

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 Inhaltstoffe 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.