### Enzymatische Umwandlung von Östrogenen / Prinzip: Umwandlung von Östradiol in Östron

Durch den Einsatz radioaktiv ( $^3$ H) markierter Östrogene besteht die Möglichkeit, die Aktivität von 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen zu messen, die die Umsetzung von Östron in

Östradiol bzw. von Östradiol in Östron katalysieren. Der quantitative Wert des Substratumsatzes dieser Enzyme erfolgt durch die Messung von Edukt (Menge des eingesetzten noch nicht umgewandelten Ausgangsstoffs) und Produkt (aus der Reaktion entstandener Stoff) nach einer Inkubation mit homogenisiertem Gewebe.

### Vorbereitung des Gewebes: Zellfraktionierung und Homogenisation

Zuerst wurde das frisch entnommene Gewebe noch im Operationssaal in Stickstoff tiefgefroren. Anschließend wurde es unter Stickstoffkühlung mit einem Mörser zu feinem Pulver gemahlen. Sämtliche weitere Schritte der Präparation von mikrosomalen Gewebefractionen fanden auf Eis statt.

### Gewinnung der Mikrosomenfraktion

PBS: (phosphate buffered saline)

8g NaCl

1,44g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

0,24g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

pH 7.2 mit HCL einstellen

ad 1L with ddH<sub>2</sub>O

Ca. 1 g gemörsertes Brustdrüsengewebe wurde mit ca. 5 ml PBS in einem handgetriebenen Teflon-Glas-Homogenisator homogenisiert. Anschließend wurden die Homogenate in 5 ml Polystyrolröhrchen überführt und in der Hettichzentrifuge bei 2620 rpm und 800\*g bei 4 °C für 5 Minuten zentrifugiert. Danach erhielt man eine flottierende Fettschicht, eine mit PBS verdünnte Mikrosomenfraktion und ein Pellet aus großen Zelltrümmern und intakten Zellen.

Die Mikrosomenfraktion wurde nochmals bei 100.000\*g und 4 °C für eine Stunde zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das Pellet wurde mit 600 µl PBS vermischt und mit Ultraschall behandelt. Nach drei Pulsen bei 40 - 50 Watt erhielten wir als Produkt eine Mikrosomenfraktion für die Aktivitäts- und Proteinbestimmung.

### Östradiolumsatz: Umwandlung von Östradiol in Östron

#### Ansatz:

400 µl Natriumphosphatpuffer pH 7,7

50 µl Mikrosomenfraktion

50 µl NAD<sup>+</sup>(5mg/ml) frisch

1 µl Estradiol (23 µM), <sup>3</sup>H-markiert

2 Stunden bei 37 °C

Um die Reaktion zu starten wurden 50 µl der Mikrosomenfraktion aus der Gewebeaufbereitung (siehe oben) mit 400 µl Puffer und 1 µl Östradiol ( $2 \cdot 10^{-5}$ M) gemischt. Anschließend wurde 2 Stunden unter Schütteln inkubiert. Mit 100 µl Stopplösung (0,21 M Ascorbinsäure in 1 % Essigsäure in Methanol) wurde die Reaktion gestoppt. Die Extraktion der Steroide erfolgte über RP-18 Cartridges (Phenomenex). Diese RP-18 Cartridges wurden mit 2 ml Methanol und 2 ml Wasser equilibriert. Nach Auftrag des Probenansatzes und Spülen mit 500 µl Wasser wurden die gebundenen Steroide von den Cartridges in Autosamplervials (Zinsser) mit 2 x 100 µl Methanol eluiert. Der Umsatz (% conv.) ließ sich nach einem HPLC-Lauf (Säule Merck, Suprasil, Laufmittel H<sub>2</sub>O:Acetonitril 1:1) ausrechnen aus dem Verhältnis von Edukt (E2) zu Produkt (E1) (1). Dabei wurde der Umsatz von Östradiol (E2) in Östron (E1) mit folgender Formel erfasst:

$$pmol / min = \frac{pmolE_2 * \%_{CONV} * D_{DILUTION}}{100 * Time[min]}$$

% conv = Konversion von Östradiol in Östron

### Proteinbestimmung:

#### Ansatz:

Lösung A bestand aus:

2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>,

0,7 % NaOH,

0,16 % Na<sub>2</sub> Tartrat,

1 % SDS

Lösung B bestand aus:

4 % CuSO<sub>4</sub>

Lösung C bestand aus:

100 Teilen Lösung A und 1 Teil Lösung B

Lösung D bestand aus:

1 : 1 -verdünntem Folin Ciocolteau-Reagenz (Sigma)

Der Proteingehalt der Mikrosomen-Fraktion wurde mit Hilfe der modifizierten Methode nach Louwry gemessen. Zuerst wurde eine verdünnte Standardreihe mit BSA hergestellt. Die Proben wurden so verdünnt, dass deren Proteinkonzentrationen in den Bereich der Standardkurve lagen. Je 250 µl der verdünnten Proben wurden in Reaktionsgefäßen vorgelegt und je 750 µl von Lösung C hinzugefügt. Nun folgte eine 10 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Je 75 µl Lösung D wurde danach hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 45 min.

in Dunkelheit stehen gelassen. Per Photometer wurde die Extinktion bei 660 nm bestimmt.

$E_{660\text{nm}}$  = Optischen Dichte<sub>660nm</sub>

Berechnung:

$$C_{\text{Probe}} = \frac{OD_{\text{probe}} * c_{\text{BSA}}}{OD_{\text{BSA}}} * \text{Verdünnungsfaktor } F$$

OD = Optische Dichte

C/c = Konzentration

F= Verdünnungsfaktor der Probe

#### Isolierung von Gesamt-RNA aus Brustdrüsengewebe:

Zuerst wurden die in Stickstoff gemörserten Gewebeproben mit dem Qiagen RNeasy Kit in RTL-Puffer mit Mercaptomethanol lysiert; dies geschah mit Hilfe eines mechanischen Qiagen Glas Shredders. Von Vorteil war dabei, dass die genomische DNA geschert und die Viskosität des Lysats verringert wurde. Um eine bessere Bindungskapazität zu erzielen fügten wir 70 % Alkohol hinzu. Die Probe wurde dann auf RNeasy Spin Säulen pipettiert und zentrifugiert damit sich die RNA an die Matrix des Säulenmaterials binden konnte, und dann wieder zentrifugiert. Nach dreimaligem Waschen mit RW1 Puffer und RPE Puffer eluierten wir die RNA von der Matrix durch Hinzufügen von RNase-freiem Wasser.

Der RNA-Gehalt wurde photometrisch bei 260nm bestimmt:

$$C_{\text{Probe}} = OD_{\text{Probe}} * 40 \mu\text{g/ml}$$

### Synthese von cDNA aus Gesamt-RNA

Verwendet wurde für die Synthese von cDNA aus Gesamt RNA der T-primed First-Strand Kit der Firma Amersham Pharmazia Biotech:

In 1,5ml Reaktionsgefäßen ist ein lyophilisierter Reaktionsmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP, FPLCpure, Murine Reverse Transkriptase, RNA guard – RNase Inhibitor, RNase-Free BSA und Not I-d(T)18 Primer) vorgelegt.

1,2 - 4 µg Gesamt-RNA füllten wir auf 33 µl mit RNase-freiem Wasser auf. Diese Lösung pipettierten wir in ein Mikrozentrifugen-Gefäß und erhitzen auf 65 °C für 5 Minuten. Anschließend transferierten wir die RNA-haltige Lösung in ein 37 °C Bad und inkubierten sie nochmals für 5 Minuten. Gleichzeitig erwärmten wir den First-Strand-Reaktionsmix auf 37 °C für 5 Minuten. Dann gaben wir die RNA-Lösung zu dem Reaktionsmix ohne beides zu vermischen. Wiederum erwärmten wir die Probe auf 37 °C für 5 Minuten. Nun wurde durch vorsichtiges Vortexen gemischt und kurz zentrifugiert. Danach wurde für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Für die PCR Analysen verdünnten wir die Proben mit Wasser je auf ca. 40 ng / µl.



### 3 Ergebnisse

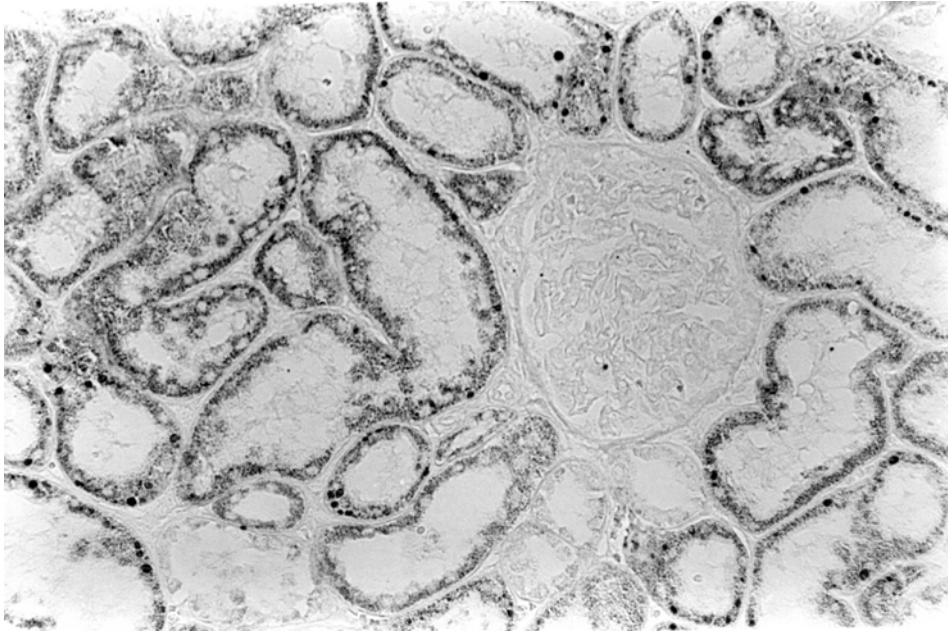
#### 3.1 Immunhistochemie für 17 $\beta$ -HSD 4 (Abb. 4-17)

##### Auswertung:

Um mittels der Methode der Immunhistochemie im Brustdrüsenepithel 17 $\beta$ -HSD 4 anzufärben haben uns Dr. Möller, Dr. Kremmer und Dr. Adamski vom Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit (München) freundlicherweise zwei verschiedene Antikörper zur Verfügung gestellt (2C7 und 2E9, siehe auch unter Material und Methoden). Eine zytoplasmatische, feingranuläre Anfärbung von Drüsenepithelzellen war mit beiden Antikörpern deutlich erkennbar. Die Färbeintensität der Epithelzellen variierte, aber die Brustdrüsenepithelzellen oder Nierenepithelzellen (Positivkontrolle, Abb.3) setzten sich stets deutlich von anderen nicht gefärbten Zellen (Fettzellen und anderen Stromazellen) ab. Die Anfärbung von Tubuloalveoli und Gängen wurde auf einer Skala von negativ bis 3+ semiquantitativ ausgewertet. Negativ bedeutet keine Anfärbung, 1+ bedeutet schwache Anfärbung, 2+ moderate Anfärbung und 3+ starke Anfärbung.

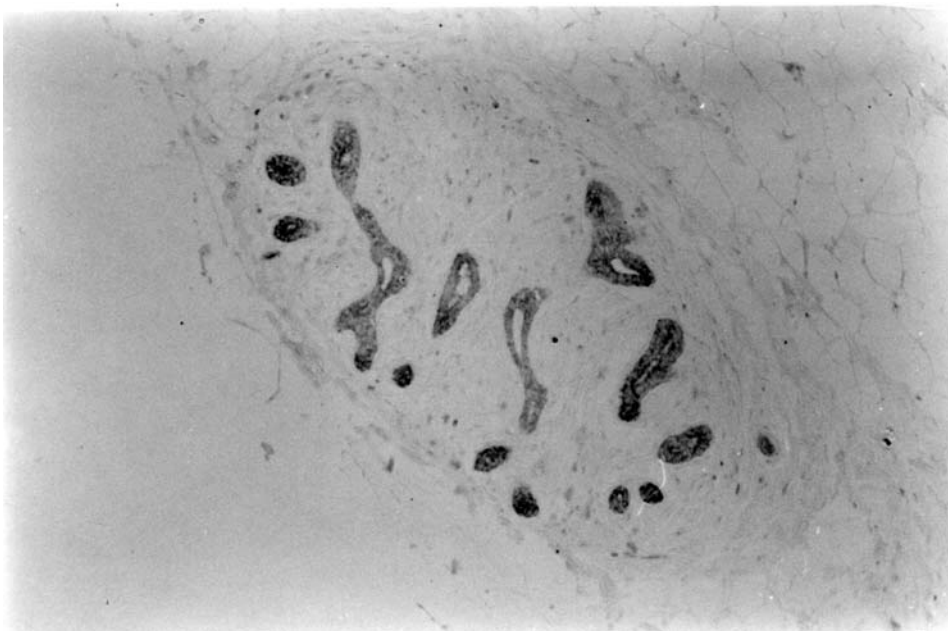
Quantitative Aussagen zur Anzahl einzelner gefärbter Drüsenepithelzellen kann man generell nicht machen, da sich einzelne Zellen oft nicht klar hervorheben, sondern meist das Bild einer gesamten Brustdrüsenepithelanfärbung entsteht. In ganz vereinzelt Schnitten blieb das Gewebe – aus nicht bekannten, vermutlich technisch bedingten Gründen – ungefärbt. Von mehreren Patientinnen wurden je zwei Proben aus unterschiedlichen Brustlokalisationen ausgewählt, um einen Eindruck von der Variabilität der Proben der Individuen zu erhalten (Beispiel: Probe 30/98-6 siehe Abb. 11 und Probe 30/98-11). Es zeigten sich dabei keine Färbeunterschiede.

Stärkere Farbkontraste zeigten sich bei dem Antikörper 2E9 (Abb. 6, 7, 8, 9, 14, 15, 26, 17) als bei dem Antikörper 2C7 (Abb. 4, 5, 10, 11, 12, 13). 2E9 färbte die Drüsenläppchen intensiver an, dafür färbte sich aber manchmal auch der Hintergrund mit an. Im Zytoplasma der Brustdrüsenepithelzellen zeigte sich bei beiden Antikörpern eine granuläre Färbung. Die Zellkerne färbten sich nicht. Bei manchen Präparaten gewinnt man aufgrund der Anfärbung basal im Epithel gelegener Zellen den Eindruck, dass auch Myoepithelzellen Antikörper banden (Abb. 13). Dies konnte in interlobulären Gängen deutlicher beobachtet werden (Abb. 6). Bindegewebszellen sowie Fettgewebszellen färbten sich entweder gar nicht oder nur sehr schwach an. Vereinzelt im Bindegewebe liegende Zellen waren positiv. Es könnte sich dabei um Makrophagen handeln. Alveolarmakrophagen konnten z.B. in Lungenpräparaten eindeutig als 17 $\beta$ -HSD 4 positiv nachgewiesen werden (hier nicht gezeigt). Das Mengenverhältnis Bindegewebe/Fettgewebe/Drüsengewebe war bei jeder Patientin sehr unterschiedlich ausgeprägt. In vielen Läppchen färbten sich die Tubuloalveoli etwas stärker an als die intralobulären Ductuli (Abb. 4, z.T. Abb. 10, Abb. 12, 13, 15). Extralobuläre Gänge entsprachen hinsichtlich der Färbeintensität denen der Ductuli in den Läppchen oder waren oft geringfügig schwächer gefärbt. Nur in wenigen Präparaten waren die interlobulären Gänge stärker als die intralobulären Ductuli angefärbt (siehe Tabelle 1 und 2). Es konnten leichte Tendenzen im Färbeverhalten der Schnitte hinsichtlich des Menstruationszyklus und der Einnahme oraler Kontrazeptiva festgestellt werden. Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen von 17 $\beta$ -HSD 4 mit den Antikörpern 2C7 und 2E9 sind in Tabelle 1 und 2 wiedergegeben und einige Präparate sind beispielhaft abgebildet.



*Abb. 3: Positivkontrolle für 17 $\beta$ -HSD 4; Niere Mensch; Antikörper 2E9; das gleiche Erscheinungsbild erhält man mit Antikörper 2C7; erkannt werden die Epithelzellen der distalen Tubuli*

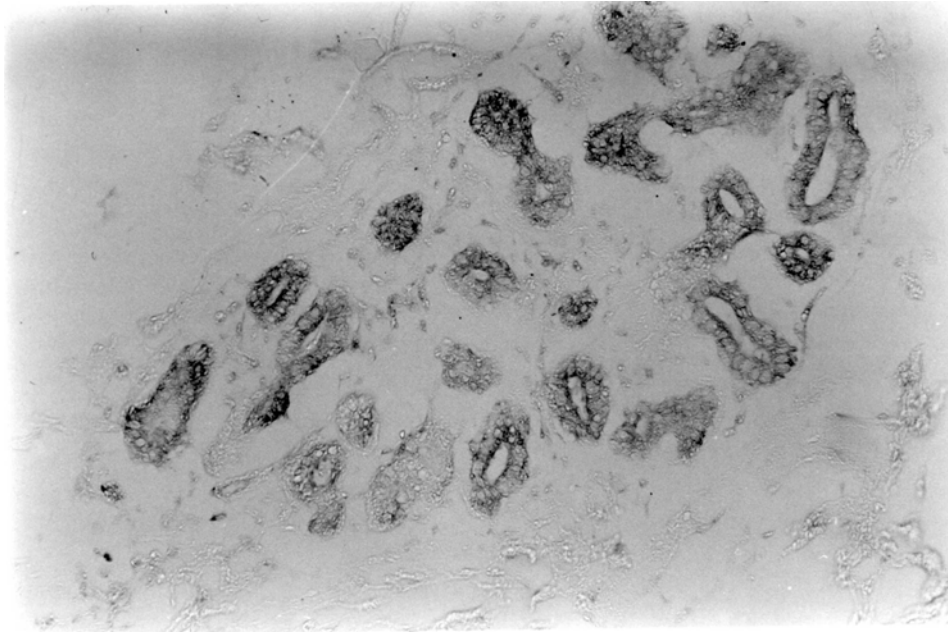
*Verg. 200-fach*



*Abb. 4: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 99/97-7); folliculäre Phase; Antikörper 2C7*

*Unterschiedlich intensive Anfärbung der einzelnen Ausschnitte der Tubuloalveoli, intralobuläre Ductuli schwach gefärbt*

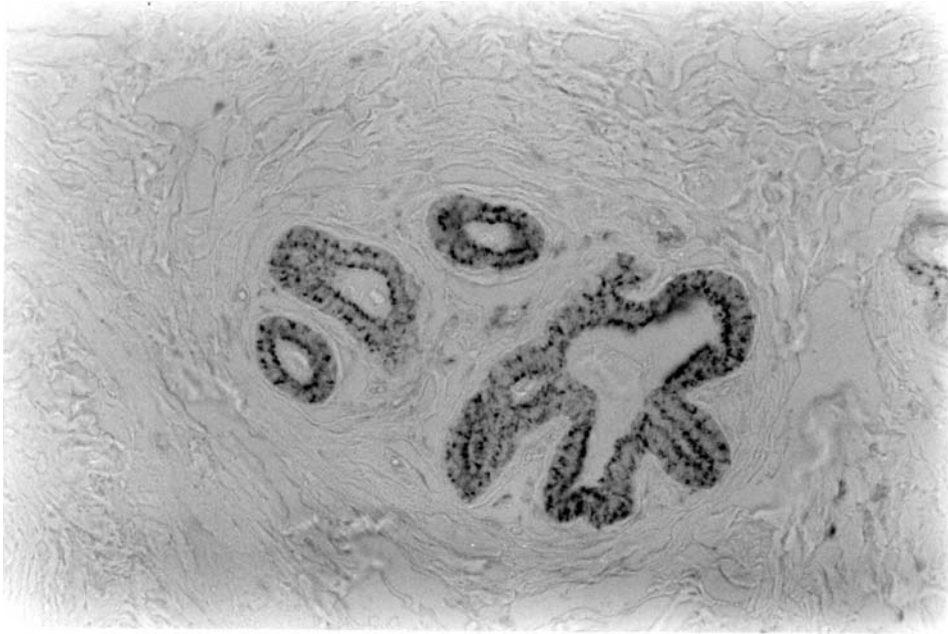
*Vergr. 100-fach*



*Abb. 5: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 23/98-4); folliculäre Phase, Antikörper 2C7, unterschiedliche Anfärbung der Tubuloalveoli  
Vergr. 200-fach*

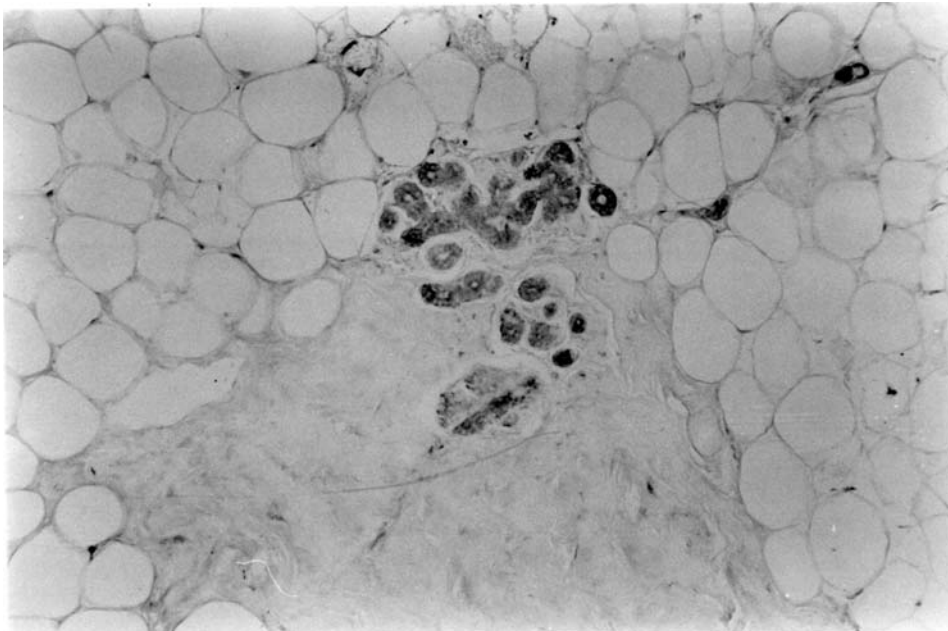


*Abb. 6: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 109/99-7), Milchgang;  
folliculäre Phase;  
Antikörper 2E9, Anfärbung stark basal im Epithel – Myoepithelzellen wahrscheinlich mit dargestellt  
Vergr. 100-fach*



*Abb. 7: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 21/98-14); folliculäre Phase; Antikörper 2E9, recht gleichmäßiges, apikal betontes Färbemuster, etwas schwächere Anfärbung der Epithelbasis*

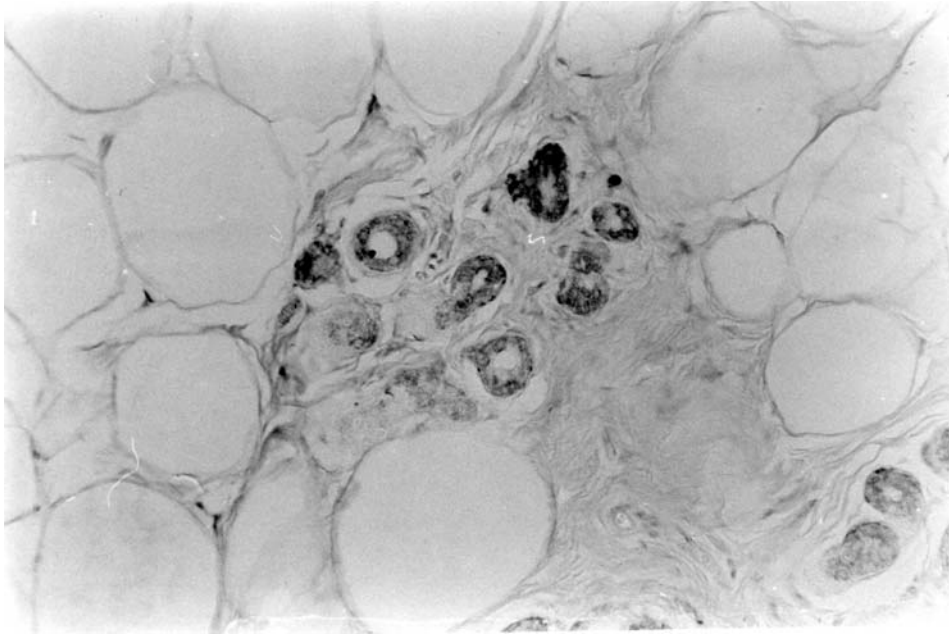
*Vergr. 200-fach*



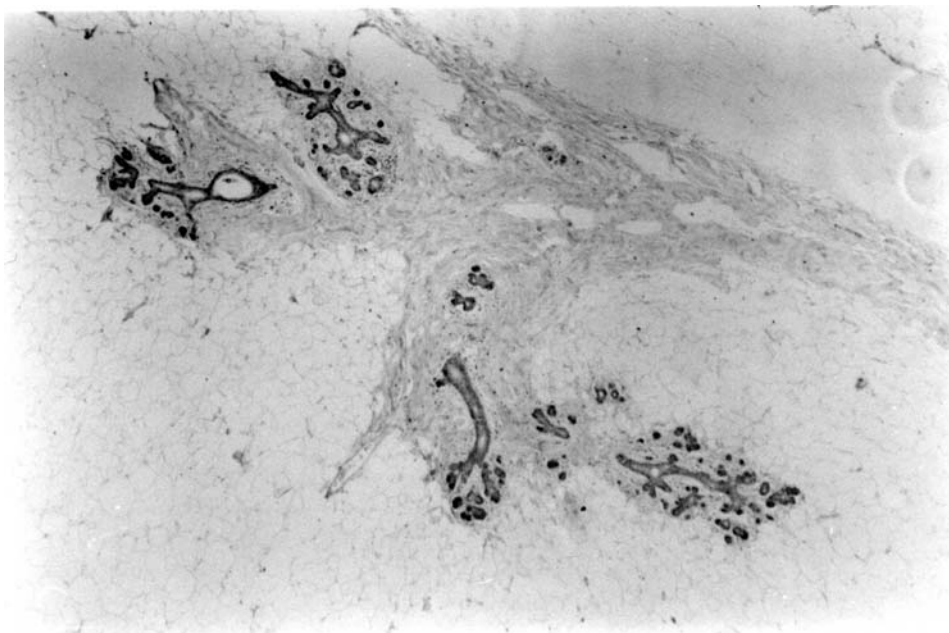
*Abb. 8: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 134/98-3); folliculäre Phase; Antikörper 2E9, unterschiedliche Anfärbung der Tubuloalveoli, schwächere Färbung der intralobulären*

*Ductuli*

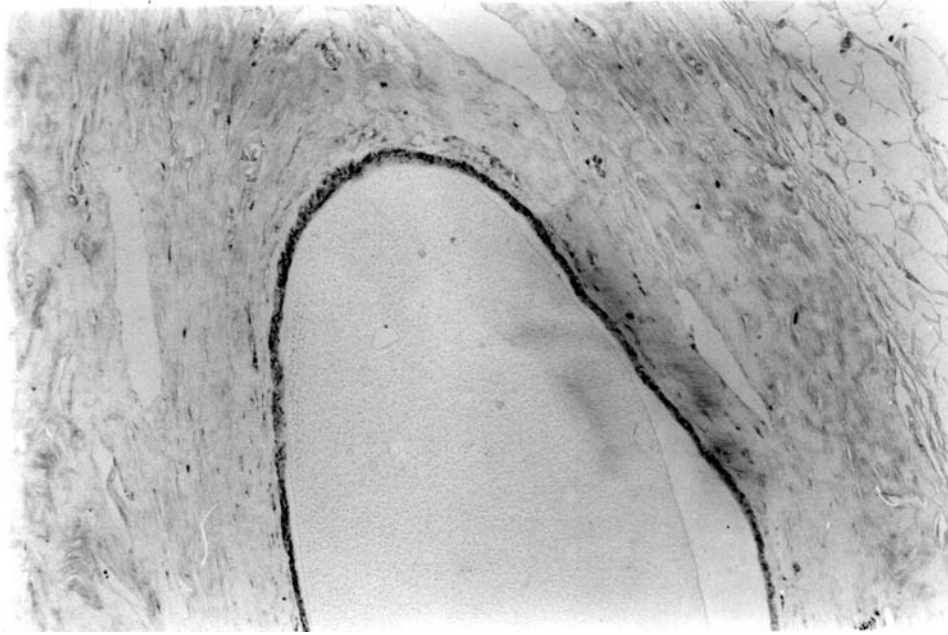
*Vergr. 100-fach*



*Abb. 9: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 105/97-3); folliculäre Phase; Antikörper 2E9. Heterogene Anfärbung der Tubuloalveoli und Ductuli*  
*Vergr. 200-fach*

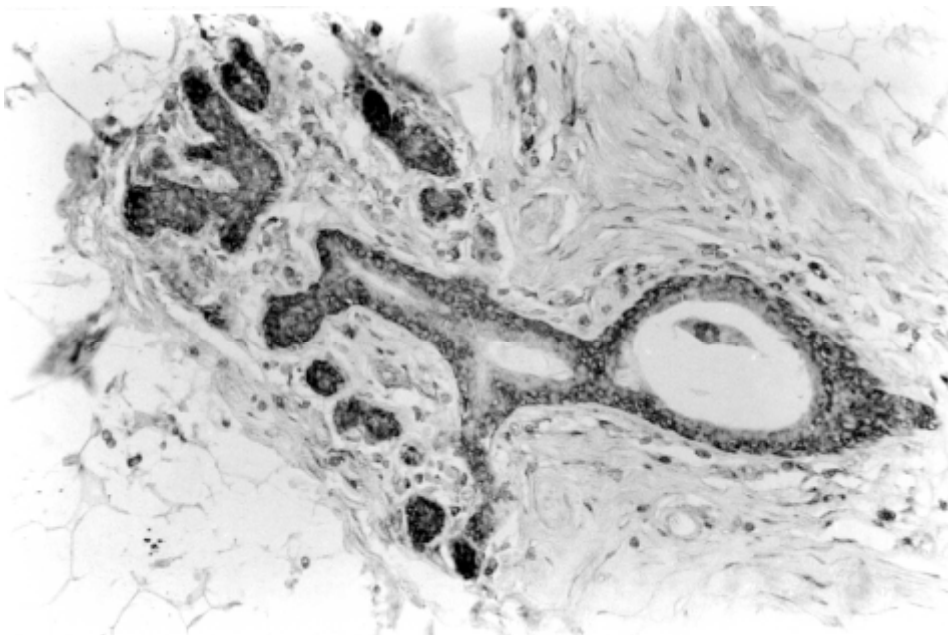


*Abb. 10: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 98/97-3); luteale Phase; Antikörper 2C7. Deutlich erkennbar ist die meist schwächere Anfärbung der intralobulären Ductuli im Vergleich mit den Tubuloalveoli*  
*Vergr. 40-fach*



*Abb. 11: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 30/98-6), Milchgang mit deutlicher, positiver Reaktion; luteale Phase; Antikörper 2C7*

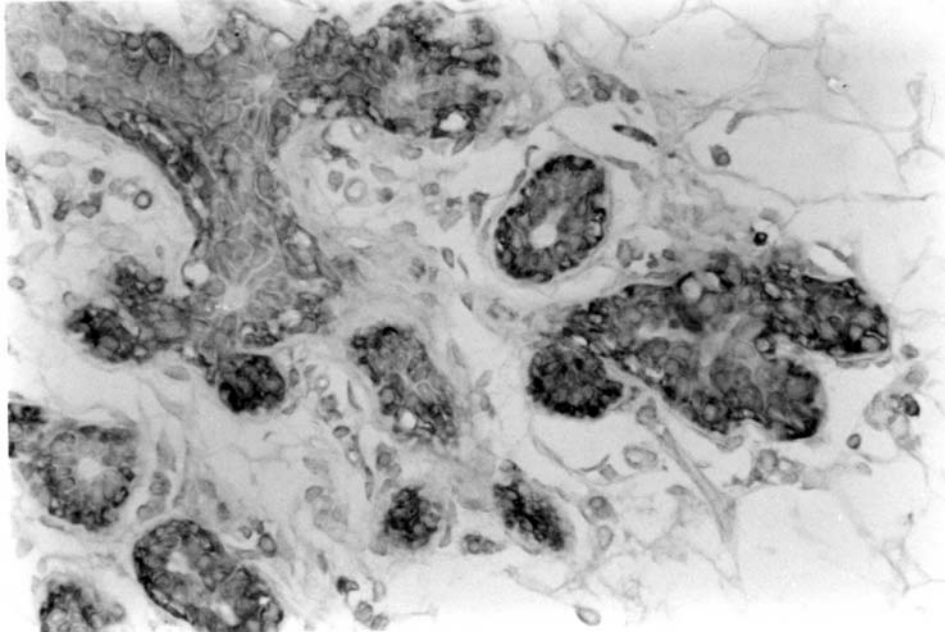
*Vergr. 100-fach*



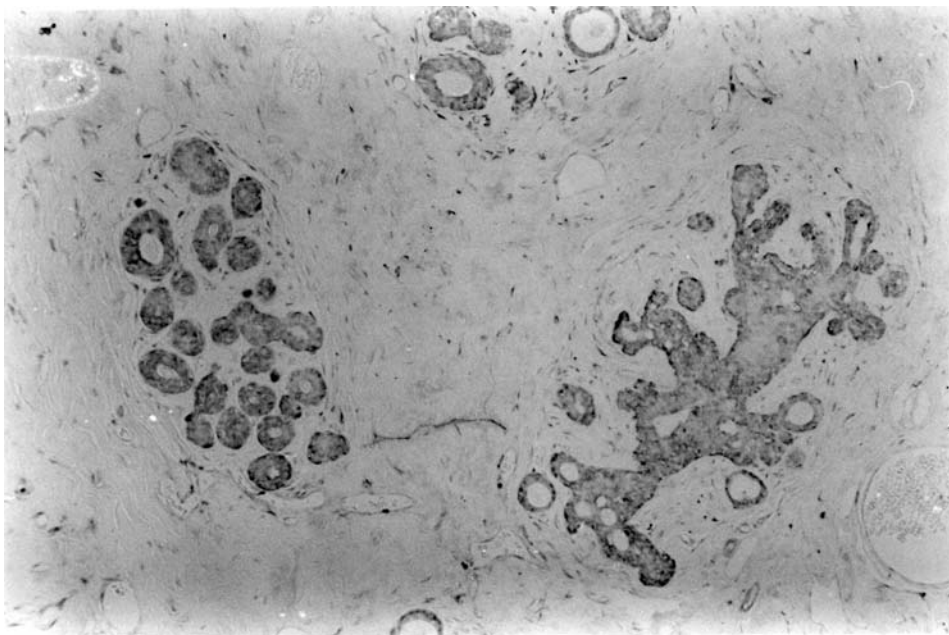
*Abb. 12: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 32/98-4); luteale Phase.*

*Intra- und extralobulärer Gang sind etwas schwächer als die Tubuloalveoli gefärbt, Antikörper 2C7*

*Vergr. 200-fach*

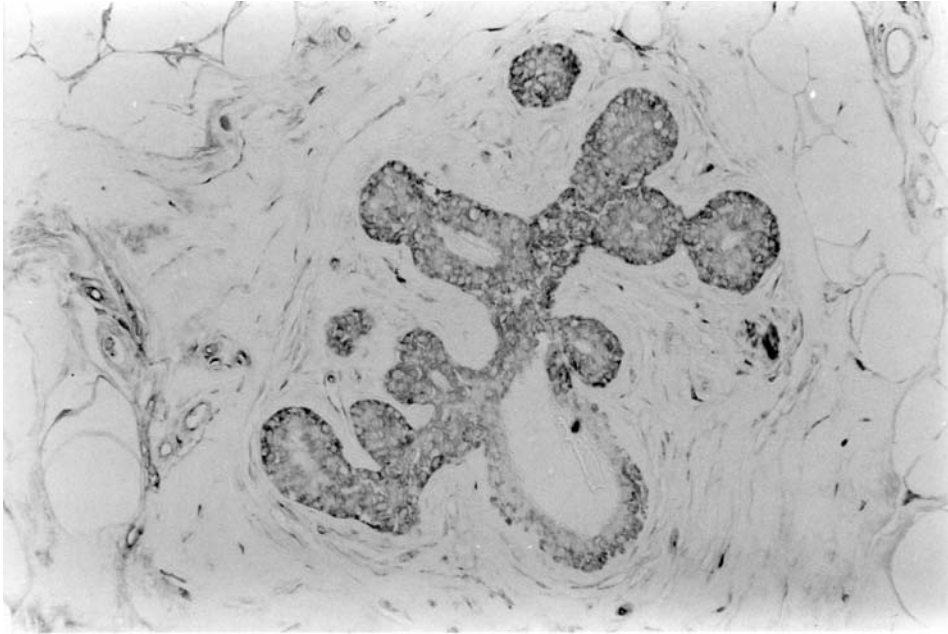


*Abb. 13: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 33/98-2); luteale Phase;  
Antikörper 2C7. Die Reaktion ist hier schwerpunktmäßig basal im Epithel und betrifft wahrscheinlich auch  
Myoepithelzellen  
Vergr. 400-fach*

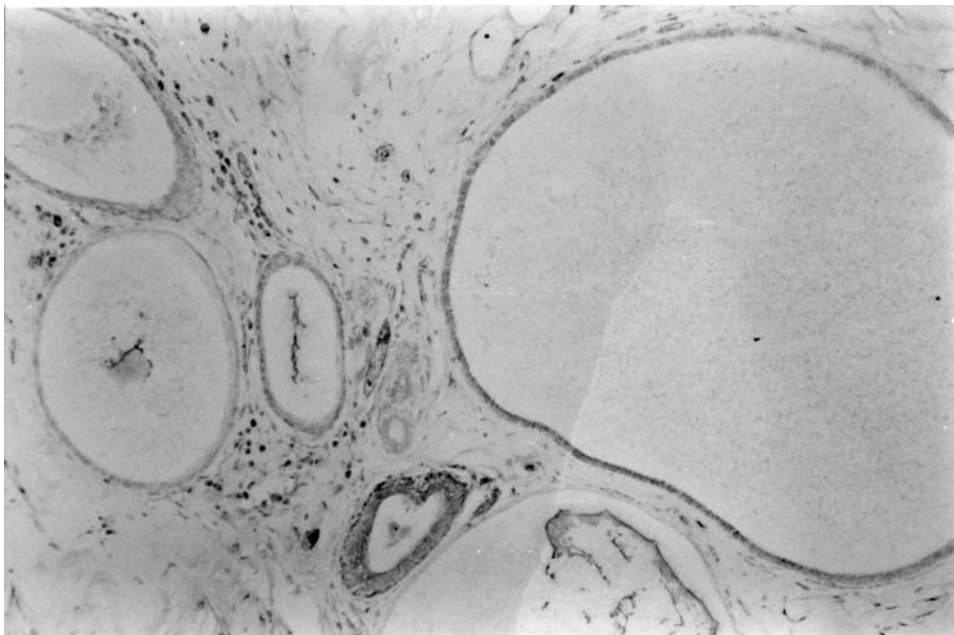


*Abb. 14: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 13/98-1); luteale Phase;  
Antikörper 2E9. Oft basal betonte Epithelreaktion, Gänge reagieren schwächer als Tubuloalveoli  
Vergr. 100-fach*

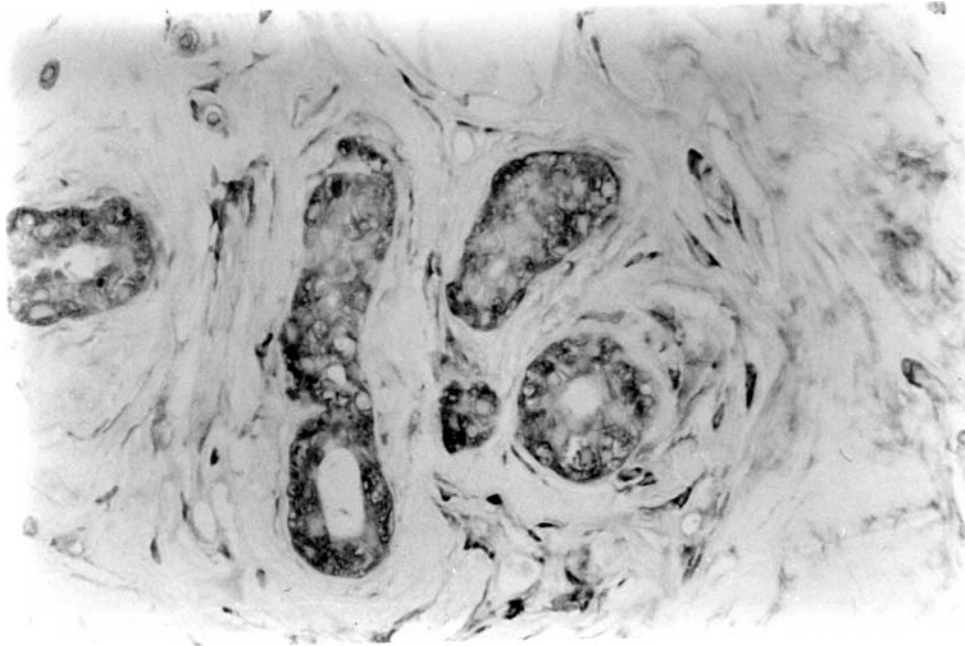




*Abb. 15: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 28/98-6); luteale Phase;  
Antikörper 2E9. Reaktion des Epithels ist basal betont  
Vergr. 200-fach*



*Abb. 16: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD 4; Brustdrüse Mensch (Probe 29/98-2); luteale Phase;  
Antikörper 2E9. Schwache oder fehlende Reaktion in den größeren extralobulären Gangstrukturen  
Vergr. 100-fach*



*Abb. 17: Immunhistochemischer Nachweis der 17 $\beta$ -HSD; Brustdrüse Mensch (Probe 51/98-6); luteale Phase; Antikörper 2E9. Recht heterogenes Färbemuster. Hier reagieren auch Bindegewebszellen positiv  
Vergr. 400-fach*

Es folgt eine tabellarische Auswertung der Immunhistochemie mit den zwei Antikörpern (2C7 und 2E9) für 17 $\beta$ -HSD 4. Berücksichtigt wurde das Färbeverhalten innerhalb der Drüsenläppchen sowie in extralobulären Drüsengängen. Differenziert wurde folgendermaßen:

- + → schwache Anfärbung
- ++ → mittelstarke Anfärbung
- +++ → starke Anfärbung
- negativ → keine Anfärbung
- kein Gang → kein Drüsengang im Schnitt getroffen
- p → Pilleneinnahme

Ergebnisse finden sich in Tabelle 1 und 2.

Tabelle 1: Immunhistochemische Ergebnisse mit den Antikörpern 2E9 und 2C7 von 17 $\beta$ -HSD

## 4 in der folliculären Phase

Antikörper 2C7 folliculäre Phase			Antikörper 2E9 folliculäre Phase		
Probe	Tubuloalveoli	Extralobuläre Gänge	Probe	Tubuloalveoli	Extralobuläre Gänge
95/97-3	p +++	+++	95/97-3	++	++
99/97-5	+++	kein Gang			
99/97-7	+	+	99/97-7	+	kein Gang
102/97-1	+	kein Gang	102/97-1	++	kein Gang
105/97-1	p +	kein Gang			
105/97-3	p +	kein Gang	105/97-3	+++	++
106/97-3	+	+	106/97-3	+	kein Gang
14/98-8	p +++	kein Gang	14/98-8	++	kein Gang
16/98-2	p ++	kein Gang	16/98-2	++	kein Gang
21/98-14	+	+	21/98-14	+++	kein Gang
23/98-4	p ++	kein Gang	23/98-4	+++	kein Gang
24/98-6	p +++	++	24/98-6	+++	++
101/98-1	+	+	101/98-1	+	+
102/98-1	+	+	102/98-1	++	++
131/98-1	++	++	131/98-1	++	+
134/98-3	+	kein Gang	134/98-3	++	++
15/99-9	+	kein Gang	15/99-9	+	kein Gang
18/99-1	+++	+++	18/99	+	kein Gang
31/99-5	p +++	kein Gang	31/99-5	++	kein Gang
44/99-3	+	kein Gang	44/99-3	++	++
98/99-2	+	+	98/99-2	++	++
99/99	p negativ	negativ	99/99-2	negativ	negativ
100/99-5	+++	kein Gang	100/99-5	+	+
109/99-7	p ++	++	109/99-7	+++	+++
145/99-6	+++	+++	145/99-6	+++	+++

Tabelle 2: Immunhistochemische Ergebnisse mit den Antikörpern 2E9 und 2C7 von 17 $\beta$ -HSD

## 4 in der lutealen Phase

Antikörper 2 C7 luteale Phase			Antikörper 2 E9 luteale Phase		
Probe	Tubuloalveoli	Extralobuläre Gänge	Probe	Tubuloalveoli	Extralobuläre Gänge
85/97-3	negativ	negativ	85/97-3	negativ	negativ
98/97-3	+++	++	98/97-3	+++	++
13/98	p +++	kein Gang	13/98	+++	++
22/98-4	++	++	22/98-4	negativ	negativ
27/98-2	negativ	negativ	27/98-2	negativ	++
28/98-1	negativ	+	28/98-6	+++	negativ
29/98-1	++	++	29/98-2	+++	negativ
30/98-6	+++	++	30/98-6	+++	+++
30/98-11	+++	+++			
32/98-4	+++	+++	32/98-4	++	++
33/98-2	+++	++	33/98-7	+++	++
51/98-6	+++	+++	51/98-6	++	++
88/98-4	negativ	negativ	88/98-3	negativ	negativ
100/98-3	+	negativ	100/98	+	negativ
1/99-3	++	++	1/99-3	negativ	negativ
2/99-4	p ++	++	2/99-4	++	++
16/99-1	+++	+++	16/99-1	+++	+++
36/99-3	p +	kein Gang	36/99-3	negativ	negativ
38/99-3	p +	+	38/99-3	+	+
41/99-1	p negativ	negativ	41/99-3	negativ	negativ
43/99-3	+++	negativ	43/99-3	+++	++
46/99-1	+++	negativ	46/99-1	++	negativ
47/99-2	++	negativ	47/99-1	+	negativ
49/99-1	++	negativ	49/99-1	++	++
66/99-7	negativ	negativ	66/99-7	++	negativ

*Kommentierung der Tabellen 1 und 2*

Für die immunhistochemischen Versuche der 17 $\beta$ -HSD 4 verglichen wir Gewebe von 47 prämenopausalen Frauen, davon 23 in der folliculären Phase und 24 in der lutealen Phase. In der folliculären Phase nahmen 9 von den 23 Frauen die Pille ein, in der lutealen Phase 5 von den 24 Frauen. Von drei Patientinnen wurden je zwei Proben aus unterschiedlichen Brustlokalisationen ausgewählt. Jede Probe wurde mit zwei Antikörpern gegen 17 $\beta$ -HSD 4 (2E9 und 2C7) untersucht. Tabelle 1 zeigt die Ergebnisse für die Proben der folliculären Phase, Tabelle 2 für die Proben der lutealen Phase.

17 $\beta$ -HSD 4 wurde immunhistochemisch bei 42 Patientinnen sowohl in der folliculären als auch in der lutealen Phase nachgewiesen. Es wurde in den Gängen und auch in den Tubuloalveoli im normalen Brustdrüsenepithel nachgewiesen. Auch bei Patientinnen unter oraler Kontrazeption zeigte sich eine positive Färbung bei beiden Antikörpern in jeder Zyklusphase. Zwar wurde eine statistische Auswertung nicht durchgeführt, tendenziell zeigte sich jedoch eine intensivere Anfärbung der 17 $\beta$ -HSD 4 in der folliculären Phase bei beiden Antikörpern. Extralobuläre Gänge und Tubuloalveoli zeigten die gleiche Färbeintensität in beiden Phasen mit beiden Antikörpern. Auffällig war aber, dass sich die Tubuloalveoli der Brustdrüsenepithelzellen in der folliculären Phase stärker bei den Frauen anfärbten, die hormonell verhüteten, und in der lutealen Phase färbten sich die Zellen der Frauen stärker an, die natürliche ovarielle Zyklen hatten.

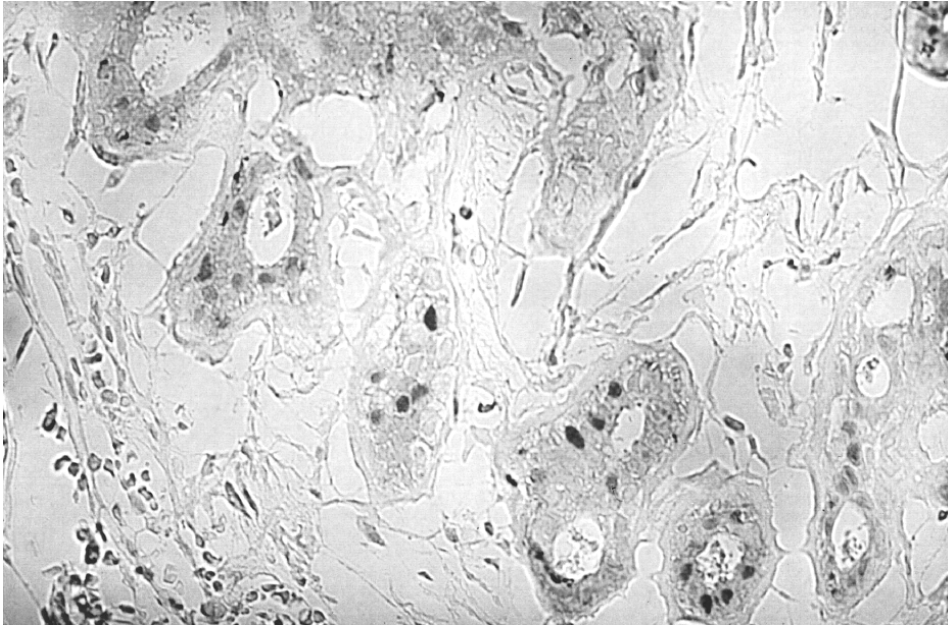
### 3.2 Immunhistochemie für Östrogen- und Progesteronrezeptoren

#### Auswertung:

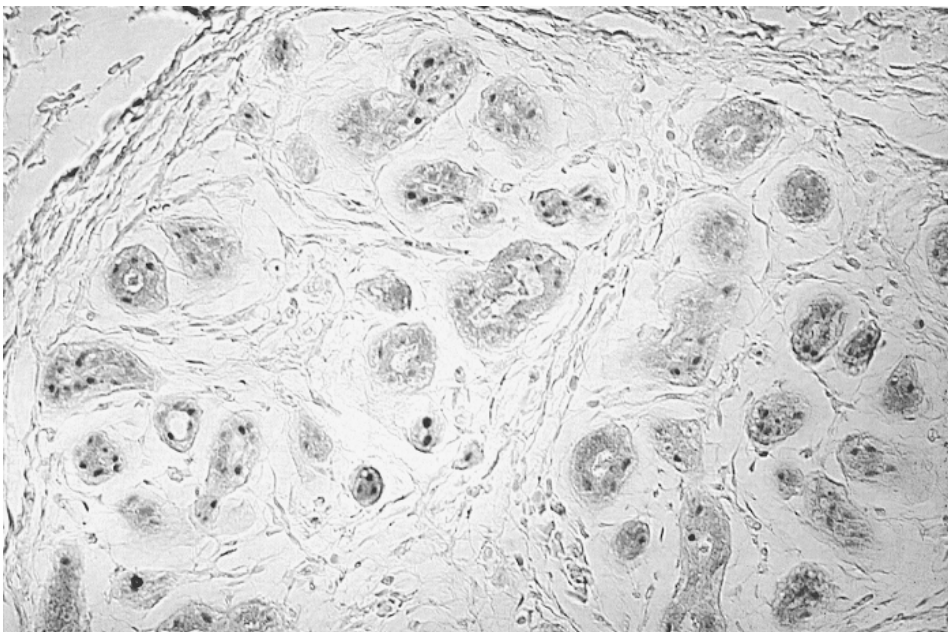
Die Präparate der Brustgewebe von 47 Frauen (63 Schnitte) wurden in Bezug auf das Auftreten von Östrogen- und Progesteronrezeptoren untersucht (von 16 Patientinnen wurden die Schnitte für beide, Östrogen- und Progesteronrezeptorfärbungen, verwendet). Je Probandin wurden 1200 bis 1500 Brustdrüsenepithelzellen ausgezählt, und dabei beurteilt, ob ihre Zellkerne gefärbt waren, oder nicht. Durchschnittlich färbten sich 4-7 % der Zellkerne positiv an. Dies galt für den Östrogenrezeptorantikörper als auch für den Progesteronrezeptorantikörper. Hauptsächlich die Zellkerne von Brustdrüsenepithelzellen färbten sich. Fettzellen, Stromazellen und Myoepithelzellen blieben frei. Zur statistischen Auswertung wurde der Wilcoxon-Rangsummen Test für unpaarige Proben verwendet.

Bei der immunhistochemischen Färbung von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in Schnitten der normalen menschlichen Brustdrüse stellte sich eine beträchtliche Heterogenität der Färbeintensität dar. Sie variierte von Patientin zu Patientin und, bei Beurteilung mehrerer Schnitte einer Patientin, auch von Lokalisation zu Lokalisation. In einzelnen Schnitten zeigten die Läppchen eine eher locker gesprenkelte Färbung, die darauf beruhte, dass nur eine oder zwei Zellen in einem Tubuloalveolus positiv waren. Die immunreaktiven Östrogen- und Progesteronrezeptoren waren offensichtlich diffus im Zellkern lokalisiert. Nur ein kleiner Teil der Zellen war positiv gefärbt, im Durchschnitt zwischen 4 und 7 % aller Epithelzellen. Die statistischen Auswertungen mit dem Wilcoxon Rangsummentest für unpaarige Stichproben ergab keine Signifikanzen, aber es zeigten sich folgende Tendenzen: Die Anzahl an Progesteron- und Östrogenrezeptoren war jeweils höher in der folliculären als in der lutealen

Phase ( $p=0,268$  und  $p=0,980$ ; Patientinnen mit und ohne Pilleneinnahme zusammengefasst). Hinsichtlich Antikonception zeigen sich folgende Tendenzen: Östrogen- sowie Progesteronrezeptoren waren unter oraler Kontrazeption niedriger exprimiert als ohne Kontrazeption (in der lutealen Phase  $p=0,271$  und  $p=0,374$ ) sowie in der folliculären Phase ( $p=0,675$  und  $0,378$ ). Die Ergebnisse der immunhistochemischen Färbungen sind als Abbildungen 18 und 19, tabellarisch in Tabelle 3 und 4, sowie graphisch in Abb. 20 und 21 wiedergegeben.



*Abb. 18: Immunhistochemischer Nachweis von Östrogenrezeptoren; Brustdrüse Mensch (Probe 95/97-7);  
follikuläre Phase; Antikörper M7047. Deutliche Anfärbung der Epithelzellen  
Vergr. 400-fach*



*Abb. 19: Immunhistochemischer Nachweis der Progesteronrezeptoren Brustdrüse Mensch (Probe 24/98-6);  
follikuläre Phase; Antikörper M3529. Deutliche Anfärbung der Epithelzellen  
Vergr. 20-fach*

*Tabelle 3: Prozentualer Anteil an östrogenrezeptor-positiver Epithelzellen in der folliculären und lutealen Phase (positiv in % bedeutet: Zahl der positiven Epithelzellen in %)*

Antikörper gegen Östrogenrezeptoren			Antikörper gegen Östrogenrezeptoren		
Follikuläre Phase		p= Pilleneinnahme	Luteale Phase		
Probe	Positiv in %		Probe	Positiv in %	
95/97-7	9.5	p	100/97-3	9.0	p
102/97-5	4.1		13/98	<1	p
14/98-1	<1	p	22/98-4	5.8	
21/98-11	3.1		27/98-2	1.0	
24/98-6	6.7	p	30/98-11	8.9	
27/98-2	1.0		51/98-6	<1	
101/98-1	4.9	p	88/98-3	3.6	
102/98-1	17.8		100/98-1	5.8	
131/98-1	7.9		2/99-4	5.3	p
15/99-9	5.0		16/99-1	5.8	
18/99-1	13.0		38/99-3	<1	p
31/99-5	<1.0	p	41/99-3	6.8	p
44/99-3	4.0		43/99-3	11.1	
			66/99-7	9.4	

*Tabelle 4: Prozentualer Anteil an progesteronrezeptor-positiver Epithelzellen in der folliculären und lutealen Phase*

Antikörper gegen Progesteronrezeptoren			Antikörper gegen Progesteronrezeptoren		
Follikuläre Phase		p= Pilleneinnahme	Luteale Phase		
Probe	Positiv in %		Probe	Positiv in %	
95/97-7	7.9	p	98/97-3	7.1	
96/97-2	15.6		100/97-3	6.9	p
99/97-7	9.5		13/98	<1	p
102/97-5	<1		22/98-4	6.1	
105/97-3	6.9	p	28/98-2	18.4	
14/98-8	<1	p	30/98-11	<1	
16/98-2	8.8	p	33/98-6	<1	
21/98-11	4.0		51/98-6	<1	
23/98-5	4.5	p	88/98-3	7.2	
24/98-6	12.6	p	100/98-1	7.4	
85/98-2	<1		1/99-3	9.3	
101/98-2	6.1	p	16/99-1	5.2	
102/98-1	12.2		36/99-3	2.8	p
131/98-1	10.3		38/99-3	1.8	p
134/98-3	9.5		43/99-3	10.8	
18/99-1	12.1		46/99-1	5.5	
31/99-5	4.6	p	47/99-2	17.2	p
44/99-3	12.6		49/99-4	5.0	p



Abb. 20: Prozentualer Anteil an östrogenrezeptor-positiver Epithelzellen in der folliculären und lutealen Phase

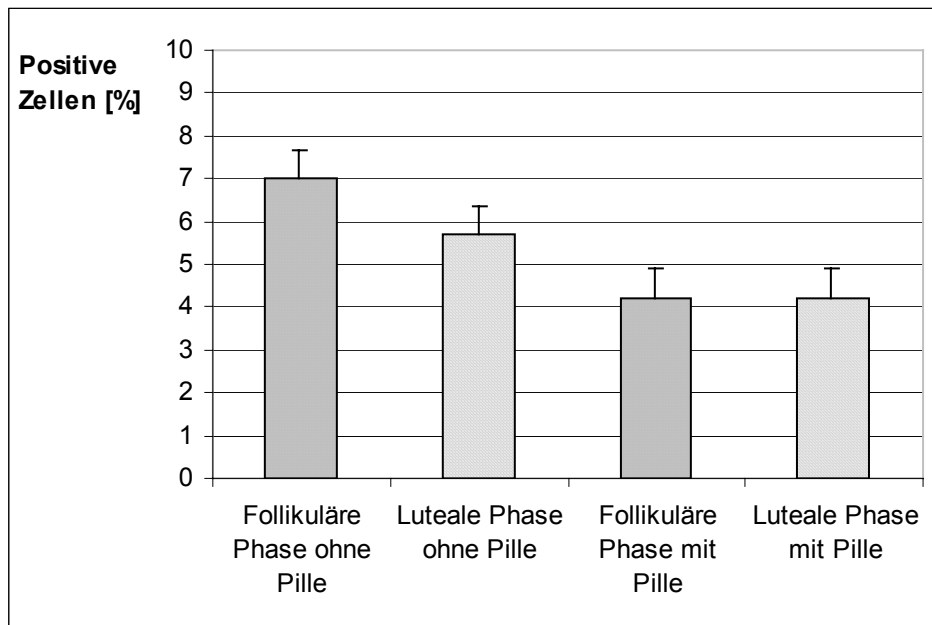
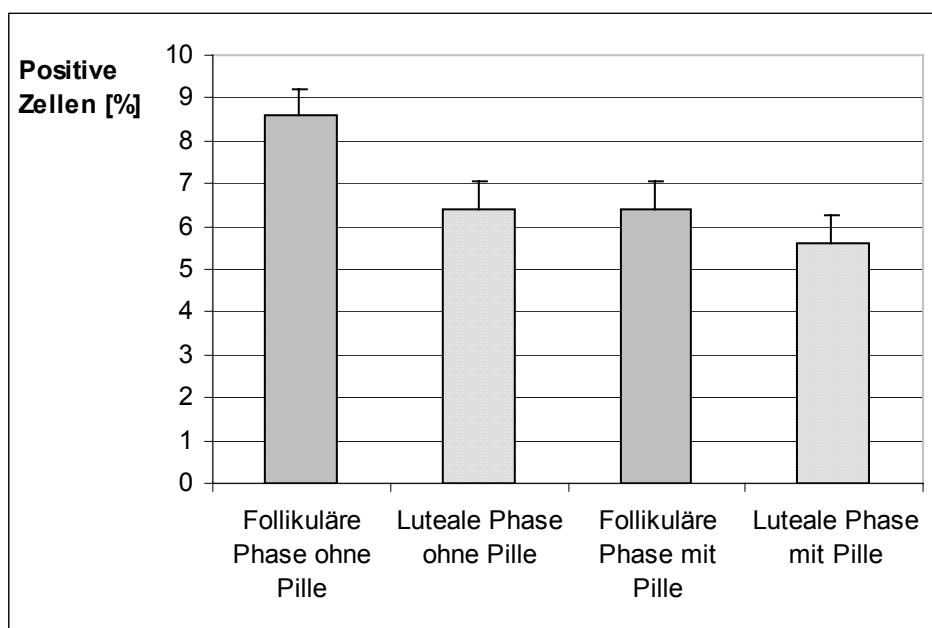
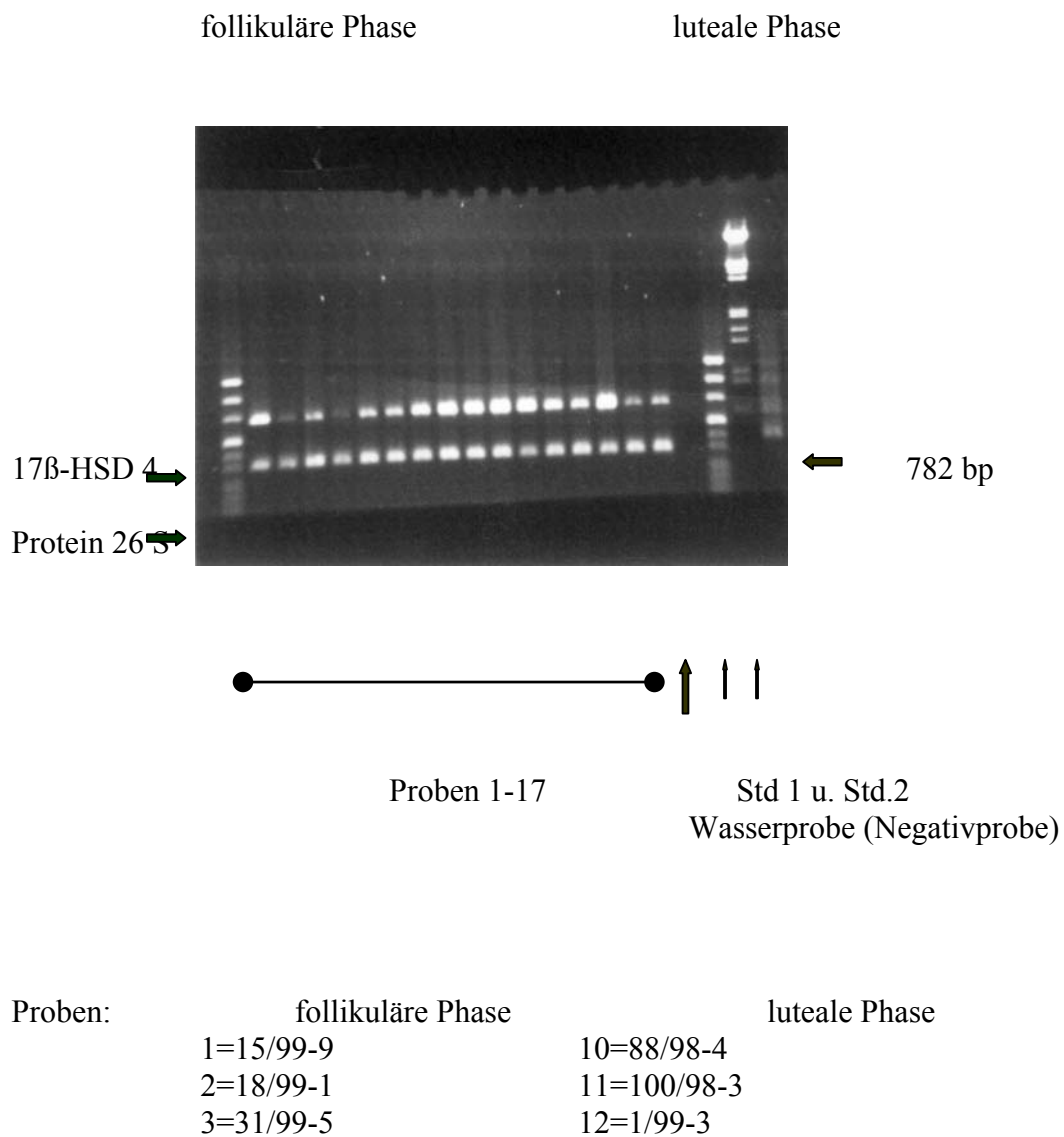


Abb. 21: Prozentualer Anteil an progesteronrezeptor-positiver Epithelzellen in der folliculären und lutealen Phase



3.3 Nachweis von 17 $\beta$ -HSD 4 cDNA mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) in weiblichem Brustdrüsengewebe (Abb.22)

Abb. 22: PCR-Produkte der 17 $\beta$ -HSD 4 amplifiziert aus cDNA von Brustdrüsenepithelzellen



4=44/99-3	13=2/99-4
5=98/99-2	14=16/99-1
6=99/99-1	15=36/99-3
7=100/99-5	16=41/99-1
8=109/99-7	17=43/99-3
9=145/99-6	

In Abb. 22 ist die PCR-Amplifikation der 17- $\beta$  HSD 4 sowie des 26S-Proteins aus cDNA von menschlichen Brustgeweben zu sehen. Dieses Experiment sollte die Expression der 17 $\beta$ -HSD 4 im Brustgewebe wiedergeben. Untersucht wurden hier insgesamt 17 Gewebe, 9 der folliculären, 8 der lutealen Phase. Die untere Reihe zeigt die PCR-Produkte des humanen 26S-Protein, auf welche die 17 $\beta$ -HSD 4 Produkte je Patient normiert wird. Die Wasserproben (Negativkontrollen) zeigen keine Signale. Die ersten neun aufgetragenen PCR-Produkte sind Proben der folliculären Phase. Proben 10-17 sind Proben der lutealen Phase. In den unten (Abb. 23) gezeigten Graphiken sind die Proben ihrer Menge an 17 $\beta$ -HSD 4 nach geordnet worden.

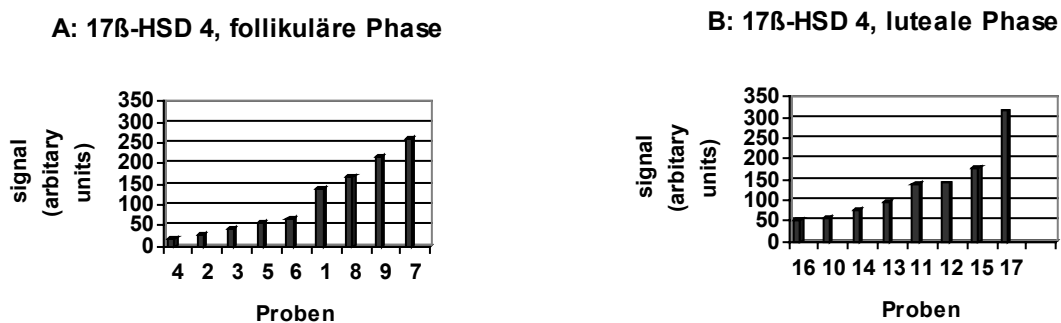


Abb. 23: PCR der 17 $\beta$ -HSD 4; Signalstärke in der folliculären Phase (A) und in der lutealen Phase (B)

*(Signal des 17 $\beta$ -HSD 4-PCR-Produkts wurde normiert auf das Signal des PCR-Produkts des housekeeping genes S26 Protein)*

17 $\beta$ -HSD 4 ist ein Enzym, welches also im Brustdrüsengewebe exprimiert ist: Es zeigte sich in allen 17 Patientenproben mit unterschiedlicher Menge. Zyklusabhängige Schwankungen für die 17 $\beta$ -HSD 4 konnten mittels PCR nicht nachgewiesen werden, wie der Vergleich von Abb. 23 A und B zeigt.

### 3.4 Ergebnis der Enzymaktivitätsmessung in menschlichem Brustgewebe

Erste Enzymaktivitätsmessungen sollten einen Hinweis darauf geben, ob menschliches Brustgewebe in der Lage ist, Östradiol in Östron umzuwandeln, eine Aktivität, die von 17 $\beta$ -HSD 4 sowie von 17 $\beta$ -HSD 2 geleistet werden kann. Untersucht wurde hier insgesamt 7 Gewebe, 5 in der folliculären und 2 in der lutealen Phase. Tabelle 5 zeigt die Ergebnisse der Messung.

Tab. 5: Umsatz von Östradiol zu Östron durch Brustgewebe der folliculären und der lutealen Phase (Enzymaktivitätsmessung)

Probe	Phase	Spez. Enzymaktivität (pmol/mg/min)
15/99-1	follikullär	1,377
18/99-1	follikullär	1,262
31/99-2	follikullär	2,183
100/99-1	follikullär	0,772
109/99-1	follikullär	2,209
16/99-2	luteal	0,865
36/99-2	luteal	0,903

In jedem Brustgewebe wurde eine oxidative Aktivität gegenüber Östradiol gemessen, die Umsätze waren jedoch sehr niedrig. Für die Aussage, ob es eine Zyklusabhängigkeit gibt oder nicht, ist die Anzahl der Proben bisher zu gering.

## 4 Diskussion

### 4.1 *Vergleich rein morphologischer und immunhistochemischer Befunde*

In der vorliegenden Arbeit wurde das Vorkommen der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 in gesunden nicht laktierenden Brustdrüsenepithelzellen der Frau während des normalen Menstruationszyklus und bei oraler Kontrazeption charakterisiert. Weiterhin wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren im Brustdrüsenewebe im Verlauf des weiblichen Zyklus sowie Veränderungen bei Einnahme oraler Kontrazeption besteht. Es erschien sinnvoll, für diese Fragestellung morphologische und biochemische Methoden einzusetzen.

Obwohl für die terminalen Gangabschnitte und die Endstücke (Ductuli=Tubuloalveoli) eine differenzierte morphologische Nomenklatur besteht, die noch dazu bei verschiedenen Autoren unterschiedlich ist, (siehe z.B. Wellings et al. (1975) und Krstic (1991)), so ist doch auffällig, dass sie sich bei Nachweis vieler funktioneller Parameter nicht oder kaum unterscheiden. Erst zwischen größeren extralobulären Gängen und terminalen Strukturen treten Unterschiede deutlich hervor. Dessen ungeachtet können sich die Epithelien in verschiedenen Läppchen im gleichen Schnittpräparat durchaus hinsichtlich der Expression von einzelnen Parametern und auch hinsichtlich ihrer Morphologie unterscheiden. Das relativ einheitliche Expressionsmuster der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 in terminalen Gängen und Endstücken unterstreicht das oben gesagte. Ähnliches beobachteten (Feuerhake et al. 2000) hinsichtlich der Expression von einzelnen Zytokeratinen, sauren Mukopolysacchariden sowie von Bcl-2 und Bax in nicht-laktierenden gesunden Brustdrüsen. Auch während der Neubildung von Läppchen, die von terminalen Gängen ausgeht, unterscheiden sich

Läppchenepithelien und terminale Gangepithelien in vielen histo- und immunhistochemischen Merkmalen praktisch nicht (Welsch et al. 1998). Erst während der Laktation unterscheiden sich Endstücke und terminale Gänge, z. B. hinsichtlich der Zytokeratinexpression deutlicher (Welsch et al. 1998). Solche Beobachtungen deuten auf relativ einheitliche molekulargenetische Eigenschaften der terminalen Gangstrukturen und der Endstücke in der nicht-laktierenden Brustdrüse hin.

#### 4.2 *Immunhistochemie und mRNA Expression der 17 $\beta$ -HSD 4 und Aktivitätsmessungen in Brustgewebe*

17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 wurde in der vorliegenden Untersuchung immunhistochemisch sowohl in Gängen als auch in den Tubuloalveoli in normalem Brustdrüsenepithel nachgewiesen; ebenso bei Frauen mit hormoneller Antikonzeption. Angefärbt haben sich zytoplasmatische fein granuläre Strukturen der Brustdrüsenepithelzellen und nicht die Zellkerne. Bei einigen Präparaten sind die Myoepithelzellen stärker angefärbt als die Drüsenepithelzellen. Bindegewebszellen sowie Fettzellen färbten sich entweder gar nicht oder nur schwach an. Mit einer Immungold-Methode haben Markus et al. (1995 a, b) die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 in Peroxisomen lokalisiert [24, 25]. Der Nachweis von granulären Strukturen weist also darauf hin, dass durch die verwendeten Antikörper tatsächlich 17 $\beta$ -HSD 4 detektiert wurde. Die Zyklusabhängigkeit der 17 $\beta$ -HSD 4 in der Mamma wurde bis jetzt noch nicht untersucht. In unseren immunhistochemischen Untersuchungen stellte sich heraus, dass das Enzym sowohl in der folliculären als auch in der lutealen Phase des ovariellen Zyklus exprimiert wird, wobei eine leicht intensivere Anfärbung der 17 $\beta$ -HSD 4 in der folliculären Phase auftrat; allerdings konnte diese Beobachtung statistisch nicht abgesichert werden. Eine Studie mit größeren Fallzahlen müsste durchgeführt werden um zu zeigen, ob 17 $\beta$ -HSD 4 eine wichtige Rolle dabei spielt, das Brustepithel in der folliculären Phase des weiblichen Zyklus vor zu hoher intrazellulärer Östradiolmengen zu schützen.

Daten für das Fehlen einer Zyklusabhängigkeit wurden von Söderqvist et al. (1998) für das Östradiol synthetisierende Enzym 17 $\beta$ -HSD 1 [46] ebenfalls gefunden. Stark zyklusabhängig verhalten sich jedoch einige 17 $\beta$ -HSDs in anderen Zielgeweben. 17 $\beta$ -HSD 1 ist im menschlichen Endometrium (ein weiteres Zielgewebe der Sexualsteroiden) in der folliculären



Phase nicht nachweisbar [21] und 17 $\beta$ -HSD 2 im gleichen Gewebe nur in der späten lutealen Phase [29].

Wir stellten im Vergleich mit und ohne Einnahme oraler Kontrazeption leichte zyklusabhängige Unterschiede in der Färbeintensität der 17 $\beta$ -HSD 4 der weiblichen Brustdrüse fest. 17 $\beta$ -HSD 4 zeigte zwar eine ähnliche Färbeintensität in Gängen und Tubuloalveoli, auffällig war aber, dass sich mit unseren beiden Antikörpern (2E9 und 2C7) gegen 17 $\beta$ -HSD 4 die Gänge und Tubuloalveoli der Brustdrüsenepithelzellen in der folliculären Phase stärker bei den Frauen anfärbten, die hormonell verhüteten, und in der lutealen Phase färbten sich die Zellen der Frauen stärker an, die natürliche ovarielle Zyklen hatten. Eine statistische Auswertung müsste auch hier mit größeren Probenzahlen erfolgen.

Söderqvist et al. (1998) konnten für die Expression von 17 $\beta$ -HSD 1 Abhängigkeiten von hormoneller Verhütung feststellen. Die Intensität der Antikörper-Färbung der 17 $\beta$ -HSD 1 war bei Frauen mit hormoneller Antikonzeption in den tubuloalveolären Epithelzellen stärker als bei Frauen mit natürlichen ovariellen Zyklen. Für Brustdrüsengänge erreichte der Unterschied sogar Signifikanz [46].

Über den mRNA-Gehalt in Brustgewebe sollte ebenfalls untersucht werden, ob 17 $\beta$ -HSD 4 in weiblichen Brustdrüsenepithelzellen zyklusabhängig exprimiert wird. Die PCR-Untersuchungen ergaben keinen Hinweis auf eine Zyklusabhängigkeit. Die Methode zur Quantifizierung der Menge an 17 $\beta$ -HSD 4-mRNA im Brustdrüsenepithel ist zukünftig zu verbessern, um noch eindeutigere Aussagen treffen zu können: Für die hier durchgeführten Versuche wurde Gesamt-RNA aus Brustgeweben extrahiert, die vermutlich wechselnde Mengen an Fettgewebe (ohne 17 $\beta$ -HSD 4 Gehalt) und wechselnden Mengen an Epithel (in dem laut immunhistochemischen Untersuchungen die 17 $\beta$ -HSD 4 zu finden ist) aufwiesen.

Die zur Vervielfältigung durch die PCR zur Verfügung stehenden 17 $\beta$ -HSD 4-mRNA war vermutlich schon durch diese Präparationsvariationen bei jeder Probe unterschiedlich. Erste Tests zur Abwandlung der Methoden wurden unternommen (nicht gezeigt): Aus histologischen Schnitten wurde Brustepithel mit Hilfe eines Skalpells ausgekratzt, und aus diesem Epithel wurde RNA isoliert. Die ersten PCR-Analysen zeigten allerdings noch keine befriedigenden Ergebnisse. Die Mengen an isolierter RNA waren wahrscheinlich zu gering.

Extrem gering waren die oxidativen Umsätze der Enzymaktivitätsmessung im Brustgewebe. Es konnte jedoch in jeder Zyklusphase oxidative Aktivität gemessen werden, eine Aktivität, die der 17 $\beta$ -HSD 4 und der 17 $\beta$ -HSD 2 zugeschrieben werden kann. Mögliche Ursachen dieses geringen Umsatzes können einerseits an der Methode liegen, andererseits liegt die Vermutung nahe, dass die Hauptaufgabe der 17 $\beta$ -HSD 4 nicht primär im Steroidstoffwechsel liegt.

Unsere Studienergebnisse wie auch andere Studien erhärten den Verdacht, dass die Aufgaben der 17 $\beta$ -HSD 4 komplex zu sein scheinen [4, 7, 27]. Es deutet viel darauf hin, dass die Aufgaben der 17 $\beta$ -HSD 4 nicht nur auf den Steroidmetabolismus beschränkt sind, wie dies bei den Hydroxysteroiddehydrogenasen 1 bis 3 und 5 vermutet wird [28, 29, 32, 34]. Unter anderem ist das Enzym an der  $\beta$ -Oxidation von Fettsäuren und an der Gallensäuresynthese beteiligt [7]. Die moderate Expression von 17 $\beta$ -HSD 4 mRNA in zahlreichen Zelltypen, ohne einen signifikant hohen Wert von 17 $\beta$ -HSD Aktivität, lässt eine unzureichende Oxidation von Östradiol durch 17 $\beta$ -HSD 4 annehmen [27]. Außerdem besteht keine Korrelation zwischen der Anwesenheit von 17 $\beta$ -HSD 4 mRNA und ihrer oxidativen Aktivität in menschlichen Zellkulturen, dies Korrelation besteht in einer Studie jedoch für 17 $\beta$ -HSD 1 und 2 [27].

Zusammenfassend kann man sagen, dass die 17 $\beta$ -HSD 4 in zahlreichen menschlichen Zelltypen exprimiert wird und vermutlich nicht nur primär mit der Inaktivierung von Sexualsteroiden betraut ist. Für deren Inaktivierung scheint insbesondere die 17 $\beta$ -HSD 2 verantwortlich zu sein [27]. Unsere Studienergebnisse wie auch zahlreiche andere neue Studien erhärten den Verdacht, dass die Aufgaben der 17 $\beta$ -HSD 4 komplex zu sein scheinen (4, 7, 27). Ihre Hauptaufgabe ist wahrscheinlich eher in einer Mitregulation des Fettmetabolismus zu suchen [27].

### 4.3 Immunhistochemie der Östrogen- und Progesteronrezeptoren

Die vorliegende Untersuchung hat gezeigt, dass sich beim immunhistochemischen Nachweis der Östrogen- und Progesteronrezeptoren nur ein Teil der Brustdrüsenepithelzellen anfärbte; im Durchschnitt waren nur 4 - 7 % der Zellen pro Schnitt Östrogenrezeptor-positiv. In kleinen Gängen färbten sich bei uns die Zellen häufig schwächer an als in den Läppchen. Dies deutet auf eine physiologische Verwandtschaft zwischen den Epithelien der kleinen Gänge und der Tubuloalveoli hin. Letztere gehen im Laufe der z.T. mehrjährigen Laktation großer Mammalier aus den kleinen Gängen hervor, was sich auch am Zytokeratinmuster (CK7 und CK19) erkennen lässt (Welsch et al. 1998). Im Gegensatz zu den eigenen Befunden färbten sich jedoch in der Studie von Ricketts et al. (1991) die Östrogenrezeptoren in den kleinen extralobulären Gängen stärker als in den Läppchen. Möglicherweise ist dieser Unterschied durch methoden-technische Einflüsse bedingt. Die Myoepithelzellen blieben in unseren Präparaten ungefärbt, sie scheinen sich diesen Befunden zufolge nicht oder kaum am Östrogen- und Progesteronstoffwechsel zu beteiligen.

Bei der immunhistochemischen Färbung von Progesteronrezeptoren zeigte die Färbung ein ähnliches Muster wie bei der Östrogenrezeptorfärbung, jedoch fiel die Intensität der Progesteronrezeptorfärbung generell stärker aus. Mögliche Ursachen für diese stärkere Intensität können an einer höheren Affinität des Antikörpers zum Progesteronrezeptor sein, oder eine stärkere Beteiligung der weiblichen Brustdrüse am Progesteronstoffwechsel. Unsere Beobachtungen der Progesteronrezeptorfärbung stimmen mit denen von Ricketts et al. (1991) überein [22, 41]. Die von uns wie auch von Malet et al. (1991) beobachtete Heterogenität unter den angefärbten Zellen lässt vermuten, dass es erhebliche Unterschiede im Zellalter, Reifegrad, Zellfunktion und Zellumsatz zwischen den einzelnen Brustepithelzellen gibt, die vermutlich die Expression des Progesteronrezeptors beeinflussen [22].

Bei der Untersuchung aller Proben (mit und ohne oraler Antikonzeption) stellten wir zwar einen höheren Östrogen- und Progesteronrezeptoranteil in der folliculären als in der lutealen Phase fest, aber in beiden Phasen werden beide Rezeptoren exprimiert. Bei statistischer Auswertung war eine nicht signifikante Tendenz feststellbar. Die Versuche sollten jedoch mit höheren Fallzahlen wiederholt werden. Dieses Ergebnis widerspricht den Ergebnissen vorheriger Studien nicht [41, 47, 51]. Auch dort sind beide Rezeptoren in der folliculären sowie in der lutealen Phase exprimiert, und es ist ebenfalls ein Abfall an Östrogenrezeptoren in der lutealen Phase feststellbar. In einer Studie von Marcopoulos et al. 1988 [23] wurden in der zweiten Zyklushälfte keine positiven Östrogenrezeptoren gefunden. Durch die Verbesserung der Nachweismethoden seit 1988 entspricht dies jedoch nicht mehr dem momentanen Stand der Wissenschaft. Normalerweise fällt die Anzahl der Östrogenrezeptoren im Verlauf des Zyklus ab [41, 47, 51], sie bleiben aber immer nachweisbar. Bei der immunhistochemischen Färbung von Progesteronrezeptoren in weiblichen Brustdrüsenepithelzellen fanden Williams et al. (1991) – im Gegensatz zu den vorliegenden Befunden - keine zyklusbedingten Schwankungen. Im Endometrium findet dagegen immer ein deutlicher Abfall der Anzahl der Progesteronrezeptoren während der lutealen Phase statt [51].

Es ergaben sich Unterschiede in der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren in der nicht-laktierenden Mamma, die mit oraler Antikonzeption korreliert werden können. Frauen, die die „Pille“ regelmäßig einnahmen, zeigten in unserem Material in beiden Phasen (luteal und folliculär) eine zahlenmäßig geringere Expression von Progesteronrezeptoren im Vergleich zu Frauen die keine Hormone einnehmen. Das gleiche Ergebnis fiel bei den Östrogenrezeptoren auf. Laut statistischer Auswertung waren diese Unterschiede nicht signifikant. Williams et al. (1991) zeigten, dass bei Gebrauch oraler hormoneller Antikonzeption die Anzahl an Östrogenrezeptoren in der Mamma während der ersten Zyklushälfte signifikant sinkt. Dadurch, dass es eine inverse Verbindung zwischen

Östrogenrezeptoren und proliferierenden Zellen gibt, kommt es zu einem früheren Anstieg an proliferierenden Zellen, der normalerweise erst in der zweiten Zyklushälfte stattfindet [51]. Nach Williams et al. (1991) scheint die hormonelle Verhütung auf die Zahl der Progesteronrezeptoren keinen Einfluss zu nehmen. Die Folge von hormoneller oraler Antikonception auf die Östrogenrezeptoren und proliferierenden Zellen könnte ein erhöhtes Brustkrebsrisiko bedeuten [51]. Die Unterschiede hinsichtlich Expressionsaktivität des Progesteronrezeptors zwischen den Befunden von Williams et al. (1991) und der vorliegenden Studie lassen sich vermutlich erst bei entsprechender Analyse sehr viel größerer Patientenzahlen bewerten.

## 5 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zu untersuchen, ob die Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 (ein Enzym, das die Umwandlung von Östradiol in Östron katalysiert) in gesunden Brustdrüsenepithelzellen der Frau menstruationszyklusabhängig variiert und ob orale Kontrazeptiva Änderungen hervorrufen. Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen repräsentieren eine Gruppe von mehreren Isoenzymen, welche vor allem Östrogene und Androgene umsetzen. 17 $\beta$ -HSD 4, die als steroidumsetzendes Enzym identifiziert wurde, konnte immunhistochemisch in Drüsenepithelien und biochemisch generell im Brustgewebe nachgewiesen werden. Weiterhin wurde geprüft, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von Progesteron- und Östrogenrezeptoren in Brustdrüsengewebe und Verlauf des weiblichen Zyklus besteht und ob sich Unterschiede durch die Einnahme oraler Antikonzeption ergeben.

Für unsere Studie untersuchten wir Brustdrüsengewebe von 47 prämenopausalen Frauen, die sich einer Mammareduktionsplastik unterzogen. Da wir postoperativ eine Zyklusanamnese erhoben, konnten wir den Tag der Operation entweder der folliculären oder lutealen Menstruationszyklusphase zuordnen.

Die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 ließ sich immunhistochemisch mit zwei verschiedenen monoklonalen Antikörpern in den Gängen und Tubuloalveoli des normalen Brustdrüsenepithels nachweisen. Anfärbt haben sich zytoplasmatische granuläre Strukturen in Drüsenepithelzellen und in Myoepithelzellen. Wir stellten leicht unterschiedliche Tendenzen in der Signalstärke der Expression von 17 $\beta$ -HSD 4 mit dem Menstruationszyklus fest. Auch bei Einnahme oraler Kontrazeptiva ergaben sich leicht unterschiedliche Tendenzen

in der Signalstärke der Expression von 17 $\beta$ -HSD 4. Man sah die Tendenz einer höheren 17 $\beta$ -HSD 4 Färbe-Intensität in der folliculären Phase und die Einnahme oraler Kontrazeptiva bewirkte eine niedrigere 17 $\beta$ -HSD 4 Färbe-Intensität in der lutealen und eine höhere in der folliculären Phase. Expressionsstudien mit mRNA ergaben keine Zyklusabhängigkeit der 17 $\beta$ -HSD 4.

Die Ergebnisse geben keine klare Aussage darüber, ob 17 $\beta$ -HSD 4 primär mit dem Umsatz von Östrogenen betraut ist, oder ob die Hauptfunktionen in Fettsäure- und Gallensäuremetabolismus liegen, Funktionen, die das Enzym auch ausüben kann.

Insgesamt war die Östrogen- und Progesteronrezeptorexpression in der folliculären Phase geringfügig höher als in der lutealen Phase. Es ergaben sich Unterschiede in der Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren durch orale Antikonzeption. Frauen die die „Pille“ regelmäßig einnehmen, zeigten in beiden Phasen (luteal und folliculär) eine geringere Expression von Östrogen- und Progesteronrezeptoren als bei Frauen die keine Hormone einnehmen. Alle Unterschiede waren jedoch statistisch nicht signifikant.



## 6 Literaturverzeichnis

1. Adamski J, Normand T, Leenders F, Monté D, Begue A, Stéhelin D, Jungblut PW, de Launoit Y: Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4. *Biochem J* 1995, 311: 437-443
2. Andersson S, Geissler WM, Patel S, Wu L: The molecular biology of androgenetic 17 beta-Hydroxysteroiddehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 53(1-6): 37-9
3. Andersson S, Geissler WM, Wu L, Davis DL, Grumbach MM, New MI, Schwarz HP, Blethen SL, Mendonca BB, Bloise W, Witchel SF, Cutler GB, Griffin JE, Wilson JD, Russel DW: Molecular genetics and pathophysiology of 17 beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 3 deficiency. *J Clin Endocrinol Metab* 1996, 81(1): 130-6
4. Andersson S: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase: isoenzymes and mutations. *Journal of Endocrinology* 1995, 146: 197-200
5. Aoshima Y, Kochakian CD: Activity, intracellular distribution and some properties of 17 $\beta$ -hydroxy-C19-steroid dehydrogenases in liver and kidney. *Endocrinology* 1963, 72: 106-114
6. Bässler R: Pathologie der Brustdrüse. In: Doerr W, Seifert G, Uehlinger E (Hrsg. ): *Spezielle pathologische Anatomie. Band 11* Springer; Berlin, Heidelberg, New York; (1978)

7. De Launoit Y, Adamski J: Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol* 1999, 22: 227-240
8. Dean KI, Majurin ML, Komu M: Relaxation times of normal breast tissues. *Acta Radiologica* 1994, 35: 258-261
9. Fanger H, Ree HJ: Cyclic changes of human mammary gland epithelium in relation to the menstrual cycle – an ultrastructural study. *Cancer* 1974, 34: 574-585
10. Ferguson DJ, Anderson TJ: Ultrastructural observations on cell death by apoptosis in the „resting“ human breast. *Virchows Arch [Pathol Anat]* 1981, 393(2): 193-203
11. Ferguson DJP, Anderson TJ: Morphological evaluation of cell turnover in relation to the menstrual cycle in the resting human breast. *Br J Cancer* 1981, 44: 177-181
12. Feuerhake F, Sigg W, Höfter EA, Dimpfl T, Welsch U: Immunohistochemical analysis of Bcl-2 and Bax expression in relation to cell turnover and epithelial differentiation markers in the non-lactating human mammary gland epithelium. *Cell Tissue Res* 2000, 299: 47-58
13. Fournier S, Brihmat F, Durand JC, Sterkers N, Martin PM, Kuttann F, Mauvais-Jarvis P: Estradiol 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase, a Marker of Breast Cancer Hormone Dependency. *Cancer Research* 1985, 45: 2895-2899

14. Geissler WM, Davis DL, Wu L, Bradshaw KD, Patel S, Mendonca BB, Elliston KO, Wilson JD, Russell DW, Andersson S: Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 3. *Nat Genet* 1994, 7(1): 34-9
15. Gompel A, Malet C, Spritzer P, Lalardrie JP, Kuttenn F, Mauvail-Jarvis P: Progesterin effect on cell proliferation and 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase activity in normal human breast cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 1986, 63: 1174-1180
16. Gompel A, Martin A, Simon P, Schöevaert D, Plu-Bureau G, Hugol D, Audouin J, Leygue E, Truc JB, Poitout P: Epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. *Breast Cancer Research and Treatment* 1996, 38: 227-235
17. Guyton A, Hall J: Female Physiology Before Pregnancy; And Female Hormons. In: Guyton A, Hall J (Hrsg.): *Medical Textbook of Physiology*; 9. Auflage; W.B. Saunders; Jackson; Mississippi; (1996): 1025-1026
18. Husen B, Psonka N, Jacob-Meisel M, Keil C, Rune GM: Differential expression of 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenases types 2 and 4 in human endometrial cell lines. *J Mol Endocrin* 2000, 24: 135-144
19. Kaufmann M, Carstensen J, Husen B, Adamski J: The tissue distribution of porcine 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase and its induction by progesterone. *J Steroid Biochem Molec Biol* 1995, 55: 535-539

20. Krstic RC: Integumentary System/Inactive or resting mammary gland. In: Krstic RV (Hrsg.): Human microscopic anatomy; 1. Auflage; Springer-Verlag; Berlin, Heidelberg; (1991) 470-471
21. Mäentausta O, Sormunen R, Isomaa V, Lehto VP, Jouppila P, Vihko R: Immunohistochemical localization of 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase in the human endometrium during the menstrual cycle. Lab Inv. 1991, 65: 582-587
22. Malet C, Gompel A, Yaneva H, Cren H, Fidji N, Mowosowicz I, Kuttenn F, Mauvais-Jarvis P: Estradiol and progesterone receptors in cultured normal human breast epithelial cells and fibroblasts: Immunocytochemical studies. J Clin Endocrinol Metab 1991, 73: 8-17
23. Markopoulos C, Berger U, Wilson P, Gazet JC, Coombes RC: Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. Br Med J 1988, 296(6633): 1349-1351
24. Markus M, Husen B, Adamski J: The subcellular Localization of 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Type 4 and its Interaction with Actin. J Steroid Biochem. Molec Biol 1995a, 55: 617-621
25. Markus M, Husen B, Leenders F, Jungblut PW, Hall PF, Adamski J: The organelles containing porcine 17 $\beta$ -estradiol dehydrogenase are peroxisomes. Eur J Cell Biol 1995b, 55: 535-539
26. Mauvais-Jarvis P, Kuttenn F, Gompel A: Estradiol / Progesteron interaction in normal and pathologic breast cells. Ann NY Acad Sci 1986, 464: 152-167

27. Miettinen M, Mustonen M, Poutanen M, Isomaa V, Wickman M, Söderqvist G, Vihko R, Vihko P: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenases in normal human mammary epithelial cells and breast tissue. *Breast Cancer Research and Treatment* 1999, 57: 175-182
28. Miettinen MM, Mustonen MV, Poutanen MH, Isomaa VV, Vihko RK: Human 17 beta Hydroxysteroiddehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression. *Biochem J* 1996, 314: 839-45
29. Mustonen MVJ, Isomaa VV, Tapanainen J, Poutanen MH, Stenbäck F, Fihko RK, Vihko PT: Human 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression and localization in term placenta and in endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1998, 83: 1319-1324
30. Normand T, Husen B, Leenders F, Pelczar H, Baert JL, Begue A, Flourens AC, Adamski J, de Launoit Y: Molecular characterization of mouse 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase 4. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995, 55: 541-548
31. Olsson H, Jernstrom H, Alm P, Kreipe H, Ingvar C, Jonsson PE, Ryden S: Proliferation of the breast epithelium in relation to menstrual cycle phase, hormonal use, and reproductive factors. *Breast Cancer Res Treat* 1996, 40(2): 187-196
- 31a. Oppermann T: Dissertation Med Fak. LMU München (in Vorbereitung)

32. Pelletier G, Luu-The V, Tetu B, Labrie F: Immunocytochemical localization of type 5 17beta-Hydroxysteroiddehydrogenase in human reproductive tissues. *J Histochem Cytochem* 1999, 47(6): 731-8
33. Peltoketo H, Isomaa V, Poutanen M, Vihko R: Expression and regulation of 17 beta-Hydroxysteroiddehydrogenase 1. *J Endocrin* 1996, 150 Suppl: 21-30
34. Peltoteko H, Nokelainen P, Piao YS, Vihko R, Vihko P: Two 17beta-Hydroxysteroiddehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999, 69(1-6): 431-9
35. Peterson OW, Hoyer PE, Van Deurs B: Frequency and distribution of estrogen receptor-positive cells in normal nonlactating human breast tissue. *Cancer Res.* 1987, 47: 5748-51
36. Pitelka DR: The Mammary Gland. In: Weiss L (Hrsg.): *Cell and tissue biology*; 5. Auflage; Urban & Schwarzenberg; New York, Amsterdam, Oxford; (1983) 944-950
37. Potten CS: The effect of age and menstrual cycle upon proliferative activity of the normal human breast. *Br J Cancer* 1988, 58(2): 163-170
38. Poutanen M, Isomaa V, Peltoketo H, Vihko R: Regulation of oestrogen action: role of 17 beta-Hydroxysteroiddehydrogenases. *Ann Med* 1995, 27(6): 675-82
39. Prudhomme JF, Malet C, Gompel A, Lalardrie JP, Ochoa C, Boue A, Mauvais-Jarvis P, Kuttann F: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Activity in Human Breast Epithelial Cell and Fibroblast Cultures. *Endocrinology* 1984, 114(5): 1483-1489

40. Qin YM, Poutanen MH, Helander HM, Kvist AP, Siivari KM, Schmitz W, Conzelman E, Hellman U, Hiltunen K: Peroxisomal multifunctional enzyme of  $\beta$ -oxidation metabolizing D-3-hydroxyacyl-CoA esters in rat liver: molecular cloning, expression and characterization. *Biochem J* 1997, 321: 21-28
41. Ricketts D, Turnbull L, Ryall G, Bakhshi R, Rawson NS, Gazet JC, Nolan C, Coombes RC: Estrogen and progesteron receptors in the normal female breast. *Cancer Res* 1991, 51(7): 1817-1822
42. Rosenber A: Über menstruelle, durch das Corpus luteum bedingte Mammaveränderungen. *Frankf. Z. Path.* 1922, 27: 466-506
43. Sabourin JC, ; Martin A, Baruch J, Truc JB, Gompel A, Poitout P: bcl-2 Expression in normal breast tissue during the menstrual cycle. *Int J Cancer* 1994: 59, 1-6
44. Schinko I, Trebbin H, Fuchs E, Welsch U: Ultrastructural and Histochemical Observations on Secretory Phenomena in the Resting Human Mammary Gland. *Z. mikrosk.-anat. Forsch.* 1990, 104: 578-592
45. Söderqvist G, MD, Isaksson E, MD, Schoultz B von, MD, Ph D, Carlström K, PhD, Toni E, MD, Skoog L, MD, PhD: Proliferation of breast epithelial cells in healthy woman during the menstrual cycle. *Obstet Gynecol* 1997, 176: 123-8
46. Söderqvist G, Poutanen M, Wickman M, Schoultz B von, Skoog L, Vihko R: 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase Type 1 in normal breast tissue during the menstrual cycle and hormonal contraception. *JCE & M* 1998, 83: 1190-1193

47. Söderqvist G, von Schoultz B, Tani E, Skoog L: Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy woman during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 1993, 168(3Pt1): 874-879
48. Söderqvist G: Effects of sex steroids on proliferation in normal mammary tissue. *Ann Med* 1998, 30(6): 511-524
49. Taubert DH.: Die zentral hormonale Regelung der Genitalfunktion während der Geschlechtsreife. In: Schmidt-Matthiesen (Hrsg): *Gynäkologie und Geburtshilfe*; 5. Auflage; Schattauer Verlag; Stuttgart, New York; (1982) 40-42
50. Vogel PM, Georgiade NG, Fetter BF, Vogel FS, Mc Carty KS Jr. : The correlation of histologic changes in the human breast with the menstrual cycle. *Am J Pathology* 1981, 104(1): 23-34
- 50a. Wellings SR, Jensen HM, Marcum RG: An atlas of subgross pathology of the human breast with special reference to possible precancerous lesions. *J Natl Cancer Inst* 1975, 55: 231-273
- 50b. Welsch U, Feuerhake F, Aarde R van, Buchheim W, Patton S: Histo- and cytophysiology of the lactating mammary gland of the African elephant (*Loxodonta africana*). *Cell Tissue Res* 1998, 294: 485-501
51. Williams G, Anderson E, Howell A, Watson R, Coyne J, Roberts SA, Potten CS: Oral contraceptive use increases proliferation and decreases oestrogen receptor content of epithelial cells in the normal human breast. *Int J Cancer* 1991, 48: 206-210



52. Wu L, Einstein M, Geissler WM, Chan HK, Elliston KO, Andersson S: Expression cloning and characterization of human 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 $\alpha$ -Hydroxysteroiddehydrogenase activity. J Biol Chem 1993, 268: 12964-12969

## **Danksagung**

Hiermit danke ich Herrn Prof. W. Mühlbauer (Klinikum München-Bogenhausen) für das Bereitstellen der Gewebeproben, Dr. med F. Feuerhake, Dr. G. Möller (GSF-Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit; München- Neuherberg), Dr. med. E. Höfter und Dr. rer.nat. M. Stöckelhuber für das Erlernen und Auswerten der experimentellen Versuche. Frau Dr. G. Möller bin ich auch für Ihre Hilfe bei der Diskussion der Befunde dankbar. Frau P. Unterberger danke ich für die anfänglichen Hilfestellungen bei der Einarbeitung in die Immunhistochemie.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. Ulrich Welsch für die vielen, konstruktiven Anregungen und die Korrekturen meiner Dissertation sowie theoretische und praktische Hilfe bei der Entstehung, Entwicklung und Vollendung meiner Arbeit.

## Lebenslauf

Geburtsdatum: 20.01.1974  
Geburtsort: Nürnberg  
Familienstand: ledig  
Konfession: evangelisch  
Vater: Lämmermann Lorenz, Berufssoldat  
Mutter: Lämmermann Sieglinde, Sekretärin

### Schulbildung:

1980 bis 1984: Albecker-Tor-Grundschule Langenau  
1984-1993: Robert-Bosch-Gymnasium Langenau

### Freiwilliges Soziales Jahr:

09/1993 bis 08/1994: Kreiskrankenhaus Heidenheim

### Hochschulstudium:

Seit Mai 1995: Humanmedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München  
16. Sept. 1997: Ärztliche Vorprüfung (Physikum), München  
27. Aug. 1998: Erstes Staatsexamen, München  
30. Aug. 2000: Zweites Staatsexamen, München  
18. Okt. 2001: Drittes Staatsexamen, München  
Seit 01. Jan. 2002: AIP, Augsburg, Gynäkologie  
Seit 01. Juli 2002: AIP, Schaffhausen (CH), Gynäkologie und Geburtshilfe  
Seit 01. Jan. 2003: AIP, Rockhampton (AUS), Gynäkologie und Geburtshilfe  
21. Okt. 2003: Erlangung der Vollapprobation als Ärztin

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr.med. Dr.rer.nat. U. Welsch

Mitberichterstatter: Prof. Dr. C. J. Thaler

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 04.05.2006