

Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung der Estrogen Rezeptoren α und β an das Estrogen Response Element

Zur Erlangung des akademischen Grades eines

DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der
Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Drazen Kostelac

aus Speyer

Dekan: Prof. Dr. M. Kappes
Referent: Prof. Dr. S. Kulling
Korreferent: Prof. J. Podlech

Tag der mündlichen Prüfung: 15.07.2004

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn **Priv. Doz. Dr. Karlis Briviba** für die fachlich kompetente und stets freundliche Betreuung und Unterstützung während der gesamten Promotion.

Prof. Dr. Sabine Kulling möchte ich danken, dass trotz der räumlichen Trennung eine zuverlässige und fruchtbare Unterstützung möglich war.

Marina Giorgi-Kotterba danke ich für die Unterstützung bei der praktischen Arbeit.

Bei meinen lieben Kollegen **Frank Kratzer** und **Jens Fleischhut** möchte ich mich für ihre Freundschaft, ihren Humor und ihre Unterstützung in allen Bereichen bedanken. Ohne sie wäre mein Weg viel länger gewesen.

Allen anderen Kollegen aus dem Institut für Ernährungsphysiologie danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre während meiner Promotion.

Meiner lieben Freundin **Christina Thuy** danke ich für die permanente Unterstützung und ihren fachlichen Rat.

Bei meinen Eltern **Nedeljka Kostelac** und **Ivica Kostelac** möchte ich mich dafür bedanken, dass sie mir den Weg zu dieser Arbeit ermöglicht haben.

Dem **HSV** danke ich für zwei wundervolle Spielzeiten voller Tiefen und keiner Höhen.

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Allgemeines	3
2.2	Kernrezeptor-Superfamilie	4
2.3	Estrogen Rezeptoren α und β	5
2.3.1	Allgemeines.....	5
2.3.2	Gewebeverteilung von ER α und ER β	6
2.3.3	Endogene Estrogene.....	8
2.3.4	Mechanismus der ER-vermittelten Signaltransduktion.....	9
2.3.5	Modulierende Faktoren	12
2.3.6	ER-regulierte Gene.....	13
2.3.7	Agonisten und Antagonisten.....	14
2.4	Phytoestrogene	16
2.4.1	Allgemeines.....	16
2.4.2	Vorkommen und Bioverfügbarkeit	17
2.4.3	Physiologische Wirkungen.....	18
2.5	Methoden der Interaktionsanalyse	20
2.5.1	Allgemeines.....	20
2.5.2	Überblick über die Methoden der Interaktionsanalyse	20
2.6	Biacore Technologie	23
3	Fragestellung	24
4	Material und Methoden	25
4.1	Biacore-System	25
4.1.1	Surface Plasmon Resonance (SPR).....	25
4.1.2	Aufbau des Gerätes	28
4.1.3	Übersicht über verfügbare Sensor Chips.....	30
4.1.4	Sensorgramm.....	30
4.1.5	Herstellung des Sensor Chips SA	32
4.1.6	Interaktionsmessungen	35
4.2	pS2-Expressionsassay	37
4.2.1	Probenvorbereitung	37
4.2.1.1	Zellkultur.....	37
4.2.1.2	Inkubation der MCF-7 Zellen	38
4.2.1.3	RNA-Isolation.....	39
4.2.1.4	RNA Gelelektrophorese.....	40
4.2.1.5	Photometrische Konzentrationsbestimmung.....	41

4.2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	41
4.2.2.1	Prinzip.....	41
4.2.2.2	cDNA-Synthese und PCR.....	42
4.2.2.3	DNA Gelelektrophorese.....	44
4.3	Zytosensor-Messungen	45
4.3.1	Vorbereitung der Zellen.....	45
4.3.2	Vorbereitung des Zytosensors.....	46
4.3.3	Messung.....	46
5	Ergebnisse	47
5.1	Messungen mit dem Biacore-System	47
5.1.1	Validierung der Messmethode.....	47
5.1.2	Estrogen Rezeptor α	51
5.1.2.1	17 β -Estradiol.....	51
5.1.2.2	Genistein.....	52
5.1.2.3	Daidzein.....	53
5.1.2.4	Coumestrol.....	54
5.1.2.5	Equol.....	55
5.1.2.6	ICI 182,780.....	56
5.1.2.7	4'- <i>O</i> -Methylequol, Ethyldaidzein, Matairesinol und Secoisolariciresinol.....	57
5.1.2.8	Kombination aus 17 β -Estradiol und Daidzein.....	58
5.1.3	Estrogen Rezeptor β	59
5.1.3.1	17 β -Estradiol.....	59
5.1.3.2	Genistein.....	60
5.1.3.3	Daidzein.....	61
5.1.3.4	Coumestrol.....	62
5.1.3.5	Equol.....	63
5.1.3.6	Ethyldaidzein.....	64
5.1.3.7	4'- <i>O</i> -Methylequol.....	65
5.1.3.8	Matairesinol.....	66
5.1.3.9	Secoisolariciresinol.....	67
5.1.4	Übersicht über die Biacore-Messungen.....	68
5.2	pS2-Assay	70
5.2.1	Bestimmung des linearen Bereichs.....	70
5.2.2	Messungen mit 17 β -Estradiol, Genistein, Daidzein und Coumestrol.....	72
5.3	Zytosensor-Messungen	74
5.3.1	Wirkung von 17 β -Estradiol auf MCF-7 Zellen.....	74
5.3.2	Wirkung von Genistein und Daidzein auf MCF-7 Zellen.....	75
5.3.3	Wirkung von Coumestrol auf MCF-7 Zellen.....	76
5.3.4	Wirkung von 17 β -Estradiol auf Caco-2 Zellen.....	77

6	Diskussion	78
6.1	Messungen mit dem Biacore-System	78
6.1.1	Rezeptorverhalten	78
6.1.2	Einfluss der Phytoestrogene.....	79
6.1.3	Kinetische Analyse.....	85
6.1.4	Fehlerfaktoren	87
6.2	pS2-Assay	88
6.3	Zytosensor-Messungen	89
6.4	Physiologische Bedeutung	90
7	Literatur	91
8	Anhang	99
8.1	Abkürzungsverzeichnis	99
8.2	Liste der verwendeten Chemikalien.....	101
8.3	Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien	104
8.4	Verwendete Lösungen und Puffer	106
8.4.1	Biacore-Messungen.....	106
8.4.2	Zellkultur.....	108
8.4.3	RNA-Isolation und PCR	110
8.5	Sequenzen der im Biacore-System verwendeten Oligonukleotide	113
8.6	Exemplarische Darstellung eines Sensorgramms	114
8.7	Darstellung eines RNA-Gels nach der RNA-Isolation.....	115
8.8	Darstellung eines DNA-Gels nach der PCR	116

1 Zusammenfassung

Der klassische estrogene Signalweg lässt sich in drei Stufen unterteilen: Bindung des Estrogens an den Estrogen Rezeptor (ER) (Stufe 1), Bindung des aktivierten Rezeptors an das Estrogen Response Element (ERE) (Stufe 2) und Aktivierung der Transkription verschiedener Zielgene (Stufe 3).

Im Vordergrund dieser Arbeit stand die Frage, ob die hier getesteten Verbindungen agonistische oder antagonistische Wirkungen besitzen. Die von Kuiper et al. [1,2] bestimmten Bindungsaffinitäten beschreiben die erste Stufe der estrogenen Wirkung, die Bindung der Phytoestrogene an die Estrogen Rezeptoren α und β . Eine Bindung an den Rezeptor alleine lässt allerdings keine Aussage zu, ob es sich um agonistische oder antagonistische Wirkungen handelt. Hierfür ist wichtig, ob die Substanzen zusätzlich in der Lage sind, die Bindung des Rezeptors an das ERE zu aktivieren und anschließend die Expression von Zielgenen zu induzieren.

In dieser Arbeit wurde eine nicht-radioaktive Echtzeit-Messmethode etabliert, mit der sich die zweite Stufe der estrogenen Wirkung, die Bindung des aktivierten ER an das ERE, beschreiben lässt.

17 β -Estradiol und die getesteten Verbindungen bewirkten eine konzentrationsabhängige Erhöhung der Bindung beider Rezeptoren an das ERE. Im Allgemeinen war 17 β -Estradiol dabei wirksamer als die getesteten Phytoestrogene. Es ergaben sich folgende Reihen für die Effektivitäten der getesteten Verbindungen:

Estrogen Rezeptor α :

ICI 182,780 > 17 β -Estradiol > Coumestrol > Equol > Genistein >> 4'-*O*-Methylequol > Daidzein = Ethyldaidzein = Matairesinol = Secoisolariciresinol

Estrogen Rezeptor β :

Coumestrol > 17 β -Estradiol > Genistein > Daidzein > Equol > 4'-*O*-Methylequol > Ethyldaidzein > Secoisolariciresinol > Matairesinol

Insgesamt war zu beobachten, dass die getesteten Verbindungen den ER β stärker aktivieren als den ER α . Diese Beobachtungen sowie die erhaltenen Reihen der Effektivitäten stehen in Einklang mit den Ergebnissen von Kuiper et al. [1,2].

Antagonistische Wirkungen sind mit dem hier etablierten Messsystem nur messbar, solange sie bis zur zweiten Stufe auftreten. Treten sie erst auf Stufe der Genexpression auf, so sind für die Beschreibung weitere Methoden nötig.

Hierfür konnte im pS2-Assay für die getesteten Verbindungen eine gute Korrelation zwischen Induktion der Genexpression und Aktivierung des Rezeptors festgestellt werden. Dies bedeutet, dass letztlich die Affinität der Substanz für den Rezeptor die agonistische oder antagonistische Wirkung bestimmt.

Im Falle des reinen Antagonisten ICI 182,780 konnte bereits gezeigt werden, dass der aktivierte Rezeptor nicht in der Lage ist, die Transkription von Zielgenen zu induzieren [126,129]. Mit dem hier etablierten Messsystem konnte eine deutliche Aktivierung der Bindung des ER α an das ERE gezeigt werden, was die Vermutung bestätigt, dass die antagonistische Wirkung von ICI 182,780 auf der Hemmung der Transkription von Zielgenen beruht und nicht auf der Hemmung der Bindung des Rezeptors an das ERE.

Während Daidzein den ER α nicht aktiviert, ist dessen reduktiver Metabolit Equol in der Lage, eine deutliche Bindungserhöhung herbeizuführen. Durch diese Metabolisierung kann Daidzein also von einem spezifischen ER β -Aktivator in einen Aktivator beider Rezeptoren umgewandelt werden. Dies ist für Menschen relevant, die in der Lage sind, Daidzein zu Equol zu metabolisieren.

Durch die Messungen mit dem Zytosensor konnte gezeigt werden, dass die getesteten Verbindungen keinen direkten Einfluss auf die metabolische Aktivität von MCF-7 und Caco-2 Zellen haben. Dies deutet darauf hin, dass die anabole Wirkung eventuell durch Beeinflussung der Genexpression erreicht wird.

2 Einleitung

2.1 Allgemeines

In den letzten Jahren hat die Zahl der hormonbedingten Krebserkrankungen immer mehr zugenommen [3,4]. So wird geschätzt, dass etwa ein Drittel der auftretenden Krebsfälle auf Hormonwirkungen zurückgeführt werden können [5].

Zahlreiche epidemiologische Studien zeigen deutliche geographische Unterschiede in der Häufigkeit und Ausbildung bestimmter hormonabhängiger Krebsarten wie Brust- und Prostatakrebs [6]. Im Vergleich zu Amerika und Nordeuropa ist die Häufigkeit derartiger Erkrankungen in Asien deutlich niedriger [7-9]. Aufgrund dieser Studien kann davon ausgegangen werden, dass Umweltfaktoren, d. h. bestimmte Nahrungsbestandteile, auf die entsprechende Krebsentstehung und -entwicklung Einfluss nehmen.

Weitere epidemiologische Studien belegen darüberhinaus, dass der Verzehr von phytoestrogenreicher Nahrung, wie sie in traditionellen asiatischen Gesellschaften stattfindet, mit einem verminderten Risiko verknüpft ist, an diesen sogenannten westlichen Krankheiten zu erkranken [10].

Für zahlreiche Phytoestrogene wurde bereits eine estrogene oder antiestrogene Wirkung gezeigt [11-14]. Einige phytoestrogenhaltige Sojaprodukte haben außerdem bei chemisch induziertem Krebs eine präventive Wirkung gezeigt [15].

Im Fokus aktueller Untersuchungen stehen daher die Mechanismen, nach denen Phytoestrogene in die Entstehung und Entwicklung solcher Krebsarten eingreifen können.

2.2 Kernrezeptor-Superfamilie

Hormonrezeptoren umfassen Membranrezeptoren wie z.B. den EGF-Rezeptor und Kernrezeptoren, die im Zellkern lokalisiert sind. Zur Kernrezeptor-Superfamilie gehören Steroidhormon, Thyroid, Retinoid und verschiedene Orphan Rezeptoren, deren physiologische Liganden bisher weitestgehend unbekannt sind [16-18]. Bis heute sind etwa 100 verschiedene Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie bekannt [19]. Die Steroidhormonrezeptoren (SHR) umfassen den Glukokortikoid Rezeptor, den Mineralokortikoid Rezeptor, den Progesteron Rezeptor, den Androgen Rezeptor und den Estrogen Rezeptor. Ihre Liganden sind kleine lipophile Verbindungen, die Steroidhormone. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation der Entwicklung und bei der Homöostase und stimulieren Wachstum und Differenzierung ihrer Zielzellen [20]. Ihre Wirkung wird durch den jeweiligen SHR vermittelt. Funktionell können SHR daher als liganden-induzierbare Transkriptionsfaktoren beschrieben werden.

Die SHR haben, wie auch die anderen Mitglieder der Kernrezeptor-Superfamilie eine modulare Struktur, bestehen also aus funktionellen Domänen [18,22,23]. In Abbildung 1 ist der Aufbau eines SHR dargestellt.

Der Rezeptor besteht aus sechs funktionellen Domänen (A-F). Die N-terminalen Domänen (A/B) mit der ligandenunabhängigen Aktivierungsfunktion (AF-1) variieren unter den Steroid Rezeptoren am meisten [24]. Die Domäne C enthält die DNA-Bindungsdomäne (DBD), um spezifische Bindungssequenzen in der DNA, sog. estrogenresponsive Elemente (ERE), zu erkennen. Sie besteht aus zwei Zinkfinger-Strukturen, die in Kombination mit der sogenannten P-Box die Bindung an das ERE ermöglichen und in Kombination mit der D-Box zur Dimerisierung führen [25]. In dieser Domäne befindet sich außerdem ein Kernlokalisierungssignal (NLS). Die D-Domäne ist an der Bindung von co-regulatorischen Proteinen beteiligt [26]. Die C-terminalen Domänen E und F beinhalten die Ligandenbindungsdomäne (LBD) und eine Region, die die agonistische Aktivität von nicht-steroidalen Antiestrogenen moduliert [27]. Die LBD beinhaltet außerdem die

ligandenabhängige Transkriptions-Aktivierungsfunktion (AF-2) [28], die hsp90-Bindungsregion [29], ein Kernlokalisierungssignal [30] und eine weitere Dimerisierungsdomäne [31].

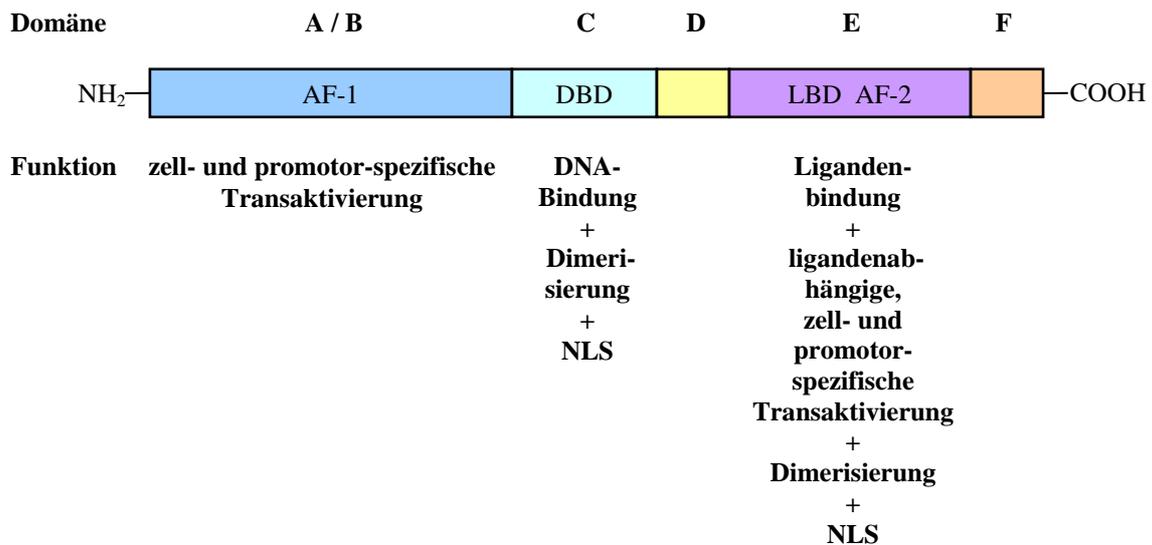


Abb. 1: Modularer Aufbau von Steroidhormonrezeptoren (nach [21]).

2.3 Estrogen Rezeptoren α und β

2.3.1 Allgemeines

Nach der Entdeckung des Estrogen Rezeptors (ER) 1986 war man der Ansicht, dass nur eine Form des Rezeptors existiert [32,33]. Diese Form wird heute als Estrogen Rezeptor α (ER α) bezeichnet. Allerdings wurde 1996 eine zweite Form des Rezeptors in der Prostata von Ratten [34] und in menschlichen Hoden [35] entdeckt. Diese Form wird heute als Estrogen Rezeptor β (ER β) bezeichnet.

ER α und ER β haben eine hohe sequenzielle Homologie (>90%) in der DBD und eine geringere in der LBD (~60%). Der humane ER α ist ein aus 595 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer hohen Interspezies-Homologie (88% zum ER α der Maus) [36]. Der ER β kommt in zwei Varianten vor. Eine „kurze“ Variante, bestehend aus 485 Aminosäuren [37] und eine „lange“ Variante, bestehend aus 530 Aminosäuren [38-40]. Physiologisch kommt die „lange“ Variante häufiger vor, allerdings scheint es keine entscheidenden funktionellen Unterschiede zu geben [21].

Normale und neoplastische estrogene Zielgewebe exprimieren nicht nur den ER α und/oder ER β , sondern auch eine Vielzahl verschiedener mutierter Formen des Rezeptors [41-48]. Es handelt sich dabei um Punktmutationen, Kürzungen und Insertionen im Rezeptormolekül. Manche dieser mutierter Formen werden *in vivo* stabil exprimiert, wodurch eine Relevanz im estrogenen Signalweg vermutet wird. So konnte in nicht-estrogen-responsiven Brusttumoren eine verkürzte Form des Rezeptors nachgewiesen werden. Es wird angenommen, dass ein in dieser Art mutierter Rezeptor eine erhöhte Aktivität ohne Ligandenbindung zeigt und daher verantwortlich für das estrogen-unabhängige Wachstum von Brusttumoren sein könnte [45]. Andererseits konnte auch nachgewiesen werden, dass mutierte Formen des ER eine erhöhte ligandenabhängige Aktivität besitzen können [49]. Aufgrund dieser verschiedenen Wirkungen scheinen auch mutierte Formen des ER bei der Entwicklung und der Progression von Tumoren eine entscheidende Rolle zu spielen.

2.3.2 Gewebeverteilung von ER α und ER β

Estrogene Zielgewebe sind dadurch definiert, dass sie funktionelle ER exprimieren und unterschiedliche Reaktionen nach dem Einfluss von Estrogenen zeigen. Die Gewebeverteilung der ER charakterisiert das potenzielle Ziel von Verbindungen, Agonisten und/oder Antagonisten, die über den ER wirken.

Tab. 1: Qualitative Gewebeverteilung von ER α und ER β . Zusammengefasst sind bekannte Daten aus Zellen und Geweben von Menschen, Mäusen und Ratten. Die Daten beinhalten RNA- und Proteinexpression (nach [21], Quellen: [1,35,50-60]).

Gewebe	ERα	ERβ
Gehirn		
Hypothalamus	++	+
Hypophyse	+++	+
Thymus	++	++
Herz-Kreislaufsystem	++	+
Lunge	+	+++
Brustdrüse	++++	+
Leber	++	-
Niere	+++	+
Blase	+	+++
Reproduktionsgewebe		
Uterus	++++	+
Hoden	+++	++
Eierstöcke	++++	++++
Prostata	++	++++
Knochen	++	++

Der ER α wird besonders im Brustdrüsengewebe, im Uterus und in den Eierstöcken exprimiert, während der ER β vorwiegend in den Eierstöcken und der Prostata vorkommt. In etwas geringeren Mengen kommt der ER α in der Hypophyse, der Niere und den Hoden, der ER β in der Lunge und in der Blase vor.

2.3.3 Endogene Estrogene

Die natürlich vorkommenden Estrogene 17β -Estradiol (E2), Estron (E1) und Estriol (E3) (Abbildung 2) sind C18-Steroide, die von Cholesterol abgeleitet sind. Vorläufermoleküle, wie z.B. Androstendion, werden durch die adrenale Drüse sekretiert und können durch Aromatisierung zu Estron metabolisiert werden. Diese Reaktion wird durch einen P450-Aromatase-Monooxygenase-Enzymkomplex katalysiert [21].

Während der Schwangerschaft produziert die Plazenta große Mengen an E2. Der Plasmalevel an E2 beträgt bei prämenopausalen, erwachsenen Frauen 20-60 pg/ml (max. 700 pg/ml während des Menstruationszyklusses) und bei postmenopausalen Frauen unter 20 pg/ml. Auch Männer produzieren etwa 20 pg/ml E2. Bei ihnen wird das Estrogen hauptsächlich durch Aromatisierung von Androstendion (über Estron) in peripheren Geweben gebildet. Estron wird durch die 17β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu E2 metabolisiert [61].

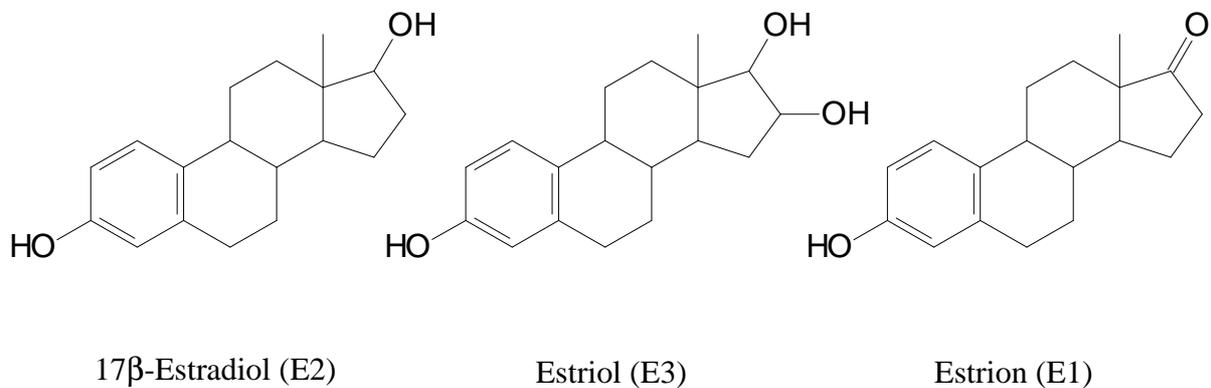


Abb. 2: Natürlich vorkommende Estrogene.

Estron und Estradiol werden, wie auch exogene Estrogene, über das Blutsystem zu ihren Zielzellen transportiert. Da Estrogene wasserunlöslich sind, werden sie mit einer hohen Affinität an das Sex-Hormon-bindende Globulin (SHG) gebunden, um im Blutsystem transportiert werden zu können. Mit einer geringeren Affinität binden sie auch an Albumin [62].

Nur freies Estrogen kann durch Diffusion aufgrund seiner Lipophilie durch die Membran in die Zelle gelangen. Daher ist nicht der Plasmalevel an Gesamttestrogen, sondern nur der freie, ungebundene Anteil an Estrogen für die spezifische Zellantwort entscheidend. Dieser beträgt etwa 2-3% [62]. Das Ausmaß der Zellantwort hängt dabei vom Gehalt an ER α und ER β ab. Die Mechanismen der ER-Signaltransduktion scheinen dabei bei ER α und ER β identisch zu sein.

2.3.4 Mechanismus der ER-vermittelten Signaltransduktion

In Abbildung 3 ist der klassische Mechanismus der estrogenen Signaltransduktion dargestellt.

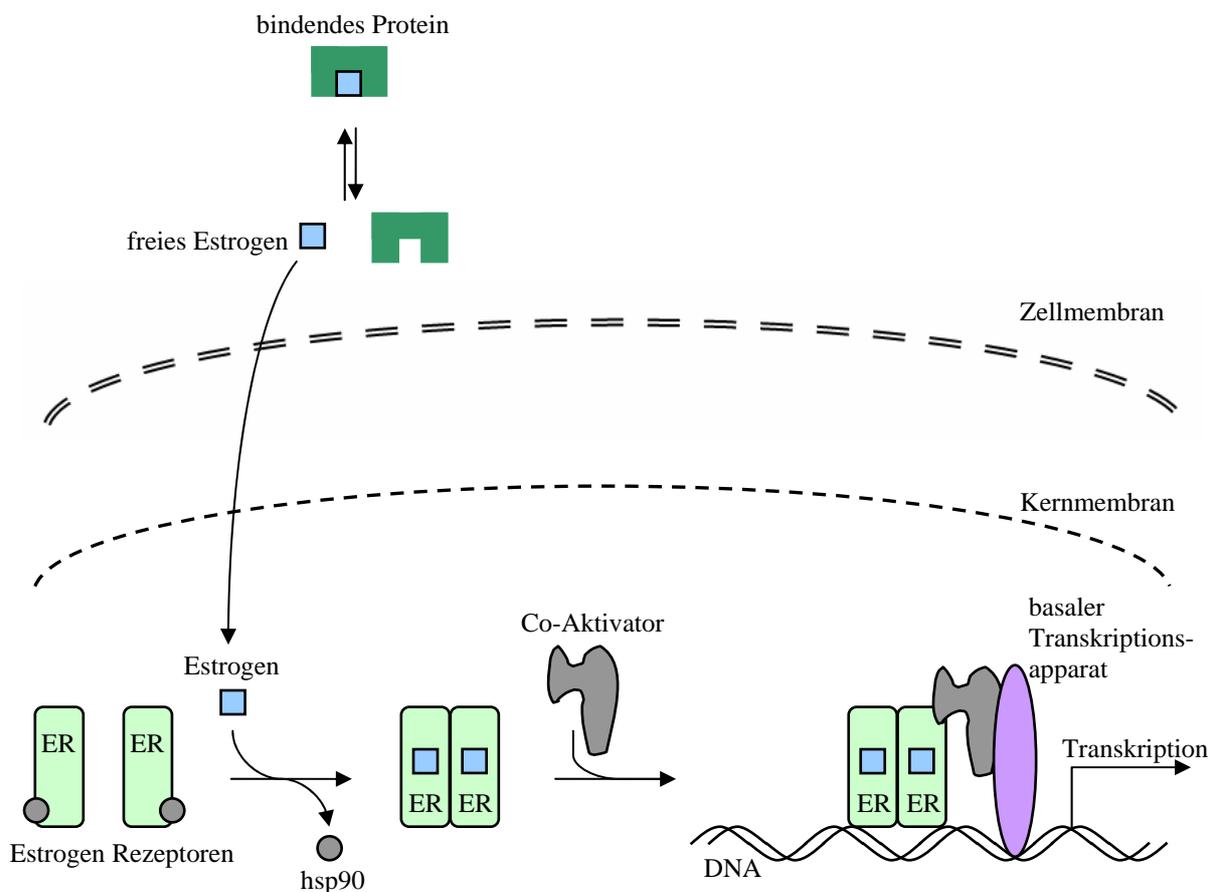


Abb. 3: Mechanismus der ER-vermittelten Signaltransduktion.

Der ER ist im Kern lokalisiert und kommt in seiner inaktiven Form gebunden an verschiedene Chaperone, wie z.B. das Hitzchock-Protein hsp90 vor. Es wird vermutet, dass Steroid Rezeptoren einen sog. Chaperon-Zyklus durchlaufen und letztlich in einem reifen Komplex vorliegen. Der Rezeptor ist in seiner Hormonbindungskonformation im Komplex stabilisiert, aus dem er spontan abgelöst werden kann [63].

Der freie Rezeptor kann dann Estrogene in einer hydrophobe Tasche der LBD binden. Durch die Konformationsänderung in der LBD kommt es schließlich zur Initialisierung der Aktivierungsfunktion AF-2 [64,65]. Katzenellenbogen et al. [66] haben gezeigt, dass LBD und AF-2 zwei unterschiedliche Strukturen sind, die in der gleichen Domäne lokalisiert sind.

Die Dimerisierung des Rezeptors ist abhängig von bestimmten Regionen in den Domänen C und E. Der ER bindet über die DBD an eine spezifische Sequenz der DNA, das ERE. Das ERE besteht aus einer invers wiederholten Abfolge von sechs Basen die durch drei Basen voneinander getrennt sind (Abbildung 4) [18,22]. Die Wiederholung ermöglicht die Bindung eines ER-Dimers. Die DBD enthält zwei Zinkfinger motive, in denen das Zink durch vier Cysteine komplexiert wird. Ein Motiv ist verantwortlich für Bindung und Unterscheidung der DNA-Basen des ERE [22,67], während das zweite Motiv zur Dimerisierung beiträgt [23]. Alle drei möglichen ER-Dimere ($ER\alpha/ER\alpha$, $ER\beta/ER\beta$, $ER\alpha/ER\beta$) binden aufgrund ihrer Homologie in der DBD an dieselbe Sequenz der DNA [68-70]. Jedes mögliche Dimer ist in der Lage, die Genexpression zu induzieren, wobei $ER\beta$ -Homodimere weniger aktiv als ER-Heterodimere zu sein scheinen.

...AGG TCA nnn TGA CCT...

Abb. 4: Allgemeine Sequenz des Estrogen Response Elements (ERE). n steht dabei für beliebige Basen.

Verschiedene Publikationen deuten darauf hin, dass die AF-1 als ligandenunabhängiger Transkriptionsaktivator fungiert, abhängig vom zellulären Zusammenhang und dem Promotor, während die AF-2 ligandenabhängig zu sein scheint [71-73].

Beide Aktivierungsfunktionen können die Genexpression induzieren. Volle agonistische Aktivität erfordert aber beide Aktivierungsfunktionen [74].

Neben dem klassischen Modell für die ER-vermittelte Signaltransduktion werden noch weitere Modelle diskutiert.

Im sogenannten „nicht-klassischen“ Modell kommt es zu einer Bindung des Liganden an den ER und anschließend zur Bindung an weitere Transkriptionsfaktoren (z.B. AP-1, Sp1, NF- κ B), die wiederum an die DNA binden und die Transkription aktivieren können [75-78]. Damit kann die Transkription von Genen reguliert werden, die kein ERE beinhalten, sondern Erkennungssequenzen für die jeweiligen Transkriptionsfaktoren. Dieses Modell der ligandenabhängigen ER-Aktivierung durch Protein-Protein Wechselwirkungen wäre eine Erklärung für die zelltypabhängige ER-Aktivität, allerdings basieren die meisten Erkenntnisse auf *in vitro* Beobachtungen, während *in vivo* Ergebnisse noch ausstehen [79].

Schließlich wird noch eine ligandenunabhängige Aktivierung der Transkription durch den ER diskutiert. Dabei erfolgt die Aktivierung des ER durch Phosphorylierungen verschiedener Serin- und Tyrosingruppen in den AF-1 und AF-2 Domänen. Diese können durch Signalwege induziert werden, die durch Wachstumsfaktor-Rezeptoren, wie den EGF-, IGF- und Insulin-Rezeptor vermittelt werden. Die Phosphorylierung bewirkt eine estrogene oder antiestrogene Wirkung, reguliert die Dimerisierung und moduliert die Assoziation mit Co-Regulator-Proteinen, abhängig von der Stelle der Phosphorylierung [80]. Der ER wiederum reguliert die Transkription von Genen, die für die Wachstumsfaktor-Aktivität wichtig sind, wodurch eine komplexe Vernetzung zwischen den Signalwegen entsteht. Weitere Moleküle, die die ligandenunabhängige Aktivierung des ER bewirken, sind cAMP [81], Dopamin [82] und der Phosphatase-Inhibitor Vanadat [83]. Neben den Wachstumsfaktoren kann auch Cyclin D1 den ER ohne Phosphorylierung aktivieren [84].

2.3.5 Modulierende Faktoren

Nach der Bindung eines Liganden nimmt das ER-Dimer eine bestimmte Konformation an und bindet an das ERE. Durch Analyse von Kristallstrukturen der gebundenen ER α und ER β konnte die Funktionsweise genauer beschrieben werden [64,85-88]. Die LBD besteht aus zwölf α -Helices (H1-H12), von denen fünf eine hydrophobe Tasche bilden. Nach Bindung eines Estrogens kommt es zu einer Konformationsänderung, wobei sich die relative Orientierung der H12 ändert [89]. Diese fungiert dabei als eine Art Deckel und stabilisiert die Bindung des Estrogens [64,85]. Das Ausmaß der Konformationsänderung hängt vom Ligendentyp ab [87]. Es konnte gezeigt werden, dass dieselbe Helix eine Rezeptor-Co-Aktivator Interaktion vermittelt. Dies lässt darauf schließen, dass die ligandenabhängige Konformationsänderung verschiedene Cofaktoren beeinflusst, damit also die Transkriptionsaktivität des Rezeptors moduliert [90].

Die Transkription von ER-regulierten Genen erfolgt durch AF-1 und AF-2, die entweder unabhängig voneinander oder synergistisch funktionieren, abhängig vom jeweiligen zellulären Kontext. Es wurde gezeigt, dass beide mit unterschiedlichen Komponenten des basalen Transkriptionsapparates (BTA) interagieren können [91], die zellspezifische Agonisten- oder Antagonistenfunktionen von Antiestrogenen modulieren [92] und Steroid Rezeptor co-aktivierende Proteine, wie SRC-1, TIF1a, RIP140 und GRIP-1, binden können [93-100]. Das CBP/p300 scheint ein essenzieller Co-Aktivator für das SRC-1 und den BTA zu sein [101,102]. Vor kurzem wurde auch ein RNA-Molekül entdeckt, das als Co-Aktivator fungiert (Steroid Rezeptor RNA Aktivator, SRA). Es scheint ein selektiver Aktivator des Progesteron Rezeptors zu sein, indem es die Genaktivierung über die N-terminale AF-1 vermittelt [103].

Neben Co-Aktivatoren sind auch Co-Repressoren bekannt [104,105]. Dazu gehören in erster Linie die Proteine SMRT und NCoR [106]. 1999 wurde von Montano et al. [107] das Protein REA (Repressor of ER activity) entdeckt, welches in der Lage ist, die Aktivierung durch SRC-1 umzukehren.

Die Interaktion mit den Co-Aktivatoren ist also wichtig für die Genaktivierung, während die Interaktion mit Co-Repressoren für die Hemmung der Genexpression entscheidend ist.

Das ERE selbst ist ein weiterer modulierender Faktor für die ER-Wirkung. Neben der bekannten Struktur für das ERE bindet der ER auch an leicht veränderte DNA-Strukturen, sogenannte imperfekte Palindrome [108]. Davon sind mehrere funktionelle Varianten bekannt, die in verschiedenen Zelltypen mit verschiedenen Genpromotoren vorkommen [109,110]. Allerdings resultiert das Vorhandensein eines ERE und von Co-Faktoren alleine nicht zwingend in einer ER-Genregulation. Die regulierenden Sequenzen der DNA sind in das Chromatin gepackt, wodurch die Zugänglichkeit des ERE und der Genpromotoren eingeschränkt sein kann [108].

2.3.6 ER-regulierte Gene

Zu den Estrogen-regulierten Genen gehört eine große Vielfalt, von denen viele noch unbekannte Funktionen mit unbekannter Relevanz haben. Beispiele für bekannte Gene sind SHR (z.B. Progesteron Rezeptor), Interleukin-4 Rezeptor, Wachstumsfaktoren (EGF, IGF), Wachstumsfaktor Rezeptoren (z.B. EGF Rezeptor), Cathepsin D (wichtig für Tumormetastasen), Proto-Onkogene (c-myc, c-fos/c-jun) und Zellzyklus-regulierende Proteine (z.B. Cyclin D1) [111-118].

Im Allgemeinen führen Estrogene zu einer Hochregulation Zellzyklus-fördernder Faktoren, wie Proto-Onkogene und Cyclin D1. Die beobachteten mitogenen Effekte von estrogenen Verbindungen sind offensichtlich darauf zurückzuführen. Die Beobachtung, dass Estrogen-regulierte Gene in Brustkrebszellen häufig überexprimiert werden, unterstützt die Auffassung, dass die Aktivierung des ER ein kritischer Schritt in der Tumorprogression ist.

Die Genregulation ist allerdings abhängig vom zellulären Kontext. Dies wird deutlich an den gewebeabhängigen Induktionen/Hemmungen von spezifischen Genen [119,120]. Im Herz führen Estrogene zu positiven Wirkungen, indem sie verschiedene Gene, wie z.B. NO-Synthase und Myosin, induzieren [120]. In Knochen führen Estrogene zu einer gesteigerten

Zellproliferation von Osteoblasten, die abhängig vom Differenzierungsstadium der Zellen, der Knochenmatrix-Protein-Synthese (z.B. Kollagen, Alkalische Phosphatase) und von Wachstumsfaktoren (TGF β , IGF) ist. Dies führt zu einer gesteigerten Knochenfestigkeit [119].

2.3.7 Agonisten und Antagonisten

Substanzen, die an den ER binden und eine ER-vermittelte Antwort bewirken, werden Estrogene/Agonisten genannt. Klassisch sind ER-Antagonisten oder Antiestrogene Substanzen, die die ER-Wirkung hemmen oder verhindern. Die estrogene Wirkung ist aber nicht nur abhängig vom Liganden, sondern auch vom zellulären und genetischen Kontext. So wirkt z.B. das Medikament Tamoxifen (Behandlung von Brustkrebs) im Uterus und im Knochen als Agonist, während es im Brustgewebe antagonistisch wirkt. Daher wurde der Begriff „Selektive Estrogen Rezeptor Modulatoren“ (SERM) kreiert [121]. Eine Vielzahl von natürlichen oder industriellen Chemikalien und natürlichen Verbindungen (Phytoestrogene) besitzen estrogene oder endokrine Wirkungen. Für diese wird der Begriff „endocrine Disruptors“ verwendet [3,4]. Alle diese Verbindungen zeigen keine einheitliche, sondern eine gemischte estrogene/antiestrogene Wirkung. Da dies zu potenziell positiven Wirkungen führen kann, wurde der Begriff „endocrine active Compound“ (EAC) eingeführt [122].

Synthetische Estrogene, die als Medikamente eingesetzt werden, sind Diethylstilbestrol (DES) und Ethinylestradiol. Tamoxifen ist eines der am besten untersuchten SERM und wird aufgrund seiner antagonistischer Effekte in der Therapie von Brustkrebs verwendet. Mittlerweile wird es auch aufgrund seiner agonistischer Effekte bei der Behandlung von Osteoporose eingesetzt [123-126]. Eine andere Klasse sind die puren Antagonisten, wie z.B. das ICI 182,780 [127-129].

In Abbildung 5 sind einige Beispiele dargestellt.

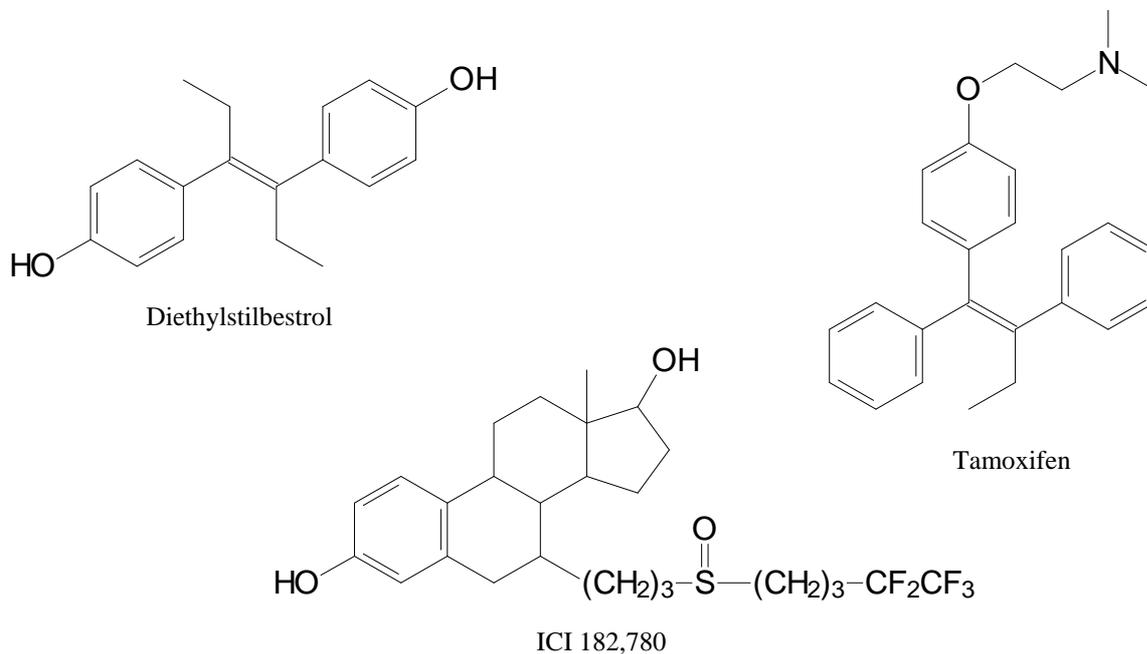


Abb. 5: Beispiele für synthetische Substanzen mit estrogenen oder antiestrogenen Aktivität.

An industriellen Chemikalien gibt es eine Reihe von Beispielen, die sowohl *in vitro* (ER-Bindung, Gentranskription) als auch *in vivo* (Uterotrophie) estrogenen oder antiestrogenen Wirkungen zeigen. Dazu gehören phenolische Verbindungen, Organochlorverbindungen und Phthalate [130-132]. Detergenzien (z.B. Alkylphenole), das Kunststoffmonomer Bisphenol A und Pestizide, wie *o,p'*-DDT, Dieldrin und Methoxychlor zeigten *in vitro* und *in vivo* estrogenen Wirkungen [2,133-135]. Weitere Beispiele sind polychlorierte Biphenyle und ihre Hydroxyderivate.

Meist wird von einer Verbindung nur eine bestimmte Wirkung (z.B. Zellproliferation oder die Bindung an den Rezeptor) gemessen. Es muss zusätzlich berücksichtigt werden, dass es durch den Metabolismus zu einer Aktivierung oder Deaktivierung der Wirkung kommen kann. Beispiel ist das SERM Tamoxifen, das in Tieren und Menschen hauptsächlich zu N-Desmethyltamoxifen metabolisiert wird, welches ähnliche estrogenen Eigenschaften wie Tamoxifen selbst hat. Ein weiterer Metabolit ist 4-Hydroxytamoxifen (OHT), das wesentlich stärker an den ER bindet [136].

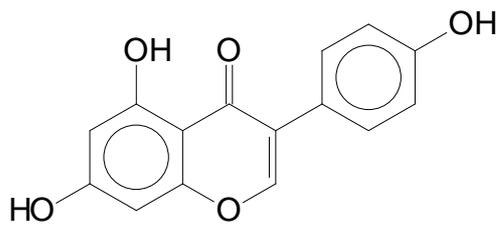
Die Bindung eines Liganden an den ER resultiert entweder in einer Aktivierung (Agonismus) oder in einer Hemmung der ER-Wirkung (Antagonismus), abhängig vom Promotor und dem zellulären Kontext. Da bekannt ist, dass Verbindungen wie Tamoxifen selektiv in Geweben wirken (Agonist im Uterus und Antagonist im Brustgewebe), ist es schwierig, estrogene und antiestrogene Wirkungen anhand der Ligandenstruktur zu unterscheiden. Allerdings unterscheiden sich steroidale Estrogene von SERMs bei der Konformationsänderung des ER nach der Bindung. Diese führt normalerweise zu einer Konformationsänderung, bei der zusätzlich noch Co-Aktivatoren wie z.B. GRIP-1 binden können. Große Liganden, wie z.B. OHT benötigen mehr Platz, wodurch es zu einer verzerrten Struktur der LBD kommt. Dies führt dazu, dass GRIP-1 nicht mehr binden kann, wodurch es zu keiner Aktivierung der AF-2 kommt. Dies scheint der Grund für die antiestrogene Wirkung von OHT im Brustgewebe zu sein [73]. Im Uterus konnten Chambon et al. [72] zeigen, dass OHT als Agonist über eine Aktivierung der AF-1 wirken kann.

Volle agonistische Wirkung ist also nur möglich, wenn AF-1 und AF-2 initiiert werden. Wird nur die ligandenunabhängige AF-1 initiiert, so kann es, abhängig vom ERE und der Anwesenheit von Co-Faktoren, trotzdem zu agonistischen Effekten kommen. Dagegen verhindern komplette Antagonisten wie das ICI 182,780 jegliche Aktivierung über AF-1 oder AF-2.

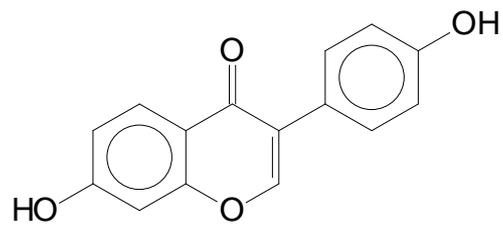
2.4 Phytoestrogene

2.4.1 Definition

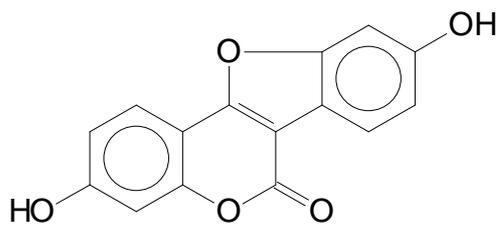
Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe mit estrogener Wirkung. Sie können in drei Hauptgruppen eingeteilt werden. Isoflavone, Coumestane und Lignane. Es sind diphenolische Substanzen mit einer strukturellen Ähnlichkeit zu natürlichen Estrogenen. In Abbildung 6 sind einige Vertreter der Phytoestrogene dargestellt.



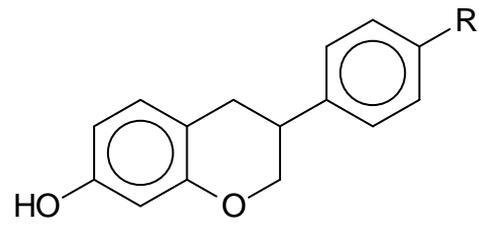
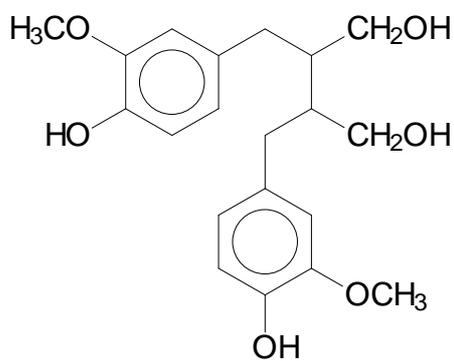
Genistein



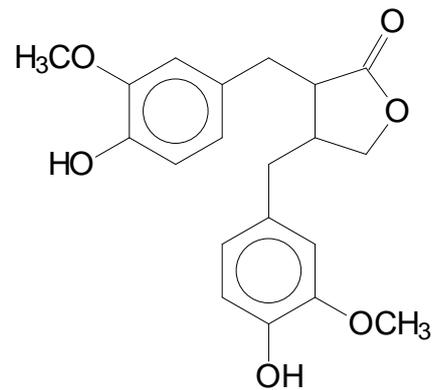
Daidzein



Coumestrol

Equol (R=OH),
4'-O-Methylequol (R=OCH₃)

Secoisolariciresinol



Matairesinol

Abb. 6: Strukturformeln der in dieser Arbeit verwendeten Phytoestrogene.

2.4.2 Vorkommen und Bioverfügbarkeit

Sojabohnen und Sojaprodukte sind die hauptsächlichen Aufnahmequellen für Isoflavone [137, 138,139]. Die wichtigsten Isoflavone sind Genistein, Daidzein und Glycitein. Diese

kommen in der Pflanze vorwiegend in glykosidisch gebundener Form vor. Der Gehalt an Isoflavonen in Sojabohnen beträgt 1,2 - 4,2 mg/g Trockengewicht [139].

Die über die Nahrung aufgenommenen Glykoside werden durch die bakterielle Darmflora in die estrogen aktiven Aglykone und die entsprechenden Zuckerreste gespalten [140]. Da nur die Aglykone, nicht aber die Glykoside als solche estrogen Wirkung besitzen, ist dieser intestinale Metabolismus von entscheidender Bedeutung. Ein weiteres Abbauprodukt ist der reduktive Daidzein-Metabolit Equol.

Coumestrol kommt hauptsächlich in Klee und Alfalfa vor. Der Gehalt beträgt 5,6 bzw. 0,7 mg/g Trockengewicht [141].

Lignane kommen vorwiegend in Ölsaaten, wie Leinsamen vor. Dort werden Gehalte von 0,8 mg Secoisolariciresinol/g Trockengewicht erreicht [142]. Durch die Darmflora werden Lignane hauptsächlich zu Enterolacton und Enterodiol abgebaut [143].

Die durch Resorption erreichbaren Plasmakonzentrationen von Isoflavonen variieren stark in Abhängigkeit von der zugeführten Nahrung. Bei japanischen Männern wurde eine bis zu 110-fach höhere Plasmakonzentration von Isoflavonen gemessen als in einer entsprechend ausgewählten Gruppe finnischer Männer. Sie erreichte in Einzelfällen Konzentrationen von 2,4 μM (600 ng/ml) [144]. Höchste Plasmakonzentrationen von Phytoestrogenen konnten 4 - 8 h nach der Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Im Falle von Daidzein und Genistein wurde der Großteil der aufgenommenen Menge innerhalb der ersten 24 h wieder ausgeschieden [145].

2.4.3 Physiologische Wirkungen

Für Phytoestrogene werden verschiedene physiologische Wirkungen diskutiert.

Zum einen können sie aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften die Funktion der natürlichen Steroidhormone imitieren. Dies kann entweder durch direkte Interaktion mit

dem Hormonrezeptor geschehen, oder durch Interaktion mit hormonmetabolisierenden Schlüsselenzymen (z.B. Aromatase [146], Hydroxysteroid-dehydrogenasen [147,148]), wobei die lokale Hormonkonzentration beeinflusst wird. In beiden Fällen können Phytoestrogene agonistische oder antagonistische Effekte auslösen.

In vitro Experimente hinsichtlich der Bindungsaffinität haben gezeigt, dass Phytoestrogene an den Estrogen Rezeptor binden können. Dies geschieht allerdings mit einer im Vergleich zu 17β -Estradiol um mehrere Zehnerpotenzen geringeren Affinität [149]. Zum $ER\beta$ konnten dabei etwas höhere Bindungsaffinitäten als zum $ER\alpha$ beobachtet werden. So zeigte beispielsweise Genistein für den $ER\beta$ eine 20-fach höhere Affinität als für den $ER\alpha$ [2]. Aufgrund der höheren Bindungsaffinität zum $ER\beta$ wird davon ausgegangen, dass Phytoestrogene ihre estrogene oder antiestrogene Wirkung über diesen ER vermitteln [150]. Da die Gewebeverteilung von $ER\alpha$ und $ER\beta$ unterschiedlich ist (s. Tab. 1), haben Phytoestrogene auf unterschiedliche Gewebe verschieden starke Wirkungen [1,151].

Zum anderen besitzen Phytoestrogene auch eine nicht-hormonelle Aktivität. Es konnte für Phytoestrogene eine antiproliferative Wirkung auf humane Krebszelllinien festgestellt werden. Da diese aber sowohl in ER-positiven als auch in ER-negativen Zelllinien auftraten, liegt die Vermutung nahe, dass diese antikanzerogenen Wirkungen nicht ER-vermittelt sind. So konnte z.B. gezeigt werden, dass Genistein ein Inhibitor von Tyrosinkinase ist [152]. Des Weiteren konnten Wechselwirkungen mit der Topoisomerase II und Enzymen des Phosphatidylinositolmetabolismus nachgewiesen werden [153].

Neben den genannten Wirkungen konnte für Isoflavone eine deutliche antioxidative Wirkung gezeigt werden. So können Isoflavone die oxidative Modifikation von LDL durch Makrophagen verhindern [154], die Resistenz von LDL gegenüber Oxidation erhöhen [155,156] und antioxidative Wirkungen in wässrigem Milieu zeigen [157,158]. Diese Wirkungen werden auf die Fähigkeit von Isoflavonen zurückgeführt, freie Radikale abfangen zu können [159].

2.5 Methoden der Interaktionsanalyse

2.5.1 Allgemeines

Die Interaktion zwischen zwei Molekülen stellt im Bereich der Biochemie, Molekularbiologie und Zellbiologie einen entscheidenden Teil dar. Jede Zelle besitzt tausende verschiedener Proteine, die spezifische Funktionen haben. Diese Funktionen erreichen sie durch Reaktion oder Interaktion mit anderen Molekülen, z.B. mit anderen Proteinen, Lipiden, Kohlenhydraten oder Nukleinsäuren. Um also die Funktionen der Proteine in der Zelle oder im Metabolismus verstehen zu können, ist eine genaue Analyse der Wechselwirkung der Proteine mit entsprechenden Molekülen notwendig [160].

In vitro lassen sich üblicherweise nur Ein-Schritt-Reaktionen zwischen zwei Molekülen nachstellen. In einer Zelle handelt es sich aber normalerweise um ein dynamisches Gleichgewicht, was eine Messung und Analyse dieser Interaktion in Echtzeit erforderlich macht.

Es war bis vor kurzem sehr schwierig, solche Wechselwirkungen auf einer Echtzeit-Basis mit den gängigen biochemischen und biophysikalischen Methoden zu messen. Im Folgenden ist ein kurzer Überblick über die bisher gängigen Methoden für die Untersuchung der Interaktion zweier Moleküle dargestellt.

2.5.2 Überblick über die Methoden der Interaktionsanalyse

Affinitätschromatographie

Dieser Methode liegt die Affinität zweier Moleküle zueinander zugrunde. So kann z.B. ein Zelllysate über eine Säule, an die ein spezifischer Antikörper gebunden ist, gegeben werden. Dadurch binden Proteine, gegen die der Antikörper gerichtet ist, an die Säule und können

anschließend durch ein geeignetes Elutionsmittel wieder von der Säule abgelöst werden. So können entweder spezifische Wechselwirkungen nachgewiesen, oder Proteine aufgereinigt werden.

Zu dieser Methode gehört auch der für die Messung der Bindungsaffinität von Estrogenen für den Estrogen Rezeptor verwendete Kompetitionsassay. Dabei wird der Rezeptor an eine Säule gebunden. Anschließend wird eine definierte Menge an radioaktiv markiertem 17β - ^3H -Estradiol mit einer definierten Menge an Testsubstanz gemischt und über die Säule gegeben. Nach dem Waschen werden die gebundenen Liganden eluiert und die Radioaktivität bestimmt. Je geringer nun die Radioaktivität ist, desto besser war die getestete Substanz in der Lage, mit 17β - ^3H -Estradiol um eine Bindung an den Rezeptor zu konkurrieren. Die Nachteile der Methode sind offensichtlich: Es werden zum einen radioaktive Substanzen verwendet, zum anderen sagt die Bindung eines Liganden an den Rezeptor alleine nichts über die biologische Wirkung aus, da selbst antiestrogen wirksame Substanzen gut an den Rezeptor binden können. Darüberhinaus dauert die Messung bis zu zwei Tage [161, 160].

Immunpräzipitation

Diese Methode wird hauptsächlich zum Nachweis von Interaktionen verwendet. Dabei bindet ein geeigneter Antikörper an ein Protein. Unter bestimmten Umständen kommt es zu einer Vernetzung der Protein/Antikörper-Aggregate untereinander, wodurch eine deutliche Präzipitation des entstehenden Netzwerks auftritt. Ist die Bindung des Antikörpers an das Protein nicht stark genug, kann durch Zugabe eines sogenannten Crosslinkers die Vernetzung der Proteine erreicht werden. Aufgrund der Spezifität kann auch ein Zelllysat verwendet werden [160].

Chromatografische Methoden

Dazu gehören Gelfiltrationschromatographie, Dichtegradientenzentrifugation und die nicht-denaturierende Elektrophorese. Durch die Interaktion zweier Moleküle kann das entstehende Aggregat von den Einzelsubstanzen durch die o.g. Methoden getrennt werden. Bei der Gelfiltration ändert sich der Partitionskoeffizient, bei der Elektrophorese die elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu den Einzelsubstanzen. Diese Methode wird besonders bei schwachen Interaktionen verwendet [160].

Far Western Methoden

Bei diesen Methoden werden Proteine aus Zelllysaten elektrophoretisch voneinander getrennt und auf Membranen geblottet. Die Membranen werden dann mit einer Lösung inkubiert, die den Liganden enthält. Die Bindung des Liganden an ein Protein kann z.B. durch Immunfärbung, also Bindung eines spezifischen, markierten Antikörpers nachgewiesen werden. Diese Methode wird hauptsächlich zur Detektion der Bindung von unbekanntem Proteinen verwendet.

Eine Variante dieser Methode ist der sogenannte Gel-Shift-Assay, der vorwiegend zum Nachweis von Bindungen an die DNA verwendet wird. Hier wird ein markierter Abschnitt der DNA mit einem Protein inkubiert und anschließend elektrophoretisch unter nicht-denaturierenden Bedingungen untersucht. Durch die Bindung eines Proteins sinkt die elektrophoretische Mobilität der DNA im Vergleich zur nicht-inkubierten DNA. Dies lässt darauf schließen, dass das untersuchte Protein spezifisch an die DNA-Sequenz binden kann [160].

Optische Meßmethoden

Wenn die Bindung eines Moleküls an ein anderes Veränderungen des Absorptionsspektrums oder eine Trübung hervorruft, lässt sich die Bindung in Echtzeit verfolgen. Der Nachteil ist, dass die verwendeten Substanzen in sehr reiner Form vorliegen müssen.

Eine Abwandlung dieser Methode ist die Beobachtung der Veränderung funktioneller Eigenschaften durch die Bindung, wie z.B. der enzymatischen Aktivität [160].

Genexpressionsmethoden

Eine weitere Methode, um die Bindung von zwei Proteinen zu untersuchen ist die Genexpressionsmethode. Hierbei wird die cDNA eines Proteins in die DNA-Bindungsdomäne des *GAL4* Gens eingeführt. Die cDNA eines weiteren Proteins wird in die Aktivator-Domäne desselben Gens fusioniert. Beide Konstrukte werden in Hefezellen co-transfiziert. Binden nun die beiden Proteine aneinander, so kommt es zu einer gemeinsamen Stimulation der Expression eines Reportergens, das dem *GAL4* Promotor nachgeschaltet ist. Als Reportergen werden häufig *HIS3* und *lacZ* verwendet. Mit Hilfe dieser Methode können auch sehr schwache Wechselwirkungen nachgewiesen werden, wobei allerdings keine Aussagen über die Kinetik der Interaktion möglich sind [160].

2.6 Biacore Technologie

Bis auf die optischen Messmethoden ist keine der oben beschriebenen Methoden geeignet, um Wechselwirkungen in Echtzeit zu messen. Die Biacore Technologie ist eine neue Methode, die das sogenannte Surface Plasmon Resonance (SPR) Phänomen verwendet, um dies zu erreichen. Sie ermöglicht durch einen großen Teil an automatisierten Vorgängen ein hohes Maß an Reproduzierbarkeit und dadurch eine genaue Bestimmung von Assoziations- und Dissoziationskonstanten. Weitere Vorteile sind, dass nur geringe Mengen an Ligand benötigt werden, die Messungen in einer sehr kurzen Zeit durchgeführt werden können und dass keine Markierung der beteiligten Moleküle notwendig ist. Die Methode kann verwendet werden, um das Verhalten einer Vielzahl von Molekülen, wie z.B. Proteinen, Kohlenhydraten, Lipiden und Nukleotiden zu untersuchen. Dabei müssen diese Moleküle nicht in aufgereinigter Form vorliegen, sondern können auch in Form von Zelllysaten oder Plasmaproben verwendet werden. Auch gefärbte und trübe Lösungen können gemessen werden [160-163].

3 Fragestellung

Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu weiblichen Sexualhormonen (z.B. 17β -Estradiol) deren Wirkungen beeinflussen können. Dies führte zu der Vermutung, dass sie möglicherweise einen protektiven Einfluss auf die Entstehung von Krebs in hormonregulierten Geweben, wie Prostata oder Brust haben. Ein entscheidender Schritt der Hormonwirkung in diesen Geweben ist die Bindung von 17β -Estradiol an den Estrogen Rezeptor, wodurch die hormonelle Signaltransduktion eingeleitet wird. Der Rezeptor bindet nach der Aktivierung im Zellkern an eine spezifische Sequenz der DNA, das Estrogen Response Element (ERE), wodurch es zur Expression verschiedener Zielgene kommt.

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, welchen Einfluss diverse Phytoestrogene auf die Bindung des Estrogen Rezeptors an das ERE haben. Um dies zu klären, wurde eine Messmethode etabliert, die auf der sogenannten biomolekularen Interaktionsanalyse (Biacore-Technologie) zur Messung der Interaktion zweier Moleküle beruht. Es sind anschließend Aussagen über die Effektivität der Aktivierung des Rezeptors durch das jeweilige Phytoestrogen möglich.

Da eine Aktivierung des Rezeptors alleine keine Aussage über die biologische Wirkung der getesteten Verbindungen zulässt (Agonist/Antagonist), wurde darüberhinaus der Effekt von Phytoestrogenen auf der Ebene der Genexpression gemessen. Dazu wurde der pS2-Assay verwendet, bei dem der Einfluss von Phytoestrogenen auf die Expression des estrogen-sensitiven pS2-Gens in Brustkrebszellen (MCF-7 Zellen) gemessen wird.

Um abschließend eine Aussage darüber treffen zu können, ob neben der Induktion der Genexpression durch Phytoestrogene auch ein estrogener Einfluss auf die metabolische Aktivität vorhanden ist, wurden Messungen mit einem Zytosensor durchgeführt.

Durch die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche sollten letztlich die molekularen Mechanismen der estrogenen oder antiestrogenen Wirkung der getesteten Phytoestrogene untersucht werden.

4 Material und Methoden

Eine Auflistung von allen eingesetzten Chemikalien und Lösungen und deren Konzentrationen sowie eine Liste der verwendeten Geräte ist im Anhang zu finden.

4.1 Biacore-System

Mit Hilfe der biomolekularen Interaktionsanalyse (BIA) ist es möglich, die Wechselwirkung zwischen zwei Molekülen in Echtzeit zu messen, ohne dass dabei eine Markierung der beteiligten Moleküle notwendig ist. Eines der Moleküle wird auf der Oberfläche eines Sensor Chips immobilisiert, während das andere mit einem konstanten Fluss über die Oberfläche geleitet wird. Gemessen wird dabei die Änderung der Massenkonzentration an der Chipoberfläche. Aus der Messung ist es anschließend möglich, eine kinetische Analyse durchzuführen, die Konzentration des injizierten Moleküls zu bestimmen oder qualitative Aussagen über die Bindung zu treffen. Für die Messung verwendet das Biacore-System das Surface Plasmon Resonance Phänomen.

4.1.1 Surface Plasmon Resonance (SPR)

Für das Auftreten der SPR ist die Totalreflexion (TIR) eines Lichtstrahls an der Grenzfläche zwischen zwei nicht-absorbierenden Medien Voraussetzung. Trifft ein Lichtstrahl aus einem Medium mit einem höheren Brechungsindex auf die Grenzfläche zu einem Medium mit einem geringeren Brechungsindex, so wird dieser von der Normalen weg in Richtung der Grenzfläche gebrochen. Ab einem kritischen Winkel ϑ , bei dem der Brechungswinkel gleich 90° ist, kommt es an der Grenzfläche zu einer Reflexion des Lichtstrahls zurück in das Medium mit dem höheren Brechungsindex. Dies Vorgang wird TIR genannt (Abb. 7).

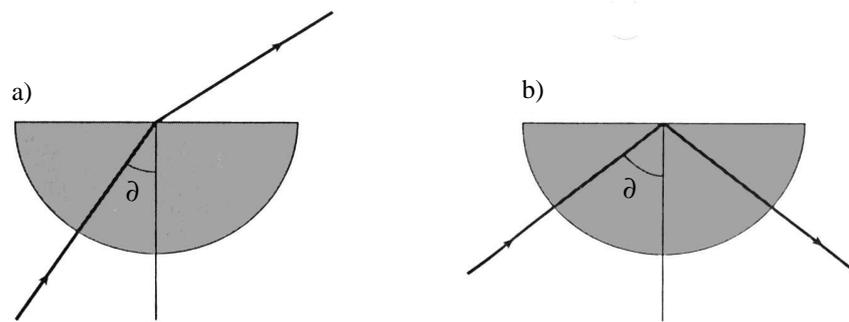


Abb. 7: Lichtbrechung (a), Totale interne Reflexion (b).

Obwohl der reflektierte Lichtstrahl dabei keine Energie verliert, ruft er eine elektrische Feldintensität, die sogenannte ‚Evanescent Wave‘, im Medium mit dem geringeren Brechungsindex hervor. Deren Wellenlänge ist dieselbe, wie die des einfallenden Lichts. Die Amplitude der Welle nimmt exponentiell mit der Entfernung von der Grenzschicht ab, wobei sie bei einer Entfernung ausgeklungen ist, die der Wellenlänge des eingestrahlenen Lichts entspricht. Diese ausklingende Welle entsteht immer, wenn es zur Totalreflexion kommt.

Wenn diese Welle nun mit einer Schicht aus leitendem Material, wie z.B. einem Metallfilm, interagieren kann, so durchdringt die p-polarisierte Komponente des eingefallenen Lichts den Metallfilm und ruft in diesem die Bildung von elektromagnetischen Wellen hervor, die sich entlang der Oberfläche des Metallfilms fortpflanzen (Abb. 8). Diese Wellen werden ‚Surface Plasmons‘ genannt. Bei nicht-magnetischen Metallen, wie z.B. Gold, sind diese ‚Surface Plasmons‘ ebenfalls p-polarisiert [160,164].

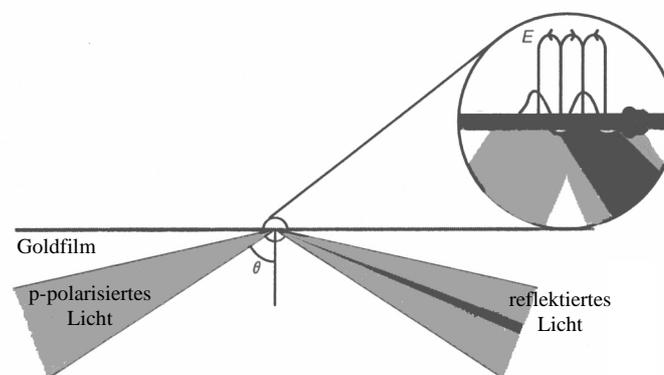


Abb. 8: Entstehung der Surface Plasmons im Metallfilm. (nach [160])

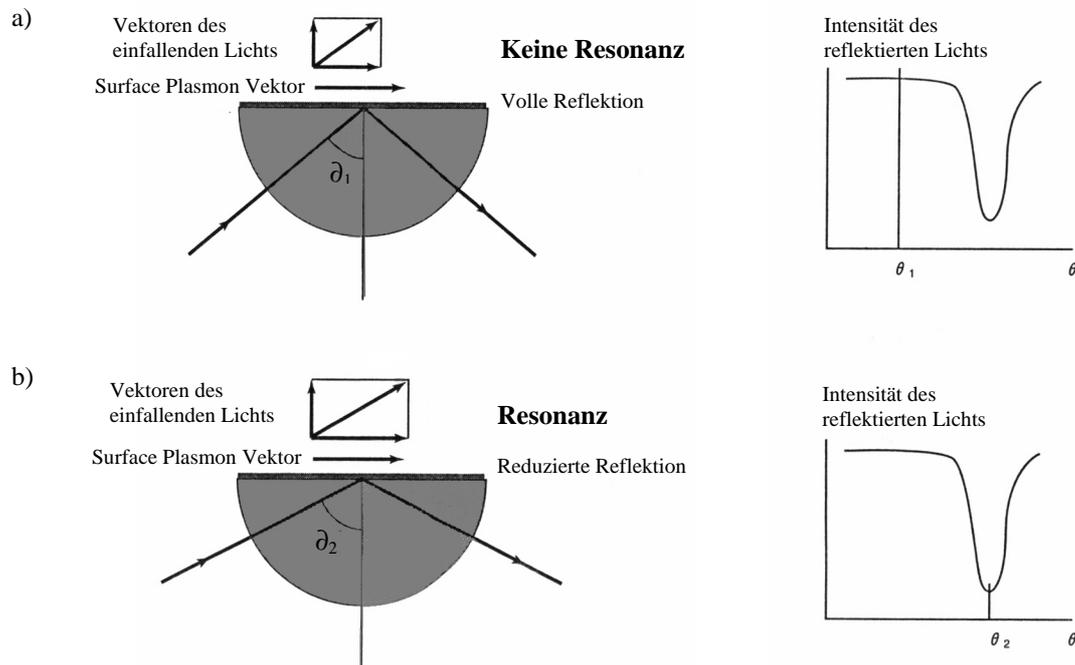


Abb. 9: Entstehung der ‚Surface Plasmon Resonance‘. a) keine Resonanz, da die Vektoren nicht übereinstimmen. b) Resonanz, da die Vektoren übereinstimmen. (nach [160])

Das Moment der einfallenden Photonen kann als ein Vektor beschrieben werden, der mathematisch in zwei Komponenten aufgeteilt werden kann: eine Komponente, die parallel zur Oberfläche verläuft und eine Komponente, die senkrecht zur Oberfläche steht. Deren Größe hängt vom Winkel ϑ ab, in dem der Lichtstrahl auf die Grenzschicht trifft. Das Moment der ‚Surface Plasmons‘ hängt u.a. von der Art und Dicke der Metallschicht ab und kann als Vektor beschrieben werden, der parallel zur Oberfläche verläuft. Zu einer Entstehung dieser ‚Surface Plasmons‘ kommt es nur dann, wenn die parallele Vektorkomponente des einfallenden Lichtstrahls dem Vektor des ‚Surface Plasmons‘ entspricht. Die Bildung äußert sich in einer verminderten Intensität des reflektierten Lichts und wird ‚Surface Plasmon Resonance‘ genannt (Abb. 9) [160,164].

Es gibt zwei Arten, die parallele Vektorkomponente des Lichts dem Vektor des ‚Surface Plasmons‘ anzupassen. Die eine besteht darin, die Wellenlänge des einfallenden Lichts zu modulieren, wodurch sich dessen Energie und damit dessen Moment ändert. Die zweite Art

ist, den Winkel ϑ des Lichtstrahls zu verändern, wodurch sich zwangsläufig die Vektoren des Lichtstrahls ändern.

Obwohl sich die gebildeten ‚Surface Plasmons‘ auf die Metallschicht beschränken, ist deren Energie und damit deren Wellenvektor teilweise von der sich in das Medium mit dem geringeren Brechungsindex ausbreitenden ‚Evanescent Wave‘ abhängig. Der Brechungsindex des Mediums bestimmt die Geschwindigkeit, mit der sich die Wellen in das Medium ausbreiten können. Dadurch hat der Brechungsindex des Mediums einen direkten Einfluss auf die Energie der ‚Surface Plasmons‘ und damit auch auf den Winkel ϑ , bei dem es zur SPR kommt. Da sich die ‚Evanescent Wave‘ nur eine sehr kleine Strecke in das Medium ausbreitet, spielen nur Änderungen des Brechungsindex direkt an der Oberfläche des Metallfilms eine Rolle [160,164].

Das Biacore-System macht sich die SPR zunutze, indem es den Winkel bestimmt, bei dem es zu einer Verminderung der Intensität des reflektierten Lichtstrahls kommt. Dabei entspricht eine Änderung des Brechungsindex um 10^{-3} einer Änderung des Winkels ϑ um $0,1^\circ$. Mit Hilfe des Biacore-Systems ist man in der Lage, Änderungen bis zu 10^{-4} zu messen, was einer Änderung des Brechungsindex um 10^{-6} entspricht [160,164].

4.1.2 Aufbau des Gerätes

Der Aufbau des optischen Systems ist in Abbildung 10 dargestellt. Um den Winkel ϑ , bei dem es zu einer Reduktion der Intensität des reflektierten Lichts kommt, zu erfassen, könnte das System einen Winkelbereich abfahren, bis die Reduktion festgestellt wird. Da aber dafür eine koordinierte, schnelle und präzise Mechanik nötig wäre, verwendet das Biacore-System eine andere Technik. Der Lichtstrahl trifft dabei keilförmig auf die Grenzschicht und wird ebenso keilförmig wieder reflektiert. Die Intensität des reflektierten Lichts wird durch einen Detektor-Array gemessen, wodurch schnelle und zuverlässige Messungen in Echtzeit möglich sind. Die in Abbildung 10 dargestellte Grenzfläche befindet sich auf einem austauschbaren Sensor Chip, der auf einem Glasträger eine dünne Goldfolie aufgezogen hat. Der Sensor Chip trennt dabei das optische System vom Flusssystem.

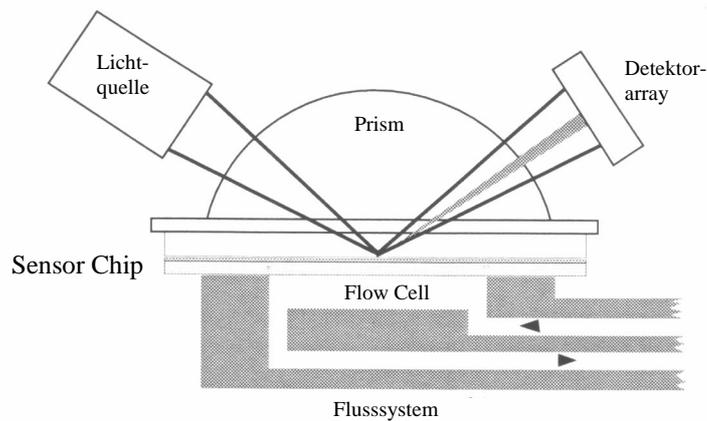


Abb. 10: Aufbau des optischen Systems. (nach [164])

Auf jedem Sensor Chip entstehen zwei Flow Cells (Fc1 und Fc2), in denen die Messungen stattfinden. Der Sensor Chip selbst bildet eine Wand einer Fc. Der Fluß über den Chip kann im Multichannel-Mode seriell durch Fc1 und Fc2 erfolgen oder parallel durch beide gleichzeitig, während im Singlechannel-Mode jede Flow Cell separat angesteuert werden kann (Abb. 11) [160,164].

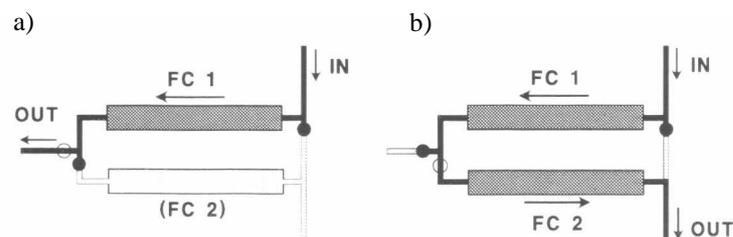


Abb. 11: Möglichkeiten der Ansteuerung der beiden Flow Cells. a) Singlechannel-Mode, nur Fc1; b) Multichannel-Mode, seriell. (nach [164])

4.1.3 Übersicht über verfügbare Sensor Chips

Für die Messung wird eines der beteiligten Moleküle auf der Oberfläche des Sensor Chips immobilisiert. Dabei existiert eine Vielzahl von Möglichkeiten, dies zu erreichen.

Die einfachste Methode ist die Verwendung eines sogenannten CM5 Sensor Chips. Dieser hat auf seiner Oberfläche freie Carboxyl-Gruppen, an die chemisch Verbindungen gebunden werden können (z.B. über Peptid-Bindungen). Daneben existieren mittlerweile eine Menge weiterer Sensor Chips, die je nach Verwendungszweck eingesetzt werden können.

Eine bereits modifizierte Variante des CM5 Sensor Chips ist der Sensor Chip SA. Dieser hat an die Carboxylgruppen das Protein Streptavidin gebunden. Biotinylierte Liganden können sehr spezifisch und sehr stabil an diese Oberfläche binden.

Der Sensor Chip NTA besitzt an seiner Oberfläche den Chelatbildner Nitrilotriessigsäure (NTA). Über Komplexierung von Ni^{2+} können Proteine gebunden werden, die freie Histidylgruppen enthalten. Durch Injektion von EDTA können diese wieder abgelöst werden.

Der Sensor Chip HPA hat eine lipophile Oberfläche und wird v.a. dafür verwendet, membranassoziierte Proteine und Membrankomponenten wie Glykolipide oder Liposomen zu binden. Es bildet sich dann ein Lipid-Monolayer auf der Oberfläche, wodurch Biomembranen simuliert werden können [160,164].

4.1.4 Sensorgramm

Wird nun ein Analyt in das System injiziert, so erreicht er nach einer exakten Temperierung mit einem konstanten Fluss die Oberfläche des Sensor Chips.

Während der Assoziationsphase kommt es zu einer Bindung des Analyten an die Oberfläche, wodurch dessen Konzentration in der Grenzschicht steigt. Dies äußert sich in einer kontinuierlichen Änderung des Resonanzwinkels. Die Änderung wird in Resonance Units

(RU) gemessen und in einem Sensorgramm als Funktion der Zeit dargestellt (Abb. 12). Nachdem der injizierte Ligand die Oberfläche des Chips passiert hat, wird der gebundene Anteil durch den konstanten Pufferfluss weggespült, und man kann so die Dissoziationsphase der Interaktion verfolgen. Die Dissoziation kann durch Injektion von geeigneten Regenerationslösungen beschleunigt und der Chip anschließend wieder verwendet werden [160,164].

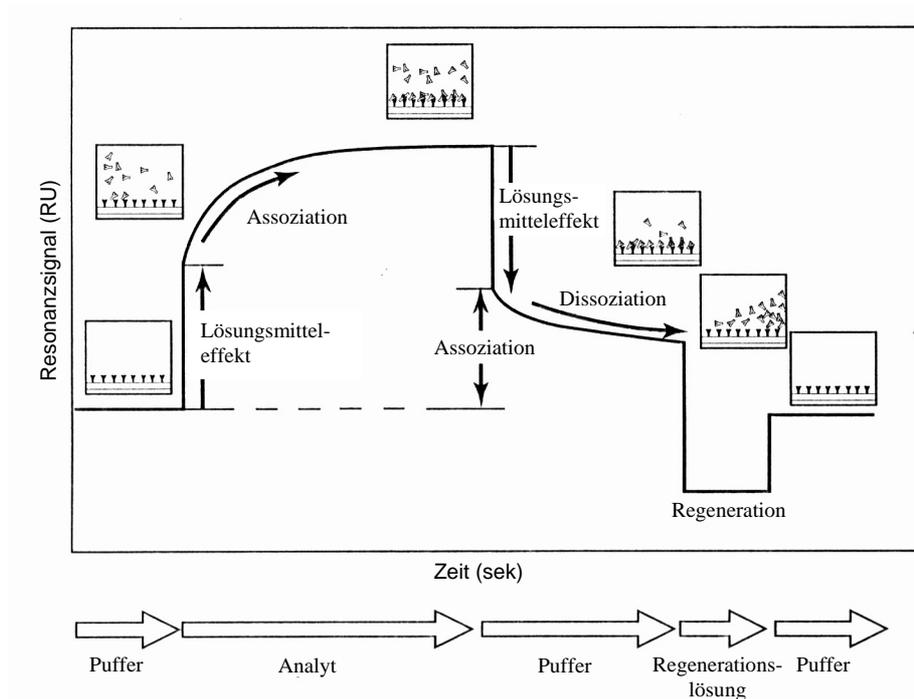


Abb. 12: Darstellung der Messung in Form eines Sensorgramms. (nach [160])

4.1.5 Herstellung des Sensor Chips SA

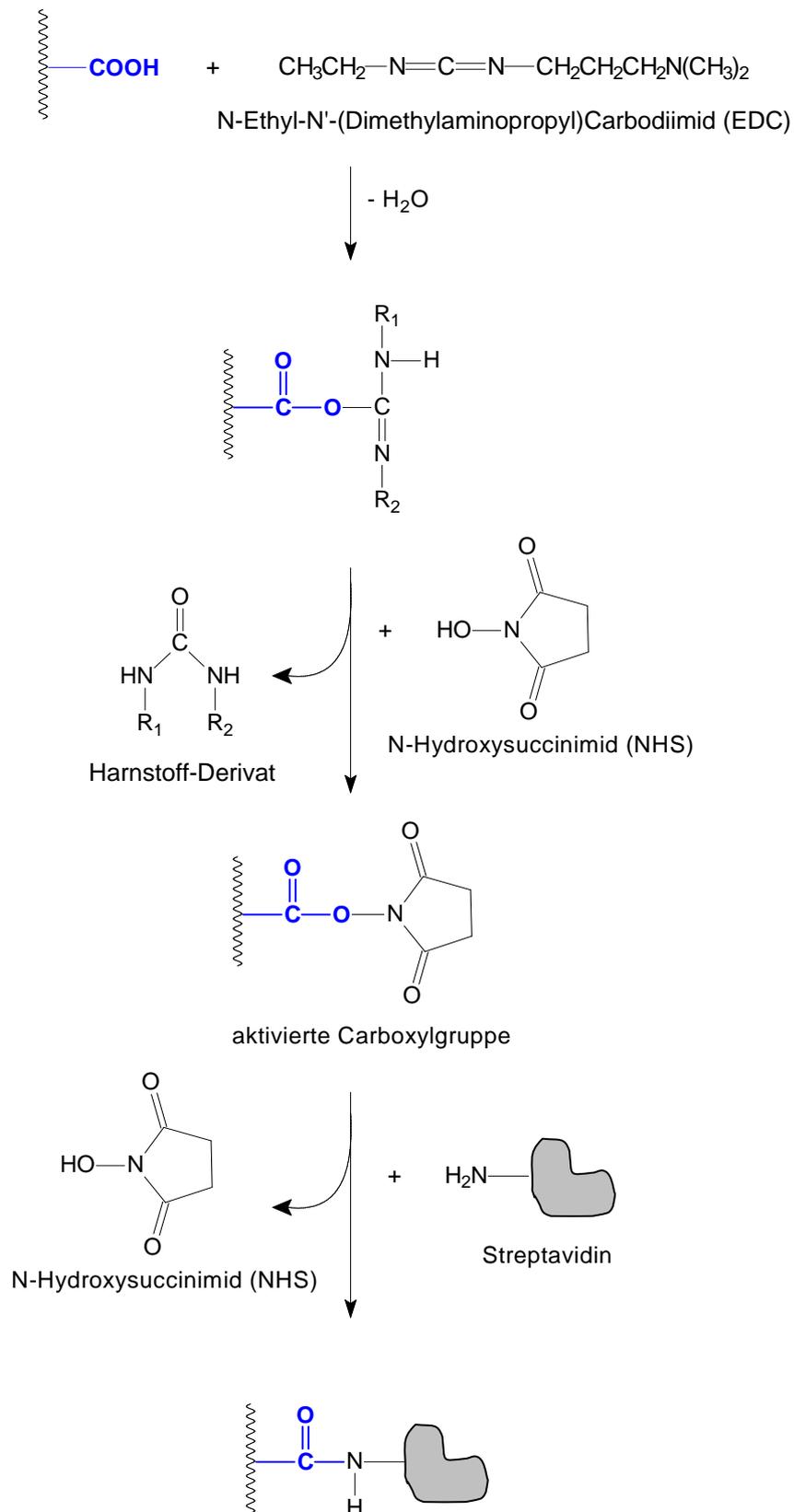


Abb. 13: Herstellung einer Streptavidin-Oberfläche auf einem CM5 Sensor Chip. (nach [164])

Für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche wurde ein selbst hergestellter Sensor Chip SA verwendet. Als Grundlage diente ein CM5 Sensor Chip, an welchen über Peptidbindungen Streptavidin gekoppelt wurde. Streptavidin bildet mit Biotin sehr starke und spezifische Komplexe.

In Abbildung 13 ist die Herstellung einer Streptavidin-Oberfläche dargestellt. Durch ein Gemisch aus N-Ethyl-N'-(Dimethylaminopropyl)Carbodiimid (EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) werden die Carboxylgruppen der Sensor Chip Oberfläche aktiviert. EDC bindet unter Wasserabspaltung an die Carboxylgruppe und wird anschließend durch NHS unter Abspaltung eines stabilen Harnstoffderivats ersetzt.

Dadurch kann im Anschluß Streptavidin an die aktivierten Carboxylgruppen binden. Überschüssige aktivierte Carboxylgruppen werden durch Zugabe von Ethanolamin deaktiviert. Es entsteht hierdurch eine stabile Streptavidinoberfläche.

Im letzten Schritt wird ein an Biotin gekoppeltes Stück der DNA, welches das Estrogen Response Element (ERE) enthält, an die Chipoberfläche gekoppelt (Abb. 14).

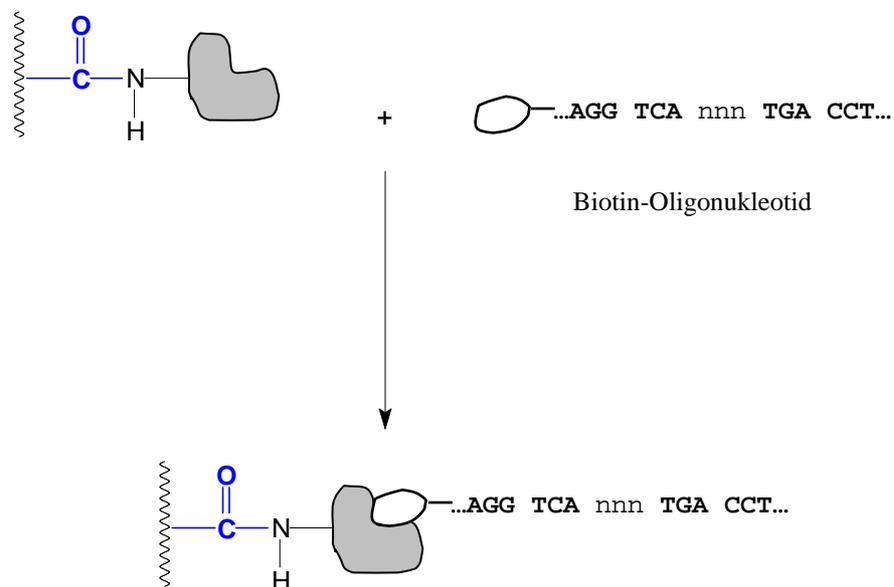


Abb. 14: Bindung eines biotinylierten Oligonukleotids an die Streptavidin-Oberfläche. n steht für beliebige Basen.

Das ERE ist eine spezifische Sequenz der DNA, an die der Estrogen Rezeptor nach seiner Aktivierung bindet. In der zweiten Flow Cell wird ebenfalls ein biotinyliertes Stück DNA gebunden, allerdings enthält dieses nicht das ERE, sondern eine unspezifische Sequenz, wodurch man in der Lage ist, unspezifische Wechselwirkungen auszuschließen [160,164].

Durchführung:

Als Fließpuffer wird HBS-EP bei einem Fluss von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ verwendet. Der Chip wird eingesetzt und das Sensorgramm im Single-Channel-Modus für Flow Cell 1 gestartet. Dann werden je 40 μl EDC und NHS in einem 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und 35 μl dieser Mischung injiziert. Während der Injektion werden 10 μl Streptavidinlösung (2 mg/ml) mit 56 μl Acetatpuffer (pH 5,0) auf eine Konzentration von 0,3 mg/ml verdünnt und direkt anschließend davon 35 μl injiziert. Nach der Injektion wird die Oberfläche durch eine weitere Injektion von 35 μl Ethanolamin deaktiviert. Das Sensorgramm wird gestoppt und erneut mit Flow Cell 2 gestartet. Für diese Meßzelle wird dieselbe Prozedur wiederholt. Man erhält so einen Chip mit zwei Flow Cells, die jeweils Streptavidin an der Oberfläche tragen und für die weitere Immobilisierung der biotinylierten Oligonukleotide vorbereitet sind. In Abbildung 15 ist ein Sensorgramm der Chipherstellung dargestellt.

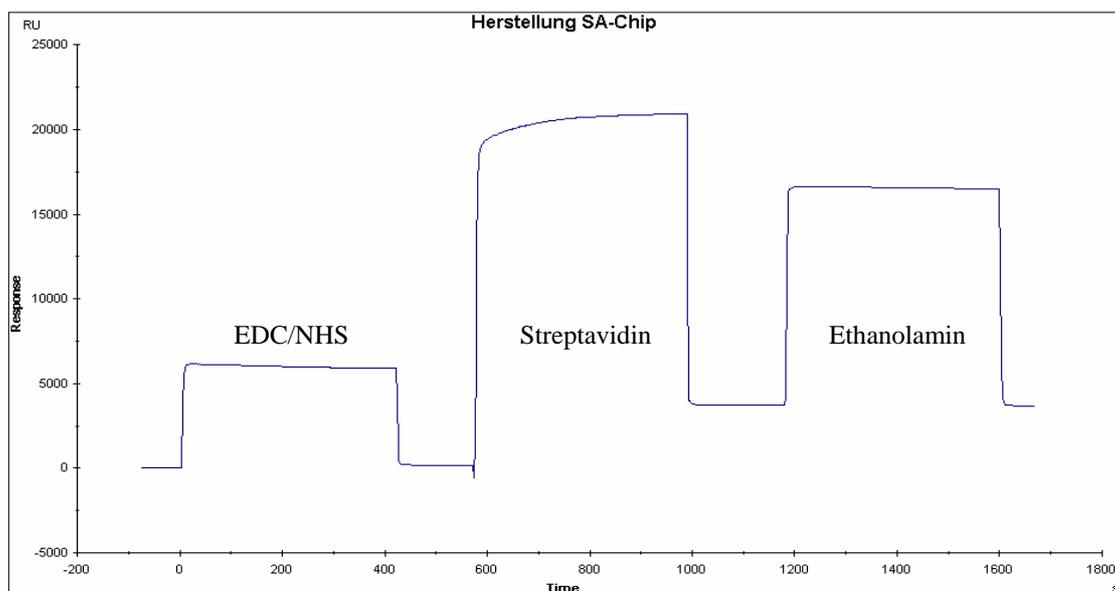


Abb. 15: Herstellung eines Sensor Chips mit Streptavidin-Oberfläche.

Das Sensorgramm wird gestoppt und der Fließpuffer durch einen TrisHCl-Puffer (pH 7,5) ausgetauscht. Bei einem Fluß von 5 $\mu\text{l}/\text{min}$ wird das Sensorgramm erneut im Single-Channel-Modus für Flow Cell 1 gestartet. Die Oligonukleotidlösungen (Lösung 1: ERE+; Lösung 2: ERE-; Sequenzen im Anhang) werden mit dem TrisHCl-Puffer auf eine Konzentration von 1 μM verdünnt. Dann werden 20 μl Oligonukleotidlösung 1 injiziert. Im Anschluss wird das Sensorgramm gestoppt und für die zweite Flow Cell erneut gestartet. Hier werden nun 20 μl Oligonukleotidlösung 2 injiziert.

Bevor der Chip für die weiteren Messungen verwendet werden kann, wird er durch Injektion von Regenerationslösung konditioniert. Dafür wird das Sensorgramm im Multi-Channel-Modus (seriell) bei einem Fluss von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ gestartet und 10 μl der Regenerationslösung injiziert. Dadurch ist der Chip für die weiteren Messungen bereit.

4.1.6 Interaktionsmessungen

Wird der Estrogen Rezeptor mit verschiedenen Verbindungen inkubiert und anschließend in das System injiziert, so bindet er an die Oberfläche der Flow Cell mit der spezifischen Sequenz (ERE+), während es in der Referenzzelle (ERE-) zu keiner Bindung kommt. In jedem Versuchsdurchlauf wird der mit 1 μM 17 β -Estradiol inkubierte Rezeptor als Referenzmessung injiziert. Zusätzlich wird zu Beginn und zum Ende der Messung der Rezeptor alleine gemessen. Dadurch besteht die Möglichkeit, einen eventuellen Drift des Signals des Rezeptors berücksichtigen zu können.

Gemessen wird das Response Signal nach 300 Sekunden, also nach einer Injektion von 50 μl Inkubationslösung bei einem Fluss von 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. Das Signal von 17 β -Estradiol ($\text{RU}_{\text{E}_2}(t)$) wird durch das interpolierte Response Signal des Rezeptors alleine zum Zeitpunkt t ($\text{RU}_{\text{ER}}(t)$) dividiert und als 100% definiert.

Die Wirkung der getesteten Substanzen wird nach folgender Formel bestimmt:

$$\frac{\left(\frac{RU_X(t_1)}{RU_{ER}(t_1)}\right)^{-1}}{\left(\frac{RU_{E2}(t_2)}{RU_{ER}(t_2)}\right)^{-1}} \times 100$$

RU_X – Response Signal nach
Inkubation des Rezeptors mit
der getesteten Substanz

RU_{E2} – Response Signal nach
Inkubation des Rezeptors mit
1 μ M 17 β -Estradiol

RU_{ER} – Response Signal des
Rezeptors alleine

Durchführung:

Der Rezeptor wird direkt nach Erhalt der Lieferung so aliquotiert, dass nach Auftauen eines Aliquots etwa 4-5 Messungen durchgeführt werden können.

Vor der Messung wird ein Aliquot aufgetaut, mit Fließpuffer auf eine Konzentration von 100 nM eingestellt und sofort auf Eis gelagert. Die getesteten Verbindungen werden in DMSO gelöst und so verdünnt, dass vor der Inkubation das Doppelte der gewünschten Konzentrationen an DMSO und an der Verbindung vorliegt. Die Inkubationsdauer beträgt 15 Minuten auf Eis (0°C), die Inkubation erfolgt bei 0,1% DMSO und 50 nM an Estrogen Rezeptor. Das entspricht einer 1:1 Mischung von Rezeptor und Substanz-Lösung. Injiziert werden 50 μ l dieser Inkubationslösung. Die verschiedenen Ansätze werden gestaffelt angesetzt, so dass die Messungen so schnell wie möglich erfolgen. Da der Rezeptor in seiner reinen Form sehr stark zum Aggregieren tendiert, ist dies unbedingt erforderlich, um zuverlässige Messwerte zu erhalten.

4.2 pS2-Expressionsassay

MCF-7 Zellen sind Brustkrebszellen, die den Estrogen Rezeptor exprimieren und in ihrem Wachstum von Estrogenen abhängig sind. Die Expression einer Vielzahl von mRNAs, Proteinen und Wachstumsfaktoren ist unter estrogener Kontrolle, daher eignen sich die Zellen sehr gut als *in vitro* Testsystem für estrogene Wirkungen.

Die estrogen-sensitive Expression des pS2-Gens in MCF-7 Zellen ist als Testsystem bereits weit verbreitet. Das Genprodukt ist u.a. an der Regulation der Proliferation beteiligt. Mit Hilfe der RT-PCR können Unterschiede im Expressionslevel nach Inkubation mit den Testverbindungen, damit also deren estrogene Wirksamkeit bestimmt werden.

4.2.1 Probenvorbereitung

4.2.1.1 Zellkultur

Medien, Puffer, Lösungen und alle verwendeten Verbrauchsmaterialien für die Zellkultur wurden vor Gebrauch autoklaviert.

MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen werden in einem Einfriermedium aus 20% FKS (Fötales Kälberserum), 70% RPMI 1640-Medium und 10% DMSO bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wachsen als Monolayer in RPMI 1640 mit 10% FKS und einem Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin, 1% nicht-essenzieller Aminosäurenlösung, 1 mM Natrium-

pyruvat und 150 mg/500 ml L-Glutamin. Bei ca. 80% Konfluenz werden die Zellen abtrypsiniert, in neue Flaschen ausgesät und mit neuem Medium versetzt. Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von etwa 30 Stunden.

Caco-2 Zellen

Caco-2 Zellen werden in einem Einfriermedium aus 20% FKS, 70% MEM-Medium und 10% DMSO bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Zellen wachsen morphologisch recht heterogen als Monolayer in MEM mit 10% FKS und einem Zusatz von 1% Penicillin/Streptomycin und 1% nicht-essenzieller Aminosäurelösung. Bei ca. 80% Konfluenz werden die Zellen abtrypsiniert, in neue Flaschen ausgesät und mit neuem Medium versetzt. Die Zellen besitzen eine Verdopplungszeit von etwa 80 Stunden.

4.2.1.2 Inkubation der MCF-7 Zellen

Die Inkubation ist im Folgenden für MCF-7 Zellen beschrieben. Mit den Caco-2 Zellen wird analog mit MEM-Medium vorgegangen.

Etwa 5×10^5 Zellen werden in 6-Loch-Kulturplatten ausgesät und bis zu einer ca. 80%igen Konfluenz wachsen gelassen. Danach wird auf ein Medium umgestellt, welches phenolrotfreies RPMI und 5% Aktivkohle-behandeltes (hormonfreies) FKS enthält. Dieses Medium wird 4 Tage lang alle 24 Stunden gewechselt. Dadurch wird die Grundexpression an estrogen-sensitiven Genen reduziert. Nach 4 Tagen erreichen die Zellen eine Konfluenz von etwa 90%. Nun wird zu diesem Medium die zu testende Verbindung hinzugegeben, wobei im Medium eine Endkonzentration an Ethanol von 0,1% eingestellt wird. Diese Inkubation wird 72 Stunden fortgeführt und das Medium erneut alle 24 Stunden gewechselt.

4.2.1.3 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA erfolgt nach der Phenol/Chloroform-Methode.

Das Medium wird abgesaugt und die Zellen mit je 2 ml PBS gewaschen. Durch Zugabe von 1 ml Trypsin für etwa 30 Sekunden werden die Zellen vom Boden gelöst. Das Trypsin wird abgesaugt und die Zellen mit je 1 ml PBS in ein Eppendorf-Cap überführt. Die Caps werden für 3 min bei 1.000 g abzentrifugiert und das PBS abgesaugt. Zum Zellpellet werden nun 500 µl Denaturierunslösung hinzugegeben und die Lösung mit Hilfe einer Pipette gut gemischt. Mit einer 2 ml Spritze mit sehr dünner Kanüle wird nun die Lösung 2-3 mal auf- und abgezogen, um durch die Scherkräfte die Zellwände zu zerstören. Die Lösung wird in ein 2 ml Eppendorf-Cap überführt und auf Eis gelagert.

Nach Zugabe von 500 µl Phenol wird die Zellsuspension für 30 Sekunden auf dem Vortex geschüttelt. Mit 50 µl einer 2 M Na-Acetat-Lösung wird ein pH-Wert von ca. 4 eingestellt, erneut kurz geschüttelt und schließlich 100 µl einer Chloroform/Isoamylalkohol-Lösung hinzugegeben. Nach 30 Sekunden Schütteln auf dem Vortex wird die Mischung für 15 Minuten auf Eis bei 0°C gelagert.

Anschließend wird 20 Minuten bei 4°C und 11.000 g zentrifugiert, wodurch es zur Ausbildung von drei Phasen, einer wäßrigen, einer organischen und einer Interphase kommt. Die obere, wäßrige Phase wird vorsichtig abpipetiert und in ein 1,5 ml Eppendorf-Cap überführt. Dann werden 500 µl Isopropanol zugegeben, kurz geschüttelt und das Gefäß 1 Stunde bei -20°C im Eisfach gelagert, damit die RNA präzipitieren kann. Es wird erneut 20 Minuten bei 4°C und 11.000 g zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Eppendorf-Cap kopfüber auf einem Papiertuch abtropfen gelassen. Das Pellet wird in 350 µl Denaturierungslösung aufgelöst, kurz gemischt und nach Zugabe von 350 µl Isopropanol das Gefäß für 1 Stunde bei -20°C gelagert. Um die ausgefallene RNA abzutrennen wird erneut für 20 Minuten bei 4°C und 13.000 g zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Zur Reinigung wird das Pellet zwei Mal in 700 µl 70%igem Ethanol resuspendiert, 15 Minuten bei Raumtemperatur gelagert, 5 Minuten bei Raumtemperatur und 11.000 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abdekantiert.

Abschließend wird das Pellet für 5 Minuten in der Vakuumzentrifuge getrocknet und in 50 µl DEPC-H₂O aufgenommen. Die Lagerung erfolgt bei -80°C.

4.2.1.4 RNA Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der Integrität der isolierten RNA wird eine denaturierende RNA Gelelektrophorese in einem 1,2%igen, formaldehydhaltigen Agarosegel durchgeführt.

Der Probenansatz erfolgt folgendermaßen (Konzentrationsangaben und Zusammensetzungen der Lösungen im Anhang):

3,5 µl	H ₂ O
2,0 µl	MOPS (10x)
3,5 µl	Formaldehyd
10,0 µl	Formamid
1,0 µl	Ethidiumbromid
1,0 µl	RNA-Lösung
2,0 µl	Blue Juice

23,0 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz ohne Blue Juice wird für 15 Minuten auf 65°C erhitzt, dann bei 0°C auf Eis gelagert und das Blue Juice kurz vor der Auftragung auf das Gel zugegeben. Die Elektrophorese erfolgt 2 Stunden bei 60 V. Zur Detektion wird das Gel bei 520 nm abfotografiert.

4.2.1.5 Photometrische Konzentrationsbestimmung

Bevor die RNA-Lösung bei der PCR eingesetzt werden kann, muss die Konzentration der RNA in der isolierten Probe bestimmt werden. 2 µl RNA-Lösung werden hierfür mit 998 µl DEPC-H₂O verdünnt und die Extinktion bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Mit Hilfe folgender Gleichung wird dann die Konzentration berechnet:

$$1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 40 \text{ µg RNA}$$

Das Verhältnis $\text{OD}_{260\text{nm}}/\text{OD}_{280\text{nm}}$ wird als Maß für die Reinheit des Isolats verwendet. Es sollte > 1,8 sein.

4.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

4.2.2.1 Prinzip

Die PCR wurde 1985 von Mullis entwickelt und dient zur *in vitro* Amplifizierung von genomischer DNA. Sie besteht im Wesentlichen aus einer zyklischen Wiederholung folgender Schritte:

95°C	Denaturierung
53-63°C	Annealing
72°C	Elongation

Die eingesetzten Primer sollten ein G/C-Verhältnis von 50-60% und eine Länge von 18-30 Basen haben. Während die Primer lang genug sein müssen, damit sie an eine spezifische Sequenz der DNA binden, ist die Maximallänge (30 Basen) durch die Zeit vorgegeben, die die Primer zum Annealen benötigen. Die Annealingtemperatur sollte i.d.R. 1-2°C unterhalb

der Schmelztemperatur der Primer liegen. Bei der Primerwahl ist darauf zu achten, dass sie über ein oder mehrere Introns hinweg an Exons binden, um die versehentliche Amplifikation genomischer DNA zu verhindern. Desweiteren sollten komplementäre Strukturen vermieden werden, damit es nicht zur Bildung von Primerdimeren kommt.

Während der Denaturierungsphase wird der DNA-Doppelstrang aufgetrennt. In der zweiten Phase, der Annealingphase, lagern sich Primer an eine komplementäre Struktur eines Stranges an, während bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, die Stränge mit Nukleotiden aufgefüllt werden. Es kommt also in jedem Zyklus zu einer Verdopplung der eingesetzten DNA-Moleküle. Diese exponentielle Zunahme lässt sich mit folgender Gleichung beschreiben:

$$N = N_0 \times (1 + E)^n$$

- N_0 – Anfangsmenge der DNA
- N – Menge an Amplifikat nach n Zyklen
- n – Anzahl der Zyklen
- E – Effizienz der PCR

Die Effizienz hat ein theoretischen Maximum von 1, während in der Praxis Effizienzen zwischen 0,78 und 0,97 auftreten.

4.2.2.2 cDNA-Synthese und PCR

cDNA-Herstellung (reverse Transkription) und anschließende PCR werden in einem Schritt durchgeführt. Es wird ein Kit (Ready-To-Go RT-PCR Beads) verwendet, welches die wichtigsten Bestandteile der Reaktionen bereits enthält, so dass im Wesentlichen nur noch die Probe und die Primer hinzugegeben werden müssen. Alle Arbeiten werden bei 4°C im Block des PCR-Gerätes durchgeführt. Folgender Ansatz wird in einem Tube mit einem Ready-To-Go RT-PCR Pellet für die reverse Transkription gewählt:

1 μ l	Oligo(dT) ₁₂₋₁₈
1 μ l	RNA (0,2 μ g)
44 μ l	DEPC-H ₂ O

46 μ l	Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wird für 30 Minuten auf 42°C erwärmt und anschließend wieder auf 4°C heruntergekühlt.

Währenddessen werden die Primer für die Reaktion vorbereitet. Es wurden folgende Primer verwendet:

pS2 (Primer 1)

5'-TGA CTC GGG GTC GCC TTT GGA G-3'

pS2 (Primer 2)

5'-GTG AGC CGA GGC ACA GCT GCA G-3'

Amplifikat hat 418 bp

HPRT (Primer 1)

5'-TGT AAT GAC CAG TCA ACA GGG-3'

HPRT (Primer 2)

5'-TGG CTT ATA TCC AAC ACT TCG-3'

Amplifikat hat 213 bp

Da das Zielgen (pS2) und das Referenzgen (HPRT) simultan in einem Tube bestimmt werden, werden alle 4 nötigen Primer in einem Mastermix vorbereitet. Dazu werden die 4 Primerlösungen (20 μ M) zu gleichen Teilen gemischt, wobei eine Mischung erhalten wird, die 5 μ M an jedem Primer enthält.

Der Ansatz für die reverse Transkription wird auf zwei Tubes zu je 23 μl aufgeteilt und je 2 μl der Primermischung zugegeben, wodurch eine Endkonzentration an Primern von 400 nM erreicht wird. Die Ansätze werden gut gemischt und kurz abzentrifugiert.

Am PCR-Gerät wird folgendes Programm verwendet:

5 min.	95°C	} 25 Zyklen
30 sek.	95°C	
50 sek.	60°C	
60 sek.	72°C	
5 min.	72°C	
bis Ende	4°C	

Nach der PCR werden die Proben aus dem Gerät entnommen und bis zur gelelektrophoretischen Auftrennung bei -20°C gelagert.

4.2.2.3 DNA Gelelektrophorese

Die PCR-Amplifikate werden anschließend in einer Gelelektrophorese getrennt. Hierfür wird ein 1,4%iges Agarosegel hergestellt. Der Probenansatz sieht folgendermaßen aus:

25 μl	PCR-Amplifikat
2 μl	Blue Juice

27 μl	Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wird in Taschen des Gels gefüllt und die Elektrophorese anschließend ca. 1 Stunde bei 100 V. Das Gel wird 45 Minuten in einer Ethidiumbromid-Lösung (0,01%) gefärbt und anschließend 45 Minuten in Wasser entfärbt.

Zur Detektion wird das Gel bei 520 nm abfotografiert und die Bandenintensität mit Hilfe einer Software (Quantity One, Biorad) ausgewertet.

4.3 Zytosensor-Messungen

Mit Hilfe des Zytosensors lässt sich der extrazelluläre pH-Wert messen. Dadurch sind Rückschlüsse auf Wirkungen möglich, die die Energieproduktion von Zellen, also den Metabolismus steigern. Im Laufe der Glykolyse entstehen u.a. freie Protonen, die von der Zelle ausgeschieden werden. Dies führt zu einer leichten Ansäuerung des die Zellen umgebenden Mediums. Diese Ansäuerung lässt sich mit dem Zytosensor quantitativ erfassen.

4.3.1 Vorbereitung der Zellen

Die Kultivierung der Zellen erfolgt wie in Abschnitt 4.2.1 beschrieben. Für die Zytosensormessungen werden 6×10^5 Zellen auf speziellen Filtern (Capsule Cups) ausgesät. Nach 24 Stunden wird das Medium gewechselt und nach 24 weiteren Stunden ist die für die Messung geeignete Zelldichte erreicht.

Vor der Messung wird das Medium aus den Cups mit den Zellen abgesaugt und anschließend ein Spacer-Ring auf den Zellteppich aufgelegt. Auf diesen Spacer-Ring wird ein Capsule Insert und 500 µl carbonatfreies Medium gegeben. Die Sensorkammern werden mit 2 ml carbonatfreiem Medium gefüllt und das vorbereitete Capsule eingesetzt.

4.3.2 Vorbereitung des Zytosensors

Zunächst wird die Referenzelektrode aufgesetzt und die dazugehörigen Schläuche angeschlossen. Der Plunger wird an die Flussleitung und an die Referenzelektrode angeschlossen und bis zur Messung in einen Schutzdeckel eingesetzt. Danach wird die Software (Cytosoft) gestartet und die Flussgeschwindigkeit auf 90% gesetzt, um das System von eventuellen Luftblasen, die die Messung stören würden, zu befreien. Nachdem das System luftblasenfrei ist, wird der Fluss auf 50% gestellt und durch mehrfaches Umschalten zwischen den beiden Kanälen eine korrekte Funktion des Systems gewährleistet.

4.3.3 Messung

Für die Messung wird der Plunger aus dem Schutzgefäß herausgenommen und in die Sensorkammern, in denen sich die Zellen befinden, eingesetzt. Hier ist unbedingt auf Luftblasenfreiheit zu achten. Durch Starten der Software wird das Messprogramm automatisch gestartet. Dabei durchläuft das Programm mehrfach einen vorprogrammierten Messzyklus:

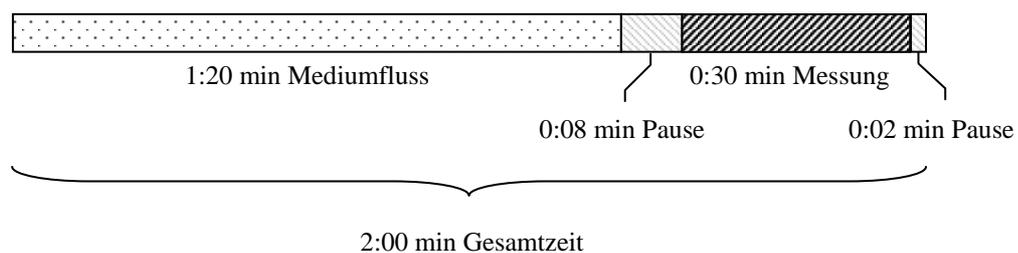


Abb. 16: Darstellung eines Messzyklus.

Um den Einfluss verschiedener Verbindungen auf den extrazellulären pH-Wert zu bestimmen, wird im Fließmedium eine geeignete Konzentration der Substanzen eingestellt und der pH-Wert 30 Minuten gemessen. Als Lösungsmittel wird 0,02% Ethanol verwendet.

5 Ergebnisse

Im Vordergrund dieser Arbeit stand zunächst die Etablierung einer neuen Methode. Das Versuchsdesign wurde bereits in Kapitel 4 erläutert.

5.1 Messungen mit dem Biacore-System

5.1.1 Validierung der Messmethode

Um die Eignung der Methode für die Analyse der Bindung des Estrogen Rezeptors an das Estrogen Response Element nachzuweisen, wird für folgende Parameter eine Validierung der Methode durchgeführt.

- Spezifität und Linearität
- Reproduzierbarkeit

Wie aus dem Datenblatt des kommerziell erworbenen Estrogen Rezeptors ersichtlich ist, ist der Rezeptor während einer Lagerung bei -80°C stabil. Allerdings neigt er nach dem Auftauen sehr stark zur Aggregation, was zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen würde. Daher werden zu Beginn sehr kleine Aliquote erstellt, damit zwischen Auftauen und der letztlichen Messung möglichst wenig Zeit vergeht. Desweiteren werden sämtliche Inkubationen bei 0°C auf Eis durchgeführt.

Spezifität und Linearität

Um die Spezifität der Methode zu untersuchen, wurden Lösungen mit verschiedenen Mengen an Estrogen Rezeptor α über eine Chipoberfläche mit dem Estrogen Response Element (ERE+) und anschließend über eine Chipoberfläche ohne das Estrogen Response Element (ERE-) injiziert. Dazwischen wurde die Oberfläche jeweils regeneriert, indem durch Injektion einer Regenerationslösung gebundene Rezeptormoleküle abgelöst wurden.

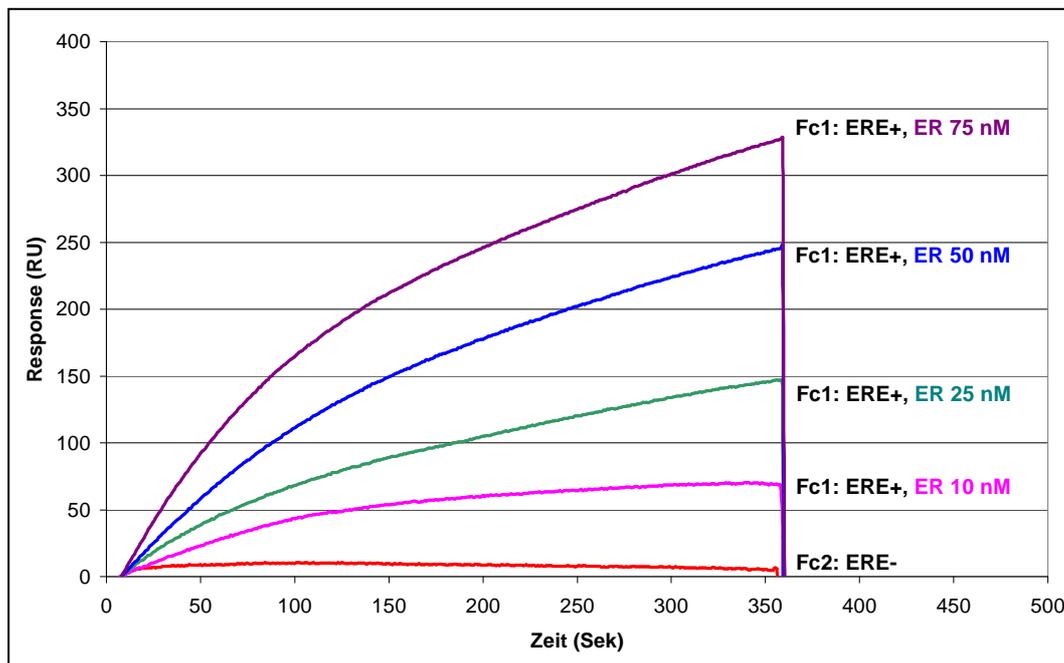


Abb. 17: Messungen zur Spezifität der Methode. Verschiedene Konzentrationen an Estrogen Rezeptor α werden nacheinander über eine Chipoberfläche mit dem ERE und ohne das ERE geleitet. Dargestellt ist exemplarisch eine Injektion in die unspezifische Meßzelle (Fc2: ERE-). Für die spezifische Meßzelle sind verschiedene Konzentrationen dargestellt. Zwischen den Injektionen wird die Chipoberfläche jeweils regeneriert.

In Abbildung 17 ist zu erkennen, dass es zu einer deutlich ausgeprägten Bindung des Rezeptors in der spezifischen Meßzelle (ERE+) kommt, während es in der unspezifischen Meßzelle (ERE-) zu keiner erkennbaren Bindung kommt. Wichtig ist, den Effekt des Lösungsmittels zu berücksichtigen, da es durch Diffusionsvorgänge während der Messung in beiden Meßzellen gleichermaßen zu leichten Schwankungen des Signals kommen kann.

Durch Subtraktion der beiden Signale voneinander kann dieser Effekt ausgeglichen werden.

In Abbildung 17 ist neben der spezifischen Bindung des Estrogen Rezeptors an die ERE+ Meßzelle ebenfalls zu erkennen, dass die Höhe des Signals nach der Injektion konzentrationsabhängig ist. In Abbildung 18 ist die Abhängigkeit der Signalthöhe von der Konzentration dargestellt.

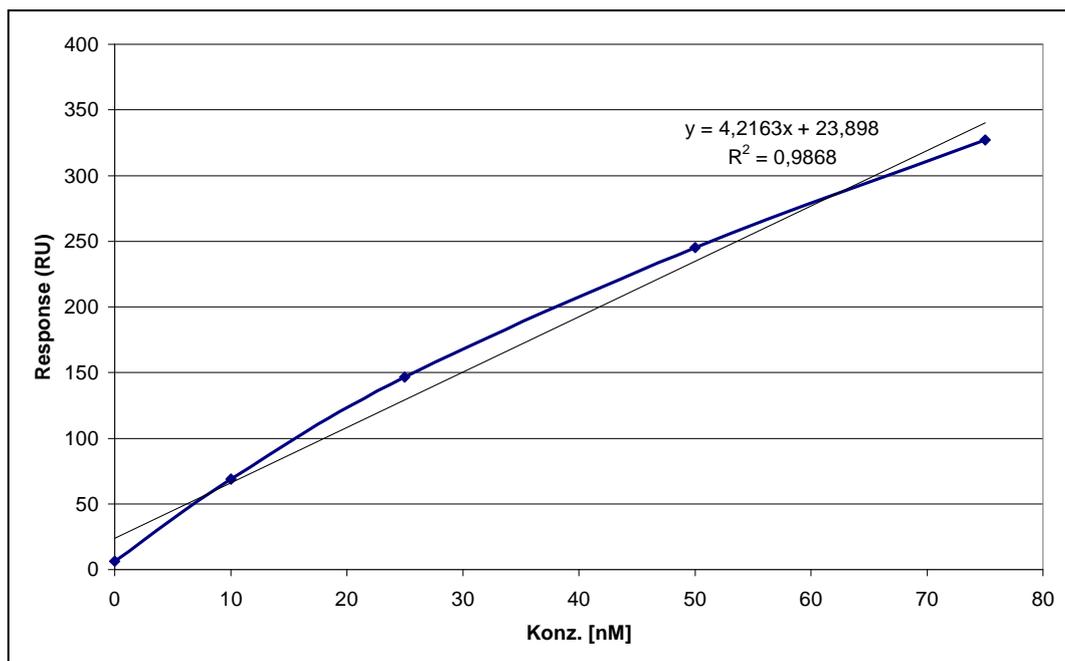


Abb. 18: Abhängigkeit zwischen Konzentration des Rezeptors und der Signalthöhe.

Es ist zu erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 75 nM an ER α ein linearer Zusammenhang besteht. Die Messungen werden bei einer Konzentration von 50 nM durchgeführt.

Reproduzierbarkeit

Bei der Bestimmung der Reproduzierbarkeit muß berücksichtigt werden, dass der Absolutwert der Bindung (RU) nach einer Injektion stark abhängt von der kommerziellen

Rezeptorcharge, dem Aggregationsgrad des Aliquots und der exakten Zusammensetzung des Fließpuffers (pH-Wert). Daher ist die Mitführung eines internen Standards (1 μM 17 β -Estradiol) erforderlich.

Für die Bestimmung der Reproduzierbarkeit wird in einer vierfachen Messung der Effekt von 10 nM 17 β -Estradiol auf die Bindung des Estrogen Rezeptors β an das ERE und dessen Streuung um den Mittelwert bestimmt.

Tab. 2: Bestimmung der Methodenreproduzierbarkeit für 17 β -Estradiol (E2) durch eine Vierfachbestimmung. Dargestellt ist der Mittelwert mit dem Variationskoeffizienten VK.

	<i>1.</i>	<i>2.</i>	<i>3.</i>	<i>4.</i>	<i>MW \pm VK(%)</i>
Rel. Erhöhung durch 10 nM E2	1,87	1,39	1,43	1,37	1,52 \pm 15,8
Rel. Erhöhung durch 1 μM E2	4,51	2,71	2,89	2,73	3,21 \pm 27,1
Normalisierung der Wirkung von 10 nM E2 auf die Wirkung von 1 μM E2	24,9%	22,9%	22,6%	21,4%	22,9% \pm 6,4

In Tabelle 2 ist bei den einzelnen Injektionen eine deutliche Schwankung der Absolutwerte zu erkennen, die auf die oben beschriebenen Faktoren zurückzuführen sind. Läßt man diese unberücksichtigt, so erhält man sehr hohe Variationskoeffizienten (ca. 16% bzw. ca 27%). Durch Normalisierung der Messungen auf die Wirkung von 1 μM 17 β -Estradiol mit Hilfe der im Methodenteil dargestellten Formel (S. 36) kann diese Schwankung auf ein akzeptables Maß von etwa 6% gebracht werden.

5.1.2 Estrogen Rezeptor α

5.1.2.1 17β -Estradiol

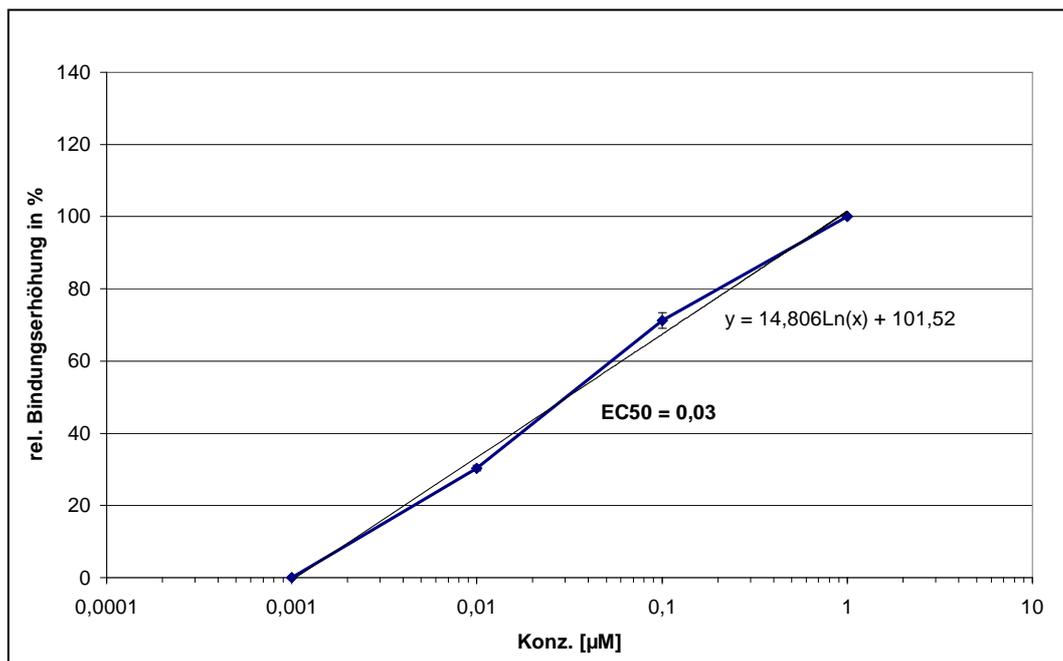


Abb. 19: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit 17β -Estradiol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β -Estradiol. (n=3)

Es ist zu erkennen, dass 17β -Estradiol bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine deutliche Bindungserhöhung bewirkt. Es besteht ein logarithmischer Zusammenhang zwischen der Wirkung von 17β -Estradiol und der eingesetzten Konzentration. Mit Hilfe einer logarithmischen Regression lässt sich die Konzentration bestimmen, die zu einer 50%igen Wirkung von 1 μM 17β -Estradiol führt. Der EC50-Wert für 17β -Estradiol ist 0,03 μM .

5.1.2.2 Genistein

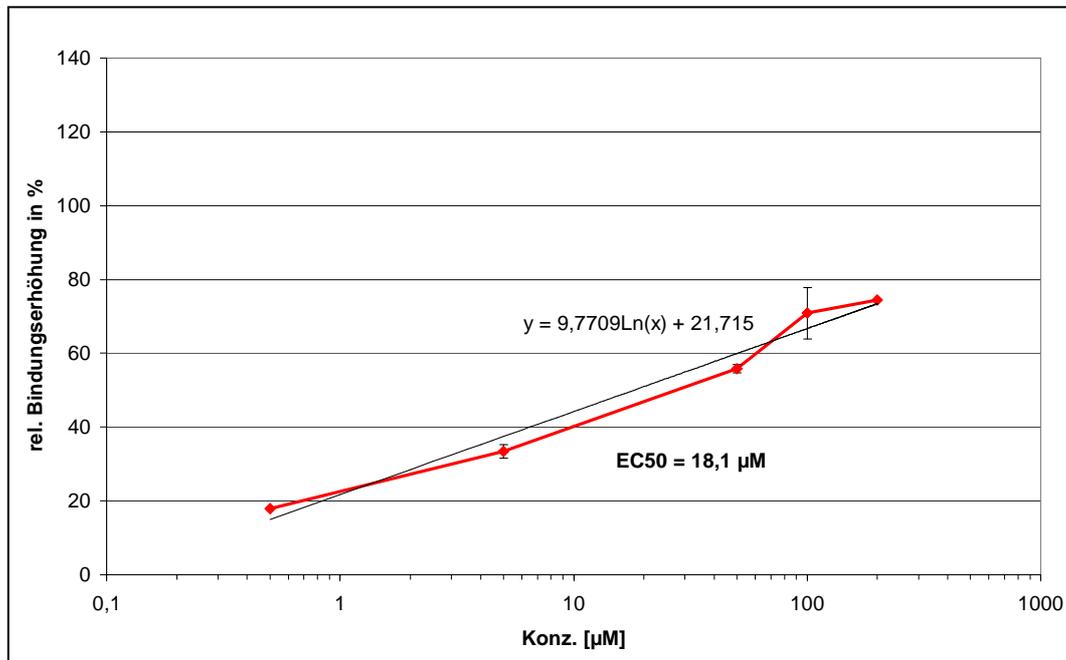


Abb. 20: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit Genistein. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 µM 17 β -Estradiol. (n=3)

In Abbildung 20 ist zu erkennen, dass Genistein ab einer Konzentration von etwa 1 µM zu einer deutlichen Bindungserhöhung führt. Die Wirkung von Genistein kann nur bis zu einer Konzentration von 300 µM getestet werden, da hier die Löslichkeitsgrenze in 0,2% DMSO erreicht ist. Bei dieser Konzentration führt Genistein zu einer etwa 75%igen Bindungserhöhung im Vergleich zu 1 µM 17 β -Estradiol. Der EC50-Wert beträgt 18,1 µM.

5.1.2.3 Daidzein

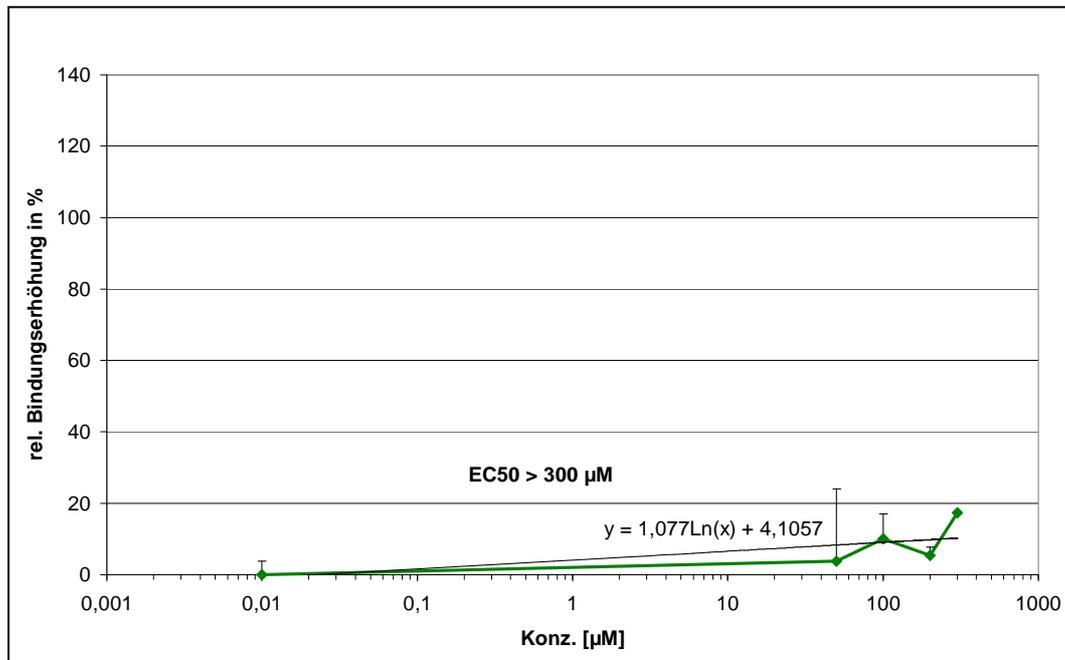


Abb. 21: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit Daidzein. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 µM 17 β -Estradiol. (n=3)

Daidzein kann aufgrund der Löslichkeitsgrenze in 0,2% DMSO nur bis zu einer Konzentration von 300 µM getestet werden. Allerdings ist auch bei dieser Konzentration im Gegensatz zu Genistein nur eine sehr schwache Wirkung zu erkennen. Dies führt dazu, dass kein exakter EC50-Wert angegeben werden kann. Dieser liegt demzufolge bei einer Konzentration größer als 300 µM.

5.1.2.4 Coumestrol

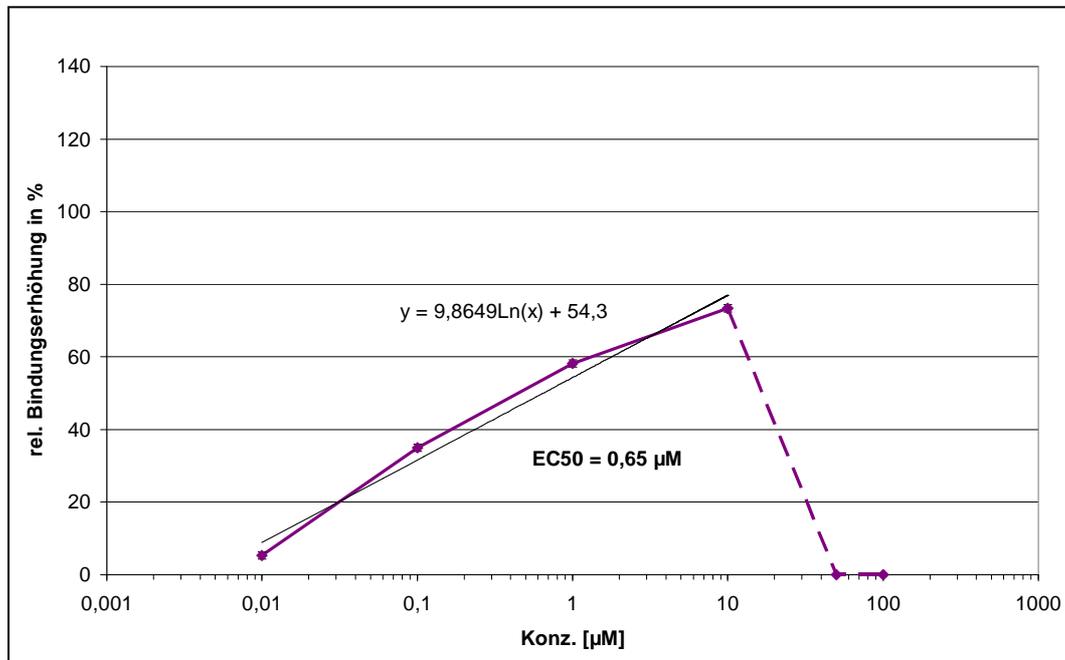


Abb. 22: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit Coumestrol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 µM 17 β -Estradiol. (n=3)

In Abbildung 22 ist zu erkennen, dass bis zu einer Konzentration von 10 µM an Coumestrol die Bindung an den Chip zunimmt. Bei dieser Konzentration wird eine Wirksamkeit von etwa 75% im Vergleich zu 1 µM 17 β -Estradiol erzielt. Die niedrigste Konzentration, bei der noch eine Wirkung erkennbar ist, beträgt 0,01 µM. Der EC50-Wert beträgt 0,65 µM.

Auffällig ist das Verhalten des Rezeptors bei einer Konzentration an Coumestrol von über 10 µM. Hier wird die Bindung des Rezeptors an das Estrogen Response Element vollständig aufgehoben. Ein derartiger Effekt ist in der Literatur bisher nicht beschrieben. Es ist anzunehmen, dass bei Konzentrationen ab 50 µM eine Art denaturierender Effekt von Coumestrol auftritt.

5.1.2.5 Equol

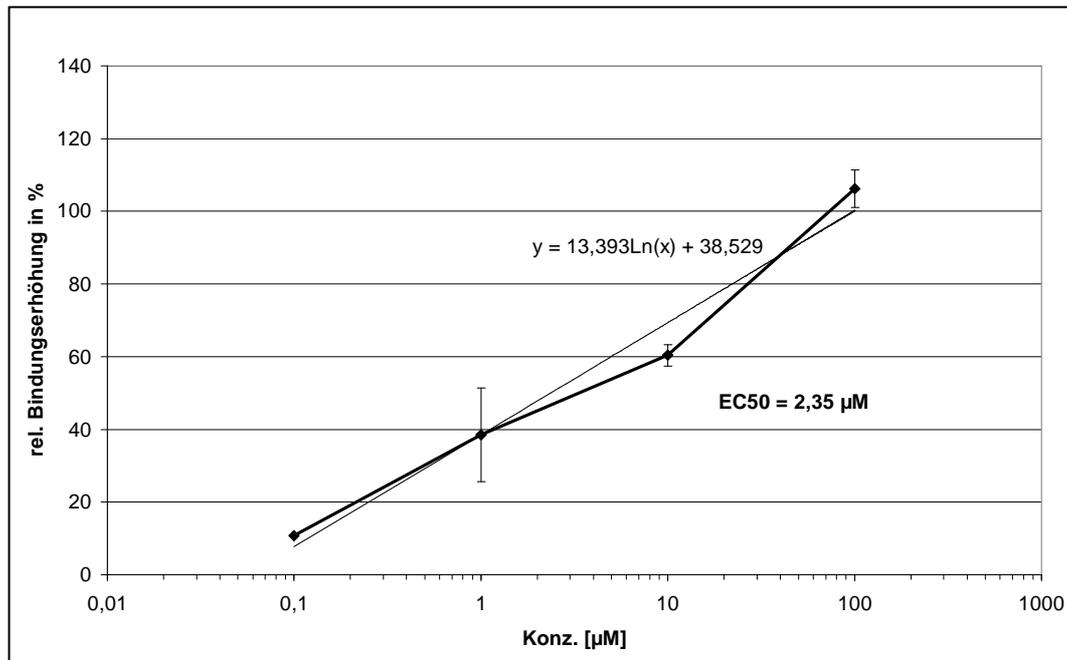


Abb. 23: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit Equol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μ M 17 β -Estradiol. (n=3)

In Abbildung 23 ist die Wirkung von Equol, einem reduktiven Daidzein-Metaboliten dargestellt. Es ist bereits ab einer Konzentration von 1 μ M eine deutliche Wirkung zu erkennen. Bei 100 μ M wird sogar eine mit 1 μ M 17 β -Estradiol vergleichbare Wirksamkeit erreicht. Es ergibt sich ein EC50-Wert von 2,35 μ M.

Während die Ausgangssubstanz Daidzein zu keiner erkennbaren Bindungserhöhung führt, ist offensichtlich, dass durch eine Umwandlung von Daidzein zu Equol eine Wirkung erreicht werden kann.

5.1.2.6 ICI 182,780

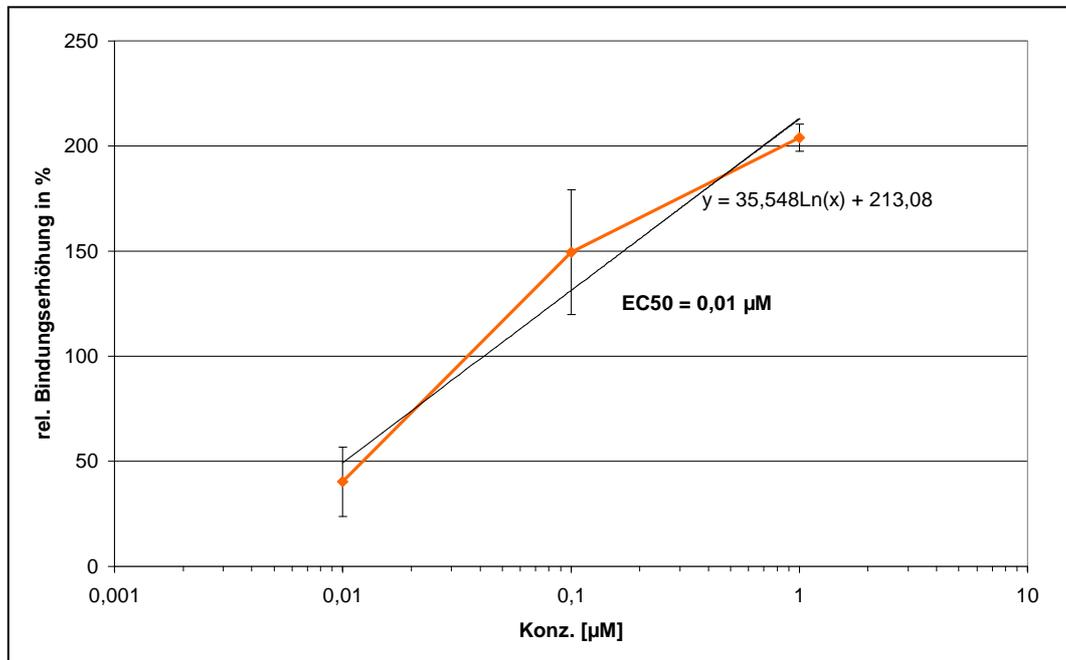


Abb. 24: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit ICI 182,780. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17 β -Estradiol. (n=3)

In Abbildung 24 ist die Wirkung des synthetischen Antagonisten ICI 182,780 auf die Bindung des ER α an das ERE dargestellt. Es ist zu erkennen, dass ICI 182,780 die Bindung bereits bei einer Konzentration von 10 nM deutlich erhöht. Bei einer Konzentration von 1 μM ist der Effekt bei über 200%. Es ergibt sich nach logarithmischer Regression ein EC50-Wert von 0,01 μM , also ein um den Faktor 3 geringerer Wert als bei 17 β -Estradiol.

5.1.2.7 4'-*O*-Methylequol, Ethylidaidzein, Matairesinol und Secoisolariciresinol

Mit dem Estrogen Rezeptor α wurden desweiteren die Verbindungen 4'-*O*-Methylequol, Ethylidaidzein, Matairesinol und Secoisolariciresinol getestet. Für diese Verbindungen konnte allerdings für die eingesetzten Konzentrationen keine Bindungserhöhung gemessen werden.

Daher kann für keine der Verbindungen ein genauer EC50-Wert bestimmt werden. Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht über die Messungen.

Tab. 3: Übersicht über die Messungen des ER α mit weiteren Verbindungen.

<i>Verbindung</i>	<i>EC50-Wert</i>
4'- <i>O</i> -Methylequol	>> 10 μM
Ethylidaidzein	>> 100 μM
Matairesinol	>> 100 μM
Secoisolariciresinol	>> 100 μM

5.1.2.8 Kombination aus 17 β -Estradiol und Daidzein

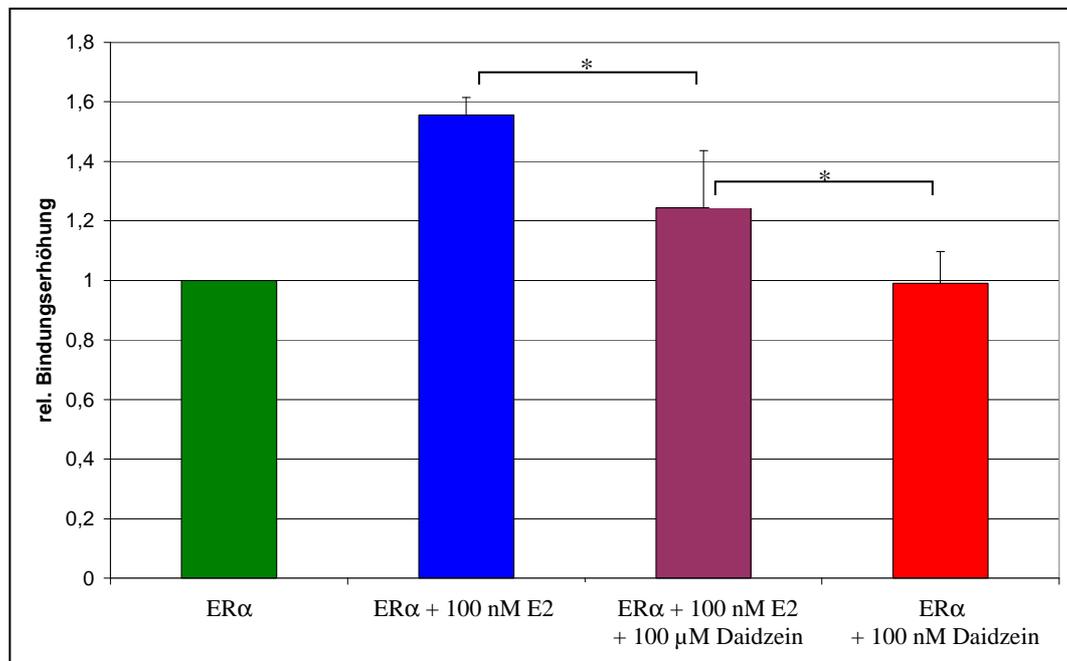


Abb. 25: Relative Bindungserhöhung des ER α durch Inkubation mit 100 nM 17 β -Estradiol/ 100 μ M Daidzein. Die Werte sind normalisiert auf die Bindung des Rezeptors alleine. (n=3), *p<0,05

Um zu untersuchen, ob Daidzein, welches bis zu 300 μ M keine nennenswerte Bindungserhöhung erzeugt, die aktivierende Wirkung von 17 β -Estradiol hemmen kann, wird ein Kombinationsversuch durchgeführt. Deutlich erkennbar ist die etwa 1,5-fache Bindungserhöhung durch 100 nM 17 β -Estradiol, während 100 μ M Daidzein keine Wirkung zeigt. Eine 1:1-Mischung aus 100 nM 17 β -Estradiol und 100 μ M Daidzein erzeugt eine von beiden Einzelsubstanzen signifikant unterschiedliche Bindungserhöhung, die bei etwa 50% des Effekts von 17 β -Estradiol alleine liegt.

Dadurch kann die anti-estrogene Wirkung von Daidzein gezeigt werden.

5.1.3 Estrogen Rezeptor β

5.1.3.1 17β -Estradiol

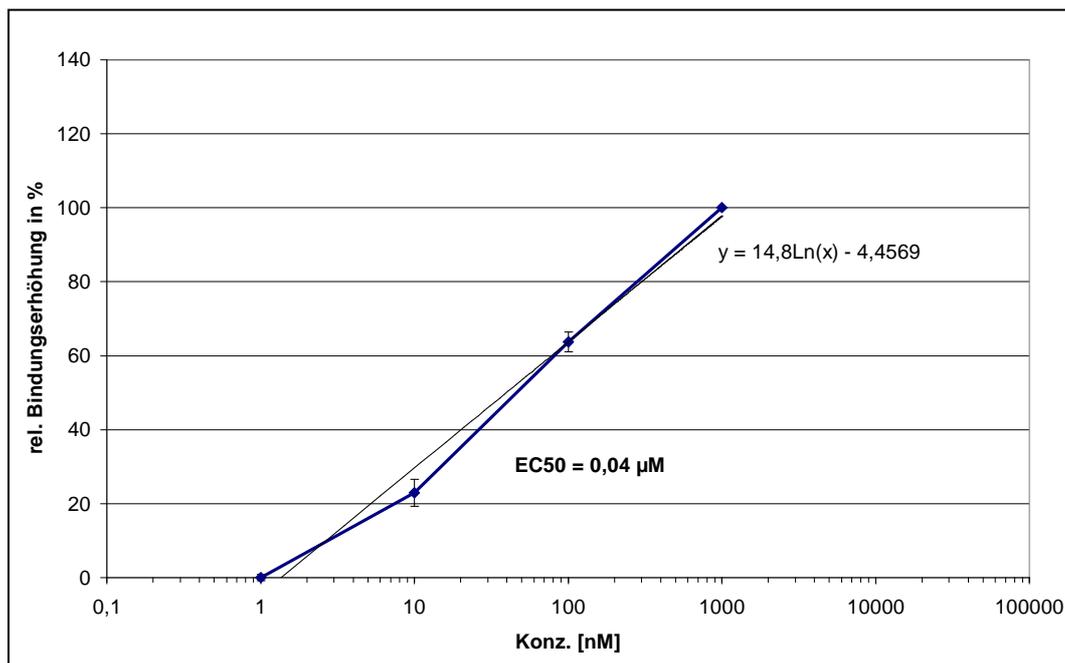


Abb. 26: Relative Bindungserhöhung des ER β durch Inkubation mit 17β -Estradiol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μ M 17β -Estradiol. (n=3)

Es ist zu erkennen, dass 17β -Estradiol ein sehr ähnliches Verhalten wie beim Estrogen Rezeptor α zeigt. Eine Konzentration von 10 nM bewirkt eine etwa 25%ige Bindungserhöhung im Vergleich zu 1 μ M 17β -Estradiol. Es lässt sich ein EC₅₀-Wert von 0,04 μ M errechnen, was nahezu identisch mit dem EC₅₀-Wert für den Estrogen Rezeptor α ist (EC₅₀=0,03 μ M).

5.1.3.2 Genistein

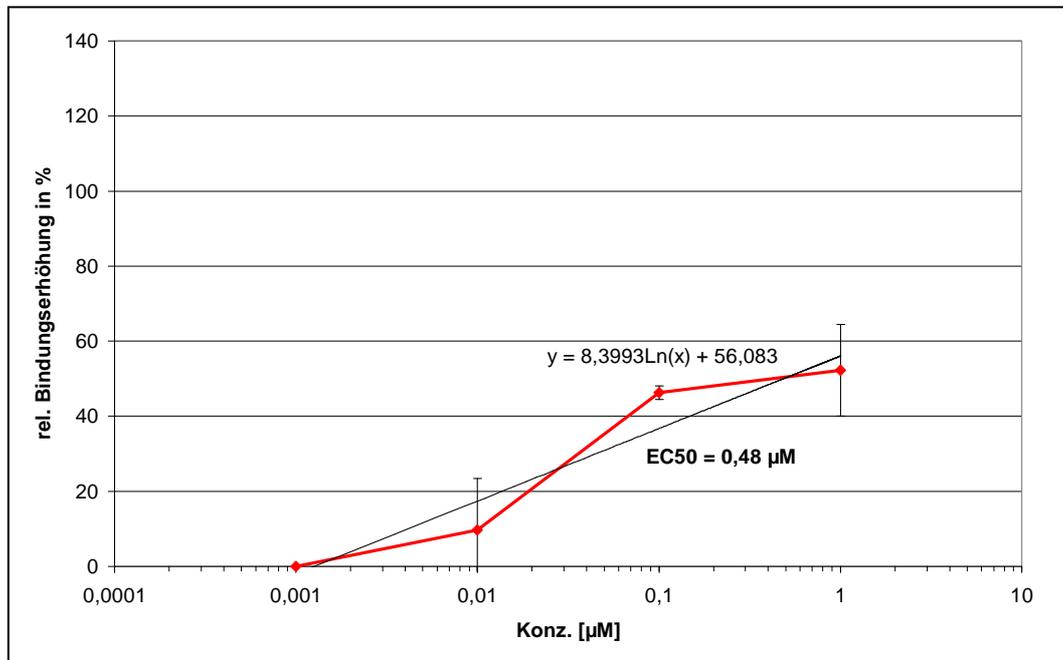


Abb. 27: Relative Bindungserhöhung des ER β durch Inkubation mit Genistein. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17 β -Estradiol. (n=3)

Für Genistein ergibt sich, wie in Abbildung 27 zu erkennen, ein EC_{50} -Wert von 0,48 μM . Eine deutliche Wirkung ist ab einer Konzentration von 0,1 μM zu beobachten. Bei Konzentrationen, die höher als 1 μM sind, scheint sich eine Art Plateau auszubilden, da keine höheren Wirkungen erzielt werden können (Daten nicht gezeigt).

5.1.3.3 Daidzein

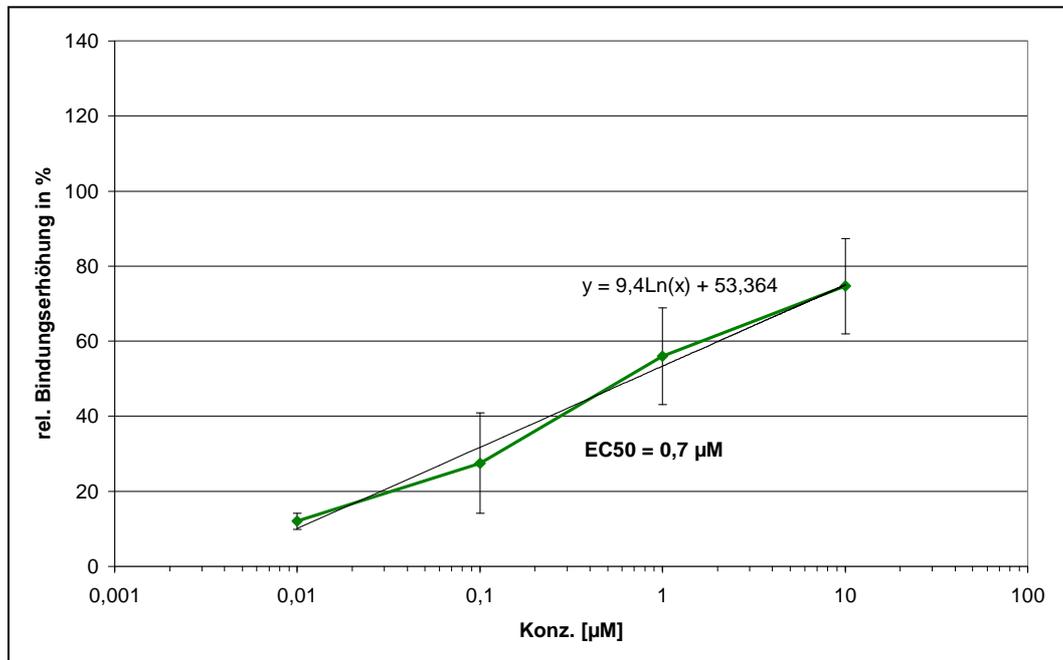


Abb. 28: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Daidzein. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

Im Gegensatz zu den Beobachtungen beim Estrogen Rezeptor α ist beim Estrogen Rezeptor β eine deutliche Bindungserhöhung nach Inkubation mit Daidzein zu messen. Bereits bei einer Konzentration von 0,01 μM ist ein leichter Effekt zu erkennen. Nach logarithmischer Regression lässt sich ein EC50-Wert von 0,7 μM berechnen.

5.1.3.4 Coumestrol

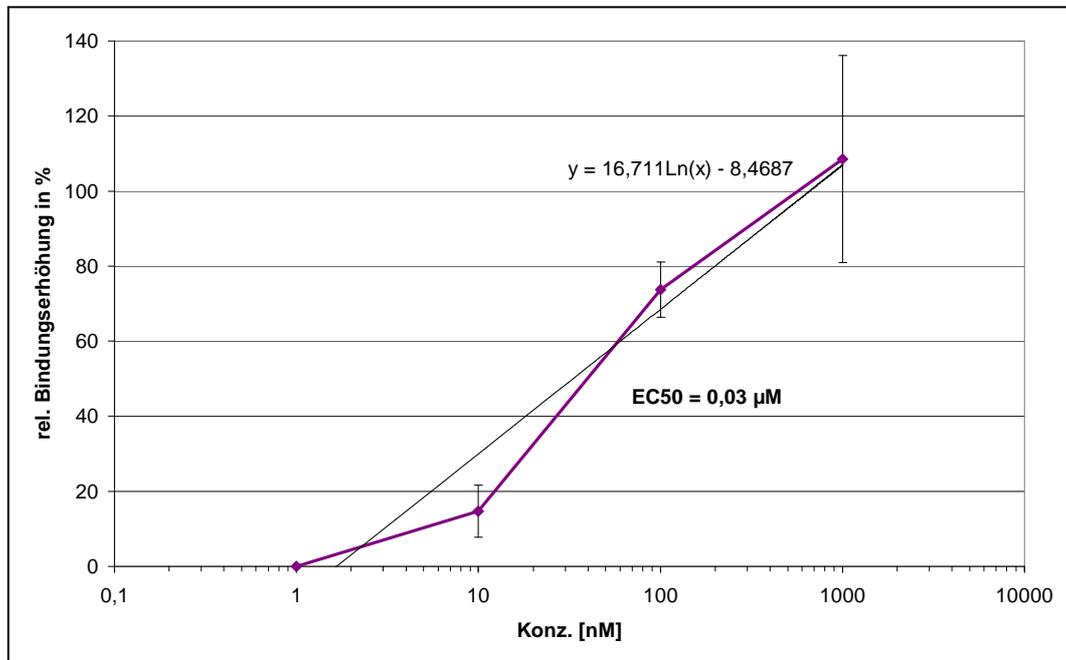


Abb. 29: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Coumestrol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

In Abbildung 29 ist zu erkennen, dass Coumestrol bereits bei einer Konzentration von 10 nM eine deutliche Wirkung auf die Bindung des Estrogen Rezeptors β an das ERE hat. Die Berechnung des EC50-Wertes ergibt 0,03 μM, wodurch Coumestrol eine mit 17β-Estradiol vergleichbare Wirkung besitzt. Ab einer Konzentration von 1 μM scheint eine Art Plateau zu entstehen, da kein höherer Effekt zu messen ist (Daten nicht gezeigt). Die für den Estrogen Rezeptor α beobachteten Denaturierungserscheinungen ab einer Konzentration von 50 μM treten hier nicht auf.

5.1.3.5 Equol

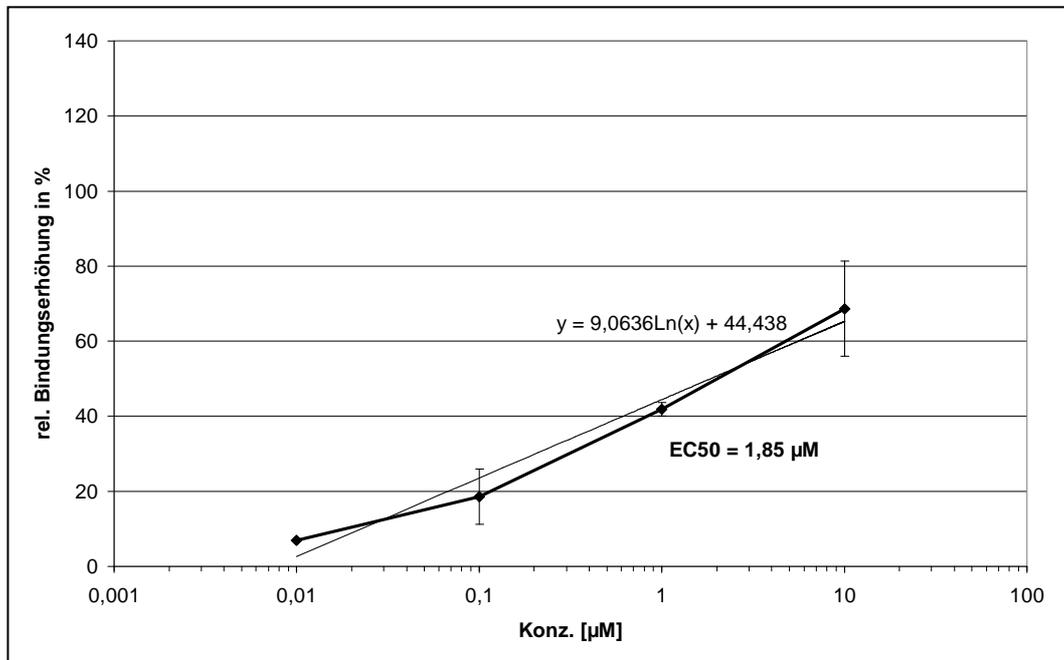


Abb. 30: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Equol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

In Abbildung 30 sind die Ergebnisse für Equol dargestellt. Ein deutlicher Effekt ist mit einer 20%igen Bindungserhöhung ab einer Konzentration von etwa 0,1 μM zu beobachten. Nach logarithmischer Regression ergibt sich für den EC50-Wert 1,85 μM, was in etwa der Wirksamkeit beim Estrogen Rezeptor α entspricht.

5.1.3.6 Ethyldaidzein

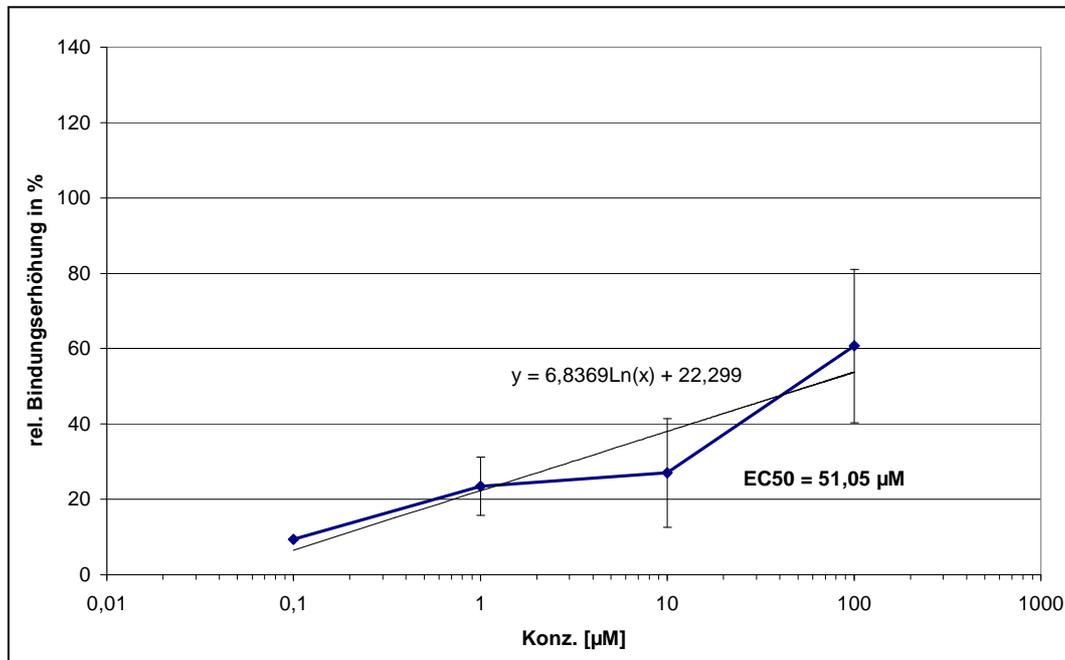


Abb. 31: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Daidzein. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

Das Daidzein-Derivat Ethyldaidzein zeigt erst ab einer Konzentration von etwa 10 μM eine deutlich steigernde Wirkung auf die Bindung des Estrogen Rezeptors β an das ERE. Nach logarithmischer Regression ergibt sich ein EC50-Wert von 51,05 μM, was einer um drei Größenordnungen schwächeren Wirkung als 17β-Estradiol entspricht.

5.1.3.7 4'-*O*-Methylequol

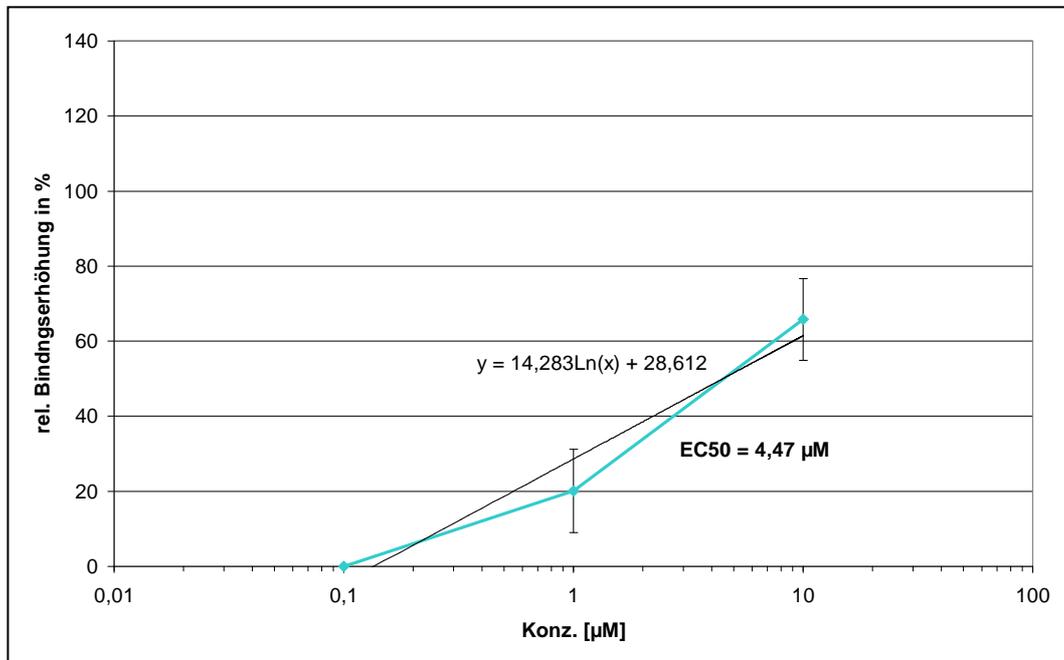


Abb. 32: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit 4'-*O*-Methylequol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

In Abbildung 32 ist der Effekt des Equol-Metabolites 4'-*O*-Methylequol dargestellt. Ab einer Konzentration von 1 μM ist eine deutliche Erhöhung der Bindung von Estrogen Rezeptor β an das ERE zu beobachten. Höhere Konzentrationen als 10 μM können aufgrund der geringen Löslichkeit von 4'-*O*-Methylequol in 0,2% DMSO nicht gemessen werden. Für den EC50-Wert ergibt sich nach logarithmischer Regression 4,47 μM.

5.1.3.8 Matairesinol

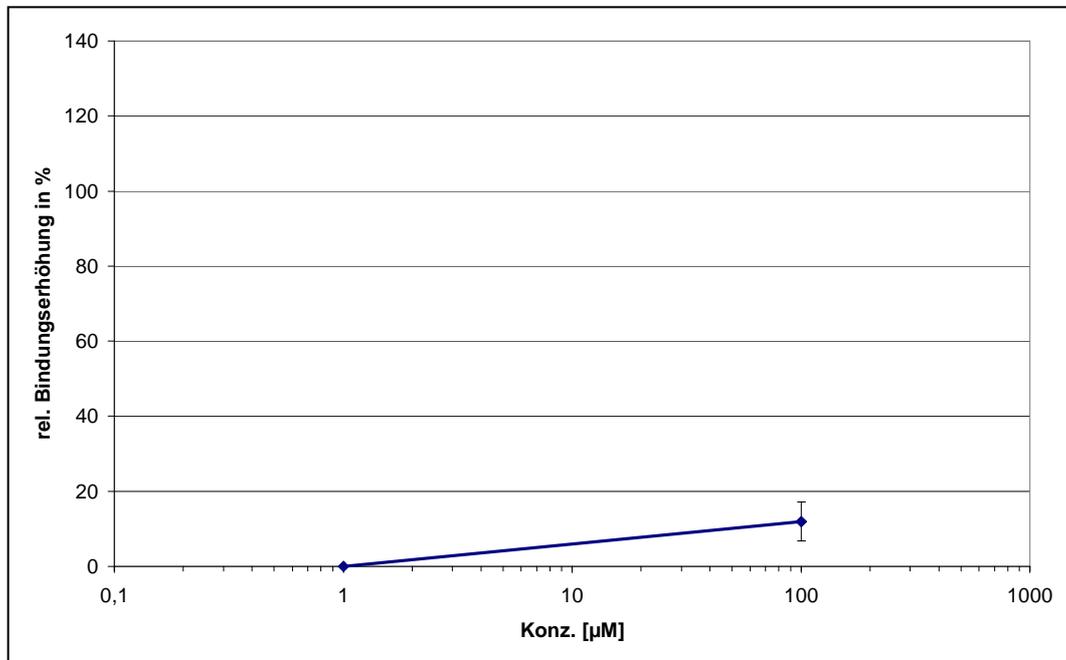


Abb. 33: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Matairesinol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

Das Lignan Matairesinol wird bis zu einer Konzentration von 100 μM getestet. Höhere Konzentrationen sind aufgrund der begrenzten Löslichkeit in 0,2% DMSO nicht möglich. Bei dieser Konzentration ist lediglich eine Bindungserhöhung um etwa 10% zu erkennen. Daher ist eine Berechnung des EC50-Wertes weder möglich noch von sinnvoller Aussagekraft.

5.1.3.9 Secoisolariciresinol

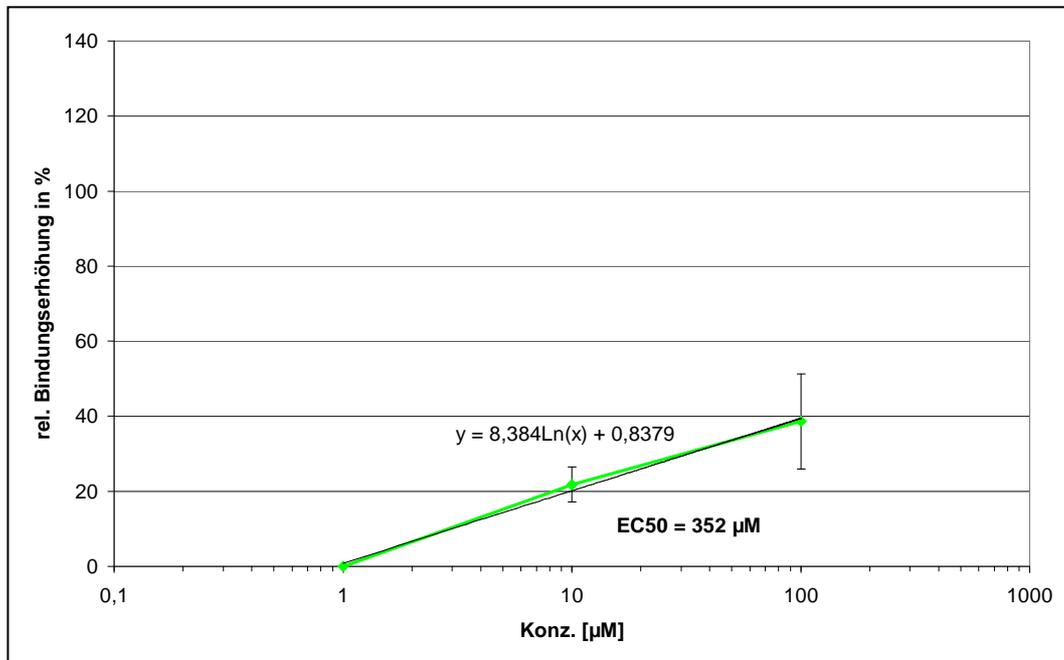


Abb. 34: Relative Bindungserhöhung des ERβ durch Inkubation mit Secoisolariciresinol. Die Werte sind normalisiert auf die Wirkung von 1 μM 17β-Estradiol. (n=3)

Das zweite Lignan Secoisolariciresinol kann, ebenso wie Matairesinol, aufgrund der begrenzten Löslichkeit in 0,2% DMSO nur bis zu einer Konzentration von 100 μM getestet werden. Bei einer Konzentration von 10 μM kann eine Erhöhung um etwa 20%, bei 100 μM von etwa 40% beobachtet werden. Die logarithmische Regression liefert einen sehr hohen EC50-Wert von 352 μM, also um vier Größenordnungen höher als bei 17β-Estradiol.

5.1.4 Übersicht über die Biacore-Messungen

In Tabelle 4 ist eine Übersicht der Messergebnisse mit dem Biacore-System dargestellt. Für beide Rezeptoren wird eine Effektivität der Bindungserhöhung errechnet, bei der die Wirkung von 17 β -Estradiol als 100 angenommen wird.

Tab. 4: Übersicht über die mit dem Biacore-System erhaltenen Ergebnisse.

<i>Verbindung</i>	<i>Estrogen Rezeptor α</i>		<i>Estrogen Rezeptor β</i>	
	EC50-Wert (μ M)	Effektivität	EC50-Wert (μ M)	Effektivität
17 β -Estradiol	0,03	100	0,04	100
Genistein	18,1	0,2	0,48	8,3
Daidzein	>> 300	<< 0,01	0,70	5,7
Coumestrol	0,65	4,6	0,03	133
Equol	2,35	1,3	1,85	2,2
ICI 182,780	0,01	300	---	---
4'- <i>O</i> -Methylequol	>> 10	<< 0,3	4,47	0,9
Ethyl daidzein	>> 100	<< 0,03	51,05	0,1
Matairesinol	>> 100	<< 0,03	>> 100	<< 0,04
Secoisolariciresinol	>> 100	<< 0,03	352	0,01

Daraus ergeben sich für die Effektivitäten folgende Reihen:

Estrogen Rezeptor α :

ICI 182,780 > 17 β -Estradiol > Coumestrol > Equol > Genistein >> 4'-*O*-Methylequol >
Daidzein = Ethyldaidzein = Matairesinol = Secoisolariciresinol

Estrogen Rezeptor β :

Coumestrol > 17 β -Estradiol > Genistein > Daidzein > Equol > 4'-*O*-Methylequol >
Ethyldaidzein > Secoisolariciresinol > Matairesinol

5.2 pS2-Assay

Der pS2-Assay wird durchgeführt, um den Effekt der Substanzen auf Ebene der Genexpression abzuschätzen. Gemessen wird die relative pS2-Expression in MCF-7 Zellen, die vorwiegend den Estrogen Rezeptor α exprimieren. Als Referenzgen wurde das Gen für die Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase (HPRT) verwendet.

5.2.1 Bestimmung des linearen Bereichs

MCF-7

Bevor Messungen mittels RT-PCR durchgeführt werden können, ist es wichtig abzuklären, in welchem Zyklenzahlbereich ein linearer Zusammenhang zwischen Amplifikatbildung und Zyklenzahl vorhanden ist. Dies wird sowohl für das pS2-Gen, als auch für das Referenzgen HPRT durchgeführt.

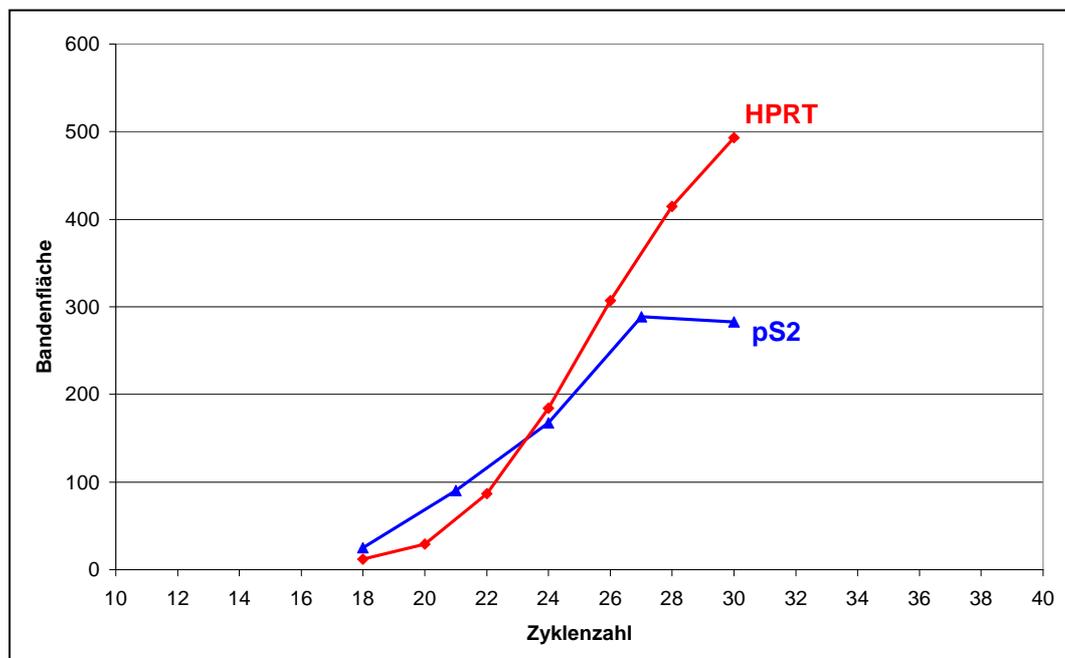


Abb. 35: Abschätzung des linearen Bereichs der Amplifikat-Bildung für pS2 und HPRT bei MCF-7 Zellen.

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht, ist für das pS2-Gen ein linearer Bereich von 18 bis 26 Zyklen, für das HPRT-Gen ein Bereich von 22 bis 28 Zyklen vorhanden. Die folgenden Messungen werden daher bei 25 Zyklen gemessen.

Caco-2

Neben den MCF-7 Zellen, die vorwiegend den Estrogen Rezeptor α exprimieren, wird auch eine Zelllinie getestet, die wesentlich mehr Estrogen Rezeptor β exprimiert. Da in der Literatur nichts über die Expression von pS2 in dieser Zelllinie bekannt ist, wird auch hier der lineare Bereich bestimmt.

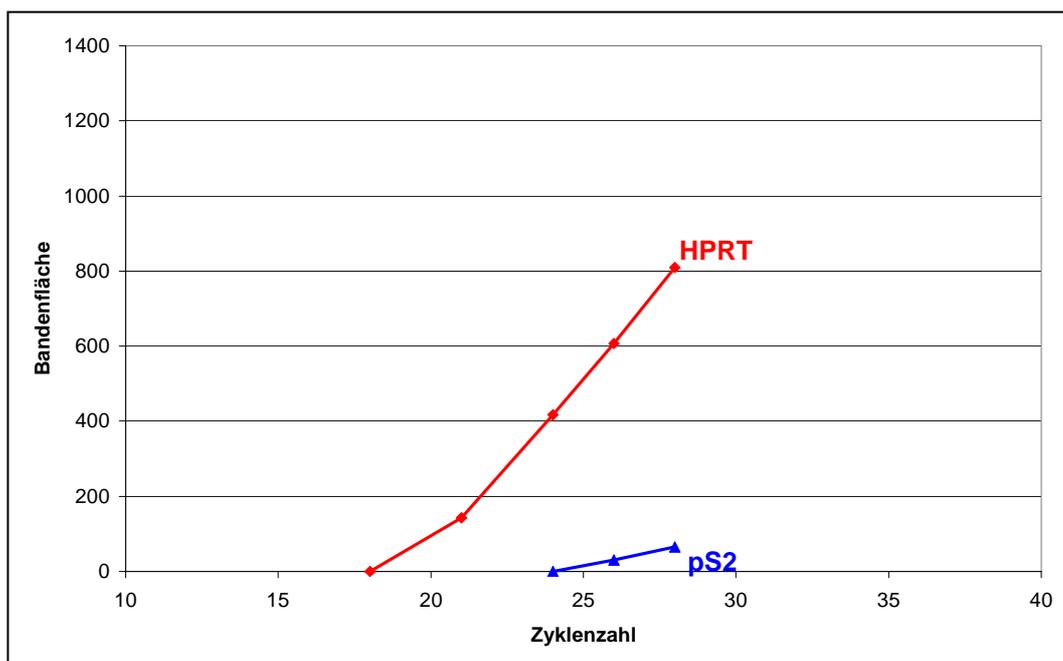


Abb. 36: Abschätzung des linearen Bereichs der Amplifikat-Bildung für pS2 und HPRT bei Caco-2 Zellen nach 48 Stunden Inkubation mit 10 nM 17β -Estradiol.

Wie in Abbildung 36 zu erkennen ist, kann die HPRT-Expression im selben Bereich bestimmt werden, wie bei den MCF-7 Zellen, während die pS2-Expression offenbar sehr gering ist. Daher ist diese Zelllinie für den pS2-Assay nicht geeignet.

Aus diesem Grund werden die weiteren Messungen nur mit den MCF-7 Zellen durchgeführt.

5.2.2 Messungen mit 17 β -Estradiol, Genistein, Daidzein und Coumestrol

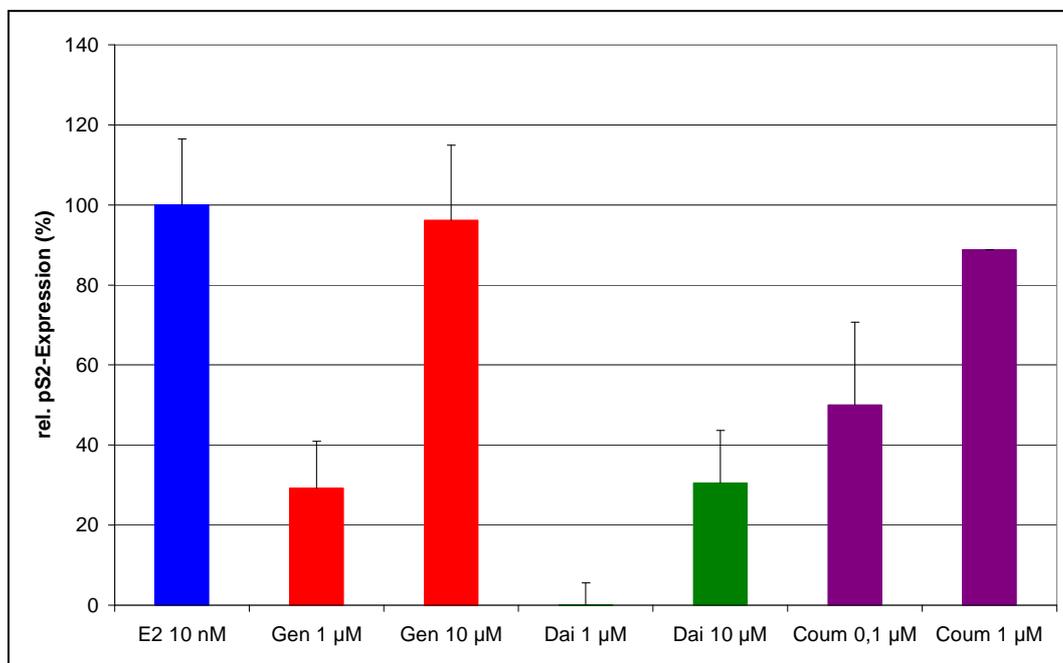


Abb. 37: Darstellung der relativen pS2-Expressionserhöhung durch Inkubation mit den angegebenen Verbindungen. Die Werte sind für den Effekt von 10 nM 17 β -Estradiol auf 100%, für die pS2-Expression in Kontrollzellen auf 0% normiert. (n=3)

In Abbildung 37 ist zu erkennen, dass Genistein bei einer Konzentration von 1 μ M etwa 30% der Wirkung von 10 nM 17 β -Estradiol besitzt. Dagegen haben 10 μ M Genistein eine mit 17 β -Estradiol vergleichbare Wirkung. Dies läßt auf eine um etwa vier Größenordnungen geringere Wirkung von Genistein schließen.

Daidzein erhöht bei einer Konzentration von 1 μM die pS2-Expression nicht signifikant, während bei 10 μM eine etwa 30%ige Wirkung erzielt wird. Diese entspricht ungefähr der Wirkung von 1 μM Genistein, wodurch auf eine um eine Größenordnung geringere Wirkung von Daidzein im Vergleich zu Genistein geschlossen werden kann.

0,1 μM Coumestrol haben einen 50%igen Effekt von 10 nM 17β -Estradiol, während 1 μM Coumestrol eine mit 17β -Estradiol vergleichbare Wirkung hat. Die Wirkung von Coumestrol läßt sich also als um etwa drei Größenordnungen geringer als die Wirkung von 17β -Estradiol einstufen.

Zusammenfassend ergibt sich daher für die Effektivität der pS2-Expressionserhöhung durch die getesteten Substanzen folgende Reihe:

17β -Estradiol > Coumestrol > Genistein > Daidzein

5.3 Zytosensor-Messungen

Um Effekte verschiedener Substanzen auf den Metabolismus von Estrogen Rezeptor-positiven Zelllinien zu testen, wird mit Hilfe eines Zytosensors die Wirkung verschiedener Verbindungen auf den Protonenausstoß, damit also auf den extrazellulären pH-Wert von MCF-7 Zellen gemessen.

5.3.1 Wirkung von 17β -Estradiol auf MCF-7 Zellen

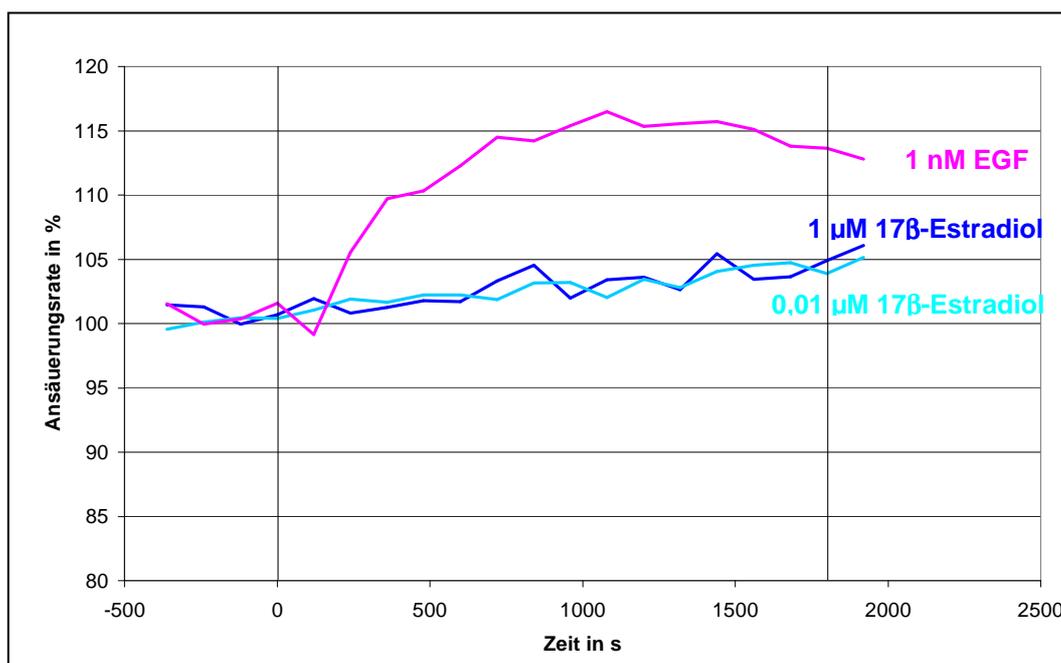


Abb. 38: Extrazelluläre Ansäuerungsrate von MCF-7 Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit 17β -Estradiol und 1 nM EGF. Werte von Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Die dargestellten Kurven entstanden nach Subtraktion mit den Lösungsmittelkurven.

Es ist in Abbildung 38 zu erkennen, dass durch Behandlung mit 1 nM EGF die Ansäuerungsrate nach etwa 15 Minuten um über 15% steigt. Dies ist auf einen metabolismus-anregenden Effekt zurückzuführen, durch den es zu einer verstärkten Produktion und einem damit verbundenen verstärkten Ausstoß von Protonen kommt.

Dagegen ist nach Behandlung mit 17β -Estradiol kein direkter Effekt zu beobachten.

5.3.2 Wirkung von Genistein und Daidzein auf MCF-7 Zellen

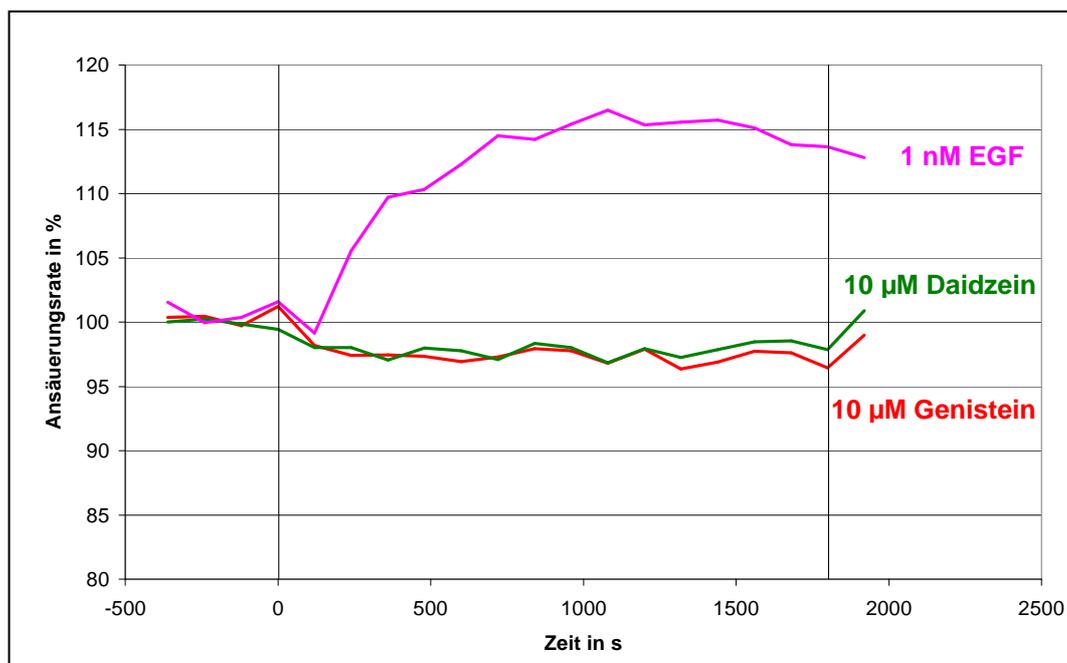


Abb. 39: Extrazelluläre Ansäuerungsrate von MCF-7 Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit 10 µM Genistein, 10 µM Daidzein und 1 nM EGF. Werte von Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Die dargestellten Kurven entstanden nach Subtraktion mit den Lösungsmittelkurven.

In Abbildung 39 ist der Effekt von je 10 µM Genistein und Daidzein dargestellt. Während es bei 1 nM EGF zu einer etwa 15%igen Erhöhung der Ansäuerung kommt, zeigt weder Genistein noch Daidzein eine Wirkung nach 30 Minuten Inkubation.

5.3.3 Wirkung von Coumestrol auf MCF-7 Zellen

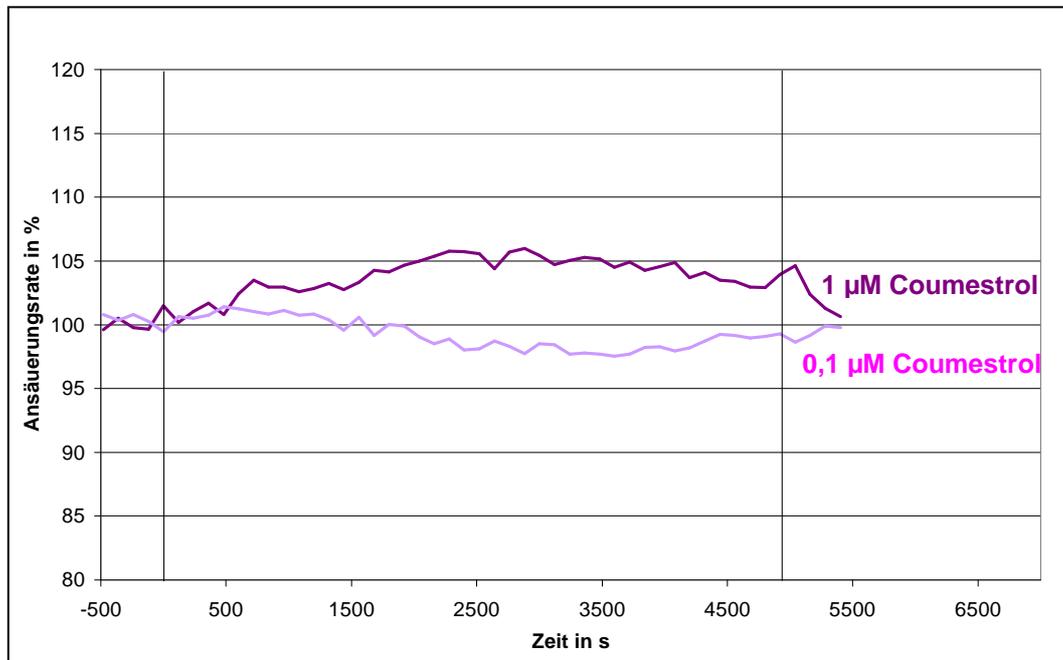


Abb. 40: Extrazelluläre Ansäuerungsrate von MCF-7 Zellen nach 80 Minuten Inkubation mit Coumestrol. Werte von Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Die dargestellten Kurven entstanden nach Subtraktion mit den Lösungsmittelkurven.

Da nach 30 Minuten Inkubation weder mit den bisher getesteten Phytoestrogenen noch mit 17β -Estradiol ein Effekt zu beobachten ist, wird ein Versuch mit $0,1 \mu\text{M}$ und $1 \mu\text{M}$ Coumestrol durchgeführt, bei dem 80 Minuten inkubiert wird.

Wie in Abbildung 40 zu sehen, ist selbst nach dieser langen Inkubationszeit kein Effekt zu erkennen.

Mit 17β -Estradiol werden desweiteren noch achtstündige Inkubation durchgeführt, allerdings ist auch dabei kein Effekt zu sehen. Nach acht Stunden sind die eingesetzten Zellen abgestorben, so dass keine längere Inkubationen durchgeführt werden können.

5.3.4 Wirkung von 17 β -Estradiol auf Caco-2 Zellen

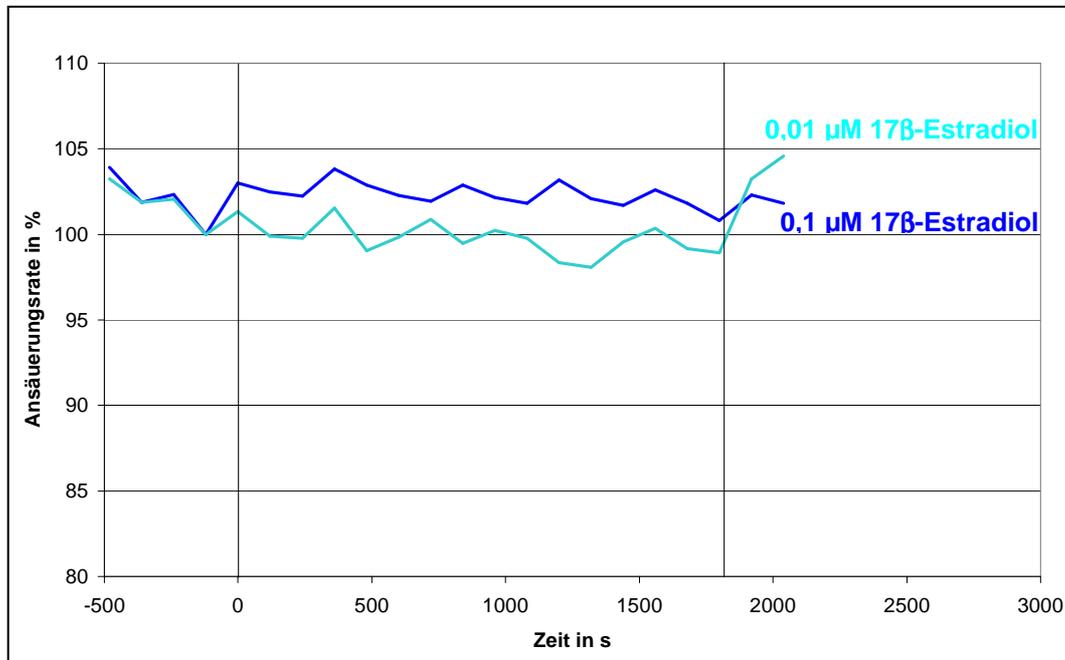


Abb. 41: Extrazelluläre Ansäuerungsrate von Caco-2 Zellen nach 30 Minuten Inkubation mit 17 β -Estradiol. Werte von Kontrollzellen wurden auf 100% gesetzt. Die dargestellten Kurven entstanden nach Subtraktion mit den Lösungsmittelkurven.

Nachdem bei MCF-7 Zellen, die vorwiegend den Estrogen Rezeptor α exprimieren, keine Wirkungen auf die extrazelluläre Ansäuerungsrate zu erkennen ist, wird abschließend noch die Wirkung von 17 β -Estradiol auf Zellen, die den Estrogen Rezeptor β exprimieren, gemessen.

In Abbildung 41 ist der Einfluss von 17 β -Estradiol auf die extrazelluläre Ansäuerungsrate von Caco-2 Zellen nach 30 Minuten Inkubation dargestellt. Es ist zu erkennen, dass analog zu den MCF-7 Zellen kein Effekt zu sehen ist.

6 Diskussion

6.1 Messungen mit dem Biacore-System

6.1.1 Rezeptorverhalten

Der Versuchsansatz für die Messungen beinhaltet die Inkubation des reinen Rezeptors mit dem Phytoestrogen. Da der aufgereinigte Rezeptor frei von jeglichen stabilisierenden Proteinen ist, ist davon auszugehen, dass er nach dem Auftauen stark zur Aggregation neigt. Des Weiteren ist eine Bindung des reinen Rezeptors an die DNA zu erwarten. Dieses Verhalten wird *in vivo* durch die Anlagerung von Chaperonen an die relevanten Bindungsdomänen verhindert. Wie in Abbildung 1 zu sehen ist, ist eine deutliche Bindung des Rezeptors an die Chipoberfläche ohne Inkubation mit Estrogenen vorhanden. In zahlreichen Publikationen [65,66,165-167] wurde postuliert, dass der Rezeptor nur als Dimer mit einem stöchiometrischen Verhältnis für die ER-ERE-Bindung von 2:1 bindet. In unserem Ansatz konnte belegt werden, dass *in vitro* der ER auch ohne Aktivierung bereits an das ERE binden kann. Ob er allerdings als Monomer oder als Dimer an das ERE bindet, kann mit dieser Methode nicht geklärt werden.

Das SPR, das für die Messungen verwendet wird, ist ein massenspezifisches Phänomen. Dies bedeutet, dass das resultierende Signal sowohl abhängig von der Massenkonzentration als auch von der Stoffmengenkonzentration ist.

Das Signal des reinen Rezeptors steigt zeitabhängig an. Dies könnte durch die mögliche Aggregation nach dem Auftauen erklärt werden. Bis zu ca. 60 Minuten nach dem Auftauen kommt es zu einem nahezu linearen Anstieg des Signals. Danach ist keine Aktivierung durch 17β -Estradiol (E2) und damit keine zuverlässige Messung mehr möglich. Daher wurde der im Methodenteil beschriebene Versuchsansatz gewählt. Dabei wird der reine Rezeptor sowohl zum Zeitpunkt 0 min, als auch zum Zeitpunkt 39 min injiziert.

Dazwischen erfolgt die Injektion des internen Standards (15 min; ER + 1 μ M E2) und der zu messenden Substanz (27 min). Dadurch kann zwischen 0 min und 39 min ein Basisliniendrift erfasst werden. Dieser scheint abhängig von Charge, Aliquot und Pufferzusammensetzung (pH-Wert) zu sein.

In seltenen Fällen konnte auch ein negativer Drift des Rezeptors beobachtet werden. Dieser kann dadurch erklärt werden, dass die Rezeptormoleküle sehr schnell degradieren und damit ihre Bindungsfähigkeit für das ERE verlieren.

Im Allgemeinen schwankte der Drift für beide Rezeptoren von -5 bis +6 RU/min.

Es wurden diverse Versuche unternommen, diesen Drift zu unterbinden. So wurde 2 mM EDTA zum Fließpuffer gegeben, um eventuelle komplexierende Ionen abzufangen. Es wurde 1 mM DTT zugegeben, um Disulfidbrücken, die sich möglicherweise bei der Aggregation bilden, zu lösen. Schließlich wurde durch Zugabe von verschiedenen Konzentrationen an hsp90 versucht, die Aggregation zu vermeiden. Allerdings hatte keine der beschriebenen Maßnahmen einen Effekt auf das Rezeptorverhalten.

Änderungen in der Ionenstärke des Fließpuffers durch Erhöhung der NaCl- oder $MgCl_2$ -Konzentration und die Variation des pH-Werts führten sogar zu einem Verlust der Bindungsfähigkeit des ER an das ERE. Dieses Phänomen macht man sich bei der Regeneration der Chipoberfläche zunutze.

Um zuverlässige Messwerte zu erhalten, muss dieser Drift daher für die Messungen jeweils gemessen und anschließend bei der Berechnung der Wirkung der getesteten Substanz berücksichtigt werden.

6.1.2 Einfluss der Phytoestrogene

Mit Hilfe des Biacore-Systems konnte eine Methode etabliert werden, mit der der Einfluss von Phytoestrogenen auf das Bindungsverhalten des ER an das ERE in der DNA gemessen werden kann.

Mit der bisher gängigen Methode, dem Kompetitions-Assay mit radioaktiv markiertem Estradiol, konnte nur das Bindungsverhalten des Estrogens an den Rezeptor untersucht werden. Inwiefern das gebundene Estrogen das Bindungsverhalten an die DNA beeinflusst, konnte nicht abgeschätzt werden. Es war also bisher nicht möglich, durch diese Methode Aussagen darüber zu treffen, ob eine Substanz agonistisch oder antagonistisch wirkt.

In Abbildung 42 ist die klassische estrogenen Signaltransduktion vereinfacht dargestellt. Zu erkennen sind die drei Stufen des klassischen estrogenen Signalweges. Stufe 1 ist die Bindung des Estrogens an den Rezeptor, Stufe 2 die Bindung des aktivierten Rezeptors an das ERE und Stufe 3 die Induktion der Expression verschiedener Zielgene. Anhand dieser Abbildung sollen die Ergebnisse der Messungen mit dem Biacore-System eingeordnet werden.

Im Versuchsansatz erfolgen sowohl Inkubation des Phytoestrogens mit dem Rezeptor (Schritt 1), als auch die Bindung des aktivierten Rezeptors an die DNA (Schritt 2) nacheinander, während die von Kuiper et al. [1,2] gemessenen Bindungsaffinitäten der Phytoestrogene nur den ersten Schritt beschreiben.

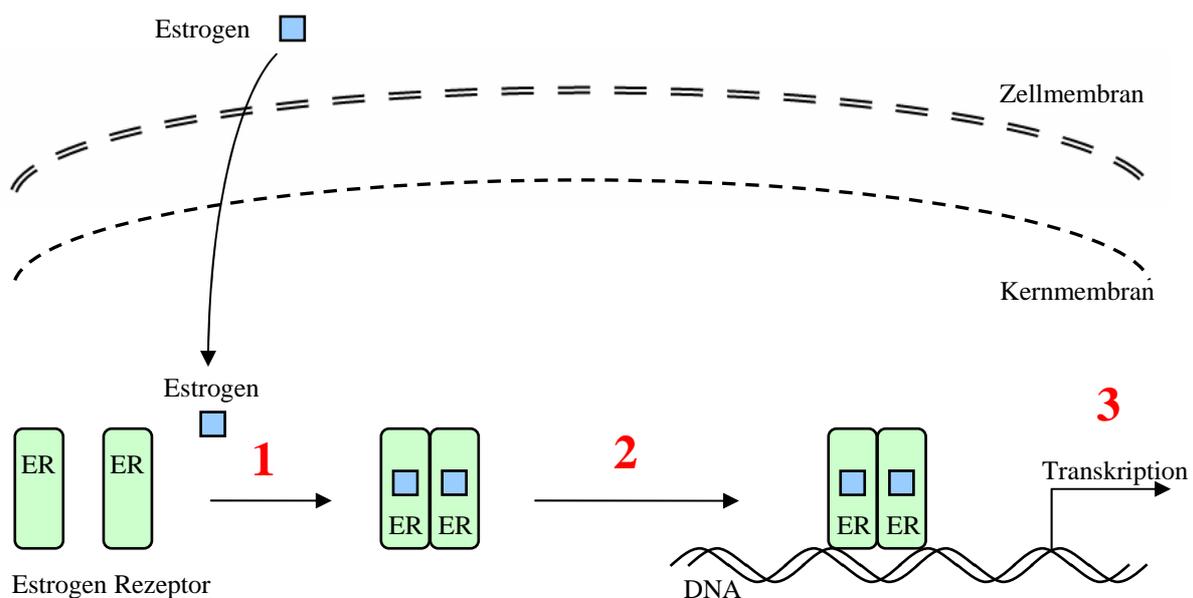


Abb. 42: Vereinfachte Darstellung der klassischen estrogenen Signaltransduktion.

Eine agonistische Wirkung führt letztlich zur estrogenen Wirkung, d.h. zur Transkription von Zielgenen. Antagonistische Wirkungen können nun auftreten, indem zum einen eine Substanz zwar an den Rezeptor bindet, diesen aber dann nicht für eine weitere Bindung an die DNA aktiviert. Zum anderen kann die Verbindung auch bewirken, dass der Rezeptor zwar für eine Bindung an die DNA aktiviert wird, dieser aber anschließend keine Transkription von Zielgenen herbeiführt.

Kommt es nun zu unterschiedlichen Ergebnissen zwischen der Effektivität der Bindung an die DNA (EB_{DNA}) und der Bindungsaffinität der jeweiligen Substanz an den Rezeptor (EB_{ER}), so kann der Einfluss der Substanz auf die Rezeptoraktivierung abgeschätzt werden.

Gleiche Werte für EB_{DNA} und EB_{ER} bedeuten, dass die Aktivierung der Rezeptorbindung in gleichem Maße wie die Bindung an den Rezeptor erfolgt.

$EB_{DNA} \ll EB_{ER}$ bedeutet, dass die Bindung des aktivierten Rezeptors an das ERE schwächer erfolgt als die Bindung des Estrogens an den Rezeptor. Die Substanz bindet also an den Rezeptor, kann ihn aber nicht in gleichem Maße für die Bindung an das ERE aktivieren. Es besteht demnach ein Unterschied in der Effektivität der Rezeptoraktivierung im Vergleich zu 17β -Estradiol.

$EB_{DNA} \gg EB_{ER}$ dagegen bedeutet, dass die Bindung des aktivierten Rezeptors an das ERE stärker erfolgt als die Bindung des Estrogens an den Rezeptor. Die Substanz bindet also an den Rezeptor und aktiviert diesen stärker, als es durch die Bindungsaffinität an den Rezeptor zu erwarten war.

In Tabelle 5 ist ein Vergleich der bisher bekannten Bindungsaffinitäten mit den hier gemessenen Werten dargestellt. Wie Tabelle 5 zeigt, ist für die meisten Verbindungen eine gute Korrelation zwischen den Werten vorhanden. Qualitativ ergibt sich für beide Messwerte die gleiche Wirkungsreihe, während teilweise Unterschiede in den Zahlenwerten vorhanden sind. Diese sind allerdings nicht sehr groß, weshalb anzunehmen ist, dass die Aktivierung des Rezeptors für die getesteten Verbindungen in gleichem Maße erfolgt. Eine Ausnahme scheint der Effektivitätswert für Genistein beim $ER\beta$ zu sein. Allerdings relativieren die verhältnismäßig hohen Standardabweichungen in Abbildung 27 diesen Effekt.

Tab. 5: Vergleich der gemessenen Effektivitäten der Bindung an das ERE mit den Bindungsaffinitäten der jeweiligen Verbindungen, sofern bekannt.

<i>Verbindung</i>	<i>Estrogen Rezeptor α</i>		<i>Estrogen Rezeptor β</i>	
	Effektivität (EB _{DNA})	Bindungsaffinität* (EB _{ER})	Effektivität (EB _{DNA})	Bindungsaffinität* (EB _{ER})
17 β -Estradiol	100	100	100	100
Genistein	0,2	4	8,3	87
Daidzein	<< 0,01	0,1	5,7	0,5
Coumestrol	4,6	20	133	140
Equol	1,3	---	2,2	---
ICI 182,780	300	---	---	---
4'-O-Methylequol	<< 0,3	---	0,9	---
Ethyl daidzein	<< 0,03	---	0,1	---
Matairesinol	<< 0,03	---	<< 0,04	---
Secoisolariciresinol	<< 0,03	---	0,01	---

*Daten nach [1,2]

Für Daidzein ergibt sich beim ER α eine Effektivität die um mehr als eine Größenordnung geringer ist, als die Bindungsaffinität für den ER α . Dies könnte damit zusammenhängen, dass bei der Berechnung der Effektivitäten eine logarithmische Regression verwendet wird, wodurch sich bei sehr geringen Wirkungen die Schwankungen der Methode wesentlich deutlicher bemerkbar machen. Eine weitere mögliche Erklärung könnte aber auch eine

geringere Fähigkeit von Daidzein sein, der ER α für eine Bindung an das ERE zu aktivieren, als es durch die Bindungsaffinität zu erwarten wäre. Beim ER β ist dagegen eine etwa um den Faktor 10 größere Effektivität der Bindungsaktivierung im Vergleich zur Bindungsaffinität vorhanden. Dies spricht für eine bevorzugte Aktivierung des ER β durch Daidzein. Diese Beobachtung steht in Einklang mit den Beobachtungen beim pS2-Assay, in dem durch 10 μ M Daidzein in einer Zelllinie, die vorwiegend den ER α exprimiert, dennoch ein deutlicher Effekt auf der Ebene der Genexpression zu erkennen war.

In Abbildung 22 ist eine Besonderheit von Coumestrol zu erkennen. Ab einer Konzentration von 50 μ M kommt es zu einer kompletten Inhibition der Bindung des ER α an das ERE. Bei niedrigeren Konzentrationen ist dagegen eine lineare Zunahme der Bindung zu erkennen. Eine Erklärung für dieses Verhalten könnte ein denaturierender Effekt von Coumestrol ab dieser Konzentration sein. In der Literatur ist ein solches Verhalten bisher nicht beschrieben. Coumestrol ist also beim ER α bis zu einer Konzentration von 50 μ M als ein Agonist zu betrachten, während ab 50 μ M Coumestrol vollständig antagonistisch auf den ER α wirkt. Dagegen wirkt Coumestrol beim ER β als reiner Agonist.

Mit Equol wurde ein reduktiver Daidzein-Metabolit getestet. Dieser scheint bei beiden Rezeptoren gleichermaßen effektiv eine Bindung an das ERE zu induzieren (Abb. 23 und 30), während die Ausgangssubstanz Daidzein beim ER α zwar keine erkennbare Wirkung zeigt, beim ER β dagegen mit einem Wert von etwa 6 deutlich aktivierend wirkt. Daher kann aus Daidzein, einem spezifischen Aktivator des ER β , durch Umwandlung zu Equol ein Aktivator beider Formen des ER entstehen. Dies ist für Menschen relevant, die in der Lage sind, Daidzein zu Equol zu metabolisieren.

Ein purer Antagonist ist das ICI 182,780. Obwohl vermutet wird, dass ICI die Bindung des Rezeptors an die DNA verhindert, konnte bereits gezeigt werden, dass ein ICI/ER-Komplex zwar an die DNA bindet, aber in einem deutlich geringeren Umfang [74,167]. Es wird daher diskutiert, dass der gebildete Komplex den Transport des Rezeptors in den Kern verhindert und/oder zu einer schnellen Degradation des Rezeptors nach der Bindung führt. In unseren Messungen konnte für den ER α eine deutliche Bindung an das ERE gezeigt werden (Abb. 24). Diese ist sogar stärker als die Bindung des E2-aktivierten Rezeptors. Mit einem

Effektivitätswert von 300 ist das ICI um den Faktor 3 wirksamer als E2. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit den Messungen von Cheskis et al. [168]. Dort konnte auch eine deutliche Aktivierung der Bindung des ICI/ER-Komplexes an das ERE beobachtet werden. Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass die antagonistische Wirkung von ICI später in der Signaltransduktionskaskade stattfinden muss. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass die Transkriptionseinheit inaktiv ist [126,129]. ICI 182,780 manifestiert also seine antagonistische Wirkung dadurch, dass es einen Bindungsplatz am Estrogen Rezeptor belegt, diesen für eine starke Bindung an das ERE aktiviert, den letzten Schritt, die Estrogen Rezeptor-vermittelte Genexpression, aber vollständig inhibiert.

Mit 4'-*O*-Methylequol wurde eine Verbindung getestet, die von Equol abgeleitet ist. Während beim ER α bis zu einer Konzentration von 10 μ M keine Aktivierung der Bindung zu messen war (Tab. 3), wurde beim ER β eine mit Equol vergleichbare Wirkung erzielt (Abb. 32). Ähnlich wie bei den Phytoestrogenen zeigt sich also eine bevorzugte Aktivierung des ER β . Durch Umwandlung von Equol zu 4'-*O*-Methylequol kann es also zu einer Deaktivierung der Wirkung beim ER α kommen.

Für *in vitro* Messungen wird häufig aufgereinigtes Daidzein verwendet. Ethyldaidzein ist eine Verbindung, die nach der Aufreinigung von Daidzein als Begleitsubstanz isoliert werden konnte. Physiologisch scheint sie zwar keine Rolle zu spielen, dennoch wurde ein möglicher Einfluss dieser Verbindung auf das Bindungsverhalten des Rezeptors untersucht.

Da bereits Daidzein beim ER α keine Bindungserhöhung bewirkte, war auch anzunehmen, dass diese Verbindung keine Aktivierung zeigt. Dies war für den ER α auch der Fall (Tab. 3). Dagegen konnte beim ER β mit einem Effektivitätswert von 0,1 eine leichte Aktivierung des Rezeptors beobachtet werden (Abb. 31). In Anbetracht der Tatsache, dass Daidzein selbst beim ER β nur eine recht schwache Erhöhung der Bindung bewirkt, kann bei diesem Effekt nicht von einer vernachlässigbaren Wirkung gesprochen werden. Allerdings relativiert sich dieser Befund durch den mengenmäßigen Überschuss an Daidzein bei der Aufreinigung. Insgesamt scheint durch die Ethylgruppe die Wirkung auf den Rezeptor abgeschwächt zu werden.

Abschließend wurden noch die beiden Vertreter der Lignane, Secoisolariciresinol und Matairesinol getestet. Während Matairesinol bis zu einer Konzentration von 100 μM bei beiden Rezeptoren keine messbare Bindungserhöhung bewirkte (Tab. 3 und Abb. 33), konnte bei Secoisolariciresinol beim $\text{ER}\beta$ eine sehr schwache Aktivierung beobachtet werden, die allerdings um vier Größenordnungen geringer war als die Wirkung von E2 (Abb. 34). Dagegen war beim $\text{ER}\alpha$ kein Effekt erkennbar (Tab.3).

In Abbildung 25 ist die kombinierte Wirkung von Daidzein und 17β -Estradiol dargestellt. Da Daidzein bis zu einer Konzentration von 300 μM keine Aktivierung des $\text{ER}\alpha$ zeigte, war es geeignet, um eine mögliche Inhibierung der Wirkung von E2 beim $\text{ER}\alpha$ zu untersuchen. Es wurde eine Mischung aus Daidzein und E2 eingesetzt, die Daidzein in 1000fachem Überschuss enthielt (100 μM Daidzein + 100 nM E2). Es konnte eine ca. 50%ige Hemmung der E2-Aktivierung durch das anwesende Daidzein beobachtet werden. Damit konnte die antagonistische Wirkung von Daidzein gezeigt werden. In großem Überschuss konkurrieren die Daidzein-Moleküle mit den E2-Molekülen um die Bindung an den $\text{ER}\alpha$. Da eine Bindung eines Daidzein-Moleküls an den Rezeptor keine erhöhte Bindung an das ERE zur Folge hat, wird der Effekt von 100 nM E2 effektiv gehemmt.

6.1.3 Kinetische Analyse

Das Biacore-System bietet die Möglichkeit, die Interaktion zwischen Rezeptor und ERE kinetisch auszuwerten, d.h. die Geschwindigkeitskonstanten für die Assoziation (k_a) und die Dissoziation (k_d) und die Gleichgewichtskonstante (K) zu bestimmen.

In diesem Falle war dies aber nicht möglich, da sich mehrere Reaktionen überlagern können und daher kein Modell für die Beschreibung der Bindung zutreffend ist. In Abbildung 43 sind die möglichen parallel stattfindenden Reaktionen dargestellt.

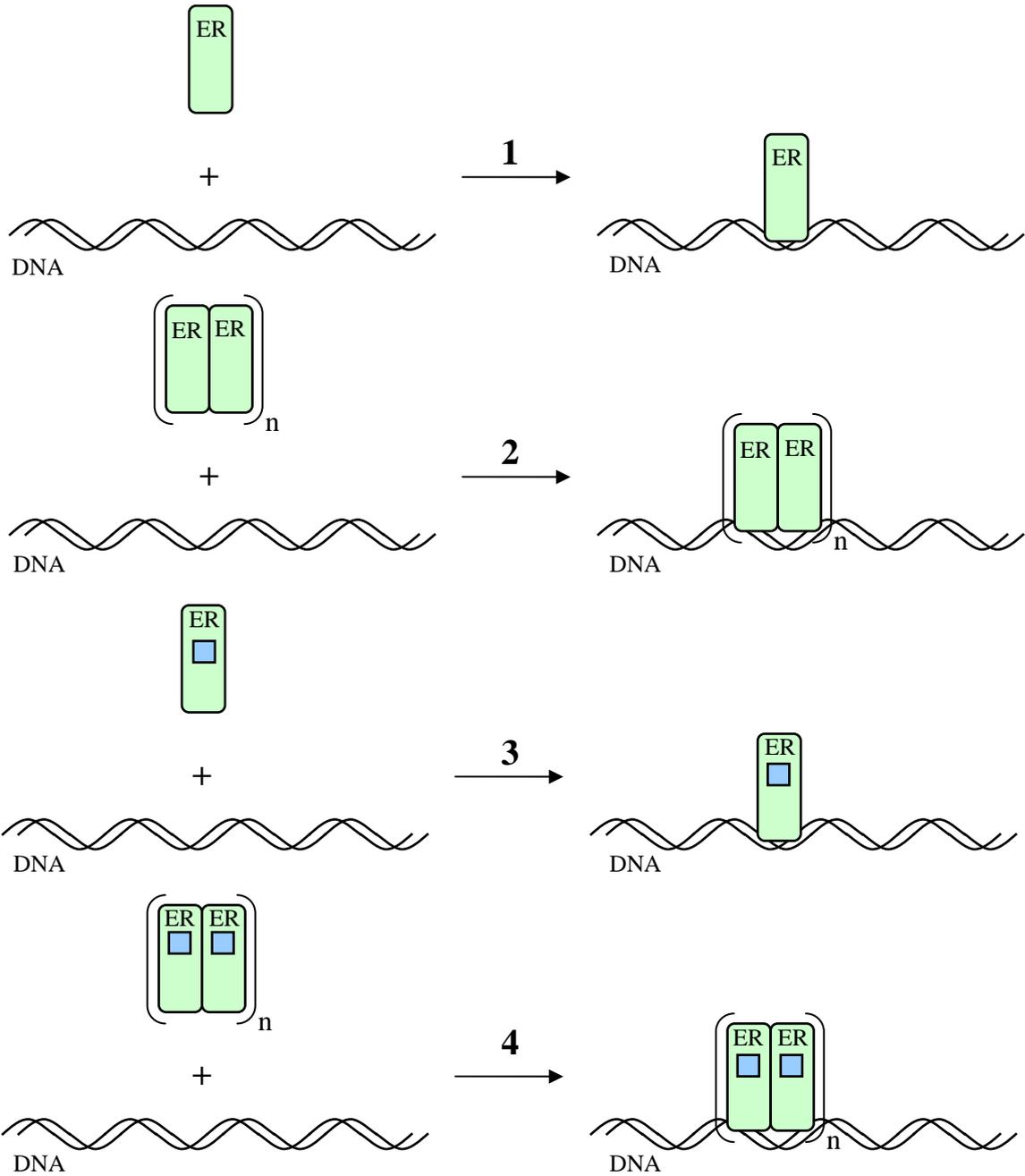


Abb. 43: Mögliche Bindungsreaktionen, die gleichzeitig ablaufen können.

1. Bindung eines nicht-aktivierten Monomers
2. Bindung eines nicht-aktivierten Dimers (Oligomers)
3. Bindung eines aktivierten Monomers
4. Bindung eines aktivierten Dimers (Oligomers)

Diese vier dargestellten Bindungsreaktionen können gleichzeitig stattfinden. Durch Inkubation des Rezeptors mit einem Estrogen wird nur das Verhältnis der Reaktionen untereinander moduliert. Daher kann für dieses Messsystem kein einfaches Bindungsmodell für die Berechnung der Konstanten zugrunde gelegt werden.

6.1.4 Fehlerfaktoren

Um die Zuverlässigkeit der Messungen mit dem Biacore-System gewährleisten zu können, müssen folgende Punkte in Betracht gezogen werden:

1. Wie bereits erwähnt, ist der Basisdrift des Rezeptors abhängig von Charge, Aliquot und Pufferzusammensetzung. Daher ist auf eine gleiche Behandlung der Rezeptorproben zu achten. Durch Mitführung eines internen Standards und einer Messung des Drifts kann dieser Fehler eliminiert werden.
2. Der Absolutwert der E2-Aktivierung ist stark chargenabhängig. So kann die Aktivierung durch E2 von 1,2 bis zu 5-fach schwanken. Je geringer dabei die Aktivierung ist, desto geringer ist der aktivierbare Anteil an ER in der Charge. Dadurch wird die Messung weniger empfindlich und der Fehler automatisch größer. Dieser Fehler kann nur durch die Verwendung einer anderen Charge minimiert werden.

6.2 pS2-Assay

Die Messungen im pS2-Assay wurden durchgeführt, um den Effekt der Phytoestrogene auf den letzten Schritt (Schritt 3) der in Abbildung 42 dargestellten estrogenen Signaltransduktion, die Expression von Zielgenen, zu messen.

Es konnte dadurch die gleiche qualitative Wirkungsreihe erhalten werden (S. 75) wie für die Aktivierung der Bindung des ER α an das ERE. Da die verwendeten MCF-7 Zellen vorwiegend den ER α exprimieren, stimmen diese Ergebnisse mit den mit dem Biacore-System gemessenen Effektivitäten überein. Dies bedeutet, dass die getesteten Substanzen die Genexpression in gleichem Maße induzieren, wie sie die Bindung des Rezeptors an das ERE aktivieren.

Im Falle von Daidzein war bei einer Konzentration von 10 μ M eine Induktion der Genexpression zu erkennen, während bei derselben Konzentration im Biacore-System keine Aktivierung der Bindung des ER α zu messen war. Dies lässt sich zum einen dadurch erklären, dass die Inkubation mit Daidzein im Biacore-System 15 Minuten beträgt, während die Inkubationszeit im pS2-Assay 72 Stunden beträgt. Durch die lange Inkubationszeit kann es zu einer Summierung des Daidzein-Effekts kommen. Zum anderen ist bereits gezeigt worden, dass MCF-7 Zellen zwar den ER α in großem Überschuss exprimieren, daneben aber auch den ER β enthalten [169]. Hier könnte die Daidzein-Wirkung durch den ER β vermittelt werden.

Genistein zeigte bei einer Konzentration von 10 μ M eine mit 10 nM 17 β -Estradiol vergleichbare Wirkung. Dies lässt auf eine um etwa drei Größenordnungen geringere Wirkung auf die Genexpression schließen, was in Einklang mit den mit dem Biacore-System erhaltenen Werten in Tabelle 5 steht.

6.3 ZytoSensor-Messungen

Um zu überprüfen, ob die Wirkungen der Substanzen ausschließlich durch die Genexpression vermittelt werden, oder eventuell auch direkte Wirkungen auf den Metabolismus vorhanden sind, wurden die Messungen mit dem ZytoSensor durchgeführt.

In den Abbildungen 38-40 sind die Ergebnisse für MCF-7 Zellen dargestellt. Es ist zu erkennen, dass nach 30 Minuten Inkubation mit 17β -Estradiol, Genistein oder Daidzein kein Effekt auf die Ansäuerungsrate vorhanden war, während durch die Positivkontrolle EGF ein etwa 15%iger Anstieg auftrat. Um zu untersuchen, ob eine längere Inkubation eine Wirkung herbeiführen kann, wurde 80 Minuten mit Coumestrol bzw. acht Stunden mit E2 inkubiert. Hier war ebenfalls kein Effekt zu beobachten.

Dies bedeutet, dass Phytoestrogene keinen unmittelbaren Einfluss auf den Metabolismus haben und ihre anabole Wirkung hauptsächlich auf der Modulation der Expression verschiedener Zielgene beruhen muss.

Da MCF-7 Zellen vorwiegend den $ER\alpha$ exprimieren, wurde auch ein Versuch mit Caco-2 Zellen durchgeführt, die etwa gleiche Mengen $ER\alpha$ und $ER\beta$ enthalten.

Wie in Abbildung 41 zu erkennen ist, trat auch hier nach 30 Minuten Inkubation kein erkennbarer Effekt auf. Dies bestätigt die Vermutung, dass die anabole Wirkung der Phytoestrogene hauptsächlich über die Genexpression vermittelt wird.

6.4 Physiologische Bedeutung

Der Verzehr von Soja-reicher Nahrung führt zu Plasma-Konzentrationen von 0,5 – 4 μM an Genistein [170,171]. Die in der Literatur beschriebenen nicht ER-vermittelten antiproliferativen Wirkungen von Phytoestrogenen in Zellkultursystemen konnten ab Konzentrationen von 10 μM beobachtet werden [172,173]. Daher scheinen *in vivo* ER-vermittelte Effekte von Phytoestrogenen eine wichtigere Rolle zu spielen als nicht ER-vermittelte.

Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von Phytoestrogenen (etwa 10 nM – 100 μM) und damit die hier gemessenen Effekte besitzen daher eine physiologische Relevanz.

Nach den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen ist davon auszugehen, dass aufgrund des lipophilen Charakters der Phytoestrogene im Zytosol und dem Zellkern, wo letztlich die Interaktionen der Rezeptoren mit der DNA stattfinden, die Inkubationskonzentrationen erreicht werden. Daher sind die Ergebnisse der Messungen mit dem Biacore-System für den getesteten Konzentrationsbereich auf *in vivo* Ereignisse übertragbar.

Estrogene und antiestrogene Wirkungen der Phytoestrogene werden durch Interaktion mit dem ER vermittelt. Daher sind Wechselwirkungen mit dem ER bei diesen Konzentrationen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* von großer Bedeutung. Die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche leisten einen Beitrag zur besseren Charakterisierung der molekularen Mechanismen agonistischer und antagonistischer Wirkungen von Phytoestrogenen.

7 Literatur

1. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta*. *Endocrinology*, 1997. **138**(3): 863-70.
2. Kuiper, G.G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. *Endocrinology*, 1998. **139**(10): 4252-63.
3. Colburn, T. and C. Clement, *Chemically induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection*. 1992, Princeton: Princeton Scientific Publishing.
4. McLachlan, J.A. and K.S. Korach, *Symposium on estrogens in the environment, III*. *Environ Health Perspect*, 1995. **103 Suppl 7**: 3-4.
5. Henderson, B.E., R.K. Ross, and M.C. Pike, *Toward the primary prevention of cancer*. *Science*, 1991. **254**: 1131-1138.
6. Thomas, J.A., *Diet, micronutrients, and the prostate gland*. *Nutr Rev*, 1999. **57**(4): 95-103.
7. Hirayama, T., *Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet*. *Natl Cancer Inst Monogr*, 1979(53): 149-55.
8. Flanders, W.D., *Review: prostate cancer epidemiology*. *Prostate*, 1984. **5**(6): 621-9.
9. Shimizu, H., et al., *Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County*. *Br J Cancer*, 1991. **63**(6): 963-6.
10. Adlercreutz, H., *Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations*. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 1990. **201**: 3-23.
11. Shemesh, M., H.R. Lindner, and N. Ayalon, *Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phytoestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma coumestrol*. *J Reprod Fertil*, 1972. **29**(1): 1-9.
12. Verdeal, K., et al., *Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of coumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors*. *J Natl Cancer Inst*, 1980. **64**(2): 285-90.
13. Makela, S., et al., *Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102**(6-7): 572-8.
14. Makela, S., et al., *Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse*. *Environ Health Perspect*, 1995. **103 Suppl 7**: 123-7.
15. Barnes, S., et al., *Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer*. *Prog Clin Biol Res*, 1990. **347**: 239-53.
16. Kliewer, S.A., J.M. Lehmann, and T.M. Willson, *Orphan nuclear receptors: shifting endocrinology into reverse*. *Science*, 1999. **284**(5415): 757-60.
17. Evans, R.M., *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*, 1988. **240**(4854): 889-95.
18. Mangelsdorf, D.J., et al., *The nuclear receptor superfamily: the second decade*. *Cell*, 1995. **83**(6): 835-9.
19. Meegan, M.J. and D.G. Lloyd, *Advances in the science of estrogen receptor modulation*. *Curr Med Chem*, 2003. **10**(3): 181-210.
20. Griffin, J.E. and S.R. Ojeda, *Textbook of endocrine physiology*. 1996, New York: Oxford University Press.
21. Mueller, S.O. and K.S. Korach, *The Handbook of Environmental Chemistry*. Part L: Endocrine Disruptors, Part I, ed. M. M. Vol. 3. 2001, Berlin: Springer-Verlag.

22. Tsai, M.J. and B.W. O'Malley, *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. Annu Rev Biochem, 1994. **63**: 451-86.
23. Beato, M., P. Herrlich, and G. Schutz, *Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot*. Cell, 1995. **83**(6): 851-7.
24. Ribeiro, R.C., P.J. Kushner, and J.D. Baxter, *The nuclear hormone receptor gene superfamily*. Annu Rev Med, 1995. **46**: 443-53.
25. Klein-Hitpass, L., et al., *A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor*. Nucleic Acids Res, 1988. **16**(2): 647-63.
26. Jackson, T.A., et al., *The partial agonist activity of antagonist-occupied steroid receptors is controlled by a novel hinge domain-binding coactivator L7/SPA and the corepressors N-CoR or SMRT*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(6): 693-705.
27. Montano, M.M., et al., *The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(7): 814-25.
28. Norris, J.D., et al., *Identification of a third autonomous activation domain within the human estrogen receptor*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(6): 747-54.
29. Chambraud, B., et al., *Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes*. J Biol Chem, 1990. **265**(33): 20686-91.
30. Picard, D. and K.R. Yamamoto, *Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor*. Embo J, 1987. **6**(11): 3333-40.
31. Peters, G.A. and S.A. Khan, *Estrogen receptor domains E and F: role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(2): 286-96.
32. Greene, G.L., et al., *Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA*. Science, 1986. **231**(4742): 1150-4.
33. Green, S., et al., *Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A*. Nature, 1986. **320**(6058): 134-9.
34. Kuiper, G.G., et al., *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(12): 5925-30.
35. Mosselman, S., J. Polman, and R. Dijkema, *ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor*. FEBS Lett, 1996. **392**(1): 49-53.
36. White, R., et al., *Structural organization and expression of the mouse estrogen receptor*. Mol Endocrinol, 1987. **1**(10): 735-44.
37. Enmark, E., et al., *Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern*. J Clin Endocrinol Metab, 1997. **82**(12): 4258-65.
38. Ogawa, S., et al., *The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **243**(1): 122-6.
39. Leygue, E., et al., *Estrogen receptor beta: mine is longer than yours?* J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(10): 3754-5.
40. Moore, J.T., et al., *Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms*. Biochem Biophys Res Commun, 1998. **247**(1): 75-8.
41. Fuqua, S.A., G.C. Chamness, and W.L. McGuire, *Estrogen receptor mutations in breast cancer*. J Cell Biochem, 1993. **51**(2): 135-9.
42. Fuqua, S.A. and D.M. Wolf, *Molecular aspects of estrogen receptor variants in breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 1995. **35**(3): 233-41.
43. Hopp, T.A. and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor variants*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 1998. **3**(1): 73-83.
44. Leygue, E.R., P.H. Watson, and L.C. Murphy, *Estrogen receptor variants in normal human mammary tissue*. J Natl Cancer Inst, 1996. **88**(5): 284-90.

45. Murphy, L.C., et al., *Estrogen receptor variants and mutations*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **62**(5-6): 363-72.
46. Petersen, D.N., et al., *Identification of estrogen receptor beta2, a functional variant of estrogen receptor beta expressed in normal rat tissues*. Endocrinology, 1998. **139**(3): 1082-92.
47. Encarnacion, C.A. and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor variants in breast cancer*. Cancer Treat Res, 1994. **71**: 97-109.
48. Leygue, E., et al., *Expression of estrogen receptor beta1, beta2, and beta5 messenger RNAs in human breast tissue*. Cancer Res, 1999. **59**(6): 1175-9.
49. Catherino, W.H., D.M. Wolf, and V.C. Jordan, *A naturally occurring estrogen receptor mutation results in increased estrogenicity of a tamoxifen analog*. Mol Endocrinol, 1995. **9**(8): 1053-63.
50. Couse, J.F., et al., *Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse*. Endocrinology, 1997. **138**(11): 4613-21.
51. Shughrue, P.J., et al., *Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ER-alpha) and beta (ER-beta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract*. Steroids, 1998. **63**(10): 498-504.
52. Saunders, P.T., et al., *Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) occurs in multiple cell types, including some germ cells, in the rat testis*. J Endocrinol, 1998. **156**(3): R13-7.
53. Pedeutour, F., et al., *Localization and expression of the human estrogen receptor beta gene in uterine leiomyomata*. Genes Chromosomes Cancer, 1998. **23**(4): 361-6.
54. Sar, M. and F. Welsch, *Differential expression of estrogen receptor-beta and estrogen receptor-alpha in the rat ovary*. Endocrinology, 1999. **140**(2): 963-71.
55. Mitchner, N.A., C. Garlick, and N. Ben-Jonathan, *Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland*. Endocrinology, 1998. **139**(9): 3976-83.
56. Ankrom, M.A., et al., *Age-related changes in human oestrogen receptor alpha function and levels in osteoblasts*. Biochem J, 1998. **333** (Pt 3): 787-94.
57. Nilsson, L.O., et al., *Demonstration of estrogen receptor-beta immunoreactivity in human growth plate cartilage*. J Clin Endocrinol Metab, 1999. **84**(1): 370-3.
58. Onoe, Y., et al., *Expression of estrogen receptor beta in rat bone*. Endocrinology, 1997. **138**(10): 4509-12.
59. Register, T.C. and M.R. Adams, *Coronary artery and cultured aortic smooth muscle cells express mRNA for both the classical estrogen receptor and the newly described estrogen receptor beta*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **64**(3-4): 187-91.
60. Ciocca, D.R. and L.M. Roig, *Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications*. Endocr Rev, 1995. **16**(1): 35-62.
61. Knobil, E. and J.D. Neill, *The Physiology of Reproduction*. Vol. 1 and 2. 1994, New York: Raven Press.
62. Gruber, C.J., et al., *Production and actions of estrogens*. N Engl J Med, 2002. **346**(5): 340-52.
63. Buchner, J., *Hsp90 & Co. - a holding for folding*. Trends Biochem Sci, 1999. **24**(4): 136-41.
64. Brzozowski, A.M., et al., *Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor*. Nature, 1997. **389**(6652): 753-8.
65. Moras, D. and H. Gronemeyer, *The nuclear receptor ligand-binding domain: structure and function*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(3): 384-91.
66. Katzenellenbogen, B.S., et al., *Hormone binding and transcription activation by estrogen receptors: analyses using mammalian and yeast systems*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. **47**(1-6): 39-48.
67. Freedman, L.P. and B.F. Luisi, *On the mechanism of DNA binding by nuclear hormone receptors: a structural and functional perspective*. J Cell Biochem, 1993. **51**(2): 140-50.
68. Cowley, S.M., et al., *Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA*. J Biol Chem, 1997. **272**(32): 19858-62.

69. Pace, P., et al., *Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha*. J Biol Chem, 1997. **272**(41): 25832-8.
70. Pettersson, K., et al., *Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(10): 1486-96.
71. Ignar-Trowbridge, D.M., et al., *Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(8): 992-8.
72. Berry, M., D. Metzger, and P. Chambon, *Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen*. Embo J, 1990. **9**(9): 2811-8.
73. Tzukerman, M.T., et al., *Human estrogen receptor transactivational capacity is determined by both cellular and promoter context and mediated by two functionally distinct intramolecular regions*. Mol Endocrinol, 1994. **8**(1): 21-30.
74. McDonnell, D.P., et al., *Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor*. Ann N Y Acad Sci, 1995. **761**: 121-37.
75. Webb, P., et al., *The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions*. Mol Endocrinol, 1999. **13**(10): 1672-85.
76. Cerillo, G., et al., *The oestrogen receptor regulates NFkappaB and AP-1 activity in a cell-specific manner*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **67**(2): 79-88.
77. Porter, W., et al., *Functional synergy between the transcription factor Sp1 and the estrogen receptor*. Mol Endocrinol, 1997. **11**(11): 1569-80.
78. McKay, L.I. and J.A. Cidlowski, *Cross-talk between nuclear factor-kappa B and the steroid hormone receptors: mechanisms of mutual antagonism*. Mol Endocrinol, 1998. **12**(1): 45-56.
79. Sommer, S. and S.A. Fuqua, *Estrogen receptor and breast cancer*. Semin Cancer Biol, 2001. **11**(5): 339-52.
80. Chen, D., et al., *Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(2): 1002-15.
81. Aronica, S.M. and B.S. Katzenellenbogen, *Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I*. Mol Endocrinol, 1993. **7**(6): 743-52.
82. Gangolli, E.A., O.M. Conneely, and B.W. O'Malley, *Neurotransmitters activate the human estrogen receptor in a neuroblastoma cell line*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1997. **61**(1-2): 1-9.
83. Auricchio, F., et al., *The role of estradiol receptor in the proliferative activity of vanadate on MCF-7 cells*. Cell Growth Differ, 1995. **6**(2): 105-13.
84. Zwijnen, R.M., et al., *CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1*. Cell, 1997. **88**(3): 405-15.
85. Shiau, A.K., et al., *The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen*. Cell, 1998. **95**(7): 927-37.
86. Tanenbaum, D.M., et al., *Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(11): 5998-6003.
87. Pike, A.C., et al., *Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist*. Embo J, 1999. **18**(17): 4608-18.
88. Pike, A.C., et al., *Structural insights into the mode of action of a pure antiestrogen*. Structure (Camb), 2001. **9**(2): 145-53.
89. Pike, A.C., A.M. Brzozowski, and R.E. Hubbard, *A structural biologist's view of the oestrogen receptor*. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000. **74**(5): 261-8.
90. Feng, W., et al., *Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors*. Science, 1998. **280**(5370): 1747-9.

91. Sabbah, M., et al., *Oestrogen receptor facilitates the formation of preinitiation complex assembly: involvement of the general transcription factor TFIIIB*. *Biochem J*, 1998. **336** (Pt 3): 639-46.
92. McInerney, E.M. and B.S. Katzenellenbogen, *Different regions in activation function-1 of the human estrogen receptor required for antiestrogen- and estradiol-dependent transcription activation*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(39): 24172-8.
93. Onate, S.A., et al., *Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily*. *Science*, 1995. **270**(5240): 1354-7.
94. Glass, C.K., D.W. Rose, and M.G. Rosenfeld, *Nuclear receptor coactivators*. *Curr Opin Cell Biol*, 1997. **9**(2): 222-32.
95. Halachmi, S., et al., *Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription*. *Science*, 1994. **264**(5164): 1455-8.
96. Cavailles, V., et al., *Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor*. *Embo J*, 1995. **14**(15): 3741-51.
97. Onate, S.A., et al., *The steroid receptor coactivator-1 contains multiple receptor interacting and activation domains that cooperatively enhance the activation function 1 (AF1) and AF2 domains of steroid receptors*. *J Biol Chem*, 1998. **273**(20): 12101-8.
98. Thenot, S., et al., *Differential interaction of nuclear receptors with the putative human transcriptional coactivator hTIF1*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(18): 12062-8.
99. McDonnell, D.P., E. Vegeto, and B.W. O'Malley, *Identification of a negative regulatory function for steroid receptors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1992. **89**(22): 10563-7.
100. Treuter, E., et al., *A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation*. *Mol Endocrinol*, 1998. **12**(6): 864-81.
101. Chakravarti, D., et al., *Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling*. *Nature*, 1996. **383**(6595): 99-103.
102. Hanstein, B., et al., *p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(21): 11540-5.
103. Lanz, R.B., et al., *A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex*. *Cell*, 1999. **97**(1): 17-27.
104. Chen, J.D. and R.M. Evans, *A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors*. *Nature*, 1995. **377**(6548): 454-7.
105. Horlein, A.J., et al., *Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor*. *Nature*, 1995. **377**(6548): 397-404.
106. McKenna, N.J., R.B. Lanz, and B.W. O'Malley, *Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology*. *Endocr Rev*, 1999. **20**(3): 321-44.
107. Montano, M.M., et al., *An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. **96**(12): 6947-52.
108. Truss, M. and M. Beato, *Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors*. *Endocr Rev*, 1993. **14**(4): 459-79.
109. Klein-Hitpass, L., et al., *An estrogen-responsive element derived from the 5' flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells*. *Cell*, 1986. **46**(7): 1053-61.
110. Dana, S.L., et al., *Novel estrogen response elements identified by genetic selection in yeast are differentially responsive to estrogens and antiestrogens in mammalian cells*. *Mol Endocrinol*, 1994. **8**(9): 1193-207.
111. van der Burg, B., et al., *Direct stimulation by estrogen of growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **43**(1-3): 111-5.
112. Rivera-Gonzalez, R., et al., *Estrogen-induced genes in the uterus of ovariectomized rats and their regulation by droloxifene and tamoxifen*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1998. **64**(1-2): 13-24.
113. De Bortoli, M., et al., *Hormonal regulation of c-erbB-2 oncogene expression in breast cancer cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **43**(1-3): 21-5.

114. Rochefort, H., *Oestrogen- and anti-oestrogen-regulated genes in human breast cancer*. Ciba Found Symp, 1995. **191**: 254-65; discussion 265-8.
115. Rochefort, H., F. Capony, and M. Garcia, *Cathepsin D: a protease involved in breast cancer metastasis*. Cancer Metastasis Rev, 1990. **9**(4): 321-31.
116. Prall, O.W., E.M. Rogan, and R.L. Sutherland, *Estrogen regulation of cell cycle progression in breast cancer cells*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1998. **65**(1-6): 169-74.
117. Weisz, A. and F. Bresciani, *Estrogen regulation of proto-oncogenes coding for nuclear proteins*. Crit Rev Oncog, 1993. **4**(4): 361-88.
118. May, F.E. and B.R. Westley, *Estrogen regulated messenger RNAs in human breast cancer cells*. Biomed Pharmacother, 1995. **49**(9): 400-14.
119. Oursler, M.J., *Estrogen regulation of gene expression in osteoblasts and osteoclasts*. Crit Rev Eukaryot Gene Expr, 1998. **8**(2): 125-40.
120. Pelzer, T., A. Shamim, and L. Neyses, *Estrogen effects in the heart*. Mol Cell Biochem, 1996. **160-161**: 307-13.
121. Mitlak, B.H. and F.J. Cohen, *In search of optimal long-term female hormone replacement: the potential of selective estrogen receptor modulators*. Horm Res, 1997. **48**(4): 155-63.
122. Barton, H.A. and M.E. Andersen, *Endocrine active compounds: from biology to dose response assessment*. Crit Rev Toxicol, 1998. **28**(4): 363-423.
123. Jordan, V.C., *Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: today and tomorrow*. J Natl Cancer Inst, 1998. **90**(13): 967-71.
124. Jordan, V.C. and M. Morrow, *Tamoxifen, raloxifene, and the prevention of breast cancer*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): 253-78.
125. Cosman, F. and R. Lindsay, *Selective estrogen receptor modulators: clinical spectrum*. Endocr Rev, 1999. **20**(3): 418-34.
126. MacGregor, J.I. and V.C. Jordan, *Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action*. Pharmacol Rev, 1998. **50**(2): 151-96.
127. Wakeling, A.E. and J. Bowler, *ICI 182,780, a new antioestrogen with clinical potential*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1992. **43**(1-3): 173-7.
128. Wakeling, A.E., M. Dukes, and J. Bowler, *A potent specific pure antiestrogen with clinical potential*. Cancer Res, 1991. **51**(15): 3867-73.
129. Gibson, M.K., et al., *The mechanism of ICI 164,384 antiestrogenicity involves rapid loss of estrogen receptor in uterine tissue*. Endocrinology, 1991. **129**(4): 2000-10.
130. Safe, S., et al., *Human Exposure to Endocrine-Active Chemicals: Hazard Assessment Problems*. Regul Toxicol Pharmacol, 1997. **26**(1): 52-8.
131. Safe, S.H., *Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?* Environ Health Perspect, 1995. **103**(4): 346-51.
132. Korach, K.S., et al., *Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes*. Mol Pharmacol, 1988. **33**(1): 120-6.
133. Shelby, M.D., et al., *Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays*. Environ Health Perspect, 1996. **104**(12): 1296-300.
134. Steinmetz, R., et al., *The xenoestrogen bisphenol A induces growth, differentiation, and c-fos gene expression in the female reproductive tract*. Endocrinology, 1998. **139**(6): 2741-7.
135. Ramamoorthy, K., et al., *Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism*. Endocrinology, 1997. **138**(4): 1520-7.
136. Jordan, V.C. and S.P. Robinson, *Species-specific pharmacology of antiestrogens: role of metabolism*. Fed Proc, 1987. **46**(5): 1870-4.

137. Coward, L., et al., *Genistein, daidzein, and their b-glycoside conjugates: antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets.* J Agric Food Chem, 1993. **41**: 1961-67.
138. Murphy, P.A., *Phytoestrogen content of processed soybean products.* Food Technol, 1982. **36**: 62-64.
139. Wang, H.J. and P.A. Murphy, *Isoflavone content in commercial soybean foods.* J Agric Food Chem, 1994. **42**: 1666-73.
140. Joannou, G.E., et al., *A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids.* J Steroid Biochem Mol Biol, 1995. **54**(3-4): 167-84.
141. Franke, A.A., et al., *Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine.* Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **208**(1): 18-26.
142. Axelson, M., et al., *Origin of lignans in mammals and identification of a precursor from plants.* Nature, 1982. **298**(5875): 659-60.
143. Setchell, K.D. and H. Adlercreutz, *Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism and biological role in health and disease, in Role of the Gut Flora in Toxicity and Cancer*, I. Rowland, Editor. 1988, London: Academic: London. 315-45.
144. Adlercreutz, H., H. Markkanen, and S. Watanabe, *Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men.* Lancet, 1993. **342**(8881): 1209-10.
145. Setchell, K.D., *Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants.* J Nutr, 2000. **130**(3): 654S-5S.
146. Le Bail, J.C., et al., *Aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids.* Cancer Lett, 1998. **133**(1): 101-6.
147. Makela, S., et al., *Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens.* Proc Soc Exp Biol Med, 1995. **208**(1): 51-9.
148. Makela, S., et al., *Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells.* Proc Soc Exp Biol Med, 1998. **217**(3): 310-6.
149. Shutt, D.A. and R.I. Cox, *Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro.* J Endocrinol, 1972. **52**(2): 299-310.
150. Cassidy, A., *Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens.* Curr Opin Lipidol, 1999. **10**(1): 47-52.
151. Akiyama, T., et al., *Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases.* J Biol Chem, 1987. **262**(12): 5592-5.
152. Polkowski, K. and A.P. Mazurek, *Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data.* Acta Pol Pharm, 2000. **57**(2): 135-55.
153. Nagata, K. and H. Handa, *Real-Time Analysis of Biomolecular Interactions.* 2000, Tokyo: Springer-Verlag.
154. Kapiotis, S., et al., *Genistein, the dietary-derived angiogenesis inhibitor, prevents LDL oxidation and protects endothelial cells from damage by atherogenic LDL.* Arterioscler Thromb Vasc Biol, 1997. **17**: 2868-74.
155. De Whalley, C.V., et al., *Flavonoids inhibit the oxidative modification of low density lipoproteins by macrophages.* Biochem Pharm, 1990. **39**: 1743-50.
156. Kanazawa, T., et al., *Protective effects of soy proteins on the peroxidizability of lipoproteins in cerebrovascular disease.* J Nutr, 1995. **125**: 639-646.
157. Ruiz-Larrea, M.B., et al., *Antioxidant activity of phytoestrogenic isoflavones.* Free Radic Res, 1997. **26**: 63-70.
158. Wei, H.C., et al., *Inhibition of tumor promoter-induced hydrogen peroxide formation in vitro and in vivo by genistein.* Nutr Cancer, 1993. **20**: 1-12.
159. Sekizaki, H., et al., *Synthesis of isoflavones and their attracting activity to Aphanomyces euteiches zoospore.* Biol Pharm Bull, 1993. **16**: 698-701.

160. Obourn, J.D., N.J. Koszewski, and A.C. Notides, *Hormone- and DNA-binding mechanisms of the recombinant human estrogen receptor*. *Biochemistry*, 1993. **32**(24): 6229-36.
161. Kretschmann, E. and H. Raether, *Surface Plasmon Resonance*. *Z Naturforschung*, 1968. **23**: 2135.
162. Liedberg, B., *Surface Plasmon Resonance*. *Sensors and Actuators*, 1983. **4**: 299.
163. Biacore, *BIAtchnology Handbook*. 1998, Uppsala, Sweden: Biacore AB.
164. Klinge, C.M., et al., *Cooperative estrogen receptor interaction with consensus or variant estrogen responsive elements in vitro*. *Cancer Res*, 1992. **52**(5): 1073-81.
165. Klinge, C.M., R.A. Bambara, and R. Hilf, *Antiestrogen-liganded estrogen receptor interaction with estrogen responsive element DNA in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1992. **43**(4): 249-62.
166. Klinge, C.M., et al., *Dissociation of 4-hydroxytamoxifen, but not estradiol or tamoxifen aziridine, from the estrogen receptor as the receptor binds estrogen response element DNA*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1996. **57**(1-2): 51-66.
167. Curtis, S.W. and K.S. Korach, *Uterine estrogen receptor-DNA complexes: effects of different ERE sequences, ligands, and receptor forms*. *Mol Endocrinol*, 1991. **5**(7): 959-66.
168. Cheskis, B.J., S. Karathanasis, and C.R. Lyttle, *Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): 11384-91.
169. Campbell-Thompson, M., J. Lynch and B. Bhardwaj, *Expression of Estrogen Receptor (ER) Subtypes and ER β Isoforms in Colon Cancer*. *Cancer Res*, 2001. **61**: 632-640.
170. Morton, M.S., et al., *Determination of lignans and isoflavonoids in human female plasma following dietary supplementation*. *J Endocr*, 1994. **142**: 251-259.
171. Barnes, S., *Effect of genistein on in vitro and in vivo models of cancer*. *J Nutr*, 1995. **125**: 777-783.
172. Markiewicz, L., et al., *In vitro bioassays of nonsteroidal phytoestrogens*. *J Steroid Biochem Molec Biol*, 1993. **45**: 399-405.
173. Messina, M., *Soy intake and cancer risk: a review of the in vitro and in vivo data*. *Nutr Cancer*, 1994. **21**: 113-131.

8 Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

BTA	-	basaler Transkriptionsapparat
Caco-2	-	menschliche Dickdarmkrebszelllinie
DBD	-	DNA-Bindungsdomäne
DEPC	-	Diethylpyrocarbonat
DMSO	-	Dimethylsulfoxid
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
DTT	-	1,4-Dithiothreitol
E2	-	17 β -Estradiol
EAC	-	estrogen aktive Substanz
EC50	-	ein 50% der Wirkung entsprechender Wert
EDC	-	N-Ethyl-N'-(Dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	-	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	-	Epidermal Growth Factor
ER	-	Estrogen Rezeptor
ERE	-	Estrogen Response Element
Fc	-	Flow Cell
FKS	-	Fötales Kälberserum
HBS-EP	-	HEPES-Puffer mit EDTA und Tensid

HEPES	-	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPRT	-	Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase
Hsp	-	Hitzeschockprotein
LBD	-	Ligandenbindungsdomäne
MCF-7	-	Menschliche Brustkrebszelllinie
MEM	-	Minumum Essential Medium
MOPS	-	3-Morpholino-1-propansulfonsäure
MW	-	Mittelwert
NHS	-	N-Hydroxysuccinimid
NLS	-	Kernlokalisierungssignal
OHT	-	4-Hydroxytamoxifen
PBS	-	Phosphat-gepufferte Salzlösung
pS2	-	Präsenilin
RT-PCR	-	Reverse Transkriptase Polymerase-Kettenreaktion
RU	-	Resonance Unit
SDS	-	Natriumdodecylsulfat
SERM	-	selektiver Estrogen Rezeptor Modulator
SHG	-	Sex-Hormon bindendes Globulin
SHR	-	Steroidhormonrezeptor
TrisHCl	-	Tris(hydroxymethyl)-aminomethanhydrochlorid
VK	-	Variationskoeffizient

8.2 Liste der verwendeten Chemikalien

17 β -Estradiol	Calbiochem, Bad Soden
4'- <i>O</i> -Methylequol	Synthese durch Wähälää et al., Helsinki, Finland
Agarose	Carl Roth, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt
Biotinylierte Oligonukleotide	Carl Roth, Karlsruhe
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Chloroform	Merck, Darmstadt
Coumestrol	Eastman Kodak Company
Daidzein	TCI, Tokyo, Kasei, Japan
DEPC	Sigma, Deisenhofen
DMSO	Sigma, Deisenhofen
EDC	Biacore, Freiburg, Freiburg
EDTA	Merck, Darmstadt
Equol	Plantech, York, UK
Estrogen Rezeptor α und β	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol p.a.	Merck, Darmstadt

Ethanolamin	Biacore, Freiburg, Freiburg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Ethylidaidzein	Isolation durch G. Jerz et al., Universität Braunschweig
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Formamid	Merck, Darmstadt
FKS	Sigma, Deisenhofen
FKS – steroidhormonfrei	C-C-pro, Neustadt/Weinstrasse
Genistein	TCI, Tokyo, Kasei, Japan
Glycerol	Merck, Darmstadt
Guanidin-Isothiocyanat	Merck, Darmstadt
HBS-EP	Biacore, Freiburg, Freiburg
HSP90	Invitrogen, Karlsruhe
ICI 182,780	Tocris, Köln
Isoamylalkohol	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Sigma, Deisenhofen
MgCl ₂ (6H ₂ O)	Merck, Darmstadt
Matairesinol	Plantech, York, UK
MEM	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
MOPS	Sigma, Deisenhofen
Natriumacetat	Merck, Darmstadt

NaCl	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
NEAA (nicht-essenzielle Aminosäuren)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
NHS	Biacore, Freiburg, Freiburg
PCR-Primer	Carl Roth, Karlsruhe
Phenol	Merck, Darmstadt
RPMI 1640	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI 1640 – phenolrotfrei	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Sarkosyl	Sigma, Deisenhofen
Secoisolariciresinol	Plantech, York, UK
SDS	Merck, Darmstadt
Streptavidin	Calbiochem, Bad Soden
Tris	Merck, Darmstadt
TrisHCl	Merck, Darmstadt

8.3 Liste der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien

Amine Coupling Kit	Biacore, Freiburg
Biacore X - Komplettsystem	Biacore, Freiburg
Biamaintenance Kit	Biacore, Freiburg
Brutschrank	Heraeus, Hanau
Digitalwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationssystem	Biorad, München
Gelkammer + Netzgerät	Biometra, Göttingen
Einweg-Pipetten	Costar/Corning, USA
Kanülen	Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	Nalgene, Hamburg
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen
Kulturflaschen	Costar/Corning, USA
Küvetten	Hellma, Müllheim
Lochplatten	Costar/Corning, USA
Magnetrührer	Ika, Staufen
Mikroskop	Nikon, Düsseldorf
Neubauer-Zählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Reaktionsgefäße	ABgene, UK
pH-Messgerät	Mettler Toledo, CH

Photometer	Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim
Pipetten	Eppendorf, Köln
Pipettenspitzen	Eppendorf, Köln
Pipettierhilfe Pipetus	Hirschmann, Eberstadt
Ready-To-Go-PCR-Kit	Amersham, Freiburg
Reaktionsgefäße, 1,5/2 ml	Eppendorf, Köln
Reaktionsgefäße, 15/50 ml	Greiner, Frickenhausen
Spritzen	Braun, Melsungen
Sterilbank	Heraeus, Hanau
Stickstoffbehälter	Air Liquide, Düsseldorf
Thermocycler	MJ Research, USA
Tiefkühlschrank	Forma Scientific, USA
Transwell-Kulturplatten für Zytosensor	Costar/Corning, USA
Ultraschall-Bad	Elma, Singen
Vakuum-Zentrifuge	Heto, DK
Vortex Genie 2	Scientific Industries, USA
Wasserbad	Braun, Melsungen
Zentrifuge, klein	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, groß	Jouan, Dreieich
Zytosensorsystem mit Computer	Molecular Devices GmbH, München

8.4 Verwendete Lösungen und Puffer

8.4.1 Biacore-Messungen

Fließpuffer (in 200 ml)

TrisHCl	1,57 g	} pH 7,5 mit 1 N NaOH
NaCl	1,75 g	
MgCl ₂ (6H ₂ O)	0,4 g	
Tween 20	40 µl	
H ₂ O _{bidet.}	200 ml	

Regenerationslösung

NaCl	0,25 M
NaOH	25 mM

HBS-EP

HEPES (pH 7,4)	0,01 M
NaCl	0,15 M
EDTA	3 mM
Sufac tant P20	0,005%

Chipaktivierung

EDC (750 mg/10 ml)	40 μ l
NHS (115 mg/10 ml)	40 μ l

Streptavidin-Lösung

Streptavidin (1 mg/0,5 ml)	10 μ l
Acetatpuffer (pH 5,0)	56 μ l

8.4.2 Zellkultur

MCF-7 Medium

RPMI 1640	500 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
NEAA (100x)	5 ml
Penicilin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
FKS	10%
L-Glutamin	150 mg

MCF-7 Magermedium

RPMI 1640 (phenolrotfrei)	500 ml
Natriumpyruvat (100 mM)	5 ml
NEAA (100x)	5 ml
Penicilin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
FKS (steroidhormonfrei)	5%
L-Glutamin	150 mg

Caco-2 Medium

MEM	500 ml
NEAA (100x)	5ml
Penicilin	100 U/ml
Streptomycin	100 µg/ml
FKS	10%

8.4.3 RNA-Isolation und PCR

Denaturierungslösung

H ₂ O	293 ml
Guanidin-Isothiocyanat	250 g
Natriumcitrat (0,75 M), pH 7,0	17,6 ml
Sarkosyl, 10%	26,4 ml
β-Mercaptoethanol	7 µl/ml

PBS

a) NaCl	22,8 g/l
Na ₂ HPO ₄	4,25 g/l
b) NaCl	22,8 g/l
NaH ₂ PO ₄	4,13 g/l
a) und b)	1:1 mischen

Chloroform/Isoamylalkohol

Chloroform	49 ml
Isoamylalkohol	1 ml

MOPS (10x)

DEPC-H ₂ O	800 ml	}	pH 7,0 mit 1 N NaOH
MOPS	41,8 g		
DEPC-Natriumacetat (3 M)	16,6 ml		
DEPC-EDTA (pH 8)	20 ml		
DEPC-H ₂ O	→ 1l		

RNA-Gelzusammensetzung

Agarose	0,6 g
MOPS (10x)	5 ml
DEPC-H ₂ O	37,5 ml
Formaldehyd	7,5 ml

TBE (10x)

Tris	108 g/l	}	pH 7,9 mit 1 N HCl
Borsäure	55 g/l		
EDTA	7,4 g/l		
DEPC-H ₂ O	→ 1l		

Blue Juice

EDTA (0,25 M)	1,5 ml
Glycerol (wasserfrei)	2 ml
Bromphenolblau (5 mg/ml)	0,4 ml

8.5 Sequenzen der im Biacore-System verwendeten Oligonukleotide

Folgende modifizierte Oligonukleotide wurden für die Herstellung der Chipoberflächen im Biacore-System verwendet:

spezifisches Oligonukleotid (ERE+)

3'-AGC TCT TTG ATC **AGG TCA** CTG **TGA CCT** GAA CTT ACT CCC CCC GAG CAA
GTT CAG GTC ACA GTG ACC TGA TCA AAG A-5'-**biotin**

unspezifisches Oligonukleotid (ERE-)

biotin-3'-AGC TCT TTG ATC TTG ATC GAA CTA CTC GAA CTT ACT CCC CCC GAG
CAA GTT CGA GCA GTT CGA TCA AGA TCA AAG A-5'

8.6 Exemplarische Darstellung eines Sensorgramms

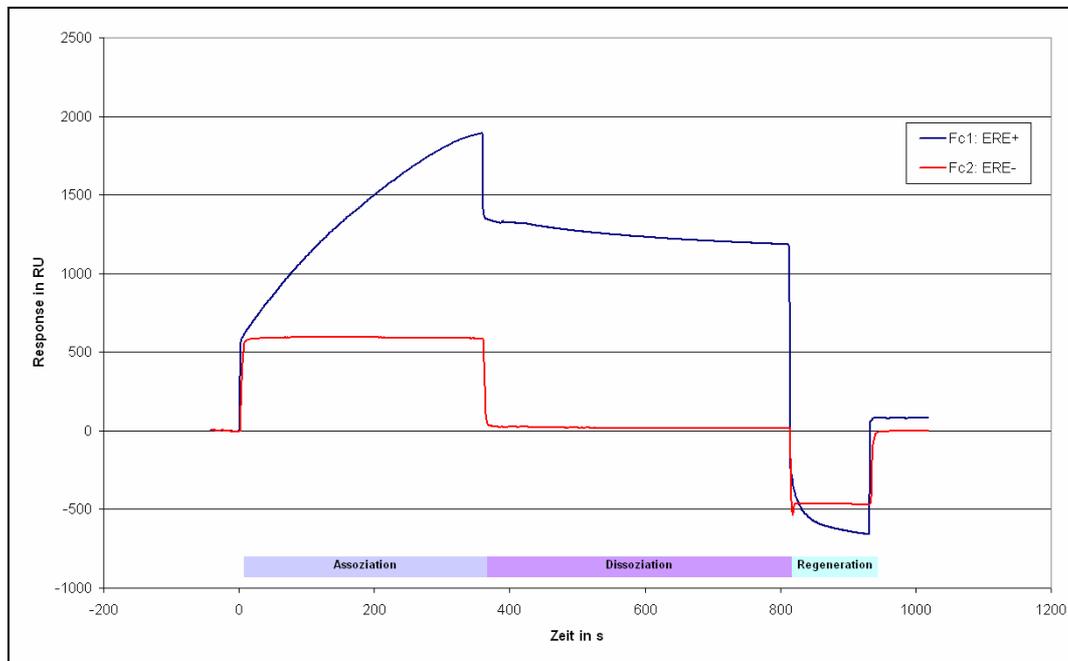


Abb. 44: Sensorgramm einer Injektion von 50 nM Estrogen Rezeptor β . Deutlich zu erkennen sind Assoziationsphase, Dissoziationsphase und die Regeneration der Chipoberfläche durch eine kurze Injektion des Regenerationsmittels.

8.7 Darstellung eines RNA-Gels nach der RNA-Isolation

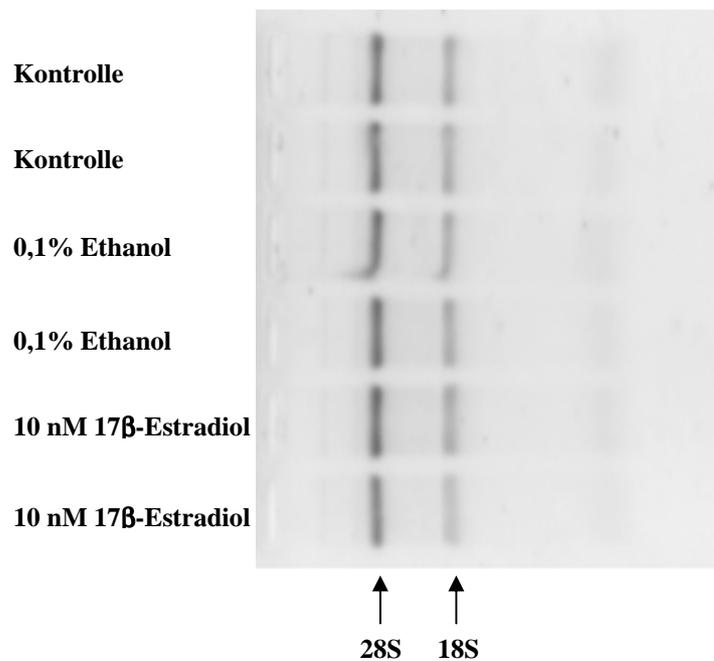


Abb. 45: RNA-Gel zur Kontrolle der Integrität der isolierten RNA. 1 μ l des RNA-Isolates wird pro Tasche aufgetragen und das Gel zwei Stunden bei 60V und maximaler Amperezahl laufen gelassen. Zur Dokumentation wird das Gel bei 520 nm abfotografiert. Zwei scharfe Banden (18S und 28S RNA) weisen auf gute Integrität und geringe Degradation hin.

8.8 Darstellung eines DNA-Gels nach der PCR

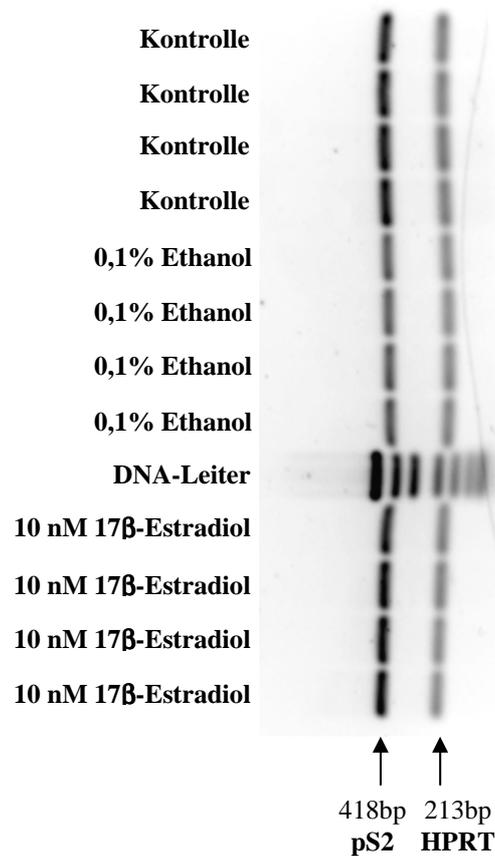


Abb. 46: Darstellung eines Gels nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Amplifikate. Der Inhalt eines PCR-Tubes wird pro Tasche aufgetragen und das Gel bei 100V ca. 90 min bei maximaler Amperezahl laufen gelassen. Anschließend wird das Gel zur Dokumentation bei 520 nm abfotografiert. Deutlich zu erkennen sind die beiden PCR-Amplifikate bei 418bp (pS2) und 213bp (HPRT).

Publikationen

Publikationen in Fachzeitschriften

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Phytoestrogens Modulate Binding Response of Estrogen Receptors α and β to the Estrogen Response Element*. J Agric Food Chem, 2003. **51**: 7632-7635.

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung von Estrogen Rezeptor α an das Estrogen Response Element*. Lebensmittelchemie, 2003. **1**: 2-3.

Hartwig A., Asmuss M., Ehleben I., Herzer U., Kostelac D., Pelzer A., Schwerdtle T., Bürkle A., *Interference by Toxic Metal Ions with DNA Repair Processes and Cell Cycle Control: Molecular Mechanisms*. Environ Health Perspect, 2002. **110(5)**: 797-799.

Kostelac D., Ehleben I., Hartwig A., *Einfluss von Co(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen*. Lebensmittelchemie, 2001. **55(5)**: 132-133.

Posterbeiträge

Briviba K., Kostelac D., Rechkemmer G., *Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors α and β to the estrogen response element*. 22. International conference on polyphenols, Helsinki, 25.-28.08.2004.

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Phytoestrogene modulieren die Bindung der Estrogen Rezeptoren α und β an das Estrogen Response Element*. 41. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, München, 11.-12.03.2004.

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Phytoestrogens modulate binding of estrogen receptors α and β to the estrogen response element*. 8. Karlsruhe Nutrition Congress, Karlsruhe, 12.-14.10.2003.

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Phytoestrogene modulieren die Bindung von Estrogen Rezeptor alpha an das Estrogen Response Element*. 40. Wissenschaftlicher Kongress der DGE, Potsdam, 13.-14.03.2003.

Kostelac D., Rechkemmer G., Briviba K., *Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung von Estrogen Rezeptor α an das Estrogen Response Element*. Deutscher Lebensmittelchemikertag, Frankfurt, 9.-11.09.2002.

Ehleben I., Herzer U., Kostelac D., Thuy C., Hartwig A., *Interference of As(III), Cd(II) and Ni(II) with cell cycle progression and control in A549 human lung cells*. 43. Frühjahrstagung der deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, Mainz, 12.-14.03.2002.

Kostelac D., Ehleben I., Hartwig A., *Einfluss von Co(II) auf die Zellzykluskontrolle UV-geschädigter Lungenkrebszellen*. GDCH Regionalverband Süd-West Arbeitstagung, Kaiserslautern, 2.-3.4.2001.

Lebenslauf

von Drazen Kostelac

Persönliche Daten: Geburtsdatum: 20.03.1976 in Speyer
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schule:

1982 – 1986 Grundschule Klosterschule in Speyer
1986 – 1995 Gymnasium Friedrich-Magnus-Schwerd Gymnasium in Speyer
19.06.1995 Schulabschluss mit allgemeiner Hochschulreife

Studium:

1995 – 1996 Studium der Diplomchemie an der Universität Karlsruhe
1996 – 2001 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe
20.01.1999 Vorprüfung der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
2000 Wissenschaftliche Abschlussarbeit am Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe:
Einfluss von Co(II) auf die Zellzykluskontrolle.
14.05.2001 Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
14.05.2001 Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemiker

Dissertation:

Seit Juli 2001 Promotion am Institut für Ernährungsphysiologie der Bundesforschungsanstalt für Ernährung und Lebensmittel:
Einfluss von Phytoestrogenen auf die Bindung der Estrogen Rezeptoren α und β an das Estrogen Response Element.