Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie

des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf

Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

Die Bestimmung des estrogenen Potentials von *Morinda citrifolia* L. unter Verwendung einer Kombination aus einem Rezeptorbindungstest und einem Alkalische Phosphatase-Induktionstest in Ishikawa Zellen.

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von

André Zeglin

aus Berlin

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 21.01.09

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. Westendorf

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. Eschenhagen

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Prof. Dr. Pfeiffer

Für meine Eltern Pia und Dietrich Zeglin.

1 Einleitung

1.1 Die Wechseljahre (Klimakterium)

Der Begriff Wechseljahre (Klimakterium) bezeichnet den Zeitraum, während dem es zu einer estrogenmangelbedingten Störung des Menstruationszyklus sowie zu subjektiven Beschwerden kommen kann. Die letzte Regelblutung (vom Ovar gesteuerte uterine Blutung) liegt in dieser Zeit und wird als Menopause bezeichnet. Die Menopause wird retrospektiv nach einjährigem Ausbleiben der Regelblutung festgelegt. Die Wechseljahre setzen sich aus den drei Phasen der Prämenopause, der Perimenopause und der Postmenopause zusammen. Die Prämenopause stellt sich bei den meisten Frauen zwischen dem 45. und 50. und die Menopause mit dem 50. Lebensjahr ein. Dies resultiert u.a. aus einer rückläufigen 17-β-Estradiol-Syntheseleistung des Ovars aufgrund einer geringeren Stimulation der Primordialfollikel durch Gonadotropin (siehe unten) und findet sein morphologisches Korrelat in einer Größenabnahme der Ovarien. Folgen sind die allmählich mangelnde Stimulation vielfältiger hormoneller Zielorgane wie Endometrium, Haut, Brust u.a.. Der Übergang von der Prämenopause zur Postmenopause wird als Perimenopause bezeichnet und nimmt etwa einen Zeitraum von zwei Jahren ein. Die Postmenopause erstreckt sich bis zum 65. Lebensjahr und ist durch ein fast gänzliches Sistieren der Inkretion von 17-β-Estradiol charakterisiert. An die Stelle des 17-β-Estradiols tritt in der Postmenopause das Östron. Es wird überwiegend durch Aromatisierung von Androstendion, einem Androgen[1], aus der Nebennierenrinde und nur zu ca. 10 % im Ovar gebildet. Die Aromatisierung erfolgt im peripheren Gewebe des Körpers, besonders im Fettgewebe, in der Leber und im Muskel. Ab dem 65. Lebensjahr spricht man dann vom Senium.

[1] Androgene = griech. Andro „männlich“; gen „erzeugend“; neben dem Androstendion zählt das Testosteron ebenfalls zu den Androgenen

1.2 Die Klinik des Estrogenmangels

Zu den Symptomen, die während des Klimakteriums auftreten können, zählen neben vegetativen Beschwerden auch solche, die auf organische Veränderungen zurückzuführen sind. Außerdem zeigen die veränderten Stoffwechselvorgänge u.U. klinische Auffälligkeiten:

1.2.1 Vegetative Beschwerden

Am häufigsten treten hier Hitzewallungen auf, die oft mit Schweißausbrüchen, Schwindel und Durchblutungsstörungen der Extremitäten einhergehen. Die zuletzt genannten vasomotorischen Beschwerden sind oft mit Tachykardien, Müdigkeit, Hypertonus, Rückenschmerzen, Gliederschmerzen und anderen allgemeinen Symptomen verbunden. Die Ursachen der Hitzewallungen finden sich neben dem Abfall des Estrogenspiegels im Serum auch in einer erhöhten Adrenalinausschüttung.

1.2.2 Organische Veränderungen

Man unterscheidet zwischen Veränderungen der Prä-, Peri- und solchen der Postmenopause. In der Prämenopause kommt es durch das gehäufte Auftreten anovulatorischer Zyklen[2] am Endometrium zu Dysregulationen, die zu ungeordneter Proliferation und Hyperplasien führen können. Darunter zeigen sich am häufigsten Polymenorrhoen[3], Dauerblutungen, Schmierblutungen und Hypermenorrhoen[4]. Gegen Ende der Perimenopause werden die Blutungsintervalle größer und es tritt die postmenopausale Amenorrhoe[5] ein. Schließlich kommt es durch den fortschreitenden Estrogenmangel zum sog. Postmenopausensyndrom. Hier stehen atrophische Veränderungen am Urogenitaltrakt, wie Vulva, Vagina, Uterus, Urethra und Blase im Vordergrund. Auch die Atrophie der Haut wird teilweise durch den Estrogenmangel verursacht. Das Vaginalepithel wird glatt und atrophisch, die Glykogeneinlagerung des Plattenepithels nimmt ab und häufig siedelt sich eine pathologische Keimflora an, was eine atrophische Kolpitis[6] begünstigen kann. Auch die Schambehaarung und die Elastizität der Haut an der Vulva schwinden durch die Hautatrophie. Die Labien werden kleiner und atrophisch. Ferner kommt es leichter zu Rhagaden und anderen Verletzungen.

---

[2] Zyklen, die von der normalen zeitlichen Abfolge des Menstruationszyklus abweichen
[3] zu häufige Regelblutungen
[4] zu starke Regelblutung
[5] Sistieren der Regelblutung
[6] Entzündung des Muttermundes

Atrophisierungserscheinungen an der Harnblase und Urethra führen zu einem Nachlassen des Blasen- und Urethtraltonus, was eine Kombination von Stress- und Harninkontinenz begünstigen kann. In besonderem Maße ist auch das Brustdrüsengewebe von der Estrogenstimulation abhängig. Daher erfolgt im Klimakterium eine zunehmende Rückbildung der Mammae mit Einlagerung von Bindegewebe. Es bildet sich eine Ptose aus. Mamille und Areola werden blasser, flachen sich ab und verlieren ihre Elastizität.

1.2.3 Veränderte Stoffwechselvorgänge

1.2.3.1 Lipidstoffwechsel

Infolge der abfallenden Serumkonzentration von 17-β-Estradiol steigen im Serum die Konzentrationen von Gesamtcholesterin und Triglyzeriden an. Letztere gelten in hohen Serumkonzentrationen als Risikofaktor für atherosklerotische Gefäßveränderungen und können damit die Entstehung einer koronaren Herzkrankheit (KHK) fördern.

1.2.3.2 Osteoporose

Unter der Osteoporose (v. griechisch *οστέον* „Knochen“ und *πορος* „hart“) versteht man eine häufige Alterserkrankung des Knochens, die ihn für Brüche anfälliger macht. Diese auch als Knochenschwund bezeichnete Krankheit ist gekennzeichnet durch eine verminderte Knochenmasse und den übermäßig raschen Abbau der Knochensubstanz und -struktur. Die erhöhte Frakturanfälligkeit kann das ganze Skelett betreffen. Man unterscheidet zwischen der primären und der sekundären Osteoporose. Zur wesentlich häufigeren primären Osteoporose zählen die postmenopausale Osteoporose, welche auf dem allmählichen Sistieren der Estrogenproduktion bei der alternden Frau beruht (siehe auch Kapitel 1.1 Die Wechseljahre) und die Altersosteoporose (Involutionsosteoporose). Bei letzterer beruht die Reduktion der Knochenmasse auf einem Bilanzdefizit: An der Knochenhomöostase sind neben knochenaufbauenden Zellen, den sogenannten Osteoblasten, auch solche beteiligt, die der Knochenresorption und damit dessen Abbau dienen, die Osteoklasten. Während der Knochenabbau und damit die Funktion der Osteoklasten im Laufe des Lebens relativ gleich bleiben, ist die Osteoblastentätigkeit in Folge altersbedingter Zellveränderungen, z.T. auch aufgrund metabolischer Faktoren, vermindert. Daraus resultiert ein verstärkter Knochenabbau und -umsatz mit zunehmendem Alter. Die sekundäre Osteoporose tritt unter anderem als Folge von Stoffwechselerkrankungen oder hormonellen Störungen auf. Sowohl die primäre als auch die sekundäre Osteoporose beruht dabei in einem Teil der Fälle auf einer mangelnden

Estrogenkonzentration im Blut, welche über den Ca^{2+}-/PO_4^{3-} Spiegel wesentlichen Einfluss auf die Knochenstabilität ausübt.

Die dadurch hervorgerufenen Veränderungen des Knochenaufbaus sind im histologischen Präparat unter dem Mikroskop sichtbar. Mit Abschluss der Wachstums, der bei Mädchen etwa mit dem 15. und bei Jungen mit dem 17. Lebensjahr erreicht ist, erreicht die Knochenmasse und -dichte ihr Optimum. Im Regelfall kann diese über ein bis zwei Jahrzehnte gehalten werden, bevor es zu einem allmählichen Abbau kommt. Dieser beginnt bei der Frau aus den in Kapitel 1.1. aufgezeigten Ursachen nach der Menopause[7] und kann im ersten Jahr bis zu 10 % betragen. Nach einigen Jahren pendelt sich der Knochenabbau schließlich wieder auf niedrigere Werte ein.

Anmerkung

Trotz der hier vorgestellten symptomhaften Schilderung der möglichen Veränderungen während der Postmenopause ist das Klimakterium nicht als krankhafter Prozess, sondern vielmehr als natürlicher Abschnitt im Leben einer Frau anzusehen.

[7] Zeitpunkt der letzten Regelbutung

2 Allgemeiner Teil

2.1 Estrogene

2.1.1 natürliche Formen und der weibliche Zyklus

Bei Estrogenen handelt es sich um Sexualhormone. Man versteht unter einem Hormon einen biochemischen Botenstoff, der innerhalb eines Lebewesens Informationen von einem Organ zum anderen oder von einem Gewebe zum anderen vermittelt. In tierischen Lebewesen werden Hormone im Regelfall durch den Blutkreislauf zu den Zielorganen transportiert. Aufgrund spezieller Rezeptoren, an welche die Hormonmoleküle binden, um ihre Wirkung zu entfalten, wirken diese nur auf bestimmte Zielorgane. Dabei gibt es neben Rezeptoren, die an der Zelloberfläche liegen, auch solche, welche sich frei im Zytoplasma der Zelle oder auf dem Zellkern befinden. Bei ersteren dringt der gebundene Effektor also nicht in die Zelle ein, sondern seine Bindung an den Rezeptor auf der Zellmembran löst die Synthese eines intrazellulären sog. Second messengers aus. Zu solchen gehört beispielsweise das zyklische AMP (cAMP), das dann Stoffwechselaktivitäten steigert oder reduziert. Der Vorteil dieses Systems liegt in der Verstärkerfunktion. Die meisten Hormone wirken auf diese Art und Weise. Andere Hormone dagegen dringen in die Zelle ein und binden direkt an den Zellkern. Die entsprechenden Rezeptoren werden als Kernrezeptoren bezeichnet und umfassen die Steroidhormon-, Thyroid- und Retinoidrezeptoren. Unter die Steroidhormonrezeptoren (SHR) subsummiert man den Glukokortikoid-, den Mineralokortikoid-, den Progesteron-, den Androgen- und den Estrogenrezeptor, wobei letzterer für diese Arbeit von zentraler Bedeutung ist. Die entsprechenden Liganden sind u.a. die Estrogene, von denen man drei verschiedene Formen unterscheidet, nämlich das17-β-Estradiol, das Östron und schließlich das Östriol. Das 17-β-Estradiol ist von diesen die biologisch aktivste Form. Dabei wird die biologische Aktivität einer Substanz definiert als die notwendige Dosis (Potenz), die zur Auslösung einer intrazellulären Signalkaskade oder der Bindung des (Hormon-)rezeptors an die ERE (Estrogen Responsive Element) –Region der DNA erforderlich ist. Chemisch sind die Estrogene durch ein Cholestangerüst charakterisiert, dessen A-Ring aromatisch ist.

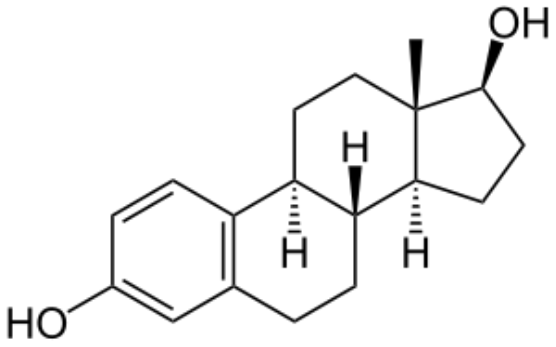


Abbildung 1: Strukturformel von 17-β-Estradiol

Bei Frauen im gebärfähigen Alter erfolgt die Bildung der Estrogene vor allem im auch als Graaf´schen Follikel bezeichneten Tertiärfollikel (siehe Abbildung 2). Dieser hat sich über das Zwischenstadium des Sekundärfollikels aus dem seit Geburt ruhenden Primärfollikel entwickelt und ist sprungreif. Beim Eisprung entlässt der Tertiärfollikel das in seinem Inneren gereifte Ei auf dessen Weg durch die Tuba uterina bis zum Ort einer potenziellen Befruchtung, dem Uterus. Der Tertiärfollikel besteht aus einer inneren Granulosa- (2) und einer äußeren Thekazellschicht (1), die beide an der Hormonbildung beteiligt sind.

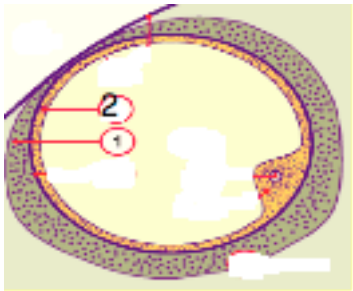


Abbildung 2: Tertiärfollikel

Der erste Schritt in der Biogenese der Estrogene findet in der Thekazelle statt. Dort werden unter dem stimulierenden Einfluss des luteinisierenden Hormons (LH), das aus der Hypophyse stammt, Steroide wie Androstendion und Testosteron gebildet. Diese dienen in einem zweiten Schritt den Granulosazellen als Substrat für die Aromatisierung, wodurch schließlich Estrogene gebildet werden. Die Aromatisierungskapazität der Granulosazellen wird durch das Follikel-stimulierende Hormon (FSH) reguliert. Nach dem Eisprung (Ovulation) organisieren sich die im Ovar verbliebenen Restbestandteile des Follikels durch Einblutung zunächst in ein Corpus rubrum, das sich unter hormonellem Einfluss zum sog. Gelbkörper (Corpus luteum) entwickelt. Dieser sezerniert überwiegend Progesteron, ein Gestagen, welches im Kapitel 2.2 behandelt wird. Da die Hormonbildung somit durch den

weiblichen Zyklus bestimmt wird, verläuft sie mit Beginn der Pubertät ebenfalls zyklisch. Dabei korrelieren die Serumkonzentrationen der Sexualsteroide mit dem Reifegrad des wachsenden Follikels und der funktionellen Leistung des Corpus luteum. Darüber hinaus findet die Estrogensynthese auch im Fettgewebe sowie in den Erfolgsorganen[8] wie dem Skelettsystem und der Brust statt. Obwohl bei Geburt etwa 2-4 Millionen Eizellen vorhanden sind, reifen im Leben einer Frau nur 300-400 Follikel vollständig heran. Nach dem 45- 50 Lebensjahr enthalten die Ovarien keine Follikel mehr und somit bleibt die Hormonbildung aus dem Ovar aus. Bei der damit eingeleiteten postmenopausalen Phase erfolgt die Estrogenproduktion im Wesentlichen im Binde-, Fett- und Muskelgewebe, sowie im Gehirn.

Tabelle 1: wichtige Hormone des weiblichen Zyklus

Hormon	**Bildungsort**	**Zielorgan**	**Aufgabe**
GnRH	Hypothalamus	HVL	FSH-Bildung und Sekretion. LH-Bildung und Sekretion.
FSH	HVL	Ovar	Wachstum der Follikel FSH-Rezeptoren am Follikel ⇑. Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen in der Granulosazellschicht des Tertiärfollikels.
LH	Hypophyse	Ovar Corpus luteum	Wachstum der Follikel. Ovulation. Stimulation der Gestagensyntese im Tertiärfollikel und Corpus luteum.

[8] Hierzu zählen die Organe, die im direkten Einfluss der endokrinen Wirkung durch die Estrogene stehen

2.1.2 Estrogen-Rezeptoren und der Weg der Signalübertragung

Man kann in den meisten Geweben des Menschen zwei verschiedene Arten des Estrogenrezeptors (engl.: estrogenic receptor ER) unterscheiden: ER-α und ER-β. Dabei gilt der ER-α als der klassische Estrogenrezeptor, da er zuerst beschrieben wurde. Der Estrogenrezeptor wird funktionell in 6 separate Domänen eingeteilt (A-F, siehe Abbildung 3). Es existieren zwei der Aktivierung dienliche Domänen, welche die Transkriptions-Aktivität in Abhängigkeit von Liganden steuern. Nachdem die Estrogenrezeptoren (ER) die Transduktion estrogener und antiestrogener Signale auf die Zielgene vermittelt haben, wird diese durch die sog. Aktivatorfunktionen des ER (AF-1, AF-2) initiiert und verläuft über ligandenspezifische Modulationen (Konformationsänderungen) des ER. Zum einen existiert in der Domäne des Rezeptors, die für die Bindung des Liganden verantwortlich ist (C-terminale E/F-Region), eine Serie von Aminosäuren, die „Activating function –2“ (AF-2) genannt wird und für die Aktivierung derjenigen Gene verantwortlich ist, die die estrogene Wirkung in Geweben des Reproduktionstraktes wie Brust und Uterus steuern. In der N-terminalen A/B-Region befindet sich die „Activating function –1 (AF-1), welche unabhängig von Liganden arbeitet. Obwohl die Transkriptionsaktivität der AF-1 normalerweise sehr gering ist, unterstützt sie auch die AF-2, um bei deren Aktivierung eine stärkere Genexpression zu bewirken. In der C Domäne befindet sich die sog. DNA-Bindungsdomäne (DBD), welche die Aufgabe hat, spezifische Bindungssequenzen in der DNA, die sog. Estrogenresponsiven Elemente (ERE), zu erkennen. Sie besteht aus zwei Zinkfinger-Strukturen, die in Kombination mit der sogenannten P-Box die Bindung an das ERE ermöglichen und in Kombination mit der D-Box zur Dimerisierung führen. Auch findet man in dieser Domäne ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Die D-Domäne ist an der Bindung von co-regulatorischen Proteinen beteiligt. In den bereits oben im Zusammenhang mit der AF-2 erwähnten C-terminalen Domänen E und F ist die Liganden-bindungsdomäne (LBD) lokalisiert. Diese beinhaltet neben der ligandenabhängigen Transkriptions-Aktivierungsfunktion (AF-2) die hsp90-Bindungsregion, ein Kernlokalisierungssignal sowie eine weitere Dimerisierungsdomäne.

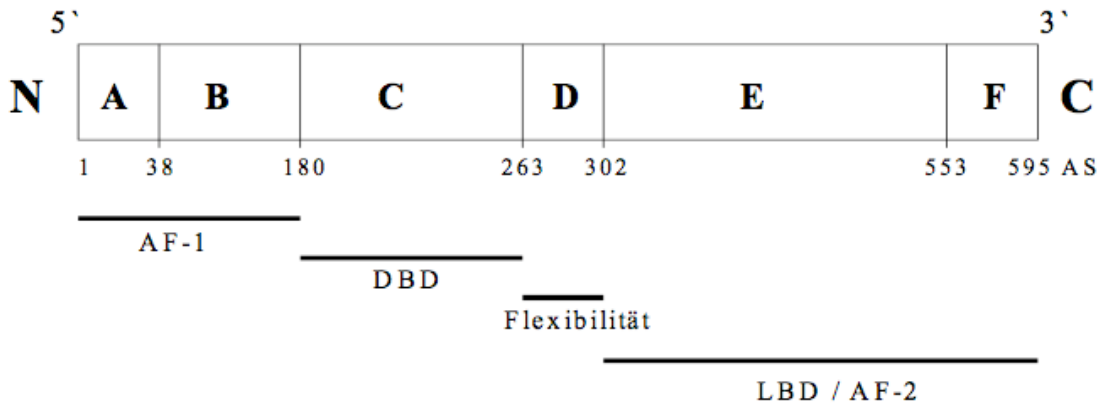


Abbildung 3: Domänen des Estrogenrezeptors

Im Einzelnen erfolgt die Signalübermittlung bei Bindung eines Liganden an einen Estrogenrezeptor folgendermaßen: In Abwesenheit von Hormonen ist der jeweilige Rezeptor von seinem Wirkort abgetrennt und befindet sich deaktiviert entweder im Zytoplasma oder im Kern der Zielzellen. Er ist dabei mit einem Proteinkomplex assoziiert, der das Hitzeschock-Protein Hsp90 enthält. Dieses schützt den ER vor proteolytischem Verdau und hält ihn in einem aktiven Zustand, der die Bindung von Hormonen erlaubt. Wenn nun ein geeigneter Ligand per Diffusion in den Zellkern gelangt, bindet dieser an den Estrogenrezeptor in einer hydrophoben Tasche der LBD (siehe oben) und führt bei diesem zu einer Konformationsänderung und Phosphorylierung. So kommt es nicht nur zu einer Initialisierung der Aktivierungsfunktion AF-2 durch die Konformationsänderung in der LBD, sondern durch die Phosphorylierung auch zu einer Aktivierung der AF-1. Dabei übt der Umfang der Konformationsänderung des ER Einfluß auf die Intensität aus, mit der die Transduktion der estrogenen und antiestrogenen Signale auf die Zielgene erfolgt. So stabilisieren unterschiedliche Liganden abhängig von ihrer intrinsischen Estrogenaktivität ein Kontinuum von Intermediärformen, die zwischen den Extremen der ungebundenen, unkonfigurierten Ruheform und der durch 17-β-Estradiol (E2) maximal aktivierten Form des ER einzuordnen sind. Im Folgenden bindet der ER über die DNA-Bindungs-Domäne (DBD) an eine spezifische Sequenz der DNA, das Estrogen Response Element (ERE). Dieses besteht aus einer invers wiederholten Abfolge von sechs Basen, die durch drei Basen voneinander getrennt sind. Die Wiederholung ermöglicht die Bindung von Estrogenrezeptor-Paaren. Diese sog. ER-Dimere (ERα/ERα, ERβ/ERβ, ERα/ERβ) binden aufgrund ihrer Homologie in der DBD an dieselbe Sequenz der DNA. Jeder dieser möglichen Dimere ist in der Lage, die Genexpression zu induzieren, wobei ERβ-Homodimere weniger aktiv als ER- Heterodimere zu sein scheinen. Ist E2 der Ligand, so bindet der ER nämlich als E2-ER-Homodimer-

Komplex an das ERE. Der Komplex wird durch das ERE gelesen und in die Synthese von mRNA, DNA und Proteinen transkribiert. (32)

Tabelle 2: Funktionen der Estrogenrezeptoren

Estrogenrezeptoren / Gewebe	ER-α	ER-β
Uterus	Zellproliferation	Begrenzung der ER-α Effekte
Brust	"	"
Prostata	"	"
Knochen	Erhöhung der Knochendichte	Erniedrigung der Knochendichte
Blutgefäßendothel	Steigerung der Durchblutung	Senkung der Durchblutung

2.1.3 Wirkungen der Estrogene

Die Estrogene bewirken neben der Steuerung der Ausbildung und Funktion des Fortpflanzungstraktes des menschlichen Körpers auch zahlreiche sog. extragenitale Effekte, die verschiedene Organsysteme betreffen. Diese Funktionen sind in Bezug zu den in Kapitel 1 genannten Veränderung im Zuge der Postmenopause von Bedeutung, da sie deren Ursache in einem Sistieren der Estrogenproduktion verdeutlichen.

2.1.3.1 Unmittelbare Auswirkungen auf den Fortpflanzungstrakt

Für den weiblichen Organismus lassen sich drei Phasen unterscheiden: Die sexuelle Entwicklung (Pubertät), die Geschlechtsreife und die Schwangerschaft:

2.1.3.1.1 Pubertät

Die somatischen Veränderungen der Frau, die mit der Pubertät einhergehen und sich als Vorbereitung für die Fortpflanzung verstehen lassen, sind überwiegend auf direkte oder indirekte Estrogenwirkungen zurückzuführen. Es kommt zur Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale. Erstere umfassen die estrogenabhängigen Veränderungen des äußeren (Labien, Klitoris und Vulva) und des inneren Genitales (Tuben, Corpus und Cervix uteri). Zu den sekundären Merkmalen zählen die Brustentwicklung, die geschlechts-spezifischen Proportionen und somit das Fettverteilungsmuster.

2.1.3.1.2 Geschlechtsreife

Neben der Aufrechterhaltung der während der Pubertät entwickelten Merkmale stehen vor allem die Vorbereitungen für eine eventuell eintretende Befruchtung im Vordergrund. Im Einzelnen kommt es zu:

- Proliferation des Vaginalepithels,
- Stimulation der zervikalen Sekretion,
- Proliferation des Endometriums,
- Sekretion der Tubenschleimhaut.

2.1.3.1.3 Schwangerschaft

Hier imponieren klinisch sichtbare Leistungen der Estrogene wie die Regulation von Wachstum und eine gesteigerte Durchblutung des Uterus. Außerdem erfolgt eine weitere Entwicklung und Differenzierung der Brustdrüse als Vorbereitung auf das Stillen (Laktation).

2.1.3.2 Extragenitale Effekte

2.1.3.2.1 Knochenstoffwechsel

Estrogene induzieren bei der Frau ähnlich wie Calcitonin eine verstärkte Aktivierung der Osteoblasten, die für die Einlagerung von Calcium in die Knochen verantwortlich sind. Im Unterschied zum Mann, bei dem die Osteoblastenaktivität überwiegend vom Calcitonin abhängig ist, bietet die Induzierbarkeit der Osteoblasten durch sowohl Calcitonin als auch Estrogene im weiblichen Organismus einen besseren Schutz des Knochens vor Abbau z.B. während der Schwangerschaft, die mit stark erhöhten Estrogenwerten im mütterlichen Serum einhergeht.

2.1.3.2.2 Anabole Wirkung

Estrogene besitzen ebenfalls eine gering ausgebildete eiweißanabole Wirkung. Diese ist z.B. während der weiblichen Pubertät für den milden Wachstumsschub und die anschließende Verknöcherung der Epiphysen verantwortlich. Im Bereich des Reproduktionstraktes fördern Estrogene die Zellteilung und die Zunahme des Zellvolumens, erhöhen die Blutzufuhr, fördern die Retention von Wasser und Elektrolyten, die Akkumulation von Aminosäuren und die Synthese von Proteinen. Diese leichte eiweißanabole Wirkung der Estrogene gewinnt mit Eintritt der Postmenopause klinische Bedeutung: Mit dem Sistieren der ovariellen Estrogenproduktion kann durch Abbau der Eiweißknochenmatrix eine Osteoporose entstehen. Einmal abgebaute Knochenmasse als Folge eines Estrogenmangels kann trotz Estrogensubstitution nur in geringem Umfang wieder aufgebaut werden.

2.1.3.2.3 Protektive Wirkung auf das Herz-Kreislauf-System

Die schützende Wirkung der Estrogene vor einer koronaren Herzerkrankung beruht auf vier Prinzipien.

- Estrogene senken die Konzentration des "schlechten" LDL-Cholesterins deutlich und heben die des "guten" HDL-Cholesterins an,
- Estrogene sorgen dafür, dass die Arterienwände glatt und dehnbar sind (Entspannung der Blutgefäße),
- Estrogene hemmen die Umwandlung der Lipoproteine in blutgefäßschädigende Substanzen und schützen damit die Gefäße (Konzentrationssenkung gefäßschädigender Substanzen),
- Estrogene können erhöhte Blutzuckerwerte senken, indem sie die Ansprechbarkeit der Körperzellen auf den Botenstoff Insulin erhöhen.

2.1.4 Synthetische Estrogene

Die synthetischen Estrogene haben im Gegensatz zu den natürlichen eine hohe, länger anhaltende estrogene Wirkung nach oraler Gabe und leiten sich vom Estradiol ab. Die wichtigsten Vertreter sind das α-Ethinylestradiol und dessen 3-Methylester, das Mestranol. Der klinische Einsatz findet im Wesentlichen aus den unten weiter ausgeführten Gründen in Kombination mit Gestagenen statt und beschränkt sich in der reinen Form u.a. auf die zusätzliche bzw. lokale Behandlung von Entzündungen des Genitaltraktes sowie einer abnormen Trockenheit der Vagina.

2.2 Gestagene

2.2.1 natürliches Vorkommen und Funktion

Auf der anderen Seite sind die Gestagene von Bedeutung, bei denen es sich ebenfalls um Steroidhormone handelt und die vorwiegend im Corpus Luteum und in der Plazenta gebildet werden. Im weiblichen Organismus kommen das Progesteron, das 20-α-Hydroxyprogesteron und das 17-α-Hydroxyprogesteron natürlich vor. Indem Progesteron bzw. seine Derivate für eine sekretorische Transformation des Endometriums verantwortlich sind und dieses das befruchtete Ei umschließt, schützen sie eine eventuell eingetretene Gravidität. Hierbei kommt es zu einem postovulatorischen Verschluss des Muttermundes und zur Abnahme der Menge und Spinnbarkeit des Zervixschleims. Ebenso wie die Estrogene fördern die Gestagene die Proliferations- und Sekretionsbereitschaft der Alveoli der Brustdrüse. Die Wirkung des Progesterons auf das Myometrium bzw. auf die gesamte glatte Muskulatur ist tonus-mindernd. In der Schwangerschaft wird dadurch der Uterus ruhiggestellt. Aber auch der Tonus von Ureter und Venen wird vermindert, so dass unter anderem auch dadurch in der Schwangerschaft häufiger Pyelitiden und Varizen auftreten können. Das Zusammenspiel mit den Estrogenen wird auch daran deutlich, dass im Uterus die Bindung von Progesteron an ein spezifisches Rezeptorprotein erfolgt, dessen Bildung durch Estrogene stimuliert wird. Die Effekte an den weiblichen Genitalorganen einschließlich Mammae lassen sich daher nur dann nachweisen, wenn das entsprechende Organ vorher durch Estrogen stimuliert wurde.

2.2.2 Synthetische Gestagene

Allen natürlichen Gestagenen ist jedoch gemeinsam, dass sie sehr rasch über den hepatischen Kreislauf inaktiviert werden, weshalb eine orale Medikation nicht günstig ist. Die Konsequenz aus dieser Tatsache war die Einführung synthetischer Gestagene. Diese besitzen nur Partialwirkungen des Progesterons und sind Derivate von Androgenen oder des Progesterons bzw. des 17-α-Hydroxyprogesterons. Sie besitzen keine signifikante androgene oder anabole Restwirkung. Gestagene werden im Rahmen der postmenopausalen Hormontherapie hauptsächlich in Kombination mit Estrogenen angewandt. Diese den Leitlinien entsprechende Vorgehensweise begründet sich auf die Tatsache, dass eine alleinige Gestagentherapie bezüglich des Therapieerfolges bei den im Abschnitt „Die Wechseljahre“ genannten Symptomen weit hinter denen einer Kombination mit Estrogenen zurücksteht, während eine Therapie mit Estrogenen allein nachweislich die Inzidenz für Mamma- und

Uteruskarzinome zu erhöhen scheint. Indikationen für eine reine Gestagentherapie sind dagegen u.a. die adjuvante Therapie beim Korpus-(Endometrium-)karzinom, die Hormontherapie bei adenomatöser Hyperplasie und die peri- bzw. postmenopausale Hormontherapie, wenn Estrogene kontraindiziert sind.

2.3 Hormonersatztherapie

Die Hormonersatztherapie (engl.: Hormone replacement therapy (HRT)) wurde seit den 60er Jahren nahezu weltweit bei Frauen zur Behandlung klimakterischer Beschwerden und zur Prävention der Osteoporose eingesetzt. Vor knapp zwei Jahrzehnten wurde die Indikation fälschlicherweise auf die Prävention kardiovaskulärer Erkrankungen erweitert. Man unterscheidet verschiedene Substitutionsformen:

Tabelle 3: Formen der Hormonersatztherapie

	Estrogen-Gestagen- Sequenztherapie		Simultantherapie
	Zweiphasig	Dreiphasig	
Ähnlichkeit mit natürlichem weiblichen Zyklus	++	+++	+
Estrogengabe	21 Tage Einnahme – 7 Tage Pause	21 Tage normale Dosierung – 7 Tage niedrige Dosierung	Kontinuierlich
Gestagengabe	Ab Tag 7-11 bis Tag 21 des Zyklus	Ab Tag 7-11 bis Tag 21 des Zyklus	Kontinuierlich
Charakteristika:	Zyklische Blutungen Während der Pause der Einnahme kann es zum Aufflammen klimakterischer Beschwerden und zu sog. Entzugs-Kopfschmerzen kommen.	Zyklische Blutungen	keine Blutungen, Therapieform der späten Menopause, in der frühen Postmenopause mögliches Auftreten von Zwischenblutungen, da das Endometrium nicht 100%ig ruhig- gestellt werden kann

+ niedrige Ähnlichkeit +++ hohe Ähnlichkeit

	Estrogen-Monotherapie	Gestagen-Monotherapie
Indikationen	Frauen nach Hysterektomie (sonst Gefahr eines Endometrium-karzinoms), Frauen mit vorhandenem Uterus Verschlusskrankheiten des Herzens, Z.n. Meningeom.	Durch Progesteronmangel bedingte menopausale Ausfallerscheinungen, Beginn des Klimakteriums, wenn das Ovar noch ausreichend Estrogene, aber kein Progesteron mehr bereitstellt.
Ähnlichkeit mit natürlichem weiblichen Zyklus	-	-
Estrogengabe		X

Anmerkung: Die Estrogen-Gestagen-Sequenztherapien (zweiphasig und dreiphasig) verminderten die Inzidenz des Endometriumkarzinoms (Corpuskarzinoms), indem die Abnahme der Gestagenkonzentration ab Tag 21 des Zyklus zu einer sog. Entzugsblutung führte. Viele Frauen empfanden die erneuten Blutungen jedoch als Belastung. Wenn trotzdem der Wunsch nach HRT bestand, blieb nur die Estrogen-Monotherapie oder Estrogen-Gestagen-Simultantherapie mit den beschriebenen Nebenwirkungen.

2.3.1 Neuere Studien

Die Womans Health Initiative (WHI)-Studie aus dem Jahr 1998, die zum Ziel hatte, die Hormonersatztherapie zu evaluieren bzw. deren Wirksamkeit zu erkunden, basierte auf zwei Ansätzen:

- Frauen mit Uterus bekamen die Kombinationstherapie mit Gestagenen und Estrogenen,
- Frauen nach Hysterektomie (Uterusentfernung) wurden nur mit Estrogenen behandelt.

Diese groß angelegte, randomisierte und placebokontrollierte Studie wurde wegen der beobachteten Nebenwirkungen der Hormonbehandlung nach 5 1/2 Jahren vorzeitig abgebrochen. Die Studie zielte darauf ab, das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer Hormon-ersatztherapie (HET bzw. engl. HRT) mit einer in den USA gebräuchlichen Estrogen-Gestagen-Kombination (0,625 mg konjugierte Estrogene plus 2,5 mg Medroxyprogesteron-acetat (MPA) täglich) zu untersuchen. Bezogen auf die durchschnittliche Gesamt-

beobachtungszeit der WHI-Studie zeigten sich in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe zusätzlich 7 Komplikationen einer koronaren Herzkrankheit (KHK), vor allem Herzinfarkte, 8 Schlaganfälle, 18 venöse Thrombembolien (darunter 8 Lungenembolien) und 8 invasive Mammakarzinome auf 10.000 Frauenjahre. Dabei ist der Begriff Frauenjahre in diesem Fall so zu verstehen, dass z.B. 10.000 Frauen ein Jahr lang die beschriebene Medikation einnahmen, bevor sich die genannten Fälle von Komplikationen manifestierten. Demgegenüber waren in der Verumgruppe im Vergleich zur Placebogruppe Kolonkarzinome um 6 und Hüftfrakturen um 5 Fälle pro 10.000 Frauenjahre vermindert. Obwohl unter der genannten HRT auch die Inzidenz für weitere Frakturen abnahm, überwog der Schaden durch eine Inzidenzerhöhung von Mammakarzionomen und o.g. Krankheiten des Herz-Kreislaufsystems deutlich den Nutzen, was schließlich 2003 nach einer durchschnittlichen Laufzeit von 5,2 Jahren zum Abbruch der Studie führte. Ein zweiter Arm dieser Studie, der sich mit der Estrogenmonotherapie befasste, wurde wegen eines deutlich erhöhten Schlaganfallrisikos der Hormonanwenderinnen Anfang März 2004 ebenfalls vorzeitig abgebrochen. Anders als unter der Kombinationsbehandlung wurde zwar kein erhöhtes Risiko für Herzinfarkte festgestellt, es konnte aber auch kein Schutz vor Herzinfarkten nachgewiesen werden, so dass die Risiko-Nutzen-Bilanz auch in dieser Studie negativ ausfiel. (77)
Die Million Women Study ist eine Beobachtungsstudie der britischen Gesundheitsheitsbehörden, in der unter anderem Daten über Hormontherapie, Krebshäufigkeit und Tumorsterblichkeit erhoben werden. Für Aufsehen sorgte die Analyse der Daten aus den Jahren 1996 – 2001, in denen 1 084 110 Frauen im Alter zwischen 50 und 64 Jahren untersucht worden waren. Die Hälfte von ihnen hatte Hormone eingenommen. Die Ergebnisse weisen auf einen Zusammenhang zwischen Hormontherapie und Brustkrebsinzidenz hin. Nach fünfjähriger Einnahme von Estrogenen traten statistisch 1,5 zusätzliche Mammakarzinome bei 1000 Anwenderinnen im Vergleich zu Frauen auf, die auf eine HRT verzichteten; bei zehnjähriger HRT waren es fünf zusätzliche Mammakarzinome. Nahmen Frauen eine Kombination aus Estrogen plus Gestagen ein, waren es im Vergleich mit Frauen ohne HRT sechs zusätzliche Mammakarzinome (pro 1000 Anwenderinnen) nach fünf Jahren Therapie und 19 zusätzliche Tumoren nach zehnjähriger Hormoneinnahme (63).

Seit Veröffentlichung der WHI- und der Million-Women-Studie ist die Verschreibung von Hormonpräparaten zur Behandlung bzw. Prävention von postmenopausalen Beschwerden deutlich zurückgegangen. Die aktuellsten Zahlen zur Verordnung von Sexualhormonen in Deutschland liefert der „Arzneiverordnungsreport 2007“ (Springerverlag 2008). So sind

zwischen 1999 und 2006 die Verordnungen zulasten der gesetzlichen Krankenversicherung um 61 % zurückgegangen. Im Jahr 2006 wurden noch 448 Millionen Estrogen-Tagesdosen verschrieben, was einer täglichen Behandlung von 1,2 Millionen gesetzlich versicherten Frauen entspricht. Estrogen-Monopräparate sind vom Rückgang offensichtlich weniger betroffen als die Estrogen-Gestagen-Präparate: So ging die Verordnung der Kombinationen von 2005 auf 2006 um 12,6 % zurück, die der Monopräparate um 4,9 Prozent.

Kürzlich wurden epidemiologische Analysen zur Entwicklung der Tumorinzidenz sowohl in den USA als auch in Deutschland veröffentlicht: Nachdem die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland (GEKID) von 1970 bis 2002 eine Zunahme der Mammakarzinom-Inzidenz beobachtete, sind die Zahlen nun rückläufig. So meldeten die Krebsregister des Saarlandes und Schleswig-Holsteins, dass die Inzidenz des Mammakarzinoms in den Jahren von 2003 bis 2005 um jährlich 5,7 Prozenz (Saarland, Einwohnerzahl: 1 Million) bzw. 6,8 Prozent (Schleswig Holstein, Einwohnerzahl: 2,8 Millionen) abgenommen habe (63). Dabei sinke die Inzidenz in beiden Bundesländern ab 2001 jährlich um 6-7 Prozent pro Jahr, was den US-amerikanischen Daten nahe kommt (s.u). Ähnlich waren auch die Daten des gemeinsamen Krebsregisters von Berlin, Brandenburg, Mecklenburg-Vorpommern, Sachsen-Anhalt und den Freistaaten Sachsen und Thüringen (GKR): Die Brustkrebsinzidenz stieg in diesen Bundesländern bis zum Jahr 2002 leicht an und ist seitdem auf nahezu gleichbleibendem Niveau. Bei den Frauen älter als 70 Jahre setzte sich ein Anstieg der jährlichen Neuerkrankungen nach 2002 fort.

In den USA erbrachten Erhebungen auf Basis des SEER-Registers (Surveillance Epidemiology and End Results) des National Cancer Institute vier Jahre nach der WHI-Studie einen Rückgang der Brustkrebsfälle im Jahr 2003 um 7 Prozent, wobei dieser Wert trotz einer kontinuierlichen Abnahme der Inzidenz um je ca. 1 Prozent pro Jahr seit 1998 ungewöhnlich hoch war. Die erweiterte Analyse des SEER-Registers wies einen jährlichen Abfall der Neuerkrankungen um jährlich 8,6 Prozent auf. Bei den über 50 jährigen Frauen ging die Rate der Neudiagnosen sogar um elf bis zwölf Prozent zurück. Mit Minus 14,7 Prozent war der Rückgang bei den estrogenrezeptorpositiven Mammakarzinomen sogar noch deutlicher (63).

2.3.2 Geschlechtshormone und Karzinome der Frau

2.3.2.1 Mammakarzinom

Bei einem Teil der Mammakarzinome gilt die ätiologische Bedeutung des Estrogens bzw. Progesterons als gesichert. So finden sich bei diesen Estrogen- bzw. Progesteronrezeptoren in Form von Kernproteinen, an die die jeweiligen Hormone binden und u.a. das Wachstum von Mammakarzinomzellen regulieren. Eine erhöhte Belastung durch Estrogene kann dabei u.a. aus einer frühen Menarche und einer späten Menopause resultieren. Auch das im Rahmen der Gestagenmangelhypothese postulierte gestörte Estrogen-Gestagen-Verhältnis mit einer Verminderung der Gestagene als Gegenspieler der Estrogene ist als Ursache möglich. Schließlich kann eine supraphysiologische Estrogenbehandlung in der Postmenopause zu einer Proliferation von Mammakarzinom-Zellen führen. Tumoren prämenopausaler Frauen sind in 50-60 %, Tumoren postmenopausaler Frauen in 70-80% rezeptorpositiv. Der Rezeptorstatus hat dabei maßgebliche Bedeutung für die Prognose: Diese ist bei hormon-rezetorpositiven Karzinomen wesentlich besser. Die Ursache dafür liegt in der Möglichkeit einer Hormontherapie, die nach der Primärtherapie operabler Mammakarzinome wesentlicher Bestandteil der adjuvanten Therapie ist.

2.3.2.2 Endometriumkarzinom

Beim Endometriumkarzinom (Korpuskarzinom) handelt es sich um eine Krebserkrankung der Gebärmutterschleimhaut. Dabei liegen in 85 % der Fälle Adenokarzinome (Karzinome der Drüsen) vor. Viele Karzinome exprimieren auf ihrer Oberfläche Estrogen- und Progesteron-rezeptormoleküle. Betroffen sind überwiegend Frauen in der Postmenopause. In Deutschland wurden im Jahr 2002 mehr als 11.000 Neudiagnosen gestellt. Als förderlich für die Tumor-entstehung wird eine langjährig erhöhte Estrogenkonzentration angenommen.

2.3.3 Nutzen-Risiko-Analyse und Therapieempfehlungen

Mit Hilfe der Hormonersatztherapie lassen sich Wechseljahresbeschwerden effektiv behandeln. Darüber hinaus zeigten kontrollierte Studien, dass die Estrogenbehandlung eine wirksame Prophylaxe der Osteoporose darstellt. Auf der anderen Seite führte eine langfristige kombinierte Hormonersatztherapie (Estrogen plus Gestagen) zu einer erhöhten Inzidenz von Brustkrebs und ischämischem Schlaganfall. Auch fehlt aufgrund der Datenlage jeglicher Hinweis auf einen kardiovaskulären Nutzen oder eine Verbesserung kognitiver Fähigkeiten durch die Hormonersatztherapie. Die Nebenwirkungen führen dazu, dass das Nutzen-Risiko-Verhältnis einer Langzeittherapie und zur Osteoporoseprophylaxe als schlecht eingestuft

wird. Das Bundesinstitut für Arzneimittel (BfArM) hat am 01. Juli 2004 ein Stufenplanverfahren veröffentlicht, das die pharmazeutischen Hersteller zu einer umfassenden Änderung der Fach- und Gebrauchsinformation verpflichtet: Die Indikation für eine Osteoporoseprophylaxe ist beschränkt auf die Prävention einer Osteoporose bei postmenopausalen Frauen mit hohem Frakturrisiko, die eine Unverträglichkeit oder Kontraindikation gegenüber anderen zur Osteoporoseprävention zugelassenen Arzneimitteln aufweisen. Eine Indikation zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden besteht nur dann, wenn Frauen in den Wechseljahren unter stark beeinträchtigenden Beschwerden leiden und kein erhöhtes Risiko für Herz-Kreislauf-Erkrankungen aufweisen. Der Einsatz der HRT soll in möglichst niedriger Dosierung und für einen kurzen, überschaubaren Zeitraum von 1-2 Jahren erfolgen.
Besitzen die Frauen noch ihre Gebärmutter, so sollten sie Kombinationspräparate aus Estrogen- und Gestagenkomponenten einnehmen, um das Risiko für ein Endometriumkarzinom zu minimieren. Frauen mit Z.n. Hysterektomie sollten nur Estrogenmonopräparate einnehmen, da die Kombinationspräparate die Entwicklung eines Brustkrebses fördern. Jedoch lassen sich nach Angaben eines Artikels des Deutschen Ärzteblattes (63) aus den epidemiologischen Daten keine direkten Beweise für eine Reduktion des Risikos für Mammakarzinome durch Verzicht auf eine Estrogen-Gestagen-Therapie in oder nach der Menopause ableiten. Auch seien die Daten aus prospektiv kontrollierten Studien zu der Frage, nach welchem Zeitraum der Hormontherapie sich das Risiko für die Entwicklung eines Mammakarzinoms erhöht und wie lange es nach Absetzen der Hormontherapie wie stark erhöht bleibt, eher heterogen. Jedoch würden die US-amerikanischen Gesundheitsbehörden und das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte (BfArM) derzeit nicht von ihren o.g. Empfehlungen zur langfristigen Hormongabe abweichen (63).

2.4 Bisherige Therapieansätze auf Basis von Phytoestrogenen

In den letzten Jahren wurden zunehmend Therapiekonzepte auf Basis pflanzlicher Heilmittel fortentwickelt. Diese basieren auch auf der Beobachtung, dass die Beschwerden bzw. Begleiterscheinungen des Klimakteriums in Ländern geringer ausfallen, in deren Ernährungsgewohnheiten Phytoestrogene traditionell eine bedeutsame Rolle spielen. Beispielhaft sei hier das Soja in asiatischen und amerikanischen Ländern sowie die Yam-Wurzel in Mexiko genannt. Auch Mittel mit Pflanzenextrakten aus Rhapontikrhababer und der Traubensilberkerze erfreuen sich seit Veröffentlichung der Ergebnisse der WHI-Studie einer großen Nachfrage. Rhapontikrharbarber enthält (neben abführend wirkenden Verbindungen) Rhaponticin, das der Substanzklasse der Stilbene angehört und eine estrogene Wirkung aufweist. Die Substanzen dieser Stoffgruppe gelten jedoch als potenziell krebserregend und erbgutverändernd. Extrakte der Traubensilberkerze üben einen positiven Einfluss auf die hormonelle Regulation im Klimakterium aus und wirken vor allem im ZNS und am Knochen. Die Phytoestrogene binden aufgrund ihrer komplementären Struktur zur Rezeptorbindungsstelle direkt am Estrogenrezeptor-α bzw. -β. Die Bindung dieser Substrate beruht auf der komplementären Passform von Substrat und Enzymkavität. Die strukturelle Grundlage für die Bindung des Substrats beruht auf der Ausbildung von Wasserstoffbrücken des phenolischen Substrats mit polaren Seitengruppen der Peptidkette in der Kavität. Diese strukturellen Grundlagen des Substrats schränken die möglichen Substanzklassen ein, die potenziell für die Hormonersatztherapie in Frage kommen. Während niedrig dosierte Phytoestrogene die estrogene Funktion in abgeschwächter Weise initiieren und somit eine schwach agonistische Wirkung aufweisen, können hochdosierte Phytoestrogene darüber hinaus kompetitiv die Bindung von 17-β-Estradiol antagonisieren.

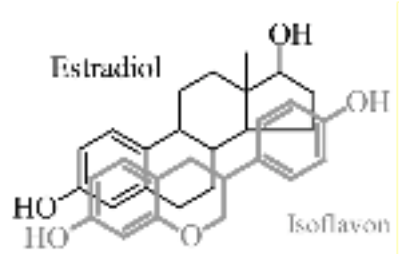


Abb. 4: Vergleich der Strukturen des 17-Beta-Estradiols und der der Phytoestrogene

2.4.1 Formen und Vorkommen

Unter die Phytoestrogene subsummiert man u.a. die Isoflavone, Lignane, Coumestane und Sterole. Hierbei kommt den Isoflavonen oder Isoflavonoiden eine bedeutende Rolle zu. Diese sind gemäß der strukturellen Einteilung eine Gruppe von Flavonoiden, worunter man organische Moleküle mit zwei aromatischen und einem heterozyklischen Kohlenstoffring versteht. Auch die Flavonole gehören zu den Flavonoiden und sind mit ihren Vertretern Quercetin, Kaempferol und Myricetin von großer Bedeutung für diese Arbeit (s.u.). Isoflavone findet man nicht nur in der Sojabohne und anderen Hülsenfrüchten, sondern auch in verschiedenen Getreidesorten, Gemüse, Leinsamen, Hopfen und Obst. Man unterscheidet u.a. vier Isoflavone mit möglicherweise positiven Effekten auf die Gesundheit: Genistein, Daidzein, Formononetin und Biochanin A. In Tabelle 4 ist das Vorkommen einiger Phyoestrogene dargestellt:

Tabelle 4: Vorkommen verschiedener Isoflavone

	Soja	Rotklee	Gemüse, Beeren, Getreide...
Isoflavone	x	x	
Lignane			x
Coumestane		x	
Sterole			x

Sojaprodukte findet man vor allem in der asiatischen Ernährung. In der westlichen Ernährung sind eher einige Lignane von Bedeutung, die in Gemüse, Beeren, Getreide, Hülsenfrüchten und Samen vorkommen.

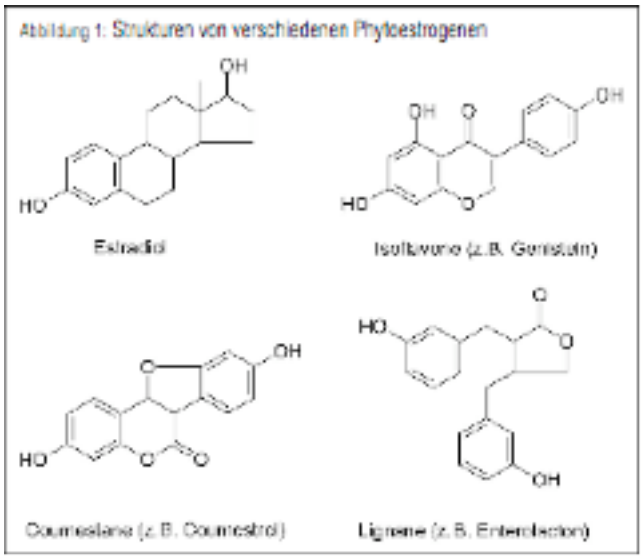


Abb. 5: Vergleich der Strukturen von Estradiol und verschiedenen Phytoestrogenen

Wie bereits oben erwähnt, sind auch die den Flavonolen zugehörigen Verbindungen Quercetin, Kaempferol und Myricetin als hormonell wirksame Substanzen zu diskutieren. Quercetin ist ein bekannter gelber Naturfarbstoff, der in vielen Pflanzen wie der Färbereiche, dem Apfel, Zwiebeln, Brokkoli, grünen Bohnen sowie dem Wein vorkommt.

2.5 *Morinda citrifolia* L.

Eine Linderung von Wechselsjahresbeschwerden wurde auch von Frauen berichtet, die regelmäßig Nonisaft einnahmen (Westendorf, persönliche Mitteilung). Dieser wird aus den Früchten von *Morinda citrifolia* L. gewonnen und erfreut sich derzeit weltweit großer Beliebtheit als Wellnessgetränk. Dies ließ die Vermutung aufkommen, dass dieser Saft eine estrogene Wirkung innehaben und damit für die Suche nach weiteren Alternativen für die Estrogen-Substitutionstherapie von Interesse sein könnte. *Morinda citrifolia* L. ist der botanische Name dieser Pflanze, die der Familie der Rötegewächse (Rubiceae) angehört (komplette botanische Systematik siehe Tabelle 5). Diese wird bis zu 6 Meter hoch, trägt immergrüne Blätter und ganzjährig Früchte (siehe Abb. 6). Die Früchte, Noni genannt, sind essbar und reifen während 8 Monaten heran. Neben ihrer halbdurchsichtigen Erscheinung ist vor allem der strenge käseartige Geruch der reifen Frucht herausstechend.

Abb. 6: *Morinda Citrifolia* L.

Tabelle 5: botanische Nomenklatur der Noni-Pflanze, *M. Citrifolia* L.

Klasse:	Dreifurchenpollen-Zweikeimblättrige (Rosopsida)
Unterklasse:	Asternähnliche (Rosidae)
Ordnung:	Enzianartige (Gentianales)
Familie:	Rötegewächse (Rubiceae)
Gattung:	*Morinda*
Art:	Noni-Baum

2.5.1 Ursprung, Ausbreitung und Verwendung

Man vermutet den Ursprung der Pflanze in Queensland, einem heutigen australischen Bundesstaat. Von dort lassen sich verschiedene Wege der Ausbreitung nachvollziehen. Der bedeutsamste ging von polynesischen Seeleuten aus. Diese brachten die Pflanze in ihren Kanus in die polynesische Inselwelt, als sie vor ca. 2000 Jahren aus Südostasien emigrierten. Daher stammt auch der Begriff „canoe plants“. Polynesische Pioniere brachten die Pflanze vor ca. 900 Jahren auf die hawaianischen Inseln. Heute findet man sie rund um den gesamten Globus zwischen dem nördlichen und südlichen Wendekreis. *Morinda citrifolia* L. wächst besonders gut bei gering bis mäßig feuchtem Klima, das am ehesten in einer Höhe zwischen dem Meeresspiegel und 500 m gegeben ist. Man findet sie vor allem in Küstennähe auf offenem Flachland, auf Wiesen und in Schluchten. Aber auch in Lavagräben kommt sie vor (siehe Abb. 6). Neben der Verwendung als Heilpflanze gibt es auch Hinweise auf eine traditionelle Verwendung der Noni-Frucht als Lebensmittel. Nachdem viele Naturvölker wie die tahitianischen Ureinwohner oder die australischen Aboriginals die Frucht bereits seit Jahrhunderten in ihre Ernährung einbezogen hatten, erklärte die US-Regierung sie 1943 für essbar (42).

2.5.2 Einige Inhaltsstoffe von Morinda citrifolia

Von den zahlreichen in verschiedenen Bestandteilen von *Morinda citrifolia* nachgewiesenen Inhaltsstoffen sind folgende für diese Arbeit von herausragender Bedeutung:

2.5.2.1 Das Sapogenin Ursolsäure

Die Saponine sind glykosidische Pflanzeninhaltsstoffe und kommen im Pflanzenreich ubiquitär vor. Sie bestehen aus einem oder mehreren Kohlenhydraten (Monosaccaride) sowie einem Nichtzucker, welcher als Sapogenin bezeichnet wird und gemäß seiner jeweiligen chemischen Konstitution als Einteilungsprinzip der Saponine dient. So finden sich in den sog. Triterpensaponinen pentazyklische Triterpensapogenine, zu welchen auch die Ursolsäure gezählt wird. Zu den typischen Eigenschaften der Saponine zählen neben dem Charakteristikum, beim Lösen in Wasser einen haltbaren Schaum zu ergeben, deren hämolytische Aktivität sowie die Bildung von Cholesterolkomplexen. Aber auch zahlreiche Wirkungen mit therapeutischer Relevanz sind für die Saponine beschrieben worden: So fand man eine u.a. eine expektorierend-sekretolytische, antiödematös-exsudative, entzündungshemmend-antiulzerogene sowie eine Wirkung als allgemeines Tonicum, die vor allem auf einer Stimulierung von Lernfähigkeit, Gedächtnis und motorischer Aktivität basiert (4). Während diese Eigenschaften für die Saponine im Allgemeinen gelten, fand man für die Ursolsäure, welche aus verschiedenen Pflanzen wie Rosmarin, Pfefferminze und Lavendel gewonnen wird, u.a. Hinweise auf eine Hemmung der Entstehung und des Wachstums von Tumoren sowie auf eine Wirkung auf die Zelldifferenzierung im Tiermodell. Die Ursolsäure und ihre Derivate sollen die Apoptose bei einer Vielzahl von Tumorzellen einschließlich Mammakarzinom, Melanom, Leberkarzinom, Prostatakarzinom sowie chronischer myeloischer Leukämie induzieren. Als Mechanismen werden hierfür u.a. die Hemmung der Reversen Transkriptase (6), die Aktivierung von Caspasen (11), (23), die Hemmung von Protein-Tyrosin-Kinasen (10) und die Freisetzung von Calcium (5) angenommen. Außerdem fanden sich Hinweise auf eine Stimulierung der Kollagensynthese durch die Ursolsäure als einen aktiven Wirkstoff, was vor allem von kosmetischem Interesse ist (33).

2.5.2.2 Das Cumarin Scopoletin

Cumarine sind phenolische Verbindungen, und zwar Lactone einer entsprechenden o-Hydroxycarbonsäure. Unterschieden werden Cumarine, die Glykoside von Hydroxycumarin darstellen, und lipophile Cumarine. Letztere sind dadurch gekennzeichnet, dass das Cumaringerüst durch terpenoide Reste substituiert vorliegt. Scopoletin, ein Vertreter der Cumarine, wurde erstmals 1993 von Wissenschaftlern an der Universität von Hawaii aus Noni isoliert. Diesem Wirkstoff werden keim- und pilztötende Eigenschaften, sowie eine blut-

drucksenkende und entzündungshemmende, das Herz und alle Muskeln entspannende Wirkung nachgesagt. Erstgenannte Wirkung war u.a. Gegenstand der Arbeit von *Kayser et al.*, welche die antibakterielle Aktivität von Scopoletin gegenüber 8 Mikroorganismen, darunter 3 grampositive und 5 gramnegative Bakterien, untersuchten. Sie erhielten Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) von 0,6 bis 10 mg/ml, was einer bedeutsamen antibakteriellen Wirkung entspricht (29). Bezüglich der blutdrucksenkenden Eigenschaften testeten *Ojewole et al.* Scopoletin in vitro und in vivo und fanden eine Relaxierung glatter Muskelfasern und eine damit einhergehende Dilatation der Blutgefäße. Hierbei schien Scopoletin eine nichtspezifische, spasmolytische Wirkung zu entfalten (52). Auf der Suche nach einer möglichen Erklärung für die entzündungshemmende Wirkung des Scopoletins untersuchten *Moon et al.* Zellen der menschlichen Mastzell-Linie (HMC-1) und stießen auf eine signifikante und dosisabhängige Hemmung der Induktion der Produktion verschiedener inflammatorischer Zytokine (TNF-alpha, IL-6, IL-8). Sie nahmen für Scopoletin daher einen potenten Effekt zur Modulation der über Mastzellen gesteuerten Entzündungsreaktionen an (44). *Panda et al.* verabreichten Scopoletin an Ratten, welche in Folge der Applikation von Levothyroxin eine hyperthyroide Stoffwechsellage aufwiesen, und fanden darunter erniedrigte Serumwerte für Schilddrüsenhormone, Glukose sowie eine reduzierte Aktivität der Glucose-6-Phosphatase. Außerdem imponierte eine Hemmung der hepatischen Lipidperoxidation sowie eine erhöhte Aktivität von Antioxidantien, der Superoxidismutase[9] und der Katalase[10]. Zusammenfassend stellte sich hier für Scopoletin u.a. die Möglichkeit einer Hemmung der Schilddrüsenfunktion und einer Senkung des Blutglukosespiegels unter Verzicht einer lebertoxischen Wirkung dar, wie sie vielen vergleichbaren Wirkstoffen eigen ist (55). *Thuong et al.* fanden für verschiedene Cumarine (darunter Scopoletin), welche sie aus einer Pflanze namens *Weigela subsellilis* isolierten, einen hemmenden Einfluß auf die LDL-Oxidation und nahmen als Ursache dieses Effektes die Bildung von Kupferionen (Cu^{2+}) bzw. freier Radikale an. Auch verlängere Skopoletin dosisabhängig die Verzögerung konjugierter Diene und hemme die Bildung Thiobarbitursäure reaktiver Substanzen (TBARS). Auch erhielten sie Hinweise darauf, dass dieses die Fragmentierung von Apolipoprotein B-100 schützen könnte. Da die Oxidation der LDL einen wesentlichen Schritt der *Atherogenese*, einer der Hauptursachen der Bildung gefäßverengender Plaques, darstellt, könnte es sich hierbei um eine Möglichkeit der Prävention der KHK handeln (68).

---

[9] Vertreter einer Gruppe von metallhaltigen Enzymen zur Katalyse der Bildung von Wasser und Sauerstoff aus Wasserstoffperoxid.

[10] Enzym (Radikalfänger), welches Wasserstoffperoxid in Wasser und Sauerstoff spaltet.

2.5.2.3 Die Flavonoide Quercetin und Kämpferol

Die Gruppe der Flavonoide lässt sich in mehrere Subgruppen unterteilen und umfasst über 4000 Verbindungen mit einer großen Vielfalt an chemischen Strukturen. Von den zahlreichen Wirkungen, die in vitro und in vivo nachgewiesen worden sind, wurde bisher folgenden hauptsächliche Bedeutung zugeschrieben:

- antiallergische, antiphlogistische Wirkung,
- antivirale, antimikrobielle Wirkung,
- antioxidative Wirkung,
- antiproliferative, antikarzinogene Wirkung.

Quercetin und Kämpferol sind zwei der am meisten in der Nahrung vorkommenden Flavonoide. Bezüglich des erstgenannten Effektes untersuchten *Pietrovski et al.* u.a. den Einfluß von Quercetin, welches sie aus den Blättern der Pflanze *Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae)* gewonnen hatten, auf ein Maus-Ohr-Ödem und fanden eine Hemmung dieses Entzündungszeichens in einem Ausmaß von 61 +/- 5 % (59).

Im Rahmen einer Entzündung verursachen bakterielle Produkte und proinflammatorische Zytokine die Bildung großer Mengen an Stickstoffmonoxid (NO), indem es zu einer Aktivierung der Nitrid-Oxid-Synthase kommt, so dass Komponenten, die die NO-Bildung hemmen, über eine antiphlogistische Wirkung verfügen. In diesem Zusammenhang stellten *Hämäläinen et al.* bei der Erforschung der Effektes von 36 natürlich vorkommenden Flavonoiden auf die NO-Produktion fest, dass einige dieser Stoffe, darunter Quercetin und Kaempferol, das iNOS- (induzierbare NO-Synthase)[11] Protein, die mRNA-Expression und auch die Produktion von NO dosisabhängig hemmten. Auch kam es zu einer Hemmung bedeutsamer Transkriptionsfaktoren für iNOS (NF-kappaB und STAT-1) (20). *Rao et al.* schlossen in ihre Untersuchungen bezüglich der entzündungshemmenden Wirkung einiger Flavonoide auch das Kaempferol ein und fanden eine Beteiligung an einigen Funktionen der Makrophagen, die für den entzündungshemmenden Prozess von Bedeutung sind. So fanden sie nicht nur signifikant und dosisabhängig die Lipopolysaccaride (LPS) und das Stickstoffmonoxid, sondern auch die Zytokine und das Interleukin-12 gehemmt (60). *Naz et al.* erhielten Hinweise auf eine antibakterielle Aktivität des Quercetins, nachdem sie dieses aus einem methanolischen Extrakt der Granatapfel-Frucht isoliert hatten. Dabei stellte sich die größte antibakterielle Wirkung gegenüber gram-positiven Bakterien dar. Als Ursache dieser Wirkung nahmen sie die phenolische Struktur an (47). *Lim et al.* untersuchten in-vitro die

[11] Stellt Stickstoffmonoxid unter Verbrauch von NADPH aus der Aminosäure L-Arginin und Sauerstoff her.

antibakterielle Aktivität von Kaempferol und Quercetin gegenüber dem Propionibacterium acnes. Beim Einsatz des Schachbrett-Tests fanden sie für beide Substanzen Minimale-Hemm-Konzentrationen von 32 µg/ ml und 64 µg/ml, was als deutliche antibakterielle Aktivität zu werten ist (37). Auch die antioxidative Wirkung war Inhalt zahlreicher Studien. *Kaindl et al.* untersuchten die antioxidativ schützende Wirkung des Quercetins anhand von kolorektalen Adenom- und Karzinom-Zell-Linien. Das kolorektale Epithel reagiert auf oxidativen Stress mit einer erhöhten Ausschüttung von Fettsäure-Hydroperoxiden (LOOH). Es konnte gezeigt werden, dass Quercetin der LOOH induzierten Stimulation von H_2O_2 dosisabhängig vorbeugte (26) . *Wang et al.* testeten für verschiedene Flavone die Zytotoxizität auf normale Zellen und eine antiproliferative Wirkung gegenüber Tumor-Zellen anhand eines MTT-Reduktions-Assays. Während die Zytotoxizität gegenüber normalen Zellen sehr gering ausfiel, hemmte Quercetin bereits in geringen Konzentrationen MCF-7- und HepG2- Tumor-zellen, welche besonders stark auf die Flavone anzusprechen schienen. Zusammenfassend stellte sich für Quercetin damit ein ausgeprägter antiproliferativer Effekt auf Tumorzellen bei nur geringer zytotoxischer Wirkung gegenüber normalen Zellen dar.
Desweiteren werden Flavonoide seit längerer Zeit zur Linderung postmenopausaler Beschwerden eingesetzt. Eine Darstellung der aktuellen Studienlage bezüglich einer Wirkung der Flavonoide auf die Estrogenrezeptoren ist dem Kapitel 6 zu entnehmen.

2.5.2.4 Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA=Poly Unsaturated Fat Acids)

Wie die weiteren Untersuchungen zeigten, kommt den Fettsäuren im Rahmen dieser Arbeit eine große Bedeutung zu. Unter Fettsäuren versteht man biogene, aliphatische Monocarbon-säuren. Sie kommen als integrierende Bestandteile tierischer und pflanzlicher Fette vor. Die Fettsäuren werden gebräuchlicherweise nach folgenden Gsichtspunkten unterteilt:

- nach chemischen Aspekten in gesättigte, ungesättigte und substituierte Fettsäuren,
- nach der Kettenlänge in kurzkettige (1-7 C), mittlere (8-12 C) und höhere (> 12 C),
- entsprechend der Ernährungsphysiologie in essentielle und nichtessentielle Fettsäuren,
- nach der Häufigkeit des Vorkommens in ubiquitäre (weit verbreitete) und seltene Fettsäuren.

Die meisten Fettsäuren, die in Pflanzen vorkommen, gehören zur Gruppe der langkettigen, unverzweigten, ungesättigten Fettsäuren mit gerader Anzahl von Kohlenstoffatomen. Von besonderer ernährungsphysiologischer Bedeutung sind die essentiellen Fettsäuren, die der menschliche Körper nicht selbst herstellen kann und daher auf eine nutritive Zufuhr ange-

wiesen ist. Diese lassen sich wiederum in die Omega-3- und Omega-6-Familie einteilen. Omega-6-Fettsäuren (z.B. Linolsäure, Gamma-Linolensäure) sind in der durchschnittlichen europäischen Ernährung ausreichend vertreten. Die Linolsäure wird in Pflanzenblättern aus gesättigten Fettsäuren gebildet. Da sie die wesentliche Speicherform pflanzlicher Fette darstellt, kommt sie in hohen Konzentrationen in Pflanzensamen vor. Typische Quellen sind Soja-Öl, Sonnennblumenöl, Weizenkeimöl, Maisöl sowie Pflanzenmargerine. Zu den Omega-3-Fettsäuren zählt man u.a. die Alpha-Linolensäure. Obwohl das ernährungsphysiologisch optimale Verhältnis für die Aufnahme von Omega-6- und Omega-3-Fettsäuren etwa 15-30:1 zugunsten erstgenannter Gruppe beträgt, wird dieses gewöhnlich nicht erreicht. U.a. enthalten Sojaöl, Leinsamenölen, Walnussöl und Rapsöl größere Mengen an Alpha-Linolensäure.

2.5.3 Toxizität des Noni Fruchtsaftes.

Während die potenziell gesundheitsfördernden Wirkungen von *Morinda citrifolia* bereits Gegenstand zahlreicher Studien waren, hält sich die Anzahl der Veröffentlichungen bezüglich etwaiger Risiken in Grenzen. Einige Studien versuchten, eine Kausalität zwischen dem Konsum von Noni-Fruchtsaft und dem Auftreten bestimmter Gesundheitsbeeinträchtigungen herzustellen: In einem der Fälle führten die Autoren eine Hyperkaliämie auf den Konsum von Noni-Fruchtsaft zurück. Hierbei stellte sich jedoch heraus, dass die Schwankungen der Noni-Fruchtsäfte verschiedener Hersteller bezüglich des Kaliumgehalts groß waren und sich nicht wesentlich von denen anderer Fruchtsäfte wie Orangen- oder Grapefruitsaft unterschieden. In einem weiteren Fall wurde eine erhöhte Resistenz gegen Cumarine (z.B. Marcumar) auf den Genuß von Noni-Fruchtsaft zurückgeführt. Hierbei wurde ein erhöhter Vitamin-K-Gehalt in dem untersuchten Saft gefunden, was die erhöhte Cumarin-Resistenz erklären sollte. Allerdings war die Ursache auch in diesem Fall eher in der Variationsbreite der großen Anzahl verschiedener Zusätze als in den Eigenschaften der Noni-Frucht selbst zu finden. Bei insgesamt vier Fällen wurde ein scheinbarer Zusammenhang zwischen dem Genuss von Noni-Fruchtsaft und einer hepatotoxischen Wirkung hergestellt. Sie sind in Tabelle 6 zusammengefasst:

Tabelle 6: Fälle von Noni-Konsumenten /- innen

Fall Nr.	Patient	Konsum	Noni-Quelle	Labor	Leber-biopsie	Angenommene Ursache
1	männlich, 45 Jahre	1 Glas /d über mehrere Wochen	Fruchtsaft	ALAT ⇑ ASAT ⇑ γGT ⇑ LDH ⇑	Leber-schaden	Anthrachinone
2	männlich, 29 Jahre	71 mL/d		Bilirubin ⇑ ALAT ⇑ ASAT ⇑ γGT ⇑ AP ⇑	Akute Hepatitis	
3	weiblich, 62 Jahre	16 ml/d				
4	Weiblich, 24 Jahre, Diagnose: MS			Bilirubin⇑ Transamina-sen ⇑		

Trotz des scheinbaren Zusammenhangs dieser vier Fälle von Lebertoxizität mit dem Konsum von Noni-Fruchtsaft gibt es Grund zum Zweifel an dieser Ätiologie: So hat der erste Patient neben Noni-Fruchtsaft täglich 7 g eines chinesischen Krauts zu sich genommen, für das zuvor bereits eine lebertoxische Wirkung beschrieben wurde. In allen vier Fällen wurden Anthrachinone als der für die Leberschädigung verantwortliche Bestandteil des Noni-Saftes herangezogen. Zweifel an der ätiologischen Bedeutung der Anthrachinone in diesen Fällen rührt jedoch daher, dass eine wesentliche Verbesserung der Leberfunktionen bereits wenige Tage bis eine Woche nach Absetzen der Anthrachinone zu erwarten gewesen wäre (76). In allen vier Fällen wird ein Rückgang der Leberenzyme jedoch erst nach einem Zeitraum von mehreren Monaten beschrieben. Desweiteren ist es höchst fraglich, ob Anthrachinone in klinisch relevanter Menge und Struktur überhaupt in Noni-Fruchtsaft nachweisbar sind. So beschränkt sich die nachgewiesene Quantität der aus Noni-Saft isolierten Anthrachinone auf < 1 ppm. Die aus Noni-Fruchtsaft isolierten Anthrachinone zeigen somit keine toxikologische Relevanz (76). Auch der 4. Fall erscheint bei genauerer Analyse vielgestaltiger als zunächst angenommen. Die 24 jährige Patientin, bei der die Diagnose einer Multiplen Sklerose gestellt worden war, erhielt aufgrund dieser Autoimmunkrankheit eine medikamentöse Behandlung

mit Interferon β. Der Grund, warum dieser Umstand nicht als Ursache der Erhöhung der Leber-enzyme herangezogen wurde, war der, dass die Laborwerte auch nach Absetzten der Inter-ferone erhöht blieben. Es gilt jedoch als erwiesen, dass die Leberschädigung bis zu einigen Wochen nach Absetzen der Interferone nicht nur voranschreitet, sondern sogar noch ihr Maximum erreichen kann (76). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass sich der Konsum von Noni-Fruchtsaft weder mit dem Auftreten von Leberzellschädigungen noch mit anderen gesundheitlichen Beeinträchtigungen in einen gesicherten Zusammenhang bringen lässt. Ein weiteres Argument gegen eine hepatotoxische Wirkung von Nonisaft rührt daher, das die jährliche Menge an Nonisaft, die weltweit getrunken wird, bei über 60 Millionen Liter liegt. Dennoch gibt es nur diese vier Berichte und alle kommen aus einem regional eng begrenzten Gebiet.

2.6 Fragestellung

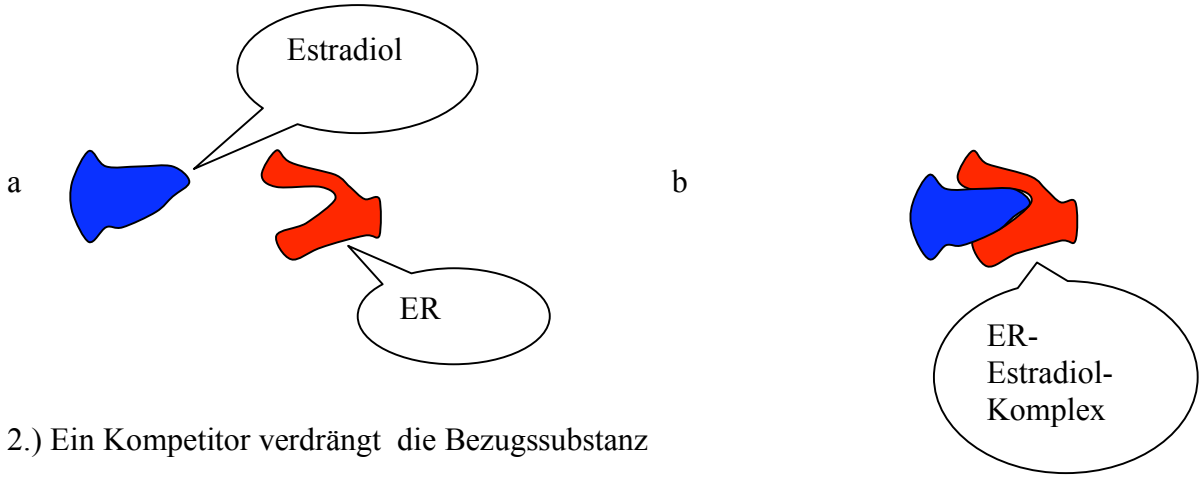
Das Ziel, pflanzliche Alternativen zum Einsatz der klassischen Hormonersatztherapie zu finden, machte es erforderlich, eine große Menge an Pflanzenmaterial in einem überschaubaren Zeitraum auf eine estrogene Wirkung zu testen. Dazu musste zunächst ein Testverfahren ausgewählt werden, welches über eine hohe Praktikabilität verfügt und sich daher als Screening-Verfahren eignet. Die Wahl fiel auf den Estrogenrezeptor-Bindungstest. Da die Konsumentinnen eines Fruchtsaftes auf der Basis der Früchte von *Morinda Citrifolia* über eine Reduktion bzw. Verzögerung postmenopausaler Erscheinungen und Beschwerden berichteten, testeten wir Extrakte dieser Pflanze zunächst im Estrogenrezeptor-Bindungstest. Um im Anschluß daran zu überprüfen, inwieweit die Bindung einer oder mehrerer Komponenten von *Morinda citrifolia* an einen der Estrogenrezeptoren in einer intrinsischen Aktivität resultiert, haben wir den AP-Assay eingesetzt. Geprüft werden sollten sowohl komplexe Pflanzenextrakte als auch isolierte Inhaltstoffe. Abschließend sollte eine Aussage getroffen werden, welche(r) der Inhaltsstoffe für die estrogenen Wirkungen verantwortlich sein könnte(n). Nachdem sich hierbei Widersprüche zwischen den Ergebnissen der beiden Testverfahren ergaben, rückte auch die Frage nach möglichen Artefaktwirkungen verschiedener Komponenten von *Morinda citrifolia* in Hinblick auf den Estrogenrezeptor-Bindungstest in den Fokus unseres Interesses.

3 Methoden

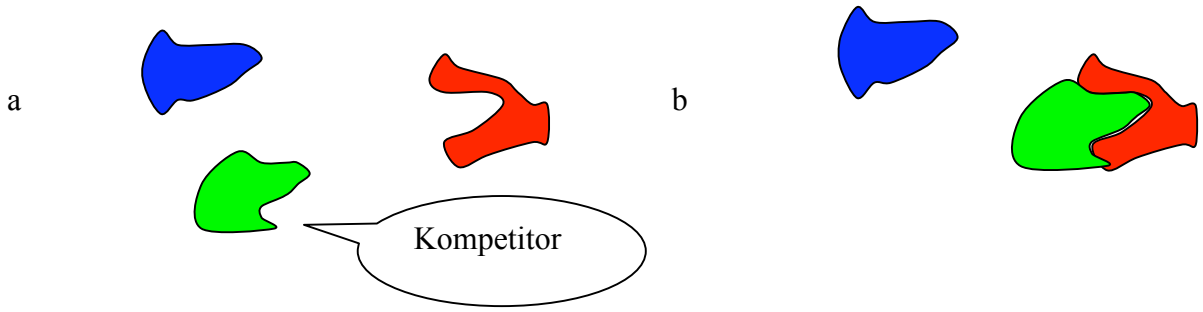
3.1 Estrogenrezeptor-Bindungstest

Dieser Agonist-Rezeptor-Verdrängungstest dient der Untersuchung der Affinität der zu testenden Substanz bzw. seiner Komponenten gegenüber einem spezifischen Rezeptor. Man bestimmt die Verdrängung des Estradiols durch eine estrogen wirksame Substanz, ausgedrückt durch Messung der Menge des im Rezeptor verbliebenen Tritium-markierten Estradiols (^3H-E_2). Dabei erfolgt diese innerhalb eines zellfreien Systems an den beiden isolierten menschlichen Estrogenrezeptoren ER-α und ER-β. Man misst die Radioaktivität, die nach der Verdrängung durch eine konkurrierende Substanz am Rezeptor verblieben ist und drückt diese in „Counts per minute“ (CPM) aus. Zur Abtrennung des Rezeptorkomplexes von nicht gebundenen Agonisten dient dessen Bindung an Hydroxylapatit. Je geringer die gemessene (Radio-)Aktivität ist, desto kleiner ist der Anteil an radioaktiv markiertem Estradiol, das am Rezeptor gebunden vorliegt, und umso höher ist die Affinität der eingesetzten Probe zu dem jeweiligen ER. Eine genaue Versuchsbeschreibung findet sich in Kapitel 4.3. Neben der Aussage, ob eine Substanz über eine bedeutsame Affinität zu den Estrogenrezeptoren verfügt, gestattet der Test auch die Möglichkeit der Quantifizierung der Affinitäten gegenüber den verschiedenen Estrogenrezeptoren. Diese ist insofern von Interesse, weil die Verteilung der Rezeptoren in den unterschiedlichen Organen voneinander abweicht. Substanzen mit vorwiegender Bindung an ERα oder ERβ haben ein unterschiedliches Wirkprofil (17). In Abbildung 7 ist der Ablauf des ER-Bindungstests vereinfacht schematisch dargestellt.

1.) Die Bezugssubstanz bindet an den ER.



2.) Ein Kompetitor verdrängt die Bezugssubstanz



3.) Nach den Waschungen verbleiben nur Liganden, die gebunden an ER und HAP vorliegen.

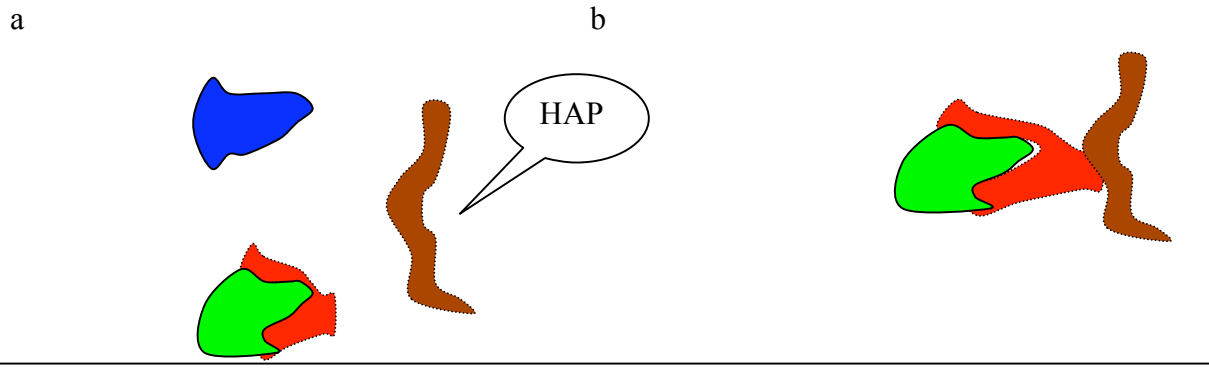


Abbildung 7: schematische Darstellung des Estrogenrezeptor-Bindungstests

3.2 Alkalischer Phosphatase-Assay

Phosphatasen sind hydrolytisch wirksame, Phosphorsäureester angreifende Enzyme. Es handelt sich um ubiquitär im Gewebe vorkommende Enzyme. Man kann Phosphatasen zum einen über den Ort ihrer Wirkung und zum anderen auch über die Einteilung in alkalische und saure Phosphatasen unterscheiden. Bezüglich ersterer sind die diagnostisch bedeutsamsten in der Leber und im Knochen, hier vor allem in den Osteoblasten, lokalisiert. Betrachtet man die Einteilung in alkalische und saure Phosphatasen, so findet man im Knochen eine spezifische alkalische Phosphatase, die aus verschiedenen Isoenzymen besteht. Diese ist als Produkt der Osteoblasten anzusehen und übt maßgeblichen Einfluss auf die Knochenmineralisation aus. Im Rahmen der Knochenmineralisation im weiblichen Organismus werden die Osteoblasten vor allem von Calcitonin und Estrogenen angeregt, Calcium in die Knochen einzulagern. Die Alkalische Phosphatase (AP, Orthophosphat-Monoester-Phosphohydrolase) katalysiert dabei die hydrolytische Spaltung organischer Phosphorsäureester zu Phosphat und dem entsprechenden Alkohol. Phosphat wird solange freigesetzt, bis das Löslichkeitsprodukt von Calciumphosphat überschritten ist. Basisches Calciumphosphat (Hydroxylapatit) schlägt sich auf der Knochenmatrix nieder. Bei dem hier beschriebenen Testverfahren macht man sich die Eigenschaften einer menschlichen Zelllinie mit dem Namen Ishikawa Zellen zunutze, die auf eine Stimulation durch Estradiol oder andere Agonisten mit einer Erhöhung der Aktivität der Alkalischen Phosphatase reagieren. Es handelt sich bei den Ishikawa Zellen um die Zelllinie eines gut differenzierten Adenokarzinoms des Endometriums. Die Stimulation der Alkalischen Phosphatase erfolgt dosisabhängig (22). Nach Hinzufügen von farblosem p-Nitrophenyl-phosphat (pNPP), eines zu diesem Enzym passenden Substrates (Chromogen), erfolgt die Abspaltung von dessen Phosphatrest durch die Alkalische Phosphatase und es entsteht p-Nitrophenol, welches schwach gelb ist. Diese Reaktion wird in einem Photometer verfolgt. Die Intensität der Farbe ist dabei proportional der Konzentration des entstandenen Nitro-phenols und damit auch der Konzentration des zu bestimmenden Agonisten in der Probe.

Für einen quantitativen Nachweis wird eine Serie mit bekannter Konzentration der Positiv-kontrolle (10^{-8} M Estradiol) durchgeführt, um eine Kalibrierungskurve für das gemessene Signal (optische Extinktion) zu erhalten.

3.3. (RP-) HPLC (analytisch und präparativ)

Der Unterschied zwischen analytischer und präparativer HPLC liegt insbesondere in der Zielsetzung. Während das Ziel einer analytischen HPLC-Trennung in der Gewinnung von qualitativen oder quantitativen Informationen über die untersuchte Probe liegt, ist es das der präparativen HPLC, die maximale Menge eines oder mehrerer Probenbestandteile in einer gewünschten Reinheit mit minimalem Zeitaufwand zu isolieren. Auch die Anforderungen an eine optimale Trennung unterscheiden sich dementsprechend. Während in der analytischen HPLC die Steigerung von Auflösung, Empfindlichkeit oder Präzision im Vordergrund stehen, sind bei der präparativen HPLC die Maximierung der Beladung, die Minimierung des Lösungsmittelverbrauches und die Optimierung der Fraktionierung die entscheidenden Parameter.

4 Experimenteller Teil

4.1 Gewinnung der Proben

Die reifen Früchte von *Morinda Citrifolia* L. wurden auf verschiedenen Inseln Französisch Polynesiens und der angrenzenden Inselwelt geerntet. Nach Entfernung des Samens und der Schale wurden die Früchte püriert und anschließend gefriergetrocknet. Es folgte die Herstellung von Hexan-Extrakten aus je 1 g getrocknetem Noni-Püree, welches mit 50 ml des Lösungsmittels bei 37° über Nacht extrahiert wurde. Im Anschluß wurde der Bodensatz entfernt und das Lösungsmittel verdampft, bevor der Rückstand in 1 ml Ethanol aufgelöst und die HPLC-Säule mit 20 µl dieser Lösung beschickt wurde. Es wurden Fraktionen im Abstand von einer Minute aufgenommen. Nachdem diese Trennung zehnmal wiederholt worden war, wurden die Fraktionen bis zum Eintrocknen abgedampt und die Überstände in 20 µl Ethanol gelöst. Diese wurden dann im Estrogenrezeptor-Bindungs- und dem AP-Test eingesetzt (25).

4.2 (RP-) HPLC (analytisch und präparativ)

Für die analytische HPLC verwendeten wir ein System der Firma Thermo Finnigan mit Chromquest-Software. Dieses besteht u.a. aus einem automatischen Probengeber, einer Flüssigkeitschromatografie-Pumpe sowie einem Diodenarray-Detektor. Fluß: 2 ml/min, Säule: RP-18, Länge 100 mm, Korngröße: 5µm. Für die präparative HPLC kam ein System der Firma Merck zum Einsatz. Dieses verfügt über eine RP-18 Säule mit einer Länge von 150 mm und einem Lösungsmittelfluß von 5 ml/Min sowie einen Detektor mit Festwellenlänge.

4.3 Estrogenrezeptor-Bindungstest

Der verwendete Verdrängungsassay stellt eine Modifikation der Hydroxylapatit-Methode dar, die von Murdoch et al. (46) beschrieben wurde. Hierbei kommen human rekombinante Estrogenrezeptoren der Subgruppen α und β zum Einsatz. Da diese jeweils in einer bestimmten Konzentration geliefert werden, erfolgt zunächst die Berechnung und Herstellung der nötigen Mengen an Rezeptor (1pmol/ 5 µl TEDG) und tritiummarkiertem Estradiol (1,2 pmol/ 5 µl Ethanol). Desweiteren sind folgende Lösungen zeitnah herzustellen:

- TEDG-DTT-Puffer, je ml TEDG-Puffer wird 1µl einer 1 M DTT-Stocklösung zugesetzt,
  - TEDG-Puffer, bestehend aus
    - 25 ml (10 mM Endkonzentration) Tris-Stock mit einer Stoffmenge von 200 mmol, wird auf einem pH-Wert von 7,5 eingestellt,
    - 10 ml (1,5 mM Endkonzentration) EDTA mit einer Stoffmenge von 75 mmol ,
    - 50 ml (10 % Endkonzentration) von 99 % (v/v) Glycerol,
    - mit Aqua deminerale aufgefüllt auf 500 ml.
  - DTT-Stocklösung mit einer Stoffmenge von 1 mol (kurz vor Gebrauch hinzugeben)
- HAP(im Kühlschrank lagern), bestehend aus
  - ca. 100 g Hydroxyapatite (Feuchtgewicht), sowie
  - 100 ml TEDG-Puffer.

Die Proben werden in den Konzentrationen 0,03; 0,1; 0,3; 0,2; 3,0 und 10,0 µg/ml eingesetzt. Sie liegen im Versuch 1:50 verdünnt vor. Damit entspricht dies den Endkonzentrationen 0,06; 0,2; 0,6; 2,0; 6,0 und 20 µg/ml. Der Versuch findet komplett bei $0^{O}C$ statt. Als Reaktionsgefäße dienen 2 ml Eppendorf-Gefäße. Je Reaktionsansatz wird eine Probe in den sechs genannten Konzentrationen, die Positivkontrolle DES im jeweiligen Lösungsmittel der Probe und als Negativkontrolle das Lösungsmittel der Probe in Dreifachbestimmung an einem Rezeptor getestet. In jedes Gefäß werden nacheinander pipettiert: 500 µl TEDG-Puffer, der 1 mM DTT enthält, 1 pmol humaner rekombinanter (isolierter) Estrogenrezeptor (ERα bzw. ERβ) in 5 µl TEDG-Puffer, 10 µl Probe, bzw. Positiv- (1µM DES) oder Negativkontrolle (Lösungsmittel) und 1,2 pmol ^{3}H-E_2 in 5 µl Ethanol. Die Reaktionsgefäße werden durch Schütteln durchmischt und über Nacht im Kühlschrank aufbewahrt. Zu jeder Probe wird anschließend 500 µl HAP (gut aufgeschüttelt) gegeben, ruhen gelassen und nach 5 min, 10 min und 15 min durch Kippen gemischt. Das HAP dient dazu, den ^{3}H-Liganden zu binden.

Die Gefäße werden daraufhin kurz bei 12000 U/min zentrifugiert und die Überstände abgegossen. Die entstehenden Pellets werden dreimal mit je 1 ml TEDG-DTT gewaschen. Nach jeder Waschung lässt man die Gefäße 5 min ruhen, zentrifugiert kurz (ca. 4000-5000 U/min) und gießt den Überstand ab. Nach dem dritten Waschgang wird 1 ml 1N HCl hinzugegeben, geschüttelt (Vortex) und bei 12000 U/min für 30 Sekunden stark abzentrifugiert. Die Überstände werden in Gefäße für den Szintillationscocktail (Ready Flow III, Liquid Scintillation Cocktail, Beckmann) überführt und im Liquid Counter (Beckmann) mit einem ^{3}H-Programm ausgezählt. Das Ergebnis wird in CPM (counts per minute) ausgedrückt. Die Analyse erfolgt grafisch, indem die EC_{50} aus der Dosiswirkungskurve durch Fällen der Lote abgelesen wird (25).

4.4 Alkalischer Phosphatase-Assay

Ein Aliquot von ca. 10^4 Zellen wird ausplattiert und mit DMEM/F12-Medium übergossen. Nach 24 Stunden findet ein Wechsel in ein DMEM/F12-Medium statt, welchem FBS (Fetal Bovine Serum, Estradiol-reduziert), zugesetzt wurde. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt ein Wechsel in ein DMEM/F12-Medium ohne Serum und die Zellen werden mit der Testsubstanz und einer Positivkontrolle (10^{-8}-M Estradiol) behandelt. Das Medium wird nun entfernt und die alkalische Pufferlösung mit 25 µl einer alkalischen Lösung von p-Nitrophenylphosphat hinzugefügt. Die Alkalische Phosphatase spaltet den Phosphatrest ab, wobei eine bathochrome Farbverschiebung auftritt. Das entstandene p-Nitrophenol lässt sich photometrisch bei 405 nm bestimmen (25). Jetzt werden die Zellen für 10-15 Minuten inkubiert. Nach Ablauf der Zeit werden 100 µl 0,05 M NaOH zu jedem Well hinzugefügt und die optische Dichte bei 405 nm gemessen. Um aus der so gemessenen Alkalischen Phosphatase-Aktivität die "spezifische" Alkalische Phosphatase-Aktivität bestimmen zu können, muss diese auf die Anzahl der Ishikawa-Zellen bezogen werden, die für die Bildung der Alkalischen Phosphatase verantwortlich sind. Dies erfolgt anhand deren DNA-Konzentration, die in der Einheit µg DNA/ml angegeben wird. Hierzu erfolgt zunächst die Aufstellung einer Eichkurve (Gerade), indem die Extinktionswerte, die an den definierten DNA-Standardlösungen bekannter Konzentrationen ermittelt wurden, in Abhängigkeit von dieser nach linearer Regression in einem Koordinatendiagramm aufgetragen werden. Anhand dieser Eichgeraden kann man über die gemessene Extinktion einer Lösung deren unbekannte Konzentration bestimmen. Im Folgenden ist beispielhaft der DNA-Gehalt einer

Kalibrationsmessung gegen die gemessenen Extinktionswerte in einem Koordinatensystem aufgetragen:

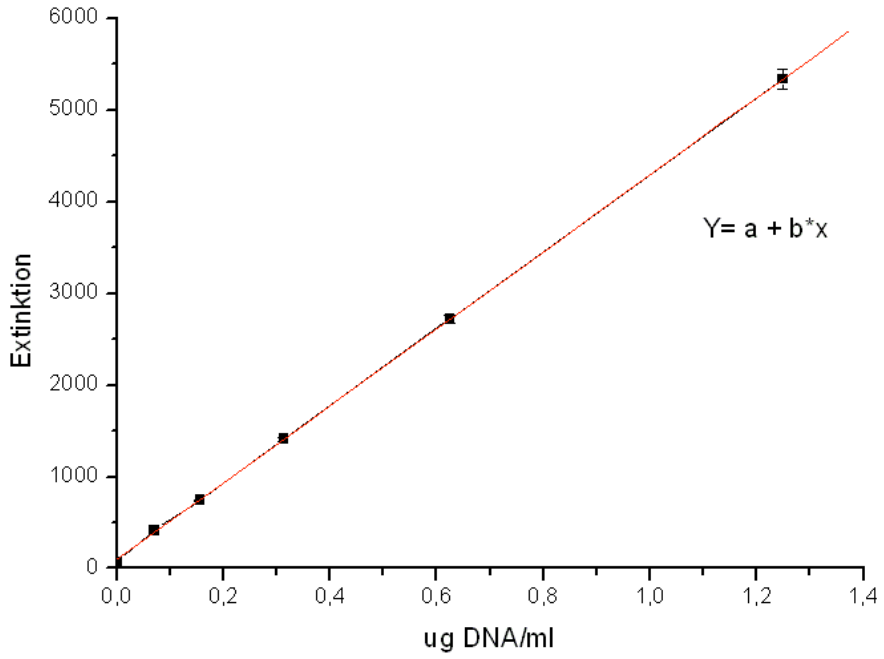


Abbildung 8: Kalibrationsgerade

5 Ergebnisse

Ziel dieser Arbeit war es, den ER-Bindungstest in Kombination mit dem AP-Assay auf ihre Tauglichkeit zur Findung von pflanzlichen Alternativen zur klassischen Hormonsubstitutionstherapie in der Postmenopause zu testen. Es zeigte sich dabei, dass die Ergebnisse der genannten Testverfahren teilweise zu gegensätzlichen Resultaten führten. Dabei sollten komplexe Pflanzenextrakte von *Morinda Citrifolia* L. auf ihre estrogene Wirkung untersucht werden. Diese Gemische lagen als Hexan-Extrakt eines Pürees von gefriergetrockneten reifen Noni-Früchten vor. Mit dem ER-Bindungstest wurde der oben angegebene Hexan-Extrakt auf seine Fähigkeit untersucht, Estrogen von den Bindungsstellen der menschlichen Estrogenrezeptoren zu verdrängen. Hierbei zeigte sich bei Anwesenheit des Extraktes eine dosisabhängige Verdrängung des Estradiols. Wie aus den Dosis-Wirkungskurven der beiden Estrogenrezeptoren α und β hervorgeht, wiesen die Extraktinhaltsstoffe eine stärkere Affinität gegenüber letzterem auf (vgl. Abb. 9).

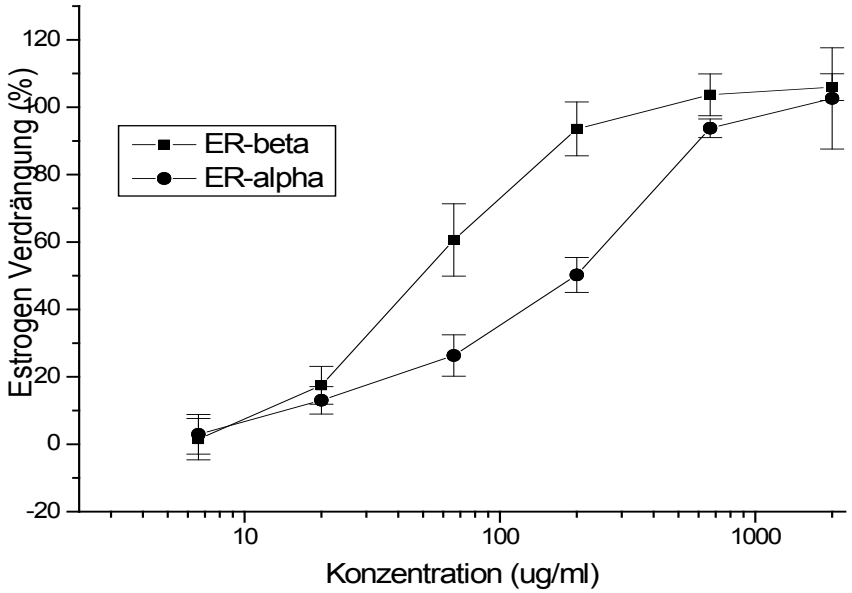


Abb. 9: ER-Bindungstest eines Hexan-Extraktes des Noni-Fruchtpürees.

Da der ER-Bindungstest keine Möglichkeit bietet, zwischen agonistischer und antagonistischer Wirkung zu unterscheiden, untersuchten wir mit Hilfe des AP-Assays die intrinsische Aktivität und fanden einen dosisabhängigen Anstieg der Aktivität der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa Zellen ab Konzentrationen von 100 µg/ml eines Hexan-Extraktes

von gefriergtrocknetem Noni-Fruchtpüree. Dies deutete auf eine intrinsische Aktivität des Extraktes hin (vgl. Abb. 10).

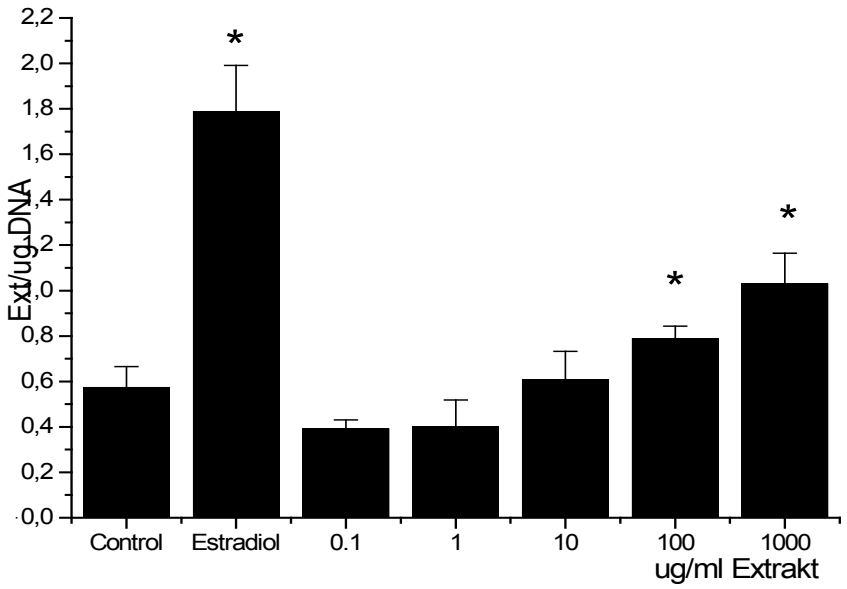


Abb. 10: Induktion der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Zellen.

Mit dem Ziel, die im Noni-Fruchtpüree estrogen wirksame Komponente zu identifizieren, erfolgten wiederholte Läufe des Hexan-Extraktes auf einer Reversed-Phase-(RP)-Chromatographiesäule, wobei die Fraktionen in Intervallen von jeweils einer Minute gesammelt wurden. Als Resultat erhielten wir 40 Fraktionen, die im ER-Bindungstest untersucht wurden. Wie in Abb. 11 zu sehen ist, wies die Fraktion mit einer Retentionszeit von 18 min annähernd die gesamte estrogene Aktivität auf.

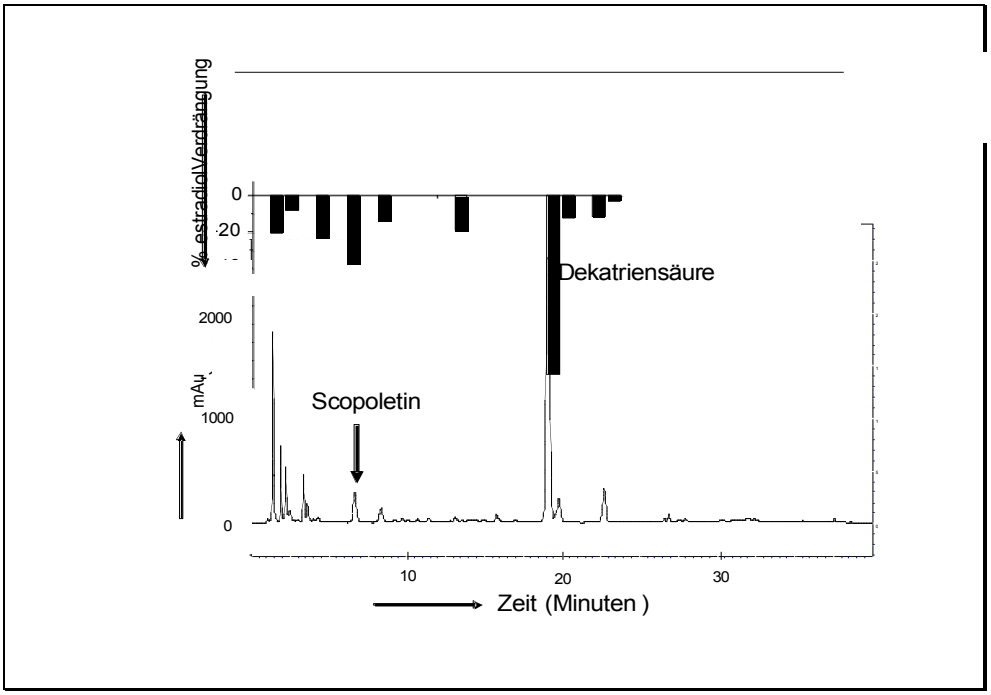


Abb. 11: obere Darstellung: Aktivität der Fraktionen eines Nonipüree-Hexan-Extraktes im Estradiol-Verdrängungstest.
Untere Darstellung: HPLC-Chromatogramm des Nonipüree-Hexan-Extraktes

Es stellte sich heraus, dass diese Fraktion entsprechend dem HPLC-Chromatogramm des Hexan-Extraktes nur eine Komponente enthielt. Diese Komponente repräsentierte den größten Peak in dem Chromatogramm des Extraktes. Zur Identifikation dieser aktiven Komponente wurde diese mehrfach mittels präparativer HPLC isoliert und spektroskopisch charakterisiert. Hierzu wurden 100 g gefriergetrocknetes Noni-Fruchtpüree extrahiert und die HPLC-Methode zuvor optimiert. Die Struktur dieser Komponente wurde aus spektroskopischen Daten gewonnen, wobei das Massenspektrum sowie 1- und 2-D NMR Spektren ausgewertet wurden. Die Auswertung der spektroskopischen Daten führte zur Identifikation von (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure (siehe Abbildung 12). Diese Auswertung wurde von Frau Dr. Simla Basar (Chemikerin) aus der Arbeitsgruppe von Prof. Westendorf durchgeführt.

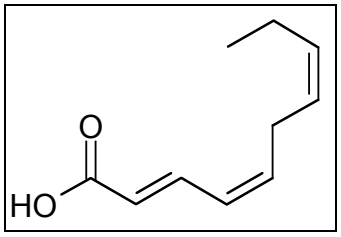


Abbildung 12: Strukturformel der (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure (DTA)

Nach Isolierung und Aufreinigung wurde die aktive Komponente im ER-Bindungstest untersucht. Wie schon beim Extrakt des Gesamt-Pürees beobachtet, wurde 17β-Estradiol dosisabhängig verdrängt (vgl. Abb. 13).

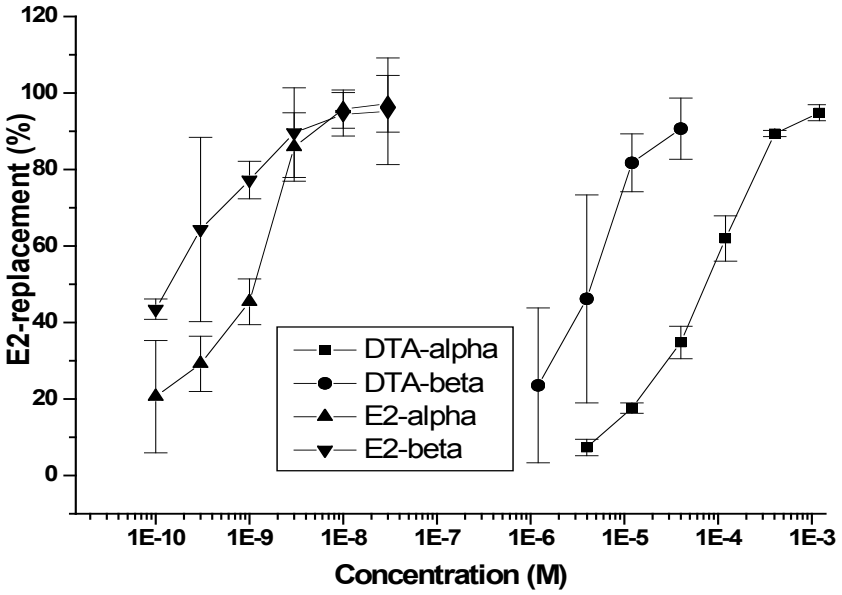


Abb. 13: ER-Bindungstest von (2E,4Z,7Z)-Dekatriensäure und Estradiol

Die relativen Affinitäten, die sich aus dem Quotienten der EC_{50}-Werte der Dekatriensäure und derjenigen des Estradiols ergaben, sind für ER-α = $6x10^4$ bzw. für ER-β = $3,2x10^4$. Diese Werte entsprechen denen der meisten Phytoestrogene (75). Wir untersuchten die isolierte (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure weiterhin im AP-Assay, um ihre intrinsische Aktivität zu bestimmen. Dieser Test verlief entgegen den Erwartungen negativ (vgl. Abb. 14). Im Gegensatz zum ER-Bindungstest zeigte sich keine estrogene Wirkung. Es ist daher denkbar, dass die scheinbare Verdrängung des Tritium-markierten Estradiols von den Estrogenrezeptoren ein Artefakt darstellt. Die Überprüfung dieser These erforderte weitere Untersuchungen.

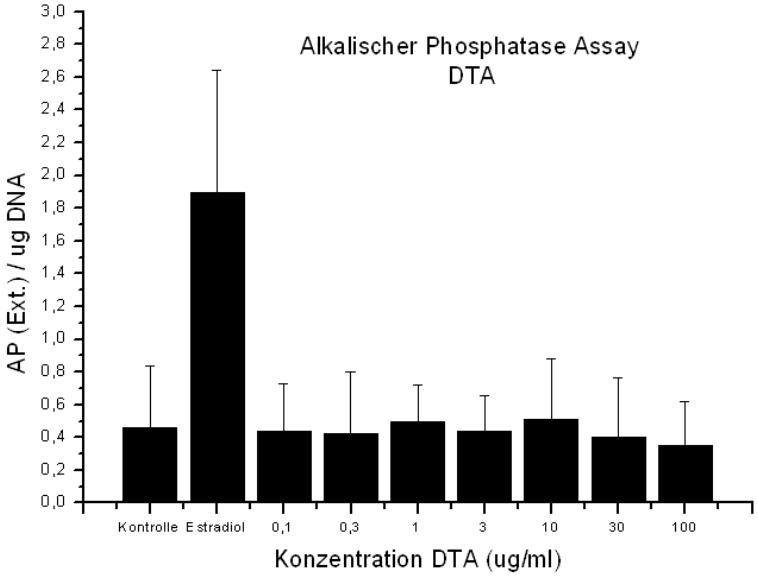


Abb. 14: Induktion der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Zellen durch (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure

5.1 Fettsäuren

Da die (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure strukturell große Ähnlichkeit mit den essentiellen ungesättigten Fettsäure aufwies, interessierte uns die Frage, ob auch diese chemisch verwandten Substanzen, die stets in unserem Körper vorkommen, eine positive Reaktion in den eingesetzten Testverfahren ergeben. Wir wiederholten daher sowohl den ER-Bindungstest als auch den AP-Assay mit weiteren Fettsäuren und wählten dazu solche mit Kettenlängen von 18 bis 20 Kohlenstoffatomen aus, die in Lebensmitteln weit verbreitet sind. So untersuchten wir 4 verschiedene Derivate mit 18 Kohlenstoffatomen, die sich in der Anzahl ihrer Doppelbindungen voneinander unterscheiden, sowie eine gesättigte Fettsäure, die Stearinsäure (siehe Abb. 15). Alle Fettsäuren, die mindestens eine Doppelbindung enthielten, verliefen im ER-Bindungstest positiv. Die EC_{50}-Werte lagen außerdem alle dicht beieinander (siehe Tabelle 7). Im AP-Assay zeigten sie aber keine Induktion.

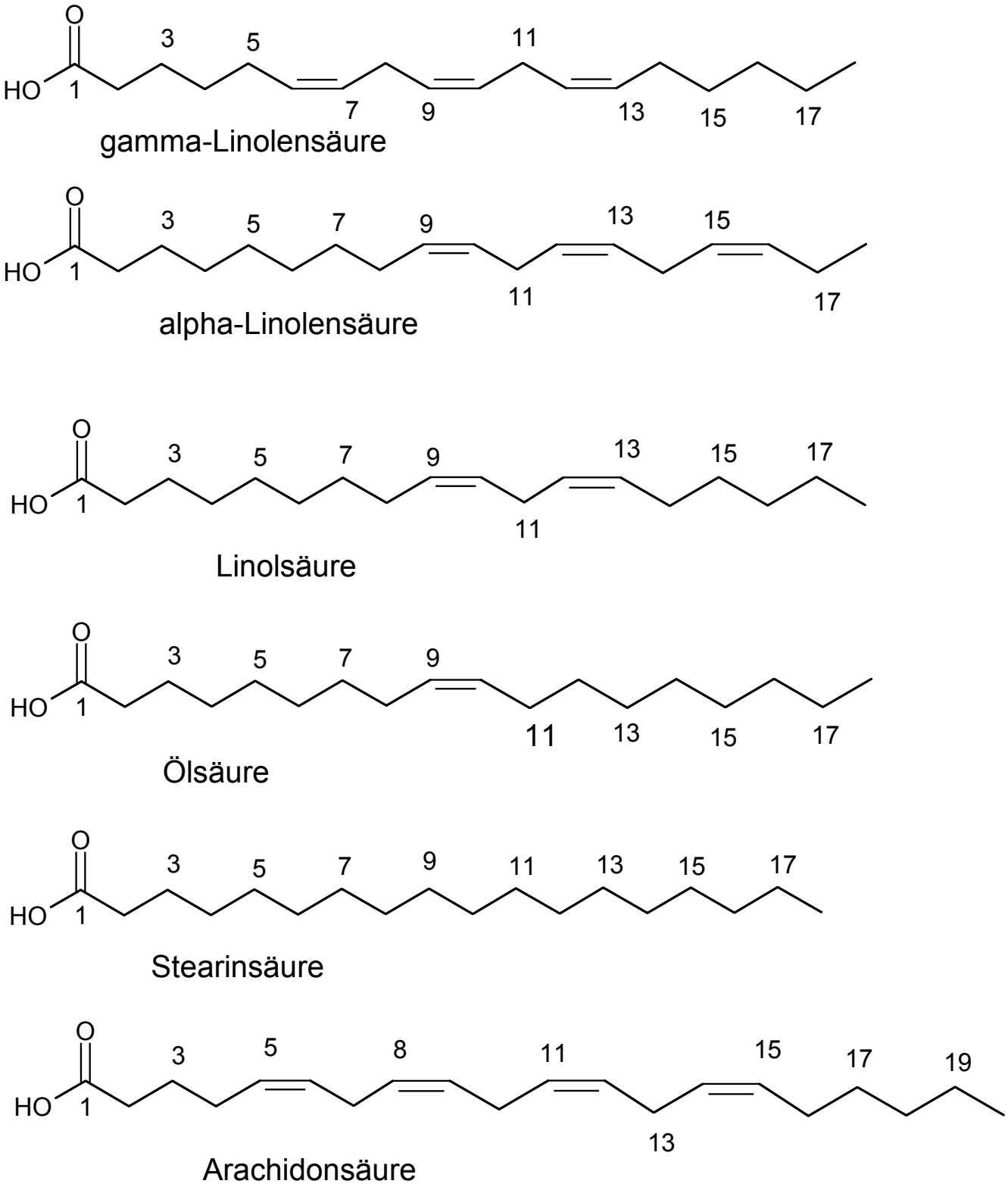


Abb. 15: Chemische Formeln der untersuchten Fettsäuren

Bei der Untersuchung der Arachidonsäure im ER-Bindungstest zeigte sich eine dosisabhängige Verdrängung des Estradiols von beiden Estrogenrezeptoren, wobei eine größere Affinität zum ER-β imponierte. Die EC_{50}-Werte lagen bei $3{,}15 \times 10^{-6}$ M für ER-α bzw. $8{,}21 \times 10^{-7}$ M für ER-β. Der Alkalische Phosphatase-Assay zeigte jedoch über allen Konzentrationen bis 10 µg/ml (letzter Messwert) keine gegenüber der Kontrolle verstärkte Aktivität.

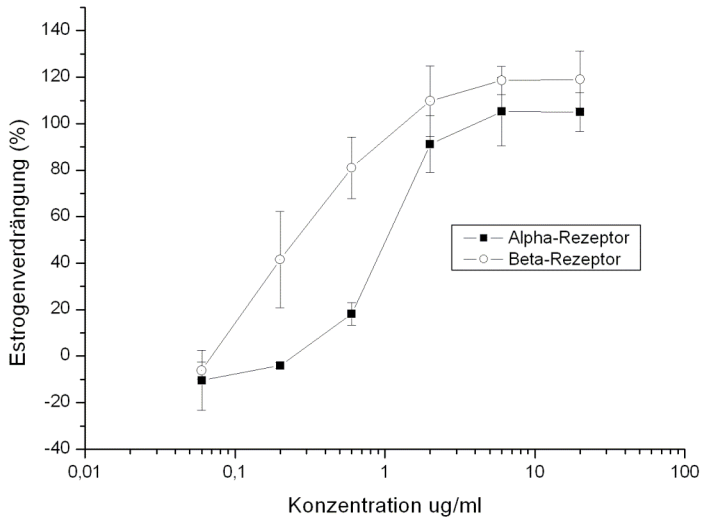


Abb. 16: ER-Bindungstest einer Lösung von Arachidonsäure in Ethanol

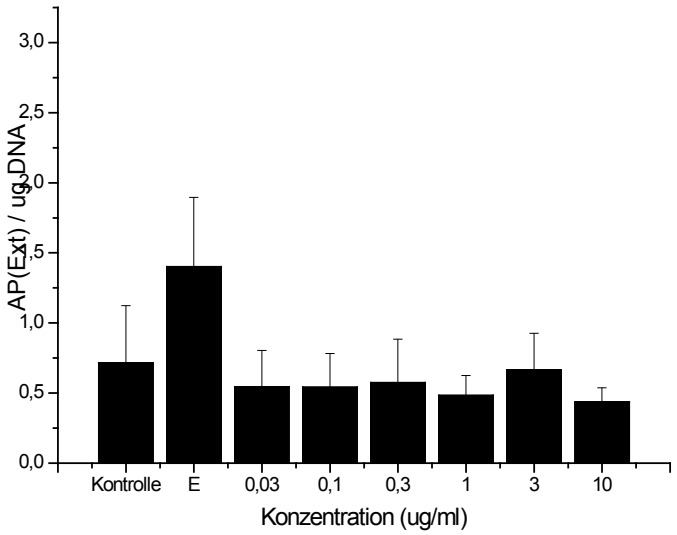


Abb. 17: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen duch Arachidonsäure.

Die Strukturformel der Linolensäure umfasst bei 18 Kohlenstoffatomen 3 Doppelbindungen. Getestet wurden sowohl die α- als auch die γ-Linolensäure. Während der ER-Bindungstest wiederum einen dosisabhängigen Anstieg der Verdrängung zeigte, differierten die gemessenen Werte für ER-α und ER-β nur unwesentlich, so dass keine wesentliche Differenz der Affinitäten für die beiden Estrogenrezeptoren gefunden wurde. Im AP-Assay zeigte sich dagegen wiederum keine deutliche Induktion. Auch die anderen getesteten ungesättigten Fettsäuren erbrachten ähnliche Ergebnisse, wobei sich wesentliche Unterschiede lediglich im Verhältnis der Affinitäten zu den verschiedenen Estrogenrezeptoren zeigten. Die jeweiligen EC_{50}-Werte sind nachfolgend in
Tabelle 7 dargestellt.

Fettsäure	EC_{50} [mol/l]	
	ER-Alpha	**ER-Beta**
Arachidonsäure	$3{,}15 \times 10^{-6}$	$8{,}21 \times 10^{-7}$
Alpha-Linolensäure	$7{,}29 \times 10^{-6}$	$7{,}87 \times 10^{-6}$
Gamma-Linolensäure	$7{,}51 \times 10^{-6}$	$8{,}98 \times 10^{-7}$
Linolsäure	$8{,}9 \times 10^{-6}$	$5{,}3 \times 10^{-6}$
Ölsäure	$2{,}62 \times 10^{-6}$	$5{,}66 \times 10^{-7}$
Stearinsäure	wurde nicht erreicht	$2{,}74 \times 10^{-6}$

Tabelle 7: Affinitäten der Fettsäuren zu den Estrogenrezeptoren

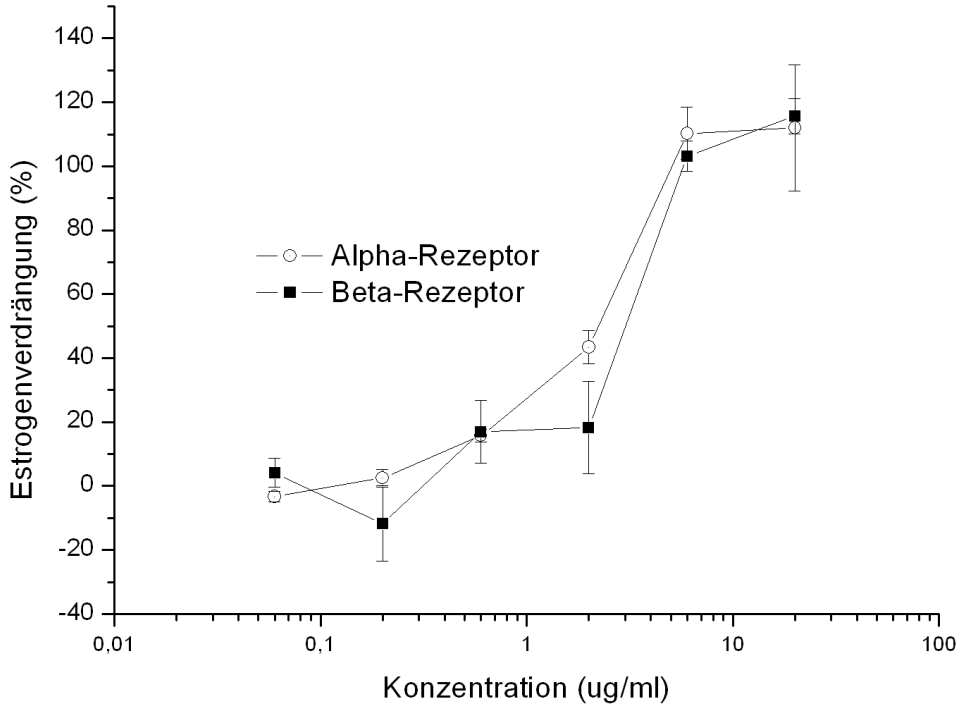


Abb. 18: ER-Bindungstest einer Lösung von α-Linolensäure in Ethanol

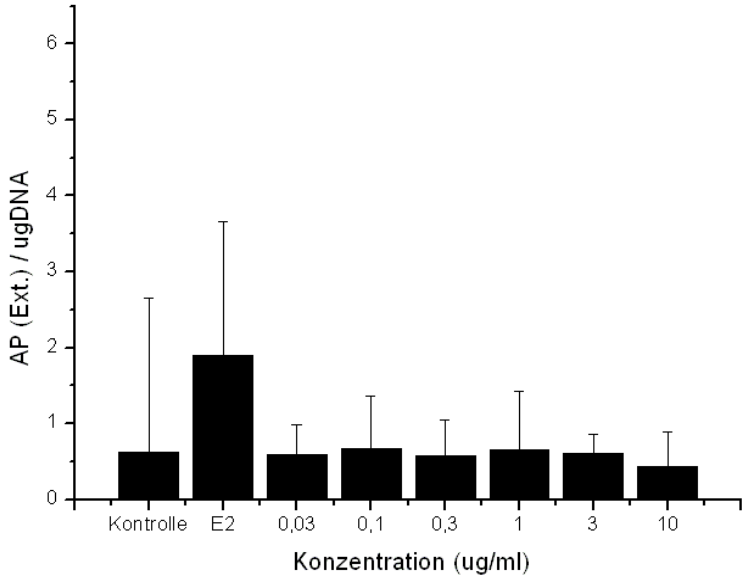


Abb. 19: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen durch α-Linolensäure

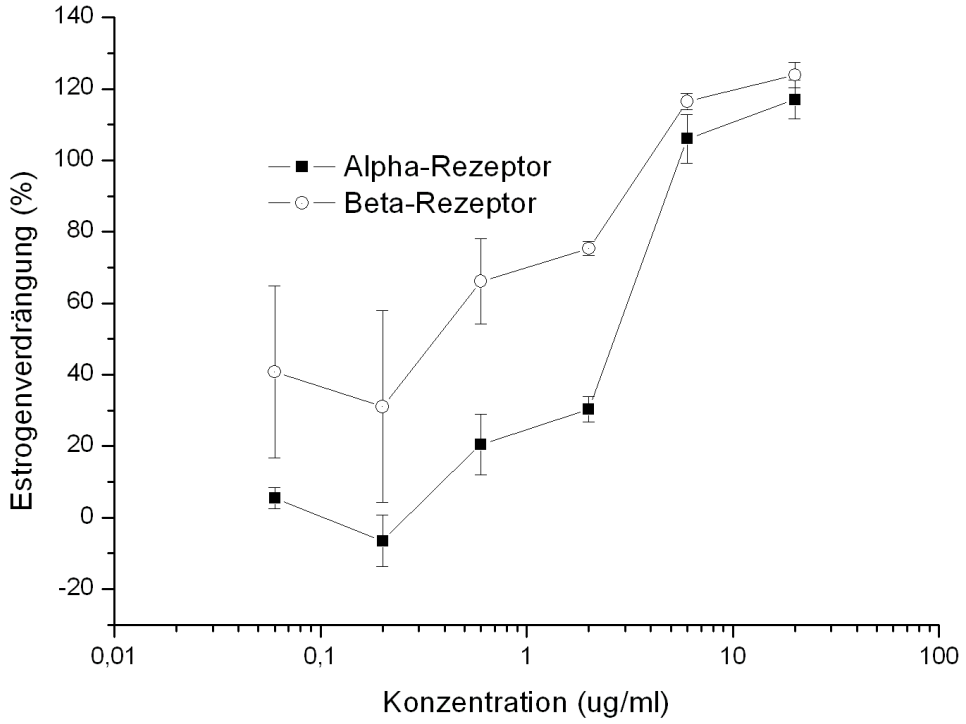


Abb. 20: ER-Bindungstest einer Lösung von γ-Linolensäure in Ethanol

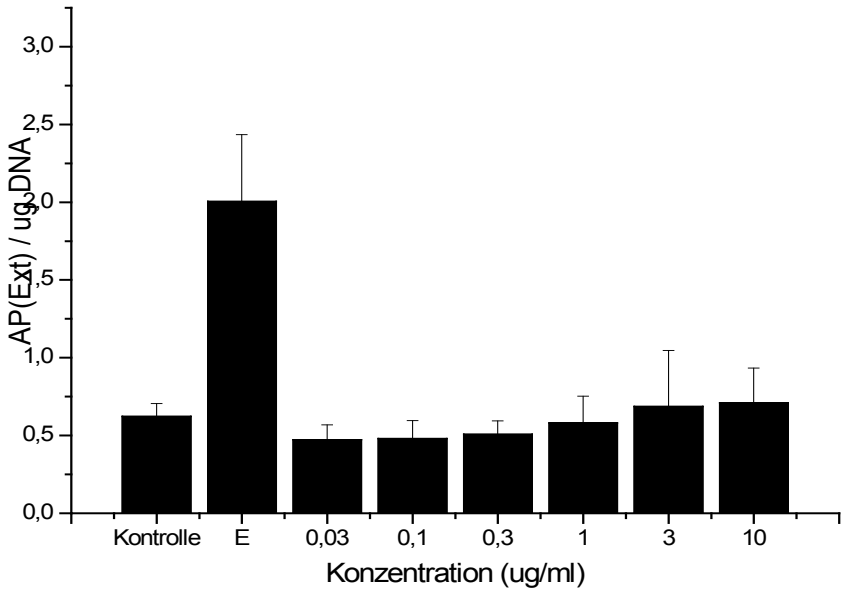


Abb. 21: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen durch γ-Linolensäure

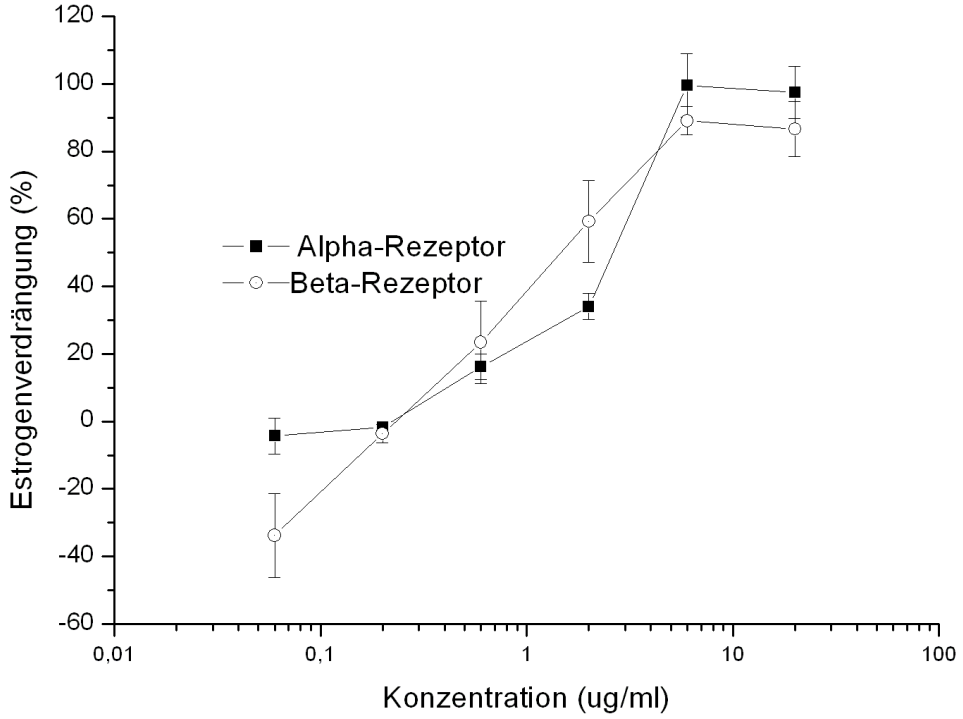


Abb. 22: ER-Bindungstest einer ethanolische Lösung von Linoläure

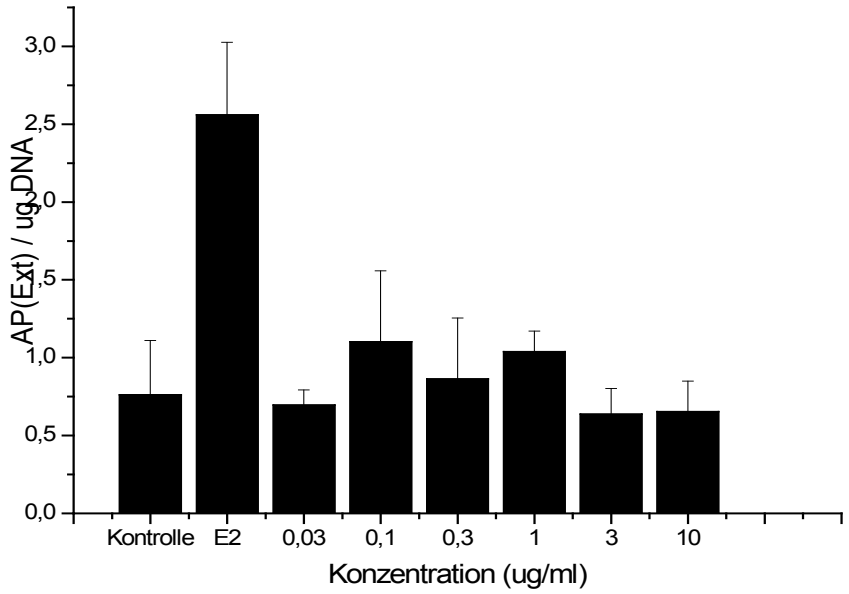


Abb. 23: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen durch Linolsäure

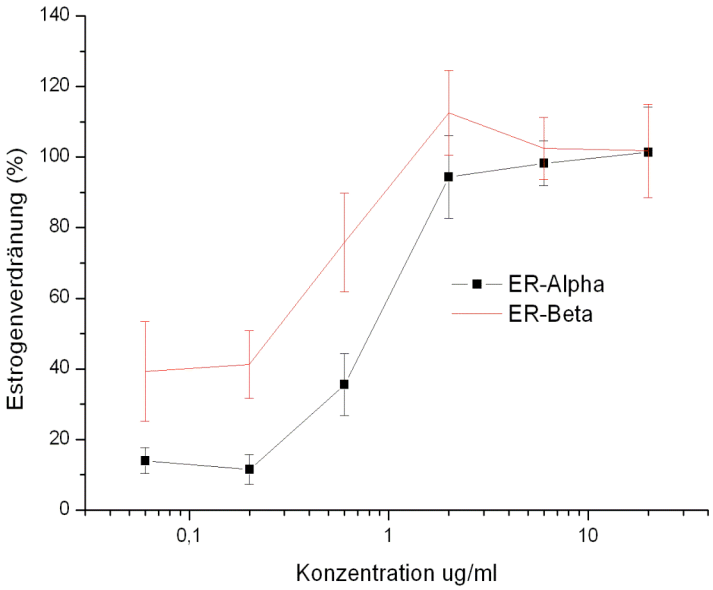


Abb. 24: ER-Bindungstest einer ethanolischen Lösung von Ölsäure

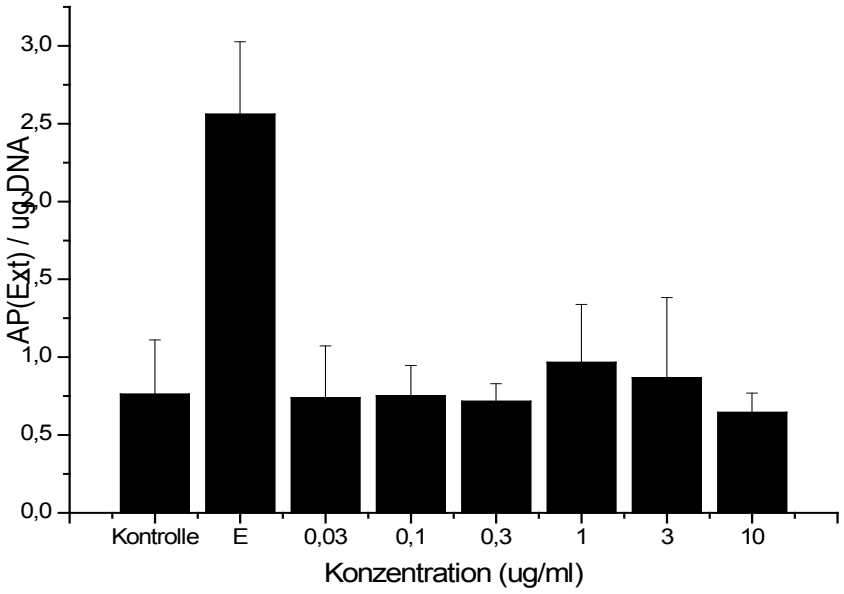


Abb. 25: AP-Test einer ethanolischen Lösung der Ölsäure

Die Stearinsäure, die einzige getestete Fettsäure ohne Doppelbindungen (gesättigt), wies im ER-Bindungstest nahezu keine Affinität zu ER-α auf, während für ER-β ein EC_{50}-Wert von $2{,}74 \times 10^{-6}$ mol/l imponierte.

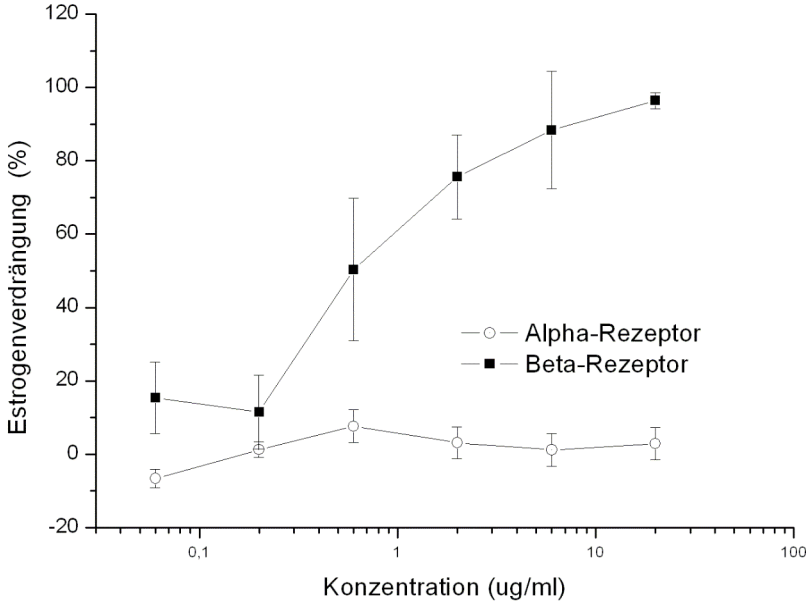


Abb. 26: ER-Bindungstest einer ethanolischen Lösung der Stearinsäure

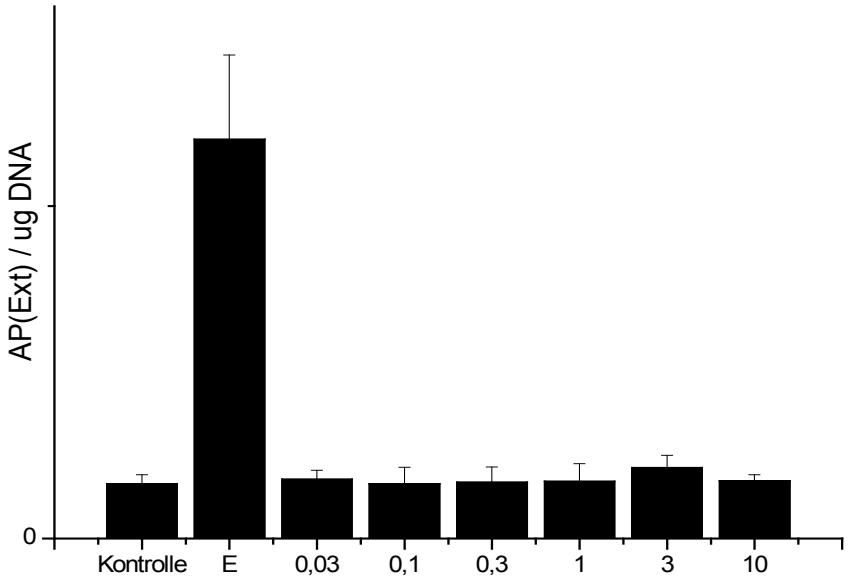


Abb. 27: AP-Test einer ethanolischen Lösung der Stearinsäure

5.2 Weitere Kandidaten für estrogene Wirkungen in Nonifrüchten:

5.2.1 Scopoletin

Bei Betrachtung von Abb. 11 (s.o.) fällt auf, dass die Fraktion, die in der HPLC zusammen mit dem Inhaltsstoff Scopoletin eluiert, ebenfalls eine gewisse Aktivität im ER-Bindungstest aufweist. Aus diesem Grund haben wir die Substanz Scopoletin, die im Handel erhältlich ist, in unsere Untersuchungen einbezogen. Wie aus Abb. 28 hervorgeht, ist die Affinität von Scopoletin zum ER-α nur relativ schwach ausgeprägt. Die mit ER-β gewonnene Kurve sinkt erst weit in den negativen Bereich ab, um dann anzusteigen und schließlich wieder abzufallen. Bei Dosen > 0,3 µg/ml erfolgte aber eine sichtbare Verdrängung von rad. Estradiol vom Rezeptor. Die Untersuchung im AP-Assay in Ishikawa-Zellen zeigt dagegen eine deutliche Aktivität (Abb. 29). Dies war sehr verwunderlich, da normalerweise der ER-Bindungstest empfindlicher reagiert als der AP-Test. Um sicher zu gehen, dass die Aktivität in diesem Test ER-vermittelt ist, haben wir den Test wiederholt und einen kompetitiven Antagonisten des Estradiols (ICI-182780) zugesetzt (Abb. 30). Durch den Antagonisten wurde die Induktion der AP fast komplett unterdrückt.

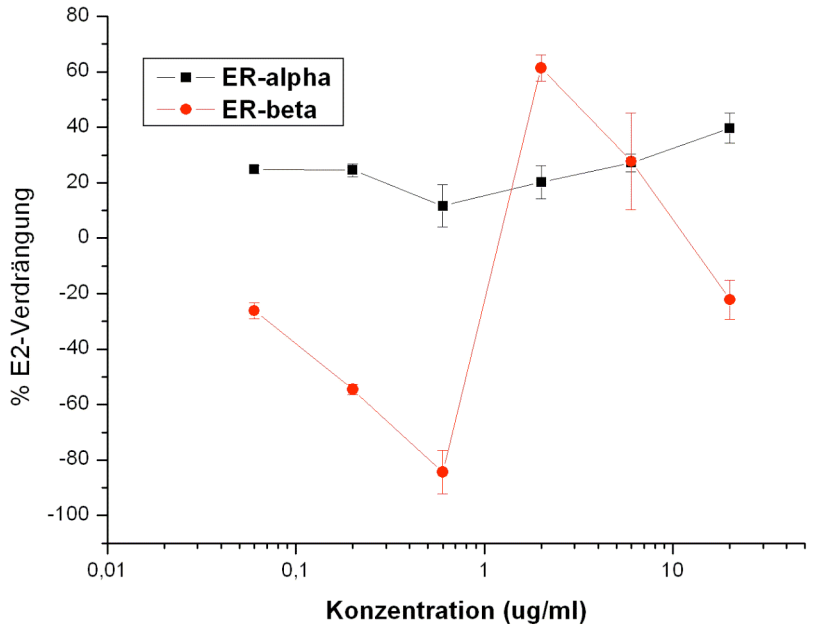


Abb. 28: ER-Bindungstest einer ethanolische Lösung von Scopoletin

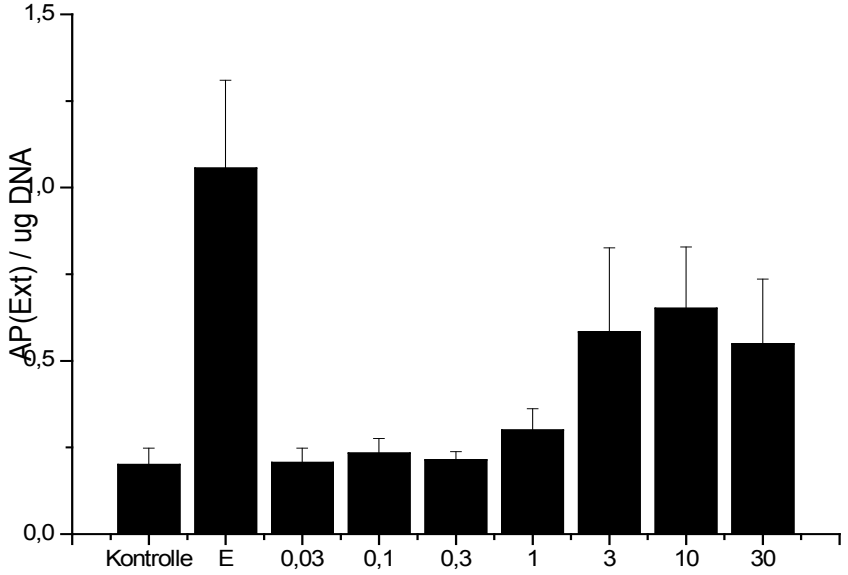


Abb. 29: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen durch Scopoletin

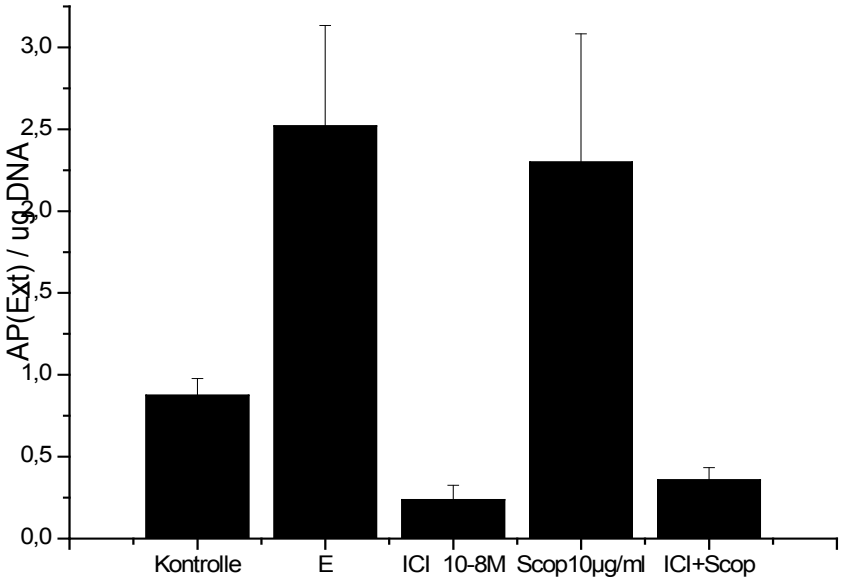


Abb. 30: Induktion der AP in Ishikawa-Zellen durch Scopoletin und Scopoletin + ICI

5.2.2 Ursolsäure

Die Ursolsäure gehört zu den Sapogeninen. Es sind zahlreiche pharmakologische Eigenschaften dieser Substanz beschrieben worden. Besonders hervorzuheben sind die entzündungshemmenden Eigenschaften. Die Verbindung wurde auch in der Frucht von *Morinda citrifolia* L. nachgewiesen (74) und ist möglicherweise an deren entzündungshemmenden Wirkungen beteiligt. Der ER-Bindungstest ergab ein unerwartetes Bild, da die Menge an radioaktiv markiertem Estradiol mit steigender Konzentration der Ursolsäure zunahm. Zu erwarten wäre nämlich vielmehr gewesen, dass entsprechend der Dosis-Wirkungs-Kurve mit zunehmender Konzentration einer estrogen wirksamen Substanz die Menge an radioaktivem Estradiol abnimmt. Dementsprechend erhielten wir im ER-Bindungstest scheinbar negative Verdrängungswerte. Besonders ausgeprägt war dieser Effekt beim ER-β (Abb. 31). Um mehr Licht in dieses Phänomen zu bringen, wiederholten wir den Test in Abwesenheit von Estrogenrezeptoren. Wie aus Abb. 32 hervorgeht, fand dennoch eine Bindung von radioaktivem Estradiol an Hydroxylapatit statt.

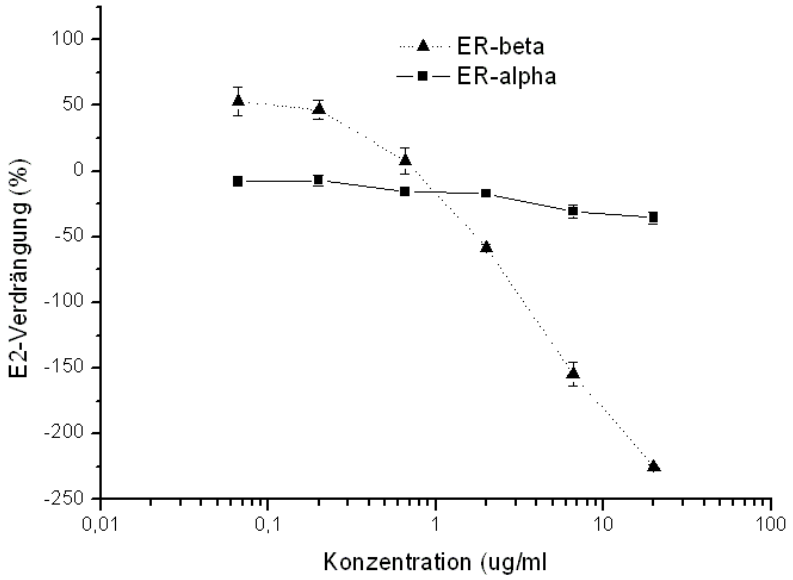


Abb. 31: ER-Bindungstest einer ethanolischen Lösung von Ursolsäure

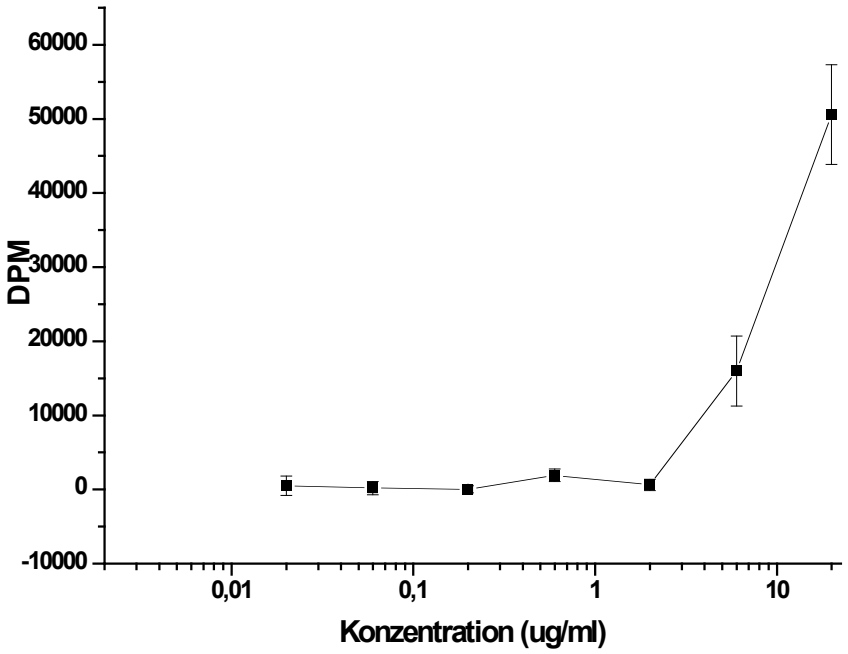


Abb. 32: Bindung von 3-H-Östradiol an Hydroxylapatit in Gegenwart von Ursolsäure und in Abwesenheit von Estrogenrezeptoren

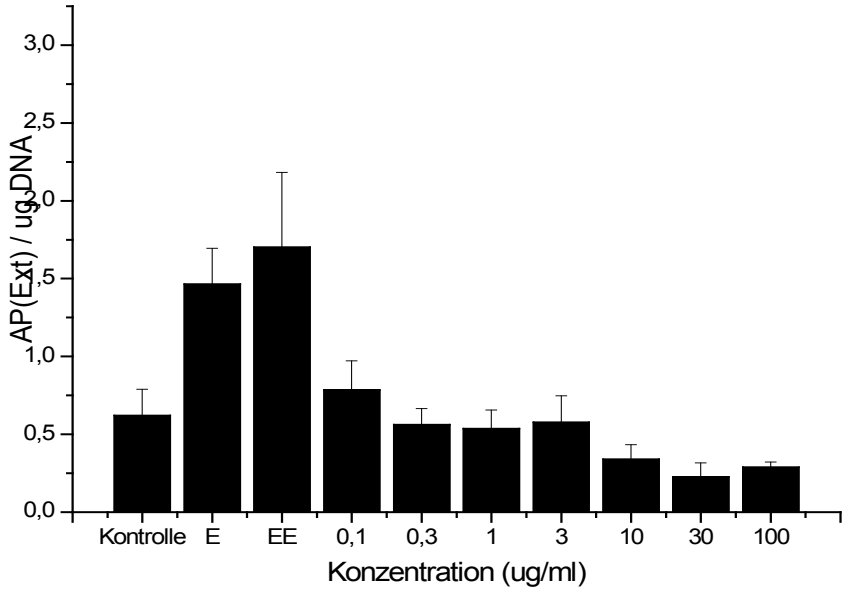


Abb. 33: Induktion von AP in Ishikawa Zellen durch Ursolsäure

Die Überprüfung der Ursolsäure im AP-Test in Ishikawa Zellen ergab ein negatives Bild. Mit steigender Konzentration (>3µg/ml) sank die Aktivität sogar unter den Kontrollwert.

5.2.3 Flavonoide: Kaempferol und Quercetin

Als weitere mögliche Kandidaten einer estrogenen Wirkung von *Morinda Citrifolia* L. kamen Flavonoide in Betracht. In analytischen Arbeiten, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Westendorf durchgeführt wurden, sind die beiden Flavonoide Quercetin und Kämpferol (chem. Formeln siehe Abbildung 34) als Bestandteile von Nonifrüchten und –blättern nachgewiesen worden (persönliche Mitteilung von Prof. Westendorf). Besonders reich an Quercetin war die unlösliche Fraktion des Nonipürees, welches als Bodensatz in Nonisaft vorkommt, wenn dieser aus Püree ohne Filtration hergestellt wird. Daher haben wir diese Verbindungen, die in reiner Form im Handel erhältlich sind, in die Untersuchungen einbezogen. Sie unterscheiden sich lediglich hinsichtlich einer einzigen OH-Gruppe. In Tabelle 8 sind die EC_{50}-Werte des ER-Bindungstests für Kaempferol und Quercetin gegenübergestellt:

Tabelle 8: EC-50- Werte von Kaempferol und Quercetin

Estrogenrezeptor	EC-50 [mol/l)	
	Kaempferol	Quercetin
ER-α	$3{,}5 \times 10^{-7}$	Ca. $3{,}3 \times 10^{-6}$
ER-β	$3{,}5 \times 10^{-9}$	$1{,}2 \times 10^{-7}$

Wie aus Abb. 35 ersichtlich ist, geht die Estradiol-Verdrängung von ERα bei Konzentrationen über 0,2 µg/ml (Kämpferol) bzw. 6 µg/ml (Quercetin) wieder zurück. Dies könnte an der Bildung von Mizellen liegen, wie im Falle der Ursolsäure beschrieben. Für ER-α wird eine 100%-ige Verdrängung des Estradiols nicht erreicht, während dies bei ERβ der Fall ist.

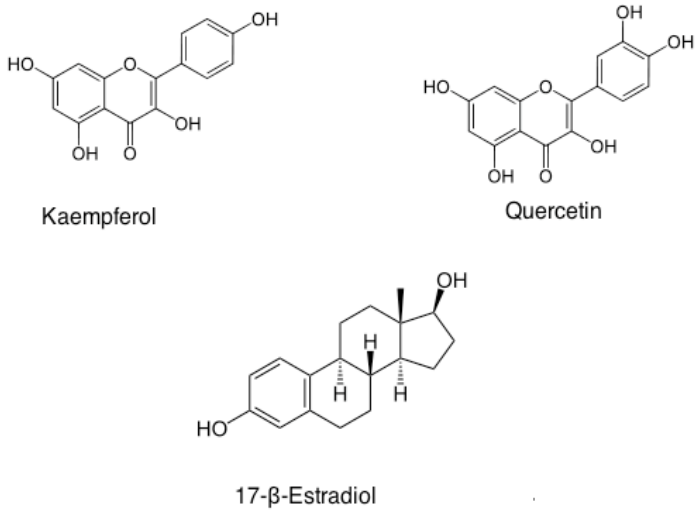


Abbildung 34: Strukturformeln der Flavonoide Kämpferol und Quercetin

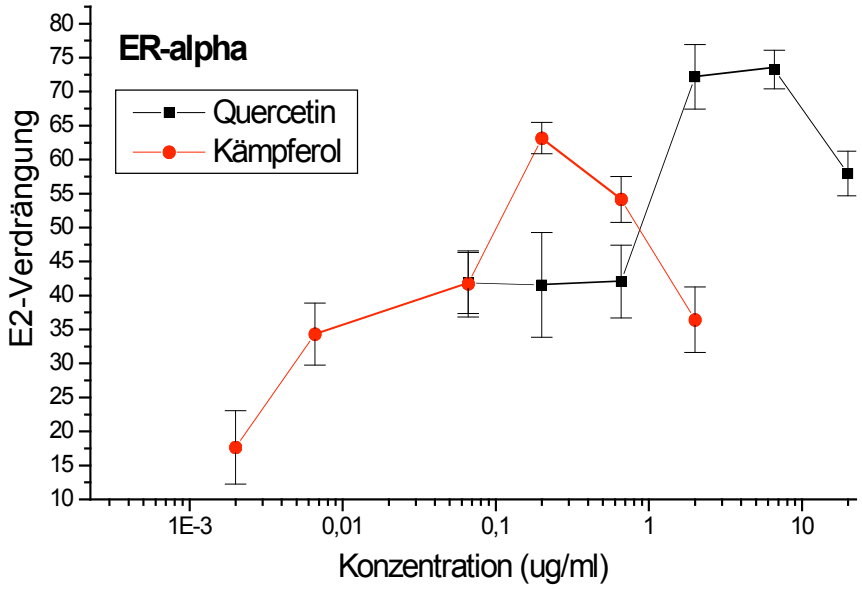


Abb. 35: Wirkung von Quercetin und Kämpferol im ER-Bindungstest (ER-α)

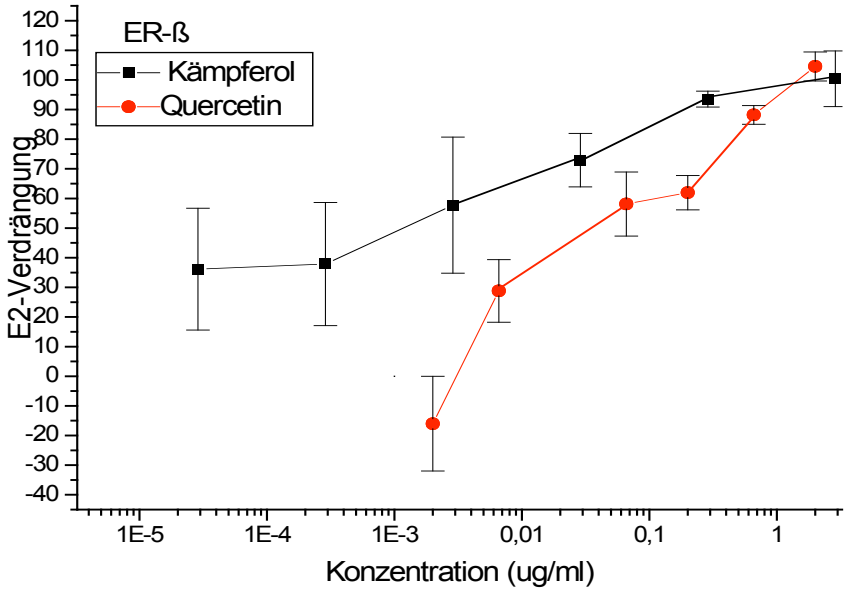


Abb. 36: Wirkung von Quercetin und Kämpferol im ER-Bindungstest (ER-β)

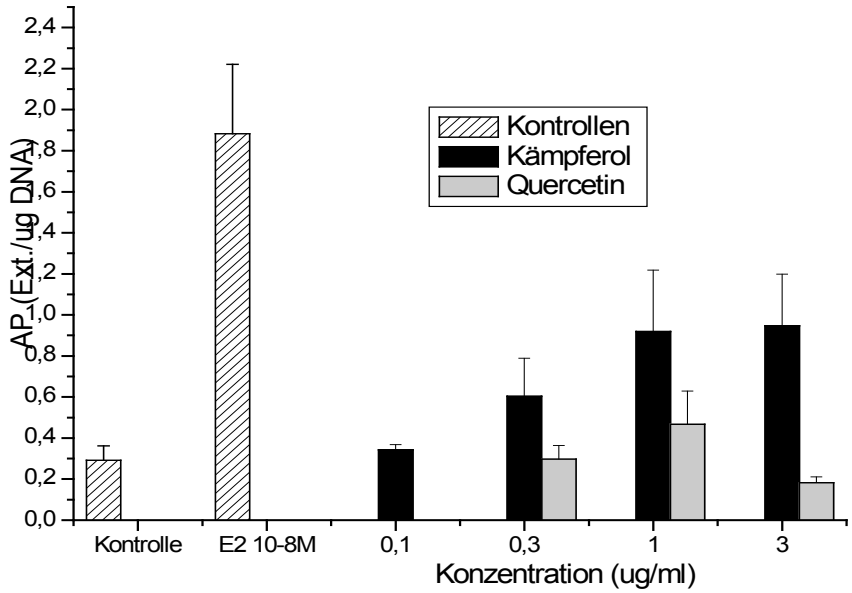


Abb. 37: Induktion von AP in Ishikawa Zellen durch Kämpferol und Quercetin

Die Untersuchung der beiden Flavonoide im AP-Induktionstest ergab eine eindeutige Aktivität (Abb. 37). Eine Zunahme der Enzyminduktion konnte im Falle des Kämpferols bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml beobachtet werden, die sich bei höheren Konzentrationen auf den 3-fachen Wert der Kontrolle erhöhte. Die intrinsische Aktivität des Estradiols wurde

dagegen nicht erreicht. Quercetin ergab nur eine schwache Induktion bei einer Konzentration von 1 µg/ml, die dann bei 3µg/ml wieder abnahm. Die insgesamt deutlich schwächere intrinsische Aktivität des Quercetins verglichen mit der des Kämpferols legt den Verdacht nahe, dass es sich bei ersterem um einen partiellen Agonisten/Antagonisten handeln könnte. Um diese Hypothese zu testen, haben wir beide Substanzen in Kombination angewendet. Dabei haben wir für Kämpferol eine Konzentration von 1 µg/ml und für Quercetin 0,3, 1,0 und 3,0 µg/ml gewählt. Wie aus der Abb. Abb. 38 hervorgeht, resultiert zunächst eine leichte Zunahme, danach aber eine Abnahme des Effektes.

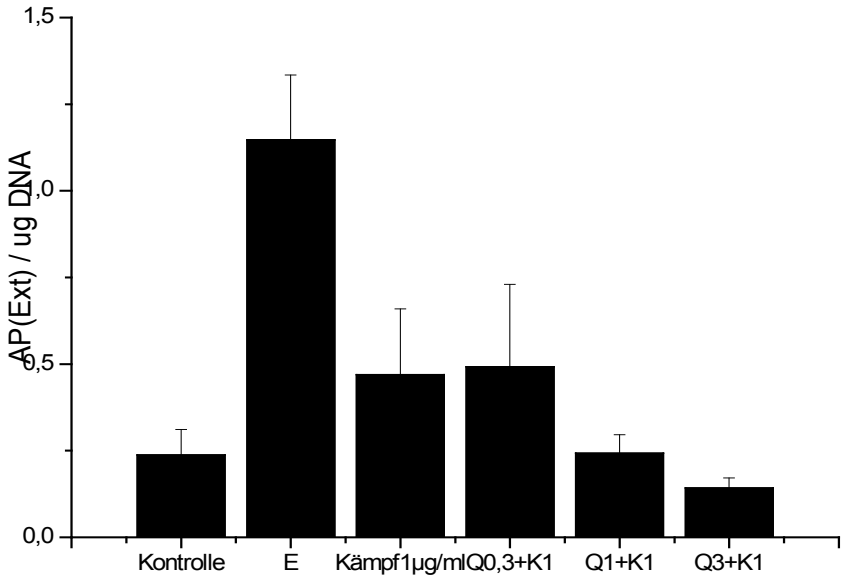


Abb. 38: Wirkung einer Kombination von Quercetin und Kämpferol auf die Induktion der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa Zellen. K= Kämpferol (1µg/ml), Q= Quercetin (0,3 - 3µg/ml)

6 Diskussion

Nachdem Anfang dieses Jahrhunderts Studien veröffentlicht wurden, welche den bisher zur Verringerung von Wechseljahresbeschwerden in der Postmenopause eingesetzten Estrogenen ein gesteigertes Risiko für Karzinome der Brust und des Endometriums nachsagten, wuchs das Bedürfnis nach nebenwirkungsärmeren Alternativen. Gesucht wurde daher nach Agonisten der Estrogenrezeptoren, die sich jedoch nicht im Sinne der o.g. Nebenwirkungen auswirken sollten. Um eine große Anzahl in Frage kommender Stoffe in einem überschaubaren Zeitraum testen zu können, wurden daher Screening-Verfahren benötigt, welche sich nicht nur durch eine hohe Praktikabilität, sondern auch durch eine hohe Zuverlässigkeit auszeichnen sollten.
In dieser Arbeit wurden zwei Screening-Testverfahren, nämlich der ER-Bindungstest in Kombination mit dem AP-Assay, auf ihre Tauglichkeit zur Findung von Alternativen zur klassischen Hormonsubstitutionstherapie in der Postmenopause auf Pflanzenbasis getestet. Dabei zeigte sich, dass die Ergebnisse der beiden Testverfahren in einigen Fällen voneinander abweichen.

6.1 Fettsäuren

Nach Durchführung der HPLC-Chromatographie eines Noni-Püree-Hexan-Extraktes und der Strukturanalyse erhielten wir mit der (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure eine Substanz, die für die bei Testung im ER-Bindungstest imponierende Affinität zu den Estrogenrezptoren verantwortlich zu sein schien. Nachdem diese im AP-Assay jedoch keine intrinsische Aktivität zeigte, galt unser Interesse vergleichbaren Substanzen. Aufgrund der großen strukturellen Ähnlichkeiten zwischen der (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure und den Fettsäuren schlossen wir einige Vertreter letztgenannter Stoffgruppe in unsere Untersuchungen mit ein. Getestet wurden hierbei die in der Ernährung weit verbreiteten Fettsäuren mit 18 Kohlenstoffatomen, die sich durch die Anzahl ihrer Doppelbindungen voneinander unterscheiden. Im Einzelnen handelte es sich dabei um die Arachidonsäure (4 Doppelbindungen), die α- und γ-Linolensäure (je 3 Doppelbindungen), die Linolsäure (2 Doppelbindungen), die Ölsäure (1 Doppelbindung) sowie die Stearinsäure (gesättigt). Interessanterweise zeigte sich bei der Stearinsäure keine Affinität zum ER-α. Anders verhielt es sich für den ER-β, für den ein EC_{50}-Wert von $2{,}74 \times 10^{-6}$ mol/l gemessen wurde. Ein Vergleich mit den Kontrollwerten lässt hier eine hohe

Affinität zum ER-β vermuten. Der für die Stearinsäure am ER-β gemessene EC_{50}-Wert entspricht in etwa denen der anderen getesteten Fettsäuren (vgl. Tabelle 7). Zum Vergleich: Der EC_{50}-Wert des 17-β-Estradiols liegt bei 10^{-8} bis 10^{-9} M, während für andere Phytoestrogene u.a. in unserer Arbeitsgruppe unter Anwendung des ER-Bindungstests EC_{50}-Werte um 10^{-6} ermittelt wurden (17), die denen der von uns bestimmten Fettsäuren ähneln. Somit müssten die Fettsäuren eine im Vergleich zum 17-β-Estradiol nur 10^{2} bis 10^{3} -fach niedrigere Affinität aufweisen. Abbildung 39 zeigt den Grundaufbau eines Steroids:

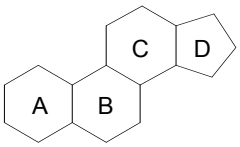


Abbildung 39: Steroidgrundgerüst

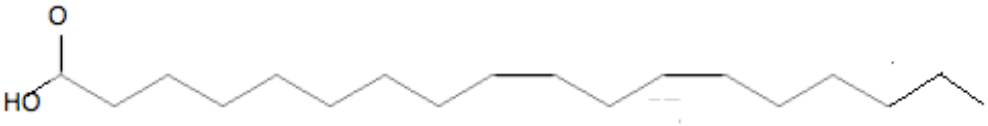


Abbildung 40: Strukturformel der Linolsäure

Anstead, GM et al. (3) beschrieben mehrere Strukturelemente, welche sie als wesentlich für die Bindung von 17-β-Estradiol an die Estrogenrezeptoren fanden: So scheint der Rezeptor den Liganden in eine hydrophobe Tasche einzuschließen, wobei 3 Ringe des Steroidgerüstes wesentlich an der Bindung beteiligt sind:

- Der B-Ring,
- eine phenolische Gruppe im A-Ring,
- 17-β-Hydroxylgruppe im D-Ring.

Ein Vergleich der Strukturen von Linolsäure als beispielhaftem Repräsentanten einer Fettsäure und der Grundstruktur der Steroide (Vgl. Abbildung 39 und Abbildung 40) zeigt auf Seiten der Fettsäure das Fehlen sämtlicher Strukturelemente, für welche *Anstead, GM et al.* (3) eine Beteiligung an der Bindung eines Liganden an einen Estrogenrezeptor annahmen. Somit erscheint eine spezifische Bindung an einen Estrogenrezeptor unwahrscheinlich, was

den mit Ausnahme der Stearinsäure positiven Verlauf des ER-Bindungstests im Sinne unserer Fragestellung als Artfaktwirkung anmuten läßt. Dies findet auch in dem negativen Verlauf des AP-Assays Bestätigung. Der Begriff Artefakt meint hierbei ein falsch positives Ergebnis für den ER-Bindungstest. Entsprechend kann auch ein falsch negatives Resultat als Artefakt bezeichnet werden.

Für die konjugierte Linolensäure, ein natürlich vorkommendes Derivat der Linolensäure (z.B. in Milch, Rindfleisch), wurde eine antikarzinogene Aktivität gegen Brustkrebs beschrieben. *Tanmahasamut et al.* behandelten eine estrogenrezeptorpositive MC7-Zellinie mit dieser und fanden eine niederregulierte Expression von ER-α auf mRNA- und Protein-Level. Auch erhielten sie Hinweise auf eine verminderte Bindungsaktivität des Kernproteins an das ERE. Sie fanden desweiteren eine Hemmung der Aktivität des Promotors, die durch das ERE gesteuert wird. (65). *Liu et al.* (38) testeten den methanolischen Extrakt der Beere des Keuschbaums *(Vitex agnus-castus* L.*)* auf eine estrogene Wirkung und wiesen im ER-Bindungstest eine Verdrängung gegenüber den beiden Estrogenrezeptoren nach. Dabei konnten sie die Linolensäure als einen Liganden der Estrogenrezeptoren isolieren und fanden für diese eine Stimulation der Expression von ER-β-mRNA. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen fanden sie jedoch keine Induktion der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa-Zellen.

Zusammenfassend geht aus den o.g. Arbeiten hervor, dass die konjugierte Linolensäure Estrogenrezeptoren unspezifisch binden und je nach ER-Subtyp-α oder –β entweder eine schwache estrogene oder antiestrogene Aktivität entfalten könnte. Da sich jedoch weder in der Literatur noch in unseren Ergebnissen ein positives Ergebnis im AP-Assay zeigte, ist für die Linolensäure und auch für die Fettsäuren im Allgemeinen ein vollständiges Ablaufen der Signalkaskade unwahrscheinlich.

6.2 Ursolsäure

Eine Beeinflussung der Estrogenrezeptoren durch die Ursolsäure wurde in der Literatur bislang noch nicht beschrieben. Um die scheinbar estrogene Wirkung des Nonipüree-Hexan-Extraktes im ER-Bindungstest zu interpretieren, die, wie anhand der Untersuchungen mit den reinen Fettsäuren gezeigt wurde, möglicherweise ein Artefakt darstellt, wurde die Ursolsäure in unsere Untersuchungen einbezogen und ihre estrogene Wirkung im ER-Bindungstest und AP-Assay untersucht. Für diese ist ein Vorkommen als Bestandteil von *Morinda Citrifolia* L. in der Literatur beschrieben (u.a. 74). Hierbei ergab der ER-Bindungstest ein unerwartetes Bild, da die Menge an radioaktiv markiertem Estradiol mit steigender Konzentration der Ursolsäure zu- und damit die Verdrängung abnahm, was sich in scheinbar negativen Verdrängungswerten ausdrückte. Mit zunehmender Konzentration einer estrogen wirksamen Substanz wäre entsprechend der Dosis-Wirkungs-Kurve aber eher eine Abnahme des radioaktiv gebundenen Estradiols anzunehmen. Dieser Effekt zeigte sich vor allem beim ER-β. Um diesem Phänomen nachzugehen, wiederholten wir den Test in Abwesenheit der Estrogenrezeptoren. Ziel war es hierbei, für den Fall eines positiven Ergebnisses im ER-Bindungstest die Abhängigkeit dieses Resultates von einer Bindung an die Estrogenrezeptoren zu ermitteln. Es fand dennoch eine Bindung von radioaktivem Estradiol an Hydroxylapatit statt. Eine mögliche Erklärung ist folgende: Oberhalb von 2µg/ml beginnt die Ursolsäure auszufallen. Die dabei gebildeten Mikrokristalle binden an Hydroxylapatit und absorbieren das lipophile Estradiol. Dadurch steigt der Anteil an gebundenem Estradiol. In Gegenwart von Estrogenrezeptoren würde dieses fälschlicherweise als Rückgang der kompetitiven Rezeptorbindung interpretiert werden. Auch die Überprüfung der Ursolsäure im AP-Test in Ishikawa Zellen ergab ein negatives Bild, wobei die Aktivität mit steigender Konzentration sogar unter den Kontrollwert sank. Auch dieses Phänomen geht möglicherweise auf die Bildung von Mikrokristallen zurück, die zu einer Schädigung (Hemmung) der Zellfunktionen führt.

Zusammenfassend erscheint es nicht wahrscheinlich, dass der Ursolsäure eine estrogene Aktivität zuzuschreiben ist. Bezüglich der Eigenschaft, die Ergebnisse des ER-Bindungstests im Sinne einer Artefaktwirkung zu beeinflussen, ist durch die Ursolsäure von eher zu niedrig gemessenen Verdrängungswerten auszugehen.

6.3 Scopoletin

Als Ergebnis eines auf einer Reversed-Phase-(RP)-Chromatographiesäule durchgeführten HPLC-Chromatogramms des Nonipüree-Hexan-Extraktes fanden wir neben der Hauptkomponente, die in dem im Anschluß durchgeführten ER-Bindungstest fast die gesamte estrogene Aktivität in sich vereinte und nach Isolierung als DTA identifiziert werden konnte, mehrere kleinere Ausschläge. Eine Fraktion konnte durch Vergleich mit einer Referenzsubstanz (Scopoletin) als solches identifiziert werden. Der Nachweis von Scopoletin in verschiedenen Bestandteilen von *Morinda Citrifolia* L. ist in der Literatur bereits mehrfach beschrieben (35). Dieser Substanz wurden bereits zahlreiche gesundheitsfördernde Effekte zugeschrieben (vgl. Kap. 2.5.2.2). Ein Zusammenhang zwischen Scopoletin und der Aktivierung der Estrogenrezeptoren wurde dagegen bisher noch nicht untersucht, so dass wir zunächst o.g. Fraktion mit Hilfe des ER-Bindungstests untersuchten und dabei bezüglich des ER-α eine nur sehr geringe Affinität fanden, wobei die mittlere Effektivdosis (EC_{50}) nicht erreicht wurde. Die Ergebnissse für den ER-β waren nicht auswertbar, da die Werte in den negativen Bereich absanken. Bei Dosen >0,3 μg/ml erfolgte aber eine sichtbare Verdrängung von rad. Estradiol vom Rezeptor, so dass insgesamt von einer gewissen Affinität der Substanz zum Rezeptor ausgegangen werden kann. Im Alkalischen Phosphatase-Assay zeigte sich jedoch eine deutliche Aktivität. Da dies sehr unerwartet war (der ER-Bindungstest ist normalerweise wesentlich empfindlicher als der AP-Assay), haben wir den Test wiederholt und einen kompetitiven Antagonisten des Estradiols (ICI-182780) zugesetzt. In Abwesenheit von ICI-182780 war wiederum eine ausgeprägte Wirkung zu erkennen, die durch den Antagonisten vollständig unterdrückt wurde. Damit liegt der Schluss nahe, dass Scopoletin in diesem Test eine ER-vermittelte estrogene Wirkung entfaltet. Aufgrund der Tatsache einer durch den AP-Assay nachgewiesenen intrinsischen Wirkung und dem negativen Verlauf des ER-Bindungstests scheint hier erneut eine Artefaktwirkung vorzuliegen, wobei in diesem Fall im ER-Bindungstest zu niedrige Werte zu erwarten sind.

6.4 Flavonoide

In analytischen Arbeiten, die in der Arbeitsgruppe von Prof. Westendorf durchgeführt wurden, sind die Flavonole Quercetin und Kaempferol als Bestandteile von *Morinda citrifolia* L. nachgewiesen worden (persönliche Mitteilung von Prof. Westendorf). Besonders reich an Quercetin war dabei die unlösliche Fraktion des Nonipürees, welches als Bodensatz im Nonisaft vorkommt, wenn dieser aus Püree ohne Filtration hergestellt wird. Der Nachweis von Quercetin als Bestandteil von *Morinda citrifolia* L. steht in Einklang mit anderen Studien, u.a. *Deng et al.* (15). Wir untersuchten beide Substanzen zunächst im ER-Bindungstest: Hierbei imponierte für beide Verbindungen eine bedeutsame Affinität zu den Estrogenrezeptoren, und zwar vornehmlich zum ER-β: Für Quercetin erhielten wir EC_{50}-Werte von ca. $3x10^{-6}$ M für ER-α und $1,2x10^{-7}$ M für ER-β. Auch *Maggliolini et al.* untersuchten die über Estrogenrezeptoren vermittelte Aktivität des Quercetins (41). Diese führten ebenfalls einen kompetitiven Verdrängungs-Assay durch. Dabei fanden sie für beide Phytoestrogene eine konzentrationsabhängige Verdrängung von radioaktiv markiertem Estradiol. Im Einzelnen zeigte die Testung von Quercetin EC_{50}-Werte von ca. $1x10^{-3}$ M für ER-α und ca. $1x10^{-5}$ M für ER-β. Während damit die Affinität gegenüber ER-α bei diesen um ca. 10^3 schwächer erscheint, ergibt sich bezüglich ER-β eine Differenz von 10^2 im Sinne einer schwächeren Verdrängung bei o.g. Arbeitsgruppe. In Übereinstimmung mit unseren Ergebnissen zeigte sich eine stärkere Bindung an ER-β im Vergleich zu ER-α. Es ist zu beachten, dass aufgrund methodischer Unterschiede die Ergebnisse der Rezeptor-Bindungsassays in den meisten Fällen nur eingeschränkt vergleichbar sind (18). Auch *Leung et al.* (34) untersuchten die Affinität der Flavonole Quercetin und Kaempferol gegenüber Estrogenrezeptor-α unter Anwendung eines ER-Bindungstests. Dabei testeten sie selektiv die Affinität gegenüber ER-α. Sie erhielten bezüglich ER-α einen EC_{50}-Wert von $4,1x10^{-5}$ M für Quercetin. Dieses Ergebnis weist für Quercetin auf eine ca. 10-fach niedrigere Verdrängung im Vergleich zu unseren Ergebnissen hin. Im Rahmen der Interpretation der Abweichungen der EC_{50}-Werte zwischen unserer und den beiden genannten Studien könnte den Versuchsbedingungen ein besonderer Stellenwert zukommen: So setzten *Maggliolini et al.* verglichen mit unserer Methode bei fast identischer Menge an Radioaktivität die doppelte Menge an Estrogenrezeptoren ein. *Leung et al.* dagegen bedienten sich der Markierung mit Fluorescein statt mit radioaktivem Tritium, um die Verdrängung messbar zu machen. Wie bereits oben erwähnt, untersuchten wir mit Kaempferol ein weiteres Flavonoid im ER-Bindungstest und fanden EC_{50}-Werte von $3,5\ x10^{-7}$ M für ER-α sowie $3,5\ x10^{-9}$ M für ER-β. Dabei erhielten *Leung et*

al. mit 3,8 x10^{-7} M einen fast identischen EC_{50}-Wert für ER-α. Interessanterweise geht die Verdrängung von Estradiol für beide ER-Subtypen bei Konzentrationen über 0,2 µg/ml (Kämpferol) bzw. 6 µg/ml (Quercetin) wieder zurück. Dies könnte an der Bildung von Mizellen liegen, wie im Falle der Ursolsäure beschrieben. Die Untersuchung der beiden Flavonoide im AP-Induktionstest ergab eine eindeutige Aktivität. Eine Zunahme der Enzyminduktion konnte im Falle des Kämpferols bei einer Konzentration von 0,3 µg/ml beobachtet werden, die sich bei höheren Konzentrationen auf den 3-fachen Wert der Negativontrolle erhöhte. Die intrinsische Aktivität des Estradiols wurde dagegen nicht erreicht. Insgesamt übertraf im AP-Assay die intrinsische Aktivität des Kämpferols deutlich die des Quercetins. Daher lag die Vermutung nahe, dass es sich bei letzterem um einen partiellen Agonisten/Antagonisten handeln könnte. Zur Überprüfung dieser Hypothese haben wir beide Substanzen in Kombination angewandt. Dabei resultierte bei konstanter Konzentration von Kämpferol und ansteigender Konzentraton von Quercetin nach einer leichten Zunahme eine Abnahme der intrinsischen estrogenen Wirkung (vgl. Abb. 38), was für die Hypothese einer agonistischen/ antagonistischen Wirkung des Quercetins spricht. Solch eine Wirkung ist mit Konsequenzen verbunden, da Quercetin sehr häufig in der Nahrung vorkommt (siehe Kapitel 2.4). Bezüglich der estrogenen Bindung ergibt sich aus dieser Wirkung für Quercetin die Möglichkeit, im Falle eines Estrogenmangels (z.B. Postmenopause) eine unterstützende estrogene Wirkung entfalten zu können, während die antagonistische Wirkung bei Estrogenüberschuss (z.B. Schwangerschaft) einen protektiven Faktor vor Brust- und Endometriumkarzinom darstellt.

Overk et al. (53) untersuchten 17 Pflanzenextrakte unter Einsatz zellfreier und zellbasierter Testverfahren auf deren Aussagekraft bezüglich einer estrogenen Aktivität. Zum Einsatz kam u.a. der Alkalische Phosphatase-Assay in Ishikawa-Zellen. Für drei Extrakte fanden sie, in Analogie zu unseren Ergebnissen bezüglich des Quercetins, im AP-Assay Hinweise auf eine Blockade des Effektes von Estrogen.

7 Ausblick

Um der Frage nachzugehen, ob die ungesättigten Fettsäuren im ER-Bindungstest die Bindung des Agonisten-Rezeptor-Komplexes an Hydroxylapatit verhindern, wird es notwendig sein, zusätzlich andere physikalische Nachweissysteme anzuwenden. So wäre der Einsatz der Protonen-NMR möglich. Hierbei würde die Komplexbildung eine Änderung der atomaren Umgebung und eine daraus resultierende Signalverschiebung der Resonanz aufgrund einer Wechselwirkung der Elektronenhüllen verursachen. Weitere Möglichkeiten beständen darin, den Rezeptorkomplex durch eine Ultrazentrifugation abzutrennen oder sich einer Gleichgewichtsdialyse zu bedienen. Dies könnte Inhalt weiterführender Arbeiten sein. Auch um die Verdrängung der reinen Fettsäuren im ER-Bindungstest verstehen zu können, sind weitere experimentelle Untersuchungen notwendig.

8 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Pflanzenextrakte von *Morinda Citrifolia* L. sowie ausgewählte Inhaltsstoffe der Früchte auf ihr estrogenes Potential hin anhand von zwei verschiedenen Testverfahren untersucht. Während mit Hilfe des ER-Bindungstests die Bindungsaffinitäten bzgl. der Estrogenrezeptoren α und β bestimmt wurden, diente der AP-Assay in Ishikawa-Zellen dazu, eine auf die Rezeptorbindung folgende intrinsische Aktivität in Form eines Anstieges der Aktivität der Alkalischen Phosphatase nachzuweisen.

Bei der Untersuchung eines Hexan-Extraktes des Frucht-Pürees von *Morinda Citrifolia* L. fanden wir deutliche Affinitäten zu ER-α und ER-β, die den EC_{50}-Werten der meisten Phytoestrogene entsprachen. Bei dem im Anschluß durchgeführten AP-Assay zeigte sich ebenfalls eine Aktivität, aber erst bei relativ hohen Konzentrationen. Die Strukturaufklärung der nach Auftrennung in der HPLC und Testung der einzelnen Fraktionen im ER-Bindungstest mit der größten Affinität zu den Estrogenrezeptoren imponierenden Substanz erbrachte die (2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure. Die Testung dieser Substanz, welche strukturell zu den ungesättigten Fettsäuren zu zählen ist, ergab eine deutliche Aktivität im ER-Bindungstest bei negativem AP-Assay. Auch bei den im Anschluß aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit getesteten Fettsäuren fanden wir relativ hohe Affinitäten zu ER-α und ER-β, jedoch keine intrinsische Aktivität. Da sich hier ein Artefaktphänomen des ER-Bindungstests darzustellen schien, schlossen wir weitere Inhaltsstoffe von *Morinda citrifolia* L. in unsere Untersuchungen ein, um die Aussagekraft der beiden verwendeten Testverfahren im allgemeinen und insbesondere bei der Erforschung dieser Pflanze zu ergründen: So erbrachte die Ursolsäure zwar in beiden Testverfahren negative Ergebnisse, offenbarte jedoch eine Fehlerquelle im Estrogenrezeptor-Bindungstest. Es scheint, als würde die Ursolsäure bei höheren Konzentrationen ausfallen und Mikrokristalle bilden, die dann zusammen mit dem lipophilen Estradiol direkt an Hydroxylapatit binden, was dann fälschlicherweise als Rückgang der kompetitiven Rezeptorbindung gewertet wird. Auch der negative Ausfall des AP-Assays ist möglicherweise auf die Bildung von Mikrokristallen zurückzuführen, woraus eine Schädigung und damit Hemmung der Zellfunktion resultieren könnte. Scopoletin, welches sowohl in unserer als auch von anderen Arbeitsgruppen in *Morinda Citrifolia* L. nachgewiesen wurde, zeigte eine sehr schwach ausgeprägte Bindung an die ER, wogegen die Induktion der AP-Aktivität deutlich ausfiel. Diese Wirkung ließ sich mit dem ER-

Antagonisten ICI hemmen, was für eine ER abhängige Wirkung des Scopoletins spricht. Für die Diskrepanz der beiden Testsysteme können wir derzeit keine Erklärung anbieten.

Abschließend kommen wir zu dem Ergebnis, dass der ER-Bindungstest durch verschiedene Artefaktphänomene zu falsch positiven oder auch falsch negativen Ergebnissen führen kann und daher nur in Kombination mit einem weiteren biologischen Test geeignet ist, eine zuverlässige Aussage zu treffen. Für die Anwendung dieses Tests sprechen jedoch die einfache Durchführung und die damit hohe Praktikabilität. Nachdem wir somit Artefaktphänomene des ER-Bindungstests im Sinne von sowohl zu hoch als auch zu niedrig gemessenen Ergebnissen gefunden hatten, zeigte die abschließende Testung der ebenfalls in *Morinda Citrifolia* L. nachgewiesenen Flavonoide Quercetin und Kämpferol positive Ergebnisse in beiden Testverfahren, wobei für Quercetin eine je nach vorherrschender Estrogenkonzentration agonistische oder antagonistische Wirkung resultierte. Dies ist insofern von großer Bedeutung, da Quercetin ebenso wie Kämpferol in der Nahrung weit verbreitet und somit in der Lage ist, in Lebensumständen mit besonderen hormonellen Anforderungen wie beispielsweise Schwangerschaft oder Postmenopause an einer ausgewogenen Hormonhomöostase mitzuwirken.

9 Summary

Extracts of the fruits of *Morinda citrifolia* L. (Noni) as well as selected compounds occurring in this plant were tested in the present dissertation with respect to their activity in two in vitro assays, the estrogen receptor binding assay (ER-binding assay) and the induction of alkaline phosphatase in Ishikawa cells (AP-assay). The former test proves the affinity of test compounds to ER-α and ER-β, whereas the intrinsic activity is received by the latter test.

The investigation of a hexane extract prepared from Noni fruits showed a significant affinity to the estrogen receptors in the ER-binding assay. The AP-assay resulted also in a positive reaction, although only at high concentrations of the extract in the tissue culture medium. Testing of different fractions obtained by an HPLC chromatography on a reversed phase column resulted in the identification of (2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoic acid as the most active fraction. Investigation of the isolated compound in the ER-binding assay confirmed the results obtained with the hexane extract, however, no activity of the compound could be observed in the AP-assay. The investigation of a variety of structurally related unsaturated fatty acids, present in almost every food, showed also positve effects in the ER-binding assay. None of these compounds did show acitivity in the AP-assay. We therefore hypothesize that the positive effects obtaind in the ER-binding assay are artefactual. This hypothesis is also confirmed by the complete absense of structural elements of the fatty acids important for the binding to the ER. Other ingredients of Noni fruits were also tested in the two test assays in order to further investigate the sensitivity of these sytems. Ursolic acid, which was negative in both assays, nevertheless showed another shortcoming of the ER-binding assay. Negative binding values were obtaind with increasing concentrations of the compound in the assay. It could be demonstrated that the binding of redioactive estradiole to the solid phase of hydroxyapatit was also present in the absense of ER. This suggests the formation of a macromolecular complex of estradiol with ursolic acid micelles in a hypersaturated solution.

Scopoletin, another ingredient of Noni fruits, was clearly positive in the AP-assay, whereas the ER-binding assay was only weakly active. The fact that the activity in the AP-assay could be almost completely reversed by addition of ICI, an ER-antagonist, suggests that the activity is mediated via an ER dependent pathway. No reason for the discrepancy of the two assays can be given at this time.

The Noni fruit ingredients quercetin and kaempferol, flavonoids which are widely distributed in plant derived food, showed positve effects in both assays. The affinity of kaempferol to

ER-α and ER-β and the intrinsic activity in the AP-assay were higher compared to quercetin. The latter compound, on the other hand, showed antagonistic activity at higher concentrations in the presence of kaempferol or estradiol. This is important, because of the presence of this compound in many food sources. Depending on situations with special hormonal requirements, such as menopause or pregnancy, the compound could help to balance the hormonal homeostatsis.

10 Literaturverzeichnis

1) Amália PM, Possa MN, Augusto MC and Francisca LS (2007) Quercetin prevents oxidative stress in cirrhotic rats. *Digestive diseases and sciences* **52/10**: 2616–262

2) An RB, Sohn DH, Jeong GS and Kim YC (2008) In vitro hepatoprotective compounds from Suaeda glauca. *Archives of pharmacal research* **31/5**: 594-597

3) Anstead GM, Carlson KE and Katzenellenbogen JA (1997) The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62/3**: 268-303

4) Bader G (1994) Pharmacology and biopharmaceutics of triterpenoid saponins. *Pharmazie* 49/6: 391-400

5) Baek JH, Lee YS, Kang CM, Kim JA, Kwon KS, Son HC and Kim KW (1997) Intracellular Ca^{2+} release mediates ursolic acid-induced apoptosis in human leukemic HL-60 cells. *International journal of cancer* **73**: 725–728

6) Bonaccorsi I, Altieri F, Sciamanna I, Oricchio E, Grillo C, Contartese G and Galati EM (2008) Endogenous reverse transcriptase as a mediator of ursolic acid's anti-proliferative and differentiating effects in human cancer cell lines. *Cancer letters* **263/1**: 130-139

7) Bryant HU (2002) Selective estrogen receptor modulators. *Reviews in endocrine & metabolic disorders* **3/3**: 231-41

8) Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA and Carlquist M (1997) Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389/6652**: 753-758

9) Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P and Baulieu EE (1990) Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *The Journal of biological chemistry* **265/33**: 20686-20691

10) Choi BM, Park R, Pae HO, Yoo JC, Kim YC, Jun CD, Jung BH, Oh GS, So HS, Kim YM and Chung HT (2000) Cyclic adenosine monophosphate inhibits ursolic acid-induced apoptosis via activation of protein kinase A in human leukaemic HL-60 cells. *Pharmacology & toxicology* **86/2**: 53-58

11) Choi YH, Baek JH, Yoo MA, Chung HY, Kim ND and Kim KW (2000) Induction of apoptosis by ursolic acid through activation of caspases and down-regulation of c-IAPs in human prostate epithelial cells. *International journal of oncology* **17/3**: 565–571

12) Chunhieng M T (2003) De´veloppement de nouveaux aliments sante tropicale: application a`la noix du Bre´sil Bertholettia excelsa et au fruit de Cambodge Morinda citrifolia. Ph.D. thesis, INPL, France.

13) Cowley SM, Haare S, Mosselman S and Parker MG (1997) Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *The journal of biological chemistry* **272/32**: 19858-19862

14) Crespo I, García-Mediavilla MV, Gutiérrez B, Sánchez-Campos S, Tuñón MJ and González-Gallego J (2008) A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. *The British journal of nutrition* **8**:1-9

15) Deng S, Palu K, West BJ, Su CX, Zhou BN and Jensen JC (2007) Lipoxygenase inhibitory constituents of the fruits of noni (Morinda citrifolia) collected in Tahiti. *Journal of natural products* **70/5**: 859-862

16) Dittmar, A (1993). Morinda citrifolia L.—Use in indigenous Samoan medicine. *Journal of Herbs, Spices and Medicine Plants* **1(3):** 77–92

17) Effenberger K (2004) Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen: Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause. Naturw. Dissertation. Universität Hamburg

18) Gray LE, Kelce WR, Wiese T, Tyl R, Gaido K, Cook J, Klinefelter G, Desaulniers D, Wilson E, Zacharewski T, Waller C, Foster P, Laskey J, Reel J, Giesy J, Laws S, McLachlan J, Breslin W, Cooper R, Di Giulio R, Johnson R, Purdy R, Mihaich E,. Safe S and Colborn T (1997) *Reprod. Toxicol.* **11**: 719-750

19) Gutendorf B and Westendorf J (2001) Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. Toxicology **166/1-2**: 79-89

20) Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M and Moilanen E (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of inflammation*: **1**: 45673

21) Heinicke, R M (1985) The pharmacologically active ingredient of Noni. *Bulletin of the National Tropical Botanical Garden* **15**: 10–14

22) Holinka CF,Hata H, Kuramato H and Gurpide E (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa Line). Cancer research **46/6**, 277I-2774

23) Hollosy F, Idei M, Csorba G, Szabó E, Bökönyi G, Sepröd A, Mészáros G, Szende B and Kéri G (2001) Activation of caspase-3 protease during the process of ursolic acid and its derivative-induced apoptosis. *Anticancer research* **21/5**: 3485–3491

24) Jackson TA, Richter JK, Bain DL, Takimoto GS, Tung L and Horwitz KB (1997) The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT. *Molecular endocrinology* **11/6**: 693-705

25) Johannes Westendorf et al, Identification of (2*E*,4*Z*,7*Z*)-decatrienoic acid a fatty acid with estrogenic properties in Noni (*Morinda citrifolia*) fruit,

26) Kaindl U, Eyberg I, Rohr-Udilova N, Heinzle C and Marian B (2007) The dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage. *Food and chemical toxicology.* **46(4)**:1320-1326.

27) Kamaraj S, Vinodhkumar R, Anandakumar P, Jagan S, Ramakrishnan G and Devaki T (2007) The effects of quercetin on antioxidant status and tumor markers in the lung and serum of mice treated with benzo(a)pyrene. *Biological and pharmaceutical bulletin* **30(12)**: 2268-2273

28) Katzenellenbogen BS, Montano MM, Le Goff P, Schodin DJ, Kraus WL, Bhardwaj B and Fujimoto N (1995) Antiestrogens: Mechanisms and actions in target cells. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology* **53/1-6**: 387-393

29) Kayser O and Kolodziej H (1997) Antibacterial activity of extracts and constituents of Pelargonium sidoides and Pelargonium reniforme. *Planta Medica* **63/6**: 508-510

30) Kim SK, Kim HJ, Choi SE, Park KH, Choi HK and Lee MW (2008) Anti-oxidative and inhibitory activities on nitric oxide (NO) and prostaglandin E2 (COX-2) production of flavonoids from seeds of Prunus tomentosa Thunberg. *Archives of pharmacal research* **31/4**: 424-428

31) Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E and Cato AC (1988) A 13 bp palindrome is a functional estrogen respospecifically with estrogen receptor. *Nucleic Acids Research*, 1988. **16/2**: 647-663.

32) Kostelac D (2004) Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung der Estrogen Rezeptoren α und β an das Estrogen Response Element. Naturw. Dissertation. Universität Karlsruhe

33) Lee KK, Cho JJ, Park EJ and Choi JD (2001) Anti-elastase and anti-hyaluronidase of phenolic substance from Areca catechu as a new anti-ageing agent. *International Journal of Cosmetic Science* **23/6**: 341-346

34) Leung LK, Po LS, Lau TY and Yuen YM (2004) Effect of dietary flavonols on oestrogen receptor transactivation and cell death induction. *British Journal of Nutrition* **91/6**: 831–839

35) Levand O and Larson HO (1979) Some chemical constituents of Morinda citrifolia. *Planta Medica* **36**: 186-187

36) Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW and Liu JW (2007) A flavonoid glycoside isolated from Smilax china L. rhizome in vitro anticancer effects on human cancer cell lines, *Journal of ethnopharmacology* **113/1**:115-124

37) Lim YH, Kim IH and Seo JJ (2007) In vitro activity of kaempferol isolated from the Impatiens balsamina alone and in combination with erythromycin or clindamycin against Propionibacterium acnes. *Journal of microbiology* **45/5**: 473-477

38) Liu J, Burdette JE, Sun Y, Deng S, Schlecht SM, Zheng W, Nikolic D, Mahady G, van Breemen RB, Fong HH, Pezzuto JM, Bolton JL and Farnsworth NR (2004) solation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of Vitex agnus-castus L. (chaste-berry). *Phytomedicine* **11/23:** 18-23

39) Liu J, Sidell N (2005) Anti-estrogenic effects of conjugated linoleic acid through modulation of estrogen receptor phosphorylation. *Breast cancer research and treatment* **94/2**: 161-169

40) Liu R, Wang J (2008) Effects of quercetin on human laryngeal cancer Hep-2 cells. Journal of clinical otorhinolaryngology, head, and neck surgery **22/4**: 169-171

41) Maggiolini M, Bonofiglio D, Marsico S, Panno ML, Cenni B, Picard D and Ando S (2001) Estrogen receptor α mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Molecular pharmacology* **60/3**: 595-602

42) Merrill ED (1943) Noni (Morinda citrifolia) as an edible plant. Technical manual: emergency food plants and poisonous plants of the islands of the pacific. Washington DC: US Gov-ernment Printing Office

43) Million Women Study Collaborators (2003) Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* **362/9382**: 419-427

44) Moon PD, Lee BH, Jeong HJ, An HY, Park SJ, Kim HR, Ko SG, Um JY, Hong SH and Kim HM (2007) Use of scopoletin to inhibit the production of inflammatory cytokines through inhibition of the IkappaB/NF-kappaB signal cascade in the human mast cell line HMC-1. *European Journal of Pharmacology* **555/2-3**: 218-225

45) Moras D. and Gronemeyer H (1998) The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **10/3**: 384-91

46) Murdoch FE, Meier DA, Furlow JD, Grunwald KA, Gorski J (1990) Estrogen receptor binding to a DNA response element in vitro is not dependent upon estradiol. *Biochemistry* **29/36:** 8377-8385

47) Naz S, Siddiqi R, Ahmad S, Rasool SA, Sayeed SA (2006) Antibacterial activity directed isolation of compounds from Punica granatum. *Food and Chemical Toxicology* **72/9**: 341-345

48) Norris JD, Fan D, Kerner SA and Donald PM (1997) Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor. *Molecular Endocrinology* **11/6**: 747-754

49) Obidoa, O. und Obasi, S.C. (1991) Coumarin compounds in cassava diets: two health implications of scopoletin in gari. *Plant Foods Hum. Nutr.* **41/3**: 283-289

50) Oh SM, Kim YP and Chung KH (2006) Biphasic effects of kaempferol on the estrogenicity in human breast cancer cells. *Archives of pharmacal research* **29/5**: 354-362

51) Ojewole J A O and Adesina S K (1983) Mechanism of the Hypotensive Effect of Scopoletin Isolated from the Fruit of Tetrapleura tetraptera. Planta Medica **49/9**: 46-50

52) Ojewole JA and Adesina SK (1983) Mechanism of the hypotensive effect of scopoletin isolated from the fruit of tetrapleura tetraptera. Planta Medica **49/9**: 46-50

53) Overk CR, Yao P ,Chen S, Deng S, Imai A, Matthew Main M, Schinkovitz A, Farnsworth NR, Pauli GF and Bolton JL (2008) High-Content Screening and Mechanism-Based Evalua-tion of Estrogenic Botanical Extracts. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening* **11** 283-293

54) Pace P, Tayor J, Suntharalingam S, Coombes RC and Ali S (1997) Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *Journal of biological chemistry* **272/41**: 25832-2538

55) Panda S and Kar A (2006) Evaluation of the antithyroid, antioxidative and antihyperglycemic activity of scopoletin from Aegle marmelos leaves in hyperthyroid rats *Phytotherapy research* **20/12**: 1103-1105

56) Peñarrieta JM, Alvarado JA, Akesson B and Bergenståhl B (2008) Total antioxidant capacity and content of flavonoids and other phenolic compounds in canihua (Chenopodium pallidicaule): an Andean pseudocereal. *Molecular nutrition & food research* **52/6**: 708-717

57) Peters, G.A. and S.A. Khan Estrogen receptor domains E and F: role in dimewith coactivator RIP-140. Molecular endocrinology **13/2**: 286-296

58) Pettersson K, Grandien K, Kuiper GJM and Gustafsson J (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response heterodimers with estrogen receptor alpha. *Molecular endocrinology* **11/10**: 1486-1496

59) Pietrovski EF, Magina MD, Gomig F, Pietrovski CF, Micke GA, Barcellos M, Pizzolatti MG, Cabrini DA, Brighente IM and Otuki MF (2008) Topical anti-inflammatory activity

of Eugenia brasiliensis Lam. (Myrtaceae) leaves. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **60/4**: 479-487

60) Rao YK, Fang SH and Tzeng YM (2008) Antiinflammatory activities of flavonoids and a triterpene caffeate isolated from Bauhinia variegata. *Phytotherapy research* **22/7**: 957-962

61) Rogerio AP, Kanashiro A, Fontanari C, da Silva EV, Lucisano-Valim YM, Soares EG and Faccioli LH (2007) Anti-inflammatory activity of quercetin and isoquercitrin in experimental murine allergic asthma. *Inflammation research* **56/10**: 402-408

62) Shiau AK, Barstad D, Loria PM, Cheng L, Kushner PJ, Agard DA and Greene GL (1998) The structural basis of estrogen receptor/ coactivator recognition and the antagonism of this action with tamoxifen. Cell **95**: 927- 937

63) Siegmund-Schultze N, Zylka-Menhorn V and Leinmüller R (2008) Hormontherapie und Brustkrebs: Ein Blick auf die aktuelle Datenlage. *Deutsches Ärzteblatt* **105/6**: 260-266

64) Sung SH, Park JH and Kim YC (1998) Hepatoprotective activity of scopoletin, a constituent of *Solanum lyartum*. *Archives of Pharmacological Research* **21/6**: 718- 722

65) Tanmahasamut P, Liu J, Hendry LB, Sidell N (2004) Conjugated linoleic acid blocks estrogen signaling in human breast cancer cells. **134/3** :674-80

66) Terao J, Kawai Y, Murota K (2008) Vegetable flavonoids and cardiovascular disease. *Asia Pac J Clin Nutr* **17/1**: 291-293

67) Tham DM, Gardner CD and Haskell WL (1998) Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemological, and mechanistic evidence. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **83/7**: 2223-2235

68) Thuong PT, Na M, Su ND, Seong RS, Lee YM, Sok DE and Bae K (2005) Inhibitory effect of coumarins from Weigela subsellis on low density lipoprotein oxidation, *Bio pharm Bull* **28/6**: 1095-1097

69) Van der Woude H (2005) The stimulation of cell proliferation by quercetin is mediated by the estrogen receptor**.** *Molecular nutrition and food research* **49/8**: 763-771

70) Vasconcelos MA, Royo VA, Ferreira DS, Crotti AE, Andrade e Silva ML, Carvalho JC, Bastos JK and Cunha WR (2006) *Journal of biosciences*. **61/7-8**: 477-482

71) Veld MGR, Zawadzka E, van den Berg JHJ, van der Saag PT, Rietjens IMCM and Murk AJ (2008) Food-associated estrogenic compounds induce estrogen receptor-mediated luciferase gene expression in transgenic male mice. *Chemico-Biological Interactions* **174/2**: 126-133

72) Wang H, Li YL, She WZ, Guo GQ, Jiang ZY, Cen YZ and Fan ZY (2007) Studies on antiproliferative effect of flavones compounds isolated from Yao herb medicines. *Journal of Chinese medical materials* **30/8**: 980-984

73) Wang H, Li YL, She WZ, Guo GQ, Jiang ZY, Cen YZ and Fan ZY (2007) Studies on antiproliferative effect of flavones compounds isolated from Yao herb medicines. *Journal of Chinese medical materials* 2007 **30/8**: 980-984

74) Wang MY, West BJ, Jensen CJ, Nowicki D, Su C, Palu AK, Anderson G (2002) Morinda citrifolia (Noni): A literature review and recent advances in Noni research. *Acta Pharacol Sin* **23/12:** 1127-1141

75) Weihua Z, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M and Gustafsson, JÅ (2000) Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc. Natl . Acad. Sci.* **97/11**: 5936 –5941

76) West BJ, Jensen CJ, Westendorf J and White LD (2006) A safety review of Noni Fruit Juice. *Yournal of Food Science* **71/8**: 100-106

77) Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama* **288/3**: 321-323

78) Yang NN, Venugopalan M, Hardikar S and Glasebrook A (1997) Correction: Raloxifene response needs more than an element. *Science* **275/5304**: 1245- 1249

11 Abkürzungsverzeichnis

^{3}H-E$_2$	mit Tritium markiertes Estradiol
AP	Alkalische Phosphatase
CPM	Counts per minute
DBD	DNA-Bindungs-Domäne
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DTA	(2*E*,4*Z*,7*Z*)-Dekatriensäure
DTT	Dithiothreitol
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen response element
FBS	fötales Kälberserum
FSH	Follikel-stimmulierendes Hormon
HAP	Hydroxylapatit
HCL	Salzsäure
HPLC	high performance liquid chromatography
HRT	hormon replacement therapy
ICI-182780	ein auch als Fulvestrant bezeichneter Estrogenrezeptor-Antagonist
KHK	koronare Kerzkrankheit
LBD	Liganden-Bindungs-Domäne
LH	Luteinisierendes Hormon
NaOH	Natronlauge
NF-kappaB	nuclear factor-kappa B
RP	reversed phase
WHI	Women's Health Initiative (WHI)

12 Danksagung

Mein Dank gilt vor allem Professor Dr. Westendorf, der mich während der gesamten Zeit dieser Arbeit unterstützt hat und dessen Betreuung stets eine große Bereicherung war. Außerdem möchte ich allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Abteilung für Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf und hierbei besonders Herrn Klaus Söhren danken, der mich nicht nur in den ER-Bindungstest eingewiesen, sondern auch durch häufige Diskussion und den daraus folgenden konstruktiven Vorschlägen zur Behebung so mancher Schwierigkeit beigetragen hat. Hierbei danke ich auch Frau Annette Kruge für ihre kompetente und stets freundliche Beratung und Anleitung.
Schließlich danke ich meinen Eltern, die mir durch ihre Liebe und Unterstützung stets geholfen haben, meine Ziele zu erreichen.

13 Persönliche Daten

Adresse:	Ahornweg 1 17373 Ueckermünde E-mail: andrezeglin@bundeswehr.org
Geburtsort:	Berlin
Geburtsdatum:	11.05.1978
Nationalität:	Deutsch

Schul-, Militär- und Hochschulausbildung

1985 – 1998	Grundschule und Gymnasium
1998 – 2000	militärische Ausbildung
2000-2006	Studium der Humanmedizin am Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Ärztliche Tätigkeit

12/ 2006 – 12/ 08	Weiterbildungsassistent für Psychiatrie am Bundeswehrkrankenhaus Berlin
seit 01/ 09	Truppenarzt im Sanitätszentrum Torgelow

Promotion

2002 – 2009	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Abteilung für Toxikologie