

Institut für Ernährungswissenschaften  
(Direktor: Prof. Dr. habil. K. Eder)  
der  
Landwirtschaftlichen Fakultät  
(Dekan: Prof. Dr. habil. P. Pickel)  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

**“Untersuchungen zum Stoffwechsel von Estronsulfat (E1S) und  
Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) im menschlichen Aortengewebe und in  
menschlichen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs).“**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

von Diplom-Oecotrophologin (FH)  
Anja Tischer

Halle/Saale 2005

**urn:nbn:de:gbv:3-000008790**

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008790>]

Institut für Ernährungswissenschaften  
(Direktor: Prof. Dr. habil. K. Eder)  
der  
Landwirtschaftlichen Fakultät  
(Dekan: Prof. Dr. habil. P. Pickel)  
der  
Martin-Luther-Universität  
Halle-Wittenberg

**“Untersuchungen zum Stoffwechsel von Estronsulfat (E1S) und  
Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) im menschlichen Aortengewebe und in  
menschlichen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs).“**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor der Trophologie (Dr. troph.)

vorgelegt von

Diplom Oecotrophologin (FH)

Anja Tischer

geb. am 03.09.1975

in Neuhaus am Rennweg

Gutachter: Prof. Dr. habil. K. Eder  
Prof. Dr. habil. G. Stangl  
Prof. Dr. habil. I. Schellenberg

Verteidigung am: 11.07.2005

Halle/Saale 2005

## **Danksagungen**

Für die bei der Entstehung dieser Arbeit allzeit geduldig gewährte Unterstützung gilt mein besonderer Dank Herrn Prof. Dr. I. Schellenberg von der Hochschule Anhalt (FH) in Bernburg.

Für das Überlassen des Themas sowie die freundliche Betreuung dieser Arbeit bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-U. Schweikert.

Für die hilfreiche Unterstützung während der praktischen Untersuchungen im Labor danke ich den Mitarbeitern der Forschungsgruppe der Abteilung Endokrinologie der Medizinischen Poliklinik der Universität Bonn.

Weiterhin danke ich Herrn Prof. Dr. C. J. Preusse aus der Klinik und Poliklinik der Herz- und Gefäßchirurgie in Bonn und seinem Operationsteam.

Herrn Prof. Dr. K. Eder und Frau Prof. Dr. G. Stangl gilt mein Dank für die bereitwillige Übernahme der Gutachtertätigkeit.

# INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
<b>Abkürzungen</b>	
<b>1 Einleitung und Ziel der Untersuchungen</b>	<b>1</b>
1.1 Auftreten koronarer Herzkrankheiten	1
1.2 Das Gefäßendothel - Schädigungen des Endothels (atherosklerotischer Plaque)	1
1.3 Ziel der Untersuchungen	3
1.4 Estrogene und Androgene im kardiovaskulären System	4
1.4.1 Estrogene	4
1.4.1.1 Herkunft und Stoffwechsel der Estrogene	4
1.4.1.2 Estrogenwirkungen auf das Gefäßsystem	5
1.4.1.3 Hormonersatztherapie	6
1.4.2 Androgene	7
1.4.2.1 Herkunft und Stoffwechsel der Androgene	7
1.4.2.2 Bedeutung der Androgene im Gefäßsystem	9
1.4.2.3 Hormonersatztherapie	10
1.5 Estronsulfat (E1S) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)	10
1.5.1 Steroidsulfatase	11
1.5.1.1 Arylsulfatase Typ I und II	11
1.5.2 Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDs)	12
1.5.2.1 17 $\beta$ -HSDs	12
1.5.2.2 3 $\beta$ -HSDs	13
<b>2 Material und Methoden</b>	<b>14</b>
2.1 Material	14
2.1.1 Untersuchungsmaterial	14
2.1.2 Chemikalien / Substanzen / Steroide	18
2.1.3 Puffer und Lösungen	20
2.1.4 Geräte und Hilfsmittel	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 Aufarbeitung und Zellkultivierung	22
2.2.2 Zellcharakterisierung ( $\alpha$ -Aktinbestimmung)	24

2.2.3 Nachweis der Enzymaktivität und Steroidbildung im Aortengewebe und in den VSMCs	25
2.2.3.1 Sulfatase – Assay	25
2.2.3.2 Chromatographie – Identifikation der Steroide	30
2.2.3.3 Messung der Radioaktivität	31
2.2.4 Rekristallisation	31
2.2.5 Proteinbestimmung	34
2.3 Statistische Auswertung	34
<b>3 Ergebnisse</b>	<b>35</b>
3.1 $\alpha$ -Aktinfilamente	35
3.2 Identifikationsnachweis der Steroide	35
3.3 Stoffwechsel von [ $^3$ H]E1S im Aortengewebe und in den VSMCs	37
3.4 Stoffwechsel von [ $^3$ H]DHEAS in den VSMCs	46
3.5 Vergleich der Sulfataseaktivität ([ $^3$ H]E1S, [ $^3$ H]DHEAS) in den VSMCs	52
3.6 Untersuchungen zur Hemmung der Sulfataseaktivität	54
3.7 pH- und Temperaturabhängigkeit der Sulfatase	61
<b>4 Diskussion</b>	<b>68</b>
4.1 Stoffwechsel von E1S und DHEAS im menschlichen Aortengewebe	68
4.2 Ausblick	78
<b>5 Zusammenfassung</b>	<b>81</b>
<b>6 Summary</b>	<b>83</b>
<b>7 Literaturverzeichnis</b>	<b>84</b>
<b>8 Lebenslauf</b>	

## Abkürzungen

### Chemikalien/Substanzen

BSA	Albumin, Bovine Serum
DOC	Natriumdesoxycholat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothyo-Cyanat-Konjugate
MEM	Minimum Essential Medium
PBS	Phosphate Buffered Saline
Tricine	N-tris[Hydroxymethyl]-methylglycine

### Steroide

Androstendion	4-Androsten-3,17-dion
Cholesterolsulfat	Cholesterol 3-sulfat
Dehydroepiandrosteron (DHEA)	3 $\beta$ -Hydroxy-5-androsten-17-on
Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)	5-Androsten-3 $\beta$ -ol-17-on sulfat
Dehydrotestosteron (DHT)	17 $\beta$ -Hydroxy-5 $\alpha$ -androstan-3-on
17 $\beta$ -Estradiol (E2)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol
Estradiolazetat	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol 17-azetat
Estradiolsulfat (E2S)	1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol 3-sulfat
Estriolsulfat (E3S)	1,3,5(10)-Estratrien-3,16 $\alpha$ -17 $\beta$ -triol 3-sulfat
Estron (E1)	3-Hydroxyestratrien-[1,3,5(10)]-on
Estronazetat	1,3,5(10)- Estratrien-3-ol-17-on azetat
Estronsulfamat (EMATE)	17-Keto-estra-1,3,5(10)-trien-3-yl
Estronsulfat (E1S)	1,3,5(10)- Estratrien-3-ol-17-on sulfat
Hydrocortisonsulfat	Cortisol 21-sulfat
Methylumbelliferylsulfat	4-Methylumbelliferylsulfat
Pregnenolonsulfat	5-Pregnen-3 $\beta$ -ol-20-on sulfat
Testosteron	17 $\beta$ -Hydroxy-4-androsten-3-on
Testosteronsulfat	4 Androsten-17 $\beta$ -ol-3-on sulfat

### Sonstige

cpm

Lichtblitze pro Minute; counts per minute

dpm

Zerfälle pro Minute;  
disintegrations per minute

Vol

Volumen

### Statistik

MW

arithmetischer Mittelwert

SD

Standardabweichung (standard deviation)

SEM

Standardfehler des Mittelwertes  
(standard error of the mean)

## **1 Einleitung und Ziel der Untersuchungen**

### **1.1 Auftreten koronarer Herzkrankheiten**

Kardiovaskuläre Erkrankungen stellen heute eine der führenden Todesursachen bei Männern und vor allem bei Frauen dar; sie sind für ca. 50% aller Todesfälle in der westlichen Welt verantwortlich [162]. Zahlreiche Untersuchungen [3, 162] zeigten, daß die Häufigkeit einer koronaren Herzkrankheit (KHK), die als "akute oder chronisch verminderte Leistungsfähigkeit des Herzens, welche durch eine Reduktion oder einen Stillstand myokardialer Blutzufuhr verursacht wird" (WHO) definiert ist, bei jüngeren Frauen sehr viel geringer ist, als bei gleichaltrigen Männern. Jedoch steigt die Häufigkeit nach der Menopause deutlich an. Frauen sind zum Zeitpunkt der Erkrankung im Durchschnitt 10 Jahre und z.Z. eines Herzinfarktes 20 Jahre älter als Männer. In den letzten 20 Jahren nahm die kardiovaskuläre Mortalität in den meisten westeuropäischen Ländern kontinuierlich ab; was in den osteuropäischen Länder nicht bestätigt werden konnte [162].

### **1.2 Das Gefäßendothel - Schädigungen des Endothels (atherosklerotischer Plaque)**

Das Gefäßendothel ist ein stoffwechselaktives, endokrines Organ, welches das Gleichgewicht verschiedener Parameter wie z.B. die Vasokonstriktion und Vasodilatation, die Förderung und Hemmung der Proliferation der glatten Gefäßmuskelzellen, die Prokoagulation und Antikoagulation, die Pro- und Antiinflammation und die Oxidation reguliert [45]. Durch den Einfluß physiologischer Reize, wie z.B. durch zirkulierende chemische Stoffe erfolgt im Gefäßendothel die Synthese und Freisetzung biologisch aktiver Substanzen (z.B. Stickstoffmonoxid, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Acetylcholin (Vasodilatator), Angiotensin II (Vasokonstriktor). Diese gefäßaktiven Substanzen können Einfluß nehmen auf die glatten Gefäßmuskelzellen (SMCs) und die mononukleären Zellen. Einer der wichtigsten Vorgänge in der Gefäßwand ist die Bildung von Stickstoffmonoxid (NO) mit Hilfe des endothelialen Enzyms Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS). Die Freisetzung von NO hemmt die Kontraktion und Proliferation der SMCs, die Monozytenadhäsion und die Plättchenaggregation [7, 19, 76, 89, 100, 125, 126, 155].

Schädigungen des Gefäßendothels führen zur Freisetzung vasoaktiver Substanzen, zur gesteigerten Aufnahme von Lipoproteinen in die Intima und Expression von Glykoproteinen auf der Endotheloberfläche, die als Adhäsionsmoleküle für Monozyten und T-Lymphozyten dienen (Abbildung 1 A). Die Einlagerung von Lipiden führt zur Umwandlung von Monozyten zu Schaumzellen, welche mit den Lymphozyten sogenannte „fatty streaks“ bilden. Nach der Proliferation der SMCs und Makrophagen entstehen „intermediate lesions“ und nach der Akkumulation von Lipiden in den Zellen und in der Bindegewebsmatrix die komplexen „fibrous plaques“. Der Plaque besteht aus lipidreichen, nekrotischem Material und einer Bindegewebskapsel mit SMCs. Die Ruptur des Plaques ist verantwortlich für auftretende intramurale Blutungen, die Exposition von thrombogenen subendothelialen Strukturen (Kollagen, Cholesterinester etc.) und die Thrombusbildung, welche zu einem partiellen oder kompletten Verschluss der betroffenen Gefäße führt (Abbildung 1 B).

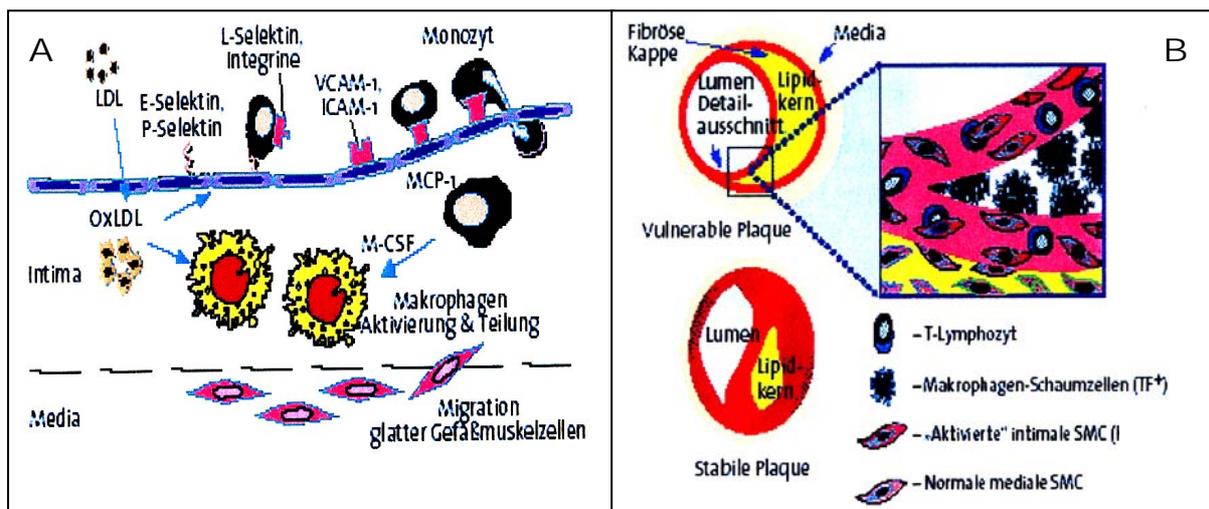


Abbildung 1:

- A. Frühe Phase der Atherogenese: Endotheliale Dysfunktion [78, 131]; Adhäsionsmoleküle (ICAM-1, VCAM-1, E-Selektin, Integrine); MCP-1 (Monocyte-Chemoattractant-Protein-1);
- B. Verminderte Bildung und verstärkter Abbau der extrazellulären Matrix führen zur Verringerung der fibrösen Kappe (Plaque-Instabilität und Rupturgefahr) [77].

Klinisch manifestieren sich diese Prozesse als Angina pectoris, instabile Angina, Myokardinfarkt, Herzinsuffizienz, Rhythmusstörungen und plötzlicher Herztod.

Die Entstehung der KHK kann durch folgende Faktoren hervorgerufen werden: Rauchen, Hypertonie, Dyslipidämie und Diabetes mellitus (Insulinresistenz, Hyperinsulinämie). Außerdem spielen Alter, Geschlecht, genetische Disposition und Ernährung eine wichtige Rolle. Neben den bereits genannten Risikofaktoren diskutiert man die Bedeutung und den Einfluß weiterer Faktoren: hämostasiologische Faktoren, Stoffwechselvariablen, Entzündungsparameter (hochsensitive C-reaktive Proteine (hs-CRP)) und Infektionen im Hinblick auf die Entstehung einer KHK [162].

### **1.3 Ziel der Untersuchungen**

Estrogene und auch Androgene haben einen wichtigen Einfluß auf verschiedene Funktionen des Gefäßendothels [7, 19, 49, 69, 125, 126, 151, 164]. Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht erklärt. Da derzeit der Einsatz der Hormontherapie (HRT) gerade im Hinblick auf den kardiovaskulären Nutzen sehr umstritten ist, wurden als Ausgangspunkt für unsere Untersuchungen „gesicherte“ Estrogen- und Androgenwirkungen verwendet [7, 19, 49, 53, 69, 125, 126, 135, 151, 164].

Ziel dieser Arbeit war, festzustellen, ob und inwieweit frisch entnommene Gefäßstücken der menschlichen Aorta, die im Rahmen kardiovaskulärer Operationen entfernt werden mußten und den hieraus kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) die Fähigkeit besitzen, aus dem im Körper in großer Menge vorliegendem Plasmaestrogen, E1S, biologisch aktive Estrogene zu bilden. Außerdem sollte untersucht werden, ob auch Androgene, ausgehend vom DHEAS, in diesem Zielgewebe gebildet werden können. Die differenten Estrogen- und Androgenwirkungen auf das Herzgefäßsystem führen zu der Frage, ob es Unterschiede im Stoffwechselmechanismus der Steroide gibt.

Dazu waren folgende „Marker“ zu untersuchen:

1. Aktivität und Regulation der Steroidsulfatase, einem Schlüsselenzym im Steroidstoffwechsel, im menschlichen Aortengewebe und in den VSMCs,
2. Aktivität anderer Enzyme im Zielgewebe, die für die Bildung biologisch aktiver Estrogene und/oder Androgene entscheidend sind und
3. Einfluß verschiedener Substanzen und Parameter (pH-Wert, Temperatur) auf die Aktivität der Steroidsulfatase.

## **1.4 Estrogene und Androgene im kardiovaskulären System**

### **1.4.1 Estrogene**

Ausgehend von der Tatsache, daß bei Frauen das Auftreten einer KHK vor der Menopause eher die Ausnahme ist, und nach der Menopause mit einhergehender Reduktion der ovariellen Hormonproduktion die Prävalenz der KHK mit zunehmendem Alter auf das Niveau gleichaltriger Männer ansteigt, stellt sich die Frage, welchen Einfluß die endogenen Estrogene auf die Genese und Progression des atherosklerotischen Plaques und auf die zu deren Progression führenden entzündlichen Prozesse haben.

#### **1.4.1.1 Herkunft und Stoffwechsel der Estrogene**

Estrogene sind Steroidhormone, welche bei der Frau hauptsächlich in den perifollikulären Granulosazellen und im Corpus luteum, während der Schwangerschaft auch in der Plazenta, gebildet werden. Die Umwandlung zirkulierender androgener Präkursoren, Androstendion und Testosteron, durch das Enzym Aromatase, ist die Hauptquelle der Estrogenbildung bei Männern [140]. Zusätzlich erfolgt die Estrogenproduktion in der Nebennierenrinde (NNR), im Gehirn, in der Leber, im Haar und im Hoden.

Die Estrogen- und Progesteronbildung in den Ovarien wird vom Hypothalamus über die Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) und dem Hypophysenvorderlappen (HVL) über das follikelstimulierende (FSH) und luteinisierende Hormon (LH) gesteuert. Der Transport der Estrogene im Blutplasma erfolgt zum größten Teil durch die Kopplung an entsprechende Transportproteine, Steroidhormonbindene Globuline (SHGB) oder Albumine. Estrogene binden mit unterschiedlicher Affinität an SHGB oder Albumine [70]. Im Zytosol oder Zellkern erfolgt die Kopplung des Estrogens an einen spezifischen Rezeptor. Die Hormon-Rezeptor-Komplexe binden an DNA-Abschnitte und steuern die Expression bestimmter Gene [82].

Durch Biotransformation werden die Hormone in hydrophile Metaboliten umgewandelt und renal ausgeschieden.

Die Estrogenkonzentration im Blut schwankt im Verlauf des Genitalzyklusses in Verbindung mit den Gonadotropinen. Frauen im gebärfähigen Alter haben einen Estrogenspiegel im Blut von ca. 100 pg/mL und während des Ovulationszeitpunktes

steigt dieser bis zu ca. 600 pg/mL an. Zum Zeitpunkt der Schwangerschaft steigt die Estrogenproduktion auf einen Wert von 20000 pg/mL an [169]. Die tägliche Estrogenproduktion beim Mann ist sehr gering und entspricht ungefähr der einer Frau in der Menopause (5 bis 20 pg/mL).

Die Wirkungen der Estrogene im Zielgewebe ist rezeptorvermittelt. Diskutiert wird die Beteiligung gefäßwandständiger Estrogenrezeptoren (ER) bei der atheroprotektiven Wirkungsvermittlung. Funktionsfähige Estrogenrezeptoren wurden beim Menschen in den SMCs [64] und Endothelzellen nachgewiesen [160]. Zellkultur-Tierexperimente zeigten, daß Estrogenrezeptor- $\alpha$  (ER- $\alpha$ ), welcher vermutlich nicht nur im Zellkern (genomisch) sondern auch in der Zellmembran lokalisiert ist, die nicht-genomische Aktivierung der endothelialen NO-Synthase reguliert [18]. Ein weiterer kernständiger Estrogenrezeptor wurde als Estrogenrezeptor- $\beta$  (ER- $\beta$ ) bezeichnet.

Neben den genomischen gibt es auch die nicht-genomischen Estrogenwirkungen [144, 149], die entweder rezeptorabhängig (ohne die Translokation in den Zellkern und der damit verbundenen Proteinbiosynthese) oder -unabhängig erfolgen können.

### **1.4.1.2 Estrogenwirkungen auf das Gefäßsystem**

Die Wirkung der Estrogene ist sehr unterschiedlich und organspezifisch. Estrogene fördern unter anderem das Wachstum der weiblichen Sexualorgane und prägen die sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale.

Estrogene greifen ebenfalls in die komplexen pathophysiologischen Mechanismen der Atherosklerose ein. Diskutiert wird der Einfluß der Estrogene auf die vaskuläre Reaktivität und endotheliale Funktion, den Fettstoffwechsel, antioxidative Prozesse, die Entzündung und die Hämostase.

Estrogene bewirken einerseits eine Steigerung der endothelabhängigen Koronararteriendilatation, der NO-Produktion [7, 19, 125, 126] und des Prostacyklinspiegels und führen andererseits zu einer Senkung der LDL-Oxidation, der freien Radikale, der Proliferation der SMCs und des Thromboxanspiegels [53]. In Zellkulturexperimenten und im Rattenmodell wurde gezeigt, daß Estrogene dosisabhängig die Proliferation der SMCs hemmen [17, 30, 147, 159]. Die Proliferation verbunden mit der Migration und der Matrixbildung sind ein Schlüsselprozeß bei der Atherogenese und Reststenose [130]. Estrogene, speziell das 17 $\beta$ -Estradiol, beeinflusste die Regeneration des Gefäßendothels positiv nach

einer mechanischen Verletzung der Aorta carotis der Ratte [69].  $17\beta$ -Estradiol hemmte im Tierexperiment die Kollagensynthese [37]. Estrogene hatten in zahlreichen Tierversuchen einen positiven Einfluß auf den Gefäßtonus. Vermutet wird, daß eine kalziumantagonistische Wirkung der Estrogene oder auch die endothelvermittelte Zunahme der NO-Freisetzung diese Wirkung verursacht [51, 58, 59, 166, 172].

Estrogene verhindern die Einlagerung und Hydrolyse von Cholesterin in die Zellwand [49, 164]. Bei Kaninchen mit erblichem LDL-Rezeptormangel stieg nach Verabreichung von  $17\alpha$ -Ethinylestradiol die mRNA der LDL-Rezeptoren in der Leber, was als Steigerung der Rezeptorzahl interpretiert wurde, die möglicherweise eine vermehrte Ausscheidung von Cholesterin bewirkt und für niedrigere Plasmaspiegel sorgt [86]. Weiterhin zeigten Frauen zyklusabhängige Veränderungen im HDL-Cholesterinspiegel, speziell bei schwangeren Frauen wurde eine signifikante Erhöhung beobachtet [5]. HDL-Cholesterin bewirkt den Abtransport des Cholesterins aus der Gefäßwand.

In Zellkulturexperimenten (mononukleare Zellen) wurde die Oxidation von LDL-Cholesterin durch supraphysiologische  $17\beta$ -Estradioldosierungen gehemmt und folglich die Bildung von Cholesterinestern verhindert [107, 128]. Estrogene modulierten bei der Genese und Progression der Atherosklerose der Koronargefäße immunologische und entzündliche Reaktionen. Estrogene führten ebenfalls zu einer Abnahme des thrombotischen Potentials und einer gesteigerten fibrinolytischen Aktivität [44, 91].

### **1.4.1.3 Hormonersatztherapie**

Eine Vielzahl epidemiologischer Studien (Nurses` Health Studie, Framingham Studie etc.) zeigten, daß durch die Hormonsubstitution das Risiko der KHK um mehr als 35% herabgesetzt wurde [5, 14, 46, 48]. Diesen Befunden stehen die Ergebnisse der ersten randomisierten, Placebo-kontrollierten Doppelblindstudie, der HERS-Studie (Heart and Estrogen/Progesterin Replacement Study) entgegen, die keine statistisch signifikanten Unterschiede hinsichtlich der kardiovaskulären Ereignisse und Sterblichkeit zwischen Placebo und behandelter Gruppe feststellte [57]. Darüber hinaus führt der langjährige (> 10 Jahre) kontinuierliche Einsatz von Estrogenen (ERT) zu einem erhöhten Risiko für das Endometrium- (3-5fache) [143],

Mammakarzinom (30– 40%) [48], Venenthrombose und Lungenembolie (3-3,5fache) [21, 60].

Der Einsatz einer Estrogen- oder Hormontherapie zur Primär- als auch zur Sekundärprävention der KHK ist aufgrund der kontroversen Daten stark eingeschränkt. Daher sind weitere Untersuchungen notwendig, die dem besseren Verständnis der molekularen und genetisch relevanten Faktoren in der Estrogenbiologie und der Vielzahl physiologischer Effekte dienen. Dieses Wissen sollte dann die Grundlage sein, ausgewählte Eigenschaften der Estrogene zu modifizieren, sodaß diese für die Behandlung und Verhinderung (Protektion) von kardiovaskulären Erkrankungen eingesetzt werden können [52].

### **1.4.2 Androgene**

Weitere Forschungsergebnisse dokumentieren eine mögliche positive Wirkung männlicher Geschlechtshormone auf das Gefäßsystem. Speziell Dehydroepiandrosteron (DHEA) und Testosteron zeigten entsprechend atheroprotektive Effekte [12, 32, 151].

#### **1.4.2.1 Herkunft und Stoffwechsel der Androgene**

Die Androgene, speziell das Testosteron, wird beim Mann in den Leydig-Zwischenzellen des Hodens produziert. Ebenfalls erfolgt die Androgenproduktion bei Mann und Frau in der Zona reticularis der NNR und bei der Frau in den Theca- und Stromazellen während der proliferativen Phase des Menstruationszykluses. Testosteron wird zu 95% in den Hoden und nur zu 5% in der NNR gebildet. Bei der Frau entsteht Testosteron vor der Menopause zum größten Teil aus der peripheren Umwandlung von Androstendion und zum geringen Teil aus anderen Androgenen bzw. wird vom Ovar gebildet. Androstendion wird größtenteils von der NNR gebildet und entsteht ansonsten im Ovar oder aus anderen Androgenen. Dagegen wird DHEA fast ausschließlich von der NNR gebildet [11]. Während der Menopause ist das Ovar die wichtigste Androgenquelle der Frau.

Die Biosynthese der Androgene im Hoden und in der NNR geht wie bei allen Steroidhormonen vom Cholesterol aus, entweder über Progesteron und Androstendion ( $\Delta^4$ -Weg) oder über Pregnenolon und DHEA ( $\Delta^5$ -Weg). Unter dem

Einfluß des adrenokortikotropen Hormons (ACTH) und Prolaktin wird in der NNR vorwiegend über den  $\Delta^5$ -Weg DHEA synthetisiert. Die Steuerung der adrenalen Androgenproduktion erfolgt über den Hypothalamus über den Kortikotropin-releasing factor (CRF) und über den HVL durch ACTH. Durch den Einfluß von ACTH unterliegen die adrenalen Androgene einer zirkadianen Rhythmik. Die Testosteronsynthese im Hoden und die Androgensynthese im Ovar wird vom Hypothalamus über GnRH und dem HVL über LH gesteuert.

Der Transport der Androgenvorstufen und Androgene erfolgt im Blut durch die Bindung an SHGB oder Albumine. Dabei ist die Affinität der Androgene zu den Transportproteinen sehr unterschiedlich. In den peripheren Geweben bzw. in der Leber erfolgt mit Hilfe spezifischer Enzymsysteme die Umwandlung zu den entsprechenden biologisch wirksamen Androgenen und Estrogenen.

Beim Mann sinkt mit zunehmenden Alter der Gesamttestosteronspiegel [36, 56, 99]; und bei beiden Geschlechtern fallen die DHEA- und DHEAS-Konzentrationen bis zum 60. Lebensjahr um mehr als 50% [63]. Dagegen bleibt die DHEA-Konzentration in der zerebrospinalen Flüssigkeit unverändert, wogegen die Estradiolkonzentration im Gehirn in der Postmenopause stark abnimmt [103].

Der altersabhängige Androgenverlust wird vermutlich durch eine verringerte Aktivität der NNR verursacht, die sich in einer Verminderung der intraadrenalen Enzymaktivitäten [161] oder Veränderungen der Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse äußert [20].

Die Wirkung der Androgene ist weitestgehend an das Vorhandensein des Androgenrezeptors (AR) gebunden, der als Transkriptionsfaktor die Genexpression und die Proteinsynthese steuert [124]. Der AR wurde in allen Zellen des Gefäßsystems, Endothelzellen, SMCs, myokardialen Fibroblasten, Makrophagen und Blutplättchen, exprimiert [81]. Die genomische Wirkung (AR) wird durch eine Reihe von Coregulatoren moduliert, die die Transkription erhöhen (Coaktivator) oder zurückhalten (Corepressor) können [54, 55, 47, 88].

Diskutiert wird neben der genomischen die nicht-genomische Wirkungsvermittlung [83], bei dem die Androgene an einen Oberflächenrezeptor binden, der zur Erhöhung der intrazellulären Signalstoffe führt. Nicht-genomische Steroidwirkungen sind schneller in der Wirkungsvermittlung (Sekunden bis Minuten), unabhängig von der RNA- und Proteinsynthese, haben keinen Einfluß auf den Zellkern und können kaum

durch klassische Antagonisten, aufgrund der unterschiedlichen steroidal Spezifität des Rezeptors, blockiert werden [54, 55, 82].

#### **1.4.2.2 Bedeutung der Androgene im Gefäßsystem**

Androgene beeinflussen eine Vielzahl von Prozessen, die geschlechtsspezifisch, aber durchaus auch geschlechtsunabhängig sein können (anabole Wirkungen).

Die Wirkung der Androgene auf das Gefäßsystem ist sehr umstritten. Diskutiert wird der Einfluß der Androgene auf die endothelialen Funktionen, den Fettstoffwechsel und antioxidative Prozesse.

Androgene wirken antagonistisch auf die estrogenabhängige Erhöhung des HDL-Cholesterinspiegels, aber senken die Triglyzeride [135]. Verschiedene Tierexperimente zeigten, daß Testosteron und DHEA einen atheroprotektiven Effekt bei männlichen Versuchstieren besaßen, wobei bei einem Teil der weiblichen Tiere eine Zunahme der Atherosklerose zu beobachten war [12, 32].

Die Wirkungen von Testosteron auf das kardiovaskuläre Erkrankungsrisiko sind schwer zu bewerten, da sie sehr widersprüchlich sind und davon abhängen, ob sie durch endogenes oder exogenes Testosteron vermittelt werden. Exogenes Testosteron hat auf verschiedene Risikofaktoren, wie z.B. das Lipoprotein (a), Insulin, Fibrinogen u.a., tiefgreifendere Wirkungen. Testosteron kann die Vasodilatation oder Vasokonstriktion mittels endothelabhängiger oder -unabhängiger Mechanismen und durch genomische oder nichtgenomische Wirkungsvermittlung steuern. Diese Wirkungen variieren in Abhängigkeit von der Spezies, Geschlecht, Erkrankung und vor allem der eingesetzten Dosis [163]. In der Summe sprechen die gegensätzlichen Ergebnisse, die durch Unterschiede bezüglich der Dosis und der Quelle der Androgene nur teilweise erklärt werden können, gegen einen sinnvollen Einsatz von Testosteron bei Atherosklerose [168].

DHEA hemmt den lysosomalen Cholesterintransport und senkt andererseits den Cholesterinesterzyklus [151]. Entgegen dem bereits eher negativen Einfluß der Androgene auf die Glukosetoleranz, vermutet man bei DHEA einen günstigen Effekt. DHEA verhindert den oxidativen Abbau von LDL-Cholesterin.

### 1.4.2.3 Hormonersatztherapie

Hormonelle Veränderungen in Abhängigkeit vom Alter treten nicht nur bei Frauen, insbesondere während der Menopause, auf, sondern auch bei Männern. Aufgrund des langsam stattfindenden Rückgangs der Androgenproduktion beim alternden Mann ist es viel schwieriger, hormonellbedingte Veränderungen festzustellen und gezielt zu therapieren.

Bei Frauen ist eine Androgentherapie nicht immer mit unerheblichen Nebenwirkungen (Virilisierung, Proliferationshemmung des Endometriums etc.) verbunden. Daher wird diese derzeit kontrovers beurteilt [38, 65].

### 1.5 Estronsulfat (E1S) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS)

Estronsulfat zirkuliert als inaktives Estrogen in großen Mengen im Blutplasma und kann jederzeit in seine biologisch aktive Form umgewandelt werden [106, 133]. Die E1S-Konzentration ist geschlechtsspezifisch unterschiedlich. Außerdem variiert sie bei Frauen während des Menstruationszyklus [133].

Freie Estrogene werden mit Hilfe der Sulfotransferase [80, 145] in wasserlösliche, besser an albuminbindende Transport- oder Ausscheidungsformen überführt. Dabei verlieren sie ihre Fähigkeit, an den klassischen ER zu binden, haben aber eine relativ hohe Halbwertszeit. E1S-Serumkonzentrationen sind 10fach höher als die von Estron oder Estradiol [134].

Mit Hilfe der Sulfotransferase erfolgt z.T. in der NNR, aber auch in der Leber die Sulfokonjugation von DHEA zu DHEAS, welches das meist zirkulierende Steroid des Menschen und der Primaten ist [85].

Durch die Abspaltung des Konjugats mit Hilfe der Steroidsulfatase werden Estrogene bzw. Androgene wieder bioverfügbar.

Der Transport sulfatierter Steroidkonjugate (z.B. E1S, DHEAS) durch die Zellmembran ist carrier-vermittelt. Steroidsulfate wurden als Substrate der Mitglieder 2er organischer Anionentransporter Genfamilien: der OATPs (organic anion transporting polypeptide superfamily) und der OATs (organic anion transporter family) [1, 50, 117, 148, 150] identifiziert.

### 1.5.1 Steroidsulfatase

Beim Menschen werden 2 große Gruppen von Arylsulfatasen unterschieden, die jeweils in der subzellulären Lokalisation, in den physikochemischen Eigenschaften und in der Substratspezifität differieren [28, 35]. Zu Typ I zählt man die Arylsulfatase C und Typ II umfaßt Arylsulfatase A und B. Neben der Bezeichnung Arylsulfatase C [141, 158] kann man in der Literatur ebenfalls die Bezeichnung Steroidsulfatase [22, 23], Sterylsulfatase [25, 26], Estronsulfatase [8, 34] und Estrogensulfatase [24] finden. Allerdings ist derzeit noch unklar, ob es sich bei der Summe dieser Bezeichnungen nicht um ein und das selbe Enzym handelt. Chang et al.1990 [16] vermuten, daß die Arylsulfatase C und Steroidsulfatase Isoformen, die s- (slow) und f- (fast) Form, von ein und dem selben Enzym stammen. Daniel et al.1990 [22] zeigten, daß die plazentare Arylsulfatase und Steroidsulfatase biochemisch und immunologisch identisch sind zu der hepatischen Steroidsulfatase. Im Gegensatz dazu steht, daß die hepatische Arylsulfatase C ein Protein ist, dessen katalytische und strukturelle Eigenschaften sich von den genannten Enzymen unterscheiden.

#### 1.5.1.1 Arylsulfatase Typ I und II

Zum Typ II zählen die löslichen, lysosomalen Arylsulfatasen A und B [28]. Arylsulfatasen A hydrolysieren vor allem Cerebrosid Sulfatide [15, 90]. Dermatansulfate und verwandte Mucopolysaccharide werden von den Arylsulfatasen B hydrolysiert [15]. Es werden keine Steroidsulfate metabolisiert.

Die Arylsulfatase C gehört zum Typ I und ist ein unlösliches, membrangebundenes Enzym [109, 132]. Aufgrund unterschiedlicher Laufgeschwindigkeiten bei der Gelelektrophorese konnten 2 verschiedene Formen, die s- und die f-Form identifiziert werden [15].

Nur die s-Form der Arylsulfatase C kann Steroidsulfate hydrolysieren [16]. Estronsulfat, Pregnenolonsulfat, DHEAS und Cholesterinsulfat sind natürliche Substrate der s-Form des Enzyms, wobei das E1S die höchste Aktivität zeigte [35, 95, 132]. In der Plazenta hat das DHEAS [27] die größte physiologische Bedeutung, während in den Fibroblasten der Haut das Cholesterinsulfat die höchsten Konzentrationen in vivo zeigte [9, 33]. Ebenfalls konnte die s-Form in der NNR, dem Skelett- und Herzmuskel, Schilddrüse und in der Milz exprimiert werden [102].

Das Substrat der f-Form ist ausschließlich das Methylumbelliferylsulfat [15]. In der Niere, Pankreas und Lebergewebe wird hauptsächlich die f-Form exprimiert [102].

Die s- und f-Form werden gewebespezifisch (Lunge, Ovarien, Testis, Intestinum) exprimiert [16, 141] und es gibt Hinweise, daß sie sich im Molekulargewicht, der Substratspezifität, dem pH-Optimum und der Thermostabilität unterscheiden [141, 142].

Neueste Erkenntnisse zeigten die mRNA Expression der Steroidsulfatase in den VSMCs von Patienten mit atherosklerotisch veränderter Aorta [106].

Ein Sulfatasemangel ist verbunden mit einer Vielzahl biochemischer Veränderungen im Gewebe. Während der Schwangerschaft kann ein Enzymmangel in der Plazenta zu Verzögerungen in der Wehentätigkeit führen [109, 152]. Bei Kindern ist ein Steroidsulfatasedefizit verbunden mit dermatologischen Veränderungen (Ichthyosis) [165].

### 1.5.2 Hydroxysteroiddehydrogenasen (HSDs)

Die HSDs werden entweder der Proteinfamilie der Short-Chain-Alkoholdehydrogenasen (SCAD) ( $3\beta$ -HSD/Ketosteroid Isomerasen,  $11\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD) zugeordnet oder sie gehören der Gruppe der Aldo-Keto-Reduktasen (AKR) an. Zu der Familie der AKR gehören zahlreiche Oxidoreduktasen ( $3\alpha$ -/ $\beta$ -HSD,  $17\beta$ -HSD,  $5\beta$ -Reduktase) [114].

#### 1.5.2.1 $17\beta$ -HSDs

$17\beta$ -HSDs steuern die Aktivierung und Inaktivierung von Androgenen und Estrogenen. Diese Isoenzyme unterscheiden sich in ihrer zellspezifischen Expression, Substratspezifität und im Regulationsmechanismus.  $17\beta$ -HSD-Isoenzyme katalysieren Oxidations- oder Reduktionsvorgänge und regulieren damit reversibel die Umsetzung der 17-Ketosteroide (z.B. DHEA, Androstendion, Estron) in 17-Hydroxysteroiden (z.B. Androstendiol, Testosteron, Estradiol). Estrogene und Androgene zeigen in der  $17\beta$ -Hydroxyform die höchste Aktivität zu ihrem Rezeptor. Derzeit sind insgesamt 11 verschiedene Isoenzyme bekannt, deren Nomenklatur in Abhängigkeit von der Reihenfolge der Entdeckung erfolgte [73, 113].

### 1.5.2.2 3 $\beta$ -HSDs

Das membrangebundene Enzym 3 $\beta$ -HSD katalysiert einen essentiellen Schritt in der Umwandlung von allen 5-Pregnen-3 $\beta$ -ol und 5-Androsten-3 $\beta$ -ol Steroiden in  $\Delta^4$ -3-Ketosteroide (Progesteron). 3 $\beta$ -HSD sind ebenfalls verantwortlich für die Umwandlung von 3 $\beta$ -Hydroxy- und 3-Keto-5 $\alpha$ -Androstan Steroiden. In der NNR spielen die 3 $\beta$ -HSDs eine Schlüsselrolle bei der Bildung von Gluko- und Mineralkortikoiden [114]. 3 $\beta$ -HSD Isoformen wurden auch beim Menschen bestätigt [71]. Ein Enzymmangel in seiner strengsten Form führt zu einer Blockade der Steroidgenese in der NNR und in den Gonaden, was bei Männern zu Pseudohermaphroditismus und bei Frauen zur Virilisierung führt [114].

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Untersuchungsmaterial

Für die Untersuchungen wurde humanes Herzgefäßgewebe verwendet, welches von der Klinik und Poliklinik der Herz- und Gefäßchirurgie in Bonn zur Verfügung gestellt wurde.

Es wurden 2 Arten von Versuchen durchgeführt:

- 1) mit frisch entnommenen Aortengewebe und/oder
- 2) mit humanen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs).

Zu 1) Das verwendete Material für die Versuche mit Aortengewebe stammte von insgesamt 9 Patienten (4 Frauen; Alter:  $47,5 \pm 8,2$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM Jahre; davon 2 mit Marfan-Syndrom: Alter: 37, 41 Jahre / 5 Männer; Alter:  $62,2 \pm 7,4$  Mittelwert  $\pm$  SEM Jahre; bei 2 weiteren Patienten bestand klinischer Verdacht auf ein Marfan-Syndrom: Alter: 36, 79 Jahre). Das Gewebe mußte wegen eines Aortenaneurysmas reseziert werden.

Zu 2) Für die Kultivierung der VSMCs wurde Gewebe der Aorta und der Arteria mammaria interna (Brustwandschlagader) eingesetzt. Die Resektion des Gewebes erfolgte aufgrund verschiedenster Krankheitsbilder: Aortenvitien, Mitralvitien, Tricuspidalvitien, Aortenklappenstenose, Aortenklappenendokarditis, Aneurysmen der Aorta ascendens, Aorta thoracalis und/oder abdominalis. Die Gewebestücke stammten von insgesamt 16 Patienten (Aorta: 3 Frauen; Alter:  $70 \pm 8,9$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM Jahre / 7 Männer; Alter:  $59 \pm 4,0$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM Jahre und A. mammaria: 1 Frau; Alter 70 Jahre / 5 Männer; Alter:  $60 \pm 2,3$ ; Mittelwert  $\pm$  SEM Jahre).

Das entfernte Gewebe, welches sonst verworfen worden wäre, konnte mit schriftlicher Einwilligung der Patienten für die Versuche verwendet werden.

Mit Hilfe der Patientenberichte konnte zudem ein umfassender Überblick über folgende Parameter erstellt werden:

Tabelle 1: Gewebeart und -herkunft, Geschlecht und Alter der Patienten (Abbildung 2), klinische Daten (Diagnose) und Hormonbehandlung;

Tabelle 2: Cholesterin-, Triglyzerid-, (Abbildung 3) Blutdruckwerte und BMI (Body-Mass- Index).

Tabelle 1:

Zusammenstellung der Patientendaten (Gewebeherkunft, Geschlecht und Alter der Patienten, klinische Daten, Hormonbehandlung).

\* Aorta ascendens; KHK (koronare Herzkrankheit); \*\* L-Thyroxin ; \*\*\* Livielle

Herkunft des Gewebes	Geschlecht (weiblich: w; männlich: m)	Alter (Jahre) (Mittelwert $\pm$ SEM)	Klinische Daten	Hormonbehandlung
1) Aortengewebe*				
Aorta (1)	w	37	Marfan-Syndrom, Aneurysma der Aorta ascendens	ja**
Aorta (2)	w	41	Marfan-Syndrom, Aneurysma der Aorta thorakalis-abdominalis	ja***
Aorta (3)	w	40	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (4)	w	72	Aneurysma der Aorta ascendens, Aortenvitium	nein
		<b>47,5 <math>\pm</math> 8,2</b>		
Aorta (5)	m	57	Aneurysma der Aorta ascendens, Aortenklappenstenose	nein
Aorta (6)	m	69	Aneurysma der Aorta ascendens, Aortenvitium	nein
Aorta (7)	m	79	Marfan-Syndrom(?), Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (8)	m	36	Marfan-Syndrom(?), Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (9)	m	70	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
		<b>62,2 <math>\pm</math> 7,4</b>		
2) VSMCs				
a) Aorta				
Aorta**(10)	w	52	Aneurysma der Aorta thorakalis	nein
Aorta (11)	w	76	Aortenvitium	nein
Aorta (12)	w	81	Aorten-, Mitral-, Tricuspidalvitium	nein
		<b>70 <math>\pm</math> 8,9</b>		
Aorta (13)	m	38	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (14)	m	55	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (15)	m	59	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (16)	m	61	Aortenvitium	nein
Aorta (17)	m	63	Aortenvitium, Parkinson – Syndrom	nein
Aorta (18)	m	68	Aneurysma der Aorta ascendens	nein
Aorta (19)	m	70	Aortenvitium	nein
		<b>59 <math>\pm</math> 4,0</b>		
b) Arteria mammaria				
A. mammaria (20)	w	70	Bypassoperation wegen koronarer Herzerkrankung Aortenvitium	ja**
A. mammaria (21)	m	51	koronare 3 Gefäßerkrankung	nein
A. mammaria (22)	m	60	Aortenklappenendokarditis, Diabetes mell. Typ II	nein
A. mammaria (23)	m	61	koronare 3 Gefäßerkrankung	nein
A. mammaria (24)	m	63	Aortenvitium, Parkinson – Syndrom	nein
A. mammaria (25)	m	64	koronare 3 Gefäßerkrankung	nein
		<b>59,8 <math>\pm</math> 2,3</b>		

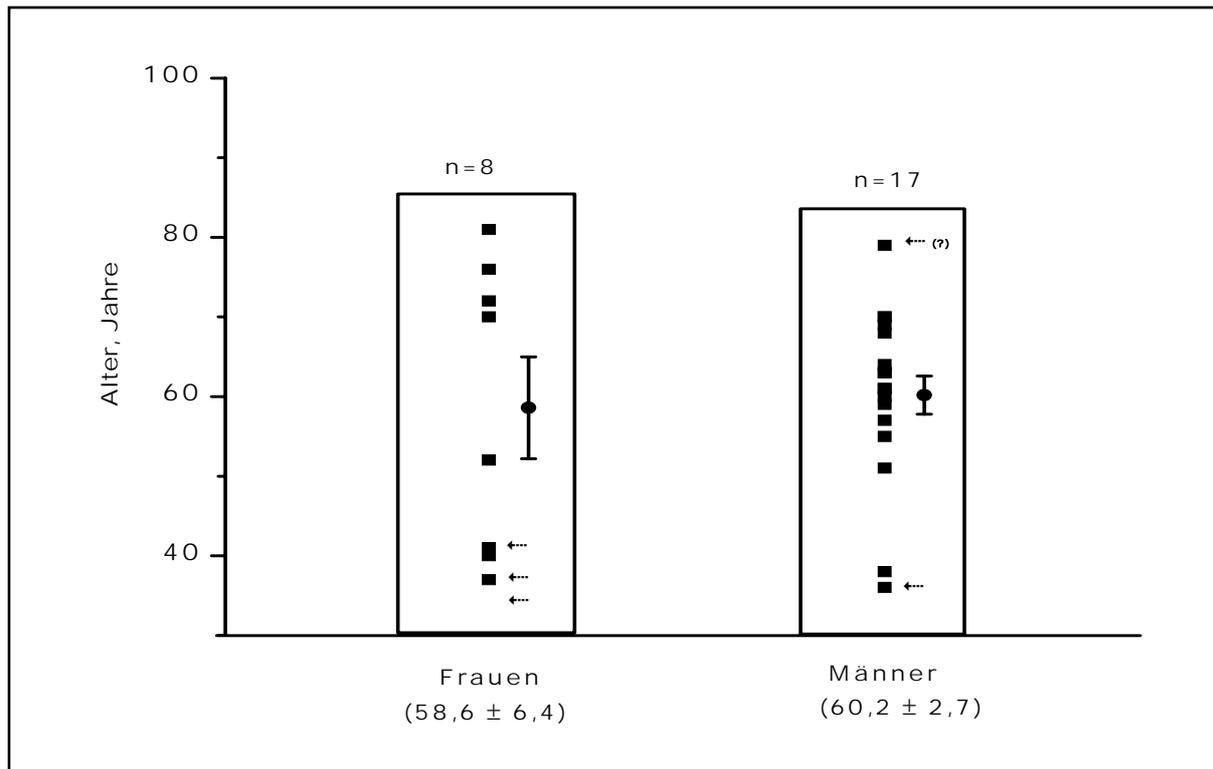


Abbildung 2:

Gegenüberstellung der Geschlechts- und Altersverteilung der untersuchten Patienten ( ←..... Patienten mit Marfan-Syndrom).

Tabelle 2:

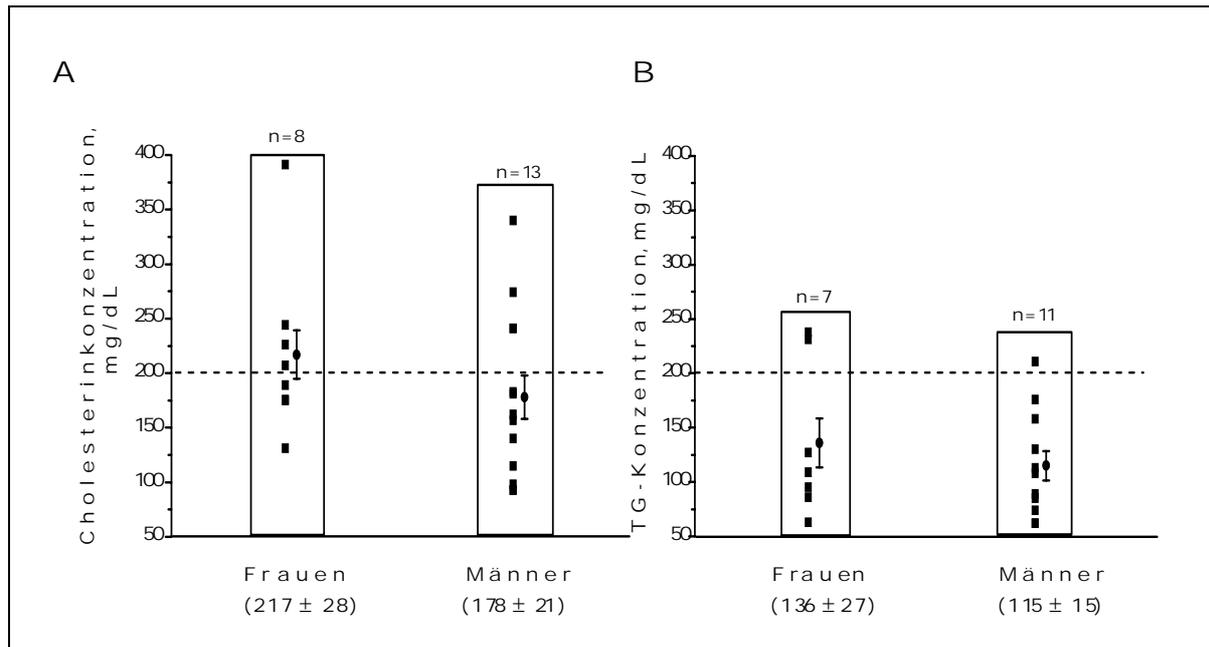
Darstellung der Cholesterin-, Triglyzerid-, Blutdruckwerte und des BMI der untersuchten Patienten; n.b.= nicht bekannt.

<sup>1</sup>Soll-Wert:  $\leq 200$  mg/dL Plasmakonzentration;

<sup>2</sup>Soll-Wert: Systolischer Wert  $< 140$  mmHg; Diastolischer Wert  $< 85$  mmHg

<sup>3</sup>BMI differiert in Abhängigkeit vom Alter; [9, 162]

Patienten Nr. (s. Tabelle 1)	Cholesterin- werte <sup>1</sup> (mg/dL)	Triglyzerid- werte <sup>1</sup> (mg/dL)	Blutdruck- werte <sup>2</sup> (mm Hg)	BMI <sup>3</sup>
1) Aortengewebe				
(1)	176	95	n.b.	23
(2)	244	n.b.	150 / 95	23
(3)	189	63	n.b.	27
(4)	226	86	n.b.	27
(5)	n.b.	n.b.	130 / 80	32
(6)	115	89	n.b.	28
(7)	n.b.	n.b.	n.b.	28
(8)	98	108	140 / 70	28
(9)	n.b.	n.b.	n.b.	n.b.
2)VSMCs				
a) Aorta				
(10)	131	231	150 / 80	n.b.
(11)	391	238	180 / 95	38
(12)	175	127	n.b.	n.b.
(13)	241	n.b.	n.b.	30
(14)	183	74	165 / 95	27
(15)	274	113	n.b.	26
(16)	n.b.	n.b.	n.b.	24
(17)	93	62	130 / 55	26
(18)	241	211	130 / 75	30
(19)	157	85	150 / 70	28
b) Arteria mammaria				
(20)	207	109	150 / 80	n.b.
(21)	162	158	170 / 90	37
(22)	140	176	110 / 36	26
(23)	340	130	140 / 80	27
(24)	93	62	130 / 55	n.b.
(25)	181	n.b.	130 / 80	23



**Abbildung 3:**

Gegenüberstellung der A. Cholesterin - und B. Triglyzeridwerte (TG) bei einem Teil der untersuchten Patienten in Abhängigkeit vom Geschlecht (-----Grenzwerte).

### 2.1.2 Chemikalien / Substanzen / Steroide

#### 1) Chemikalien

- DOC	Merck, Darmstadt
- EDTA	Merck, Darmstadt
- Folin-Ciocalteus (Folinreagenzlösung)	Merck, Darmstadt
- Mowiollösung	Hoechst, Frankfurt
- Szintillationsflüssigkeit (Ultima Gold™)	Packard Bioscience, Groningen (NL)
- TritonX-100-Lösung	Merck, Darmstadt
- Tween 20-Lösung	Merck, Darmstadt

#### 2) Substanzen

- BSA	Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Anti-Mäuse-Immunglobulin F (ab) 2, FITC (2. Antikörper)	Dako, Hamburg
- FCS	Cytogen, Ober-Mörlen
- MEM	Gibco Life Technologies, Karlsruhe

- monoklonaler Anti  $\alpha$ -Smooth Muscle Actin (1. Antikörper) Sigma, Taufkirchen
- Nichtessentielle Aminosäuren (L-Alanin, L-Asparagin, L-Asparaginsäure, Glycin, L-Prolin, L-Serin) Gibco Life Technologies, Karlsruhe
- Penicillin Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- PBS-Puffer Biochrom, Berlin
- Streptomycin Sigma-Aldrich, Taufkirchen
- Tricine-Puffer Sigma-Aldrich, Steinheim
- Trypsin Gibco, Eggenstein

### 3) Steroide

#### *markierte Steroide*

- [7-<sup>3</sup>H] DHEAS (16 Ci/mmol)
- [1,2,6,7-<sup>3</sup>H] DHEAS (74 Ci/mmol)
- [6,7-<sup>3</sup>H] E1S (40 - 46 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] Androstendion (47 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] DHEA (47 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] Estron (51,3 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] Estradiol (52 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] Androstendion (47 mCi/mmol)
- [4-<sup>14</sup>C] Testosteron (48 mCi/mmol) Perkin Elmer, Boston (USA)

#### *nichtmarkierte Steroide*

- Androstendion, DHEA, Estron, Estradiol, Testosteron Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Cholesterolsulfat, DHEAS, Estradiol-sulfat, Estriolsulfat, E1S, Hydrocortison-sulfat, Methylumbelliferylsulfat, Pregnenolonsulfat, Testosteronsulfat Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Estronazetat, Estradiolazetat Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim
- Estronsulfamat (EMATE) Sigma, Deisenhofen

### 2.1.3 Puffer und Lösungen

#### Kulturmedium (pH 7,4)

- 500 ml MEM (+ L-Glutamin; +/- Phenolrot)
- 2,5 ml Penicillin (10000 Units/ml) / Streptomycin (10000 µl/ml)
- 10 ml Tricine Puffer (pH 7,4; 1M)
- 5 ml Nichtessentielle Aminosäuren

#### Trypsin / EDTA-Lösung (pH 7,4)

- 0,14 % Trypsin
- 0,07 % EDTA

#### Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4)

- 100 ml NaCl (0,9%)
- 4 ml KCl (1,15%)
- 1,5 ml CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O (1,62%)
- 1 ml MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O (3,82%)
- 20 ml Phosphatpuffer (0,1M), (NaH<sub>2</sub>P0<sub>4</sub> :Na<sub>2</sub>HP0<sub>4</sub>)

Tabelle 3:

Schema für die Herstellung der verwendeten Pufferlösungen (pH-Werte: 4,5 - 9,0).

pH-Werte	Substanzen				
	Trizma Citrat (2 M) (ml)	Trizma-base (mg)	Tris-HCl (mg)	NaOH(1N) ( $\mu$ l)	H <sub>2</sub> O (ml)
4,5	0,79	126	-	-	10
5,5	0,79	270	-	-	10
6,5	0,79	350,9	-	-	10
7,0	-	8	68,5	-	10
7,4	-	-	100	90	50
8,0	-	37	30,7	-	10
8,5	-	51,3	12,3	-	10
9,0	-	54,7	7,6	-	10

TEG - Lösung (pH 7,4)

20 mM Tris - HCl  
1,5 mM EDTA  
10 % Glycerol

Färbemittellösung

200 ml CH<sub>3</sub>-COOH  
2 ml C<sub>8</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>  
4 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (100%)

Reagenz A

2 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>  
0,1 N NaOH

Reagenz B

0,5 % CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O  
1 % C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>KNaO<sub>6</sub> · 4H<sub>2</sub>O

### 2.1.4 Geräte und Hilfsmittel

- Analysenwaage	Mettler Waagen GmbH, Germany
- Fluoreszenzmikroskop	Orthoplan, Leitz Wetzlar
- Sartorius-Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
- $\beta$ -Szintillationszähler ( $\beta$ -Counter)	Packard Bioscience, Groningen (NL)
- Spektrophotometer	Shimadzu Corporation, Japan
- Zellzuchtwerkbank (Laminar Flow Hood)	Bio-Flow Technik, Germany
- Kieselgel-Dünnschichtchromatographie-Fertigfolie (DC-Folie; Polygram Sil-G bzw. Sil-G Hy)	Machery und Nagel, Düren
- Szintillationsfläschchen (5 bzw. 20 ml)	Packard Bioscience, Groningen (NL)
- Zählgläschen	Wheaton, Millville (USA)
- Zellkulturschalen	Falcon Plastics, Becton-Dickinson, Heidelberg
- Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen	Becton Dickinson, Heidelberg

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Aufarbeitung und Zellkultivierung

#### *1) Aufarbeitung für die Untersuchungen mit Aortengewebe*

Die Aufarbeitung des frisch resezierten Aortengewebes wurde nach der Methode von Ross 1971 durchgeführt [129]. Unmittelbar nach der operativen Entnahme des Gewebes (Aortenaneurysma) wurde dieses in eine mit eiskalter isotonischer Kochsalzlösung gefüllte Petrischale gegeben (Abbildung 5). Das Gewebe wurde von Blutgerinnseln und Fettauflagen befreit. Mit Hilfe eines Skalpell wurde die äußerste Schicht (Adventitia) abgetrennt und der Rest des Gewebes in etwa 3 - 4 mm kleine Stücke geschnitten. Die Proben wurden als Vorbereitung für die vorgesehenen Untersuchungen auf einer Analysenwaage gewogen.



Abbildung 5:

Vorbereitung eines Aortenstückes (Aortenaneurysma) in eiskalter, isotonischer Kochsalzlösung auf Eis für die Untersuchungen mit Aortengewebe.

### *2) Kultivierung menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen (VSMCs)*

Die Kultivierung der Zellen wurde nach einer Methode von Jones et al. 1996 [62] durchgeführt.

Die notwendigen Arbeiten für die Zellkultivierung erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Zellzuchtwerkbank, welche einen horizontalen, laminaren, sterilfiltrierten Luftstrom gewährleistet. 60 x 15 mm große mit Polystyrene beschichtete Zellkulturschalen wurden für die Kultivierung der glatten Gefäßmuskelzellen eingesetzt.

Nach der Resektion des Gewebes erfolgte die Vorbereitung für die Zellkultur. Das Gewebe wurde in eine mit PBS-Puffer versehene Petrischale gegeben und analog wie im Punkt 1 (Aneurysma) vorbereitet. Für die Kultivierung menschlicher glatter Gefäßmuskelzellen wurde die Muskularis (glatte Muskulatur), welche sich zwischen der Elastika interna und Elastika externa befindet, präpariert und in etwa 3 - 4 mm gleichgroße Stücke zerteilt. Mit einer Injektionsnadel wurden die Stückchen in die Kulturschalen verteilt und mit jeweils 4 ml einer sterilen Lösung (Kulturmedium), bestehend aus Minimum Essential Medium (MEM), Penicillin, Streptomycin, Tricine-Puffer, nichtessentiellen Aminosäuren und 20%igem FCS gefüttert. Unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 85% relative Luftfeuchtigkeit) wurden die Zellkulturschalen im Inkubator aufbewahrt. Nach ca. 5 Tagen und weiterhin einmal wöchentlich wurde das Medium abgesaugt und durch neues ersetzt (4 ml MEM + 10% FCS). Der Zeitraum bis zum Erreichen der Konfluenz der

ausgesproßten Zellen variierte in Abhängigkeit von den verpflanzten Geweben und betrug durchschnittlich 8 - 10 Wochen. Die Gewebestücke wurden mit einer Pasteurpipette entfernt. Bei einem Konfluenzstadium von 60 - 80% erfolgte die Subkultivierung der Zellen.

Das Medium wurde entfernt und die Zellen mit je 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach Entfernen des Puffers wurden die Zellen mit jeweils 0,3 ml Trypsin /EDTA-Lösung versehen und bei 37°C fünf Minuten inkubiert. Die gelösten Zellen waren im Mikroskop als kugelähnliche sich schnell bewegende Formationen sichtbar. Sofort nach dem Erreichen dieses Stadiums wurden die Zellen im Medium mit 20% FCS resuspendiert, was gleichzeitig den Prozeß der Trypsinierung stoppte. Die im Medium befindlichen Zellen wurden zügig in die vorgesehenen Schalen verteilt und mit ca. 4 ml Medium + 20% FCS gefüttert. Fortan erfolgte zweimal wöchentlich der Mediumwechsel (Medium + 10% FCS) und bei einem Konfluenzstadium von 60 – 80% die Subkultivierung der Zellen. Die für die Untersuchungen eingesetzten Zellen waren bis auf wenige Ausnahmen (n= 6; 6./7.Passage) in der dritten bis fünften Passage.

### **2.2.2 Zellcharakterisierung ( $\alpha$ -Aktinbestimmung)**

Die  $\alpha$ -Aktinbestimmung in den VSMCs erfolgte unter standardisierten Bedingungen [79, 156]. Das erforderliche Zellmaterial wurde auf gereinigten Deckgläschen, welche sich in einer Zellkulturplatte mit 24 Vertiefungen befanden, gezüchtet. Als Referenz für die Untersuchungen dienten einerseits Gefäßmuskelzellen mit positiver  $\alpha$ -Aktinlokalisierung (Positivkontrolle) und andererseits menschliche knochenähnliche Zellen (hOB-Cells) als Negativkontrolle. Nachdem die Zellen das Stadium der Konfluenz (Inkubation bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 95% Luftfeuchtigkeit) erreicht hatten, wurden diese nach Entfernung des Wachstumsmediums (MEM + FCS) mehrmals in PBS-Puffer gewaschen.

Die Fixierung der Zellen erfolgte mit 2%iger Formaldehydlösung 3 Minuten bei Raumtemperatur. Diese Reaktion wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-Puffer beendet.

Die Inkubation der Zellen mit einer 0,2%igen TritonX-100-Lösung führte zur einer gesteigerten Durchlässigkeit der Zellen/Zellwand für den ersten Antikörper. Dieser Vorgang der Permeabilisierung wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS und

durch die Zugabe einer 2%igen BSA-Lösung gestoppt. Nach einer Inkubationszeit von 1 - 2 h bei 4°C wurde die BSA-Lösung entfernt und der 1. Antikörper (Verdünnung 1:200) zugegeben. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Die Zellen wurden 3 x 10 Minuten mit einer 0,15%igen Tween 20-Lösung gewaschen. Anschließend wurde der 2. Antikörper (Verdünnung 1:20) zugegeben.

Nach einstündiger Inkubation bei 4°C in einer feuchten Kammer wurden die Zellen 3 x 10 Minuten mit einer 0,15%igen Tween 20-Lösung gewaschen.

Für die Fluoreszenzmikroskopie wurden die Deckgläschen mit der bewachsenen Seite auf einen mit Mowiolösung versehenen Objektträger präpariert. Die spezifische Lokalisierung der Aktinfilamente in den glatten Gefäßmuskelzellen erfolgte bei einer Wellenlänge von 495 nm (Emission: 525 nm) im Fluoreszenzmikroskop.

### **2.2.3 Nachweis der Enzymaktivität und Steroidbildung im Aortengewebe und in den VSMCs**

Aortengewebe und VSMCs wurden mit [<sup>3</sup>H]E1S und/oder [<sup>3</sup>H]DHEAS inkubiert, die entstandenen Metabolite extrahiert und chromatographisch aufgetrennt. Die quantitative Bestimmung der Metaboliten erfolgte über die Messung der Radioaktivität (<sup>3</sup>H/<sup>14</sup>C) im β-Szintillationszähler.

#### **2.2.3.1 Sulfatase - Assay**

##### *1) Stoffwechseluntersuchungen mit Aortengewebe*

Unsere Untersuchungen wurden nach einer Methode von Gant et al. 1977 [43] und Milewich et al. 1984 [95] durchgeführt.

Die präparierten Gewebestückchen (ca. 20 - 30 mg) wurden in 16 x 100 mm große Glasröhrchen übertragen, die 1 ml Substratlösung (Krebs-Ringer-Phosphat-Puffer (pH 7,4; 5 mM Glucoselösung); Substrat: [<sup>3</sup>H]E1S bzw. [<sup>3</sup>H]DHEAS) enthielten. Für die Versuche wurden markierte Substanzen mit einer Reinheit von > 90% verwendet. Die Konzentration des eingesetzten Substrats war abhängig von der Versuchsart. Es wurden folgende Untersuchungen am Aortengewebe durchgeführt:

- a) Inkubation in Abhängigkeit von der Zeit (Time Course) mit einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 5, 10, 15, 30, 60 und 120 Minuten.
- b) Untersuchung des Einflusses von Estronsulfamat auf die Enzymaktivität der Sulfatase. Für die Untersuchungen wurde für E1S eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S und 0,9  $\mu\text{M}$  nichtmarkiertes E1S) und für Estronsulfamat Endkonzentrationen von 0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  gewählt. Die Proben wurden 30 Minuten inkubiert.
- c) Untersuchung des Einflusses verschiedener Steroidsulfate auf die Enzymaktivität der Sulfatase. Für die Untersuchungen wurde für E1S bzw. DHEAS eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. [ $^3\text{H}$ ]DHEAS und 0,9  $\mu\text{M}$  nichtmarkiertes E1S bzw. DHEAS) und für die Steroidsulfate (E1S, Testosteronsulfat, DHEAS, Methylumbelliferylsulfat, Pregnenolonsulfat, Cholesterolsulfat, Estriolsulfat, Estradiolsulfat, Hydrocortisonsulfat) von  $2 \times 10^{-5}$  M (20  $\mu\text{M}$ ) gewählt. Die Proben wurden 30 Minuten inkubiert.

Alle Versuche mit Aortengewebe wurden im Duplikat durchgeführt. Die Proben wurden bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Die Reaktion wurde beendet, indem man die Proben auf Eis stellte. Die Proben wurden zunächst im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Zur Inkubationslösung wurden

- nach der Inkubation mit E1S : 11000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ] Estron und  
6000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ] Estradiol bzw.
- nach der Inkubation mit DHEAS : 6000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ] DHEA,  
6000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ] Androstendion,  
6000 dpm [ $^{14}\text{C}$ ] Testosteron

als Wiederfindungsstandards zugegeben und mit einem Vortex-Schüttelmixgerät für eine Minute gemischt. Die Extraktion der Steroide erfolgte durch die Zugabe von je 5 ml  $\text{CHCl}_3$ . Nach der Zugabe von 0,5 ml destilliertem Wasser und 10 minütigem Mischen wurden die Proben bei 2000 rpm, 15 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Mit einer Pasteurpipette wurde die organische Phase in 25 x 150 mm große Glasröhrchen übertragen. Die Extraktion erfolgte mit insgesamt 15 ml  $\text{CHCl}_3$ . Nach der Extraktion wurden die Proben 5 x mit jeweils 5 ml destilliertem Wasser gewaschen. 100  $\mu\text{l}$  des

gewaschenen Extraktes wurde für die Bestimmung der Hydrolyserate (Sulfataseaktivität) in 6 ml große Szintillationsfläschchen pipettiert, eingedampft ( $N_2$ ) und mit 5 ml Szintillationsflüssigkeit aufgefüllt. Für die Bestimmung der Konzentration der entstandenen Einzelmetaboliten wurden für die chromatographische Auftrennung (s. 2.2.3.2) 500  $\mu$ l des gewaschenen Extraktes eingesetzt. Die Messung der Radioaktivität ( $^3H/^{14}C$ ) der Proben erfolgte im  $\beta$ -Szintillationszähler.

### 2) Stoffwechseluntersuchungen mit VSMCs

Entsprechend der Versuchsart erfolgte die Inkubation mit der Substratlösung (+/- Substanzen) in *intakten Zellmonolayer* oder *Homogenaten von VSMCs*.

#### *Intakte Zellmonolayer.*

Einen Tag vor Beginn der Untersuchungen wurde das Medium, welches mit FCS angereichert war (10%ig), abgesaugt und die konfluierenden Zellrasen mit 2 ml PBS-Puffer gewaschen. Nach dem Absaugen des Puffers wurden die Zellen mit 2 ml MEM (ohne FCS) gefüttert.

Am Tag des Versuches wurden die radiomarkierten Substanzen, [ $^3H$ ]E1S im phenolrotfreien und [ $^3H$ ]DHEAS im phenolrotgefärbten MEM (ohne FCS) gelöst. Dazu wurden die markierten Steroide in ein Flachbodenglas pipettiert und eingedampft ( $N_2$ ). Nach Zugabe des errechneten MEM-Volumens (s. Versuchsdurchführung), wurde die Substratlösung 30 Minuten bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Alle Proben wurden im Duplikat untersucht. Je Zellkulturschale (Durchmesser: 35 mm) wurde 1 ml Substratlösung pipettiert. Folgende Untersuchungen wurden durchgeführt:

- a) Inkubation in Abhängigkeit von der Zeit (Time Course) mit einer Endkonzentration von 0,05  $\mu$ M [ $^3H$ ]E1S bzw. [ $^3H$ ]DHEAS. Die Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 2, 4, 6, 8, 10 und 24 Stunden.
- b) Inkubation in Abhängigkeit von der Substratkonzentration mit den Endkonzentrationen 0,05; 0,1; 0,25; 0,5; 1; 2,5; 5; 10; 15; 20 und 30  $\mu$ M. Für die beiden niedrigsten Konzentrationen wurde ausschließlich markiertes Substrat ([ $^3H$ ]E1S bzw. [ $^3H$ ]DHEAS) verwendet, ab einer Konzentration von 0,25  $\mu$ M wurde 0,1  $\mu$ M markierte Substanz mit der nichtmarkierten Substanz E1S bzw. DHEAS

auf die entsprechende Endkonzentration verdünnt (Verdünnungen: 1:2,5; 1:5; 1:10; 1:25; 1:50; 1:100; 1:150; 1:200; 1:300). Die Inkubation erfolgte jeweils über einen Zeitraum von 6 Stunden.

c) Untersuchung des Einflusses von Estronsulfamat auf die Sulfataseaktivität.

Für die Untersuchungen wurde für E1S bzw. DHEAS als Substrat eine Endkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  (0,1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. DHEAS und 0,9  $\mu\text{M}$  nichtmarkiertes E1S bzw. DHEAS) und für den Hemmer eine Endkonzentrationen von 0,0001; 0,001; 0,01; 0,05; 0,1 und 1  $\mu\text{M}$  gewählt. Die Proben wurden 6 Stunden inkubiert.

d) Untersuchung des Einflusses verschiedener Steroidsulfate auf die Sulfataseaktivität.

Die Konzentrationen der Substrate ([ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. DHEAS) und der Steroidsulfate wurden wie in den Untersuchungen am frisch entnommenen Aortengewebe gewählt. Die Proben wurden 4 Stunden inkubiert.

Die Inkubation erfolgte unter standardisierten Bedingungen (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, 85% relative Luftfeuchtigkeit). Die Schalen wurden nach der Inkubationszeit auf Eis gestellt, um die Reaktion zu beenden. Der Überstand der Kulturschalen wurde in 16 x 100 mm große Glasröhrchen übertragen und bei -20°C im Tiefkühlschrank aufbewahrt. Analog zur Versuchsdurchführung mit Aortengewebe erfolgte die Aufarbeitung der Proben. Die in den Schalen verbliebenen Gefäßmuskelzellen wurden 3 x mit 2 ml Tris-NaCl-Lösung (pH 7,4; 0,02  $\mu\text{M}$  Tris-NaCl) gewaschen und bei -20°C bis zur Proteinbestimmung aufbewahrt. Für die Messung der Radioaktivität ( $^3\text{H}/\text{C}^{14}$ ) der Gesamtmetabolite (Sulfataseaktivität) wurden 100  $\mu\text{l}$ /Probe und für die der Einzelmetabolite 500  $\mu\text{l}$ /Probe (siehe 2.2.3.2) eingesetzt. Die Messung der Radioaktivität ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ) der Proben erfolgte im  $\beta$ -Szintillationszähler.

### *Homogenat von VSMCs.*

Die Methode für die Herstellung eines Zellhomogenats aus VSMCs wurde nach einer Methode von Fisher et al. 1978 [40] und Milewich et al. 1984 [95] durchgeführt. Für die Untersuchungen im Zellhomogenat wurden die VSMCs einen Tag vor Beginn der Untersuchungen gewaschen und mit MEM (ohne FCS) gefüttert. Am Versuchstag wurden die Schalen auf Eis gestellt, das Medium wurde abgesaugt und die Zellen wurden 3 x mit 2 ml Tris-NaCl-Lösung gewaschen. Die Waschlösung wurde entfernt

und es wurde 2,5 ml TEG-Lösung dazugegeben. Mit einem Gummiwischer wurden die Zellen vom Boden der Schalen gelöst und mit einer Pasteurpipette in Glasröhrchen (auf Eis) übertragen. Die Zellsuspension wurde bei 2000 rpm, 10 Minuten und 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellmaterial mit ca. 2 ml Tris-Puffer (pH 7,4; 10 mM Tris-HCl) gemischt. Die Zertrümmerung der Zellen erfolgte über einen Zeitraum von 2 x 5 Sekunden bei 50 W am Ultraschallgerät. Das Homogenat wurde bei 2500 rpm, 10 Minuten und 4°C zentrifugiert.

50 µl des Homogenates wurde pro Probe für die Proteinbestimmung verwendet. Für die Untersuchungen zur Bestimmung der Sulfataseaktivität in Abhängigkeit verschiedener pH- und Temperaturwerte wurden 50 µl Homogenat/Probe eingesetzt. Alle Proben wurden im Duplikat untersucht. Das Homogenat (Verdünnung 1 : 2; 30 µg Protein/50 µl Puffer) wurde in Glasröhrchen mit 50 µl Inkubationslösung (Pufferlösung s. Tabelle 3, Substrat: [<sup>3</sup>H]E1S bzw. [<sup>3</sup>H]DHEAS) übertragen. Die Zusammensetzung der Proben erfolgte nach folgendem Schema:

- Blank → 50 µl Substratlösung  
(Leerwert) 40 µl Puffer  
10 µl Ethanol
- Kontrolle → 50 µl Substratlösung  
40 µl Homogenat  
10 µl Ethanol
- Hemmer → 50 µl Substratlösung  
40 µl Homogenat  
10 µl Hemmer (EMATE, 10<sup>-8</sup> M).

Alle Proben wurden im Duplikat untersucht. Folgende Experimente wurden durchgeführt:

a) Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher pH-Werte der Inkubationslösungen auf die Sulfataseaktivität.

Für die Versuche wurde für [<sup>3</sup>H]E1S bzw. [<sup>3</sup>H]DHEAS eine Endkonzentration von 0,1 µM/100 µl Probe verwendet. Die Pufferlösung wurde auf unterschiedliche pH-Werte (s. Tabelle 3) eingestellt. Die Proben wurden bei 37°C eine Stunde im Schüttelwasserbad inkubiert.

b) Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Inkubationstemperaturen auf die Sulfataseaktivität.

Für die Untersuchungen wurde für [<sup>3</sup>H]E1S bzw. [<sup>3</sup>H]DHEAS eine Endkonzentration von 0,1 µM/100 µl Probe verwendet. Bei allen Experimenten wurden die markierten Substanzen im Tris-HCl-Puffer pH 7,4 (s. Tabelle 3) gelöst. Die Proben wurden im Duplikat bei unterschiedlichen Temperaturen (20, 37, 60, 80°C) über einen Zeitraum von einer Stunde inkubiert.

Nach der Inkubation wurde die Reaktion beendet, indem man die Proben auf Eis stellte. Die Proben wurden bei -20°C aufbewahrt. Die weitere Bearbeitung der Proben erfolgte wie für die VSMCs beschrieben, allerdings angepaßt an das eingesetzte Probenvolumen von 100 µl:

- Extraktion → 3 x 1 ml CHCl<sub>3</sub>
- Internal Recovery Standards → 5000 dpm [<sup>14</sup>C] Estron / [<sup>14</sup>C] Estradiol bzw. 3000 dpm [<sup>14</sup>C] DHEA / [<sup>14</sup>C] Androstendion/ [<sup>14</sup>C] Testosteron
- Waschen des Extraktes → 5 x 2 ml destilliertes H<sub>2</sub>O.

Die Proben wurden, wie bereits in vorangegangenen Abschnitten beschrieben, für die Messung im β-Szintillationszähler vorbereitet.

### 2.2.3.2 Chromatographie – Identifikation der Steroide

Für die chromatographische Auftrennung wurde ein Aliquot (500 µl) des gewaschenen Extrakts entnommen und mit 25 µl einer Referenz- bzw. Trägerlösung versetzt. Die Trägerlösung bestand aus einem Gemisch nichtradioaktiv markierter Steroide. Für die Auftrennung der Estrogene wurden je 10 mg Estron, Estradiol in 10 ml Methanol und für die der Androgene je 10 mg DHEA, Androstendion, Testosteron in 10 ml Chloroform gelöst.

Das Gemisch bestehend aus Extrakt und Trägerlösung wurde eingedampft (N<sub>2</sub>), der Rückstand in 2x 50 µl CHCl<sub>3</sub> gelöst und auf eine DC-Folie (Sil-G Hy) aufgetragen. Das Laufmittel für die Trennung der Steroide bestand bei den Estrogenen aus Toluol : Ethanol (85 :15, vol : vol) und bei den Androgenen aus Dichlormethan : Ethylazetat

: Methanol (85 : 15 : 1,7, vol: vol: vol). Für die Darstellung der Steroide wurde die DC-Folie mit einer Färbemittellösung besprüht und auf einer Heizplatte (>100°C) erhitzt. Anschließend wurden die Steroide markiert und die DC-Folie wurde in je einen vertikalen Streifen pro Probe zerschnitten. Die Streifen wurden in horizontale Abschnitte zerteilt. Jeder Abschnitt entsprach der Position eines identifizierten Steroids und wurde in ein 20 ml Szintillationsfläschchen gegeben. Die verbliebenen Abschnitte zwischen den Metaboliten wurden zusammen in ein 20 ml Szintillationsfläschchen gegeben. Nach Zugabe von 10 ml Szintillationsflüssigkeit wurde im  $\beta$ -Szintillationszähler die Radioaktivität ( $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ ) der Metaboliten gemessen.

### 2.2.3.3 Messung der Radioaktivität

Die Messung der Radioaktivität von Tritium und Kohlenstoff-14 erfolgte im  $\beta$ -Szintillationszähler. Die Aktivität der spezifischen Substanz konnte mit Hilfe eines rechnerinternen Programms in dpm ausgedruckt werden. Die Zugabe der  $^{14}\text{C}$ -markierten Substanzen diente der Ermittlung der Wiederfindungsrate (recovery rate), mit deren Hilfe man nach Abzug der Leerwerte (Blanks) die Menge der gebildeten Steroide wie folgt berechnen konnte:

- Aortengewebe:  $\text{pmol} \cdot \text{mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{Zeit (min; h)}^{-1}$  und
- VSMCs :  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{Zeit (h)}^{-1}$ .

### 2.2.4 Rekristallisation

Die durchgeführten Methoden zur Rekristallisierung wurden nach Schweikert et al. 1974 modifiziert [138, 139]. Folgende Steroide wurden rekristallisiert a) Estron, Estradiol und b) DHEA.

#### Zu a) Identifikationsnachweis von Estron und Estradiol als Metaboliten von E1S

##### *Trennung und Reinigung von Estron bzw. Estradiol*

Für die Untersuchungen zur Rekristallisierung von Estron und Estradiol wurden die Chloroform Restextrakte (Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M } [^3\text{H}]\text{E1S}$ ;  $37^\circ\text{C}$ ; 24 h), welche bei  $-20^\circ\text{C}$  aufbewahrt wurden, verwendet. Die Doppelproben einer Zell-Linie wurden gepoolt, mit  $30 \mu\text{l}$  Trägerlösung (jeweils mg Estron, Estradiol / ml Methanol)

gemischt und eingedampft. Der Rückstand wurde in 50 µl CHCl<sub>3</sub> gelöst und auf eine DC-Folie (Sil G) aufgetragen. Für die Auftrennung wurde das Laufmittelsystem Chloroform : Methanol (98 : 2, vol : vol) verwendet. Zur Darstellung der Steroide wurden die Chromatographieplatten mit Wasser besprüht, die leicht sichtbaren Spots entsprechend einer Vorlage markiert und separat ausgeschnitten. Das Kieselgel wurde abgekratzt, in eine mit Glaswolle gestopfte Pasteurpipette eingesaugt und mit je 3 ml Ethylazetat eluiert. Nach der zweiten Trennung der Substanzen (Laufmittel: Dichlormethan : Ethylether (90 : 10; vol : vol)), erfolgte die Azetylierung von Estron und Estradiol. Die Eluate wurden eingedampft (N<sub>2</sub>) und mit 3 Tropfen Essigsäureanhydrid über Nacht bei Raumtemperatur azetyliert. Die Proben wurden erneut eingedampft, mit 3 x 10 Tropfen Benzol befeuchtet und getrocknet. Nach Zugabe von 30 µg Estronazetat bzw. Estradiolazetat (gelöst in Chloroform / Methanol; 1:1; vol : vol) wurden die Proben chromatographisch aufgetrennt:

- Laufmittel für Estronazetat : Isooctan : Ethylazetat (50 : 50; vol : vol);
- Laufmittel für Estradiolazetat: Isooctan : Ethylazetat (80 : 20; vol : vol).

Das Eluat wurde erneut eingedampft und jedes der isolierten Steroide wurde im Laufmittelsystem Dichlormethan : Ethylether (97 : 3; vol : vol) gereinigt.

### *Rekristallisierung*

Die Eluate der letzten Reinigung wurden in teflonverschließbaren Glasröhrchen (16 x 100 mm) aufgefangen, eingedampft (N<sub>2</sub>), mit 30 mg der nichtmarkierten Referenzsteroiden (Estronazetat bzw. Estradiolazetat) versetzt und bei 55°C in 0,5 ml Ethylether gelöst. Nach Zugabe von 0,5 ml Petroleumether (40-60°C) wurden die Röhrchen sofort auf Eis gestellt bis zur ersten Kristallbildung, 24 Stunden im Kühlschrank bei 4°C und für mehrere Tage im Tiefkühlschrank bei -20°C aufbewahrt. Die 2. Rekristallisierung wurde im gleichen Lösungsmittelsystem, Ethylether – Petroleumether, durchgeführt. Nach der Kristallbildung wurde die jeweilige Mutterlauge (Ursprungslösungen, in der Kristallbildung erfolgte) mit einer an der Spitze ausgezogenen Pasteurpipette in ein Zählgläschen übertragen. Ein Aliquot der gebildeten Kristalle wurden in vorbereitete Zählgläschen gegeben. Die verwendeten Gläschen wurden zu Beginn der Untersuchungen (Leergewicht) und nach Zugabe der Mutterlauge bzw. der Kristalle (getrocknet) auf einer Präzisionswaage gewogen.

Die Bestimmung der Gewichte der getrockneten Mutterlauge bzw. Kristalle dienten als Grundlage für die Berechnung der spezifischen Aktivität und der Ermittlung des  $^3\text{H} / ^{14}\text{C}$ -Quotienten.

Zu b) Identifikationsnachweis von DHEA als Metabolit von DHEAS

*Trennung und Reinigung von DHEA*

Für die Rekristallisierung von DHEA wurden die Chloroform - Extrakte (Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS;  $37^\circ\text{C}$ ; 24 h) gepoolt, mit  $50 \mu\text{l}$  einer Trägerlösung (jeweils mg DHEA / ml  $\text{CHCl}_3$ ) eingedampft und unter Aufnahme von  $50 \mu\text{l}$   $\text{CHCl}_3$  auf eine DC-Folie (Sil G) aufgetragen. Für die Auftrennung wurden folgende Laufmittelsysteme verwendet:

- Dichlormethan : Ethylazetat : Methanol (85 :15 : 1,7; vol: vol: vol),
- Toluol: Ethylazetat (50 : 30; vol : vol)
- Dichlormethan : Aceton (92,5 : 7,5; vol : vol).

Die Darstellung und Isolierung des Steroids, DHEA, erfolgte wie für die Estrogene beschrieben. Das isolierte Androgen, DHEA, wurde mit je 3 ml Ethylazetat eluiert.

*Rekristallisierung*

Die Eluate der dritten Reinigung wurden eingedampft und mit 30 mg nichtmarkiertem DHEA versetzt. Anschließend wurde 3 x nacheinander in folgenden Lösungsmittelsystemen rekristallisiert:

- Methanol – Wasser
- Aceton – Wasser
- Benzol – n-Heptan.

Für die vollständige Auflösung des Gemisches wurde dieses im Schüttelwasserbad erwärmt. Die Kristallbildung erfolgte durch Absenken der Temperatur (24 Stunden bei  $4^\circ\text{C}$ ; 4-5 Tage bei  $-20^\circ\text{C}$ ). Die Messung der Radioaktivität der Mutterlauge und der Kristalle erfolgte im  $\beta$ -Counter.

### 2.2.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung wurde mit der von Lowry et al. 1951 [84] beschriebenen Methode durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen mit 1 ml einer 0,1%igen Natriumdesoxycholat / NaOH-Lösung bei 37°C 24 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden vom Boden der Schalen gelöst, in Plastikröhrchen (75 x 12 mm) überführt und bei 4000 rpm, 10 min bei 20°C zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurde mit 400 µl destilliertem Wasser verdünnt. Für die Proteinbestimmung im Homogenat (gelöst in Tris-Puffer, pH 7,4) wurden 50 µl/Probe verwendet. Diese Proben wurden mit destilliertem Wasser auf 500 µl verdünnt. Als Referenzmaterial wurden 400 µl einer BSA-Lösung (je 2 mg BSA in 1 ml H<sub>2</sub>O) mit 3,6 ml destilliertem Wasser verdünnt. Für die Herstellung der Standardreihe wurde die BSA-Lösung mit 100 µl 0,1%igen Natriumdesoxycholat / NaOH-Lösung und beim Homogenat mit 50 µl Tris-Puffer, pH 7,4, versetzt und auf ein Endvolumen von 500 µl mit destilliertem Wasser verdünnt. Die Standardreihe umfaßte einen Bereich von 0 - 50 µg Protein. Zu den Homogenatproben sowie den Proben der Standardreihe wurden jeweils 10 µl einer 0,5 N NaOH-Lösung gegeben und bei Raumtemperatur 10 Minuten inkubiert. Danach wurden die Proben und die Standardreihe mit 1 ml Reagenz C (Reagenz A : Reagenz B; 50 : 1; vol : vol) gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Zugabe von 0,1 ml einer 1 : 1; vol : vol mit destilliertem Wasser verdünnten Folinreagenzlösung. Nach 30 minütiger Inkubation erfolgte die Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 700 nm und einer Küvettenschichtdicke von 1 cm am Spektrophotometer.

### 2.3 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung der Ergebnisse wurde mit Hilfe des Graphik- und Statistikprogramms Origin 7.0 [111] durchgeführt. Zur Verdeutlichung der Verteilung bzw. Streuung der Ergebnisse wurden statt der Einzelwerte die Mittelwerte mit den entsprechenden Standardabweichungen/Standardfehlern (Mittelwert ± SD bzw. SEM) angegeben.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 $\alpha$ -Aktinfilamente

Die  $\alpha$ -Aktinbestimmung wurde in allen untersuchten Zelllinien, die aus der Aorta und Arteria mammaria kultiviert wurden, durchgeführt. Abbildung 5 zeigt die grün leuchtenden, langen Aktinfilamente einer glatten Gefäßmuskelzelle im Fluoreszenzmikroskop. Die Bilder wurden photographisch dokumentiert.

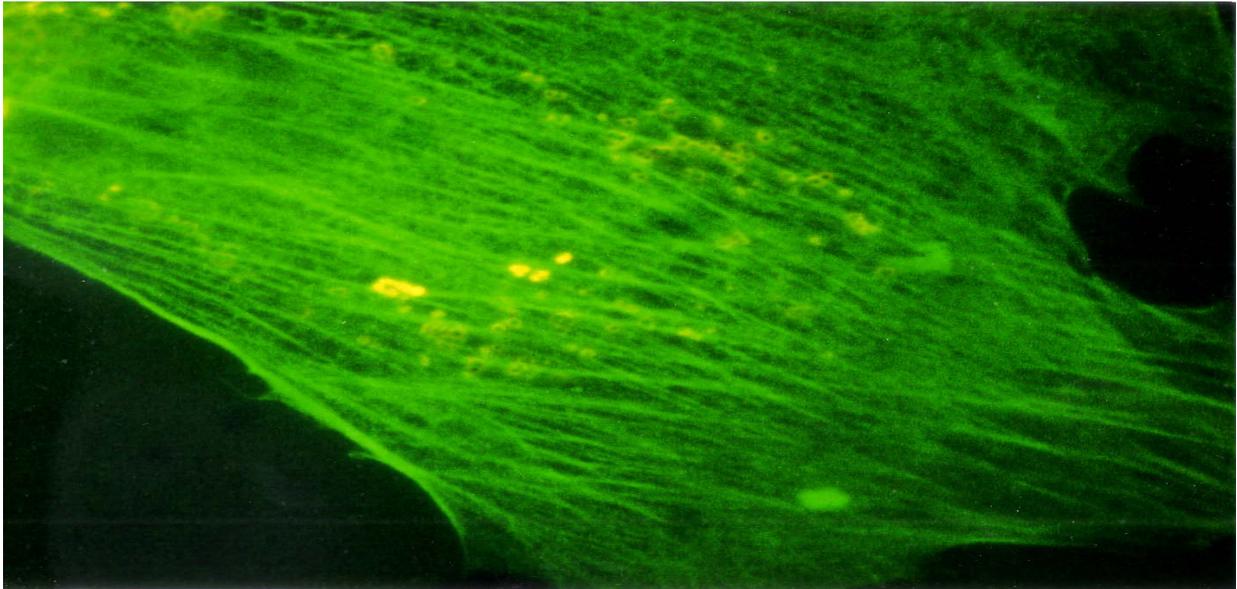


Abbildung 5:

$\alpha$ -Aktinfilamente einer glatten Gefäßmuskelzelle, die aus dem Aortengewebe der Arteria mammaria kultiviert wurde.

#### 3.2 Identifikationsnachweis der Steroide

Die Identifizierung der entstandenen Metabolite erfolgte durch die Rekristallisierung im Anschluß an die Inkubation mit [ $^3$ H]E1S bzw. [ $^3$ H]DHEAS von insgesamt 7 verschiedenen Zelllinien.

Für den Identifikationsnachweis von Estron und Estradiol wurden 3 verschiedene Zelllinien der VSMCs (A - 42, M - 11 und A - 44) von einer 81jährigen Frau und 2 Männern (Alter: 63 Jahre und 79 Jahre) mit 0,1  $\mu$ M [ $^3$ H]E1S 24 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Identität des in den VSMCs nachgewiesenen Estrons wurde durch die Rekristallisierung bestätigt. Nach 2facher Rekristallisierung wurde sowohl eine

konstante spezifische Aktivität ( $\text{dpm} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) als auch ein konstanter  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient (Tabelle 4) nachgewiesen. Der Identifikationsnachweis von Estradiol war unter den eingesetzten Versuchsbedingungen nicht möglich, da die gebildeten Estradiolmengen in den verschiedenen Zelllinien nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden zu niedrig waren (Tabelle 4). Eine Kristallbildung fand statt, allerdings war die Aktivität der Mutterlauge und die der Kristalle zu gering, so daß eine Auswertung nicht möglich war.

Die Bildung von Dehydroepiandrosteron (DHEA) wurde nach der Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS (24 h,  $37^\circ\text{C}$ ) in 4 verschiedenen Zelllinien der VSMCs (A - 23, M - 12, A - 27 und M - 6) von 3 Frauen (Alter: 52, 70 und 76 Jahre) und einem 60jährigen Mann nachgewiesen. Nach der 3fachen Rekristallisierung in 3 verschiedenen Lösungsmitteln war sowohl die spezifische Aktivität ( $\text{dpm} \cdot \text{mg}^{-1}$ ) als auch der  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotient konstant (Tabelle 5).

#### Tabelle 4:

Identifikationsnachweis von Estron durch Rekristallisation zu konstanter spezifischer Aktivität und konstantem  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten in 3 verschiedenen Zelllinien.

n.n. = nicht nachweisbar

Zelllinien	Kristallisation (Kristalle – KR)	Lösungsmittel	Estron		
			$^3\text{H}$ (dpm/mg)	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
M – 11	KR - 1	Ethylether – Petrolether	11785	62	189
	KR - 2	Ethylether – Petrolether	12001	62	194
A – 44	KR - 1	Ethylether – Petrolether	4773	66	72
	KR - 2	Ethylether – Petrolether	4719	66	72
A – 42	KR - 1	Ethylether – Petrolether	956	59	16
	KR - 2	Ethylether – Petrolether	982	61	16

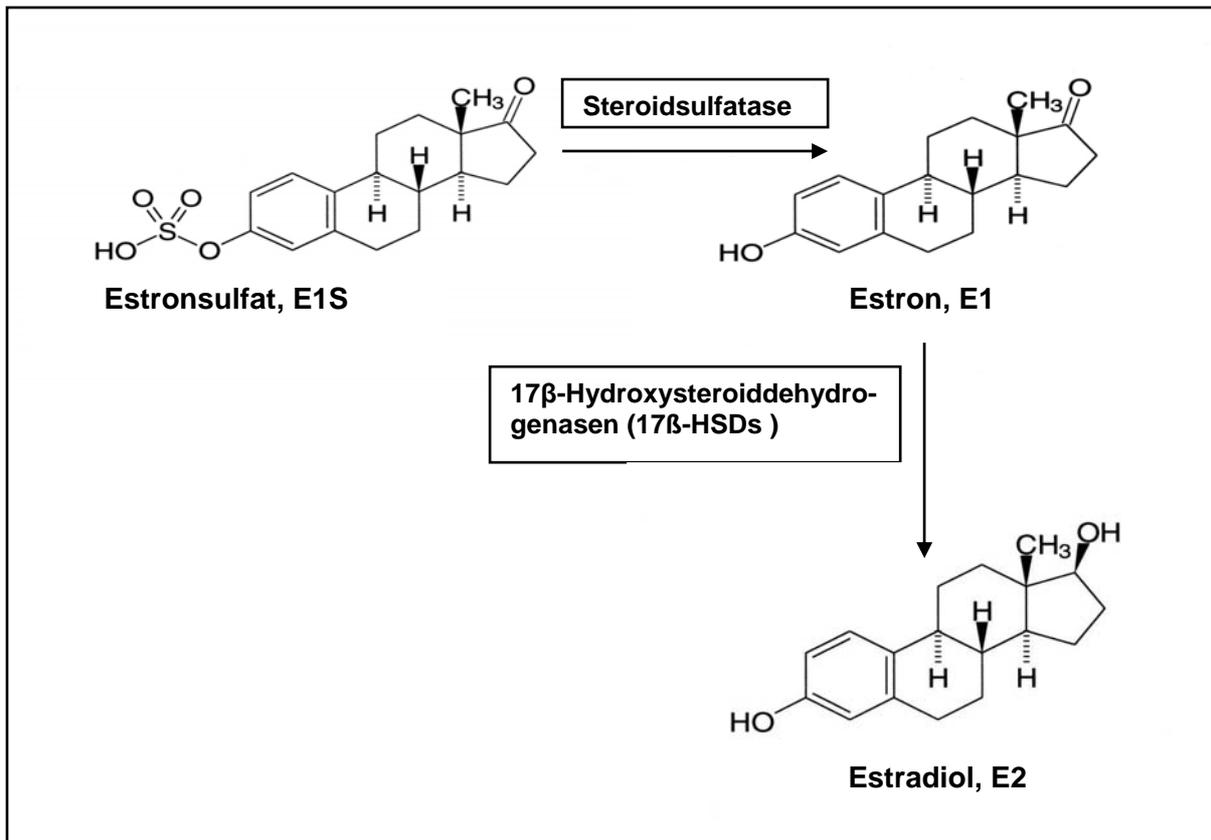
Tabelle 5:

Identifikationsnachweis von DHEA durch Rekristallisation zu konstanter spezifischer Aktivität und konstantem  $^3\text{H}/^{14}\text{C}$ -Quotienten in 4 verschiedenen Zelllinien.

Zelllinien	Kristallisation (Kristalle – KR)	Lösungsmittel	DHEA		
			$^3\text{H}$ (dpm/mg)	$^{14}\text{C}$	$^3\text{H}/^{14}\text{C}$
A – 23	KR - 1	Methanol – Wasser	2361	81	29
	KR - 2	Aceton – Wasser	2511	86	29
	KR - 3	Benzol – n-Heptan	2186	66	33
M – 6	KR - 1	Methanol – Wasser	1187	66	18
	KR - 2	Aceton – Wasser	1300	72	18
	KR - 3	Benzol – n-Heptan	2060	60	34
M – 12	KR - 1	Methanol – Wasser	613	21	30
	KR - 2	Aceton – Wasser	652	21	31
	KR - 3	Benzol – n-Heptan	664	17	39
A – 27	KR - 1	Methanol – Wasser	1176	29	41
	KR - 2	Aceton – Wasser	1264	31	40
	KR - 3	Benzol – n-Heptan	1317	32	41

### 3.3 Stoffwechsel von [ $^3\text{H}$ ]E1S im Aortengewebe und in den VSMCs

Wie in der Abbildung 6 ersichtlich, konnte im Aortengewebe und in den VSMCs die Bildung von Estron und Estradiol nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]E1S nachgewiesen werden. Die Untersuchungen wurden am Aortengewebe von einem Mann und in den VSMCs von 3 Frauen und 7 Männern durchgeführt (Abbildung 7, 9).



**Abbildung 6:**

Metabolisierung von Estronsulfat (E1S) zu Estron (E1) vermittelt durch die Steroidsulfatase und von E1 zu Estradiol (E2) durch die 17β-HSDs.

Für die Untersuchung des Stoffwechsels von E1S wurden 2 Versuchsreihen mit Aortengewebe und den VSMCs durchgeführt:

**1)** Im ersten Versuchsteil wurde die Abhängigkeit der Estrogenbildung von der Inkubationsdauer (Time Course) untersucht (Abbildung 7, 8). Hierzu wurde das Aortengewebe (a) mit  $0,1 \mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]E1S und die VSMCs (b) mit  $0,05 \mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]E1S über unterschiedliche Zeitspannen bei 37°C inkubiert.

**2)** Im zweiten Versuchsteil wurde die Abhängigkeit der Estrogenbildung von der Substratkonzentration ( $0,05 - 30 \mu\text{M}$  [<sup>3</sup>H]E1S) nach einer Inkubationszeit von 6 Stunden in den VSMCs untersucht (Abbildung 9, 10). Hierbei wurde die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  im Aortengewebe und in den VSMCs bestimmt.

In den Graphiken wurden die Mittelwerte der Messpunkte mit ihren Standardfehlern (Mittelwert  $\pm$  SEM) dargestellt.

**Zu 1a)**

Abbildung 7 A und 8 A zeigen die Bildung von Estron und Estradiol aus E1S sowie die Sulfataseaktivität (Summe von Estron und Estradiol) im Aortengewebe eines 70jährigen Patienten nach der Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S über einen Zeitraum von 120 Minuten.

Die Sulfataseaktivität und Estronbildung stieg linear bis zu einer Inkubationszeit von 120 Minuten. Nach einer Inkubationszeit von 120 Minuten wurde eine Sulfataseaktivität von  $0,31 \text{ pmol} \cdot \text{mg Gewebe}^{-1}$  und Estronkonzentration von  $0,3 \text{ pmol} \cdot \text{mg Gewebe}^{-1}$  gemessen. Der Hauptmetabolit dieser Untersuchungen war Estron. Die Bildung von Estradiol konnte im Aortengewebe des 70jährigen Patienten nicht nachgewiesen werden.

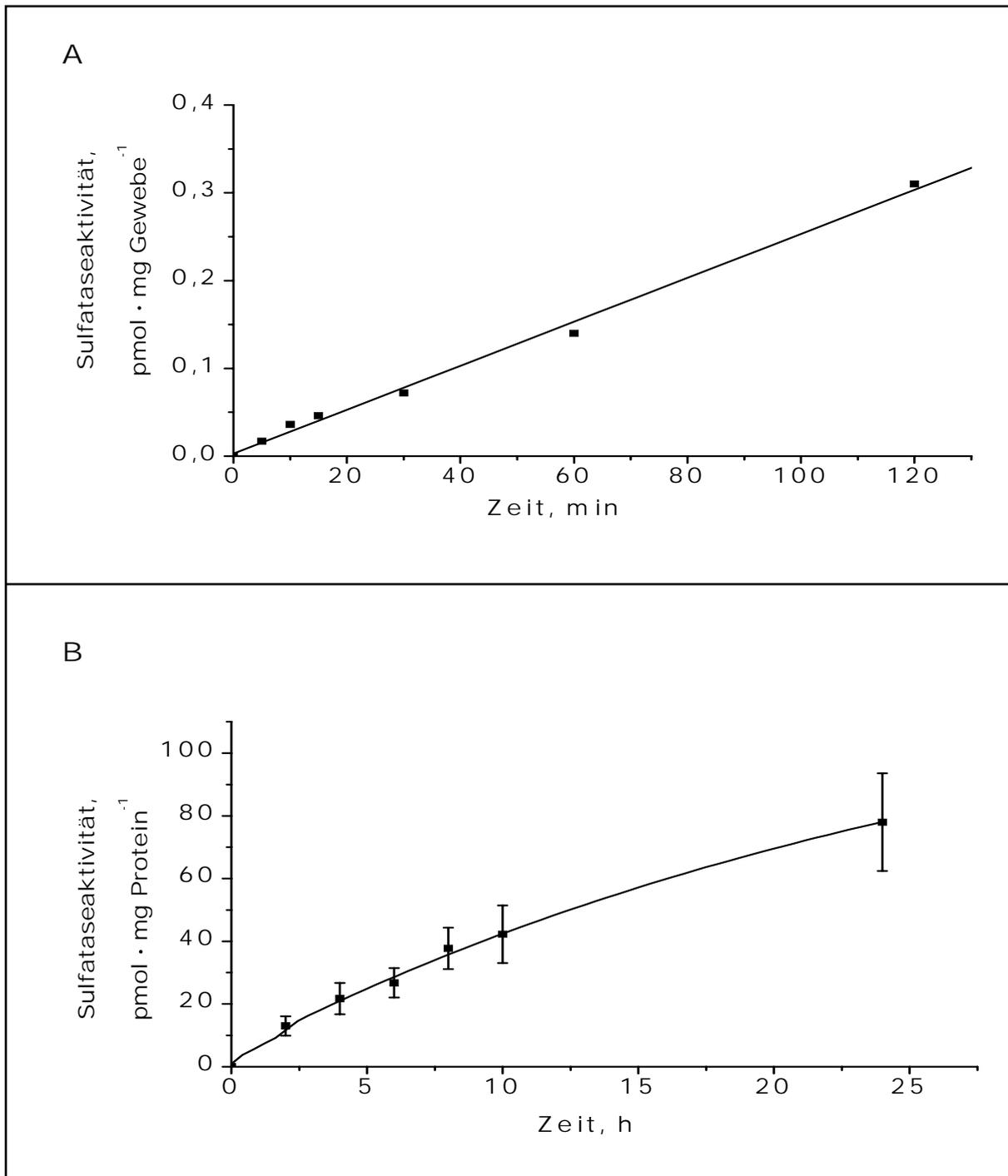
**Zu 1b)**

In Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde in 4 verschiedenen Zelllinien der VSMCs von 4 Männern (Alter: 38, 61, 68, 70 Jahre) die Estrogenbildung nach der Inkubation mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S nachgewiesen (Abbildung 7/8 C).

Die Sulfataseaktivität und die Estronbildung stieg bis zu einer Inkubationszeit von 6 Stunden linear an (Sulfataseaktivität:  $26,8 \pm 4,7 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ ; Estronkonzentration:  $22 \pm 4 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ ) und flachte dann ab. Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurde eine Sulfataseaktivität von  $78 \pm 16 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  und eine Estronkonzentration von  $59 \pm 11 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  gemessen. Ein deutlicher Anstieg in der Estradiolbildung wurde ab einer Inkubationszeit von 6 Stunden ( $0,8 \pm 1,3 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ ) beobachtet. Nach 24 Stunden wurde eine Estradiolkonzentration von  $7,6 \pm 1,7 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  gemessen.

*Die Sulfataseaktivität (Summe der gebildeten Metabolite) war zu jedem Zeitpunkt gleich der Summe aus Estron und Estradiol.*

Im Aortengewebe und in den VSMCs wurde die höchste Sulfataseaktivität und Estronkonzentration nach 120 Minuten bzw. 24 Stunden gemessen. Der quantitativ wichtigste Metabolit war nach der Inkubation mit E1S in Abhängigkeit von der Inkubationszeit im Aortengewebe und in den VSMCs Estron.

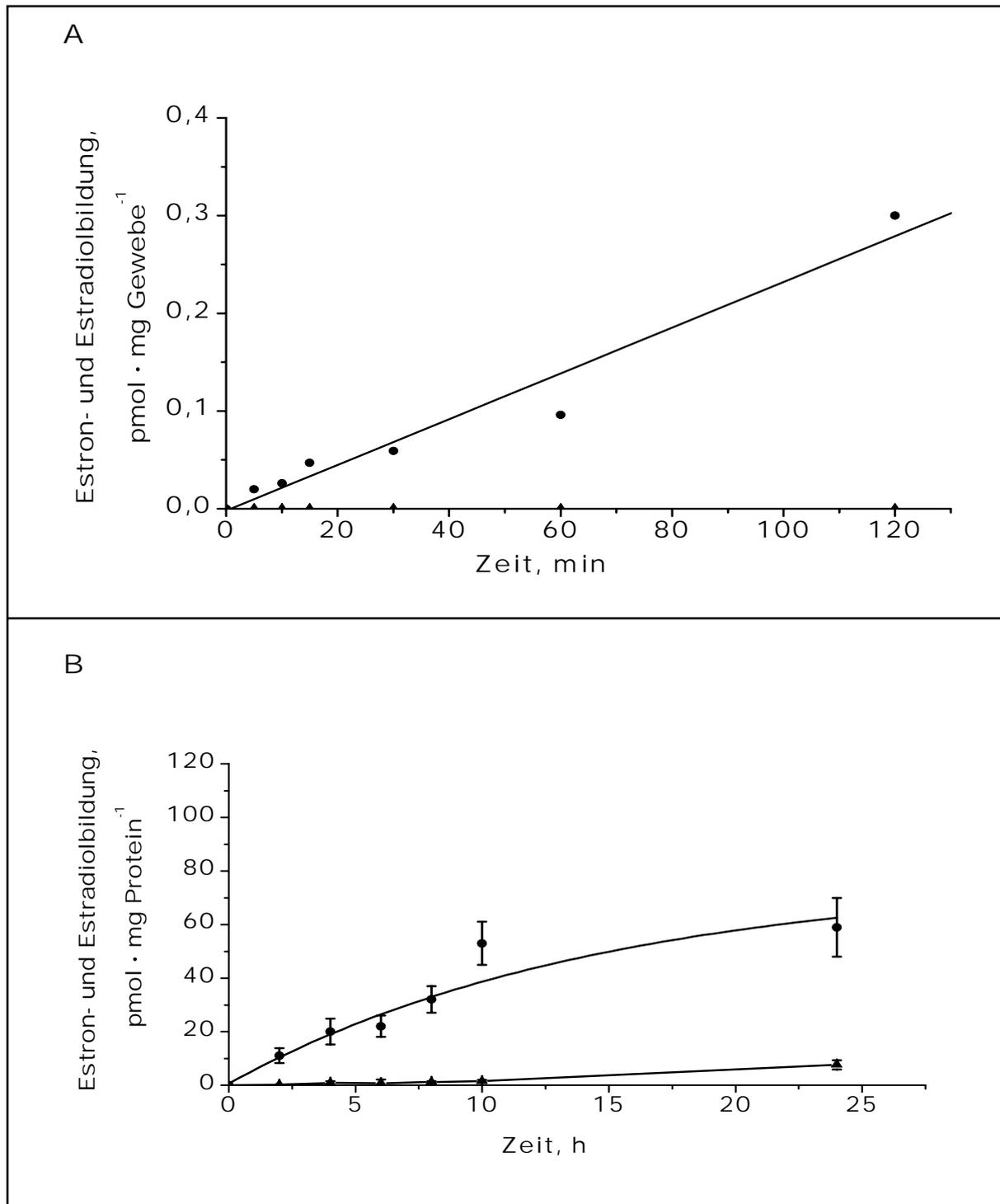


**Abbildung 7:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und Sulfataseaktivität (Time Course) im Aortengewebe und in den VSMCs

A. Inkubation des Aortengewebes eines 70jährigen Patienten mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (5 - 120 Minuten);

B. Inkubation der VSMCs von 4 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).



**Abbildung 8:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und Estron- (-●-) sowie Estradiolbildung (-▲-) (Time Course) im Aortengewebe und in den VSMCs

- A. Inkubation des Aortengewebes eines 70jährigen Patienten mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (5 - 120 Minuten);
- B. Inkubation der VSMCs von 4 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).

Abbildung 9 und 10 zeigen die Bildung von Estron und Estradiol aus E1S sowie die Sulfataseaktivität (Summe von Estron und Estradiol) in den VSMCs von 3 Frauen (Alter: 52, 76 und 81 Jahre) und 3 Männern (Alter: 51, 61 und 63 Jahre) bei steigender Substratkonzentration.

### **Zu 2)**

In den VSMCs stieg die Sulfataseaktivität bis zu einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  linear an und flachte dann ab. Die Sättigung der Sulfatase erfolgte ab einer Substratkonzentration von 10 - 15  $\mu\text{M}$ . Für den Konzentrationsbereich von 0,05 - 30  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S wurde eine Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  von 10  $\mu\text{M}$  und ein  $V_{\max}$  von 5  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  berechnet (Abbildung 9). Die Estronbildung stieg bis zu einer Substratkonzentration von 15  $\mu\text{M}$  linear an und flachte dann ab. Die entstandene Estradiolmenge war niedriger als die des Estrons. Ein deutlicher Anstieg in der Estradiolbildung konnte erst ab einer Substratkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  nachgewiesen werden (Abbildung 10).

*Die Sulfataseaktivität (Summe der gebildeten Metabolite) war in Abhängigkeit von den eingesetzten E1S-Konzentrationen in jedem Messpunkt gleich der Summe aus Estron und Estradiol.*

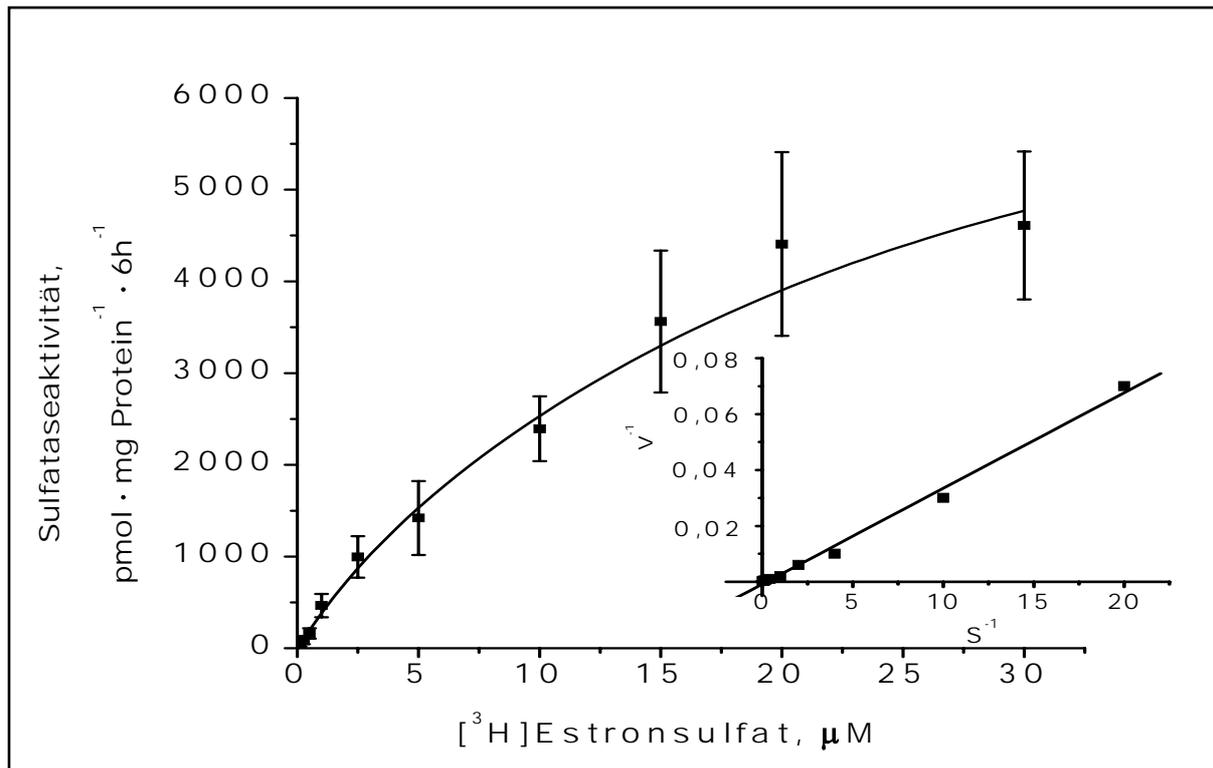


Abbildung 9:

Beziehung zwischen Substratkonzentration und Sulfataseaktivität zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit  $V_{max}$  in den VSMCs;

6stündige Inkubation der VSMCs von 6 Patienten mit  $[^3\text{H}]E1S$  jeweils über einen Konzentrationsbereich von 0,05 – 30  $\mu\text{M}$

(V: Reaktionsgeschwindigkeit in  $\text{pmol} \cdot \text{mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bzw.  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  ; S: Substratkonzentration in  $\mu\text{M}$ ).

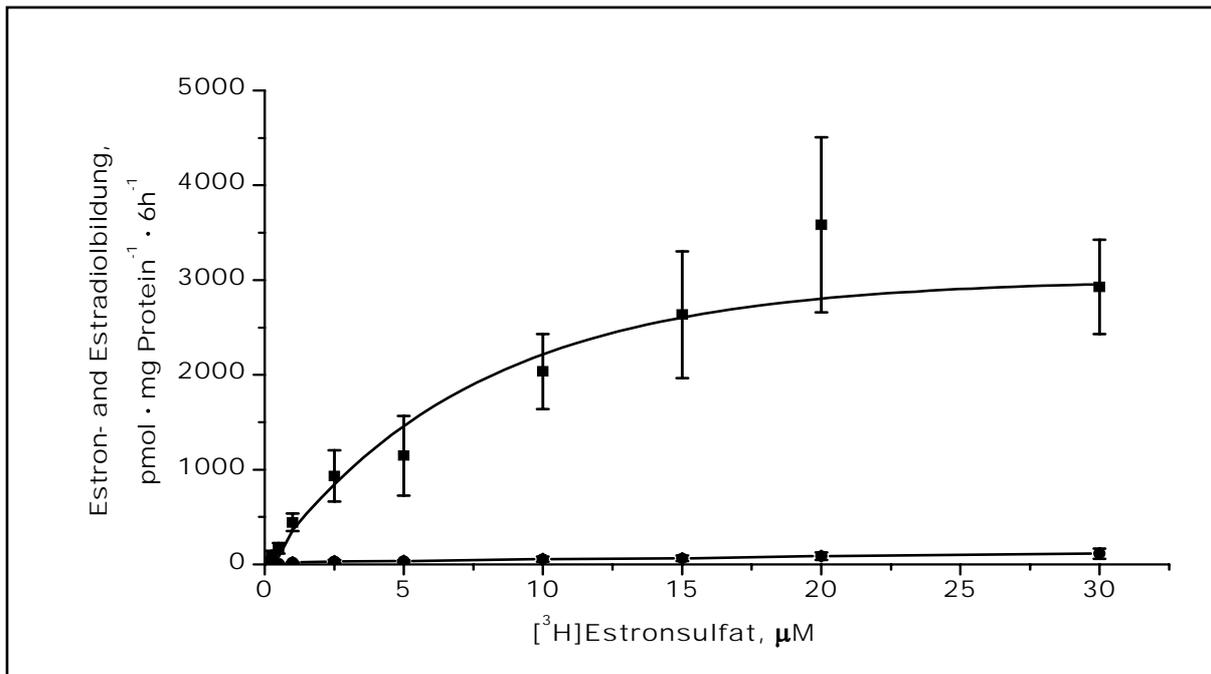


Abbildung 10:

Beziehung zwischen Substratkonzentration und Estron- (-■-) sowie Estradiolbildung (-●-) in den VSMCs

6stündige Inkubation der VSMCs von 6 Patienten mit [<sup>3</sup>H]E1S jeweils über einen Konzentrationsbereich von 0,05 – 30 μM.

Tabelle 6 zeigt einen Überblick über die Sulfataseaktivität und Estron- und Estradiolbildung in den VSMCs (n=8) nach Inkubation mit 0,05 μM [<sup>3</sup>H]E1S. Die Angaben zum Geschlecht, Alter der Patienten und Herkunft des Gewebes wurden in der Auswertung mit berücksichtigt.

In den VSMCs wurden keine signifikanten Unterschiede in der Estron- und Estradiolbildung in Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Patienten bzw. der Gewebeherkunft festgestellt. Nach 6stündiger Inkubation mit 0,05 μM [<sup>3</sup>H]E1S konnte in den VSMCs eine durchschnittliche Estronkonzentration von  $21 \pm 2,3$  pmol · mg Protein<sup>-1</sup> · 6h<sup>-1</sup> und Estradiolkonzentration von  $0,98 \pm 0,11$  pmol · mg Protein<sup>-1</sup> · 6h<sup>-1</sup> gemessen werden.

VSMCs von zwei Patienten mit Marfan-Syndrom zeigten keine Unterschiede in der Estron- und Estradiolbildung im Vergleich zum Gewebe anderer Patienten.

Tabelle 6:

Estron- und Estradiolbildung in den VSMCs in Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter der Patienten und der Gewebeherkunft nach der Inkubation mit 0,05  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S.

- \* Aortenaneurysma von Patienten mit Marfan-Syndrom;
- \*\* A - Aorta (Aorta ascendens / descendens), Aortenaneurysmen;
- \*\*\* M - Arteria mammaria

Herkunft/ Lokalisation des Gewebes	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hydrolyse ( $\Sigma$ der gebildeten Metabolite)	Bildung von	
				Estron	Estradiol
VSMCs -Zelllinien				(pmol $\cdot$ mg Protein $^{-1}$ $\cdot$ 6h $^{-1}$ )	
A - 20**	männlich	70	30	27	0,6
A - 22	männlich	68	34	29	0,6
A - 23	weiblich	52	26	19	1,4
A - 28	männlich	63	23	19	0,9
A - 34*	weiblich	37	17	16	1,3
A - 40	männlich	38	13	11	0,8
M - 9***	männlich	51	34	29	1,2
M - 10	männlich	61	30	21	1,0
<b>Mittelwert <math>\pm</math> SEM</b>			<b>26 <math>\pm</math> 2,7</b>	<b>21 <math>\pm</math> 2,3</b>	<b>0,98 <math>\pm</math> 0,11</b>

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Sulfataseaktivität in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Substratkonzentration im Aortengewebe und in den VSMCs qualitativ der Summe des gebildeten Estron und Estradiols entsprach. Der quantitativ wichtigste Metabolit aller Untersuchungen im Aortengewebe und in den VSMCs war Estron. In Abhängigkeit von der Inkubationszeit wurde im Aortengewebe nach 120 Minuten und in den VSMCs nach 24 Stunden die höchste Sulfataseaktivität und Estron- bzw. Estradiolkonzentration gemessen. Für die Michaelis-Menten-Konstante wurde für die VSMCs ein Wert von 10  $\mu\text{M}$  ermittelt. In Abhängigkeit vom Alter und Geschlecht der Patienten sowie der Herkunft des eingesetzten Gewebes konnten keine Unterschiede in der Estron- und Estradiolbildung festgestellt werden.

### 3.4 Stoffwechsel von [<sup>3</sup>H]DHEAS in den VSMCs

Nach der Inkubation mit [<sup>3</sup>H]DHEAS konnte in den VSMCs die Bildung von DHEA, Androstendion und z.T. von Testosteron nachgewiesen werden (Abbildung 11). Die Untersuchungen zum Stoffwechsel von DHEAS wurden in den VSMCs von insgesamt 7 Männern und einer Frau durchgeführt (Abbildung 12, 15).

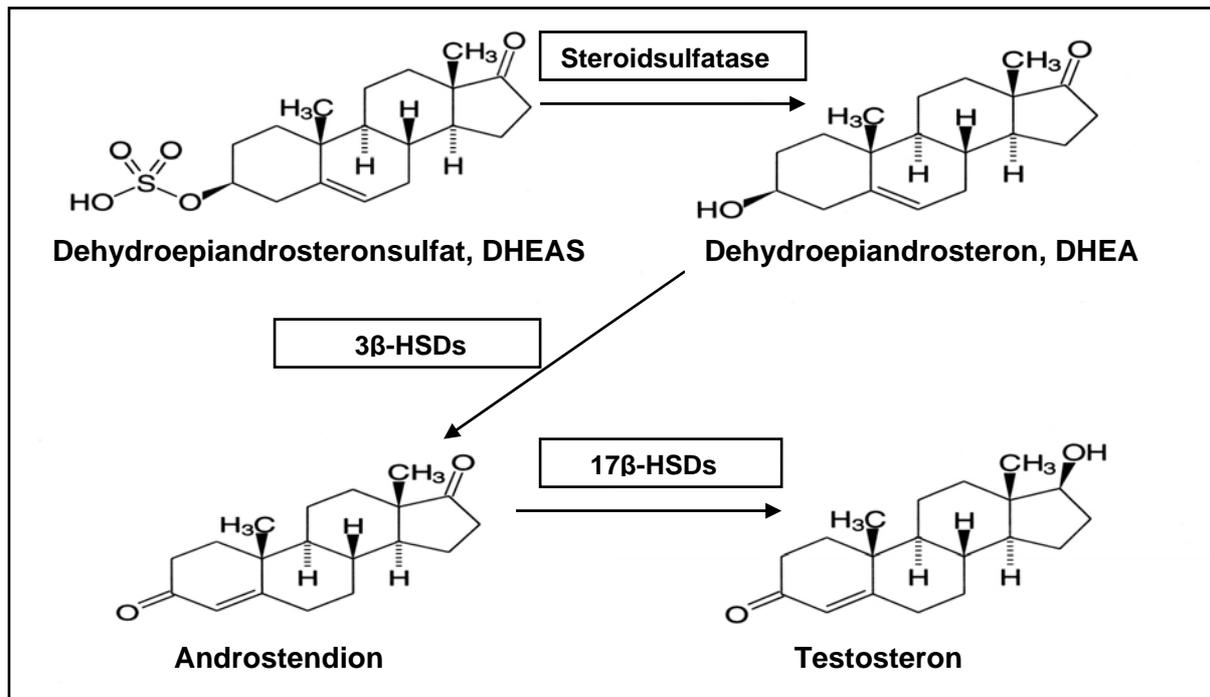


Abbildung 11:

Metabolisierung von DHEAS zu DHEA vermittelt durch die Steroidsulfatase und von DHEA zu Androstendion durch die 3β-HSDs sowie von Androstendion zu Testosteron durch die 17β-HSDs.

Für die Untersuchung des Stoffwechsels von DHEAS wurden in den VSMCs analog wie bei E1S 2 Versuchsreihen (Time Course und Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante:  $K_m$ ) durchgeführt (Abbildung 12 – 14; 15, 16). In den Graphiken wurden die Mittelwerte der Messpunkte mit ihren Standardfehlern (Mittelwert  $\pm$  SEM) dargestellt.

#### Zu 1)

Die Abbildung 12 zeigt die Sulfataseaktivität und die Bildung von DHEA, Androstendion und Testosteron nach der Inkubation mit 0,05  $\mu$ M [<sup>3</sup>H]DHEAS in 4 verschiedenen Zelllinien der VSMCs von einer 37jährigen Patientin mit Marfan-

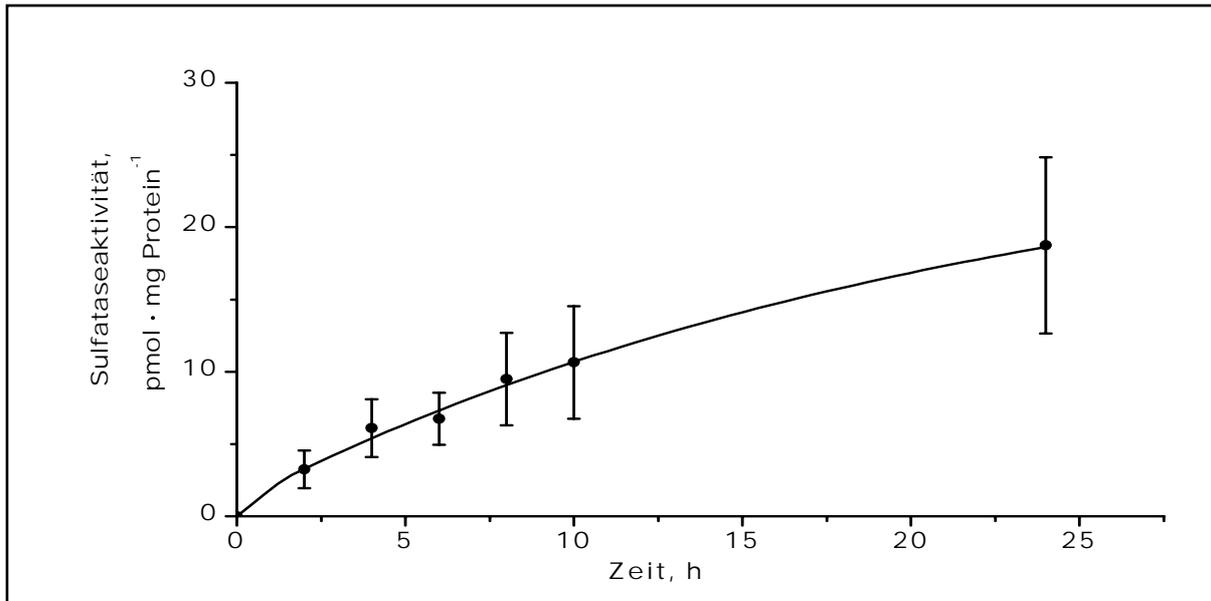
Syndrom und einer 79jährigen Patientin sowie von einem 38- und 51jährigen Patienten.

Die Sulfataseaktivität stieg bis zu einer Inkubationszeit von etwa 6 Stunden (Sulfataseaktivität:  $6,8 \pm 1,8 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$ ) linear an und flachte dann ab. Nach 24 Stunden wurde eine Sulfataseaktivität von  $18,8 \pm 6,1 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  gemessen.

In 3 verschiedenen Zelllinien der VSMCs von 2 Frauen (37jährige Patientin mit Marfan-Syndrom und 79jährige Patientin) und einem 38jährigen Mann wurde die Bildung von DHEA, Androstendion und Testosteron nachgewiesen (Abbildung 13). Die DHEA-Bildung stieg bis zu einer Inkubationszeit von 8 Stunden linear an und flachte dann ab. Die Bildung von Androstendion und Testosteron stieg erst ab einer Inkubationszeit von 10 Stunden deutlich an. Nach 24 Stunden wurde die höchste DHEA-, Androstendion- und Testosteronkonzentration gemessen (DHEA:  $7,6 \pm 4,4 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ , Androstendion:  $0,86 \pm 0,45 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ , Testosteron:  $0,19 \pm 0,05 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$ ). Der quantitativ wichtigste Metabolit der nachgewiesenen Steroide war DHEA.

*Die Sulfataseaktivität (Summe der gebildeten Metabolite) war zu jedem Zeitpunkt qualitativ größer als die Summe der nachgewiesenen Metabolite DHEA, Androstendion und Testosteron.*

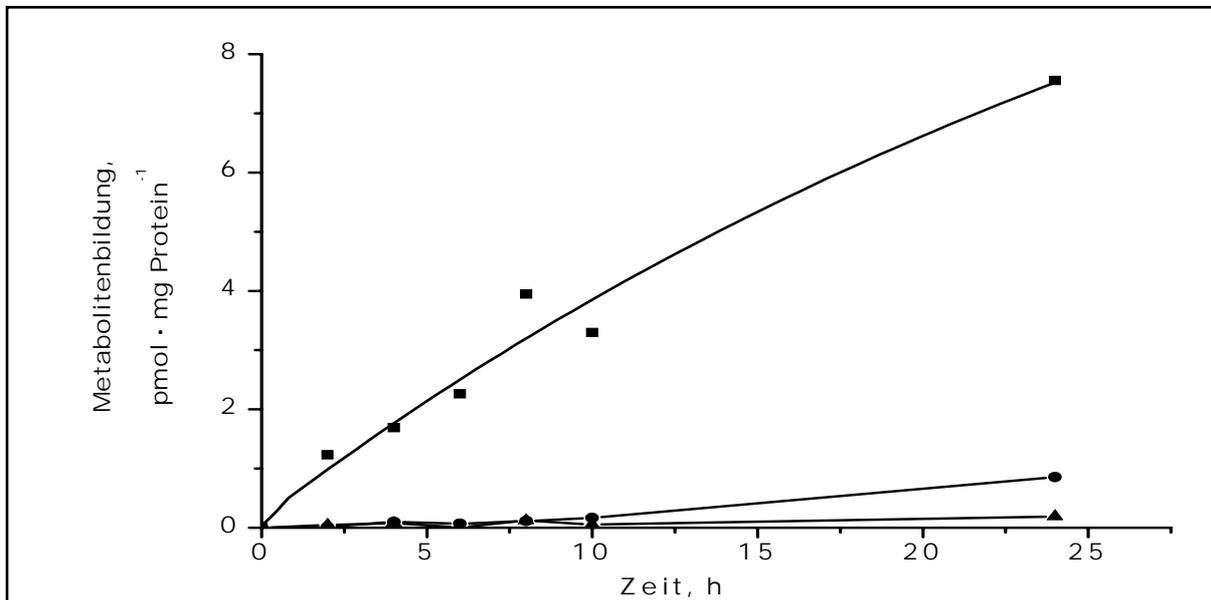
Weiterhin wurde die Androstendion- und Testosteronbildung in den VSMCs eines 38jährigen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEA untersucht. Wie Abbildung 14 B zeigt, stieg die Androstendion- und Testosteronbildung nach 8 - 10 Stunden Inkubation deutlich an. Nach 24 Stunden wurde eine Androstendionkonzentration von  $83 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  und Testosteronkonzentration von  $15,5 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1}$  gemessen.



**Abbildung 12:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und Sulfataseaktivität (Time Course) in den VSMCs;

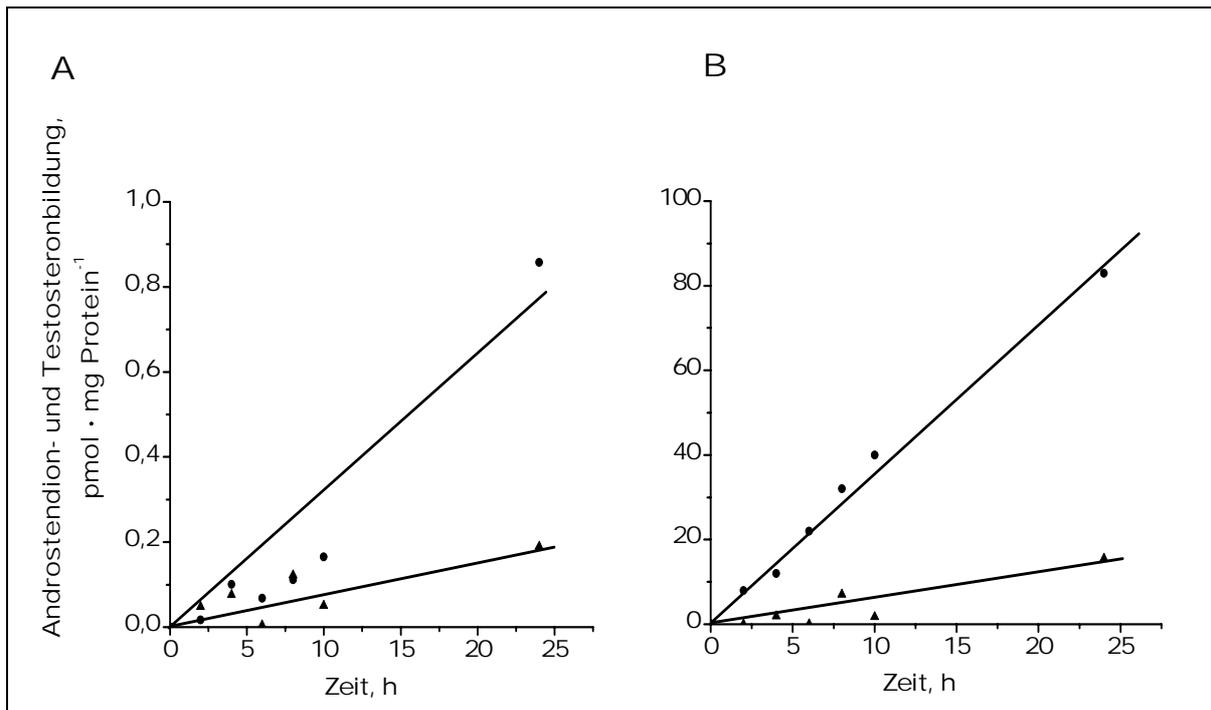
Inkubation der VSMCs von 4 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).



**Abbildung 13:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und DHEA- (-■-), Androstendion- (-●-) und Testosteronbildung (-▲-) (Time Course) in den VSMCs;

Inkubation der VSMCs von 3 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).



**Abbildung 14:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und Androstendion- (●) sowie Testosteronbildung (▲) (Time Course) in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten;

- Inkubation der VSMCs von 3 verschiedenen Patienten mit 0,05 µM [3H]DHEAS jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden);
- Inkubation der VSMCs eines 38jährigen Patienten mit 0,05 µM [3H]DHEA jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).

Abbildung 15 und 16 stellt die Sulfataseaktivität und die Steroidbildung in den VSMCs von 4 Männern (Alter: 38, 63, 64 Jahre und 79jähriger Patient mit Marfan-Syndrom) bei steigender Substratkonzentration dar.

## **Zu 2)**

In den VSMCs stieg die Sulfataseaktivität bis zu einer Substratkonzentration von 5 µM linear an und flachte dann ab (Abbildung 15). Eine Sättigung des Enzyms wurde nach einer [3H]DHEAS-Konzentration von 10 µM erreicht. Im Bereich von 0,05 - 30 µM [3H]DHEAS wurde für die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  ein Wert von 5 µM und für  $V_{max}$  von 0,7 nmol · mg Protein<sup>-1</sup> · 6h<sup>-1</sup> berechnet (Abbildung 15). Die Bildung von DHEA und Androstendion wurde in einer Zelllinie vom Aortengewebe eines

79jährigen Patienten mit Marfan-Syndrom nachgewiesen. Die DHEA- und Androstendionkonzentration stieg zunächst an. Ab einer Substratkonzentration von 15 - 20  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS flachte die DHEA- und Androstendionbildung ab (Abbildung 16). Der Hauptmetabolit der nachgewiesenen Steroide war DHEA. Die Bildung von Testosteron lag unter der Nachweisgrenze.

*Die Sulfataseaktivität (Summe der gebildeten Metabolite) war in Abhängigkeit von den eingesetzten DHEAS-Konzentrationen in jedem Messpunkt qualitativ größer als die Summe der nachgewiesenen Metabolite.*

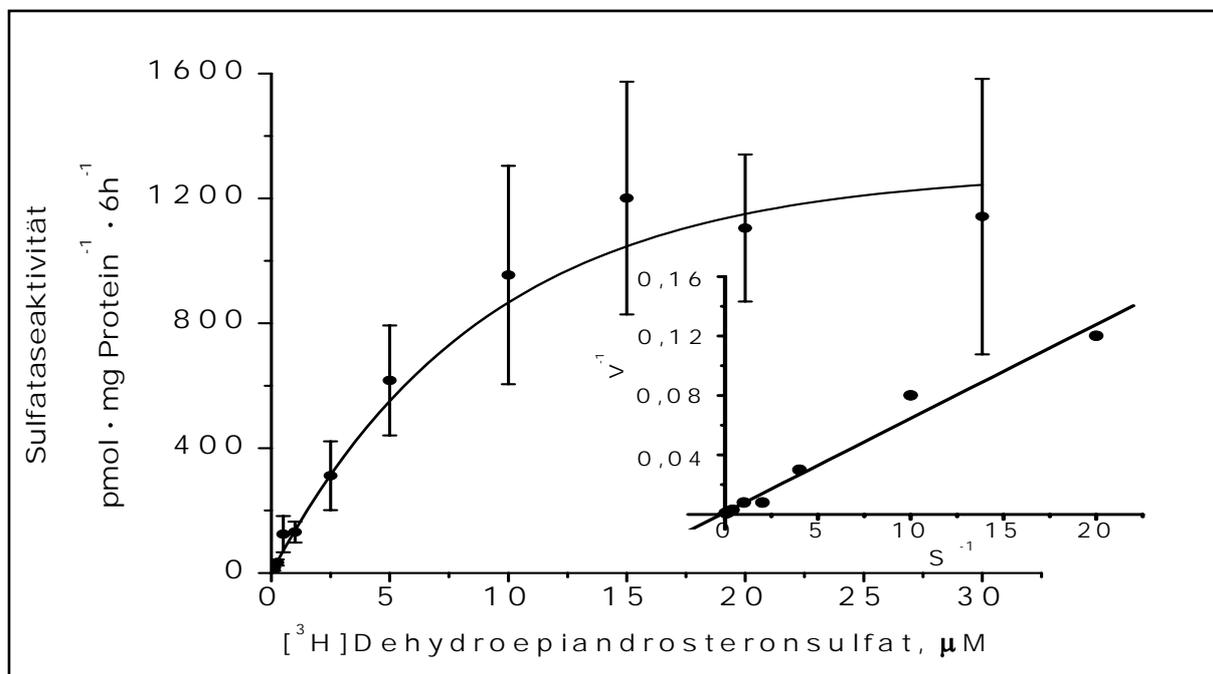
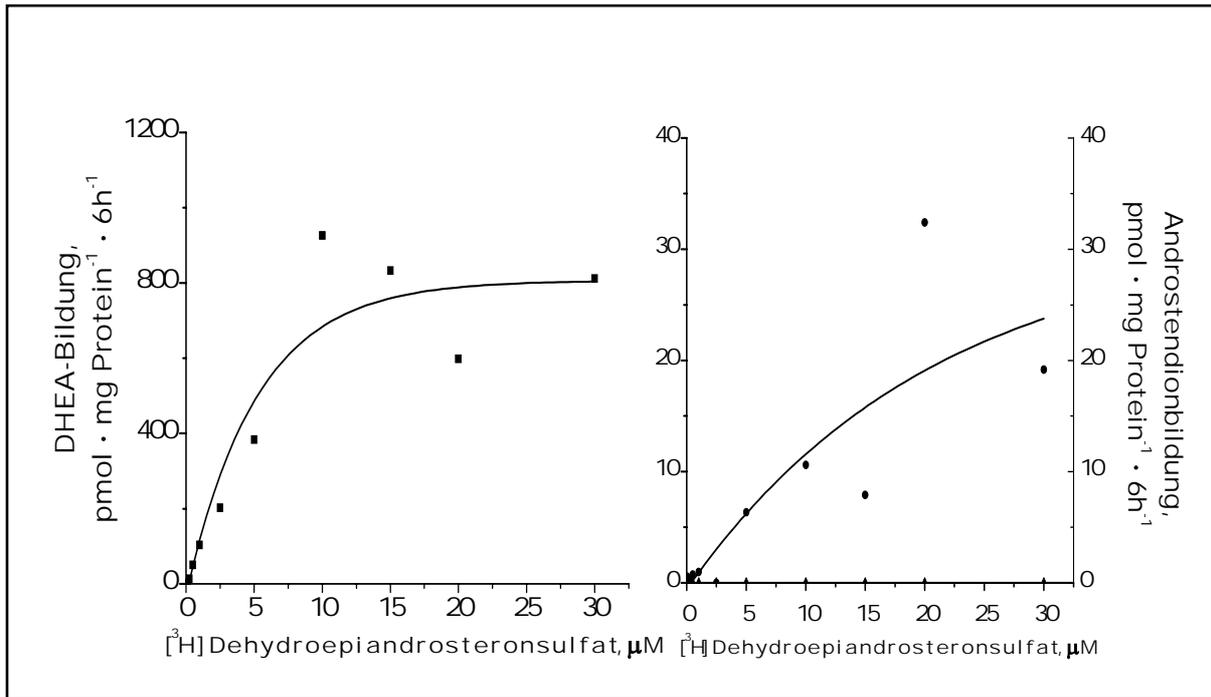


Abbildung 15:

Beziehung zwischen Substratkonzentration und Sulfataseaktivität zur Ermittlung der Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  und der maximalen Substratumsatzgeschwindigkeit  $V_{\text{max}}$  in den VSMCs;

6stündige Inkubation der VSMCs von 4 Patienten mit [ $^3\text{H}$ ]DHEAS jeweils über einen Konzentrationsbereich von 0,05 – 30  $\mu\text{M}$ ;

(V: Reaktionsgeschwindigkeit in  $\text{pmol} \cdot \text{mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bzw.  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  ; S: Substratkonzentration in  $\mu\text{M}$ ).



**Abbildung 16:**

Beziehung zwischen Substratkonzentration und DHEA- (■), Androstendionbildung (●) in den VSMCs;

6stündige Inkubation der VSMCs eines 79jährigen Patienten mit Marfan-Syndrom mit [<sup>3</sup>H]DHEAS jeweils über einen Konzentrationsbereich von 0,05 – 30 µM.

Tabelle 7 zeigt die Sulfataseaktivität und DHEA- und Androstendionkonzentration nach 6stündiger Inkubation mit 0,05 µM [<sup>3</sup>H]DHEAS in den VSMCs in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter der Patienten und der Gewebeherkunft.

In Abhängigkeit vom Geschlecht und Alter der Patienten sowie der Herkunft des Gewebes wurden keine Unterschiede in der DHEA- und Androstendionbildung festgestellt.

Tabelle 7:

DHEA- und Androstendionbildung in den VSMCs in Abhängigkeit vom Geschlecht, Alter der Patienten und der Gewebeherkunft nach der Inkubation mit 0,05  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS. \* Aortenaneurysma von Patienten mit Marfan-Syndrom; \*\* A – Aorta (Aorta ascendens / descendens), Aortenaneurysmen

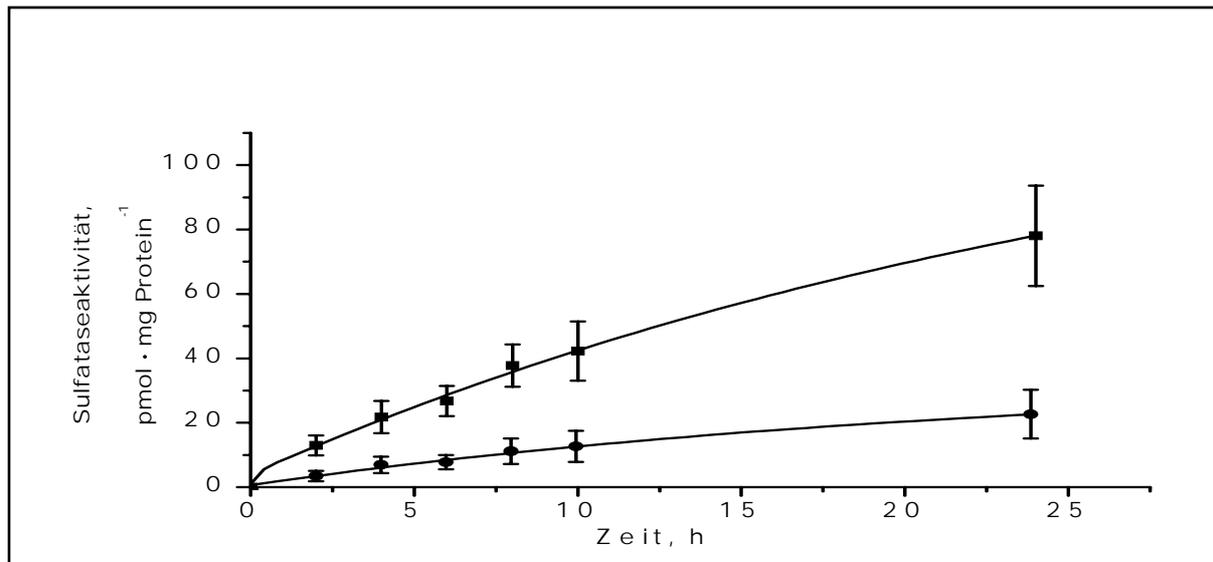
Herkunft/ Lokalisation des Gewebes	Geschlecht	Alter (Jahre)	Hydrolyse ( $\Sigma$ der gebildeten Metabolite)	Bildung von	
				DHEA	Androsten- dion
VSMCs-Zelllinien				(pmol $\cdot$ mg Protein $^{-1}$ $\cdot$ 6h $^{-1}$ )	
A - 32**	weiblich	79	8	3,5	0
A - 34*	weiblich	37	3	1,8	0,01
A - 40	männlich	38	5	1,5	0,194

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, daß in den VSMCs die höchste Sulfataseaktivität erst nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden erreicht wurde. Die Bildung von DHEA, Androstendion und z.T. von Testosteron konnte in den VSMCs nachgewiesen werden. Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_m$  betrug in den VSMCs 5  $\mu\text{M}$ .

### 3.5 Vergleich der Sulfataseaktivität ([ $^3\text{H}$ ]E1S, [ $^3\text{H}$ ]DHEAS) in den VSMCs

Abbildung 17 zeigt die Beziehung zwischen Inkubationszeit und Sulfataseaktivität (Time Course) in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten (0,05  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. 0,05  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS).

Die Sulfataseaktivität war nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]E1S doppelt so hoch wie nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]DHEAS.



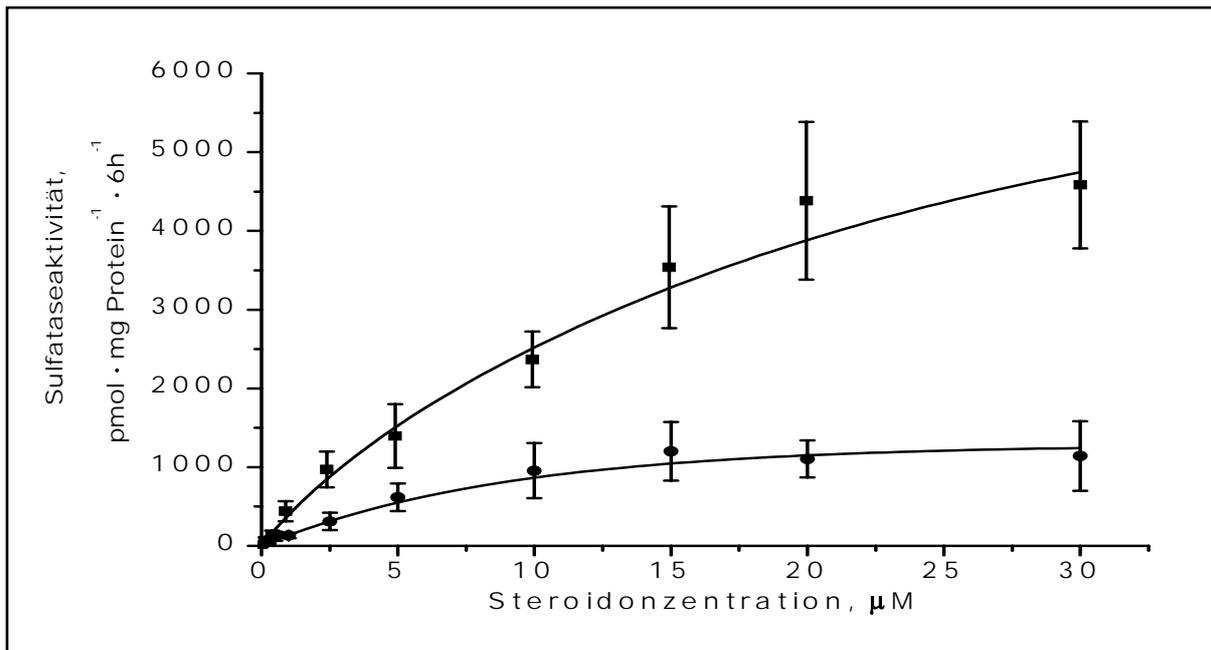
**Abbildung 17:**

Beziehung zwischen Inkubationszeit und Sulfataseaktivität (Time Course) in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten

- A. Inkubation der VSMCs von 4 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{E1S}$  (-■-) jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden);
- B. Inkubation der VSMCs von 4 verschiedenen Patienten mit  $0,05 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$  (-●-) jeweils über unterschiedliche Zeitspannen (2 - 24 Stunden).

Abbildung 18 zeigt die Beziehung zwischen Substratkonzentration und Sulfataseaktivität in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten ( $0,05 - 30 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{E1S}$  bzw.  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ ).

Nach 6stündiger Inkubation war in den VSMCs die Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]\text{E1S}$  doppelt so hoch wie nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$ . Für die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) wurde in den VSMCs nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]\text{E1S}$  ein Wert von  $10 \mu\text{M}$  und mit  $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$  von  $5 \mu\text{M}$  bestimmt.



**Abbildung 18:**

Beziehung zwischen Substratkonzentration und Sulfataseaktivität in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten;

6stündige Inkubation der VSMCs von 6 Patienten mit  $[^3\text{H}]$ E1S (-■-) und von 4 Patienten mit  $[^3\text{H}]$ DHEAS (-●-) jeweils über einen Konzentrationsbereich von 0,05 – 30  $\mu\text{M}$ .

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Sulfataseaktivität in den VSMCs in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Substratkonzentration nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]$ E1S doppelt so hoch war wie nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]$ DHEAS.

### 3.6 Untersuchungen zur Hemmung der Sulfataseaktivität

1) Untersuchungen zum Einfluß von Estronsulfamat (EMATE) auf die Aktivität der Sulfatase im Aortengewebe (a) und in den VSMCs (b).

#### **Zu 1a)**

In der Abbildung 19 A ist die Hemmung der Sulfataseaktivität durch steigende Estronsulfamatkonzentrationen (0,0001 – 1  $\mu\text{M}$ ) im Aortengewebe von 2 Männern (Alter: 67 und 69 Jahre) nach der Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ E1S dargestellt. Die eingesetzten Estronsulfamatkonzentrationen hemmten die Aktivität der Sulfatase

unterschiedlich stark. Für  $IC_{50}$  wurde ein Wert von  $1,6 \times 10^{-8}$  M bestimmt (Abbildung 19 A).

### Zu 1b)

In der Abbildung 19 B ist die Hemmung der Sulfataseaktivität durch steigende Estronsulfamatkonzentrationen ( $0,0001 - 1 \mu\text{M}$ ) in den VSMCs von einer Frau (Alter: 81 Jahre) und 5 Männern (Alter: 38, 55, 61, 63 Jahre und 79jähriger Patient mit Marfan-Syndrom) dargestellt. In Abhängigkeit von der eingesetzten Estronsulfamatkonzentration wurde die Sulfataseaktivität nach 6stündiger Inkubation unterschiedlich stark gehemmt. Für den  $IC_{50}$  wurde ein Wert von  $1,1 \times 10^{-9}$  M bestimmt.

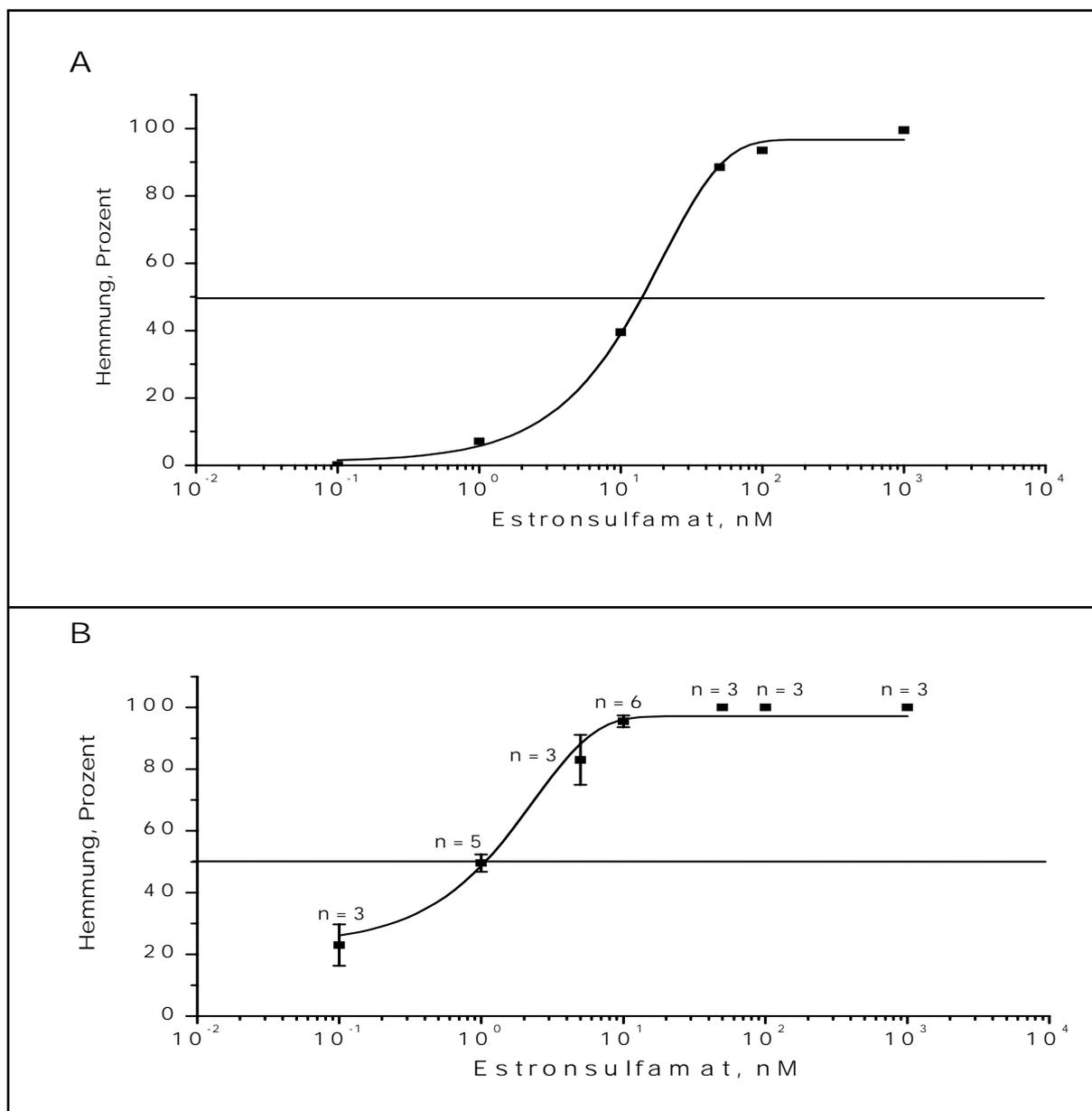


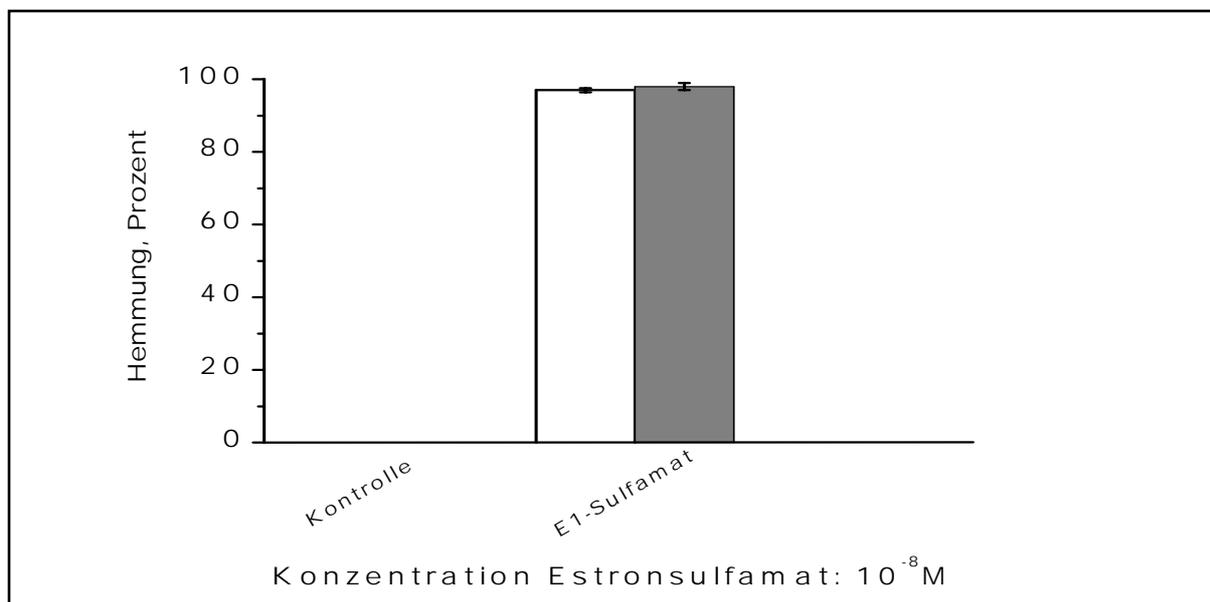
Abbildung 19:

Hemmung der Sulfataseaktivität durch Estronsulfamat im Aortengewebe und in den VSMCs

- A. 30minütige Inkubation des Aortengewebes von 2 Patienten mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bei unterschiedlichen Estronsulfamat-Konzentrationen (0,0001 - 1  $\mu\text{M}$ );
- B. 6stündige Inkubation der VSMCs von 3-6 Patienten mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bei unterschiedlichen Estronsulfamat-Konzentrationen (0,0001 - 1  $\mu\text{M}$ ).

Weiterhin wurde die Hemmung der Sulfataseaktivität durch Estronsulfamat (Konzentration: 0,01  $\mu\text{M}$ ) in Abhängigkeit von verschiedenen Ausgangssubstraten (E1S bzw. DHEAS) in den VSMCs von einer 52jährigen Frau und 2 Männern (Alter: 55, 63 Jahre) bzw. 3 Männern (Alter: 59, 61 und 64 Jahre) nach der 6stündigen Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. [ $^3\text{H}$ ]DHEAS untersucht.

Wie in Abbildung 20 ersichtlich, wurde unter den gewählten Versuchsbedingungen kein Unterschied in der Hemmwirkung festgestellt. Die Sulfataseaktivität wurde jeweils zu 97 - 98% gehemmt.

Abbildung 20:

Hemmung der Sulfataseaktivität durch Estronsulfamat in den VSMCs bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten

- 6stündige Inkubation der VSMCs von 3 Patienten mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bei einer Estronsulfamat-Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  ( $10^{-8}$  M);

6stündige Inkubation der VSMCs von 3-6 Patienten mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS bei einer Estronsulfamat-Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  ( $10^{-8}$  M).

- 2) Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Steroidsulfate auf die Aktivität der Steroidsulfatase im Aortengewebe: a) [ $^3\text{H}$ ]E1S;  
c) [ $^3\text{H}$ ]DHEAS) und  
in den VSMCs: b) [ $^3\text{H}$ ]E1S  
d) [ $^3\text{H}$ ]DHEAS.

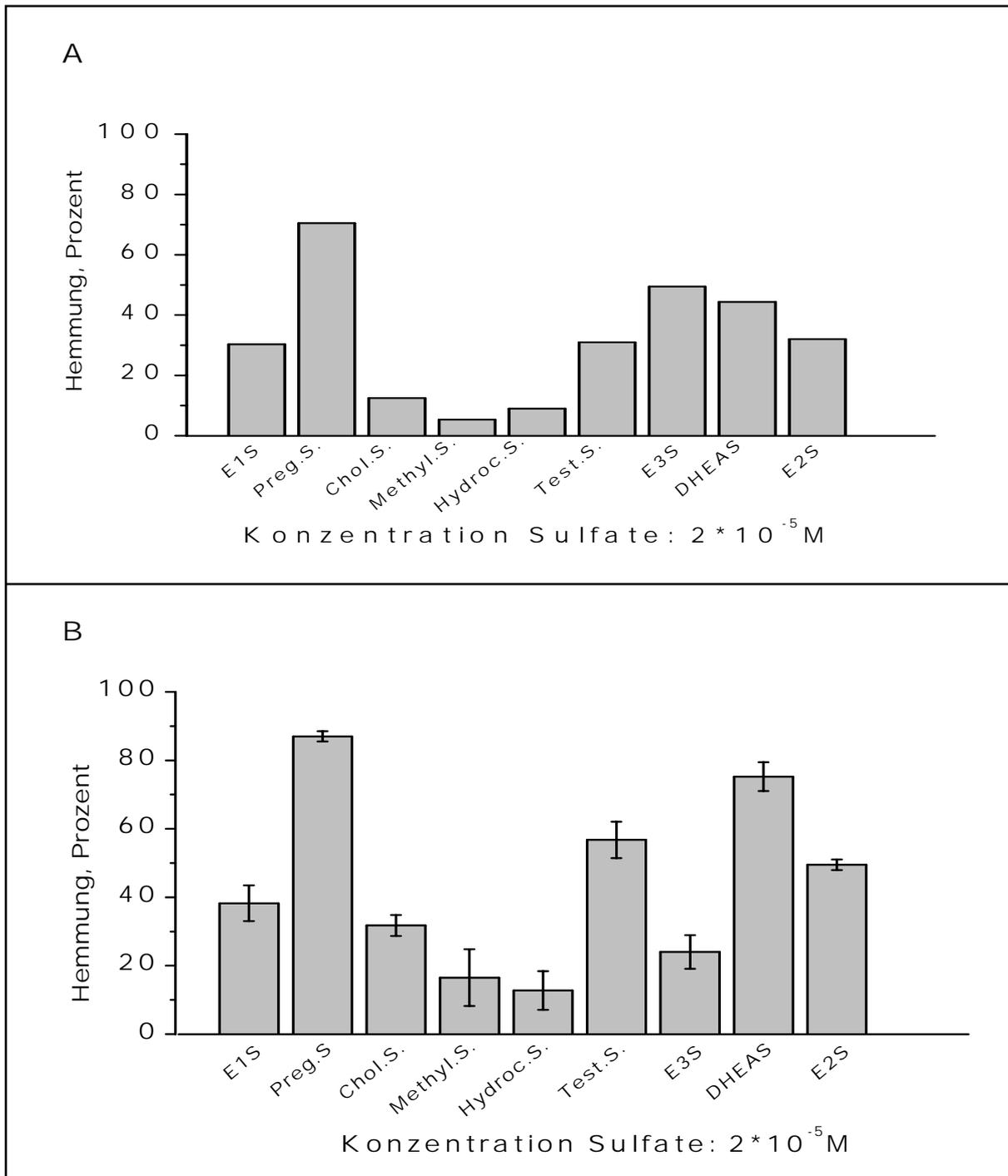
### Zu 2a)

Abbildung 21 A zeigt die Hemmung der Sulfataseaktivität durch verschiedene Steroidsulfate im Aortengewebe von 2 Frauen (Alter: 40 Jahre und 41jährige Patientin mit Marfan-Syndrom) und einem 57jährigen Mann.

Erst ab einer Sulfatkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5}$  M) und einer Inkubationszeit von 30 Minuten erfolgte die Hemmung der Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S. Stärkster Inhibitor war Pregnenolonsulfat mit einer Hemmwirkung auf die Sulfataseaktivität von 70%. Estriolsulfat (E3S), DHEAS, Estradiolsulfat (E2S), E1S und Testosteronsulfat hemmten die Sulfataseaktivität zu  $\leq 50\%$ . Der Einfluß von Cholesterolsulfat, Hydrocortisonsulfat und Methylumbelliferylsulfat auf die Sulfataseaktivität war  $< 10\%$ .

### Zu 2b)

Abbildung 21 B zeigt die Hemmung der Sulfataseaktivität durch verschiedene Steroidsulfate von 4 verschiedenen Zelllinien der VSMCs von 2 Frauen (Alter: 37jährige Patientin mit Marfan-Syndrom und 72 Jahre) und 2 Männern (Alter: 38 und 63 Jahre). Nach 4stündiger Inkubation bei einer Sulfatkonzentration von 20  $\mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5}$  M) und einer Substratkonzentration von 1  $\mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S erwies sich Pregnenolonsulfat als stärkster Hemmer ( $> 80\%$ ). DHEAS und Testosteronsulfat zeigten eine Hemmung von  $\geq 60\%$ . E2S und E1S hemmten die Sulfataseaktivität zu 40 - 50%. Bei Cholesterolsulfat, Methylumbelliferylsulfat, Hydrocortisonsulfat und E3S betrug die Hemmung der Sulfatase  $\leq 30\%$ .



**Abbildung 21:**

Einfluß verschiedener Steroidsulfate (E1S, Pregnenolonsulfat, Cholesterolsulfat, Methylumbelliferylsulfat, Hydrocortisonsulfat, Testosteronsulfat, E3S, DHEAS und E2S) auf die Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit E1S im Aortengewebe und in den VSMCs

A. 30minütige Inkubation des Aortengewebes von 3 Patienten mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bei einer Sulfatkonzentration von  $20 \mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5}$  M);

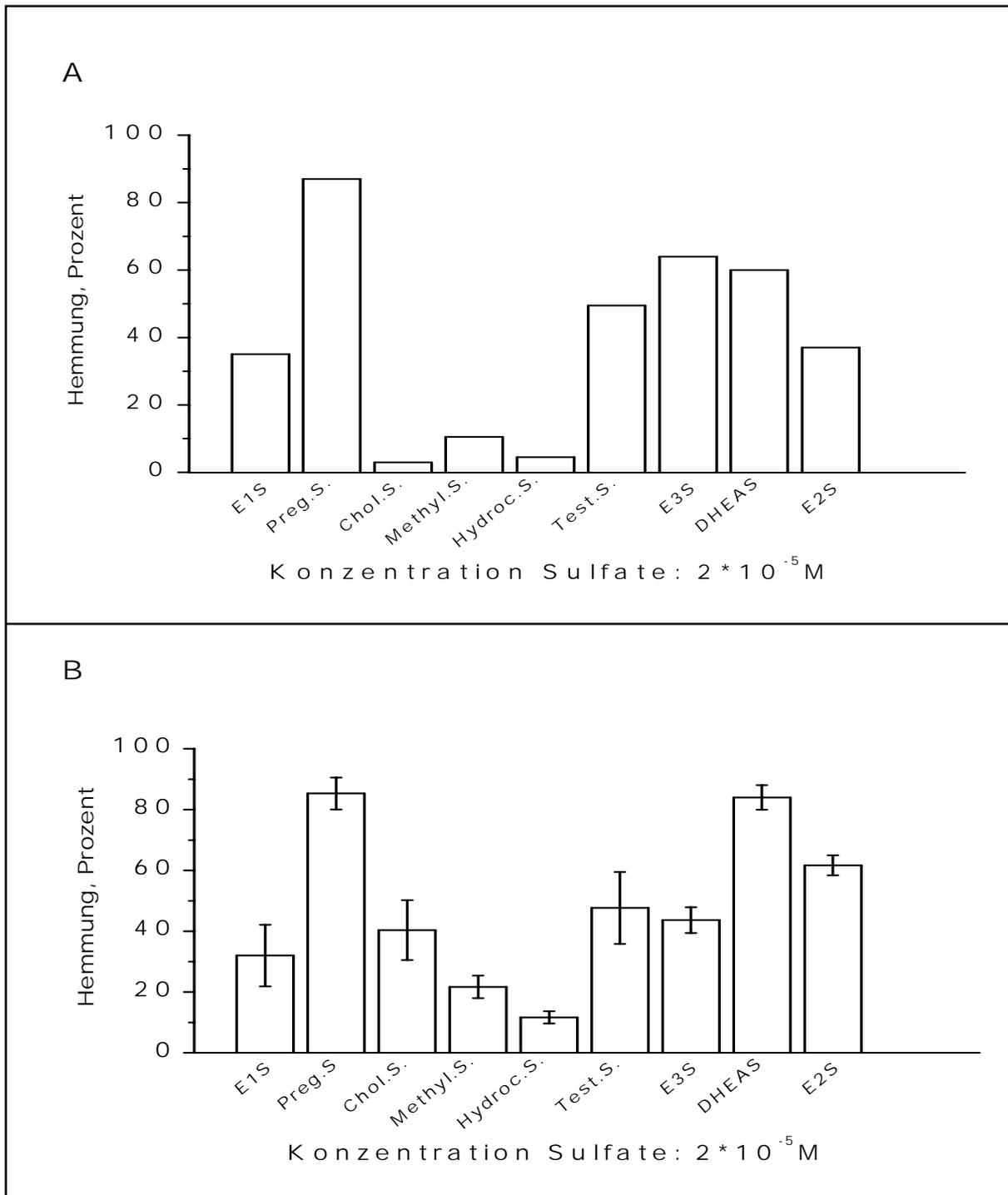
B. 4stündige Inkubation der VSMCs von 4 Patienten mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S bei einer Sulfatkonzentration von  $20 \mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

**Zu 2c)**

Abbildung 22 A zeigt die Hemmung der Sulfataseaktivität durch verschiedene Steroidsulfate (Konzentration:  $20 \mu\text{M}$ ) im Aortengewebe von 2 Männern (Alter: 66 und 67 Jahre) nach der 30minütigen Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS. Die Sulfataseaktivität wurde durch die verschiedenen Steroidsulfate unterschiedlich stark gehemmt. Pregnenolonsulfat war mit  $> 80\%$  der stärkste Hemmer der Sulfataseaktivität. E3S, DHEAS, Testosteronsulfat, E2S und E1S zeigten eine Hemmwirkung von  $\leq 60\%$ . Cholesterolsulfat, Hydrocortisonsulfat und Methylumbelliferylsulfat hemmten die Sulfataseaktivität zu  $\leq 10\%$ .

**Zu 2d)**

In der Abbildung 22 B ist die Hemmung der Sulfataseaktivität durch verschiedene Steroidsulfate (Konzentration:  $20 \mu\text{M}$ ) von 3 verschiedenen Zelllinien der VSMCs von einer 37jährigen Frau und 2 Männern (Alter: 63 und 64 Jahre) nach der 4stündigen Inkubation mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS dargestellt. Pregnenolonsulfat und DHEAS hemmten die Sulfataseaktivität am stärksten ( $> 80\%$  Hemmung). E2S, Testosteronsulfat, E3S, Cholesterolsulfat und E1S zeigten eine Hemmung von  $\leq 60\%$ . Methylumbelliferylsulfat und Hydrocortisonsulfat hemmten die Sulfataseaktivität zu  $\leq 20\%$ .



**Abbildung 22:**

Einfluß verschiedener Steroidsulfate (E1S, Pregnenolonsulfat, Cholesterolsulfat, Methylumbelliferylsulfat, Hydrocortisonsulfat, Testosteronsulfat, E3S, DHEAS und E2S) auf die Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit DHEAS im Aortengewebe und in den VSMCs

- A. 30minütige Inkubation des Aortengewebes von 2 Patienten mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS bei einer Sulfatkonzentration von  $20 \mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ );
- B. 4stündige Inkubation der VSMCs von 3 Patienten mit  $1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS bei einer Sulfatkonzentration von  $20 \mu\text{M}$  ( $2 \times 10^{-5} \text{ M}$ ).

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die Hemmwirkung der verschiedenen Steroidsulfate auf die Sulfataseaktivität sehr unterschiedlich war. Pregnenolonsulfat war im Aortengewebe und in den VSMCs sowohl nach der Inkubation mit E1S als auch mit DHEAS der stärkste Hemmer. Der Einfluß der eingesetzten Steroidsulfate auf die Sulfataseaktivität war in den VSMCs vergleichbar zu dem im Aortengewebe. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Hemmwirkung der Steroidsulfate in Abhängigkeit vom verwendeten Substrat (E1S, DHEAS) festgestellt werden.

### **3.7 pH- und Temperaturabhängigkeit der Sulfatase**

1) Untersuchungen zum Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung auf die Aktivität der Sulfatase nach der Inkubation mit E1S **(a)** bzw. DHEAS **(b)**.

Die Untersuchungen zum Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung auf die Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]E1S bzw. [ $^3\text{H}$ ]DHEAS fand im Zellhomogenat vom Aortengewebe einer 37jährigen Patientin mit Marfan-Syndrom (Abbildung 23 A) und eines 79jährigen Patienten mit Marfan-Syndrom (Abbildung 23 B) statt.

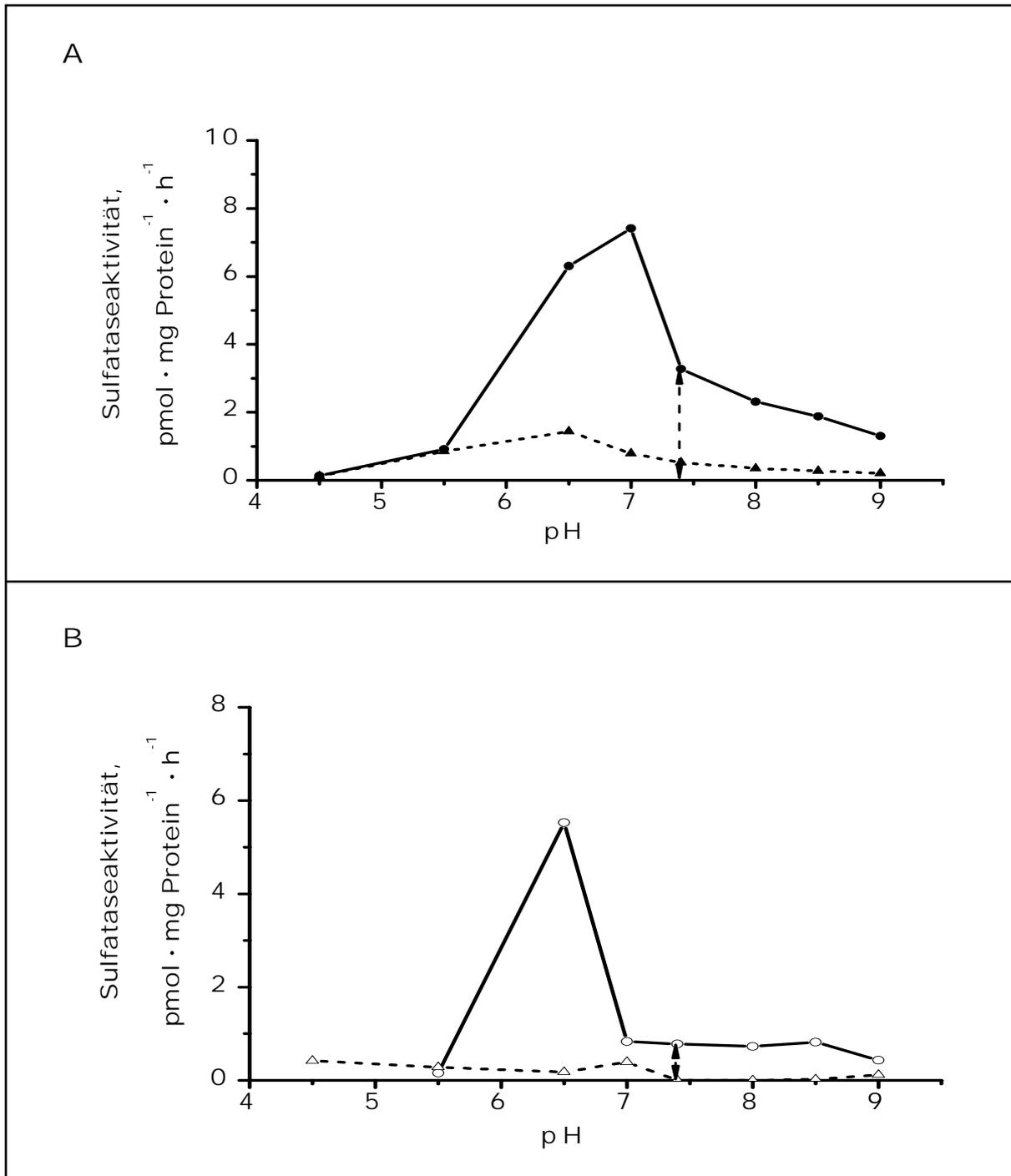
#### **Zu 1a)**

Abbildung 23 A zeigt den Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung (4,5 - 9,0) auf die Aktivität der Sulfatase nach der Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]E1S im Zellhomogenat. Bei einem pH-Wert von 7,0 wurde die höchste Sulfataseaktivität (Kontrolle) von  $7,4 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  gemessen. Die Hemmwirkung von Estronsulfamat (Konzentration:  $0,01 \mu\text{M}$ ) auf die Sulfataseaktivität war bei einem pH-Wert von 6,5 am stärksten (90%).

**Zu 1b)**

In der Abbildung 23 B ist der Einfluß des pH-Wertes der Inkubationslösung (4,5 – 9,0) auf die Aktivität der Sulfatase nach der Inkubation mit  $0,1 \mu\text{M}$  [ $^3\text{H}$ ]DHEAS im Zellhomogenat dargestellt. Die höchste Sulfataseaktivität ( $5,5 \text{ pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) wurde bei einem pH-Wert von 6,5 gemessen. Bei einem pH-Wert von 7,0 wurde die größte Hemmwirkung von Estronsulfamat (Konzentration:  $0,01 \mu\text{M}$ ) auf die Aktivität der Sulfatase von 97% nachgewiesen.

Zusammenfassend läßt sich feststellen, daß die höchste Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit [ $^3\text{H}$ ]E1S bei einem pH-Wert von 7,0 bzw. mit [ $^3\text{H}$ ]DHEAS bei 6,5 gemessen wurde (Abbildung 24). *Ein deutlicher Unterschied in der Sulfataseaktivität ist in Abhängigkeit von den verschiedenen Ausgangssubstraten bei einem pH-Wert von 7,0 zu beobachten.*



**Abbildung 23:**

Beziehung zwischen pH-Wert der Inkubationslösung und Sulfataseaktivität sowie deren Hemmung durch Estronsulfamat im Zellhomogenat bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten

A. einstündige Inkubation des Zellhomogenats einer 37jährigen Patientin mit Marfan-Syndrom mit  $0,1 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]E1S$  bei unterschiedlichen pH-Werten der Inkubationslösung (4,5 - 9,0);

Estronsulfamatkonzentration:  $0,01 \mu\text{M}$  (-▲-); Kontrollprobe (-●-);

B. einstündige Inkubation des Zellhomogenats eines 79jährigen Patienten mit Marfan-Syndrom mit  $0,1 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$  bei unterschiedlichen pH-Werten der Inkubationslösung (4,5 - 9,0);

Estronsulfamatkonzentration:  $0,01 \mu\text{M}$  (- $\Delta$ -); Kontrollprobe (- $\circ$ -).

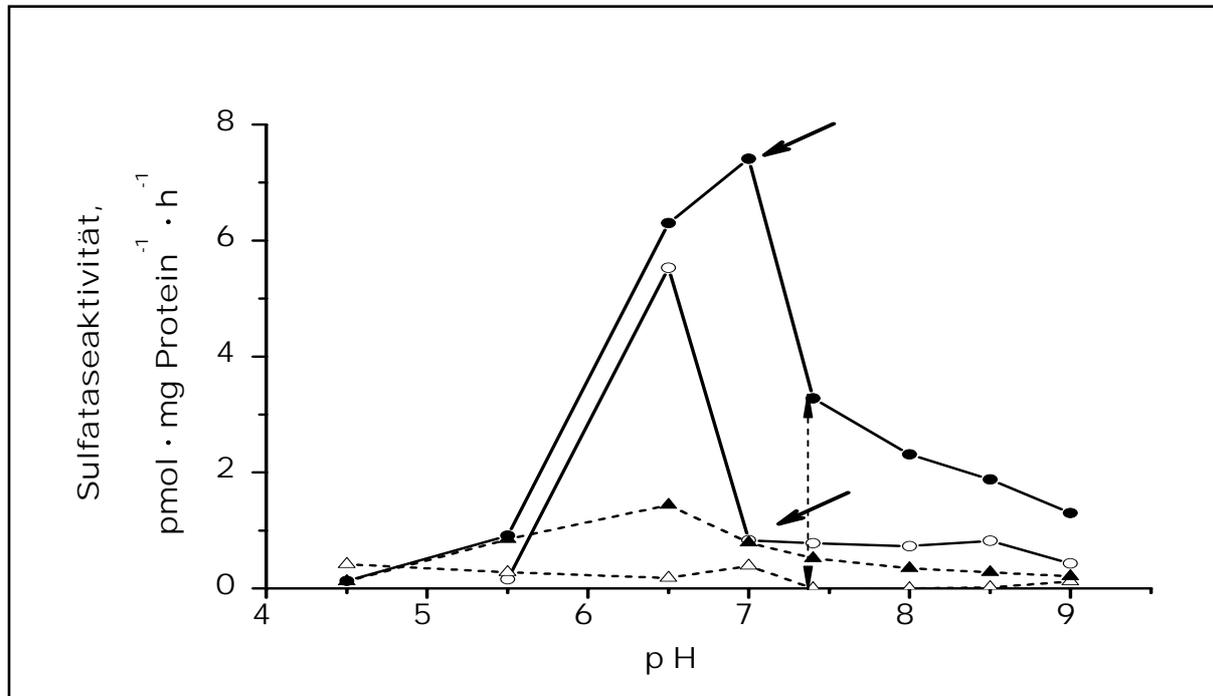


Abbildung 24:

Beziehung zwischen pH-Wert der Inkubationslösung und Sulfataseaktivität sowie deren Hemmung durch Estronsulfamat im Zellhomogenat bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten;

Einstündige Inkubation des Zellhomogenats

- einer 37jährigen Patientin mit Marfan-Syndrom mit  $0,1 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{E1S}$  (Estronsulfamat (- $\blacktriangle$ -); Kontrollprobe (- $\bullet$ -)) bzw.
- eines 79jährigen Patienten mit Marfan-Syndrom mit  $0,1 \mu\text{M}$   $[^3\text{H}]\text{DHEAS}$  (Estronsulfamat (- $\Delta$ -); Kontrollprobe (- $\circ$ -)) bei unterschiedlichen pH-Werten der Inkubationslösung.

**2)** Untersuchung des Einflusses unterschiedlicher Temperaturen auf die Aktivität der Sulfatase nach der Inkubation mit E1S (a) bzw. DHEAS (b).

Die Untersuchungen zum Einfluß verschiedener Temperaturen auf die Sulfataseaktivität mit unterschiedlichen Ausgangssubstraten ( $[^3\text{H}]$ E1S bzw.  $[^3\text{H}]$ DHEAS) erfolgte im Zellhomogenat vom Aortengewebe einer 70jährigen Patientin.

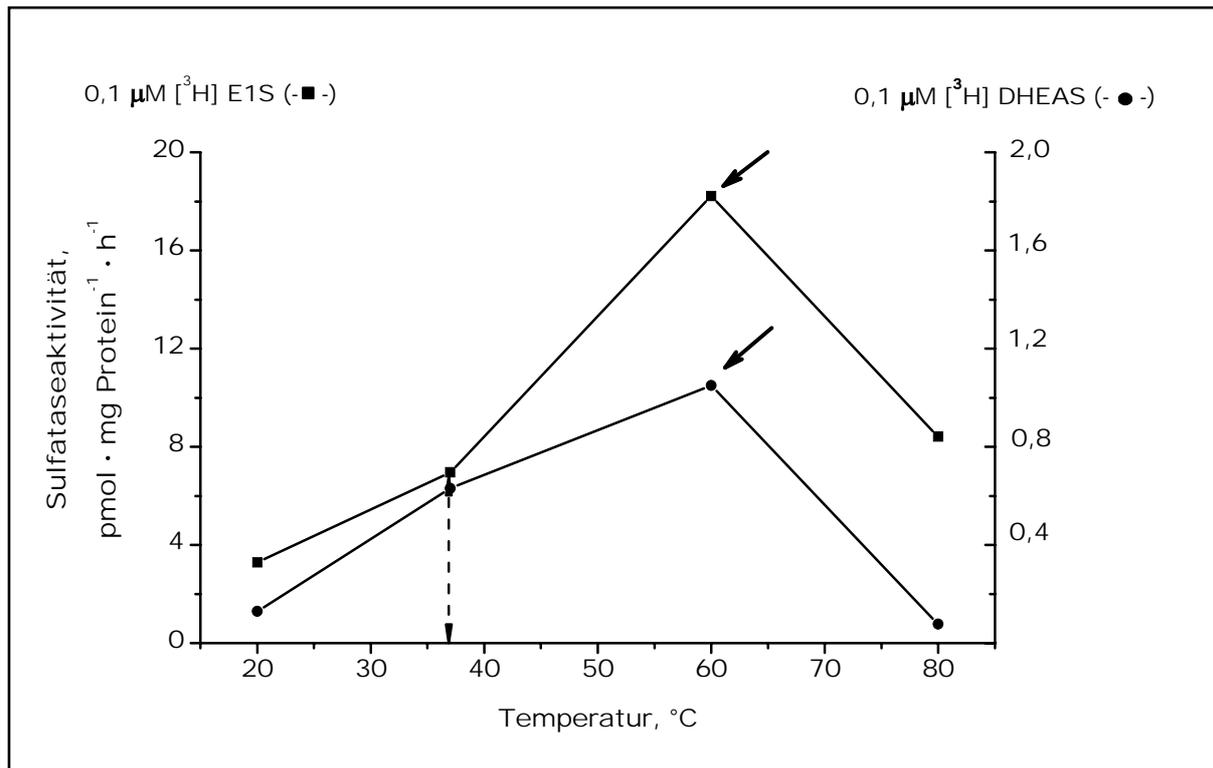
**Zu 2a)**

Abbildung 25 zeigt den Einfluß unterschiedlicher Inkubationstemperaturen (20 - 80°C) auf die Sulfataseaktivität nach der einstündigen Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ E1S. Die höchste Sulfataseaktivität von 18,2  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  wurde bei einer Temperatur von 60°C gemessen. Die Sulfataseaktivität war bei 37°C (7  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) geringer als bei 60°C, aber vergleichbar zu der bei 80°C (8,4  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ).

**Zu 2b)**

Nach der einstündigen Inkubation mit 0,1  $\mu\text{M}$   $[^3\text{H}]$ DHEAS bei unterschiedlichen Temperaturen (20 - 80 °C) wurde die höchste Sulfataseaktivität von 1,05  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  bei einer Inkubationstemperatur von 60°C gemessen (Abbildung 25). Bei dieser Temperatur war die Sulfataseaktivität doppelt so hoch wie bei 37°C (0,6  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ). Bei einer Inkubationstemperatur von 80°C (0,78  $\text{pmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) konnte eine Sulfataseaktivität vergleichbar der bei 37 °C gemessen werden.

Die höchste Sulfataseaktivität wurde nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]$ E1S und  $[^3\text{H}]$ DHEAS bei einer Temperatur von 60°C gemessen. *Die Sulfataseaktivität war in Abhängigkeit von den Inkubationstemperaturen und den daraus resultierenden Messpunkten nach der Inkubation mit  $[^3\text{H}]$ DHEAS geringer als mit  $[^3\text{H}]$ E1S.*



**Abbildung 25:**

Beziehung zwischen verschiedenen Inkubationstemperaturen und Sulfataseaktivität im Zellhomogenat bei unterschiedlichen Ausgangssubstraten; Einstündige Inkubation des Zellhomogenats einer 70jährigen Patientin mit 0,1 µM [³H]E1S (-■-) bzw. 0,1 µM [³H]DHEAS (-●-) bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen (20 - 80°C).

**Zusammenfassend läßt sich feststellen:**

- 1) Im Aortengewebe und in den VSMCs wurde nach der Inkubation mit E1S die Bildung von Estron und Estradiol nachgewiesen. Der quantitativ wichtigste Metabolit aller Untersuchungen mit E1S war Estron. Für die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) wurde in den VSMCs ein Wert von 10 µM berechnet.
- 2) In den VSMCs wurde nach der Inkubation mit DHEAS die Bildung von DHEA, Androstendion und z.T. von Testosteron bestätigt. Der quantitativ wichtigste Metabolit der nachgewiesenen Steroide war DHEA. Für die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) wurde in den VSMCs ein Wert von 5 µM berechnet.

- 3)** Die Sulfataseaktivität war in den VSMCs nach der Inkubation mit E1S in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Substratkonzentration doppelt so hoch wie nach der Inkubation mit DHEAS.
- 4)** Für Estronsulfamat wurde im Aortengewebe nach der Inkubation mit E1S ein  $IC_{50}$  von  $1,6 \times 10^{-8}$  M und in den VSMCs von  $1,1 \times 10^{-9}$  M bestimmt. Estronsulfamat (0,01  $\mu$ M) zeigte in den VSMCs unabhängig vom eingesetzten Substrat (E1S, DHEAS) die gleiche Hemmwirkung auf die Sulfataseaktivität.
- 5)** Pregnenolonsulfat war im Aortengewebe und in den VSMCs der stärkste Hemmer der Sulfataseaktivität.
- 6)** Die höchste Sulfataseaktivität wurde im Zellhomogenat der VSMCs nach der Inkubation mit E1S bei einem pH-Wert von 7,0 und mit DHEAS von 6,5 gemessen.
- 7)** Bei einer Inkubationstemperatur von 60°C wurde im Zellhomogenat der VSMCs die höchste Sulfataseaktivität unabhängig vom eingesetzten Substrat (E1S, DHEAS) nachgewiesen.

## 4 Diskussion

### 4.1 Stoffwechsel von E1S und DHEAS im menschlichen Aortengewebe

Unsere Untersuchungen dienen dem weiteren Verständnis, zu zeigen, wie Estrogene und Androgene die in der Literatur beschriebene kardioprotektive Wirkung auf das Herzgefäßsystem ausüben.

Unser Patientengut zeigte die klinische Symptomatik (Hypertonie, Adipositas), die charakteristisch für Patienten mit koronaren Herzkrankheit ist [116]. Aus diesem Grund ist anzunehmen, daß das verwendete Herzgefäßgewebe für unsere Stoffwechseluntersuchungen geeignet war.

Frühere Untersuchungen im menschlichen Knochen und in Osteoblastenzellen (HOBCells) zeigen, daß E1S oder DHEAS als Substrat für die Estrogen- und/oder Androgenbildung bei Männern und Frauen dient [41, 101]. Die lokale Synthese von Estron bzw. DHEA erfolgte in diesem Gewebe durch die Hydrolyse von E1S bzw. DHEAS vermittelt durch das Enzym Sulfatase. Andere Untersuchungen haben die Sulfataseaktivität in verschiedenen adulten und fetalen Geweben [43, 87, 92, 94, 105, 119] sowie isolierten menschlichen Zellen, beispielsweise den Amnion-, Chorion-, [96, 98] Vaginal-, Ovarial- und Endometriumzellen [97] nachgewiesen. Die Quelle der lokalen Estrogenbildung in den extragonadalen Geweben [157, 171] können einerseits zirkulierende Androgene bzw. Androgenvorstufen (Aromatase) oder andererseits E1S (Sulfatase) sein.

Ebenso wie im menschlichen Knochen der Nachweis der Estrogen (ER- $\alpha$ ,  $\beta$ )-, und Androgenrezeptoren (AR) erbracht wurde, so erfolgte auch die Wirkung der Estrogene und Androgene in den Zellen des Herzgefäßsystems rezeptorvermittelt [18, 64, 81, 101, 160]. Von Interesse ist, daß in den menschlichen VSMCs der Aorta die mRNA Expression der Sulfatase [92, 106] und die der Aromatase [104] nachgewiesen wurde. RT-PCR Analysen zeigten Unterschiede in den mRNA Expressionsspiegeln der Sulfatase (STS) und Sulfotransferase (EST) in Abhängigkeit vom pathophysiologischen Zustand des Aortengewebes. Das Zytokin Interleukin-1 $\beta$ , bekannt als ein wichtiger Regulationsfaktor, senkte die mRNA Expression der STS und steigerte die der EST, was in verschiedenen atherosklerotisch veränderten Aorten von Frauen zu einer Senkung der lokalen Estrogenbiosynthese führte [106].

Unseres Wissens gibt es derzeit keine Untersuchungen zur Aktivität der Sulfatase im menschlichen Herzgefäßgewebe. Deshalb wurde der Stoffwechsel von E1S und

DHEAS im frisch resezierten Aortengewebe und in den daraus kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen untersucht.

Mit diesen Untersuchungen konnte erstmalig gezeigt werden, daß Aortengewebe und VSMCs die erforderlichen Enzymsysteme besitzen, um aus E1S, dem mengenmäßig wichtigsten Estrogen im Serum, Estron und Estradiol zu bilden. Weiterhin konnte in den VSMCs nach der Inkubation mit DHEAS, die Bildung von DHEA, Androstendion und z.T. von Testosteron nachgewiesen werden. Wir vermuten daher, daß die lokale Estrogen- und Androgenbildung aus zirkulierenden Vorstufen eine wichtige Rolle in der Morphologie spielt. Bereits bekannte Ergebnisse unterstützen diese Vermutung [7, 19, 49, 69, 125, 126, 151, 164].

In allen Untersuchungen war Estron der quantitativ wichtigste Metabolit. Im Gegensatz zu Estradiol, was in deutlich geringeren Mengen gebildet wurde, ist Estron biologisch unwirksamer. Es besitzt nur etwa ein Viertel der Wirkung des Estradiols [13] und hat, wie E1S und Estriol, eine signifikant niedrigere Affinität zum Estrogenrezeptor [146].

Die lokale Estrogenbildung ist folglich sehr entscheidend, da durch sie verschiedene Gewebsvorgänge, wie beispielsweise die Steigerung der NO-Produktion, Vasodilatation, Prostazyklinspiegel bzw. Senkung der Proliferation glatter Gefäßmuskelzellen, Endothelin-1-Spiegel, LDL-Oxidation, freien Radikale und Thromboxanspiegel, angestoßen werden können [162]. Bei postmenopausalen Frauen sind auftretende kardiovaskuläre Komplikationen vermutlich zum großen Teil auf das Absinken des  $17\beta$ -Estradiols zurückzuführen, dessen kardioprotektive Wirkung durch Estron oder Estriol nicht ersetzt oder induziert werden kann [31].

Unsere kinetischen Untersuchungen zeigen einen hohen Wert für die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ). Eine Sättigung konnte erst weit über der im Serum vorliegenden E1S-Konzentration (Männer: 1,8 nM; Frauen Zyklusmitte: 7,7 nM / Postmenopause: 0,3 - 2,3 nM [108, 133]), bei einer Substratkonzentration von 10  $\mu$ M erreicht werden. Verglichen mit den Angaben aus der Literatur (s. Tabelle 8) wird deutlich, daß der in den VSMCs berechnete  $K_m$  im Konzentrationsbereich anderer Gewebe liegt. Unterschiede in der maximalen Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) belegen vermutlich die relative Enzymmenge in den verschiedenen Geweben. Gerade durch die unterschiedlichen Werte für  $K_m$  und  $V_{max}$  in den einzelnen Geweben und Zellen wird gezeigt, wie gewebsspezifisch das Enzym Sulfatase agiert und wie sich die

Sulfataseaktivität bei pathophysiologischen Zuständen ändert. Dem entspricht, daß im Brustkrebsgewebe eine signifikant höhere Sulfataseaktivität gemessen wurde als im nichtkarzinomatös veränderten Brustdrüsen- und Brustfettgewebe [157], was speziell bei postmenopausalen Frauen zu deutlich höheren Estrogenspiegeln im kranken als im normalen Gewebe und Plasma führt [10, 112, 170]. Andererseits sind die Werte für die Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) in den karzinomatös veränderten Knochenzellen (HOS, MG-63) [41] geringer als in normalen Zellen (HOB) und im Knochen (Bone fragments) [101].

Tabelle 8:

Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) für das Enzym Sulfatase nach der Inkubation mit E1S in verschiedenen menschlichen Zellen bzw. Geweben.

Gewebeart	Sulfatase (Substrat: E1S)		Literaturverweis
	$\sim K_m$	$\sim V_{max}$	
- Brustdrüsen- gewebe	35 $\mu\text{M}$	2640 $\text{nmol} \cdot \text{mg DNA}^{-1} \cdot \text{h}$	[153]
- Endometrium	3,12 $\mu\text{M}$		[119]
- Lungengewebe	9 $\mu\text{M}$	1,4 $\text{nmol} \cdot 100 \text{ mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{h}$	[94]
- Knochen (Bone fragments)	5,2 $\mu\text{M}$	0,04 $\text{nmol} \cdot 100 \text{ mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[101]
- Osteoblasten (HOB)	5,9 $\mu\text{M}$	0,85 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[101]
- Brustdrüsenkrebs- gewebe	7,6 $\mu\text{M}$	1,2 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[105]
Brustdrüsenkrebs- zellen (MCF-7)	6,3 $\mu\text{M}$	2,5 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[87]
	6,3 $\mu\text{M}$	20,9 $\text{nmol} \cdot \text{mg DNA}^{-1} \cdot \text{h}$	[153]
- Osteosarkomazellen (HOS)	0,98 $\mu\text{M}$	0,19 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
MG-63	0,3 $\mu\text{M}$	0,5 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[41]
- vaginalen und ovarielen Krebszelle	5 $\mu\text{M}$		[97]
<b>→ unsere Ergebnisse:</b>			
<b>VSMCs</b>	<b>10 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0,83 <math>\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}</math></b>	

Unter den eingesetzten Bedingungen waren keine signifikanten Unterschiede in der Sulfataseaktivität und Estrogenbildung bei Männern und Frauen unterschiedlichsten Alters bei gleicher E1S-Konzentration nachweisbar. Dies wurde auch in Untersuchungen im menschlichen Knochen beobachtet [101]. Eine Erklärung ist darin zu suchen, daß unsere Arbeiten im weit supraphysiologischen Bereich und unter Kurzzeitinkubationen durchgeführt wurden. In vivo variiert geschlechtsabhängig

und bei Frauen zudem zyklusabhängig [169] die tägliche Serumproduktion von Estron und Estradiol. Mit Erlöschen der Ovarialfunktion fallen die Estradiolspiegel deutlich ab [70, 169]. Daher erfolgt die Estrogenbildung bei postmenopausalen Frauen hauptsächlich durch die periphere Umwandlung von Testosteron und Androstendion im Fett- und Muskelgewebe. Die Estrogenbildung aus Androstendion wurde in ersten Versuchen in den VSMCs nachgewiesen. Wir fanden im Vergleich zum Androstendion-Stoffwechsel, daß E1S die quantitativ größere Quelle für die Bildung biologisch aktiver Estrogene ist. Im Brustkrebsgewebe war die Estronbildung aus E1S 10fach höher als die aus Androstendion [136].

Verglichen mit E1S ist DHEAS vor allem im Androgenstoffwechsel sehr bedeutsam. DHEAS ist ein wichtiger Präkursor für die Synthese von Testosteron. Bei jungen Männern und Frauen sind die DHEAS-Serumspiegel ungefähr 100-500 mal höher als die von Testosteron und 1000-10000 mal höher als die von Estradiol, was zeigt, welches große Reservoir an Substrat für die Bildung von Androgenen und/oder Estrogenen im jeweiligen Zielgewebe zur Verfügung steht [63, 74, 110]. Bei Männern korrelieren niedrige Testosteronspiegel im Serum mit einem steigenden Risiko für die koronare Atherosklerose [115].

Unsere Versuche belegen, daß neben der Bildung freier Estrogene aus E1S, vermittelt durch die Sulfatase, auch Androgene, ausgehend von DHEAS, entstehen. Dies weist auf die wichtige Rolle dieses Enzyms hin.

Darüber hinaus konnte ausgehend von DHEAS eine gesamte Kaskade von Enzymen (3 $\beta$ -HSD, 17 $\beta$ -HSD) nachgewiesen werden.

Obwohl in unseren Untersuchungen DHEA aus DHEAS mengenmäßig das wichtigste Stoffwechselprodukt war, besitzt Testosteron, welches nur in sehr geringen Mengen nachgewiesen werden konnte, die stärkere androgene Wirkung. Das biologisch aktivste Androgen ist Dihydrotestosteron (DHT) [13]. Die Bildung von DHT konnte bereits in den VSMCs der Ratte mit Hilfe der 5 $\alpha$ -Reduktase nachgewiesen werden, wo es im Vergleich zu Testosteron eine höhere mitogene Aktivität zeigte [42, 81].

Interessant ist, daß neben DHEA, Androstendion und Testosteron noch weitere Metabolite gebildet wurden. Zukünftige Untersuchungen könnten diese genauer charakterisieren.

Durch die Bildung von Testosteron und DHEA können verschiedene Gewebsvorgänge, wie beispielsweise die Vasodilatation und/oder Vasokonstriktion, Veränderungen des Gefäßtonus, angestoßen werden. Der direkte Effekt von Testosteron auf die koronare Zirkulation bei Männern ist derzeit unbekannt. Während im Tierversuch Estradiol die Migration glatter Gefäßmuskelzellen der Ratte hemmte, zeigte Testosteron (exogen) diesen Effekt nicht [68]. Bei postmenopausalen Frauen führt die DHEA- und Testosterongabe zu einer Steigerung der Proliferation von Endothelialzellen in großen und kleinen Gefäßen [167]. Vermutlich liegen die geschlechtsspezifischen Unterschiede in der Androgenwirkung in ihrer Vermittlung. Im Gegensatz zu Testosteron konnte für DHEA noch kein spezifischer Rezeptor in den Zellen des Gefäßsystems (endotheliale Zellen, glatte Muskelzellen, myokardiale Fibroblasten, Makrophagen etc.) identifiziert werden, durch den sich die protektiven Effekte von DHEA erklären lassen [81].

Die im Körper vorliegenden DHEAS-Plasmakonzentrationen betragen im Alter von 20-30 Jahren bei Männern 10 und 13  $\mu\text{mol/L}$  und Frauen 6  $\mu\text{mol/L}$  und fallen bis zum 70./80. Lebensjahr um mehr als 70% [63, 72, 110]. Damit liegen die verwendeten Substratkonzentrationen (0,05 - 30  $\mu\text{M}$  DHEAS) weitestgehend im physiologischen Bereich von jungen Menschen. Da unsere Untersuchungen vorrangig an älteren Patienten durchgeführt wurden, wäre es möglich, daß die DHEA-, Androstendion- und Testosteronbildung in vivo, aufgrund der geringeren Verfügbarkeit von DHEAS im Alter, niedriger sein könnte.

In den VSMCs wurde durch die Enzymkinetik (z.B.  $K_m$ ) gezeigt, daß die Sulfatase in großer Menge vorliegt und über eine hohe Aufnahmekapazität für DHEAS (5 -10  $\mu\text{M}$ ) verfügt. Verglichen mit den Ergebnissen aus der Literatur (s. Tabelle 9) kann man feststellen, daß der berechnete  $K_m$  für die VSMCs im selben Größenordnungsbereich der aufgeführten Gewebe liegt. Darüber hinaus befindet sich der berechnete  $K_m$  für die Sulfatase nach der Inkubation mit DHEAS im Konzentrationsbereich der Sulfatase nach der Inkubation mit E1S (s. Tabelle 8).  $V_{\text{max}}$  differiert in Abhängigkeit von der Gewebeart und der dort vorliegenden relativen Enzymmenge. Anhand der Untersuchungen und den Angaben in der Literatur wurde gezeigt, wie sich in Abhängigkeit vom Gewebe (pathophysiologische Zustände) die enzymkinetischen Eigenschaften ändern.

Tabelle 9:

Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Umsatzgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) für das Enzym Sulfatase nach der Inkubation mit DHEAS in verschiedenen menschlichen Zellen bzw. Geweben.

Gewebeart	Sulfatase (Substrat: DHEAS)		Literaturverweis
	$\sim K_m$	$\sim V_{max}$	
- Brustdrüsen- gewebe	13 $\mu\text{M}$	317 $\text{nmol} \cdot \text{mg DNA}^{-1} \cdot \text{h}$	[153]
- Endometrium	5,75 $\mu\text{M}$		[119]
- fetale Membran	6 $\mu\text{M}$		[43]
- Lungengewebe	7 $\mu\text{M}$	1,0 $\text{nmol} \cdot 100 \text{ mg Gewebe}^{-1} \cdot \text{h}$	[94]
- Brustdrüsenkrebs- zellen (MCF 7)	3,6 $\mu\text{M}$ 3,6 $\mu\text{M}$	0,32 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 2,7 $\text{nmol} \cdot \text{mg DNA}^{-1} \cdot \text{h}$	[87] [153]
- Osteosarkomazellen (HOS)	0,58 $\mu\text{M}$	1,47 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	
MG-63	0,74 $\mu\text{M}$	12,7 $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$	[41]
- vaginalen und ovarielen Krebszellen	6 $\mu\text{M}$ 4 $\mu\text{M}$		[97]
<b>→ unsere Ergebnisse:</b>			
<b>VSMCs</b>	<b>5 <math>\mu\text{M}</math></b>	<b>0,12 <math>\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}</math></b>	

Untersuchungen zum Stoffwechsel von DHEA in der menschlichen Genitalhaut zeigten geschlechtsspezifische Unterschiede in der Umwandlungsrate. Während bei Männern vorrangig Androstendion und Androstandion gebildet wurde, gefolgt von Androstendiol und Androstendion, waren bei den Frauen Androstendiol und Androstendion die Hauptmetaboliten, gefolgt von DHT und Androstandion [66]. In vivo differiert sowohl die DHEAS- als auch die DHEA-Plasmakonzentration alters- und geschlechtsspezifisch. Auch die Testosteron- und Androstendionkonzentration variiert in Abhängigkeit vom Alter [72]. Beim erwachsenen Mann liegt die

Testosteronkonzentration zwischen 12 - 40 nmol/L und sinkt ab dem 40. Lebensjahr jährlich um durchschnittlich 0,4%. Nicht gebundenes, freies Testosteron fällt sogar um 1,2% [99]. Bei der Frau, deren Testosteronproduktion im Ovar, in der NNR sowie durch die periphere Umwandlung erfolgt, bleibt diese bis ins hohe Lebensalter weitgehend konstant (Gesamttestosteron: 0,5 - 2,4 nmol/L; freies Testosteron: 3,5 - 29 pmol/L), [39]. In der Postmenopause ist das Ovar die wichtigste Quelle der Androgenproduktion (Gesamttestosteron: 0,5 - 1,8 nmol/L; freies Testosteron: 2,1 - 23 pmol/L) [39].

Unter den eingesetzten Bedingungen wurden in den VSMCs keine Unterschiede in der Sulfataseaktivität sowie DHEA- und Androstendionbildung bei Frauen und Männern unterschiedlichen Alters festgestellt. Die Ursachen sind wahrscheinlich, wie bei E1S, in den eingesetzten Substratkonzentrationen, die im supraphysiologischen Bereich lagen, und den Kurzzeitinkubationen zu suchen. Damit stehen unsere Ergebnisse nicht im Gegensatz dazu, was in der Peripherie gemessen werden kann.

Weiterhin zeigen unsere Ergebnisse, daß die Sulfataseaktivität in den VSMCs in Abhängigkeit von der Inkubationszeit und Substratkonzentration nach der Inkubation mit E1S doppelt so hoch war wie die nach der Inkubation mit DHEAS. Da die Sulfataseaktivität mit E1S höher war als die mit DHEAS wurde bei gleicher Substratkonzentration mehr Estron als DHEA gebildet. Durch diese differente Verfügbarkeit könnte auch die Bildung biologisch aktiver Steroide sowie deren Wirkungen auf das Gefäßsystem unterschiedlich beeinflußt werden.

Die Unterschiede in der Sulfataseaktivität, die auch in anderen Geweben [41, 87, 94, 97, 119] gefunden wurden, der nichtlineare Kurvenverlauf verbunden mit den differenten maximalen Umsatzgeschwindigkeiten ( $V_{max}$ ) könnten auf die Anwesenheit von mehr als einer Sulfatase hinweisen.

Milewich et al. 1984 [107] zeigte in verschiedenen Geweben von Mäusen, daß die Hydrolyserate von E1S ungefähr 3fach höher war als die von DHEAS. Milewich und Porter 1987 [97] fanden in 4 unterschiedlichen Krebszelllinien des Ovars, Vagina und Endometriums ebenfalls eine 3fach höhere Hydrolyserate nach der Inkubation mit E1S. Neben der differenten Hydrolyserate wurden im menschlichen Myometrium ebenfalls Unterschiede im pH-Wert, Temperaturmilieu und in der Hemmwirkung verschiedener Substanzen nach der Inkubation mit E1S zu der mit DHEAS festgestellt werden, die nach Prost et al. 1983 [119] auf die Existenz 2er

verschiedener Sulfatasen hinweisen. MacIndoe et al. 1988 [87] gehen trotz der ähnlichen subzellulären Lokalisation und pH-Anforderungen der MCF-7 Sulfatase nach der Inkubation mit E1S bzw. DHEAS davon aus, daß die Unterschiede in der Temperatur- und Ethanolempfindlichkeit, den Einfluß verschiedener Hemmer und ihrer Kinetik, klar belegen, daß es 2 Isoenzyme gibt.

Mit der Absicht, die wichtige Rolle der Sulfatase unter physiologischen und pathologischen Bedingungen besser zu untersuchen, wurden vielfältige Forschungen durchgeführt, um Substanzen zu entwickeln, die dem Substrat dieses Enzyms, z.B. E1S, geometrisch sehr ähnlich sind, aber selber nicht katalysiert werden können [127]. Diese alternativen Substanzen besitzen Sulfatgruppe(n), welche mit dem Substrat, E1S, um die Enzymbindung am aktiven Zentrum konkurrieren und folglich die Hydrolyse (zu Estron) verhindern [127]. Die derzeit größte inhibitorische Wirkung auf die Sulfataseaktivität besitzt EMATE (Estron-3-O-sulfamat), [122, 123]. Estronsulfamat erwies sich in plazentalen Mikrosomen als ein zeit-, konzentrations- und pH-abhängiger irreversibler steroidaler Hemmer [2, 120]. Im Aortengewebe und in den VSMCs war Estronsulfamat potentieller Hemmer der Sulfataseaktivität nach der Inkubation mit E1S ( $IC_{50}$  Aortengewebe:  $1,6 \times 10^{-8}$  M,  $IC_{50}$  VSMCs:  $1,1 \times 10^{-9}$  M) und der mit DHEAS. Diese Ergebnisse wurden auch in plazentalen Mikrosomen und intakten MCF-7 Brustkrebszelllinien gefunden [121].

Daten aus der Literatur zur Enzymkinetik zeigen, daß viele sulfatierte Steroide die Hydrolyse von anderen blockieren [87, 119]. Unsere Ergebnisse im Aortengewebe und in den VSMCs bestätigen auch, daß die Hydrolyse von E1S bzw. DHEAS durch verschiedene Steroidsulfate, E1S, Pregnenolonsulfat, Cholesterolsulfat, Methylumbelliferylsulfat, Hydrocortisonsulfat, Testosteronsulfat, Estriolsulfat, DHEAS und Estradiolsulfat gehemmt wird. Allerdings waren keine deutlichen Unterschiede in der Hemmung in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat ersichtlich. Dies steht aber nicht im Widerspruch zu unseren Ergebnissen, die auf die Annahme von mehr als einer Sulfatase verweisen. Eine Erklärung ist darin zu suchen, daß aufgrund des begrenzten Zell- bzw. Gewebematerials die Untersuchungen nur mit einer Konzentration der Steroidsulfate (20  $\mu$ M) durchgeführt werden konnten.

Andererseits sind die unterschiedlichen pH-Optima für die Sulfatase im Zellhomogenat von VSMCs (s. Tabelle 10) ein weiterer Beleg für unsere Annahme. Diese Ergebnisse sind auch mit denen aus der Literatur vergleichbar und

entsprechen der beschriebenen Charakteristik für die Sulfatase als ein Vertreter der Arylsulfatase C [109, 132, 141, 142].

Tabelle 10:

pH-Optima für das Enzym Sulfatase nach der Inkubation mit E1S bzw. DHEAS in verschiedenen menschlichen Zellen bzw. Geweben.

Gewebeart	pH-Optimum		Literaturverweis
	Sulfatase (E1S)	Sulfatase (DHEAS)	
- Endometriumgewebe	6,5	7,3	[119]
- fetale Membran (Chorion)		7,0	[43]
- Prostataepithel (Homogenat)	7,0	7,0	[67]
- Brustdrüsenkrebszellen (Homogenat)	6,0 - 7,0	6,0 - 7,0	[87]
- vaginale Karzinomazellen	6,0 - 7,5		[97]
<b>→ unsere Ergebnisse:</b>			
<b>Zellhomogenat der VSMCs</b>	<b>7,0</b>	<b>6,5</b>	

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Sulfatase ein sehr stabiles Enzym ist, welches auch bei hohen Temperaturen (Temperaturoptima: 60°C) agieren kann (s. Tabelle 11). In Abhängigkeit von der Inkubationstemperatur war die Aktivität der Sulfatase nach der Inkubation mit DHEAS im Zellhomogenat der VSMCs deutlich geringer als die nach der Inkubation mit E1S. Diese Ergebnisse wurden auch in Epithelzellen der Prostata nachgewiesen [67].

Tabelle 11:

Temperaturoptima für das Enzym Sulfatase nach der Inkubation mit E1S bzw. DHEAS in verschiedenen menschlichen Zellen bzw. Geweben.

Gewebeart	Temperaturoptima (°C)		Literaturverweis
	Sulfatase (E1S)	Sulfatase (DHEAS)	
- Amnion	60		[96]
- Chorion		53	[43]
- Endometrium	50 – 60	60	[119]
- Epithelzellen der Prostata	60	60	[67]
- vaginale Karzinomazellen	50		[97]
<b>→ unsere Ergebnisse:</b>			
<b>Zellhomogenat der VSMCs</b>	<b>60</b>	<b>60</b>	

In der Summe deuten die Unterschiede in der Sulfataseaktivität (Time Course,  $K_m$ ) und die differenten Werte für die pH-Optima in Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat, die auch durch die Literatur bestätigt werden, auf die Anwesenheit von mehr als einer Sulfatase hin.

## 4.2 Ausblick

Durch die vorliegende Arbeit konnte ein möglicher Wirkmechanismus der Estrogene und Androgene im Aortengewebe und in den VSMCs aufgezeigt werden (Abbildung 26). Unsere Ergebnisse sind vergleichbar mit denen in anderen Geweben und zeigen, daß unabhängig von der Gewebestruktur und -funktion die gleiche Enzymatik für den Steroidstoffwechsel zugrunde liegt. Daher wären weitere Untersuchungen zu den noch nicht nachgewiesenen Stoffwechselmechanismen von Interesse.

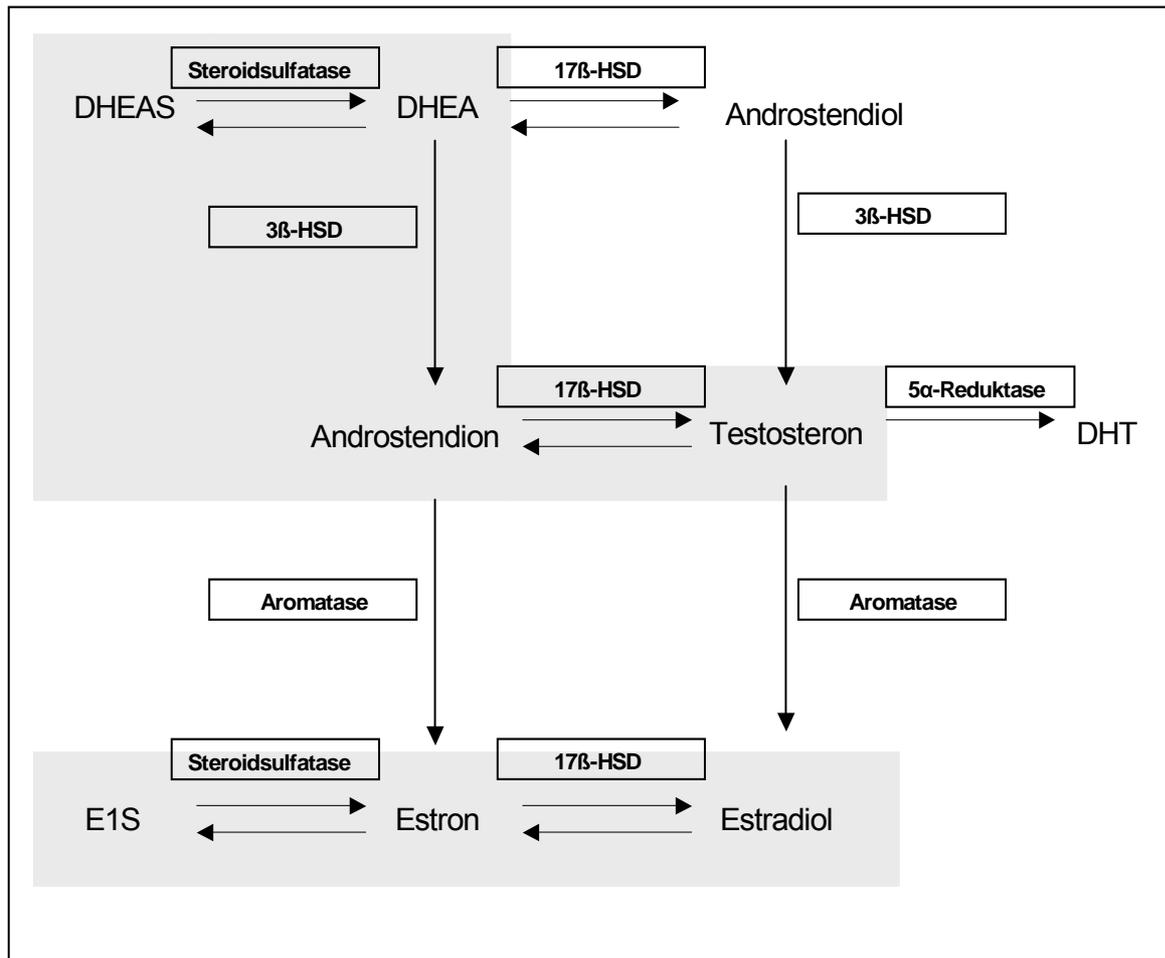


Abbildung 26:

Schematische Darstellung des nachgewiesenen Stoffwechselmechanismus  ausgehend von

- Estronsulfat (E1S) im frischen Aortengewebe und in den menschlichen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs) und
- Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) in den menschlichen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs).

Basierend auf den derzeit vorliegenden Untersuchungsergebnissen deutet sich an, daß speziell die Sulfatase und 17β-HSD eine wichtige Funktion im Estrogen- und Androgenstoffwechsel des menschlichen Aortengewebes spielt.

Unsere Ergebnisse belegen, daß menschliches Aortengewebe ein Produktionsort und Zielorgan weiblicher und männlicher Sexualhormone ist. Vermutlich werden Estrogene und Androgene für die Aufrechterhaltung der Gefäßstruktur benötigt. Dem

entspricht, daß die Häufigkeit der kardiovaskulären Ereignisse bei Frauen vor der Menopause deutlich geringer ist als bei menopausalen Frauen [162]. Die positiven "Endothel-Effekte" der Estrogene könnten daher eine mögliche Erklärung für den partiellen Schutz prämenopausaler Frauen vor kardiovaskulären Ereignissen sein [29]. Bei Männern korrelieren verringerte DHEA-, DHEAS- und Testosteronspiegel im Plasma mit einem steigenden Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen [4, 75, 115, 137, 154]. Bei Frauen mit hohen DHEAS-Plasmakonzentrationen konnte vor oder nach dem Auftreten anderer Risikofaktoren für eine koronare Herzerkrankung keine Risikoreduktion beobachtet werden [6, 61, 154].

Weiterhin weisen unsere Ergebnisse auf die Anwesenheit von mehr als einer Sulfatase hin. Da die Sulfatase eine wichtige Funktion im Steroidstoffwechsel spielt, wären weitere Untersuchungen zur eindeutigen Charakterisierung dieses Enzyms im Aortengewebe sinnvoll.

## 5 Zusammenfassung

Unsere Ergebnisse konnten zeigen, daß menschliches Aortengewebe ein Produktionsort und Zielorgan weiblicher und männlicher Sexualhormone ist.

Estrogene und Androgene zeigen kardioprotektive Effekte auf verschiedene Endothelfunktionen. Der genaue Wirkungsmechanismus ist noch nicht bekannt. Derzeit ist der Einsatz der Hormontherapie (HRT) gerade im Hinblick auf den kardiovaskulären Nutzen sehr umstritten.

Ziel dieser Arbeit war, zu zeigen, ob frisches Aortengewebe und kultivierte glatte Gefäßmuskelzellen (VSMCs) die Fähigkeit besitzen, ausgehend von E1S und DHEAS, biologisch aktive Estrogene und/oder Androgene zu bilden.

Das verwendete Gewebematerial stammte von insgesamt 25 Patienten. Erstmals konnte gezeigt werden, daß menschliches Aortengewebe die erforderlichen Enzymsysteme besitzt, um Estrogene (Estron und Estradiol) aus E1S als auch Androgene (DHEA, Androstendion, Testosteron) aus DHEAS zu bilden. In allen Untersuchungen waren Estron nach der Inkubation mit E1S und DHEA nach der Inkubation mit DHEAS die quantitativ wichtigsten Metaboliten. Für die Sulfatase wurde in den VSMCs eine Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) von 10  $\mu\text{M}$  (E1S) bzw. 5  $\mu\text{M}$  (DHEAS) berechnet. Die maximale Substratumsatzgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) betrug in den VSMCs 0,83  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  (E1S) bzw. 0,12  $\text{nmol} \cdot \text{mg Protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  (DHEAS). In den VSMCs war die Hydrolyserate nach der Inkubation mit E1S (Time Course,  $K_m$ ) 2fach höher als nach der Inkubation mit DHEAS. Estronsulfamat war ein potentieller Hemmer der Sulfataseaktivität ( $\text{IC}_{50\text{Gewebe}}$ :  $1,6 \times 10^{-8}$  M;  $\text{IC}_{50\text{VSMCs}}$ :  $1,1 \times 10^{-9}$  M). Die Sulfataseaktivität wurde ebenfalls durch verschiedene Steroidsulfate gehemmt. Pregnenolonsulfat war im Aortengewebe und in den VSMCs der stärkste Hemmer. In Abhängigkeit vom eingesetzten Substrat (E1S, DHEAS) konnten keine signifikanten Unterschiede in der Hemmung der Sulfataseaktivität durch die verschiedenen Steroidsulfate festgestellt werden. Der optimale pH-Wert für die Sulfatase lag nach der Inkubation mit E1S bei 7,0 und der mit DHEAS bei 6,5. Die höchste Sulfataseaktivität wurde unabhängig vom eingesetzten Substrat bei einer Temperatur von 60°C gemessen.

Sowohl die Bedeutung des Stoffwechsels von E1S und DHEAS als auch die Eigenschaften der Steroidsulfatase im menschlichen Aortengewebe wurden diskutiert.

Die Ergebnisse zum Stoffwechselmechanismus der Estrogene und Androgene im menschlichem Aortengewebe dienen als Grundlage für weiterführende Untersuchungen, die den Einfluß und die Bedeutung der Steroidhormone in diesem Gewebe sowohl in physiologischer als auch pathophysiologischer Hinsicht (Atherosklerose) aufklären sollen.

## 6 Summary

Our results showed that human aortic tissue is a production place and target tissue of female and male sex hormones.

Estrogens and androgens are cardioprotective effects on various functions of the endothelium. The exact mechanism is unclear. At present the employment of hormone replacement therapy (HRT) is strongly reduced regarding the cardiovascular use. The present study was undertaken to assess free estrogen and androgen formation in human aortic tissue.

Human tissue was from aorta and mammary artery specimens obtained from 25 patients undergoing cardiovascular surgery.

We demonstrated that human aortic tissue contains the necessary enzyme machinery to form estrone and estradiol from E1S and DHEA, androstenedione, and testosterone from DHEAS, in humans. Estrone from E1S and DHEA from DHEAS were the major metabolite formed. Sulfatase activity was determined as a relationship between substrate concentration (0.05 – 30  $\mu\text{M}$  E1S or DHEAS) and estrogen or androgen formation. Lineweaver-Burk analysis of data showed an apparent  $K_m$  of E1S for sulfatase of approximately 10  $\mu\text{M}$  and of DHEAS of 5  $\mu\text{M}$  in human vascular smooth muscle cells. The maximum velocity values ( $V_{\max}$ ) observed in experiments were approximately 0.83  $\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  (E1S) and 0.12  $\text{nmol} \cdot \text{mg protein}^{-1} \cdot 6\text{h}^{-1}$  (DHEAS). The sulfatase activity from E1S was several fold higher than that of DHEAS. Estrone sulfamate, a specific SST inhibitor, blocked SST with an apparent  $\text{IC}_{50}$  of  $1.6 \cdot 10^{-8}\text{M}$  (aortic tissue), and  $1.1 \cdot 10^{-9}\text{M}$  (VSMCs). Sulfatase activity was also blocked by different steroid sulfates in human aortic tissue. Pregnenolonesulfate was the strongest inhibitor. As a function of the assigned substrate (E1S, DHEAS) no significant differences in the inhibition of the sulfatase activity could be determined. The optimum pHs were 7.0 for estrone sulfatase and 6.5 for DHEAS sulfatase. The optimal temperature of steroid sulfatase was 60°C. Both the meaning of the metabolism of E1S and DHEAS and the characteristics of the steroid sulfatase in the human aortic tissue were discussed. Our results serve as basis for resuming investigations, which are to clear the influence and the meaning up of the steroid hormones in this fabric both in physiological and pathophysiological regard (atherosclerosis).

**7 Literaturverzeichnis**

1. Adachi, H., Suzuki, T., Abe, M., Aasano, N., Mizutamari, H., Tanemoto, M. et al., 2003: Molecular characterization of human and rat organic anion transporter OATP-D. *Am J Physiol Renal Physiol* 285(6):F1188-97.
2. Ahmed, S., James, K., Owen, C.P., Patel, C.K., Patel, M., 2001: Novel inhibitors of the enzyme estrone sulfatase (ES). *Bioorganic & Med Chem Letters* 11: 841-844.
3. American Heart Association, 2001: Heart and stroke statistical update. American Heart Association 2000, Dallas/TX, American Heart Association Web site. Statistics. <http://www.americanheart.org>
4. Barrett-Connor, E., Khaw, K.-T., Yen, S.S.C., 1986: A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality, and cardiovascular disease. *N Engl J Med* 315: 15-1524.
5. Barrett-Connor, E., Bush, T.L., 1991: Estrogen and coronary heart disease in woman. *JAMA* 265: 1861-1867.
6. Barrett-Connor, E., Goodman-Gruen, D., 1995: Dehydroepiandrosterone sulfate does not predict cardiovascular death in postmenopausal women. The Rancho Bernardo Study. *Circulation* 91: 1757-1760.
7. Bath, P.M., Hassall, D.G., Gladwin, A.M., Palmer, R.M., Martin, J.F., 1991: Nitric oxide and prostacyclin. Divergence of inhibitory effects on monocyte chemotaxis and adhesion to endothelium in vitro. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 11: 254-260.
8. Benedetto, M.T., Tabanelli, S., Gurpide, E., 1990: Estrone sulfate sulfatase activity is increased during in vitro decidualization of stromal cells from human endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 70(2):342-345.

9. Bergner, E.A., Shapiro, L.J., 1981: Increased cholesterol sulfate in plasma and red blood cell membranes of steroid sulfatase deficient patients. *J Clin Endocrinol Metab* 53(1): 221-223.
10. Brodi, A., Lu, Q., Nakamura, J., 1997: Aromatase in the normal breast and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61(3-6): 281-286.
11. Bruch, H.B., 1991: Androstendionmetabolismus in kultivierten menschlichen Knochenzellen von Patienten mit und ohne Osteoporose. Dissertation. Uni. Bonn.
12. Bruck, B., Brehme, U., Gugel, N., Hanke, S., Finking, G., Lutz, C., Benda, N., Schmahl, F.W., Haasis, R., Hanke, H., 1997: Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 17: 22-29.
13. Buddecke, E., 1989: *Grundriss der Biochemie. Für Studierende der Medizin Zahnmedizin und Naturwissenschaften.* Walter de Gruyter Berlin - New York (8. Auflage).
14. Bush, T.L., Barrett-Connor, E., Cowan, L.D., Criqui, M.H., Wallace, R.B., Suchindran, C.M., Tyroler, H.A., Rifkind, B.M., 1987: Cardiovascular mortality and non-contraceptive estrogen use in women: results from the Lipid Research Clinics Program follow-up study. *Circulation* 75:1102-1109.
15. Chang, P.L., Varey, P.A., Rosa, N.E., Ameen, M., Davidson, R.G., 1986: Association of steroid sulfatase with one of the arylsulfatase C isozymes in human fibroblasts. *J Biol Chem* 261(31):14443-14447.
16. Chang, P.L., Mueller, O.T., Lafrenie, R.M., Varey, P.A., Rosa, N.E., Davidson, R.G., Henry, W.M., Shows, T.B., 1990: The human arylsulfatase-C isoenzymes: Two distinct genes that escape from x inactivation. *Am J Hum Genet* 46: 729-737.

17. Chen, S.-J., Li, H., Durand, J., Oparil, S., Chen, Y.-F., 1996: Estrogen reduces myointimal proliferation after balloon injury of rat carotid artery. *Circulation* 93: 577-584.
18. Chen, Z., Yuhanna, I.S., Galcheva-Gargova, Z.I., Karas, R.H., Mendelsohn, M.E., Shaul, P.W., 99: Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103: 401-406.
19. Cornwell, T.L., Arnold, E., Boerth, N.J., Lincoln, T.M., 1994: Inhibition of smooth muscle cell growth by nitric oxide and activation of cAMP-dependent protein kinase by cGMP. *Am J Physiol* 267: C 1405-C 1413.
20. Crilly, R.G., Francis, R.M., Nordin, B.E., 1981: Steroid hormones, ageing and bone. *Clin Endocrinol Metab.* 10(1): 115-139.
21. Daly, E., Vessey, M.P., Hawkins, M.M., Carson, J.L., Gough, P., Marsh, S., 1996: Risk of venous thromboembolism in users of hormone replacement therapy. *Lancet* 348: 977-980.
22. Daniel, W.L., Chang, P.L., 1990: Comparison of arylsulfatase C and steroid sulfatase from human placenta and liver. *Enzyme* 43(4):212-222.
23. Dibbelt, L., Kuss, E., 1983: Human placental steroid-sulfatase. Kinetics of the in-vitro hydrolysis of dehydroepiandrosterone 3-sulfate and of 16 alpha-hydroxydehydroepiandrosterone 3-sulfate. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 364(2):187-1.
24. Dibbelt, L., Kuss, E., 1984: Human placental steroid-sulfatase solubilized with a cholic-acid derivative: molecular mass, kinetic properties and susceptibility to glycosidases. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem* 365(9): 1145-1153.

25. Dibbelt, L., Herzog, V., Kuss, E., 1989: Human placental sterylsulfatase: immunocytochemical and biochemical localization. *Biol Chem Hoppe Seyler* 370(10): 1093-1102.
26. Dibbelt, L., Kuss, E., 1991: Human placental sterylsulfatase. Interaction of the isolated enzyme with substrates, products, transition-state analogues, amino-acid modifiers and anion transport inhibitors. *Biol Chem Hoppe Seyler* 372(3): 173-185.
27. Diczfalusy, E., 1969: Steroid metabolism in the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol (Copenh)* 61(4): 649-64.
28. Dodgson, K.S., Rose, F.A., 1975: Sulfohydrolases. *Metabolic Pathways* (Greenberg, D.M., ed.) 3<sup>rd</sup> edn. Vol. 7: 359-431, Academic Press, New York.
29. Drexler, H., Landmesser, U., 2003: Endothelfunktion und kardiovaskuläre Erkrankungen. UNI-MED, Bremen (2.Auflage).
30. Dubey, R.K., Gillespie, D.G., Imthurn, B., Rosselli, M., Jackson, E.K., Keller, P.J., 1999: Phytoestrogens inhibit growth and MAP kinase activity in human aortic smooth muscle cells. *Hypertension* 33 [part II]: 177-182.
31. Dubey, R.K., Jackson, E.K., Gillespie, D.G., Zacharia, C.L., Imthurn, B., Keller, P.J., 2000: Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20: 964-972.
32. Eich, D.M., Nestler, J.E., Johnson, D.E., Dworkin, G.H., Ko, D., Wechsler, A.S., Hess, M.L., 1993: Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation. *Circulation* 87 : 261-269.

33. Epstein, E.H., Krauss, R.M., Shackleton, C.H., 1981: X-linked ichthyosis: increased blood cholesterol sulfate and electrophoretic mobility of low-density lipoprotein. *Science* 214(4521): 659-660.
34. Evans, T.R., Rowlands, M.G., Jarman, M., Coombes, R.C., 1991: Inhibition of estrone sulfatase enzyme in human placenta and human breast carcinoma. *J Steroid Biochem Mol Biol* 39(4A): 493-499.
35. Farooqui, A.A., 1980: Sulfatases, sulfate esters and their metabolic disorders. *Clinica Chimica Acta* 100: 285-299.
36. Feldman, H.A., Longcope, C., Derby, C.A., Johannes, C.B., Araujo, A.B., Coviello, A.D., Bremner, W.J., McKinlay, J.B., 2002: Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: Longitudinal results from the Massachusetts Male Aging Study. *J Clin Endocrin Metab* 87(2): 589-598.
37. Fischer, G.M., Swain M.L., 1985: Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis* 54: 177-185.
38. Fischl, F., 2001: Androgene und Androgentherapie bei der Frau. *J Urol Sonderheft Urogynäkol* 1: 16-20.
39. Fisher, D.A., Nelson, J.C., 2001: Endocrine testing. In: DeGroot, L.J., Jameson, J.L., eds. *Endocrinology* 3. London, W.B. Saunders: 2574-2600.
40. Fisher, L. K., Kogut, M.D., Moore, R.J., Goebelsmann, U., Weitzman, J.J., Isaacs Jr, H., Griffin, J.E., Wilson, J.D., 1978: Clinical, endocrinological, and enzymatic characterization of two patients with 5 alpha-reductase deficiency: evidence that a single enzyme is responsible for the 5 alpha-reduction of cortisol and testosterone. *J Clin Endocrin Metab* 47: 653-664.

41. Fujikawa, H., Okura, F., Kuwano, Y., Sekizawa, A., Chiba, H., Shimodaira, K., Saito, H., Yanaihara, T., 1997: Steroid sulfatase activity in osteoblast cells. *Biochem and Biophys Research Comm* 231: 42-47.
42. Fujimoto, R., Morimoto, I., Morita, E., Sugimoto, H., Ito, Y., Eto, S., 1994: Androgen receptors, 5 alpha-reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 50(3-4): 169-174.
43. Gant, N.F., Milewich, L., Calvert, M.E., MacDonald, C.P., 1977: Steroid sulfatase activity in human membranes. *J Clin Endocrin Metab*: 965-972.
44. Gebara, O.C.E., Mittleman, M.A., Sutherland, P., Lipinska, I., Matheney, T., Xu, P., Welty, F.K., Wilson, P.W.F., Levy, D., Muller, J.E., Tofler, G.H., 1995: Association between increased estrogen status and increased fibrinolytic potential in the Framingham Offspring Study. *Circulation*: 52-58.
45. Gibbons, G.H., Dzau, V.J., 1994: The emerging concept of vascular remodeling. *N Engl J Med* 330: 1431-1438.
46. Grady, D., Rubin, S.M., Petitti, D.B., et al., 1992: Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 117: 1016-1037.
47. Gregory, C.W., He, B., Johnson, R.T., Ford, O.H., Mohler, J.L., French, J.S., Wilson, E.M., 2001: A mechanism for androgen receptor-mediated prostate cancer recurrence after androgen deprivation therapy. *Cancer Res* 61: 4315-4319.
48. Grodstein, F., Stampfer, M.J., Colditz, G.A., et al., 1997: Postmenopausal hormone therapy and mortality. *N Engl J Med* 336: 1769-75.

49. Haarbo, J., Leth-Espensen, P., Stenders, S. et al., 1991: Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestogen replacement therapy attenuate aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *J Clin Invest* 87: 1274-1279.
50. Hagenbuch, B., Meier, P.J., 2003: The superfamily of organic anion transporting polypeptides. *Biochim Biophys Acta* 1609: 1-18.
51. Han, S.Z., Karaki, H., Ouchi, Y., Akishita, M., Orimo, H., 1995:  $17\beta$ -estradiol inhibits  $Ca^{2+}$  influx and  $Ca^{2+}$  release induced by Thromboxane  $A_2$  in porcine coronary artery. *Circulation* 91: 26-2626.
52. Herrington, M. D., Howard, T.D., 2003: From presumed benefit to potential harm-hormone therapy and heart disease. *N Engl J Med* 349;6: 519-521.
53. Hayes, S.N., 2000: Heart disease in woman. Murphy JG (ed) *Mayo clinical cardiology review*. Williams & Wilkins, Lippincott: 1122.
54. Heinlein, C.A., Chang, C., 2002: Androgen receptor (AR) coregulators: an overview. *Endocr Rev* 23: 175-200.
55. Heinlein, C.A., Chang, C., 2002: The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol Endocrinol* 16: 2181-2187.
56. <http://www.jenapharm.de> (2003)
57. Hulley, S., Grady, D., Bush, T., Furberg, C., Herrington, D., Riggs, B., Vittinghoff, E., 1998: Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 280: 605-613.

58. Jiang, C., Sarrel, P.M., Lindsay, D.C., Poole-Wilson, Collins, P., 1991: Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 $\beta$ - oestradiol in vitro. *Br J Pharmacol* 104: 1033-1037.
59. Jiang C., Poole-Wilson, P.A., Sarrel, P.M., Mochizuki, S., Collins, P., MacLeod, K.T., 1992: Effect of 17beta–oestradiol on concentration, Ca<sup>2+</sup>current and intracellular free Ca<sup>2+</sup> in giunea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol* 106: 739-745.
60. Jick, H., Derby, L.E., Myers, M.W., Vasilakis, C., Newton, K.M., 1996: Risk of hospital admission for idiopathic venous thromboembolism among users of postmenopausal oestrogens. *Lancet* 348: 981-983.
61. Johannes, C.B., Stellato, R.K., Feldman, H.A., Loncope, C., McKinlay, J.B., 1999: Relation of dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfatate with cardiovascular disease risk factors in women: Longitudinal results from the Massachusetts Women’s Health Study. *J Clin Epidemiol* 52/2: 95-103.
62. Jones, G.E., 1996: *Human Cell Culture Protocols*. Humana Press, Totowa (New Jersey): 3-334.
63. Kalimi, M., Regelson, W., 2000: *Dehydroepiandrosterone (DHEA) Biochemical, Physiological and Clinical Aspects*. Walter de Gruyter, Berlin - New York.
64. Karas, R.H., Patterson, B.L., Mendelsohn, M.E., 1994: Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 89: 43-50.
65. Katz, S., Morales, A.J., 1998: Dehydroepiandrosterone (DHEA) and DHEA-sulfate (DHEAS) as therapeutic options in menopause. *Semin Reprod Endocrinol*16: 161-170.
66. Kaufman, F.R., Stanczyk F.Z., Matteri, R.K., Gentzschein, E., Delgado, C., Lobo, R.A., 1990: Dehydroepiandrosterone and dehydroepiandrosterone sulfatate metabolism in human genital skin. *Fertil Steril* 54(2): 251-254.

67. Klein, H., Molwitz, T., Bartsch, W., 1989: Steroid sulfate sulfatase in human benign prostatic hyperplasia: Characterization and quantification of the enzyme in epithelium and stroma. *J Steroid Biochem* 33: 5-200.
68. Kolodgie, F.D., Jacob, A., Wilson, P.S., Carlson, G.C., Farb, A., Verma, A., Virmani, R., 1996: Estradiol attenuates directed migration of vascular smooth muscle cells in vitro. *Am J Pathol* 148(3): 969-976.
69. Krasinski, K., Spyridopoulos, I., Asahara, T., van der Zee, R., Isner, J.M., Losordo, D.W., 1997: Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95: 1768-1772.
70. Kuhl, H., 2001: Klimakterium, Postmenopause und Hormonsubstitution. UNI-MED, Bremen (2. Auflage).
71. Labrie, F., Simard, J., Luu-The, V., Pelletier, G., Belanger, A., Lachance, Y., Zhao, H.F., Labrie, C., Breton, N., de Launoit, Y., et al., 1992: Structure and tissue-specific expression of 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/5-ene-4-ene isomerase genes in human and rat classical and peripheral steroidogenic tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8): 421-435.
72. Labrie, F., Belanger, A., Cusan, L., Gomez, J.L., Candas, B., 1997: Marked decline in serum concentrations of adrenal C sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 2396-2402.
73. Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.-X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R., Belanger, A., 1997: The key role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62: 148-158.
74. Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.-X., Simard, J., Labrie, C., 2000: Role of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid formation in peripheral intracrine tissues. *TEM* 11(10): 421-427.

75. LaCroix, A.Z., Yano, K., Reed, D.M., 1992: Dehydroepiandrosterone sulfate, incidence of myocardial infarction and extent of atherosclerosis in men. *Circulation* 86: 1529-1535.
76. Laufs, U., Fata, V.L., Lutzky, J., Liao, J.K., 1998: Upregulation of endothelial nitric oxide synthase by HMG CoA reductase inhibitors. *Circulation* 97: 1129-1135.
77. Libby, P., 2001: Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104: 365-372.
78. Libby, P., 2002: Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 420: 868-874.
79. Lindl, T., 2000: Zell – und Gewebekultur. Spektrum Akademischer Verlag-Gustav Fischer (4.Auflage):156-157.
80. Linnemann, M., Kühl, M., 2002/2003: Biochemie für Mediziner- Ein Lern- und Arbeitsbuch mit klinischem Bezug. Springer-Verlag Berlin–Heidelberg (6.Auflage).
81. Liu, P.Y., Death, A.K., Handelsman, D.J., 2003: Androgen and cardiovascular disease. *Endocrine Reviews* 24(3): 313-340.
82. Lodish, H., Berk, A., Zipursky, S.L., Matsudaira, P., Baltimore, D. und Darnell, J.E., 2002: Molekulare Zellbiologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH Heidelberg - Berlin (4.Auflage): 156-157.
83. Losel, R., Wehling, M., 2003: Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 46-56.
84. Lowry, O. H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 3: 265-275.

85. Luu-The, V., Dufort, I., Paquet, N., Reimnitz, G., Labrie, F., 1995: Structural characterization and expression of the human dehydroepiandrosterone sulfotransferase gene. *DNA Cell Biol* 14(6): 511-518 (Abstract).
86. Ma, P.T. , Yamamoto, T., Goldstein, J.L., Brown, M.S., 1986: Increased mRNA for low density lipoprotein receptor in livers of rabbits treated with 17alpha-ethinyl-estradiol. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 792-796.
87. MacIndoe, J.H., Woods, G., Jeffries, L., Hinkhouse, M., 1988: The hydrolysis of estrone sulfate and dehydroepiandrosterone sulfate by MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrinology* 123: 1281-1287.
88. Magklara, A., Brown, T.J., Diamandis, E.P., 2002: Characterization of androgen receptor and nuclear receptor co-regulator expression in human breast cancer cell lines exhibiting differential regulation of kallikreins 2 and 3. *Int J Cancer* 100: 507-514.
89. Medical Communications Services, 1991: Kardiovaskuläre Wirkungen einer Hormonsubstitutionstherapie. *Proceedings Internationales Nordisk Symposium Kopenhagen, Dänemark, Februar 91.*
90. Mehl, E., Jatzkewitz, H., 1968: Cerebroside 3-sulfate as a physiological substrate of arylsulfatase A. *Biochim Biophys Acta* 151(3): 6-627.
91. Meilahn, E.N., Kuller, L.H., Matthews, K.A. et al., 1992: Hemostatic factors according to menopausal status and use of hormone replacement therapy. *Ann epidemiol* 2: 445-455.
92. Miki, Y., Nakata, T., Suzuki, T., Darnel, A.D., et al., 2002: Systemic distribution of steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in human adult and fetal tissues. *J Clin Endocrinol & Metabol* 87(12): 5760-5768.

93. Milewich, L., Gomez-Sanchez, C., Madden, J.D., Bradfield, D.J., et al., 1978: Dehydroepiandrosterone sulfate in peripheral blood of premenopausal, pregnant and postmenopausal women and men. *J Steroid Biochem* 9: 1159-1164.
94. Milewich, L., Garcia, R.L., Johnson, A.R., 1983: Steroid sulfatase activity in human lung tissue and in endothelial pulmonary cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 57: 8-14.
95. Milewich, L., Garcia, R.L., Gerrity, L.W., 1984: Steroid sulfatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroidoxidoreductase activities in mouse tissues. *J Steroid Biochem* 21: 529-538.
96. Milewich, L., Garcia, R.L., 1985: Steroid sulfatase activity in amnion tissue and amnion cells maintained in monolayer culture. *J Clin Endocrinol Metab* 61: 812-816.
97. Milewich, L., Porter, J.C., 1987: In situ steroid sulfatase activity in human epithelial carcinoma cells of vaginal, ovarian, and endometrial origin. *J Clin Endocrinol Metab* 65: 164-169.
98. Mitchell, B.F., Cross, J., Hobkirk, R., Challis, J.R.G., 1984: Formation of unconjugated estrogens from estrone sulfate by dispersed cells from human fetal membranes and decidua. *J Clin Endocrinol & Metabol* 58(5): 845-849.
99. Mock, K., Lunglmayr, G., 1999: Androgene und Estrogene beim alternden Mann. *J Urol Urogynäkol Sonderheft* 2: 5-9.
100. Moorodian, D. L., Hutsell, T.C., Keefer, L.K., 1995: Nitric oxide (NO) donor molecules: Effect of NO release rate on vascular smooth muscle cell proliferation in vitro. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 674-678.
101. Muir, M., Romalo, G., Wolf, L., Elger, W., Schweikert, H.U., 2004: Estrone sulfate is a major source of local estrogen formation in human bone. *J Clin Endocrinol & Metabol* 89(9): 4685-4692.

102. Munroe, D.G., Chang, P.L., 1987: Tissue-specific expression of human arylsulfatase-C isozymes and steroid sulfatase. *Am J Hum Genet* 40: 102-114.
103. Murakami, K., Nakagawa, T., Shozu, M., Uchide, K., Koike, K., Inoue, M., 1999: Changes with aging of steroidal levels in the cerebrospinal fluid of women. *Maturitas* 33: 71-80.
104. Murakami, H., Harada, N., Sasano, H., 2001: Aromatase in atherosclerotic lesions of human aorta. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 79: 67-74.
105. Naithoh, K., Honjo, H., Yamamoto, T., Urabe, M., Ogino, Y., Yasumura, T., Nambara, T., 1989: Estrone sulfate and sulfatase activity in human breast cancer and endometrial cancer. *J Steroid Biochem* 33: 1049-1054.
106. Nakamura, Y., Miki, Y., Suzuki, T., Nakata, T., Darnel, A.D., Moriya, T., Tazawa, C., Saito, H., Ishibashi, T., Takahashi, S., Yamada, S., Sasano, H., 2003: Steroid sulfatase and estrogen sulfotransferase in the atherosclerotic human aorta. *Amer J Path* 163: 1329-1339.
107. Negre-Salvayre, A., Pieraggi, M.T., Mabile, L., Salvayre, R., 1993: Protective effect of 17 $\beta$ -estradiol against the cytotoxicity of minimally oxidized LDL to cultured bovine aortic endothelial cells. *Atherosclerosis* 99: 207-217.
108. Noel, C.T. Reed, M.J., Jacobs, H.S., James, V.H.T., 1981: The plasma concentration of estrone sulphate in postmenopausal women: Lack of diurnal variation, effect of ovariectomy, age and weight. *J Steroid Biochem* 14: 1101-1105.
109. Noel, H., Plante, L., Bleau, G., Chapdelaine, A., Roberts, K.D., 1983: Human placental steroid sulfatase: purification and properties. *J Steroid Biochem* : 1591-1598.

110. Ogiu, T., Hard, G.C., Schwartz, A.G., Magee, P.N., 1990: Investigation into the effect of DHEA on renal carcinogenesis induced in the rat by a single dose of DMN. *Nutr Cancer* 14(1): 57-67.
111. ORIGINLAB Corporation, One Roundhouse Plaza, Northampton, MA – USA; <http://www.originlab.com>; 1991-2002.
112. Pasqualini, J.R., Chetrite, G., Nestour, E.L., 1996: Control and expression of oestrone sulphatase activities in human breast cancer. *J Endocrinol* 150(1): S99-105.
113. Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J., Adamski, J., 1999: 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17 $\beta$ -ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23: 1-11.
114. Penning, T.M., 1997: Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocrine Reviews* 18(3): 281-305.
115. Phillips, G.B., Pinkernell, B.H., Jing, T.Y., 1994: The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb* 14: 701-706.
116. Pilger, E., Schulte, K.-L., Diehm, C., Gröchenig, E., 2002: *Arterielle Gefäßerkrankungen: Standards in Klinik, Diagnostik und Therapie*. Georg Thieme Verlag Stuttgart.
117. Pizzagalli, F., Varga, Z., Huber, R.D., Folkers, G., Meier, P.J., St-Pierre, M.V., 2003: Identification of steroid sulfate transport processes in the human mammary gland. *J Clin Endocrinol & Metabol* 88(8): 3902-3912.
118. Poršová-Dutoit, I., Šulcová, J., Stárká, L., 2000: Do DHEA/DHEAS play a protective role in coronary heart disease? *Physiol Res* 49: 43-56.

- 
119. Prost, O., Adessi, G.L., 1983: Estrone und dehydroepiandrosterone sulfatase activities in normal and pathological human endometrium biopsies. *J Clin Endocrinol & Metabol* 56: 653-661.
120. Purohit, A., Williams, G.J., Howarth, N.M., Potter, B.V., Reed, M.J., 1995: Inactivation of steroid sulfatase by an active site-directed inhibitor, estrone-3-O-sulfamate. *Chemistry* 34(36): 11508-11514.
121. Purohit, A., Williams, G.J., Roberts, C.J., Potter, B.V., Reed, M.J., 1995: In vivo inhibition of estrone sulphatase and dehydroepiandrosterone sulphatase by estrone-3-O-sulphamate. *Int J Cancer* 63(1): 106-111.
122. Purohit, A., Vernon, K.A., Wagenaar Hummelinck, A.E., Woo, L.W., Hejaz, H.A.M., Potter, B.V., Reed, M.J., 1998: The development of A-ring modified analogues of estrone-3-O-sulphamate as potent steroid sulphatase inhibitors with reduced oestrogenicity. *J Steroid Biochem Molec Biol* 64: 269-275.
123. Purohit, A., Potter, B.V., Parker, M.G., Reed, M.J., 1998: Steroid sulphatase: expression, isolation and inhibition for active-site identification studies. *Chem Biol Interact* 109(1-3): 183-3.
124. Quigley, C.A., De Bellis, A., Marschke, K.B., El-Awady, M.K., Wilson, E.M., French, F.F., 1995: Androgen receptor defects: historical, clinical and molecular perspectives. *Endocr Rev* 16: 271-321.
125. Radomski, M.W., Palmer, R.M.J., Moncada, S., 1987: Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet* 2: 1057-1058.
126. Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S., 1990: An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 87(13): 53-57.

127. Reed, M.J., Purohit, A., Woo, L.W.L., Newman, S.P., Potter, B.V.L., 2004: Steroid sulfatase: Molecular biology, regulation and inhibition. *Endocrine reviews*.
128. Rifci, V.A., Khachadurian, A.K., 1992: The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17 $\beta$ -estradiol. *Metabolism* 41: 1110-1114.
129. Ross, R., 1971: The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fiber. *J Cell Biol* 50: 172-186.
130. Ross, R., 1993: The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 90s. *Nature* 362: 801-809.
131. Ross, R., 1999: Atherosclerosis – an inflammatory disease. *NEJM* 340: 115-126.
132. Roy, A.B., 1976: Sulphatases, Lysosomes and Disease. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science* 54: 111-135.
133. Ruder, H.J., Loriaux, L., Lipsett, M.B., 1972: Estrone sulfate: production rate and metabolism in man. *J Clin Invest* 51: 1020-1033.
134. Samojlik, E., Santen, R.J., Worgul, T.J., 1982: Plasma estrone sulfate: assessment of reduced estrogen production during treatment of metastatic breast carcinoma. *Steroids* 39: 497-507.
135. Sarrel, P.M., 1998: Cardiovascular aspects of androgens in women. *Semin Reprod Endocrinol* 16: 121-128.
136. Sasano, H., Frost, A.R., Saitoh, R., Harada, N., Poutanen, M., Vihko, R., Bulun, S.E., Silverberg, S.G., Nagura, H., 1996: Aromatase and 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 in human breast carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81(11): 4042-4046.

137. Schaefer, C., Friedman, G., Ettinger, B., Quesenberry, C., Liu, J., Haan, M., Orentreich, N., Vogelmann, J., 1996: Dehydroepiandrosterone sulfate (DHEAS), angina, and fatal ischemic heart disease. (Abstract) *Am J Epidemiol* 143: S69.
138. Schweikert, H.U., Wilson, J.D., 1974: Regulation of human hair growth by steroid hormones, I. Testosterone metabolism in isolated hairs. *J Clin Endocrinol Metab* 38: 811-8.
139. Schweikert, H.U., Wilson, J.D., 1974: Regulation of human hair growth by steroid hormones, II. Androstenedione metabolism in isolated hairs. *J Clin Endocrinol Metab* 39: 1012-10.
140. Schweikert, H.U., 2003: Estrogen in the male: nature, sources and biological effects. *Encyclopedia of Hormones*. Elsevier Science (USA): 584-591.
141. Shankaran, R., Ameen, M., Daniel, W.L., Davidson, R.G., Chang, P.L., 1991: Characterization of arylsulfatase C isozymes from human liver and placenta. *Biochim Biophys Acta* 1078(2): 251-257.
142. Simard, J.P., Ameen, M., Chang, P.L., 1985: Biochemical characterization of arylsulfatase-C isozymes in human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 128(3): 1388-1394.
143. Smith, D.C., Prentice, R., Thompson, D.J., Herrmann, W.L., 1975: Association of exogenous estrogen and endometrial carcinoma. *N Engl J Med* 293: 1164-1167.
144. Smith, S.K., Kelly, R.W., 1987: The effect of estradiol-17 $\beta$  and actinomycin D on the release of PGF and PGE of separated cells from human endometrium. *Prostaglandins* 34: 553-561.
145. Strott, C.A., 1996: Steroid sulfotransferases. *Endocrine Reviews* 17(6): 670-698.

146. Stumpf, P., 1992: Estrogen replacement therapy: current regimens. In: Swartz D.P., eds. Hormone replacement therapy. Baltimore, M.: Williams and Wilkins: 171-0.
147. Suzuki, A., Mizuno, K., Ino, Y., Okada, M., Kikkawa, F., Mizutani, S., Tomoda, Y., 1996: Effects of  $17\beta$  – estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells in vitro. *Cardiovasc Res* 32: 516-523.
148. Sweet, D.H., Bush, K.T., Nigam, S.K., 2001: The organic anion transporter family: from physiology to ontogeny and the clinic. *Am J Physiol Renal Physiol* 281: F197-F205.
149. Szego, C.M., Sjostrand, B.M., Seeler, B.J., Baumer, J.W., Sjostrand, F.S., 1988: Microtubule and plasmalemmal reorganisation: acute response to estrogens. *American Journal of Physiology* 254 (Endocrinol Metab 17): E775-785.
150. Tamai, I., Nezu, J., Uchino, H., Sai, Y., Oku, A., Shimane, M., Tsuji, A., 2000: Molecular identification and characterization of novel members of the human organic anion transporter (OATP) family. *Biochem Biophys Res Commun* 273: 251-260.
151. Taniguchi, S., Yanase, T., Kobayashi, K., Takayanagi, R., Nawata, H., 1996: Dehydroepiandrosterone markedly inhibits the accumulation of cholesteryl esters in mouse macrophage J774-1 cells. *Atherosclerosis* 126(1): 143-154.
152. Taylor, N.F., 1982: Review: placental sulphatase deficiency. *J Inherit Metab Dis* 5(3):164-76.
153. Tobacman, J.K., Hinkhouse, M., Khalkhali-Ellis, Z., 2002: Steroid sulfatase activity and expression in mammary myoepithelial cells. *J Steroid Biochem & Mol Biol* 81: 65-68.

- 
154. Trivedi, D.P., Khaw, K.T., 2001: Dehydroepiandrosterone sulfate and mortality in elderly men and women. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4171-4177.
155. Tsao, P.S., McEvoy, L.M., Drexler, H., Butcher, E.C., Cooke, J.P., 1994: Enhanced endothelial adhesiveness in hypercholesterolemia is attenuated by L-arginine. *Circulation* 89(5): 2176-2182.
156. Ulrich-Merzenich, G., Metzner, C., Bionde, R.R., Malsch, G., Schiermeyer, B. and Vetter, H., 2002: Simultaneous isolation of endothelial and smooth muscle cells from human umbilical artery or their growth response to low-density lipoproteins. *In Vitro Cell Dev Biol-Animal* 38: 265-272.
157. Utsumi, T., 1989: Local production of estrogen via aromatase and estrone sulfatase in breast cancer tissue. *Nippon Geka Gakkai Zasshi* 90(6) : 920-927.
158. Vaccaro, A.M., Salvioli, R., Muscillo, M., Renola, L., 1987: Purification and properties of arylsulfatase C from human placenta. *Enzyme* 37(3): 115-126.
159. Vargas, R., Wroblewska, B., Rego, A., Hatch, J., Ramwell, P.W., 1993: Estradiol inhibits smooth muscle cell proliferation of pig coronary artery. *Br J Pharmacol* 109: 612-617.
160. Venkov, C.D., Rankin, A.B., Vaughan, D.E., 1996: Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. *Circulation* 94: 727-733.
161. Vermeulen, A., Deslypere, J.P., Schelfhout, W., Verdonck, L., Rubens, R., 1982: Adrenocortical function in old age: response to acute adrenocorticotropin stimulation. *J Clin Endocrinol Metab* 54(1): 187-1.
162. von der Lohe, E.: *Koronare Herzkrankheit bei Frauen*. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 2002.

- 
163. von Eckardstein, A., Wu, F.C.W., 2003: Testosterone and atherosclerosis. *Growth Hormone & IGF Research* 13: S72-S84.
164. Walsh, B.W., Schiff, I., Rosner, B., Greenberg, L., Ravnikar, V. and Sacks, F.M., 1991: Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* 325: 16-1204.
165. Webster, D., France, J.T., Shapiro, L.J., Weiss, R., 1978: X-linked ichthyosis due to steroid-sulphatase deficiency. *Lancet* I: 70-72.
166. Weiner, C.P., Lizasoain, I., Baylis, S.A. et al., 1994: Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5212-5216.
167. Williams, M.R., Dawood, T., Ling, S., Dai, A., et al., 2004: Dehydroepiandrosterone increases endothelial cell proliferation in vitro and improves endothelial function in vivo by mechanisms independent of androgen and estrogen receptors. *J Clin Endocrinol & Metabol* 89(9): 4708-4715.
168. Wu, F.C., von Eckardstein, A., 2003: Androgens and coronary artery disease. *Endocr Rev* 24(4):183-217.
169. Yen, S.S.C., Jaffe R.B., 1991: *Reproductive endocrinology: physiology, pathophysiology and clinical management*. Philadelphia 4.
170. Yue, W., Santner, S.J., Masamura, S., Wang, J.P., Demers, L.M., Hamilton, C., Santen, R.J., 1998: Determinants of tissue estradiol levels and biologic responsiveness in breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 49(1): S33-37.
171. Yue, W., Santen, R.J., Wang, J.-P., Hamilton, C.J., Demers, L.M., 1999: Aromatase within the breast. *Endocrine-Related Cancer* 6: 157-164.

172. Zitzmann, M., Brune, M., Kornmann, B., Gromoll, J., von Eckardstein, S., von Eckardstein, A., Nieschlag, E., 2001: The CAG repeat polymorphism in the AR gene affects high density lipoprotein cholesterol and arterial vasoreactivity. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4867-4873.

## 8 Lebenslauf

Name: Anja Tischer  
Geburtsdatum und -ort: 03.09.1975 in Neuhaus am Rennweg  
Staatsangehörigkeit: Deutsch  
Familienstand: Ledig

### Bildungsweg

1982 - 1986 Grundschule Großbreitenbach  
1986 - 1991 Polytechnische Oberschule Großbreitenbach  
1991 - 1994 Staatliches Gymnasium am Lindenberg Ilmenau  
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife  
1994 - 1996 Studium der Ernährungswissenschaften an der FSU in Jena  
1996 - 2000 Wechsel/Abschluß des Studiums der Haushalts- und Ernährungswissenschaften an der Hochschule Anhalt in Bernburg  
April 1999 - März 2000 Diplomarbeit an der Bundesanstalt für Züchtungsforschung, Institut für Züchtungsmethodik bei Gemüse in Quedlinburg  
Abschluß: Diplom Oecotrophologin (FH)

### Berufliche Tätigkeit

Mai 2000 - Mai 2001 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Food-GmbH Jena  
Mai 2001 - Juli 2003 wissenschaftliche Mitarbeiterin in der Hormonforschung im Fachbereich Medizin der Rheinischen Friedrich-Wilhelm-Universität Bonn  
August 2003 - Juni 2004 Abfassung und Fertigstellung der Dissertation mit dem Thema „Untersuchungen zum Stoffwechsel von Estronsulfat (E1S) und Dehydroepiandrosteronsulfat (DHEAS) im menschlichen Aortengewebe und in menschlichen kultivierten glatten Gefäßmuskelzellen (VSMCs)“.  
seit Oktober 2004 wissenschaftliche Mitarbeiterin an der Hochschule Anhalt (FH) in Bernburg, Arbeitsgruppe Bioanalytik

## **Erklärung**

Hiermit versichere ich, daß ich

- die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe,
- die wörtlich oder inhaltlich aus anderen Quellen entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe und
- die Inanspruchnahme persönlicher Hilfen namentlich aufgeführt habe.

Halle/Saale, den 27.04.2005

Anja Tischer