

**Der Einfluss von Phytoestrogenen auf Estrogenrezeptor
gesteuerte Expressionsmuster in unterschiedlichen
Zellpopulationen –
Untersuchung potentieller pflanzlicher Alternativen zur
Hormonersatztherapie in der Menopause**

Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereiches Chemie
der Universität Hamburg

vorgelegt von

Katharina Effenberger

aus Hamburg

Hamburg 2004

1. Gutachter: Prof. Dr. J. Westendorf
2. Gutachter: Prof. Dr. M. Korth

Tag der Disputation: 16.Juli 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	6
1.1	Postmenopause und Hormonersatztherapie	6
1.1.1	Beschwerden in der Menopause - Wirkungen und Gefahren der Hormonersatztherapie	6
1.1.2	Arzneiformen	7
1.2	Phytoestrogene	8
1.2.1	Definition	8
1.2.2	Wirkungen	12
1.2.3	Vorkommen	15
1.2.4	Arzneiformen	17
1.2.5	Stand der Forschung	17
1.2.5.1	Knochen	18
1.2.5.2	Brust	21
1.2.5.3	Endometrium	22
1.2.5.4	Leber	23
1.2.6	Stand der Forschung hinsichtlich der untersuchten Pflanzen	24
1.2.6.1	Humulus lupulus	24
1.2.6.2	Glycyrrhiza glabra	26
1.2.6.3	Glycine max.	27
1.2.6.4	Cimicifuga racemosa	28
1.2.6.5	Phaseolus vulgaris	29
1.2.6.6	Sophora flavescens, Sarothamnus scoparius	29
1.3	Estrogenrezeptoren	29
1.3.1	Funktion	30
1.3.2	Splicevarianten und Polymorphismen	33
1.3.3	Struktur-Wirkungs-Beziehungen	35
1.3.4	Verteilung im Organismus	36
1.3.5	Rolle der ER in der Signaltransduktion bei bestimmten Krebsarten	36
1.4	Modelle zur experimentellen Überprüfung estrogener Wirkungen	38
1.4.1	Beschreibung der ausgewählten Zellsysteme und Gründe für ihre Wahl	38
1.4.1.1	„Modell Knochen“	38
1.4.1.2	„Modell Brust“	40
1.4.1.3	„Modell Endometrium“	41
1.4.1.4	„Modell Leber“	42
1.4.2	Beschreibung der verwendeten Endpunkte	42
1.4.2.1	Messung der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in der hFOB/ER α -Zelllinie	42
1.4.2.2	Messung der Genexpression in U-2 OS/ER-Zelllinien	42
1.4.2.3	Messung der Proliferation in der MCF-7-Zelllinie	43
1.4.2.4	Messung der Transkriptionsaktivität in transient transfizierten MCF-7 Zellen	44
1.4.2.5	Messung der Alkalischen Phosphatase in der Ishikawa-Zelllinie	44
1.4.2.6	Messung der Genexpression in der Fe 33-Zelllinie	45
1.5	Fragestellung	46
2.	Methoden	49
2.1	Rezeptor-Bindungsassay	49
2.2	Untersuchung der Zytotoxizität: Bestimmung der „Colony Forming Efficiency“	50
2.3	Alkalische Phosphatase in hFOB/ERα9 Zellen	50

2.3.1	Zellsystem hFOB/ER	50
2.3.2	Bestimmung der Alkalischen Phosphatase	51
2.4	Proteinbestimmung nach Bradford	52
2.5	RT-PCR in U-2 OS/ER Zellen	53
2.5.1	Zellsystem U-2 OS/ER	53
2.5.2	RNA-Isolierung (6-well)	54
2.5.3	cDNA Synthese (Reverse Transkription)	54
2.5.4	Durchführung der RT-PCR	55
2.6	Experimente im Zellsystem MCF-7	57
2.6.1	Proliferationsassay in MCF-7 Zellen	57
2.6.2	Luciferase Assay in MCF-7 Zellen	58
2.6.2.1	Transiente Transfektion der MCF-7 Zellen	58
2.6.2.2	Durchführung des Luciferase Assays	58
2.6.3	Überprüfung der Estrogenrezeptor-Expression in MCF-7 Zellen	61
2.6.3.1	Mittels RT-PCR	61
2.6.3.2	Mittels Realtime-RT-PCR	61
2.7	Experimente im Zellsystem Ishikawa	61
2.7.1	Alkalische Phosphatase in Ishikawa Zellen	61
2.7.2	Überprüfung der Estrogenrezeptor-Expression in Ishikawa Zellen mittels Realtime-RT-PCR	62
2.8	Realtime-RT-PCR in Fe33 Zellen	62
2.8.1	Die Realtime-RT-PCR	62
2.8.2	Vorbereitung und Analyse der Realtime-RT-PCR	66
3.	Ergebnisse	71
3.1	Der Rezeptor-Bindungsassay - Untersuchung der differentiellen Affinität der pflanzlichen Proben zu den Estrogenrezeptoren	71
3.2	Überprüfung der Zytotoxizität der Phytoestrogene in Zellkultur	86
3.3	Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf den Knochen	88
3.3.1	Regulation der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in hFOB/ER Zellen	89
3.3.2	Regulation der Genexpression in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen mittels RT-PCR	91
3.3.2.1	Alkalische Phosphatase (AP) und Interleukin-6 (IL-6)	92
3.3.2.2	Presenelin-2 (pS2) und von Willebrand Faktor (VWF)	96
3.4	Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf das Brustgewebe	99
3.4.1	Untersuchung der Transaktivierung im Luciferase Assay	99
3.4.2	Untersuchung der Proliferation in MCF-7 Zellen	102
3.4.3	Gegenüberstellung der Transaktivierung mit der Proliferation in MCF-7 Zellen	104
3.4.4	Regulation der ER-Expression in MCF-7 Zellen	106
3.5	Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf das Endometrium	109
3.5.1	Regulation der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa Zellen	110
3.5.1.1	Überprüfung der synergistischen bzw. antagonistischen Effekte von Phytoestrogenen in Anwesenheit von Estrogenen am Beispiel von Xanthohumol und Ethinylestradiol	112
3.5.1.2	Überprüfung der ER-Vermittlung der beobachteten Effekte	114
3.5.2	Regulation der ER-Expression in Ishikawa Zellen	116
3.6	Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf die Leber	118
3.6.1	Regulation der Genexpression in Fe33 Zellen mittels Realtime-RT-PCR	118

3.6.1.1	Die Calcium Binding Protein (9k)-Genexpression	122
3.6.1.2	Die Angiotensinogen-Genexpression	123
3.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	124
4.	Diskussion	129
4.1	Molekulare Mechanismen der Rezeptorbindung	129
4.2	Phytoestrogene im Knochenmodell	133
4.2.1	Einfluss auf Alkalische Phosphatase und Interleukin-6	133
4.2.2	Presenelin-2 und von Willebrand Faktor	137
4.2.3	Molekulare Mechanismen der Phytoestrogene	139
4.3	Das MCF-7 Zellsystem als Brustkrebsmodell	140
4.3.1	ER-Expression	140
4.3.2	Transkriptionsaktivität der Phytoestrogene am ER	140
4.3.3	Förderung der Proliferation durch Phytoestrogene	143
4.3.4	Zytotoxizität der Phytoestrogene	145
4.4	Das Zellsystem Ishikawa als Endometrium-Modell	146
4.4.1	ER-Expression	146
4.4.2	Estrogenität der Phytoestrogene am Endometrium	147
4.5	Das Zellsystem Fe33 als Modell für die Leber	150
4.5.1	Regulation der AT-Genexpression	151
4.5.2	Regulation der CaBP9k-Genexpression	152
4.5.3	Differentielles Profil der Phytoestrogene	153
4.6	Zusammenfassende Beurteilung der Testsysteme in Bezug auf die Erschließung des Profils der Phytoestrogene	154
5.	Ausblick	155
6.	Zusammenfassung auf Deutsch und Englisch	158
6.1	Zusammenfassung	158
6.2	Summary	162
7.	Literaturverzeichnis	167
8.	Anhang	184
8.1	Anhang zum Methodenteil	184
8.2	Abkürzungsverzeichnis	196
8.3	Liste mit R- und S-Sätzen	199
	Lebenslauf	201
	Danksagung	203

1. Einleitung

1.1 Postmenopause und Hormonersatztherapie

1.1.1 Beschwerden in der Menopause - Wirkungen und Gefahren der Hormonersatztherapie

Mit dem Versiegen der ovariellen Estrogenproduktion beginnt für jede Frau die Menopause. Weltweit geschieht dies im Durchschnitt zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr, für Europäerinnen konnte ein engerer Zeitraum ermittelt werden, und zwar zwischen dem 50. und 52. Lebensjahr (1). Während die Zeitspanne um den Anfang dieser Phase herum, die Perimenopause, gekennzeichnet ist durch Hitzewallungen (bei 50-70% der Frauen), Schlafstörungen und Stimmungsschwankungen mit Depressionen, so verändert sich diese Symptomatik im weiteren Verlauf der Menopause, der so genannten Postmenopause. Es kommt unter anderem zu einer Abnahme der Knochendichte und damit einhergehender gesteigerter Osteoporosegefahr. Laut der Million Women Study (2) sind ein Drittel der Frauen von einer Osteoporose betroffen. Außerdem geht die Postmenopause mit atrophischen Veränderungen in Brust- und Endometriumgewebe und mit Trockenheit der Schleimhäute (hauptsächlich im Genitalbereich) einher. Die für die Perimenopause angeführten Charakteristika können ebenfalls bis zu fünf Jahre anhalten.

Mittel der Wahl gegen diese Wechseljahresbeschwerden war seit Jahrzehnten die Hormonersatztherapie (HRT), bestehend aus entweder einer Kombination aus Estrogen- und Progesteronderivaten (kombinierte HRT) oder auch einem Estrogenderivat allein. Diese birgt sowohl Vorteile wie die Linderung, bzw. Prävention von Wechseljahrsbeschwerden in sich als auch Nachteile, die bedenkliche Gesundheitsrisiken darstellen. Ergebnis zahlreicher Langzeitstudien ist, dass eine über einen längeren Zeitraum verabreichte HRT mit erheblichen Gefahren einhergeht (3;4). So wurde beispielsweise der Estrogen-Gestagen-Arm der WHI (Women's Health Initiative)-Studie nach durchschnittlich 5,2 Jahren Beobachtungs- und Behandlungszeitraum vorzeitig abgebrochen (3), zum einen aufgrund eines erhöhten Mammakarzinomrisikos, zum anderen aufgrund der vom ersten Behandlungsjahr an fortbestehenden Erhöhung der Risiken für kardiovaskuläre Erkrankungen, Schlaganfall und Lungenembolie (1). Die mit einer Erhöhung der Risiken verbundene Dauer der HRT ist noch umstritten, nach 5 Jahren ist sie aber signifikant (3;5). Der optimale Zeitpunkt des Beginns sowie die Dauer einer Estrogentherapie zur Prävention der Osteoporose sind bislang ungeklärt (6). Deutlich geworden ist unter anderem in der kürzlich publizierten „Million Women Study“

(7), dass das Brustkrebsrisiko im Verlauf einer kombinierten HRT signifikant ansteigt (relatives Risiko gegenüber Plazebo 2,0), wobei dies für eine Estrogen-Monotherapie nur in geringerem Ausmaß beobachtet wurde (relatives Risiko 1,3) (8-10).

Frauen, deren Uterus nicht entfernt wurde, dürfen aufgrund einer Stimulierung des Endometriums durch Estrogen und der damit einhergehenden Hyperplasie und der erhöhten Gefahr eines Endometriumkarzinoms keine alleinige Estrogentherapie erhalten (1;11-13).

Die signifikant erhöhten Risiken bei kombinierter HRT wurden beobachtet für: Mammakarzinom (26%) (7), Schlaganfall (41%), kardiovaskuläre Erkrankungen (29%), Herzinfarkt und thromboembolische Ereignisse (113%) (3;14); außerdem bei Estrogen-Monotherapie für ein Endometriumkarzinom (15), wohingegen die Analyse der jüngst beendeten WHI-, HERS- und PEPI-Studien weder bei sequenzieller noch bei kontinuierlicher Gestagenzugabe einen Risikoanstieg ergaben (16-18). Weiterhin ist in der Diskussion ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer Demenz (19;20).

Geringere Risiken hingegen wurden bei kombinierter HRT beobachtet für Darmkrebs und Knochenfrakturen (3;21).

Im Ergebnis übersteigen die Gesundheitsrisiken, die sich aus einer kombinierten Estrogen-Gestagen-Therapie ergeben, die Vorzüge einer solchen Therapie innerhalb eines Beobachtungszeitraumes von 5,2 Jahren in der Vereinigten Staaten (3). Vor diesem Hintergrund wird deutlich, dass es von großer Bedeutung ist, Alternativen für die konventionelle HRT zur Linderung der Wechseljahresbeschwerden und zur Prävention von Osteoporose zu finden.

1.1.2 Arzneiformen

In Deutschland nehmen etwa vier bis fünf Millionen Frauen Präparate zur Hormonsubstitution ein. Am häufigsten werden derzeit Kombinationspräparate verordnet. Darin sind unterschiedliche Substanzen enthalten; als estrogene Komponente meist konjugierte equine Estrogene, Estradiol oder Estriol sowie verschiedene Gestagene (zum Beispiel Medrogeston, Norethisteronacetat), Progesteron oder Tibolon. Letzteres ist ein Gestagen mit estrogenen und androgenen Partialwirkungen. Es ist davon auszugehen, dass sowohl alle angewandten Estrogene als auch Gestagene qualitativ vergleichbare Wirkungen an den reproduktiven und nichtreproduktiven Erfolgsorganen ausüben, solange nicht durch randomisierte kontrollierte prospektive Studien belegt ein anderes Urteil gefällt werden kann (1). Die Wahl und

Dosierung der Wirkstoffe sollte sich nach der individuellen Verträglichkeit richten sowie den Schutz des Endometriums und den optimalen Behandlungszeitraum berücksichtigen.

Auf dem Arzneimittelmarkt befinden sich momentan die folgenden Applikationsformen für die HRT: Tabletten, Transdermale Therapeutische Systeme (TTS), Cremes (wobei zu unterscheiden ist zwischen Vaginalcremes und auf den Körper aufzutragende Cremes), Estradiol-Nasalsprays sowie ein gestagenhaltiges Miniimplantat. Bei der Wahl der Applikationsform sollten deren Unterschiede besonders auf dem Gebiet des Lipidstoffwechsels Beachtung finden. Das TTS, bei dem die Hormone über die Haut in den Organismus gelangen, bewirkt eine leichte Senkung des LDL- sowie einen milden Anstieg des HDL-Cholesterolspiegels. Der Serum-Triglyceridspiegel bleibt jedoch unbeeinflusst, so dass sich diese Arzneiform für Frauen mit erhöhtem Triglyceridspiegel eignet. Oral zugeführte Estrogene haben auf LDL- und HDL-Cholesterol ausgeprägtere Effekte als das TTS, der Triglyceridspiegel hingegen wird angehoben (22;23). Einen Schutz für das kardiovaskuläre System bietet somit eher die orale Anwendungsform als das TTS, jedoch auch nur für herzgesunde, nicht vorgeschädigte Frauen (22;24). Nachteil des TTS ist ein allergenes Potential des Pflasterklebstoffes.

Die topische Anwendung von Estrogenen, zum Beispiel Estradiol, ist besonders effektiv gegenüber atrophischen Erscheinungen im Urogenitaltrakt und sonstigen klimakterischen Beschwerden wie Hitzewallungen und nächtlichem Schwitzen. Langzeitstudien zur Wirksamkeit hinsichtlich Osteoporoseprävention oder gegenüber dem kardiovaskulären Risiko liegen bisher nicht vor. Besonders ist auf die akkurate Anwendung durch die Patientin zu achten.

Vaginalcremes eignen sich ebenfalls bei Beschwerden im Urogenitaltrakt sowie bei vaginaler Schleimhauttrockenheit. Sie bieten jedoch keinen Schutz vor Osteoporose und haben keinen Effekt auf das kardiovaskuläre System.

1.2 Phytoestrogene

1.2.1 Definition

Unter Phytoestrogenen werden Pflanzeninhaltsstoffe verstanden, die im menschlichen Organismus eine dem endogenen Steroidhormon 17 β -Estradiol ähnliche Wirkung haben. Im Blickpunkt der Forschung stehen vor allem Isoflavonoide, Lignane und Coumestane, da sie möglicherweise einen vorbeugenden Effekt auf die Entstehung hormonabhängiger Tumore

wie zum Beispiel Brust- oder Prostatakrebs besitzen (25;26). Noch sind die Ergebnisse jedoch widersprüchlich und es kann, zumindest beim Verzehr großer Mengen, ein umgekehrter Effekt nicht ausgeschlossen werden (27). Weiterhin besitzen auch prenylierte Flavonoide aus Hopfen (*Humulus lupulus*, L., Cannabaceae), das Stilbenderivat Rhaponticin aus der Rhabarberwurzel und weitere Flavonoidverbindungen eine Estrogenwirkung und zählen ebenfalls zu den Phytoestrogenen.

Isoflavonoide haben für die Pflanze als Phytoalexine eine Schutzfunktion gegenüber Pilzbefall und sind hauptsächlich in Hülsenfrüchten verbreitet. Hauptlieferant von Isoflavonoiden, voran Genistein, ist Soja (*Glycine max*, L., Fabaceae). Der Gehalt an Isoflavonoiden hängt sehr stark von Anbau, Ernte und Verarbeitung der Pflanzen ab. Isoflavonoide entstehen aus Flavonoiden (Abb.1.A.) infolge Arylwanderung. Sie liegen meist glykosidisch gebunden vor. Die wichtigsten Aglyka sind Genistein, Daidzein, Biochanin A und Formononetin (Abb.1.B). Daidzein entsteht durch metabolische Demethylierung aus Formononetin.

Aus Lignanen wird die pflanzliche Gerüstsubstanz Lignin gebildet, sie zählen somit zu den Ballaststoffen. Eine wichtige Quelle für Lignane ist Getreide, vor allem Roggen und Leinsamen. Lignane entstehen durch Verknüpfung zweier Phenylpropan-Einheiten (Coniferyl- oder Sinapylalkohol) über die Arylseitenketten. Durch unterschiedliche Verknüpfungen ergeben sich sechs Grundtypen. Secoisolariciresinol und Matairesinol liegen als Glykoside in der Pflanze vor und werden durch Darmbakterien in die resorbierbaren Verbindungen Enterodiol bzw. Enterolacton umgewandelt, die dann eine estrogenische Wirkung entfalten (Abb.2). Weitere interessante Lignane sind das Neo-Olivil aus der Brennesselwurzel, das möglicherweise zur Wirkung der Droge bei benigner Prostatahyperplasie beiträgt und das Podophyllin, ein Harz aus dem Podophyllwurzelstock, das zytostatisch wirksam ist.

Coumestane finden sich vor allem in Sprossen, zum Beispiel in Alfalfa-Sprossen. Die Grundstruktur der Coumestane leitet sich vom Cumarin ab (Abb.3).

Abbildung 1:

A.

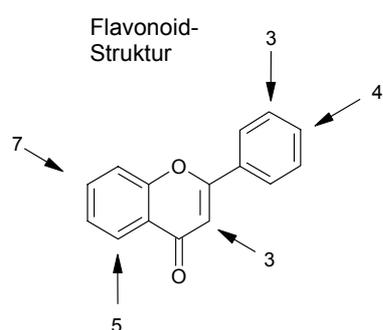


Abb. 1.A.: Flavonoide. Grundgerüst der im Pflanzenreich weit verbreiteten Flavonoid-Struktur. Mit den Pfeilen sind die bevorzugten Substitutionspositionen gekennzeichnet. Durch Arylwanderung des phenolischen Ringes von Position 2 hin zu Position 3 im Molekül entstehen Isoflavonoide. [1.2.1]

B.



Abb 1.B: Isoflavonderivate. Aglyka der wichtigsten Isoflavone, Genistein, Daidzein und Formononetin. Daidzein entsteht durch metabolische Demethylierung aus Formononetin. [1.2.1]

C.

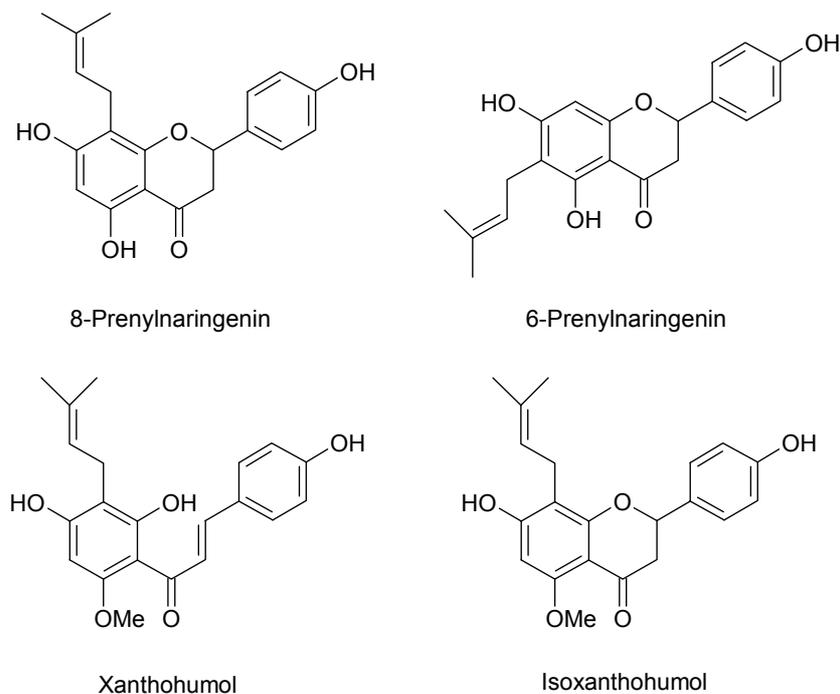


Abb 1.C.: Flavanonderivate. Strukturen der Flavanonderivate 8-Prenylnaringenin (8-PN), 6-Prenylnaringenin (6-PN), und Isoxanthohumol (IXH) sowie seiner offenen Chalkonform Xanthohumol (XH). Diese Verbindungen sind Bestandteile der Hopfenpflanze (*Humulus lupulus* L.)

Durch Verschiebung der Prenylgruppe an die Position 6 des Flavanongerüsts wird aus 8-PN das 6-PN. Dies führt zu einer Veränderung des estrogenen Charakters. [1.2.1]

D.

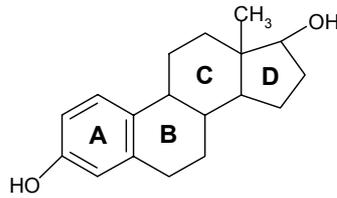


Abb. 1.D.: Das endogene Hormon 17β-Estradiol (E₂). Das Vorhandensein und die Position der OH-Gruppen im E₂, bzw. den Phytoestrogenen werden als eine der Voraussetzungen für estrogenen Aktivität angenommen. [1.2.1]

Abbildung 2

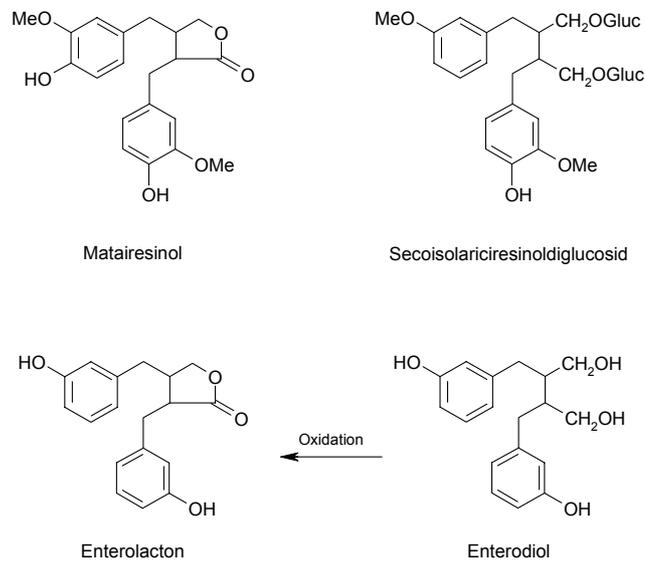


Abb. 2: Lignane. Matairesinol und Secoisolariciresinol liegen als Glykoside in der Pflanze vor und werden durch Darmbakterien in die resorbierbaren Verbindungen Enterolacton, bzw. Enterodiol umgewandelt, die dann eine estrogenen Wirkung entfalten. Enterolacton entsteht durch Oxidation aus Enterodiol. [1.2.1]

Abbildung 3

A.

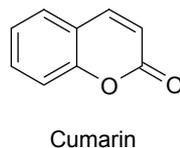
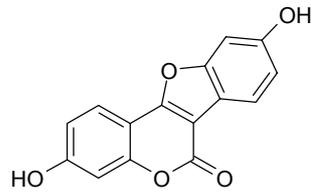


Abb. 3.A.: Coumarin. Grundstruktur der Coumestane. [1.2.1]

B.



Coumestrol

Abb. 3.B: Coumestrol. Ein typischer Vertreter der Coumestane. [1.2.1]

1.2.2 Wirkungen

Phytoestrogene wirken wie das endogene Hormon 17 β -Estradiol (E₂) (Abb. 1.D), besitzen aber eine geringere Potenz (28). So können sie dosisabhängig am Estrogenrezeptor (ER) die Wirkung des endogenen Hormons inhibieren und die Hormonwirkung modulieren. Dass Phytoestrogene präventiv auf die Entstehung bestimmter Tumoren wirken können (29), beruht hauptsächlich darauf, dass es sich bei ihnen um so genannte Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) handelt. Bei Personengruppen, die sich traditionell phytoestrogenreich ernähren, liegt die Häufigkeit von solchen Tumoren niedriger; als Beispiel sei die geringere Brustkrebsinzidenz asiatischer Frauen genannt (30). SERM sind in der Lage konzentrationsabhängig und gewebespezifisch sowohl estrogene als auch antiestrogene Wirkungen auszuüben (zum Beispiel in-vitro estrogene Wirkung am Knochen und antiestrogene Wirkung im Brustgewebe) (28;31). Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass es zwei Estrogenrezeptoren gibt (ER α und ER β), die unterschiedliche organspezifische und auch gewebespezifische Verteilungsmuster aufweisen (32-36). Sie werden verschiedenartig reguliert und scheinen, je nach dem Kontext, in dem sie sich befinden (37), verschiedene biologische Rollen auszuüben (34). Auch die Konzentration des zirkulierenden endogenen Estrogens spielt eine Rolle. Isoflavone wirken bei hoher E₂-Konzentration (zum Beispiel prämenstruell) estrogenantagonistisch. Bei niedrigem E₂-Spiegel einer postmenopausalen Frau können sie einen gegenteiligen Effekt haben und estrogenagonistisch agieren (25).

Estrogene sind an der Induktion eines Karzinoms offensichtlich nicht beteiligt, wohl aber an der Promotion (38). Dies erklärt, warum eine verlängerte Lebensexposition gegenüber endogenen Estrogenen mit einer erhöhten Brustkrebsinzidenz einhergeht. Wie beschrieben konkurrieren die Phytoestrogene mit E₂ um die Bindung am ER und sind durch ihre schwächer estrogene Wirkung (am ER α) in der Lage den proliferationsfördernden Effekt der

endogenen Estrogene auf hormonsensibles Gewebe kompetitiv zu hemmen. Ein kausaler Zusammenhang mit den Phytoestrogenen ist jedoch nicht bewiesen, und die Resultate der durchgeführten Studien sind widersprüchlich (39;40). Bisher fehlen Daten zur Langzeitsicherheit für die Anwendung von Phytoestrogenen (41).

Phytoestrogene besitzen noch weitere physiologische Wirkungen (42).

Sie sind potente Antioxidantien (43), da sie sowohl in-vitro (44) als auch in-vivo (45) ausgeprägte antioxidative Eigenschaften zeigen. Die stärkste solcher Eigenschaften weist das Equol auf, ein Metabolit der Isoflavone, dessen molekulare Struktur derjenigen des Tocopherols (Vitamin E) ähnelt (Abb.4). Ein antioxidativer Effekt wirkt der Bildung freier Radikale entgegen, welche eine Schlüsselrolle bei degenerativen und altersassoziierten Erkrankungen spielen aber auch am Mechanismus der Kanzerogenese durch die Induktion von chromosomalen Mutationen beteiligt sind.

Für Genistein ist bekannt, dass es in hoher Dosis hemmend auf die Tyrosinkinase und die DNA-Topoisomerase II (46-48) wirkt. Enzyme wie die Tyrosinkinase, die an der intrazellulären Signaltransduktion beteiligt ist, und die Topoisomerase II, die für die Replikation und Transkription der DNA benötigt wird, sind Cofaktoren der Kanzerogenese. Mit Hilfe verschiedener Wachstumsfaktoren wirken sie auf die Zellproliferation und -transformation. In diesen Effekten liegen auch mögliche Gefahren der Phytoestrogene hinsichtlich einer mutagenen Wirkung. Für Genistein wurde berichtet, dass es zu DNA-Strangbrüchen führen kann (49).

Weitere Enzyme, die von einigen Phytoestrogenen gehemmt werden, sind die 5α -Reduktase und die Aromatase (50-52). Die 5-alpha-Reduktase, ein prostataspezifisches Enzym, ist für die enzymatische Konversion des Testosterons in den biologisch wirksameren Metaboliten Dihydrotestosteron verantwortlich (Abb.5). Dieses spielt bei der Promotion und Progression des Prostatakarzinoms eine Schlüsselrolle. Die Aromatase ist für die Bildung von Estrogenen aus androgenen Vorstufen verantwortlich (Abb.5). Bei Frauen nach der Menopause entstehen Estrogene durch Aromatase-Aktivität in der Haut, in den Muskeln, in der Leber und vor allem im Fettgewebe aus Androstendion und Testosteron, die in der Nebennierenrinde gebildet werden. Auch im Mammakarzinomgewebe ist die Aromatase sehr häufig vorhanden. Folglich werden Aromatasehemmer in der Tumorthherapie angewandt (zum Beispiel Formestan, Anastrozol, Letrozol, Aminoglutethimid).

Weiterhin stimulieren Phytoestrogene, wie zum Beispiel Isoflavone und Lignane in der Leber die SHBG-Synthese und reduzieren damit den Wirkspiegel der biologisch aktiven endogenen Estrogene (44;53;54).

Auch antiangiogene Effekte wurden in-vitro nachgewiesen (55-57). Die Neoangiogenese ist ein entscheidender Faktor im Rahmen der Tumorpromotion. Für die endogenen Estrogene konnte nachgewiesen werden, dass sie einige Schritte der Tumorangienese fördern. Genistein erwies sich in-vitro als potenter Angiogenesehemmer.

Generell kann davon ausgegangen werden, dass nahrungstypische Mengen an Phytoestrogenen für Erwachsene unbedenklich sind (58). Säuglinge sollten wegen der Hormonwirkung nicht überwiegend mit Sojaprodukten ernährt werden.

Abbildung 4

A.

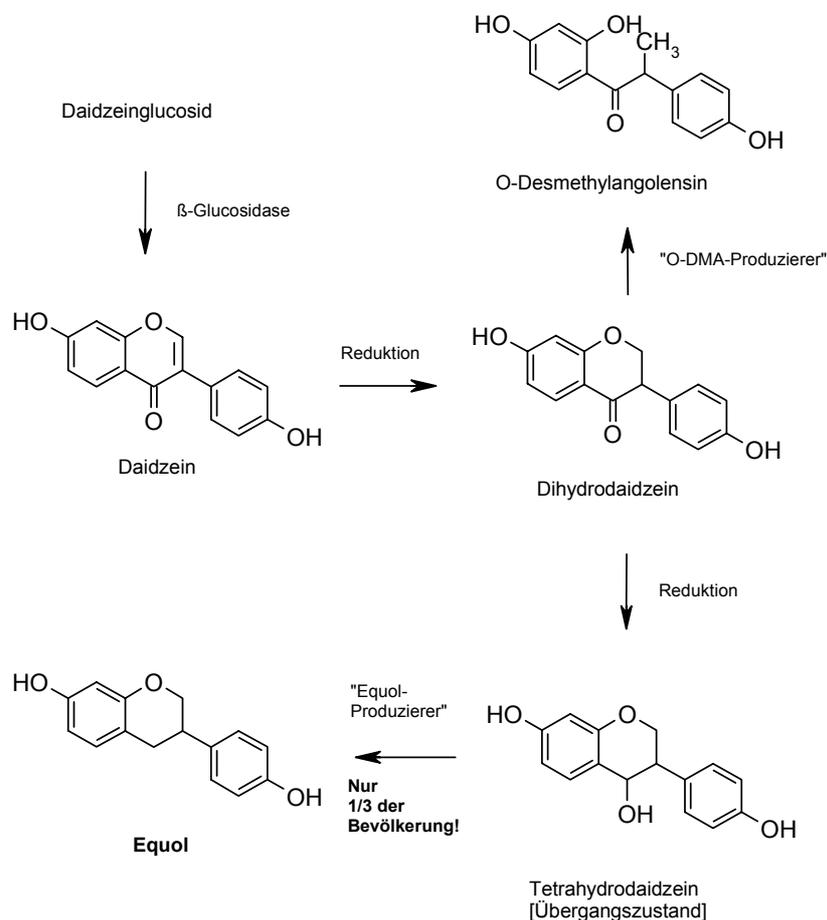


Abb. 4.A.: Metabolismus der Isoflavone durch die Darmflora am Beispiel des Daidzeins. Equol, welches Ähnlichkeit zum Tocopherol (s. Abb. 4.B) aufweist, ist ein potentes Antioxidanz [1.2.2]

B.

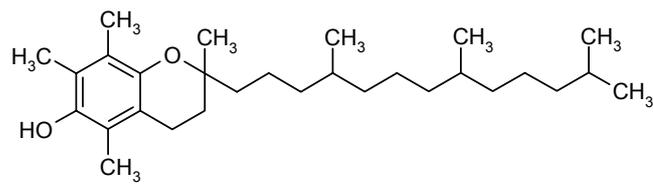


Abb. 4.B: α -Tocopherol (Vitamin E). Ein potentestes Antioxidanz, das Strukturähnlichkeit mit Equol aufweist. [1.2.2]

Abbildung 5

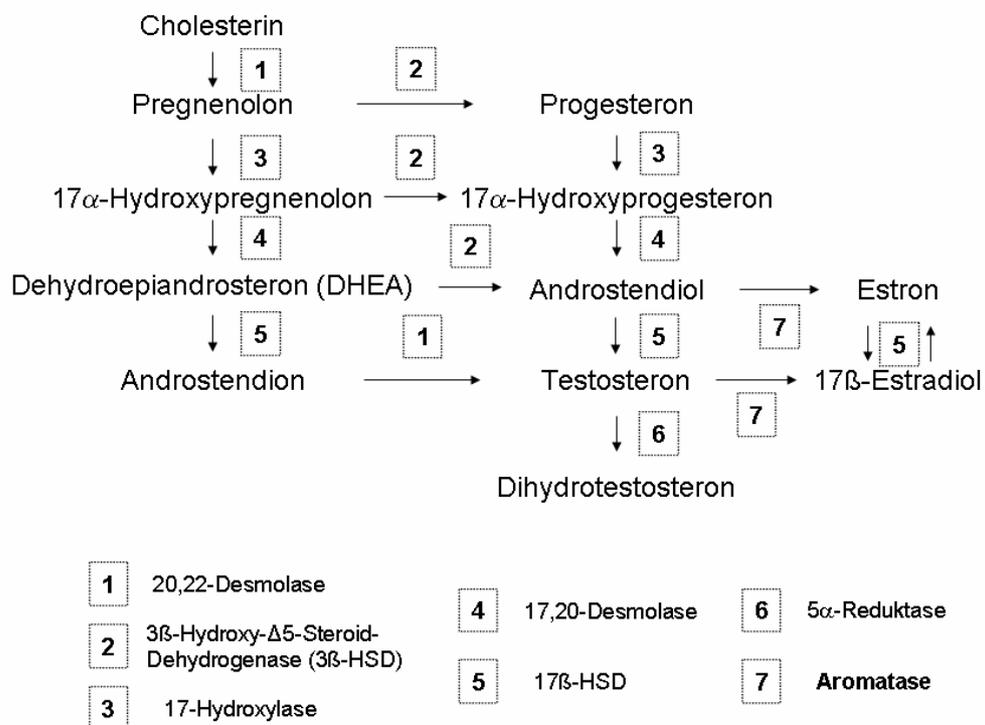


Abb. 5: Biosynthese von 17 β -Estradiol (E₂). [1.2.2]

1.2.3 Vorkommen

Tabelle 1 gibt einen Überblick über die wichtigsten pflanzlichen Quellen. In der Pflanze sind die Phytoestrogene glykosidisch gebunden und zunächst inaktiv. Durch Abspaltung der Zuckerreste werden die Substanzen aktiviert. Mit der Nahrung werden Phytoestrogene vor allem in Form von Sojaprodukten (Isoflavone) aufgenommen, zum einen gezielt wie zum Beispiel Tofu, Miso-Suppe oder Sojamilch, oder auch versteckt in mit Sojakonzentrat oder Sojamehl angereicherten Nahrungsmitteln (vor allem in den USA). Weiterhin enthalten eine Vielzahl an Nahrungsmitteln moderate Mengen an Phytoestrogenen wie Sprossen,

getrocknete Früchte, Garbanzo Bohnen, Orangensaft , Spargel, Knoblauch oder Lakritz (59). Das in Soja vorkommende glykosidisch gebundene Biochanin A wird nach Spaltung in Aglykon und Zuckerrest metabolisch in Genistein umgewandelt (Abb.1) (28). Genistein ist das am intensivsten untersuchte und wohl am weitesten verbreitete Isoflavon.

Lignane sind Substanzen mit einer 2,3-Dibenzylbutanstruktur (Abb.2) und dienen der Pflanze als Bausteine für das Ligningerüst der pflanzlichen Zellwände. Sie sind in hoher Konzentration enthalten in Leinsamen, außerdem in Getreide, Linsen und in geringeren Mengen in etlichen Samen und Gemüsesorten. Lignane unterliegen im menschlichen Organismus einem enterohepatischen Kreislauf. Die im Urin beim Menschen letztendlich nachzuweisenden Lignane sind Enterolacton und Enterodiol. Sie sind Metaboliten der pflanzlichen Lignane Matairesinol und Secoisolariciresinol (Abb.2) (28).

Tabelle 1

Struktur	Verbindung	Beispiele
Isoflavone	Daidzein	Soja, Büschelbohne
	Genistein	Soja, Besenginster, Hauhechel, Kleearten
	Formononetin	Traubensilberkerze, Süßholz, Hauhechel, Kleearten
Lignane	Secoisolariciresinol	Leinsamen, Roggen, Kampherbaum, Brennessel, Fichte, Wasserfenchel
	Matairesinol	Leinsamen, Roggen, Kampherbaum, Wasserfenchel
Coumestane	Coumestrol	Alfalfa, Soja, Kleearten
Flavanonderivate	Prenylnaringenine Xanthohumol	Hopfen

Tab. 1: Überblick über die wichtigsten pflanzlichen Quellen der Phytoestrogene. [1.2.3]

1.2.4 Arzneiformen

Auf dem deutschen Markt befinden sich zurzeit zahlreiche Produkte, die die Beschwerden in den Wechseljahren lindern sollen. Zum großen Teil handelt es sich um unterschiedliche Sojazubereitungen (*Glycine max.*, L.) wie Extrakte oder Sojalecithin in Kapselform. Als Lösung oder in Tablettenform ist ein Extrakt aus der Traubensilberkerze (*Cimicifuga racemosa*, L.) weit verbreitet. Außerdem finden sich Zubereitungen, meist als Kapseln, aus Rotklee (*Trifolium pratense* L.) (1), Rhapontikrhababer (*Rheum rhaponticum*, L.) und Mischungen aus Isoflavonen.

Zugelassen sind in Deutschland zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden zur Zeit nur Extrakte des Traubensilberkerzen-Wurzelstocks (1).

1.2.5 Stand der Forschung

Da Phytoestrogene SERMs und somit in der Lage sind, estrogene und antiestrogene Effekte auszuüben, eignen sie sich potentiell als Alternative zur HRT mit synthetischen Estradiolderivaten. Es gilt zu überprüfen, ob die Phytoestrogene nur die erwünschten nicht aber die unerwünschten Wirkungen endogener oder synthetischer Estrogene ausüben.

Bisherige molekular- und zellbiologische Untersuchungen sowie Tierversuche und in geringerem Ausmaß klinische Studien (25) geben Anlass zu der Vermutung, dass sich die postmenopausale Einnahme von Phytoestrogenen positiv auswirken könnte auf klimakterische Beschwerden, den Erhalt der Knochendichte (60), die Verhinderung bestimmter Krebsarten und kardiovaskuläre Krankheitsbilder. Da die bisher durchgeführten klinischen Studien Mängel im jeweiligen Studiendesign aufweisen (1) und keine hinreichenden Daten zur Langzeiteffizienz und Sicherheit vorliegen, können Phytoestrogene bis heute nicht als vollwertige Alternative zur HRT angesehen werden (61). Epidemiologische Beobachtungen bestätigen diese Vorzüge dadurch, dass sich für Bevölkerungsteile, die sich hauptsächlich pflanzlich ernähren und dabei vornehmlich Sojaprodukte konsumieren, ein günstigeres Profil der oben genannten Krankheiten ergibt, das heißt, es gibt weniger osteoporotische Knochenbrüche, eine geringere Inzidenz an Mammakarzinomen, usw. (62).

In dieser Arbeit habe ich mich konzentriert auf die Untersuchung der Wirkungen einiger ausgewählter pflanzlicher Inhaltsstoffe und Extrakte auf den Knochen, auf das Brust- und Endometriumgewebe und auf die Leber. Daher möchte ich kurz auf den bisherigen Stand der Forschung in diesen Bereichen eingehen.

1.2.5.1 Knochen

Der Knochenumbau ist ein dynamischer Prozess, der durch die Balance von Knochenformation und -resorption gekennzeichnet ist. Das rapide Absinken des Estrogenspiegels zu Beginn der Menopause ist verantwortlich für den beschleunigten Knochenabbau bei Frauen, die so genannte Typ I- Osteoporose (63). Diese zeichnet sich durch ein Ungleichgewicht in der Homöostase aus Knochenaufbau und Knochenabbau aus. Die Aktivität der Osteoklasten überwiegt gegenüber der der Osteoblasten, was zu einem gesteigerten Frakturrisiko führt. Neben der Hauptursache, dem Estrogenmangel, gibt es weitere wichtige Faktoren, die auf das Ausmaß des Knochenverlustes einwirken wie kulturelle Herkunft, genetische Veranlagung und Ernährungsgewohnheiten. Auch die maximal während des Heranwachsens erreichte Knochenmasse hat Einfluss auf das Risiko im Zuge der Menopause eine Osteoporose zu entwickeln (64).

Im Knochen sind sowohl ER α als auch ER β zu finden, wobei je nach Art des Knochens oder nach dessen Differenzierungsgrad (65;66) der eine oder der andere ER Subtyp überwiegt (67). Im kortikalen Knochen, der zu ca. 90% calcifiziert die äußere Knochenschale bildet und für das Längenwachstum verantwortlich ist, findet sich überwiegend ER α ; im spongiösen Knochen, der im Zentrum des Röhrenknochens lokalisiert ist und überwiegend Knochenmark enthält (ca.75%), herrscht ER β vor (67). Die Spongiosa trägt zur Instandhaltung des Knochens maßgeblich bei (Abb. 6).

Die HRT wirkt effektiv dem Verlust an Knochendichte entgegen. Nachteilig sind jedoch die erhöhten Risiken von Brust- oder Endometriumkrebs (3). Von allen derzeit erforschten natürlichen Alternativen bieten die Phytoestrogene das größte Wirksamkeitspotential. Während der Mineralisationsphase des Knochens ist in Osteoblasten ein Anstieg der ER β -mRNA zu verzeichnen, nicht jedoch der von ER α (65). In Osteoklasten ist laut Kuiper et al. (68) keine ER β -mRNA nachweisbar. Phytoestrogene, wie zum Beispiel Genistein, zeigen in der Regel eine viel höhere Bindungsaffinität zum ER β als zu ER α (35;68), [eigene Daten s. Kap.3.1]. Für Genistein wurde ebenfalls gezeigt, dass die Transkriptionsaktivität nach Bindung an ER β beinahe doppelt so groß ist wie die nach Bindung von E₂ an ER α oder ER β (68). Es gilt folglich zu untersuchen, ob der Beitrag, den Phytoestrogene zur Instandhaltung des Knochens und zu dessen Mineralisation über ER β zu leisten in der Lage sind, für die Vorbeugung gegen Osteoporose in der Menopause wirksam ausgenutzt werden kann.

Zur Effektivität der Phytoestrogene im Hinblick auf die Prävention der Osteoporose gibt es weitaus weniger Daten als zur Wirksamkeit der HRT. Alle bisher veröffentlichten Studien weisen Mängel im Design auf, wie beispielsweise eine nur geringe Probandenzahl oder zu

kurze Dauer, und sie liefern kein Ergebnis zur Beeinflussung der Zahl der Knochenfrakturen (1). Eine Zulassung für die Indikation Osteoporoseprävention liegt für kein Phytoestrogen vor. Im Falle der Anreicherung der Ernährung mit Isoflavonen aus Soja wurde eine Erhöhung des Knochenmineralgehaltes und der Knochendichte nach 6-monatiger Studiendauer gefunden (69). Morabito et al. (70) fanden beim Vergleich von Genistein mit kombinierter HRT heraus, dass Genistein den postmenopausalen Knochenverlust am Oberschenkelhals sogar effektiver verhindert als die gewählte Form der HRT (1mg E₂ + 0,5mg Norethisteron). Die HRT reduziert sowohl Knochenresorptions- als auch Knochenformationsmarker und verhindert somit den Knochenumbau insgesamt. Genistein hingegen führte ebenfalls zu einer Reduktion der Resorptionsmarker, jedoch wurden gleichzeitig auch Knochenformationsmarker erhöht (25;70). Dieser Aspekt könnte eine mögliche Erklärung für die günstigere Beeinflussung des Knochenmineralgehaltes durch Genistein darstellen (s.u.). Setchell et al. (60) verfassten kürzlich einen Übersichtsartikel zum aktuellen Stand der bisher durchgeführten Studien mit Phytoestrogenen. Es handelt sich um in-vitro Studien an Osteoblasten- und Osteoklastenkulturen (71-76), in-vivo Studien mit Rattenmodellen zur postmenopausalen Osteoporose (77-80) und auch Humanstudien mit den Phytoestrogenen Genistein und Daidzein (70;81;82). Die Analyse dieser Untersuchungen ergab, dass eine phytoestrogenreiche Ernährung auf lange Sicht signifikant einen knochenkonservierenden Effekt hat, wobei das Ausmaß und der exakte Mechanismus dieser Wirkung weitgehend spekulativ bleiben. Die Ergebnisse der Humanstudien sind viel versprechend aber auch recht variabel; neben vereinzelt festgestelltem fehlenden Effekt auf den Erhalt der Knochendichte bei postmenopausalen Frauen (83), wurde meist ein signifikant positiver Effekt auf die Knochendichte festgestellt (70;84-86). Die Studien können unterteilt werden in solche, die durch Messung biochemischer Parameter der Osteoblasten-, bzw. Osteoklastenaktivität einen Nachweis für verringerten Knochenabbau geliefert haben und in solche, die als Endpunkt eine Knochendichte-Messung durchgeführt haben (87). Aufgrund meist kurzer Studiendauer (bis zu 24 Monaten) und relativ kleinem, in der Mehrzahl asiatischem Probandenkollektiv ist es schwierig, eine akkurate signifikante Aussage über die Veränderung des Zustandes des Knochens zu machen. Auch die Bestimmung der optimalen täglich einzunehmenden Dosis Sojaprotein steht noch aus (88).

Wie schon erwähnt, wurden zahlreiche in-vitro Untersuchungen mit Osteoblasten, osteoblastartigen Zellen und Osteoklasten durchgeführt. Sie zeigen einheitlich direkte Effekte von Phytoestrogenen auf die genannten Zelltypen. Um solche Untersuchungen handelt es sich auch in dieser Arbeit, so dass ich die bisherigen Erkenntnisse kurz darstellen möchte.

Bestimmte Phytoestrogene - beinahe ausnahmslos handelt es sich in den Untersuchungen um Sojaprotein, Genistein oder Daidzein - sind in der Lage, in Osteoblasten die Aktivität der Alkalischen Phosphatase (AP) und die Proteinexpression von Osteocalcin zu erhöhen (74;89). Auf Transkriptionsebene ist Genistein unter anderem in der Lage, die Genexpression der AP und des Progesteron Rezeptors zu steigern (72). Chen et al. berichten von einer gesteigerten Proliferationsrate in osteoblastartigen Zellen, einer gesenkten Interleukin-6 (IL-6) Sekretion sowie einer Verdopplung des Osteoprotegerin (OPG)/RANKL-Verhältnisses ((72;90-92)).

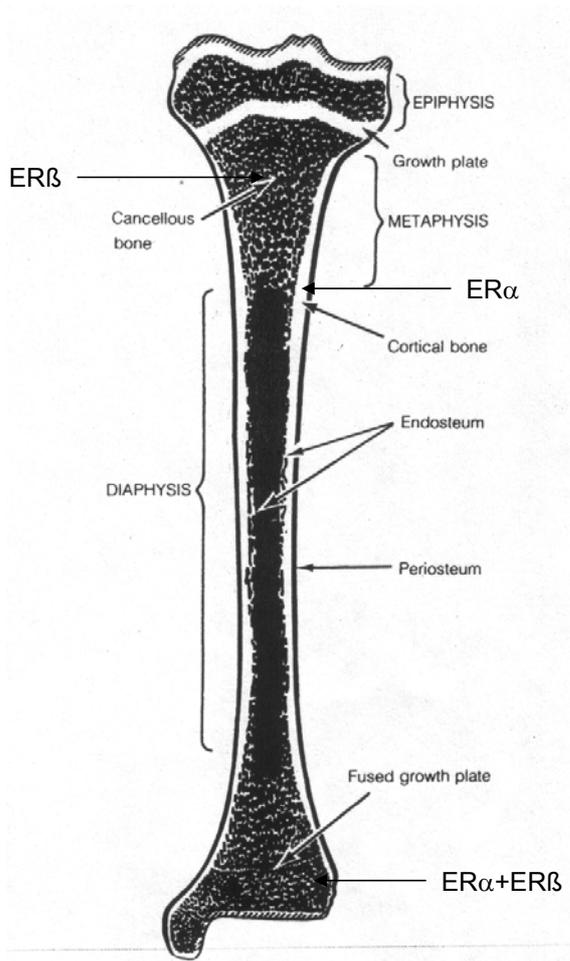
In Osteoklasten ist Genistein in der Lage, durch seine die Tyrosinkinase hemmende Wirkung deren Aktivität zu inhibieren (93;94). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass die Osteoklastenproliferation gehemmt, ihre Apoptoserate induziert und die Anzahl ihrer Vorläuferzellen reduziert wurde (95). Yamagishi et al. (47) berichten von einer verringerten RANKL-mRNA Expression und einer gesteigerten OPG-mRNA Expression in osteoklastartigen Zellen nach Genisteinbehandlung. Der Mechanismus soll die Hemmung der Topoisomerase II-Aktivität sein.

All diese Effekte tragen zu einer erhöhten Osteoblasten-, bzw. verminderten Osteoklastenaktivität bei, somit letztendlich zu einer reduzierten Knochenresorption. Um eine Aussage über die Möglichkeit einer Osteoporoseprävention mit phytoestrogenreicher Ernährung machen zu können, ist eine prospektive Studie zur Evaluierung der effektiven Senkung des Frakturrisikos durch Phytoestrogene vonnöten (60).

OPG ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor (TNF) Superfamilie (96). Es wird von Osteoblasten produziert, durch E_2 oder Genistein stimuliert (91) und verringert die Osteoklastendifferenzierung sowie einen durch Ovariectomie induzierten Knochenverlust in Ratten (97). OPG dient als Rezeptor für den Osteoklastendifferenzierungsfaktor RANKL (= cytokine receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand oder auch OPGL) (Kong, Lacey 1999) und blockiert seine Expression nach dessen Bindung (98). Eine gesteigerte RANKL-Expression führt über eine stimulierte Osteoklastendifferenzierung und -funktion zu erhöhter Knochenresorption (60).

Die Bedeutung der AP und des IL-6 werden in Kapitel 1.4 beschrieben.

Abbildung 6



[abgeändert aus: Jee W.S.S. The skeletal tissues. In: Weiss L.. ed. *Histology, cell and tissue biology*, New York: Elsevier Biomedical 1983: 230-255]

Abb. 6: Längsschnitt eines Röhrenknochens. Der kortikale Knochen (cortical bone) bildet die äußere Knochenschale und enthält überwiegend ER α . ER ist verantwortlich für das Längenwachstum. Der im Zentrum des Röhrenknochens lokalisierte spongiöse Knochen weist vornehmlich ER β auf. Seine Funktion ist die Instandhaltung des Knochens. In der Wachstumsplatte sind ER α und ER β vorhanden. Dort tragen sie zu deren Verschmelzung bei. Der ER-Gehalt ist abhängig von der jeweiligen Differenzierungsphase des Knochens. [1.2.5.1]

1.2.5.2 Brust

Das Brustgewebe ist ein hormonsensitives Gewebe. Eine lebenslang hohe Estrogenexposition kann zur Entwicklung eines Mammakarzinoms führen. Es wurde festgestellt, dass der Spiegel an biologisch aktivem, frei zirkulierendem Estrogen bei Brustkrebspatientinnen höher ist als in einer Vergleichsgruppe gesunder Frauen (28;99). So ist auch eine individuell nicht

indizierte oder zu lang angewandte HRT ein großer Risikofaktor für übersteigerte Zellproliferation des Brustgewebes (100). Dieses durch E_2 stimulierte unkontrollierte Wachstum von Zellen kann die Entstehung eines Tumors begünstigen. Die Inzidenzrate für ein Mammakarzinom ist bei Frauen in den westlichen Ländern sechs- bis siebenfach höher als bei Frauen in Ostasien (30). Bei Asiatinnen wurde im Vergleich zu Amerikanerinnen eine kürzere Zyklusdauer und ein geringerer endogener Estrogenspiegel festgestellt, zwei Faktoren, die vermutlich mitverantwortlich sind für die geringere Krebsrate. Dass die traditionell hohe Sojazufrucht in asiatischen Ländern einen Einfluss auf diese Faktoren hat, konnte in bisher durchgeführten kontrollierten Studien nicht bestätigt werden (40;101). Lamartiniere et al. (102) jedoch zeigten in einer tierexperimentellen Studie, dass Genistein eine protektive Wirkung gegenüber chemisch induziertem Brustkrebs aufweist, sofern eine Einnahme bereits vor der Pubertät begonnen wurde, bzw. dann schon einmal stattgefunden hat. Als Mechanismus vermuten diese Autoren eine Modulation der ER-Expression sowie der Signaltransduktion von Wachstumsfaktoren. Als Ergebnis von Fall-Kontroll-Studien wurde von einer signifikanten Reduktion des Brustkrebsrisikos bei prä- und postmenopausalen Frauen, die eine hohe Dosis an Phytoestrogenen zu sich nahmen, berichtet (28;103;104;104). In zwei weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass eine signifikant geringere Exkretion von Phytoestrogenen oder deren Metaboliten im Urin postmenopausaler Frauen mit Mammakarzinom gefunden wurde (105;106).

Zusammenfassend lässt sich die Beobachtung festhalten, dass sich die Einnahme von Phytoestrogenen umgekehrt proportional zur Häufigkeit von Brust- und auch Endometriumkarzinom (s. u.) verhält. Dies setzt – neben anderen möglichen Mechanismen - entweder eine verminderte Estrogenität solcher Substanzen oder einen Antagonismus zu endogenen Estrogenen voraus (28). In-vitro wird dies deutlich in einer Reduktion der Proliferation von Brustkrebszellen, auf die ich detailliert im Kapitel 3.4 eingehe.

1.2.5.3 Endometrium

Auch das Endometriumgewebe reagiert bei Zufuhr von Estrogenen mit einer gesteigerten Teilungsrate, was mit einem erhöhten Karzinomrisiko verbunden ist. Dem entgegen wirkt Progesteron (107). Das Ergebnis der PEPI-Studie (Postmenopausal Estrogen/ Progestin Interventions Trial) belegt dies: Ca. ein Drittel der ausschließlich mit konjugierten equinen Estrogenen behandelten postmenopausalen Frauen entwickelten eine Hyperplasie des Endometriums. Kombiniert man diese Monotherapie mit einem Progesteronderivat, so ist keine gesteigerte Hyperplasie zu beobachten (108;109). Gegen eine kombinierte

Progesterongabe spricht aber, dass sie für den Anstieg des Brustkrebsrisikos unter HRT verantwortlich ist (9) und außerdem die positive Wirkung der HRT auf den Lipidspiegel unterdrückt (22).

Zur Prävention des Endometriumkarzinoms trägt eine Senkung des endogenen Estrogenspiegels bei. Für bestimmte Phytoestrogene konnte gezeigt werden, dass sie dies bewirken, da sie den Metabolismus endogener Hormone beeinflussen (101;110); sie stimulieren außerdem die hepatische Produktion von SHBG (44;53;54), so dass weniger freies Estrogen zur Verfügung steht. Weiterhin sind sie an den ER kompetitive Bindungspartner (35;68;111) mit einer geringeren intrinsischen Aktivität (ca. 0,1% der Aktivität von E₂ (25;112)).

In einer Fall-Kontroll-Studie untersuchten Horn-Ross et al. quantitativ den Zusammenhang zwischen der Einnahme von Phytoestrogenen und dem Risiko eines Endometriumkarzinoms (112). Sie fanden heraus, dass sich besonders bei Frauen in der Menopause der Konsum von Isoflavonen oder Lignanen als Bestandteil der Ernährung (im Rahmen einer ausgewogenen Ernährung) positiv auf die Senkung des Endometriumkarzinomrisikos auswirkt. In einer weiteren Studie wird berichtet, dass die Zufuhr von Soja bei Frauen, die niemals schwanger waren und niemals Estrogene zu sich nahmen, mit einem reduzierten Gebärmutterkrebsrisiko einhergeht (113).

1.2.5.4 Leber

Es ist bekannt, dass eine orale HRT die endogene Synthese des Glykoproteins Angiotensinogen (AT) stimuliert. Dabei ist es unerheblich, ob es sich um eine Estrogen-Monotherapie handelt oder um eine kombinierte HRT (114). AT wird vor allem in Hepatozyten synthetisiert und in den Blutkreislauf abgegeben. Als eine zentrale Komponente des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems dient es als Substrat des Enzyms Renin und wird durch dieses zu Angiotensin I (AT I) umgesetzt. Im weiteren Verlauf der Kaskade wird AT I durch das Angiotensin-Converting-Enzyme (ACE) in das vasokonstriktorisch wirkende Angiotensin II (AT II) umgewandelt. Letztendlich erfolgt ein Anstieg des Aldosteronspiegels im Blut. Die Konzentration von AT spielt über die Kontrolle der AT I Produktion eine wichtige Rolle bei der Regulation der Synthese von biologisch aktivem AT II. Der AT Blutspiegel wird durch zahlreiche physiologische und pathologische Faktoren beeinflusst. Ein hoher Blutspiegel ist zum Beispiel festzustellen in der Schwangerschaft oder unter kontrazeptiver Therapie. Die hepatische AT Synthese unterliegt der Kontrolle hormoneller

Faktoren wie unter anderem Estrogenen, Glucocorticoiden und AT II und ist abhängig von der AT Genexpression in Hepatozyten (115;116).

AT kann zum einen auf Proteinebene durch Messung der entstandenen Menge AT I nach definierter Zugabe rekombinanten Renins nachgewiesen werden (114); zum anderen kann eine Veränderung der Genexpression in Hepatozyten bestimmt werden (116). Mechanistisch konnte gezeigt werden, dass der AT-Promotor auf dem AT-Gen direkt der Kontrolle durch E₂ über ein Estrogen-Response-Element (ERE) unterliegt (115;117). Besonders kritisch ist dies für Frauen, die unter Bluthochdruck, koronarer Herzkrankheit oder sonstigen Herzfunktionsstörungen leiden und eine HRT durchführen. Ein Anstieg von AT bei gleich bleibendem (114) oder erhöhtem Reninspiegel (118;119) birgt die Gefahr der Ausbildung eines arteriellen Bluthochdrucks in sich, was einen Anstieg der allgemeinen kardiovaskulären Sterblichkeitsrate begünstigen kann (120;121). Jedoch gibt es gleichzeitig Untersuchungen, bei denen ein unveränderter oder sogar leicht gesenkter Reninspiegel und als Folge auch Blutdruck bei Frauen unter HRT beobachtet wurde (114;119).

1.2.6 Stand der Forschung hinsichtlich der untersuchten Pflanzen

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen handelt es sich zum einen um Extrakte und zum anderen um isolierte Inhaltsstoffe. Von den Pflanzen ist eine estrogene Wirksamkeit entweder schon bekannt und in Teilen erforscht, oder sie leitet sich bisher nur aus Vermutungen ab, die zum Beispiel auf traditioneller Anwendung durch Bevölkerungsteile im asiatischen Raum basieren. Zur ersten Gruppe gehören *Humulus lupulus*, L. (Hopfen), *Glycine max.* L. (Soja), *Cimicifuga racemosa* L. (Traubensilberkerze) und *Glycyrrhiza glabra* L. (Süßholz). Weitgehend unerforscht ist eine estrogene Wirksamkeit für *Phaseolus vulgaris* L. (Gartenbohne), *Sophora japonica* L. (Japanischer Perlschnurbaum) und *Sarothamnus scoparius* L. (Besenginster).

Der Ethanolextrakt aus Soja (SOY) mit der Hauptkomponente Genistein und der ethanolische Extrakt aus dem Wurzelstock der Traubensilberkerze (CIM) sind im Verlaufe der Arbeit hinzugezogen worden. Dies dient dem Zweck, die weiteren Stoffe und Extrakte in ein Verhältnis zu bereits vielfach untersuchten und gegen menopausale Beschwerden angewandten Phytoestrogenen setzen zu können.

1.2.6.1 Humulus lupulus

Aus Hopfen werden vier Inhaltsstoffe untersucht: 8-Prenylnaringenin (8-PN), 6-Prenylnaringenin (6-PN), Xanthohumol (XH) und Isoxanthohumol (IXH) sowie ein ethanolischer Spezialextrakt (HE-1) und ein entfetteter Ethanolextrakt (HE-2).

Zahlreiche Untersuchungen liegen zur estrogenen Aktivität von Hopfenextrakten vor, bzw. zur Bestimmung der estrogenwirksamen Inhaltsstoffe (122-128). Zu ihnen zählen die oben genannten Pflanzen sowie weitere Derivate derselben (124). In-vitro weist ein methanolischer Hopfenextrakt eine signifikante Bindung zu ER α sowie ER β auf, stimuliert die Aktivität der AP in Ishikawa Zellen und induziert estrogenresponsive Gene wie den Progesteron Rezeptor (PR) in Ishikawa Zellen sowie Presenelin-2 (pS2) in S30 Brustkrebszellen (129). Außerdem wurde in-vitro eine hemmende Wirkung auf die Knochenresorption beschrieben (130).

Das bisher am stärksten wirksame Phytoestrogen aus Hopfen ist das Flavanonderivat 8-PN (Abb.1 C.) (124). Sein Vorkommen ist nicht auf die Hopfenpflanze beschränkt, 8-PN ist auch Bestandteil des Kernholzes der traditionellen thailändischen Arzneipflanze *Anaxagorea luzonensis*. Es weist teilweise eine größere estrogenen Wirksamkeit auf als etablierte Phytoestrogene wie Genistein, Daidzein oder Coumestrol (123;128). Es bindet an ER α und ER β mit einer ca. 0,01fachen Potenz von E₂ (128). In-vivo wirkt 8-PN am Uterus und am Vaginalepithel wie E₂ (Zunahme des Uterusgewichtes und der Mitoserate im Uterus- und Vaginalepithel), wobei die erforderlichen Konzentrationen ca. drei Zehnerpotenzen über der vom E₂ liegen. Im Knochen ovariectomierter Ratten hat 8-PN ebenfalls eine estrogenartige Wirkung: Es vermindert die Exkretion von Knochenresorptionsmarkern im Urin und verhindert die Abnahme der Knochendichte (80). Auch in-vitro zeigt 8-PN estrogenen Aktivität; es induziert in Ishikawa Zellen die AP, wozu eine ungefähr vierfach höhere Konzentration relativ zu E₂ erforderlich ist, und es zeigt im *Hefetest*-Reporter-Gen-Assay (eine Methode, mit der untersucht wird, ob die Wirksamkeit ER-vermittelt ist) eine Aktivität, die einem Hundertstel derjenigen von E₂ entspricht. Damit ist die Substanz in diesen Systemen effektiver als Genistein (128). Dass 8-PN seine Wirkung zumindest auch ER α -vermittelt ausübt, belegt auch seine Aktivität im Luciferase Assay [(131); eigene Ergebnisse].

Durch Verschiebung der Prenylgruppe an die Position 6 des Flavanongerüsts (aus 8-PN wird 6-PN, Abb.1 C.), wird die estrogenen Potenz der Verbindung stark herabgesetzt. Sie beträgt nur noch weniger als 1% derer des 8-PN. Dies zeigt sich unter anderem in einem kompetitiven Bindungsassay an den ER, in dem 6-PN nur eine sehr geringe Wirkung aufweist (124).

Zwei weitere Bestandteile des Hopfens sind das Flavanonderivat Isoxanthohumol und seine ringoffene Chalkonform, das Xanthohumol (Abb.1 C.). Beim XH handelt es sich um einen metabolischen Vorläufer des 8-PN, in das es über die Abspaltung des Methylrestes der phenolischen Methoxygruppe und oxidativen Ringschluss überführt werden kann. In-vitro inhibiert XH die Knochenresorption, wobei der Mechanismus noch unklar ist. Einerseits wird

eine estrogene und damit antiresorptive Potenz des 8-PN angenommen, andererseits wird auch eine verminderte Interleukin-1-Freisetzung oder -Synthese diskutiert (130;132). Interleukin-1 ist wie auch IL-6 ein Zytokin, das die Knochenresorption stimuliert, und es wird in seiner Biosynthese durch Estrogen moduliert (133). Des Weiteren ist für XH eine antikanzerogene Wirksamkeit beschrieben, die auf einem breiten Spektrum inhibitorischer Mechanismen beruhen soll, und zwar im Stadium der Initiation, Promotion und Progression der Kanzerogenese. Es ist in der Lage unterschiedliche Enzymaktivitäten zu modulieren und wirkt antioxidativ und antiestrogen (134). Auch IXH stellt einen potentiellen Vorläufer von 8-PN dar, da es sich strukturell um ein am 5-Hydroxylrest methyliertes 8-PN handelt. In einem Reporter-gen-Assay zeigt IXH eine nur schwache Wirkung über ER α , sie ist 10⁻³mal schwächer als die von E₂ und 400-mal schwächer als die des 8-PN (135). Beide Substanzen, XH und IXH, wirken in-vitro in Mammakarzinomzellen (MCF-7) und Ovarialkarzinomzellen (A-2780) antiproliferativ und könnten somit eine Therapiemöglichkeit darstellen zur Prävention von Mamma- und Ovarialkarzinom (125).

1.2.6.2 Glycyrrhiza glabra

In dieser Arbeit wird ein Ethylacetatextrakt (GLY) aus der Süßholzwurzel untersucht. Estrogene Aktivität von Süßholz ist in der Literatur bereits beschrieben worden (136). Tamir et al. (137) führten sowohl mit einem Extrakt aus Süßholz als auch mit einzelnen Bestandteilen daraus (Glabridin, ein Isoflavon, und Glabren) in-vitro Untersuchungen durch. Sie fanden heraus, dass die Substanzen des Extraktes an die Estrogenrezeptoren binden und auf die Stimulation von MCF-7 Zellen einen biphasischen Einfluss haben: In geringen Konzentrationen wirken sie ER-abhängig proliferationsfördernd, wohingegen sie in hohen Konzentrationen (oberhalb 15 μ M) ER-unabhängig antiproliferative Effekte zeigen. In-vivo Untersuchungen, die als Endpunkt eine Messung der Creatinkinase (CK)-Aktivität haben, zeigen, dass sowohl der Extrakt (137) als auch Glabridin (138) in der Lage sind, die CK-Aktivität im Uterus der Ratte und in der Diaphyse, dem Mittelstück der Röhrenknochen, zu erhöhen.

Im Gegensatz zu den oben genannten Ergebnissen fanden Amato et al. keine Induktion des Wachstums von MCF-7 Zellen durch einen Süßholzwurzelextrakt (139). Außerdem konnten sie in einem Reporter-gen-Assay keine Transaktivierung für ER α oder ER β feststellen. Auch in-vivo stimuliert der Extrakt nicht das Uterusgewicht in Ratten.

In Ishikawa Zellen, einer estrogenresponsiven Endometriumkarzinomzelllinie, zeigt ein Süßholzextrakt eine schwache Induktion zweier estrogenregulierter Gene, und zwar PR und pS2 (129).

Als Mechanismus für eine protektive Wirkung der Süßholzwurzel gegen das Endometriumkarzinom beschreiben Mori et al. (140) die Suppression der Proto-Onkogene c-fos und c-jun, die durch Estradiol induziert werden und zu erhöhter Zellproliferation und – differenzierung beitragen.

1.2.6.3 Glycine max.

Am häufigsten untersucht sind die Isoflavonderivate Genistein und Daidzein, zwei Hauptkomponenten aus dem Extrakt der Sojabohne. Ein kürzlich veröffentlichter Reviewartikel fasst die Daten bisher durchgeführter klinischer Studien zur Anwendung von Soja gegen estrogenvermittelte Krankheiten oder Symptome wie Brustkrebs oder Wechseljahrsbeschwerden sowie zur Osteoporoseprävention zusammen und bewertet die Ergebnisse vor dem Hintergrund wissenschaftlicher Untersuchungen (25).

Genistein bindet an ER β ca. 20fach stärker als an ER α . Im Vergleich zu E₂ beträgt die Bindungsaffinität an ER β 87% (68). Die Bindungsaffinität von Daidzein an ER α , bzw., ER β beträgt weniger als 1% derjenigen des E₂ (68). Zur Erreichung einer mit E₂ vergleichbaren Transkriptionsaktivität durch den Rezeptor müssen von Genistein 10⁴fach höhere Konzentrationen eingesetzt werden (141). Weiterhin stimuliert Genistein, bzw. eine Mischung aus Soja-Isoflavonen, die Proliferation von MCF-7 Zellen in-vitro und in-vivo (142-144). Kürzlich wurden in MCF-7 Zellen zwei phytoestrogenresponsive Gene entdeckt, von denen bisher noch keine Regulation durch Estrogen oder Phytoestrogene wie Genistein bekannt war (145). Diese könnten als hilfreiche molekulare Marker dienen bei der Aufklärung der Mechanismen der Phytoestrogene.

In-vivo lässt sich aufgrund der bisherigen Humanstudienlage nicht bestätigen, dass die Einnahme von Genistein oder Sojaprodukten einen Einfluss auf das postmenopausale Brustkrebsrisiko hat. Tierexperimentell konnte jedoch eine protektive Wirkung bei Gabe sehr hoher Genisteindosen gegenüber chemisch induzierten Tumoren gezeigt werden (25). Auch lässt sich keine signifikante Besserung von menopausalen Symptomen belegen. Nur eine Studie unter sieben ergab ein positives Ergebnis (bei begonnener Phytoestrogeneinnahme vor der Pubertät) (25).

Eine Metaanalyse des Effektes von Genistein oder Soja-Isoflavonen gegenüber Hormonersatztherapie auf den Knochenmineralgehalt ergibt für eine hohe Zufuhr an

Isoflavonen knochenkonservierende Langzeiteffekte (60). Auf molekularer Ebene zeigt sich eine Erhöhung der Knochenformationsmarker und eine Reduktion der Knochenresorptionsmarker an Lendenwirbelsäule und Oberschenkelhals (s. o.). Im Unterschied dazu senkte eine kombinierte Hormongabe die gesamte Knochenumbaurate (25;70;146;147). Genistein wirkt sich somit günstiger auf den Knochenmineralgehalt aus, besonders günstig für Frauen, die im Zuge der Genisteinmetabolisierung das Phytoestrogen Equol bilden (Abb.4). Der Verlust an Knochendichte kann nach Cotter et al. (87) im gleichen Maße wie durch HRT aufgehalten werden. Die Ergebnisse der Studien werden untermauert durch in-vitro Befunde, die zuvor detailliert beschrieben wurden. In Stromazellen des Knochenmarks verstärkt Genistein die Ausdifferenzierung hin zu Osteoblasten und reduziert die Differenzierung und Heranreifung von Adipozyten (148).

1.2.6.4 *Cimicifuga racemosa*

CIM: Der Extrakt aus *Cimicifuga racemosa* wird traditionell gegen Beschwerden in den Wechseljahren verwendet. Kürzlich veröffentlichten Wuttke et al. (149) eine Studie an ovariectomierten Ratten, die für sechs Stunden, bzw. drei Monate mit einem Traubensilberkerzen-Extrakt oder Estradiol behandelt wurden. Untersucht wurden die Effekte auf Knochen und Uterus; ersteres durch Analyse der Genexpression in Osteoblasten und Osteoklasten sowie Knochendichtemessung, und letzteres ebenfalls durch Untersuchung der Modulation der uterinen Genexpression und des Uterusgewichtes. Ergebnis ist, dass der Pflanzenextrakt bei kurzzeitiger Applikation wie E₂ die Expression von Genen in Osteoblasten stimuliert und sich auch in Osteoklasten dem E₂ entsprechend verhält. Die Knochendichte vermag der Extrakt bei dreimonatiger Gabe zu steigern, allerdings nicht in dem Ausmaß, wie es E₂ tut. Am Uterus hingegen zeigt der Traubensilberkerzen-Extrakt weder einen Effekt auf die Genexpression noch auf das Uterusgewicht und verhält sich damit antiestrogen in diesem Organ.

Bei Überprüfung der estrogenen Potenz in-vitro konnten Liu et al. (129) für *Cimicifuga* keine Aktivität feststellen: Es erfolgte keine Induktion der AP-Aktivität und keine Hochregulation der PR-mRNA in Ishikawa Zellen, ferner keine Induktion von pS2 in der Brustkrebszelllinie S30. Auch wurde keine signifikante kompetitive Bindung zu ER α oder ER β beobachtet.

Weitere Untersuchungen und Reviews unterstützen dieses Ergebnis (41;150). Klinische Studien mit ausreichend großer Probandenzahl und Dauer sowie unter Plazebokontrolle stehen jedoch noch aus.

Die weiteren Testsubstanzen sind ebenfalls Ethylacetatextrakte, und zwar mit PHA bezeichnet aus der Gartenbohne, SOPH aus dem Japanischen Perlschnurbaum und SAR vom Besenginster gewonnen.

1.2.6.5 Phaseolus vulgaris

Volkstümlich werden die von Samen befreiten Früchte der Gartenbohne bei Harnwegserkrankungen angewendet. Boue et al. untersuchten kürzlich anhand etablierter Zellkulturassays die estrogenen Effekte eines *Phaseolus*-Extraktes. In MCF-7 Zellen, einer humanen Brustkrebszelllinie, stimulierte er im Gegensatz zu Estradiol nicht die Proliferation, und es wurde eine erhöhte Präferenz des Extraktes zu ER β gegenüber ER α festgestellt (151).

1.2.6.6 Sophora flavescens, Sarothamnus scoparius

Für Extrakte aus *Sophora* und *Sarothamnus* sind in-vitro bisher keine estrogenen oder antiestrogenen Effekte bekannt. Veröffentlicht wurde vor kurzem eine antiinflammatorische Wirkung durch Inhibition des Zytokins IL-6 und des Enzyms COX-2 (152) ausgeübt durch das Isoflavonglykosid Sophoricosid, ein Genisteinderivat, das aus unreifen Früchten des Japanischen Perlschnurbaums isoliert wurde. Auch wurden Inhaltsstoffe mit antioxidativer Aktivität in einem *Sophora*-Butanolextrakt gefunden (153). Besenginster wird als Droge angewandt bei Herzinsuffizienz oder Herzmuskelschaden. In den Blüten sind unter anderem Alkaloide, Lektine und Flavonylglykoside enthalten.

1.3 Estrogenrezeptoren

Beim Menschen wurden bisher zwei Subtypen von Estrogenrezeptoren (ER) identifiziert, ER α und ER β , sowie zahlreiche Splicevarianten und Polymorphismen (34). Die Subtypen unterscheiden sich durch die Abfolge einiger Aminosäuren in der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne des Rezeptorproteins und in der DNA-bindenden Domäne (s. Abb. 7 D.) sowie in ihrer Verteilung im Organismus (s. u.)

Im Jahr 2000 identifizierten Hawkins et al. einen dritten Subtyp im *Teleost* Fisch (*Micropogonias undulatus*) (154). Dieser ER γ genannte Subtyp weist Unterschiede in der Aminosäuresequenz in Regionen des Proteins auf, die wichtig für die Ligandenbindung und Rezeptoraktivierung sind.

1.3.1 Funktion

Beim Estrogenrezeptor (ER) handelt es sich um einen nukleären ligandengesteuerten Transkriptionsfaktor. Als Transkriptionsfaktor bezeichnet man ein Regulatorprotein, welches die Transkription von Genen beeinflusst. Im ungebundenen Zustand befindet sich der Rezeptor nach alter Literatur im Cytosol und wird nach Bindung des Liganden in den Nukleus transloziert (155-157). Ca. zehn Jahre später wies man den damals nur einen ER sowohl im Cytosol als auch im Nucleus in unterschiedlichen Verteilungsmustern je nach Zellart nach (158-162). Luqmani et al. bezeichnen das Vorkommen des ER in der cytosolischen Fraktion humaner Brustkrebszellen als Artefakt (163). Ein Artikel aus dem Jahr 1986 beschreibt bereits einen kernständigen ER (164), gegenwärtig werden die ER zur Superfamilie der nukleären Hormonrezeptoren gezählt (165).

Nach Bindung eines Liganden in der hydrophoben Bindungstasche (Abb. 7.A.) des Rezeptors erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins, das als Komplex mit anderen Proteinen vorliegt. Hierdurch spaltet sich ein Hitzeschock-Protein (hsp90) ab, und es erfolgt eine Dimerisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Es kann sich sowohl um ein Homodimer ($ER\alpha$ mit $ER\alpha$) als auch um ein Heterodimer ($ER\alpha$ mit $ER\beta$) handeln (166). Die resultierende unterschiedliche Konformation des Komplexes lässt auf ein anderes Umfeld von Coregulatoren und somit modulierte Hormonwirkungen schließen (Abb.7.B).

Nach Gabe eines Phytoestrogens befinden sich trotzdem noch endogene Estradiolmoleküle an Bindungsstellen von ERs. Folglich kann die Dimerisierung eines Rezeptorsubtyps mit jeweils unterschiedlichen Liganden stattfinden. Auch dies führt zu einer wiederum anderen Konformation des dimeren Komplexes.

Mit der Dimerisierung ist die Voraussetzung zur Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an das Estrogen Response Element (ERE) auf der DNA geschaffen. Ein solches befindet sich in der Promotorregion eines von ihm kontrollierten Gens, eines Targetgens. Über ein ERE reguliert der Rezeptor die Transkription seiner Zielgene (Abb.7.C.) (167). Zu diesem Zweck besitzt das Rezeptormolekül eine DNA-bindende Domäne (Abb.7.D.). Die Transaktivierung (die Aktivierung der Transkriptionsaktivität) des Rezeptormoleküls erfordert die Rekrutierung von Coaktivatoren wie zum Beispiel SRC-1 (168), das Ausschalten der Transaktivierung (Silencing) hingegen so genannte Corepressoren wie beispielsweise SMRT. Die notwendigen Coaktivatoren sowie Wachstumsfaktoren können in einer dafür existierenden Domäne, die mit AF-1 bezeichnet wird, an den Komplex binden. Jede Art eines Liganden, ein Agonist, partieller Agonist oder SERM, führt zu einer charakteristischen Konformation im Bereich

dieser AF-1 (169) und somit zur unterschiedlichen Rekrutierung von Coaktivatoren und – repressoren.

Im Anschluss an die Gentranskription erfolgt die Proteinsynthese, zum Beispiel von Enzymen, Second messengers oder Rezeptoren. Abbildung 7.C. verdeutlicht die Wirkungsweise des ER.

Handelt es sich bei dem Liganden um einen Antagonisten, so besteht die Möglichkeit der DNA-Bindung strukturell nicht, da der Rezeptor-Ligand-Komplex eine andere Konformation hat. Ob SERMs agonistisch oder antagonistisch wirken, ist abhängig vom Gewebe, in dem sie an den ER binden, von der Spezies, vom ER-Subtyp, dem ERE-Promotor Kontext (d.h. der Effekt einer Substanz ist abhängig vom Gen, das aktiviert wird) und von der Dosis, in der sie verabreicht werden (170).

Häufig antagonisiert ER β im Zellkontext die Wirkungen von ER α ; nach Bindung von E₂ an ER α kommt es zum Beispiel zur Aktivierung der Transkription, während ER β im Komplex mit E₂ die Transkription unterbindet. Jedoch gibt es auch Gene, die speziell durch einen der beiden Rezeptorsubtypen reguliert werden (171). Weiterhin ist es für die Transkription von Bedeutung, ob sich im Anschluss an die Ligandenbindung Homo- oder Heterodimere bilden (172).

Abbildung 7

A.

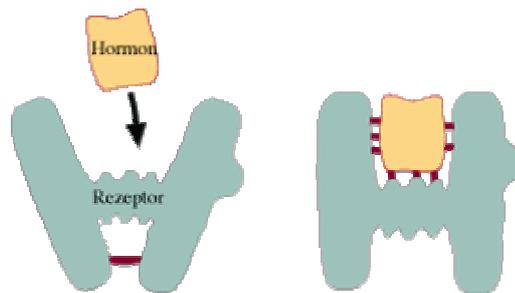


Abb. 7.A: Estrogenrezeptor. Nach Bindung eines Liganden in der hydrophoben Bindungstasche des Rezeptors erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins.

Das Modell zeigt wie gut sich der natürliche Ligand E₂ in die hydrophobe Bindungstasche einzufügen vermag. [1.3.1]

B.

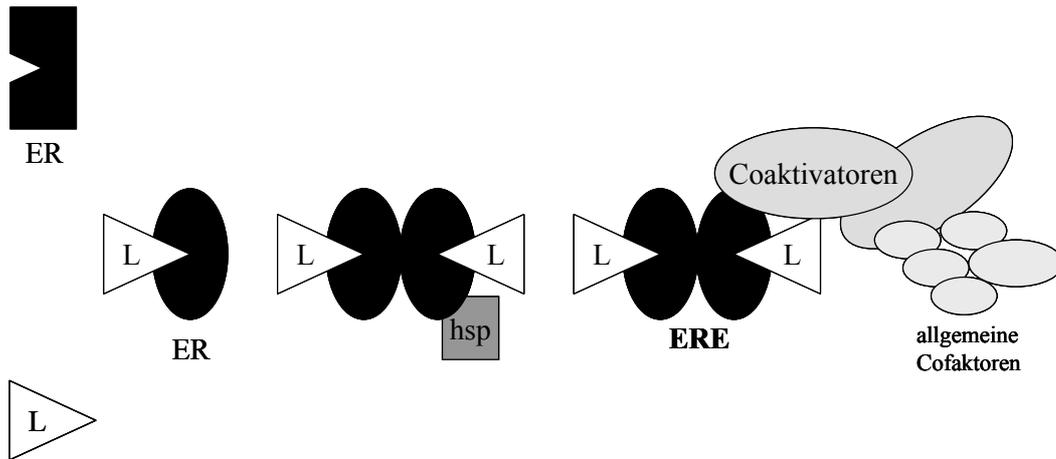


Abb. 7.B: Mechanismus der Ligandenbindung am ER. Nach Bindung eines Liganden am Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins und Dimerisierung des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Es spaltet sich ein Hitzeschock-Protein (hsp) ab. Bei der Dimerisierung kann sowohl ein Homodimer (ER α mit ER α) als auch ein Heterodimer (ER α mit ER β) entstehen. Die resultierende unterschiedliche Konformation des Komplexes lässt auf ein anderes Umfeld von Coregulatoren und somit modulierte Hormonwirkungen schließen. [1.3.1]

C.

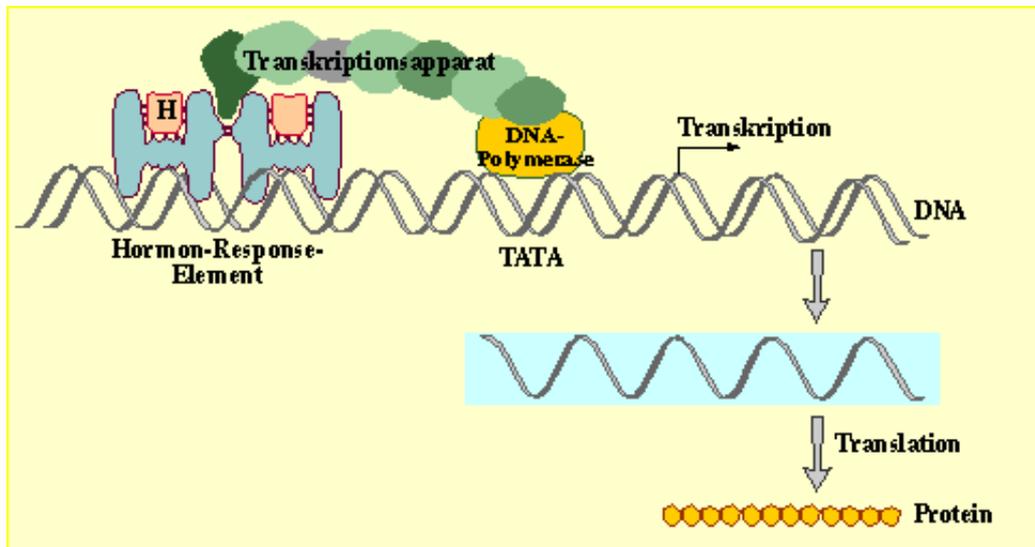


Abb. 7.C.: Wirkungsweise des ER. Dimerisierung ist Voraussetzung zur Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an das Estrogen Response Element (ERE) auf der DNA. Ein solches befindet sich in der Promotorregion eines ER-kontrollierten Gens. Über ein ERE reguliert der Rezeptor die Transkription seiner Zielgene. Das ERE ist hier mit „Hormon-Response-Element“ bezeichnet. [1.3.1]

D.

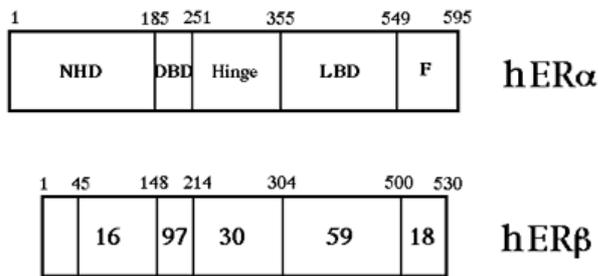


Abb. 7.D.: Domänen der humanen Estrogenrezeptoren ER α und ER β . Die Subtypen unterscheiden sich durch die Abfolge einiger Aminosäuren in der C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (LBD) des Rezeptorproteins und in der DNA-bindenden Domäne (DBD). Die einzelnen Domänen sind im ER α -Diagramm benannt. Die Zahlen im ER β -Diagramm geben die Sequenzhomologie in % wieder. [1.3.1]

1.3.2 Splicevarianten und Polymorphismen

Rezeptorsplicevarianten entstehen durch Spleißen des primären RNA Transkripts; den daraus hervorgehenden Varianten eines Rezeptors fehlen ein oder mehrere Exons, was mit der Progression von Brustkrebs in Verbindung gebracht wird (173).

Für ER β sind besonders die Varianten ER β 2, ER β cx und ER β cx/ β 2 untersucht (174-176). Omoto et al. haben ER α -positive MCF-7 Zellen mit einem ER β 1 (dem Wildtyp-ER β), bzw. ER β cx/ β 2 Expressionsvektor cotransfiziert. In beiden Zelllinien stellten sie ein verringertes Wachstum der Zellen fest, jedoch war nur für das ER β 1 Konstrukt ein DNA-Protein Komplex mit dem ERE nachweisbar. Die ER β cx/ β 2 Isoform besitzt darüber hinaus nicht die Fähigkeit Steroidhormone zu binden (177). Dies lässt darauf schließen, dass ER β 1, bzw. ER β cx/ β 2 die Funktion von ER α in MCF-7 Zellen auf unterschiedliche Weise einschränken (174). Die Splicevariante ER β cx konnte in verschiedenen menschlichen Organen und etablierten Zelllinien nachgewiesen werden. Es wurde jedoch weder eine Bindungsfähigkeit für E₂ gezeigt noch ein Komplex des Proteins mit dem ERE oder die Fähigkeit zur ligandenabhängigen Transaktivierung. Eine Dimerisierung geht dieser Rezeptor vorwiegend mit ER α ein und verhindert so die Bindung von ER α an die DNA und die ER α -vermittelte Transaktivierung. Es scheint sich um einen Rezeptor mit inhibitorischer Eigenschaft zu handeln, der möglicherweise die ER α -vermittelte Estrogenwirkung inhibiert (176;178). Er lässt sich in zahlreichen ER α -positiven Brustkrebsgeweben nachweisen. Im menschlichen Darm ist ER β der vorherrschende ER Subtyp, neben ihm sind ER β 1 und ER β 2 vorhanden. Ein vermindertes Vorkommen dieser Subformen ist bei Frauen verknüpft mit einer gesteigerten Tumorgenese im Kolon (175).

Bei einem Rezeptor-Polymorphismus handelt es sich um eine vielgestaltige Ausprägung des Proteins aufgrund unterschiedlicher Genotypen, deren Häufigkeiten nicht allein der natürlichen Mutationsrate entsprechen. Polymorphismen von ER α werden unter anderem in Zusammenhang gebracht mit einem gesteigerten Mammakarzinom- sowie Prostatakarzinomrisiko (179;180). Gut untersucht sind zwei Isoformen, eine 46kDa umfassende, ER α 46, und eine mit 66kDa, genannt ER α 66. In einem Zellkontext, in dem die Transaktivierung über die Aktivierungsdomäne AF-2 erfolgt, verhält sich ER α 46 wie ein ligandeninduzierbarer Transkriptionsfaktor. Im Gegensatz dazu übt er über die andere Aktivierungsdomäne AF-1 eine dominant negative Wirkung aus. Als Mechanismen sind eine Heterodimerbildung (s. u.) zwischen den beiden Rezeptorisoformen denkbar oder auch eine direkte kompetitive Verdrängung an der DNA-Bindungsstelle von ER α . Funktionell wird für ER α 46 eine Rolle bei der Zellproliferation postuliert, da sich das hER α 66/hER α 46 Verhältnis im Zuge der MCF-7 Proliferation ändert (181).

Das Fehlen von ER α und / oder ER β wurde durch „Ausschalten“ der Gene in so genannten „Knockout“ (ERKO) oder „Estrogen receptor null“ Mäusen und Ratten untersucht. Couse et al. (182) und Emmen et al. (183) beschreiben detailliert die Phänotypen die sich für α ERKO und β ERKO Mäuse ergeben. Hier seien nur einige genannt, die im Kontext dieser Arbeit interessant sind. Beide ERKO Varianten sind lebensfähig. Der α ERKO ist unfruchtbar, der Reproduktionstrakt ist für Estrogene unempfindlich. Es sind keine ER-vermittelten estrogenen Signalwege feststellbar. Der ER β wird im α ERKO normal exprimiert. Beim β ERKO ist das weibliche Tier subfertil, das männliche uneingeschränkt fertil. Die Brustdrüse ist im β ERKO voll entwickelt, im α ERKO hingegen findet keine estrogengesteuerte Entwicklung der Brust in Pubertät und Erwachsenenalter statt (184). Der Estradiolspiegel im Serum ist in α ERKO erhöht, in β ERKO ist er normal.

Es gibt erst wenige Daten zu fehlenden estrogenen Wirkungen am Knochen in Knockout-Mäusen. Ein Reviewartikel (185) stellt die bisherigen Ergebnisse der Studien mit ERKO Versuchstieren dar, die aus einem Zeitraum von drei Jahren stammen: Die Beobachtungen sind geschlechts- und speziesspezifisch und divergieren von Studie zu Studie in Teilen. So wurde beispielsweise in α ERKO Mäusen eine verringerte Femurlänge festgestellt, was bei einem Mann (bis heute ist nur ein Fall eines ER α -defizienten Mannes untersucht) nicht gezeigt werden konnte (182). Es ist von einer ER α -vermittelten Förderung der Knochenreifung die Rede (185), jedoch wurde auch von einem reduzierten longitudinalen

Wachstum des Femurs und dessen Durchmessers sowie, schwächer ausgeprägt, einem Verlust der Knochendichte in weiblichen α ERKO Mäusen berichtet (186). Die Knochenresorptionsrate ist sowohl in α ERKO Mäusen als auch im ovariectomierten Rattenmodell erhöht (187).

Eine Metaanalyse der bisherigen Daten ergibt Folgendes: Der wachstumsfördernde Effekt von Estrogenen während der Knochenentwicklung scheint $ER\alpha$ -vermittelt in beiden Geschlechtern vorhanden zu sein. Fehlt $ER\alpha$, so kann $ER\beta$ im weiblichen Tier den Verlust kompensieren. Gleichzeitig hat $ER\beta$ eine antagonistische Wirkung gegenüber $ER\alpha$ im spongiösen Knochen: Er wirkt der Knochenformation entgegen und reduziert die $ER\alpha$ -vermittelte inhibitorische Wirkung auf Osteoklastengenes und -aktivität (185).

1.3.3 Struktur-Wirkungs-Beziehungen

Strukturelle Voraussetzung für die Ligand-Rezeptor-Komplexbildung ist der phenolische Ring A des Estradiolmoleküls (Abb.1 D.). Da die Bindungskavitäten des Rezeptors durch Estradiol nicht vollständig ausgefüllt werden, vor allem gegenüber den Ringen B und C, sind Liganden mit variierendem hydrophobem Molekülteil vorstellbar.

Die Position und Anzahl der Hydroxylgruppen im Molekül haben auf die Bindungsaffinität großen Einfluss. Sie tragen über Wasserstoffbrückenbindungen zur Interaktion mit dem Rezeptor bei. Essentiell ist hierbei die Funktion des phenolischen Ringes - im E_2 über die Hydroxyl-Gruppe an Position 3 im Ring A - sowie die Wasserstoff-Donor-Funktion des 17β -Hydroxylrestes (188). Besonders kleine hydrophobe Reste an bestimmten Positionen tragen zur Erhöhung der Bindungsaffinität bei (189). Der hydrophobe Charakter einer Substanz sowie eine starre Ringstruktur erhöhen ihre estrogenen Aktivität (188).

Eine solche abweichende Struktur mit erhaltenem Ring A zeigen die Phytoestrogene (Abb.1 A). Sie sind in der Lage an $ER\alpha$ und $ER\beta$ zu binden. Wie der kompetitive Rezeptor-Bindungsassay zeigt, ist die Verdrängung durch Phytoestrogene am $ER\beta$ meist stärker als am $ER\alpha$ (35). Diese erhöhte $ER\beta$ -Affinität geht für eine Reihe getesteter Phytoestrogene einher mit einer steigenden Transkriptionsaktivität, also estrogenen Potenz.

Sun et al. stellen neue nicht-steroidale ER-Liganden vor, die subtyp-selektiv entweder agonistisch oder antagonistisch wirken. R,R-Tetrahydrochrysen zum Beispiel bindet mit vierfacher Affinität an $ER\beta$, wirkt an $ER\alpha$ als Agonist, an $ER\beta$ aber als vollständiger Antagonist (190). Die Entwicklung selektiver Agonisten oder Antagonisten an $ER\alpha$ oder $ER\beta$ und die Aufklärung ihres Wirkungsmechanismus sollten zu gewebe selektiv wirksamen Substanzen führen, die Einsatz finden könnten in der HRT und Brustkrebsprävention (191).

1.3.4 Verteilung im Organismus

Im menschlichen Organismus lässt sich für ER α und ER β ein spezifisches Verteilungsmuster ausmachen, wobei in bestimmten Organen bzw. Gewebetypen jeweils ein Rezeptorsubtyp in seiner Expression stark überwiegt. Der ER α findet sich verstärkt in der Niere und Nebenniere, in der Brustdrüse, in der Leber, im Uterus (mit Ausnahme der Endothelzellen im Endometrium (192)) und im ZNS in der Hypophyse (25;35). Überwiegend ER β herrscht vor im Gefäßsystem, im Knochen (s. u.), in der Lunge, in der Blase und in der Prostata [42].

Da im Zuge dieser Arbeit estrogene Wirkungen am Knochen untersucht werden, ist es von Bedeutung die dortige ER-Verteilung detaillierter anzuschauen. Im kortikalen Knochen, der die feste äußere Knochenschale bildet und eine überwiegend mechanisch protektive Funktion ausübt, liegt vorwiegend ER α vor. Auch in Osteoblasten, den knochenformierenden Zellen, und den aus ihnen hervorgegangenen, allmählich calcifizierenden Osteozyten ist ER α vorhanden. Dicht an der Knochenbildungsoberfläche sowie in proliferierenden Chondrozyten der Wachstumsplatte wurde ebenfalls eine hohe ER α -Expression nachgewiesen. Damit kann unter anderem auf eine Bedeutung des ER α für Längenwachstum und Festigkeit des Knochens geschlossen werden (193). Im gitterartig aufgebauten spongiösen Knochen, der im Knochenzentrum lokalisiert ist und überwiegend aus Mark und Weichgewebe besteht und somit eine metabolische Funktion besitzt, überwiegt ER β . Dieser ist auch stark exprimiert in Osteoblasten und Osteozyten sowie in Osteoklasten (194-196). Ähnlich wie ER α findet ER β sich auch in Chondrozyten der Wachstumsplatte. Folglich scheint ER β maßgeblich an der Instandhaltung des Knochens beteiligt zu sein. Sein Vorhandensein in Osteoklasten könnte zur Erklärung der direkten Wirkung von Estrogenen auf Osteoklasten sein (195). Außerdem haben beide ER-Subtypen eine Funktion bei der Verschmelzung der Wachstumsplatte.

1.3.5 Rolle der ER in der Signaltransduktion bei bestimmten Krebsarten

Für die zelluläre Antwort auf estrogene Stimulation ist das Verhältnis der Expression der beiden ER-Subtypen entscheidend. Hall et al. (166) beschreiben ER β als insgesamt weniger aktiv als ER α aufgrund einer im Rezeptorprotein vorliegenden repressorischen Domäne. Bei Coexpression mit ER α und Estradiolkonzentrationen unterhalb der Sättigungskonzentration fungiert ER β als ein inhibitorisch wirkender Modulator der Transkriptionsaktivität von ER α . Er ist in der Lage diese um 25% herabzusetzen. Als Folge findet auch die sich anschließende Proteinexpression nur eingeschränkt statt. Die zelluläre Sensitivität gegenüber E₂ wird durch ER β herabgesetzt. ER α allein spielt eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Progression von Brustkrebs (174).

Als Mechanismus der ER β -vermittelten repressorischen Aktivität fanden Hall et al. (166) zum einen die Bildung von Heterodimeren von ER α und ER β und zum anderen die Fähigkeit von ER β unabhängig von einer Ligandenbindung mit den Promotoren von Zielgenen zu interagieren. Dass ER β auch als positiver dominanter Regulator der ER-Aktivität wirken kann, zeigt die verstärkte estrogene Effektivität von Genistein in Anwesenheit von ER β (197). Die Subtypen stehen zueinander in einem „Yin-Yang-Verhältnis“ (171).

Paech et al. (167) führten zur Testung der Transaktivierungseigenschaften von ER α und ER β im Beisein eines ERE einen Luciferase Assay durch (s. Kap. 2.). Auch dieser Versuch ergab, dass im Falle einer Bindung von E₂ an die Rezeptorsubtypen, ER α die Transkription aktiviert, während ER β sie inhibiert.

Einige neuere Untersuchungen gibt es zu den molekularbiologischen Konsequenzen, die sich durch Genistein als Ligand an den Estrogenrezeptoren ergeben.

Genistein zeigt im Reportergen Assay in transfizierten MCF-7 Zellen eine starke Aktivierung durch ER α , an dem er ein voller Agonist ist. Damit einher geht die Beobachtung, dass die ER α -mRNA- und von dieser sich ableitende Proteinspiegel durch Genistein herunter reguliert werden, wie es auch durch E₂ geschieht (198). In Konzentrationen, in denen Genistein die Transkriptionsaktivität in MCF-7 Zellen stimuliert (bis 1 μ M), wirkt es gleichzeitig proliferationsfördernd, hohe Konzentrationen jedoch ($\geq 10\mu$ M) erweisen sich als stark zytotoxisch, ein Effekt, der unabhängig vom Vorhandensein von Estrogenrezeptoren in der Zelllinie ist (198). Kürzlich berichteten Power et al. (144) von einer Heraufregulation von ER β und erhöhter Proliferationsrate in MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Genistein wie auch E₂. Sie folgern daraus, dass die Erhöhung der ER β -Expression in Brustkrebszellen ein Marker ist für die estrogene Antwort der Zellen. Shaaban et al. untersuchten den ER β -Gehalt in Brustkrebspatientinnen verglichen mit gesunden Frauen und stellten dabei fest, dass die ER β -Konzentration in den Zellen um so geringer war, je weiter fortgeschritten der Tumor war (199).

In Mäusen wurde unter Genisteingabe eine Herabregulation von ER α in Brustdrüse von weiblichen und in der Prostata von männlichen Tieren beobachtet (32;102). Diese Ergebnisse machen den Aufklärungsbedarf der molekularen Mechanismen deutlich, über die Phytoestrogene das Krebsgeschehen beeinflussen.

1.4 Modelle zur experimentellen Überprüfung estrogener Wirkungen

Die experimentelle Überprüfung von Substanzen auf ihre estrogene Wirksamkeit nimmt ihren Ursprung in Tierversuchen. Nach Fütterung einer entsprechenden Substanz an Ratten oder Mäuse in einem definierten Zeitraum wird die Entwicklung des Uterusgewichtes verfolgt und mögliche Auswirkungen auf den Zyklus oder das Brustdrüsengewebe untersucht. Differenziertere Untersuchungen erfolgen an Tieren in bestimmten Entwicklungsstadien sowie an ovariectomierten Tieren, die zum Einsatz kommen, um den postmenopausalen Zustand zu simulieren.

Heutzutage gehen solchen in-vivo Untersuchungen in-vitro Studien voraus, das heißt, es werden in einem ersten Schritt Zellkulturen zur systematischen Ermittlung estrogener Wirkungen herangezogen. Etabliert haben sich hierbei estrogensensitive humane Brustkrebszelllinien, wie MCF-7 Zellen, oder die Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa. Zu detaillierteren Überprüfung werden transgene Zelllinien herangezogen, die entweder mit ER α oder ER β transfiziert sind, und so eine Rückführung der erzielten Wirkungen direkt auf einen Rezeptorsubtyp zulassen. Eine Erweiterung dessen bietet die zusätzliche Transfektion von Zellen mit einem Reporter gen, wie beispielsweise dem ERE-TK-Luc Konstrukt, zur Erforschung der Fähigkeit einer Substanz, die Transkription über einen ER zu aktivieren. Der Einsatz von Tiermodellen erfolgt erst im Anschluss an positive in-vitro Ergebnisse, wobei auch hier eine Fortentwicklung stattgefunden hat, und zwar die Etablierung von Knockout-Tieren (s. unter 1.3).

1.4.1 Beschreibung der ausgewählten Zellsysteme und Gründe für ihre Wahl

Die Zellsysteme, die in dieser Arbeit verwendet werden, stammen entsprechend der Fragestellung aus den Bereichen Knochen, Brust, Endometrium und Leber.

1.4.1.1 „Modell Knochen“

Es ist bekannt, dass Estrogene ihren Einfluss auf den Erhalt des Knochens unter anderem direkt über die Regulation der Osteoblastentätigkeit ausüben (200). Sie modulieren ER-vermittelt die Synthese extrazellulärer Matrixproteine und anderer Proteine, die an der Instandhaltung und Mineralisierung des Knochens beteiligt sind (201). Zur Untersuchung estrogener Wirkungen am Knochen bieten sich Osteoblasten, bzw. osteoblastähnliche Zellen folglich an. Ein solcher Phänotyp ist zum Beispiel charakterisiert durch die Sekretion von Typ I-Collagen, durch histochemisch nachweisbare Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität und

durch die Synthese und Sekretion von Osteocalcin. Die AP- und Osteocalcinssekretion werden stimuliert durch $1\alpha,25$ -Dihydroxyvitamin D₃ (200;202).

Das „natürlichste“ Zellsystem wären menschliche primäre Osteoblasten. Diese lassen sich durch spezielle Techniken aus frisch entnommenen Knochenproben isolieren und kultivieren (203). Von Nachteil sind jedoch ihre nur geringe Kultivierungsdauer (ca. fünf Passagen) sowie die starke Varianz in den Ergebnissen von mit ihnen durchgeführten Experimenten. Begründet ist dies zum einen in inhomogenen Differenzierungsstadien, in denen sich die einzelnen Zellen befinden (204), zum anderen ist der Gehalt an ER α und ER β nicht bekannt und variiert stark (205). Auch der Grad der Konfluenz der Zellkulturen hat großen Einfluss (206). Es handelt sich also sowohl um intraindividuelle Unterschiede, das heißt, die unterschiedlichen Zellpassagen eines Individuums liefern keine reproduzierbaren Ergebnisse, als auch um interindividuelle Differenzen zwischen den einzelnen Patienten. Es ließ sich trotz Einteilung in Gruppen nach Alter und Geschlecht keine Konformität der Ergebnisse feststellen. Somit ist dieses System zur vergleichenden Untersuchung der estrogenen Wirkung verschiedener Substanzen nicht geeignet.

Die Verwendung einer humanen immortalisierten osteoblastartigen Zelllinie liefert eine homogene Zellpopulation. Die in Kultur befindlichen Zellen entsprechen sich in ihrem Differenzierungsgrad. Um darüber hinaus in der Lage zu sein, experimentell die ER α - , bzw. ER β -vermittelten Wirkungen voneinander zu trennen, wurden aus der humanen fetalen Osteoblasten (hFOB)-Zelllinie, hFOB 1.19, zwei neue kloniert, hFOB/ER α 9 und hFOB/ER β 6, die je einen der ER-Subtypen exprimieren. Die hFOB 1.19 Zellen entstammen primären Kulturen, gezüchtet aus Biopsien einer spontanen Fehlgeburt. Sie wurden transfiziert mit einem Gen zur temperaturabhängigen Immortalisierung sowie mit einem für eine Neomycin-Resistenz kodierenden Gen. Der Subklon mit der höchsten AP-Aktivität, hFOB 1.19, weist einen osteoblastartigen Phänotyp auf und stellt ein homogenes Modellsystem zur Erforschung der Stadien der Osteoblastendifferenzierung beim Menschen dar (207). Diese Zelllinie wurde nun stabil transfiziert mit einem ER α -, bzw. ER β -Expressionsvektor, und es wurde jeweils der Subklon identifiziert mit dem höchsten Gehalt an funktionellem ER. Mit den neu entstandenen Estrogen responsiven Zelllinien, hFOB/ER α 9 und hFOB/ER β 6, stehen ausgezeichnete Systeme zur Untersuchung des estrogenen Einflusses auf die Funktion humaner Osteoblasten zur Verfügung (208;209). Die zellulären Antworten auf Estradiol scheinen abhängig zu sein vom ER-Subtyp und dem vorliegenden Differenzierungsgrad der Osteoblasten (209). Weiterhin zeigt E₂ ER-vermittelt einen Effekt auf die Reifung und Entwicklung von Osteoblasten durch differentielle Regulation der

Expression extrazellulärer Matrixproteine wie AP, Osteocalcin und Collagen Typ I und durch Senkung der Proliferationsrate (210).

Vorteil solcher temperaturabhängig immortalisierter Zellen ist, dass sie sich einerseits schnell teilen (bei 34°C) und zeitlich vorhersagbare Differenzierungsphasen durchleben können und andererseits als ausdifferenzierte, sich nicht mehr teilende Zellen vorliegen können (bei 39°C). Es besteht die Möglichkeit, in jedem der Stadien Substanzen an diesen Zellen, zum Beispiel auf ihre estrogenen Wirkungen hin, zu testen (211)

Ein wiederum anderes (oder weiteres) Modell zur Untersuchung von Mechanismen in osteoblastartigen Zellen bieten die seit langem etablierten Osteosarkomzelllinien. Das Osteosarkom ist der am häufigsten auftretende Knochentumor, dessen Zellen sich durch eine abnorm schnelle Proliferation und veränderte Funktionalitäten auszeichnen. Sie produzieren im Übermaß pathologisches Osteoid, ein Komplex aus extrazellulären Matrixproteinen, die im Normalfall, nicht jedoch hier, zur Mineralisation der Knochenmatrix beitragen (212). Transformierte Osteosarkomzellen weisen etliche Charakteristika des Osteoblastenphänotyps auf, jedoch findet keine koordinierte Ausdifferenzierung dieser Zellen statt (213).

Um eine solche Zelllinie handelt es sich bei den U-2 OS Zellen, die dem Oberschenkelhalstumor eines 15-jährigen Mädchens entstammen (214).

Um die spezifischen Wirkungen durch ER α , bzw. ER β auf die estrogenabhängige Transkription auf dem mRNA-Level zu untersuchen, ist eine Zelllinie erforderlich, welche die beiden Rezeptoren in gleicher Konzentration stabil exprimiert. Hier eignet sich die U-2 OS-Zelllinie, da sie osteoblastartige Eigenschaften besitzt, schnell proliferiert, endogen keine Estrogenrezeptoren nachweisbar sind und die Zellen problemlos zu transfizieren sind. Bei Monroe et al. (215) findet sich eine genaue Beschreibung der Entwicklung zweier Zelllinien, genannt U2OS/ER α und U2OS/ER β , mit Doxycyclin-induzierbarem ER α , bzw. ER β . Durch die Induzierbarkeit der Rezeptorexpression lässt sich die ER-abhängige Transkription eindeutig bestimmen, denn in nicht Doxycyclin behandelten Zellen findet diese nicht statt.

Dies bietet eine optimale Vergleichsmöglichkeit der Wirkungen der Phytoestrogene auf die beiden Rezeptorsubtypen.

1.4.1.2 „Modell Brust“

Die am häufigsten verwendete Zelllinie zur Analyse estrogener Wirkungen auf ein Mammakarzinom System in-vitro ist die MCF-7 Zelllinie. Sie wurde im Jahr 1970 aus einem metastasierenden Mammakarzinom einer 69-jährigen kaukasischen Frau gewonnen (DSMZ-

Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH; ATCC (HTB 22)). Im Cytoplasma von MCF-7 Zellen wurden beide ER-Subtypen nachgewiesen (DSMZ, andere ref.). Erst kürzlich bestätigten Power et al. (144) das Vorhandensein beider Rezeptorproteine per Western Blot. In der Literatur findet sich jedoch auch die Angabe, MCF-7 Zellen enthielten lediglich ER α (170;216). Wir haben dies mittels klassischer RT-PCR sowie Realtime RT-PCR überprüft und beide Rezeptoren gefunden. Die Rezeptor Konzentrationen werden durch Estrogene, bzw. estrogenwirksame Substanzen moduliert (eigene Ergebnisse, (144;217)).

Zur Analyse estrogenen, bzw. antiestrogenen Effekte potentiell hormonartiger Substanzen in-vitro bieten die MCF-7 Zellen eine sehr gute Kombination unterschiedlicher Testmöglichkeiten (s. u. Modelle). Auch können in-vivo Experimente mit ihnen durchgeführt werden. Das Einbringen einer MCF-7 Zellsuspension in entsprechend präparierte Mäuse induziert bei diesen ein Mammakarzinom, so dass die Effekte gefütterter Substanzen auf die Zellen nach einer bestimmten Behandlungszeit und anschließender Gewebeentnahme untersucht werden können (142;143).

1.4.1.3 „Modell Endometrium“

Zusätzlich zur Charakterisierung pflanzlicher Estrogene durch Rezeptor-Bindungsstudien und Untersuchungen am Mammakarzinom Modell soll auch ein Modell für das hormonsensitive Endometrium Anwendung finden. Das Endometrium besteht aus unterschiedlichen Zellpopulationen wie Epithel- und Stromazellen und wird hauptsächlich durch steroidale Sexualhormone reguliert (218). Die Ishikawa Zelllinie ist eine humane Endometriumkarzinomzelllinie, bestehend aus Drüsenzellen, die einem Adenokarzinom des Endometriums einer 39-jährigen Frau entstammen (219). Sie enthält sowohl ER α als auch ER β und ist estrogenresponsiv (220). Ähnlich wie bei MCF-7 Zellen beschrieben, werden mit Ishikawa Zellen sowohl Untersuchungen in Zellkultur durchgeführt als auch im Tumorgewebe von Mäusen, nachdem bei ihnen durch Zellimplantation ein Endometriumkarzinom induziert wurde (219). Zur in-vitro Untersuchung potentieller Estrogene stehen verschiedene Testverfahren zur Verfügung (s. u. Modelle).

Die Induktion der Alkalischen Phosphatase in dieser Zelllinie ist für Estrogene spezifisch (221).

1.4.1.4 „Modell Leber“

Die Untersuchung der direkten Regulation endogener hepatischer Gene über den Estrogen Rezeptor durch Estrogen, bzw. Phytoestrogene, erfordert ein Zellsystem, in dem die beobachteten Effekte möglichst auf einen ER-Subtyp zurückgeführt werden können. Da in der Leber ER α der vorherrschende Subtyp ist, eignet sich die Zelllinie Fe33. Diese ist ein Subklon der FTO-2B Zellen, eine aus einem Rattenhepatom etablierte Zelllinie, die stabil mit ER α transfiziert wurde (116;222). Die Fe33 Zellen weisen einen konstanten ER α -Spiegel auf, mögliche Interaktionen mit ER β im Hinblick auf die rezeptorvermittelten Wirkungen sind auszuschließen. Dies ist einer der Vorteile gegenüber Zellkulturen primärer Hepatozyten. In ihnen nimmt außerdem die Rezeptorkonzentration innerhalb von vier Stunden drastisch ab (116), was sich für Untersuchungen mit estrogenwirksamen Substanzen als problematisch erweist.

Krattenmacher et al. (222) haben sich mit der Suche nach einem in-vivo und in-vitro Modell befasst, mit dem sich die hepatische Aktivität als Antwort auf estrogenartige Stoffe quantifizieren und die zugrunde liegenden Mechanismen erforschen lassen. Er stellte fest, dass der Einfluss von Estrogenen auf den Blutspiegel von Angiotensinogen (AT) im ovariectomierten Rattenmodell ein direkt über hepatische ER vermittelter Effekt ist.

1.4.2 Beschreibung der verwendeten Endpunkte

1.4.2.1 Messung der Alkalische Phosphatase-Aktivität in der hFOB/ER α -Zelllinie

Der wohl meist beschriebene estrogenregulierbare Marker für die Knochenformation in Osteoblasten ist das extrazelluläre Matrixprotein Alkalische Phosphatase (AP). In hFOB Zellen nach Abschluss der Proliferationsphase während weiterer Differenzierung und beginnender Mineralisierung induziert (210), trägt sie zur Bildung von Calciumphosphat, einem Hauptbestandteil mineralisierter Knochensubstanz, bei. Waters et al. (209) haben die ER-vermittelte Regulation der AP im Zuge der Differenzierung der Zelllinien hFOB/ER α und hFOB/ER β auf mRNA- und Proteinebene dargestellt. In den hFOB/ER Zelllinien untersuchen wir die Regulation dieses Proteins nach Behandlung der Zellkultur mit Phytoestrogenen im Vergleich zu E₂.

1.4.2.2 Messung der Genexpression in U-2 OS/ER-Zelllinien

Die U-2 OS/ER Zelllinien bieten mit ihren oben beschriebenen Charakteristika ein neues optimales Modell zur Untersuchung estrogenregulierter Genexpression, die direkt auf eine

ER-Isoform zurückgeführt werden kann. Wie kürzlich von Monroe et al. (215) gezeigt wurde, handelt es sich sowohl um etablierte osteoblastspezifische Gene (AP oder IL-6) als auch um solche, von denen bisher keine E₂-Regulation in Osteoblasten bekannt war. Als humane Osteosarkomzelllinie gleicht die U-2 OS Zelllinie im Phänotyp nicht gänzlich humanen Osteoblasten. Alle bisher in hFOB Zellen überprüften Gene wurden jedoch ebenfalls in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen induziert und in der gleichen "Richtung" durch E₂ reguliert. Mittels RT-PCR werden in dieser Arbeit zwei osteoblastspezifische Gene, AP und Interleukin-6 (IL-6), das Estrogen-Markergen Presenelin-2 (pS2) und das bisher am stärksten E₂-regulierte Gen, der von Willebrand Faktor (VWF), untersucht.

Das Zytokin IL-6 trägt über eine Erhöhung der Osteoklastenformation und -aktivität zur Erhöhung der Resorptionsrate des Knochens bei (223). Estrogendefizienz unterstützt diesen Effekt. In Osteoblasten, bzw. hFOB/ER Zellen wird die Synthese von IL-6 durch E₂-Behandlung unterdrückt (209).

In unterschiedlichen Zellsystemen dient pS2 als etabliertes Markergen für den Nachweis estrogener Wirkung. Seine Expression wird durch Estrogene über den ER vermittelt (224-226). In bestimmten Brustkrebsarten wird pS2 überexprimiert (142).

Erst kürzlich entdeckten Monroe et al. (215) die estrogene Regulation des von Willebrand Faktor in den U-2 OS/ER-Zelllinien. Als Cofaktor (Faktor VIIIA) des Faktor VIII der Blutgerinnung beschleunigt VWF die Thrombozytenaggregation an das Gefäßendothel (227). Hierbei interagiert er mit zahlreichen Collagentypen, die auch in der Knochenmatrix stark vertreten sind. Somit ist eine Funktion des VWF in der extrazellulären Matrix des Knochens denkbar (215). Auch stößt man in der Literatur im Zusammenhang mit dem Prozess der Knochenregeneration und der damit verbundenen Revaskularisierung des neu entstehenden Knochengewebes auf den VWF, bzw. verwandte Faktoren (228). Das Vorhandensein im Osteosarkom könnte die Vaskularisierung im Zuge eines aktiven Knochenumbaus widerspiegeln.

1.4.2.3 Messung der Proliferation in der MCF-7-Zelllinie

Vorteil der MCF-7 Zelllinie ist ihre vielseitige Verwendbarkeit bei der Testung hormonartiger Substanzen in-vitro. Durch Kombination verschiedener Testsysteme lassen sich vorhandene estrogene sowie antiestrogene Effekte nachweisen. E₂ stimuliert in diesen Zellen die Proliferation (229) sowie die Expression estrogenresponsiver Gene wie pS2 oder den Progesteron Rezeptor (230). Eine Substanz kann in diesem Sinne gleichzeitig estrogene dabei aber antiproliferative Eigenschaften besitzen (216). Die Überprüfung des Wirkspektrums von

Phytoestrogenen ist unter Anwendung eben dieser Modelle bereits vielfach beschrieben und seit langem etabliert (142;231).

1.4.2.4 Messung der Transkriptionsaktivität in transient transfizierten MCF-7 Zellen

Um heraus zu finden, ob die estrogenen Wirkungen ER-vermittelt sind, dient ein Reporter-gen-Assay, auch Luciferase-Assay genannt. Gemessen wird die Transkriptionsaktivität der Rezeptoren nach Ligandenbindung in Form von Biolumineszenz. Hierzu wird in MCF-7 Zellen ein Estrogen-Response-Element (ERE) cotransfiziert mit einem Luciferase Reporter Vektor (TK-Luc) (232). Kürzlich beschrieben Joung et al. (233) die Anwendung dieser Methode zur Analyse der Estrogenität einiger Isoflavonoide im Vergleich zu E₂. Eine Fortentwicklung dieses Systems ist das „Dual-Luciferase Reporter Assay System“ (Promega), in welchem die MCF-7 Zellen transient mit einem durch Estrogen induzierbaren Firefly Luciferase Reporter (ERE-TK-Luc) sowie einem Renilla Luciferase Reporter (phRG-TK), letzterer als interne Kontrolle, transfiziert werden (Monroe *et al.*, 2003b). Mit Hilfe dieser Methode fanden zum Beispiel Maggolini et al. (198) eine starke Aktivierung des endogenen ER α durch Genistein in MCF-7 Zellen.

1.4.2.5 Messung der Alkalischen Phosphatase in der Ishikawa-Zelllinie

Bisherige Forschungsergebnisse haben gezeigt, dass Estrogene die Alkalische Phosphatase-Aktivität in Ishikawa Zellen stimulieren. Diese Eigenschaft hat sich als ein häufig benutzter Parameter zur Überprüfung der Estrogenität eines Stoffes im Endometrium etabliert (234). Die Induktion der AP in Ishikawa Zellen ist spezifisch für Estrogene, andere Steroidhormone zeigen diesen Effekt nicht, und Antiestrogene wie zum Beispiel Tamoxifen oder ICI inhibieren die estrogeninduzierte AP Aktivität (235). Dies lässt darauf schließen, dass die Aktivität des Enzyms in dieser Zelllinie vornehmlich ER-vermittelt reguliert wird (220;236). Littlefield et al. (221) etablierten einen Assay im Mikrotitermaßstab, mit dem sich die Aktivität des Enzyms zuverlässig kolorimetrisch bestimmen lässt und die dosisabhängige Stimulation durch Estrogen nachgewiesen werden kann.

Kayisli et al. (218) führen die positiven gesundheitlichen Wirkungen von Isoflavonen unter anderem auf ihre Fähigkeit zurück, die Funktion von Zellen des Endometriums zu modulieren. Sie weisen dort sowohl estrogene als auch antiestrogenen Eigenschaften auf. So lässt sich die relative estrogenen Potenz von Phytoestrogenen anhand dieses Modells überprüfen (236;237). Es bietet ein stabiles etabliertes System mit hoher Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Häufig wird es in Kombination mit Proliferations- und

Genexpressionsanalysen, auch in Mammakarzinommodellen, sowie mit Transaktivierungs- und Rezeptor-Bindungsstudien kombiniert (129;220).

Auf diese Weise lassen sich die estrogenen und / oder antiestrogenen Effekte von Substanzen abschätzen.

1.4.2.6 Messung der Genexpression in der Fe 33-Zelllinie

Zur Untersuchung estrogenen Wirkungen auf Hepatozyten eignet sich, wie oben bereits erwähnt, AT als Marker (222). Unter Ethinylestradiol (EE) steigt der AT-Blutspiegel im Rattenmodell um 60% gegenüber der Kontrolle. Dieses Ergebnis ist vergleichbar mit der Situation beim Menschen. In Fe33 Zellen fanden Krattenmacher et al. zudem einen durch EE induzierten Anstieg der AT-mRNA. Folglich scheinen das Rattenmodell sowie das Fe33-Modell geeignete Systeme darzustellen zur Erforschung der hepatischen Reaktion auf estrogene Substanzen.

In dieser Arbeit wird die estrogengesteuerte Genexpression in Fe33-Zellen an zwei Beispielen verdeutlicht. Mittels der sehr empfindlichen Realtime RT-PCR wird die Regulation von Angiotensinogen und dem Calcium-Binding-Protein (9k) durch EE sowie erstmals durch Phytoestrogene untersucht.

Angiotensinogen ist ein hauptsächlich in der Leber synthetisiertes und in die Blutbahn sezerniertes Protein, dessen Spiegel durch Hormontherapie beeinflusst wird (115;116). Als zentraler Faktor im Renin-Angiotensin-Aldosteron-System dient AT als Substrat für Renin zur Herstellung von Angiotensin I (AT I). Letzteres dient gleichzeitig als negatives Feedback für die AT Sekretion. Durch das Angiotensin-Converting-Enzyme wird AT I in Angiotensin II (AT II) umgewandelt. Zentral und peripher über AT II-Rezeptoren wirkt diese Substanz stark vasokonstriktorisch und setzt darüber hinaus aus der Nebennierenrinde direkt Aldosteron frei. An den Nieren führt AT II über Verminderung der renalen Durchblutung zu einer Abnahme der glomerulären Filtrationsrate. Aldosteron bewirkt zusätzlich eine Natrium-Rückresorption sowie Verminderung der Wasserausscheidung, so dass das zirkulierende Plasmavolumen und damit der Blutdruck erhöht wird. Der AT Blutspiegel wird durch zahlreiche physiologische und pathologische Faktoren beeinflusst. Erhöht ist er beispielsweise während der Schwangerschaft sowie unter Estrogentherapie, erniedrigt bei Nebenniereninsuffizienz sowie Inhibition des Angiotensin-Converting-Enzyme. Diese Veränderungen beruhen hauptsächlich auf der Modifikation der hepatischen Biosynthese unter hormoneller Kontrolle. Hierbei wird die hepatische Genexpression moduliert (115). Feldmer et al. (117) fanden auf dem AT Gen

ein halbpalindromartiges ERE, welches die Effekte durch Estrogene vermittelt. Der Effekt von Phytoestrogenen auf den mRNA-Spiegel von AT wurde bislang nicht untersucht.

Als weiterer Marker dient das Vitamin D-abhängige Calcium-Binding-Protein (CaBP9k, auch Calbindin-D(9k)), ein Mitglied der intrazellulären Calcium-Binding Proteine. Es spielt in der Leber und zahlreichen anderen Geweben, wie Uterus, Intestinum und Plazenta, eine wichtige Rolle beim Calciumtransport und bei der Calciumresorption. Im Intestinum vermittelt CaBP9k die intrazelluläre Diffusion, ein Teilschritt des aktiven transzellulären Calciumtransportes. Bei hoher Calciumzufuhr über die Ernährung wird die Biosynthese von CaBP9k herabreguliert, da der Vitamin D₃-Spiegel ebenfalls herunter reguliert wird (238).

Die Expression von CaBP9k wird unter anderem durch Steroidhormone und ihre Rezeptoren moduliert und erfolgt gewebe- und speziesspezifisch (239). Im Hinblick auf die Regulation der Genexpression durch Estrogene in der Rattenleber ist CaBP9k das bisher empfindlichste Gen. Sein Promotor enthält ein unvollständig palindromartiges ERE, welches mit dem ER interagiert sowie eine AP1 Region (240;241).

An et al. (242) untersuchten die Eignung der CaBP9k-mRNA Regulation als Parameter im Rattenmodell zur Einschätzung der estrogenen Potenz von in der Umwelt vorkommenden Alkylphenolen. Sie fanden eine hohe Korrelation zwischen der dosis- und zeitabhängigen Modulation des Uterusgewichtes und der CaBP9k-mRNA Expression. Darüber hinaus beobachteten sie, dass die ER α -mRNA entsprechend der CaBP9k-mRNA durch Alkylphenole und E₂ stimuliert wurde, was auf eine Beteiligung von ER α an der Regulation der CaBP9k-mRNA Expression schließen lässt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich das CaBP9k-Gen als Marker zur Aufklärung der Estrogenität potentiell hormonwirksamer Verbindungen eignet.

Der Einfluss von Phytoestrogenen auf die CaBP9k-Expression relativ zum Estrogen wurde bislang kaum untersucht. Thomae et al. berichten von nur schwachen dosisabhängigen Effekten von Genistein, bzw. 8-PN im Vergleich zu E₂ oder EE (241).

1.5 Fragestellung

Wie einleitend beschrieben wird aus Gründen der Osteoporoseprävention und Linderung der Symptomatik von Wechseljahresbeschwerden mit Eintritt der Menopause bei Frauen in westlichen Industrienationen standardmäßig eine Hormonersatztherapie durchgeführt. Diese besteht entweder aus einem synthetischen, bzw. equinen Estrogen allein oder aus einer Kombination aus Estrogen und Gestagen. Da mit diesen Therapieformen ein erhöhtes

Mamma-, bzw. Endometriumkarzinomrisiko einhergeht sowie als Nebenwirkung eine Blutdruckerhöhung auftreten kann, soll in dieser Arbeit auf Zellkulturebene überprüft werden, ob es mögliche pflanzliche Alternativen zur HRT gibt.

Dabei stehen folgende Fragen im Vordergrund:

- Welchen Einfluss haben die pflanzlichen Stoffe und Zubereitungen auf die Endpunkte, die in den Zielgeweben als estrogene Marker bestimmt werden sollen?
- Besitzen die pflanzlichen Stoffe eine Affinität zu den Estrogenrezeptoren ER α und ER β ?
- Sind die pflanzlichen Inhaltsstoffe in der Lage die ER-vermittelte Transkription zu modulieren?
- Wie ist das Verhalten der Phytoestrogene auf das Zellwachstum in Abwesenheit von Estrogenrezeptoren in den Zellen?
- Sind die getesteten pflanzlichen Proben mit Recht als Phytoestrogene zu bezeichnen?

Die untersuchten Zielgewebe sind Knochen, Brust, Endometrium und Leber. Folgende Modelle werden verwendet:

Für den Knochen werden humane Osteoblasten-, bzw. Osteosarkom-Zelllinien (hFOB/ER und U-2 OS/ER) verwendet, die jeweils mit einem der ER-Subtypen stabil transfiziert sind. Gemessen wird die Aktivität und Genexpression des Enzyms Alkalische Phosphatase. Neben diesem Knochenformationsmarker werden in den U-2 OS/ER-Zelllinien weitere Gene (IL-6, pS2, VWF) auf ihre Regulation hin untersucht.

Für das Brustkrebsgewebe wird die Proliferation in der humanen MCF-7-Zelllinie überprüft, die durch estrogenwirksame Strukturen stimuliert wird.

Im Hinblick auf das Endometrium soll die Enzymaktivität der Alkalischen Phosphatase in der humanen Ishikawa-Zelllinie gemessen werden. Sie stellt in diesem System einen sensitiven Marker für Estrogene dar.

Zuletzt soll zur Einschätzung der estrogenen Effekte in Hepatozyten die Regulation der Genexpression von Angiotensinogen, einem Glied in der Kette des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems, und einem weiteren estrogenregulierbaren Gen (CaBP9k) in der Hepatomzelllinie Fe33 untersucht werden. Diese Zelllinie ist stabil transfiziert mit ER α , dem vorherrschenden ER-Subtyp in der Leber.

Darüber hinaus gilt es, die Bindungsaffinität der pflanzlichen Proben an die ER-Subtypen im Zuge eines zellfreien Rezeptor-Bindungs-Assays herauszufinden. Hierbei wird die Fähigkeit

der Testsubstanzen untersucht, radioaktiv markiertes Estradiol vom Rezeptorprotein zu verdrängen.

Die Transkriptionsaktivität, die jede Probe am ER im Vergleich zu Estradiol hat, wird mit Hilfe transienter Transfektion eines Promotor-Reportergen-Konstruktes (ERE-TK-Luc) in MCF-7 Zellen analysiert. Gemessen wird die Aktivität des Enzyms Luciferase in Form von Lumineszenz.

Ein weiterer Punkt ist die Bestimmung der Zytotoxizität der Pflanzenstoffe in einer allgemein verwendeten Fibroblasten-Zelllinie, den V79 Zellen.

Die Frage, die sich nun stellt, ist: Kann man mit Hilfe dieser Modelle die estrogene Wirkung einer ausgewählten Batterie von Pflanzenextrakten und -inhaltsstoffen bestimmt werden? Zeigen die Pflanzen differenzielle Effekte in unterschiedlichen Organen und an den verschiedenen Estrogenrezeptoren sowie in Bezug auf unterschiedliche Parameter?

Insgesamt soll diese Arbeit einen Beitrag dazu leisten, mögliche Alternativen zur klassischen HRT in Form von Phytoestrogenen aufzudecken, um durch deren SERM-Charakter zu einer ungefährlicheren Möglichkeit der Substitutionstherapie zu gelangen, die von weniger gravierenden Nebenwirkungen begleitet ist.

2. Methoden

2.1 Rezeptor-Bindungsassay

Um die unterschiedlichen relativen Bindungsaffinitäten von pflanzlichen Extrakten und Inhaltsstoffen gegenüber E_2 und auch gegenüber den beiden Estrogenrezeptorsubtypen $ER\alpha$ und $ER\beta$ zu untersuchen, eignet sich der Rezeptor-Bindungsassay, auch Verdrängungsassay genannt. Die Verdrängung radioaktiv markierten Estradiols ($^3H-E_2$) vom ER durch hormonwirksame Substanzen wird bestimmt und damit eine Aussage über die Bindungsaffinität der verdrängenden Substanz gemacht. Die Verdrängung erfolgt innerhalb eines zellfreien Systems an den beiden isolierten menschlichen Estrogenrezeptoren, die in reiner Form im Handel verfügbar sind. Ergebnisse dieses Assays lassen auch Rückschlüsse auf Struktur-Wirkungsbeziehungen in Bezug auf Liganden der Estrogenrezeptoren zu. Phytoestrogene zeigen teilweise eine erhöhte Affinität zu $ER\beta$ gegenüber $ER\alpha$, oder sie haben gleiche Affinität zu den beiden Subtypen (68). Diskutiert wird ein verbessertes Wirkungs-Nebenwirkungsprofil durch Substanzen, die eine erhöhte $ER\beta$ -Affinität aufweisen (243;244), eine Hypothese, auf die ich in der Diskussion noch genauer eingehen werde.

Gemessen wird in diesem Experiment die Radioaktivität ($^3H-E_2$), die nach der Verdrängung durch einen Kompetitor am Rezeptor verblieben ist. Je höher die Affinität einer Probe zu einem ER ist, desto mehr $^3H-E_2$ verdrängt sie aus seiner Bindung und desto geringer ist der Messwert im Szintillationszähler.

Die genaue Versuchsbeschreibung findet sich im Anhang. Kurz gefasst werden der jeweilige ER, $^3H-E_2$ und die hormonwirksame Substanz vermischt und über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Tags darauf wird der Rezeptor samt seinem Liganden extrahiert und die verbliebene Radioaktivität gemessen. Als Positivkontrolle dient Diethylstilbestrol (DES), ein sehr starkes synthetisches Estrogen, als Negativkontrolle das Lösungsmittel der Probe. Je Assay wird ein ER-Subtyp mit einer Probe in sechs verschiedenen Konzentrationen (6ng/ml – 2000ng/ml) einschließlich DES (1 μ M) als Positiv- und Lösungsmittel der Probe als Negativkontrolle vermessen.

Die Ergebnisse werden grafisch ausgewertet. Die Affinität einer Substanz zu $ER\alpha$ und $ER\beta$ wird in einem Koordinatensystem dargestellt, wobei auf der Ordinate „% Verdrängung“ aufgetragen ist und auf der Abszisse logarithmisch unterteilt die Konzentration der Probe in μ g/ml. Ermittelt wird die IC_{50} , d.h. die Konzentration einer Probe, die erforderlich ist, um 50% des radioaktiv markierten E_2 vom Rezeptor zu verdrängen. Man erhält diesen Wert,

indem man für jede erstellte Verdrängungskurve eine sigmoide Regressionskurve errechnet. Der zu $y = 50$ (50% Verdrängung vom Rezeptor) gehörige Abszissenabschnitt ist die IC_{50} .

2.2 Untersuchung der Zytotoxizität: Bestimmung der „Colony Forming Efficiency“

Untersucht wird die Fähigkeit von Zellen, nach Behandlung mit einer Testsubstanz Kolonien zu bilden. Das Ergebnis wird ausgedrückt als „Colony Forming Efficiency“ (CFE). Die Konzentrationen der Proben sollten so gewählt werden, dass das Medium letztendlich nicht mehr als 0,5% Lösungsmittel enthält und sowohl nicht-toxische als auch toxische Konzentrationen eingeschlossen werden, nicht jedoch mehr als 5000 μ g/ml. Die Phytoestrogene wurden eingesetzt in den Konzentrationen 1,0 μ g/ml, 3,0 μ g/ml, 10,0 μ g/ml, 30,0 μ g/ml, 100,0 μ g/ml und 300,0 μ g/ml, als Negativkontrolle Medium mit 0,5% Lösungsmittel. Als Zellsystem dienen V79-Zellen, eine Fibroblastenzelllinie aus der Lunge eines chinesischen Hamsters (245). Diese Zellen lassen sich problemlos kultivieren und sind etabliert hinsichtlich der Bestimmung der CFE.

Pro Testsubstanz wird eine Doppelbestimmung durchgeführt. Eine geringe Menge V79-Zellen werden ausplattiert (200 Zellen/ 25cm²) und nach 24 Stunden für eine Periode von 24 Stunden den Testsubstanzen und Kontrollen ausgesetzt. Im Anschluss daran wird ein Mediumwechsel mit einem Wachstumsmedium durchgeführt und die Zellen 6 Tage darin belassen und inkubiert. Zur Auswertung des Experimentes werden die Zellen angefärbt und die Zahl der entstandenen Kolonien bestimmt.

Das Ergebnis wird grafisch dargestellt und die Wirkungen der Substanzen im Vergleich zur LM-Kontrolle interpretiert.

2.3 Alkalische Phosphatase in hFOB/ER α 9 Zellen

2.3.1 Zellsystem hFOB/ER

Die hFOB 1.19 Zellen entstammen primären Kulturen gezüchtet aus Biopsien einer spontanen Fehlgeburt. Sie wurden transfiziert mit einem Gen zur temperaturabhängigen Immortalisierung, und zwar einer temperaturempfindlichen Mutante (ts58) des SV40 Large T Antigen (207). Bei Inkubation mit 33,5°C findet eine schnelle Proliferation statt, bei der so genannten restriktiven Temperatur von 39,5°C findet eine Zellteilung, wenn überhaupt, nur noch in sehr geringem Ausmaß statt. Die weitere genetische Charakterisierung ist im Abschnitt „Modelle“ beschrieben. Diese Zelllinie weist einen Osteoblastartigen Phänotyp auf

und stellt ein homogenes Modellsystem zur Erforschung der Stadien der Osteoblastendifferenzierung beim Menschen dar.

Zur Entwicklung der hFOB/ER α Zelllinie wurde in die ER-negative hFOB 1.19 Zelllinie das für den humanen ER α Wildtyp kodierende Gen sowie ein Gen für eine Hygromycinresistenz stabil transfiziert (208). Die hFOB/ER β Zelllinie entstand durch stabile Transfektion von hFOB 1.19 mit einem ER β Expressionsvektor und einem Vektor für eine Zeocinresistenz (209). Genauere Angaben finden sich im Anhang. Die Selektionierung der positiven Transfektanten wurde durch Zugabe von Hygromycin (für hFOB/ER α), bzw. Zeocin (für hFOB/ER β) zum Kulturmedium initiiert und durch Ringklonen 14 Tage lang fortgeführt. Der Subklon mit der jeweils höchsten Konzentration an funktionellem ER wurde mit hFOB/ER α 9, bzw. hFOB/ER β 6 bezeichnet.

Die neu entwickelten Zelllinien wurden auf ihre Sensitivität gegenüber Estrogen hin überprüft. In hFOB/ER α 9 wurde die Funktionalität des ER durch seine Fähigkeit zur Stimulation der Luciferase in einem ERE-TK-Luciferase System unter Beweis gestellt (208). Der ER in hFOB/ER β 6 Zellen ist ebenfalls funktionstüchtig, was Waters et al. (209) durch die antagonisierende Wirkung von R,R-Tetrahydrochrysen auf ER β - nicht jedoch auf ER α -vermittelte Wirkung gezeigt haben. Mit diesen Zelllinien stehen Modelle zur Aufklärung der differentiellen Wirkung des jeweiligen ER-Subtyps in Osteoblasten auf Zellfunktion und -differenzierung zur Verfügung.

2.3.2 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase

Die Messung der AP erfolgt nach dem Protokoll von Sigma und der Beschreibung nach Robinson et al. (210) und beruht auf dem Prinzip der Absorptionsmessung freien p-Nitrophenols, das durch Phosphatbspaltung aus p-Nitrophenylphosphat im Falle von Enzymanwesenheit in alkalischem Milieu entsteht (s. Anhang). Die Menge an gebildetem gelb gefärbten p-Nitrophenol ist proportional zur Aktivität der AP. Mit Hilfe eines Standards wird die einer Absorption entsprechende AP-Aktivität in Sigma U/ml ermittelt. Als externer Standard dient die Verdünnungsreihe einer p-Nitrophenol-Standardlösung. Ausgehend von einer stets frisch hergestellten Stammlösung der Konzentration 50nmol/ml werden Verdünnungen laut Protokoll hergestellt, von denen jede einer bestimmten Enzymaktivität (in Sigma U/ml) entspricht.

Die Zellen, hFOB/ER α , bzw. hFOB/ER β in den Passagen 3-6 wurden in einer Dichte von 5.000 Zellen pro Well in 96-well-Platten ausgesät und in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS zu einem Konfluenzgrad von 80% kultiviert. (Da die so erreichten Messwerte in hFOB/ER β zu

gering zur Auswertung waren, wurden 30.000 Zellen/Well in 24-well-Platten getestet, bzw. 55.000 Zellen/Well in 12-well-Platten.) Anschließend wurden die Zellen in Achterparallelen mit frisch hergestelltem 10^{-8} M Ethinylestradiol (EE), reinem Medium als Kontrolle oder den Phytoestrogenen der Konzentration 0,1µg/ml, 1,0µg/ml oder 10,0µg/ml behandelt. Der Effekt des Lösungsmittels, in dem die Proben gelöst sind, ist vernachlässigbar gering. Deshalb kann als Negativkontrolle Medium verwendet werden.

An Tag 3 erfolgt ein Mediumwechsel, die Messung der AP-Aktivität wird am Tag 5 durchgeführt. Dieser Messtag hat sich nach intensiver Untersuchung zahlreicher Messzeitpunkte aufgrund sehr guter und reproduzierbarer Ergebnisse in der hFOB/ER α Zelllinie als der am besten geeignete erwiesen. Die Alkalische Phosphatase hat an diesem Tag eine bereits ausreichende, gut messbare Aktivität (209), und es findet in den Wells noch keine Ablösung der Zellen statt, was bei längerer Kultivierung aufgrund überschrittener Konfluenz schnell erfolgt. Zur Messung in hFOB/ER β Zellen wurden alle Tage zwischen Tag 3 und Tag 7 getestet und führten zu keinem Zeitpunkt zum Erfolg.

Eine detaillierte Beschreibung der Durchführung findet sich im Anhang.

Die gemessenen Enzymaktivitäten werden bezogen auf die Menge an Gesamtprotein je Well, die unter Anwendung der Proteinbestimmung nach Bradford (246) (s. dort) durchgeführt wird. Jedem Well wird hierzu ein Aliquot von 5µl entnommen, das in eine 96-well-Platte überführt wird.

Nach Normalisierung auf das Gesamtprotein, d.h. Division eines jeden Absorptionwertes der AP-Bestimmung durch den Proteinwert, werden die Werte nach Mittelwertbildung in Relation gesetzt zur Mediumkontrolle und grafisch dargestellt.

2.4 Proteinbestimmung nach Bradford

Bradford et al. (247) etablierten einen Assay zur Bestimmung des Gesamtproteins, der zur Normalisierung gemessener Größen, die sich auf eine bestimmte Zellzahl beziehen, standardmäßig angewandt wird. Hierbei bindet das verwendete Coomassie Brilliant Blue G-250 Reagenz kovalent an die Sulfhydrylgruppen der Proteine, was eine Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nach 595 nm zur Folge hat. Die dabei entstehende Menge des Farbkomplexes ist proportional zur vorhandenen Proteinmenge.

Die Durchführung erfolgt in 96-well-Mikrotiterplatten. Aus dem entsprechenden Versuch werden Aliquots des Zelllysats in die Wells gegeben. Im Regelfall (ca. 1×10^5 Zellen) handelt es sich um ein Volumen von 5µl. Dieses kann erhöht werden im Falle einer geringen Zellzahl,

es dürfen jedoch nicht mehr als 50µl sein. Mit 0,15N NaCl werden die Aliquots zu 50µl ergänzt. Nach Zugabe von 200µl 1:5-verdünntem Coomassie Reagenz (s. Anhang) wird für 20min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert und sofort im Anschluss bei 620nm die Absorption gemessen. Als Standard dient hier eine Eichkurve, die mit bovinem Serum Albumin (BSA) aufgenommen wird (s. Anhang). Das Ergebnis ermittelt man durch Ablesen aus dieser Eichkurve und Multiplizieren des Wertes mit dem Verdünnungsfaktor (im Falle von 5µl Probe ist der Faktor 10). Die Einheit ist µg Protein /ml.

2.5 RT-PCR in U-2 OS/ER Zellen

2.5.1 Zellsystem U-2 OS/ER

Bei Monroe et al. (215) findet sich eine genaue Beschreibung der Entwicklung zweier Zelllinien, genannt U2OS/ER α und U2OS/ER β , mit Doxycyclin-induzierbarem ER α , bzw. ER β . Zur Herstellung wird ein zwei Vektoren enthaltendes System verwendet, von denen der eine ein regulatorisches Plasmid darstellt, welches einen Tetracyclin-Repressor exprimiert, der zweite enthält einen Cytomegalievirus-Promotor, der die Fähigkeit besitzt, die Expression eines Zielgens unter bestimmten Bedingungen voran zu treiben. In Abwesenheit von Doxycyclin (Dox) unterbindet der Tetracyclin-Repressor die Transkription des Zielgens, Zugabe von Dox ermöglicht dessen Expression (s. Anhang). Durch die Induzierbarkeit der Rezeptorexpression lässt sich ER-abhängige Transkription eindeutig bestimmen, denn in nicht mit Dox behandelten Zellen findet diese nicht statt. Die U-2 OS/ER Zelllinien lassen sich ohne genetische Mutationen über eine sehr große Zahl von Passagen kultivieren.

Die Inkorporierung einer Epitop (FLAG)-Markierung am N-terminalen Ende des ER-Proteins erlaubt einen Vergleich der Konzentrationen von ER α , bzw. ER β in den beiden Zelllinien (248). Das FLAG-Epitop ist eine Aminosäuresequenz innerhalb des Proteins, die im Zuge einer Antigen-Antikörper-Reaktion von einem Antikörper erkannt wird. Beide Rezeptorproteine können so auf demselben Western Blot detektiert werden. Der Rezeptorspiegel in beiden Zelllinien ist ungefähr identisch. Dies bietet eine optimale Vergleichsmöglichkeit der Wirkungen der Phytoestrogene auf die beiden Rezeptorsubtypen.

Zur Vorbereitung für die PCR wurden die U-2 OS/ER α , Passage 12, bzw. U-2 OS/ER β Zellen, ebenfalls Passage 12, in 6-well-Platten ausplattiert und bis zu einem Konfluenzgrad von ca. 60% in Standardmedium kultiviert. Das Medium wird zugunsten des Dox-enthaltenden Induktionsmediums gewechselt. Nach 24 Stunden erfolgt ein erneuter Mediumwechsel, wobei dem Induktionsmedium die Substanzen in den Verdünnungen 0,1, 1,0

und 10,0µg/ml oder 10⁻⁸M E₂ zugefügt werden. Für die Positiv- und Negativkontrolle (Medium) werden je zwei Wells behandelt, jede Verdünnung einer Probe erhält ein Well. Die Inkubation erfolgt für 24 Stunden bei 37°C. Anschließend werden die Zellen zur RNA-Isolierung geerntet. Je Zelllinie wurde das Experiment in doppelter Ausführung angefertigt.

2.5.2 RNA-Isolierung (6-well)

Der Schritt der RNA-Isolierung muss sehr sorgfältig durchgeführt werden, da die RNA als Transkriptionsvorlage zur Synthese der cDNA dient, welche später im Zuge der PCR amplifiziert wird. Das Protokoll der Phenol–Guanidin Isothiocyanat Methode geht auf Subramaniam et al. (249) zurück.

Im Zuge dieser Isolierungsmethode finden unterschiedliche Fällungen statt. Zunächst werden die Zellen mit dem Trizol Reagenz geerntet, in sterile 1,5ml-Gefäße überführt und mit Chloroform ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wird weiter verarbeitet, die erste Fällung erfolgt mit Isopropanol für 24 Stunden bei –20°C. Das entstehende Präzipitat wird in DEPC Wasser aufgenommen. Es folgt eine Lithiumchloridfällung, die über Nacht im Kühlschrank belassen wird. Das entstehende Pellet wird wiederum in DEPC Wasser resuspendiert und nacheinander 3M Natriumacetat und Ethanol hinzu gegeben. Diese letzte Fällung wird für mindestens zwei Stunden bei –20°C durchgeführt und das Präzipitat eingetrocknet. Nach Resuspendierung des Pellets mit DEPC Wasser wird von jeder Probe eine 1:100 Verdünnung mit DEPC Wasser hergestellt, die im Spektrometer bei 260nm und 280nm vermessen wird. Der Quotient A_{260} / A_{280} sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen, sonst ist mit zu großer Verunreinigung genomischer DNA zu rechnen. Die Konzentration der RNA berechnet sich nach der Formel:

$$\text{RNA } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = [(A_{260}) \times (40\mu\text{g/ml}) \times \text{Verdünnungsfaktor}(100)] / 1000 .$$

Das jeweils 1µg RNA entsprechende Volumen wird berechnet nach

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

Die detaillierte Beschreibung der Methode befindet sich im Anhang.

2.5.3 cDNA Synthese (Reverse Transkription)

Die reverse Transkription der Gesamt-RNA wird in einem 20µl Reaktionsansatz pro Probe durchgeführt wie bei Rickard et al. (250) beschrieben.

Jeweils 1µg RNA wird mit je 1µl Random und 1µl Oligo dT Primer in einem sterilen Gefäß kombiniert und mit DEPC-Wasser zu 10µl ergänzt. Diese Mischung wird für 10min bei 70°C

erhitzt gefolgt von einer 5-minütigen Kühlung auf Eis. Daraufhin werden 10µl des frisch hergestellten Master Mixes (Zusammensetzung s. Anhang) hinzu gegeben, der unter anderem die Reverse Transkriptase, die Nukleotidbausteine und einen Puffer enthält, und es wird für eine Stunde bei 42°C inkubiert. Zuletzt verdünnt man die Proben mit je 30µl Wasser. Aliquots der entstandenen cDNA (2µl) werden anschließend in Doppelbestimmung für die Amplifikation per PCR eingesetzt. Die Lagerung der cDNA erfolgt bei -20°C.

2.5.4 Durchführung der RT-PCR

Zur Durchführung der PCR dienen Aliquots von je 2µl cDNA als Template. Diese werden im Verlauf der PCR amplifiziert, wobei von jeder Probe eine Doppelbestimmung angefertigt wird. Die verwendeten Primersequenzen finden sich in Tabelle 2.A. In jedem Reaktionsgefäß befindet sich neben der cDNA 18µl PCR Master Mix, der wie im Anhang beschrieben frisch hergestellt wird.

Die genauen PCR Bedingungen (215) zeigt Tabelle 3. Begonnen wird die PCR mit einem sogenannten „Hot Start“, einem 94°C heißen Temperaturabschnitt, welcher der Aktivierung der Polymerase dient (s. auch Abschnitt Light Cycler). Beendet wird die PCR-Reaktion während der linearen Phase der Amplifikation, für pS2 und das Housekeeping Gen β -Actin ist dies nach 20 Zyklen, für den VWF nach 25 und für AP und IL-6 nach 30 Zyklen der Fall. Im Anschluss an die PCR werden die PCR Produkte elektrophoretisch auf einem 1,5% (m/V) Agarose Gel getrennt und durch Ethidiumbromid-Färbung im UV-Licht sichtbar gemacht.

Tabelle 2

A.

Gen	Primer Sequenz
hAP	For 5' - ACGTGGCTAAGAATGTCATC -3' Rev 5' - CTGGTAGGCGATGTCCTTA -3'
hIL-6	For 5' - GAGGTATACCTAGAGTACCTCCAG -3' Rev 5' - GCCCAGTGGACAGGTTTCTGACC -3'
pS2	For 5' - AGGCCAGACAGAGACGTGTACAGTGG -3' Rev 5' - GAGTAGTCAAAGTCAGAGCAGTCAATC -3'
VWF	For 5' - GGAGATGTTTGCCTACGGCTTGAC -3' Rev 5' - GGAGCACTGGTCCTGCACATCGTTGATG -3'
hβ-Actin	For 5' - AGCCATGTACGTTGCTA -3' Rev 5' - AGTCCGCCTAGAAGCA -3'

B.

Gen	Primer Sequenz
hERα	For 5'- AATTCAGATAATCGACGACGCCAG – 3' Rev 5'- GTGTTTCAACATTCTCCCTCCTC – 3'
hERβ	For 5'- TAGTGGTCCATCGCCAGTTAT – 3' Rev 5'- GGGAGCCACACTTCACCAT – 3'

Tab. 2: Primersequenzen für die RT-PCR. [2.5.4]

Tab. 2.A: Verwendete Primer in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen; **Tab. 2.B:** Verwendete Primer in MCF-7 und Ishikawa Zellen.

Tabelle 3**A.**

Gen	Denaturierung		Annealing		Extension		Anzahl Zyklen
	(°C)	(sec)	(°C)	(min)	(°C)	(min)	
hAP	94	30	58	2	72	2	30
hIL-6	94	30	62	1	72	1	30
pS2	94	30	55	2	72	2	20
VWF	94	30	65	1	72	1	25
hβ-Actin	94	30	55	2	72	2	20

B.

Gen	Denaturierung		Annealing		Extension		Anzahl Zyklen
	(°C)	(sec)	(°C)	(min)	(°C)	(min)	
hERα	94	30	55	2	72	2	25
hERβ	94	30	55	2	72	2	25

Tab. 3: Konditionen für die RT-PCR. Jeder PCR-Lauf beginnt mit einem „Hot Start“ bei 94°C für 3min. Am Schluss des PCR-Laufes wird ein Kühlprogramm bei 4°C gefahren bis die Proben entnommen werden.

Tab. 3.A: Verwendete Konditionen in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen; **Tab. 3.B:** Verwendete Konditionen in MCF-7 und Ishikawa Zellen. [2.5.4]

2.6 Experimente im Zellsystem MCF-7

2.6.1 Proliferationsassay in MCF-7 Zellen

Mit dem Proliferationsassay wird die Anzahl lebender Zellen mit Hilfe einer kolorimetrischen Reaktion bestimmt. Ein Tetrazoliumsalz wird in Anwesenheit reduzierender Enzymsysteme proportional zur Zahl lebender Zellen zu einem farbigen Formazan reduziert (Abb.8).

Die Analyse der relativen Proliferationsrate wird unter Anwendung des „Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay Kits“ von Promega (Madison, WI) durchgeführt. Das Cell Titer 96 AQueous One Solution Reagenz enthält ein solches inneres Tetrazoliumsalz, kurz MTS oder Owen´s Reagenz genannt, und einen Stabilisator.

Da mir unterschiedliche Protokolle hinsichtlich der einzusetzenden Zellzahl für den Proliferationsassay mit MCF-7 Zellen in 96-well-Mirkotiterplatten vorlagen, habe ich empirisch diejenige Zahl ermittelt, bei der für die Positivkontrolle die maximale Stimulation der Proliferation erreicht wird. Je Well wurden 6.400 (215), bzw. 10.000 MCF-7 Zellen (Passage 159) in 100µl Standardmedium (s. Anhang) ausplattiert. Die genaue Versuchsdurchführung ist im Anhang beschrieben.

Der Assay wird in Dreifachbestimmung durchgeführt. Zur Bestimmung der relativen Proliferation wird der Mittelwert des Leerwertes von allen Messwerten subtrahiert und anschließend die Mittelwerte der Dreierbestimmungen gebildet. Die relative Proliferation zum Mittelwert der mit Medium behandelten Zellen wird errechnet und grafisch unter Einbeziehung der Standardabweichung dargestellt.

Abbildung 8

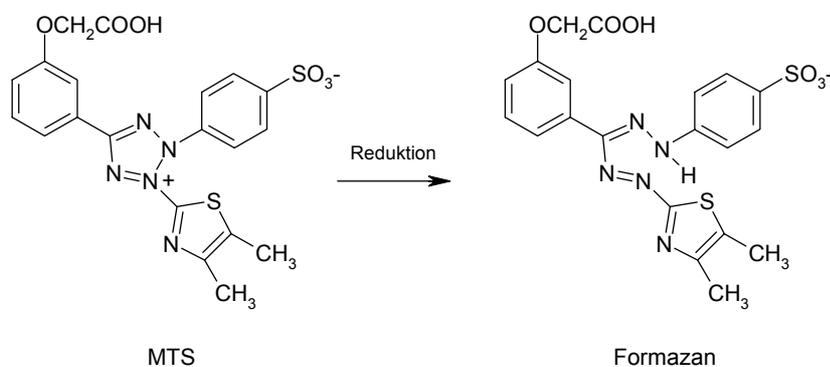


Abb. 8: Reaktionsmechanismus des Proliferationsassays. Mit dem Proliferationsassay wird die Anzahl lebender Zellen mit Hilfe einer kolorimetrischen Reaktion bestimmt. Ein Tetrazoliumsalz wird in Anwesenheit

reduzierender Enzymsysteme proportional zur Zahl lebender Zellen zu einem farbigen Formazan reduziert.
[2.6.1]

2.6.2 Luciferase Assay in MCF-7 Zellen

Um die Transkriptionsaktivität der Rezeptoren nach Ligandenbindung zu testen, wurde der Luciferase-Assay durchgeführt. Hierzu muss in den Zellen, die getestet werden sollen, ein mit dem ER gekoppeltes Reporterkonstrukt vorliegen, das die Messung estrogener Effekte entsprechend ihrer Stärke zulässt. Zu diesem Zweck werden MCF-7 Zellen, Passage 160, mit einem E2-responsiven Vektor transfiziert, der die Synthese der Firefly Luciferase (FFLuc) voran treibt (ERE-TK-Luc) sowie einem Kontroll-Vektor (pRL-TK), der konstitutiv die Renilla Luciferase (RLuc) exprimiert.

2.6.2.1 Transiente Transfektion der MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen, Passagen 159-160, wurden in 12-well-Platten in Standardmedium in Kultur genommen und bei ausreichendem Konfluenzgrad (50-60%) transient mit 1 µg ERE-TK-Luc und 1 µg pRL-TK unter Anwendung des Lipofectamine Plus Reagenzes (Invitrogen) transfiziert wie bei Monroe et al. (248) beschrieben (s. Anhang). Drei Stunden nach der Transfektion werden die Zellen gewaschen und mit 10% cs-FBS enthaltendem DMEM/F12 versehen. Die weitere Behandlung erfolgt 24 Stunden später mit den Testsubstanzen in den Konzentrationen 0,1, 1,0 und 10,0 µg/ml oder 10^{-8} M E₂ in DMEM/F12 mit Zusatz von 10% cs-FBS oder mit diesem Medium allein. Je Behandlung wird eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Nach wiederum 24 Stunden werden die Zellen geerntet (s. Anhang) und das Lysat im Luciferase Assay eingesetzt.

2.6.2.2 Durchführung des Luciferase Assays

Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgt unter Anwendung des „Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems“ (Promega, Madison, WI). Es handelt sich um ein duales Reportersystem, da simultan zwei individuelle Reporterenzyme innerhalb eines Systems exprimiert und nacheinander gemessen werden, und zwar die Luciferase des Glühwürmchens (Firefly, lat. *Photinus pyralis*) und die der Gattung Renilla (lat. *Renilla reniformis*). Die Expression des einen Reporters ist hierbei an spezielle experimentelle Bedingungen geknüpft, und zwar wird das Promotor-Reporter-Konstrukt ERE-TK-Luc durch E₂ reguliert, während die Aktivität des co-transfizierten Reporters nicht von diesen abhängig ist (keine E₂-Regulation des pRL-TK). Er dient somit als interne Kontrolle. Bezieht man die jeweils gemessene FFLuc-Aktivität auf die entsprechende RLuc-Aktivität, so ist es möglich variable

Parameter im Experiment, wie beispielsweise Unterschiede in der Zahl lebender Zellen, in der Effizienz der Transkription oder in den Pipettierolumina, zu minimieren.

Gemessen wird die Biolumineszenz in einem Luminometer. Hierbei handelt es sich um die Emission von Licht nach vorheriger Absorption von Strahlung. Zuerst wird die Lumineszenz des Firefly Reporters vermessen, die durch Zugabe des Zelllysats in das vorgelegte Luciferase Assay Reagent II initiiert wird. Sofort danach wird durch Zufügen des Stop&Glo[®] Reagent in denselben Reaktionsansatz der erste Effekt gequencht und die Reaktion der Renilla Luciferase in Gang gesetzt (Abb.9.A). Dies ist möglich, da die Strukturen der beiden Luciferase Enzyme voneinander verschieden sind und die Enzyme unterschiedliche Substratanforderungen besitzen.

Die Firefly und auch die Renilla Luciferase fungieren direkt nach ihrer Translation als genetischer Reporter. Während der von der Firefly Luciferase katalysierten Reaktion wird unter Beteiligung von ATP, Magnesium und Sauerstoff das Beetle Luciferin zum Oxiluciferin oxidiert, Photonen werden emittiert, und es tritt eine Art Lichtblitz auf (s. Abb.9.A), der gemessen wird. Die Renilla Luciferase oxidiert unter Verbrauch von Sauerstoff das so genannte Coelenterat-Luciferin zum Coelenteramid und erzeugt auf diese Weise Lumineszenz.

Der Reaktionsablauf kann wie folgt zusammengefasst werden (Abb.9.B):

1. Zufügen von 20µl Zelllysats zum Luciferase Assay Reagent II, das in Luminometer Gefäßen zu je 100µl vorgelegt wurde. Durchmischen durch auf und ab Pipettieren.
2. Messen der Firefly Luciferase Aktivität.
3. Zugabe von 100µl Stop&Glo[®] Reagent. Durchmischen.
4. Messen der Renilla Luciferase Aktivität.
5. Das Luminometer wird so programmiert, dass es die Messwerte automatisch normalisiert (FFLuc gegen RLuc) und den Mittelwert jeder Dreierbestimmung samt Standardabweichung errechnet. Die Ergebnisse, ausgedrückt in relativen Lichteinheiten (Relative Light Units, RLU), werden anschließend grafisch dargestellt (215).

Abbildung 9

A.

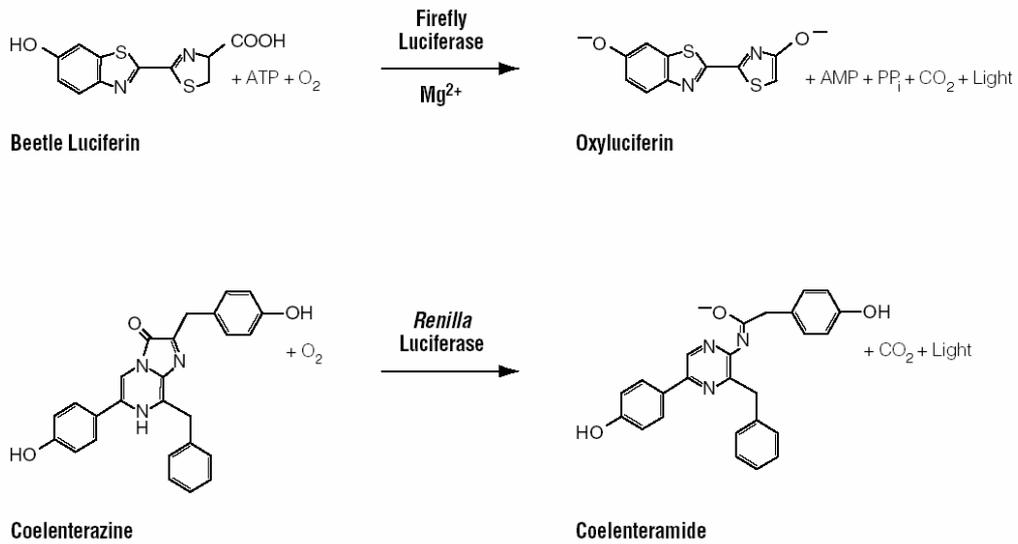


Abb. 9.A: Verlauf der Luciferasereaktion. Zuerst wird die Lumineszenz des Firefly Reporters vermessen (Oxyluciferin), die durch Zugabe des Zelllysats in das vorgelegte Luciferase Assay Reagent II (enthält Beetle Luciferin) initiiert wird. Sofort danach wird durch Zufügen des Stop&Glo[®] Reagent (enthält Coelenterazine) in denselben Reaktionsansatz der erste Effekt gequencht und die Reaktion der Renilla Luciferase in Gang gesetzt. Das durch die emittierte Licht dient der zweiten Messung. [2.6.2]

B.

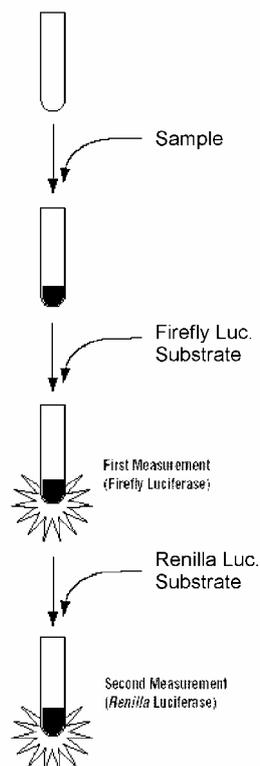


Abb. 9.B: Schematischer Versuchsablauf des Luciferase Assays. 20µl Zelllysat und 100µl Luciferase Assay Reagent II (das Firefly Substrat) werden im Luminometer Gefäß zusammen gebracht und durchmischt. Anschließend wird die Firefly Luciferase Aktivität gemessen. 100µl Stop&Glo® Reagent (das Renilla Substrat) werden hinzu gegeben und nach Durchmischen die Renilla Luciferase Aktivität vermessen. [2.6.2]

2.6.3 Überprüfung der Estrogenrezeptor-Expression in MCF-7 Zellen

2.6.3.1 Mittels RT-PCR

Die MCF-7 Zellen, Passage 160, wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in Standardmedium kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie unter Zusatz von 10^{-8} M E₂, bzw. in reinem Medium mit 10% cs-FBS in Doppelbestimmung für 24 Stunden behandelt. Die RNA-Isolierung, cDNA-Synthese und Durchführung der PCR erfolgt wie im obigen Abschnitt für die U-2 OS/ER Zelllinien beschrieben. Die Primersequenzen für ER α und ER β sind in Tabelle 2 B. aufgelistet, die PCR-Konditionen finden sich in Tabelle 3.

2.6.3.2 Mittels Realtime-RT-PCR

Die Behandlung der Zellkultur entspricht der für die RT-PCR, als Testsubstanzen wurden hier jedoch, ebenfalls in Doppelbestimmung, eingesetzt: 10^{-9} M EE; 10^{-7} M ICI; EE(10^{-9} M)+ICI(10^{-7} M); 0,1µg/ml 8-PN; 8-PN(0,1µg/ml)+ICI(10^{-7} M); 10µg/ml SAR; SAR(10µg/ml)+ICI(10^{-7} M) und reines Medium.

Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgten wie oben, die Durchführung der Realtime PCR wie im dortigen Abschnitt beschrieben.

2.7 Experimente im Ishikawa-Zellsystem

2.7.1 Alkalische Phosphatase in Ishikawa Zellen

Das Prinzip und auch die Durchführung der AP-Bestimmung in Ishikawa Zellen entspricht derjenigen für die hFOB/ER Zelllinien. Da die Ishikawa Zellen einfach zu kultivieren sind, schnell proliferieren und im Vergleich zu Osteoblasten eine kleinere Zellgröße haben, kann problemlos mit 96-Well-Mikrotiterplatten gearbeitet werden. Es werden 10.000 Zellen pro Well in Standardmedium ausplattiert und nach einem Tag für weitere 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Die Behandlung mit den Proben erfolgt in serumfreiem Medium.

Im Anhang befindet sich eine kurze Beschreibung zur Durchführung, welche die Modifikationen gegenüber dem Versuchsaufbau für die hFOB/ER deutlich macht (218;251).

2.7.2 Überprüfung der Estrogenrezeptor-Expression in Ishikawa Zellen mittels Realtime-RT-PCR

Die Ishikawa Zellen, Passage 62, wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in Standardmedium kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie unter Zusatz von 10^{-9} M EE, 10^{-7} M ICI, EE(10^{-9} M)+ICI(10^{-7} M), 10 μ g/ml Soph, Soph(10 μ g/ml)+ICI(10^{-7} M), 10 μ g/ml HE-1, HE-1(10 μ g/ml)+ICI(10^{-7} M) bzw. in reinem Medium mit 10% cs-FBS als Doppelbestimmung für 24 Stunden behandelt.

Die RNA-Isolierung und cDNA-Synthese erfolgten wie oben, die Durchführung der Realtime PCR wie im Abschnitt Realtime-RT-PCR beschrieben.

2.8 Realtime-RT-PCR in Fe33 Zellen

2.8.1 Die Realtime-RT-PCR

Der wesentliche Unterschied zwischen Realtime und klassischer RT-PCR besteht darin, dass im Verlauf der Realtime PCR nach jedem durchlaufenen Zyklus die entstandene Menge an Produkt quantifiziert wird. Dies erlaubt das genaue Verfolgen des Amplifikationsverlaufs, der in Form einer sigmoiden Kurve grafisch vom Gerät dargestellt wird. Eine exakte Quantifizierung der Unterschiede in den m-RNA Levels ist möglich. Vorteilhaft gegenüber normaler RT-PCR ist weiterhin, dass diese Methode sehr empfindlich ist, nur ungefähr die halbe Laufzeit beansprucht und dass Gele, wenn überhaupt, nur zur Produktkontrolle angefertigt werden müssen.

Die hier verwendete Realtime PCR-Maschine ist der Light Cycler von der Firma Roche (Mannheim). Die zur PCR notwendigen Reagenzien, im Wesentlichen eine Taq Polymerase und ein DNA-interkalierender Farbstoff (SYBR Green I), enthält ein auf den Light Cycler zugeschnittener Kit (s. Anhang). Es handelt sich um einen „Hot Start“ Master Mix.

Die Verwendung der „FastStart Taq Polymerase“, einer modifizierten Form der thermostabilen rekombinanten Taq-Polymerase, minimiert die Möglichkeit der Entstehung unspezifischer Amplifikationsprodukte, die das gewünschte Produkt verunreinigen. Bei Raumtemperatur ist sie inaktiv aufgrund hitzelabiler Schutzgruppen an einigen Aminosäureresten des Enzyms. Während einer Temperaturphase also, in der nicht-spezifische Primerbindung möglich wäre, findet keine Elongation statt. Bei hoher Temperatur werden die

Schutzgruppen abgespalten und so das Enzym aktiviert. Aus diesem Grund beginnt die Realtime PCR mit einem 10-minütigen 95°C heißen Abschnitt.

Der SYBR Green I Farbstoff ist spezifisch für doppelsträngige DNA. Bindet er an eine solche wird seine Fluoreszenz drastisch erhöht. Während jeder Phase der PCR, in der DNA synthetisiert wird, bindet SYBR Green I an die amplifizierten PCR-Produkte, die so aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden können (Abb.10).

Zur Erhöhung der Spezifität der Primerbindung kann dem Reaktionsgemisch Magnesiumchlorid in einer Endkonzentration von 1-5mM hinzugefügt werden.

Die Auswertung der Amplifikation der Realtime PCR wird kombiniert mit einer Schmelzkurven-Analyse („Melting Curve“). Auf diese Weise erhält man Sicherheit über die Identität und Reinheit des Produktes. Zusätzlich kann an dieser Stelle zur Überprüfung ein Gel angefertigt werden. Dort sollte ein Produkt eine saubere Bande liefern in einer seiner Größe entsprechenden Höhe aufweisen (Abb. 11). Die Schmelzkurve sollte aus einem sauberen Peak pro Produkt bestehen, der den definierten Schmelzpunkt des jeweiligen Produktes darstellt (Abb.12.A). Sind mehr als ein Peak vorhanden, deutet dies auf eine Verunreinigung des gewünschten Endproduktes hin, d.h. während der PCR ist nicht nur der durch die Primer begrenzte Bereich des Zielgens amplifiziert worden, sondern es sind beispielsweise auch Primerdimere entstanden. Die Spezifität lässt sich erhöhen durch eine Zugabe von bis zu 10% DMSO zum Reaktionsansatz (Promega Notes Number 65, 1998, S. 27; Abb.12.B). Durch DMSO werden die Basenpaar-Interaktionen geschwächt. Dies hat zur Folge, dass die Primer nur an die Sequenzen binden, zu denen sie die höchste Affinität aufweisen, somit wird die Spezifität der Primerbindung erhöht (252;253). Zugleich wird der Schmelzpunkt des Produktes erniedrigt, da die DNA-Stränge bei niedrigerer Temperatur voneinander getrennt werden (254).

Die Phasen der Realtime PCR während der Amplifikation entsprechen denen der klassischen PCR und bestehen aus Denaturierung, Annealing und DNA-Replikation (Abb. 10). Die Dauer einer jeden ist jedoch weitaus geringer, sie liegt in einem Bereich zwischen 2 und 15sec (im Vergleich dazu bei der klassischen PCR ca. 0,5-2 min). Je Replikation von 25 Basenpaaren sollte ungefähr eine Sekunde Zeit veranschlagt werden.

Vorweg geht dem Abschnitt Amplifikation eine 10-minütige Präinkubation bei 95°C, die wie oben erwähnt der Abspaltung der Schutzgruppen von der Taq-Polymerase dient. Nach erfolgter Amplifikation wird die Schmelzkurve erstellt. Hierzu wird ein Temperaturgradient von 95°C nach 65°C gefahren mit 1°C / 20sec. Als letztes kühlt die Maschine bei 40°C. Die Anzahl der Zyklen liegt konstant bei 50 Zyklen, die der Light Cycler durchläuft. Dies ist

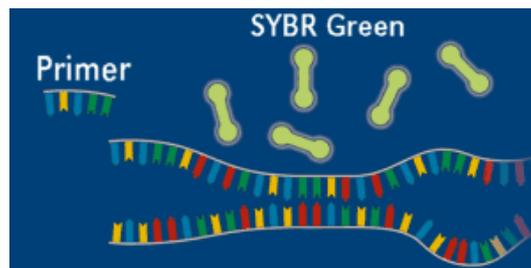
notwendig für die Interpretation der sigmoiden Kurven, die sich ergeben durch die Darstellung der gemessenen Fluoreszenz am Ende eines jeden Zyklus. Für jede Probe im Light Cycler wird nach jedem Lauf eine solche auf dem Bildschirm angezeigt.

Als Housekeeping-Gen dient das von der Firma Roche empfohlene Porphobilinogen-Deaminase-Gen (PBGD). Dies ist ein Gen, welches in verschiedenen Zelltypen konstitutiv und konstant exprimiert wird. Obwohl es sich bei den Fe33 Zellen um eine Rattenhepatomzelllinie handelt, können aufgrund einer hohen Sequenzhomologie die Primer für das humane PBGD-Gen verwendet werden.

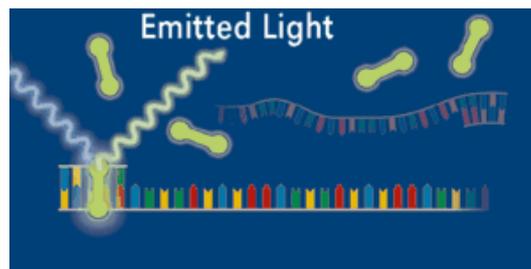
Beim Design von Primern für die Realtime PCR ist zu beachten, dass ihre Größe möglichst zwischen 150 und 200 Nukleotiden liegt und sie, wenn möglich, Exon-überspannt sind.

Abbildung 10

A.



B.



C.

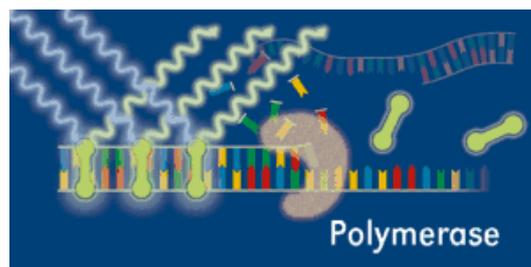


Abb. 10: Phasen der Realtime PCR.

Abb. 10.A: Denaturierung. Auftrennung des DNA-Doppelstranges bei 95°C. [2.6.3]

Abb. 10.B: Annealing. Andocken der Primer an die entsprechenden DNA-Abschnitte bei spezifischer Annealingtemperatur des jeweiligen Primers. Der SYBR Green I Farbstoff ist spezifisch für doppelsträngige DNA. Bindet er an eine solche wird seine Fluoreszenz drastisch erhöht. [2.6.3]

Abb. 10.C.: DNA Replikation. Während jeder Phase der PCR, in der DNA synthetisiert wird, bindet SYBR Green I an die amplifizierten PCR-Produkte, die so aufgrund ihrer Fluoreszenz detektiert werden können. [2.6.3]

Abbildung 11

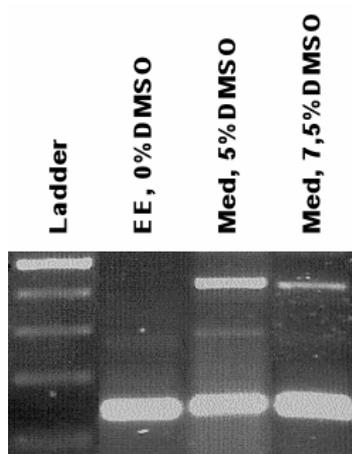
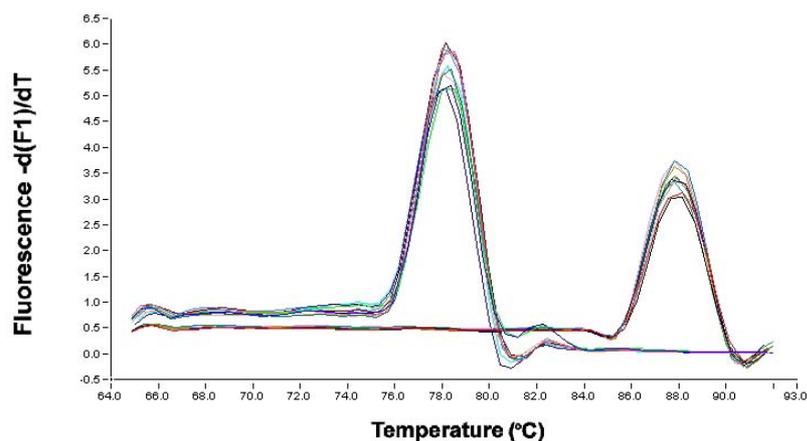


Abb. 11: Beispiel eines Gels zur Überprüfung der Identität und Reinheit von Realtime-PCR-Produkten.

Die Fe33 Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1µg/µl Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Die folgenden 24 Stunden wurde mit bzw. ohne Zusatz von 10⁻⁸M EE zum Medium (EE bzw. Med) weiter inkubiert. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2µl cDNA in der Realtime-PCR eingesetzt (Tab.5). Für die Amplifikation werden spezifische Primer eingesetzt, hier ist als Beispiel die des Calcium Binding Protein (9k) (CaBP9k)-Gens gezeigt (Tab. 4). Mit „Ladder“ ist die Sequenz unterschiedlicher Produktgrößen (in Basenpaaren) bezeichnet, sie dient als Kontrolle für die Produktidentität. Die Existenz einer, bzw. mehrerer Banden gibt Aufschluss über die Reinheit. Weiterhin ist gezeigt, dass Zusatz von DMSO die Spezifität der Primerbindung erhöht (s. a. Abb.12). [2.8.1]

Abbildung 12

A.



B.

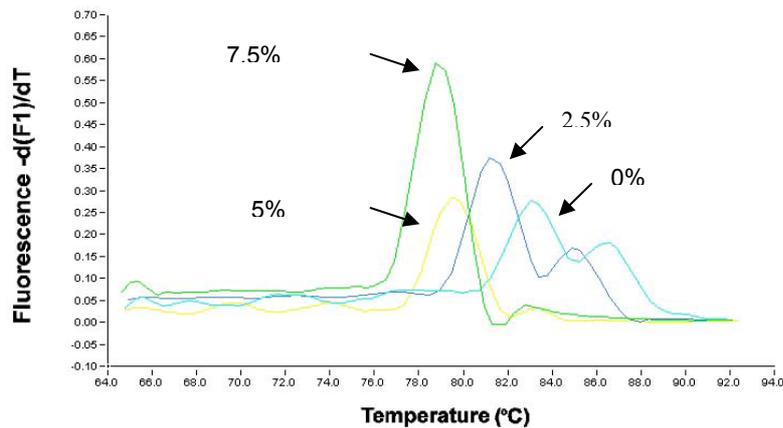


Abb. 12.A und B: Analyse der Schmelzkurve („Melting Curve“). Man erhält Sicherheit über die Identität und Reinheit des Produktes. Zusätzlich kann an dieser Stelle zur Überprüfung ein Gel angefertigt werden (Abb. 11).

Abb. 12.A: Schmelzkurve. Die Schmelzkurve sollte aus einem sauberen Peak pro Produkt bestehen, der den definierten Schmelzpunkt des jeweiligen Produktes darstellt. Sind mehr als ein Peak vorhanden, deutet dies auf eine Verunreinigung des gewünschten Endproduktes hin. [2.6.3]

Abb. 12.B: Schmelzkurve bei unterschiedlichen Mengen DMSO-Zusatz zum Reaktionsansatz. Sind mehr als ein Peak vorhanden, so kann die Spezifität durch eine Zugabe von bis zu 10% DMSO zum Reaktionsansatz erhöht werden. Durch DMSO werden die Basenpaar-Interaktionen geschwächt. Dies hat zur Folge, dass die Primer nur an die Sequenzen binden, zu denen sie die höchste Affinität aufweisen, somit wird die Spezifität der Primerbindung erhöht. Zugleich wird der Schmelzpunkt des Produktes erniedrigt, da die DNA-Stränge bei niedrigerer Temperatur denaturieren. [2.6.3]

2.8.2 Vorbereitung und Analyse der Realtime-RT-PCR

Die Fe33-Zellen, Passage 8, wurden mit Standardmedium in 6-well-Platten ausgesät und bei einem Konfluenzgrad von 60-70% für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium versehen. Die Behandlung mit den Testsubstanzen (0,1, 1,0 und 10,0 μ g/ml) und Kontrollen (10⁻⁸M, bzw. 10⁻⁷M EE und Medium) erfolgt in serumfreiem Medium für weitere 24 Stunden. Die Dauer des Behandlungszeitraumes von 24 Stunden zeigt sich in Bezug auf den AT-mRNA-Spiegel, der sich gegenüber kürzeren Behandlungszeiten beinahe verdoppelt (222), als richtig gewählt. Der CaBP9k-mRNA-Spiegel ist nach 24 Stunden sogar fünffach so hoch wie nach 5 Stunden (240). Die Konzentrationen der Proben sowie die Isolierung der RNA und die Synthese der cDNA entsprechen den Angaben für die U-2 OS/ER Zellen im Vorfeld der RT-PCR.

Zum Einsatz der cDNA als Template in der Realtime PCR muß diese eventuell verdünnt werden wie im Falle der Amplifikation von AT, was sich in einem gezackten, schlecht auswertbaren Kurvenverlauf zeigt.

Die detaillierte Beschreibung der Zusammensetzung des Master Mixes für die Realtime PCR findet sich im Anhang. Hier sei in Kürze die Durchführung erläutert:

Anstelle von PCR-Reaktionsgefäßen verwendet der Light Cycler Glaskapillaren von ca. 30µl Fassungsvermögen. Sie ermöglichen eine optimale Wärmeübertragung vom Innenraum des Gerätes in die Lösung. Diese Kapillaren werden mit 18µl Master Mix bestehend aus FastStart Taq-DNA-Polymerase, SYBR Green I Farbstoff, MgCl₂, Forward- und Reverse- Primer (Tabelle 4), Wasser und 2µl cDNA Template befüllt. Nach Zentrifugieren der Kapillaren erfolgt die PCR im Light Cycler, die Konditionen befinden sich in Tabelle 5. Es schließt sich die qualitative und quantitative Analyse der Ergebnisse an. Wie oben bereits erwähnt, dient zur qualitativen Auswertung die Schmelzkurve. Um völlige Sicherheit über die Identität eines Produktes (zum Beispiel bei einem sehr kleinen Nebenpeak wie in Abb.12.A zu sehen) und fehlende verfälschende Nebenprodukte zu erlangen, kann ein Gel entsprechend der klassischen RT-PCR angefertigt werden.

Die quantitative Analyse erfolgt mit Hilfe einer speziellen kommerziell erhältlichen Auswertungssoftware zur relativen Quantifizierung (Relative Quantification Program, Firma Roche). Für jedes Gen, das quantifiziert werden soll, und für das Housekeeping Gen ist eine Verdünnungsreihe einer jeweils gleich behandelten cDNA anzufertigen (zum Beispiel die der Mediumkontrolle) und diese im Light Cycler zu amplifizieren. Es wird pro Gen ein so genannter „Coefficient File“ erstellt, der eine Validierung des Systems für das jeweilige Gen darstellt. (Die Effizienz der Amplifikation des Zielgens wird durch das Rel Quant Programm in ein mathematisches Verhältnis zu der des Housekeeping Gens gesetzt). Jede Amplifikation des entsprechenden Gens wird für die quantitative Analyse auf seinen „Coefficient File“ bezogen. Als Parameter für die Quantifizierung dient der „Crossing Point“ (CP). Dieser wird von der Light Cycler Software für jede sigmoide Kurve, also jeden Amplifikationsverlauf, errechnet. Mathematisch ist der „Crossing Point“ der Abszissenabschnitt, der sich ergibt, wenn man die Tangente durch den Wendepunkt im linearen Bereich der sigmoiden Kurve auf die x-Achse hinunter verlängert. Die Einheit der Abszisse ist die Anzahl der Zyklen. Je höher der Zahlenwert des CP, desto weniger Template ist enthalten. Die nötige Anzahl an Zyklen bis die Amplifikation in einen linearen Bereich gelangt, das heißt, bis die Menge des Produktes exponentiell ansteigt, ist um so größer, je weniger Template vorhanden ist. Mit anderen Worten: Ein später Anstieg der sigmoiden Kurve im Koordinatensystem und damit ein höherer CP-Wert ist Ausdruck einer geringen Menge Template (Abb.13.A).

Das RelQuant[®]-Programm setzt vereinfacht ausgedrückt den Logarithmus der Konzentration ins Verhältnis zum CP, was im Idealfall zu einer Geraden führt (Abb.13.B).

Eine weitere Funktion, die das RelQuant[®] Programm bietet, ist eine automatische Effizienz-Korrektur der jeweiligen Quantifizierung. Dies ist von Bedeutung, da sich die einzelnen PCR-Läufe, auch desselben Gens, nicht in ihrer Effizienz gleichen. Die Werte werden normalisiert auf einen Kalibrator, den man bei jeder PCR mitlaufen lässt. Wie alle Proben wird er in Doppelbestimmung eingesetzt. Er besteht aus einer Probe, die zum einen auf das untersuchte Gen hin amplifiziert wird (Kapillaren an den Positionen 1 und 2) und zum anderen auf das Housekeeping-Gen PBGD hin (Kapillaren an den Positionen 3 und 4).

Abbildung 13

A.

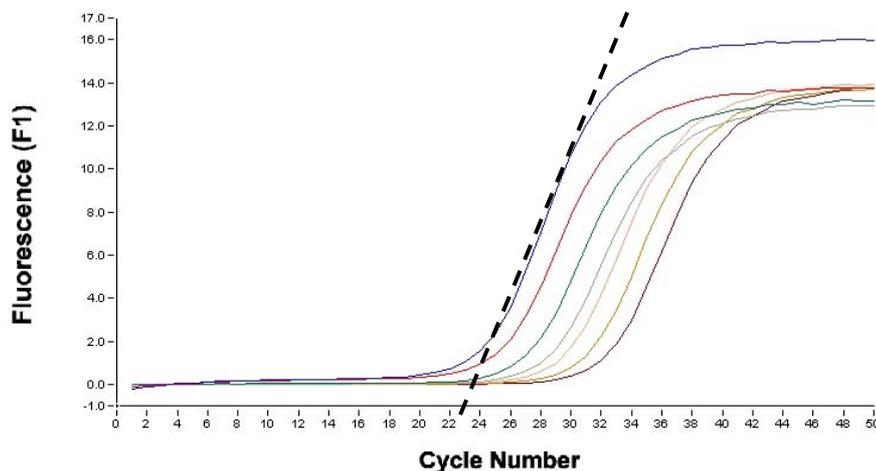


Abb. 13.A: Verdünnungsreihe von CaBP. Dargestellt sind die Verdünnungen einer aus Fe33 Zellen isolierten cDNA, in der die CaBP9k-Genexpression untersucht wurde. Eine Verdünnungsreihe ist Grundlage der Quantifizierung des jeweiligen Gens. Die abgebildeten Kurven entsprechen den Verdünnungen (die linearen Kurvenbereiche von links nach rechts betrachtet): „1:1“ (cDNA pur), 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100. Die gestrichelte Linie zeigt die Tangente durch den Wendepunkt einer Kurve. Der Schnittpunkt mit der Abszisse ist der „Crossing Point“ (CP). Die Einheit der Abszisse ist die Anzahl an Zyklen. Je höher der Zahlenwert des CP, desto weniger Template ist enthalten. [2.6.3]

B.



Abb. 13.B: RelQuant® Auswertung. Beispiel einer Regressionsgeraden durch ermittelte Datenpunkte des RelQuant® Programms. Auf der Ordinate ist logarithmisch die Konzentration aufgetragen, auf der Abszisse der Crossing Point (CP). Dieser dient als Parameter für die Quantifizierung. [2.6.3]

Tabelle 4

Gene	Primer Sequence
rAT	For 5'- CCTCGCTCTCTGGACTTATC -3' Rev 5'- CAGACACTGAGGTGCTGTTG -3'
rCaBP	For 5'- CTCTGGCAGCACTCACTGAC -3' Rev 5'- CTTGGACAGCTGGTTTGGAT -3'
hERα	For 5'- CCACCAACCAGTGCACCATT - 3' Rev 5'- GGTCTTTTCGTATCCCACCTTTC -3'
hERβ	For 5'- AGAGTCCCTGGTGTGAAGCAAG -3' Rev 5'- GACAGCGCAGAAGTGAGCATC -3'
hPBGD	For 5'- CCTGAAACTCTGCTTCGCTG -3' Rev 5'- CTGGACCATCTTCTTGCTGAAC -3'

Tab. 4: Primersequenzen für die Realtime-PCR. [2.8.2]

Tabelle 5

Gen	Denaturierung		Annealing		Extension		Anmerkungen
	(°C)	(sec)	(°C)	(sec)	(°C)	(sec)	
CaBP	95	30	58	2	72	15	Proben unverdünnt; 5% DMSO
rAT	95	5	56	3	72	15	Proben 1:10 verdünnt
hERα	95	5	56	3	72	15	Proben unverdünnt
hERβ	95	5	56	3	72	15	Proben unverdünnt; 7,5% DMSO
hPBGD	95	5	56	3	72	15	Proben unverdünnt

Tab. 5: Realtime-PCR Konditionen. Jeder PCR-Lauf beginnt mit einem „Hot Start“ bei 95°C für 10min.

Am Schluss des PCR-Laufes wird die Schmelzkurve erstellt: Es läuft ein Temperaturprogramm beginnend bei 95°C auf 65°C, von wo aus die Temperatur mit 0,1°C/sec wieder auf 95°C gebracht wird. Danach kühlt der Light Cycler bei 40°C.

3. Ergebnisse

In dieser Arbeit wird die estrogenen Potenz einiger pflanzlicher Extrakte und isolierter Einzelstoffe aus Pflanzen analysiert. Um die Beschreibung der Ergebnisse übersichtlich zu gestalten, teile ich die Proben in zwei große Gruppen ein. In die eine Gruppe gehören die Extrakte und Inhaltsstoffe aus Hopfen, es handelt sich um HE-1 und HE-2 – zwei unterschiedlich hergestellte Hopfenextrakte – und um 8-PN, 6-PN, XH, und IXH – vier isolierte Bestandteile daraus. Die andere Gruppe besteht aus den getesteten Pflanzenextrakten Soph, SAR, GLY, PHA und für einige Untersuchungen RHA, SOY und CIM. Rhaponticin wurde zunächst mit untersucht, zeigte aber in den Knochenmodellen lediglich eine schwache, in MCF-7 Zellen dagegen eine ziemlich stark proliferative Wirkung, so dass es aus weiteren Untersuchungen ausgeschlossen wurde. Die Extrakte SOY und CIM wurden im Verlauf der Arbeit hinzu gezogen, um einerseits die gefundenen Wirkungen der Proben aus Pflanzen, für die noch keine oder kaum Estrogenität beschrieben worden ist, ins Verhältnis zu setzen zu bekannten Wirkungen von Soja und Traubensilberkerze, und andererseits um diese häufig untersuchten Extrakte in Modellen zu testen, in denen sie noch nicht untersucht worden sind. Die Konzentrationen 0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml, in denen die Proben in der Regel in den Zellkulturassays eingesetzt werden, entsprechen für die Flavonoidstrukturen ungefähr einer Molarität von $0,5 \times 10^{-6} \text{M}$ – $0,5 \times 10^{-4} \text{M}$. Die zur Behandlung eingesetzte E_2 - oder EE-Konzentration 10^{-8}M (entspricht 2,7ng/ml). Damit werden die potentiellen Phytoestrogene in 10^2 – 10^4 -facher Konzentration eingesetzt, was den bisherigen Ergebnissen hinsichtlich vergleichbarer Wirkungen von E_2 oder anderen synthetischen Estrogenen entspricht und auch Unterschieden in der Rezeptor-Bindungsaffinität Rechnung trägt (68;131).

3.1 Der Rezeptor-Bindungsassay - Untersuchung der differentiellen Affinität der pflanzlichen Proben zu den Estrogenrezeptoren

Der Rezeptor-Bindungsassay wurde durchgeführt, um die differentiellen Affinitäten der Phytoestrogene auf die beiden ER-Subtypen zu untersuchen. (Die Messung der Bindung des radioaktiv markierten E_2 im Gleichgewichtszustand des Systems in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen des Phytoestrogens erlaubt die Interpretation der Affinität des jeweiligen Kompetitors zum ER.) Zum Ausschluss zellulär bedingter Variablen, wie beispielsweise Interaktionen mit unterschiedlichen Cofaktoren, die in der Lage sind den ER zu binden und dessen Konformation zu ändern, wird in einem zellfreien System unter

Anwendung rekombinanter humaner Estrogenrezeptoren gearbeitet. Gleichzeitig wird so der Einfluss möglicher Metabolite der Phytoestrogene umgangen.

Es ist jedoch anzumerken, dass dieser Assay nicht zwischen ER-Agonisten und ER-Antagonisten unterscheidet, er gibt lediglich Aufschluss über die Affinität einer Substanz zum Rezeptor (255). Zur Überprüfung der Modulation der Funktionalität des ER als Folge der Bindung eines Liganden (der Probe) an den Rezeptor, wird ein Transaktivierungsassay durchgeführt.

Es ist möglich ein falsch negatives Ergebnis zu erhalten, wenn es metabolischer Aktivierung einer Verbindung bedarf, bevor sie eine Rezeptoraffinität aufweist, oder falls sie im Reaktionsgemisch keine vollständige Löslichkeit aufweist. Tensidartige Substanzen, wie beispielsweise in der Pflanzenwelt weit verbreitete Saponine, können den Rezeptor „umhüllen“. Vorstellbar sind auch denaturierende Effekte enthaltener Stoffe (255). Beides würde ebenfalls zu falsch negativen Ergebnissen führen.

Der Parameter, mit dem die Bindungsaffinität zu einem Rezeptor ausgedrückt wird, ist die IC_{50} . Es handelt sich hierbei um die Konzentration einer Probe, die benötigt wird, um die am ER spezifisch gebundene Menge 3H -Estradiol um 50% zu reduzieren. Je größer die benötigte Konzentration der Probe, desto geringer ist ihre Affinität zum Rezeptor (Tab. 6.A). Der Vergleich der IC_{50} -Werte der Proben mit denen von E_2 , die hier in-vitro ermittelt werden, lässt sich als Indiz interpretieren für die Fähigkeit der Proben, die Funktion der Estrogenrezeptoren in-vivo zu modulieren (255).

Daraus lassen sich zwei weitere Parameter ableiten:

1) Der Quotient aus $IC_{50}(\text{Probe}, ER\alpha)$ und $IC_{50}(E_2, ER\alpha)$ beschreibt die relative Potenz eines Phytoestrogens gegenüber dem endogenen Liganden E_2 bezüglich der Bindungsaffinität (für $ER\beta$ entsprechend). Der Verdrängung durch E_2 wird der Wert 1 zugeordnet, die Werte der Phytoestrogene liegen meist ca. 3 Zehnerpotenzen höher. Das bedeutet, dass die Bindungsaffinität der Phytoestrogene zu beiden ER-Subtypen um dieses Maß geringer ist im Vergleich zu E_2 . Je größer ein solcher Zahlenwert ist, desto geringer ist die Affinität der entsprechenden Probe zum ER (Tab. 6.B).

2) Bildet man den Quotienten aus den IC_{50} -Werten einer Probe ($IC_{50(ER\alpha)}/IC_{50(ER\beta)}$), so erhält man die ER-Subtyp spezifische Affinität dieser Probe. Ist der Quotient <1 , d.h. der Wert im Zähler kleiner als der im Nenner, hat die Probe eine erhöhte Affinität zu $ER\alpha$ gegenüber $ER\beta$. Ist der Quotient >1 , so liegt eine erhöhte Affinität zugunsten $ER\beta$ vor (Tab. 6.C).

Eine definierte Menge Rezeptor (ER α , bzw. ER β) wird 18 Stunden bei 4°C mit radioaktiv markiertem Estradiol ($^3\text{H-E}_2$) in Anwesenheit steigender Konzentrationen der Testverbindungen, bzw. einem Überschuss an DES inkubiert. Als potentes synthetisches Estrogen bindet DES mit gleicher relativer Affinität an die beiden Rezeptorproteine (68). Die Menge an $^3\text{H-E}_2$, die nicht durch DES verdrängt werden kann, bezeichnet man als unspezifische Bindung. Mittels Extraktion mit HAP wird das noch am ER gebundene $^3\text{H-E}_2$ isoliert und nach Aufnahme in Ethanol am Szintillationszähler quantifiziert.

Zur grafischen Auswertung mittels einer Verdrängungskurve (s. Methoden) wird der zugehörige Zahlenwert der unspezifischen Bindung (in CPM) von allen anderen Messwerten abgezogen. Anschließend erfolgt eine Normalisierung gegen den korrigierten Lösungsmittelwert (entspricht der Konzentration 0,0 $\mu\text{g/ml}$ des Phytoestrogens) und die Umrechnung in die prozentuale Verdrängung des $^3\text{H-E}_2$ vom jeweiligen ER-Subtyp. Im Idealfall stellt der Graph eine steigende sigmoide Kurve dar. Eine zweite Darstellung zeigt für jede getestete Probe ein Säulendiagramm, wobei auf der Ordinate die Mittelwerte der drei CPM-Messungen samt Standardabweichung aufgetragen sind und auf der Abszisse die Konzentrationen, in denen die Probe vermessen wurde, sowie DES; die Abstände sind vereinheitlicht.

Estradiol zeigt am ER α eine IC $_{50}$ von 0,31ng/ml (das entspricht ungefähr einer Molarität von 1nM), am ER β von 0,48ng/ml (Abb.14). Der aus dem Hopfen isolierte Inhaltsstoff 8-PN steht dem E $_2$ nur wenig nach. Seine IC $_{50}$ -Werte liegen in derselben Größenordnung wie die des E $_2$. Die IC $_{50}$ -Werte der übrigen pflanzlichen Verbindungen, die hier getestet wurden, liegen ca. 10 3 -fach darüber (Tab. 6.A).

Wie E $_2$ zeigt auch 8-PN eine Präferenz in der Affinität zu ER α , die zugehörige IC $_{50}$ beträgt 1,53ng/ml, diejenige für 1,88ng/ml ER β ng/ml (Abb.15). Die Quotienten der Rezeptorspezifischen Affinität ER α / ER β sind 0,65 für E $_2$ und 0,81 für 8-PN (Tab. 6.C). Eine erhöhte Affinität zu ER β zeigen 6-PN, XH und IXH in absteigender Reihenfolge mit 3,4-, 2,7- und 1,9-fachem Überwiegen gegenüber ER α . Die Bindungsaffinität von 6-PN zu ER α ist mit einer IC $_{50}$ =1,42 $\mu\text{g/ml}$ ca. 10 3 -fach geringer als die des 8-PN, für ER β beträgt sie jedoch nur 0,42 $\mu\text{g/ml}$ (Abb.16). Der Unterschied zu 8-PN am ER β verringert sich auf 0,25 x10 3 . Auch XH und IXH weisen beinahe gleiche IC $_{50}$ -Werte am ER α auf, und zwar von 1,94 $\mu\text{g/ml}$ und 2,0 $\mu\text{g/ml}$. In Bezug auf ER β hat XH mit 0,73 $\mu\text{g/ml}$ eine etwas stärkere Affinität als IXH mit IC $_{50}$ =1,04 $\mu\text{g/ml}$ (Abb. 17 und 18).

Im Gegensatz zu den hohen in diesem Assay festgestellten Bindungsaffinitäten der Einzelsubstanzen zeigen die beiden Hopfenextrakte HE-1 und HE-2 keine nachweisbaren Affinitäten zu einem der ER-Subtypen. Im Falle des HE-1 lässt sich die Verdrängungskurve für ER α grafisch extrapolieren und ein IC-Wert von mehr als 2,0 μ g/ml vermuten (Abb.19 und 20). Diese beiden Extrakte unterscheiden durch das Lösungsmittel, in dem sie vorliegen (DMSO), von den isolierten Hopfeninhaltsstoffen, die in Ethanol gelöst worden sind.

Von den übrigen Extrakten ist der Extrakt aus *Glycyrrhiza glabra* derjenige mit der höchsten Affinität zu ER α (IC₅₀= 0,72 μ g/ml), der dem Wert für ER β (IC₅₀= 0,72 μ g/ml) entspricht (Abb.21). Seine relative Potenz gegenüber E₂ ist dabei jedoch um das mehr als 10³-Fache geringer (Tab. 6.B). Interessanterweise zeigt GLY eine zu beiden Rezeptorsubtypen gleich starke Affinität auf. Etwas schwächer in seiner Bindungsaffinität ist der Extrakt aus *Sophora japonica* (Abb. 22). Soph weist eine Präferenz für ER α gegenüber ER β auf, und zwar mit dem Faktor 0,76 (Tab. 6.C). Die ermittelten IC₅₀-Werte für Soph betragen 1,27 μ g/ml für ER α und 1,69 μ g/ml für ER β .

Ein interessantes Profil liefert auch SAR. Während der Extrakt aus *Sarothamnus scoparius* zu ER α eine Affinität von IC₅₀=0,72 μ g/ml besitzt, ist seine Bindungsaffinität zu ER β durch eine IC₅₀ von nur 0,46 μ g/ml gekennzeichnet (Abb.23). Damit weist SAR eine deutliche ER β -Präferenz auf. Die relative Potenz in Bezug auf ER β ist ca. 0,95x10³-fach geringer gegenüber der von E₂.

Die drei Extrakte PHA, SOY und CIM sind in DMSO gelöste Proben. Aus den Verdrängungskurven von SOY geht hervor, dass der Sojaextrakt keine Affinität zu ER α aufweist, der IC₅₀-Wert für ER β liegt oberhalb des Messbereiches. Der die Verdrängung durch SOY an ER β darstellende Graph zeigt einen markanten Anstieg ab der Konzentration 10 μ g/ml, so dass auf eine über 2,0 μ g/ml liegende IC₅₀ geschlossen werden kann (Abb.24). Ähnlich verhält es sich bei PHA für ER β . Eine Extrapolation der Verdrängungskurven für ER β unter Beibehaltung der Steigung zwischen den Abszissenabschnitten 600ng/ml und 2000ng/ml würde in beiden Fällen einen IC₅₀-Wert von ca. 3,5-4,0 μ g/ml liefern. Die Messwerte für PHA an ER α sind nicht auswertbar (Abb.25). Keinerlei Potenz in diesem System zeigt der Extrakt aus *Cimicifuga racemosa*. Über eine Bindungsaffinität zu ER α lässt sich keine Aussage machen, für ER β ist sie nicht vorhanden (Abb.26).

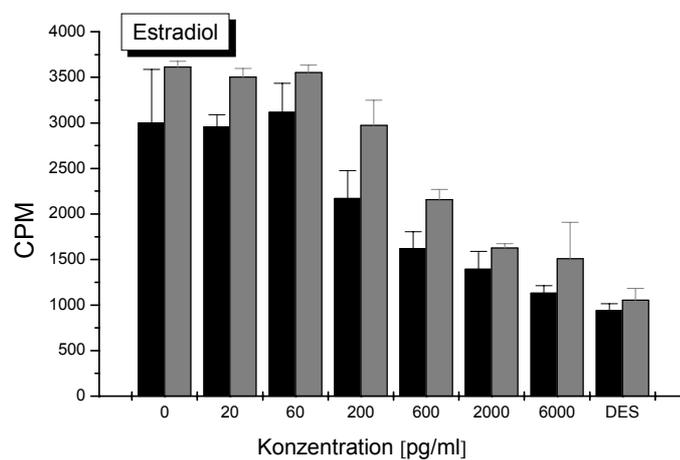
Die relativen Potenzen der Proben gegenüber Estradiol liegen in folgenden Größenordnungen: für die isolierten Substanzen aus dem Hopfen zwischen den Faktoren 3,9 (8-PN an ER β) und 6,5x10³ (IXH an ER α), für SAR und GLY in Bezug auf ER β bei 0,95x10³ und 1,5x10³, für

ER α sind sie identisch bei $2,3 \times 10^3$. Soph ist bezüglich beider ER-Subtypen etwas weniger potent mit $4,1 \times 10^3$ und $3,5 \times 10^3$ für ER α , bzw. ER β .

Zusammenfassend ist auffällig, dass die in DMSO und nicht in Ethanol gelösten Proben entweder keine, eine kaum nachweisbare (PHA und SOY für ER β) oder nicht auswertbare Bindungsaffinitäten aufweisen. Die höchsten Bindungsaffinitäten weist 8-PN auf, gefolgt von den Hopfeninhaltsstoffen an ER β und den Extrakten SAR und GLY.

Abbildung 14

A.



B.

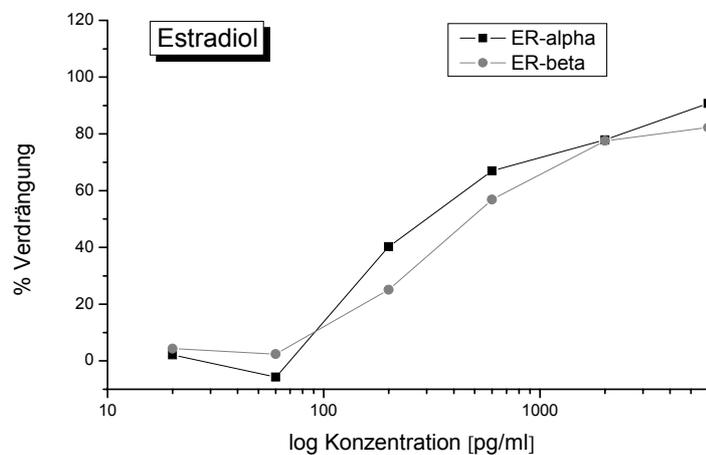
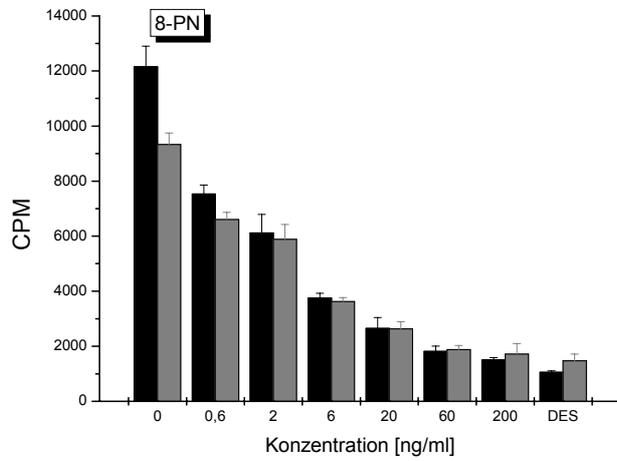


Abbildung 15

A.



B.

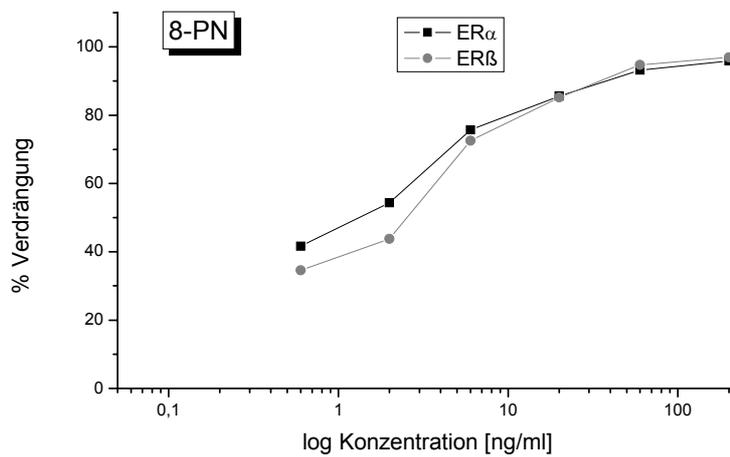
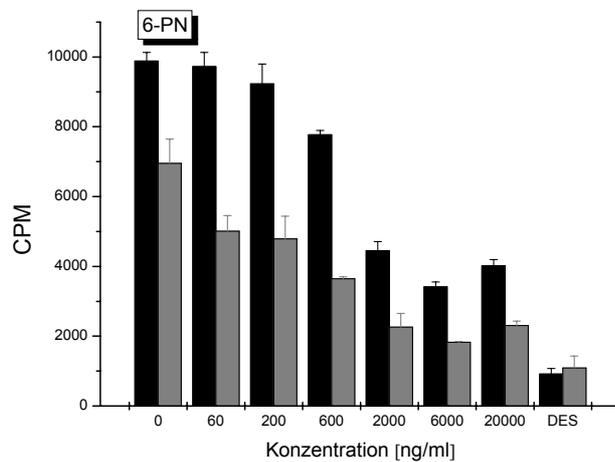


Abbildung 16

A.



B.

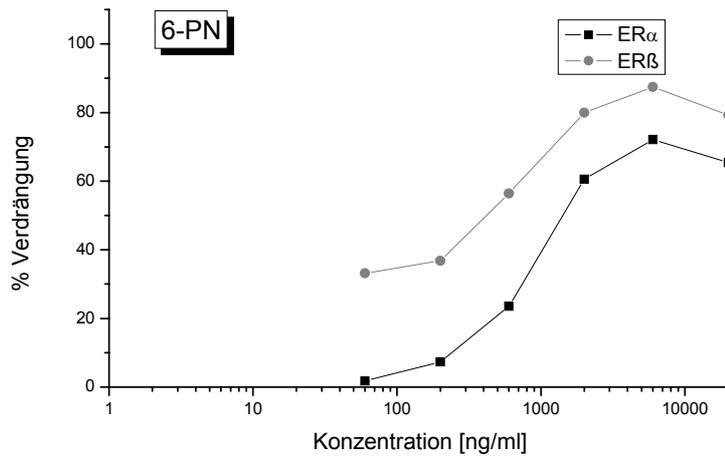
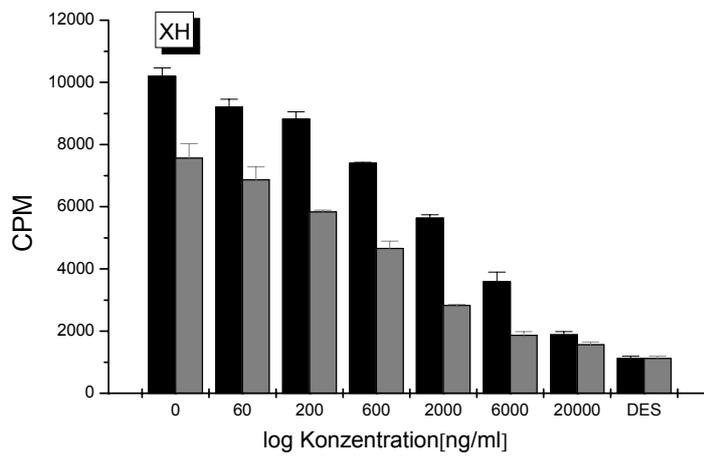


Abbildung 17

A.



B.

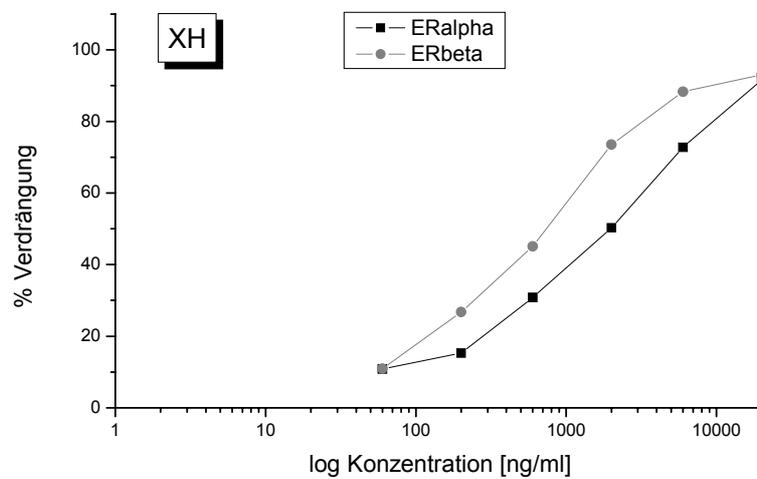
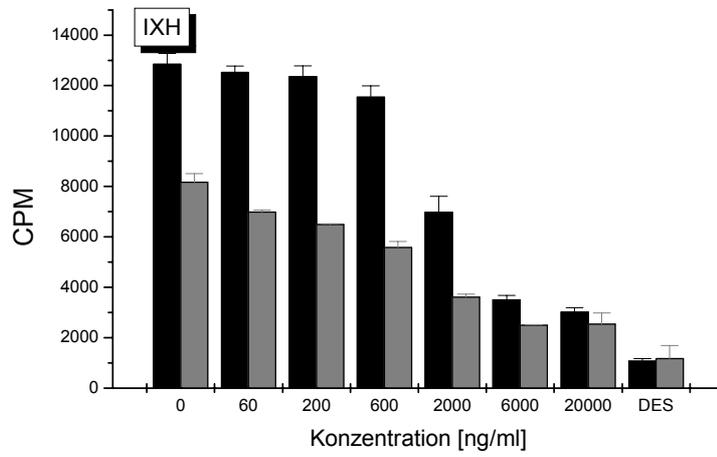


Abbildung 18

A.



B.

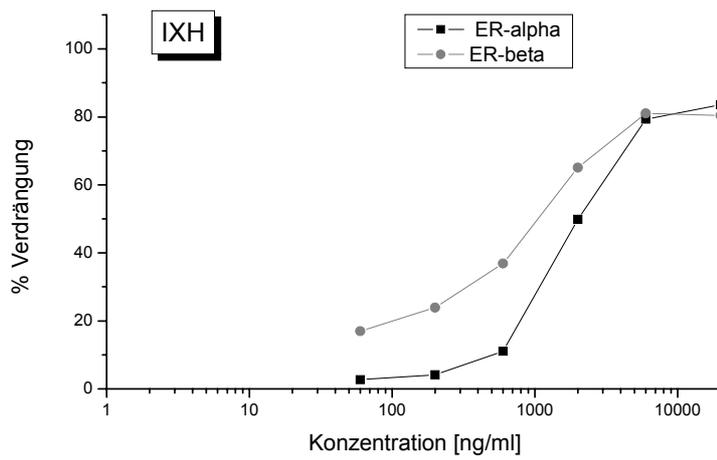
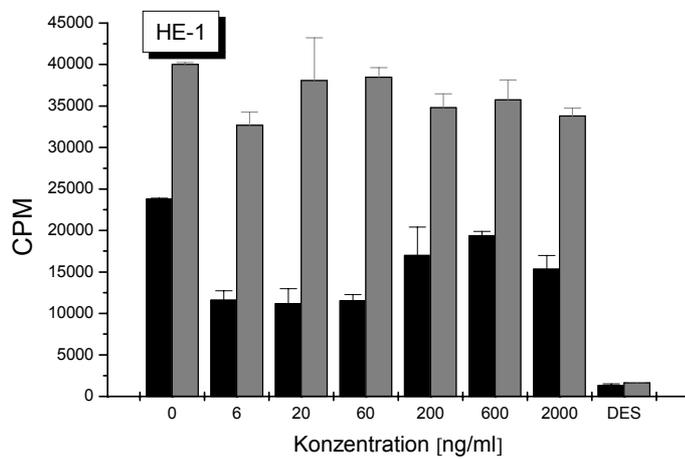


Abbildung 19

A.



B.

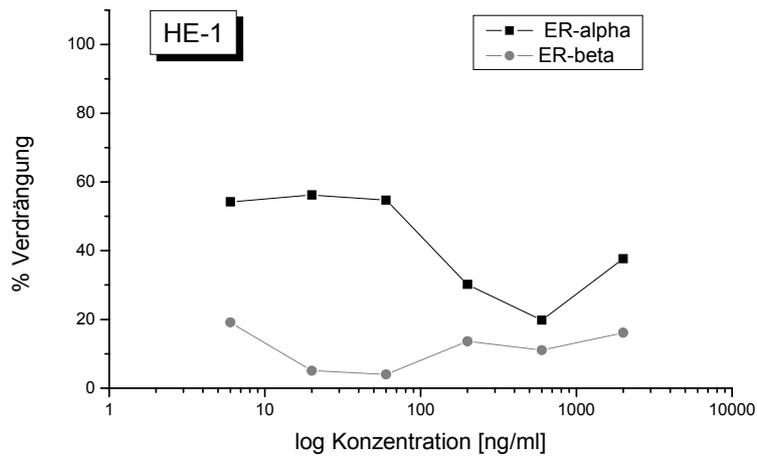
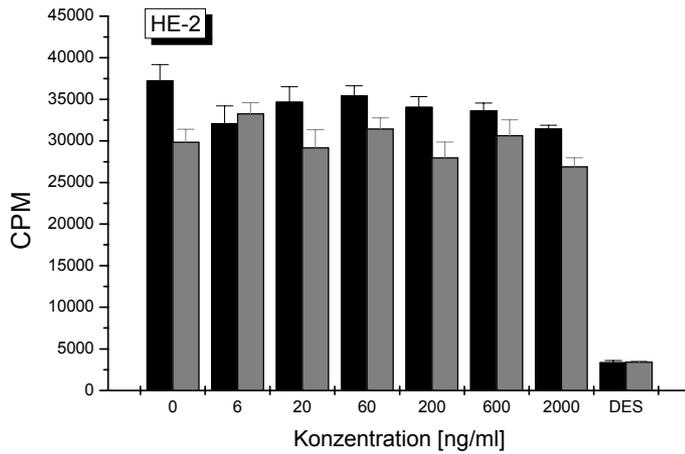


Abbildung 20

A.



B.

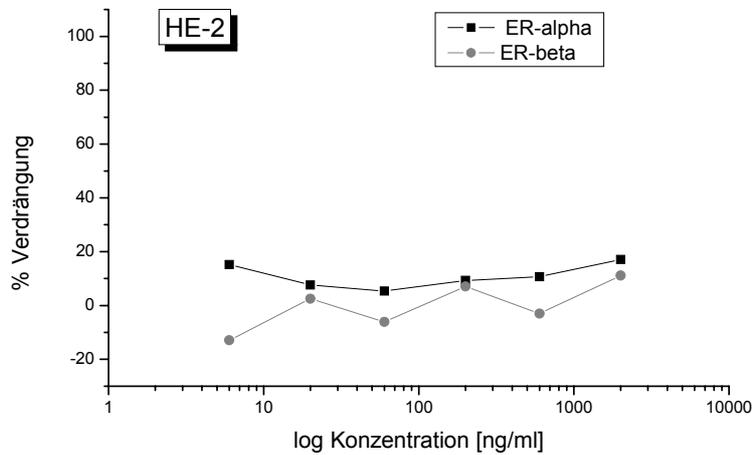
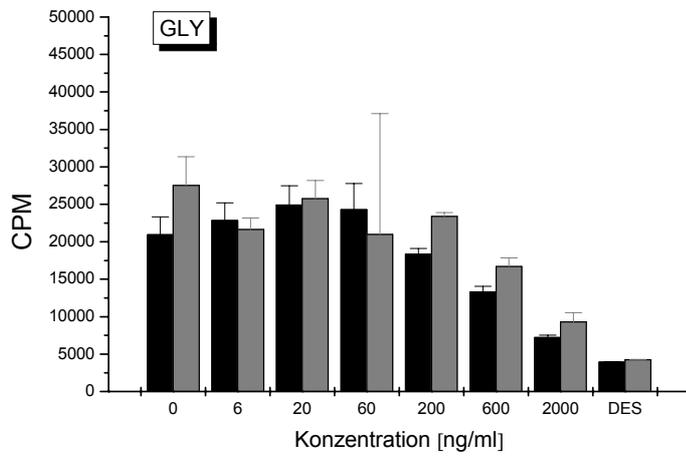


Abbildung 21

A.



B.

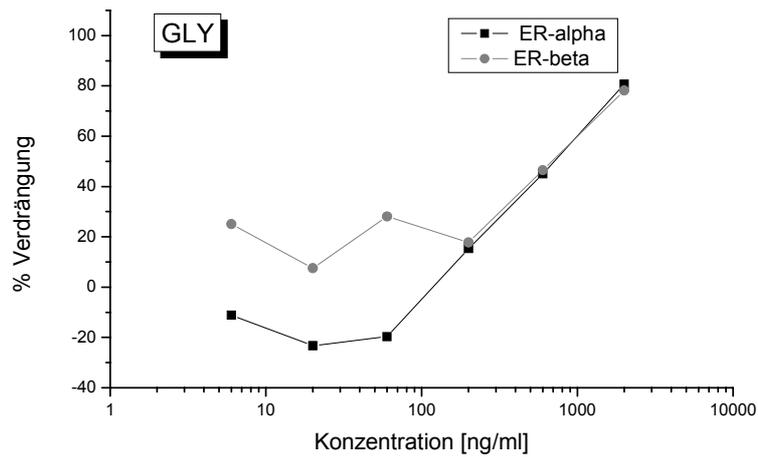
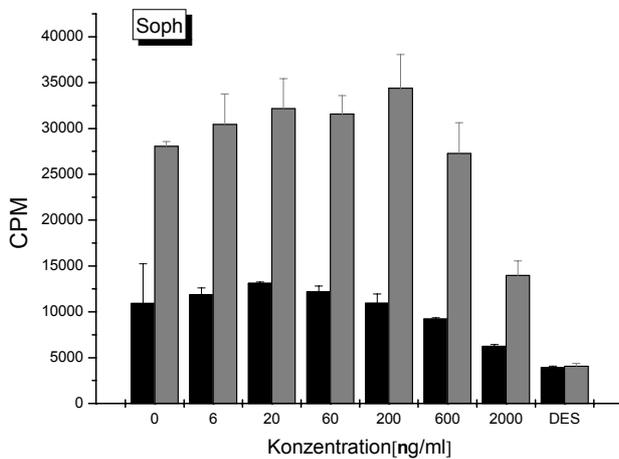


Abbildung 22

A.



B.

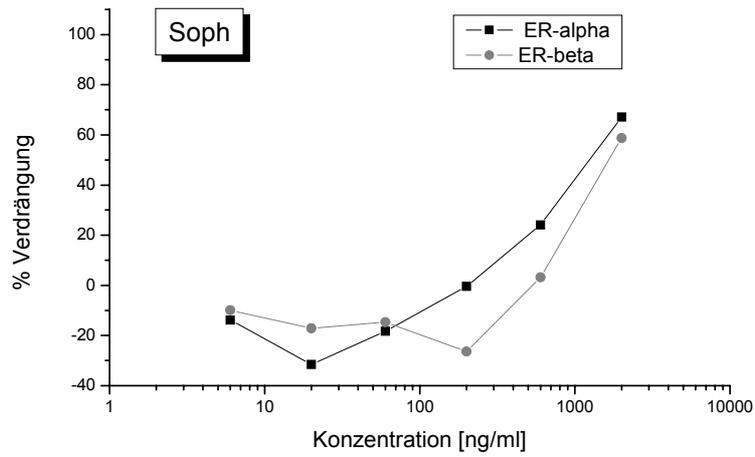
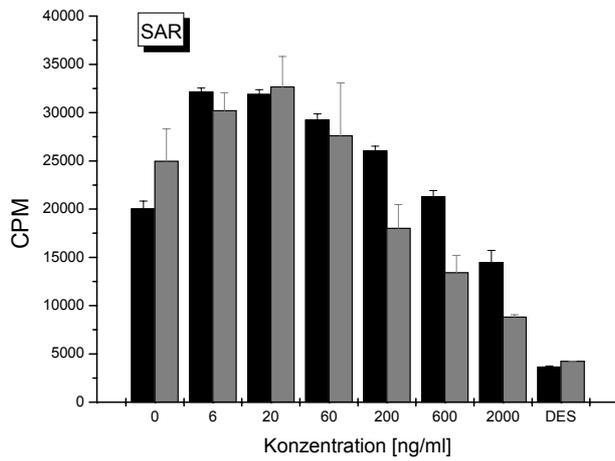


Abbildung 23

A.



B.

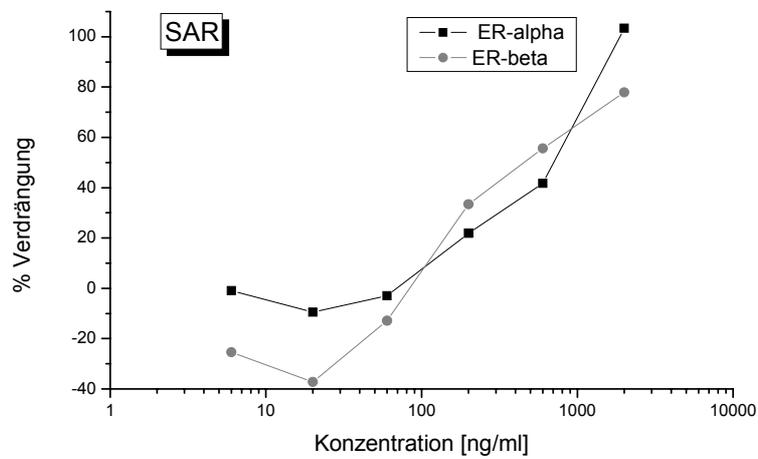
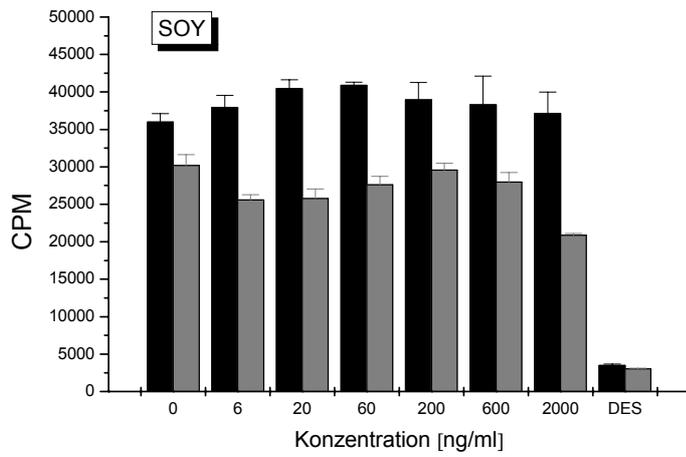


Abbildung 24

A.



B.

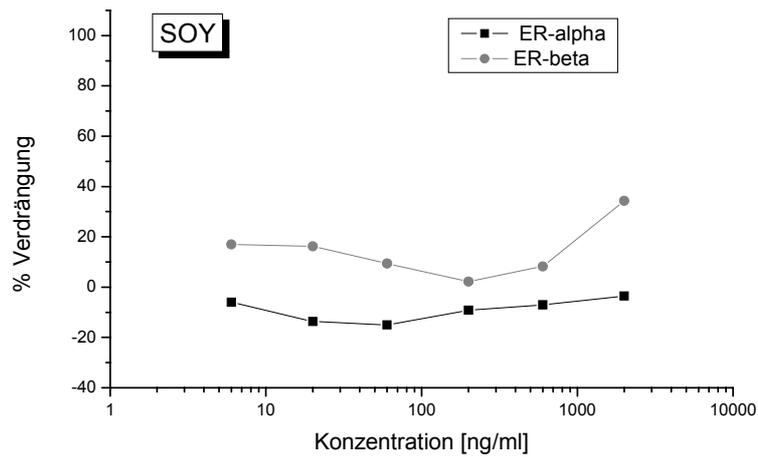
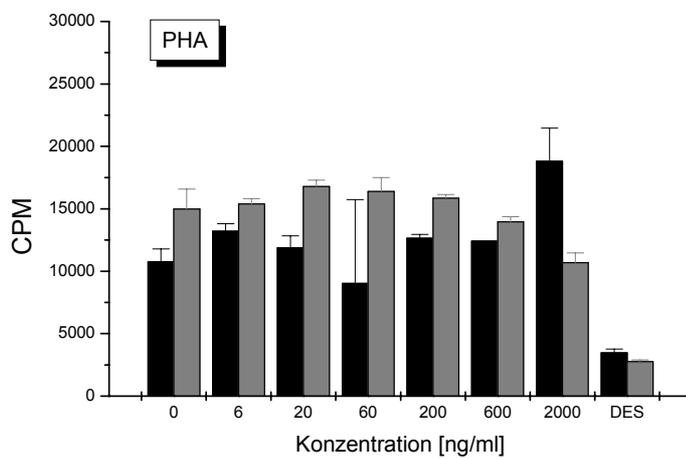


Abbildung 25

A.



B.

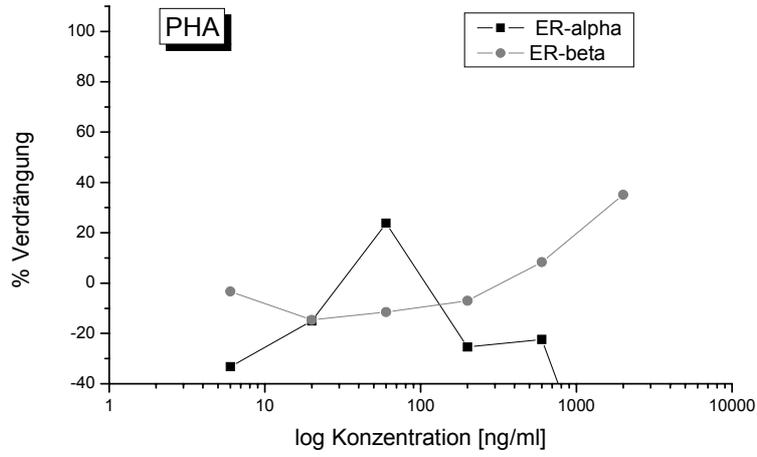
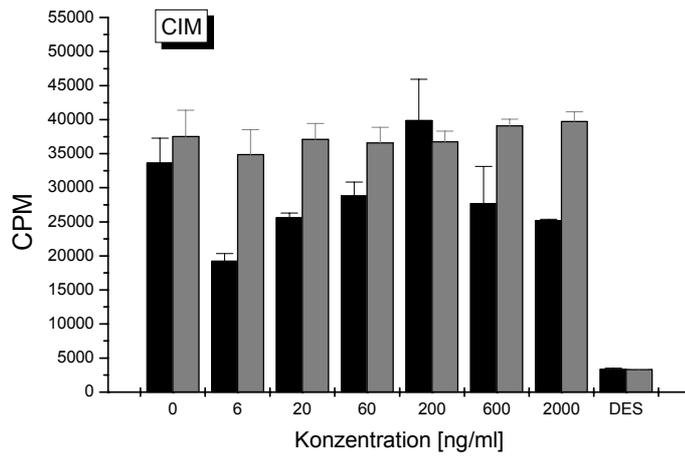


Abbildung 26

A.



B.

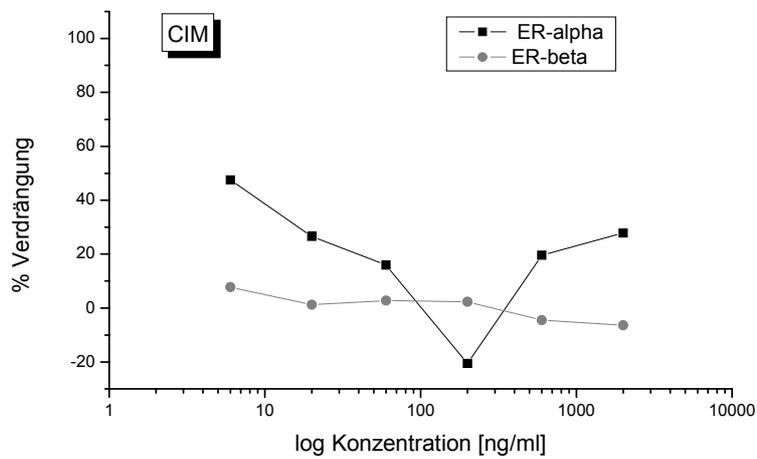


Abb. 14-26: Kompetitive Verdrängung von ³H-Estradiol von ER α und ER β durch Phytoestrogene. Es handelt sich um einen zellfreien Assay mit humanen rekombinanten Estrogenrezeptoren (ER). Der jeweilige ER wird mit der Probe in den angegebenen Konzentrationen, bzw. der Positivkontrolle (1 μ M DES) oder Negativkontrolle (LM) sowie ³H-E₂ (1,2pM) 18 Stunden lang inkubiert. Anschließend wird der Überschuss an ³H-E₂ Hydroxylapatit gebunden und nach mehreren Waschungen der verbliebene Rest gebundenen ³H-E₂ am ER im Szintillationszähler vermessen. Je Probe wurde eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die **Abbildungen A** zeigen die gemessene **Radioaktivität (in CPM) des am ER verbliebenen ³H-E₂** in Relation zu den Konzentrationen der Probe; schwarze Säulen für ER α , graue Säulen für ER β . Je höher die Affinität einer Probe zu einem ER ist, desto mehr ³H-E₂ verdrängt sie aus seiner Bindung und desto geringer ist der Messwert im Szintillationszähler. In den **Abbildungen B** ist die prozentuale **Verdrängung (% Verdrängung) des ³H-E₂ durch die Probe** an ER α (!) und ER β (.) dargestellt. Anhand dieser Graphen wird die IC₅₀ einer jeden Probe ermittelt. Die IC₅₀ ist die Konzentration einer Probe, die erforderlich ist, um 50% des ³H-E₂ aus seiner Rezeptorbindung zu verdrängen. Die Abszisse ist logarithmisch unterteilt. [3.1.1]

Tabelle 6

A.

Probe	IC ₅₀ ER α [μ g/ml]	IC ₅₀ ER β [μ g/ml]
Estradiol	0,31 x10 ⁻³	0,48 x10 ⁻³
8-PN	1,53 x10 ⁻³	1,88 x10 ⁻³
6-PN	1,42	0,42
XH	1,94	0,73
IXH	2,0	1,04
HE-1*	>2,0	-
HE-2*	-	-
SAR	0,72	0,46
Soph	1,27	1,69
GLY	0,72	0,72
PHA*	n.a.	>2,0
SOY*	-	>2,0
CIM*	n.a.	-

B.

Probe	IC₅₀ (Phytoestrogen, ERα)/ IC₅₀ (E₂, ERα)	IC₅₀ (Phytoestrogen, ERβ)/ IC₅₀ (E₂, ERβ)
Estradiol	1	1
8-PN	4,9	3,9
6-PN	4,6 x10 ³	0,9 x10 ³
XH	6,3 x10 ³	1,5 x10 ³
IXH	6,5 x10 ³	2,2 x10 ³
HE-1*	>6,5 x10 ³	-
HE-2*	-	-
SAR	2,3 x10 ³	0,95 x10 ³
Soph	4,1 x10 ³	3,5 x10 ³
GLY	2,3 x10 ³	2,3 x10 ³
PHA*	n.a.	>4,2 x10 ³
SOY*	-	>4,2 x10 ³
CIM*	n.a.	-

C.

Probe	IC₅₀ (ERα)/ IC₅₀ (ERβ)
Estradiol	0,65
8-PN	0,81
6-PN	3,38
XH	2,66
IXH	1,92
HE-1*	n.a.
HE-2*	-
SAR	1,57
Soph	0,76
GLY	1,0
PHA*	(>1)
SOY*	(>1)
CIM*	n.a.

Tab. 6: Bindungsverhalten der Phytoestrogene an den Estrogenrezeptoren. [3.1]

Tab. 6.A: IC₅₀-Werte der Phytoestrogene und des E₂ für ER α und ER β . Je kleiner der IC₅₀-Wert [μ g/ml] einer Probe, desto höher ihre Rezeptoraffinität. Die IC₅₀ ist die Konzentration einer Probe, die erforderlich ist, um 50% des ³H-E₂ aus seiner Rezeptorbindung zu verdrängen. * Extrakte gelöst in DMSO; ** manuell ermittelt (ohne sigmoide Anpassung).

Tab. 6.B: Relative Potenz der Phytoestrogene. Der Quotient aus IC₅₀ (Probe,ER α) und IC₅₀ (E₂,ER α) beschreibt die relative Potenz eines Phytoestrogens gegenüber dem endogenen Liganden E₂ zur Verdrängung am Rezeptor (für ER β entsprechend). Der Verdrängung durch E₂ wird der Wert 1 zugeordnet. Je größer der Zahlenwert eines Phytoestrogens ist, desto geringer ist die Affinität der entsprechenden Probe zum ER.

Tab. 6.C: Rezeptor-spezifische Affinität - ER α / ER β . Bildet man den Quotienten aus der IC₅₀ einer Probe am ER α (IC₅₀(Probe,ER α)) und IC₅₀(Probe,ER β), so erhält man die ER-Subtyp spezifische Affinität dieser Probe. Ist der Quotient <1, hat die Probe eine erhöhte Affinität zu ER α gegenüber ER β . Ist der Quotient >1, so liegt eine erhöhte ER β -Präferenz vor. Werte in () deuten eine Tendenz an.

3.2 Überprüfung der Zytotoxizität der Phytoestrogene in Zellkultur

Um potentielle zytotoxische Effekte der pflanzlichen Substanzen und Extrakte in Zellkultur zu überprüfen, wurden V79-Zellen mit diesen in den Konzentrationen 1 μ g/ml, 3 μ g/ml, 10 μ g/ml, 30 μ g/ml, 100 μ g/ml und 300 μ g/ml und mit 0,5% Ethanol enthaltendem Medium als Kontrolle für 24 Stunden behandelt. Die Wirkungen der Phytoestrogene auf die Fähigkeit der Zellen während einer folgenden 6-tägigen Inkubationszeit Kolonien zu bilden, ihre Colony Forming Efficiency“ (CFE), wurden analysiert. Die Zahl der vorhandenen Kolonien wurde gegen die der LM-Kontrolle normalisiert, so dass sich die relative Toxizität gegenüber dem Medium mit einer Zahl größer „1“ für nicht-toxisch, bzw. kleiner „1“ für zytotoxisch ausdrücken lässt. In Tabelle 7 sind die ungefähren EC₅₀-Werte aufgelistet, die sich aus der grafischen Darstellung der Ergebnisse (Abb. 27) ableiten lassen. Die EC₅₀ gibt hier die Konzentration an (oder den Bereich, in dem sich der wahre Wert befindet), durch welche die Zahl lebender Zellen um die Hälfte reduziert wird.

Die Ergebnisse (Abb. 27) zeigen, dass nach Behandlung mit den Proben in den Konzentrationen 100 μ g/ml und 300 μ g/ml, mit Ausnahme des Sojaextraktes SOY, keine, bzw. kaum Zellen überleben. Von den Hopfeninhaltsstoffen und -extrakten zeigt HE-2 die geringste Toxizität. In der Konzentration 3 μ g/ml hat HE-2 sein Maximum mit 113% CFE gegenüber der Kontrolle, bei 10 μ g/ml liegt die Zahl der Kolonien dicht unter der Kontrolle, bei 100 μ g/ml sind nur noch ca. 20% davon vorhanden. Der Extrakt HE-1 zeigt einen drastischen Abfall der Kolonienzahl von 10 μ g/ml, der relative Wert liegt hier bei 1,06, hin zu 30 μ g/ml, wo kaum noch lebende Zellen vorhanden sind. Bei XH und stärker bei 8-PN ist eine massive

Abnahme der Kolonienzahl bereits für die Konzentration 10µg/ml deutlich, bei 6-PN schon für 3µg/ml. Am toxischsten in diesem Zellsystem ist IXH, bei 1µg/ml dieser Substanz sind nur 4% der Kolonienzahl der LM-Kontrolle vorhanden. Trotz der beobachteten toxischen Effekte sind, wie bei HE-2, auch bei den anderen Hopfensubstanzen und HE-1 Effektivitäten in der Kolonienbildung nachweisbar, die über die der Kontrolle hinausgehen, am höchsten liegt die CFE von 1µg/ml 8-PN mit ca. 130%, gefolgt von 3µg/ml HE-1 mit 116%. In diesen Fällen ist eine protektive Wirkung des Extraktes auf die Zellen nach dem Ausplattieren vorhanden.

Von den übrigen Extrakten weist GLY, dann Soph die höchste Zytotoxizität auf. Bei beiden sind bereits bei der Konzentration 10µg/ml keine Kolonien mehr nachweisbar, die relativen Werte betragen für 3µg/ml Soph 0,9 und für 3µg/ml GLY nur 0,1. Ein ähnliches Profil zeigt SAR. Bei 10µg/ml beträgt die Kolonienzahl noch 3% verglichen mit der Kontrolle. Wenig toxisch sind CIM und noch ausgeprägter SOY. Während CIM bei der Konzentration 100µg/ml keine Kolonienbildung mehr aufweist, entspricht die von SOY in dieser Konzentration noch dem Kontrollwert. Selbst nach Behandlung mit 300µg/ml SOY sind noch 88% der Kolonien verglichen mit der Kontrolle nachweisbar. Für die geringen Konzentrationen von SOY liegt die CFE um 100% herum mit einem Maximum von 110% bei 1µg/ml. Sehr viel stärker wirkt CIM in den Konzentrationen 1µg/ml und 3µg/ml auf die Kolonienbildung, die Anzahl steigt auf 127% bzw. 124% gegenüber dem Medium.

Das interessanteste Profil in Bezug auf die CFE zeigt das IXH; in allen getesteten Konzentrationen inhibiert es die Kolonienbildung beinahe gänzlich. In der Stärke der Zytotoxizität folgen 6-PN und GLY. Am wenigsten toxisch sind SOY, CIM und HE-2.

Abbildung 27

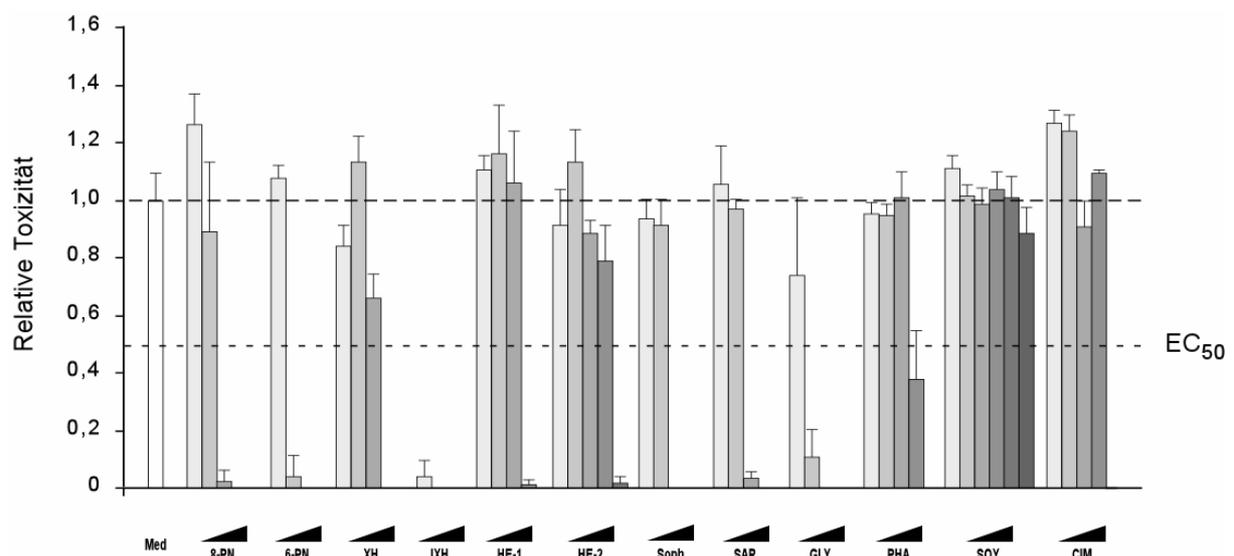


Abb. 27: Zytotoxizität der Phytoestrogene in V79 Zellen. Die V79 Zellen (200 Zellen/ 25cm²) wurden in DMEM/F12 mit 10% FBS ausgesät und nach 24 Stunden mit den angegebenen Proben in den Konzentrationen 1,0µg/ml, 3,0µg/ml, 10,0µg/ml, 30,0µg/ml, 100,0µg/ml und 300,0µg/ml oder Medium als Kontrolle in serumfreiem Medium behandelt. Sieben Tage später wurde die Kolonie-Bildungs-Effizienz (“colony forming efficiency”, CFE) bestimmt und relativ zur Mediumkontrolle dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Dreifachbestimmung +/- SD. [3.2]

Tabelle 7

Probe	Ungefähre EC₅₀ [µg/ml]
8-PN	3-10
6-PN	1-3
XH	10-30
IXH	<1
HE-1	10-30
HE-2	30-100
SAR	3-10
Soph	3-10
GLY	1-3
PHA	10-30
SOY	>300
CIM	100-300

Tab. 7: Zytotoxizität der Phytoestrogene: EC₅₀-Werte. Mithilfe der grafischen Darstellung (Abb. 27) der Zytotoxizität lässt sich eine Angabe über den Konzentrationsbereich [µg/ml] machen, in dem die jeweilige Probe die Zahl lebender Zellen auf 50% verringert (EC₅₀). [3.2]

3.3 Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf den Knochen

Der Knochen ist ein dynamisches, sich ständig in einem Gleichgewicht des Auf- und Abbaus befindliches Gewebe. Im Zuge des Resorptionsvorganges stellt er für den Organismus eine Mineralstoffquelle dar, die der Resorption entgegensteuernde Formation füllt diesen Speicher wieder und ist verantwortlich für den Erhalt der Knochenstärke. Die Osteoporose ist ein pathologischer Zustand, der dadurch charakterisiert ist, dass die Balance zwischen Knochenresorption und -formation zugunsten der Resorption verschoben ist; die Knochenmasse und -dichte nimmt ab, er verliert an Stärke. Ein solcher Prozess geht während

der Menopause vor sich (256). Die nachweislich dagegen erfolgreiche HRT hat zu intensiver Forschung Anlass gegeben, um Alternativen zur Estrogentherapie zu finden, die nicht die gefährlichen Nebenwirkungen im Brust- und Endometriumgewebe mit sich bringen (182). Bei solchen Alternativen handelt es sich beispielsweise um synthetische SERM oder Phytoestrogene.

Die Wirkung ausgewählter pflanzlicher Stoffe auf den Knochenformationsmarker Alkalische Phosphatase und die Expression knochenspezifischer Gene wird in diesem Kapitel beschrieben.

3.3.1 Regulation der Alkalischen Phosphatase-Aktivität in hFOB/ER Zellen

Als Testsystem für die Regulation der AP-Aktivität durch EE, bzw. die Phytoestrogene dienen die humanen Osteoblastenzelllinien hFOB/ER α und hFOB/ER β (208;209). Die AP ist beides, ein Marker für Knochenformation (in-vivo) und für die Ausdifferenzierung von Osteoblasten in konfluenter Zellkultur (in-vitro) (209). Die Messung sollte also möglichst zur späten Differenzierungsphase der hFOB/ER-Zellen hin erfolgen. Die Phasen der Differenzierung sind unterschiedlich bei den beiden Zelllinien: früh / mittel / spät an Tag 4, 11, 21 in hFOB/ER α und an Tag 3, 6, 12 in hFOB/ER β (209).

Wie im Abschnitt Methoden beschrieben, ist der bestmögliche Zeitpunkt in hFOB/ER α Zellen Tag 5. Sie befinden sich hier zwischen der frühen und mittleren Phase der Differenzierung (209). Die AP-Aktivität ist aber ausreichend stark, um einwandfrei und reproduzierbar bestimmt werden zu können. Schwierigkeiten hingegen machte die AP-Bestimmung in der mit ER β transfizierten Zelllinie. An keinem Messtag (Tag 3-7) konnte trotz Wechsel der Plattengröße, Stimulation mit den Testsubstanzen bei unterschiedlicher Konfluenz der Zellen, ICI-Vorbehandlung oder Verlängerung der Inkubationszeit des Enzyms mit dem Substrat eine Stimulation der AP-Aktivität durch EE beobachtet werden. Dies ist übereinstimmend mit der Literatur (209). Es kann zum einen darauf zurück geführt werden, dass die Promotoren solcher Gene, die für endogene Proteine kodieren, ER-Subtyp spezifisch durch E2 reguliert werden (167), zum anderen kann die im Verhältnis zur hFOB/ER α -Zelllinie geringere ER-Konzentration in der hFOB/ER β -Zelllinie verantwortlich sein für die nur geringen Messwerte (209).

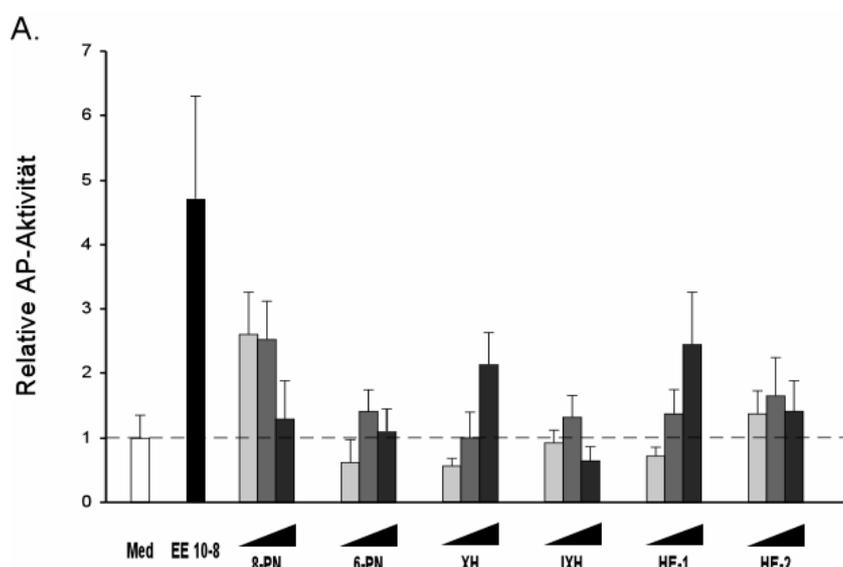
Die Behandlung der hFOB/ER α Zellen mit 10^{-8} M EE führt zu einem 4,7-fachen Anstieg der AP-Aktivität verglichen mit dem Medium. Die Stimulation durch alle Proben wird gegen die Mediumkontrolle normalisiert, im Diagramm wird ihr der Wert „1“ zugeordnet (Abb.28.A und B). Alle Komponenten aus dem Hopfen induzieren die AP-Aktivität in geringerem

Ausmaß als E2 es tut, die stärkste Substanz ist 8-PN. In den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1,0µg/ml bewirkt 8-PN einen beinahe 3-fachen Anstieg. Der ethanolische Spezialextrakt HE-1 und etwas schwächer XH erhöhen die AP-Aktivität dosisabhängig. In der Konzentration 10,0µg/ml zeigt HE-1 eine ebenso starke Stimulation wie 8-PN, und zwar knapp 3-fach gegenüber dem Medium, XH hingegen weist eine maximal nur ca. 2,2-fache Induktion auf. Weniger als 2-fach verstärkt der entfettete Ethanolextrakt HE-2 die Aktivität der AP in allen drei Konzentrationen, IXH und 6-PN zeigen keine signifikanten Effekte verglichen mit der Mediumkontrolle.

Bei den übrigen Pflanzenextrakten ist vor allen Dingen GLY auffällig. In der Konzentration 1,0µg/ml weist es mit einem Faktor von ungefähr 12 gegenüber der Kontrolle eine ca. 2,5-fach stärkere Induktion der AP auf als 10^{-8} M EE (Faktor 4,7). Noch etwas effektiver in der Stimulation als EE zeigen sich SAR und Soph jeweils in allen drei Konzentrationen. Die Extrakte SOY und PHA zeigen keine signifikanten induktiven Effekte in Bezug auf die AP-Aktivität. Interessant ist CIM, welches stark inhibierend auf die Enzymaktivität wirkt, sie beträgt nur ca. 20% verglichen mit dem Medium.

Zusammenfassend zeigt GLY in diesem Assay die stärkste estrogenen Potenz, die auch die der Positivkontrolle EE weit übertrifft. Mit einer halb so starken Stimulation wie GLY sie zeigt, folgen SAR und Soph, die damit ebenfalls die AP stärker induzieren als EE es tut. Die Proben aus dem Hopfen zeigen eine geringere AP-Stimulation als EE, mit einer ca. 65%igen Effektivität derer des EE zeigen 8-PN in seiner geringsten, gefolgt von HE-1 in seiner höchsten Konzentration die stärksten Effekte. Als einziges weist CIM eine Inhibition der AP-Induktion auf.

Abbildung 28



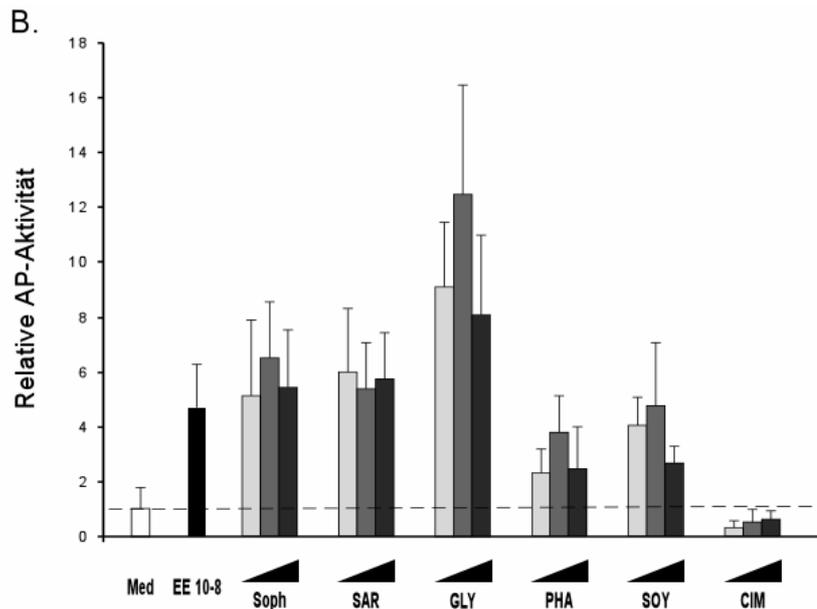


Abb. 28: Regulation der Alkalische Phosphatase-Aktivität durch Ethinylestradiol (EE) und Phytoestrogene in hFOB/ER α Zellen. Pro Well (in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurden 5.000 Zellen in DMEM/F12 mit 10% FBS ausplattiert und in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS bis zu einem Konfluenzgrad von 80% kultiviert. Anschließend erfolgte die Behandlung der Zellen für 4 Tage mit den angegebenen Proben (0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml und 10,0 μ g/ml) oder EE (10^{-8} M). Die Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität wurde bestimmt, gegen den Proteingehalt normalisiert und relativ zum Medium dargestellt. **Abb. 28.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 28.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte. Die Balken zeigen den Mittelwert jeder 8-fach-Bestimmung +/- SD. [3.3.1]

3.3.2 Regulation der Genexpression in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen mittels RT-PCR

Um die individuellen (isoformspezifischen) Wirkungen von ER α und ER β auf die E₂-abhängige Transkription in Osteoblasten zu überprüfen, ist eine humane Zelllinie geeignet, welche stabil je einen der beiden Rezeptoren in gleicher Konzentration exprimiert. Die U-2 OS Zelllinie wurde aufgrund ihrer osteoblastartigen Eigenschaften, des Fehlens endogener ER-Expression und der problemlosen Transfektion, die mit ihr möglich ist, gewählt (215).

Weiterhin erfolgte eine Auswahl an Genen, die in Osteoblasten durch Estradiol über ER α und ER β reguliert werden, um so differenzielle Effekte von E₂, bzw. Phytoestrogenen durch diese beiden Subtypen zu beleuchten. Auch estrogenagonistische sowie –antagonistische Effekte können auf diese Weise Subtyp-bezogen erforscht werden.

Nach Induktion des ER durch Doxycyclin in U-2 OS/ER α , bzw. U-2 OS/ER β und anschließender Behandlung der Zellen mit 10^{-8} M E₂, den Testsubstanzen oder 0,5%

lösungsmittelhaltigem Medium (hier Ethanol) wurde die Modulation der Genexpression der Alkalischen Phosphatase, des Interleukin-6, des Presenelin-2 und des von Willebrand Faktors per RT-PCR überprüft.

Ein Vorexperiment hat die von Monroe et al. unter Anwendung der Realtime-RT-PCR durchgeführte Gene-Chip-Analyse für die U-2 OS/ER β Zelllinie (215) auch mit RT-PCR bestätigt. Die gewählten Gene werden durch 10⁻⁸M E₂ reguliert (Abb. 29).

Abbildung 29

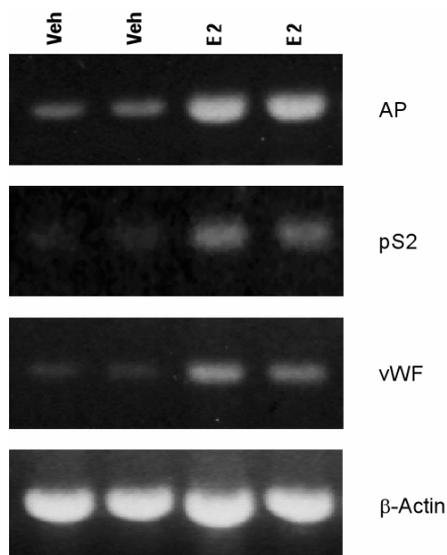


Abb. 29: Vorexperiment zur Regulation der Genexpression durch E₂ in der U-2 OS/ER β Zelllinie. U-2 OS/ER β Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1 μ g/ μ l Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Für weitere 24 Stunden wurde mit E₂ (10⁻⁸M), bzw. der Lösungsmittelkontrolle inkubiert. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2 μ l cDNA in der PCR eingesetzt (Tab.3). Für die Amplifikation der Gene werden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2). Die Genexpression des β -Actins dient als Kontrolle für die reverse Transkription. [3.3.2]

3.3.2.1 Alkalische Phosphatase (AP) und Interleukin-6 (IL-6)

Zwei der Gene, AP und IL-6 spielen im Knochenstoffwechsel eine wichtige Rolle. Als Marker für Knochenformation wird AP durch E₂ hochreguliert (210;257), IL-6 hingegen ist ein mit der Resorption des Knochens in Zusammenhang stehendes Zytokin und wird durch E₂ herunter reguliert (258).

Bei den Hopfeninhaltsstoffen und -extrakten (Abb. 30.A und B) regulieren 6-PN dosisabhängig und 1,0 μ g/ml HE-2 die AP-Genexpression in den U-2 OS/ER α Zellen in gleichem Ausmaß wie E₂. In der Konzentration 1,0 μ g/ml vermag HE-1 und noch mehr 8-PN

die AP sogar stärker als E₂ hoch zu regulieren. Ähnlich hohe Effekte wie E₂ erzeugt IXH (1,0µg/ml), XH ist schwächer wirksam. In den U-2 OS/ERβ Zellen hat 8-PN einen dem E₂ vergleichbar starken Effekt, gefolgt von XH, HE-1 und HE-2 jeweils in der Konzentration 1,0µg/ml sowie 6-PN, welches wiederum eine Dosisabhängigkeit zeigt. IXH ist hier schwächer wirksam.

Interleukin-6 wird durch E₂ und alle Komponenten aus Hopfen in der U-2 OS/ERα Zelllinie herunter reguliert. Eine Ausnahme bildet nur IXH, welches lediglich in der mittleren Konzentration eine schwache Wirkung zeigt (Abb. 31.A). Die Extrakte HE-1 und HE-2 weisen dosisabhängige Wirkungen auf, 6-PN zeigt reverse Dosisabhängigkeit. In ihren jeweils effektivsten Konzentrationen sind sie so stark wirksam wie E₂. Dies ist auch der Fall für 10µg/ml 8-PN und 1,0µg/ml XH. Überraschenderweise wird die IL-6 Genexpression durch sämtliche Testsubstanzen (aus Hopfen und den anderen Pflanzen) und E₂ in U-2 OS/ERβ Zellen nicht herunter reguliert (Abb. 31.B), sondern, wenn man überhaupt von einer Tendenz des E₂ im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle sprechen möchte, eher etwas herauf. Hier wird die Subtyp-spezifische Regulation eines endogenen Gens deutlich (167).

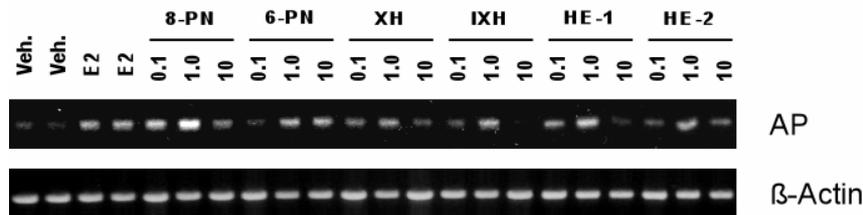
Bei den übrigen Extrakten ist die reverse Dosisabhängigkeit von Soph und PHA bei der Regulation der AP in U-2 OS/ERα Zellen auffällig. Interessanterweise stimuliert Soph die Genexpression in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1,0µg/ml stärker als die Positivkontrolle 10⁻⁸M E₂. In der Stärke dazwischen liegt 1,0µg/ml SAR, gefolgt von 0,1µg/ml PHA, welches hier die gleiche Potenz wie E₂ aufweist. In allen getesteten Konzentrationen ist GLY in beiden U-2 OS/ER Zelllinien schwächer wirksam als E₂ mit einem Maximum bei 1,0µg/ml. In der U-2 OS/ERβ Zelllinie zeigen Soph, SAR und PHA mit E₂ vergleichbar starke Effekte, Soph und PHA tun dies dosisabhängig, wohingegen SAR hier mit reverser Dosisabhängigkeit agiert. Nur wenig ausgeprägtere Bande als die Negativkontrolle zeigt das RHA in den beiden Zelllinien.

Zu einer Senkung der IL-6-Genexpression sind auch all diese Extrakte in der Lage. Dosisabhängig reguliert SAR (10µg/ml) die IL-6-Expression sogar stärker herunter als E₂, PHA genauso stark wie das Hormon. Ebenso tun dies Soph und GLY, eine reverse Dosisabhängigkeit aufweisend. RHA ist auch hier inaktiv.

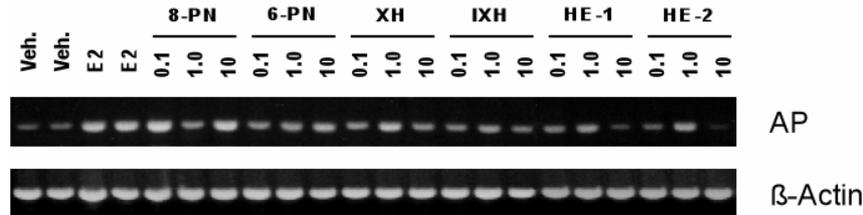
Insgesamt weisen bei der Regulation dieser knochenspezifischen Gene aus dem Hopfen 8-PN und die beiden HE-Extrakte, sowie SAR und Soph die höchsten Aktivitäten auf. Es sind sowohl dosisabhängige Effekte zu beobachten als auch revers dosisabhängige.

Abbildung 30

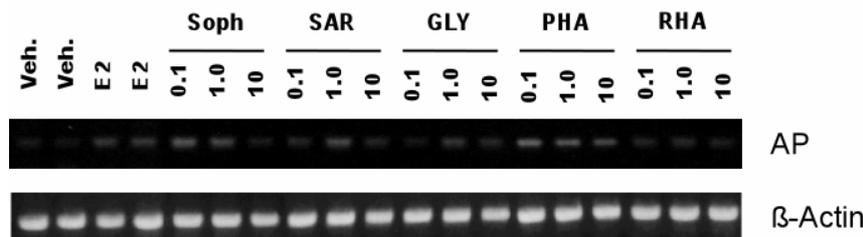
A.



B.



C.



D.

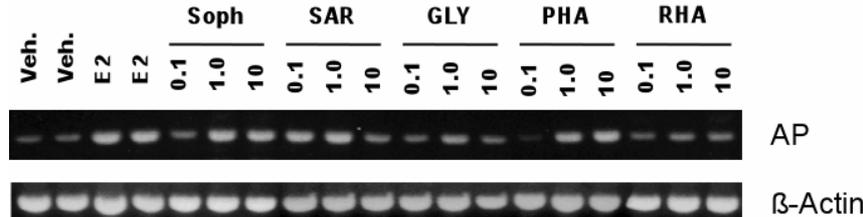


Abb. 30: Regulation der Alkalischen Phosphatase-mRNA-Expression durch E₂ und Phytoestrogene. U2-OS/ER α (Abb. 30.A und C) und U2-OS/ER β (Abb. 30.B und D) Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1 μ g/ μ l Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml und 10,0 μ g/ml (d.h. 0,5 \times 10⁻⁶M – 0,5 \times 10⁻⁴M) und 10⁻⁸M E₂ hinzugegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2 μ l cDNA in der PCR eingesetzt (Tab.3). Für die Amplifikation der humanen Alkalischen Phosphatase (AP) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2.A). Die β -Actin-Genexpression dient als Kontrolle für die reverse Transkription. **Abb. 30.A und B** zeigen die Regulation der AP-Genexpression durch

die Proben aus dem Hopfen, **Abb. 30.C und D** diejenige durch die Extrakte der übrigen Phytoestrogene. [3.3.2.1]

Abbildung 31

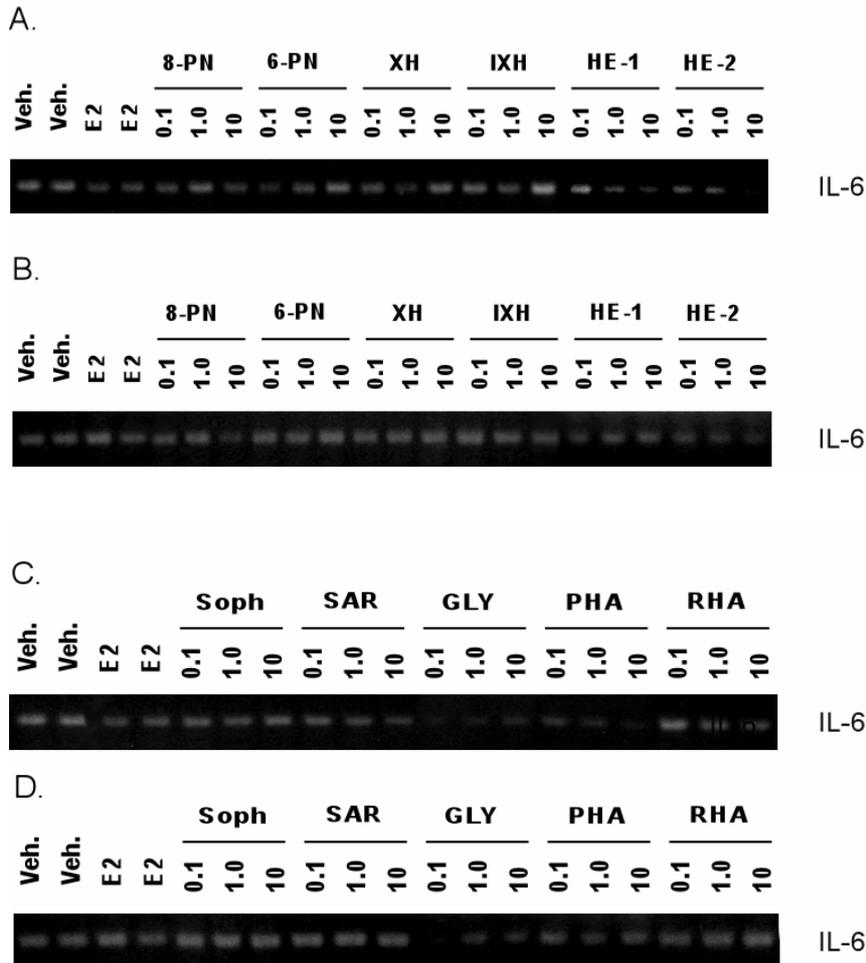


Abb. 31: Regulation der Interleukin-6 mRNA-Expression durch E₂ und Phytoestrogene. U2-OS/ER α (**Abb. 31.A und C**) und U2-OS/ER β (**Abb. 31.B und D**) Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1 μ g/ μ l Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml und 10,0 μ g/ml (d.h. 0,5 \times 10⁻⁶M – 0,5 \times 10⁻⁴M) und 10⁻⁸M E₂ hinzugegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2 μ l cDNA in der PCR eingesetzt (Tab.3). Für die Amplifikation des humanen Interleukin-6 (IL-6) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2.A). Die β -Actin-Genexpression (**Abb. 30**) dient als Kontrolle für die reverse Transkription. **Abb. 31.A und B** zeigen die Regulation der IL-6-Genexpression durch die Proben aus dem Hopfen, **Abb. 31.C und D** diejenige durch die Extrakte der übrigen Phytoestrogene. [3.3.2.1]

3.3.2.2 *Presenelin-2 (pS2) und von Willebrand Faktor (VWF)*

Ein anderes gut charakterisiertes und durch Estrogen reguliertes Gen ist pS2. Lediglich die niedrigeren Konzentrationen von 8-PN (0,1µg/ml und 1,0µg/ml) und 10,0µg/ml IXH sind in der Lage die pS2-mRNA in einem dem E₂ vergleichbaren Maße in U-2 OS/ERα Zellen hoch zu regulieren (Abb. 32.A). Die Extrakte HE-1 und HE-2 weisen mittelstarke Effekte auf, während 6-PN und XH die Genexpression im Vergleich zur Negativkontrolle kaum steigern. In der U-2 OS/ERβ Zelllinie ist ebenfalls 8-PN, hier in allen Konzentrationen, dem E₂ in seiner Wirkung ebenbürtig, jedoch zeigen auch HE-1 und HE-2 in der jeweils höchsten Konzentration einen solch starken Effekt (Abb. 32.B). Schwächer als E₂ steigern XH und IXH die pS2-Genexpression, ihre maximale Wirkung entfalten sie in der mittleren Konzentration 1,0µg/ml. Wiederum schwächer wirksam ist 6-PN. Eine Dosisabhängigkeit weisen 8-PN, 6-PN und die beiden Extrakte auf.

Der Einfluss der weiteren pflanzlichen Extrakte zeigt sich wie folgt: In U-2 OS/ERα Zellen zeigt nur SAR mit E₂ vergleichbar starke Effekte. Der Extrakt weist für 1,0µg/ml und 10,0µg/ml einen entsprechenden Anstieg der pS2-mRNA auf. Etwas schwächer stimulieren GLY (0,1µg/ml) und Soph (1,0µg/ml und 10,0µg/ml) die pS2-Genexpression. RHA und PHA zeigen so gut wie keinen Effekt. Auch in der U-2 OS/ERβ Zelllinie hat SAR einen ebenso starken Effekt auf die Genexpression wie E₂, allerdings in Verbindung mit einer reversen Dosisabhängigkeit. Mit der gleichen Potenz reguliert PHA dosisabhängig die pS2-mRNA, dicht gefolgt von Soph und GLY 1,0µg/ml. Die Verbindung RHA ist wirkungslos.

Kürzlich wurde gezeigt, dass der von Willebrand Faktor einen äußerst sensitiven Marker für die E₂-Regulation in den U-2 OS/ER Zelllinien darstellt (215). Er wurde deshalb in dieser Arbeit zur weiteren (intensiveren) Charakterisierung der hormonartigen Effekte der Phytoestrogene gewählt. In den U-2 OS/ERα Zellen wird VWF stark hochreguliert, und zwar gleichermaßen durch E₂, 8-PN, 6-PN, HE-1 und HE-2 (Abb. 33.A). Diese Verbindungen und Extrakte zeigen mit Ausnahme von 8-PN eine dosisabhängige Regulation. Die Hopfeninhaltsstoffe XH und IXH sind schwächer wirksam, für die jeweilige höchste Konzentration (10,0µg/ml) scheint sogar eine Inhibition verglichen mit der Lösungsmittelkontrolle vorzuliegen. In der U-2 OS/ERβ Zelllinie fällt die Regulation durch Estrogen insgesamt schwächer aus als in der ERα-enthaltenden Zelllinie (215). Die stärksten Effekte in dieser Zelllinie, sogar geringfügig stärker als die von E₂, zeigen 8-PN mit reverser Dosisabhängigkeit und HE-1, letzterer jedoch dosisabhängig (Abb. 33.B). In der Konzentration 10,0µg/ml ist HE-2 ebenso wirksam wie E₂, es folgt XH, welches in der

mittleren Konzentration seinen maximal stimulierenden Effekt auf die VWF-Genexpression zeigt. Die Substanzen IXH und 6-PN weisen keinerlei Wirkungen auf.

Nicht nur die Stoffe und Extrakte aus Hopfen, sondern auch Soph und SAR in allen Konzentrationen, sowie GLY und PHA dosisabhängig in der jeweils höchsten Konzentration regulieren die VWF-Genexpression stark herauf, in einem Maße, wie es auch $10^{-8}M$ E₂ tut. Wiederum zeigt RHA keine nennenswerten Effekte. In der U-2 OS/ERβ Zelllinie erweist sich SAR in den beiden höheren Konzentrationen 1,0µg/ml und 10,0µg/ml stärker wirksam als E₂. Die Extrakte Soph, GLY und PHA sind mit diesem ungefähr gleichauf in ihrer Wirkung. Soph ist vor allem in der mittleren Konzentration aktiv, GLY und PHA vornehmlich in den beiden höheren Konzentrationen, 1,0mg/ml und 10,0µg/ml.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass auch in Bezug auf die Regulation der beiden nicht knochenspezifischen Parameter pS2 und VWF die Proben 8-PN und SAR die potentesten Phytoestrogene darstellen, dicht gefolgt von HE-1, HE-2, PHA, Soph und GLY.

Abbildung 32

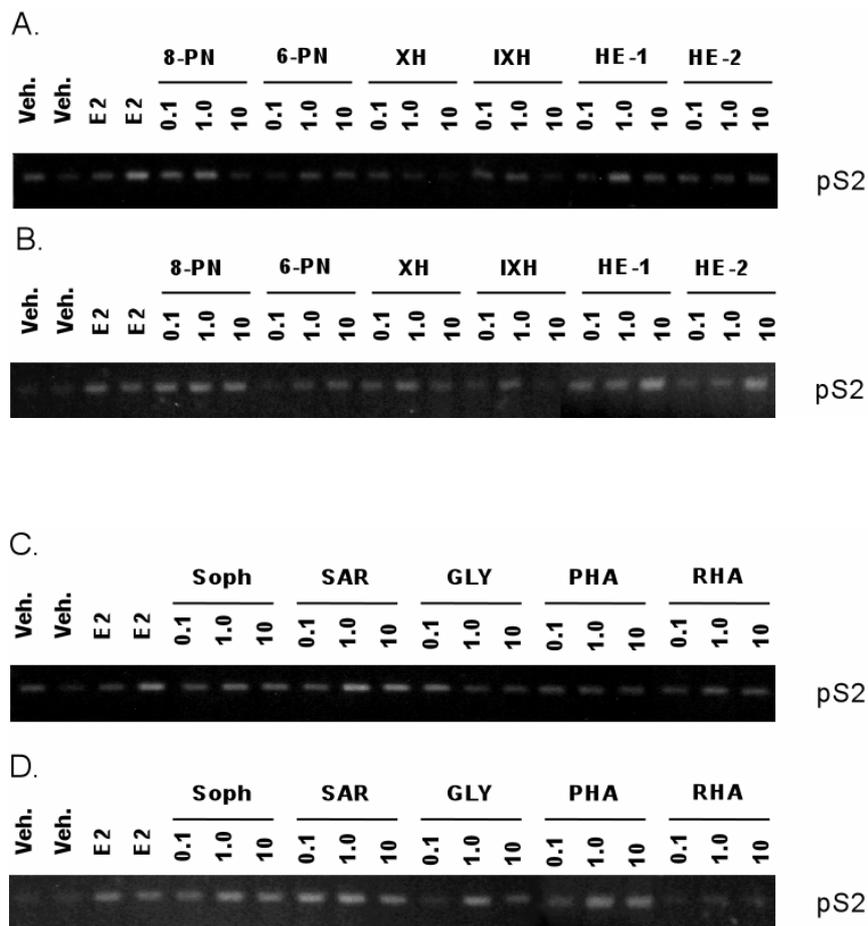


Abb. 32: Regulation der Presenelin-2 mRNA-Expression durch E₂ und Phytoestrogene. U2-OS/ER α (Abb. 32.A und C) und U2-OS/ER β (Abb. 32.B und D) Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1 μ g/ μ l Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml und 10,0 μ g/ml (d.h. 0,5x10⁻⁶M – 0,5x10⁻⁴M) und 10⁻⁸M E₂ hinzugegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2 μ l cDNA in der PCR eingesetzt (Tab.3). Für die Amplifikation des humanen Presenelin-2 (pS2) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2.A). Die β -Actin-Genexpression (Abb. 30) dient als Kontrolle für die reverse Transkription. **Abb. 32.A und B** zeigen die Regulation der pS2-Genexpression durch die Proben aus dem Hopfen, **Abb. 32.C und D** diejenige durch die Extrakte der übrigen Phytoestrogene. [3.3.2.2]

Abbildung 33

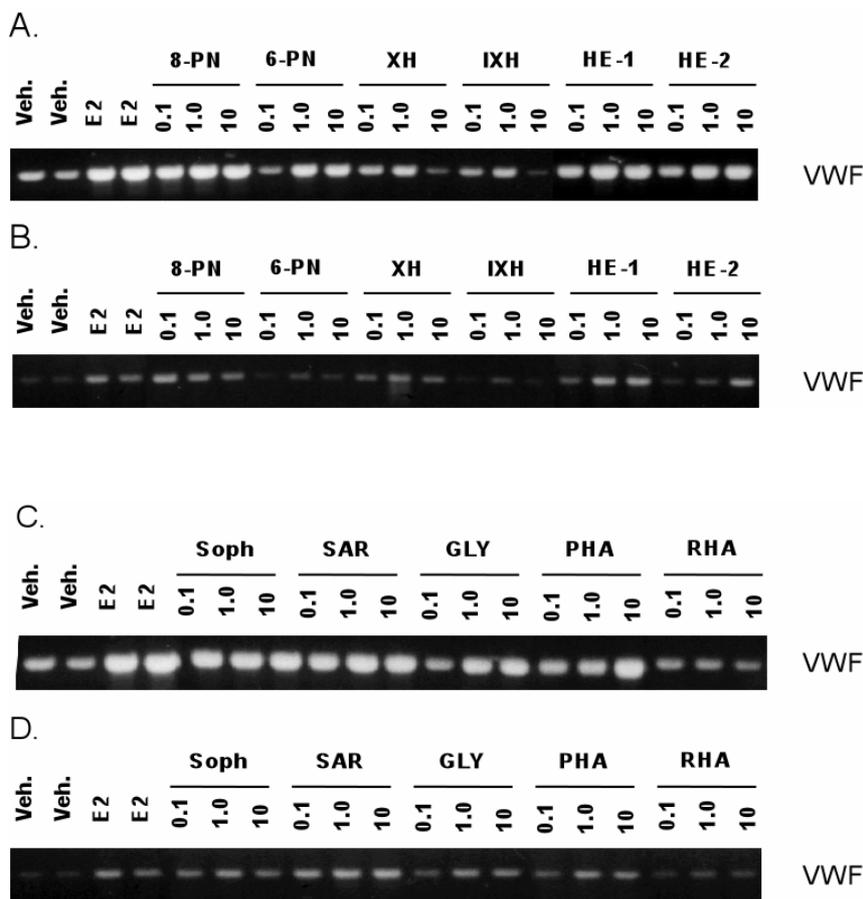


Abb. 33: Regulation der von Willebrand Faktor mRNA-Expression durch E₂ und Phytoestrogene. U2-OS/ER α (Abb. 33.A und C) und U2-OS/ER β (Abb. 33.B und D) Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS kultiviert und über Nacht mit 1 μ g/ μ l Doxycyclin zur Induktion der ER-Expression behandelt. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1 μ g/ml, 1,0 μ g/ml und 10,0 μ g/ml (d.h. 0,5x10⁻⁶M – 0,5x10⁻⁴M) und 10⁻⁸M E₂ hinzugegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2 μ l cDNA in der PCR eingesetzt (Tab.3). Für die Amplifikation des humanen von Willebrand Faktor (VWF) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2.A). Die β -Actin-Genexpression (Abb. 30) dient als Kontrolle für die reverse Transkription. **Abb. 33.A und B** zeigen die Regulation der pS2-

Genexpression durch die Proben aus dem Hopfen, **Abb. 33.C und D** diejenige durch die Extrakte der übrigen Phytoestrogene. [3.3.2.2]

Als Ergebnis diese Untersuchungsabschnitts lässt sich festhalten, dass das Genprofil für die U-2 OS/ER Zelllinien die ausgeprägte estrogenartige Wirkung vom Hopfeninhaltsstoff 8-PN und von den Extrakten HE-1 und SAR verdeutlicht. Diese zeigen starke Effekte auf die Expressionen aller Gene. Auch die Extrakte Soph und PHA weisen nennenswerte Effekte auf. HE-2 und GLY sind mittelstark wirksam. Das Rhaponticin ist hinsichtlich aller getesteten Gene unwirksam.

Da es sich hier um semiquantitative RT-PCR handelt, mit der die Untersuchung stattfand, ist eine exakte Quantifizierung der Wirkungen nicht möglich, es lassen sich jedoch deutliche Tendenzen und Differenzen erkennen. Laut Monroe et al. (215) ist VWF mit 4,9-facher Hochregulation der sensitivste Marker für estrogen Regulation in U-2 OS/ER α , AP wird durch E₂ 1,7-fach reguliert, für U-2 OS/ER β zeigt pS2 eine 3,4-fache Regulation durch E₂. Unsere Ergebnisse können diese Beobachtungen bestätigen.

Weiterhin machen die Untersuchungen in Zelllinien, die jeweils nur einen Rezeptor-Subtyp enthalten, deutlich, dass es sich bei den Wirkungen der Phytoestrogene um ER-Subtypspezifische Wirkungen handelt. Die pflanzlichen Proben sind in der Lage sowohl estrogenagonistische als auch estrogenantagonistische Effekte auszuüben, je nach Rezeptorsubtyp und je nach reguliertem Parameter. Sie besitzen damit Charakteristika Selektiver-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren.

3.4 Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf das Brustgewebe

3.4.1 Untersuchung der Transaktivierung im Luciferase Assay

Der Luciferase Assay wurde durchgeführt, um zu überprüfen, ob die Phytoestrogene in der Lage sind, über den ER eine Transkription auszulösen. Dazu wird getestet, ob sie ein transient transfiziertes ER-Reportergen zu aktivieren vermögen. Das Reporter-Plasmid ERE-TK-Luc beinhaltet die Firefly-Luciferase-Sequenz unter Kontrolle eines Estrogen-Response-Elements. Als interne Kontrolle für die Transfektion wurde der Kontroll-Vektor pRL-TK in MCF-7 Zellen cotransfiziert, welcher die Renilla Luciferase exprimiert. Diese ist enzymatisch von der FFLuc unterscheidbar. In den MCF-7 Zellen ist ER α der überwiegende ER-Subtyp, die ER β -Konzentration ist vernachlässigbar gering (s. dort, (198))

Nach 24-stündiger Behandlungszeit mit den Proben und Kontrollen wurden die Zellen geerntet und auf ihre Luciferaseaktivität hin untersucht. Jeder Messwert ergibt sich aus einer Dreifachbestimmung. Dargestellt sind die Mittelwerte mit Standardabweichungen. Diese sind verhältnismäßig gering bei diesem Assay, ein Indiz für seine hohe Reproduzierbarkeit. Als Positivkontrolle dient 10^{-8} M E_2 , als Negativkontrolle das Lösungsmittel (5µl Ethanol/ml). Verglichen mit der LM-Kontrolle vermag Estradiol die Transkriptionsaktivität des ER um das 34-Fache zu stimulieren (Abb. 34).

8-PN ist mit Abstand die aktivste Substanz unter den Hopfeninhaltsstoffen und -extrakten. Mit reverser Dosisabhängigkeit zeigt es eine 22-fache Induktion der Luciferase in seiner geringsten Konzentration (0,1µg/ml) gegenüber dem LM; in der höchsten Konzentration (10,0µg/ml) stimuliert es noch um das 9-Fache. Mit 13-facher Aktivierung folgt IXH (1,0µg/ml), dann HE-1 und HE-2 jeweils mit maximaler Wirksamkeit in ihrer höchsten Konzentration, und zwar 11-fach und 9-fach. Ebenfalls dosisabhängig induziert 6-PN die FFLuc-Aktivität um das maximal 8-Fache. Eine Einheit darunter liegt 1,0µg/ml XH.

Übertroffen wird 0,1µg/ml 8-PN in der Stärke der Transkriptionsaktivierung von SAR, dem Extrakt aus Besenginster, der dosisabhängig eine knapp 27-fache Aktivierung aufweist. In seiner geringsten Konzentration entspricht SAR der Wirksamkeit von 10,0µg/ml 8-PN. Auch 1,0µg/ml Soph ist recht effektiv in der Transaktivierung des ER mit 18-facher Luciferaseinduktion. Etwa halb so stark ist die Wirksamkeit von GLY in seinen beiden höheren Konzentrationen, gefolgt von PHA und RHA, die es dosisabhängig auf eine knapp 6-fache, bzw. 4-fache Induktion bringen.

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass alle getesteten Phytoestrogene in der Lage sind, die ER-Reportergen Expression zu aktivieren. Estradiol zeigt sich mit Abstand am effektivsten bezüglich der Stimulation der ER-Transkriptionsaktivität. Immerhin 79% seiner Wirkung weist 10,0µg/ml SAR auf. Ein interessantes Verhalten zeigt 8-PN, welches in der geringsten Konzentration seinen maximalen Effekt hat, und zwar eine noch 65%ige Wirkung derer von E_2 . Es handelt sich hiermit um eine sehr potente Substanz, die vermutlich bei einer noch geringeren Konzentration ihr Wirkmaximum besitzt. Für Genistein beispielsweise beobachteten Maggiolini et al. (198) noch eine nennenswerte Luciferaseinduktion bei 1nM, 0,1µg/ml 8-PN entsprechen 1µM! Erreicht ist das Wirkmaximum innerhalb dieses Assays (*Systems*) bei jeweils 1,0µg/ml Soph, IXH, GLY und XH (nach abnehmender Potenz geordnet). Die übrigen Testsubstanzen weisen eine Dosisabhängigkeit auf (Ausnahme 8-PN).

Abbildung 34

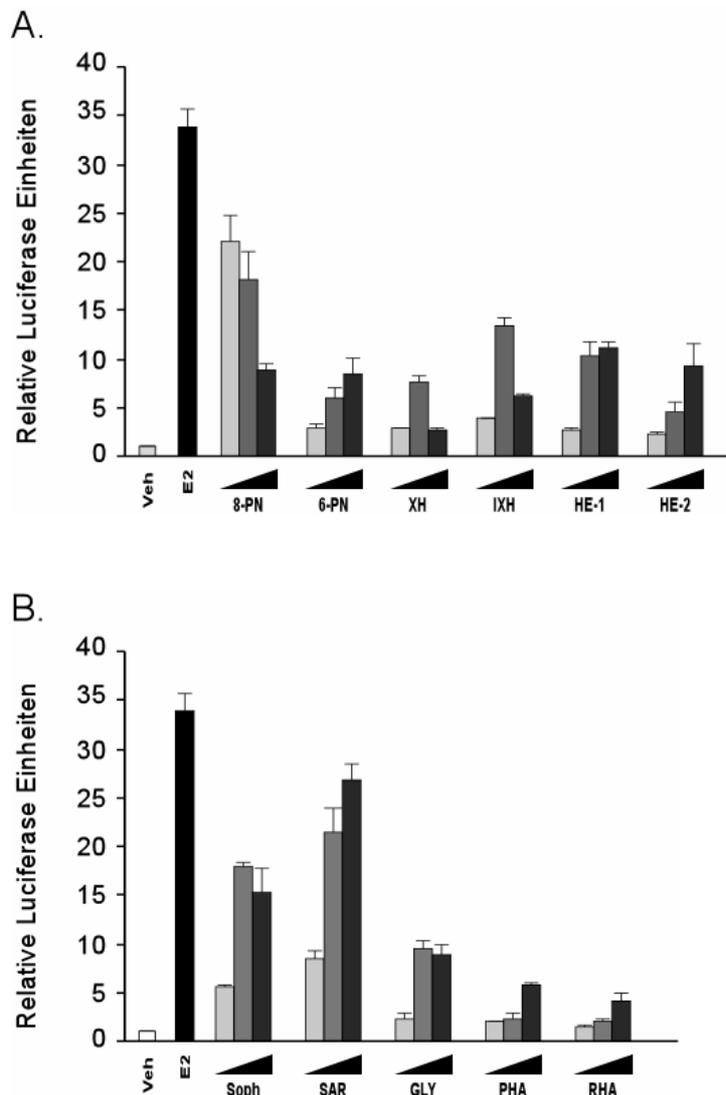


Abb. 34: Modulation der Transkriptionsaktivität (oder Luciferaseaktivität) E₂ und Phytoestrogene. Die MCF-7 Zellen wurden in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und bei 50%-60% Konfluenz transient mit 1µg ERE-TK-Luc (Vektor für das Reportergen der Firefly-Luciferase, FFLuc) und 1µg pRL-TK (Kontroll-Vektor für die Renilla-Luciferase, RLuc) transfiziert. Nach 3 Stunden wurden die Zellen gewaschen und mit E₂ (10⁻⁸M) und den angegebenen Proben (0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml) 24 Stunden lang in DMEM/F12 mit 10% cs-FBS behandelt. Anschließend wurden die Zellen geerntet und das Lysat im Luciferase Assay eingesetzt. Die Messwerte [in Relativen Luciferase Einheiten] wurden normalisiert, wobei der Quotient aus FFLuc und RLuc als internem Standard gebildet wurde. **Abb. 34.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 34.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte. Der Mittelwert jeder Dreifachbestimmung +/- SD ist relativ zur LM-Kontrolle dargestellt. [3.4.1]

3.4.2 Untersuchung der Proliferation in MCF-7 Zellen

Da Phytoestrogene Liganden der Estrogenrezeptoren sind und diese auch zu aktivieren vermögen (eigene Daten; (198)), ist es von Bedeutung ihre modulierende Wirkung auf die physiologische Antwort ER-haltiger Mammakarzinomzellen zu untersuchen. Estrogene stimulieren die Proliferation vieler Brustkrebszelllinien, was zum Einsatz von Antiestrogenen, bzw. SERMs in der Behandlung maligner Tumoren geführt hat. Auch Phytoestrogene weisen zum Teil eine SERM-Charakteristik auf (s. Ergebnisse in U-2 OS/ER; (150;259)), so dass sich der Proliferationsassay zur Einschätzung der estrogenen oder antiestrogenen Potenz der pflanzlichen Stoffe eignet.

In Konzentrationen bis zu 10µg/ml stimulieren alle getesteten Phytoestrogene die Proliferation der MCF-7 Zellen in gleichem Ausmaß oder stärker als E₂ (Abb. 35). Die einzige Ausnahme bildet der Extrakt der Gartenbohne PHA.

Es deutet sich bei allen Testsubstanzen - mit Ausnahme der beiden Hopfenextrakte HE-1 und HE-2 sowie RHA bei mehr als 10µg/ml - ein zum Teil drastischer Abfall der Zellzahl an, ein Effekt, der auf antiestrogene Wirksamkeit in höheren Konzentrationen, bzw. bei Absinken unter die Mediumkontrolle auf Zelltod hindeutet. Maggolini et al. bestätigen dies und zeigen weiterhin, dass ein solch inhibitorischer Effekt nicht durch Zugabe von E₂ rückgängig gemacht werden kann (198). Die Ergebnisse lassen vermuten, dass es einen recht scharfen Übergang gibt von proliferativen zu zytotoxisch wirkenden Dosen der Phytoestrogene. Die zytotoxische Wirkung wird vermutlich nicht über einen ER-abhängigen Mechanismus vermittelt, wie Maggolini et al. anhand der Behandlung ER-negativer Zelllinien mit den für MCF-7 Zellen toxischen Dosen der Phytoestrogene zeigten (198). Auch für diese Zelllinien waren die eingesetzten Dosen toxisch.

Als Positivkontrolle dient 10⁻⁸M E₂. Die Proben sind in den Konzentrationen 0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml eingesetzt, und die erzielten Proliferationswerte sind gegen reines Medium normalisiert. Diesem gegenüber zeigt E₂ eine 2,1-fache Stimulation der Proliferation. Die Werte der Phytoestrogene liegen zwischen 48% und 130% der Wirkung des Estradiols.

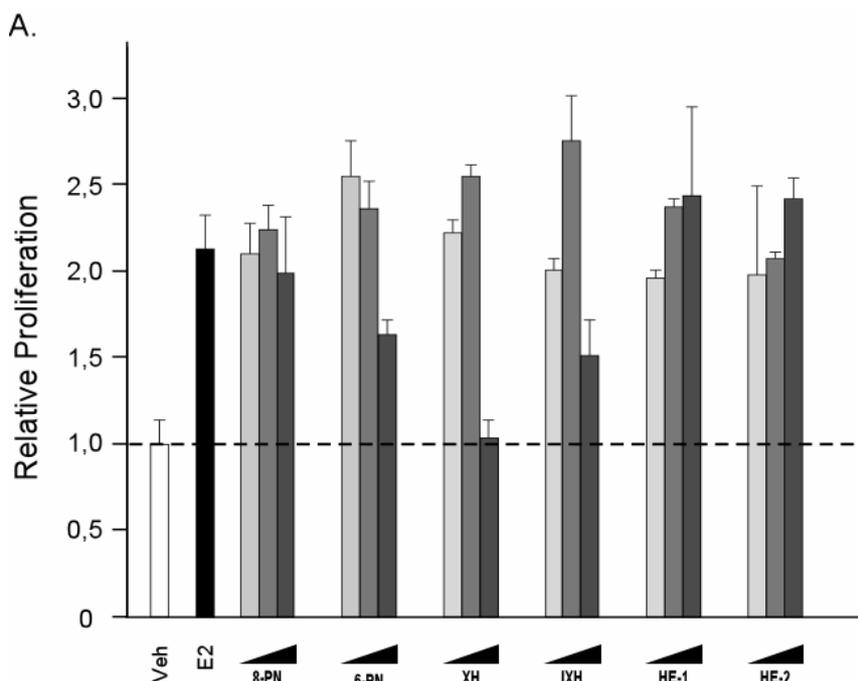
Die beiden Extrakte HE-1 und HE-2 aus Hopfen zeigen als einzige eine dosisabhängige Erhöhung der Proliferation, deren größter Wert bei 10µg/ml noch nicht erreicht zu sein scheint; die maximale Stimulation beträgt im Falle beider Extrakte eine 2,4-fache gegenüber dem Medium, das heißt eine ca. 14% stärkere Stimulation als durch E₂. Unter den isolierten Hopfeninhaltsstoffen weist 1,0µg/ml IXH den stärksten Effekt auf mit einer knapp 2,8-fachen Stimulation gegenüber der Mediumkontrolle. Dicht gefolgt wird es von 1,0µg/ml XH und

0,1µg/ml 6-PN, welche beide eine 2,5-fache Stimulation aufweisen. Bei XH und IXH ist ein drastischer Abfall der Proliferation von der Konzentration 1,0µg/ml zu 10,0µg/ml zu beobachten, bei 6-PN fällt dieser schwächer aus, und die Substanz zeigt reverse Dosisabhängigkeit. Für 8-PN liegen die Werte um den des E₂ herum mit maximal 2,2-facher Stimulation in der mittleren Konzentration, die Tendenz leicht abnehmend zu 10,0µg/ml hin.

Von den übrigen Pflanzenextrakten stimuliert SAR in der Konzentration 1,0µg/ml die MCF-7-Proliferation mit einem Faktor von 2,7 gegenüber dem Medium am stärksten. Sie liegt damit rund 25% über dem Effekt des E₂. Die Extrakte Soph und GLY folgen mit einer ca. 2,4-fachen proliferativen Wirkung verglichen mit Medium in den Konzentrationen 0,1µg/ml, bzw. 1,0µg/ml. Für Soph zeigt sich ein ähnliches Bild wie für 6-PN, eine ca. 2,5-fache Stimulation in der niedrigsten Dosis bei reverser Dosisabhängigkeit. Diese beobachtet man auch für PHA, wobei dessen stärkster Effekt mit 2,0-facher Stimulation knapp unterhalb der E₂-Wirkung liegt. Die Substanz RHA fördert dosisabhängig die Proliferation mit Werten zwischen 2,1- und gut 2,2-facher Stimulation.

Ein wünschenswertes Profil in diesem Assay zeigt in allen getesteten Konzentrationen allein PHA. Es weist einen geringeren proliferativen Effekt als E₂ auf, einen jedoch immer noch erhöhten gegenüber der Mediumkontrolle. Im Hinblick auf die übrigen Extrakte und Substanzen müssten Konzentrationen unterhalb von 0,1µg/ml eingesetzt werden, um eventuell nicht-proliferative Effekte sehen zu können. Die Frage ist jedoch, ob sich in den weiteren Testsystemen in anderen Gewebekulturen bei so niedrigen Konzentrationen positive, erwünschte Wirkungen zeigen würden.

Abbildung 35



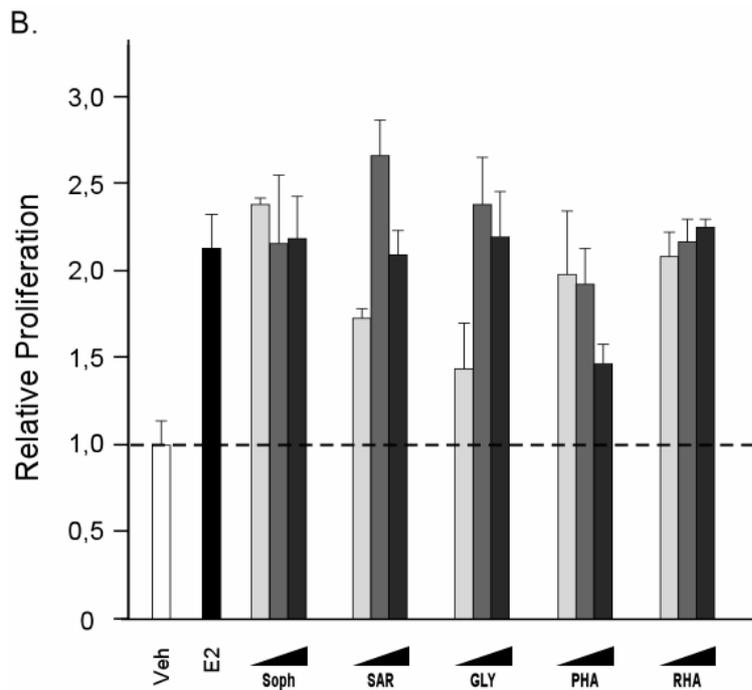


Abb. 35: Bestimmung der Proliferation in MCF-7 Zellen durch E₂ und Phytoestrogene. Pro Well (in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurden 6400, bzw. 10.000 Zellen in DMEM/F12 mit 10% FBS ausplattiert und nach einem Tag mit 10⁻⁸M ICI und 5% cs-FBS in DMEM/F12 für weitere 24 Stunden kultiviert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit serumfreiem DMEM/F12 gewaschen und mit den angegebenen Proben (0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml) oder EE (10⁻⁸M) in Medium mit 1% cs-FBS für 72 Stunden inkubiert. Es folgt die Bestimmung der relativen Proliferationsrate der mit Testsubstanzen behandelten Zellen im Vergleich zur Mediumkontrolle. **Abb. 35.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 35.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte. Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Dreifachbestimmung +/- SD. [3.4.2]

3.4.3 Gegenüberstellung der Transaktivierung mit der Proliferation in MCF-7 Zellen

Zur Charakterisierung der Estrogenität einer Verbindung wird häufig eine Kombination aus Analyse der ER-Affinität, der Proliferation und der ER-vermittelten Transaktivierung, beides in MCF-7 Zellen, durchgeführt. Da die proliferierende Wirkung in Brustkrebsgewebe, die eine gefährliche Nebenwirkung klassischer HRT darstellt, ein entscheidender Faktor bei der Bewertung von Phytoestrogenen als mögliche Estrogenalternative ist, sollte deren Mechanismus möglichst eingehend untersucht werden. Zur Erkundung, ob es sich um eine ER-vermittelte Stimulation der Proliferation handelt, auf die in der Diskussion näher eingegangen wird, erfolgt hier eine Gegenüberstellung der Ergebnisse des Luciferase- und des Proliferationsassays. Es stellt sich die Frage nach dem Vorliegen einer Korrelation dieser Ergebnisse. Generell sei vorweg zu schicken, dass die erreichte Transkriptionsaktivität aller getesteten Phytoestrogene unter derjenigen des Estradiols bleibt; für die proliferativen Effekte ist dies nicht der Fall, die Stimulation durch die pflanzlichen Proben übersteigt oftmals die des

E₂. Es können jedoch Tendenzen beobachtet werden, die sich in beiden Experimenten gleichermaßen für eine Substanz oder einen Extrakt finden.

Bei den Hopfeninhaltsstoffen ist dies bei allen Substanzen bis auf 6-PN der Fall. Für diese Substanz ist die Transkriptionsaktivität sehr gering, während die Proliferation höher als die durch E₂ erzielte ist. Für XH, IXH, HE-1 und HE-2 korrelieren die Ergebnisse beider Assays sogar unter Beibehalt der Relationen zwischen den einzelnen Konzentrationen. XH und IXH haben ihr Maximum bei 1,0µg/ml, bei 10µg/ml nimmt die Luciferaseaktivität ab, und eine beginnende Inhibition der Proliferation ist zu beobachten. Für die beiden Hopfenextrakte zeigt sich ein ähnliches Bild, es liegt aber jeweils eine Dosisabhängigkeit vor.

Ein interessantes Profil zeigen Soph, welches teilweise korreliert, und GLY, das eine vollständige Korrelation zeigt. In der geringsten Konzentration zeigt Soph im Luciferase-Assay nur wenig Aktivität, die aber für die beiden höheren stark ansteigt bis etwa auf die Hälfte derer von E₂. Die Proliferation wird durch Soph in allen drei Konzentrationen gleichermaßen und in gleicher Stärke wie durch E₂ induziert. Dies könnte ein Hinweis auf die hohe Sensitivität des Proliferationsassays im Hinblick auf estrogene Effekte sein. Ein ähnliches Verhalten, wenn auch schwächer in seiner Ausprägung, zeigt GLY im Luciferase-Assay. Als einer der beiden einzigen Extrakte (der andere ist SAR) hat GLY jedoch in seiner geringsten Konzentration von nur 0,1µg/ml eine inhibitorische Wirkung auf die Proliferation im Vergleich zu E₂. Bei der mittleren Konzentration wird ein Maximum erreicht, das über der Stimulation durch E₂ liegt, dann erfolgt ein leichter Abfall. Ein ebenfalls interessantes Bild liefert SAR, welches dosisabhängig die stärksten Effekte im Luciferase-Assay zeigt. Im Proliferationsassay verhält sich SAR ähnlich wie GLY, die Werte für 0,1µg/ml und 1,0µg/ml fallen in Relation mit der höheren Potenz im Hinblick auf die Transaktivierung auch stärker aus, für 10µg/ml ist jedoch bereits eine beginnende inhibitorische Wirkung auf das Zellwachstum zu erkennen. Dass diese den Beginn einer unspezifischen Zytotoxizität darstellt, ist zu vermuten.

Keine Korrelation der Ergebnisse ist bei PHA und RHA festzustellen. Im Luciferase-Assay zeigen beide eine vergleichbar äußerst geringe Aktivität, während PHA einen biphasischen Effekt auf die Proliferation hat (in den geringen Konzentrationen entspricht seine Wirkung knapp der von E₂, für 10µg/ml ist eine beginnende Inhibition zu erkennen) und RHA in allen drei Konzentrationen ebenso stark wie E₂ die Proliferation stimuliert.

3.4.4 Regulation der ER-Expression in MCF-7 Zellen

Zusätzlich zur qualitativen Analyse mittels RT-PCR, die zeigt, ob beide ER-Subtypen in der Zelllinie vorhanden sind, wurden modellhaft zwei Phytoestrogene gewählt und ihr Einfluss auf die Regulation der ER-Expression im Vergleich zu EE unter Anwendung der Realtime PCR untersucht. Die Behandlung fand mit und ohne Parallelbehandlung durch den ER-Antagonisten ICI statt. Gewählt wurden die beiden Phytoestrogene, 8-PN und SAR, welche die höchste Aktivität im Luciferase-Assay zeigten.

Untersucht wurde die ER-Regulation in MCF-7 Zellen aus folgenden Gründen: 1. Die Regulation des ER α - und ER β -Proteins soll bei der Aufklärung des Mechanismus helfen, mit dem die Phytoestrogene an der Modulation der Proliferation beteiligt sind (144);

2. Für ER α und ER β wird eine Rolle im Brustkrebsgeschehen vermutet (166;260).

3. Maggiolini et al. (198) fanden heraus, dass ER α die proliferative, nicht jedoch die zytotoxische Wirkung in MCF-7 Zellen vermittelt. Unter diesem Aspekt ist die Regulation dieses Rezeptors durch die Phytoestrogene interessant. Maggiolini selbst zeigte, dass ER α -mRNA und -Protein durch die Phytoestrogene Genistein und Daidzein herunter reguliert wird (198;216).

Die Untersuchung fand mittels RT-PCR und Realtime RT-PCR statt.

Die MCF-7 Zellen wurden mit der Lösungsmittelkontrolle, bzw. 10^{-8} M E₂ behandelt und nach Aufbereitung der RNA sowie reverser Transkription zunächst mithilfe konventioneller PCR auf die Existenz von ER α und ER β untersucht. Sowohl ER α - als auch ER β -mRNA lassen sich in MCF-7 Zellen nachweisen, wobei ein relatives Überwiegen von ER α offensichtlich ist (Abb. 36). Des Weiteren ist erkennbar, dass die ER α -Expression durch Behandlung mit E₂ unverändert bleibt. Die Expression von ER β hingegen ist in der LM-Kontrolle deutlich stärker ausgeprägt als bei mit E₂ behandelten Zellen.

Die Realtime Analyse hat ergeben, dass ER α mit einem über 450-fachen Überschuss in dieser Zelllinie gegenüber ER β vorhanden ist; bezogen auf die unbehandelte Kontrolle sind dies 3,06pg/ml ER α und 0,007pg/ml ER β (Abb. 37). Durch Behandlung mit 10^{-9} M EE wird die Expression von ER α auf 47% ihres Kontrollwertes herunter reguliert, ER β im Vergleich dazu noch mehr, und zwar auf nur 36%. Dies bedeutet, dass sich das Verhältnis von ER α zu ER β zugunsten eines noch höheren Faktors, und zwar von 590, verschiebt. In beiden Fällen übt ICI (10^{-7} M) allein einen von der Stärke her vergleichbaren Effekt auf die Rezeptorexpression aus, jedoch in entgegengesetzter Richtung: Im Falle von ER α findet eine 25%ige Herabregulation verglichen mit der Mediumkontrolle statt, die ER β -Expression hingegen wird um 19% heraufreguliert durch Behandlung mit ICI. Der Unterschied der Konzentration von ER α zur

Konzentration von ER β wird dadurch verringert auf den Zahlenwert 280. Durch Parallelbehandlung der Zellen mit 10⁻⁹M EE und 10⁻⁷M ICI wird der Rezeptorspiegel auf einen zwischen den beiden Einzelbehandlungen liegenden Wert gebracht, ER α auf 59% und ER β auf 82% verglichen mit dem Kontrollwert.

Auch 0,1 μ g/ml 8-PN und 10 μ g/ml SAR vermögen den ER α -Spiegel zu senken, 8-PN auf 61%, SAR sogar stärker als EE auf 32%. Durch Parallelbehandlung mit ICI ändert sich ER α -Expression im Falle von 8-PN nicht signifikant, im Falle von SAR wird sie auf 54% angehoben, ein ähnlicher Effekt, wie er für EE zu beobachten ist (Anhebung durch parallele Behandlung von 59% allein auf 75%).

Während in Bezug auf ER α SAR potenter war als 8-PN, verhält es sich bei der Regulation von ER β anders herum. Der differentielle Effekt der Phytoestrogene, ihr SERM-Charakter, wird hier deutlich. Beinahe so stark wie EE reguliert 10 μ g/ml SAR die ER β -Expression auf 43% herunter, unter Behandlung mit 0,1 μ g/ml 8-PN ist ER β nur noch in Spuren vorhanden (im Diagramm kaum sichtbar auf 0,4%). Bei beiden Phytoestrogenen bewirkt parallele Behandlung mit ICI wie beim EE eine Erhöhung der ER β -Expression, und zwar auf immerhin 68% für 8-PN (das bedeutet gleichzeitig eine 68%ige Steigerung gegenüber 8-PN allein) und auf 104% für SAR verglichen mit dem Medium.

Behandlung mit 8-PN hebt das Verhältnis von ER α zu ER β in einem noch stärkeren Ausmaß als EE an (größer als 1000), SAR hingegen erniedrigt das Verhältnis sogar gegenüber der Mediumkontrolle erheblich, und zwar auf „nur“ 331-faches Überwiegen von ER α .

Für die ER-Regulation in MCF-7 Zellen ist festzuhalten, dass a) beide ER-Subtypen durch Estrogenbehandlung herunter reguliert werden, und zwar ER α um den Faktor 2 und ER β um knapp 3; b) dass Phytoestrogene in der Lage sind, die ER-Expression in gleichem Maße wie oder stärker als EE zu regulieren; c) dass Phytoestrogene das relative Verhältnis von ER α zu ER β zu modulieren vermögen; und d) dass die Effekte durch ICI umgekehrt, bzw. abgeschwächt werden, das heißt sie sind zumindest teilweise ER-vermittelt.

Die mittels Realtime-RT-PCR erzeugten Ergebnisse bestätigen im Allgemeinen den Befund der konventionellen RT-PCR mit dem Unterschied, dass die mit Realtime PCR festgestellte ER α -Herabregulation durch EE anscheinend nicht durch E₂ erzeugt wurde. Zum einen handelt es sich bei der Auswertung der RT-PCR aber nur um eine semiquantitative Analyse, sie ist bei weitem nicht exakt; zum anderen ist EE ein potenteres synthetisches Estrogen als das endogene E₂, in Zellkultur wird es nicht so schnell wie E₂ metabolisiert und verliert damit nicht an Wirkung. Ein stärkerer Effekt des EE ist zu erwarten und auch zu verfolgen.

Abbildung 36

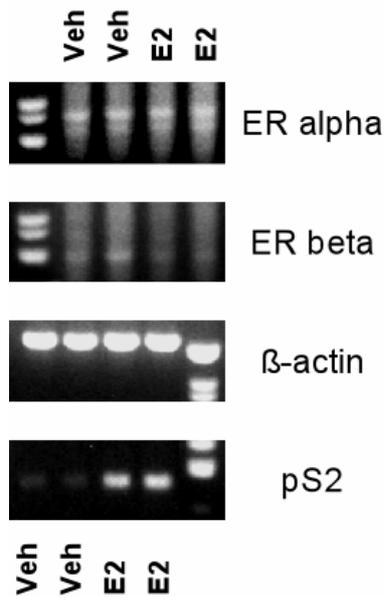
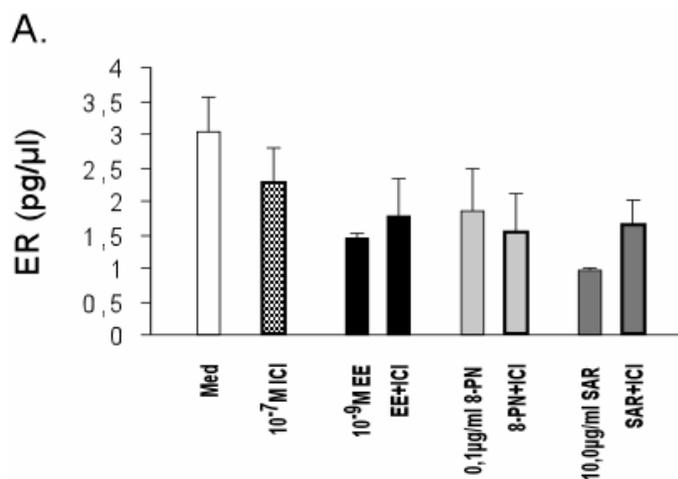


Abb. 36: ER-Expression in MCF-7 Zellen mittels RT-PCR. Die MCF-7 Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Anschließend wurden sie unter Zusatz von 10^{-8} M E_2 , bzw. in reinem Medium mit 10% cs-FBS in Doppelbestimmung für 24 Stunden behandelt. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und $2\mu\text{l}$ cDNA in der RT-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation der Rezeptorproteine wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 2.B). Die β -Actin-Genexpression dient als Kontrolle für die reverse Transkription, die pS2-Genexpression für die Behandlung mit Medium, bzw. 10^{-8} M E_2 . [3.4.3]

Abbildung 37



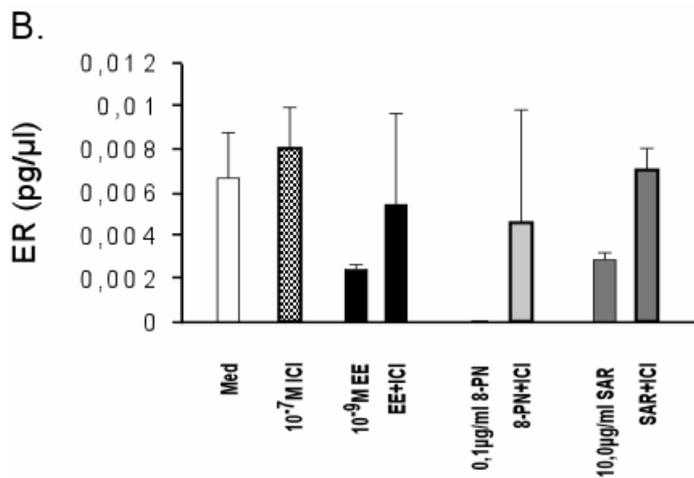


Abb. 37.A und B: ER-Expression in MCF-7 Zellen mittels Realtime-RT-PCR. Die MCF-7 Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Die Behandlung der Zellkultur mit den angegebenen Substanzen (10⁻⁷M ICI, 10⁻⁹M EE, 0,1µg/ml 8-PN, 10,0µg/ml SAR) wurde in Doppelbestimmung für weitere 24 Stunden durchgeführt. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2µl cDNA in der Realtime-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation der Rezeptorproteine wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 4). Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Doppelbestimmung +/- SD. [3.4.3]

3.5 Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf das Endometrium

Wie einleitend beschrieben, stellt das Endometrium als einschichtiges Epithel aus Bindegewebe und tubulären Drüsen die Schleimhaut der Gebärmutter dar. Es besteht aus unterschiedlichen Zellpopulationen wie Epithel- und Stromazellen und wird hauptsächlich durch Sexualhormone (Geschlechtshormone) reguliert (218). Nach dem Ergebnis des PEPI Trials erkrankten rund ein Drittel aller Frauen unter HRT mit Estrogenen an einem Endometriumkarzinom. Bei kombinierter HRT ist kein erhöhtes Risiko für ein solches Karzinom zu verzeichnen, jedoch steigt unter diesem Therapieschema das Brustkrebsrisiko an und die positive Wirkung auf den Lipidspiegel wird nivelliert (28). Für Phytoestrogene, genauer Isoflavone und Lignane, wurde kürzlich gezeigt, dass ihr Konsum mit einem erniedrigten Risiko für ein Endometriumkarzinom einhergeht, ein Effekt der bei postmenopausalen Frauen verstärkt zu beobachten ist (112).

Holinka et al. (234) fanden in der Ishikawa Zelllinie ein geeignetes Modell zur Untersuchung der Mechanismen estrogener Wirkungen am Endometrium und etablierten die Aktivität der Alkalischen Phosphatase als zuverlässigen Endpunkt zur Analyse hormoneller Wirkungen in dieser Zelllinie.

3.5.1 Regulation der Alkalischen Phosphatase in Ishikawa Zellen

In dieser Arbeit wurde die Induzierbarkeit der AP in Ishikawa Zellen ausgenutzt, um die Estrogenität pflanzlicher Verbindungen und Extrakte zu untersuchen. Diese wurden in einem Konzentrationsbereich zwischen 10^{-4}M bis 10^{-6}M eingesetzt, die Positivkontrolle Ethinylestradiol in der Konzentration 10^{-8}M . Die Untersuchung der Dosis-Wirkungs-Beziehungen bei Wober et al. (251) zeigt die Eignung der Konzentrationen in diesem System. Alle getesteten Proben sind in der Lage, die AP-Aktivität zu induzieren, jedoch liegen die Effekte in einem Bereich von 20% bis maximal 85% der Wirkung von EE. Die Ergebnisse sind in Abbildung 38.A und B relativ zur Mediumkontrolle grafisch dargestellt. Eine Behandlung mit Medium im Vergleich zum Lösungsmittel Ethanol (5 $\mu\text{l/ml}$) ergab keinen signifikanten Unterschied in der AP-Aktivität (Daten nicht gezeigt), so dass als Negativkontrolle reines Medium verwendet wird.

Durch EE wird die AP-Aktivität ungefähr zehnfach erhöht. Die höchste AP Aktivität der Proben aus *Humulus lupulus* zeigt der ethanolische Spezialextrakt (HE-1) in der Konzentration 10 $\mu\text{g/ml}$, sie liegt mit einer etwa 8-fachen Aktivierung 20% niedriger als die des EE. Es folgen die isolierten Inhaltsstoffe Xanthohumol (XH) und 0,1 $\mu\text{g/ml}$ 8-Prenylnaringenin (8-PN). In den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g/ml}$ und 1,0 $\mu\text{g/ml}$ stimuliert XH die AP ca. 6,0-fach, 8-PN in den gleichen Konzentrationen 5,0-5,5-fach.

Isoxanthohumol (IXH) und 6-Prenylnaringenin (6-PN) zeigen ebenfalls in den beiden geringeren Konzentrationen mit dem Maximum bei 1,0 $\mu\text{g/ml}$ ihre stärksten Effekte, die bei 6-PN mit ca. 3,5-facher Erhöhung der Aktivität etwas oberhalb derer des IXH (ca. 3-fach) liegen. Der entfettete Ethanolextrakt (HE-2) hingegen zeigt mit Abstand bei 10 $\mu\text{g/ml}$ die stärkste Stimulation, und zwar 3,5-fach. Für die beiden Extrakte ist eine Dosisabhängigkeit zu beobachten, bei den vier Einzelsubstanzen liegen die höchsten Konzentrationen bereits im zytotoxischen Bereich.

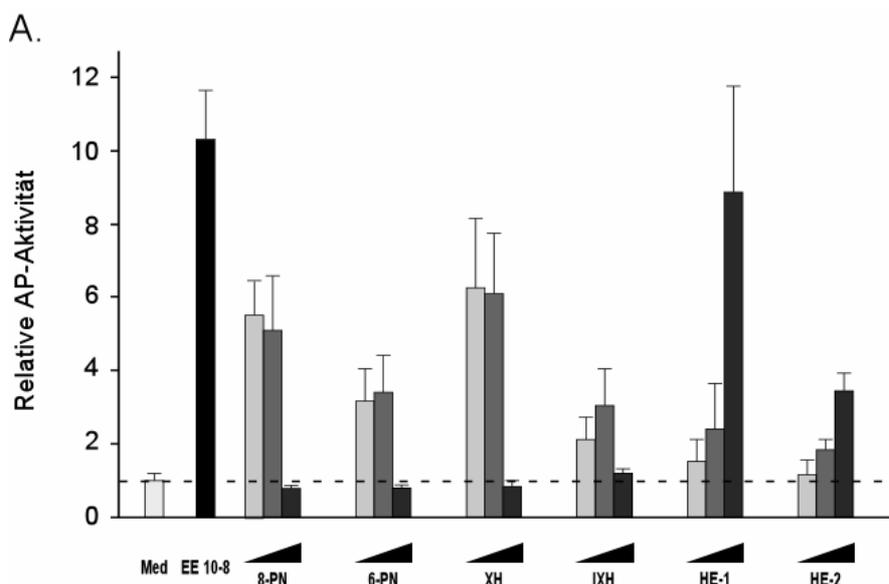
Da die maximalen Wirkungen bereits bei den niedrigeren Konzentrationen erreicht sind, wurde für XH eine Verdünnungsreihe als modellhaftes Beispiel angefertigt, die den Verlauf der Stimulation dosisabhängig verfolgt (Abb. 39.A). Gleichzeitig wurde auch eine Verdünnungsreihe für EE in den Konzentrationen 10^{-12}M bis 10^{-6}M ermittelt. Im Vergleich dazu umfassen die für XH eingesetzten Konzentrationen einen Bereich von $0,5 \times 10^{-7}\text{M}$ bis $2,5 \times 10^{-5}\text{M}$ (0,01 $\mu\text{g/ml}$ bis 5,0 $\mu\text{g/ml}$). Das EE hat sein Maximum der AP-Aktivierung, eine 17-fache Stimulation gegenüber der Mediumkontrolle, bei 10^{-7}M erreicht, ein steiler Anstieg seiner Wirksamkeit ist vom Wert für 10^{-11}M hin zu 10^{-10}M zu verzeichnen. Die AP-Aktivität wird hier von einer knapp 4,0-fachen auf eine gut 12-fache hochreguliert. Genau in diesem

Bereich befinden sich die Effektivitäten der XH-Konzentrationen. Die maximale Wirkung zeigt 0,5µg/ml XH mit einer 6,5-fachen Aktivität der AP verglichen mit dem Medium. In der Konzentration 0,01µg/ml zeigt XH bereits eine 4-fache AP-Aktivität, der Wert für 0,05µg/ml (2,8-fach) fällt heraus, da für 0,1µg/ml XH (4,8-fache AP-Aktivität) ein Anstieg in der Dosis-Wirkungskurve gegenüber 0,01µg/ml zu verzeichnen ist. Bei der höchsten getesteten Konzentration ist die AP-Aktivität wieder auf den Ausgangswert von 4,0 zurück gefallen.

Bei den unterschiedlichen Pflanzenextrakten zeigt der Extrakt des Japanischen Perlschnurbaumes (Soph) eine stärkere AP-Aktivierung als der Süßholzwurzel-Extrakt (GLY), sie induzieren die AP knapp 30%, bzw. 40% schwächer als EE. Gefolgt werden sie von den Extrakten aus Gartenbohne (PHA), Besenginster (SAR), dann Traubensilberkerze (CIM) und Soja (SOY) (Abb. 38.B). Die Effekte aller Extrakte sind überwiegend dosisabhängig. Bei Soph steigt die Effektivität von 0,1µg/ml zu 1,0µg/ml stark an, und zwar von einer 2,5- auf eine 7,2-fache gegenüber der Mediumkontrolle, der Unterschied zu 10µg/ml ist nur marginal. Der Extrakt der Süßholzwurzel (GLY) zeigt bei 10µg/ml eine 6-fache Stimulation der AP, es folgen bei der gleichen Konzentration PHA und SAR ungefähr gleichauf mit 5-, bzw. 4,5-facher Stimulation. Nur wenig aktiv sind in diesem Assay SOY und CIM, bei 10µg/ml induzieren sie die AP nur 2,5, bzw. 3,0-fach.

Es ist auffällig, dass die Extrakte bei der Konzentration 10µg/ml noch nicht im zytotoxischen Bereich liegen, anders verhält es sich mit den Einzelsubstanzen, was auch Kayisli et al. fanden (218).

Abbildung 38



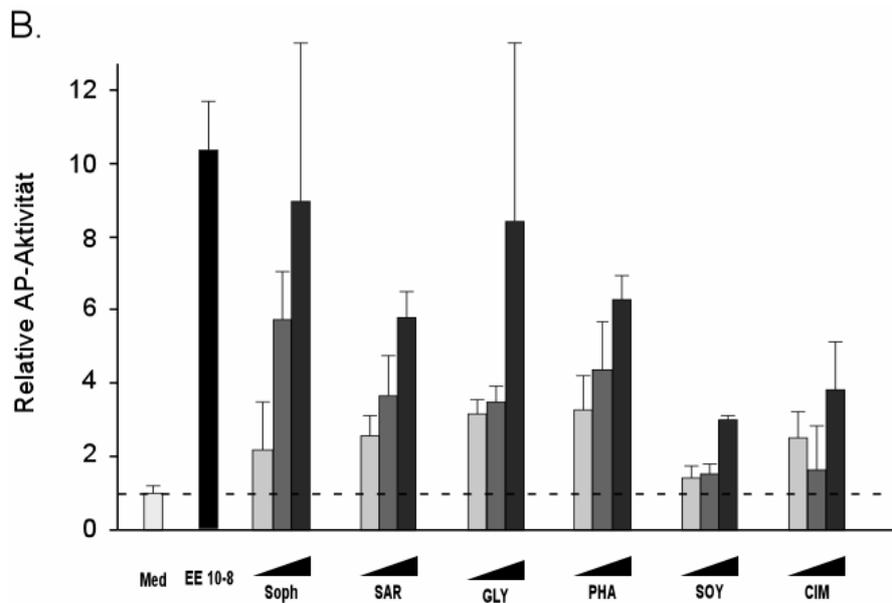


Abb. 38: Regulation der Alkalischen Phosphatase-Aktivität durch Ethinylestradiol (EE) und Phytoestrogene in Ishikawa Zellen. Pro Well (in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurden 10.000 Zellen in DMEM/F12 mit 10% FBS ausplattiert und nach einem Tag für weitere 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. In serumfreiem DMEM/F12 erfolgte die Behandlung mit den angegebenen Proben (0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml) oder EE (10^{-8} M) für 48 Stunden. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität bestimmt, gegen den Proteingehalt normalisiert und relativ zum Medium dargestellt. **Abb. 38.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 38.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte. Die Balken zeigen den Mittelwert jeder 4-fach-Bestimmung +/- SD. [3.5.1]

3.5.1.1 Überprüfung der synergistischen bzw. antagonistischen Effekte von Phytoestrogenen in Anwesenheit von Estrogen am Beispiel von Xanthohumol und Ethinylestradiol

In diesem Experiment sollte untersucht werden, ob bei gleichzeitiger Anwendung eines Estrogens (EE) und eines Phytoestrogens (XH) eine Reduktion des Effektes im Sinne einer antagonistischen Wirkung erzielt wird, wie es bei partiellen Agonisten/Antagonisten zu erwarten wäre. Die beiden Substanzen wurden ausgewählt, weil ihre AP-Aktivität vergleichbar ist. Die entsprechenden Konzentrationen wurden aus den Verdünnungsreihen der beiden Substanzen ermittelt (Abb. 39.A). Für EE liegt die Konzentration zwischen 10^{-11} M und 10^{-10} M, für XH bei 0,5µg/ml, bzw. 1,0µg/ml (dies entspricht ungefähr $0,25 \times 10^{-5}$ M und $0,5 \times 10^{-5}$ M). Wie auch bei Kayisli et al. beschrieben (218), erniedrigt eine Zugabe des Isoflavons die AP-Aktivität im Vergleich zu EE allein jedoch kaum (Abb. 39.B). Ein Effekt ist vermutlich zu erwarten bei Vorbehandlung durch XH und anschließender EE-Behandlung, wie Kayisli et al. es zeigen. Zu erwähnen ist, dass der Konzentrationsunterschied in diesem

Experiment mit einem Faktor von 10^4 zwei Zehnerpotenzen größer ist als der von Kayisli et al. gewählte (218).

In unserem Experiment konnte eine milde Reduktion der durch $3 \times 10^{-11} \text{M}$ und 10^{-10}M EE hervorgerufenen Stimulation der AP (Abb. 39.B) gezeigt werden. Die höhere Konzentration, $1,0 \mu\text{g/ml}$ XH, hat hier den stärkeren Einfluss gegenüber der geringeren ($0,5 \mu\text{g/ml}$).

Abbildung 39

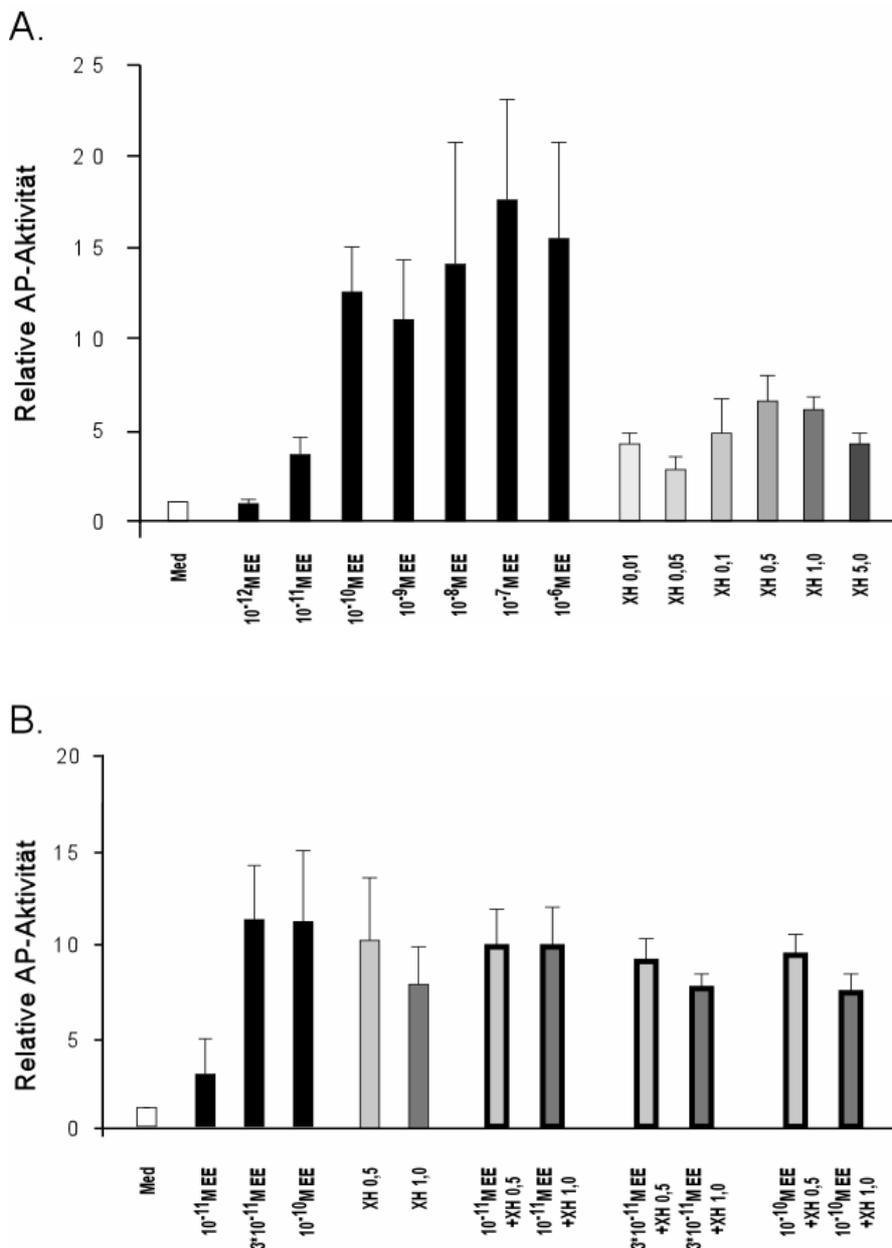


Abb. 39.A: Dosisabhängiger Verlauf der Stimulation der Alkalischen Phosphatase durch EE und Xanthohumol in Ishikawa Zellen. Pro Well (in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurden 10.000 Zellen in DMEM/F12 mit 10% FBS ausplattiert und nach einem Tag für weitere 24 Stunden mit 10% cs-FBS

enthaltendem Medium inkubiert. In serumfreiem DMEM/F12 erfolgt die Behandlung mit Ethinylestradiol (EE) (10^{-12}M - 10^{-6}M) oder Xanthohumol (XH) ($0,01\mu\text{g/ml}$ - $5,0\mu\text{g/ml}$) für 48 Stunden. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität bestimmt, gegen den Proteingehalt normalisiert und relativ zum Medium dargestellt. Die Balken zeigen den Mittelwert jeder 8-fach-Bestimmung \pm SD. [3.5.1.1]

Abb. 39.B: Überprüfung des antagonistischen Effektes eines Phytoöstrogens bei Parallelbehandlung mit EE in Ishikawa Zellen. Die Zellkultur erfolgt wie unter Abb. 39.A beschrieben. Zur Behandlung wurden eingesetzt: EE (10^{-11}M , $3 \cdot 10^{-11}\text{M}$ und 10^{-10}M), XH ($0,5\mu\text{g/ml}$, $1,0\mu\text{g/ml}$) sowie alle Zweierkombinationen dieser Behandlungen.

Die Balken zeigen den Mittelwert jeder 8-fach-Bestimmung \pm SD. [3.5.1.1]

3.5.1.2 Überprüfung der ER-Vermittlung der beobachteten Effekte

Um zu testen, ob die beobachteten Effekte ER-vermittelt sind, wurde von jeder Probe die Konzentration, welche die stärkste AP-Aktivität aufwies, mit dem ER α -Antagonisten ICI182,780 (10^{-7}M) parallel behandelt. Als Positivkontrolle diente EE (10^{-9}M). Die Parallelbehandlung mit ICI hemmt die AP-Aktivität, sie sinkt unter den Wert der Mediumkontrolle ab (Abb. 40). Eine Ausnahme bildet nur EE, welches aber gleichzeitig auch die am stärksten induzierende Substanz darstellt; somit ist die Relation der Hemmung der Enzymaktivität auch hier gewahrt. Die alleinige Behandlung mit ICI senkt die Aktivität sogar auf die Hälfte ihres Ausgangswertes (ihres Wertes in reinem Medium). Es zeigt sich, dass im Falle aller Substanzen die Wirkungen zu einem entscheidenden Teil über den ER vermittelt werden (251). ICI 182,780 als ER α -Antagonist wurde gewählt, da in Ishikawa Zellen dieser ER-Subtyp stark überwiegt (Abb. 41).

Abbildung 40

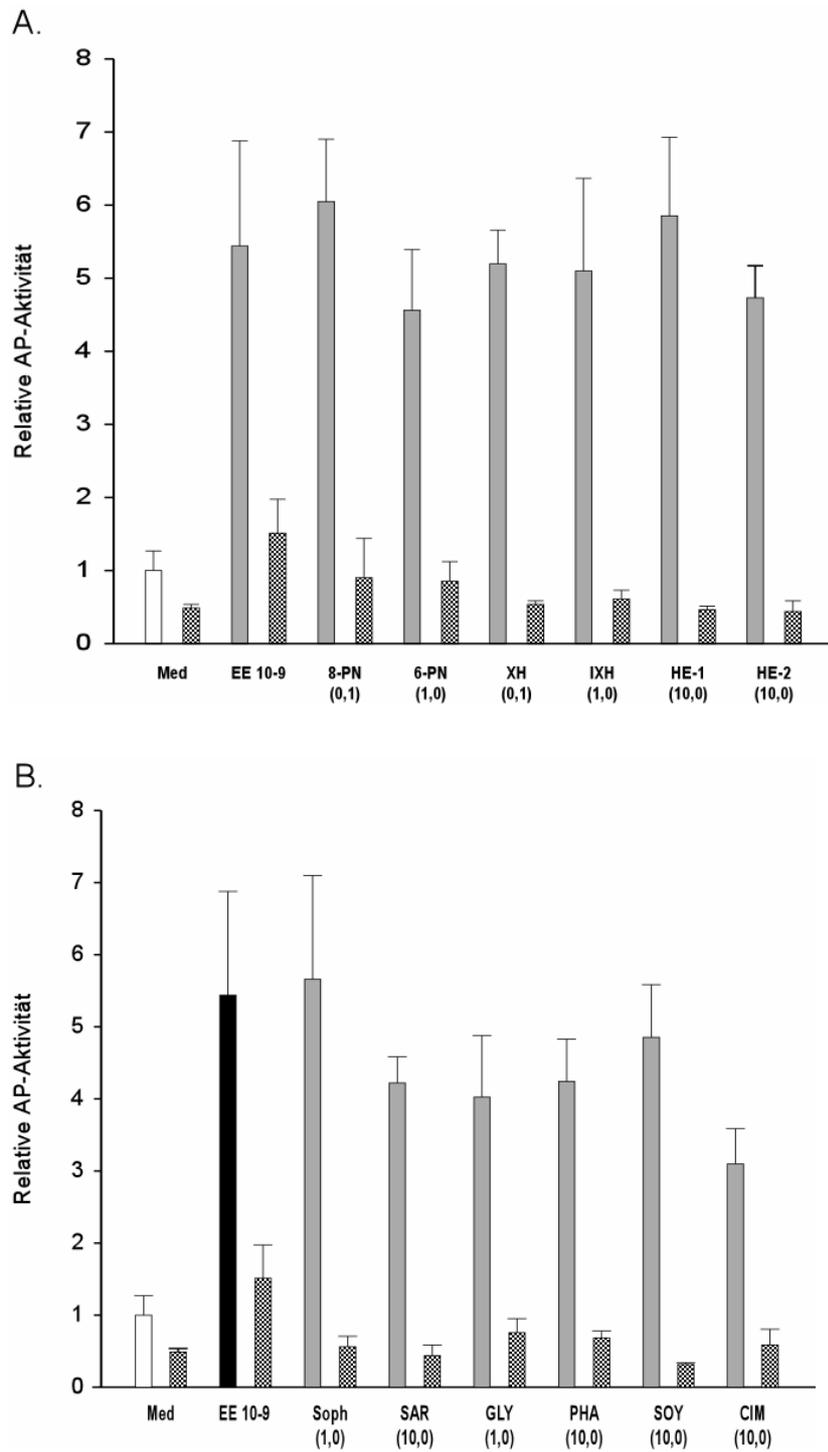


Abb. 40: Überprüfung der ER-Vermittlung der Stimulation der Alkalischen Phosphatase durch EE und Phytoestrogene in Ishikawa Zellen. Pro Well (in 96-Well-Mikrotiterplatten) wurden 10.000 Zellen in DMEM/F12 mit 10% FBS ausplattiert und nach einem Tag für weitere 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. In serumfreiem DMEM/F12 erfolgt die Behandlung mit den angegebenen Proben [$\mu\text{g}/\text{ml}$] oder EE [M] jeweils mit oder ohne Parallelbehandlung durch ICI182,780 (10^{-7}M) für 48 Stunden. Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase (AP)-Aktivität bestimmt, gegen den Proteingehalt

normalisiert und relativ zum Medium dargestellt. **Abb. 40.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 40.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte.

Die Balken zeigen den Mittelwert jeder 4-fach-Bestimmung +/- SD. Schraffierte Balken zeigen parallele Behandlung mit ICI an. [3.5.1.2]

Zusammenfassend lässt sich für diesen Assay festhalten: Die Induktion der Alkalischen Phosphatase ist ein ER-vermittelter Effekt. Keines der Phytoestrogene hat einen dem EE vergleichbar starken Effekt in dieser Zelllinie. Die stärksten Effekte zeigen 10µg/ml HE-1 (ca. 80% von EE), 1,0 bzw. 10µg/ml Soph (ca. 72% von EE) und 10µg/ml GLY (ca. 60% von EE). Da die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen als Modell und Maß für Estrogenität am Endometrium gilt, besteht die Hoffnung, dass die getesteten Substanzen auch in-vivo ein geringeres Risiko für die Entwicklung eines Endometriumkarzinoms aufweisen als synthetische Estrogene.

3.5.2 Regulation der ER-Expression in Ishikawa Zellen

Die Überprüfung der Existenz der ER-Subtypen und deren Konzentration, bzw. ihr relatives Verhältnis in der Menge zueinander fand mittels Realtime RT-PCR statt. Um auch den Einfluss auf die Regulation der ER-Expression durch Phytoestrogene im Vergleich zu EE und einer Mediumkontrolle zu untersuchen, wurden modellhaft zwei Extrakte gewählt, welche sich im Vergleich zu den übrigen Proben als die stärksten Estrogene in Bezug auf die AP-Induktion in Ishikawa Zellen erwiesen. Es handelt sich hierbei um den Hopfenextrakt HE-1 und den *Sophora*-Extrakt Soph, jeweils in der Konzentration 10µg/ml. Die Behandlung fand mit und ohne Parallelbehandlung durch den ER-Antagonisten ICI (10^{-7} M) statt, die Konzentration der Positivkontrolle EE beträgt, wie bei der entsprechenden Untersuchung in MCF-7 Zellen 10^{-9} M. Gleichzeitig dient das Ergebnis dieser Untersuchung auch als ein Hinweis darauf, welche Rolle die Modulation der ER-Konzentrationen für die beobachteten Effekte auf die AP-Regulation durch die Phytoestrogene spielt, und sie zeigt, ob die Regulation der ER-Subtypen durch die Behandlungen verändert wird, wie wir es in MCF-7 Zellen beobachtet haben.

Bezogen auf die unbehandelte Kontrolle befindet sich in den verwendeten Ishikawa Zellen ein 21-facher Überschuss an ER α gegenüber ER β , in absoluten Konzentrationen ausgedrückt sind dies 0,179pg/ml ER α und 0,009pg/ml ER β (Abb. 41.A und B). Im Unterschied zu den MCF-7 Zellen wird die ER α -Expression durch Behandlung mit 10^{-9} M EE um 100% heraufreguliert, die ER β -Expression nur um ca. 16%. Dies bedeutet, dass sich das Verhältnis von ER α zu ER β zugunsten eines höheren Faktors, und zwar eines von 37, verschiebt; das heißt, es handelt sich

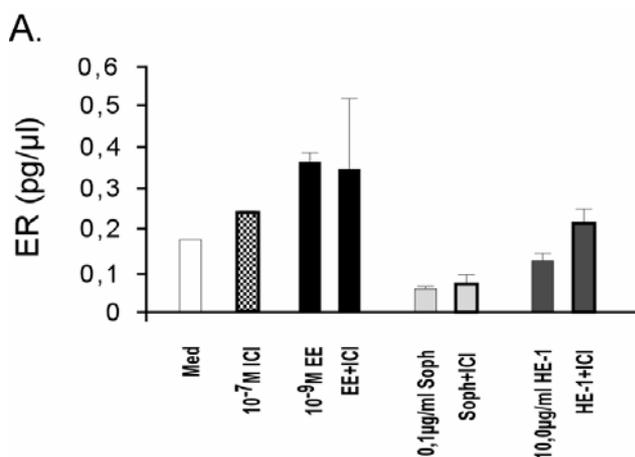
um die gleiche Richtung der Verschiebung des ER α /ER β -Verhältnisses wie in MCF-7 Zellen trotz unterschiedlicher Regulation des jeweils einzelnen Subtyps. Behandlung der Zellen mit ICI ergibt für beide ER-Subtypen Konzentrationen zwischen denen der Medium- und der EE-Kontrolle. Auch das Verhältnis ER α /ER β pendelt sich damit zwischen den beiden Behandlungen ein, und zwar auf den Wert 25. Eine Parallelbehandlung der Zellen mit 10⁻⁹M EE und 10⁻⁷M ICI übt keinen signifikanten Unterschied auf die ER-Konzentrationen aus.

Im Gegensatz zu EE und in viel stärkerem Ausmaß als ICI es vermag, senken die Extrakte HE-1 und Soph die Rezeptorspiegel erheblich: HE-1 um rund 30% gegenüber der Mediumkontrolle und Soph sogar um 67% im Falle von ER α und 41% durch HE-1 und wiederum stärker um 60% durch Soph im Falle von ER β . Hier wird der antiestrogene Charakter von Soph und HE-1 sehr deutlich. Die Parallelbehandlung der Extrakte mit ICI hat keinen großen Einfluss, es ist lediglich eine leichte Anhebung der ER-Spiegel zu beobachten.

Auf das Verhältnis von ER α zu ER β wirkt sich HE-1 dem ICI vergleichbar aus, es erhöht den Quotienten ER α /ER β vom Wert 21 der Mediumkontrolle auf 25 (im Vergleich dazu EE-Behandlung mit 37). Interessanterweise senkt Soph diesen Quotienten auf 17,3 und damit als die einzige Behandlung, die das Verhältnis in diese Richtung zu regulieren vermag.

Bezüglich der ER-Regulation in Ishikawa Zellen ist festzuhalten, dass 1. beide ER-Subtypen durch Estrogenbehandlung in entgegengesetzter Weise zu den Pflanzenextrakten reguliert werden, und zwar werden sie in ihrer Konzentration erhöht durch EE und herab reguliert durch die Extrakte; 2. dass Phytoestrogene das relative Verhältnis ER α zu ER β zu modulieren vermögen; 3. dass die antiestrogenen Effekte von ICI durch die Phytoestrogene übertroffen werden, und 4. dass eine Modulation des Verhältnisses von ER α zu ER β in dem Ausmaß wie sie hier stattfand, keinen nennenswerten Einfluss auf die AP-Stimulation hat.

Abbildung 41



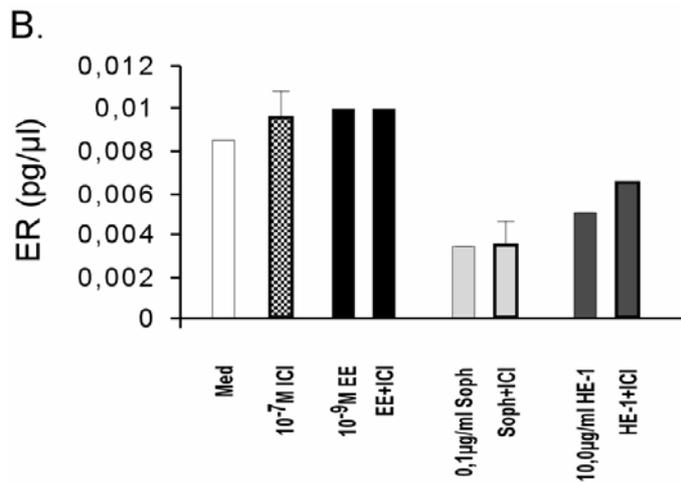


Abb. 41.A und B: ER-Expression in Ishikawa Zellen mittels Realtime-RT-PCR. Die Ishikawa Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Die Behandlung der Zellkultur mit den angegebenen Substanzen (10⁻⁷M ICI, 10⁻⁹M EE, 0,1µg/ml 8-PN, 10,0µg/ml SAR) wurde in Doppelbestimmung für weitere 24 Stunden durchgeführt. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2µl cDNA in der Realtime-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation der Rezeptorproteine wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 4). Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Doppelbestimmung +/- SD. [3.5.2]

3.6 Wirkungen der ausgewählten pflanzlichen Proben auf die Leber

3.6.1 Regulation der Genexpression in Fe33 Zellen mittels Realtime-RT-PCR

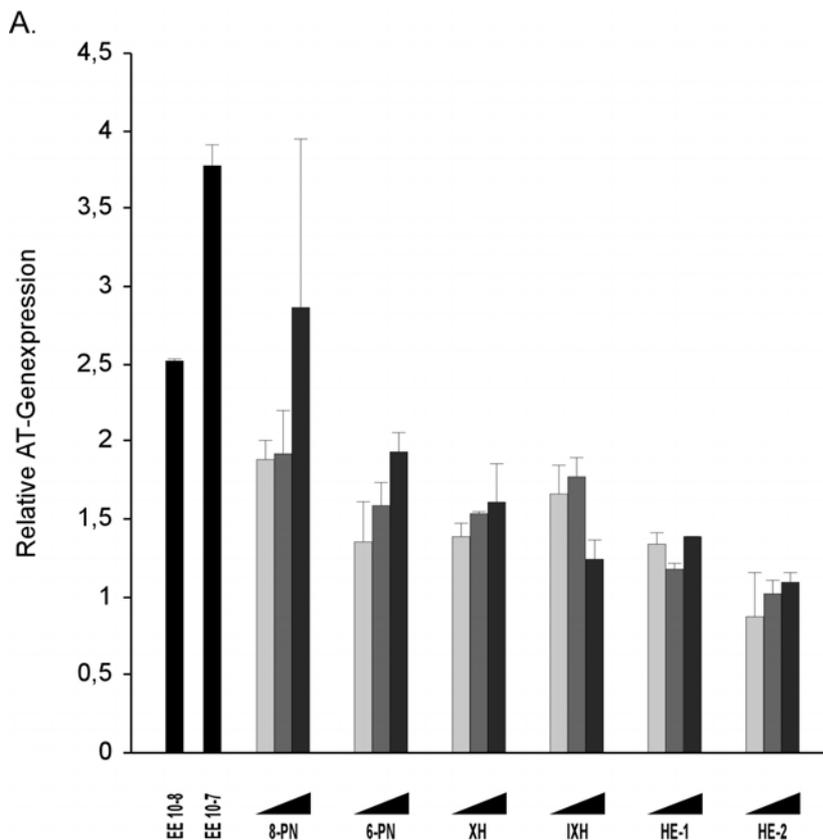
Unter Anwendung der Realtime RT-PCR wurden in der nur ER α exprimierenden Rattenhepatomzelllinie Fe33 estrogenregulierbare hepatische Gene untersucht. Gegenüber der Untersuchung der Genexpression mittels semiquantitativer RT-PCR besteht hier der große Vorteil, dass sich die beobachteten Effekte der Phytoestrogene verglichen mit E₂ exakt quantifizieren lassen. Zur Untersuchung der differentiellen Wirkungen wurde zum einen das Angiotensinogen (AT)-Gen gewählt, welches von physiologischer Bedeutung bei der Blutdruckregulation ist. Als zweites untersuchten wir das bisher als am stärksten estrogenregulierte identifizierte Gen in dieser Zelllinie, das Calcium Binding Protein (9k) (CaBP9k) (240;241). Die Effekte von EE auf die mRNA-Spiegel dieser Gene wurden im Vergleich zu den Phytoestrogenen getestet. Die eingesetzten Konzentrationen sind wie gehabt 0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml in serumfreiem Medium. Als Positivkontrolle dient 10⁻⁸M EE (bzw. 10⁻⁷M EE zusätzlich bei AT) und als Negativkontrolle das reine Medium, in dem die Proben gelöst sind. Normalisiert sind die Werte gegen den Kalibrator, welcher sich auf eine

mit reinem serumfreiem Medium behandelte Fe33-Kultur bezieht und in der grafischen Darstellung gleich „1“ gesetzt wird.

Wie auch in der Literatur zu finden, bewirkte EE in der Konzentration 10^{-8} M einen ca. 2,6-fachen Anstieg der AT-Expression (222), 10^{-7} M EE einen ca. 4-fachen Anstieg (Abb. 42). Die getesteten Phytoestrogene weisen maximal eine 3-fache Stimulation auf.

Die hohe Empfindlichkeit des CaBP9k-Gens gegenüber Estrogen zeigt sich in dem immensen Anstieg der Expression infolge Behandlung mit 10^{-8} M EE, und zwar ungefähr um den Faktor 190 (Abb. 43). Thomae et al. (241) konnten ebenfalls mit Realtime PCR eine 60-fache Stimulation zeigen. Die getesteten Phytoestrogene hingegen regulieren die CaBP9k-Expression maximal um das 6-fache herauf, was auch Thomae et al. kürzlich für Genistein und 8-PN beschrieben (241). Deutliche Unterschiede und Tendenzen lassen sich jedoch differenziert erkennen.

Abbildung 42



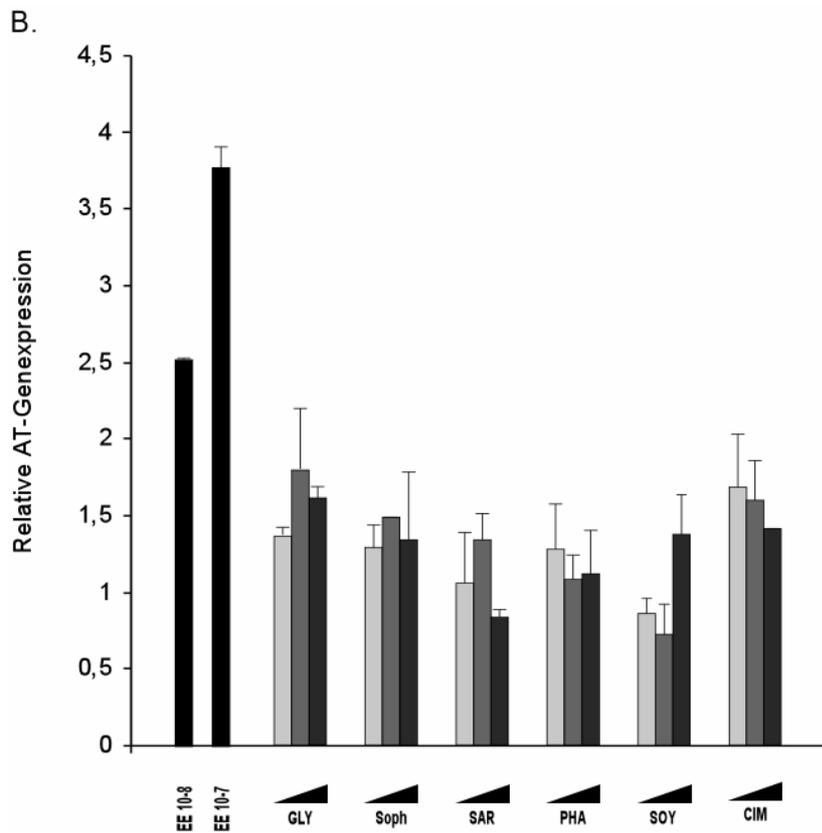


Abb. 42: Regulation der Angiotensinogen mRNA-Expression durch EE und Phytoestrogene mittels Realtime-RT-PCR. Fe33 Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml (d.h. $0,5 \times 10^{-6} \text{M}$ – $0,5 \times 10^{-4} \text{M}$) oder 10^{-7}M , bzw. 10^{-8}M EE hinzu gegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2µl cDNA in der Realtime-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation des Angiotensinogen (AT) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 4). Jede amplifizierte mRNA wird im Rahmen der quantitativen Analyse auf seinen „Coefficient File“ (s. Text) bezogen. **Abb. 42.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 42.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte.

Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Doppelbestimmung +/- SD. [3.6.1]

Abbildung 43

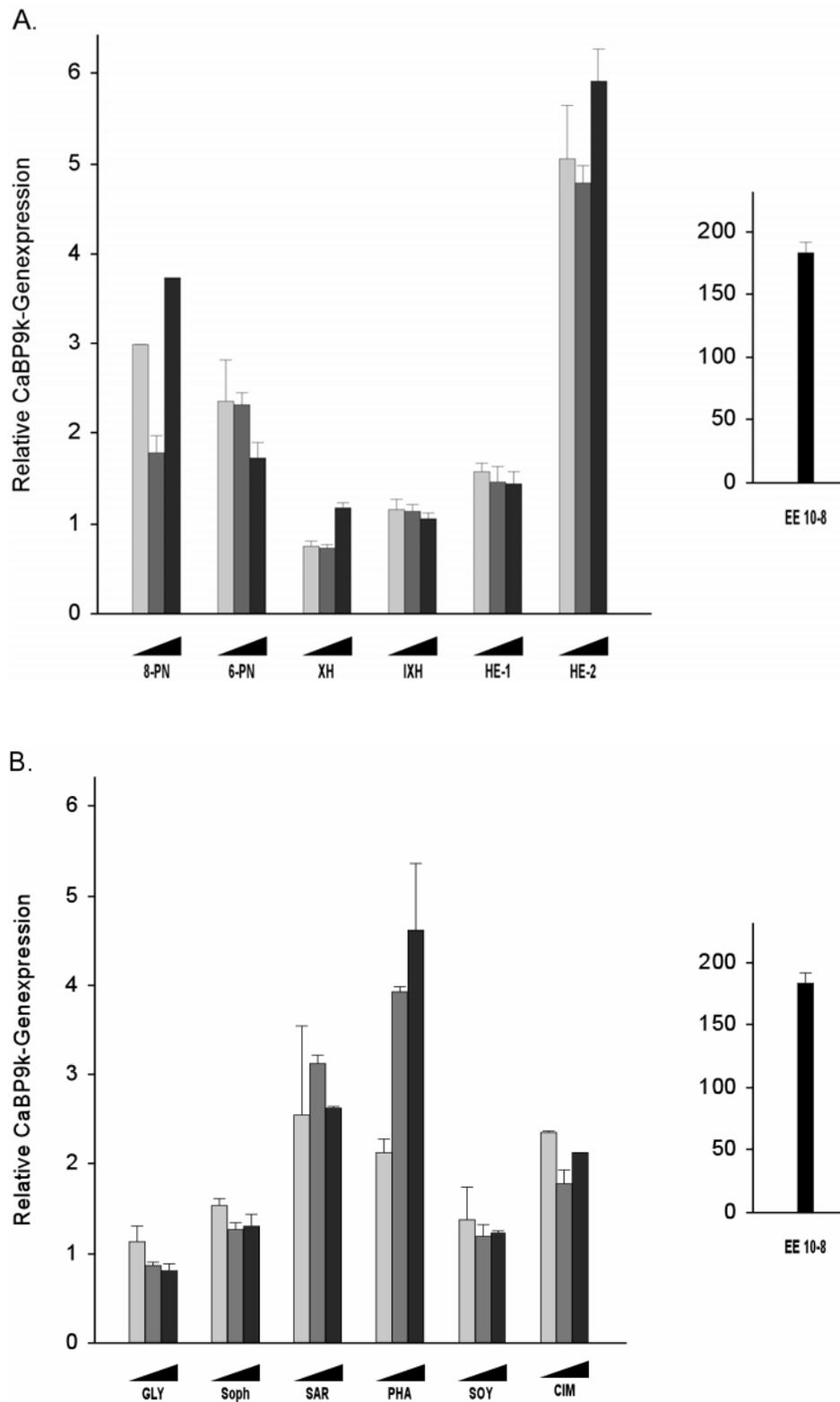


Abb. 43: Regulation der Calcium Binding Protein (9k)-Genexpression mRNA-Expression durch EE und Phytoestrogene mittels Realtime-RT-PCR. Fe33 Zellen wurden in 6-Well-Platten bis zu einem Konfluenzgrad von 70-80% in DMEM/F12 mit 10% FBS kultiviert und für 24 Stunden mit 10% cs-FBS enthaltendem Medium inkubiert. Für weitere 24 Stunden wurden die angegebenen Proben in den Konzentrationen 0,1µg/ml, 1,0µg/ml

und 10,0µg/ml (d.h. $0,5 \times 10^{-6} \text{M}$ – $0,5 \times 10^{-4} \text{M}$) oder 10^{-8}M EE hinzugegeben. Die mRNA wurde geerntet und isoliert, in cDNA umgeschrieben und 2µl cDNA in der Realtime-PCR eingesetzt. Für die Amplifikation des Calcium Binding Proteins 9k (CaBP9k) wurden spezifische Primer eingesetzt (Tab. 4). Jede amplifizierte mRNA wird im Rahmen der quantitativen Analyse auf seinen „Coefficient File“ (s. Text) bezogen. **Abb. 43.A:** Proben aus dem Hopfen. **Abb. 43.B:** Unterschiedliche Pflanzenextrakte.

Die Balken zeigen den Mittelwert jeder Doppelbestimmung +/- SD. [3.6.1]

3.6.1.1 Die Calcium Binding Protein (9k)-Genexpression

Der entfettete Ethanolextrakt HE-2 weist in den drei getesteten Konzentrationen, besonders 10µg/ml, die höchsten Effekte auf die CaBP9k-Expression im Vergleich zu den Substanzen aus Hopfen auf, aber auch im Vergleich zu allen weiteren Proben. Sie bewegen sich zwischen einer 5- und 6-fachen Stimulation der Expression gegenüber der Mediumkontrolle (Abb. 43). Interessant ist, dass der andere ethanolsche Spezialextrakt aus dem Hopfen, HE-1, hingegen beinahe inaktiv ist (max. 1,5-fache Stimulation). Völlig ohne Effekt sind die Inhaltsstoffe XH und IXH, ersterer wirkt sogar leicht inhibitorisch in den Konzentrationen 0,1µg/ml und 1,0µg/ml. In der Stärke dazwischen liegen 8-PN mit einer maximalen Stimulation vom Faktor 3,8 bei 10µg/ml und 6-PN mit maximaler Wirkung von ca. 2,4 für 0,1µg/ml und 1,0µg/ml.

Die Betrachtung der unterschiedlichen Pflanzenextrakte ergibt folgende Reihenfolge in absteigender CaBP9k-Expressions-Aktivierung: PHA > SAR > CIM > Soph ≥ SOY > GLY. Bei PHA liegt eine starke Dosisabhängigkeit vor, die höchste Konzentration erreicht einen Wert von ca. 5,0 gegenüber der Mediumkontrolle. SAR zeigt einen Maximalwert von 3,1 für die mittlere Konzentration, der Verlauf könnte eine reverse Dosisabhängigkeit darstellen, die Konzentration von 0,1µg/ml hat jedoch eine sehr große Standardabweichung. Auch CIM zeigt reverse Dosisabhängigkeit, 0,1µg/ml stimuliert die CaBP9k-Expression ungefähr 2,2-fach, 10µg/ml CIM ca. 2,0-fach. Bei Soph und SOY zeigen sich ebenfalls 0,1µg/ml als am effektivsten mit einer Stimulation von 2,6, bzw. 2,5 gegenüber dem Medium. Die höchste Konzentration von GLY zeigt noch einen Wert knapp oberhalb der Mediumkontrolle, während die geringeren Konzentrationen die CaBP-Expression leicht inhibieren.

Insgesamt ergibt sich folgende Reihenfolge für die Wirksamkeit bezüglich der CaBP9k-Expression: HE-2, PHA, dann 8-PN in der jeweils höchsten Konzentration verhalten sich stärker wirksam als SAR, die beiden niedrigeren Konzentrationen von 6-PN, gefolgt von CIM, welches in allen Konzentrationen ungefähr gleich stark agiert.

3.6.1.2 Die Angiotensinogen-Genexpression

Im Hinblick auf die AT-Regulation zeigt sich bei den Hopfeninhaltsstoffen und -extrakten ein anderes Bild (Abb. 42). Das 8-PN ist hier die am stärksten dosisabhängig auf die AT-Genexpression wirkende Verbindung. Mit einer knapp 3,0-fachen Stimulation bei 10µg/ml ist 8-PN so effektiv wie 10⁻⁸M EE (2,6-fach). Die beiden geringeren Konzentrationen von 8-PN liegen beim Faktor 2,0, ein Wert, den auch 10µg/ml 6-PN erreicht, dicht gefolgt von 0,1µg/ml und 1,0µg/ml IXH und schließlich mit flachem Konzentrations-Wirkungsverlauf XH (ca. 1,7-fache Stimulation in der höchsten Konzentration). Der Extrakt HE-1 befindet sich mit allen drei Konzentrationen um den Faktor 1,4 herum, der die CaBP9k-Genexpression so stark stimulierende Extrakt HE-2 beeinflusst die AT-Genexpression interessanterweise nicht.

Von den unterschiedlichen Pflanzenextrakten erreicht keiner eine Hochregulation von AT im Ausmaß von 10⁻⁸M EE, sie erreichen maximal eine 1,8-fache Hochregulation (CIM 0,1µg/ml, bzw. GLY 1,0µg/ml). Anführend in der stimulierenden Wirkung ist CIM, das wie bei der Betrachtung von CaBP9k auch hier eine reverse Dosisabhängigkeit aufweist. Auch GLY erreicht den Faktor 1,8, und zwar in seinen höheren Konzentrationen. Mit geringem Abstand folgen Soph, PHA, SAR und schließlich SOY. Während sich Soph in allen Konzentrationen zwischen den Faktoren 1,4 und 1,5 bewegt, tut PHA dies in abgeschwächter Form zwischen 1,1 und 1,2. Von SAR und SOY bewirkt jeweils nur eine Konzentration (1,0µg/ml für SAR und 10,0µg/ml für SOY) eine Stimulation der AT-Genexpression, die oberhalb der Mediumkontrolle (Faktor 1) liegt.

Zusammenfassend ermöglicht CaBP9k als sehr sensitiver estrogenregulierter Marker in Fe33 Zellen die differentielle Erkennung estrogener Effekte hormonwirksamer Substanzen. Angiotensinogen wird ebenfalls durch Estrogen reguliert und stellt einen bedeutenden physiologischen Parameter dar.

In Bezug auf CaBP9k sind alle Proben nur sehr schwach estrogenwirksam, die 190-fache Stimulation durch 10⁻⁸M EE steht einer maximal 6-fachen durch die Phytoestrogene entgegen. Der Extrakt HE-2 ist die potenteste Probe unter den Hopfensubstanzen, gefolgt von 8-PN und 6-PN, die übrigen Bestandteile zeigen keine nennenswerten Effekte. Anders verhält es sich bei der AT-Regulation, 8-PN erreicht die Potenz von 10⁻⁸M EE (ca. 2,6-fache Stimulation), die übrigen Hopfeninhaltsstoffe und Extrakte stimulieren die AT-Genexpression maximal zweifach. In diesem Fall ist für HE-2 kein Effekt zu verzeichnen.

Mit Ausnahme von HE-2, PHA und evtl. SAR, die eine Dosisabhängigkeit im Effekt erkennen lassen, zeigen die untersuchten Extrakte ihre höchsten Effekte auf die CaBP9k-

Genexpression in der jeweils niedrigsten Konzentration. PHA ist nach HE-2 am stärksten wirksam, SAR dann CIM folgen, die übrigen Extrakte zeigen kaum Effekte. Auch hier liefert die Betrachtung der AT-Expression ein verändertes Muster der Stimulation: Kein Extrakt erreicht die Potenz von EE, CIM und GLY kommen auf 70% der Wirkung von 10^{-8} M EE, dicht gefolgt von Soph, und anschließend den übrigen Extrakten. Die Wirkungen der einzelnen Konzentrationen weisen keine großen Differenzen auf, was darauf hindeutet, dass ein Sättigungsgleichgewicht erreicht ist.

Alle getesteten Phytoestrogene, mit Ausnahme der höchsten Konzentration von 8-PN, zeigen im Hinblick auf die Regulation der Angiotensinogen-Genexpression in Fe33-Zellen ein wünschenswertes Profil. Die durch Estrogene bewirkte Hochregulation von AT ist nicht erwünscht, da vermehrte Synthese von AT in Hepatozyten über einen erhöhten AT-Plasmaspiegel zum Blutdruckanstieg führt. Bei Frauen, die eine Hormon-Ersatz-Therapie erhalten, wird so ein Hypertonus erzeugt.

Gleichzeitig konnten wir zeigen, dass unterschiedliche estrogenregulierbare Gene in der Rattenhepatomzelllinie Fe33 differentiell durch Phytoestrogene moduliert werden. Sie wiesen nicht nur eine Regulation in unterschiedlichem Ausmaß auf, sondern auch, wie zum Beispiel für HE-2 oder PHA, eine gegensätzliche Wirkung in Bezug auf die Stimulation der Genexpression im Vergleich zu EE. Dies legt die Vermutung nahe, dass es sich um Selektive-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren handelt.

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die isolierten Hopfeninhaltsstoffe 6-PN, XH und IXH sowie die Extrakte SAR, PHA und SOY (für PHA und SOY mit geminderter Aussagekraft) zeigen eine erhöhte Bindungsaffinität zur ER β gegenüber ER α . Für die Extrakte HE-1, HE-2 und CIM lassen sich keine Aussagen machen, da der Assay im Falle dieser in DMSO gelösten Extrakte gestört zu sein scheint. Die Substanz RHA wurde innerhalb dieser Arbeit nicht auf ihre Rezeptorbindung hin untersucht.

Die höchste Affinität zu den beiden Estrogenrezeptoren ergibt sich unter den Phytoestrogenen mit Abstand für 8-PN. Es folgen die übrigen aus dem Hopfen untersuchten Einzelsubstanzen 6-PN, XH und IXH bezüglich ihrer Affinität zu ER β sowie die Extrakte SAR und GLY, die an beiden ER hohe Affinitäten aufweisen. Ihre relativen Potenzen gegenüber E₂ liegen in der Größenordnung von 10^3 , die Ausnahme bildet 8-PN mit nur einem Zahlenwert von 4-5.

Ausschlaggebend für die Wirkung der Phytoestrogene ist nicht nur ihre Rezeptoraffinität sondern auch die Transkriptionsaktivität am Rezeptor. Zwischen diesen beiden Größen besteht kein direkter Zusammenhang wie unsere Ergebnisse zeigen. Die Transaktivierung ist besonders ausgeprägt für 8-PN, und zwar bereits in sehr geringen Konzentrationen. Auch SAR und Soph gefolgt von IXH und HE-1 sollen hier als die wirksamsten Proben erwähnt werden. Jedoch weisen GLY, 6-PN und XH keine erhöhten Transkriptionsaktivitäten auf.

Mit einer erhöhten Affinität einer estrogenwirksamen Substanz zu ER β wurde in der Vergangenheit ein positives, d.h. an gefährlichen Nebenwirkungen ärmeres Profil verbunden (129;141). Die beiden gefährlichsten mit der HRT einhergehenden, estrogenvermittelten Risiken sind das Mammakarzinom und das Endometriumkarzinom. Im Hinblick darauf möchte ich einige der Profile solcher Phytoestrogene, die eine erhöhte ER β -Präferenz aufweisen (6-PN, XH, IXH, SAR, SOY) an dieser Stelle kurz beleuchten.

Während 6-PN die Proliferation in MCF-7 Zellen schon in geringer Konzentration stark hervorruft, induziert es die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nicht in nennenswertem Ausmaß. Auch in Bezug auf die Knochenparameter tut sich die Substanz nicht hervor, eine mäßige Stimulation der AP in Osteoblasten sowie eine Herabregulation von IL-6 lassen sich feststellen. In Hepatozyten reguliert 6-PN die AT-mRNA herauf, weniger als EE es tut, aber nach 8-PN am stärksten unter allen Proben, der Effekt auf CABP9k ist schwächer. Aufgrund der stark proliferativen Wirkung in MCF-7 Zellen ist zu vermuten, dass hinsichtlich des Brustkrebsrisikos keine Entwarnung für 6-PN gegeben werden kann.

XH weist eine ebenso starke proliferative Wirkung in MCF-7 Zellen auf wie 6-PN, und die zytotoxische Wirkung in V79 Zellen ist zusätzlich um etwa eine Größenordnung gegenüber 6-PN erniedrigt. Hinzu kommt, dass XH die AP in Ishikawa Zellen noch mit ca. 55%iger Effektivität derer von EE stimuliert. Bezüglich der Regulation der Knochenmarker wie auch der Genexpression in Hepatozyten ist XH schwach estrogenwirksam. Die Beurteilung von XH gleicht der des 6-PN.

IXH ist die Substanz mit der vergleichbar stärksten Stimulation des Zellwachstums der MCF-7 Zellen. Schon aufgrund dieser Tatsache kann keine positive Beurteilung dieser Substanz bezüglich einer eventuellen Alternative zur Estrogengabe in der HRT erfolgen. Interessanterweise zeigt IXH gleichzeitig den stärksten zytotoxischen Effekt in V79 Zellen, ein Effekt, der ausschlaggebend für die Unwirksamkeit der AP-Aktivität in Osteoblasten sein kann, da die AP-Genexpression, wenn auch schwach, stimuliert wird. In Ishikawa Zellen ist IXH ebenfalls nur schwach wirksam, so auch bezüglich der CaBP9k-Stimulation in Fe33

Zellen, etwas potenter zeigt sie sich bei der AT-Regulation. Wäre auch die MCF-7-Zellproliferation weniger ausgeprägt, würde IXH ein viel versprechendes Profil abgeben.

Der Extrakt SAR, der eine hohe Transkriptionsaktivität zeigt, bildet mit den bisher beschriebenen Substanzen aus dem Hopfen die Gruppe der im Brustkrebsmodell am stärksten proliferativ wirkenden Phytoestrogene, er liegt für die mittlere Konzentration 1,0µg/ml zwischen IXH und 6-PN. Die Induktion der AP im Modell für das Endometrium fällt auch hier schwächer aus. Positiv tut sich SAR in Bezug auf den Knochen hervor. Nicht nur hinsichtlich der AP-Enzymaktivität sondern auch hinsichtlich der estrogenartigen Regulation aller untersuchten Gene in den U-2 OS/ER Zelllinien ist SAR sehr effektiv. Gleichzeitig zeigt sich unter SAR keine verstärkte AT-Expression in der Leber. Dieser Extrakt sollte auf jeden Fall in anderen Brustkrebsmodellen sowie in-vivo getestet werden.

Zu guter Letzt leiten wir auch für SOY eine ERβ-Präferenz ab, die einher geht mit sehr geringer Transaktivierung des ER. Weder in Ishikawa noch in V79 Zellen zeigt SOY einen nennenswerten Effekt auf den gemessenen Parameter. Auch in Fe33 Zellen verhält sich der Extrakt unauffällig, lediglich in Osteoblasten ist bereits für geringe Konzentrationen ein die AP-Aktivität stimulierender Effekt zu verzeichnen, der oberhalb dessen von EE liegt. Die Untersuchung der Proliferation in MCF-7 Zellen steht für diesen Extrakt wie auch die der Genexpression im U-2 OS/ER-Modell noch aus. Aufgrund der bisherigen Ergebnisse präsentiert SOY ein positives Profil. Der tatsächlichen Wirkung auf die Mineralisation des Knochens sollte jedoch noch nachgegangen werden. Ein Inhaltsstoff dieses Extraktes, und zwar Genistein, ist hinsichtlich dieser Frage und auch derjenigen der Zellproliferation bereits näher untersucht worden (s. Diskussion; (72;261)).

Eine erhöhte Affinität zu ERα zeigen 8-PN und Soph, wobei Soph eine stärkere Präferenz zeigt, die zwischen der von ERα und 8-PN liegt. GLY verhält sich beiden ER-Subtypen gegenüber gleich bezüglich seiner Affinität. Bei hoher Transkriptionsaktivität entspricht die MCF-7-Zellproliferation etwa der durch E₂ hervorgerufenen, die AP-Induktion in Ishikawa Zellen ist ungefähr halb so stark wie die durch EE verursachte. Sehr effektiv ist 8-PN bezüglich der knochenspezifischen AP. In hFOB/ERα Zellen wird ihre Aktivität beinahe so stark wie durch EE hochreguliert, ihre Genexpression sogar stärker als durch E₂ im U-2 OS/ER-System. Hinsichtlich der Regulation der anderen Gene in diesen Zellen ist 8-PN meist die potenteste Substanz. Leider führt sich ihre Wirksamkeit auch in Fe33 Zellen fort, so dass auch die AT-Expression in beinahe dem gleichen Maße wie durch EE induziert wird. Somit eignet sich diese Substanz in-vivo vermutlich nicht.

Die Extrakte GLY und Soph gleichen sich in ihren mittelstarken Effekten auf die Zellproliferation der Brustkrebszelllinie. Auch die Stimulation der AP in Ishikawa Zellen ist bei beiden vergleichbar hoch. So können auch die positiven Effekte am Knochen, GLY ist das effektivste Phytoestrogen unter den getesteten hinsichtlich der AP-Aktivität in hFOB/ER α Zellen, das Gesamtprofil, das negativ beurteilt werden muss, nicht verändern. Ein mäßiger Anstieg der AT-mRNA ist in Fe33 Zellen zu verzeichnen.

Auch diejenigen Extrakte, für die wir im Rezeptor-Bindungsassay keine Aussage treffen konnten (HE-1, HE-2 und CIM, eingeschränkt auch für PHA und SOY), zeigen interessante Wirkungen. Betrachtet man die beiden Hopfenextrakte, so fällt auf, dass lediglich ihr mittelstarker proliferativer Effekt gleich ist. In V79 Zellen ist HE-1 etwas toxischer als HE-2, und auch in Ishikawa Zellen ist HE-1 sehr potent, und zwar mit einer 80%igen Effektivität derer des EE am wirksamsten unter den pflanzlichen Proben. In den Knochenmodellen zeigen HE-1 und HE-2 durchgängig bemerkenswerte estrogenartige Wirkungen, wobei HE-1 immer etwas stärker ist als HE-2. Dies gilt auch für die Transkriptionsaktivität am ER. Allein bezüglich der CaBP9k-Regulation ist HE-2 potenter als HE-1, die AT-mRNA regulieren beide nicht in nennenswertem Maße. Neben der ER-Bindungsaffinität in-vitro sollten diese Extrakte auch in-vivo hinsichtlich entscheidender estrogener Parameter untersucht werden, da in ihnen ein mögliches Therapiepotential stecken könnte.

Unter allen getesteten Phytoestrogenen ist PHA das einzige, welches nicht das MCF-7-Zellwachstum stimuliert! Diese Beobachtung geht einher mit einer nur halb so starken Wirksamkeit am Endometrium verglichen mit E2 und einem viel versprechenden Profil in Bezug auf den Knochen mit teilweiser reverser Dosisabhängigkeit, was die Potenz des Extraktes zum Ausdruck bringt. In Hepatozyten zeigt PHA einen differentiellen Effekt, und zwar eine mäßige Stimulation der CaBP9k-Expression kombiniert mit nicht vorhandener AT-Induktion. Der Extrakt der Gartenbohne weist ein sehr positives Profil auf ohne zu diesem Zeitpunkt erkennbare Nachteile.

Auch für den bereits in der Literatur beschriebenen Extrakt CIM sollte der Proliferationsassay und der Luciferase-Assay noch in unseren Testsystemen durchgeführt werden. Ein antiestrogener Effekt bezüglich der Proliferation wurde von Zierau et al. gezeigt (262). In Ishikawa Zellen und auch in hFOB/ER α Zellen beobachteten wir keine AP-Stimulation. Auffällig ist die geringe Toxizität in V79 Zellen wie sie auch SOY aufweist. In Hepatozyten ist CIM in allen Konzentration gleichmäßig wenig aktiv. Neben den bereits erwähnten Untersuchungen sollte auch die Feststellung der Bindungsaffinität und Transaktivierung durch

den ER vorgenommen werden. Die zusätzlichen Daten könnten zur Findung einer potentiellen HRT-Alternative beitragen.

Mit den Hopfenextrakten HE-1 und HE-2 und dem Extrakt der Gartenbohne PHA sowie möglicherweise dem Extrakt aus Besenginster SAR, dem Sojaextrakt SOY und dem der Traubensilberkerze CIM stehen unter Umständen Phytoestrogene zur Verfügung, die aufgrund ihres SERM-Charakters ernsthafte Alternativen zur Estrogensubstitution in der Menopause darstellen könnten.

4. Diskussion

Phytoestrogenen werden antiproliferative, antikanzerogene, antiosteoporotische und den Hormonspiegel modulierende Wirkungen nachgesagt. Zahlreiche epidemiologische Studien bestätigen dies. In Bevölkerungsgruppen, die sich traditionell phytoestrogenreich ernähren, ist die Inzidenz estrogenvermittelter Krebserkrankungen und die Schwere (post-) menopausaler Symptome geringer. Andererseits ist die Beweislage dafür, dass Phytoestrogene nur die wünschenswerten, nicht aber die unerwünschten Wirkungen von Estrogenen aufweisen, spärlich (150). Die Effektivität der Phytoestrogene ist abhängig vom endogenen Estrogenspiegel und von der Konzentration, in der sie zu sich genommen werden. Am häufigsten untersucht wurden Extrakte aus Soja, bzw. Einzelbestandteile dieser Pflanze wie die Isoflavone Genistein und Daidzein. Eine umfassende Untersuchung anderer pflanzlicher Extrakte und deren Inhaltsstoffe steht bislang noch aus (28). Eine Vielzahl von Studien liefert lediglich Hinweise darauf, dass die Brustkrebsinzidenz geringer sein könnte als unter HRT oder dass ein antiosteoporotischer Effekt vorliegen könnte. Eine positive Auswirkung auf das kardiovaskuläre System ist fraglich, ein Effekt auf die Vaginalschleimhaut nicht nachweisbar (150).

In dieser Arbeit wurde die Wirksamkeit einiger potentieller Phytoestrogene in unterschiedlichen Zellsystemen sowie ihre Bindungsaffinität zu den ER-Subtypen in-vitro untersucht. Deutlich geworden ist, dass die untersuchten Verbindungen und Extrakte in der Lage sind, in unterschiedlichem Ausmaß an die endogenen Estrogenrezeptoren, ER α und ER β , zu binden und dass sie sowohl estrogene als auch antiestrogenen Effekte auszuüben vermögen – abhängig vom gleichzeitigen Vorhandensein estrogenen Substanzen wie zum Beispiel endogenem E₂, bzw. synthetischen Derivaten. Dies zeigt sich beispielsweise an einer positiven bei postmenopausalen Frauen beobachteten Auswirkung von Isoflavonen auf die Knochendichte, die bei prämenopausalen Frauen nicht beobachtet wurde (218;263).

4.1 Molekulare Mechanismen der Rezeptorbindung

Nach Gabe eines Phytoestrogens befinden sich trotzdem noch endogene E₂-Moleküle an Bindungsstellen von Estrogenrezeptoren. Folglich kann nicht nur Homo- oder Heterodimerisierung der beiden ER-Subtypen stattfinden, sondern auch Dimerisierung zweier ER mit jeweils unterschiedlichem Liganden. Auch dies führt zu einer erneut anderen Konformation des Ligand-Rezeptor-Komplexes. Mittels Strukturanalysen kann gezeigt

werden, dass einige Phytoestrogene in der Lage sind, beinahe wie E₂ die Bindungstasche eines ER auszufüllen. Durch die von E₂ unterschiedliche Molekülstruktur jedoch wird die Konformation des Gesamtkomplexes verändert, so dass er auch eine antagonistische Konformation annehmen kann. Diese Effekte können als Erklärung für gemischte agonistische und antagonistische Effekte der Phytoestrogene dienen, ihr so genanntes SERM-Verhalten (264). Die Kombination der Untersuchungen an verschiedenen Zielstrukturen soll einen Beitrag zur Charakterisierung der untersuchten Verbindungen und Extrakte leisten, sowohl bezüglich ihrer positiven oder negativen Auswirkungen auf die Gesundheit als auch zur Aufklärung ihrer molekularen Mechanismen in Bezug auf die Beeinflussung von Zellfunktionen.

Wichtig ist hierbei zu wissen, ob es sich um ER-vermittelte Effekte handelt oder um andere genomische Einflüsse, über welche die potentiellen Phytoestrogene wirksam werden. Der Rezeptor-Bindungsassay dient der Bestimmung der Fähigkeit einer Testverbindung mit radioaktiv markiertem Estradiol um die Bindungsstelle am ER zu konkurrieren und dies aus seiner Bindung zu verdrängen. Er stellt eine schnelle und sehr sensitive Methode dar, um diese Fähigkeit zu quantifizieren. Aus dem Verhalten einer Probe in-vitro kann auf ER-modulierende Eigenschaften in-vivo zurück geschlossen werden. Außerdem lassen sich Aussagen zu Struktur-Wirkungsbeziehungen für die Einschätzung der Affinität potentieller ER-Liganden treffen sowie über die Beschaffenheit der Liganden-Bindungsstellen am Rezeptorprotein (68;189).

Unsere Ergebnisse zeigen, dass der Assay störanfällig ist für die Untersuchung komplexer Gemische, wie sie in Pflanzenextrakten vorliegen; auch die Art des Lösungsmittels, in dem die Proben gelöst werden, ist von Bedeutung. Auffällig ist, dass in DMSO gelöste Extrakte im Vergleich zu in Ethanol gelösten zum Teil keine auswertbaren Ergebnisse liefern. Es handelt sich bei DMSO um ein sehr polares, wasserähnliches Molekül, welches in der Lage ist, Wasserstoffbrücken zu bilden und damit auch vorhandene Wasserstoffbrücken-Bindungen zu verändern. Diese jedoch sind für die Ligandenbindung an den ER von ausschlaggebender Bedeutung. Wie DMSO in Wasser dessen „kristalline“ Struktur zu stören vermag, so hat es auch einen Einfluss auf den molekularen Zustand des Reaktionsgemisches.

Die Störanfälligkeit hinsichtlich der pflanzlichen Extrakte ist verständlich, wenn man sich vor Augen hält, dass in ihnen eine Vielzahl strukturell unterschiedlicher Verbindungen vorliegt, die mit dem Rezeptor interferieren und sein Bindungsvermögen ändern können. Möglich ist, dass verschiedene Substanzen enthalten sind, die mit jeweils unterschiedlicher Affinität an die

Rezeptoren binden können. Für den Kurvenverlauf von HE-1 und HE-2 an ER β ist eine Zu- und anschließende Abnahme, ein „Auf und Ab“, zu beobachten. Grund hierfür könnten mehrere solcher ER-bindender Bestandteile in den Extrakten sein, die sich gegenseitig verdrängen und so diesen Kurvenverlauf erzeugen (Abb. 19+20).

Es muss sich jedoch nicht um direkte Liganden handeln, sondern um Stoffe, von denen vermutlich mehrere in der Lage sind, die Konformation des Rezeptors allosterisch zu verändern. Wird die ER-Konformation moduliert, so steht dieser nicht mehr oder nicht in vollem Ausmaß für die Bindung eines Liganden zur Verfügung. Es ist auch möglich, dass nun für andere Substanzen Bindungstaschen offen gelegt werden, die vor Konformationsänderung nicht zugänglich waren. Solche Effekte kommen besonders bei höheren Konzentrationen der Extrakte zum Tragen, da zum einen auch die Konzentration nur in geringen Mengen enthaltener Bestandteile ansteigt, und sich zum anderen die Relationen, in denen sich die einzelnen Bestandteile im Extrakt befinden, verschoben werden können. Denkbar ist dies zum Beispiel für den Kurvenverlauf von CIM an ER α (Abb. 26), von SOY an ER β (Abb. 24) und für Soph hinsichtlich beider Rezeptor-Subtypen (Abb. 22).

Ein weiteres Modell ist die Existenz einer bindenden Substanz im Extrakt, die $^3\text{H-E}_2$ verdrängt, wobei Begleitsubstanzen allosterische Effekte aufweisen und die ER-Konformation verändern; dies ist vorstellbar im Falle von HE-1, dessen Verdrängungskurve für ER α im Bereich von 0,3 $\mu\text{g/ml}$ bis 3,0 $\mu\text{g/ml}$ eine Verdrängung von über 50% aufweist, dann allerdings einen rapiden Abfall zeigt (Abb. 19).

Wahrscheinlich ist auch, dass estrogenartige Verbindungen das $^3\text{H-E}_2$ vom Rezeptor verdrängen, jedoch Begleitsubstanzen im Extrakt die ER-Konformation allosterisch verändern, so dass diese Verbindungen nicht mehr binden können (anfängliche Verdrängung, d.h. die Kurve beginnt mit relativ hohen y-Werten). Durch die erzeugte Konformationsänderung ist es möglich, dass zum Beispiel $^3\text{H-E}_2$ wieder binden kann (Kurve fällt ab). Dies könnte für PHA an ER α der Fall sein (Abb. 25).

Generell ist festzuhalten, dass bei Extrakten, die potente Stoffe in Bezug auf die ER α - oder ER β -Affinität enthalten, die Messung reproduzierbar funktioniert; handelt es sich jedoch um schwach estrogene Verbindungen, so kommen die beschriebenen Störeffekte voll zum Tragen.

Die für Estradiol gefundenen ER-Bindungsaffinitäten liegen im Bereich derer, die in der Literatur beschrieben sind, und zwar um 10^{-8}M und 10^{-9}M herum (68;123). Es ist jedoch darauf zu achten, dass aufgrund methodischer Unterschiede die Ergebnisse der Rezeptor-

Bindungsassays in den meisten Fällen nicht vergleichbar sind (255). Bei der Rezeptorbindung handelt es sich um eine Adsorptionsisotherme. Diese ist definiert als eine Funktion der Temperatur und der Zeit der Gleichgewichtseinstellung (68). Weiterhin spielen die Konzentrationen der eingesetzten Rezeptoren, Kompetitoren und des zu verdrängenden Radioliganden eine Rolle. So fanden Milligan et al. beispielsweise eine 10^2 -fache relative Potenz von 8-PN am ER in isoliertem uterinen Cytosol aus der Ratte (123), in unserem zellfreien System mit humanen rekombinanten ER hingegen ist der Faktor nur 4-5. Die Modifikation, in der die ER jeweils vorliegen sowie die Bestandteile des angewandten Reaktionssystems haben erheblichen Einfluss auf die gemessenen Bindungsaffinitäten. Am Beispiel des 8-PN ist dies deutlich nachvollziehbar. Milligan et al. (128) untersuchten dessen Affinität zu den ER-Subtypen zusätzlich (zur oben genannten Arbeit) in drei unterschiedlichen Systemen und erzielten um den Faktor 10 divergierende Resultate. Die ER lagen entweder intrazellulär vor, in Bakterien exprimiert oder isoliert. Die mit isolierten Rezeptoren erhaltenen IC_{50} -Werte von 8-PN für $ER\alpha$ und $ER\beta$ stimmen mit unseren Ergebnissen überein. Die von uns gezeigte sehr hohe Affinität von 8-PN zur den ER findet sich wieder bei Schaefer et al. (265).

Die Affinität von E_2 zu $ER\alpha$ ist gegenüber der zu $ER\beta$, wie bereits beschrieben, leicht erhöht (68). Dieser Befund hat zur Suche nach Verbindungen geführt, die eine Prävalenz für $ER\beta$ aufweisen. Mit einem solchen Profil einer Substanz wird der Verlust der unerwünschten Effekte des E_2 wie eine gesteigerte Zellproliferation in Mamma- und Endometriumgewebe verknüpft sowie ein positiver Effekt auf den Erhalt des Knochens (60;243;244). Für einige Phytoestrogene wurde eine erhöhte $ER\beta$ -Affinität festgestellt (68), und zwar für die Hopfenbestandteile 6-PN, XH und IXH mit einem Faktor zwischen 2 und 3, sowie stark ausgeprägt für den Extrakt SAR.

Bei Interpretation der Struktur-Wirkungsbeziehungen fällt auf, dass die genaue Position der Hydroxylgruppen und ihre Anzahl im Molekül auf die Bindungsaffinität zu den Estrogenrezeptoren entscheidenden Einfluss zu haben scheint. Voraussetzung zur Bindung an den ER ist ein aromatischer A-Ring im Molekül (Abb.1.D), wie ihn sowohl E_2 als auch die Flavonoide besitzen (68) sowie ein präziser Abstand zwischen zwei Hydroxylgruppen, die sich an jedem Ende eines planaren und weitgehend hydrophoben Moleküls befinden (188).

Die Flavanonderivate IXH und 8-PN unterscheiden sich nur durch den Substituenten an Position 5: eine Methoxygruppe im IXH und eine Hydroxylgruppe im 8-PN (Abb.1.C). Durch diese Veränderung kehrt sich die Subtypspezifität um. Jedoch führt auch die Verschiebung

der Prenylgruppe im Flavanongerüst des Naringenins zu einer ausschlaggebenden Veränderung der Bindungscharakteristik: Während 8-PN sehr stark an die Rezeptoren bindet und wie E₂ eine ER α -Präferenz aufweist, ist die Affinität von 6-PN zu den ER sehr viel schwächer und die Präferenz für ER β fast dreifach erhöht gegenüber der für ER α . (Tab 6.A und C.). Interessant ist zudem die Beobachtung, dass die ER α -Affinität von IXH und seiner offenen Chalkonform XH nahezu identisch sind und XH in Bezug auf ER β eine um ca. ein Drittel stärkere Affinität aufweist als IXH. Dies lässt vermuten, dass trotz der veränderten Ringstruktur die molekularen Wechselwirkungen mit dem ER weitgehend erhalten bleiben. Für IXH und 6-PN ist anhand der Verdrängungskurven besonders deutlich zu sehen, dass keine vollständige Verdrängung des ³H-E₂ erfolgt. Die Graphen dieser Substanzen haben im gemessenen Konzentrationsbereich bereits ihr Plateau erreicht, im Gegensatz zu beispielsweise GLY und Soph, die Kurven nähern sich jedoch nicht asymptotisch einer gedachten 100%-Linie. Weiterhin ist der Verlauf der Graphen für die beiden ER-Subtypen nicht parallel. Dies könnte darauf hindeuten, dass die Substanzen an unterschiedliche Bindungsstellen in den Rezeptormolekülen andocken (68).

Mit dem Hintergrundwissen über das Verhalten der Proben an den einzelnen ER-Subtypen ist es nun interessant ihr Verhalten in zellulären Systemen zu interpretieren, in denen zusätzlich zur Rezeptorbindung die Einflüsse von Cofaktoren und Effektoren zum Tragen kommen (266).

4.2 Phytoestrogene im Knochenmodell

4.2.1 Einfluss auf Alkalische Phosphatase und Interleukin-6

Zunächst beschäftigten wir uns mit der Wirksamkeit im Knochen unter Verwendung zweier Zellsysteme mit jeweils transfiziertem ER α oder ER β , und zwar hFOB/ER und U-2 OS/ER, in denen wir die Regulation der Alkalischen Phosphatase untersuchten. Die Ergebnisse eines Zellkulturassays, in dem das Enzym AP nachgewiesen wird, sollen den Beobachtungen der Regulation der AP-Genexpression gegenüber gestellt werden. Bisherige Untersuchungen der Wirkung von Phytoestrogenen auf den Knochenstoffwechsel sind, wie in der Einleitung bereits erwähnt, meist epidemiologischer Art oder beziehen sich auf Sojaextrakte und dessen Inhaltstoffe, in geringerem Umfang auch auf Inhaltstoffe aus dem Hopfen.

Die Phase der Etablierung der Messung der Enzymaktivität der AP im hFOB/ER Zellsystem war sehr lang und von zahlreichen Schwierigkeiten begleitet, einerseits bezüglich der

Kultivierung der Zellen und andererseits bezüglich der Zuverlässigkeit und Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Die hFOB/ER Zelllinien weisen keine vollständige Konfluenz auf und können nicht über beliebig viele Passagen kultiviert werden. Ersteres führt dazu, dass sich die Durchführung direkt in der Kulturschale und nicht durch Entnahme eines Aliquots als die zuverlässigste erwiesen hat. Diese Methode liefert im Falle der hFOB/ER α Zellen eindeutige Ergebnisse, die sich klar von der Nachweisgrenze des Verfahrens abheben. Für die hFOB/ER β Zellen ist dies nicht der Fall. Die Färbungen unterscheiden sich zwischen den einzelnen Behandlungen kaum voneinander, signifikante Unterschiede sind auch für die Kontrollen nicht nachzuweisen. Waters et al. (209) führen als Grund hierfür auf, dass der Rezeptorspiegel, der in diesen Zellen exprimiert wird, sehr viel geringer ist als der in der hFOB/ER α Zelllinie. Gleichzeitig negieren sie eine AP-Stimulation in hFOB/ER β Zellen durch E₂. Für weitere Untersuchungen osteoblastischer Markergene wurde das Zellsystem gewechselt zugunsten der neuen U-2 OS/ER Zelllinien, welche äquivalente Rezeptorspiegel aufweisen (248).

Die AP ist ein osteoblastischer Marker, dessen Aktivität besonders nach Abschluss der Proliferationsphase im Zellzyklus verstärkt ist (209). Verfolgt man das Ziel, sie möglichst in einem späten Stadium der hFOB/ER-Differenzierung zu messen, so ergeben sich folgende Probleme: Die Zellen lösen sich von ihrer Kulturfläche am Boden des Wells wie ein Teppich ab, und es entsteht somit bei den Waschschrritten ein großer Verlust. Des Weiteren beginnen die Zellen nach Beendigung der Proliferation, die bei den hFOB/ER Zelllinien nur zu einer 80-90%igen Konfluenz im Kulturgefäß führt, zu sterben und die Zelldichte nimmt ab. Der Tag, an dem eine Bestimmung noch ohne Zellverlust möglich ist, musste empirisch ermittelt werden, es handelt sich um Tag 5 nach der Stimulation.

Dem gegenüber steht die Überprüfung der Genexpression in U-2 OS/ER Zellen. Generell bestehen die Vorzüge dieser Zelllinien, auch für hFOB/ER, darin, dass die beobachteten Effekte direkt auf einen Subtyp zurück geführt werden können und dass keine Interaktionen zwischen den Rezeptoren wie beispielsweise Homo- und Heterodimere erwartet werden müssen, die sich auf die Signaltransduktion auswirken können. Obwohl in Osteoblasten sowohl ER α als auch ER β nachgewiesen wurden, existieren erst wenige Daten zu den Beiträgen des jeweiligen Subtyps an der Regulation endogener Gene.

Im Speziellen bieten die erst kürzlich etablierten U-2 OS/ER Zelllinien folgende Vorteile gegenüber den hFOB/ER Zellen:

Die Expression der Estrogenrezeptoren ist durch Doxycyclin induzierbar. Dadurch lässt sich die ER-abhängige Transkription eindeutig bestimmen, denn in nicht Dox behandelten Zellen findet diese nicht statt.

Weiterhin werden die ER-Subtypen in ungefähr gleicher Konzentration exprimiert und ihre Rezeptorspiegel lassen sich durch Inkorporierung eines Flag-Epitops in den beiden Zelllinien im Western Blot detektieren (215). Sie erlauben somit eine bessere Vergleichbarkeit der Effekte der Testverbindungen in Bezug auf ihre Rezeptor-spezifischen Wirkungen.

Alle bisher in hFOB Zellen auf ihre Regulation überprüften Gene werden ebenfalls in U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β Zellen induziert und in der gleichen "Richtung" durch Estrogen reguliert. Da sich in den hFOB/ER Zelllinien nicht alle estrogeninduzierbaren Gene nachweisen lassen, gewinnen wir durch die Verwendung der U-2 OS/ER Zelllinien zahlreiche Marker hinzu. Es steht mit ihnen insgesamt ein effektiveres Modell zur Testung der Substanzen auf ihre Wirkung am Knochen zur Verfügung.

Vergleicht man nun die AP-Genexpression und die Enzymaktivität der AP miteinander, so zeigt sich, dass sie in derselben Weise und in ähnlichem Ausmaß in den U-2 OS/ER Zelllinien und hFOB/ER α 9 reguliert werden. Besonders aktiv sind die Extrakte Soph, SAR, GLY und auch PHA, gefolgt vom 8-PN und auch HE-1. Häufig untersucht wurden Sojaextrakte. Hier zeigt SOY jedoch keine auffällige Stimulation in Bezug auf die Enzymaktivität. Eine geradezu antiestrogene Eigenschaft weist CIM auf. Letztere Beobachtung steht einem schwach positiven in-vivo Effekt gegenüber, der in ovariectomierten Ratten beobachtet wurde (149).

In den hFOB/ER α Zellen zeigt GLY die stärkste estrogene Potenz auf die AP-Aktivität in Form einer die EE-Stimulation weit übertreffenden Wirkung. Dies ist insofern interessant, als dass Glabridin, eine Substanz aus dem Extrakt der Süßholzwurzel, bereits als Phytoestrogen identifiziert worden ist und laut Tamir et al. (138) auf Brustkrebszellen antiproliferativ wirkt. Wir beobachteten jedoch besonders für die mittlere Konzentration einen proliferativen Effekt in MCF-7 Zellen, so dass diese Wirkung eingehender und anhand weiterer Brustkrebszelllinien untersucht werden sollte. Der uterogene Effekt ist weitaus schwächer ausgeprägt als der von EE, was auch für die AT-Induktion in Leberzellen der Fall ist. Ein zusätzlich zu diesen Erkenntnissen knochenbauender Effekt der Pflanze wäre sehr wünschenswert.

Mit einer halb so starken Stimulation wie GLY sie zeigt, folgen SAR und Soph, die damit ebenfalls potenter in Bezug auf die AP-Induktion sind als EE. In U-2 OS/ER α Zellen zeigen

Soph und SAR sowie PHA die ausgeprägteste Wirksamkeit, sie übertreffen sogar den Effekt von E₂ auf die AP-Genexpression. In U-2 OS/ERβ sind die stärksten Effekte identisch mit den durch E₂ hervorgerufenen. Teilweise reverse Dosisabhängigkeit der Extrakte zeigt deren hohe hormonelle Potenz bezüglich dieses knochenspezifischen Markers. Eine Inhaltsstoffanalyse sollte Aufschluss über die aktiven in ihnen enthaltenen Einzelstoffe geben.

Alle Proben aus dem Hopfen sind in ihrer Wirkung auf die AP-Enzyminduktion schwächer wirksam als 10⁻⁸M EE; 8-PN in seiner geringsten, sowie HE-1 in seiner höchsten Konzentration zeigen ungefähr 65% der Effektivität von EE. Etwas anders verhält sich das Profil der Hopfeninhaltsstoffe bei der Analyse der AP-Genexpression in den U-2 OS-Zelllinien. Hier zeigt sich 8-PN wiederum als die am stärksten wirksame Substanz. In der ERα enthaltenden Zelllinie übertrifft sie sogar die Stimulation durch das Hormon E₂. In der ERβ-Zelllinie entspricht es diesem in seiner Wirkung. Auch die beiden Extrakte gefolgt von 6-PN sind in der Lage die AP-Genexpression nennenswert zu stimulieren.

Bis jetzt ist erst wenig über den Einfluss von Hopfeninhaltsstoffen auf den Knochenstoffwechsel bekannt. Für 8-PN wurde in-vivo ein die Knochendichte erhöhender Effekt in Ratten beobachtet, welcher jedoch einher geht mit ebenfalls estrogener Wirkung am Uterus (80). Auch wir konnten diese bestätigen, aber schwächer ausgeprägt als durch EE. In unterschiedlichen Geweben zeigte 8-PN eine estrogene Aktivität, die größer war als die bekannter Phytoestrogene wie zum Beispiel Genistein (123;128;267). Tobe et al. (130) wiesen für XH eine die Knochenresorption inhibierende Wirkung in-vitro nach, deren Mechanismus jedoch bislang unbekannt ist. Dies ist insofern nicht überraschend, da XH ein Vorläufer von 8-PN ist (130). Auch Genistein verhält sich in hFOB/ERα Zellen schwach estrogen (72). Da sowohl 8-PN als auch XH, letzteres sogar mit der derselben Subtypspezifität wie Genistein, an die beiden Estrogenrezeptoren binden, ist zu vermuten, dass diese Substanzen in ähnlicher Weise wie Genistein in-vivo einen knochenerhaltenden Effekt zeigen (268;269). Gestützt wird diese Annahme durch die Feststellung, dass alle hier untersuchten Proben aus Hopfen an ERα eine Transkriptionsaktivität zeigen, die zwar unter der von E₂ bleibt, allerdings im Gesamtbild der Testsubstanzen recht ausgeprägt ist. Bis auf ihre erhöhte proliferative Wirkung in MCF-7 Zellen, besonders muss hier IXH (1,0µg/ml) erwähnt werden, zeigen sie schwach estrogene Effekte in Ishikawa und Fe33 Zellen; 8-PN zeichnet sich jedoch in Bezug auf die AT-Expression als ebenso effektiv wie EE aus. Zu erwähnen ist noch die hohe Zytotoxizität von IXH in höheren Konzentrationen als 1,0µg/ml, gefolgt von 6-PN, welches sich ab 3,0µg/ml als zytotoxisch erweist.

Im Hinblick auf die Vergleichbarkeit der Beobachtungen in den beiden Zellsystemen ist anzumerken, dass der Vergleich der Phytoestrogene mit dem Hormon im Falle der hFOB/ER Zellen mit EE durchgeführt wurde, im Falle der U-2 OS/ER Zellen hingegen mit E₂. Grund hierfür ist die größere metabolische Beständigkeit des EE, die bei Inkubationszeiten von mehr als 24 Stunden vonnöten ist; gleichzeitig ist dieses Derivat aber auch potenter als E₂. Dass also die Wirkungen einiger Hopfensubstanzen schwächer sind als die des EE in hFOB/ER α Zellen, aber stärker als diejenigen des E₂ im U-2 OS/ER Zellsystem, wird hiermit verständlich.

Trotz der teilweisen Diskrepanz, die sich aber beschränkt auf die Ausprägung der Wirkungen und nicht auf ihre Richtung, lassen diese Beobachtungen positive Effekte der Testverbindungen auf den Knochenstoffwechsel in-vivo vermuten. Gestärkt wird diese Annahme dadurch, dass sich die Phytoestrogene auch in Bezug auf den Knochenresorptionsparameter IL-6 wie Estrogen verhalten und dessen Genexpression in U-2 OS/ER α Zellen herab regulieren. Dass auch die IL-6-Produktion durch E₂ sowie durch das meist als Modellsubstanz eines Phytoestrogens verwendete Genistein dosisabhängig gesenkt wird, zeigten Chen et al.(270). Sie beobachteten eine 40-60%ige Abnahme des Zytokins in hFOB/ER α Zellen als Folge dieser Behandlungen. Weniger ausgeprägt ist dieser Effekt in ihrer Mutterzelllinie hFOB1.19, deren ER-Gehalt pro Zellkern sehr viel geringer ist. Diese positive Assoziation zwischen ER α -Gehalt und IL-6-Reduktion könnte auch der Grund dafür sein, dass wir in der U-2 OS/ER β Zelllinie keine nennenswerten Effekte der Phytoestrogene, bzw. des E₂ auf die IL-6 Expression beobachteten (271). Es besteht auch die Möglichkeit, dass es sich bei IL-6 um einen durch ER α regulierten Parameter handelt (272). Festzuhalten ist die Beteiligung eines ER-vermittelten Signaltransduktionsweges bei der IL-6-Regulation in Osteoblasten. Die E₂-vermittelten Effekte werden durch den ER β -Antagonisten R,R-Tetrahydrochrysen geblockt (209). Eine erhöhte IL-6-Produktion deutet auf gesteigerte Osteoklastengengese hin (270;273). Sind Phytoestrogene in der Lage diese in über die Ernährung erreichbaren Konzentrationen zu senken (270) und gleichzeitig Knochenformationsmarker wie AP oder Osteoprotegerin in Osteoblasten zu erhöhen, so ist dies ein wichtiger Hinweis auf ihren positiven Einfluss auf die Instandhaltung des Knochens.

4.2.2 Presenelin-2 und von Willebrand Faktor

Zusätzlich zu den beiden bekannten, am Knochenstoffwechsel beteiligten Parametern AP und IL-6 wurde die Regulation der Genexpression von Presenelin-2 und der von Willebrand Faktor in den U-2 OS/ER Zelllinien untersucht.

Hierbei ist pS2 ein gut charakterisierter estrogenregulierter Parameter in verschiedenen Zellsystemen (129;225;274), welcher in bestimmten Brustkrebsarten überexprimiert wird (275). Ob pS2 eine Rolle im Zuge der Knochenformation innehat, ist nicht bekannt. Aufgrund seiner zuverlässigen Induzierbarkeit durch Estrogene dient er uns bei der Aufklärung der Estrogenität der Phytoestrogene in den U-2 OS/ER Zelllinien.

Die Genexpression des VWF wird durch E₂ und die Phytoestrogene stark reguliert. Monroe et al. (215) zeigten in U-2 OS/ER α Zellen eine 4,9-fache Hochregulation durch E₂. Wie eingangs bereits erwähnt, spielt der VWF eine wichtige Rolle bei der Thrombozytenaggregation an das Gefäßendothel. Hierbei interagiert der VWF mit zahlreichen Collagentypen, die auch in der Knochenmatrix stark vertreten sind. Somit ist eine Funktion des VWF in der extrazellulären Matrix des Knochens denkbar (215). Auch stößt man in der Literatur beim Prozess der Knochenregeneration und der damit verbundenen Revaskularisierung des neu entstehenden Knochengewebes auf den VWF, bzw. verwandte Faktoren (228). Das Vorhandensein im Osteosarkom könnte die Vaskularisierung im Zuge eines aktiven Knochenumbaus widerspiegeln.

Interessanterweise werden diese beiden Parameter durch dieselben Proben in hohem, estrogenähnlichen Maße reguliert wie die Knochenmarker AP und IL-6, und zwar vor allem durch 8-PN, SAR, GLY, Soph und PHA sowie die Hopfenextrakte HE-1 und HE-2. Zur vollständigen Aufklärung der Rolle der Gene pS2 und VWF für Wachstum und Funktion von Osteoblasten sind weitere Studien notwendig.

Insgesamt lässt sich für die Untersuchungen in Bezug auf den Knochen Folgendes festhalten: Die Regulation eines Gens ist nicht direkt proportional zur Produktion des entsprechenden Proteins, was deutlich wird an den differentiellen Effekten der Proben hinsichtlich der Alkalischen Phosphatase. Zugleich demonstrieren die Ergebnisse die Einheitlichkeit und Reproduzierbarkeit der estrogenen Effekte der Proben zwischen den beiden in-vitro Osteoblastenmodellen.

Die Phase der Differenzierung, in der sich die Osteoblasten befinden, ist von ausschlaggebender Bedeutung für das Ausmaß der estrogenen Modulation knochenspezifischer Parameter in den Zellen. Diese Eigenschaft der Reifung ist den Osteosarkomzellen verloren gegangen. Solch immortalisierte Tumorzelllinien zeichnet kontinuierliche Proliferation aus.

4.2.3 Molekulare Mechanismen der Phytoestrogene

Die Wirkungen von E₂ und den Phytoestrogenen auf die Transkription in osteoblastartigen Zellen unterscheiden sich je nach Vermittlung durch ER α oder ER β . Jeder Rezeptorsubtyp spielt also eine gesonderte Rolle in der Signaltransduktion estrogener Effekte. Dies machen auch die von Monroe et al. (215) durchgeführten Untersuchungen per Realtime PCR in Zelllinien, die jeweils nur einen Rezeptor-Subtyp enthalten, deutlich. Die pflanzlichen Proben sind in der Lage sowohl estrogenagonistische als auch estrogenantagonistische Effekte auszuüben, je nach ER-Subtyp und reguliertem Parameter. Sie besitzen damit Charakteristika Selektiver-Estrogen-Rezeptor-Modulatoren.

In dieser Arbeit wird zum ersten Mal für Bestandteile aus dem Hopfen und weitere pflanzliche Extrakte gezeigt, dass sie positive estrogenartige Wirkungen auf osteoblastähnliche Zellkulturen ausüben. In einigen Fällen sind diese Effekte sogar stärker als die durch E₂ hervorgerufenen. Dies bezieht sich auch auf die Beeinflussung der Genexpression wichtiger Marker des Knochenstoffwechsels. Die Phytoestrogene zeigen eine knochenerhaltende Potenz.

Aufgrund dieser Beobachtungen können die Testverbindungen zu Recht als Phytoestrogene bezeichnet werden. Die Auswertung aller weiteren Betrachtungen in den E₂-responsiven Geweben muss zeigen, ob mit ihnen eine potentielle Alternative zur Estrogentherapie in der Menopause zur Verfügung stehen könnte.

Unter diesem Aspekt ist es wichtig, trotz der Präventivwirkung der HRT gegenüber Osteoporose die in ihr liegenden Gefahren, ein erhöhtes Mamma- und Endometriumkarzinomrisiko, nicht außer Acht zu lassen (182).

Obwohl bekannt ist, dass Estrogene das Wachstum vieler Mammakarzinome stimulieren, wird eine negative Korrelation beobachtet zwischen der Brustkrebsinzidenz und der Aufnahme phytoestrogenreicher Nahrung in asiatischen Bevölkerungsgruppen (198). Zur Aufklärung dieser antiestrogenen Charakteristik haben wir Experimente zur Transaktivierung eines transient transfizierten (über ein) ER-abhängigen Reportergens und zur Proliferation in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durchgeführt. Weiterhin überprüften wir die ER α - und ER β - Expression in dieser Zelllinie unter dem Einfluss zweier modellhafter, am ER aktiver Phytoestrogene sowie EE, allein und in Kombination mit ICI.

4.3 Das MCF-7 Zellsystem als Brustkrebsmodell

4.3.1 ER-Expression

Die Angaben über das Vorhandensein der ER-Subtypen in MCF-7 Zellen divergieren in der Literatur. Zum einen wird von der alleinigen Existenz von ER α berichtet (170;216), zum anderen von der beider Subtypen, ER α und ER β (144). Bekannt ist des Weiteren, dass die Rezeptorexpression durch Estrogene reguliert wird.

Laut Maggiolini et al. (198) wird die ER α -mRNA und auch das ER α -Protein durch 10 μ M Genistein herab reguliert, aber nicht in dem Ausmaß wie durch E₂. Von E₂ ist bekannt, dass es ER α in Brustkrebszellen herunter reguliert, und zwar sowohl über einen erhöhten Abbau des ER α -Proteins als auch über eine reduzierte Transkriptionsrate seines Gens (276). In Bezug auf die Herabregulation der ER α -mRNA durch EE und auch durch die getesteten Phytoestrogene können wir diese Ergebnisse bestätigen; 8-PN in seiner geringsten Konzentration (0,1 μ g/ml) ist etwas schwächer wirksam als EE, SAR in seiner höchsten (10 μ g/ml) sogar etwas stärker. Die Effekte werden durch Parallelbehandlung mit ICI ganz oder teilweise aufgehoben, was auf eine ER-Beteiligung an der Regulation hindeutet. Ähnlich verhält es sich auch hinsichtlich der Modulation der ER β -mRNA, wobei sich hier 8-PN stärker wirksam zeigt.

Power et al. (144) stellen einen Zusammenhang her zwischen der Regulation der ER-Expression durch eine Substanz und deren Effekt auf die Proliferation in MCF-7 Zellen. Einhergehend mit einer Stimulation der Proliferation, zum Beispiel durch E₂, beobachten sie eine gesteigerte Expression von ER β . Eine inhibierende Wirkung auf die Proliferation, wie beispielsweise Tamoxifen sie ausübt, sehen sie mit einer gesteigerten Expression von ER α verknüpft. Wir fanden eine gegenteilige Regulation von ER β und auch keine Hochregulation der ER α -Expression durch das Antiestrogen ICI.

Ein Grund für die Unterschiedlichkeit der Berichte hinsichtlich des Vorhandenseins der ER-Subtypen könnte die Vielfalt an Ausprägungen der im Umlauf befindlichen MCF-7 Zelllinie sein. Außerdem wurden verschiedene Methoden zum Rezeptornachweis angewandt, Watanabe et al. (170) nutzten RT-PCR, während Power et al. (144) Immunfluoreszenz und Western Blot durchführten.

4.3.2 Transkriptionsaktivität der Phytoestrogene am ER

Von Bedeutung ist die Aufklärung der Transkriptionsaktivität der Testverbindungen am ER. Der Untersuchung geht eine transiente Transfektion eines ER-regulierten Luciferase-Reportergens in MCF-7 Zellen voraus. Bindung einer estrogenartigen Substanz an den ER

aktiviert die spezifische Transkription estrogenregulierter Gene, deren Produkte als Endpunkt des estrogenen Effektes gemessen werden können. Da endogene Gene zusätzlich durch andere zelluläre Mechanismen reguliert werden (255), wurde ein Reporter-gen unter der Kontrolle des humanen, in MCF-7 Zellen enthaltenen ER, eingeführt, welches für ein exogenes Enzym, die Luciferase, kodiert. Der Luciferase-Assay gilt als sehr sensitive Methode. Endpunkt der Messung sind relative Lichteinheiten, da die Luciferase die Entstehung eines Produktes katalysiert, welches eine Biolumineszenz aussendet (255). Dieser Assay dient als Erweiterung des Rezeptor-Bindungsassays, da er darüber hinaus in der Lage ist, zwischen Agonisten und Antagonisten zu unterscheiden und eine Aussage über die Potenz eines Liganden zur ER-vermittelten Transaktivierung zu machen. Beim hier verwendeten Versuchsmodell handelt es sich um eine Fortentwicklung des klassischen Luciferase-Assays (232), welche folgende Vorteile bietet: Zum Ersten liegt durch Cotransfektion des Renilla-Luciferase Kontrollvektors ein interner Standard und damit ein direkter Bezugspunkt für die Messwerte vor (198). Zum Zweiten erlaubt die transiente Transfektion eine Anpassung an die jeweils verwendete MCF-7 Linie, mit der auch andere Tests im Zuge desselben Projektes durchgeführt werden.

Einschränkend muss jedoch erwähnt werden, dass hier praktisch nur die Transaktivierung durch ER α festgestellt wird, da dieser in den verwendeten MCF-7 Zellen mit großem Überschuss (450-fach) der vorherrschende ER-Subtyp ist. Zu vermuten ist allerdings, dass das Vorhandensein von ER β die E₂-induzierbare Transkription, wenn auch in geringem Umfang, beeinflusst, und es sich um eine durch Rezeptorinteraktionen zustande kommende Gesamtwirkung handelt, die wir messen. Monroe et al.(248) zeigten dies vor kurzem für äquimolare ER-Coexpression in menschlichen Osteoblasten aber auch in Brustkrebszellen. Als vornehmliche Interaktion der Rezeptor-Subtypen wird primär die Bildung von Heterodimeren angenommen (277). Die gemessene Gesamtwirkung kann also eine erhöhte (bei vorliegendem Synergismus), eine erniedrigte (bei Antagonismus) oder eine solche sein, die zwischen denen der beiden ER-Subtypen allein liegt. Welcher ER der stärkere oder schwächere Aktivator der Transkription ist, kann aufgrund unseres Testsystems nicht gesagt werden. Hall und McDonnell ordnen einem Heterodimer aus ER α und ER β dieselbe Transkriptionsaktivität zu wie ER α allein (166). Sie postulieren für ER β eine modulierende Rolle gegenüber ER α bei geringem Hormonspiegel in MCF-7 Zellen und beschreiben ihn als weniger transkriptionsaktiv verglichen mit ER α . Außerdem zeigen sie, dass die Sensitivität eines ER α -exprimierenden Zellsystems durch Coexpression von ER β gegenüber E₂ gesenkt wird.

Das ERE-TK-Luc Konstrukt kann verwendet werden, um, wie hier, die ER-vermittelte estrogene Potenz zu testen (233) oder auch, um die Funktionalität eines in ein System transfizierten ER sicher zu stellen (208).

Die Phytoestrogene sind in der Lage mit einer bis zu 80%igen Wirksamkeit, gemessen am E₂, die Luciferaseaktivität, das heißt die Expression eines ER-Reportergens, zu stimulieren. Sie weisen damit am endogenen ER α eine mehr oder minder starke transkriptionelle Aktivität auf. Die stärkste Aktivität zeigt der Extrakt SAR in der Konzentration 10 μ g/ml. Bereits 0,1 μ g/ml 8-PN erweist sich als nur geringfügig weniger aktiv. Auch Joung et al. bestätigten, dass die Potenz eines Phytoestrogens in Bezug auf diesen Parameter mit der von E₂ vergleichbar sein kann (233). Dass Phytoestrogene ihre Aktivität über den ER und nicht über einen anderen endogenen Steroidrezeptor ausüben, zeigten Maggolini et al. (198) anhand von Genistein und Quercetin, indem sie parallel zu den Phytoestrogenen ein Antiestrogen, ein Antiandrogen, ein Antigestagen, bzw. ein Antiglukocorticoid gaben. Bis auf das Antiestrogen waren die Verbindungen nicht in der Lage die Transkriptionsaktivität zu inhibieren.

Ein Bewertungskriterium der estrogenen Potenz der Proben gegenüber E₂ ist häufig die EC₅₀. Die Berechnung dieser Größe ist jedoch nur möglich, wenn innerhalb der eingesetzten Konzentrationsspanne die maximale Wirkung einer Substanz in diesem System erreicht wird, was in unserem Fall nur für XH, IXH, Soph und GLY der Fall ist. In den übrigen Fällen und auch für E₂ wären zur Ermittlung der EC₅₀ Verdünnungsreihen anzufertigen. 8-PN ist die einzige Verbindung, bei der das Maximum bereits überschritten scheint, also vermutlich bei einer geringeren Konzentration als 0,1 μ g/ml zu finden ist. Dies ist Ausdruck der hohen transkriptionellen Potenz der Verbindung am ER. Zierau et al. (131) benennen eben diese Konzentration, 0,1 μ g/ml, als diejenige, für die 8-PN estrogene Aktivität im Luciferase Assay zeigte. Eine interessante Beobachtung machten Joung et al. (233): Sie testeten Isoflavonoide je einzeln und zusammen in unterschiedlichen Mischungen und fanden heraus, dass die estrogenen Effekte der Mischungen niedriger sind als das arithmetische Mittel der durch die jeweiligen Einzelstoffe verursachten Effekte. Daraus kann bezüglich unserer Extrakte abgeleitet werden, dass in ihnen womöglich Substanzen enthalten sind, die isoliert betrachtet, potenter sein könnten als der Gesamtextrakt. Die Wirkungen der Einzelstoffe folgen einem komplizierten Verdrängungsgesetz, welches sich aus dem Massenwirkungsgesetz ergibt.

4.3.3 Förderung der Proliferation durch Phytoestrogene

Hat man nun einen Hinweis auf die Aktivität der Proben am ER, so ist es aufgrund eines vermutlichen Zusammenhangs (s. o., (144;198)) wichtig, auch ihr Verhalten im Brustgewebe zu untersuchen, und zwar ihren Effekt auf die Proliferation. Seit langem ist ein proliferativer Effekt von Estrogen und Phytoestrogenen in MCF-7 Zellen bekannt, bis heute jedoch ist ihr Wirkmechanismus nicht vollständig aufgeklärt. Wiese et al. (278) gehen von einer komplexen Signalkaskade aus, die unter dem Einfluss estrogenartige Substanzen in Gang gesetzt wird. Auch wurde eine Erhöhung der SHBG-Produktion durch Genistein diskutiert und ein damit einhergehender gesenkter proliferativer Effekt in einer Hepatomzelllinie (54). Eine kürzlich veröffentlichte Arbeit von Frasor et al. beschreibt detailliert ein komplexes Netzwerk von Genen, deren Expression durch E_2 in MCF-7 Zellen reguliert wird und weit reichende Effekte auf die Signaltransduktion, den Metabolismus der Zellen und auch auf die Aktivität des E_2 selbst hat (279).

Maggiolini et al. testeten ausgewählte Phytoestrogene und fanden bei Behandlung mit subtoxischen Dosen eine mit der proliferativen Wirkung einhergehende starke Transkriptionsaktivität des $ER\alpha$ in MCF-7 Zellen (198). Einen solchen direkten Zusammenhang konnten wir nicht beobachten, nur im Falle von SAR, welches in beiden Systemen eine sehr hohe Effektivität besitzt, lässt sich eine Proportionalität erkennen. Wurde die Dosis bei Maggiolini et al. weiter erhöht, war eine zytotoxische Wirkung zu beobachten, und zwar übereinstimmend mit unseren Daten sowohl in MCF-7- als auch im ER-freien Zellsystem, den V79-Zellen.

Hinzu kommt die oben bereits erwähnte Beobachtung von Power et al. (144), der einhergehend mit gesteigerter Proliferation eine Veränderung der ER-Spiegel beschreibt. Verknüpft man diese Aussagen, so ist festzuhalten, dass sowohl erhöhte Transkriptionsaktivität von $ER\alpha$ als auch eine Verlagerung des Konzentrationsverhältnisses $ER\alpha/ER\beta$ hin zu einem kleineren Quotienten und scheinbar eine erhöhte $ER\beta$ -Affinität ein Indiz für erhöhte MCF-7-Proliferation ist. Dies gibt somit Anlass zur Vermutung einer schlechten Prognose im Hinblick auf das Wachstum eines Mammakarzinoms. Solch eine Verschiebung des ER-Verhältnisses wurde interessanterweise auch im Falle fortgeschrittener invasiver Endometriumkarzinome festgestellt (280). Eine mit erhöhter $ER\beta$ -Affinität verschiedener pflanzlicher Extrakte einhergehende gesteigerte MCF-7-Proliferation fanden Boue et al. (151). Unsere Ergebnisse zeigen außerdem, dass Proben, die schwächer an die ER-Subtypen binden als E_2 , in der Lage sind, die Proliferation von MCF-7 Zellen stärker zu fördern als dieses, was sich auch in der Literatur wieder findet (141).

Eine ebenso starke proliferierende Wirkung wie 10^{-8} M E₂ weisen 0,1µg/ml 8-PN und 10,0µg/ml SAR auf, die beiden Proben, welche die Transkriptionsaktivität am meisten zu steigern vermögen. Damit sind sie nicht die effektivsten Proben im Proliferationsassay, diese Stellung wird von 1,0µg/ml IXH übernommen, gefolgt von SAR bei 1,0µg/ml; für diese beiden Konzentrationen lässt sich auch eine Aktivierung der Transkriptionsaktivität feststellen. Generell ist eine Regelmäßigkeit aber nicht erkennbar.

Auch die von Power et al. (144) beschriebene Hochregulation von ERβ durch E₂ bzw. 8-PN oder SAR, konnten wir, wie bereits erwähnt, nicht nachvollziehen. Hierfür mögen die existierenden recht heterogenen Subklone der MCF-7-Zelllinie mit verantwortlich sein und auch die Unterschiedlichkeit der Systeme, in denen die jeweiligen Bestimmungen durchgeführt wurden: Für die zelluläre Antwort der MCF-7 Zellen sind die Kulturbedingungen, die Anzahl der Passagen (281), sowie der experimentelle Aufbau entscheidend. Besonders die estrogenvermittelte Proliferation hat sich als sehr variabel in den einzelnen im Umlauf befindlichen MCF-7-Zelllinien erwiesen. Nicht zuletzt sind die Ergebnisse auch abhängig von der angewendeten Meßmethode (³H-Thymidin-Inkorporation, MTT-Reduktion, Zählung der Nuklei) (255).

Interessanterweise werden gerade Phytoestrogene mit einer erhöhten ERβ-Affinität mit einem weniger gefährlichen Profil im Vergleich zu E₂ verknüpft. Mit ihrem Konsum werden geringere Raten an hormonabhängigen und auch nicht-hormonabhängigen Krebserkrankungen verbunden; für Genistein wurde die Inhibition des Wachstums zahlreicher Krebszelllinien gezeigt (282). Als Erklärung hierfür mag zumindest teilweise der biphasische Effekt dienen, den die Phytoestrogene in Bezug auf die Zellproliferation zeigen. Es besteht ein scharfer Übergang zwischen proliferativer und zytotoxischer Wirkung auf die Zellen (MCF-7 und V79). Hieraus lässt sich ableiten, dass sie in geringer Konzentration verzehrt die Entwicklung und Promotion bestimmter hormonabhängiger Brustkrebsarten vermutlich fördern können, in hohen wirken sie hingegen antitumorigen. Daraus folgt, dass eine Empfehlung phytoestrogenreicher Ernährung oder gar Substitution von Phytoestrogenen als Arzneiform bei postmenopausalen Frauen kritisch überdacht werden sollte. Auch der endogene Estrogenstatus spielt eine wichtige Rolle, da hormonsensitives Gewebe nach Entwöhnung wahrscheinlich hypersensitiv reagiert (198). Für Frauen mit Diagnose Brustkrebs sollte der Phytoestrogenanteil der Ernährung abgestimmt sein auf die Art des jeweiligen Tumortyps.

Somit stellt die Beobachtung der estrogenstimulierten Zellproliferation in MCF-7 Zellen eine sehr sensitive Methode zur Einschätzung der Estrogenität dar. Sowohl in-vivo als auch in-vitro induzieren Estrogene die Proliferation von Brustkrebszellen (144). Für zahlreiche (potentielle) Phytoestrogene hingegen wurden wie oben beschrieben biphasische Effekte auf dieses System festgestellt (28;216). Ein solcher biphasischer Effekt lässt sich auch für alle Proben bis auf SOY in den Ergebnissen des Zytotoxizitätsassays erkennen.

4.3.4 Zytotoxizität der Phytoestrogene

Inhibition, bzw. Zytotoxizität erfordert im Assay den Einsatz supraphysiologischer oder nur bei sehr phytoestrogenreicher Ernährung erreichbarer Konzentrationen, das heißt von über 10µM, was ca. 2,6µg/ml entspricht (28;216).

Als Maß bei der Betrachtung der Zytotoxizität dient die EC₅₀, die Konzentration der Probe, die eine Verringerung der Zahl lebender Zellen um 50%, verglichen mit der Negativkontrolle (Medium), bewirkt. Die EC₅₀ von Flavonoiden liegen im allgemeinen zwischen 4,2-18µg/ml (216;261), ein Konzentrationsfenster, in dem sich auch zahlreiche der von uns getesteten Phytoestrogene befinden. Auffällig ist die sehr geringe Zytotoxizität des Sojaextraktes, gefolgt vom *Cimicifuga*-Extrakt und dem Hopfenextrakt HE-2. Die EC₅₀ von Naringenin, einem Bestandteil von Zitrusfrüchten, beträgt in der ER-negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-43 18µg/ml (283), Prenylierung dieser Verbindung erhöht die Toxizität auf EC₅₀-Werte zwischen 3-10µg/ml für 8-PN und sogar 1-3µg/ml für 6-PN, allerdings in unserem Messsystem, in V79 Zellen. Zur exakten Beurteilung müsste Naringenin in unserem Test mit eingesetzt werden. Ebenso verhält es sich im Falle von Genistein, für das eine EC₅₀ von 5µg/ml aufzufinden ist. Der Sojaextrakt hingegen zeigt sich in der Konzentration 300µg/ml in V79-Zellen noch nicht zytotoxisch. Dies deutet darauf hin, dass sich zytoprotektive Substanzen im Extrakt befinden könnten oder die Konzentration des Genistein darin sehr gering ist (<1,7%).

In unterschiedlichen Zellkulturen untersuchten Miranda et al. (125) die Zytotoxizität prenylierter Flavonoide aus dem Hopfen, darunter auch XH und IXH. In MCF-7 Zellen fanden sie nach 4-tägiger Behandlungszeit eine EC₅₀ von 3,5µM für XH und 4,7µM für IXH, in anderen Zelllinien differieren diese Werte je nach Robustheit der Zellen. In V79 Zellen ist IXH die Substanz mit der geringsten EC₅₀, und zwar <1µg/ml, was ungefähr dem von Miranda et al. gefundenen Wert entspricht. Die EC₅₀ von XH liegt bei uns um das mehr als das 10-Fache höher. Folgerichtig ist das Ausmaß der Zytotoxizität von Verbindungen, die

man im Falle von Krebszelllinien mit einem chemopräventiven Effekt verknüpft, abhängig von der Art der Zelllinie (125).

Übereinstimmende Befunde liefert die Betrachtung der Zytotoxizität von GLY im Vergleich zu einem seiner Bestandteile, dem Isoliquiritigenin. Für letzteres wird ein toxischer Konzentrationsbereich ab 2,55µg/ml in MCF-7 und ER-negativen HeLa-Zellen angegeben (216). Dies stimmt überein mit dem von uns ermittelten Wert einer EC₅₀ zwischen 1µg/ml und 3µg/ml. Damit gehört GLY wie auch wie auch 6-PN und mehr noch IXH zur Gruppe der recht zytotoxischen Verbindungen.

Den entgegengesetzten Pol bilden SOY und CIM. In der Literatur findet sich für CIM sowohl proliferative als auch antiproliferative Effekte in unterschiedlichen Zelllinien. Auch das Ausmaß der Estrogenität wird kontrovers diskutiert (237). Begründet sein mag dies in der Heterogenität der untersuchten Extrakte. Es lässt darauf schließen, dass sich unter Umständen viel versprechende SERM-artige Substanzen im Inhaltstoffspektrum der Pflanze befinden.

Der Mechanismus, über den Proliferation, bzw. Zytotoxizität vermittelt wird, ist nicht vollständig aufgeklärt. Dass es sich um unterschiedliche oder mehrere ineinander greifende Wirkungen handeln muss, zeigt sich daran, dass proliferative und antiproliferative Effekte sowohl in ER-haltigen Zellen als auch in Zellen ohne ER zu beobachten sind, und daran, dass auch solche Substanzen oder Extrakte, die keine ER-Affinität aufweisen, die Zellproliferation beeinflussen ((198;216;261); eigene Ergebnisse). Hier wird eine Veränderung des Zellstoffwechsels durch unspezifische inhibitorische Effekte diskutiert wie zum Beispiel die Inhibition von Tyrosinkinasen (261;284).

4.4 Das Zellsystem Ishikawa als Endometrium-Modell

4.4.1 ER-Expression

Neben der Estrogenität im Brustgewebe, bzw. in Brustkrebszellen, ist auch diejenige im Endometrium von Bedeutung. Für in-vitro Untersuchungen ist die Ishikawa Zelllinie fest etabliert, bei der es sich, wie bereits beschrieben, um epitheliale Drüsenzellen handelt, die einem Adenokarzinom entstammen. Critchley et al. (192) befassten sich mit der Untersuchung des Profils der ER α - und ER β -Expression im vaskulären Endothel des Endometriums, welches aus Drüsen- und Stromazellen besteht. Mithilfe spezifischer Antikörper identifizierten sie sowohl ER α als auch ER β in den Zellkernen dieser Zelltypen. Wie bei den MCF-7 Zellen ist in Ishikawa Zellen ein relatives Überwiegen von ER α

gegenüber ER β mittels Realtime PCR feststellbar, jedoch mit einem lediglich 21-fachen Überschuss in mit Medium behandelte Kultur gegenüber einem 450-fachen Überwiegen in MCF-7 Zellen. Die Extrakte Soph und HE-1 modulieren dieses Verhältnis in anderer Weise als EE es tut, sie verhalten sich antiestrogen. Während EE sowohl die Genexpression von ER α als auch die von ER β stimuliert, wird sie durch die pflanzlichen Proben stark inhibiert. Eine solche Beobachtung machten auch Bhat et al. (220) für die als Phytoestrogen etablierte Substanz Resveratrol, die unter anderem in Rotwein aufzufinden ist. Einhergehend mit der Genexpression fanden sie auch die ER-Proteinexpression unterdrückt.

Interessanterweise konnten Wober et al. (251) ebenfalls unter Anwendung der Realtime RT-PCR nur ER α nicht jedoch ER β in Ishikawa Zellen detektieren (251). Da in der Publikation aber weder die Bedingungen noch das System der Realtime PCR genannt sind, lässt sich jenes Ergebnis nicht diskutieren, es steht jedoch anderen Berichten entgegen (285). Im Hinblick auf die Vielfältigkeit der in Umlauf befindlichen MCF-7 Zelllinien, die wie beschrieben eine hohe Variabilität in den ER-Subtypen innehaben, ließe sich ein solcher Zustand auch für die bereits seit Jahrzehnten etablierte Ishikawa Zelllinie vermuten.

4.4.2 Estrogenität der Phytoestrogene am Endometrium

Eine häufig zur Überprüfung potentieller estrogener oder antiestrogener Effekte in Ishikawa Zellen angewandte Methode ist die Messung der Alkalischen Phosphatase (236;251). Entscheidender Vorteil dieses Assays ist seine hohe Reproduzierbarkeit der Ergebnisse gepaart mit einer hohen Sensibilität bezüglich synthetischer Estrogene und auch pflanzlicher Verbindungen und Extrakte (251).

Das synthetische EE zeigt gegenüber der Kontrolle einen 10-fach stärker stimulierenden Effekt auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Keine der getesteten pflanzlichen Proben erreicht eine mit dem EE vergleichbare Wirksamkeit. In diesem überwiegend ER α -enthaltenden Zellsystem zeigen sie sich also als schwache Estrogene. Der Einfluss ER β -vermittelter Wirkungen in Ishikawa Zellen, ER α überwiegt mit einem Faktor zwischen 21 und 37, je nach Behandlung der Zellen, ist vermutlich gering, aber um ein Vielfaches höher als in MCF-7 Zellen, in denen verhältnismäßig viel weniger ER β enthalten ist. In welchem Ausmaß die AP durch E₂ oder EE stimuliert wird, hängt vom experimentellen Design ab. In der Literatur variieren sie zwischen einem 2-3-fachen und 15-fachen Anstieg (221;234;286;287). Diese Tatsache, dass die Phytoestrogene weniger potent sind als EE, ist im Hinblick auf das mit einer Estrogentherapie einhergehende erhöhte Risiko eines Endometriumkarzinoms als positiv zu beurteilen. Ein stark estrogener Effekt am Endometrium ist auch in-vivo nicht

erwünscht. Hinzu kommt die Beobachtung, dass Flavonoide in der Lage sind, in Anwesenheit eines Estrogens wie ein Antiestrogen zu wirken ((218), s. unten).

Festzustellen ist, dass die isolierten Einzelsubstanzen aus dem Hopfen in diesem System eine stärkere estrogene Potenz aufweisen als die Extrakte, eine Beobachtung, die wir bereits für die Transkriptionsaktivität konstatierten und in der Literatur belegt fanden. Wie auch bei der Untersuchung der knochenspezifischen AP zeigen sich die Hopfenbestandteile als recht effektiv, HE-1 in der höchsten Konzentration (10µg/ml) mit ca. 85% des EE-Effektes, dann XH, dann 8-PN bereits in den niedrigeren Konzentrationen (0,1µg/ml und 1,0µg/ml). Auch bei Wober et al. (251) bewirkt 8-PN einen dosisabhängigen Anstieg bis hin zur Konzentration 10^{-5} M (entspricht ungefähr 1,0µg/ml), bis zu der die Substanz getestet wurde. Wir zeigen zusätzlich, dass die AP-Aktivität bei 10^{-4} M wieder stark abfällt, und zwar unter den Wert der Mediumkontrolle, so dass wir uns hier bei dieser Substanz im zytotoxischen Bereich zu befinden scheinen. Bei Milligan et al. (123) ist 8-PN die bei weitem wirksamste Substanz nach E_2 mit maximaler AP-Stimulation bei bereits knapp 10^{-7} M während sie für E_2 nur eine Zehnerpotenz darunter liegt. Für XH stellten sie jedoch keine Wirksamkeit fest, 6-PN und IXH, die bei uns weniger aktiv sind als XH, liegen bei Milligan et al. in ihren Effekten dazwischen. Damit zeigt sich 8-PN bei ihnen stärker wirksam als Genistein. Die Erklärung für den Unterschied der wirksamen Konzentrationen liegt vermutlich in der Inkubationszeit, die in unserem Experiment 48 Stunden, bei Milligan et al. 72 Stunden beträgt.

Auch die Extrakte aus Soph und GLY sind in ihren hohen Konzentrationen sehr wirksam, ihr stärkster Effekt entspricht jedoch nur ca. 70% des durch EE hervorgerufenen. Der getestete ethanolische *Cimicifuga*-Extrakt zeigt in seiner höchsten eingesetzten Konzentration von 10µg/ml eine nur ca. 30%ige Stimulation der AP im Vergleich zu der des EE. Eine auch nur schwach stimulierende Wirkung haben zwei unterschiedliche Extrakte dieser Pflanze bei Wober et al. (251) gezeigt. Der Frage, ob CIM auch in-vivo keinen stark ausgeprägten uterogenen Effekt besitzt, wurde vor kurzem nachgegangen, und die vermutete SERM-Eigenschaft für diese Pflanze konnte bestätigt werden. Es zeigte sich keine dem E_2 entsprechende uterogene Wirksamkeit (149).

Zusätzlich führten wir eine gleichzeitige Behandlung der Zellen modellhaft mit einem der Flavonoide (XH) und EE durch, um einen eventuellen antiestrogenen Effekt zu überprüfen. Dies ergab eine milde, aber keine signifikante Senkung der AP-Aktivität im Vergleich zur alleinigen Wirkung durch EE. Diese Beobachtung lässt auf eine lediglich schwache antiestrogene Eigenschaft der Verbindung schließen. Maggiolini et al. (198) stellen Ähnliches

fest, zeigen jedoch gleichzeitig, dass sich eine signifikant verminderte AP-Stimulation durch EE bei 30-minütiger Vorbehandlung der Zellen mit einem Phytoestrogen einstellt. Dies erklärt sich dadurch, dass es sich bei der estrogenvermittelten Regulation der AP über die Bindung an den ER um einen genomischen Mechanismus handelt. Der Bindung des Liganden an den ER folgt eine Signaltransduktionskette, die in der Regulation der Enzymproduktion der AP endet. Die alleinige Vorinkubation mit einem Phytoestrogen, welches antiestrogene Eigenschaften besitzt, führt folglich zu einer effizienteren Modulation der estrogenen Wirkung.

Ob diese in-vitro Beobachtungen auf in-vivo Verhältnisse übertragbar sind, müssen Tierexperimente sowie Humanstudien zeigen. Für Genistein konnte nachgewiesen werden, dass es im Tierexperiment antikanzerogene Effekte, besonders in Bezug auf estrogenabhängige Krebsarten hat (288). Diel et al. (259;289) verglichen in-vitro und in-vivo Wirkungen von Genistein, bzw. Daidzein und untersuchten deren Effekt im Vergleich zu EE auf eine Auswahl estrogenregulierter uterogener Gene und gleichzeitig den jeweiligen Effekt auf das Uterusgewicht und auf das Wachstum von Zellen, die einem Adenokarzinom entstammen. Für Genistein ergab sich ein differentieller Effekt, der wiederum die These, dass es sich um ein SERM handelt, bestätigt: Während die Genexpression als sensibelstes System auch durch Phytoestrogene teilweise wie durch Estrogen moduliert wird, zeigen sich diese nur als schwache Estrogene in Bezug auf normales und malignes Endometriumgewebe der Ratte. Horn-Ross et al. (112) führten unter amerikanischen Frauen eine Fall-Kontroll-Studie durch, um das Verhältnis zwischen typischerweise in amerikanischer Ernährung enthaltener Phytoestrogene und dem Endometriumkarzinomrisiko zu ermitteln. Für einige Isoflavone (Genistein und Daidzein) und Lignane (zum Beispiel Secoisolariciresinol) wiesen sie ein gesenktes Risiko in Bezug auf diese Krebsart nach, wobei die Abnahme des Risikos in Bezug auf postmenopausale Frauen sogar etwas stärker ausgeprägt zu sein scheint. Als Begründung für diesen Effekt werden die Senkung des endogenen Estrogenspiegels und die kompetitive Bindung an die ER angegeben. Weiterhin vermuten sie eine Aromataseinhibition durch die Phytoestrogene, so dass die Umwandlung von Androstendion zu Estron, welches dann uterogen wirksam werden kann, vermindert wird. Ein solcher Effekt auf die Aromatase und auch andere im Estrogenstoffwechsel beteiligte Enzyme wurde bereits nachgewiesen (290). Interessanterweise stellten sie im Zuge der Studie keinen Einfluss auf das Brustkrebsrisiko fest (s. oben), was wahrscheinlich darin begründet liegt, dass die Probandinnen geringere Mengen an Phytoestrogenen zu sich nahmen als in weiter vorn beschriebenen Studien zur Einschätzung des Brustkrebsrisikos (291). Horn-Ross et al. leiten daraus ab, dass in niedriger

Dosis aufgenommene Phytoestrogene einen stärkeren Effekt auf solche Karzinomarten haben, die nur estrogenabhängig sind als auf solche, die estrogen- und progesteronabhängig sind (112).

Festzuhalten ist, dass sich Phytoestrogene in Bezug auf die AP-Produktion in Ishikawa Zellen wie schwache Estrogene verhalten. Dem gegenüber kann die Anwesenheit dieser Phytoestrogene auch die estrogeninduzierte AP Aktivität senken (198). Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Interaktionen zwischen Phytoestrogenen und ihren molekularen Zielstrukturen wie Estrogenrezeptoren und anderen Transkriptionsfaktoren in Endometriumzellen zu untersuchen.

Dass die Effekte zumindest teilweise ER-vermittelt sind, zeigt eine Parallelbehandlung mit dem ER-Antagonisten ICI, welcher die AP-Stimulation in Ishikawa Zellen fast völlig unterbindet (236;237). Da in der Zelllinie beide ER-Subtypen enthalten sind, kann nicht zwischen ER α -, bzw. ER β -vermittelten Effekten unterschieden werden.

4.5 Das Zellsystem Fe33 als Modell für die Leber

Wie im Endometrium, so sind auch in der Leber in Bezug auf die dort untersuchte Expression estrogenresponsiver Gene die Phytoestrogene als schwache Estrogene aktiv und zeigen zugleich SERM-Eigenschaften (eigene Daten, (292)). Ersteres ergibt sich daraus, dass sich die pflanzlichen Substanzen und Extrakte mit der Stärke ihrer Effekte unterhalb derer des EE aufhalten. Die SERM-Aktivität zeigt sich in der differentiellen Wirkung, welche die Verbindungen auf die einzelnen Gene ausüben; sie verhalten sich in ihrer Modulationsweise nicht gleich von Gen zu Gen, sowohl bezüglich der Stärke als auch der Richtung des Effektes. Es wurde der Begriff „target specificity“ geprägt, der SERMs zusätzlich zu ihrer Gewebespezifität („tissue specificity“) charakterisiert (292).

Als Modell für die Untersuchungen am Organ Leber steht die Rattenhepatomzelllinie Fe33 zur Verfügung, die ER α stabil transfiziert enthält (116). In der Leber ist ER α der vorherrschend vorhandene Subtyp. Klett et al. zeigten, dass in-vitro unter Verwendung primärer Hepatozyten erzielte estrogene Effekte wie der Anstieg der Angiotensinogen-mRNA und auch der Sekretion von AT, auch im Fe33 Modell nachgewiesen wurden. Von Vorteil ist, dass die Fe33 Zelllinie nur ER α enthält, das heißt, die beobachteten Effekte können direkt auf diesen Subtyp zurückgeführt werden und Interaktionen zwischen ER α und ER β , wie sie in primären Hepatozyten oder auch in der Ishikawa Zelllinie vorkommen, können

ausgeschlossen werden. Weiterhin weist sie einen stabilen ER-Spiegel auf und vermag damit einheitliche Ergebnisse zu liefern. In primären Hepatozyten nimmt der ER-Gehalt innerhalb weniger Stunden in-vitro drastisch ab (116;222;240). Vorversuche und Berichte zur AT-Regulation durch Estrogen mit primären Hepatozyten zeigten sehr uneinheitliche Ergebnisse (240). Daher bieten sie kein sinnvolles System zur Überprüfung estrogener Effekte in-vitro (222).

4.5.1 Regulation der AT-Genexpression

Ziel Krattenmachers et al. (222) war es, sowohl ein in-vivo Tiermodell als auch ein in-vitro Modell zu etablieren, um die hepatische Aktivität estrogener Testsubstanzen zu untersuchen und die zugrunde liegenden Mechanismen direkter oder indirekter Art zu erforschen, was ihnen mit der Fe33 Zelllinie gelang.

Wie einleitend bereits beschrieben, ist die hepatische Biosynthese von AT unter anderem abhängig von Estrogenen. Schwankungen in der AT-Produktion gehen einher mit Veränderungen in der AT-Genexpression (115;222). Dass Estrogene über diesen Pfad den Blutdruck beeinflussen, wird deutlich an Erscheinungen wie Schwangerschafts-Gestose oder sich unter kontrazeptiver oder substitutiver Therapie entwickelnder Hypertonie (114;115). Krattenmacher et al. folgern aus ihren kombinierten in-vivo/in-vitro Experimenten eine direkt ER-vermittelte Stimulation der AT-Expression in der Leber (222), was durch die Beobachtung gestützt wird, dass der AT-Promotor direkt über ein ERE reguliert wird (117). Beschrieben wurde zusätzlich ein Zusammenhang zwischen dem AT-Plasmaspiegel und dem hepatischen ER α -Gehalt der weiblichen Ratte (293), was später erweitert wurde um die Erforschung des estrogenen Einflusses auf diese beiden Parameter. Sie werden in der weiblichen Ratte durch Estrogengabe dosisabhängig heraufreguliert (294).

Im ovariectomierten, bzw. zusätzlich hypophysectomierten Rattenmodell wurde nach 11-tägiger EE-Behandlung ein 60%iger, bzw. 80%iger Anstieg des AT-Plasmaspiegels beobachtet, kein Effekt jedoch bei E₂-Behandlung, was sich auf die unterschiedliche metabolische Stabilität der Substanzen zurückführen lässt. Vermutlich wird in der Leber keine ausreichende, die Proteinsynthese stimulierende E₂-Konzentration erreicht, bei Erhöhung der E₂-Dosis kann sich dies ändern (295). Das EE unterliegt zudem einem enterohepatischen Kreislauf, so dass ein ausreichend hoher intrahepatischer Spiegel dieser Substanz wahrscheinlich ist (222). In der Fe33-Zelllinie beschreiben Krattenmacher et al. nach 24-stündiger Behandlung mit 10⁻⁸M EE einen 2,4-fachen Anstieg der AT-mRNA. Dieser Wert stimmt mit dem unsrigen genau überein, bei Behandlung mit 10⁻⁷M EE steigt er auf ca. 3,9.

4.5.2 Regulation der CaBP9k-Genexpression

Ähnlich der pS2-Expression, die wir in den U-2 OS/ER-Zelllinien als etablierten estrogenen Marker verwendeten ohne eine Funktion im Knochenstoffwechsel zu kennen, dient in den Fe33 Zellen das Vitamin D-abhängige Calcium Binding Protein (CaBP9k) als sensitiver estrogener Parameter (116;240). Funktionell spielt es eine wichtige Rolle bei Calciumtransport und -resorption (241).

An et al. (242) untersuchten die Eignung der CaBP9k-mRNA Regulation als Parameter im Rattenmodell zur Einschätzung der estrogenen Potenz von in der Umwelt vorkommenden Alkylphenolen. Sie fanden eine hohe Korrelation zwischen der dosis- und zeitabhängigen Modulation des Uterusgewichtes und der CaBP9k-mRNA Expression. Darüber hinaus beobachteten sie, dass die ER α -mRNA entsprechend der CaBP9k-mRNA durch Alkylphenole und E₂ stimuliert wurde, was auf eine Beteiligung von ER α an der Regulation der CaBP9k-mRNA Expression schließen lässt. Diese Ergebnisse legen nahe, dass sich das CaBP9k-Gen als Marker zur Aufklärung der Estrogenität potentiell hormonwirksamer Verbindungen eignet.

Diel et al. untersuchten den Einfluss von E₂, bzw. EE auf den CaBP9k-Spiegel in Fe33 Zellen und vergleichsweise im ovariectomierten Rattenmodell sowie im Uterus der Ratte (240). In 24-stündiger Kombinationsbehandlung mit Dexamethason und Glucagon erhöht EE (10⁻⁸M) den CaBP9k-mRNA-Spiegel um das 15-Fache, nachgewiesen mittels „Differential Display RT-PCR“ und anschließend Northern Blot. Die Regulation durch das synthetische Hormon ist damit sehr viel geringer als die von uns detektierte (ca. 190-fach). Grund dafür mag zunächst die sehr empfindliche Methode der Realtime RT-PCR sein, die wir anwendeten. Weiterhin bestand unsere Behandlung aus 10⁻⁸M EE ohne Zusatz anderer Hormone.

Nach 14-tägiger E₂-Behandlung zeigte sich in-vivo kein Anstieg des mRNA-Spiegels von CaBP9k in der Leber, dafür aber in denselben Versuchstieren im Uterus (240).

Thomae et al. (241) beschäftigten sich wie wir mit der Regulation der Genexpression in Fe33 Zellen durch ausgewählte Phytoestrogene (s. u.) und ermittelten CaBP9k als das sensitivste Gen hinsichtlich der Regulation durch Estrogene. Für die Modulation des CaBP9k erstellten sie Dosis-Wirkungs-Kurven mittels Realtime RT-PCR für EE und E₂ in einem Konzentrationsbereich von 10⁻¹⁰M bis 10⁻⁶M, was eine Hochregulation der Genexpression um das 60-, bzw. das 35-Fache gegenüber der Kontrolle ergab. Dies bestätigt zum einen die vermutlich schnellere Metabolisierung des endogenen Hormons und zum anderen sowohl die Empfindlichkeit der Methode als auch die Responsivität des Gens gegenüber Estrogenen. Die immer noch vorhandene Differenz zu unserem Ergebnis könnte auf dem Unterschied in der

Behandlung der Zellkulturen beruhen oder auch auf der Art der Negativkontrolle (Lösungsmittelhaltiges Medium gegenüber reinem Medium).

4.5.3 Differentielles Profil der Phytoestrogene

Die getesteten Phytoestrogene weisen in Bezug auf die Genexpression ein differentielles Profil auf. Hinsichtlich der AT-Genexpression verhalten sie sich wünschenswert, lediglich 8-PN in seiner höchsten Konzentration (10 µg/ml) erreicht die Stärke von 10^{-8} M EE, wobei sein Wert eine große Standardabweichung enthält. Auch Vollmer et al. identifizierten 8-PN vor kurzem als stark estrogenwirksam in Bezug auf die Genexpression in der Rattenleber (296). Alle weiteren Proben induzieren die AT-mRNA maximal um das 2-Fache gegenüber der Kontrolle und sind damit weniger stark wirksam als EE, der Reihenfolge nach (abnehmend in der Stärke) 6-PN, dann IXH, GLY und CIM mit ungefähr gleichen Effekten. Besonders HE-2 hebt sich kaum vom Kontrollwert ab. In der Gesamtheit ist das Profil der Phytoestrogene recht einheitlich, also ohne große Unterschiede in ihren Effekten.

Anders verhält es sich beim CaBP9k. Bezüglich der CaBP9k-Genexpression haben mehrere der Verbindungen so gut wie keinen Effekt, und zwar XH, IXH und SOY. Auch der stärkste durch eines der Phytoestrogene ausgeübte Effekt bleibt mit 6-facher Stimulation durch HE-2 weit unterhalb der Wirkung des EE. Dieser Hopfenextrakt ist unwirksam hinsichtlich der AT-Genexpression. Der Reihe nach (abnehmend) folgen PHA, 8-PN (beide in der höchsten Konzentration), dann SAR, 6-PN und CIM (bereits bei geringeren Konzentrationen). Ein ähnliches Muster beschreiben Thomae et al. (241), die für Genistein, Daidzein und Naringenin schwache Effekte, für 8-PN jedoch keinen Einfluss feststellten. Der sowohl Genistein als auch Daidzein enthaltende Sojaextrakt zeigt in unseren Untersuchungen keinen nennenswerten Effekt, was einerseits auf nur geringe Konzentrationen der beiden Substanzen im Extrakt hindeuten kann, andererseits spielen auch Interaktionen aller Bestandteile miteinander eine Rolle für die Gesamtwirkung. Der Hopfeninhaltsstoff 8-PN zeigt bei uns einen Einbruch in der Dosis-Wirkungskurve für die mittlere Konzentration 1 µg/ml. Während die CaBP9k-Stimulation für die niedrigste und höchste Konzentration beim Faktor 3, bzw. fast 4 liegt, beträgt dieser für die mittlere lediglich knapp 2. Möglicherweise handelt es sich um ein Artefakt.

Zusammenfassend zeigen sich die Phytoestrogene in Bezug auf das Organ Leber als schwache Estrogene und weisen SERM-artige Eigenschaften auf. Besonders im Hinblick auf die AT-Genexpression, deren Erhöhung durch Estrogene eine direkte gesundheitliche Gefahr

darstellt, zeigen die pflanzlichen Stoffe ein wünschenswertes Profil. Ein chronischer Hypertonus führt durch Freisetzung von Wachstumsfaktoren (zum Beispiel PDGF) zu einer Verdickung der Gefäßwände und damit zu einer zusätzlichen Widerstandserhöhung. Außerdem stellt sie eine der Hauptursachen der Atherosklerose dar und geht somit einher mit einem erhöhten Risiko für einen Schlaganfall; die Ausbildung einer Hypertonie sollte deshalb unbedingt vermieden werden.

4.6 Zusammenfassende Beurteilung der Testsysteme in Bezug auf die Erschließung des Profils der Phytoestrogene

Zusammenfassend ist festzuhalten, dass sich die gewählten Testsysteme als zuverlässig und geeignet erweisen zur Überprüfung der estrogenen Potenz pflanzlicher Verbindungen und Extrakte. Die von uns ermittelten Ergebnisse stehen generell im Einklang mit denen anderer Arbeitsgruppen, weisen jedoch auch Differenzen auf und gehen darüber hinaus. Wir untersuchten zahlreiche Extrakte, deren potentiell estrogenen Wirksamkeit und deren SERM-Charakter noch nicht bekannt sind. Die gewählte Kombination der Testmodelle gibt Aufschluss über das Verhalten der Proben in unterschiedlichen Geweben sowie über deren ER-Affinität und ER-Aktivität. Über die Wirkung von Phytoestrogenen in der Leber ist erst wenig bekannt, während die Erstellung eines Profils für Brust- und Endometriumgewebe etabliert ist und die Wirkung auf den Knochen im Hinblick auf eventuelle Osteoporoseprävention immer häufiger untersucht wird.

Die Verknüpfung der experimentellen Erkenntnisse zeigt, dass die Phytoestrogene als SERMs agieren und einzelne unter ihnen das Potential haben könnten, Alternativen zur HRT darzustellen. Die Eigenschaft der Phytoestrogene wie ein schwaches Estrogen zu wirken, macht es erklärlich, dass sie sich unter bestimmten experimentellen Bedingungen wie Estrogene verhalten, das heißt die Zellproliferation fördern oder E₂-abhängige Genexpression stimulieren (297). Gleichzeitig sind Phytoestrogene jedoch auch in physiologischen Konzentrationen in der Lage auf estrogeninduziertes Zellwachstum oder in Anwesenheit von E₂ inhibitorisch zu wirken (217;298). Dieser Zustand entspricht den Verhältnissen im menschlichen Organismus. Trotzdem ist Vorsicht geboten beim Konsum von Phytoestrogenen für postmenopausale Frauen mit hormonsensitivem Brustkrebs (198).

5. Ausblick

Mit großer Hoffnung verknüpft ist die Fähigkeit der Phytoestrogene die Estrogenrezeptoren selektiv zu modulieren, ihr so genannter SERM-Charakter. Sie sind in der Lage sowohl estrogenagonistisch als auch estrogenantagonistisch zu wirken, und zwar je nach Zelltyp, ER-Subtyp und Parameter. Auch das gleichzeitige Vorhandensein von Estrogenen hat Einfluss auf die Wirkung von Phytoestrogenen, sie vermögen die estrogenen Effekte zu antagonisieren (198;230). Diese Tatsache könnte eine Möglichkeit bieten, die unakzeptabel hohen mit der HRT einhergehenden Risiken maßgeblich abzuschwächen. Davis et al. (299) haben kürzlich ein neuartiges Therapieschema entworfen und diskutiert, das aus einem gering dosierten Estrogen in Kombination mit einem SERM besteht, wobei hier zunächst an eine synthetische Substanz wie Raloxifen gedacht wurde. Anstelle des Raloxifen wäre theoretisch auch ein Phytoestrogen vorstellbar. Um heraus zu finden, ob ein Phytoestrogen diese Position einnehmen kann, müssen die in Frage kommenden pflanzlichen Verbindungen vollständig charakterisiert werden, und zwar zunächst in-vitro, dann in Form von Tierexperimenten und später in Humanstudien in-vivo. Auch die Identifizierung der wirksamen Strukturen innerhalb der Extrakte ist vonnöten, da die Gesamtwirkung eines Extraktes mit großer Wahrscheinlichkeit nicht die Stärke enthaltener Einzelsubstanzen widerspiegelt (233).

Konkret bedeutet dies, dass die innerhalb unserer Testsysteme gewonnenen Erkenntnisse um die im Folgenden beschriebenen Untersuchungen erweitert werden sollten.

Das durch Davis et al. (299) erläuterte Therapieschema gibt die tatsächliche Situation im Organismus der Frau wieder. Ein geringer Spiegel endogenen Estrogens ist auch bei peri- und postmenopausalen Frauen vorhanden. Das eingenommene Phytoestrogen wird also immer kompetitiv wirken müssen. Somit ist es sinnvoll die im jeweiligen Assay (*Testsystem*) potentesten Proben und auch die Extrakte HE-2, PHA, CIM und SOY, welche ein positives Gesamtbild aufweisen, erneut, und zwar in Kombination mit einer geringen Konzentration E_2 , bzw. EE zu testen ($10^{-9}M$ und $10^{-10}M$ E_2 , bzw. EE). Ein möglicher antagonistischer Effekt einer Probe auf die Wirkung des Estrogens kann so ermittelt werden. Dabei ist von Interesse, ob der die Knochendichte erhaltende Effekt, den sowohl einige der Phytoestrogene als auch bekanntermaßen Estrogene ausüben, bestehen bleibt.

Mithilfe des von uns verwendeten Rezeptorbindungsmodells konnte keine Aussage über die Bindungsaffinität der Extrakte HE-1, HE-2, PHA und CIM zu den ER-Subtypen gemacht werden; diese sollte auf anderem Wege ermittelt werden, da ihre Kenntnis einen wichtigen

Beitrag zur Aufklärung des zugrunde liegenden Mechanismus estrogener Wirkungen der Verbindungen liefert.

Alle Proben bis auf PHA zeigen in MCF-7 Zellen eine mit E₂ übereinstimmende oder diese übertreffende proliferative Wirksamkeit. Um zu überprüfen, ob diese ER-vermittelt stattfindet, ist eine Parallelbehandlung mit ICI durchzuführen, was auch in der Literatur beschrieben wird (216;261). Als Erweiterung bezüglich des Verhaltens von Phytoestrogenen in der Brustkrebszelllinie MCF-7 könnte man die Regulation zweier kürzlich entdeckter phytoestrogenspezifischer Gene als molekulare Marker hinzu ziehen (145).

Bereits durchgeführt haben wir eine Kombinationsbehandlung aus Phytoestrogen und EE in Ishikawa Zellen und den Einfluss auf die AP-Stimulation beobachtet. Festzuhalten ist, dass sich Phytoestrogene in Bezug auf die AP-Induktion in Ishikawa Zellen wie schwache Estrogene verhalten. Jedoch kann die Anwesenheit dieser Phytoestrogene die estrogeninduzierte AP-Aktivität senken, ihre antagonistische Potenz wird hierin deutlich. Es bedarf weiterer Untersuchungen, um die Interaktionen zwischen Phytoestrogenen und ihren molekularen Zielstrukturen wie Estrogenrezeptoren und anderen Transkriptionsfaktoren zu untersuchen.

Abgesehen von den klimakterischen Beschwerden bei Frauen und der möglichen Alternative in der Substitutionstherapie, könnte ein Einsatzgebiet von Phytoestrogenen auch die Prävention des Prostatakarzinoms beim Mann sein (300;301). Das Risiko einer Hyperplasie der Prostata steigt mit höherem Lebensalter an. Grund ist unter anderem ein verminderter Testosteron-Estrogen-Quotient (302;303). Es stehen humane Prostatakarzinom-Zelllinien zur Verfügung die sich in der ER-Expression unterscheiden, d.h. solche mit ER α und ER β sowie solche, die nur ER β exprimieren (zum Beispiel LnCAP, PC3, DU145) (304). Der Subtyp ER β überwiegt in-vivo stark im Prostata Gewebe.

Der estrogene Effekt der Pflanzeninhaltsstoffe ließe sich untersuchen wie folgt:

1. Untersuchung der Proliferationsaktivität
2. Untersuchung ihrer Fähigkeit Apoptose zu induzieren (Caspaseaktivität, DNA Fragmentierung)
3. Regulation der Genexpression: besonders PSA (prostate specific antigen) (305), sowie weitere Androgen und Estrogen regulierte Gene (pS2, etc.)

Das viel versprechende Profil von Phytoestrogenen im Allgemeinen und mehr noch die in dieser Arbeit gewonnen Erkenntnisse im Speziellen zeigen, dass in ihnen mögliche

Alternativen zur klassischen HRT liegen. Einige der getesteten Extrakte scheinen nur die erwünschten, nicht jedoch die unerwünschten estrogenen Wirkungen der HRT aufzuweisen, wie unsere Ergebnisse zeigen. 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.

6. Zusammenfassung auf Deutsch und Englisch

6.1 Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden ausgewählte Pflanzen auf ihr estrogenes Potential hin in unterschiedlichen Zielgeweben überprüft.

Hierbei handelt es sich um solche Gewebe, die hinsichtlich der Risiken und Vorteile der Hormonersatztherapie (HRT) eine wichtige Rolle spielen. Die klassische HRT geht einher mit einem erhöhten Mamma- und Endometriumkarzinomrisiko auf der einen sowie einem gesenkten Osteoporose-Risiko auf der anderen Seite. Gleichzeitig ist mit einem erhöhten Blutdruck unter Estrogentherapie zu rechnen, da Estrogene das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System beeinflussen. Aufgrund der nachteiligen Effekte der HRT müssen alternative Therapieoptionen gefunden werden, welche nur die wünschenswerten Aspekte aufweisen, nicht jedoch die unerwünschten. Solche Alternativen könnten in der Anwendung pflanzlicher Extrakte bzw. isolierter Inhaltsstoffe liegen, die eine selektive Estrogenrezeptor-modulierende (SERM) Aktivität zeigen. Die molekularen Mechanismen und die ER-Spezifität vieler Phytoestrogene sind bisher nicht bekannt.

Innerhalb dieses Projektes wurden pflanzliche Proben in den Zielstrukturen Brust, Endometrium, Knochen und Leber untersucht.

Als Brustkrebsmodell dient die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7, deren Proliferation als estrogen Marker untersucht wurde (229;261). Weiterhin wurden diese Zellen mit dem Promotor-Reportergen Konstrukt ERE-TK-Luc transient transfiziert und so die Transkriptionsaktivität der pflanzlichen Proben anhand des Luciferase-Assays analysiert (233).

Als Modell für das Endometrium zogen wir die humane Endometriumkarzinomzelllinie Ishikawa heran und bestimmten in ihr die Stimulation der Alkalischen Phosphatase (AP) durch Estrogen im Vergleich zu Phytoestrogenen (237). Sowohl in den verwendeten Ishikawa als auch in MCF-7 Zellen bestimmten wir mittels Realtime-RT-PCR die ER α - und ER β -Spiegel, um einen Hinweis darauf zu erlangen, über welche(n) Subtyp(en) die beobachteten Effekte vermittelt werden.

Zur Einschätzung der estrogenartigen Wirkung am Knochen haben wir Testsysteme auf der Enzymebene – Messung der AP-Aktivität in humanen fetalen Osteoblasten (hFOB/ER α) (208) – und der Ebene der Genexpression angewandt. In den erst kürzlich entwickelten osteoblastartigen Zelllinien, die jeweils einen ER-Subtyp enthalten (U-2 OS/ER α und U-2 OS/ER β), verfolgten wir per RT-PCR die Regulation knochenspezifischer (AP und

Interleukin-6 (IL-6)) sowie zweier estrogenregulierter Gene (pS2 und von Willebrand Faktor (VWF)) (209;215).

Die ER α -enthaltende Rattenhepatomzelllinie Fe33 dient als zuverlässiges Modell zur Überprüfung der Regulation des Angiotensinogen-Gens und eines weiteren sehr sensibel auf Estrogene reagierenden Gens, des Calcium-Binding-Proteins (9k) (222;240). Mithilfe der Realtime-RT-PCR untersuchten wir die differentielle Modulation dieser Gene durch die Phytoestrogene im Vergleich zu Ethinylestradiol (EE).

Zusätzlich zu diesen Zellkulturmethoden haben wir die Bindungsaffinität der Proben zu den Estrogenrezeptoren ER α und ER β in einem zellfreien Assay unter Anwendung humaner rekombinanter Rezeptorproteine analysiert (128;255).

Bei den in dieser Arbeit untersuchten Pflanzen handelt es sich sowohl um Extrakte als auch um isolierte Inhaltsstoffe aus Pflanzen, von denen eine estrogene Wirksamkeit entweder schon bekannt und in Teilen erforscht ist oder sich bisher nur aus Vermutungen aufgrund traditioneller Anwendungen ableitet. Zur ersten Gruppe gehören *Humulus lupulus*, L. (Hopfen), *Glycine max.* L. (Soja), *Cimicifuga racemosa* L. (Traubensilberkerze), *Glycyrrhiza glabra* L. (Süßholz) und *Rheum rhaponticum* L. (Rhapontikrhabarber). Weitgehend unerforscht ist eine estrogene Wirksamkeit für *Phaseolus vulgaris* L. (Gemeine Gartenbohne), *Sophora japonica* L. (Japanischer Perlschnurbaum) und *Sarothamnus scoparius* L. (Besenginster).

Wir gingen der Frage nach, ob sich mit Hilfe dieser Modelle an der ausgewählten Batterie von Pflanzen ihre estrogene Wirksamkeit bestimmen läßt.

Aus den Experimenten in Zellkulturen aus den insgesamt vier verschiedenen Geweben können wir ableiten, dass es sich 1. bei den untersuchten pflanzlichen Proben und Extrakten um Phytoestrogene handelt, da die estrogene Wirkung über die ER-Subtypen vermittelt wird und die Effekte teilweise estrogenähnlich sind und 2. dass es sich um SERMs handelt, da die Proben in verschiedenen Zelltypen an ER α und ER β unterschiedliche Wirkungen aufweisen (Gewebespezifität). Zusätzlich konnten wir zeigen, dass die Phytoestrogene als SERMs auch innerhalb ein und desselben Zelltyps differentielle Effekte gegenüber unterschiedlichen Parametern aufweisen (Targetspezifität) (306).

Aus den in diesem Projekt betrachteten Zielstrukturen lassen sich folgende Proben als Hoffnungsträger und damit als für weitere Forschung geeignete Phytoestrogene identifizieren, wobei solche geeignet sind, die in-vitro nicht die unerwünschten Wirkungen des Estradiols (E₂), bzw. des synthetischen EE aufweisen: Es sind die **Extrakte aus Hopfen (HE-1 und**

HE-2), aus **Besenginster (SAR)** und **Gartenbohne (PHA)** sowie mit Einschränkung die Extrakte aus **Soja (SOY)** und **Traubensilberkerze (CIM)**.

Bei allen Phytoestrogenen ist der eingesetzten Dosis genaues Augenmerk zu schenken (142;231). Besonders in Bezug auf die Proliferation in MCF-7 Zellen, die als Parameter für ein erhöhtes Brustkrebsrisikos dient, ist die Betrachtung der Effektivität jeder Konzentration von großer Bedeutung. Während SAR in der Konzentration 0,1µg/ml deutlich weniger proliferativ wirkt als E₂, so ist es bei 1,0µg/ml um 25% effektiver als das endogene Estrogen; mit der nächst höheren Konzentration sinkt die Effektivität wieder unter die des E₂ ab (Abb. 35). Für HE-1 und HE-2 ist eine Dosisabhängigkeit erkennbar, nur in den niedrigen Konzentrationen sind sie schwächer wirksam als E₂. Für ein positives Profil dieser Phytoestrogene in-vivo wird also die eingenommene Dosis einen wichtigen Faktor darstellen. Der einzige Extrakt, welcher in allen drei eingesetzten Konzentrationen (0,1µg/ml, 1,0µg/ml und 10,0µg/ml) weniger proliferativ wirkt als E₂, ist PHA. Die in der Literatur bereits vielfach beschriebenen Extrakte SOY und CIM sind in unserem Testsystem noch zu überprüfen, es gibt Hinweise auf antiestrogene Eigenschaften für CIM in MCF-7 Zellen (262). Für Sojaextrakte differieren die Angaben (142;151;307).

In Bezug auf die Bindungsaffinität zu ER α und ER β zeigen sich nach E₂ 8-PN, gefolgt von SAR und GLY sowie den übrigen aus dem Hopfen isolierten Einzelsubstanzen 6-PN, XH und IXH als die wirksamsten. Ihre relativen Potenzen liegen in der Größenordnung von 10³ gegenüber E₂, mit Ausnahme von 8-PN, welches nur ca. 5-fach weniger affin ist. Eine erhöhte ER β -Affinität, wie sie auch das etablierte und vielfach untersuchte Genistein aufweist, wurde bisher mit einem positiven, evtl. nicht mit den erhöhten Risiken für Mamma- und Endometriumkarzinom einhergehenden Profil in Verbindung gebracht (129;141). Von den hier untersuchten Proben haben 6-PN, XH und IXH sowie möglicherweise die Extrakte SAR und SOY eine Präferenz für ER β ; diese jedoch sind interessanterweise nicht mit den günstigsten Gesamtprofilen verbunden. Über die Affinität der Extrakte HE-1, HE-2, PHA und CIM ließ sich keine Aussage machen, da das verwendete Lösungsmittel DMSO den Test stört.

Ausschlaggebend für die Wirkung der Phytoestrogene ist nicht nur ihre Rezeptoraffinität, sondern auch die Transkriptionsaktivität am Rezeptor. Zwischen diesen beiden Größen besteht kein direkter Zusammenhang wie unsere Ergebnisse zeigen: Die Transaktivierung ist besonders ausgeprägt für 8-PN, und zwar bereits in sehr geringen Konzentrationen. Jedoch weisen auch SAR und Soph gefolgt von IXH und HE-1 nennenswerte Aktivitäten auf. Bei PHA ist die Transkriptionsaktivität nur schwach ausgeprägt.

Hinsichtlich der AP-Stimulation in Ishikawa Zellen ist eine gewisse Kongruenz mit den Transaktivierungspotentialen zu erkennen. Keine Probe erreicht die Potenz von EE. Am effektivsten ist HE-1 gefolgt von Soph, dann GLY und XH, dann 8-PN und schließlich SAR und PHA. Zu erwähnen ist, dass die Einzelsubstanzen aus dem Hopfen im Gegensatz zu den übrigen Pflanzenextrakten ihre stärksten Effekte in den niedrigeren Konzentrationen aufweisen, was Ausdruck ihrer hohen ER-Affinität sein könnte.

Am Modell für die Leber wird die Targetspezifität der Phytoestrogene besonders deutlich. Sie weisen eine differentielle Regulation von CaBP9k und AT auf: Das AT, ein wichtiger Faktor im RAAS-System, wird am stärksten durch EE heraufreguliert, gefolgt von 8-PN und 6-PN in ihren höchsten Konzentrationen, dann IXH, GLY und CIM; lediglich schwach stimulierend sind SOY und Soph. Ein anderes Bild zeigt sich für CaBP9k. Es wird durch die Phytoestrogene insgesamt nicht nennenswert, verglichen mit EE, hochreguliert, Unterschiede lassen sich jedoch deutlich erkennen: HE-2, PHA und 8-PN in ihren höchsten Konzentrationen sind am potentesten, es folgen SAR, 6-PN und CIM.

Im Gegensatz zu den bisher besprochenen Ergebnissen ist eine starke Effektivität der Phytoestrogene im Knochen gewollt, da eine Stimulation von Markern der Knochenformation mit dem Erhalt der Knochendichte in-vivo verknüpft wird. Besonders aktiv, teilweise sogar stärker als EE, sind die Extrakte Soph, SAR, GLY und auch PHA, gefolgt von 8-PN. Antiestrogen bezüglich der AP-Enzymaktivität zeigt sich allerdings CIM, während SOY keinen nennenswerten Effekt aufweist. Die Untersuchung der AP-Genexpression in den U-2 OS/ER-Zelllinien steht für CIM und SOY jedoch noch aus.

Hinsichtlich der ER-unabhängigen Zytotoxizität (198) zeigen die Phytoestrogene interessanterweise große Unterschiede. Den einen Pol bilden IXH, dann GLY und 6-PN mit sehr hoher Toxizität, den anderen SOY, welches keinerlei Toxizität zeigt, gefolgt von CIM und HE-2. Bei diesen tritt sie erst in sehr hoher Konzentration (30-300µg/ml) auf.

Bisher wird ein hoher Anteil an Phytoestrogenen in der Ernährung mit einer Senkung des Brustkrebsrisikos in Verbindung gebracht (104). Aus den Ergebnissen dieser Arbeit lässt sich ableiten, dass einige Phytoestrogene in geringer Konzentration verzehrt, die Entwicklung und Promotion bestimmter hormonabhängiger Brustkrebsarten vermutlich fördern können, in hohen wirken sie hingegen antitumorigen (zum Beispiel 6-PN, XH, IXH, SAR). Bei anderen Phytoestrogenen kann dies anders herum sein (zum Beispiel HE-1, HE-2, SOY, Genistein) (142;143). Daraus folgt, dass eine Empfehlung phytoestrogenreicher Ernährung oder gar Substitution von Phytoestrogenen als Arzneiform bei postmenopausalen Frauen kritisch überdacht werden sollte. Auch der endogene Estrogenstatus spielt eine wichtige Rolle, da

hormonsensitives Gewebe nach Entwöhnung wahrscheinlich hypersensitiv reagiert (198). Für Frauen mit Diagnose Brustkrebs sollte der Phytoestrogenanteil der Ernährung abgestimmt sein auf die Art des jeweiligen Tumortyps.

Für einige Phytoestrogene konnten wir schwach estrogene, bzw. antiestrogene Wirkungen in der Ishikawa Zelllinie nachweisen. Entsprechend wiesen Horn-Ross et al. (112) mittels einer Fall-Kontroll-Studie unter amerikanischen Frauen ein gesenktes Risiko in Bezug auf das Endometriumkarzinomrisiko für Genistein und Daidzein nach, wobei die Abnahme des Risikos in Bezug auf postmenopausale Frauen sogar etwas stärker ausgeprägt zu sein scheint. Aufgrund des beobachteten positiven Wirkprofils in Osteoblasten und Osteoblastartigen Zelllinien in dieser Arbeit kann auf ein mögliches Potential dieser Phytoestrogene geschlossen werden, auch in-vivo präventiv gegenüber Osteoporose wirksam zu sein. Bereits vorhandene in-vivo Ergebnisse unterstützen diese Perspektive (77;88). Weitere Studien unter besonderer Berücksichtigung der Proben HE-1, HE-2, SAR, PHA sowie SOY und CIM werden ihr tatsächliches Potential als Alternative zur klassischen HRT zeigen müssen.

6.2 Summary:

Loss of estrogen at the onset of menopause results in an increased fracture risk and osteoporosis. While hormone replacement therapy (HRT) prevents these effects there are also significant risks associated with it. Most dangerous is the increase of risks of breast and endometrial cancers. Also high blood pressure is an undesirable side effect of HRT as estrogens influence the renin-angiotensin-aldosterone-system. Thus alternative therapies, such as the use of certain plant-derived compounds which show selective estrogen receptor modulator (SERM) activity, are necessary. However, the molecular mechanisms and estrogen receptor specificity of many of the phytoestrogens in osteoblasts and other estrogen responsive tissues are not known. In the current study we tested selected plant extracts and plant derived compounds for their estrogenic potential in different target tissues.

Cell lines derived from breast, endometrium, liver and bone tissues were investigated because they play an important role in respect of the risks and benefits of HRT.

Estrogen-induced proliferation of the human breast carcinoma cell line MCF-7 serves as a model for breast cancer (229;261). Also the transactivation of the plant-derived compounds compared to estradiol (E_2) were tested in this cell system using the transiently transfected estrogen response element firefly luciferase (ERE-TK-Luc) reporter gene construct (233).

As a model for the endometrium we applied the stimulation of alkaline phosphatase (AP) in the human endometrial carcinoma Ishikawa cell line. Induction of AP-activity in this cell line serves as a marker for estrogenic potential (237).

In Ishikawa as well as in MCF-7 cells, the ER α - and ER β -levels were determined using realtime-RT-PCR. This should indicate the involvement of the distinct ER-subtypes in mediating the observed effects.

To assess the estrogenic effect of the plant-derived compounds versus estrogen on bone we employed test systems on the level of enzymatic activity (proteins) and on the level of gene regulation. AP activity was measured in human fetal osteoblasts (hFOB/ER α) (208). The recently developed human osteosarcoma cell lines U2-OS/ER α and U2-OS/ER β , stably expressing either ER α or ER β , were assayed for regulation of the bone specific genes AP and interleukin-6 (IL-6) as well as two other estrogen regulated genes, presenelin-2 (pS2) and von Willebrand factor (VWF) (209;215).

Concerning the liver, the ER α -containing rat hepatoma cell line Fe33 serves as a reliable model to examine the regulation of the Angiotensinogen (AT) and the calcium binding protein (9k) (CaBP9k) gene (222;240). The expression of the latter is currently the most sensitive regarding modulation through estrogen. AT, as the substrate of renin, is involved in the regulation of blood pressure. Using realtime RT-PCR, we analyzed the differential expression of these genes in response to the phytoestrogens compared to the more stable estrogenic compound ethinyl estradiol (EE).

In addition to these cell culture methods, we tested the ER-binding affinity of the plant compounds to the two ER-subtypes in a cell free system using human recombinant receptor proteins of ER α and ER β proteins (128;255).

In this study we investigated extracts and isolated compounds (ingredients) of plants concerning their phytoestrogen character. For some of these plants an estrogenic potency is already known and partially analyzed, for others such potency is merely derived from speculations based on their traditional use. Belonging to the first group we tested extracts from *Humulus lupulus*, L. (hops), *Glycine max.* L. (soy), *Cimicifuga racemosa* L. (black cohosh), *Glycyrrhiza glabra* L. (liquorice) and *Rheum rhaponticum* L. (rhapontic rhubarb). As mostly unexplored plants, in respect of estrogenicity, we analyzed extracts from *Phaseolus vulgaris* L. (common bean), *Sophora japonica* L. (pagoda tree flower) und *Sarothamnus scoparius* L. (broom).

The central question throughout this work has been: Is it possible to determine the estrogenic efficacy of a battery of selected plants applying the model systems described above?

The cell culture experiments with cells originating from the four different tissues lead to the following statements: 1. The tested plant-derived compounds and extracts can be declared phytoestrogens because their estrogenic effects are mediated through the estrogen receptors and display estrogenic activity using several independent assays. 2. The samples display SERM-like activities. In diverse tissues they show differential effects through ER α and ER β , i.e. tissue specificity. In addition, we were able to demonstrate target specificity which a SERM is able to display within a single cell type, independent of tissue specificity and differential levels of expression of various cofactors (308).

As a result of this project we identified the following phytoestrogens as potential alternatives for HRT: The **extracts from the hop plant (HE-1 and HE-2)**, from **broom (SAR)** and from the **common bean (PHA)**. In addition **extracts from soy (SOY)** and **black cohosh (CIM)** may also serve as potential HRT alternatives. Further *in vitro* and *in vivo* investigation in other estrogen-responsive tissues will demonstrate whether these phytoestrogens only show the desired and not the unwanted effects of estrogen.

The dosage of phytoestrogen treatment is critical in its functional analysis (142;231). This is especially true in regard of the proliferation in MCF-7 cells, which serves as a marker for an increased risk of breast cancer. The effect of each dose must be carefully analyzed. For example, while SAR shows an evidently lower proliferative effect at 0.1 μ g/ml than the endogenous E₂, the extract reaches its maximum at 1.0 μ g/ml with a 25% stronger stimulation than displayed by E₂. For the highest concentration cell proliferation is similar to that of E₂ treated cells (Fig. 35). HE-1 and HE-2 act in a dose dependent manner. They show effects below those of E₂ only at the lower concentrations. Therefore, the dosage of a phytoestrogen which is taken will play an important role in determining its *in vivo* profile.

The only sample which lacks any proliferative effect compared with E₂ is PHA. Based on the results in the literature, CIM may have antiestrogenic effects in MCF-7 cells (262), whereas the observations for SOY differ (142;151;309). SOY and CIM yet have to be analyzed in our MCF-7 test system.

Regarding the binding affinity to ER α and ER β , none of the phytoestrogens binds as efficiently as E₂. The isolated compounds from hops, apart from 8-PN, display relative affinities of approximately 3 orders of magnitude lower than E₂. 8-PN shows the strongest ER-binding affinity which is only 0.5 orders of magnitude lower compared to E₂. An increased affinity for ER β , as observed for the well-known phytoestrogen genistein, has been

connected with a positive overall action, i.e. decreased risks of breast and endometrial cancers (129;141). In our study, 6-PN, XH and IXH, and potentially SAR and SOY, reveal a preference for ER β . Interestingly, these are not the samples with the most favorable overall profiles though.

Due to disturbing solvent effects the ER affinities of the extracts HE-1, HE-2, PHA and CIM could not be determined in our system.

Not only the ER-affinity, but also the transcriptional activity at the receptor, is decisive for the efficacy of phytoestrogens. A direct proportionality of these two modes of action does not seem to exist. Transactivation is very pronounced for 8-PN with lower concentrations already inducing ERE activation. Similarly, SAR and Soph, followed by IXH and HE-1, display considerable activities. For PHA, transcriptional activity is less obvious.

Similarities can be observed between a sample's AP stimulation in Ishikawa cells and the potential for transactivation. None of the test compounds induced AP activity as strong as EE. The hop extract HE-1 dose dependently displays the highest effect, followed by Soph, GLY and XH, then 8-PN, SAR and PHA. It should be mentioned that the isolated hop compounds, in contrary to the plant extracts, exhibit their strongest effects in the low concentrations. This may be due to their high affinity to the estrogen receptor subtypes.

The *in vitro* hepatocyte model for the liver demonstrates the target specificity of the phytoestrogens. In these cells a differential regulation of the genes CaBP9k and AT is observed. Angiotensinogen is strongly up-regulated by EE. In their highest concentrations, 8-PN and 6-PN also display remarkable effects, followed by IXH, GLY and CIM. SOY and Soph only weakly stimulate AT gene expression. Diverse behavior is observed for the modulation of the CaBP9k gene. Compared to EE, none of the tested phytoestrogens displays any significant effect. However, differential potencies between the phytoestrogens are evident: HE-2, PHA and 8-PN, each at 10.0 μ g/ml, are the most potent samples, followed by SAR, 6-PN and CIM.

In contrast to the results described so far, where the estrogen stimulated effects are undesirable, estrogenicity of the plant compounds in bone would have positive physiological effects. Stimulation of bone formation markers is connected with the conservation of bone density *in vivo*. The extracts Soph, SAR, GLY and PHA, followed by 8-PN are especially active in our osteoblast models, partially even more than EE. Surprisingly, CIM shows an anti-estrogenic effect regarding AP enzyme activity, whereas SOY displays no considerable

action. Modulation of AP gene expression and the other E₂-regulated genes in the U2-OS/ER system still has to be investigated for CIM and SOY.

Finally, in respect of ER-independent cytotoxicity (198) the phytoestrogens display tremendous differences. On the one hand IXH and GLY, and to a lesser extent 6-PN, show high cytotoxic effects. On the other hand SOY is not cytotoxic and CIM and HE-2 are only cytotoxic at very high concentrations (30-300µg/ml).

So far a good deal of phytoestrogen supplementation of nutrition (in the diet) has been connected with a decreased risk of breast cancer (104). Based on the results of our study, certain phytoestrogens consumed in low doses presumably have an enhancing effect on development and promotion of some hormone dependent breast cancers. In contrast, at high concentrations they act antiestrogenic (e.g. 6-PN, XH, IXH, SAR). For other phytoestrogen compounds (e.g. HE-1, HE-1, SOY, genistein) the opposite is true (142;143). This means that any recommendation of a phytoestrogen-rich diet or even medical substitution of phytoestrogens for postmenopausal women should be critically evaluated. In addition, the endogenous estrogen status plays an important role since hormone sensitive tissues probably react hypersensitive to hormones after estrogen withdrawal (198). In conclusion, for women with breast cancer, the amount of phytoestrogens in their diet ought to be adapted to the type of tumor respectively.

For some of the phytoestrogens weak estrogenic or even anti-estrogenic effects were observed in the endometrial Ishikawa cell line. Consistent with this, Horn-Ross et al. (112) found a decreased risk of endometrial cancer after treatment with genistein or daidzein in a case-control-study of American women. Interestingly, it appears that the risk reduction is greater for post-menopausal women than for pre-menopausal women.

In the current study most of the tested phytoestrogens displayed positive profiles in osteoblasts and osteoblast-like cell lines. Therefore a feasible potential of these compounds to effectively prevent osteoporosis *in vivo* might be concluded. This assumption is supported by previous investigations found in the literature (77;88). Further studies in special consideration of HE-1, HE-2, SAR, PHA, as well as SOY und CIM will elucidate their actual potential as alternatives for the classic HRT.

7. Literaturverzeichnis

Reference List

1. Lasek, R. and Müller-Oerlinghausen, B. (2003) *AVP* **30**, 1-40
2. Stevenson J.C. and Rees M. Further confusion in postmenopausal health. 2003. Issued on behalf of Women's Health Concern, and of the British Menopause Society. Conference Proceeding
3. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M., and Ockene, J. (2002) *JAMA* **288**, 321-333
4. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1997) *Lancet* **350**, 1047-1059
5. Davis, S. R. (2003) *Med.J.Aust.* **178**, 634-637
6. Greendale, G. A., Espeland, M., Slone, S., Marcus, R., and Barrett-Connor, E. (2002) *Arch.Intern.Med.* **162**, 665-672
7. Beral, V. (2003) *Lancet* **362**, 419-427
8. Olsson, H. L., Ingvar, C., and Bladstrom, A. (2003) *Cancer* **97**, 1387-1392
9. Greendale, G. A., Reboussin, B. A., Slone, S., Wasilauskas, C., Pike, M. C., and Ursin, G. (2003) *J.Natl.Cancer Inst.* **95**, 30-37
10. Schairer, C., Lubin, J., Troisi, R., Sturgeon, S., Brinton, L., and Hoover, R. (2000) *JAMA* **283**, 485-491
11. Cushing, K. L., Weiss, N. S., Voigt, L. F., McKnight, B., and Beresford, S. A. (1998) *Obstet.Gynecol.* **91**, 35-39
12. Grady, D., Gebretsadik, T., Kerlikowske, K., Ernster, V., and Petitti, D. (1995) *Obstet.Gynecol.* **85**, 304-313
13. Weiderpass, E., Adami, H. O., Baron, J. A., Magnusson, C., Bergstrom, R., Lindgren, A., Correia, N., and Persson, I. (1999) *J.Natl.Cancer Inst.* **91**, 1131-1137
14. Armitage, M., Nooney, J., and Evans, S. (2003) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **59**, 145-155
15. Anderson, G. L., Judd, H. L., Kaunitz, A. M., Barad, D. H., Beresford, S. A., Pettinger, M., Liu, J., McNeeley, S. G., and Lopez, A. M. (2003) *JAMA* **290**, 1739-1748
16. Hulley, S., Furberg, C., Barrett-Connor, E., Cauley, J., Grady, D., Haskell, W., Knopp, R., Lowery, M., Satterfield, S., Schrott, H., Vittinghoff, E., and Hunninghake, D. (2002) *JAMA* **288**, 58-66
17. Rossouw, J. E., Anderson, G. L., Prentice, R. L., LaCroix, A. Z., Kooperberg, C., Stefanick, M. L., Jackson, R. D., Beresford, S. A., Howard, B. V., Johnson, K. C., Kotchen, J. M., and Ockene, J. (2002) *JAMA* **288**, 321-333

18. The Writing Group for the PEPI Trial (1996) *JAMA* **275**, 370-375
19. Shumaker, S. A., Legault, C., Rapp, S. R., Thal, L., Wallace, R. B., Ockene, J. K., Hendrix, S. L., Jones, B. N., III, Assaf, A. R., Jackson, R. D., Kotchen, J. M., Wassertheil-Smoller, S., and Wactawski-Wende, J. (2003) *JAMA* **289**, 2651-2662
20. Yoon, B. K. (2003) *JAMA* **290**, 1707-1708
21. Cauley, J. A., Robbins, J., Chen, Z., Cummings, S. R., Jackson, R. D., LaCroix, A. Z., LeBoff, M., Lewis, C. E., McGowan, J., Neuner, J., Pettinger, M., Stefanick, M. L., Wactawski-Wende, J., and Watts, N. B. (2003) *JAMA* **290**, 1729-1738
22. Fait, T., Malkova, J., and Zivny, J. (2002) *Ceska.Gynekol.* **67**, 285-293
23. Lamon-Fava, S., Posfai, B., Asztalos, B. F., Horvath, K. V., Dallal, G. E., and Schaefer, E. J. (2003) *Metabolism* **52**, 1330-1336
24. Seifert-Klauss, V. and Schumm-Draeger, P. M. (2003) *Internist (Berl)* **44**, 1500-1507
25. Zittermann, A. (2003) *Zentralbl.Gynakol.* **125**, 195-201
26. Sarkar, F. H. and Li, Y. (2003) *Cancer Invest* **21**, 744-757
27. Zhang, S., Qin, C., and Safe, S. H. (2003) *Environ.Health Perspect.* **111**, 1877-1882
28. Tham, D. M., Gardner, C. D., and Haskell, W. L. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 2223-2235
29. Tanaka, T., Kohno, H., Tanino, M., and Yanaida, Y. (2002) *Ecotoxicol.Environ.Saf* **52**, 38-45
30. Parkin, D. M., Bray, F., Ferlay, J., and Pisani, P. (2001) *Int.J.Cancer* **94**, 153-156
31. Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J., and Nilsson, S. (1998) *Mol.Pharmacol.* **54**, 105-112
32. Breinholt, V., Hossaini, A., Svendsen, G. W., Brouwer, C., and Nielsen, E. (2000) *Food Chem.Toxicol.* **38**, 555-564
33. Couse, J. F., Lindzey, J., Grandien, K., Gustafsson, J. A., and Korach, K. S. (1997) *Endocrinology* **138**, 4613-4621
34. Gustafsson, J. A. (2000) *Semin.Perinatol.* **24**, 66-69
35. Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S., and Gustafsson, J. A. (1997) *Endocrinology* **138**, 863-870
36. Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., and Scanlan, T. S. (1997) *Science* **277**, 1508-1510
37. Monroe, D. G., Johnsen, S. A., Subramaniam, M., Getz, B. J., Khosla, S., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (2003) *J.Endocrinol.* **176**, 349-357
38. Dragan, Y. P., Xu, Y. D., and Pitot, H. C. (1991) *Prev.Med.* **20**, 15-26

39. McMichael-Phillips, D. F., Harding, C., Morton, M., Roberts, S. A., Howell, A., Potten, C. S., and Bundred, N. J. (1998) *Am.J.Clin.Nutr.* **68**, 1431S-1435S
40. Petrakis, N. L., Barnes, S., King, E. B., Lowenstein, J., Wiencke, J., Lee, M. M., Miike, R., Kirk, M., and Coward, L. (1996) *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **5**, 785-794
41. Huntley, A. and Ernst, E. (2003) *Menopause.* **10**, 58-64
42. Kurzer, M. S. and Xu, X. (1997) *Annu.Rev.Nutr.* **17**, 353-381
43. Miranda, C. L., Stevens, J. F., Ivanov, V., McCall, M., Frei, B., Deinzer, M. L., and Buhler, D. R. (2000) *J.Agric.Food Chem.* **48**, 3876-3884
44. Wang, L. Q. (2002) *J.Chromatogr.B Analyt.Technol.Biomed.Life Sci.* **777**, 289-309
45. Zhuang, H., Kim, Y. S., Koehler, R. C., and Dore, S. (2003) *Ann.N.Y.Acad.Sci.* **993**, 276-286
46. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987) *J.Biol.Chem.* **262**, 5592-5595
47. Yamagishi, T., Otsuka, E., and Hagiwara, H. (2001) *Endocrinology* **142**, 3632-3637
48. Boersma, B. J., Barnes, S., Kirk, M., Wang, C. C., Smith, M., Kim, H., Xu, J., Patel, R., and Darley-Usmar, V. M. (2001) *Mutat.Res.* **480-481**, 121-127
49. Boos, G. and Stopper, H. (2000) *Toxicol.Lett.* **116**, 7-16
50. Morrissey, C. and Watson, R. W. (2003) *Curr.Drug Targets.* **4**, 231-241
51. Lephart, E. D., Lund, T. D., and Horvath, T. L. (2001) *Brain Res.Brain Res.Rev.* **37**, 25-37
52. Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., Hase, T., Arosemena, P. J., Kellis, J. T., Jr., and Vickery, L. E. (1993) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **44**, 147-153
53. Pino, A. M., Valladares, L. E., Palma, M. A., Mancilla, A. M., Yanez, M., and Albala, C. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 2797-2800
54. Mousavi, Y. and Adlercreutz, H. (1993) *Steroids* **58**, 301-304
55. Kim, M. H. (2003) *J.Cell Biochem.* **89**, 529-538
56. Myoung, H., Hong, S. P., Yun, P. Y., Lee, J. H., and Kim, M. J. (2003) *Cancer Sci.* **94**, 215-220
57. Fotsis, T., Pepper, M. S., Aktas, E., Breit, S., Rasku, S., Adlercreutz, H., Wahala, K., Montesano, R., and Schweigerer, L. (1997) *Cancer Res.* **57**, 2916-2921
58. Humfrey, C. D. (1998) *Nat.Toxins.* **6**, 51-59

59. Horn-Ross, P. L., Barnes, S., Lee, M., Coward, L., Mandel, J. E., Koo, J., John, E. M., and Smith, M. (2000) *Cancer Causes Control* **11**, 289-298
60. Setchell, K. D. and Lydeking-Olsen, E. (2003) *Am.J.Clin.Nutr.* **78**, 593S-609S
61. Kronenberg, F. and Fugh-Berman, A. (2002) *Ann.Intern.Med.* **137**, 805-813
62. Tham, D. M., Gardner, C. D., and Haskell, W. L. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 2223-2235
63. Rizzoli, R. and Bonjour, J. P. (1997) *Lancet* **349 Suppl 1**, sI20-sI23
64. Bilezikian, J. P. (1998) *J.Bone Miner.Res.* **13**, 774-776
65. Arts, J., Kuiper, G. G., Janssen, J. M., Gustafsson, J. A., Lowik, C. W., Pols, H. A., and van Leeuwen, J. P. (1997) *Endocrinology* **138**, 5067-5070
66. Bodine, P. V., Henderson, R. A., Green, J., Aronow, M., Owen, T., Stein, G. S., Lian, J. B., and Komm, B. S. (1998) *Endocrinology* **139**, 2048-2057
67. Bord, S., Horner, A., Beavan, S., and Compston, J. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 2309-2314
68. Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der, B. B., and Gustafsson, J. A. (1998) *Endocrinology* **139**, 4252-4263
69. Potter, S. M., Baum, J. A., Teng, H., Stillman, R. J., Shay, N. F., and Erdman, J. W., Jr. (1998) *Am.J.Clin.Nutr.* **68**, 1375S-1379S
70. Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R., and Squadrito, F. (2002) *J.Bone Miner.Res.* **17**, 1904-1912
71. Chen, X. W., Garner, S. C., and Anderson, J. J. (2002) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **295**, 417-422
72. Rickard, D. J., Monroe, D. G., Ruesink, T. J., Khosla, S., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (2003) *J.Cell Biochem.* **89**, 633-646
73. Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G., and Barnes, S. (1996) *J.Cell Biochem.* **61**, 629-637
74. Mizutani, K., Ikeda, K., Kawai, Y., and Yamori, Y. (1998) *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **253**, 859-863
75. Chen, X., Garner, S. C., Quarles, L. D., and Anderson, J. J. (2003) *J.Nutr.Biochem.* **14**, 342-349
76. Yamaguchi, M. and Sugimoto, E. (2000) *Mol.Cell Biochem.* **214**, 97-102
77. Fanti, P., Monier-Faugere, M. C., Geng, Z., Schmidt, J., Morris, P. E., Cohen, D., and Malluche, H. H. (1998) *Osteoporos.Int.* **8**, 274-281

78. Ishimi, Y., Miyaura, C., Ohmura, M., Onoe, Y., Sato, T., Uchiyama, Y., Ito, M., Wang, X., Suda, T., and Ikegami, S. (1999) *Endocrinology* **140**, 1893-1900
79. Picherit, C., Coxam, V., Bennetau-Pelissero, C., Kati-Coulibaly, S., Davicco, M. J., Lebecque, P., and Barlet, J. P. (2000) *J.Nutr.* **130**, 1675-1681
80. Miyamoto, M., Matsushita, Y., Kiyokawa, A., Fukuda, C., Iijima, Y., Sugano, M., and Akiyama, T. (1998) *Planta Med.* **64**, 516-519
81. Alekel, D. L., Germain, A. S., Peterson, C. T., Hanson, K. B., Stewart, J. W., and Toda, T. (2000) *Am.J.Clin.Nutr.* **72**, 844-852
82. Ho, S. C., Chan, S. G., Yi, Q., Wong, E., and Leung, P. C. (2001) *J.Bone Miner.Res.* **16**, 1363-1369
83. Kim, M. K., Chung, B. C., Yu, V. Y., Nam, J. H., Lee, H. C., Huh, K. B., and Lim, S. K. (2002) *Clin.Endocrinol.(Oxf)* **56**, 321-328
84. Horiuchi, T., Onouchi, T., Takahashi, M., Ito, H., and Orimo, H. (2000) *Osteoporos.Int.* **11**, 721-724
85. Guthrie, J. R., Ball, M., Murkies, A., and Dennerstein, L. (2000) *Climacteric.* **3**, 254-261
86. Mei, J., Yeung, S. S., and Kung, A. W. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 5217-5221
87. Cotter, A. and Cashman, K. D. (2003) *Nutr.Rev.* **61**, 346-351
88. Anderson, J. J. and Garner, S. C. (1998) *Baillieres Clin.Endocrinol.Metab* **12**, 543-557
89. Dang, Z. C., van Bezooijen, R. L., Karperien, M., Papapoulos, S. E., and Lowik, C. W. (2002) *J.Bone Miner.Res.* **17**, 394-405
90. Chen, X. W., Garner, S. C., and Anderson, J. J. (2002) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295**, 417-422
91. Viereck, V., Grundker, C., Blaschke, S., Siggelkow, H., Emons, G., and Hofbauer, L. C. (2002) *J.Cell Biochem.* **84**, 725-735
92. Chen, X., Garner, S. C., Quarles, L. D., and Anderson, J. J. (2003) *J.Nutr.Biochem.* **14**, 342-349
93. Blair, H. C., Jordan, S. E., Peterson, T. G., and Barnes, S. (1996) *J.Cell Biochem.* **61**, 629-637
94. Williams, J. P., Jordan, S. E., Barnes, S., and Blair, H. C. (1998) *Am.J.Clin.Nutr.* **68**, 1369S-1374S
95. Rassi, C. M., Lieberherr, M., Chaumaz, G., Pointillart, A., and Cournot, G. (2002) *J.Bone Miner.Res.* **17**, 630-638
96. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M.,

- Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W. J., and . (1997) *Cell* **89**, 309-319
97. Simonet, W. S., Lacey, D. L., Dunstan, C. R., Kelley, M., Chang, M. S., Luthy, R., Nguyen, H. Q., Wooden, S., Bennett, L., Boone, T., Shimamoto, G., DeRose, M., Elliott, R., Colombero, A., Tan, H. L., Trail, G., Sullivan, J., Davy, E., Bucay, N., Renshaw-Gegg, L., Hughes, T. M., Hill, D., Pattison, W., Campbell, P., Boyle, W. J., and . (1997) *Cell* **89**, 309-319
 98. Lacey, D. L., Timms, E., Tan, H. L., Kelley, M. J., Dunstan, C. R., Burgess, T., Elliott, R., Colombero, A., Elliott, G., Scully, S., Hsu, H., Sullivan, J., Hawkins, N., Davy, E., Capparelli, C., Eli, A., Qian, Y. X., Kaufman, S., Sarosi, I., Shalhoub, V., Senaldi, G., Guo, J., Delaney, J., and Boyle, W. J. (1998) *Cell* **93**, 165-176
 99. Key, T. J. and Pike, M. C. (1988) *Eur.J.Cancer Clin.Oncol.* **24**, 29-43
 100. Davis, S. R. (2003) *Med.J.Aust.* **178**, 634-637
 101. Lu, L. J., Anderson, K. E., Grady, J. J., Kohen, F., and Nagamani, M. (2000) *Cancer Res.* **60**, 4112-4121
 102. Lamartiniere, C. A., Cotroneo, M. S., Fritz, W. A., Wang, J., Mentor-Marcel, R., and Elgavish, A. (2002) *J.Nutr.* **132**, 552S-558S
 103. Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M., and Lopez, D. (1997) *Lancet* **350**, 990-994
 104. Dodin, S., Blanchet, C., and Marc, I. (2003) *Med.Sci.(Paris)* **19**, 1030-1037
 105. Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J. T., Woods, M., Goldin, B. R., and Gorbach, S. L. (1982) *Lancet* **2**, 1295-1299
 106. Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., Wahala, K., Makela, T., Brunow, G., and Hase, T. (1986) *J.Steroid Biochem.* **25**, 791-797
 107. Key, T. J. and Pike, M. C. (1988) *Br.J.Cancer* **57**, 205-212
 108. (1996) *JAMA* **275**, 370-375
 109. Davis, S. R. (2003) *Med.J.Aust.* **178**, 634-637
 110. Hutchins, A. M., Martini, M. C., Olson, B. A., Thomas, W., and Slavin, J. L. (2001) *Nutr.Cancer* **39**, 58-65
 111. Miksicek, R. J. (1995) *Proc.Soc.Exp.Biol.Med.* **208**, 44-50
 112. Horn-Ross, P. L., John, E. M., Canchola, A. J., Stewart, S. L., and Lee, M. M. (2003) *J.Natl.Cancer Inst.* **95**, 1158-1164
 113. Goodman, M. T., Wilkens, L. R., Hankin, J. H., Lyu, L. C., Wu, A. H., and Kolonel, L. N. (1997) *Am.J.Epidemiol.* **146**, 294-306
 114. Schunkert, H., Danser, A. H., Hense, H. W., Derkx, F. H., Kurzinger, S., and Riegger, G. A. (1997) *Circulation* **95**, 39-45

115. Ibarra-Rubio, M. E. and Pedraza-Chaverri, J. (1993) *Rev.Invest Clin.* **45**, 387-398
116. Klett, C., Ganten, D., Hellmann, W., Kaling, M., Ryffel, G. U., Weimar-Ehl, T., and Hackenthal, E. (1992) *Endocrinology* **130**, 3660-3668
117. Feldmer, M., Kaling, M., Takahashi, S., Mullins, J. J., and Ganten, D. (1991) *J.Hypertens.* **9**, 1005-1012
118. Derkx, F. H., Steunkel, C., Schalekamp, M. P., Visser, W., Huisveld, I. H., and Schalekamp, M. A. (1986) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **63**, 1008-1015
119. Hassager, C., Riis, B. J., Strom, V., Guyene, T. T., and Christiansen, C. (1987) *Circulation* **76**, 753-758
120. Gordon, D. B. (1983) *Hypertension* **5**, 353-362
121. Alderman, M. H., Madhavan, S., Ooi, W. L., Cohen, H., Sealey, J. E., and Laragh, J. H. (1991) *N.Engl.J.Med.* **324**, 1098-1104
122. Kumai, A. and Okamoto, R. (1984) *Toxicol.Lett.* **21**, 203-207
123. Milligan, S. R., Kalita, J. C., Heyerick, A., Rong, H., De Cooman, L., and De Keukeleire, D. (1999) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **84**, 2249-2252
124. Milligan, S. R., Kalita, J. C., Pocock, V., Van, D. K., V, Stevens, J. F., Deinzer, M. L., Rong, H., and De Keukeleire, D. (2000) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **85**, 4912-4915
125. Miranda, C. L., Stevens, J. F., Helmrich, A., Henderson, M. C., Rodriguez, R. J., Yang, Y. H., Deinzer, M. L., Barnes, D. W., and Buhler, D. R. (1999) *Food Chem.Toxicol.* **37**, 271-285
126. Rong, H., Boterberg, T., Maubach, J., Stove, C., Depypere, H., Van Slambrouck, S., Serreyn, R., De Keukeleire, D., Mareel, M., and Bracke, M. (2001) *Eur.J.Cell Biol.* **80**, 580-585
127. Stevens, J. F., Taylor, A. W., Nickerson, G. B., Ivancic, M., Henning, J., Haunold, A., and Deinzer, M. L. (2000) *Phytochemistry* **53**, 759-775
128. Milligan, S., Kalita, J., Pocock, V., Heyerick, A., De Cooman, L., Rong, H., and De Keukeleire, D. (2002) *Reproduction.* **123**, 235-242
129. Liu, J., Burdette, J. E., Xu, H., Gu, C., van Breemen, R. B., Bhat, K. P., Booth, N., Constantinou, A. I., Pezzuto, J. M., Fong, H. H., Farnsworth, N. R., and Bolton, J. L. (2001) *J.Agric.Food Chem.* **49**, 2472-2479
130. Tobe, H., Muraki, Y., Kitamura, K., Komiyama, O., Sato, Y., Sugioka, T., Maruyama, H. B., Matsuda, E., and Nagai, M. (1997) *Biosci.Biotechnol.Biochem.* **61**, 158-159
131. Zierau, O., Gester, S., Schwab, P., Metz, P., Kolba, S., Wulf, M., and Vollmer, G. (2002) *Planta Med.* **68**, 449-451

132. Batt, D. G., Goodman, R., Jones, D. G., Kerr, J. S., Mantegna, L. R., McAllister, C., Newton, R. C., Nurnberg, S., Welch, P. K., and Covington, M. B. (1993) *J.Med.Chem.* **36**, 1434-1442
133. Pacifici, R., Rifas, L., McCracken, R., Vered, I., McMurtry, C., Avioli, L. V., and Peck, W. A. (1989) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**, 2398-2402
134. Gerhauser, C., Alt, A., Heiss, E., Gamal-Eldeen, A., Klimo, K., Knauff, J., Neumann, I., Scherf, H. R., Frank, N., Bartsch, H., and Becker, H. (2002) *Mol.Cancer Ther.* **1**, 959-969
135. Coldham, N. G., Horton, R., Byford, M. F., and Sauer, M. J. (2002) *Food Addit.Contam* **19**, 1138-1147
136. Oerter, K. K., Janfaza, M., Wong, J. A., and Chang, R. J. (2003) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **88**, 4077-4079
137. Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Izrael, S., and Vaya, J. (2001) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **78**, 291-298
138. Tamir, S., Eizenberg, M., Somjen, D., Stern, N., Shelach, R., Kaye, A., and Vaya, J. (2000) *Cancer Res.* **60**, 5704-5709
139. Amato, P., Christophe, S., and Mellon, P. L. (2002) *Menopause.* **9**, 145-150
140. Mori, H., Niwa, K., Zheng, Q., Yamada, Y., Sakata, K., and Yoshimi, N. (2001) *Mutat.Res.* **480-481**, 201-207
141. Morito, K., Hirose, T., Kinjo, J., Hirakawa, T., Okawa, M., Nohara, T., Ogawa, S., Inoue, S., Muramatsu, M., and Masamune, Y. (2001) *Biol.Pharm.Bull.* **24**, 351-356
142. Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M., and Helferich, W. G. (2001) *Cancer Res.* **61**, 5045-5050
143. Ju, Y. H., Allred, C. D., Allred, K. F., Karko, K. L., Doerge, D. R., and Helferich, W. G. (2001) *J.Nutr.* **131**, 2957-2962
144. Power, K. A. and Thompson, L. U. (2003) *Breast Cancer Res.Treat.* **81**, 209-221
145. Ramanathan, L. and Gray, W. G. (2003) *Toxicol.Appl.Pharmacol.* **191**, 107-117
146. Somekawa, Y., Chiguchi, M., Ishibashi, T., and Aso, T. (2001) *Obstet.Gynecol.* **97**, 109-115
147. Li, B. and Yu, S. (2003) *Biol.Pharm.Bull.* **26**, 780-786
148. Heim, M., Frank, O., Kampmann, G., Sochocky, N., Pennimpede, T., Fuchs, P., Hunziker, W., Weber, P., Martin, I., and Bendik, I. (2003) *Endocrinology*
149. Seidlova-Wuttke, D., Hesse, O., Jarry, H., Christoffel, V., Spengler, B., Becker, T., and Wuttke, W. (2003) *Eur.J.Endocrinol.* **149**, 351-362
150. Wuttke, W., Jarry, H., Westphalen, S., Christoffel, V., and Seidlova-Wuttke, D. (2002) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **83**, 133-147

151. Boue, S. M., Wiese, T. E., Nehls, S., Burow, M. E., Elliott, S., Carter-Wientjes, C. H., Shih, B. Y., McLachlan, J. A., and Cleveland, T. E. (2003) *J.Agric.Food Chem.* **51**, 2193-2199
152. Kim, B. H., Chung, E. Y., Ryu, J. C., Jung, S. H., Min, K. R., and Kim, Y. (2003) *Arch.Pharm.Res.* **26**, 306-311
153. Tang, Y. P., Li, Y. F., Hu, J., and Lou, F. C. (2002) *J.Asian Nat.Prod.Res.* **4**, 123-128
154. Hawkins, M. B., Thornton, J. W., Crews, D., Skipper, J. K., Dotte, A., and Thomas, P. (2000) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **97**, 10751-10756
155. Kalimi, M. and Fujimoto, G. I. (1978) *Biochim.Biophys.Acta* **538**, 231-235
156. Bulger, W. H. and Kupfer, D. (1982) *Mol.Pharmacol.* **21**, 533-537
157. Navarro, D., Leon, L., Chirino, R., Fernandez, L., Pestano, J., and Diaz-Chico, B. N. (1998) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **64**, 49-58
158. Giordano, A. L., Ahdieh, H. B., Mayer, A. D., Siegel, H. I., and Rosenblatt, J. S. (1990) *Horm.Behav.* **24**, 232-255
159. Mobbs, B. G. and Johnson, I. E. (1987) *J.Steroid Biochem.* **28**, 653-662
160. Mobbs, B. G., Johnson, I. E., and Liu, Y. (1990) *Prostate* **16**, 235-244
161. Schutze, N., Vollmer, G., Wunsche, W., Grote, A., Feit, B., and Knuppen, R. (1994) *Exp.Clin.Endocrinol.* **102**, 399-408
162. Eissa, S., Mostafa, M. M., El Gendy, A. A. E. A., and Senna, I. A. (1997) *Clin Chem* **43**, 405-406
163. Luqmani, Y. A., Temmim, L., Memon, A., Ali, M. A., and Parkar, A. H. (1997) *Int.J.Cancer* **71**, 526-538
164. Barraclough, C. A., Camp, P., Weiland, N., and Akabori, A. (1986) *Neuroendocrinology* **42**, 6-14
165. Martini, P. G. and Katzenellenbogen, B. S. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **85**, 117-122
166. Hall, J. M. and McDonnell, D. P. (1999) *Endocrinology* **140**, 5566-5578
167. Paech, K., Webb, P., Kuiper, G. G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P. J., and Scanlan, T. S. (1997) *Science* **277**, 1508-1510
168. Monroe DG, Johnsen SA, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Riggs BL, and Spelsberg TC (2003) *J Endocrinol* **176**, 349-367
169. Hubbard, R. E., Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Walton, J., Bonn, T., Gustafsson, J. A., and Carlquist, M. (2000) *Eur.J.Cancer* **36 Suppl 4**, S17-S18
170. Watanabe, T., Inoue, S., Ogawa, S., Ishii, Y., Hiroi, H., Ikeda, K., Orimo, A., and Muramatsu, M. (1997) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **236**, 140-145

171. Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E. R., Warner, M., and Gustafsson, J. A. (2003) *FEBS Lett.* **546**, 17-24
172. Monroe DG, Johnsen SA, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Riggs BL, and Spelsberg TC (2003) *J Endocrinol* **176**, 349-367
173. Ferro, P., Forlani, A., Muselli, M., and Pfeffer, U. (2003) *Int.J.Mol.Med.* **12**, 355-363
174. Omoto, Y., Eguchi, H., Yamamoto-Yamaguchi, Y., and Hayashi, S. (2003) *Oncogene* **22**, 5011-5020
175. Campbell-Thompson, M., Lynch, I. J., and Bhardwaj, B. (2001) *Cancer Res.* **61**, 632-640
176. Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y., and Muramatsu, M. (1998) *Nucleic Acids Res.* **26**, 3505-3512
177. Critchley, H. O., Henderson, T. A., Kelly, R. W., Scobie, G. S., Evans, L. R., Groome, N. P., and Saunders, P. T. (2002) *J.Clin Endocrinol.Metab* **87**, 5265-5273
178. Saji, S., Omoto, Y., Shimizu, C., Horiguchi, S., Watanabe, T., Funata, N., Hayash, S., Gustafsson, J. A., and Toi, M. (2002) *Breast Cancer* **9**, 303-307
179. Cai, Q., Shu, X. O., Jin, F., Dai, Q., Wen, W., Cheng, J. R., Gao, Y. T., and Zheng, W. (2003) *Cancer Epidemiol.Biomarkers Prev.* **12**, 853-859
180. Cancel-Tassin, G., Latil, A., Rousseau, F., Mangin, P., Bottius, E., Escary, J. L., Berthon, P., and Cussenot, O. (2003) *Eur.Urol.* **44**, 487-490
181. Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., Sonntag-Buck, V., and Gannon, F. (2000) *EMBO J.* **19**, 4688-4700
182. Couse, J. F. and Korach, K. S. (1999) *Endocr.Rev.* **20**, 358-417
183. Emmen, J. M. and Korach, K. S. (2003) *Gynecol.Endocrinol.* **17**, 169-176
184. Kregel, J. H., Hodgins, J. B., Couse, J. F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J. F., Sar, M., Korach, K. S., Gustafsson, J. A., and Smithies, O. (1998) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **95**, 15677-15682
185. Windahl, S. H., Andersson, G., and Gustafsson, J. A. (2002) *Trends Endocrinol.Metab* **13**, 195-200
186. Korach KS, Taki M, and Kimbro KS (1997) The effects of estrogen receptor gene disruption on bone. In Paoletti R, editor. *Women's Health and Menopause*, Kluwer Academic Publishers and Fondazione Giovanni Lorenzini, Amsterdam
187. Pan LC, Ke HZ, Simmons HA, Crawford DT, ChidseyFrink KL, McCurdy SP, Schafer JR, Kimbro KS, Taki M, Korach KS, and Thompson DD (1997) *J Bone Miner Res* **12**, 126

188. Fang, H., Tong, W., Shi, L. M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B. S., Xie, Q., Dial, S. L., Moland, C. L., and Sheehan, D. M. (2001) *Chem.Res.Toxicol.* **14**, 280-294
189. Anstead, G. M., Carlson, K. E., and Katzenellenbogen, J. A. (1997) *Steroids* **62**, 268-303
190. Sun, J., Meyers, M. J., Fink, B. E., Rajendran, R., Katzenellenbogen, J. A., and Katzenellenbogen, B. S. (1999) *Endocrinology* **140**, 800-804
191. Katzenellenbogen, B. S., Montano, M. M., Ediger, T. R., Sun, J., Ekena, K., Lazennec, G., Martini, P. G., McInerney, E. M., Delage-Mourroux, R., Weis, K., and Katzenellenbogen, J. A. (2000) *Recent Prog.Horm.Res.* **55**, 163-193
192. Critchley, H. O., Brenner, R. M., Henderson, T. A., Williams, K., Nayak, N. R., Slayden, O. D., Millar, M. R., and Saunders, P. T. (2001) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**, 1370-1378
193. Kusec, V., Viridi, A. S., Prince, R., and Triffitt, J. T. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 2421-2428
194. Onoe, Y., Miyaura, C., Ohta, H., Nozawa, S., and Suda, T. (1997) *Endocrinology* **138**, 4509-4512
195. Braidman, I. P., Hainey, L., Batra, G., Selby, P. L., Saunders, P. T., and Hoyland, J. A. (2001) *J.Bone Miner.Res.* **16**, 214-220
196. Vidal, O., Kindblom, L. G., and Ohlsson, C. (1999) *J.Bone Miner.Res.* **14**, 923-929
197. Pettersson, K., Delaunay, F., and Gustafsson, J. A. (2000) *Oncogene* **19**, 4970-4978
198. Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D., and Ando, S. (2001) *Mol.Pharmacol.* **60**, 595-602
199. Shaaban, A. M., O'Neill, P. A., Davies, M. P., Sibson, R., West, C. R., Smith, P. H., and Foster, C. S. (2003) *Am.J.Surg.Pathol.* **27**, 1502-1512
200. Eriksen, E. F., Colvard, D. S., Berg, N. J., Graham, M. L., Mann, K. G., Spelsberg, T. C., and Riggs, B. L. (1988) *Science* **241**, 84-86
201. Komm, B. S., Terpening, C. M., Benz, D. J., Graeme, K. A., Gallegos, A., Korc, M., Greene, G. L., O'Malley, B. W., and Haussler, M. R. (1988) *Science* **241**, 81-84
202. Benz, D. J., Haussler, M. R., and Komm, B. S. (1991) *J.Bone Miner.Res.* **6**, 531-541
203. Robey, P. G. and Termine, J. D. (1985) *Calcif.Tissue Int.* **37**, 453-460
204. Siggelkow, H., Benzler, K., Atkinson, M. J., and Hufner, M. (1998) *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* **106**, 217-225
205. Ankrom, M. A., Patterson, J. A., d'Avis, P. Y., Vetter, U. K., Blackman, M. R., Sponseller, P. D., Tayback, M., Robey, P. G., Shapiro, J. R., and Fedarko, N. S. (1998) *Biochem.J.* **333 (Pt 3)**, 787-794

206. Siggelkow, H., Schulz, H., Kaesler, S., Benzler, K., Atkinson, M. J., and Hufner, M. (1999) *Calcif.Tissue Int.* **64**, 414-421
207. Harris, S. A., Enger, R. J., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (1995) *J.Bone Miner.Res.* **10**, 178-186
208. Harris, S. A., Tau, K. R., Enger, R. J., Toft, D. O., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (1995) *J.Cell Biochem.* **59**, 193-201
209. Waters, K. M., Rickard, D. J., Riggs, B. L., Khosla, S., Katzenellenbogen, J. A., Katzenellenbogen, B. S., Moore, J., and Spelsberg, T. C. (2001) *J.Cell Biochem.* **83**, 448-462
210. Robinson, J. A., Harris, S. A., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (1997) *Endocrinology* **138**, 2919-2927
211. Spelsberg, T. C., Harris, S. A., and Riggs, B. L. (1995) *Calcif.Tissue Int.* **56 Suppl 1**, S18-S21
212. Benayahu, D., Shur, I., Marom, R., Meller, I., and Issakov, J. (2001) *J.Cell Biochem.* **84**, 108-114
213. Siggelkow, H., Niedhart, C., Kurre, W., Ihbe, A., Schulz, A., Atkinson, M. J., and Hufner, M. (1998) *Differentiation* **63**, 81-91
214. Ponten, J. and Saksela, E. (1967) *Int.J.Cancer* **2**, 434-447
215. Monroe, D. G., Getz, B. J., Johnsen, S. A., Riggs, B. L., Khosla, S., and Spelsberg, T. C. (2003) *J.Cell Biochem.* **90**, 315-326
216. Maggiolini, M., Statti, G., Vivacqua, A., Gabriele, S., Rago, V., Loizzo, M., Menichini, F., and Ando, S. (2002) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **82**, 315-322
217. Panno, M. L., Salerno, M., Pezzi, V., Sisci, D., Maggiolini, M., Mauro, L., Morrone, E. G., and Ando, S. (1996) *J.Cancer Res.Clin.Oncol.* **122**, 745-749
218. Kayisli, U. A., Aksu, C. A., Berkkanoglu, M., and Arici, A. (2002) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **87**, 5539-5544
219. Nishida, M., Kasahara, K., Kaneko, M., Iwasaki, H., and Hayashi, K. (1985) *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi* **37**, 1103-1111
220. Bhat, K. P. and Pezzuto, J. M. (2001) *Cancer Res.* **61**, 6137-6144
221. Littlefield, B. A., Gurrpide, E., Markiewicz, L., McKinley, B., and Hochberg, R. B. (1990) *Endocrinology* **127**, 2757-2762
222. Krattenmacher, R., Knauthe, R., Parczyk, K., Walker, A., Hilgenfeldt, U., and Fritzemeier, K. H. (1994) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **48**, 207-214
223. Manolagas, S. C. and Jilka, R. L. (1995) *N.Engl.J.Med.* **332**, 305-311
224. Barkhem, T., Andersson-Ross, C., Hoglund, M., and Nilsson, S. (1997) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **62**, 53-64

225. Barkhem, T., Haldosen, L. A., Gustafsson, J. A., and Nilsson, S. (2002) *Mol.Pharmacol.* **61**, 1273-1283
226. Brown, A. M., Jeltsch, J. M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 6344-6348
227. Budde, U. and Schneppenheim, R. (2001) *Rev.Clin Exp Hematol.* **5**, 335-368
228. Lewinson, D., Maor, G., Rozen, N., Rabinovich, I., Stahl, S., and Rachmiel, A. (2001) *Histochem.Cell Biol.* **116**, 381-388
229. Soto, A. M. and Sonnenschein, C. (1985) *J.Steroid Biochem.* **23**, 87-94
230. Bhat, K. P., Lantvit, D., Christov, K., Mehta, R. G., Moon, R. C., and Pezzuto, J. M. (2001) *Cancer Res.* **61**, 7456-7463
231. Ju, Y. H., Carlson, K. E., Sun, J., Pathak, D., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A., and Helferich, W. G. (2000) *J.Agric.Food Chem.* **48**, 4628-4634
232. Demirpence, E., Duchesne, M. J., Badia, E., Gagne, D., and Pons, M. (1993) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **46**, 355-364
233. Joung, K. E., Kim, Y. W., and Sheen, Y. Y. (2003) *Arch.Pharm.Res.* **26**, 756-762
234. Holinka, C. F., Hata, H., Kuramoto, H., and Gurbide, E. (1986) *Cancer Res.* **46**, 2771-2774
235. Littlefield, B. A., Gurbide, E., Markiewicz, L., McKinley, B., and Hochberg, R. B. (1990) *Endocrinology* **127**, 2757-2762
236. Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H., and Gurbide, E. (1993) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **45**, 399-405
237. Wober, J., Weisswange, I., and Vollmer, G. (2002) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **83**, 227-233
238. Bronner, F. (2003) *J.Cell Biochem.* **88**, 387-393
239. Yun, S. M., Choi, K. C., Kim, I. H., An, B. S., Lee, G. S., Hong, E. J., Oh, G. T., and Jeung, E. B. (2004) *Mol.Reprod.Dev.* **67**, 251-256
240. Diel, P., Walter, A., Fritzemeier, K. H., Hegele-Hartung, C., and Knauth, R. (1995) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **55**, 363-373
241. Thomae, R., Kolba, S., and Vollmer, G. Regulation of gene expression by phytoestrogens in the rat hepatoma cell line Fe33. 2003. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.*
242. An, B. S., Kang, S. K., Shin, J. H., and Jeung, E. B. (2002) *Mol.Cell Endocrinol* **191**, 177-186
243. Messina, M., Barnes, S., and Setchell, K. D. (1997) *Lancet* **350**, 971-972

244. Ingram, D., Sanders, K., Kolybaba, M., and Lopez, D. (1997) *Lancet* **350**, 990-994
245. Chu, C. Y., Chang, J. P., and Wang, C. J. (1994) *Food Chem Toxicol.* **32**, 373-377
246. Bradford, M. M. (1976)
247. Bradford, M. M. (1976)
248. Monroe, D. G., Johnsen SA, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Riggs BL, and Spelsberg TC (2003) *J Endocrinol* **176**, 349-367
249. Subramaniam, M., Harris, S. A., Oursler, M. J., Rasmussen, K., Riggs, B. L., and Spelsberg, T. C. (1995) *Nucleic Acids Res.* **23**, 4907-4912
250. Rickard, D. J., Subramaniam, M., and Spelsberg, T. C. (1999) *J.Cell Biochem. Suppl* **32-33**, 123-132
251. Wober, J., Weisswange, I., and Vollmer, G. (2002) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **83**, 227-233
252. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M., and Higuchi, R. (1994) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **91**, 5695-5699
253. Varadaraj, K. and Skinner, D. M. (1994) *Gene* **140**, 1-5
254. Baskaran, N., Kandpal, R. P., Bhargava, A. K., Glynn, M. W., Bale, A., and Weissman, S. M. (1996) *Genome Res.* **6**, 633-638
255. Gray, L. E., Jr., Kelce, W. R., Wiese, T., Tyl, R., Gaido, K., Cook, J., Klinefelter, G., Desaulniers, D., Wilson, E., Zacharewski, T., Waller, C., Foster, P., Laskey, J., Reel, J., Giesy, J., Laws, S., McLachlan, J., Breslin, W., Cooper, R., Di Giulio, R., Johnson, R., Purdy, R., Mihaich, E., Safe, S., Colborn, T., and . (1997) *Reprod.Toxicol.* **11**, 719-750
256. Prestwood, K. M., Pilbeam, C. C., and Raisz, L. G. (1995) *Annu.Rev.Med.* **46**, 249-256
257. Riggs, B. L. and Khosla, S. (1995) *Acta Orthop.Scand.Suppl* **266**, 14-18
258. Qu, Q., Harkonen, P. L., Monkkonen, J., and Vaananen, H. K. (1999) *Bone* **25**, 211-215
259. Diel, P., Smolnikar, K., Schulz, T., Laudenschlager, U., Michna, H., and Vollmer, G. (2001) *Hum.Reprod.* **16**, 997-1006
260. Gustafsson, J. A. and Warner, M. (2000) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **74**, 245-248
261. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., and Carroll, K. K. (1997) *Cancer Lett.* **112**, 127-133
262. Zierau, O., Bodinet, C., Kolba, S., Wulf, M., and Vollmer, G. (2002) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **80**, 125-130

263. Mei, J., Yeung, S. S., and Kung, A. W. (2001) *J.Clin Endocrinol Metab* **86**, 5217-5221
264. Somjen, D., Amir-Zaltsman, Y., Gayer, B., Kulik, T., Knoll, E., Stern, N., Lu, L. J., Toldo, L., and Kohen, F. (2002) *J.Endocrinol.* **173**, 415-427
265. Schaefer, O., Humpel, M., Fritzeimer, K. H., Bohlmann, R., and Schleuning, W. D. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **84**, 359-360
266. Diel, P. (2002) *Toxicol.Lett.* **127**, 217-224
267. Kitaoka, M., Kadokawa, H., Sugano, M., Ichikawa, K., Taki, M., Takaishi, S., Iijima, Y., Tsutsumi, S., Boriboon, M., and Akiyama, T. (1998) *Planta Med.* **64**, 511-515
268. Li, B. and Yu, S. (2003) *Biol.Pharm.Bull.* **26**, 780-786
269. Morabito, N., Crisafulli, A., Vergara, C., Gaudio, A., Lasco, A., Frisina, N., D'Anna, R., Corrado, F., Pizzoleo, M. A., Cincotta, M., Altavilla, D., Ientile, R., and Squadrito, F. (2002) *J.Bone Miner.Res.* **17**, 1904-1912
270. Chen, X. W., Garner, S. C., and Anderson, J. J. (2002) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **295**, 417-422
271. Kassem, M., Harris, S. A., Spelsberg, T. C., and Riggs, B. L. (1996) *J.Bone Miner.Res.* **11**, 193-199
272. Lindberg, M. K., Erlandsson, M., Alatalo, S. L., Windahl, S., Andersson, G., Halleen, J. M., Carlsten, H., Gustafsson, J. A., and Ohlsson, C. (2001) *J.Endocrinol* **171**, 425-433
273. Jilka, R. L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D. C., Abrams, J. S., Boyce, B., Broxmeyer, H., and Manolagas, S. C. (1992) *Science* **257**, 88-91
274. Brown, A. M., Jeltsch, J. M., Roberts, M., and Chambon, P. (1984) *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **81**, 6344-6348
275. Nunez, A. M., Jakowlev, S., Briand, J. P., Gaire, M., Krust, A., Rio, M. C., and Chambon, P. (1987) *Endocrinology* **121**, 1759-1765
276. Santagati, S., Gianazza, E., Agrati, P., Vegeto, E., Patrone, C., Pollio, G., and Maggi, A. (1997) *Mol.Endocrinol* **11**, 938-949
277. Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S., and Parker, M. G. (1997) *J.Biol.Chem* **272**, 19858-19862
278. Wiese, T. E., Kral, L. G., Dennis, K. E., Butler, W. B., and Brooks, S. C. (1992) *In Vitro Cell Dev.Biol.* **28A**, 595-602
279. Frasor, J., Danes, J. M., Komm, B., Chang, K. C., Lyttle, C. R., and Katzenellenbogen, B. S. (2003) *Endocrinology* **144**, 4562-4574
280. Takama, F., Kanuma, T., Wang, D., Kagami, I., and Mizunuma, H. (2001) *Br.J.Cancer* **84**, 545-549

281. Katzenellenbogen, B. S., Kendra, K. L., Norman, M. J., and Berthois, Y. (1987) *Cancer Res.* **47**, 4355-4360
282. Peterson, G. (1995) *J.Nutr.* **125**, 784S-789S
283. So, F. V., Guthrie, N., Chambers, A. F., Moussa, M., and Carroll, K. K. (1996) *Nutr.Cancer* **26**, 167-181
284. Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M., and Fukami, Y. (1987) *J.Biol.Chem* **262**, 5592-5595
285. Lessey, B. A., Ilesanmi, A. O., Castelbaum, A. J., Yuan, L., Somkuti, S. G., Chwalisz, K., and Satyaswaroop, P. G. (1996) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **59**, 31-39
286. Simard, J., Sanchez, R., Poirier, D., Gauthier, S., Singh, S. M., Merand, Y., Belanger, A., Labrie, C., and Labrie, F. (1997) *Cancer Res.* **57**, 3494-3497
287. Albert, J. L., Sundstrom, S. A., and Lyttle, C. R. (1990) *Cancer Res.* **50**, 3306-3310
288. Zava, D. T. and Duwe, G. (1997) *Nutr.Cancer* **27**, 31-40
289. Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., Vollmer, G., and Michna, H. (2000) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **73**, 1-10
290. Le Bail, J. C., Champavier, Y., Chulia, A. J., and Habrioux, G. (2000) *Life Sci.* **66**, 1281-1291
291. Tham, D. M., Gardner, C. D., and Haskell, W. L. (1998) *J.Clin.Endocrinol.Metab* **83**, 2223-2235
292. Bramlett, K. S. and Burris, T. P. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **86**, 27-34
293. Ignatenko, L. L., Mataradze, G. D., and Rozen, V. B. (1992) *Hepatology* **15**, 1092-1098
294. Stavreus-Evers, A., Parini, P., Freyschuss, B., Elger, W., Reddersen, G., Sahlin, L., and Eriksson, H. (2001) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **78**, 83-88
295. Gordon, M. S., Chin, W. W., and Shupnik, M. A. (1992) *J.Hypertens.* **10**, 361-366
296. Vollmer, G., Caldarelli, A, Zierau, O, Metz, P, Kolba, S, Diel, P, and Thomae, R. Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver. 2003. *Exp Clin Endocrinol Diabetes*.
- Ref Type: Hearing
297. Adlercreutz, H. and Mazur, W. (1997) *Ann.Med.* **29**, 95-120
298. Mousavi, Y. and Adlercreutz, H. (1992) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **41**, 615-619
299. Davis, S. R. (2003) *Med.J.Aust.* **178**, 634-637
300. Cross, H. S., Kallay, E., Farhan, H., Weiland, T., and Manhardt, T. (2003) *Recent Results Cancer Res.* **164**, 413-425

301. Farhan, H., Wahala, K., and Cross, H. S. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **84**, 423-429
302. Suzuki, K., Ito, K., Ichinose, Y., Kurokawa, K., Suzuki, T., Imai, K., Yamanaka, H., and Honma, S. (1995) *Scand.J.Urol.Nephrol.* **29**, 65-68
303. Stone, N. N., Laudone, V. P., Fair, W. R., and Fishman, J. (1987) *Urol.Res.* **15**, 165-167
304. Maggiolini, M., Vivacqua, A., Carpino, A., Bonofiglio, D., Fasanella, G., Salerno, M., Picard, D., and Ando, S. (2002) *Mol.Pharmacol.* **62**, 1027-1035
305. Woynarowska BAHigdon, A. L., Munoz, R. M., Bushong, P., and Waters, S. J. (2001) *Invest New Drugs* **19**, 283-291
306. Bramlett, K. S. and Burris, T. P. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **86**, 27-34
307. Rowlands, J. C., Berhow, M. A., and Badger, T. M. (2002) *Food Chem.Toxicol.* **40**, 1767-1774
308. Bramlett, K. S. and Burris, T. P. (2003) *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **86**, 27-34
309. Rowlands, J. C., Berhow, M. A., and Badger, T. M. (2002) *Food Chem.Toxicol.* **40**, 1767-1774
310. Moore, J. T., McKee, D. D., Slentz-Kesler, K., Moore, L. B., Jones, S. A., Horne, E. L., Su, J. L., Kliewer, S. A., Lehmann, J. M., and Willson, T. M. (1998) *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **247**, 75-78
311. Reinholz, G. G., Getz, B., Sanders, E. S., Karpeisky, M. Y., Padyukova, N. S., Mikhailov, S. N., Ingle, J. N., and Spelsberg, T. C. (2002) *Breast Cancer Res.Treat.* **71**, 257-268

8. Anhang

8.1 Anhang zum Methodenteil

Zellkultur

Standardmedium für alle verwendeten Zelllinien ist DMEM/F12 (Sigma., St. Louis, MO) unter Zusatz von 10% FBS (Invitrogen, Carlsbad, MA) und 1% Antimycotic/Antibiotic Solution (Invitrogen), bzw. 1% Penicillin-Streptomycin-Lösung (Pen-Strep). Wird von dieser Zusammensetzung des Kulturmediums abgewichen, ist dies explizit angegeben. Die Inkubation erfolgt bei 37°C, 5% CO₂ und 90% relativer Feuchte im Brutschrank, soweit nicht anders angegeben. Eine Ausnahme bilden die hFOB/ER Zelllinien (s. dort).

Die hFOB/ER Zelllinien werden kultiviert in DMEM/F12 Medium (Sigma, St. Louis, MO) mit 10% FBS (Invitrogen), bzw. 10% cs-FBS (Sigma) während laufender Experimente. Im Falle der hFOB/ER α wird dem Medium jeden zweiten Tag wechselnd 300 μ g/ml Geneticin (G418= Neomycin, Sigma), bzw. 50 μ g/ml Hygromycin B (Invitrogen) zugefügt, im Falle der hFOB/ER β Zellen wird Geneticin mit 250 μ g/ml Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, MA) abgewechselt. Inkubiert werden diese Zelllinien bei 33,5°C und 5% CO₂.

Die U2-OS/ER Zelllinien werden standardmäßig in DMEM/F12 mit 10% FBS, 1% Antimycotic/Antibiotic Solution (Invitrogen) und 5mg/l Blasticidin S (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN) kultiviert. Im Falle einer Induktion des jeweiligen ER ist die Zusammensetzung des Mediums wie folgt: Dem DMEM/F12 werden 10% cs-FBS, 1% Antimycotic/Antibiotic Solution sowie 1 μ g/ml Doxycyclin (Sigma) hinzugefügt.

Das im Zytotoxizitätsassay verwendete Wachstumsmedium setzt sich zusammen wie folgt:
DMEM Medium (Sigma) + 10% FBS + 1% Glutamin (Invitrogen) + 1% Pen-Strep

Reagenzien mit Gefahrenhinweisen (R-Sätze) und Sicherheitsratschlägen (S-Sätze)

- Penicillin-Streptomycin-Lösung: 2g Streptomycin / 400ml 0,9% Kochsalzlösung + 1,256g (= 5000 I.E.) Penicillin/ 1ml wird steril filtriert vor Gebrauch im Medium.
R61, R 20/21/22, R 42/43, S 22, S45, S 36/37/39.

- Phosphate Buffered Saline (PBS): 1l enthält 0,8g NaCl, 1,15g Na₂HPO₄·2H₂O, 0,1g KH₂PO₄ und 0,2g KCL; pH 7,4 R 36/37/38, S 26, S 27
- Coomassie-Lösung (BioRad, München): R 10, R 20/22, R 34; S 7, S 26
- DES R 40, R 61, S 36/37, S 45, S 53
- DMSO (Merck, Darmstadt): R 36/38, S 26
- Doxycyclin (Sigma, St. Louis, MO): R 20/21/22, R 36/37/38, R 63, S 22, S 26, S 36
- DTT (Sigma, St. Louis, MO): R 36/37/38, S 26, S 36
- EDTA (Merck, Darmstadt): R 22
- 17β-Estradiol (Sigma, St. Louis, MO): R 60, R 61, S 22, S 45, S 53, S 36/37/39
- Ethanol (Merck, Darmstadt): R 11, S 7, S 16
- Hygromycin B (Invitrogen, Carlsbad, MA): S 24/25
- Isopropanol (Merck, Darmstadt): R 11, S 7, S 16
- Light Cycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche, Mannheim): Light Cycler Fast Start Enzyme; Light Cycler Fast Start Reaction Mix: S 24/25
- Rhaponticin (Sigma, St. Louis, MO): S 24/25
- Sigma Kit Nr.104-LL p-Nitrophenylphosphat: S 24/25
- Tris (Merck, Darmstadt): R 36/38
- Trizol (Invitrogen, Carlsbad, MA) R 24/25, R 34, S 28, S 45
- Trypsin-EDTA (10X) (Invitrogen, Carlsbad, MA): R 36/37/38, R 42

Herstellung der Extrakte

Die Herstellung der Extrakte erfolgte durch die Firma Dr. Willmar Schwabe GmbH&Co., Karlsruhe.

HE-1: 159,74g Hopfentreber (entspricht 212,99g Rohhopfen) wurden seriell extrahiert: 1. Drogenextraktion mit Wasser (1:12), 1 Stunde bei 90°C; 2. Extraktion des Drogenrückstands nach Wasserextraktion mit 92% (m/V) Ethanol (1:10) zweimal bei 60°C.

HE-2: 150,00g Hopfendroge wurden mit 92% (m/V) Ethanol extrahiert; anschließend mit Heptan konzentriert und verteilt. Die Heptanphase wurde abgetrennt und die Restphase getrocknet.

Soph: 36kg Droge wurden mit 60% (m/V) Ethanol zweistufig extrahiert, anschließend mit Ethylacetat ausgerührt.

SAR: 1kg fein vermahlene Droge wurden zweimal mit der 7-fachen Menge Heptan 1 Stunde bei 50°C extrahiert, zwischendurch auf 20°C abgekühlt mit Nutsche abgesaugt. Nach

Vereinigung der Extraktlösungen werden 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 Abkühlen abgesaugt. Wiederum werden die Extraktlösungen zur Trockne eingengt und nachgetrocknet.

GLY: 1kg fein vermahlene Droge wurden zweimal mit der 7-fachen Menge Heptan 1 Stunde bei 50°C extrahiert, zwischendurch auf 20°C abgekühlt mit Nutsche abgesaugt. Nach Vereinigung der Extraktlösungen werden 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 Abkühlen abgesaugt. Wiederum werden die Extraktlösungen zur Trockne eingengt und nachgetrocknet.

PHA: 2kg fein vermahlene Droge wurden zweimal mit der 7-fachen Menge Heptan 1 Stunde bei 50°C extrahiert, zwischendurch auf 20°C abgekühlt mit Nutsche abgesaugt. Nach Vereinigung der Extraktlösungen werden 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 Abkühlen abgesaugt. Wiederum werden die Extraktlösungen zur Trockne eingengt und nachgetrocknet.

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

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

Ad 2.1: Rezeptor-Bindungsassay

Rekombinanter humaner ER α und ER β (Panvera, Madison, WI): Die Rezeptoren werden in einer bestimmten Konzentration [pmol $^3\text{H-E}_2$ gebunden /ml] und Aktivität [pmol $^3\text{H-E}_2$ gebunden /mg] geliefert, letztere muss beim Einsatz im Experiment einberechnet werden.

Im Vorfeld des Experimentes sind folgende Reagenzien (frisch) herzustellen:

DES-Stammlösung: 10^{-3}M in Ethanol, bzw. DMSO, für den Assay auf 10^{-6}M verdünnen

Tris-Stammlösung (200mM): 12,1g Trishydroxymethylaminomethan (Tris) auf 500ml Wasser, pH 7,5

EDTA- Stocklösung (80mM): 7,44g EDTA (Titriplex III) auf 250ml

DTT-Stammlösung (1M): 0,154g Dithiothreitol (DTT) auf 1ml; im Kühlschrank lagern.

TEDG-Puffer: 10mM Tris pH 7,5 (=25ml Tris-Stock)

1,5mM EDTA-Stock (=9,375ml)

10% (V/V) Glycerol (=50ml)
ad 500ml Destilliertes Wasser
max. 4 Wochen im Kühlschrank haltbar.

Kurz vor Gebrauch: 1mM DTT-Stammlösung (=0,5ml) dazu geben.

HAP: 100g (Feuchtgewicht) Hydroxylapatit auf 100ml TEDG-Puffer; max.; im Kühlschrank lagern).

Berechnung und Herstellung der nötigen Mengen Rezeptor (1pmol/ 5µl TEDG) und Radioaktivität (1,2pmol/5µl Ethanol).

Die Konzentrationen, in denen die Proben eingesetzt werden, sind 0,3 µg/ml, 1,0, 3,0, 10,0, 30,0 und 100,0µg/ml. Da sie im Versuch 1:50 verdünnt vorliegen, entspricht dies den Endkonzentrationen 6ng/ml, 20, 60, 200, 600 und 2000ng/ml. Für 8-PN wurden geringere Konzentrationen eingesetzt, und zwar 0,0015µg/ml, 0,005, 0,015, 0,05, 0,15 und 0,5µg/ml. Das entspricht tatsächlichen Konzentrationen von 0,03ng/ml bis 10ng/ml.

Der Versuch ist vollständig auf Eis durchzuführen. Als Reaktionsgefäße dienen 2ml-Eppendorf Gefäße. Je Reaktionsansatz wird eine Probe in den sechs genannten Konzentrationen, die Positivkontrolle DES im jeweiligen Lösungsmittel der Probe und als Negativkontrolle das Lösungsmittel der Probe in Dreifachbestimmung an einem Rezeptor untersucht. In jedes Gefäß werden der Reihe nach pipettiert: 500µl TEDG-Puffer, der 1mM DTT enthält, 1pmol humaner rekombinanter (isolierter) Estrogenrezeptor (ER α , bzw. ER β) in 5µl TEDG-Puffer, 10µl Probe, bzw. Positiv- (1µM DES) oder Negativkontrolle und 1,2pmol $^3\text{H-E}_2$ in 5µl Ethanol.

Die 24 Reaktionsgefäße werden durch Schütteln durchmischt und 18 Stunden im Kühlschrank inkubiert.

Zu jeder Probe werden anschließend 500µl HAP (gut aufgeschüttelt) gegeben, ruhen gelassen und nach 5min, 10min und 15min durch Kippen gemischt. Das HAP dient dazu den ^3H -Liganden an sich zu binden. Die Gefäße werden daraufhin sehr kurz bei 12000 U/min zentrifugiert und die Überstände abgegossen. Die entstehenden Pellets werden dreimal mit je 1ml TEDG-DTT gewaschen. Nach jeder Waschung lässt man die Gefäße 5min ruhen, zentrifugiert sehr kurz (ca. 4000-5000 RPM, Antippen der Zentrifuge) und gießt den Überstand ab. Nach der dritten Waschung wird 1ml Ethanol hinzugegeben, gevortext und stark abzentrifugiert bei 12000 U/min für 30 Sekunden.

Die Überstände werden in Gefäße für den Szintillationszähler überführt, mit 9ml Szintillationscocktail (Ready Flow III, Liquid Scintillation Cocktail, Beckman) versetzt und

im Coulter Counter (Beckman) mit einem ^3H -Programm ausgezählt. Das Ergebnis wird in CPM (counts per minute) ausgedrückt. Die Analyse erfolgt grafisch.

Es wird eine Estradiol Verdünnungsreihe für jeden ER-Subtyp angefertigt, wobei E_2 in den Konzentrationen 20 pg/ml, 60 pg/ml, 200 pg/ml, 600 pg/ml, 2000 pg/ml und 6000 pg/ml eingesetzt wird.

Ad 2.2: Zur Zytotoxizität: Bestimmung der „Colony Forming Efficiency“

Es werden pro Konzentration einer jeden Probe zwei 25cm^2 -Zellkulturflaschen mit je 200 Zellen in 5ml Wachstumsmedium (s. o.) angesetzt und bei 37°C und $5\%\text{CO}_2$ inkubiert. Nach 24 Stunden wird das Medium durch 5ml serumfreies Medium ersetzt, welches die Prüfsubstanz in der jeweiligen Konzentration enthält. Die Zellen werden 24 Stunden mit dem Behandlungsmedium inkubiert. Danach wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit serumfreiem Medium gewaschen und das Wachstumsmedium erneuert. Man lässt die Kulturen 6 Tage im Inkubator wachsen. Nach Absaugen des Mediums werden die Kolonien mit 2,5ml Giemsa Lösung (Merck) angefärbt und anschließend gezählt. Bei der Giemsa Lösung handelt es sich um eine Azur-Eosin-Methylenblaulösung für die Mikroskopie.

Ad 2.3.1: Genetische Charakterisierung der hFOB/ER Zelllinien

Die hFOB 1.19 Zelllinie wurde mit Expressionsvektoren für $\text{ER}\alpha$, bzw. $\text{ER}\beta$ stabil transfiziert. $\text{ER}\alpha$ wurde in die Zellen gebracht durch Transfektion mit dem $\text{ER}\alpha$ Expressionsvektor pHEGO-HYG (ATCC) (207). Der Vektor wurde hergestellt durch Einbringung des $\text{ER}\alpha$ -cDNA-Fragmentes in den EcoRI Bereich des pBlueskript SK Vektors (Firma Stratagene). Selektioniert werden diese Zellen über eine Neomycinresistenz (G418, Geneticin).

Für $\text{ER}\beta$ wurden hFOB 1.19 Zellen stabil transfiziert mit dem $\text{ER}\beta$ Expressionsvektor pZeo $\text{ER}\beta$. Der Vektor wurde hergestellt durch das Einbringen der humanen $\text{ER}\beta_1$ -cDNA Sequenz (am N-Terminus um 48 Aminosäuren gekürzt gegenüber der vollen Kettenlänge des Rezeptors) (310) in den eukaryotischen Expressionsvektor pZeoSV2(+) der Firma Invitrogen.

Ad 2.3.2: Durchführung des Alkalische Phosphatase Assays

Als Standard dient eine Verdünnungsreihe aus einer frisch zubereiteten p-Nitrophenol-Stocklösung der Konzentration 50nmol/ml. Diese wird hergestellt durch Verdünnen von $50\mu\text{l}$ der p-Nitrophenol Standardlösung (Sigma Nr. 104-1) mit 10,0ml 0,02N NaOH. Jede

Verdünnung (0, 5, 10, 20, 30, 40 und 50nmol/ml, s. Protokoll Sigma Kit) entspricht einem in Sigma U/ml angegebenen Wert an AP-Aktivität.

Direkt vor der Durchführung des Versuchs wird eine 1:1 Mischung aus p-Nitrophenylphosphat- Substratlösung und Alkaline Buffer Solution (1,5M 2-Amino-2-methyl-1-propanol, pH10,3; Sigma Nr. 221) hergestellt. Diese hat bei Verwendung im Versuch Raumtemperatur. An Tag 5 werden nach Absaugen des Mediums und zweimaligem Waschen mit Phosphate Buffered Saline (PBS) 50µl der frisch zubereiteten Mischung in jedes Well pipettiert. Dies sollte mit einer Multikanalpipette geschehen, um eine möglichst simultane Behandlung der Zellen zu gewährleisten. Die Platten werden bei 37°C für mindestens 30min bis zur Gelbfärbung der Positivkontrolle inkubiert. Ist nach dieser Zeit keine oder nur eine sehr schwache Färbung zu beobachten, kann die Zeit auf maximal 45min erhöht werden. Zum Abstoppen der Reaktion dient ein äquivalentes Volumen 0,05N NaOH-Lösung, die ebenfalls möglichst gleichzeitig und in gleicher Reihenfolge wie das vorige Reagenz zugegeben werden sollte. Die Messung erfolgt sofort im Anschluss bei 405nm am HP Spectracount. Das präzise Einhalten von Reihenfolge und Zeiten ist bei dieser Methode für die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse sehr wichtig.

Bezogen werden die Messwerte auf das Gesamtprotein je Well. Zur Bestimmung dessen dient der Proteinassay nach Bradford. Dieser kann direkt aus dem Reaktionsgemisch des AP-Assays erfolgen, da der alkalische Puffer die Zellen lysiert.

Ad 2.4: Proteinbestimmung nach Bradford

Die Coomassie-Lösung (BioRad Proteinassay, Bio Rad Laboratories, München) wird direkt vor der Anwendung 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt. Dabei kommt es zu einem Farbumschlag von rotbraun nach graublau. Es wird eine Eichkurve erstellt aus einer BSA-Stocklösung (Bovines Serumalbumin, Sigma) der Konzentration 2mg/ml durch Verdünnung mit 0,15 M NaCl mit den Verdünnungen 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120 und 140µg/ml. Im Assay werden je 50 µl eingesetzt.

Ad 2.5: RT-PCR in U2-OS/ER Zellen

Ad 2.5.1 Genetische Charakterisierung der U2-OS/ER Zelllinien

Ausgegangen wurde von der ER-negativen Osteosarkom-Zelllinie U2-OS. Zur Herstellung ER α - und ER β -induzierbarer Zelllinien verwendeten Monroe et al. (215) das T-RExTM System (Invitrogen). Dieses System macht Gebrauch von zwei Vektoren. Wie bereits erwähnt exprimiert der eine Vektor, pcDNA6/TR[©], den Tetracyclin (Tet)-Repressor; der zweite,

pcDNA4/TO[®], enthält den Cytomegalievirus Promotor, der unter der Kontrolle von Tet-Operator Sequenzen die Expression des Zielgens betreibt. In Abwesenheit von Dox bindet der Tet-Repressor an die Tet-Operator Sequenzen und verhindert die Transkription des klonierten Gens. Wird dem Kulturmedium 1µg/ml Dox hinzugefügt, so wird der Tet-Repressor aus seiner Bindung gelöst und Transkription des Zielgens kann stattfinden.

Der Vektor pcDNA6/TR[®] wurde linearisiert und bei einer Zelldichte von 50% unter Anwendung von Lipofectamin Plus Reagenz (Invitrogen) in U2-OS Zellen transfiziert. In DMEM/F12-Medium erfolgt unter Zusatz von 5mg/l Blasticidin S (Boehringer Mannheim) Ringklonung, wobei entstandene einzelne Kolonien durch „Einzäunen“ mit zylindrischen Ringen voneinander isoliert werden. Zur Überprüfung des positiven Verlaufs der Transfektion wurde die Dox-induzierte Expression des Luciferase-Gens getestet. Diese kommt zustande durch Induktion eines pcDNA4/TO Vektors, der ein kloniertes Luciferase-Gen enthält. Der Subklon mit der höchsten Dox-Induzierbarkeit des Luciferase-Gens wurde für das weitere Vorgehen verwendet.

Mit einem FLAG-Epitop markierte ER α -, bzw. ER β - Rezeptorproteine, die in dem Vektor pcDNA4/TO[®] kloniert vorliegen (215), wurden ebenfalls linearisiert und entsprechend obiger Beschreibung kloniert. Die resultierenden Zelllinien, die ER α , bzw. ER β nach Induktion exprimieren, werden als U2OS/ER α und U2OS/ER β bezeichnet.

Ad 2.5.2: RNA Isolierung

Herstellung des Diethylpyrocarbonat (DEPC) Wassers: 1ml DEPC wird auf 1l destilliertes Wasser gegeben, über Nacht bei Raumtemperatur stehen gelassen, dann autoklaviert.

Die behandelten Zellen werden nach Absaugen des Mediums zweimal mit PBS gewaschen, wobei nach der letzten Waschung auf vollständiges Entfernen des Puffers zu achten ist. Zum Ernten der Zellen wird der Zellrasen mit 500µl Trizol (Invitrogen) vollkommen bedeckt und das Zelllysat mithilfe eines Zellschabers und einer Pipette in ein steriles 1,5ml Gefäß, das der Zellbehandlung entsprechend gekennzeichnet ist, überführt. Vor Zugabe von 100µl Chloroform in jedes Reaktionsgefäß sollte 5 min gewartet werden, um eine vollständige Lyse der Zellen und gute Durchmischung zu gewährleisten. Die Proben werden kurz gevortext und anschließend bei 4°C mit 10000g für 10min zentrifugiert.

Die klare wässrige Phase, welche die obere Schicht im Gefäß bildet, wird vorsichtig ohne Spuren der organischen Phase in ein neues gekennzeichnetes Gefäß pipettiert. Nach Zugabe von mindestens des gleichen Volumens Isopropanol (300µl) wird die Fällung über Nacht bei -20°C stehen gelassen. Erneutes Zentrifugieren bei 4°C für 20min erzeugt ein Pellet, welches

vorsichtig von der überstehenden Flüssigkeit befreit wird. Dann werden 300µl DEPC Wasser hinzugefügt und gut durch zweifaches Vortexen vermischt. Die Lithiumchlorid-Fällung wird durch Zugabe von 100µl LiCl (Sigma) initiiert und bei 4°C über Nacht stehen gelassen.

Zentrifugieren für 20min bei 4°C erzeugt bei diesem Schritt ein klares Pellet, welches nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes in 300µl DEPC Wasser aufgenommen und resuspendiert wird. Nacheinander werden 30µl 3M Natriumacetat-Lösung und 800µl Ethanol hinzugegeben und die Gefäßes nach kurzem Durchmischen für mindestens 2 Stunden bei -20°C gehalten.

In einem letzten Aufbereitungsschritt wird wiederum bei 4°C 20min lang zentrifugiert, die Flüssigkeit abgesaugt und das Innere der Gefäße getrocknet. Das Pellet wird in 50µl DEPC Wasser aufgenommen und die vollständige Resuspension durch abwechselndes Vortexen, Warten und Auf-und-Ab-Pipettieren sichergestellt.

Von jeder Probe wird eine 1:100 Verdünnung zur spektrometrischen Quantifizierung der RNA hergestellt. Liegen die Messwerte außerhalb des Konfidenzbereiches des Gerätes, wird eine geringere Verdünnung gewählt und die Berechnung der RNA-Konzentration mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor durchgeführt.

Ad 2.5.3: cDNA Synthese

Die genaue Durchführung ist im Methodenteil beschrieben. Die dort erwähnte 20mM dNTP Stocklösung setzt sich zusammen aus je 200µl eines 100mM Stocks von ATP, TTP, GTP und CTP (Promega) sowie 200µl DEPC Wasser. Die Endkonzentration der dNTP-Mischung im Reaktionsgemisch ist 2mM. Die verwendeten Primer sind ein Random Primer (100pmol/µl Stock) und ein Oligo dT Primer (25pmol/µl Stock) von Promega (Madison, WI).

Der Master Mix enthält (pro Gefäß):

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

0,5 µl RNAsin (Promega)

2 µl 20 mM dNTP Mix

4 µl 5X Buffer (Promega)

3 µl Wasser

Ad 2.5.4: Durchführung der PCR

Die Menge an PCR Master Mix wird entsprechend der Anzahl an Proben kalkuliert und jeder Bestandteil mit dem Faktor $F = \text{Anzahl(Proben)} + 2$ multipliziert wie folgt hinzu gegeben:

q.s. μl H_2O

2xF μl 10X PCR Buffer (Invitrogen)

2xF μl 15 mM MgCl_2 (10X) (Invitrogen)

2xF μl 2 mM dNTPs (10X)

2xF μl Rediload (10X) (Promega)

_____ μl Primer (forward) (10 pmol/ 20 μl Reaktion)

_____ μl Primer (reverse) (10 pmol/ 20 μl Reaktion)

1xF μl DMSO

0,2xF μl Taq Polymerase (Promega)

Endvolumen= 18 μl x F

Für die Primer muß jeweils das 10pmol entsprechende Volumen [μl] berechnet werden, welches dann mit F multipliziert wird:

Primer [μl]= (10pmol x F / Konzentration (primer)[pmol/ μl]) .

Die Menge Wasser, die dem Mix zugefügt wird, berechnet sich nach

Wasser [μl]= (18 μl x F) – (Master Mix ohne Wasser [μl]) .

Die Primer wurden entweder an der Mayo Clinic, Rochester, MN synthetisiert oder von der Firma MWG bezogen.

Ad 2.6.1: Proliferationsassay in MCF-7 Zellen

Die MCF-7 Zellen werden ausplattiert (6400, bzw. 10.000 Zellen pro Well) und für 24 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgt eine Vorbehandlung der Zellen mit 10^{-8}M ICI und 5% cs-FBS in DMEM/F12 für weitere 24 Stunden, um die estrogenen Effekte des Mediums zu antagonisieren. Die Zellen werden mit serumfreiem DMEM/F12 zweimal gewaschen und mit je 100 μl der Testsubstanzen in den Konzentrationen 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ und 10,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$, einer oder mehrerer Positivkontrollen (E_2 , EE oder DES) der Konzentration 10^{-8}M sowie als Negativkontrolle mit reinem Medium behandelt. Es werden Dreierparallelen angefertigt. Das Medium enthält während der 72-stündigen Behandlungszeit 1% cs-FBS.

Die Bestimmung der relativen Proliferationsrate der mit Testsubstanzen behandelten -im Vergleich zu nur mit Medium kultivierten Zellen- erfolgt wie bei Reinholz et al. (311) beschrieben. In jedes Well und zusätzlich in drei nur mit Medium befüllte Wells zur

Leerwertbestimmung werden 20µl Cell Titer 96 AQueous One Solution (Promega) gegeben. Die Zellen werden 30min bei 37°C inkubiert. Anschließend wird die Absorption bei 490nm im Spektrometer (SpectraMax 340 plate reader/ spectrophotometer, Molecular Devices Corp., Sunnyvale, CA oder vergleichbares Instrument) gemessen. Es liegt eine lineare Beziehung vor zwischen der Anzahl lebender Zellen und der Absorption bei 490nm.

Ad 2.6.2: Luciferase-Assay in MCF-7 Zellen

Ad 2.6.2.1 Transfektion von MCF-7 Zellen mit ERE-TK-Luc und pRL-TK:

Der pRL-TK Vektor (Promega, Madison, WI, Nr. E2241) enthält eine Herpes simplex Virus Thymidinkinase (HSV-TK)- Promotorregion stromaufwärts von RLuc. Der HSV-TK sorgt für eine geringe konstitutive Expression des RLuc Kontrollreporters in den Zellen. Der pRL „Kontroll-Reporter-Vektor“ enthält die cDNA, welche die Renilla Luciferase (RLuc) kodiert. Die konstitutive Expression der RLuc wird durch bestimmte Promotor Elemente, die sich auf dem Plasmid befinden, sicher gestellt.

ERE-TK-Luc (Promega) ist der estrogeninduzierbare Firefly Luciferase Reporter Vektor.

Die Transfektion wird in 12-well Platten vorgenommen. Zunächst werden in jedes Well 250µl serumfreies DMEM/F12 gegeben, welches 1,33µl Plus Reagent (Invitrogen) enthält. Diese Mischung ist direkt vor der Transfektion im nötigen Maßstab herzustellen. Die Platten werden für 10-15min bei Raumtemperatur inkubiert. Nun werden 250µl der ebenfalls frisch hergestellten Mischung aus serumfreiem DMEM/F12 und Lipofektamin (1,33µl in 250µl Medium) auf die Zellen gegeben und wiederum 15min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Zellen werden zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 500µl Transfection Mix zugegeben. Dieser besteht aus 50ng pRL-TK und 0,5µg ERE-TK-Luc je Well und wird direkt vor Zugabe in der notwendigen Menge hergestellt. Die Transfektion findet bei 37°C über 3 Stunden im Inkubator statt. Im Anschluss wird das Medium mit DMEM/F12, welches 10% cs-FBS enthält, ersetzt und die Zellen, wie in „Methoden“ beschrieben, behandelt.

Ernten der MCF-7 Zellen

Nach der 24 Stunden Behandlung müssen die MCF-7 Zellen zum Einsatz im Luciferase Assay geerntet werden. Unter dem Mikroskop wird der Zustand der Zellen überprüft. Dies geschieht unter Anwendung der „Passive Lysis“ Methode, die bei Promega beschrieben ist (Instructions zu Kat.Nr. E1980). Zum Ernten der Zellen wird Passive Lysis Buffer (5X) verwendet (Promega Nr. E1941), der zunächst 1:5 mit destilliertem Wasser verdünnt wird.

Pro Well werden nach zweimaligem Waschen mit PBS 200µl des verdünnten Puffers (1X) eingesetzt; sind nur wenig Zellen in den Wells vorhanden, kann das Volumen auf 100µl reduziert werden. Die Platten werden für 15min bei Raumtemperatur geschüttelt bis zur vollkommenen Lyse der Zellen (Mikroskop). Das Lysat kann nun direkt aliquotiert (20-30µl) im Luciferase Assay eingesetzt oder in markierte Eppendorfgefäße überführt werden zur Lagerung bei -80°C.

Ad 2.6.2.2: Luciferase Assay in MCF-7

Die Bestimmung der Luciferase Aktivität erfolgt unter Anwendung des Dual-Luciferase[®] Reporter Assay Systems (Promega, Madison, WI, Nr. E1980). Das Luminometer ist ein Turner Designs 20/20 Luminometer (Sunnyvale, CA, USA).

Die Herstellung des Luciferase Assay Reagent II, des Firefly Substrats, erfolgt durch Zugabe des mit gelieferten Luciferase Assay Buffers II zum lyophilisierten Substrat.

Das Stop&Glo[®] Reagent, das Renilla Substrat, wird durch Lösen des Stop&Glo[®] Substrate in seinem Gefäß mit Hilfe des Stop&Glo[®] Solvent hergestellt. Die Mischung wird 10sec gevortext und sollte leuchtend gelb sein. Das Gefäß wird beschriftet mit „50X Renilla Substrat“. Zum Einsatz im Assay wird die benötigte Menge des rekonstituierten Stop&Glo Substrate zu einem Volumenteil mit 50 Volumenteilen Stop&Glo[®] Buffer versetzt. Diese Mischung wird als Stop&Glo[®] Reagent bezeichnet.

Ad 2.7.1: Alkalische Phosphatase-Bestimmung in Ishikawa Zellen

Die Zellen, Passage 62, werden mit einer Dichte von 10.000 Zellen pro Well in Standardmedium in 96-well Platten ausplattiert. Nach 24 Stunden erfolgt ein Mediumwechsel zu DMEM/F12 mit 10% cs-FBS. Weitere 24 Stunden später werden die Zellen mit den Substanzen in serumfreiem Medium für 48h behandelt. Als Positivkontrolle dient EE in der Konzentration 10^{-8} M, wie bei den hFOB/ER Zellen in situ hergestellt aus einer 10^{-3} M Stocklösung. Die Proben werden in den Konzentrationen 0,1, 1,0 und 10,0µg/ml eingesetzt. Jede Behandlung erfolgt als Viererparallele.

Nach der Behandlungszeit (48h) wird das Medium vorsichtig abgesaugt, jedes Well mit 50µl der frisch hergestellten 1:1 Mischung aus p-Nitrophenylphosphat- Substratlösung und Alkaline Buffer Solution versehen, die Platte leicht geschüttelt und für 10-15min in den Inkubator gestellt. Es sei nochmals betont, dass es wichtig ist, dass das Abstoppen der Reaktion in der gleichen Reihenfolge und nach definierter Zeit geschieht. Zum Abstoppen

werden hier 100µl 0,05N NaOH in jedes Well gegeben und die Messung sofort am Spektrometer (Spectra Count) bei 405nm durchgeführt.

Anschließend wird die Proteinbestimmung nach Bradford durchgeführt.

Ad 2.8: Realtime-RT-PCR in Fe33 Zellen

Light Cycler, Roche (Mannheim, Nr. 2011468)

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

Light Cycler Kapillare, Roche (Nr. 1909339)

Die Primer für CaBP, AT, PBGD,... wurden synthetisiert von der Firma MWG (Ebersberg, Deutschland)

Relative Quantification Software RelQuant[®], Roche

Ad 2.8.2: Vorbereitung der PCR

Die Menge an Master Mix für die Real-time PCR richtet sich nach der Anzahl an Proben. Jeder Bestandteil wird mit dem Faktor **F= Anzahl(Proben) + 2** multipliziert (bei einer Probenzahl von weniger als 32 ist +1 ausreichend):

Das benötigte Volumen LightCycler FastStart Master SYBR Green I muss im Voraus berechnet und durch Zusammengeben der Substanzen nach Herstelleranweisung angefertigt werden.

In ein Eppendorf Gefäß werden gegeben:

11,6xF µl H₂O (wird dem Reaktionsansatz DMSO hinzugefügt, verringert sich die Wassermenge)

X/5xF µl DMSO (X steht für die Prozentzahl DMSO, die hinzugefügt werden soll)

2xF µl LightCycler FastStart Master SYBR Green I

2,4xF µl MgCl₂ Stock Solution [4 mM Endkonzentration]

_____ µl Primer (forward) (10 pmol/ 20µl Reaktion)

_____ µl Primer (reverse) (10 pmol/ 20µl Reaktion)

Endvolumen= 18µl x F

Für die Primer muss jeweils das 10pmol entsprechende Volumen [µl] berechnet werden, welches dann mit F multipliziert wird:

Primer [μl]= (10pmol x F / Konzentration (Primer)[pmol/μl]) .

Die Menge Wasser, die dem Mix zugefügt wird, berechnet sich nach

Wasser [μl]= (18μl x F) – (Master Mix ohne Wasser [μl]). Hier erfolgt im Falle eines DMSO-Zusatzes noch die Subtraktion des DMSO-Volumens.

Ist die Zugabe von DMSO für ein Gen erforderlich, so muss dessen Master Mix getrennt von dem des PBGD hergestellt werden.

Die Mischung wird kurz gevortext und anschließend ein Aliquot von 18μl in jede Kapillare pipettiert. Es ist darauf zu achten, dass die Kapillaren entsprechend der ihnen zugeordneten Position im Light Cycler (1-32) den jeweils richtigen Mix erhalten.

Anschließend werden in jede Kapillare 2μl der verdünnten oder unverdünnten cDNA gegeben. Zur Vereinheitlichung der Füllstände in den Kapillaren muss die Kapillarkraft überwunden werden. Hierzu werden die Kapillaren in die nummerierten Light Cycler Zentrifugenadapter in einem Kühlblock (Roche, Nr. 1909312) überführt und kurz (ca. 20sec) bei 2000xg(?) in einer Eppendorf-Zentrifuge zentrifugiert.

Für jedes untersuchte Gen wird eine Verdünnungsreihe hergestellt, die dem RelQuant[®] Programm als Grundlage zur Auswertung dient. Die cDNA wird dazu 1:2, 1:5, 1:10, 1:20, 1:50 und 1:100 mit Aq. dest. verdünnt und mit den Primern des jeweiligen Gens amplifiziert.

Die Belegung des Karussells im Light Cycler erfolgt nach den Instruktionen im Handbuch des RelQuant[®]-Programms. Das Karussell beinhaltet 32 Positionen für Kapillaren, die wie folgt belegt werden sollten: Position 1+2: Kalibrator Zielgen, Position 3+4: Kalibrator PBGD, 5+6: Probe 1 Zielgen, 7+8: Probe 1 PBGD, 9+10: Probe 2 Zielgen, 11+12: Probe 2 PBGD,...

8.2 Abkürzungsverzeichnis

ACE	Angiotensin-Converting-Enzyme
AF-1	Die „transcriptional activation function“ eines ER, die Domäne, an die ligandenabhängig Cofaktoren und Wachstumsfaktoren zur Regulation der Gentranskription binden können.
AP	Alkalische Phosphatase

AP-1	Activation Protein-1, ein so genanntes „enhancer element“, über das ER-vermittelte Transkription stattfindet. Voraussetzungen sind Bindung eines Liganden am ER und die Anwesenheit der AP-1-Transkriptionsfaktoren Fos und Jun zur Aktivierung der Transkription (s. Fig. 6 AP-1)
AT, rAT	Angiotensinogen, Angiotensinogen von der Ratte (bezieht sich auf den Gencode)
AT I	Angiotensin I
AT II	Angiotensin II
BSA	Bovines Serum Albumin
CIM	ethanolischer Extrakt aus <i>Cimicifuga racemosa</i> L.
CK	Creatin Kinase
COX-2	Cyclooxygenase 2
CP	Crossing Point
cs-FBS	Fetales Rinderserum von estrogenwirksamen Inhaltsstoffen weitgehend befreit durch Kohlefiltration
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DES	Diethylstilbestrol
DMSO	Dimethylsulfoxid
Dox	Doxycyclin
E ₂	17β-Estradiol
ER α /β	Estrogen Rezeptor α /β
ERE	Estrogen-Response-Element
ERKO	Estrogenrezeptor-Knockout Maus
FBS	Fetal Bovine Serum, fetales Rinderserum
FFLuc	Firefly Luciferase
HE-1	ethanolischer Hopfen-Spezialextrakt
HE-2	entfetteter ethanolischer Hopfenextrakt
HERS-Studie	The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
³ H-E ₂	Tritium-markiertes 17β-Estradiol
hFOB	humane fetale Osteoblasten
hFOB/ER α	kurz für hFOB/ER α 9, humane fetale Osteoblasten-Zelllinie, stabil transfiziert mit ER α
hFOB/ERβ	kurz für hFOB/ERβ6
HRT	Hormonersatztherapie

IL-6	Interleukin-6
IXH	Isoxanthohumol
LM	Lösungsmittel
OPG	Osteoprotegerin
PBS	Phosphate Buffered Saline
PEPI-Studie	The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions Trial
PHA	Ethylacetatextrakt aus <i>Phaseolus vulgaris</i> , L., Fabaceae
6-PN	6-Prenylnaringenin
8-PN	8-Prenylnaringenin
PR	Progesteron Rezeptor
pS2	Presenelin-2
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
RHA	Rhaponticin
RLuc	Renilla Luciferase
SAR	Ethylacetatextrakt aus <i>Sarothamnus scoparius</i> L.
SD	Standardabweichung
SERM	Selektiver Estrogenrezeptor Modulator
SHBG	Sex-Hormone-Binding-Globulin
Soph	Ethylacetatextrakt aus <i>Sophora japonica</i> , L.
SOY	ethanolischer Sojaextrakt
Tet	Tetracyclin
TNF	Tumornekrosefaktor
TTS	Transdermales Therapeutisches System
VWF	von Willebrand Faktor
XH	Xanthohumol
WHI-Studie	Women's Health Initiative; das weltweit umfangreichste Forschungsprojekt zur Thematik, inwieweit u.a. postmenopausale Estrogen-, bzw. Estrogen-Gestagen-Therapie bei Frauen im Alter zwischen 50 und 79 Jahren estrogenassoziierte Karzinome, kolorektale Karzinome, kardiovaskuläre Erkrankungen und Osteoporose beeinflussen; Beginn der Studie war 1991 und war für diesen Teil auf 8,5 Jahre angelegt.

8.3 Liste mit R- und S-Sätzen

Gefahrenhinweise (R-Sätze) und Sicherheitsratschläge (S-Sätze):

R-Sätze:

R 10	Entzündlich
R 11	Leichtentzündlich
R 22	Gesundheitsschädlich beim Verschlucken
R 34	Verursacht Verätzungen
R 40	Verdacht auf krebserzeugende Wirkung
R 42	Sensibilisierung durch Einatmen möglich
R 60	Kann die Fortpflanzungsfähigkeit beeinträchtigen
R 61	Kann das Kind im Mutterleib schädigen
R 63	Kann das Kind im Mutterleib möglicherweise schädigen

Kombinationen der R-Sätze:

R 20/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen und Verschlucken
R 20/21/22	Gesundheitsschädlich beim Einatmen, Verschlucken und bei Berührung mit der Haut
R 24/25	Giftig bei Berührung mit der Haut und beim Verschlucken
R 36/38	Reizt die Augen und die Haut
R 36/37/38	Reizt die Augen, die Atmungsorgane und die Haut
R 42/43	Sensibilisierung durch Einatmen und Hautkontakt möglich

S-Sätze:

S 7	Behälter dicht geschlossen halten
S 16	Von Zündquellen fernhalten – Nicht rauchen
S 22	Staub nicht einatmen
S 26	Bei Berührung mit den Augen sofort gründlich mit Wasser abspülen und Arzt konsultieren
S 27	Beschmutzte, getränkte Kleidung sofort ausziehen
S 28	Bei Berührung mit der Haut sofort abwaschen mit viel ...(Herstellerangabe)
S 36	Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung tragen

- S 45 Bei Unfall oder Unwohlsein sofort Arzt hinzuziehen (wenn möglich, dieses Etikett vorzeigen)
- S 53 Exposition vermeiden – vor Gebrauch besondere Anweisungen einholen.- Nur für berufsmäßigen Verwender.

Kombinationen der S-Sätze:

- S 24/25 Berührung mit den Augen und der Haut vermeiden
- S 36/37 Bei der Arbeit geeignete Schutzhandschuhe und Schutzkleidung tragen
- S 36/37/39 Bei der Arbeit geeignete Schutzkleidung, Schutzhandschuhe und Schutzbrille/
Gesichtsschutz tragen

Lebenslauf Katharina Effenberger

Persönliche Daten:

Adresse: Mövenstraße 3
22301 Hamburg
Tel.: 040 460 73593
Mobil: 0171 482 0951
Email: keffenbe@uke.uni-hamburg.de

Geburtsort : Hamburg

Geburts-
datum: 13. April 1976

Nationalität: Deutsch

Schul- und Hochschulausbildung:

1982-1995 Grundschule, Orientierungsstufe und Gymnasium Winsen
1995 Abitur

1995-1999 Studium der Pharmazie an der Universität Hamburg
1997 1. Pharmazeutisches Staatsexamen
1999 2. Pharmazeutisches Staatsexamen
1999-2000 Praktisches Jahr in einer öffentlichen Apotheke in Hamburg
12 / 2000 3. Pharmazeutisches Staatsexamen ;
 Approbation als Apothekerin

Promotion:

04 / 2001 Promotionsbeginn am Institut für Experimentelle und Klinische Toxikologie,
 Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

06-08 / 2002 Research Trainee an der Mayo Clinic, Rochester, Minnesota; Department of
 Biochemistry and Molecular Biology, Labor Prof. Dr. Thomas C. Spelsberg

10 / 2002 Erneuter Aufenthalt an der Mayo Clinic, Rochester, als Special Project
 Associate unter Prof. Dr. Thomas C. Spelsberg

Berufliche Tätigkeiten und Praktika:

- 10 / 1993 Praktikum in der Abteilung für Orthopädie im Kreiskrankenhaus Winsen
- 08 / 1995 Assistant Teacher an der Royal Bath High School, England
- 09 / 1995 Praktikum in der Krankenhausapotheke, Kreiskrankenhaus Winsen
- 08/2000 Arbeit in der öffentlichen Apotheke in Cambridge, England
- ab 2000 Teilzeitbeschäftigung in der öffentlichen Apotheke in Hamburg

Lehre:

- 2001-2004 Kursus der allgemeinen und systematischen Pharmakologie und Toxikologie für
Medizinstudenten (10,5-21 Stunden pro Semester);
- Pharmakologisch-toxikologischer Demonstrationskurs für Pharmazeuten (5,5 Stunden
pro Semester);
- Assistenz bei der Hauptvorlesung Pharmakologie für Zahnmediziner (4,5 Stunden pro
Semester).

Publikationen:

Effenberger, KE, Johnsen, SA, Monroe, DG, Spelsberg, TC, and Westendorf, J. Regulation of Osteoblastic Phenotype by Hop-derived Phytoestrogens. Submitted.

Johnsen, SA, Subramaniam, M, Effenberger, KE, and Spelsberg, TC. Loss of TGF β Regulation of Cellular Proliferation in TIEG Null Cells. Submitted.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde im Institut für Klinische und Experimentelle Toxikologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Betreut wurde sie in hervorragender Weise durch Herrn Professor Dr. Westendorf. Bei ihm möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die stetige fachliche Begleitung besonders bedanken. Er hat mir die Freude an der Forschung vermittelt und mir innerhalb des Projektes die Möglichkeit zur kreativen Entfaltung gegeben. Auch das Sammeln von Erfahrungen in der Lehre, welches er mir ermöglichte, war sehr wichtig für mich.

Für die freundliche Bereitstellung der pflanzlichen Proben danke ich der Firma Dr. Willmar Schwabe Arzneimittel GmbH (Karlsruhe).

Herrn Professor Dr. Korth danke ich sehr herzlich für die immerwährende Bereitschaft zur fachlich konstruktiven Diskussion und für die Unterstützung bei meinem Vorhaben. Aus seiner Arbeitsgruppe hat mir Herr Frank Steffens dankenswerterweise unter Aufwendung seiner Zeit die Methode der Realtime-PCR nahe gebracht.

Mein besonderer Dank gilt weiterhin Herrn Professor Dr. T.C. Spelsberg (Department of Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA) für die exzellente wissenschaftliche und darüber hinaus gehende Beratung. Ihm selbst und allen seinen Mitarbeitern danke ich sehr für die außerordentlich liebenswürdige und persönliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis an der Mayo Clinic in Rochester. Im Speziellen bedanke ich mich bei Herrn Steven Johnsen, PhD (ZMNH, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) für seine ständige und selbstlose Hilfsbereitschaft und seine Zuversicht hinsichtlich des Gelingens dieser Arbeit. Ohne ihn wäre mir Vieles verschlossen geblieben! Auch Herrn Terry Ruesink für die tatkräftige Unterstützung: Thank you!

Über den schweren Beginn und die Probleme bezüglich humaner Osteoblasten hat mir Herr Dr. David Rickard (Department of Musculoskeletal Diseases Biology, Glaxo Smith Kline, Collegeville, PA, USA) trotz der Entfernung hinweggeholfen. Vielen Dank für die zuverlässige und nicht endende Hilfestellung!

Für ein stets offenes Ohr und die Vermittlung von Motivation sowie Ausstrahlung von Optimismus gilt mein herzlicher Dank Herrn Dr. Albrecht Sakmann (Institut für Pharmazie, Universität Hamburg).

Herrn Professor Dr. Seitz und seiner Arbeitsgruppe danke ich vielmals für die freundliche Möglichkeit zur Nutzung des Light Cyclers und die Offenheit für meine Fragen.

Ebenfalls möchte ich allen Kollegen und Kolleginnen aus der Toxikologie, die mich auf meinem Weg begleitet haben, herzlich danken. Besonders sei Frau Sabine Schröder für die fachkundige Einführung in die Zellkultur gedankt; außerdem Herrn Klaus Söhren, der mir zeigte, dass man auch mit Gelassenheit bei der Laborarbeit ans Ziel kommt.

Außerhalb des Labors haben mich Herr Dr. Götz Neurath (GAB Consulting, Lamstedt) sowie Herr Dr. Christian Edye und Herr Klaus Harpprecht in guten und in schlechten Zeiten motivierend begleitet, wofür ich sehr dankbar bin.

Von ganzem Herzen danke ich meinen Eltern für ihre niemals endende Unterstützung und Motivation, für ihren festen Glauben an das Gelingen der Arbeit und die Liebe, mit der sie mich in allem begleiten. Ohne sie wäre ich nicht an diesem Punkte angelangt.