

7. ZUSAMMENFASSUNG

Das Endometrium ist das Hauptzielorgan der weiblichen Sexualhormone Östradiol und Progesteron. Dabei steuert Östradiol hauptsächlich den Aufbau des Gewebes durch die Proliferation der Zellen, während Progesteron für die Umwandlung des Endometriums in ein differenziertes sekretorisches Gewebe zuständig ist. Eine alleinige Wirkung von Östradiol, bzw. Substanzen mit östrogenen Potenz, in Abwesenheit von Progesteron, führt zu einem erhöhten Risiko an einem endometrialen Adenokarzinom zu erkranken. Unter anderem ist für Tamoxifen, einem Antiöstrogen, das erfolgreich zur Brustkrebsbehandlung eingesetzt wird, wiederholt eine agonistische Aktivität, und damit eine stimulierende Wirkung im Uterus, beschrieben worden. Ziel dieser Arbeit war es einen Beitrag zur Aufklärung der molekularen Grundlagen möglicher Risiken der Antiöstrogentherapie, die durch eine Stimulation des Uterusgewebes entstehen, zu leisten.

Die endometriale Adenokarzinomzelllinie RUCA-1 ist ein repräsentatives *in vivo/in vitro* Modell für die Untersuchung von hormonabhängigen Prozessen. Die RUCA-1 Zelllinie weist einen hohen Differenzierungsgrad auf und exprimiert, wie ich nachweisen konnte, den Östrogenrezeptorsubtyp ER- α . Dieser repräsentiert, zum einen ein funktionelles Differenzierungsmerkmal und zum anderen ist er von Bedeutung für die Untersuchung von östrogenabhängig-regulierten Genen. Als Marker für die Wirksamkeit von Östrogenen bzw. Antiöstrogenen wurden, die Gene Komplement C3 und Clusterin vertiefend untersucht.

Nach subcutaner Inokulation von RUCA-1 Zellen in ein syngenes Tier, bildete sich ein Inokulationstumor, der über die ipsilateralen axialen Lymphknoten in die Lunge metastasierte. In diesem komplexen Modell konnte gezeigt werden, daß Tamoxifen einen Einfluß auf die Proliferation des Uterus hat und einen sehr starken Einfluß auf die Zunahme des Gewichts der ipsilateralen axialen Lymphknoten ausübt. Letzteres ist ein deutlicher Hinweis darauf, daß diese Gewichtserhöhung auf eine vermehrte Metastasierung zurückzuführen ist.

Bei der Untersuchung der, als östrogen-reguliert beschriebenen Gene, konnte sowohl *in vitro*, als auch *in vivo*, jeweils eine östrogene Wirkung von Tamoxifen auf die Transkription der mRNA von Clusterin und Komplement C3 dargestellt werden. Diese östrogen-abhängige Transkriptionsregulation von Clusterin konnte auf der Ebene des „reifen“ Proteins ebenfalls verifiziert werden. Im Uterusgewebe war ebenfalls eine östrogenregulierte Expression des „reifen“ Clusterins nachweisbar, die aber ein, zum Tumor entgegengesetztes, Regulationsmuster aufwies. Somit konnte erstmals sowohl für eine mRNA, als auch für ein „reifes“ Protein eines Gens, ein hormonabhängiges Regulationsmuster beschrieben werden, das zwischen Normalgewebe und entsprechendem Tumor diametral entgegengesetzt ist.

Außerdem konnte wiederum für Tamoxifen bewiesen werden, daß die agonistische Wirkung sogar zu einer spezifischen differentiellen Expression des reifen Proteins führt.

Die Ergebnisse zeigen zum einen, daß das RUCA-1 Modell sehr gut geeignet ist, hormonelle Einflüsse auf die Genexpression *in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Die gewonnenen Daten ermöglichen ein sehr differenziertes Untersuchungsprofil. Zum anderen, wurde ein weiterer Beweis für die agonistische Aktivität von Tamoxifen *in utero* und für die möglichen Gefahren seines Einsatzes, z.B. in der Brustkrebstherapie bzw. in der Prävention als Brustkrebsprophylaxe, erbracht.

8. SUMMARY

Oliver Zierau:

Influence of antiestrogens on the expression of estradiol regulated genes in the endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I

The endometrium is the main target organ of the sexual steroid hormones estradiol and progesterone. The main influences of estradiol are on the proliferation of cells, while progestins mainly trigger the conversion of the endometrium to a differentiated, secretory tissue. The unopposed action of estradiol or estrogenic substances in general, in the absence of progesterone is believed to increase the risk for the development of an endometrial adenocarcinoma. For the antiestrogene Tamoxifen has already been described an agonistic activity in the uterus. The goal of my work was to contribute to the identification of molecular mechanisms, which may represent the basis for the risks associated with an antiestrogene therapy.

The endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I is a representative *in vivo/in vitro* model to study hormone dependent processes in uterine derived tissues. The RUCA-I cell line is characterized by a moderately to highly differentiated phenotype and expresses the estrogen receptor ER- α . The expression of hormone receptors is an indicator of a higher magnitude of differentiation and it is prerequisite for investigating estrogen dependent regulated genes and processes. As an example, Clusterin and complement C3 expression were analyzed in depth.

After subcutaneous inoculation of RUCA-I cells in syngenic animals, they form a tumor at the ectopic site. This inoculation tumor metastasizes to the lung using the lymphogenic pathway. It could be demonstrated that Tamoxifen influences the proliferation of the uterus and has an even more pronounced influence on the weight of the ipsilateral axial lymph nodes, whereas it is almost ineffective on the tumor growth at the ectopic site. This finding provides evidence for the assumption that this increase in weight of the lymph nodes results from an increase in metastasis.

Investigations on the estrogen regulated gene expression demonstrated an estrogenic action of Tamoxifen on the transcription of Clusterin and of complement C3 mRNA *in vitro* and *in vivo*. The estrogen dependent regulation of gene expression could also be verified on the level of the mature protein. In the uterus, if compared to the tumor, could be shown a diametrically inversed pattern of regulation of the mature protein. This is the first description of a hormonal regulation of a gene both for mRNA and the mature protein which is diametrically inversed in normal tissue and its corresponding tumor.

Furthermore it could be shown, that the agonistic activity of Tamoxifen even results in a specific, differential expression of the mature Clusterin protein. These data demonstrate on one hand the validity of the RUCA-I model for investigations on hormonal influences on gene expression, and on the other hand they allow by detailed studies, because of the possible utility of the model *in vitro* and *in vivo*. Finally my data additional further proof for the agonistic activity of Tamoxifen in the uterus and the risks potentially associated by its use e.g. in breast cancer therapy or prevention.