

Aus dem Institut für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie
Des Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. T. Eschenhagen

**Auswirkung von Pflanzenauszügen auf
Estrogenrezeptoren in U-2 OS/ ER α und ER β - sowie
hFOB/ER α -Zellen unter besonderer Berücksichtigung
der Extrakte aus *Morinda citrifolia* (Noni)**

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg
vorgelegt von
Swenja Katharina Lieberei
aus Braunschweig

Hamburg 2007

Angenommen vom Fachbereich Medizin

Der Universität Hamburg am: 05.11.2007

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Prof. Dr. J. Westendorf

2. Gutachter: Prof. Dr. E. H. Pfeiffer

3. Gutachter: Prof. Dr. A. Schaefer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	6
2. Thematische Einordnung der Arbeit	7
2.1. Phytoestrogene	7
2.2. Medizinische Themenorientierung der Doktorarbeit	13
2.2.1. Knochen	13
2.2.2. Osteoporose	14
2.2.3. Die Menopause	16
2.2.4. Hormonersatztherapie	17
2.2.5. Markergene	18
Alkalische Phosphatase	18
Interleukin-6	18
Von-Willebrand-Faktor	19
2.3. Pflanzen	19
2.3.1. Besenginster	19
2.3.2. Gartenbohne	19
2.3.3. Traubensilberkerze	20
2.3.4. Sojabohne	20
2.3.5. Noni	21
3. Material und Methoden	23
3.1. Extrakte der Pflanzen	24
3.2. Zellen	26
3.2.1. hFOB/ER α 9	26
3.2.2. U-2 OS/ER α und β	26
3.3. Alkalische Phosphatase Assay mit hFOB/ERα9 und U-2 OS/ERα und β-Zellen	27
3.3.1. Durchführung des Alkalische Phosphatase Assay	27
3.3.2. DNA Bestimmung	29
3.4. Realtime RT-PCR mit dem Light Cycler	29
3.4.1. Anbau der Zellen und RNA Isolation mit Trizol	29
3.4.2. Herstellung der cDNA	31
3.4.3. Realtime RT-PCR Durchführung und Auswertung mit RelQuant®	31

4. Ergebnisse	38
4.1. Alkalische Phosphatase Aktivität in U-2 OS/ERα und ERβ Zellen sowie in hFOB/ER α9 Zellen	38
4.1.1. hFOB Zellen	39
4.1.2. U-2 OS/ER Zellen	39
4.1.3. Auswirkungen der wässrigen Extrakte	40
4.1.3.1. in den hFOB-Zellen	40
4.1.3.2. in den U-2 OS/ER α und ER β -Zellen	41
4.1.4. Auswirkungen der ethanolischen Extrakte	43
4.1.4.1. in den hFOB/ER α 9-Zellen	43
4.1.4.2. in den U-2 OS/ER α und ER β	44
4.1.5. Auswirkungen weiterer Noni Extrakte	46
4.1.5.1. in den hFOB/ER α 9-Zellen	46
4.1.5.2. in den U-2 OS/ER α und ER β -Zellen	47
4.2. Regulation der Genexpression in U-2 OS/ERα und U-2 OS/ERβ Zellen untersucht mittels Realtime RT-PCR	49
4.2.1. Interleukin-6 (IL-6)	49
4.2.2. Alkalische Phosphatase (AP)	55
4.2.3. von-Willebrand-Faktor (vWF)	60
4.3. Zusammenfassung der Ergebnisse	64
4.3.1. Wirkung im APA	64
4.3.2. Wirkung auf die Genexpression, gemessen durch Realtime RT-PCR	65
4.3.2.1. AP	65
4.3.2.2. IL-6	66
4.3.2.3. vWF	66
5. Diskussion	67
5.1. Testverfahren und Probencharakteristik	67
5.2. Erfahrungen mit den Estrogen Testsystemen	68
5.3.: Aktivitätsregulierung durch Phytoestrogene: Alkalische Phosphatase	70
5.4: Realtime RT-PCR, Transkriptionsebene	71
5.5: Perspektiven	71
6.1. Zusammenfassung	73

6.2. Summary	74
7. Literaturverzeichnis	75
8. Anhang	85
8.1. Abkürzungsverzeichnis	85
8.2. Anhang zum Methodenteil	86
Danksagung	88
Lebenslauf	89
Erklärung	90

1. Einleitung

Phytoestrogene sind Stoffe, die in verschiedenen Pflanzen enthalten sind und hormonähnliche Wirkungen im Körper hervorrufen. Ihre Anwendung in Hinsicht auf Wechseljahresbeschwerden, Osteoporose, Herz-Kreislaufkrankungen und Krebs wird diskutiert (Metka M., 2001). Da Estrogene in der Hormonersatztherapie eine wichtige Rolle spielen, aber ebenfalls gezeigt werden konnte, dass eine verlängerte Exposition mit Estrogenen schwerwiegende Nebenwirkungen haben kann, (siehe unten) wird auch auf dem Gebiet der Phytoestrogene nach möglichen Alternativen gesucht.

In der vorliegenden Arbeit werden Auszüge verschiedener Pflanzen, für die bereits phytoestrogene Eigenschaften nachgewiesen wurden (Besenginster, Sojabohne, Gartenbohne und Traubensilberkerze, von Effenberger K., 2004), mit synthetisch hergestellten Estrogenen und Auszügen aus Noni (*Morinda citrifolia*), denen eine solche Phytoestrogenwirkung in der Volksmedizin zugeschrieben wird (Wang M., 2002), verglichen.

Für den experimentellen Nachweis der estrogenen Wirkung wird eine Osteosarkomzelllinie (Monroe et al. 2003), die mit jeweils einem der Estrogenrezeptoren (U-2 OS/ER α oder -ER β) stabil transfiziert wurden, sowie hFOB/ER α Zellen, als Beispiel für ein humanes Osteoblastenmodell, herangezogen.

In der Arbeit wird mit Hilfe eines Alkalischen Phosphatase Assays die Aktivität der Alkalischen Phosphatase, eines durch Estrogen induzierbaren Enzyms, nachgewiesen. Außerdem werden mit Hilfe der Realtime RT-PCR Markergene untersucht. Als molekulare Indikatoren werden Interleukin-6, Alkalische Phosphatase und der von-Willebrand-Faktor eingesetzt. Von diesen wurde im Versuch gezeigt, dass sich deren Aktivität durch Estrogenwirkung modulieren lässt (Effenberger K., 2004).

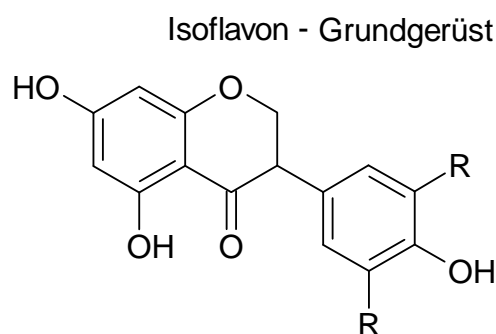
Das Ziel der Arbeit ist, über die Expression der Markergene und die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase Hinweise zu entdecken, ob und wie in den Pflanzenextrakten, speziell in den Extrakten aus *Morinda citrifolia*, Komponenten mit Wirkungen vorliegen, die einer der estrogenen Wirkung in positiver Hinsicht entsprechen.

2. Thematische Einordnung der Arbeit

2.1. Phytoestrogene

Phytoestrogene sind in Pflanzen enthaltene Stoffe die eine Affinität zu Estrogenrezeptoren aufweisen und dem endogenen Hormon Estradiol ähnliche Wirkungen entfalten können (Murkies A. et al., 1998; Tham D. et al. 1998, Knight D., 1995). Die estrogenähnlichen Wirkungen mancher Pflanzen wurden erstmals von Loewe et al. (Loewe S. et al., 1927) beschrieben. Nahezu alle Pflanzen enthalten solche Stoffe, aber vor allem über pflanzliche Nahrungsmittel wie Gemüse, Beeren, Hülsenfrüchte, Getreide und Samen kommt der Mensch mit diesen Substanzen direkt in Kontakt. Zu nennen wären hier Isoflavonoide, Lignane, Coumestane und Flavonoide. Es handelt sich um Diphenole, die eine Ähnlichkeit mit der Struktur des Estradiol haben.

Untersucht wurden bisher vor allem Isoflavonoide aus Soja. Diese Substanzen sind in ihrer natürlichen Verbreitung weitgehend auf Hülsenfrüchte begrenzt sowie im Wurzelstock der Traubensilberkerze zu finden. In diesen Pflanzen werden sie vor allem als biochemische Schutzkomponente gegenüber Pilzbefall gebildet. Oft sind sie nicht konstitutiv vorhanden, sondern werden durch Stressfaktoren induziert und dann in der Pflanze akkumuliert. Die vakuoläre Speicherform ist in der Regel das Glykosid bzw. unterschiedliche Glykoside. Wichtige Beispiele der Aglyka sind Genistein, Daidzein und Formononetin (Frohne D. und Jensen U., 1992, Kulling S. und Watzl B., 2003).



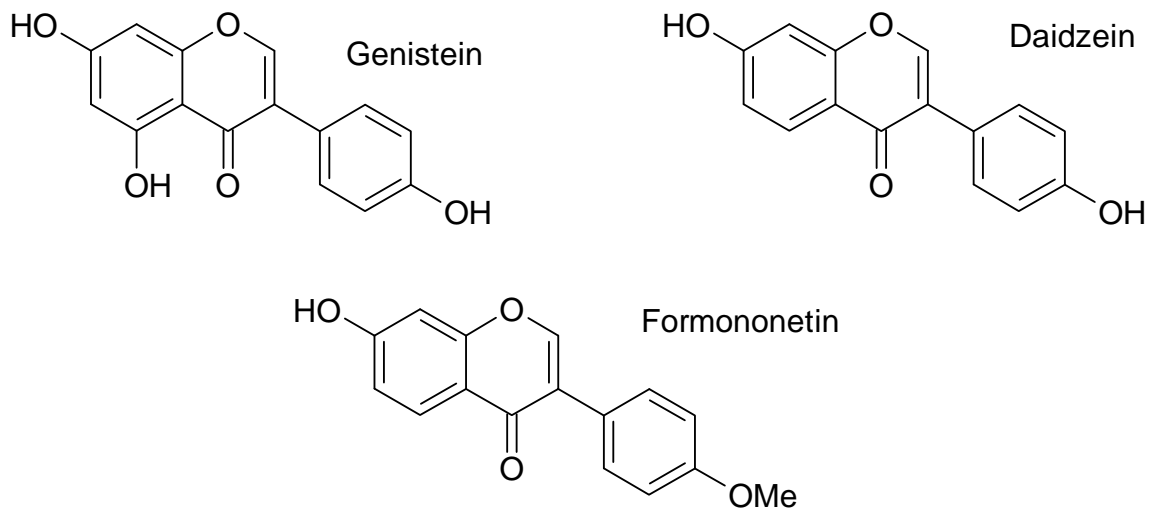


Abbildung 1: Isoflavon Grundstruktur und die drei häufigsten Isoflavonderivate: Genistein, Daidzein und Formononetin.

Lignane, eine von der Zimtsäure abgeleitete Stoffgruppe, haben ebenfalls hormonähnliche Wirkung. Sie kommen in unterschiedlichen Pflanzengruppen vor, so z.B. in Leinsamen, Nüssen und Roggen. Lignane weisen ähnliche Verknüpfungen des Grundbausteins Zimtsäure auf wie das Lignin, der Holzbaustoff der Pflanzen.

Coumestane, z.B. das Coumestrol, das die höchste estrogene Aktivität der bisher bekannten Phytoestrogene hat, finden sich in Sprossen z.B. in Soja, Klee und Alfalfa-Sprossen (Kulling S. und Watzl B., 2003), die Grundstruktur leitet sich vom Cumarin ab (Abbildung 2).

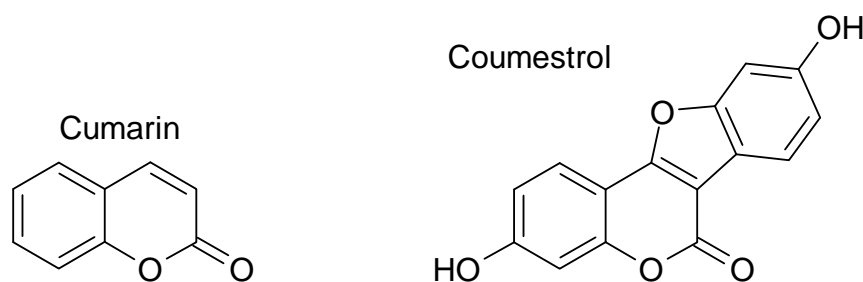


Abbildung 2: Cumarin, aus der Grundstruktur leiten sich die Coumestane ab, und Coumestrol, ein Coumestan

Flavonoide befinden sich in den oberirdischen Teilen von Blütenpflanzen. Sie sind in höheren Pflanzen die am häufigsten auftretenden sekundären Pflanzeninhaltsstoffe. Diese Stoffgruppe ist chemisch nicht mit den Steroiden verwandt, kann aber eine ähnliche Wirkung entfalten. Dies erklärt sich durch ihr Verhalten am Estrogenrezeptor. Sie haben die Aufgabe, den Blüten, Blättern und Früchten ihre Farbe zu verleihen und bieten der

Pflanze Schutz vor äußeren schädlichen Einflüssen, daher finden sich die höchsten Konzentrationen in den äußeren Blättern (z.B. bei Kohlgemüsen, Salaten) oder in den Schalen. Die Empfehlung, Äpfel nicht zu schälen oder Tomaten nicht zu häuten hat also durchaus ihre Berechtigung. Unter anderem sind sie auch im Wein, vor allem Rotwein, und Hopfen enthalten. Mittlerweile sind etwa 6500 Verbindungen bekannt, die zwar alle die gleiche chemische Grundstruktur besitzen, jedoch die unterschiedlichsten Eigenschaften aufweisen.

Sie werden vorbeugend gegen viele Krankheiten eingesetzt, haben immunmodulatorische Effekte, wirken gefäßstärkend, entzündungshemmend und krampflösend. Flavonoide verfügen über ein beträchtliches antioxidatives Potential und sind in der Lage, sehr reaktive Verbindungen, wie sie z.B. durch UV-Strahlung entstehen können (Sauerstoffverbindungen wie z.B. Superoxid und Hydroxylradikale, Stickstoffverbindungen wie z.B. Peroxynitrit), abzufangen und in verträglichere Verbindungen zu überführen, bevor die Zelle Schaden nehmen kann (Watzl B. und Rechkemmer G., 2001). Weiterhin sollen sie gegen Hitzewallungen helfen (Bowe J., 2006)

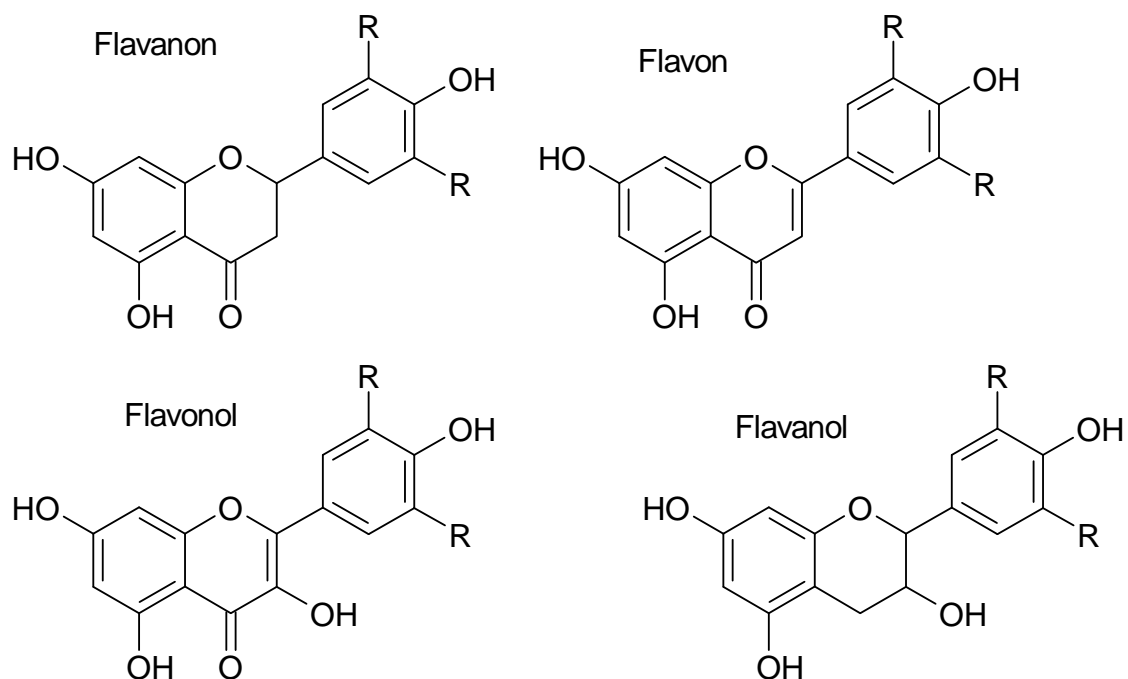


Abbildung 3: Beispiele für Strukturformeln der Flavonoide: Die meisten Flavonoide liegen in der Pflanze nicht frei vor, sondern als Flavonoidglykoside.

Einen kleinen Überblick mit Beispielen für die wichtigsten pflanzlichen Quellen der Phytoestrogene gibt Tabelle 1:

Tab. 1 Wichtige pflanzliche Quellen der Phytoestrogene

Struktur	Verbindung	Beispiele
Isolflavone	Daidzein	Soja, Büschelbohne
	Genistein	Soja, Besenginster, Lupinen, Hauhechel, Kleearten
	Formononetin	Traubensilberkerze, Süßholz, Hauhechel, Kleearten
Lignane	Secoisolariciresinol	Leinsamen, Roggen, Kampferbaum, Lärche, Lorbeerblätter, Brennesselwurzel, Fichte, Wasserfenchel
	Matairesinol	Leinsamen, Roggen, Kampferbaum, Wasserfenchelfrüchte
Coumestane	Coumestrol	Alfalfa, Soja, Kleearten
Flavanonderivate	Prenylnaringenin, Xanthohumol	Hopfen

Phytoestrogenen wird ein hemmender Effekt auf die Entstehung hormonabhängiger Tumoren, wie z.B. Brust- oder Prostatakrebs, zugesprochen (Sarkar F., 2003, Tham D. et al. 1998, Nikander E. et al. 2004). Vom Verzehr großer Mengen phytoestrogenhaltiger Nahrungsmittel wird aber abgeraten, da ein umgekehrter (steigernder) Effekt nicht ausgeschlossen werden kann (Zhang S. et al., 2003). Der angenommene positive Effekt der Phytoestrogene beruht hauptsächlich auf der Beobachtung dass bei Personengruppen, die sich traditionell phytoestrogenreich ernähren, die Häufigkeit von hormonabhängigen Tumoren niedriger liegt. Ein kausaler Zusammenhang ist jedoch noch nicht bewiesen.

Phytoestrogene liegen in der Pflanze glykosidisch gebunden vor. Sie werden erst durch die Spaltung zu Aglyka im Körper aktiv. Nach Aufnahme der Nahrung werden die Phytoestrogene im Darm durch die dort vorhandene Bakterienflora deglykosyliert und in der Folge oxidiert. Dann werden diese durch passive Diffusion (Aglyka, z. B. als Enterodiol bzw. Enterolacton aus Lignanen, Genistein, Daidzein und Formononetin aus Isoflavonoiden) oder spezifische Glukosetransporter (z. B. das Flavonol Quercetin) aufgenommen und in der Leber zu Metaboliten sulfatiert, glukuronidiert oder methyliert.

Auch die Metaboliten weisen estrogene Eigenschaften auf. Sie gelangen in den enterohepatischen Kreislauf und werden biliär bzw. mit dem Harn ausgeschieden (Metka M., 2001).

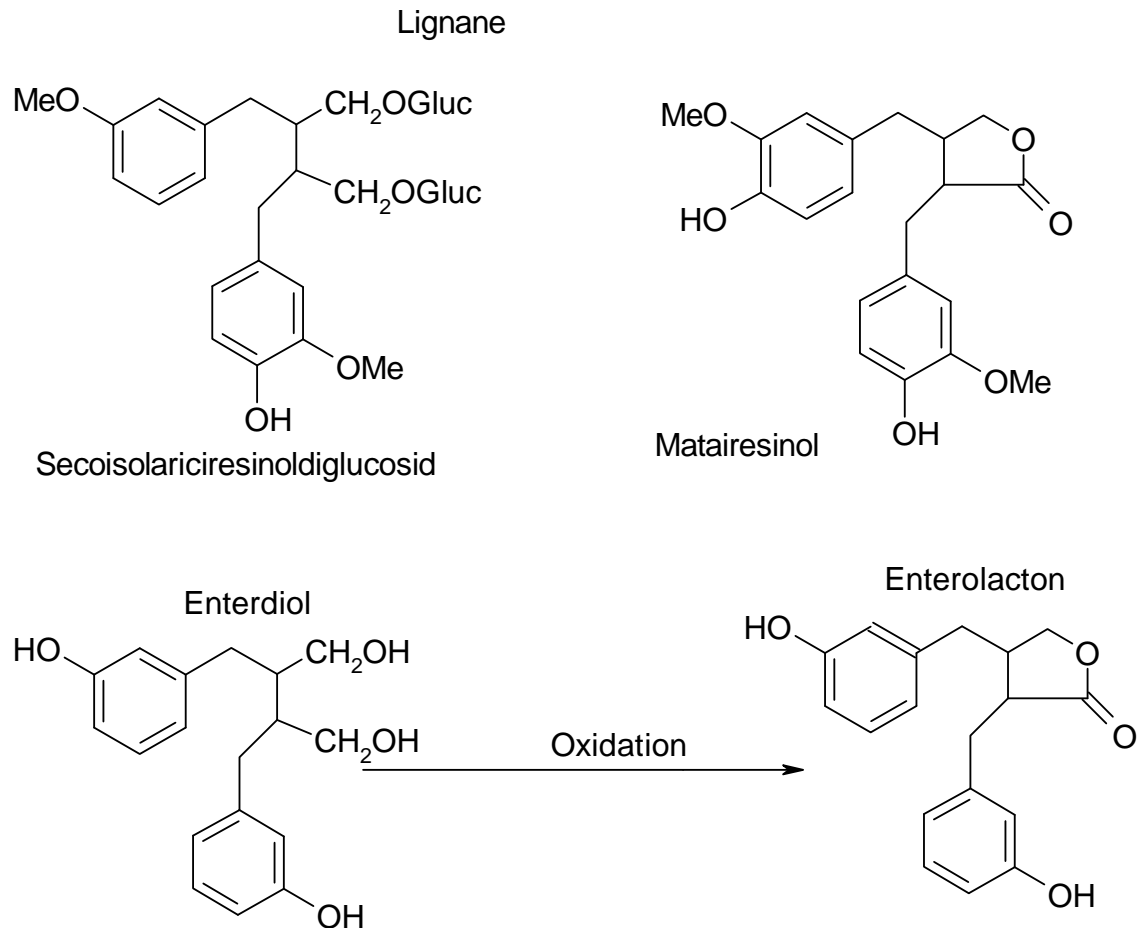


Abbildung 4: Lignane: Secoisolariciresinol ist ein in der Pflanze vorliegendes Glucosid, Matairesinol ist ein Aglycon. Sie werden durch Darmbakterien zu Enterolacton und Entrodiol umgewandelt und so resorbierbar. Enterolacton und Entrodiol haben estrogene Wirkung.

Im Körper wirken sie dann ähnlich wie das endogene Hormon Estradiol (E₂). Sie sind zwar um das 10² bis 10³-fache geringer wirksam, können jedoch in einer 100-fach höheren Konzentration im Körper vorhanden sein (Tham D. et al., 1998, Kulling S. und Watzl B., 2003). Sie vermögen als sogenannte SERM (Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren) die Wirkung des endogenen Hormons auf den Estrogenrezeptor zu imitieren, zu blockieren und/oder zu modulieren (Vollmer G. et al. 2004, Diez-Perez A., 2006). Sie sind konzentrationsabhängig und gewebespezifisch in der Lage estrogene und antiestrogene Wirkungen zu erzielen. So ist im *in-vitro* Versuch gezeigt worden, dass estrogene

Wirkungen am Knochen und antiestrogene Wirkungen im Brustgewebe erzielt wurden (Tham D. et al., 1998, Adlercreutz H. et al., 1995).

Dies wird durch die Eigenschaft erklärt, dass Phytoestrogene eine geringere Aktivität am Rezeptor auslösen als Estradiol. So wirken bei hoher E₂-Konzentration z. B. Isoflavone estrogenantagonistisch, bei niedrigen Spiegeln von E₂ aber wirken sie estrogenagonistisch (Zittermann A. 2003, Tham D. et al., 1998, Kulling S. und Watzl B., 2003). Die gegensätzlichen Wirkungen erklären sich zum Teil auch durch das Vorhandensein zweier Estrogenrezeptoren (ER α und ER β), welche in den verschiedenen Geweben und Organen in spezifischen Konzentrationen enthalten sind (Kulling S. und Watzl B., 2003, Nilsson S. und Gustafsson J., 2000, Couse J. et al., 1997, Kuiper G., 1997). Diese werden durch Estrogene unterschiedlich reguliert und scheinen je nach Gewebe, in dem sie sich befinden (Monroe D. et al., 2003), verschiedene biologische Aktivitäten auszuüben (Gustafsson J., 2000). So sind α -Rezeptoren vor allem in Leber, Brust, Ovarien, ZNS und Uterus (Diez-Perez A., 2006), β -Rezeptoren in Knochen, ZNS und im Herz-Kreislaufsystem (Endothel) (Metka M. 2001), aber auch an Urogenitaltrakt, Gastrointestinaltrakt, Ovarien, Prostata und Hoden (Kulling S. und Watzl B., 2003, Diez-Perez A., 2006) zu finden. Für zahlreiche Phytoestrogene wurde eine deutlich höhere Affinität zu β -Rezeptoren gefunden (An et al. 2001, Barkhem T. et al., 1998, Kuiper G. et al., 1997), was einen Vorteil gegenüber der Hormonersatztherapie (HRT) wäre, da natürliche und synthetische Estrogene wesentlich stärker an ER α binden. Es wird aber auch eine erhöhte Affinität von Genistein und Coumestrol zum ER α beschrieben (Kulling S. und Watzl B., 2003).

Neben der hormonähnlichen Wirkung werden den Phytoestrogenen noch weitere gesundheitsfördernde Wirkungen nachgesagt, zum Beispiel antioxidative Effekte (Tham D. et al., 1998). Genistein zum Beispiel induziert die als Radikalfänger fungierenden Enzyme Katalase, Superoxiddismutase und Glutathionperoxidase. Flavonoide hemmen die Superoxidanionenbildung und tragen so zum Zellschutz und zur Verzögerung der Apoptose bei (Metka M., 2001). In verschiedenen Studien konnte ein günstiger Effekt auf den Fett- bzw. Cholesterinstoffwechsel gezeigt werden (Knight D., 1995, Murkies A., 1998, Tham D. et al., 1998).

Isoflavone, besonders Genistein, inhibieren darüber hinaus in hoher Dosis Enzyme, die an der Wachstumsstimulation in der Zelle beteiligt sind und Cofaktoren der Kanzerogenese sind, wie die DNA-Topoisomerase II und die Tyrosinkinase (Boersma B., 2001). Dies hemmt

die Zellproliferation, kann aber auch in gesunden Zellen zu DNA-Strangbrüchen führen (Boos G., 2000).

In der Leber sollen Phytoestrogene, zum Beispiel Isoflavone und Lignane, die Bildung von SHBG (Sexual-Hormone-Binding-Globulin) induzieren und so zu einer Reduktion des im Blut vorhandenen endogenen Hormons sorgen (Wang L., 2002).

Es wurden auch antiangiogene Eigenschaften gefunden, (Kim M., 2003, Fotsis T. et al., 1997) besonders für Genistein, Apigenin, 3-Hydroxyflavon, 3'4'-Dihydroxyflavon, 2'3'-Dihydroxyflavon und Luteolin *in-vitro*. Die Neoangiogenese ist im Rahmen des Tumorwachstums ein wichtiger Faktor.

Ein Problem ist auch die in der Menopause auftretende Atrophie der Vaginalschleimhaut. Werden Phytoestrogene topisch verabreicht agieren sie wie Estrogene, indem sie eine Proliferation der Epidermis verursachen, die Kollagensynthese unterstützen, den enzymatischen Kollagenabbau verringern und so der Atrophie entgegenwirken.

2.2. Medizinische Themenorientierung der Doktorarbeit

2.2.1. Knochen

Der Knochen dient einerseits als Stützgewebe für Bewegung und Schutz im menschlichen Körper, andererseits hat er eine wichtige Funktion als Calcium- und Phosphationenspeicher. Er steht über verschiedene Mechanismen mit dem Extrazellularraum in Kontakt und spielt für die Homöostase der Elektrolyte eine sehr wichtige Rolle. Außerdem befindet sich das Knochenmark im Knochen. Es ist durch ihn als die Stätte der Blutbildung vor äußeren Einflüssen gut geschützt.

Ein langer Röhrenknochen, z. B. der Oberschenkelknochen, besteht makroskopisch zu 80% aus der Cortikalis oder Compakta, welche einen sehr hohen Mineralanteil (70%) hat und hauptsächlich für die mechanischen Aufgaben und das Längenwachstum verantwortlich ist. Im Inneren des Knochens befindet sich die Spongiosa, ein Gitterwerk feiner Knochenbälkchen, in welchem das blutbildende Knochenmark, das Fettmark und die Blutgefäße gut geschützt liegen. Die Spongiosa ist bei erwachsenen Menschen hauptsächlich in Sternum, Wirbelkörpern und den Epiphysen der langen Röhrenknochen zu finden.

Die Compakta ist in einzelne kleine Einheiten, die Osteone, gegliedert, welche sich aus einem Haverkanal mit Osteoblasten, Blutgefäßen und Nervenfasern zusammensetzen. Um

diese sind bis zu sechs Knochenschichtlamellen gelegt. Zwischen den Lamellen befinden sich Osteozyten. Die Zellen im Knochen stammen aus der Osteoblastenfamilie, zu der unter anderem auch die Osteoblasten gehören, von denen sich das Osteoblastom und das Osteosarkom ableiten.

Ausdruck einer vermehrten Aktivität der Osteoblasten ist die Erhöhung der Konzentration der von ihnen produzierten Alkalischen Phosphatase im Blutplasma (allerdings wird Alkalische Phosphatase auch in der Leber produziert).

Auch beim erwachsenen Menschen wird der Knochen noch ständig umgebaut. Dieser Umbau beginnt immer mit dem Abbau des Knochens. Am wichtigsten ist hierbei das Parathormon aus den Nebenschilddrüsen, welches die Osteoklasten aktiviert. Diese resorbieren ein Stück des Knochens (Howship-Lakune) von etwa 70µm Länge und geben vor ihrer Apoptose ein Signal an die Osteoblasten ab, welches diese auffordert, den Defekt aufzufüllen. Außer von diesem Signal werden die Osteoblasten auch von Estrogenen und TGF-β stimuliert (Löffler und Petrides 1997).

Im Knochen sind sowohl ERα als auch ERβ vorhanden, im kortikalen Knochen vor allem ERα, im spongiösen Knochen ERβ (Bord S., 2001).

Der sinkende Estrogenspiegel in der Menopause wirkt sich auch auf die Knochen aus. So treten bei postmenopausalen Frauen durch das Fehlen der anabolen Estrogenwirkung Wirbel- und Oberschenkelknochenbrüche wesentlich häufiger auf als bei Männern gleichen Alters. Hier kann die Hormonersatztherapie (HRT) helfen. Allerdings sind die Nebenwirkungen, bzw. Risiken beträchtlich (siehe unten). So wird auch hier die Alternative der Phytoestrogene in Betracht gezogen, besonders wegen ihrer Affinität zum β-Rezeptor (An J. et al., 2001, Barkhem T. et al., 1998, Kuiper G., 1998).

2.2.2. Osteoporose

Osteoporose ist der Verlust von Knochensubstanz (des Mineralanteils sowie des organischen Materials) über die altersphysiologische Norm hinaus. Meist findet er unbemerkt statt und zeigt sich erst durch das Brechen eines Knochens bei moderater Belastung. Häufig erkranken Frauen, es kann aber auch Männer betreffen. In geringerem Maß ist der Knochenabbau bei beiden Geschlechtern im Alter ein natürlicher Prozess. Jedoch kommt es bei Frauen häufig mit Absinken des Estrogenspiegels zu einem rascheren Abbau von Knochensubstanz und durch die geringere vorhandene Knochenmasse ist schneller ein kritischer Wert unterschritten. Es scheinen auch genetische Faktoren eine

Rolle zu spielen (Lehrbuch der Pharmakologie Burgis E. und Hoc S., 2003). Als Risikofaktoren an Osteoporose zu erkranken gelten:

- Gehäufte Fälle von Osteoporose in der Familie (genetische Veranlagung)
- Spätes Einsetzen der ersten Monatsblutung sowie frühes Einsetzen der Menopause
- Bewegungsmangel, Inaktivität
- Vitamin D und calciumarme- sowie phosphatreiche Ernährung
- Längere Einnahme von Glucocorticoiden
- Rauchen und übermäßiger Alkoholkonsum
- Untergewicht
- Entzündlich rheumatische Erkrankungen (z.B. Polyarthritits), Darmerkrankungen
- Estrogenmangel

Weiterhin spielt die kulturelle Herkunft und die während des Heranwachsens gebildete Knochenmasse eine Rolle (Kulak C., 1999; Scholz H. und Schwabe H., 2000).

Medikamentös gibt es keine kausale Therapie um das gestörte Gleichgewicht von Knochenab- und Aufbau zu regulieren. Die besten Wirkungen gegen den Knochenabbau konnten mit der Hormonersatztherapie erzielt werden. Sie verhindert den schnellen Knochenabbau, hat jedoch inakzeptable Nebenwirkungen (siehe unten). Es werden zur Therapie auch Bisphosphonate, Calcium, Vitamin D und Calcitonin eingesetzt. Sogenannte SERMs (Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren), hauptsächlich Raloxifen, wurden in Studien untersucht und auch schon angewendet (Hoc S. 2003).

Calcitonin wird hauptsächlich bei akuten, schmerzhaften Schüben eingesetzt. Es hat analgetische und zentralnervöse Effekte, zudem hemmt dieses körpereigene Hormon den Knochenabbau. Calcium und Vitamin D haben einen eher geringen Effekt. Calcium muss bereits vor Eintreten der Menopause eingenommen werden, damit ein Effekt nachweisbar ist. Trotzdem ist die ausreichende Versorgung wichtig, da bei calciumarmer Ernährung der Knochenabbau schneller voranschreitet. Durch Gabe von Bisphosphonaten (zum Beispiel Fosamax, Didronel, Actonel) in Kombination mit Calcium/Vitamin D₃, lässt sich die Häufigkeit von Frakturen deutlich reduzieren. Es werden die knochenabbauenden Zellen (Osteoklasten) weitgehend in ihrer Resorptionstätigkeit blockiert, aber auch die den Knochen aufbauenden Osteoblasten werden gebremst. Es kommt zu einer generellen Knochenumbauhemmung. Die Zahl der Knochenbrüche nimmt um die Hälfte ab. Andererseits kommt es jedoch zu einer Überalterung des Knochens mit Mikro- und Stressfrakturen.

SERMs (zum Beispiel Raloxifen, Tamoxifen, Phytoestrogene) zeigen diesen Nachteil nicht. Sie bieten eine physiologische Hemmung des Knochenab- und -umbaus und verschlechtern die Knochenqualität auch dann nicht, wenn mit ihnen die Osteoporose über lange Zeit behandelt wird. Dabei bleibt die Reparatur von Mikrofrakturen erhalten, und es kommt nicht zu deren Anhäufung wie unter Bisphosphonaten. Die Kristallstruktur und der Mineralisierungsgrad des Knochens und somit seine Elastizität blieben im physiologischen Bereich. Für Raloxifen sind an Nebenwirkungen bis jetzt Hitzewallungen, thromboembolische Ereignisse, periphere Ödeme, leicht erniedrigte Thrombozytenkonzentrationen und Wadenkrämpfe bekannt, ähnlich wie bei Einnahme von Estrogenen. Thromboembolien, eingeschränkte Leberfunktion einschließlich Cholestase, schwere Nierenschädigungen und ungeklärte Uterusblutungen gelten als Kontraindikation. Phytoestrogene scheinen auch eine positive Wirkung auf den Knochenstoffwechsel zu haben. Diese Wirkung muss aber noch in weitergehenden Studien untersucht werden (Tham D. et al., 1998, Lehrbuch der Pharmakologie Burgis E. und Hoc S., 2003).

Seit 1998 ist Raloxifen zur Prävention atraumatischer Wirbelbrüche bei postmenopausalen Frauen mit einem erhöhten Osteoporose-Risiko zugelassen. Es steigert nachweislich die Knochendichte der Hüfte und Wirbelsäule, jedoch nicht so stark wie es Bisphosphonate tun. In den bisherigen Studien wurde auch kein Anstieg der Brustkrebshäufigkeit verzeichnet, jedoch ist die Langzeitwirkung von Raloxifen auf das Brustkrebsrisiko nicht bekannt (Therapiehinweise des Bundesausschusses zu Raloxifen 2000).

2.2.3. Die Menopause

Die Wechseljahre einer Frau stellen einen natürlichen Vorgang dar. In dieser Zeit, meistens zwischen dem 45. und dem 55. Lebensjahr, stellt der Körper die Hormonproduktion ein und geht aus dem fortpflanzungsfähigen Alter über in die Phase der ovariellen Erschöpfung. Dies kann Wechseljahresbeschwerden in Form von depressiven Verstimmungen, Hitzewallungen, Schwitzen, Schlaflosigkeit, Nervosität, Reizbarkeit, Schwindel, Ängsten, Kopfschmerzen und Durchblutungsstörungen verursachen. Besonders ausgeprägt sind diese Beschwerden meistens in der Zeit der sogenannten Perimenopause, der Zeit, in der der Körper die ovarielle Funktion einstellt. Im weiteren Verlauf der eingestellten Hormonproduktion werden eine Abnahme der Knochendichte bis zur Osteoporose (siehe oben), Brust- und Genitalgewebeatrophien sowie eine Zunahme von Herz- und Kreislauferkrankungen beobachtet.

Die Zunahme der Herz-Kreislauf Erkrankungen ist auch auf sinkende HDL- und dann reflektorisch steigende LDL- Spiegel im Blut zurückzuführen. Phytoestrogenen wird nachgesagt, dass durch ihre agonistische Wirkung am ER β -Rezeptor eine Verschiebung in gegenteiliger Richtung stattfindet (Bailey C. et al., 2006).

2.2.4. Hormonersatztherapie

Die Hormonersatztherapie wird eingesetzt, um gegen Wechseljahresbeschwerden, Osteoporose und sogar vorbeugend gegen Herz- und Kreislaufprobleme zu helfen. Es wird entweder eine Kombinationstherapie von Estrogen- und Gestagenpräparaten oder eine Monotherapie mit Estrogen eingesetzt. Mögliche Verabreichungsformen sind Tabletten, Cremes (vaginal oder auf den Körper aufzutragen), transdermale therapeutische Systeme (TTS) oder Nasensprays. Die verschiedenen Applikationsformen haben u.a. Auswirkungen auf den Lipidspiegel im Blut. So wird durch das TTS der HDL-Spiegel leicht angehoben, der LDL-Spiegel leicht gesenkt und der Triglyzeridspiegel kaum beeinflusst. Durch Tabletten werden diese Effekte stärker induziert, aber auch der Triglyzeridspiegel angehoben (Fait T., 2002, Lamon-Fava S., 2003). Die lokale Anwendung als Vaginalcreme ist besonders bei atrophischer Vaginitis und trockenen Schleimhäuten eine sehr erfolgreiche Behandlungsform. Hier werden allerdings kaum Wirkungen auf Knochenstoffwechsel und auf das kardiovaskuläre System beobachtet.

Dass eine Hormonersatztherapie nicht nur Vorteile hat, wurde in unterschiedlichen, groß angelegten Studien gezeigt. So wurden z. B. in der „Million Women Study“ 53% der weiblichen Bevölkerung in Großbritannien im Alter zwischen 50 bis 64 Jahren untersucht (1.084.110 Frauen) (Stevenson J., 2003, Redaktion FAKT des Mitteldeutschen Rundfunks 2006). Hierbei wurde gezeigt dass bei einer Hormonbehandlung bei fünfjähriger Anwendung je nach Therapie 5-7 Brustkrebsfälle pro 1000 Frauen mehr auftraten als ohne Therapie. Zwar sollen Estrogene nicht an der Induktion der Tumoren beteiligt sein, wohl aber an deren Promotion (Dragan Y. et al., 1991).

Ähnliches wurde in der „Women's Health Initiative“ gezeigt, einer Studie mit 16.608 Frauen aus den USA. Sie wurde nach 5,2 Jahren vorzeitig abgebrochen, da sich in der Gruppe, die das Hormonpräparat bekam, ein Anstieg von Brustkrebs, Beinvenenthrombosen sowie Schlaganfällen, Herzinfarkten und Lungenembolien zeigte. Es wurde aber auch ein Abfall der Häufigkeit von Darmkrebs und Hüftfrakturen gezeigt, welcher aber insgesamt nicht die Tolerierung der Nebenwirkungen rechtfertigte (Rossouw J., 2002).

Die Nachfrage nach Alternativen ist groß, z.B. werden Phytoestrogene zu diesem Zweck untersucht. Es ist in verschiedenen Studien belegt, dass Phytoestrogene die Intensität und Häufigkeit von Hitzewallungen und anderen menopausalen Beschwerden lindern können (Adlercreutz H., 1992). Weiterhin wurde gezeigt, dass bei regelmäßiger Einnahme von Phytoestrogenen das Brustkrebs- (Thanos J. et al., 2006) und das Dickdarmkrebsrisiko (Cotterchio M. et al., 2006) sinken. Auf dem Markt sind vor allem verschiedene Zubereitungen aus Soja (Extrakte und Kapseln) und Traubensilberkerze (Extrakte und Tabletten), Rotklee- und Rhapontikrhabarber-Kapseln. Zugelassen sind in Deutschland zur Behandlung von Wechseljahresbeschwerden jedoch nur Traubensilberkerzenpräparate.

2.2.5. Markergene

Alkalische Phosphatase

Die Alkalische Phosphatase (AP) ist ein Schlüsselenzym für die Osteogenese, kommt aber auch in der Leber, den Gallenwegen im Darm und der Plazenta vor. Es hydrolysiert Phosphorsäureester. Es sind über 15 verschiedene Isoenzyme bekannt. Zu hohe Werte im Blut können ihre Ursache z.B. in Erkrankungen der Leber, der Galle, der Schilddrüse oder des Pankreas haben. Auch bei Knochenerkrankungen wie Osteomalazie, Knochenmetastasen, Hyperparathyreoidismus oder auch bei Knochenbrüchen ist der Wert der AP erhöht. Bei Osteoporose sind die AP-Werte üblicherweise im Normbereich. Kinder im Wachstum und Frauen im letzten Schwangerschaftsdrittel weisen oft erhöhte AP-Werte auf. Dies ist jedoch normal und liefert keinen sicheren Hinweis auf eine Erkrankung. Ein zu niedriger Gehalt an AP findet sich z.B. als Begleiterscheinung eines Vitamin-C-Mangels (Skorbut), als Folge einer Bypass-Operation, bei Schilddrüsen-Unterfunktion (Hypothyreose), Morbus Wilson oder schwerer Anämie. Im Osteoblastenmodell kann sie die Aktivität des Stoffwechsels der Zellen anzeigen (Löffler G. und Petrides P., 1997).

Interleukin-6

Interleukine sind körpereigene Botenstoffe des Immunsystems, von denen es mehrere Untergruppen gibt. Diese interagieren mit den verschiedenen Zellen des Immunsystems und sind maßgeblich an der Fieberentstehung beteiligt. Interleukin-6 (IL-6) wird von Monozyten/Makrophagen und Epithelzellen nach Bakterienkontakt oder Hypoxie gebildet und regt in der Leber die Synthese sogenannter Akut-Phasen-Proteine (z. B. C-reaktives-Protein) an (Löffler G. und Petrides P., 1997).

Von-Willebrand-Faktor

Der von Willebrand Faktor (vWF) ist ein multimeres Glycoprotein der Blutstillung. Es zirkuliert im Plasma im Komplex mit Faktor VIII, einem Gerinnungsfaktor. Der vWF wird von den Endothelzellen synthetisiert, von diesen in das Plasma sezerniert und auch in der subendothelialen Matrix deponiert. Sowohl der im Plasma frei vorkommende als auch der subendotheliale vWF ist für die Hämostase (Blutstillung) erforderlich (Löffler und Petrides 1997). Der vWF schützt den Faktor VIII vor einem vorzeitigen Abbau und vermittelt die Adhäsion von Thrombozyten an das subendotheliale Kollagen (Löffler G. und Petrides P., 1997, www.biotest.de, www.haemophilieportal.de). Es wurde gezeigt, dass der vWF auch ein sensibler Marker für die E₂-Regulation in U-2 OS/ER Zellen ist (Monroe D. et al., 2003; Effenberger K. 2004).

2.3. Pflanzen

2.3.1. Besenginster

Sarothamnus scoparius W.D.J. KOCH kommt in Mittel-, Süd- und Osteuropa vor und gehört in die Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütengewächse). Er wird bis zu zwei Meter hoch, hat rutenförmige, kantige Zweige, kleine Blätter und leuchtend gelbe Blüten. Alle Teile der Pflanze enthalten Alkaloide, weshalb der Besenginster als schwach giftig eingestuft wird. Flavonoide, insbesondere Isoflavonoide, und Tyramin sind als medizinisch relevante Inhaltsstoffe beschrieben. Hauptsächlich wird er zur Unterstützung von Kreislaufstörungen (verzögert AV-Überleitung, hemmt die Reizbildung im Herzen) und niedrigem Blutdruck verwendet, sowie als Diuretikum und Wehenmittel eingesetzt. Außerdem wurden Effekte auf die Darmperistaltik und das vegetative Nervensystem beschrieben, (www.heilpflanzen-suchmaschine.de). Es konnten ebenfalls phytoestrogene Eigenschaften nachgewiesen werden (Effenberger K., 2004).

2.3.2. Gartenbohne

Phaseolus vulgaris L., stammt ebenfalls aus der Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütengewächse). Beheimatet ist sie im westlichen Südamerika und in Mexiko, kommt aber heutzutage fast weltweit vor. Als Busch- (20-60cm hoch) oder Stangenbohne (1-4m hoch) wächst sie als einjährige Gemüsepflanze in vielen Gärten. Die dreizähligen Blätter sind gestielt und die kleinen Blüten sind gelblich oder weiß bis rosa-

violett. Die Hülsen enthalten das giftige Phasin, ein Lektin, welches die Schleimhaut des Gastrointestinaltraktes schädigt, jedoch durch Kochen zerstört wird. Medizinisch verwendet werden nur die von den Samen befreiten Hülsen, die harntreibend und blutzuckersenkend wirken sollen (Frohne D. und Jensen U. 1992). Auch hier konnten im Experiment phytoestrogene Eigenschaften nachgewiesen werden (Effenberger K., 2004).

2.3.3. Traubensilberkerze

Cimicifuga racemosa (L.) NUTT, aus der Familie der *Ranunculaceae* (Hahnenfussgewächse), stammt ursprünglich aus Kanada und den USA, wächst aber als Kulturpflanze auch in Europa. Die Staude wird bis zu 2m groß und hat kleine, weiße Blüten, die in länglichen Trauben angeordnet sind. Medizinisch verwendet werden nur die nach der Fruchtreife gesammelten Wurzeln. Sie enthalten das harzartige Cimicifugin und das Racemosin (eine Bitterstofffraktion), Flavonoide, Isoflavonoide, Phenolcarbonsäuren und Triterpenglykoside (Actein und Cimifugosid). Eingesetzt werden Traubensilberkerzenprodukte gegen Wechseljahresbeschwerden, prämenstruelles Syndrom und schmerzhafte Menstruationsbeschwerden. Bereits die nordamerikanischen Ureinwohner setzten es wegen der günstigen Wirkung auf psychovegetative Beschwerden wie Hitzewallungen, Schweißausbrüche, Reizbarkeit und Schlafstörungen ein. Es wird unter anderem auch ein positiver Effekt auf die urogenitale Schleimhaut und die Knochendichte beobachtet, ohne dass es dabei zu den unerwünschten Effekten einer Hormontherapie auf Gebärmutter oder Brustgewebe kommt (www.heilpflanzen-suchmaschine.de).

2.3.4. Sojabohne

Glycine max. (L.) MERR, auch aus der Familie der *Fabaceae* (Schmetterlingsblütengewächse), ist eine buschförmige, verzweigte, 50cm bis 2m hohe Pflanze. Sie wächst in China, Ostasien, Amerika und Europa und wird vor allem als Nahrungsmittel genutzt. Soja wird als Sojamilch, Sojaöl, Sojaquark (Tofu), Sojabohne und vieles mehr verwendet. Oft dient es als Fleischersatz. Sojaprotein wirkt cholesterinsenkend und enthält alle essentiellen Aminosäuren. Weiterhin sind in Soja Isoflavonoide enthalten. Soja soll bei Wechseljahresbeschwerden, bei Brustschmerzen vor Einsetzen der Monatsblutung (Mastodynie) sowie vorbeugend gegen Osteoporose, Brustkrebs und Prostatakrebs helfen (Kulling S. und Watzl B. 2003). Ein kausaler Zusammenhang ist jedoch nicht vollständig erwiesen, so dass diese Befunde mit Vorsicht interpretiert werden müssen.

2.3.5. Noni

Morinda citrifolia L., aus der Familie der *Rubiaceae*, stammt ursprünglich aus Südostasien (Indonesien) und Australien. Sie wächst heutzutage als Wildpflanze in vielen tropischen und subtropischen Gebieten, so auch am Rand der Regenwälder der französisch-polynesischen Inseln. Dort wurde sie vor über 2000 Jahren von Siedlern „eingeschleppt“, die diese Pflanze zu verschiedenen medizinischen Zwecken einsetzten. Es handelt sich um einen 3-6m hohen, immergrünen Baum oder Stauch mit elliptisch bis elliptisch-ovalen glänzenden 20-45cm langen und 7-25cm breiten Blättern mit 1,5-2mm langen, gestauchten Stielen. Etwa 75-90 tubulöse Blüten wachsen in eiförmig bis rundlichen Blütenständen, sind weiß und 10-30mm lang. Die Fruchtstände sind oval, 4-10cm lang, 3-4cm breit, erst grün und werden mit zunehmender Reife hellgelb bis weiß und weich (siehe Abb. 5). Sie setzen sich aus den aus Blüten entstehenden Einzelfrüchten zusammen und beinhalten in jedem Fruchtstand unterschiedliche Reifestadien (s. Abb.5). Sie haben eine knotige Oberfläche und können im Inneren verholzt sein. Da die reife Frucht recht unangenehm riecht und schmeckt werden die Früchte vor der vollen Reife verwendet. Die Samen sind dreieckig und in den Einzelfrüchten von einer Luftkammer umgeben.

Die Pflanze wird, außer zu medizinischen Zwecken, auch als Färbemittel (die Rinde rot, die Wurzeln gelb) (Wang M., 2002) und Notnahrung (Wang M., 2002) eingesetzt. Die Frucht wird roh mit Salz oder gekocht verzehrt (Wang M., 2002). Sie wird unter anderem auch Indian Mulberry, Cheese fruit oder Nono genannt. Noni werden unter anderem antibakterielle Aktivitäten gegen *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgani*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonellen* und *Shigellen* zugesprochen (Atkinson N., 1956, Zaidan M., 2005). Auch antivirale und antituberkulöse Effekte (American Chemical Society Press release 2000, Saludes J. et al., 2002) sowie anthelmintische Wirksamkeit (Raj R., 1975) werden beschrieben. Ebenso wurde in Untersuchungen eine analgetische (Younos C. et al., 1990), antioxidative (Wang M., 2001) und antiinflammatorische (Wang M., 2002) Wirkung gefunden. Auch ließen sich starke antioxidative Aktivitäten nachweisen (Calzuola I. et al., 2006). Es wird gesagt die Pflanzen, welche in Französisch Polynesien wachsen, hätten die beste Qualität (Heinicke R., 2001).



Abbildung 5: *Morinda citrifolia*, var. *citrifolia* Vom Blütenstand zur zusammengesetzten Frucht (Fruchtstand von Noni in unterschiedlichen Reifestadien) (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Johannes Westendorf)

Es sind drei verschiedene Varietäten von *Morinda citrifolia* bekannt, die meistverbreitete und meistverwendete Unterart ist die auf Tahiti und den Nachbarinseln wachsende *Morinda citrifolia* var. *Citrifolia*. Hier kann man zwei Haupttypen finden, einen mit großen Fruchtständen und ovalen Blättern und einen mit kleinen Fruchtständen und länglichen Blättern. Die zweite Varietät ist die *Morinda citrifolia* var. *potteri*, eine auf Hawaii wachsende Art mit grün-weißen Blättern. Die *Morinda citrifolia* var. *bracteata* ist eine in Indonesien und an den Küsten zwischen indischem und pazifischem Ozean vorkommende Form (Nelson S., 2006).



Abbildung 6: *Morinda citrifolia* var. *citrifolia*, Noni-Pflanze auf Hawaii bei Kona. Wächst auf Lavaboden (Abbildung mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Johannes Westendorf).

3. Material und Methoden

Zwei verschiedene Testsysteme wurden eingesetzt.

Das erste Testsystem ist ein Enzymassay, der Alkalische Phosphatase Assay (APA). Es werden U-2 OS/ ER α und ER β Zellen getestet sowie hFOB ER α 9 Zellen.

Das zweite System dient dem Nachweis von mRNA mittels PCR, hier werden die U-2 OS/ ER α und ER β Zellen untersucht. Die Markergene deren Expression geprüft wird, sind die Gene für die Alkalische Phosphatase, Interleukin-6 und den von-Willebrand-Faktor. Für alle drei Gene wurde eine Estrogensensibilität in den verwendeten Testsystemen beschrieben (Effenberger K., 2004; Effenberger K. et al., 2005).

3.1. Extrakte der Pflanzen

Mit dem APA untersuchte Extrakte:

Reihung der Proben nach der biologischen Extraktquelle unter Berücksichtigung der Polarität des Extraktionslösungsmittels:			
Probe:		Hergestellt:	Herkunft:
1. bis 3.	Noniblätter, wässriger Auszug, Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, getrocknet*	2g getrocknete, zerkleinerte Blätter 20ml mit kochendem Wasser übergossen 30 min ziehen lassen, gefiltert mit Faltenfilter, dann Spritzenfilter 22 μ	Malediven Tahiti Teebeutel der Firma TNI
4. bis 6.	Noniblätter, ethanolischer Auszug, Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, getrocknet*	2g getrocknete, zerkleinerte Blätter mit 20ml EtOH abs. über Nacht im Schwenker bei Zimmertemperatur schwenken lassen, gefiltert mit Faltenfilter, dann Spritzenfilter 22 μ m	Malediven Tahiti Teebeutel der Firma TNI
7.	Noniblätter, methanolischer Auszug, Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, (frisch/getrocknet)	Fraktion AqMeOH gelöst in 80% EtOH entspr. 100mg/ml	Tahiti, TNI
8.	Noniblätter, Hexan Auszug Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, (frisch/getrocknet)	Fraktion Hexan eingeengt, danach aufgenommen in EtOH abs. entspr. 100mg/ml	Tahiti, TNI
9.	Saft (TNI) gepresst Früchte fermentiert, d.h. lytische Prozesse** und oxidative Veränderungen*** in der Probe.	Saft der Firma TNI aus der käuflich zu erwerbenden Flasche	Tahiti, TNI
10.	Fruchextrakt EtOAc Früchte	EtOAc Gelöst in EtOH abs entspr 10mg/ml	Tahiti , TNI

Die Blätter werden von ausgebildeten Pflückern in Französisch Polynesien gepflückt, wobei darauf geachtet wird, dass nur tief dunkelgrüne Blätter ohne Beschädigung verwendet werden. (* Die Trocknung erfolgt in drehenden Trommeln, die auf 50°C erwärmt werden)(**Reaktionen wie Proteinabbau, Deglycosidierung, Esterspaltung) (***)insbesondere an phenolischen Substanzen)

Tabelle 2: Reihung der mit APA untersuchten Proben nach der biologischen Extraktquelle unter Berücksichtigung der Polarität des Extraktionslösungsmittels.

Mit Light Cycler untersuchte Extrakte:

Mit Realtime RT-PCR untersuchte Proben

Probe1 (Noni1)TNJ	Nonipüree, ethanolischer Auszug, EtOH abs	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe2 (Noni2)TNJ	Nonipüree, wässriger Auszug	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe3 (Noni3) TNJ	Noniblätter, ethanolischer Auszug, EtOH abs	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe4 (Noni4) TNJ	Noniblätter, wässriger Auszug	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe5 (CIM)	Cimicifuga racemosa, Droge (siehe unten)	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe6 (PHA)	Phaseolus vulgaris, Droge (siehe unten)	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe7 (SAR)	Sarothamnus scoparius, Droge (siehe unten)	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml
Probe8 (SOY)	Glycine max, Droge (siehe unten)	Eingesetzt in den Konzentrationen 10, 1 und 0,1 µl/ml

Tabelle 3: Proben, welche mit Realtime RT-PCR untersucht wurden

Herstellung der Extrakte der Referenzproben durch die Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe (Effenberger K., 2004)

CIM: 2kg Droge wurde mit der 10-fachen Menge 60%(m/V) Ethanol zweifach bei 50-60°C extrahiert, anschließend abgesaugt und die Extraktlösung vereinigt.

PHA: 2kg fein vermahlene Droge wurde zweimal mit der 7-fachen Menge Heptan eine Stunde bei 50°C extrahiert, zwischendurch auf 20°C abgekühlt und durch eine Nutsche abgesaugt. Nach Vereinigung der Extraktlösungen wurden diese zur Trockne eingengt und nachgetrocknet. Der Drogenrückstand wurde nun zweimal mit der 7-fachen Menge Ethylacetat 1 Stunde bei 50°C extrahiert und nach dem Abkühlen abgesaugt. Danach wurden die Extraktlösungen wiederum zur Trockne eingengt und nachgetrocknet.

SAR: 1kg fein vermahlene Droge wurde zwei mal mit der 7-fachen Menge Heptan 1 Stunde bei 50°C extrahiert, zwischendurch auf 20°C abgekühlt und durch eine Nutsche abgesaugt. Nach Vereinigung der Extraktlösungen wurden diese zur Trockne eingengt

und nachgetrocknet. Der Drogenrückstand wurde nun zweimal mit der 7-fachen Menge Ethylacetat 1 Stunde bei 50°C extrahiert und nach dem Abkühlen abgesaugt. Wiederum wurden die Extraktlösungen zur Trockne eingengt und nachgetrocknet.

SOY: Es wurde mit 2kg Sojaschrot eine zweistufige Wirbel-/Rührextraktion durchgeführt; das Verhältnis Droge zu Lösungsmittel (80%*m/V*) Ethanol) betrug 1:10. Anschließend wurde 5-10 min per Ultra-Turrax zerkleinert und für 1 Stunde bei 60°C eine Rührextraktion durchgeführt.

3.2. Zellen

3.2.1. hFOB/ER α 9

hFOB 1.19 und die daraus modifizierten hFOB/ER Varianten stellen ein homogenes Modellsystem zur Untersuchung humaner Osteoblasten dar.

hFOB 1.19 Zellen wurden aus einer Biopsie einer spontanen Fehlgeburt als primäre Kultur gezüchtet und mit einem temperatursensiblen Gen zur temperaturabhängigen Immortalisierung transfiziert (temperaturempfindliche Mutante ts58 des SV40 Large T Antigen) (Harris S. et al., 1995), so dass bei einer Temperatur um 33,5°C eine rasche Proliferation erfolgt, bei einer Temperatur um 39,5°C Zellteilung kaum noch stattfindet.

Für die hFOB/ER α 9 Zelllinie wurde in die ER-negativen hFOB1.19 Zellen das für den humanen ER α Wildtyp kodierende Gen sowie ein Gen für Hygromycinresistenz stabil transfiziert. Die Stabilisierung der Transfektanten wurde durch Hygromycinzugabe zum Kulturmedium initiiert und durch Ringklonen 14 Tage lang durchgeführt. (Harris S. et al., 1995). Der Subklon mit der höchsten Konzentration an funktionellem ER α wurde hFOB/ER α 9 genannt.

Die hFOB/ER α 9 Zelllinie wurden in einem ERE-TK Luciferase System auf ihre Sensitivität gegenüber Estrogen überprüft (Harris S. et al., 1995, Effenberger K., 2004).

3.2.2. U-2 OS/ER α und β

Das Zellsystem der U-2 OS Zellen leitet sich von den Zellen eines Oberschenkel Tumors eines 15-Jährigen Mädchens ab. Die sonst ER-negativen Zellen wurden von Monroe et al. 2003 mit dem T-RExTM System (Invitrogen) (siehe Anhang) mit doxycyclin-induzierbaren Estrogenrezeptoren ER α und ER β versehen, (Monroe D. et al., 2003). Dies bewirkt, dass das Zielgen nur unter der Anwesenheit von Doxycyclin (Dox) exprimiert

wird. So lässt sich die Wirkung der Substanzen eindeutig auf die Anwesenheit der Rezeptoren beziehen, da diese ohne Dox nicht exprimiert werden. Die Zellen lassen sich über einen langen Zeitraum ohne genetische Mutationen kultivieren.

Zellen auftauen und einfrieren

Die Zellen wurden als Stammkulturen bei -80°C gelagert. Für die Experimente wurden die Zellen aus der -80°C Gefriertruhe schnell im Wasserbad aufgewärmt und so rasch wie möglich in Flaschen mit warmem Medium (37°C) gegeben, bei hFOBs ausnahmsweise mit 20% FBS da die Zellen sehr empfindlich sind und sich sonst oft nicht erholen. Dann werden die Flaschen in den Brutschrank gestellt. Steril arbeiten ist erforderlich, um Pilzbefall der Zellkulturen zu vermeiden. Am folgenden Tag findet ein Mediumwechsel mit 10% FBS statt. Dann erfolgt alle 3-5 Tage ein Mediumwechsel.

Zum Einfrieren der Zellen werden diese trypsiniert, dann wird die Reaktion mit Serum abgestoppt. Anschließend werden die Zellen 5 Minuten bei 1000 Umdrehungen/Min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Je nach Zellzahl wird etwa 15ml kaltes Serum hinzugegeben, je 1 ml der Zellsuspension wird in Nunc Cryotubes (welche in Eis stehen) abgefüllt und pro Tube wird 10% DMSO hinzugefügt. Danach werden die Gefäße auf Eis gelagert und so schnell wie möglich auf -80°C gebracht.

3.3. Alkalische Phosphatase Assay mit hFOB/ER α 9 und U-2 OS/ER α und β Zellen

3.3.1. Durchführung der APA

Die hFOB/ER α 9 Zellen wurden nach dem Auftauen in Kultur bei 36°C , 5%CO₂, 90% relative Feuchte, im DMEM/F12 Medium (Sigma, St. Louis, MO) plus 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, MA) abwechselnd mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin (G418= Neomycin, Sigma) und 100 $\mu\text{g/ml}$ Hygromycin B (Invitrogen) im Wechsel alle 3 Tage bis zur nächsten Passage geführt, dann wurden sie bis zur Aussaat in die 96-well Platten nur noch mit DMEM/F12 Medium plus 10% FBS mit 300 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin behandelt, da sie sonst nicht überlebten.

Die Messung der Alkalischen Phosphatase erfolgte nach dem Protokoll von Sigma und der Beschreibung nach Robinson et al. (Robinson J. et al., 1997). Diese arbeitet nach dem Prinzip der Absorptionsmessung freien p-Nitrophenols, welches durch Phosphatabspaltung aus p-Nitrophenylphosphat bei Enzymanwesenheit im alkalischen Milieu entsteht und eine Gelbfärbung ergibt. Die Intensität der Gelbfärbung ist proportional zur AP-Aktivität.

Die Zellen der Passage 6-9 wurden mit einer Dichte von 5000/well auf eine 96-well Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 80% (am 3.-4. Tag) in DMEM/F12 mit 10 % FBS wachsen gelassen. Dann wurden die Zellen in Achterparallelen mit Substanzen (Noni Blätterauszüge und Saft in den Konzentrationen 0,01 µl/ml, 0,03 µl/ml, 0,1 µl/ml und 0,3 µl/ml bei den ethanolischen Lösungen, und 0,1 µl/ml, 0,3 µl/ml, 1 µl/ml und 3 µl/ml bei wässrigen den Lösungen und Kontrollen (Ethinylestradiol (EE), als synthetisches Estrogen, und E₂, immer frisch hergestellt in Konzentrationen von 10⁻⁸ M , reines Medium, Medium mit EtOH) behandelt und in Medium mit 10% cs-FBS (Sigma) drei Tage wachsen gelassen. Danach wurden die Substanzen und Kontrollen erneuert.

Am 6. Tag, welcher experimentell die am besten einsetzbaren Zellen brachte, wurden die Zellen zwei mal mit 100 µl PBS gewaschen und dann mit 25 µl Substrat Stammlösung (p-Nitrophenylphosphat- Substratlösung) und 25 µl alkalischem Puffer von Sigma (1,5M 2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH 10,3; Sigma Nr. 221) 30 Minuten im Inkubator bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion mit 100µl 0,05N NaOH abgestoppt und es folgte eine Messung im Hewlett & Packard Spectracount® bei 405nm. Beim Abstoppen der Reaktion ist darauf zu achten dass in der gleichen Reihenfolge abgestoppt wird, wie das Reagenz hinzugegeben wurde.

Anschließend folgte die DNA- Bestimmung, damit die Absorptionswerte nach DNA Gehalt normalisiert werden konnten. D.h. die Absorptionswerte der AP-Bestimmung wurden durch die der DNA-Bestimmung dividiert und nach Mittelwertbildung in Relation zur Negativ-kontrolle graphisch dargestellt. Die Auswertung der Signifikanz erfolgte mit dem Software Programm Statistika®.

Die Zellen U-2 OS/ERα und -β wurden zu 10.000/well in 96-well Platten in DMEM/F12 Medium (Invitrogen) mit 10% FBS und 1% Antimycotic/Antibiotic Solution (Invitrogen) und 5mg/l Blastocidin S (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) ausplattiert. Induktion der ER erfolgte durch 1 µg/ml Doxycyclin (Sigma) in DMEM/F12, 10% FBS und 1% Antimycotic/Antibiotic Solution. Am nächsten Tag wurde auf Medium mit 10% cs- FBS, 1µg/ml Doxycyclin und 1% Antimycotic/Antibiotic Solution umgesetzt.

Am dritten Tag wurde serumfreies Medium mit den Substanzen oder den Kontrollen bei 37°C für 48 Stunden inkubiert (Noni Blätterauszüge und Saft in den Konzentrationen 0,01 µl/ml, 0,03 µl/ml, 0,1 µl/ml und 0,3 µl/ml bei ethanolischen Lösungen, sowie 0,1 µl/ml, 0,3 µl/ml, 1 µl/ml und 3 µl/ml bei wässrigen Lösungen) und Kontrollen (EE und E₂ immer frisch hergestellt in Konzentrationen von 10⁻⁸M, reines Medium, Medium mit EtOH).

Dann wurde das Medium vorsichtig mit der Vakuumflasche abgesaugt, die Zellen mit 100µl PBS 2x gewaschen und mit 25 µl Substrat Stammlösung und 25 µl alkalischem Puffer von Sigma 15 Min im Inkubator bei 37°C inkubieren gelassen. Dann wurde die Reaktion mit 100µl 0,05N NaOH abgestoppt und es folgte eine Messung im Spectracount bei 405nm. Anschließend erfolgte die DNA- Bestimmung.

3.3.2. DNA Bestimmung

Zur Bestimmung der DNA wurde nach dem Protokoll von Molecular Probes mit dem Pico Green® dsDNA Quantitation Kit (P-7589) (Invitrogen) vorgegangen. Zuerst wurde eine Standard DNA Verdünnungsreihe hergestellt, mit 50.000, 40.000, 30.000, 25.000, 20.000, 15.000, 10.000, 5.000, 1.000 Zellen (absolute Anzahl), sowohl in den Zellen der Testsysteme als auch von der DNA Stock Lösung aus dem Kit, in den Konzentrationen 10µg/ml, 5 µg/ml, 2,5 µg/ml, 1,25 µg/ml, 0,625 µg/ml, 0,313 µg/ml, 0,156 µg/ml 0,078 µg/ml. Die Zellen wurden hierzu abtrypsiniert, gezählt und 4 Minuten bei 1000/Min Umdrehungen zentrifugiert, mit PBS gewaschen, noch einmal 4 Minuten bei 1600/Min Umdrehungen zentrifugiert und anschließend mit 150 µl TE-Puffer (hergestellt aus TE-Pufferkonzentrat von Invitrogen 1:20 verdünnt) eingefroren. Am folgenden Tag wurde nach Protokoll Pico Green Lösung (1:200 mit TE Buffer verdünnt) je well 50µl und DNA je 50 µl in schwarze 96-well Platten übertragen und nach 5 min inkubieren im Fluorocount® bei 485, 520 nm gemessen.

Mit den 96-well Platten des Alkalische Phosphatase Assays wurde genauso verfahren. Aus jedem Well wurden 50 µl entnommen und mit 50 µl Pico Green Lösung 5 min inkubiert, dann im Fluorocount gemessen. Die Messergebnisse des Alkalische Phosphatase Assays wurden durch die der DNA-Bestimmung korrigiert und anschließend wurden diese Werte auf die Negativkontrolle gleich 1 normalisiert.

3.4. Realtime RT-PCR mit dem Light Cycler

3.4.1. Anzucht der Zellen und RNA Isolation mit Trizol

Die U-2 OS Zelllinien werden auf 6-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 80% wachsen gelassen, dann wurden sie am ersten Tag mit Medium, 10% FBS und Doxycyclin behandelt. Am folgenden Tag wurden die Substanzen im Medium ohne FBS aber mit Doxycyclin in den Konzentrationen von 10 µl/ml, 1 µl/ml und 0,1 µl/ml eingesetzt, je 2 ml pro Well.

Am folgenden Tag fand die RNA Isolierung nach dem Protokoll der Phenolguanidin-isothiocyanat Methode statt, welche auf Subramaniam et al. (Subramaniam M. et al., 1995) zurückgeht. Hier muss man möglichst sauber und sehr sorgfältig arbeiten, da diese RNA im Anschluss als Transkriptionsvorlage für die zu messende cDNA dient. Die Zellen wurden zweimal mit je 500µl PBS gewaschen, PBS wurde gut abgesaugt, so dass möglichst keine Restflüssigkeit bleibt. Pro Well wurden 500 µl Trizol zugegeben, damit der ganze Boden bedeckt war. Nach einigen Minuten wurden die Zellen mit dem Zellschaber abgekratzt und in sterile 1,5 ml Eppendorf Gefäße überführt und gut durchgemischt. Nach ca. 5 Minuten bei Raumtemperatur fand eine vollständige Lyse der Zellen statt. Dann wurden 100 µl Chloroform dazugeben und 15 Sekunden auf dem Vortex durchgemischt. Es fand eine Zentrifugation bei 10000/Min Umdrehungen bei 4 C° statt. Die obere, klare Phase wurde abpipettiert und in neue Eppendorf 1,5 ml Gefäße gegeben (ca. 200-250 µl). Dazu wurden 300 µl Isopropanol gegeben und bei -20 C° vollzog sich die erste Fällung. Nach mindestens 24 Stunden wurden die Proben bei 4 C° 20 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand sehr vorsichtig abgesaugt. Pro Eppendorf Gefäß (1,5ml) wurden 300µl DEPC Wasser (1ml DEPC in 1l Aqua dest., über Nacht stehen gelassen, morgens autoklavieren) dazugegeben, alles zwei mal im Vortex gut durchgemischt und 100 µl 4 C° kalte 4M Lithiumchlorid Lösung (Sigma) hinzugefügt. Über Nacht wurden die Proben in den Kühlschrank (4 C°) gestellt, wobei die zweite Fällung stattfand. Am nächsten Tag wurde der Ansatz 20 Minuten bei 10000 x g zentrifugiert und der Überstand sehr vorsichtig abpipettiert. Dann wurden 300 µl DEPC Wasser hinzugeben, mit einer Pipettenspitze resuspendiert, 30 µl 3M Natriumacetat und 800µl Ethanol (EtOH) (etwa das 2 ½ -fache des Volumens) dazugegeben und kurz auf einem Vortex vermischt (ca. 15 Sekunden). Dann vollzog sich bei -20 C° (mind. 2 Stunden) die letzte Fällung. Darauf wurde erneut für 20 Minuten bei 10000 x g bei 4 C° zentrifugiert, der Überstand abgesaugt und unter dem Sterilabzug bei Raumtemperatur eintrocknen gelassen. Nachdem das restliche EtOH verdunstet war, wurden pro Eppendorf Gefäß (1ml) 30 µl DEPC Wasser hinzugeben, resuspendiert und 15 Sekunden im Vortex vermischt, kurz stehengelassen und noch einmal vermischt.

Die gewonnene RNA wurde 1:50 verdünnt und zur spektrometrischen Quantifizierung bei 260 und 280nm in einer Quarzküvette gemessen, die Relation A_{260}/A_{280} sollte 1,5-2,0 betragen, die RNA ist sonst unrein und zu verwerfen. Der RNA Gehalt wird nach folgender Formel gemessen:

$$\text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = [(A_{260}) \times (40 \mu\text{g}/\text{ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}(50)] / 1000$$

daraus lässt sich das Volumen errechnen welches 1 μg RNA entspricht:

$$V [\mu\text{l}] = 1 [\mu\text{g}] / \text{RNA} [\mu\text{g}/\mu\text{l}]$$

3.4.2. Herstellung der cDNA

Die so gewonnene RNA muss nun in cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkription). Wir benutzten einen 20 μl Reaktionsansatz pro Probe, wie bei Rickard et al. (Rickard D. et al., 1999) beschrieben. Auch hier ist darauf zu achten, steril und genau zu arbeiten. Jeweils 1 μg RNA wurde auf 8 μl mit DEPC Wasser ergänzt, dann wurde je 1 μl Random (100pmol/ μl Stock) (Promega) und 1 μl Oligo dT Primer (25 pmol/ μl Stock) (Promega) hinzugegeben. Das Gemisch wurde für 10 Minuten im Heizblock bei 70 C° erhitzt, dann 5 Minuten auf Eis gestellt. Es wurden 10 μl frisch hergestellter „Mastermix“ (siehe unten) hinzugefügt und dann alles im Heizblock für eine Stunde bei 42 C° erwärmt. Danach wurden pro Probe 20 μl DEPC Wasser hinzugefügt und die cDNA bis zur Weiterverwendung eingefroren.

Herstellen des „Mastermixes“:

Der erste Schritt ist das Herstellen der 20mM dNTP-Stocklösung aus 50 μl DEPC Wasser und je 50 μl eines 100mM Stocks von dATP, dTTP, dGTP und dCTP (Promega). Der Mastermix muss immer frisch hergestellt werden. Per Tube werden verwendet:

0,5 μl AMV Reverse Transkriptase (>10 Units) (Roche)

0,5 μl RNAsin (Promega)

2 μl 20mM dNTP Mix

4 μl 5X Puffer (Promega)

3 μl Wasser

3.4.3. Realtime RT-PCR Durchführung und Auswertung mit RelQuant®

Zu Beginn der PCR muss ein Realtime RT-PCR „Mastermix“ hergestellt werden. Hierbei ist zu beachten, dass die Substanzen alle gekühlt verwendet und in der richtigen Reihenfolge zusammengemischt werden. Pro Light Cycler Glaskapillare werden 18 μl Realtime PCR „Mastermix“ und 2 μl cDNA Template verwendet (unverdünnt oder 1:2 verdünnt, siehe Tabelle). Von jeder Probe wird eine Doppelbestimmung angefertigt. Beim Belegen der Light Cycler Glaskapillaren 1-32 und des Light Cycler Karussells (Position 1-32) ist darauf zu achten, die richtige Position mit der richtigen Probe zu bestücken, da das

RelQuant® Auswertungsprogramm sonst die Auswertung nicht vornehmen kann (Belegung wie folgt: 1+2 Kalibrator Zielgen, 3+4 Kalibrator β -Actin, 5+6 Probe 1 Zielgen, 7+8 Probe 1 β -Actin, ...). Nach dem Befüllen der Kapillaren werden diese im Roche Light Cycler Zentrifugenadapter Kühlblock Nr. 1909312 kurz zentrifugiert (ca. 15 Sekunden) um die Kapillarkräfte zu überwinden und dann der Nummerierung nach in das Light Cycler Karussell gestellt. Dann folgt die PCR im Light Cycler (Konditionen siehe Tabelle 5).

Nach der PCR folgt die quantitative Auswertung mit der kommerziell erhältlichen Auswertungssoftware RelQuant® (Relative Quantification Program, Firma Roche), sowie die qualitative Auswertung mittels der Schmelzkurve (siehe Abbildung 7). Für jedes untersuchte Gen, auch das Housekeeping-Gen, muss eine Verdünnungsreihe angefertigt werden, damit das RelQuant® Programm eine Grundlage für die Auswertung hat. Die Verdünnungsreihe wird mit der entsprechenden Menge Realtime RT-PCR Master Mix und der cDNA der jeweiligen Mediumkontrolle in den Verdünnungen 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 in Aqua dest. hergestellt. Aus dieser Verdünnungsreihe wird ein „Coefficient File“ (graphische Darstellung: Grade bzw. Ausgleichsgrade) erstellt, welcher eine Validierung des Systems für das jeweilige Gen darstellt.

Real-Time PCR Master Mix (*multiplier* = Anzahl Proben+1):

11,6 μ l x multipler H₂O (der Anteil DMSO in der Probe wird anstatt H₂O hinzugefügt)

2,4 μ l x multipler MgCl₂ Stock Solution (4mM im Endkonzentrat)

2 μ l x multipler Light Cycler FastStart Master SYBR Green I (als letztes hinzugeben)

1 μ l x multipler Primer forward (10pmol/20 μ l Reaktion)

1 μ l x multipler Primer reverse (10pmol/20 μ l Reaktion)

Mischung kurz vortexen, dann je 18 μ l in jede Light Cycler Kapillare geben.

Mit der RT-PCR lässt sich feststellen, wie viel mRNA (die vorher in cDNA umgeschrieben wurde) in den mit den Proben behandelten Zellen gebildet wurde. Es ist also ein Maß für die Genexpression. Die Realtime RT-PCR startet mit einem „Hot Start“, für 10 Minuten bei 95° C, dann folgen die für die einzelnen Gene leicht unterschiedlichen Temperaturzyklen, wobei nur die Temperaturen und Zeiten für das Annealing leicht differieren, das β -Actin läuft als Housekeeping-Gen bei dem jeweiligen Temperaturzyklus mit. Nach der Amplifikation wird eine Schmelzkurve erstellt (siehe Abbildung 7) indem ein Temperaturgradient von 95° C bis 65° C mit ca. 1° C /20 Sekunden gefahren wird. Am Schluss kühlt die Maschine das Reaktionsgemisch auf 40° C ab.

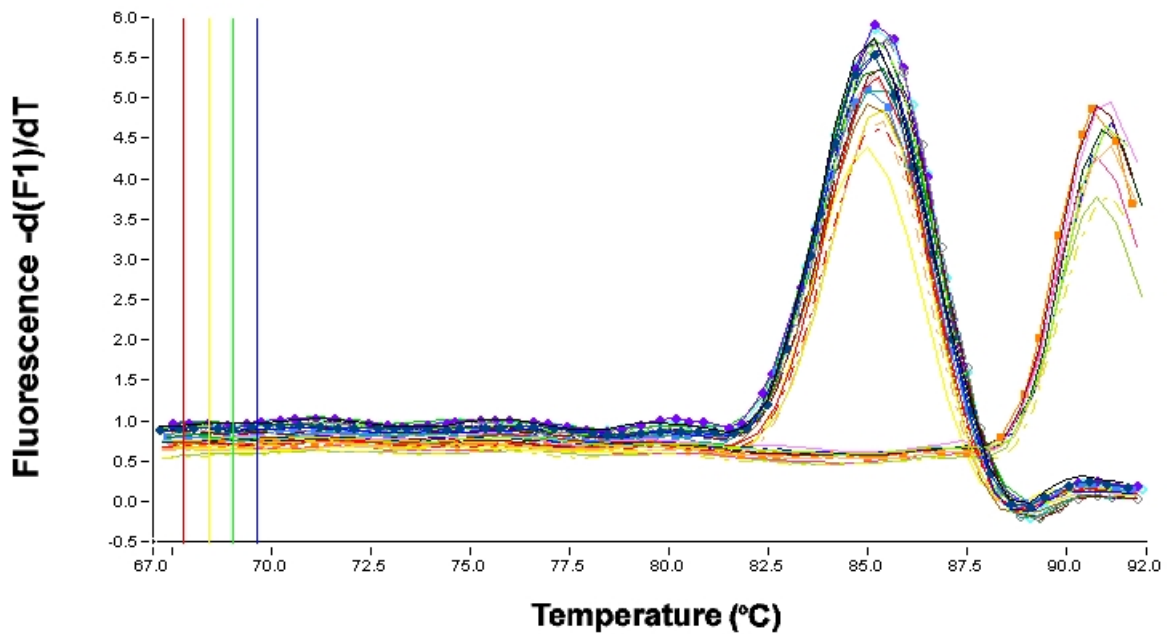


Abbildung.7: Schmelzkurve. Ist das Produkt rein, entsteht pro Produkt ein Peak. Dieser stellt den Schmelzpunkt des jeweiligen Produktes dar. Sind mehrere Peaks in einer Kurve vorhanden, ist das Produkt nicht rein. Hier z. B. die Schmelzkurve für AP(85°C, blaue Kurve) und β -Actin (91°C, gelb/grüne Kurve).

Der Light Cycler durchläuft 50 Zyklen, die Fluoreszenz wird jeweils am Ende eines Zyklus gemessen. So entsteht die sigmoide Kurve. Die gemessene Fluoreszenz wird auf dem Bildschirm des mit dem Light Cycler verbundenen Computers angezeigt.

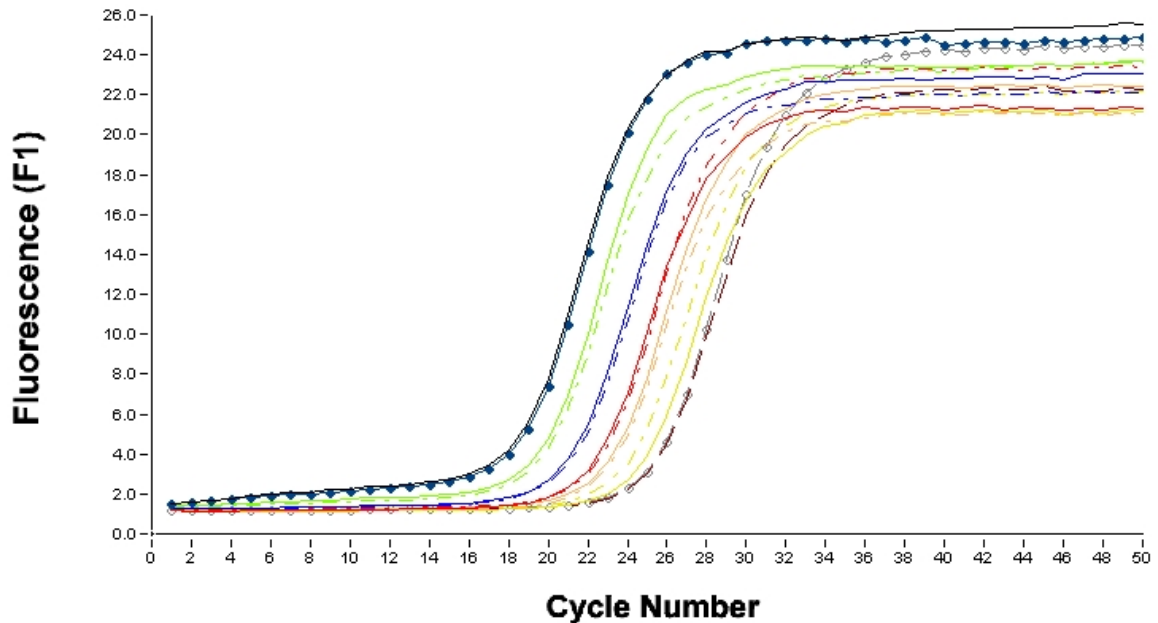


Abbildung 8: Verdünnungsreihe: zur Auswertung benötigt das RelQuant® Programm eine Verdünnungsreihe von jedem Produkt. Von links nach rechts betrachtet entsprechen die ansteigenden Kurven den Verdünnungen: DNA pur (1:1), dann 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100.

Der Unterschied der Realtime RT-PCR und der RT-PCR ist, dass mit der Realtime RT-PCR schon geringere Mengen an mRNA quantifiziert werden können. Außerdem benötigt diese Methode nur etwa die Hälfte der Laufzeit und es wird am Ende jedes Laufes eine Schmelzkurve („Melting Curve“) erstellt, anhand derer die Reinheit und Identität der Produkte überprüft werden kann. Gele müssen so kaum noch angefertigt werden, es sei denn zur genaueren Produktkontrolle. Es sollte nur einen Peak in der Schmelzkurve geben, ansonsten ist davon auszugehen, dass das Produkt verunreinigt ist. Es können z.B. Primerdimere entstanden sein. Ist dies der Fall, kann man dem Reaktionsgemisch DMSO hinzufügen (siehe unten). Da nach jedem Zyklus die entstandene Menge an Produkt quantifiziert wird, ist eine genaue Verfolgung des Amplifikationsverlaufes möglich. Das Gerät stellt die Produktmenge graphisch in einer sigmoid verlaufenden Kurve dar. Anhand dieser Kurven kann der „Crossing Point“ vom RelQuant® Auswertungsprogramm genau berechnet werden und so können sehr empfindlich kleinste Unterschiede an mRNA Gehalt festgestellt werden.

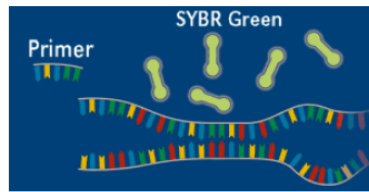
Der „Crossing Point“ wird für jeden Amplifikationsverlauf von der Light Cycler Software errechnet. Legt man eine Tangente durch den linearen Bereich im Wendepunkt der

sigmoiden Kurve an und verlängert diese auf die x-Achse erhält man den „Crossing Point“. Je mehr Template enthalten ist desto eher steigt die Amplifikationskurve an.

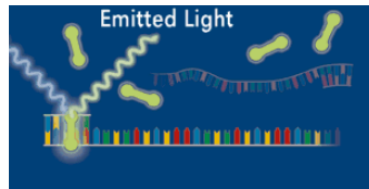
Die Phasen der Realtime RT-PCR sind dieselben wie in der herkömmlichen PCR. Auch hier gibt es Denaturierung, Annealing und Replikation, doch ist die Realtime RT-PCR mit 2 bis 15 Sekunden für diese Schritte schneller als die herkömmliche PCR mit 0,5-2 Minuten. Pro Replikation je 25 Basenpaare sollte etwa eine Sekunde veranschlagt werden (Effenberger K., 2004).

Das verwendete Gerät ist der Light Cycler der Firma Roche (Mannheim), die auch einen auf den Light Cycler zugeschnittenen „Hot Start“ Master Mix anbietet. Dieser enthält die zur PCR notwendigen Reagenzien, vor allem eine Taq Polymerase, eine modifizierte Form der thermostabilen rekombinanten Taq Polymerase, und einen DNA-interkalierenden Farbstoff (SYBR-Green I), welcher sich spezifisch in doppelsträngige DNA (dsDNA) einlagert. Bindet er an diese, wird seine Fluoreszenz stark erhöht. So können die entstandenen PCR-Produkte durch ihre Fluoreszenz quantifiziert werden. Die Taq Polymerase ist bei Raumtemperatur inaktiv, was durch hitzelabile Schutzgruppen an mehreren Aminosäuren erreicht wird. Durch sie wird die Entstehung unspezifischer Amplifikationsprodukte vermindert, da in der Temperaturphase, in der eine nicht-spezifische Primerbindung möglich wäre, keine Elongation stattfinden kann. Zum Abspalten der Schutzgruppen startet die Realtime RT-PCR mit einem 10 Minuten langen Abschnitt.

A.



B.



C.

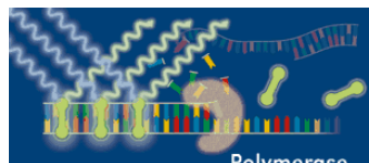


Abbildung 9: Phasen der Realtime RT-PCR

A: Denaturierung (Auftrennung der DNA Doppelstränge)

B: Annealing (bei entsprechender Temperatur docken die Primer an die entsprechenden DNA Abschnitte an, der für dsDNA spezifische SYBR Green Farbstoff bindet, dadurch wird die Fluoreszenz stark erhöht)

C: DNA Replikation (der SYBR Green Farbstoff der gebunden ist kann aufgrund der Fluoreszenz ermittelt werden)

Zur weiteren Erhöhung der Spezifität der Primerbindung wird dem Reaktionsgemisch 4mM Magnesiumchlorid zugefügt. Weiterhin lässt sich die Spezifität durch Zugabe von DMSO (Promega Notes Number 65, 1998) erhöhen. Dies bewirkt eine Schwächung der Basenpaarinteraktion, so dass die Primer nur an Sequenzen binden, zu welchen sie eine hohe Affinität haben (Cheng S. et al., 1994; Varadaraj K. et al., 1994). Als Nebenwirkung muss man mit einer Absenkung des Schmelzpunktes rechnen, da die DNA-Stränge schon bei geringeren Temperaturen wieder voneinander getrennt werden (Baskaran N. et al., 1996).

Als Housekeeping-Gen wird ein Gen verwendet, welches in möglichst allen verschiedenen Zelltypen konstitutiv und konstant gebildet wird. Hier wird das β -Actin verwendet.

Die Primer wurden synthetisiert von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland). Beim Design ist darauf zu achten, dass die Größe möglichst zwischen 150 und 200 Nukleotiden beträgt, und dass sie Exon-überspannend sind.

Tabelle 4: Primersequenzen für die Realtime RT-PCR

Gen	Primer Sequenz
h AP	For 5'-CCT CTC CAA GAC GTA CAA CAC C-3' Rev 5'-CGG GAA CGC TCA GTG GCT GCG C-3'
h IL-6	For 5'-TAC CCC CAG GAG AAG ATT CC-3' Rev 5'-GCC ATC TTT GGA AGG TTC AG-3'
h vWF	For 5'-GAT GGC TGT GAT ACT CAC TTC TGC-3' Rev 5'-CCC TCA GCC AGA CAC TTG TGT TC-3'
β-Actin	For 5'-TCA CCC ACA CTG TGC CCA TCT ACG A-3' Rev 5'-CAG CGG AAC CGC TCA TTG CCA ATG G-3'

Tabelle 5: Realtime PCR Konditionen. Jeder Lauf beginnt mit 95C° für 10 Minuten („Hot Start“).

Anmerkung: Trotz der höheren Annealing-Temperatur läuft das β-Actin bei der jeweiligen Temperatur des Markergens mit

Gen	Denaturierung		Annealing		Extension		Anmerkungen
	(C°)	(sec)	(C°)	(sec)	(C°)	(sec)	
AP	95	5	59	2	72	15	Proben 1:2, 5% DMSO
IL-6	95	5	54	3	72	15	Proben unverdünnt, 5% DMSO
vWF	95	5	58	2	72	15	Proben unverdünnt
β-Actin	95	5	62	2	72	15	Proben unverdünnt

Weitere Materialien für die Realtime RT- PCR

Light Cycler, Roche (Mannheim, Nr. 2011468)

Light Cycler – FastStart DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim, Nr. 2239264),
(ein Kit, welcher einen Mix für einen „Hot Start“ für den Light Cycler enthält)

Light Cycler Glaskapillare, Roche, (Nr. 1909339), ca 30µl Fassungsvermögen

Primer für AP, IL6, vWF und β-Actin, synthetisiert von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland)

Relative Quantification Software RelQuant®, Roche

4. Ergebnisse

4.1. Alkalische Phosphatase Aktivität in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen sowie in hFOB/ER α Zellen

Mit dem Zellsystem der U-2 OS/ER α und ER β Zellen sowie den hFOB/ER α Zellen wurde die Regulation der Alkalischen Phosphatase (AP)- Aktivität durch Estrogen (EE, E₂) und die verschiedenen Noni Extrakte (Proben, siehe Tabelle A und Material und Methoden) untersucht.

Reihung der Proben nach der biologischen Extraktquelle unter Berücksichtigung der Polarität des Extraktionslösungsmittels.

Tabelle 6: Reihung der Proben nach der biologischen Extraktquelle unter Berücksichtigung der Polarität des Extraktionslösungsmittels

Probe:			Herkunft:
1.	Noniblätter, wässriger Auszug	Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, getrocknet*	Malediven
2.			Tahiti
3.			Teebeutel
4.	Noniblätter, ethanolischer Auszug	Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, getrocknet*	Malediven
5.			Tahiti
6.			Teebeutel
7.	Noniblätter, methanolischer Auszug	Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, (frisch/getrocknet)	Tahiti, TNI
8.	Noniblätter, Hexan Auszug	Reife und physiologischer Zustand nicht bekannt, (frisch/getrocknet)	Tahiti, TNI
9.	Saft (TNJ) gepresst	Früchte fermentiert, d.h. lytische Prozesse** und oxidative Veränderungen*** in der Probe	Tahiti, TNI
10.	Fruchtextrakt EtOAC	Früchte	Tahiti, TNI

Die Blätter werden von ausgebildeten Pflückern in Französisch Polynesien gepflückt, wobei darauf geachtet wird, dass nur tief dunkelgrüne Blätter ohne Beschädigung verwendet werden. (* Die Trocknung erfolgt in drehenden Trommeln, die auf 50°C erwärmt werden)(* *Reaktionen wie Proteinabbau, Deglycosidierung, Esterspaltung) (***)insbesondere an phenolischen Substanzen)

Die eingesetzten Proben lassen sich bezüglich der potentiell vorhandenen und extrahierten Wirkstoffe in eine Reihung bringen. Diese ist in Tab.7 dargestellt.

Tabelle 7: Reihung der Proben nach Polarität des Extraktionsmittels

Höchste Polarität: (wässrige Auszüge)	Probe 1-3
(Saft)	Probe 9, Veränderung durch Fermentation (z.B. Glycosidabbau, oxidative Prozesse, d.h. Veränderung der phenolischen Inhaltstoffe)
Hohe Polarität: (methanolischer Auszug)	Probe 7
Mittlere Polarität: (ethanolische Auszüge)	Probe 4-6
Niedrige Polarität: (EtOAc Auszüge)	Probe 8
Niedrigste Polarität: (Hexan Auszüge)	Probe 10

4.1.1. hFOB Zellen

Die AP ist ein Marker für Knochenformation (*in vivo*) und ebenfalls für die Ausdifferenzierung der *in vitro* Zellsysteme (Waters K. et al., 2001), daher sollte bei den hFOB/ER α 9 Zellen möglichst in einer späten Differenzierungsphase gemessen werden (Effenberger K., 2004). Die Differenzierungsphasen sind bei der hFOB/ER α 9 Zelllinie früh / mittel / spät an Tag 4 / 11 / 21 festgestellt worden (Effenberger K., 2004). In der späten Phase war aber die Reproduzierbarkeit der Testergebnisse nicht gegeben. Der experimentell ermittelte bestmögliche Zeitpunkt zur Messung der AP-Aktivität ist der 8. – 10. Tag.

Die Behandlung der hFOB/ER α 9 Zellen mit 10⁻⁸M EE führte zu einem Anstieg der AP-Aktivität um das 2,7-fache gegenüber der Mediumkontrolle, die Behandlung mit 10⁻⁸M E₂ führte zu einem 2,8-fachen Anstieg. Der AP-Aktivität der Mediumkontrolle (Negativkontrolle) wird im Diagramm der Wert 1 zugeordnet. Alle ermittelten Ergebnisse werden auf die Mediumkontrolle normalisiert.

4.1.2. U-2 OS ER Zellen

Die U-2 OS Zelllinien sind ursprünglich Zellen, welche keine eigenen Estrogenrezeptoren exprimieren. Sie wurden je mit den doxycyclininduzierbaren Estrogenrezeptoren ER α oder ER β stabil transfiziert. Je Zelllinie werden beide Rezeptoren in gleicher Konzentration exprimiert (Monroe D. et al., 2003, siehe auch Material und Methoden).

Sie eignen sich somit für die auf die isoformspezifische Wirkung (ER α oder ER β) bezogene Forschung. Die Estrogen-agonistischen und -antagonistischen Effekte der pflanzlichen Substanzen können im Vergleich zu der Wirkung von EE und E₂ untersucht

werden. Es wurde in dieser Arbeit auch die AP-Aktivität bei U-2 OS Zellen ohne Zugabe von Doxycyclin untersucht. Hier zeigte sich keinerlei AP-Aktivität in allen Proben. Auch EE und E₂ hatten keinerlei Effekt. Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die gemessenen Effekte estrogenrezeptorvermittelt sind.

Die Behandlung der U-2 OS/ER α Zellen mit 10⁻⁸M EE führte zu einem Anstieg der AP-Aktivität um das 3,9-fache gegenüber der Mediumkontrolle. Die Behandlung mit 10⁻⁸M E₂ führte zu einem 4-fachen Anstieg. Die Behandlung der U-2 OS/ER β Zellen mit 10⁻⁸M EE führte zu einem Abfall der AP-Aktivität auf das 0,75-fache, die Behandlung mit 10⁻⁸M E₂ führte zu einem Abfall auf das 0,6-fache gegenüber der Mediumkontrolle. Der AP-Aktivität der Mediumkontrolle wird im Diagramm der Wert 1 zugeordnet, alle ermittelten Ergebnisse werden durch die Mediumkontrolle normalisiert (siehe Abbildungen 10 bis 15, Seite 42 bis 48).

4.1.3. Auswirkungen der wässrigen Extrakte

4.1.3.1. in den hFOB-Zellen

Die wässrigen Substanzen wurden in einer Konzentration von 0,3 – 10 μ l/ml eingesetzt. Der Extrakt aus Noniblättern von den Malediven zeigte einen konzentrationsabhängigen Anstieg der AP-Aktivität auf das 1,65-fache der Mediumkontrolle. In der hohen Konzentration (10 μ l/ml) war die Stimulation der AP-Aktivität schwächer (auf das 1,2-fache) (Abbildung 10).

Bei den Extrakten der Noniblätter von Tahiti zeigte sich keine signifikante Steigerung der AP-Aktivität, ebenso wie bei dem eingesetzten Nonisaft (siehe Tabelle 8).

Bei dem Extrakt aus dem käuflich zu erwerbendem Nonitee stimulierte die geringste Konzentration (0,3 μ l/ml) die AP-Aktivität am stärksten. Die Stimulation fiel konzentrationsabhängig ab, vom 1,6-fachen der Mediumkontrolle auf das 1,2-fache (10 μ l/ml).

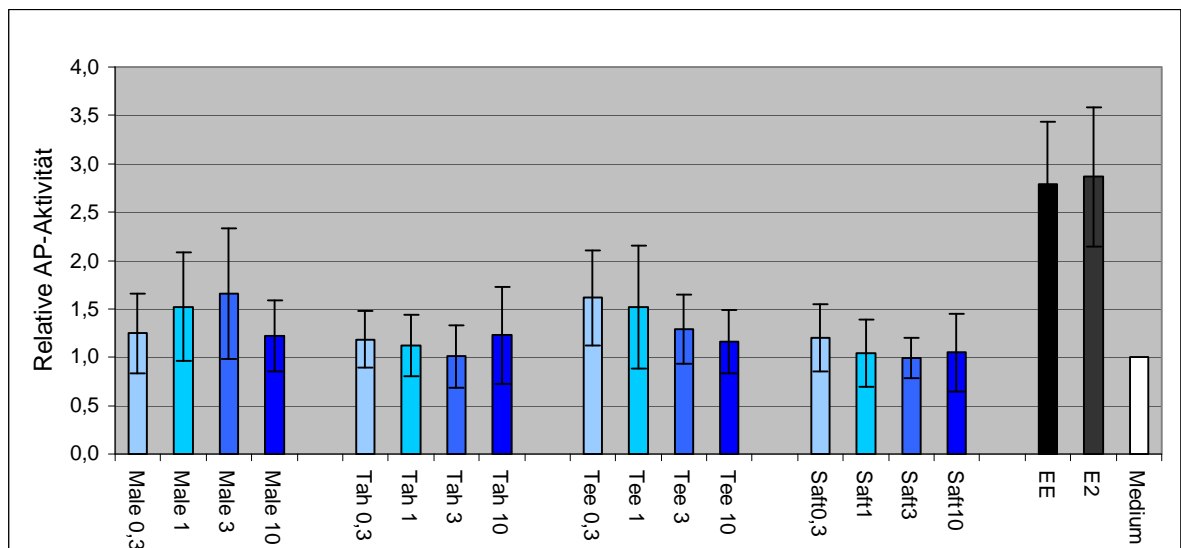


Abbildung 10: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in hFOB/ER α Zellen durch EE, E₂ und wässrige Extrakte.

Tabelle 8: Auswirkung der wässrigen Extrakte auf hFOB/ ER α 9-Zellen

Resultate:	
Probe 1 (Malediven)	Stimulation, mit ansteigender Konzentration bis max. Wert, dann weniger Stimulation
Probe 2 (Tahiti)	Keine signifikante Wirkung
Probe 3 (Tee)	Steigerung der AP-Aktivität bereits bei geringster Konzentration, dann zur steigenden Konzentration weniger stark
Probe 9 (Saft)	Keine signifikante Wirkung

4.1.3.2. in den U-2 OS/ER α und ER β -Zellen:

Die wässrigen Substanzen wurden in Konzentrationen von 0,3 – 10 μ l/ml eingesetzt. Der Extrakt aus Noniblättern von den Malediven zeigte sowohl bei den U-2 OS/ER α als auch bei den ER β Zellen einen nicht signifikanten Anstieg der AP-Aktivität in der niedrigsten Konzentration, dann einen leichten Abfall der AP-Aktivität mit steigender Konzentration. Bei den U-2 OS/ER α Zellen geht die Aktivität auf den Wert der Mediumkontrolle zurück, bei den U-2 OS/ER β Zellen wird die AP-Aktivität signifikant unter das Niveau der Negativkontrolle (auf das 0,72-fache) abgesenkt (Abbildung 11).

Bei den Extrakten aus den Noniblättern von Tahiti zeigte sich in den U-2 OS/ER α Zellen in allen Konzentrationen eine leichte, signifikante Steigerung der AP-Aktivität (auf das

1,2-1,3-fache). Bei den ER β Zellen ist in der 0,3 μ l/ml Konzentration eine Steigerung der AP-Aktivität um das 1,5-fache der Mediumkontrolle zu verzeichnen, in den anderen Konzentrationen gab es keine signifikanten Änderungen der AP-Aktivität.

Bei dem Extrakt aus dem käuflichen Nonitee von TNI ist bei den ER α Zellen in den beiden höchsten Konzentrationen ein nicht signifikanter Anstieg der AP-Aktivität zu erkennen. Bei den ER β Zellen ist in den niedrigsten Konzentrationen ein Anstieg der AP-Aktivität auf das 1,5-fache zu verzeichnen, dann fällt die AP-Aktivität auf das 1,2-fache der Mediumkontrolle ab.

Der Nonisaft führt bei beiden Zelllinien zu einer Stimulation der AP-Aktivität, konzentrationsabhängig ansteigend bis auf den 1,4-fachen Wert der Kontrolle bei ER α Zellen und den 1,65-fachen bei ER β Zellen.

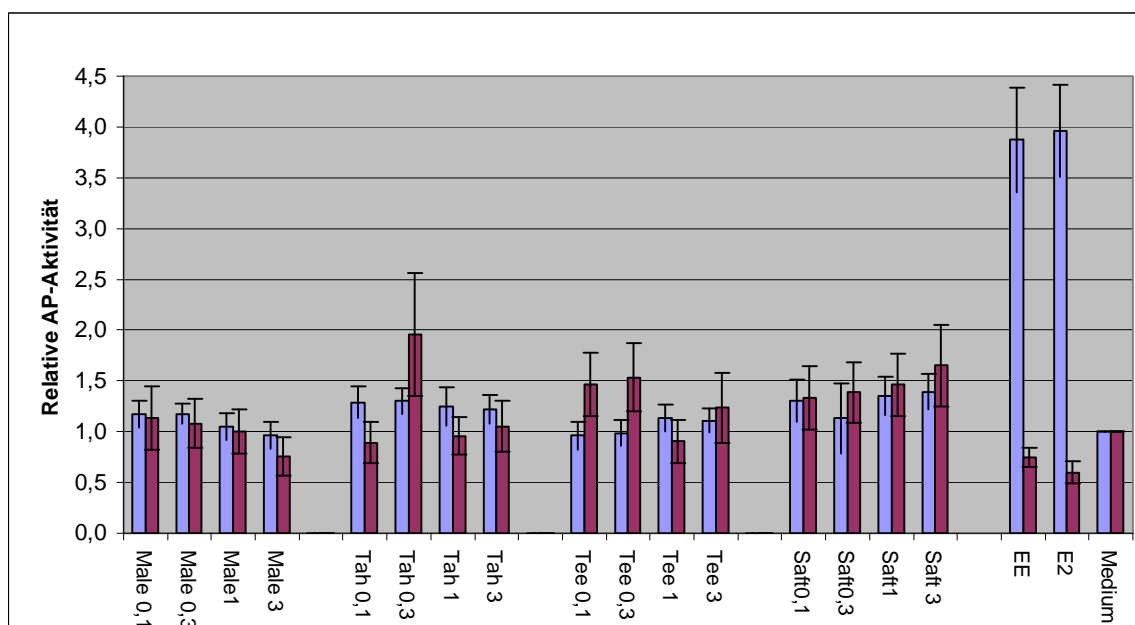


Abbildung 11: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in U-2 OS/ER α (blau) und U-2 OS/ER β Zellen (lila) durch EE, E₂ und wässrige Noni Blatt-Extrakte.

Tabelle 9: Auswirkung der wässrigen Extrakte auf U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 1 (Malediven)	Keine signifikante Wirkung
Probe 2 (Tahiti)	Schwach stimulierender Effekt
Probe 3 (Tee)	Keine signifikante Wirkung
Probe 9 (Saft)	Schwach stimulierender Effekt

Tabelle 10: Auswirkung der wässrigen Extrakte auf U-2 OS/ ER β

Resultate:	
Probe 1 (Malediven)	In höchster Konzentration Hemmung der Enzymaktivität
Probe 2 (Tahiti)	Signifikante Steigerung der AP-Aktivität nur in mittlerer Konzentration (reproduzierbar!), sonst keine Wirkung
Probe 3 (Tee)	In den beiden niedrigsten Konzentrationen Stimulation der AP-Aktivität
Probe 9 (Saft)	Stimulierender Effekt, bereits bei geringster Konzentration, dann mit steigenden Konzentrationen ansteigend

4.1.4. Auswirkungen der ethanolischen Extrakte

4.1.4.1. in den hFOB/ER α 9 Zellen:

Die ethanolischen Auszüge wurden in Konzentrationen von 0,01–0,3 μ l/ml untersucht. Bei dem Auszug der Malediven-Noniblätter ist in den Proben mit der niedrigsten Konzentration die AP-Aktivität auf das 1,3-fache der Mediumkontrolle erhöht, in den höheren Konzentrationen fällt die AP-Aktivität auf das Level der Mediumkontrolle (Abbildung 12).

Die Blätter der Nonipflanze von Tahiti stimulieren ebenfalls in der 0,01 μ l/ml Konzentration am stärksten (1,7-fach), inhibieren aber in den steigenden Konzentrationen die AP-Aktivität (0,7 bei 0,03 μ l/ml, 0,75 bei 0,1 μ l/ml und 0,85 bei 0,3 μ l/ml).

Der ethanolische Auszug aus dem Tee der Fa. TNI steigert die Aktivität der AP auf das 2,2-fache der Mediumkontrolle und ist damit fast so stark induzierend wie EE (2,7-fach). Bei steigender Extraktkonzentration sinkt die AP-Aktivität. Bei Konzentrationen von 0,1 μ l/ml und 0,3 μ l/ml haben die Proben sogar einen inhibierenden Effekt (0,6-fach).

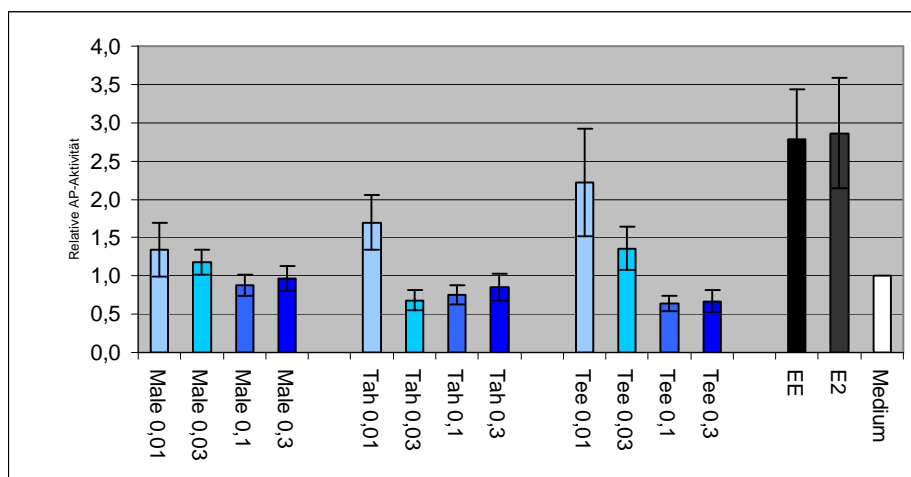


Abb.12: Aktivität der alkalische Phosphatase in hFOB/ ER α - Zellen durch EE, E₂ und ethanolische Auszüge aus Noniblättern.

Tabelle 11: Auswirkung der ethanolischen Extrakte auf hFOB/ER α 9

Resultate:	
Probe 4 (Malediven)	Anstieg der AP-Aktivität bei den niedrigen Konzentrationen, sonst keine Wirkung
Probe 5 (Tahiti)	Niedrigste Konzentration stark stimulierend, sonst hemmender Effekt
Probe 6 (Tee)	Anstieg der AP-Aktivität bei den niedrigen Konzentrationen, die hohen Konzentrationen haben hemmenden Effekt

Generell ergibt sich bei den ethanolischen Extrakten eine eindeutige Steigerung der Enzymaktivität sofern nur niedrige Extraktkonzentrationen eingesetzt werden. Bei höheren Konzentrationen tritt keine Steigerung oder sogar eine Hemmung ein. Es liegt ein konzentrationsabhängiges Ansprechen des ER α vor. Das Vorliegen einer inhibitorischen zusätzlich zur fördernden Komponente in komplexen Pflanzenextrakten ist denkbar.

4.1.4.2. in den U-2 OS/ER α und ER β

Die ethanolischen Auszüge wurden in Konzentrationen von 0,01 – 0,3 μ l/ml untersucht. Bei dem Auszug der Noniblätter von den Malediven findet sich bei den U-2 OS/ER α ein konzentrationsabhängiger Anstieg auf einen maximalen Wert des 2,2-fachen der Kontrolle mit anschließender konzentrationsabhängiger Minderung auf das 1, 7-fache. Bei den ER β

Zellen findet sich eine signifikante Aktivitätsminderung, konzentrationsabhängig fallend bis auf das 0,45-fache der Mediumkontrolle. Es ist damit stärker hemmend als EE (0,6-fach).

Die Blätter der Nonipflanzen aus Tahiti stimulieren ebenfalls bereits in der niedrigsten Konzentration die AP-Aktivität in den U-2 OS/ER α Zellen, konzentrationsabhängig steigend auf das 2,8-fache, dann abfallend auf das 2-fache der Kontrolle. Bei den U-2 OS/ER β Zellen findet sich keine Wirkung auf die AP-Aktivität.

Der ethanolische Auszug des TNI-Beuteltees steigert die Aktivität der AP bei den U-2 OS/ER α auf das 2- bis zu 2,5-fache der Mediumkontrolle. Bei den U-2 OS/ER β Zellen findet sich ein nicht signifikanter steigernder Effekt auf die AP-Aktivität (Abbildung 13).

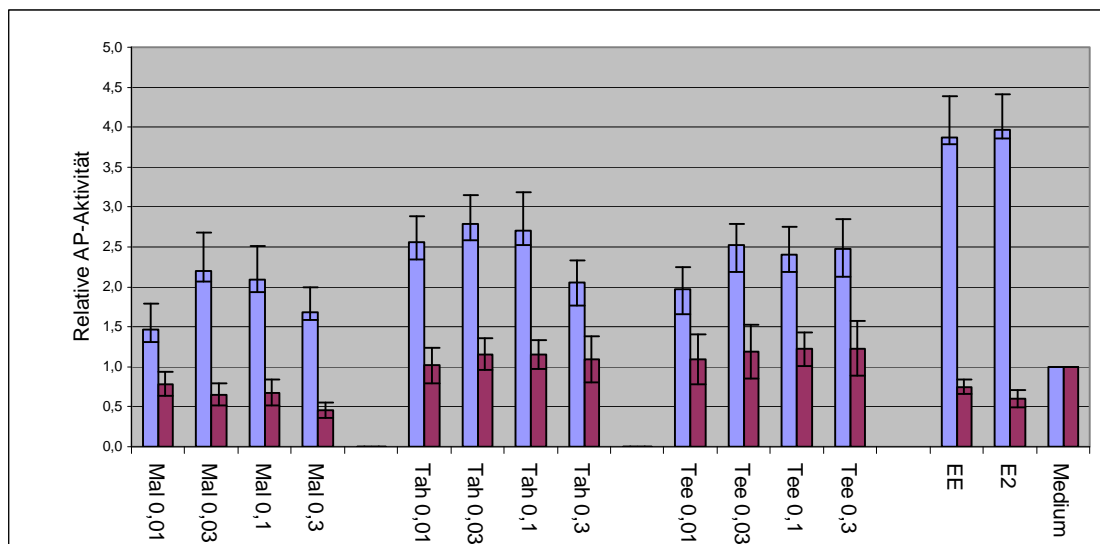


Abb.13: Aktivität der Alkalischen Phosphatase in U-2 OS/ER α (blau) und ER β Zellen (lila) durch EE, E₂ und ethanolische Auszüge aus Noniblättern.

Tabelle 12: Auswirkung der ethanolischen Extrakte auf U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 4 (Malediven)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität
Probe 5 (Tahiti)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität
Probe 6 (Tee)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität

Tabelle 13: Auswirkung der ethanolischen Extrakte auf U-2 OS/ ER β

Resultate:	
Probe 4 (Malediven)	Hemmung der Enzymaktivität (wie EE und E ₂)
Probe 5 (Tahiti)	Keine signifikante Wirkung
Probe 6 (Tee)	Keine signifikante Wirkung

Alle ethanolischen Extrakte wirken bei U-2 OS/ER α positiven Zellen steigernd auf die AP-Aktivität, bei den hFOB Zellen jedoch nur in den niedrigen Konzentrationen.

Bei den U-2 OS/ER β positiven Zellen findet sich bei Noni-Blättern von den Malediven im ethanolischen Extrakt eine starke Hemmung der AP-Aktivität. Diese liegt im wässrigen Extrakt nur in leichter Form in der höchsten Konzentration vor. Möglicherweise befindet sich in der ethanolischen Fraktion ein inhibitorischer Faktor im Extrakt.

Bei den U-2 OS/ER β positiven Zellen ist bei Noni Blättern von Tahiti sowohl im wässrigen als auch im ethanolischen Extrakt keine Änderung der Enzymaktivität zu sehen, mit einer Ausnahme (wässrig 0,3).

Bei den ER β positiven Zellen ist bei TNI-Teebeuteln eine Steigerung der Enzymaktivität zu sehen, sowohl im wässrigen als auch im ethanolischen (nicht signifikant, leicht) Extrakt.

4.1.5. Auswirkungen der weiteren Noni Extrakte

4.1.5.1. in den hFOB/ER α Zellen:

Der Auszug mit Methanol zeigte, ebenso wie die Hexanfraktion und der EtOAc Auszug aus den Nonifrüchten in der 0,01 μ l/ml Konzentration eine starke Stimulation der AP-Aktivität (Auszug Methanol um das 2,1-fache, EtOAc Fruchtauszug um das 2,4-fache und der Hexan Auszug um das 2,6-fache). Auch bei diesen Proben sank die Stimulation der AP-Aktivität mit steigender Konzentration leicht ab, blieb jedoch deutlich über dem Niveau der Mediumkontrolle (Met 1,9-fach, Fruit 2,0-fach und Hex 1,7-fach) (Abbildung 14)

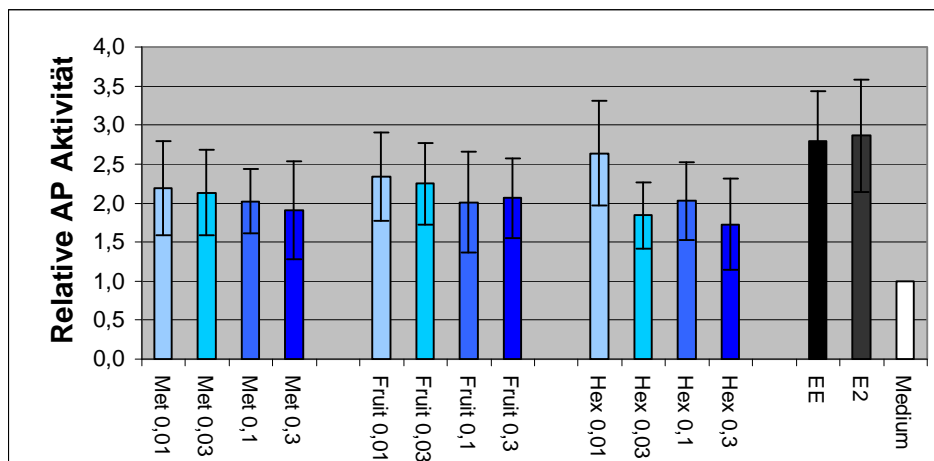


Abbildung 14: Relative Aktivität der Alkalischen Phosphatase in hFOB/ER α Zellen, behandelt mit methanolischen und Hexanauszügen aus Noniblättern sowie einem EtOAc Extrakt aus Nonifruucht.

Tabelle 14: Auswirkung der TNJ Extrakte auf hFOB/ER α 9

Resultate:	
Probe 7 (Blätter, Methanol)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität, am stärksten in den niedrigen Konzentrationen
Probe 8 (Blätter, Hexan)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität, am stärksten in den niedrigen Konzentrationen
Probe 10 (Frucht, EtOAc)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität, am stärksten in den niedrigen Konzentrationen

4.1.5.2. in den U-2 OS/ER α und ER β -Zellen

Bei dem methanolischen Blattextrakt findet sich bei den U-2 OS/ER α Zellen in den niedrigsten Konzentrationen keine Wirkung, in der höchsten Konzentration aber eine starke Hemmung der AP-Aktivität auf das 0,4-fache der Mediumkontrolle. Bei den U-2 OS/ER β Zellen ist in den niedrigsten Konzentrationen eine leichte Steigerung der Aktivität auf das 1,38-fache des Kontrollwertes vorhanden, dann erfolgt konzentrationsabhängig ein Abfall der Aktivität auf den Kontrollwert.

Der Hexan-Auszug steigert bei den U-2 OS/ER α Zellen die AP-Aktivität um das bis zu 3-fache. Auf die U-2 OS/ER β Zellen zeigt dieser Auszug keine Wirkung in Bezug auf die AP-Aktivität.

Die Behandlung mit dem EtOAc-Fruchtauszug lässt bei den U-2 OS/ER α Zellen die Enzymaktivität auf das bis zu 2-fache des Kontrollwertes steigern. Bei den U-2 OS/ER β Zellen findet sich in der niedrigsten Konzentration eine Hemmung der AP-Aktivität auf

das 0,6-fache der Mediumkontrolle, in den weiteren Konzentrationen ist kein Einfluss auf die Enzymaktivität zu erkennen (Abbildung 15).

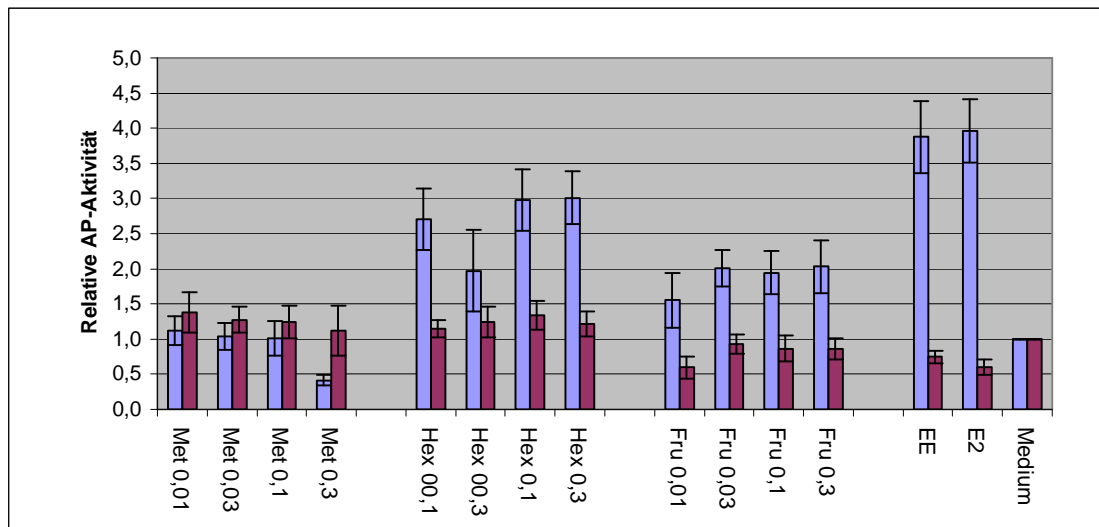


Abbildung 15 Relative Aktivität der Alkalischen Phosphatase in U-2 OS/ER α (blau) und ER β Zellen (lila), behandelt mit methanolischen und Hexanauszügen aus Noniblättern sowie einem EtOAc Extrakt aus der Nonifruucht.

Tabelle 15: Auswirkung der TNI Extrakte auf U-2 OS/ER α Zellen

Resultate:	
Probe 7 (Blätter, Methanol)	Signifikante Hemmung in der höchsten Konzentration, gegenläufig zu EE und E2
Probe 8 (Blätter, Hexan)	Sehr deutliche Steigerung der AP-Aktivität
Probe 10 (Frucht, EtOAc)	Deutliche Steigerung der AP-Aktivität

Tabelle 16: Auswirkung der TNI Extrakte auf U-2 OS/ER β Zellen

Resultate:	
Probe 7 (Blätter, Methanol)	Leichte Steigerung der AP-Aktivität, nicht signifikant
Probe 8 (Blätter, Hexan)	Leichte Steigerung der AP-Aktivität, nicht signifikant
Probe 10 (Frucht, EtOAc)	Hemmung der Enzymaktivität in niedrigster Konzentrationen, sonst keine signifikante Wirkung

Die stärkste Systemregulation findet in den mit unpolaren Extrakten (Hexan- und EtOAc-Auszug) behandelten Zellen statt. Möglicherweise sind die wirksamen Stoffe recht lipophil. Es gibt aber auch Hinweise auf hydrophile Stoffe mit z.T. gegenläufiger Wirkung auf die Rezeptoren.

4.2. Regulation der Genexpression in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen untersucht mittels Realtime RT-PCR

Die U-2 OS Zelllinie exprimiert keine eigenen Estrogenrezeptoren. Sie wurden mit den Estrogenrezeptoren ER α bzw. ER β stabil transfiziert und exprimieren je einen der Rezeptoren in gleicher Konzentration (siehe auch Material und Methoden). Somit eignen sich für die Untersuchung der isoformspezifischen Wirkung (ER α oder ER β). Die estrogen-agonistischen und -antagonistischen Effekte der pflanzlichen Substanzen können so im Vergleich zu EE und E2, sowie hinsichtlich ihrer unterschiedlichen Effekte auf die beiden Estrogenrezeptoren untersucht werden.

Tabelle 17: Mit Realtime RT-PCR untersuchte Proben

Probe 1	(Noni1) TNI Nonipüree, ethanolischer Auszug
Probe 2	(Noni2) TNI Nonipüree, wässriger Auszug
Probe 3	(Noni3) Noniblätter, ethanolischer Auszug
Probe 4	(Noni4) Noniblätter, wässriger Auszug
Probe 5	(CIM) <i>Cimicifuga racemosa</i>
Probe 6	(PHA) <i>Phaseolus vulgaris</i>
Probe 7	(SAR) <i>Sarothamnus Scoparius</i>
Probe 8	(SOY) <i>Glycine max</i>

Die Extrakte wurden in einer Konzentration von 0,1 $\mu\text{l/ml}$, 1 $\mu\text{l/ml}$ und 10 $\mu\text{l/ml}$ eingesetzt, EE und E2 jeweils in einer Konzentration von 10^{-8}M .

4.2.1. Interleukin-6 (IL-6)

Interleukin-6 ist ein Protein, das im Knochenstoffwechsel mit der Resorption im Zusammenhang steht und durch E₂ herunterreguliert werden soll (Qu Q. et al., 1999).

Bei den U-2 OS/ER Zellen welche auf IL-6 untersucht wurden, findet sich sowohl in den Zellen mit ER α als auch in denen mit ER β eine Hemmung der relativen Genexpression bei den mit EE und E₂ behandelten Proben.

Bei den U-2 OS/ER α Zellen findet sich bei Noni1 ein hemmender Effekt auf die Genexpression, der mit steigender Konzentration nachlässt. Bei Noni2 ist in den niedrigen Konzentrationen eine sehr geringe, nicht signifikante Steigerung im Vergleich zur Mediumkontrolle zu erkennen. Die höchste Konzentration wirkt hemmend auf die Genexpression. Noni3 zeigt einen konzentrationsabhängig steigenden Verlauf, vom 0,77-fachen ansteigend auf das 2-fache der Mediumkontrolle. Noni4 zeigt in der niedrigsten Konzentration eine sehr starke Steigerung der Genexpression auf das 3,6-fache der Kontrolle, in den weiteren Konzentrationen zeigt sich keine signifikante Wirkung (Abbildung 16).

In den niedrigen Konzentrationen wirkt CIM hemmend auf die Genexpression (das 0,45-fache der Kontrolle), in der höchsten Konzentration steigert es die relative Genexpression auf das 1,7-fache des Kontrollwertes. PHA hat in der niedrigsten Konzentration keine Wirkung, in der mittleren Konzentration wirkt es hemmend und in der höchsten Konzentration steigernd auf die relative Genexpression. SAR wirkt in der niedrigsten (3,9-fach) und der höchsten (2,65-fach) Konzentration steigernd auf die relative Genexpression. SOY wirkt in der niedrigsten Konzentration 1,6-fach und der höchsten 1,3-fach steigernd auf die relative Genexpression (Abbildung 17).

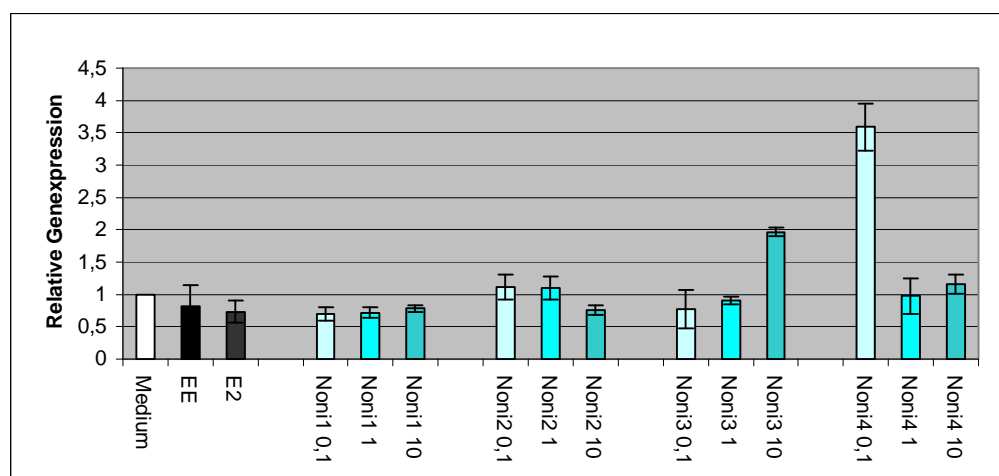


Abbildung 16: Relative Genexpression von IL-6 in mit Noniprogen behandelten U-2 OS/ER α Zellen.

Tabelle 18: Auswirkung der Noniextrakte auf die relative Genexpression von IL-6 in U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 1 (Noni1; Püree, ethanolisch)	Hemmung der relativen Genexpression in allen Konzentrationen
Probe 2 (Noni2; Püree, wässrig)	In der höchsten Konzentration leicht hemmender Effekt
Probe 3 (Noni3; Noniblätter, ethanolisch)	In niedrigster Konz. hemmend, in höchster steigernd auf die relative Genexpression
Probe 4 (Noni4, Noniblätter, wässrig)	In niedrigster Konzentration stark steigernd (gegenläufig zu EE) auf die relative Genexpression, weitere Konzentrationen kein Effekt

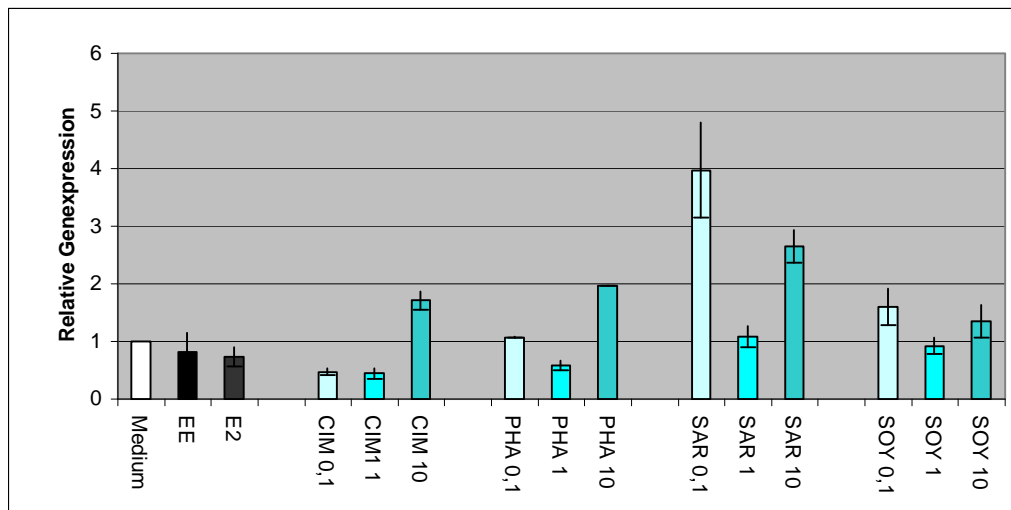


Abbildung 17: Relative Genexpression von IL-6 in mit den Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ER α Zellen

Tabelle 19: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von IL-6 in U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	Hemmend in den niedrigen Konzentrationen (wie EE), steigend in der höchsten
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	Hemmend in der mittleren, steigend in der höchsten Konzentration
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	Stark steigend in der niedrigsten und höchsten Konzentration
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	Steigend in der niedrigsten und höchsten Konzentration

Bei den U-2 OS/ER β Zellen findet sich bei den mit Noni1 behandelten Zellen eine Steigerung der Genexpression von IL-6 in der niedrigsten und der höchsten Konzentration. Noni2 wirkt in den beiden niedrigeren Konzentrationen steigend auf die Genexpression (1,8 bis 2,8-fach) in der höchsten Konzentration wirkt die Probe hemmend auf die Genexpression (0,53-fach). Noni3 wirkt konzentrationsabhängig hemmend, in der niedrigsten Konzentration stark (0,6-fach), dann ansteigend auf das Kontrollniveau. In der mittleren Konzentration wirkt Noni4 1,3-fach steigend, in der höchsten Konzentration hemmend, 0,7-fach (siehe Abbildung 18).

CIM hat in allen Konzentrationen einen hemmenden Effekt auf die relative Genexpression, ähnlich stark wie E₂. PHA hat in der niedrigsten Konzentration einen schwach hemmenden, in der mittleren einen stark hemmenden Effekt (0,45-fach zur Mediumkontrolle). SAR hat einen sehr stark hemmenden Effekt, stärker als EE und E₂, besonders in der niedrigsten Konzentration. In den höheren Konzentrationen wirkt SAR auch hemmend, jedoch weniger stark. SOY zeigt in allen Konzentrationen eine hemmende Wirkung, am stärksten ist diese in der höchsten Konzentration (Abbildung 19).

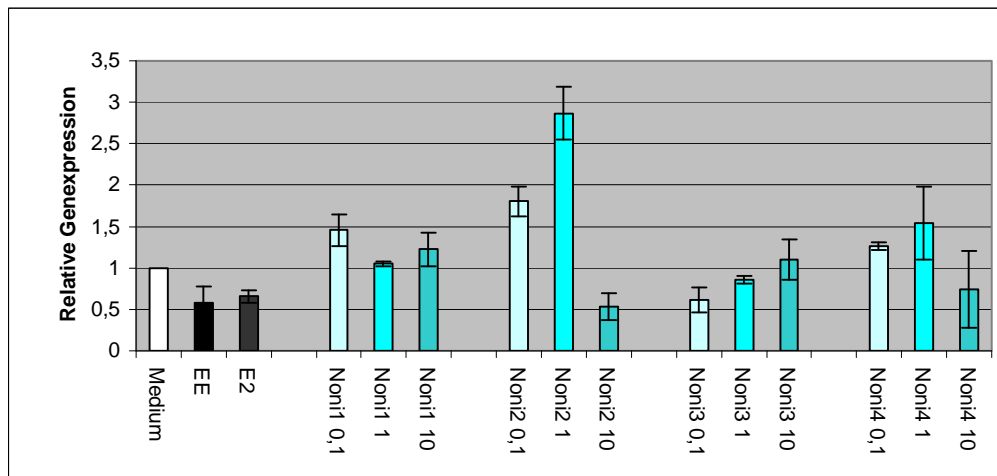


Abbildung 18: Relative Genexpression von IL-6 in mit Noniprüben behandelten U-2 OS/ER β Zellen

Tabelle 20: Auswirkung der Noniextrakte auf die relative Genexpression von IL-6 in U-2 OS/ER β

Resultate:	
Probe 1 (Püree, ethanolisch)	Steigernd in niedrigster und höchster Konzentration, gegenläufig zu EE und E ₂
Probe 2 (Püree, wässrig)	Stark steigernd in niedrigster und mittlerer Konzentration, gegenläufig zu EE und E ₂ , hemmend in höchster Konzentration
Probe 3 (Noniblätter, ethanolisch)	Hemmend in niedrigster Konzentration, in höchster kein Einfluss auf die relative Genexpression
Probe 4 (Noniblätter, wässrig)	Steigernd in niedrigster und mittlerer, hemmend in höchster Konzentration

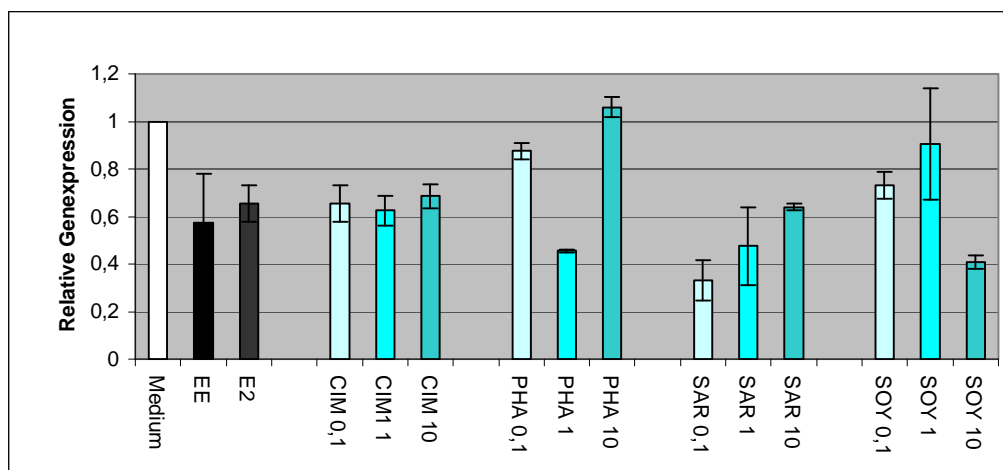


Abbildung 19: Relative Genexpression von IL6 in mit den Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ER β Zellen

Tabelle 21: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von IL-6 in U-2 OS/ER β

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	Hemmende Wirkung in allen Konzentrationen (wie EE)
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	Hemmende Wirkung in der mittleren Konzentration
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	Hemmende Wirkung in allen Konzentrationen (wie EE)
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	Hemmende Wirkung in allen Konzentration (wie EE), am stärksten in der höchsten

4.2.2. Alkalische Phosphatase (AP)

Die alkalische Phosphatase ist ein Enzym, welches als Marker für Knochenformation durch E_2 herauf reguliert werden soll (Robinson J. et al., 1997, Riggs B. und Khosla S., 1995). Die U-2 OS/ $ER\alpha$ zeigten nach der Behandlung mit EE bzw. E_2 eine Heraufregulierung der relativen Genexpression gegenüber der Mediumkontrolle um das 2,8- (EE) und (E_2) 1,7-fache (Abbildung 20).

Noni1 regulierte in den niedrigeren Konzentrationen die Genexpression leicht hoch, in der höchsten Konzentration wirkt es hemmend auf die Genexpression von AP. Noni2 hemmt in der niedrigsten Konzentration die AP sehr stark, dieser Effekt wird dann konzentrationsabhängig schwächer, die höchste Konzentration wirkt sogar leicht steigernd gegenüber der Kontrolle. Noni3 verhält sich ähnlich wie Noni2, nur wirkt es in der höchsten Konzentration nicht steigernd. Noni4 hat in den niedrigen Konzentrationen einen leicht hemmenden Effekt (Abbildung 20).

CIM und PHA haben beide einen nicht merklichen bis leicht hemmenden Effekt auf die relative Genexpression der AP. SAR hat in den beiden höheren Konzentrationen einen steigernden Effekt, SOY zeigt in der mittleren Konzentration eine Hemmung der relativen Genexpression, in der hohen und der niedrigen Konzentration ist kein Effekt erkennbar (Abbildung 21).

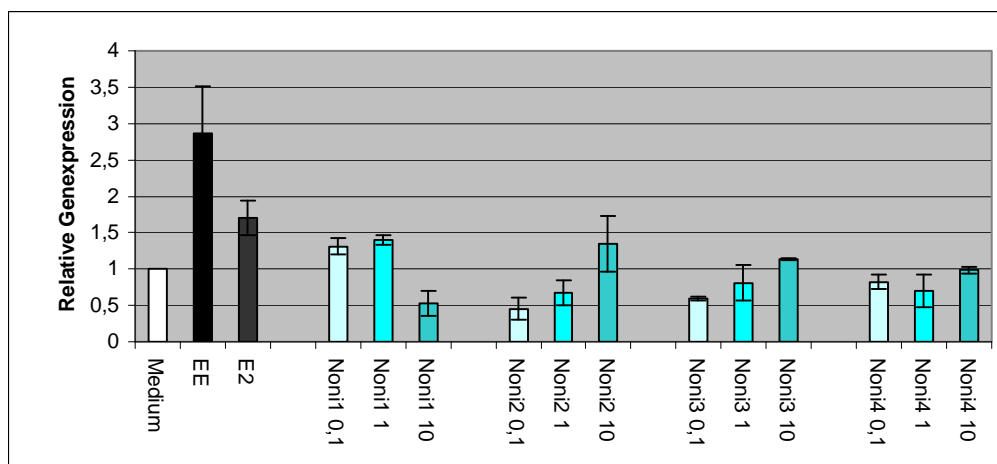


Abbildung 20: Relative Genexpression von AP in mit Noniprogenen behandelten U-2 OS/ $ER\alpha$ Zellen

Tabelle 22: Auswirkung der Noniextrakte auf die relative Genexpression von AP in U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 1 (Püree, ethanolisch)	Steigerung der Genexpression in niedrigeren Konzentrationen, Hemmung in der höchsten Konzentration
Probe 2 (Püree, wässrig)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigernd auf leicht über Mediumkontrolle
Probe 3 (Noniblätter, ethanolisch)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigernd auf Mediumkontrolle
Probe 4 (Noniblätter, wässrig)	Nicht signifikante leichte Hemmung der relativen Genexpression

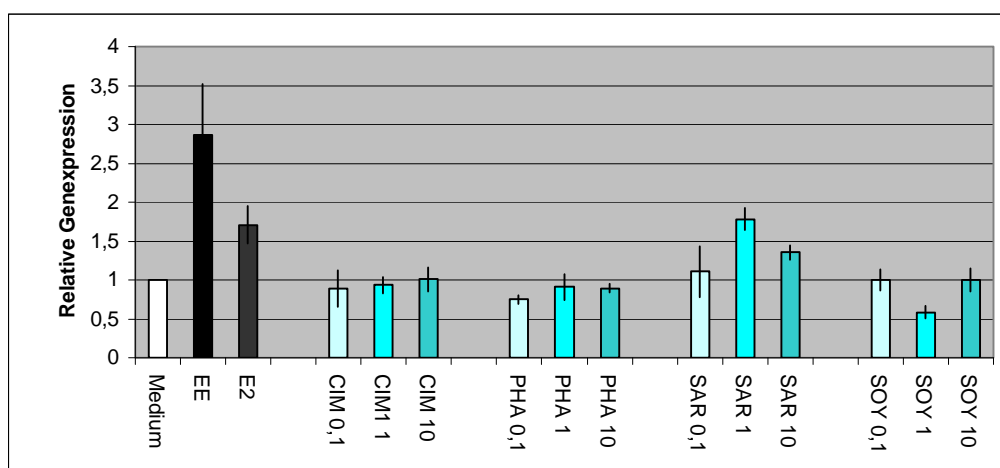


Abbildung 21: Relative Genexpression von AP in den mit den Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ER α Zellen

Tabelle 23: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von AP in U-2 OS/ER α Zellen

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	Nicht signifikante leichte Hemmung der relativen Genexpression
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	Nicht signifikante leichte Hemmung der relativen Genexpression
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	Relative Genexpression steigernde Wirkung in der mittleren und höchsten Konzentration
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	Hemmend in der mittleren Konzentration, sonst keine Wirkung auf die relative Genexpression

Bei den U-2 OS/ER β Zellen wirkt sowohl EE als auch E₂ leicht hemmend auf die relative Genexpression der AP. Noni1 wirkt in der niedrigsten Konzentration stark hemmend, dann konzentrationsabhängig steigernd auf das 1,2-fache der Mediumkontrolle. Noni2 wirkt in der niedrigsten Konzentration schwach hemmend, in der mittleren schwach steigernd. Noni3 wirkt in allen Konzentrationen hemmend. Noni4 wirkt in der niedrigsten Konzentration hemmend, dann konzentrationsabhängig steigernd auf das 1,62-fache der Mediumkontrolle (Abbildung 22).

CIM wirkt in allen Konzentrationen hemmend. PHA und SAR haben eine sehr ähnliche Verlaufskurve, von etwa Mediumkontrolle wirken sie konzentrationsabhängig steigernd auf die relative Genexpression (auf das 1,5-fache). SOY wirkt in der niedrigsten Konzentration hemmend, dann konzentrationsabhängig steigernd auf etwa das Niveau der Mediumkontrolle (Abbildung 23).

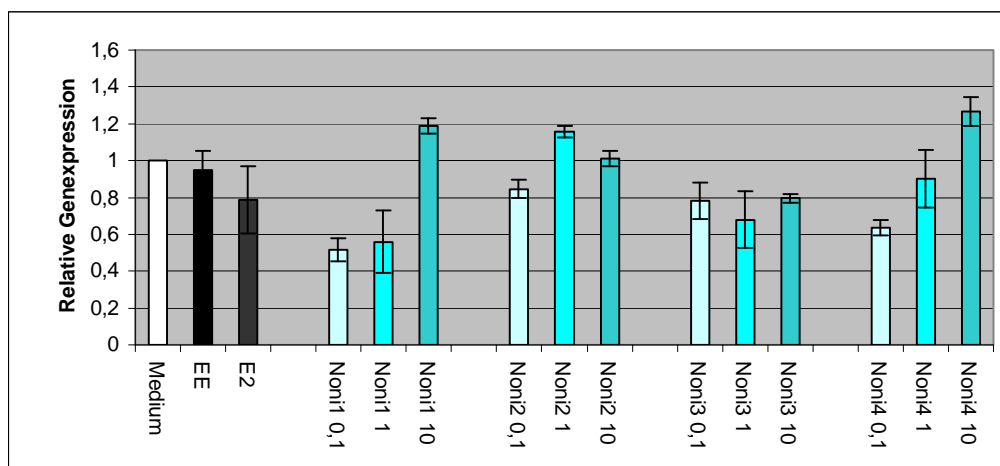


Abbildung 22: Relative Genexpression von AP in mit Noniprogenen behandelten U-2 OS/ERβ Zellen

Tabelle 24: Auswirkung der Noni Extrakte auf die relative Genexpression von AP in U-2 OS/ERβ

Resultate:	
Probe 1 (Püree, ethanolisch)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigend auf über Mediumkontrolle
Probe 2 (Püree, wässrig)	In niedrigster Konzentration hemmend, in mittlerer leicht über Mediumkontrolle
Probe 3 (Noniblätter, ethanolisch)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression
Probe 4 (Noniblätter, wässrig)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigend auf über Mediumkontrolle

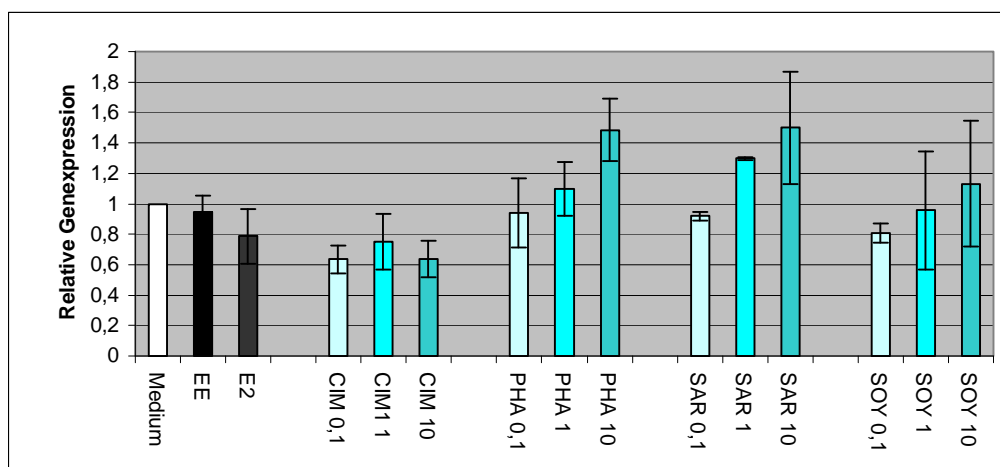


Abbildung 23: Relative Genexpression von AP in den mit den Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ER β Zellen

Tabelle 25: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von AP in U-2 OS/ER β Zellen

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	In niedrigster Konzentration auf Mediumkontroll-Niveau, konzentrationsabhängig steigernd
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	In niedrigster Konzentration auf Mediumkontroll-Niveau, konzentrationsabhängig steigernd
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigernd auf Mediumkontrolle.

4.2.3. Von Willebrand Faktor (vWF)

Der vWF ist ein multimeres Glycoprotein der Blutstillung, wird aber auch als sensitiver Marker für E₂-Regulation in U-2 OS/ER Zellen beschrieben (Monroe D. et al., 2003; Effenberger K. et al., 2005).

Die mit EE behandelten U-2 OS/ER α Zellen zeigten eine Steigerung der relativen Genexpression um das 6,8-fache der Mediumkontrolle, die mit E₂ behandelten eine Steigerung um das 4,5-fache.

Bei allen mit Noniprogenen behandelten U-2 OS/ER α Zellen zeigte sich keinerlei Effekt auf die relative Genexpression (Abbildung 24).

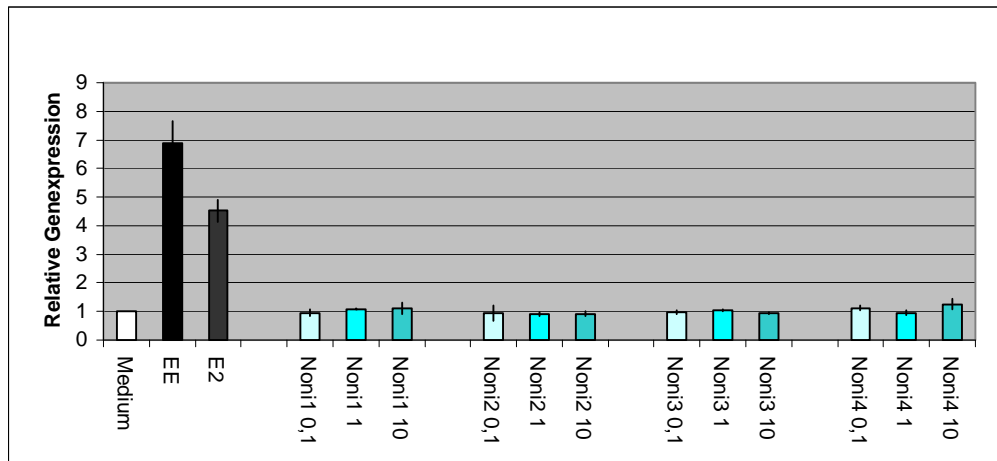


Abbildung 24: Relative Genexpression von vWF in mit Noniprogenen behandelten U-2 OS/ER α Zellen

Tabelle 26: Auswirkung der Noniextrakte auf die relative Genexpression von vWF in U-2 OS/ER α

Resultate:	
Probe 1 (Püree, ethanolisch)	Keine Wirkung
Probe 2 (Püree, wässrig)	Keine Wirkung
Probe 3 (Noniblätter, ethanolisch)	Keine Wirkung
Probe 4 (Noniblätter, wässrig)	Keine Wirkung

CIM zeigte in den niedrigen Konzentrationen eine ganz leichte Hemmung. PHA stimulierte in der mittleren Konzentration auf das 1,97-fache der Mediumkontrolle, in der höchsten Konzentration wirkt es leicht hemmend. SAR zeigt eine konzentrationsabhängige Steigerung der relativen Genexpression, auf das 2,13-fache der Kontrolle. SOY zeigt in den niedrigen Konzentrationen eine leichte Steigerung.

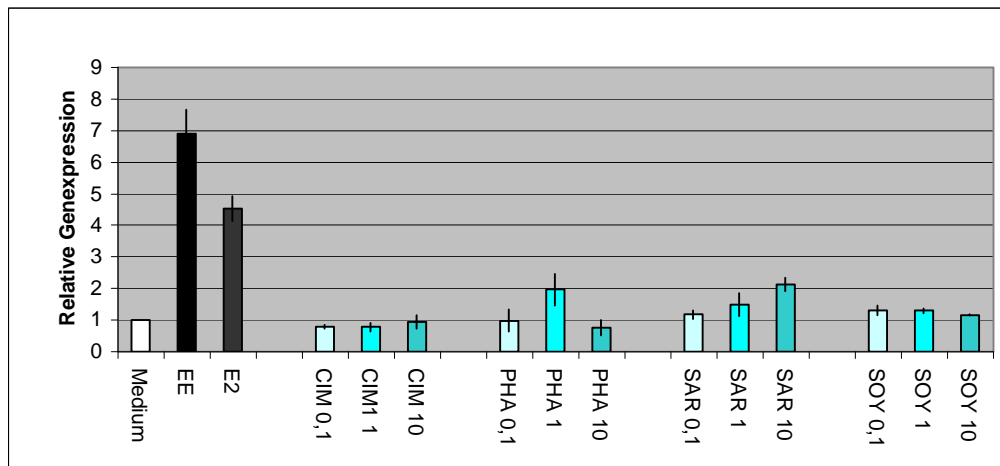


Abbildung 25: Relative Genexpression von vWF in den Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ER α Zellen

Tabelle 27: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von vWF in U-2 OS/ER α Zellen

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	In niedrigen Konzentrationen sehr geringe Hemmung
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	In mittlerer Konzentration Steigerung der rel. Genexpression
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	In niedrigster Konzentrationen leicht über Mediumkontroll-Niveau, konzentrationsabhängig steigernd
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	Leicht steigernd in niedrigen Konzentrationen

Bei den mit EE und E₂ behandelten U-2 OS/ERβ zeigt sich eine Hemmung der relativen Genexpression bei EE auf das 0,68-fache der Mediumkontrolle und bei E₂ auf das 0,6-fache. Noni1 wirkt in der niedrigsten Konzentration etwa so stark hemmend wie E₂, dann steigert sich die relative Genexpression konzentrationsabhängig auf das 1,3-fache. Noni2 steigert in allen Konzentrationen die relative Genexpression, am stärksten in der höchsten (2,61-fach). Noni3 hemmt in allen Konzentrationen, am stärksten in der niedrigsten (0,44-fach). Noni4 wirkt in der niedrigsten Konzentration etwa so stark hemmend wie E₂, dann steigert es die relative Genexpression konzentrationsabhängig auf das 1,24-fache (Abbildung 26).

CIM hemmt in allen Konzentrationen, am meisten in der niedrigsten und der höchsten (je 0,6-fach). PHA hemmt ebenfalls in allen Konzentrationen, konzentrationsabhängig zunehmend, in der höchsten auf das 0,3-fache der Mediumkontrolle. SAR hemmt schwächer, aber auch in allen Konzentrationen, am meisten in der mittleren (0,75-fach). SOY hemmt wie die anderen ebenfalls in allen Konzentrationen, konzentrationsabhängig zunehmend, in der höchsten auf das 0,52-fache der Mediumkontrolle (Abbildung 27).

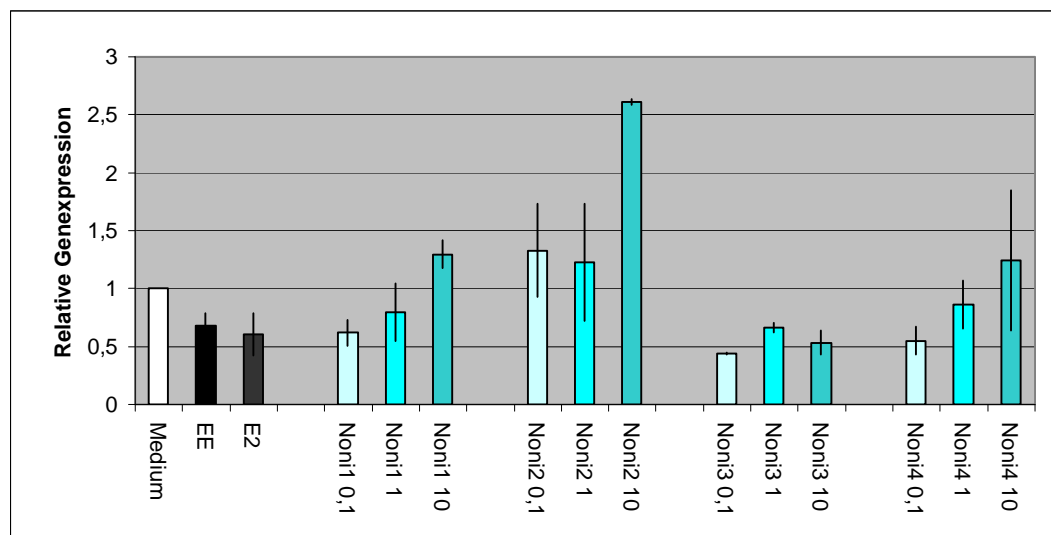


Abbildung 26: Relative Genexpression von vWF in mit Noniproben behandelten U-2 OS/ERβ Zellen

Tabelle 28: Auswirkung der Noniextrakte auf die relative Genexpression von vWF in U-2 OS/ERβ

Resultate:	
Probe 1 (Püree, ethanolisch)	In niedrigster Konzentration hemmend, konzentrationsabhängig steigernd auf über Mediumkontrolle
Probe 2 (Püree, wässrig)	Wirkung in allen Konzentrationen steigernd auf die relative Genexpression, am stärksten in der höchsten Konzentration
Probe 3 (Noniblätter, ethanolisch)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression
Probe 4 (Noniblätter, wässrig)	In der niedrigsten Konzentrationen hemmend, konzentrationsabhängig steigernd auf über Mediumkontrolle

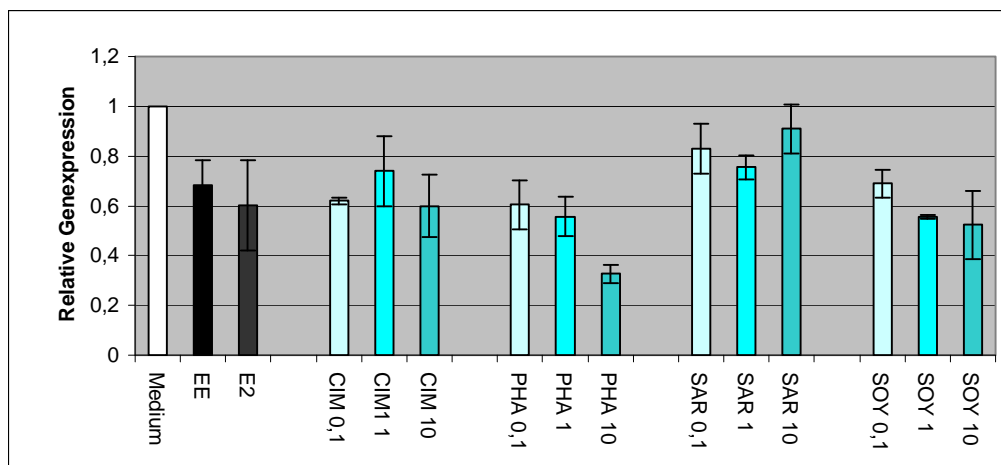


Abbildung 27: Relative Genexpression von vWF in den mit Vergleichsproben behandelten U-2 OS/ERβ Zellen

Tabelle 29: Auswirkung der Vergleichsproben auf die relative Genexpression von vWF in U-2 OS/ER β Zellen

Resultate:	
Probe 5 (<i>Cimicifuga racemosa</i> , CIM)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression
Probe 6 (<i>Phaseolus vulgaris</i> , PHA)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression
Probe 7 (<i>Sarothamnus scoparius</i> , SAR)	Alle Konzentrationen wirken leicht hemmend auf die relative Genexpression
Probe 8 (<i>Glycine max</i> , SOY)	Alle Konzentrationen wirken hemmend auf die relative Genexpression

4.3.: Zusammenfassung der Ergebnisse

4.3.1. Wirkung im APA

Im APA war die deutlichste Wirkung auf die U-2 OS/ER α Zellen zu verzeichnen. Am stärksten war der Anstieg der Enzymaktivität bei den mit polaren Substanzen behandelten Zellen, besonders bei den ethanolischen (Tahitiblätter>Beuteltee>Maledivenblätter) und bei der Hexanfraktion, aber auch bei dem EtOAc-Noni-Fruchtauszug.

Bei den hFOB/ER α Zellen ergab sich eine eindeutige Steigerung der Enzymaktivität bei den ethanolischen Noniextrakten nur in den niedrigen Extraktkonzentrationen, jedoch eine Hemmung bei höheren Konzentrationen, ohne Anzeichen von Zelltod. Das heißt, es gibt ein konzentrationsabhängiges Ansprechen des α -Rezeptors (Effenberger K. 2004). Zusätzlich ist das Vorhandensein einer inhibitorische Komponente, zusätzlich zur fördernden, im Pflanzenextrakt denkbar.

Weiterhin ist bei den hFOB/ER α Zellen eine sehr starke Induktion der AP-Aktivität durch die Hexan- und die Methanolfraktion, sowie durch den EtOAc-Fruchtauszug vorhanden.

Alle ethanolischen Extrakte wirken bei ER α positiven U-2 OS und hFOB Zellen steigernd auf die AP-Aktivität, bei den hFOB ER α 9-Zellen jedoch nur in den geringsten Konzentrationen.

Bei den wässrigen Extrakten gab es z.T. leichte Steigerungen in der AP-Aktivität: bei den U-2 OS/ER α Zellen bei Nonisaft und Blättern von Tahiti, bei den hFOB/ER α 9 Zellen bei Noniblättern der Malediven und bei Noni-Beuteltee.

In den U-2 OS/ER β Zellen wirken EE und E₂ hemmend auf die AP-Aktivität. Von den untersuchten Extrakten wirkt nur der Extrakt der Malediven Blätter ähnlich. Die anderen Extrakte haben keine signifikante Wirkung auf die AP-Aktivität in den U-2 OS/ER β Zellen.

Bei den ER β positiven Zellen ist bei den Malediven Blättern im ethanolischen Extrakt eine starke Hemmung der AP-Aktivität zu verzeichnen, die im wässrigen Extrakt nur in leichter Form in der höchsten Konzentration vorhanden ist. Vermutung: Bei der ethanolischen Fraktion ist ein inhibitorischer Faktor im Extrakt vorhanden. Von den wässrigen Extrakten wirkten Noni Fruchtsaft und Beuteltee steigend auf die AP-Aktivität der U-2 OS/ER β Zellen

4.3.2. Wirkung auf die Genexpression, gemessen durch Realtime RT-PCR

4.3.2.1. AP

Auf die U-2 OS/ER α Zellen wirkten EE und E₂ stimulierend auf die relative Genexpression der AP. Von den Noniextrakten wirkt nur der ethanolische Extrakt vom Nonipüree (Noni1) in den niedrigen Konzentrationen sowie die höchste Konzentration des wässrigen Auszugs vom Nonipüree (Noni2) stimulierend. In den niedrigen Konzentrationen wirkt Noni2 hemmend, ebenso Noni1 in der höchsten und der ethanolische Auszug aus Noniblättern (Noni3). Von den Vergleichsproben wirkt nur SAR in der mittleren Konzentration stimulierend auf die relative Genexpression der AP.

Bei den U-2 OS/ER β Zellen wirken EE und E₂ nur in sehr geringem Maße hemmend auf die relative Genexpression der AP. Noni1 und Noni4 (wässriger Blätterextrakt) wirken in den niedrigen Konzentrationen, Noni3 in allen Konzentrationen hemmend. Von den Vergleichsproben wirkt CIM am stärksten hemmend, SOY nur in der niedrigsten Konzentrationen, PHA und SAR wirken steigend.

Bei den U-2 OS/ER α Zellen ist nur in den geringen Konzentration der ethanolischen Püree-Extrakte und in der höchsten Konzentration der wässrigen Püree-Extrakte eine Wirkung zu erkennen. Möglicherweise ist in der ethanolischen Fraktion ein Stoff in höherer Konzentration gelöst oder es sind Stoffe vorhanden, die in der wässrigen Probe durch pflanzeigene Enzyme abgebaut werden. Von den Vergleichsproben wirkt nur SAR steigend.

Die U-2 OS/ER β Zellen zeigen unter Estrogen-Einfluss eine Hemmung der relativen Genexpression. Entsprechende Effekte finden sich nur bei den ethanolischen Noni Extrakten und bei dem wässrigen Extrakt aus Noniblättern, sowie bei CIM.

4.3.2.2. IL-6

Bei den U-2 OS/ER α Zellen wirken EE und E₂ hemmend auf die relative Genexpression von IL-6 (in der Literatur beschrieben, Effenberger K. et al., 2005), ebenso Noni1, Noni2 und Noni3 in der höchsten Konzentration und Noni4 (in der niedrigsten Konz.) wirken stark steigernd. Von den Vergleichsproben wirkt CIM (in den beiden niedrigsten Konzentrationen) am stärksten hemmend, SAR und SOY wirken steigernd, PHA erst steigernd (mittlere Konzentration) dann hemmend (höchste Konzentration).

Auch bei den U-2 OS/ER β Zellen wirken EE und E₂ hemmend auf die relative Genexpression von IL-6, sogar stärker als bei den U-2 OS/ER α Zellen. Noni1 und Noni2 haben einen steigernden Effekt, Noni3 (in der niedrigsten Konzentration) und Noni4 (in der höchsten Konzentration) wirken hemmend. Von den Vergleichsproben wirken CIM, SAR und SOY in allen Konz. hemmend, PHA nur in der mittleren.

Sowohl bei ER α - als auch bei den ER β -Zellen ist bei den mit Estrogenen behandelten Proben eine Hemmung der relativen Genexpression nachzuweisen. Dies wurde bereits vorher beschrieben (Effenberger K. et al., 2005). Bei den Proben ist diese Reaktion nicht gleichmäßig nachzuweisen.

4.3.2.3. vWF

Bei den U-2 OS/ER α Zellen wirken EE und E₂ stark steigernd auf die relative Genexpression des vWF. Die Noniextrakte hatten keinerlei Effekt. Von den Vergleichsproben hatte PHA in der mittleren Konzentration einen leicht steigernden Effekt und SAR einen dosisabhängig steigenden Effekt.

Bei den U-2 OS/ER β Zellen wirken EE und E₂ hemmend auf die relative Genexpression von vWF. Von den Noniprobe n wirkt Noni3 in allen Konzentrationen hemmend, Noni1 und Noni4 in den niedrigen Konzentration, Noni2 wirkt steigernd. Die Vergleichsproben wirken alle hemmend auf die relative Genexpression von vWF.

In der Literatur ist die relative Genexpression des vWF als estrogensensibel beschrieben. Dass bei den U-2 OS/ER α Zellen von den Noniprobe n und CIM keine Veränderung der relativen Genexpression induziert wurde, bedeutet jedoch nicht, dass keine Phytoestrogene vorhanden sind. Es handelt sich bei den Pflanzenextrakten um Stoffgemische, die unterschiedlichste Inhaltsstoffe haben. Es können auch hemmende Stoffe vorhanden sein.

5. Diskussion

5.1. Testverfahren und Probencharakteristik

Die vorliegende Untersuchung hatte zum Ziel, estrogene Wirkungen von Pflanzenextrakten, speziell von Extrakten aus *Morinda citrifolia*, an zellulären Testsystemen zu prüfen. Dabei kamen als Extrakte praxisnah hergestellte wässrige und ethanolische Fraktionen zum Einsatz. Naturgemäß entstehen bei diesen Extraktionen Mehrkomponenten-Systeme, deren Zusammensetzung von Vorkommen und Extrahierbarkeit bzw. Löslichkeit der Inhaltsstoffe bestimmt wird.

Durch die Wahl der Testzellen mit definierten Estrogenrezeptoren (ER α oder ER β in U-2 OS-Zellen und ER α in hFOB-Zellen) wird das Testsystem insbesondere auf estrogenartige Wirkstoffe ausgerichtet. Die entsprechende Leistungsfähigkeit der Testsysteme ist in der Literatur hinreichend belegt (Monroe D. et al., 2003; Effenberger K. et al., 2005). Es ist jedoch durch die Auswahl der Extrakte aus Noni und deren Zusammensetzung nicht auszuschließen, dass die Zellen des Testsystems nicht nur über die Estrogenrezeptoren Signale empfangen, sondern auch durch andere membranlösliche oder membrantransportierbare Substanzen eine Wirkung erzielt wird. Auch können andere Rezeptoren angesprochen werden, und höhermolekulare Inhaltsstoffe können transmembrane Wirkungen erzielen (z.B. Kohlenhydratoligomere: Galactouronane, Bui A. et al., 2006). Hierzu betonten Samoylenko et al. (Samoylenko V. et al., 2006), dass die biologisch aktiven Prinzipien von Noni bei weitem noch nicht vollständig bekannt sind.

Im Fall der Untersuchung von Extrakten aus fraktionierten Extraktionsprozessen ist stets von mehreren Substanzen pro Fraktion auszugehen, deren Qualität darin liegt, ähnliche Affinitäten zu den Extraktionsmitteln aufzuweisen. In der vorliegenden Arbeit werden Extraktionen mit einer Reihe von Extraktionsmitteln vorgenommen, die sich von hoch polaren (Wasser) über solche minderer Polarität (Methanol, Ethanol, Ethylacetat) bis zu unpolaren Extraktionsmitteln (Hexan) erstrecken.

Es ist demnach davon auszugehen, dass im jeweiligen Testmaterial mehrere Substanzen sehr ähnlicher Polarität auf die Zellen im Testmedium einwirken. Mit jeder Änderung der Konzentrationen der Pflanzenauszüge ändert sich auch die relative Wirksamkeit der Extraktkomponenten auf die Zellen, je nachdem wie gut diese Substanzen in den wässrigen Testsystemen löslich sind.

Verschiedene Arbeitsgruppen (Bui A. et al., 2006; Saludes J. et al., 2002; Sang S. et al., 2001; Takashima J. et al., 2004) haben Extrakte aus Noni auf deren Inhaltsstoffe untersucht. Aus diesen Arbeiten gehen die komplexen Zusammensetzungen der Stoffklassen in den Extrakten sehr klar hervor.

In Tabelle 30 sind die neueren publizierten Inhaltsstoffe in methanolischen Auszügen und deren Verteilung auf die Ethylacetatfraktion nach Alkalisierung und Ansäuerung der eingengten methanolischen Fraktion dargestellt, ebenso wie die in Hexan erzielten sehr unpolaren Substanzen, vor allem mit Steroidcharakter und die zahlreichen neu beschriebenen Iridoide, Antrachinone, Oligo- und Polysaccharide. Auffällig ist auch das Vorkommen der zahlreichen β -glycosidischen Fettsäureester vor allem im Fruchtextrakt (Dalsgaard P. et al., 2006; Samoylenko V. et al., 2006). Viele dieser Glycoside werden bei wässriger Extraktion ohne Schutzvorkehrungen mit großer Wahrscheinlichkeit in die entsprechenden Aglyca und freie Zucker gespalten, da nahezu alle Pflanzen hohe Aktivitäten apoplastischer β -Glycosidasen aufweisen (Wink M., 2005). Sollte dies der Fall sein, entstehen dabei Substanzen die aufgrund ihres chemischen Grundkörpers sehr wahrscheinlich zellmembranwirksame Komponenten darstellen.

5.2. Erfahrungen mit den Estrogen Testsystemen

Das Verhalten der beiden Estrogenrezeptoren ist vielfach in der Literatur untersucht worden. Es zeigte sich unter anderem, dass E_2 gleich stark an beide Rezeptoren ($ER\alpha$ und $ER\beta$) bindet, die Verteilung der Rezeptoren in den Geweben jedoch unterschiedlich ist (Couse J. et al., 1997). Weiterhin wurde gezeigt das ein reiner Agonist auf $ER\beta$ antagonistische und auf $ER\alpha$ agonistische Wirkung haben kann (Katzenellenbogen B. et al., 2000) und das die Regulation verschiedener Gene durch $ER\alpha$ und $ER\beta$ gegenläufig beeinflusst wird/werden kann (Wang J. et al., 2006, Monroe D. et al., 2003). Cvorovic et al. (Cvorovic A. et al., 2006) beschrieben einen hemmenden Effekt von $ER\beta$ auf das Brustkrebswachstum, er postulierte das $ER\beta$ -selektive Phytoestrogene sicherer sein könnten als die HRT.

Tabelle 30: Beispiele verschiedener Inhaltsstoffe von Noniextrakten laut Literatur

polar	Gepresste Nonifrukt, Liu et al. 2001	6-O-(beta-D-glucopyranosyl)-1-O-octanoyl-beta-D-glucopyranose, asperulosidic acid
	Gepresste Nonifrukt, Samoylenko et al. 2006	1-O-(3'-methylbut-3'-enyl)-beta-d-glucopyranose, 1-n-butyl-4-(5'-formyl-2'-furanyl)methyl succinate, 4-epi-borreriagenin, asperulosidic acid, deacetylasperulosidic acid, 1-n-butyl-4-methyl-2-hydroxysuccinate, 1-n-butyl-4-methyl-3-hydroxy-succinate, alpha- und beta-glucopyranose, scopoletin
	Gepresste Nonifrukt, Wang et al. 2000	6-O-(beta-D-glycopyranosyl)-1-O-octanoyl-beta-D-glucopyranose, 6-O-(beta-D-glycopyranosyl)-1-O-hexanoyl-beta-D-glucopyranose, 3-methylbut-3-enyl-6-O-beta-D- glycopyranosyl-beta-D-glucopyranoside
	Methanolischer Auszug, Blätter basisch (pH 9,0) Takashima et al	8-Dehydroxymethylgardenosid (Citrofosid), Roseosid II, Deacetylasperulosid, Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-1- β -D-glucopyranosid, ursolic acid
	sauer (pH 3,5) Takashima et al	1,5,15-Trimethylmorindol, Kaempferol-3-O- α -L-rhamnopyranosyl-1- β -D-glucopyranoside, Quercetin-3-O α -L-rhamnopyranosyl-1- β -D-glucopyranoside, 13-hydroxy- 9,11,15-octadecatrienoic acid, pteryxin, peucedanocoumarin III, 5,15-dimethylmorindol, barbinervic acid, cletic acid, rotungenic acid, hederagenin, oleanolic acid, pheophorbide a, methyl pheophorbide b, methyl pheophorbide a, 15(S)-hydropurpurin-7 lactone dimethyl ester, 15(R) hydropurpurin-7-lactone-dimethylester, 13(S)-hydroxyphenophorbide a methyl-ester, 3-O-acetylpomolic acid, 13-epi-phaeophorbide a methyl ester, phytol
	N- butanol fraktion Sang et al 2001	Citrifolinoside A, asperuloside, asperulosidic acid (iridoid glycosides), β -sitosterol, ursolic acid
unpolar	Hexanfraktion, Blätter Saludes JP et al 2002	Cycloartenol, Stigmasterol, Beta-sitosterol, Campesta-5,7,22-trien-3-beta-ol, Ketosteroide (Stigmasta-4-en-3-one, Stigmasta-4-22-dien-3-one, E-phytol)

Das Testsystem der U-2 OS/ER α und ER β Zellen ist ein weltweit genutztes und etabliertes System für die Untersuchung der estrogenen Wirkung verschiedener Substanzen (Monroe D. et al., 2003; Effenberger K., 2004; Effenberger K. et al., 2005; Tee M. et al., 2004). Es konnte in Mikroarray-Untersuchungen gezeigt werden, dass wenige Gene sowohl von ER α als auch von ER β gemeinsam reguliert werden. AP und vWF wurden bereits mit verschiedenen Extrakten untersucht. So wurde von Monroe et al. (Monroe D. et al., 2003), untersucht und beschrieben, dass bei mit E₂ behandelten U-2 OS/ER α Zellen eine vermehrte Transkription der AP und des vWF stattfindet. Dies wurde bestätigt und mit weiteren Extrakten, unter anderem auch Pflanzenextrakten, untersucht (Effenberger K. 2004; Effenberger K. et al., 2005). Es wurde auch eine Heraufregulation der AP in U-2 OS/ER β -Zellen beschrieben (Effenberger K. 2005), jedoch gibt es auch Untersuchungen die ein Nichtansprechen der relativen Genexpression von AP beschreiben (Monroe D. et al., 2003). Bei IL-6 ist eine Hemmung der relativen Genexpression in beiden U-2 OS-Zelllinien beschrieben (Effenberger K. et al., 2005).

Die in der Literatur vorliegenden, besonders die an Pflanzenextrakten ausgeführten Tests (Effenberger K., 2004), weisen aus, dass die Testverfahren für wässrige /alkoholische Extrakte mit heterogenen Extraktstoffmischungen zur Überprüfung der estrogenen Wirkung geeignet sind. Allerdings treten in quantitativer Hinsicht Unterschiede hervor, deren Natur nach Effenberger (Effenberger K., 2004) weiter untersucht werden müssen: „Die Forschung an diesen und anderen pflanzlichen Stoffen sollte weiter vorangetrieben und intensiviert werden, um möglichst schnell vollwertige alternative Therapieoptionen zur HRT anbieten zu können.“ In diesem Sinne sind die Untersuchungen an Noniextrakten zu sehen.

5.3. Aktivitätsregulierung durch Phytoestrogene: Alkalische Phosphatase

Monroe et al. (Monroe D. et al., 2003) lieferten quantitative Daten zur Aktivitätserhöhung der zellulärer AP durch Applikation von Estrogen. Die AP wird ebenfalls durch Phytoestrogene erhöht (Effenberger K., 2004). Die Änderung der AP durch die Noniextrakte ist ebenfalls eindeutig, allerdings unterscheiden sich die Noniprobe sehr klar: die ER α positiven Zellen (U-2 OS/ER α , hFOB/ER α 9) reagieren mit einer Steigerung der AP-Aktivität, vor allem bei Behandlung mit ethanolischen und Hexan-Extrakten. Diese Reaktion entspricht den Annahmen und Befunden der Stoffverteilung in den Extraktionsmedien unterschiedlicher Polarität (Tabelle 30). Nach Sang et al. (Sang S. et al., 2001), vor allem aber nach Saludes et al. (Saludes J. et al., 2002), liegen die Phytosterole in den unpolaren Fraktionen, z.T. auch in den alkoholischen Fraktionen vor. Damit ist eine phytosteroläquivalente Wirkung durch die Stoffe in den weniger polaren Fraktionen der Nonigewebe belegt. Dies gilt sowohl für Extrakte aus Blättern, als auch für die Extrakte aus Früchten. Da im Zuge der Aufarbeitungsprozesse auch solche Substanzen extrahiert werden, die potentiell auch in andere Regulationsmechanismen in der Zelle bzw. der Zellmembran eingreifen können als am Estrogenrezeptor, ist das Nichtansprechen bzw. die Minderung der AP-Aktivität der U-2 OS/ER β Zellen gesondert zu bewerten. Es sollte geprüft werden ob die in den Extrakten vorhandenen weiteren Substanzen eine gegenteilige Wirkung aufweisen und somit eine einheitliche Veränderung der AP-Aktivität verhindern.

5.4: Realtime RT-PCR, Transkriptionsebene

Im Gegensatz zu den eindeutigen, vor allem auch konzentrationsabhängigen regelhaft verlaufenden Reaktionen der Aktivierung der AP im Enzymassay sind die Realtime-PCR Ergebnisse nicht eindeutig auslegbar. Zwar sind auch klare Belege für Transkriptionserhöhungen vorhanden, so z.B. der AP in den U-2 OS/ER α Zellen beim ethanolischen Fruchtextrakt und bei ethanolischem Sarothamnus-Extrakt, jedoch ist in keinem Fall eine klare Konzentrations-Wirkungsbeziehung vorhanden. Dies wird allerdings vermutlich deutlich verbessert werden können, wenn die polyfaktoriellen Proben mit zum Teil sehr hohen Gehalten unterschiedlicher bioaktiver Stoffe einer Fraktionierung und weiteren Tests unterzogen werden. Diese Analysen werden möglich, wenn die Extrakte über unpolare Testsysteme gereinigt, z.B. Sephadex LH 20 (Dalsgaard P. et al., 2006) oder Einzelfractionen über semipräparative HPLC mit RT 18 Trennsäulen gewonnen werden (Takashima J. et al., 2004).

5.5: Perspektiven

Noni ist eine Pflanze mit äußerst großem Potential bioaktiver Stoffe, die von ihrer antioxidativen Wirkung (Wang M. et al., 2001) über antiinflammatorische bis zur anticarcinogenen Wirkung beschrieben werden.

Die derzeitige Problematik zum detaillierteren Verständnis der Noni Wirkpotentiale liegt in der großen Anzahl von Stoffen, die als Stoffgemisch in biologischen Testverfahren noch überschneidende, gegebenenfalls sogar antagonistische Wirkung entfalten.

Die grundsätzlichen, nunmehr erforderlichen Schritte in der weiteren Bearbeitung sind fraktionierte Extraktionen, die semipräparative Stofftrennung und die danach mit definierten Stoffgruppen an komplexen Testsystemen auszuführenden Biotests. Wünschenswert ist in solchen Zusammenhängen die Erfassung polyfaktorieller Antworten, so wie es im DNA-Microarray möglich ist. Mit der Microarray-Chiptechnik wird auch die Analyse der Stoffgemische, d.h. die Bewertung der komplexen Extrakte ermöglicht.

Bei der außerordentlich großen Anzahl an Nutzern von Nonipräparaten ist es ein besonderer Faktor der medizinischen Begleitforschung akute und chronische Auswirkungen oder Nebenwirkungen der komplexen Pflanzenwirkstoffe zu untersuchen. In Einzelfallberichten (Pawlus A. et al., 2005; Kamiya K. et al., 2005) wird auf lebertoxische Effekte durch Antrachinone hingewiesen. Dem stehen sehr systematische Studien von West B. et al., 2006, sowie Westendorf J. et al. 2007 entgegen in denen jedwede Indikation für hepatotoxische oder genotoxische Effekte aus Nonisaft

ausgeschlossen werden können. Die Autoren weisen allerdings darauf hin, dass möglicherweise Wurzelextrakte von *Morinda citrifolia* oder andere Beimischungen in der Lage sein könnten, höhere Gehalte an Antrachinonderivaten mit einzubringen.

Für die medizinische Anwendung wird in der Folgestufe die Frage der Bioverfügbarkeit der Substanzen und der Interferenz mehrerer Extraktkomponenten zu beantworten sein. Schließlich sollte in retrospektiven und prospektiven epidemiologischen Studien an Noni-Konsumentinnen (es gibt davon weltweit mehrere Millionen) nach Anzeichen einer physiologischen Hormonwirkung gesucht werden. Ausgehend von hier erhobenen Befunden sollte sich dazu besonders eine Überprüfung der Knochendichte bei postmenopausalen Frauen eignen.

6.1. Zusammenfassung

Die zentrale Fragestellung der vorliegenden Arbeit war die Erfassung der Auswirkung unterschiedlicher Pflanzenextrakte, insbesondere von *Morinda citrifolia*, auf die Induktion des Enzyms Alkalische Phosphatase bzw. auf die Expression von Markergenen in ausgewählten Zelllinien. Als zu untersuchende Gene wurden der vWF (von Willebrand Faktor), IL-6 (Interleukin-6) und AP (alkalische Phosphatase) gewählt. Als Zelllinien wurden die experimentell erprobten und in der Literatur beschriebenen Zelllinien hFOB/ER α 9 und U-2 OS/ER α und ER β eingesetzt. Die Eignung dieser Zelllinien wurde durch Monroe et al., 2003) und Effenberger et al., 2005) erarbeitet und belegt.

Für die Erfassung der *Morinda citrifolia* (Noni) Wirkung wurden verschiedene Extrakte eingesetzt, deren physikochemischen Charakteristika unter Verwendung neuer Resultate zu bioaktiven Inhaltsstoffen von Noni gruppiert wurden.

Im Alkalischen Phosphatase Assay zeigte sich bei allen ethanolischen Extrakten bei ER α positiven Zellen ein steigernder Effekt auf die AP-Aktivität, bei den hFOB Zellen jedoch nur in den geringsten Konzentrationen. Bei den wässrigen Extrakten gab es z.T. leichte Steigerungen in der AP-Aktivität. Die unpolare Hexanfraktion zeigte auch bei ER α positiven Zellen einen stark aktivierenden Effekt.

In der Realtime RT-PCR sind die Ergebnisse nicht eindeutig. Bei den Extrakten sind die Reaktionen in den unterschiedlichen Konzentrationen nicht gleichmäßig. Grundsätzlich weisen alle Extrakte eine verändernde Wirkung auf, es kommt jedoch nicht in allen Konzentrationen zu einer Steigerung der Genexpression.

Diese Diskrepanz wird zurückgeführt auf die mögliche Interaktion der potentiell bioaktiven Stoffe und deren unterschiedliche Wirkung auf die Testzellen.

In jedem Fall enthalten die unpolaren Extrakte, hergestellt über Hexanextraktion, eine ausgeprägte Wirkung, so dass von diesem Befund ableitbar ist, dass Komponenten wie zum Beispiel Sitosterin unter anderem die Estrogenrezeptoren besetzen ohne dass in diesen Extrakten noch weitere, zum Teil hemmende Stoffe, ihre Wirkung entfalten können.

Bei den Ethanolextrakten sind die Resultate nicht so eindeutig. Von daher müssen Interaktionswirkungen postuliert werden.

Dementsprechend kann als Ausblick abgeleitet werden, dass die estrogenen Wirkungen aus *Morinda citrifolia* nach Fraktionierung sehr viel deutlicher zutage treten können.

6.2. Summary

This study presents the action of extracts prepared from *Morinda citrifolia* (Noni) and other phytoestrogen containing plants on the induction of alkaline phosphatase and on the expression of marker genes in selected test cell lines. The investigated genes are vWF (von Willebrand Factor), IL-6 (interleukin-6) and AP (alkaline phosphatase). The cell lines used are the well described test systems hFOB/ER α 9 and U-2 OS/ER α and ER β . It has previously been shown by Monroe D. et al. and Effenberger K. et al. that these cell lines are suitable to serve as sensitive marker systems.

Several extracts have been used to test and describe the influence of *Morinda citrifolia* (Noni). The extracts were grouped according to their physicochemical characteristics. In the Alkaline Phosphatase (AP) Assay the ethanol extracts reveal an enhancement of the AP-activity with ER α positive cell lines. Similar effects were observed also in the hFOB cells, but only at low concentrations.

Aqueous extracts led partially to slight enhancements of AP-activation. The non-polar hexane-extracts led to a strong activation with ER α cells.

In the realtime RT-PCR the results are not so easy to interpret, because with all extracts used the reactions varied with the concentrations applied. Basically all extracts lead to changes, but the application is not in all cases correlated to an enhancement of the gene expression. In some cases gene expression was reduced by the extracts. This discrepancy might be due to the potentially diverse and antidromic action of the sum of bioactive extract components on the test cells.

In any case the non polar extracts, produced by hexane treatment, reveal an expressed action on the cells. From these results it can be unequivocally deduced, that compounds as for example sitosterin interact with positions at the estrogen receptor and thus, other potentially inhibiting compounds are not able to interfere.

With ethanolic extracts these results are less pronounced. The interpretation of the experimental outcome again needs to postulate interactions of bioactive ingredients. As a perspective it must be deduced from the actual state of the results, that the positive medical effects of *Morinda citrifolia* will be seen much more precisely when selected fractions of bioactive compounds are tested.

7. Literaturverzeichnis

Adlercreutz H, Goldin BR, Gorbach SL. 1995: Soybean phytoestrogen intake and cancer risk. *J Nutr.* 125, 757-770.

Adlercreutz H, Hamalainen E, Gorbach S, Goldin B. 1992: Dietary phyto-oestrogens and menopause in Japan. *Lancet* 339(8803):1233.

Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Hockerstedt K, Hamalainen E, Wahala K, Makela T, Hase T. 1992: Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 41, 331-337.

An J, Tzagarakis-Foster C, Scharschmidt T, Lomri N, Leitman DC. 2001: Estrogen receptor β -selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by phytoestrogens. *J. Biol. Chem.* Vol. 276, 17808-17814.

American Chemical Society 2000: Noni plant may yield new drugs to fight tuberculosis. Press release, The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies.

Atkinson N. 1956: Antibacterial substances from flowering plants. 3. Antibacterial activity of dried Australian plants by a rapid direct plate test. *Australian J Exper Biol.* 34, 17-26.

Bairey Merz CN, Johnson BD, Braunstein GD, Pepine CJ, Reis SE, Paul-Larador M, Hale G, Sharaf BL, Bittner V, Sopko G, Kelsey SF. 2006: Phytoestrogens and lipoprotein in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 91 (6): 2209-13.

Barkham T, Carlson B, Nielsson Y, Emark E, Gustafson JA, Nielsson S. 1998: Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacol.* 54, 105-112.

Baskaran N, Kandpal RP, Bhargava AK, Glynn MW, Bale A, Weisman SM. 1996: Uniform amplification of a mixture of deoxyribonucleic acids with varying GC content. *Genome Res.* 6 (7), 633-638.

Boersma BJ, Bares S, Kirk M, Wang CC, Smih M, Kim H, Xu J, Patel R, Darley-Usmar VM. 2001: Soy isoflavonoids and cancer – metabolism at the target site *Mutat Res.* 480-481:121-7.

Boos G, Stopper H. 2000: Genotoxicity of several clinically used topoisomerase II inhibitors. *Toxicol Lett.* 116(1-2):7-16.

Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J. 2001: Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin. EndocrinolMetab.* 86(5):2309-14.

Bowe J, Li XF, Kinsey-Jones J, Heyerick A, Brain S, Milligan S, O'byrne K. 2006: The hop phytoestrogen, 8-prenylnaringenin, reverses the ovariectomy-induced rise in skin temperature in an animal model of menopausal hot flushes *J Endocrinol.* 191(2):399-405.

Bui AK, Bacic A, Pettolino F. 2006: Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). *Phytochemistry* 67, 1271-1275.

Burgis E. 2001: Intensivkurs Allgemeine und spezielle Pharmakologie, 2. Auflage, Urban und Fischer Verlag, S351-352.

Calzuola I, Gianfranceschi GL, Marslili V. 2006: Comparative activity of antioxidants from wheat sprouts, *Morinda citrifolia*, fermented papaya and white tea. *Inter J of Food Sciences and Nutrition* 57, 168-177.

Cheng S, Fockler C, Barnes WM, Higuchi R. 1994: Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91 (12), 5695-5699.

Cotterchio M, Boucher BA, Manno M, Gallinger S, Okey A, Harper P. 2006: Dietary phytoestrogen intake is associated with reduced colorectal cancer risk. *J Nutr.* 136(12):3046-3053.

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS. 1997: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology*. 138(11):4613-21.

Cvoro A, Paruthiyil S, Jones J, Tzagarakis-Foster C, Clegg NJ, Tatomer D, Medina RT, Tagliaferri M, Schaufele F, Scanlan TS, Diamond MI, Cohen I, Leitman DC. 2006: Selective activation of estrogen receptor {beta} transcriptional pathways by an herbal extract. *Endocrinology*. Nov 9.

Dalsgaard PW, Potterat O, Dieterle F, Paululat T, Kühn T, Hamburger M. 2006: Nonisoides E – H, new trisaccharide fatty acids esters from the fruit of *Morinda citrifolia* (Noni). *Planta Med*.72(14): 1322-1327.

Diez-Perez A. 2006: Selective estrogen receptor modulators. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 50(4):720-34.

Dragan YP, Xu YD, Pitot HC. 1991: Tumor promotion as a target for estrogen/antiestrogen effects in rat hepatocarcinogenesis. *Prev Med*. 20(1):15-26.

Effenberger K. 2004: Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen Zellpopulationen – Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur Hormonersatztherapie in der Menopause, Dissertation, Hamburg 2004.

Effenberger KE, Johnsen SA, Monroe DG, Spelsberg TC, Westendorf JJ. 2005: Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop-derived phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*. (5):387-99.

Fait T, Malkova J, Zivny J. 2002: Effect of hormone replacement therapy on the cardiovascular system. *Ceska Gynekol*. 67(5):285-93.

Fotsis T, Pepper MS, Aktas E, Breit S, Rasku S, Adlercreutz H, Wähälä K, Montesano R, Schweiger L. 2003: Flavonoids, dietary-derived Inhibitors of cell proliferation and *in vitro* angiogenesis. *Cancer research* 57, 2916-2921.

Frohne D, Jensen U. 1992: Systematik des Pflanzenreichs unter Berücksichtigung chemischer Merkmale und pflanzlicher Drogen. G Fischer Stuttgart, 4.Aufl.

Furusawa E, Hirazumi A, Story S, Jensen J. 2003: Antitumor potential of a polysaccharid-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on a sarcoma 180 ascites tumor in mice. *Phytother Res* 10, 1158-1164.

Gustafsson JA. 2000: An update on estrogen receptors. *Semin Perinatol.* 24(1):66-9.

Harris SA, Enger RJ, Riggs BL, Spelberg TC. 1995: Development and characterization of a conditionally immortalized human fetal osteoblastic cell line. *J Bone Miner Res.* 10 (2):178-86.

Harris SA, Tau KR, Enger RJ, Toft DO, Riggs BL, Spelberg TC. 1995: Estrogen response in the hFOB1.19 human fetal osteoblastic cell stably transfected with the human estrogen receptor gene. *J Cell Biochem.* 59(2): 193-201.

Heinicke R. 2001: The Xeronine system: a new cellular mechanism that explains the health promoting action of Noni and Bromelian. Direct Source Publishing.

Hoc, S. 2003: Osteoporose: Mikroarchitektur des Knochens erhalten, *Deutsches Ärzteblatt* 100, Ausgabe 49, Seite A-3260.

<http://flexicon.doccheck.com/> 2006

<http://www.biotest.de> 2006

Katzenellenbogen BS, Choi I, Delage-Mourroux R, Ediger TR, Martini PG, Montano M, Sun J, Weis K, Katzenellenbogen JA. 2000: Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 30; 74(5):279-85.

Kamiya K, Tanaka Y, Endang H, Umar M, Satake T. 2005: New anthraquinones and iridoid from the fruits of *Morinda citrifolia*. Chem. Pharm. Bull. 53; 1597-1599.

Kim MH. 2003: Flavonoids inhibit VEGF/bFGF-induced angiogenesis in vitro by inhibiting the matrix-degrading proteases. J Cell Biochem 89, 529-538.

Knight DC, Eden JA 1996: A review of the clinical effects of phytoestrogens. Obstetrics & Gynecology;87:897-904.

Kuiper GGJM., Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S and Gustafsson JÅ. 1997: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . Endocrinology 138, No. 3 863-870.

Kulak CA, Bilezikian JP. 1999: Bone mass measurement in identification of women at risk for osteoporosis. Int J Fertil Womens Med. 44(6): 269-78.

Kullung S, Watzl B. 2003: Basiswissen aktualisiert, Phytoestrogene, Ernährungs-Umschau 50, Heft 6, S. 234-239.

Lamon-Fava S, Posfai B, Asztalos BF, Horvath KV, Dallal GE, Schaefer EJ. 2003: Effects of estrogen and medroxyprogesterone acetate on subpopulations of triglyceride-rich lipoproteins and high-density lipoproteins. Metabolism. (10):1330-6.

Liu G, Bode A, Ma WY, Sang S, Ho CT, Dong Z. 2001: Two novel glycosides from the fruits of *Morinda citrifolia* (noni) inhibit AP-1 transactivation and cell transformation in the mouse epidermal JB6 cell line. Cancer Res 61, 5749-5756.

Löffler Petrides, 1997: Biochemie und Pathobiochemie, 5. Auflage, Springer Verlag 749-752.

Loewe S, Lange F, Spohr E. 1927: Über weibliche Sexualhormone (Thelytropine). Biochem. Zeitschr. 180, 1-26.

Metka M. 2001: Phytoestrogene, Phytogestagene und Phytoandrogene, Journal für Menopause, 8 (4), Ausgabe Deutschland, S. 12-18.

Monroe DG, Getz BJ, Johnson SA, Riggs BL, Khosla S, Spelsberg TC 2003: Estrogen receptor isoform-specific regulation of endogenous gene expression in human osteoblastic cell lines expressing either ER α or ER β . Journal of Cellular Biochemistry 90:315-326.

Monroe, DG, Johnson SA, Subramanian M, Getz BJ, Riggs BL, Khosla S, Spelsberg TC. 2003: Mutual antagonism of estrogen receptors α and β and their preferred interactions with steroid receptor coactivators in human osteoblastic cell lines. Journal of Endocrinology; 176: 349-357.

Murkies AL, Wilcox G, Davis SR. 1998: Phytoestrogens. J Endocrin Metabol; 83: 297-303.

Nelson S.C. 2006: *Morinda citrifolia* (noni) Species profiles for Pacific islands agroforestry, www.traditionaltree.org

Nikander E, Metsä-Heikkilä M, Ylikorkala O, Tiitinen A. 2004: Effects of phytoestrogens on bone turnover in postmenopausal women with a history of breast cancer. Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism Vol. 89, No. 3 1207-1212.

Nilsson S, Gustafsson J-Å. 2000: Estrogen receptor transcription and transactivation: Basic aspects of estrogen action, Breast Cancer Res, 2:360-366.

Pawlus A.D, Su B.N, Keller W.J, Kinghorn A.D. 2005: An anthraquinone with potent quinone reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (noni). J. Nat. Prod. 68 (12), 1720-1722.

Qu Q, Harkonen PL, Monkkonen J, Vaananen HK. 1999: Conditioned medium of estrogen-treated osteoblasts inhibits osteoclast maturation and function in vitro. Bone 25 (2), 211-215.

Raj RK. 1975: Screening of indigenous plants for antihelminthic action against human *Ascaris Lumbricoides*: Part-II. Indian J Physiol Pharmacol 19: 47-9.

Redaktion FAKT des mdr und die AOK 2006: Hormonersatztherapie in der Kritik

Rickard DJ, Subramaniam M, Spelsberg TC. 1999: Molecular and cellular mechanisms of estrogen action on the skeleton. J Cell Biochem. 75, 123-132.

Riggs BL, Khosla S. 1995: Role of biochemical markers in assessment of osteoporosis. Acta Orthop Scand Suppl. 266: 14-18.

Robinson JA, Harris SA, Riggs L, Spelsberg TC. 1997: Estrogen regulation of human osteoblastic cell proliferation and differentiation. Endocrinology 138(7): 2919-2927.

Rossouw JE. 2002: Effect of postmenopausal hormone therapy on cardiovascular risk. J Hypertens Suppl. 20(2):S62-5.

Saludes JP, Garson MJ, Franzblau SG. 2002: Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* Linn. (Rubiaceae). Phytother Res 16(7): 683-5.

Samoylenko V, Zhao J, Dunbar DC, Khan IA, Rushing JW, Muhammed J. 2006: New constituents from Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. J. Agric Food Chem. 54 (17), 6398-6402.

Sang S, Cheng X, Zhu N, Wang M, Jhoo JW, Stark RE, Badmaev V, Ghai G, Rosen RT, Ho CT. 2001: Iridoid glycosides from the leaves of *Morinda citrifolia*. J Nat. Prod. 64, 799-800.

Sarkar FH, Li Y. 2003: Soy isoflavones and cancer prevention. Cancer Invest 21, 744-757.

Scholz, H, Schwabe, H. 2000: Taschenbuch der Arzneimitteltherapie, 12. Auflage, Thieme Verlag, 252-253.

Stevenson JC, Rees M., 2003 Further confusion in postmenopausal health. Issued on behalf of Women's health Concern, and of British Menopause Society. Conference Proceeding.

Stossi F, Barnett DH, Frasor J, Komm B, Lyttle R, Katzenellenbogen BS. 2004: Transcriptional profiling of estrogen-regulated gene expression via estrogen receptor (ER) α or ER β in osteosarcoma cells: distinct and common target genes for these receptors. *Endocrinology* 145, 3473-3486.

Subramaniam M, Harris SA, Oursler MJ, Rasmussen K, Riggs L, Spelsberg TC. 1995: Identification of a novel TGF- β -regulated gene encoding a putative zinc finger protein in human osteoblasts. *Nucleic Acids Res.* 23, 4907-4912.

Takashima J, Ideka Y, Komiyama K, Hayashi M, Kishida A, Ohsaki A. 2004: New constituents from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Phytochemistry*; 65; 945-954.

Tee MK, Rogatsky I, Tzagarakis-Foster C, Cvorovic A, An J, Christy RJ, Yamamoto KR, Leitman DC. 2004: Estradiol and selective estrogen receptor modulators differentially regulate target genes with estrogen receptors α and β . *MBC* 15, 1262-1272.

Tham DM, Gardner CD, Haskell WL. 1998: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrin Metabol* 83: 2223-35.

Thanos J, Cotterchio M, Boucher BA, Kreiger N, Thompson LU. 2006: Adolescent dietary phytoestrogen intake and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control.* Dec;17(10):1253-61.

Tomas B, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson JÅ, and Nilsson S. 1998: Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial estrogen agonists/antagonists. *Molecular Pharmacology*, Vol. 54, 105-112.

Varadaraj K, Skinner DM. 1994: Denaturants or cosolvents improve the specificity of PCR amplification of a G + C-rich DNA using genetically engineered DNA polymerases. *Gene*, 140 (1): 1-5.

Vollmer G, Zierau O. 2006: Was sind Phytoestrogene und Phyto-SERMs: Pflanzeninhaltsstoffe mit Wirkung auf das Hormonsystem. Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie, Institut für Zoologie, Technische Universität Dresden.

Wang JM, Irwin RW, Brinton RD. 2006: Activation of estrogen receptor alpha increases and estrogen receptor beta decreases apolipoprotein E expression in hippocampus *in vitro* and *in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(45):16983-8.

Wang LQ. 2002: Mammalian phytoestrogens: enterodiol and enterolactone. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 777(1-2):289-309

Wang M, kikuzaki H, Jiu Y, Nakatani N, Zhu N, Csiszar K, Boyd C, Rosen RT, Ghai G, Ho CT. 2000: Novel glycosides from Noni (*Morinda citrifolia*). J Nat Prod, 1182-1183.

Wang MY, Su C. 2001: Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). Ann NY Acad Sci; 952: 161-8.

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. University of Illinois/ Acta Phamacol Sin, S1127-1141

Waters KM, Rickard DJ, Riggs BL, Khosla S, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Moore J, Spelsberg TC. 2001: Estrogen regulation of human osteoblasts function is determined by the stage of differentiation and the estrogen receptor isoform. J Cell Biochem 83 (3), 448-462.

Watzl B, Rechkemmer G. 2001: Basiswissen aktualisiert, Flavonoide. Ernährungs Umschau 48, S498-502

West BJ, Jensen CJ, Westendorf J, White LD. 2006: A safty review of Noni fruit juice. Journal of Food Science 71 (8), 100-106

Westendorf J, Efenberger K, Iznaguen H, Basar S. 2007: Toxicological and analytical investigation of Noni (*Morinda citrifolia*) fruit juice. J. Agric. Food Chem. 55; 529-537.

Wink M. 2005: Wie funktionieren Phytopharmaka. Zeitschrift für Phytotherapie 26; 262-270.

www.heilpflanzen-suchmaschine.de,
www.realtimeprimers.org

Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC, Misslin R, Mortier F. 1990. Analgesic and behavioural effects of *Morinda citrifolia*. Planta Med; 56: 430-4

Zaidan MR, Noor Rain A, Badrul AR, Adlin A, Norazah A, Zakiah I. 2005: *In vitro* screening of five local medicinal plants for antibacterial activity using disc diffusion method. Trop Biomed.22 (2): 165-70.

Zhang S, Qin C, Safe SH. 2003: Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. Environ. Health Perspect. 111, 1877-1882

Zittermann, A. 2003: Phytoöstrogene. Zentralbl. Gynakol. 125, 195-201,

8. Anhang

8.1. Abkürzungsverzeichnis

AP	Alkalische Phosphatase
APA	Alkalische Phosphatase Assay
CIM	Extrakt aus <i>Cimicifuga racemosa</i> L. NUTT, der Traubensilberkerze
CP	Crossing Point
cs-FBS	weitgehend von allen estrogen wirksamen Bestandteilen befreites fetales Rinderserum
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM/F12	Dulbecco's modified Eagle Medium/F12
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
dsDNA	Doppelsträngige DNA
E ₂	17β-Estradiol
EE	Ethinylestradiol
ERα/β	Estrogenrezeptor α/β
EtOAc	Ethylacetat
EtOH	Ethanol
FBS	Fetales Rinderserum (Fetal Bovine Serum)
hFOB ERα9	humane fetale Osteoblasten, stabil transfiziert mit Estrogenrezeptor α
Hex	Hexan
HDL	High-Density-Lipoprotein
HRT	Hormonersatztherapie
IL-6	Interleukin-6
LDL	Low-Density-Lipoprotein
Met	Methanol
Noni1	Nonipüree, ethanolischer Auszug
Noni2	Nonipüree, wässriger Auszug
Noni3	Noniblätter, ethanolischer Auszug
Noni4	Noniblätter, wässriger Auszug
PBS	Phosphat Buffered Saline (isotoner Phosphatpuffer)
PHA	Extrakt aus <i>Phaseolus vulgaris</i> L., der Gartenbohne
SAR	Extrakt aus <i>Sarothamnus scoparius</i> W. D. J. KOCH, der Besenginster
SERM	Selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SHBG	Sexual-Hormon-Binding-Globulin
SOY	Extrakt aus <i>Glycine max.</i> (L) MERR, der Sojabohne
TE-Buffer	Tris-HCL Puffer mit EDTA
TNI	Tahitian Noni International Inc.
TNJ	Tahitian Noni Juice (Markenprodukt der Fa. Tahitian Noni International Inc.)
TTS	Transdermal therapeutisches System
U2OS ERα/β	Osteosarkomzellen, stabil transfiziert mit ERα bzw. ERβ
vWF	von Willebrand Faktor
WHO	World Health Organisation

8.2. Anhang zum Methodenteil:

Zu den hFOB/ER Zellen

ER α wurde durch Transfektion mit dem ER α Expressionsfaktor pHEGO-HYG (ATCC) (Harris S. et al., 1995) in hFOB 1.19 Zellen gebracht. Der Vektor wurde durch das Einbringen des ER α -cDNA-Fragmentes in den EcoRI Bereich des pBlueskript SK Vektors (Firma Stratagene) erzeugt (Effenberger K., 2004). Selektiert werden die Zellen über eine Neomycinresistenz (Geneticin, G418). Der Klon hFOB/ER α 9 entspricht der verwendeten Zelllinie.

Zu U-2 OS/ER α und β und dem T-RExTM System:

Das System, welches von Monroe et al. (Monroe D. et al., 2003) zur Herstellung der ER induzierbaren Zelllinien verwendet wurde, macht Gebrauch von zwei Vektoren, einem Tetracyclin-Repressor (pcDNA6/TR \odot) und einem Cytomegalievirus Promotor (pcDNA4/TO \odot), welcher unter Kontrolle der Tet-Operator Sequenzen das Zielgen exprimiert. Ist kein Dox vorhanden so bindet der Tetracyclin-Repressor an die Tet-Operator Sequenzen und die Transkription des klonierten Gens wird verhindert.

Bei einer Zelldichte von 50% wurde der Vektor pcDNA6/TR \odot linearisiert und in U-2 OS Zellen transfiziert, unter Anwendung von Lipofectamin Plus Reagenz (Invitrogen).

Eine Ringklonierung fand in DMEM- Medium unter Zusatz von 5mg/dl Blasticidin (Boehringer Mannheim, Indianapolis, In) statt. Zur Überprüfung der erfolgreichen Transfektion wurde die Dox- induzierte Expression des Luciferase- Gens getestet und der Subklon mit der höchsten Dox- Induzierbarkeit wurde weiterverwendet.

U-2 OS/ER α und ER β wurden aus mit FLAG-Epitop markierten ER α . bzw. ER β Rezeptorproteinen, welche mit Vektor pcDNA4/TO \odot kloniert vorlagen, ebenfalls linearisiert und nach obiger Beschreibung kloniert (Monroe D. et al., 2003). So können auch die Konzentrationen der Rezeptoren in den Zelllinien bestimmt werden (Monroe D. et al., 2003), so dass davon ausgegangen werden kann, dass beide Zelllinien eine etwa gleich hohe Rezeptorenanzahl enthalten, was für den Vergleich der Wirkungen der Substanzen wichtig ist. Dies kann geschehen, da die Epitop Markierungen am N-terminalen Ende des ER-Proteins von einem Antigen als Antikörper erkannt werden und so im Western Blot dargestellt werden können.

Zum AP- Assay:

Das Prinzip der Messung der AP beruht auf dem System der Absorbtionsmessung freien, gelb gefärbten p-Nitrophenols, welches in alkalischem Milieu bei Enzymanwesenheit durch Phosphatabspaltung aus p-Nitrophenylphosphat entsteht. Die Menge an gebildetem p-Nitrophenol ist proportional zur Aktivität der AP.

Als Standard dient eine Verdünnungsreihe (0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50nmol/ml) aus einer frisch zubereiteten p-Nitrophenol-Stocklösung der Konzentration 50nmol/ml. Diese wird hergestellt durch eine Verdünnung der p-Nitrophenolstandardlösung von Sigma (Nr. 104-1), mit 10,0ml 0,02 NaOH. Jede Verdünnung entspricht einem in Sigma U/ml angegebenen Wert an AP-Aktivität (Effenberger K. 2004).

Quellen der Primersequenzen:

Da sich die anfänglich von uns verwendeten Primer nicht mit Realtime RT-PCR untersuchen ließen, benutzten wir Primer- Sequenzen für AP, vWF sowie β -Actin, die wir von der Arbeitsgruppe um Dave Monroe bekommen haben. Für IL-6 benutzten wir eine Sequenz von der Universität von Pennsylvania, (publiziert auf der Internetseite www.realtimeprimers.org) übergeben durch Steven A. Johnsen, Ph.D.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Arbeitsgruppe für Toxikologie des Institutes für Experimentelle und Klinische Pharmakologie und Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Ich danke Herrn Prof. Dr. J. Westendorf für die Bereitstellung des Themas sowie die Betreuung der Arbeit, ferner für die jederzeitige Möglichkeit der Diskussion und das ständige wissenschaftliche Interesse an der Arbeit. Auch danke ich Frau Dr. K. Effenberger für die Einarbeitung in die Technik und wertvolle thematische Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Sabine Schröder für die Einarbeitung in den Umgang mit Zellkulturen, die tägliche praktische Unterstützung und die zahlreichen Hinweise und Handgriffe ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre sowie dem gesamten Team der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Westendorf.

Weiterhin danke ich meiner Kommilitonin und Freundin Marlies Schmitt, ohne deren Motivation diese Arbeit wohl nie ein Ende gefunden hätte.

Für die Bereitstellung der pflanzlichen Proben danke ich der Firma Tahitian Noni International Inc. Utah, USA und der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH Karlsruhe.

Vor allem möchte ich mich bei meinen Eltern Reinhard und Roswitha sowie meinen Geschwistern Saskia, Ankea und Ansgar bedanken, die immer ein offenes Ohr für meine Sorgen und Probleme haben und mich auf meinem Weg mit Liebe und Ratschlägen immer begleitet und bestärkt haben. Auch bedanke ich mich bei meinem Ehemann Matthias, der mich in schlechten Zeiten gut zu motivieren weiss und der immer an mich glaubt, sowie bei seinen Eltern, die stets mit Interesse den Stand der Dinge verfolgen.

Lebenslauf

Swenja Katharina Lieberei
Horner Weg 38a
20535 Hamburg

Geburtsdatum/-ort :

24.05.1979, Braunschweig

Schulbildung:

1986-1989 Rudolf-Steiner Schule Braunschweig
1989-1999 Rudolf-Steiner Schule Hamburg-Wandsbek
1999 Abschluss: Abitur

Freiwilliges Soziales Jahr:

1. 8.1999-31.7.2000 Diakonisches Werk der evangelisch-reformierten Kirche, im
Haus Blinkfuer auf Borkum

Studium:

Oktober 2000 bis Oktober 2006
Studium der Medizin an der Universität Hamburg

Berufliche Karriere:

Seit Dezember 2006 Assistenzärztin der I. Medizinischen Abteilung im
Diakoniekrankenhaus Rotenburg (Wümme)

Sonstige Nebentätigkeiten:

03.1996-07.1999 Jugendgruppenleiterausbildung, dann Jugendarbeit in der
evangelischlutherischen Kirchengemeinde Berstedt bis 1999
25.4.'01-31.03.'02 Laboraushilfe im Labor Prof. Arndt und Partner
12.12.'02-31.10'05 Pflegeaushilfe in der Parkresidenz Alstertal im
Dementenbereich
11.2004-02.2007 Grundausbildung der Akupunktur bei der Deutschen
Ärztegesellschaft für Akupunktur e.V. (Grundkurse 1-10
sind absolviert: siehe Belege für 1. und 10. Kurs 11 sowie
die Prüfung zum A-Diplom werden noch in diesem Jahr
abgeschlossen)

Erklärung:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Prüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung der Promotion beworben habe.

Swenja Lieberei