

Charakterisierung ausgesuchter Pflanzeninhaltsstoffe in Hinblick  
auf ihre estrogenen Wirkung

**Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Simone Alexandra Schmidt

aus

Köln

Bonn Februar 2003

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Universitätsprofessor Dr. Dr. H. Michna
2. Referent: Universitätsprofessor Dr. K. Mohr

Tag der Promotion: 17.07.2003

## **Erklärung**

Die vorliegende Dissertationsarbeit wurde am Institut für Morphologie und Tumorforschung an der Deutschen Sporthochschule Köln unter Betreuung von Prof. Dr. K. Mohr und Prof. Dr. Dr. H. Michna angefertigt.

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Siegburg, den

---

Simone Schmidt

*Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit*

*„Der unermesslich reichen, stets sich erneuernden Natur gegenüber wird der Mensch, soweit er auch in der wissenschaftlichen Erkenntnis fortgeschritten sein mag, immer das sich wundernde Kind bleiben und muss sich stets auf neue Überraschungen gefasst machen.“*

(MAX PLANCK)

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG</b> .....	1
1.1	Phytoestrogene .....	1
1.1.1	Biosynthese, Vorkommen und Wirkungen.....	1
1.1.2	Beobachtungen und Untersuchungen am Tier und am Menschen.....	11
1.2	Estrogene .....	17
1.2.1	Physiologische Wirkungen .....	17
1.2.2	Aktivierung des Estrogenrezeptors.....	19
1.2.3	Klassische Wirkmechanismen .....	20
1.2.4	Alternative Wirkmechanismen .....	21
1.2.5	Estrogenrezeptor-Subtypen.....	22
1.3	Beschreibungen der untersuchten Gene .....	25
1.3.1	Clusterin .....	25
1.3.2	Cyclin D1 .....	25
1.3.3	Cyclooxygenase-2 .....	27
1.3.4	Komplement C3.....	28
1.3.5	Progesteronrezeptor.....	28
1.4	Zielsetzungen der Arbeit.....	30
<b>2</b>	<b>MATERIAL</b> .....	32
2.1	Laborgeräte .....	32
2.2	Chemikalien.....	32
2.3	Verbrauchsmaterialien.....	34
2.4	Enzyme, <i>Kits</i> und weitere Substanzen .....	34
2.5	Estrogene, Antiestrogene und Phytoestrogene .....	35
2.6	Primer .....	36
2.7	Antikörper und Seren.....	36
2.8	Zellen .....	37
2.9	Gewebe .....	38

<b>3</b>	<b>METHODEN</b> .....	44
3.1	Zellkultur .....	44
3.1.1	Zelllinie .....	44
3.1.2	Kulturbedingungen .....	44
3.1.3	Passagieren der Zellen.....	44
3.1.4	Einfrieren und Auftauen der Zellen .....	45
3.1.5	Aktivkohlebehandlung des Kälberserums.....	45
3.1.6	Hormonbehandlung .....	46
3.1.7	Propidiumiodid-Färbung .....	46
3.1.8	Durchflusszytometrie .....	49
3.2	mRNA-Analytik .....	51
3.2.1	RNA-Isolierung .....	51
3.2.2	Quantifizierung von Nukleinsäuren.....	52
3.2.3	DNA-Verdau .....	52
3.2.4	cDNA-Synthese .....	53
3.2.5	Ableiten der Primer.....	55
3.2.6	Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987).....	55
3.2.6.1	Semiquantitative PCR .....	59
3.2.6.1.1	Agarosegelelektrophorese der PCR-Fragmente.....	59
3.2.6.1.2	Dokumentation der Gele.....	60
3.2.6.1.3	Densitometrische Auswertung .....	60
3.2.6.2	<i>Real-Time</i> PCR .....	61
3.3	Histologische Techniken.....	65
3.3.1	Fixierung, Dehydrierung und Einbettung .....	65
3.3.2	Aufblocken, Erstellen und Aufziehen der Schnitte .....	65
3.3.3	Entparaffinieren und Autoklavieren der Schnitte.....	66
3.3.4	Färbungen des Uterus- und des Vaginalepithels.....	67
3.3.5	Progesteronrezeptorfärbung mittels Immunhistochemie .....	69
3.4	Statistik.....	72
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE</b> .....	74
4.1	Wirkungen der Phytoestrogene auf Proliferation und Apoptose- induktion in der Zelllinie MCF-7 .....	74

4.1.1	Effekte nach Verabreichung von Einzelsubstanzen.....	74
4.1.2	Effekte nach Verabreichung von Kombinationen aus Estrogen und Phytoestrogen .....	78
4.2	Wirkungen der Phytoestrogene <i>in vivo</i> im Rattenmodell .....	82
4.2.1	Uterotropher Assay in Wistar Ratten nach Behandlung mit Ethinyl- estradiol und Genistein .....	82
4.2.2	Analyse der Expression und Lokalisation des Progesteronrezeptors in Mammagewebe von Da/Han Ratten nach Applikation der Unter- suchungssubstanzen .....	83
4.2.3	Vergleich der estrogenen Wirkstärke der Untersuchungssubstanzen in verschiedenen Rattenstämmen .....	84
4.2.4	Untersuchungen von Kombinationswirkungen in Wistar Ratten .....	88
4.2.5	Analyse einer möglichen Organselektivität der Phytoestrogene.....	95
4.2.5.1	Genexpression des Progesteronrezeptors und von Cyclin D1 in der Mamma.....	96
4.2.5.2	Genexpression von Komplement C3 und der Cyclooxygenase-2 im Uterus .....	99
4.2.5.3	Genexpression des Progesteronrezeptors und der Cyclooxy- genase-2 in der <i>Vena cava</i> .....	101
<b>5</b>	<b>DISKUSSION</b> .....	104
5.1	Analyse der Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7.....	107
5.1.1	Wahl des Modellsystems MCF-7 .....	107
5.1.2	Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion in der Zelllinie MCF-7 nach Applikation von Einzelsubstanzen und Kombinationen.....	107
5.2	Analyse der Phytoestrogenwirkungen im Rattenmodell .....	115
5.2.1	Effekte der Phytoestrogene <i>in vivo</i> auf Uterusgewicht und Uterus- sowie Vaginalepithelhöhen .....	115
5.2.2	Effekte der Phytoestrogene <i>in vivo</i> auf die Expression verschie- dener estrogensensitiver Gene in einzelnen Geweben .....	120
5.2.3	Effekte der Phytoestrogene <i>in vivo</i> auf die Expression des estrogen- sensitiven Proteins des Progesteronrezeptors .....	129

5.2.4	Analyse der kombinatorischen Effekte von Phytoestrogenen nach gleichzeitiger Applikation mit reinen Estrogenen .....	130
5.2.5	Analyse der organspezifischen bzw. gewebespezifischen Effekte der Phytoestrogene durch Vergleich der Genexpression einzelner Gene in verschiedenen Geweben .....	132
5.3	Schlussbetrachtung .....	135
<b>6</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>	<b>137</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>140</b>
<b>8</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>160</b>
8.1	Abkürzungsverzeichnis .....	160
8.2	Abbildungsverzeichnis .....	163
8.3	Tabellenverzeichnis .....	167



# 1 EINLEITUNG

Seit Jahrzehnten steht die mögliche estrogenere Wirkung von Stoffen natürlichen Ursprungs im Blickpunkt des wissenschaftlichen und in zunehmendem Maße auch des öffentlichen Interesses. Diese Verbindungen, die sowohl aus dem Pflanzen- als auch aus dem Pilzreich stammen können und demnach als Phyto- bzw. Mykoestrogene (Stoffe mit Affinität zum Estrogenrezeptor) bezeichnet werden, zeigen bei genauerer Betrachtung im Tier und im Menschen vielfältige pharmakologische und toxikologische Wirkungen.

Die vorliegende Arbeit soll dazu dienen, ausgewählte Vertreter der Phytoestrogene molekularbiologisch genauer zu untersuchen und einen Beitrag zur Aufklärung ihrer Wirkweise zu liefern.

In den folgenden Abschnitten der Einleitung soll nun zunächst das Vorkommen, die chemischen Strukturen sowie die Wirkungen der Substanzen im Tier und im Menschen erläutert werden. Epidemiologische Beobachtungen und Tierversuche verschiedener Arbeitsgruppen werden vorgestellt, um einen Überblick über die vielfältigen Eigenschaften der Phytoestrogene zu erbringen.

Im Anschluss daran werden die physiologischen Wirkungen der körpereigenen Sexualhormone - insbesondere die der Estrogene - vorgestellt. Die genaue Wirkweise der Substanzen, die klassische sowie die alternative Aktivierung des Estrogenrezeptors und dessen Subtypen werden erläutert.

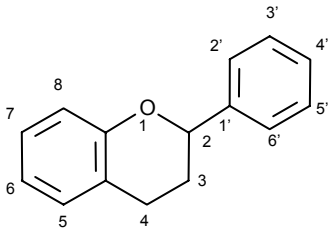
Abschließend werden die für die vorliegende Arbeit entscheidenden Gene, deren Expression auf mRNA-Ebene analysiert wird, genauer charakterisiert.

## 1.1 Phytoestrogene

### 1.1.1 Biosynthese, Vorkommen und Wirkungen

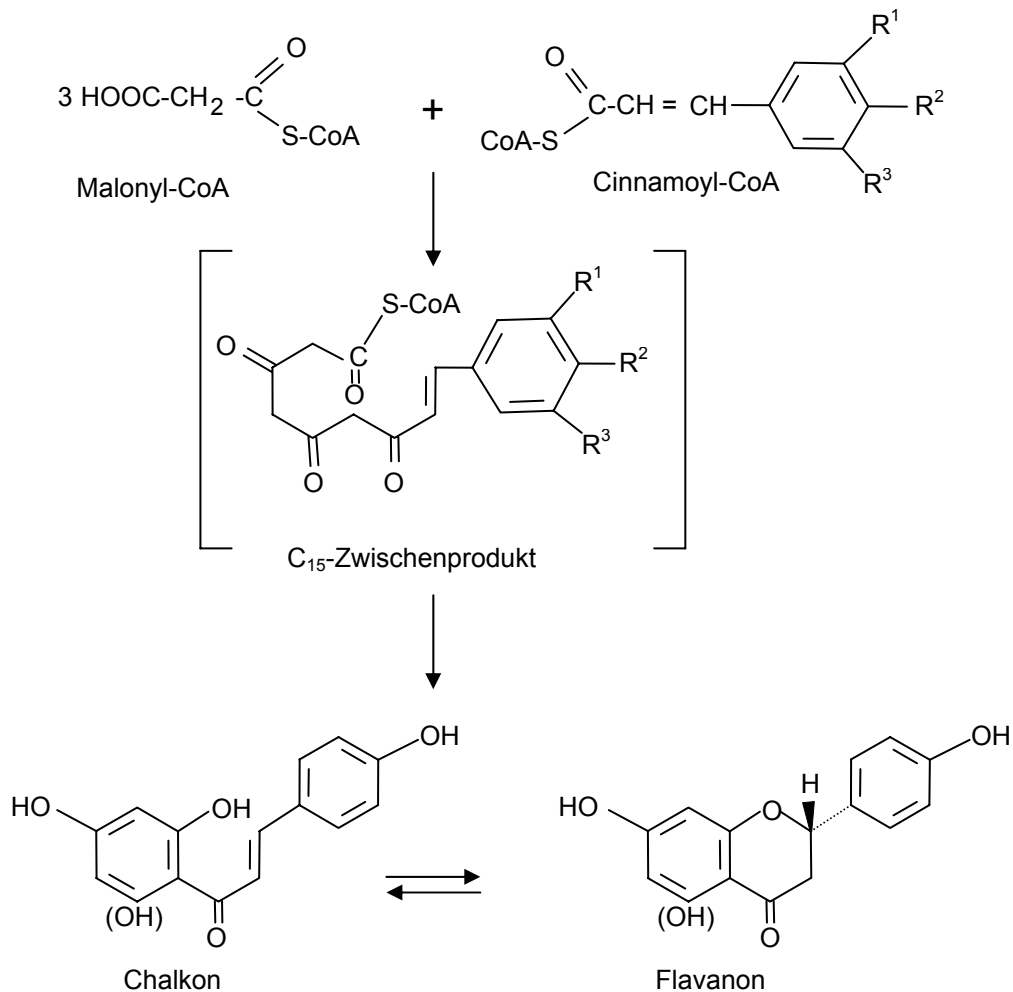
Die **Flavonoide** zählen zu einer der größten Gruppen der sekundären Pflanzeninhaltsstoffe und kommen im Pflanzenreich ubiquitär vor. In der Pflanze selbst kann man sie in allen Teilen antreffen - bevorzugt jedoch in den oberirdischen Pflanzenteilen, besonders in den Laub- und Kelchblättern. Sehr häufig liegen die Flavonoide dabei in glykosidierter Form vor, wobei als Zuckerkomponenten z. B. D-Glukose, D-Galaktose oder L-Rhamnose in Frage kommen.

Chemisch betrachtet kann man Flavonoide als Phenylchromanderivate ansehen, denn sie bestehen aus einem  $C_6-C_3-C_6$ -Grundgerüst mit 15 Kohlenstoffatomen. Die nach einer Schätzung über 2.000 verschiedenen Derivate (Teuscher, 1990) sind über vielfältige Substitutionen an den beiden aromatischen Ringen A und C und über den Oxidationsgrad der C-Atome 2, 3 und 4 des Chromangerüsts zu erklären (Abb. 1). Aglyka kennt man alleine ca. 500 verschiedene (Teuscher, 1990).



**Abb. 1: Flavangrundgerüst (2-Phenylchroman)**

Die Biosynthese der Phenylchromanderivate geht von drei Acetat-Einheiten (Malonyl-CoA) und einer Phenylpropan-Einheit (Cinnamoyl-CoA) aus, die zu einem  $C_{15}$ -Zwischenprodukt kondensieren, welches schließlich zu einem primär gebildeten Chalkon reagiert (Abb. 2). Dieses Chalkon zyklisiert entweder enzymatisch zu Flavanonen oder aber es geht spontan in solche über. Durch vielfältige Oxidationen, Reduktionen oder auch Dehydrierungen entstehen die einzelnen Untergruppen. Beispiele dieser Untergruppen sind die Flavone, Flavonole oder Flavan-3,4-diole.



**Abb. 2: Biosynthese der Phenylchromanderivate**

R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup> = verschiedene organische Reste  
(nach Teuscher, 1990)

Die biologischen Bedeutungen der Flavonoide für die Pflanze sind noch nicht abschließend geklärt. Als sicher anzusehen sind ein Schutz vor Insektenbefall bzw. Bakterien-, Virus- oder Pilzinfektionen, eine Anlockung von Bestäubern durch die charakteristischen Farben und Fluoreszenzen und eine Kontrolle von Wachstumsvorgängen - sowohl positiv wie auch negativ.

Ihr Name leitet sich vom lateinischen Wort *flavus* (= gelb) ab und beruht auf der teilweise intensiven Gelbfärbung einiger Vertreter, jedoch sind auch leuchtend rote und blaue Derivate zu finden. Eine wichtige Rolle bei der Farbgebung spielen neben der chemischen Struktur der Substanzen auch der vorherrschende pH-Wert in den jeweiligen Pflanzenteilen sowie eine mögliche Chelatbildung der Flavonoide mit verschiedenen Metallionen (z. B. Fe<sup>3+</sup> oder Al<sup>3+</sup>).

Pharmakologische Wirkungen sind vielfältig und hängen von den strukturellen Gegebenheiten ab. Therapeutischen Einsatz finden Flavonoiddrogen u. a. aufgrund des ihnen zugesprochenen Vitamin P-Effektes (P = Permeabilität), der mit einer Normalisierung einer erhöhten Kapillarpermeabilität und einer Herabsetzung ihrer Brüchigkeit durch Hemmung der Hyaluronidase einhergeht (Teuscher, 1990).

Weiterhin zeigen Flavonoide Einfluss auf die Kollagenbiosynthese und die Entwicklung von Entzündungsreaktionen, was über eine Hemmung der Prostanoid-synthese, der Lymphozytenfunktion und der Histaminausschüttung zu erklären ist (Teuscher, 1990). Besonders hervorzuheben ist hierbei das Rutin - ein Flavonol-diglykosid, welches therapeutisch häufig eingesetzt wird.

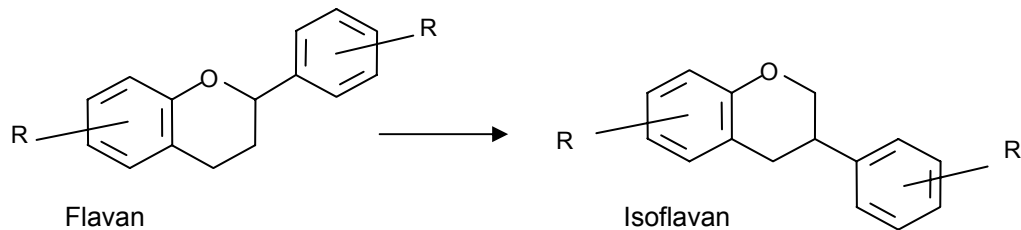
Eine weitere Wirkkomponente der Substanzen ist in der leichten Muskelrelaxation der glatten Muskulatur zu sehen, deren Folge eine spasmolytische und diuretische Wirkung sein kann (Teuscher, 1990). Darüber hinaus kann es zu einer gesteigerten Gallensaftausscheidung kommen (Teuscher, 1990).

Bestandteile des Silymarinkomplexes aus der Mariendistel (*Silybum marianum* L., *Asteraceae*) sind für ihre antihepatotoxische Wirkung bekannt und werden bei drohenden oder bereits bestehenden Vergiftungen therapeutisch genutzt, z. B. nach Genuss des grünen Knollenblätterpilzes (*Amanita phalloides*, *Amanitaceae*) und der darin enthaltenen Amatoxine (Teuscher, 1990).

Schließlich werden dem Flavon Apigenin, dem Flavonol Kaempferol, dem Flavanon Naringenin sowie dem Chalkon Phloridizin schwache estrogenartige Wirkungen zugesprochen (Miksicek, 1995).

Von großem Interesse in Hinblick auf eine mögliche estrogenische Wirkung ist die Untergruppe der **Isoflavonoide**, die man im Gegensatz zu den weit verbreiteten Flavonoiden nur in einigen wenigen Pflanzenarten findet. Von besonderer Bedeutung sind hierbei die *Fabaceae* (früher: *Papilionaceae*) - also die Schmetterlingsblütengewächse, die zu der Ordnung der *Fabales* (Leguminosen) zu zählen sind und gemeinhin als Hülsenfrüchte bezeichnet werden. Bekannt sind bis zum heutigen Zeitpunkt ca. 100 natürlich vorkommende Isoflavonoidderivate, die häufig in Form von Glykosiden vorliegen und bevorzugt an D-Glukose oder L-Rhamnose gebunden sind (Hunnius, 1998). Chemisch betrachtet handelt es sich bei dieser Untergruppe um 3-Phenylchromane, die sich aus den Flavonoiden ableiten und aus ihnen durch Wanderung des Arylrestes von der Position 2 des Chromanringes

in die Position 3 hervorgehen. So entsteht Genistein z. B. aus dem Flavanon Naringenin über die besagte Wanderung des Ringes. Diese Reaktion wird durch das Cytochrom-P-450 Enzym Isoflavon-Synthase katalysiert (Dixon und Ferreira, 2002).



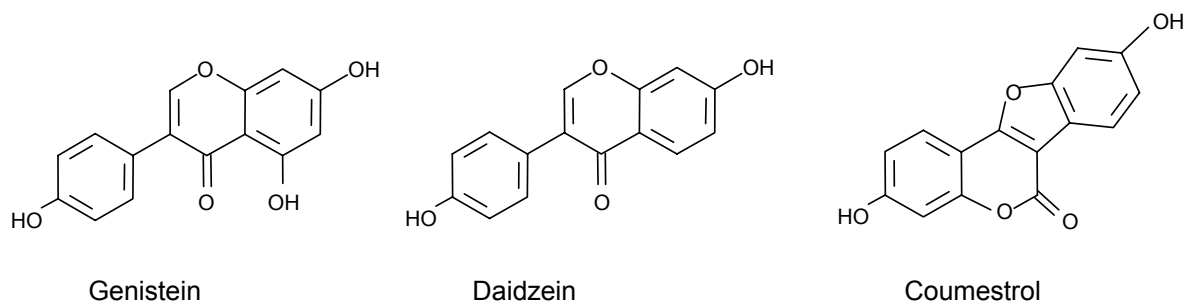
**Abb. 3: Biogenese der Isoflavane durch Arylwanderung**

R = organischer Rest

Die genaue biologische Bedeutung dieser Substanzen für die Pflanze ist noch weitgehend unbekannt. Auch hier geht man von einer antibakteriellen, virostatistischen und fungistatischen Wirkung aus. Zusätzlich wird u. a. eine Wirkung als Signalsubstanz bei der Wurzelknöllchenbildung und als Zwischenprodukt des Phytoalexin-Metabolismus diskutiert.

Hohe Konzentrationen an Isoflavonoiden, z. B. an den Isoflavonen Genistein, Daidzein oder dem Coumestan Coumestrol (Abb. 4), findet man in der Sojabohne (Abb. 5; *Glycine max* (L.) MERR., *Fabaceae*), einem fett- und eiweißreichen, einjährigen, behaarten Kraut, welches in ostasiatischen Regionen beheimatet ist.

Heutzutage wird die Sojabohne jedoch auch in subtropischen Gebieten Ostasiens, Nordamerikas, Brasiliens, Osteuropas und Südafrikas kultiviert (von Bruchhausen, 1993).



**Abb. 4: Strukturformeln der Isoflavonoidderivate Genistein, Daidzein und Coumestrol**



**Abb. 5: *Glycine max* (L.) MERR.**

(aus <http://www.mpiz-koeln.mpg.de/pr/garten/schau/Glycinemax/Sojabohne.html>)

Schon Walz beschrieb 1931 diese Isoflavonglykoside als Hauptvertreter der Phytoestrogene in der Sojabohne „*Soja hispida*“, und auch späteren Datums findet man dazu vielfältige Literaturangaben (Eldridge, 1982; Murphy, 1982; Pettersson und Kiessling, 1984; Seo und Morr, 1984).

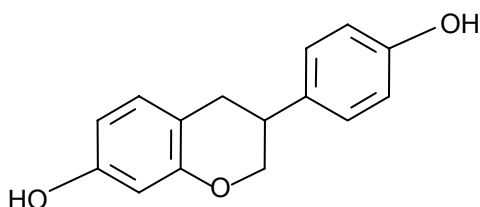
Auch in verschiedenen heimischen Kleearten, z. B. *Trifolium pratense* L. (Wiesen- oder Rotklee) oder *Trifolium repens* L. (Abb. 6; Weißklee), die ebenfalls zur Familie der *Fabaceae* zählen, sind Genistein und Coumestrol anzutreffen.



**Abb. 6: *Trifolium repens* L.**

(aus [http://wald.heim.at/urwald/540187/pf\\_klee\\_1.html](http://wald.heim.at/urwald/540187/pf_klee_1.html))

Pharmakologisches Interesse erweckten diese Stoffe durch den Verdacht einer möglichen estrogenen Wirkung, die deutlich über die der oben genannten Flavonoide hinausging und in epidemiologischen Beobachtungen am Menschen und am Tier zum Vorschein kam. Eine Metabolisierung im Organismus zu Stilbenderivaten, deren estrogenes Potential bekannt war (z. B. Diethylstilbestrol), wurde als in Frage kommende Ursache diskutiert. Setchell und Mitarbeiter beschrieben 1987 Metabolisierungsvorgänge von Isoflavonoiden und Lignanen - einer weiteren Gruppe von Phytoestrogenen - zu heterozyklischen Phenolen durch die mikrobielle Darmflora im tierischen Gastrointestinaltrakt als entscheidend. Hauptmetabolit ist hierbei das entstehende nichtsteroidale Estrogen Equol (Abb. 7). Seinen Namen verdankt Equol der Tatsache, dass es zuerst aus dem Harn von Stuten isoliert wurde.



**Abb. 7: Strukturformel von Equol**

Aufgrund der bereits erwähnten und in Kapitel 1.1.2 genauer erläuterten epidemiologischen Beobachtungen am Menschen sind vielfältige Versuche in Gewebe-

kulturen und auch im Tier durchgeführt worden. Ein häufiger Kritikpunkt an diesen Experimenten war jedoch die zumeist extrem hohe verabreichte Dosis der untersuchten Substanzen. Obwohl pharmakokinetische Berechnungen zu der Aufnahme von Isoflavonoiden über die Nahrung auch bei Konsumenten von sehr großen Sojamenen nicht über maximal 1 bis 5  $\mu\text{M}$  gelangten (Barnes *et al.*, 1996), wurden in einem Großteil der Studien Isoflavonoidkonzentrationen von über 10  $\mu\text{M}$  eingesetzt.

Genauer erforscht hat man inzwischen die Mechanismen der Resorption von Phytoestrogenen aus dem Magen-Darm-Trakt. So wurden von der Arbeitsgruppe um Andlauer Versuche an isolierten Rattendärmen durchgeführt, die Aufschluss über die resorbierten Substanzen und ihre Metaboliten gaben (Andlauer *et al.*, 2000 a; Andlauer *et al.*, 2000 b). Über die genaue Analyse von Blut, Urin und Fäzes von sieben Frauen, die eine definierte Menge an Isoflavonoiden pro kg Körpergewicht zu sich nahmen, konnten Xu und Mitarbeiter 1995 zeigen, dass die Bioverfügbarkeit der Phytoestrogene entscheidend durch die mikrobielle Darmflora geprägt wird.

Im Magen oder Dünndarm von Mensch und Tier muss es zu einer Spaltung der Phytoestrogene in das Aglykon und den Zucker kommen, da die Isoflavonoide in der Pflanze überwiegend in Form von Glykosiden vorliegen und in dieser Form aufgrund der hohen Hydrophilie und des großen Molekulargewichtes nicht resorbiert werden können. Diese Spaltung kann entweder hydrolytisch mithilfe von Salzsäure im Magen oder aber auch bakteriell durch z. B. Laktobazillen oder Bifidobakterien - bzw. allgemein formuliert durch Bakterien mit  $\beta$ -Glukosidase-Aktivität - erfolgen. Die anschließenden Metabolisierungsvorgänge können ebenfalls durch eine Reihe von Darmbakterien (z. B. Clostridien) durchgeführt werden (Xu *et al.*, 1995). Es ist beispielsweise inzwischen bekannt, dass Genistein im Organismus sehr stark metabolisiert und nur ca. 14 bis 16 % in unveränderter Form wieder ausgeschieden wird (Boersma *et al.*, 2001).

Ein weiterer Effekt von Isoflavonoiden, der neben dem estrogenen ebenfalls für einen möglichen gesundheitlichen Benefit sorgen könnte, ist in dem antioxidativen Potential dieser Substanzen zu sehen. Aufgrund der strukturellen Gegebenheiten der Polyphenole zeigen auch Genistein, Daidzein und Coumestrol antioxidative Eigenschaften. So erklärten Djuric und Mitarbeiter im Jahr 2001, dass die Nahrungsergänzung mit einem sojahaltigen Präparat oxidative DNA-Schäden vermin-



dern kann. Diese antioxidative Wirkung der Phytoestrogene ist auch der Grund für die lange Haltbarkeit von Tempeh. Tempeh wird aus gekochten und enthülsten Sojabohnen hergestellt, denen die Pilze *Rhizopus oligosporus* oder *Rhizopus oryzae* beigefügt werden. Nach ein bis zwei Tagen entsteht durch Fermentation eine mit einer weißen Pilzschicht überzogene Masse, die einem Camembert ähnelt. Speziell in Indonesien dient Tempeh seit Generationen als Nahrungsmittel.

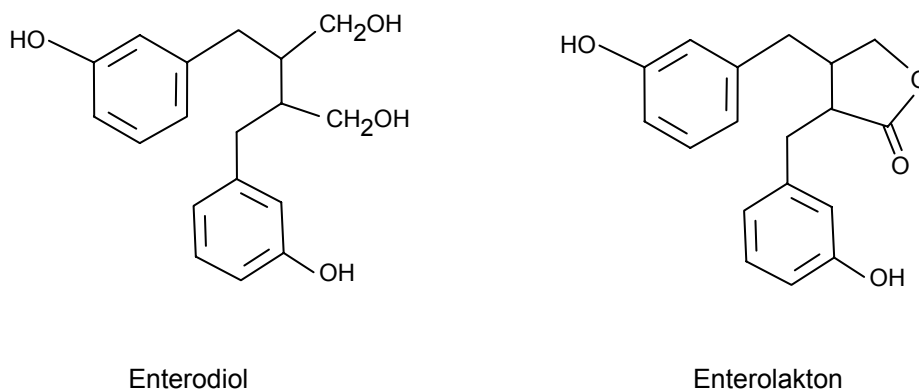
Auch eine Hemmung der Angiogenese durch die Isoflavonoide konnte *in vitro* von verschiedenen Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (Fotsis *et al.*, 1995; Lamartiniere, 2000). Durch diese verminderte Gefäßneubildung können die Entwicklung und das Fortschreiten von chronischen Erkrankungen und Karzinomen verhindert werden. Angiogenese ist ein Vorgang, der in einem gesunden Erwachsenenkörper nur eine untergeordnete Rolle spielt. Ausnahmen findet man z. B. bei der Wundheilung und der Bildung des Gelbkörpers, des Endometriums und der Plazenta. In diesen Fällen unterliegt die Angiogenese einer übergeordneten Steuerung und ist die Folge eines ausgewogenen Gleichgewichtes von Angiogenesehemmern und Angiogenesestimulatoren. Bei verschiedenen pathologischen Vorgängen (z. B. rheumatoide Arthritis, Psoriasis, solide Tumore) kommt es jedoch zu einer drastischen Zunahme der Angiogeneserate, die dann nicht mehr selbst limitierend ist (Fotsis *et al.*, 1993).

Abschließend soll an dieser Stelle der Einfluss von Isoflavonoiden auf verschiedene Enzyme wie z. B. die Tyrosinkinase und die Topoisomerase II erwähnt werden (Bergan *et al.*, 2001; Boersma *et al.*, 2001). So ist Genistein als ein wirkungsvoller Hemmstoff der Tyrosin-Autophosphorylierung des EGF-Rezeptors (*epidermal growth factor*) anzusehen (Kim *et al.*, 1998). Auch wenn Lamartiniere in den Jahren 2000 und 2002 beschrieb, dass dieser Effekt stark vom Alter der untersuchten Ratten zum Zeitpunkt der Applikation und dem jeweils betrachteten Organ abhängig ist, so kann man doch von einem starken Einfluss auf die Signaltransduktion durch Genistein sprechen. Auch Schultze-Mosgau und Mitarbeiter beschrieben 1998 starke Effekte von Genistein und Equol auf die Signaltransduktion. Weitere nicht genauer erläuterte Wirkungen von Isoflavonoiden, die jedoch für ein Gesamtbild dieser Substanzen nicht außer Acht gelassen werden dürfen, sind nach Meinung von Polkowski und Mazurek u. a. die Induktion der Apoptose und der Differenzierung von Krebszellen, die Hemmung der Zellproliferation und die Unterdrückung der Osteoklasten- und Lymphozytenfunktion (Polkowski und Mazu-

rek, 2000) sowie die Hemmung von Alkohol-Dehydrogenasen (Keung, 1993) und Aldehyd-Dehydrogenasen (Keung und Vallee, 1993).

**Lignane**, die ebenfalls zu den Pflanzeninhaltsstoffen mit estrogenen Wirkung gehören, sind Dimere aus Phenylpropanderivaten, die durch Verknüpfungen der Kohlenstoffatome 2 bzw. 2' der Seitenketten entstanden sind (Teuscher, 1990). Zusätzliche C-C-Bindungen, Etherbrücken oder Laktongruppierungen können ebenfalls vorhanden sein.

Bedeutende Lignane, die häufig in der Literatur Erwähnung finden, sind beispielsweise Enterodiol und Enterolakton (Abb. 8), welche im tierischen und menschlichen Organismus durch mikrobielle Metabolisierung aus Secoisolariciresinol und Mataresinol entstehen. Alle vier dieser Lignane können aus dem Darm resorbiert werden und somit in den Blutkreislauf gelangen. Bei ihrer Leberpassage können sie weiteren Metabolisierungsprozessen unterliegen oder aber sie werden schließlich an Glukuron- oder Schwefelsäure konjugiert und über den Harn oder den Fäzes ausgeschieden. Anzutreffen sind diese Verbindungen u. a. in Leinsamen (*Semen Lini* aus *Linum usitatissimum L.*, *Linaceae*) oder auch in verschiedenen Gräsern.



**Abb. 8: Strukturformeln der Lignane Enterodiol und Enterolakton**

Die oben bereits erwähnte mögliche estrogenen Wirkkomponente der genannten Substanzen wurde u. a. mit einem Schutz vor hormonabhängigen Tumorarten (Mamma-, Endometrium-, Ovarial- oder Prostatakarzinom), vor Osteoporose, vor Herz-Kreislauf-Erkrankungen und vor den Symptomen des Klimakteriums in Verbindung gebracht. Jedoch haben Beobachtungen der vergangenen Jahrzehnte ebenso gezeigt, dass Substanzen natürlichen Ursprungs im Verdacht stehen,

nachteilige Wirkungen auf das Reproduktionsvermögen einzelner Tierpopulationen und eventuell auch des Menschen auszuüben.

In dem folgenden Abschnitt soll nun genauer auf diese einzelnen Beobachtungen eingegangen werden.

### **1.1.2 Beobachtungen und Untersuchungen am Tier und am Menschen**

Untersuchungen der Ernährungsgewohnheiten und des Vorkommens verschiedener chronischer Krankheiten im südostasiatischen Raum führten zu der Annahme, dass eine sojareiche Ernährung - wie sie in diesen Erdteilen üblich ist - das Risiko eine hormonabhängige Krebserkrankung, kardiovaskuläre Erkrankungen oder Osteoporose zu erleiden, deutlich senkt (Tominaga, 1985; Severson *et al.*, 1989; Adlercreutz, 1990 a; Barnes *et al.*, 1996). Zusätzlich beobachtete man, dass insbesondere japanische Frauen weniger unter den so genannten „Wechseljahrsbeschwerden“ litten als ihre westeuropäischen oder nordamerikanischen Altersgenossinnen (Lock, 1986). Gleiche Ergebnisse fand man auch für die Osteoporose, die in Japan eine deutlich geringere Inzidenz aufweist. Jedoch waren es die Beobachtungen der Krebshäufigkeiten, die letztendlich für das große Interesse der westlichen Welt an den Ernährungsformen der Japanerinnen verantwortlich waren.

Wanderten japanische Frauen nach Nordamerika aus, so änderte sich ihr Risiko, eine hormonabhängige maligne Krankheit zu erleiden, nicht signifikant. Dies wurde mit der Weiterführung ihrer traditionell sojareichen Ernährung erklärt, denn sie verzehren ca. 30- bis 50-mal mehr Sojaprodukte als amerikanische Frauen. Die nächste weibliche Generation - also die Töchter dieser Frauen - zeigte ein ähnlich hohes Risiko für z. B. Brustkrebs wie die Nordamerikanerinnen selbst (Shimizu *et al.*, 1991). Dies wurde mit einer Anpassung der Ernährungsgewohnheiten an amerikanische Standards erklärt, also mit einer insgesamt nahezu sojafreien, stattdessen aber sehr fettreichen Nahrung.

Und gerade diese Beobachtungen an japanischen Frauen sind die Grundlage für die massive Bewerbung von sojahaltigen Präparaten auch auf dem deutschen Markt.

Mit 25,9 % Neuerkrankungsfällen im Jahr 1998 stellt Brustkrebs bei Frauen immer noch die häufigste Krebsform dar (bezogen auf alle Krebserkrankungen). Auch bei den Männern steht mit Prostatakrebs, der eine prozentuale Häufigkeit von 18,7 %

aufweist, eine hormonabhängige Krebsform an Nummer eins der Krebserkrankungen (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002). Betrachtet man die durch Krebs verursachten Sterbefälle, so sterben mit 17,1 % die meisten Krebspatientinnen an Brustkrebs. Und nur in wenigen Prozent (5 bis 10 %) der Erkrankungsfälle stehen genetische Ursachen wie z. B. Mutationen des BRCA 1 Gens (*breast cancer 1*) im Vordergrund (Hofmann *et al.*, 1998). Die Angst vor Krebs ist sicherlich ein mitentscheidender Faktor, weshalb sich sowohl in Apotheken (Alsifemin<sup>®</sup>, Menoflavin<sup>®</sup>) als auch in Drogeriemärkten (Tetesep<sup>®</sup> Femin Aktiv meno, aktivpunkt. Balance<sup>®</sup>) und Reformhäusern (Alsiroyal<sup>®</sup>) inzwischen ein reichhaltiges Angebot an Nahrungsergänzungsmitteln findet, die Pflanzenextrakte aus Soja und Klee oder aber auch die isolierten Isoflavonoide enthalten.

Verschiedene Gynäkologen empfehlen ihren Brustkrebspatientinnen - z. T. in der Nachsorge, z. T. aber auch während der Akutphase der Erkrankung - die Einnahme von sojahaltigen Präparaten. Ebenso wird vielen Patientinnen in der Postmenopause die Einnahme solcher Produkte empfohlen, um die Symptome des Klimakteriums - also Hitzewallungen, Schlafstörungen oder leichte Verstimmtheit - zu behandeln. Auch in verschiedenen Taschenbüchern oder Ratgebern zu Themen wie Krebsvorsorge, Wechseljahre u. Ä. findet man Empfehlungen zur Einnahme von Sojapräparaten (z. B. Bernd Kleine-Gunk: „Brustkrebs vorbeugen: So vermindern Sie Ihr Risiko“, TRIAS Verlag Stuttgart, 1999; Ulla Rahn-Huber: „Kursbuch Wechseljahre“, Südwest Verlag München, 2001).

Dies geschieht alles, obwohl die genauen Wirkmechanismen der Inhaltsstoffe noch nicht abschließend geklärt sind. Ein weiterer Aspekt, der für die möglichen Wirkungen der Phytoestrogene als Schutz vor Krebserkrankungen verantwortlich sein könnte und zumeist völlig außer Acht gelassen wird, ist die Tatsache, dass asiatische Frauen und auch Männer schon während ihrer Embryonalentwicklung und der frühen Kindheit hohen Konzentrationen von Isoflavonoiden ausgesetzt sind und diese nicht erst im Erwachsenenalter konsumieren. Falls diese Tatsache den entscheidenden Anteil bei der Prävention von Krankheiten ausmacht, so scheint die Zufuhr von Phytoestrogenen durch den Erwachsenen oder aber auch durch Frauen in der Postmenopause als wenig sinnvoll.

In Bezug auf die Wirkungen zum Schutz vor Osteoporose und vor kardiovaskulären Erkrankungen liegt es nahe, von einer estrogenen Wirkung der Substanzen

auszugehen. Der Schutz vor hormonabhängigen Krebserkrankungen dagegen lässt eher auf eine antiestrogene Wirkung schließen. Somit ist es verständlich, dass unter einem großen Teil der Gynäkologen und der Patientinnen eine deutliche Unsicherheit herrscht, inwieweit diese Präparate nicht eventuell doch negative Einflüsse auf den Krankheitsverlauf nehmen können. Darüber hinaus dürfen die weiteren Effekte der Phytoestrogene, die bereits oben beschrieben wurden (antioxidativ, Hemmung der Angiogenese u. a. m.), sowie insgesamt andere Lebensweisen der Asiaten für eine mögliche Wirkung im Schutz vor Krebserkrankungen nicht vergessen werden.

Im Zusammenhang mit Verbindungen, die sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte ausüben können, wurde der Begriff der SERMs eingeführt, also der **selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren**. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist Tamoxifen, das zur Therapie des estrogenabhängigen Brustkrebses eingesetzt wird. Tamoxifen wirkt an der Brust als Antagonist, an der Uterusschleimhaut jedoch als Agonist. Dies erklärt das erhöhte Risiko, unter einer Tamoxifen-Therapie an einem Endometriumkarzinom zu erkranken. Ein weiterer Vertreter dieser Gruppe ist Raloxifen, welches am Knochen als Agonist wirkt und zur Prophylaxe und Therapie der Osteoporose eingesetzt wird. An der Brust und an der Uterusschleimhaut wirkt Raloxifen als Antagonist, so dass das Risiko für eine bösartige Entartung dieser Gewebe nicht erhöht ist, sondern stattdessen eventuell sogar ein Schutz besteht.

Bei Durchsicht der Literatur findet man vielfältige Studien am Tier und am Menschen. Lamartiniere und Mitarbeiter stellten im Jahr 1995 eine Studie vor, aus der hervorging, dass die Gabe von Genistein an neugeborene Ratten diese vor einem durch DMBA (Dimethylbenz[*a*]anthrazen) induzierten Brustkrebs schützen konnte. Ein Jahr später konnte dies von Murrill und Mitarbeitern ebenso für eine viertägige Gabe von Genistein vor der Pubertät der Ratten bestätigt werden. Diese Schutzwirkung vor Krebs verschwand bzw. verminderte sich mit zunehmendem Alter der Tiere bei der ersten Genisteingabe (Constantinou *et al.*, 1996). Die Arbeitsgruppe um Cassidy untersuchte Frauen mit bekannter Zykluslänge und verabreichte ihnen einen Monat lang täglich 60 g Sojaprotein (mit 45 mg Daidzein). Die Forscher beobachteten unter der Phytoestrogeneinnahme eine Verlängerung des Menstruationszyklus, insbesondere der folliculären Phase, sowie erniedrigte Gipfel an LH

(luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) (Cassidy *et al.*, 1994).

In der Follikelphase ist die Zellteilungsrate in der weiblichen Brustdrüse niedriger als in den übrigen Zyklusphasen, so dass für Frauen mit einem längeren Zyklus ein geringeres Brustkrebsrisiko erwartet wird. Dieser verlängerte Menstruationszyklus, der bei Japanerinnen ebenfalls vorliegt und durchschnittlich 32 Tage beträgt, scheint mit dem um ca. 25 % reduzierten Brustkrebsrisiko dieser Frauen in Verbindung zu stehen (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000).

Einen positiven Effekt von Phytoestrogenen auf den Cholesterolgehalt in der Aorta und damit auf eine potentielle Arteriosklerose konnte von Alexandersen und Mitarbeitern 2001 bei Kaninchen gezeigt werden. Zusätzlich verbesserten die Phytoestrogene bei der Kombination mit Estradiol (als Bestandteil einer Hormonersatztherapie) den antiarteriosklerotischen Effekt von diesem. Auch Potter und Mitarbeiter beschrieben im Jahr 1996 eine Absenkung des Plasmaspiegels von Cholesterolem nach einer sojahlaltigen Diät bei Hamstern.

Betrachtet man den Knochen, so können auch hier positive Ergebnisse aus Tierversuchen gewonnen werden. Genistein und Daidzein konnten in verschiedenen Studien knochenerhaltend in ovariectomierten Nagern wirken (Anderson und Garner, 1998). So zeigten Okamoto und Mitarbeiter eine Hemmung der Osteoklastentätigkeit in erster Linie durch Genistein, jedoch schwächer auch durch Daidzein (Okamoto *et al.*, 2001).

Als Beispiel für einen positiven Effekt bei Wechseljahrsbeschwerden soll an dieser Stelle die Wirkung von Sojamehl auf die Häufigkeit von Hitzewallungen (*hot flashes*) genannt werden. In einer Studie mit 58 postmenopausalen Frauen zeigte Sojamehl im Vergleich zum deutlich schwächeren Weizenmehl (enthält Enterolakton) eine offensichtliche Reduktion der Hitzewallungen nach 12-wöchiger Einnahme (Murkies *et al.*, 1995).

Jedoch dürfen neben diesen scheinbar positiven Wirkungen die möglichen negativen nicht unerwähnt bleiben. Hierbei sollen an erster Stelle die Beeinträchtigung der Fertilität und Entwicklungsstörungen genannt werden (McLachlan und Newbold, 1987; Setchell *et al.*, 1987).

Bereits im Jahr 1946 begann die Diskussion um Phytoestrogene aus Klee und Luzerne, nachdem Beobachtungen einen deutlichen Zusammenhang zwischen

der Aufnahme dieser Stoffe über das Futter und einer verminderten Fertilität und erschweren Geburten („*clover disease*“) von Schafen und Kühen gezeigt haben (Bennetts *et al.*, 1946; Kallela, 1964; Kallela *et al.*, 1984). Auch Adams berichtete 1995, dass Kühe und Schafe, die über lange Zeit mit phytoestrogenhaltigen Pflanzen gefüttert wurden, Unfruchtbarkeiten zeigten. Er konnte zwischen einer zeitlich begrenzten und einer dauerhaften Infertilität unterscheiden. Die bleibende Unfruchtbarkeit erklärte er über Veränderungen am Zervix, so dass es nicht zu einer Konzeption kommen konnte (Adams, 1995 a; Adams, 1995 b). Ein weiteres Phytoestrogen aus Heu (Zearalenon) konnte für frühzeitig auftretende Aborte in einer Kuhherde verantwortlich gemacht werden (Kallela und Ettala, 1984).

Beobachtungen an Geparden in Gefangenschaft zeigten, dass die Phytoestrogene Genistein und Daidzein als Bestandteil einer speziellen Raubkatzennahrung im Verdacht standen, die Ursache für die sinkende Fertilität dieser Katzen zu sein. Darüber hinaus bedrohten Lebererkrankungen - verursacht durch einen Venenverschluss in der Leber - die Population dieser Tiere in nordamerikanischen Tierparks. Es konnte jedoch hierbei keine Verbindung zu den Phytoestrogenen geknüpft werden (Setchell *et al.*, 1987).

Die Arbeitsgruppe um Freni-Titulaer beobachtete bereits in den Jahren 1978 bis 1981 eine stark verfrüht einsetzende Thelarche (Entwicklung der weiblichen Brustwarze und Brustdrüse) bei Kleinkindern in Puerto Rico, die sie u. a. auch mit dem Verzehr von sojahaltigen Diäten in Zusammenhang brachten. Allerdings kam die Arbeitsgruppe zu keinem abschließenden Ergebnis, da auch Pestizide und Abfall von pharmazeutischen Fabriken als Verursacher in Frage kamen (Freni-Titulaer *et al.*, 1986).

White und Mitarbeiter konnten in einer im Jahr 2000 vorgestellten Studie Zusammenhänge zwischen einem jahrelangen Sojakonsum und einer nachlassenden Hirnleistung feststellen. Personen, die in der Mitte ihres Lebens über mehrere Jahre mehrmals wöchentlich sojahaltige Nahrungsmittel zu sich nahmen, zeigten im höheren Alter deutlich schlechtere Denkleistungen als ihre Altersgenossen. Außerdem konnte ein deutlich niedrigeres Hirngewicht und eine Weitung der Ventrikel bei einer späteren Autopsie festgestellt werden (White *et al.*, 2000). Allerdings sind bei der zitierten Studie deutliche Mängel festzustellen; so unterschieden sich die beiden Untersuchungsgruppen u. a. im Durchschnittsalter, das in der Kontroll-

gruppe um zwei Jahre höher lag, sowie in der Inzidenz von Schlaganfällen, die in der Kontrollgruppe ebenfalls deutlich höher war.

Schließlich zeigten Untersuchungen an Veganern (Personen, die keinerlei tierische Produkte zu sich nehmen), die sich u. a. von Tofu und Bohnenmus als Ersatz für Fleisch und Milchprodukte ernährten, ein deutliches Risiko einen Mineralstoffmangel zu erleiden. Besonders hervorzuheben sind dabei die Ergebnisse für Calcium, Magnesium und Eisen. Verursacht wird dieser Mineralstoffmangel vermutlich - unabhängig von den Phytoestrogenen - durch die hohen Spiegel an Phytaten (Salze der Phytinsäure). Diese Stoffe werden auch durch die normalerweise üblichen Methoden zur Senkung hoher Phytatmengen in der Sojabohne (z. B. sehr langes Kochen) nicht zerstört. Beim Verzehr von Tofu u. Ä. zusammen mit Fleisch wird dieser mineralblockierende Effekt jedoch deutlich reduziert. Dies und die Tatsache, dass Asiaten häufig geringere Mengen an Tofu pro Mahlzeit zu sich nehmen, erklärt die Beobachtung, dass sie von dem Mineralstoffmangel meist nicht betroffen sind (Ologhobo und Fetuga, 1984; Sandstrom *et al.*, 1989; Torre *et al.*, 1991).

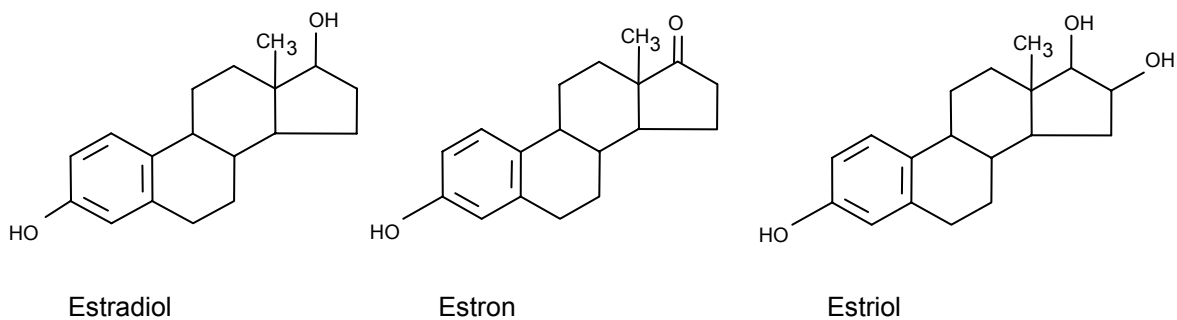
Abschließend bleibt an dieser Stelle festzuhalten, dass zumindest ein Teil der beschriebenen negativen Effekte auf Mensch und Tier scheinbar auf die estrogene Wirkkomponente der Phytoestrogene zurückzuführen ist. Andere erwähnte Beobachtungen scheinen unabhängig von einer estrogenen Wirkung abzulaufen.



## 1.2 Estrogene

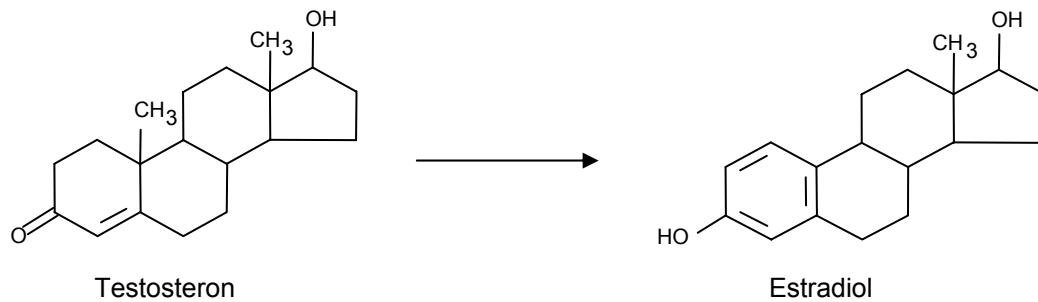
### 1.2.1 Physiologische Wirkungen

Als natürliche Liganden des Estrogenrezeptors kommen neben dem Estradiol zwei weitere Estrogene in Frage, die aus Estradiol durch Metabolisierungsvorgänge hervorgehen, aber ebenso auch in den Follikelepithelien produziert werden und deutlich schwächere Wirkung zeigen als ihre Ausgangsverbindung. Hierbei handelt es sich um Estron und Estriol (Abb. 9). Estron zeigt noch ca. ein Drittel der Estradiolwirkung, wohingegen der Hauptmetabolit Estriol nur noch ca. ein Zehntel der biologischen Aktivität des Estradiols besitzt. Die Ausscheidung der drei Substanzen erfolgt nach der Bindung an Glukuron- oder Schwefelsäure in der Leber z. T. über die Galle und z. T. mit dem Harn (Mutschler *et al.*, 2001).



**Abb. 9: Strukturformeln von Estradiol, Estron und Estriol**

Estrogene, die zu der Gruppe der Steroidhormone zu zählen sind, fungieren als Informationsüberträger bei der Regulation einer Vielzahl von Stoffwechselfvorgängen und Organfunktionen. Sie werden überwiegend in den Granulosa- und Thekazellen der Ovarien zusammen mit den Gestagenen (Progesteron) aus dem männlichen Geschlechtshormon Testosteron über eine Aromatisierung des Ringes A unter oxidativer Entfernung der C-19-Methylgruppe durch das Enzym Aromatase gebildet (Abb. 10). Alternativ kommt auch eine Synthese über Androstendion und Estron in Frage (Mutschler *et al.*, 2001).



**Abb. 10: Biosynthese von Estradiol aus Testosteron**

Aufgrund ihrer hohen Lipophilie können die Estrogene sehr gut Zellmembranen überwinden - auch die des Magen-Darm-Traktes - und dann anschließend mit einer hohen Affinität an ihre spezifischen Rezeptoren binden.

Die oben beschriebenen Stoffwechselforgänge und Organfunktionen, die durch Estrogene beeinflusst werden, sollen nun im Folgenden genauer charakterisiert werden. Zunächst seien die klassischen Wirkungen auf das Wachstum der weiblichen Geschlechtsorgane und die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau erwähnt sowie die Kontrolle des monatlichen Menstruationszyklus mit der Eireifung und der Zellproliferation im Uterus. Diese klassisch estrogenregulierten Prozesse erfolgen meist im Zusammenspiel mit den Gestagenen und sind die Folge einer Interaktion des Hormons mit dem Estrogenrezeptor, der in entsprechend großen Mengen in den Zielorganen wie z. B. Uterus, Ovarien, Vagina und Mamma exprimiert wird. In den erwähnten Geweben kommt es dabei durch Estrogene u. a. zu einer Zellvergrößerung bzw. Zellvermehrung, die entweder durch eine Steigerung der Replikationsrate und/oder durch eine Senkung der Absterberate zustande kommt. Darüber hinaus wird die Biosynthese des Progesteronrezeptors induziert (Horwitz *et al.*, 1978). Jedoch sind auch Estrogenwirkungen in nicht klassischen Zielorganen festzustellen. Beispiele hierfür sind das Gehirn, die Knochen, das kardiovaskuläre System, das Immunsystem und die Leber. Aus diesen Gründen werden verschiedene pathologische Prozesse wie degenerative Veränderungen im ZNS (Fillit *et al.*, 1986), Osteoporose (Turner *et al.*, 1994) oder Arteriosklerose (Henderson *et al.*, 1986; Henderson *et al.*, 1988) häufig mit einem Estrogenmangel in Verbindung gebracht, z. B. in Folge des Klimakteriums. Abbildung 11 zeigt sowohl klassische als auch nicht klassische Zielorgane für eine Estrogenwirkung.

klassische Zielorgane	nicht klassische Zielorgane
Eierstöcke	Niere
Vagina	Langerhans-Inseln
Gebärmutter	Leber
Brustdrüse	Knochen
Nebenniere	Kardiovaskuläres System
Prostata	Makrophagen
Hypophyse	Thymozyten
Hypothalamus	Lymphozyten
Leydig-Zellen	Endothelzellen
	Osteoblasten
	Gliazellen bzw. Schwann-Zellen

**Abb. 11: Estrogensensitive Gewebe und Zellen**  
(nach Diel, 2002)

Allerdings soll nicht unerwähnt bleiben, dass der Verdacht besteht, dass erhöhte Estrogenspiegel die Entstehung und Entwicklung von verschiedenen Tumorerkrankungen (z. B. der Mamma) begünstigen (Colditz, 1993). Im Tierversuch induziert E<sub>2</sub> in verschiedenen Organen von Ratten, Mäusen und Hamstern eindeutig Tumore. Neuere Untersuchungen und Beobachtungen zeigen, dass im Menschen leichte Steigerungen der zirkulierenden Estrogenspiegel durch gesteigerte endogene Produktion oder durch gesteigerte therapeutische Estrogendosen das Brust- und Uteruskrebsrisiko erhöhen (Nandi *et al.*, 1995; Kristensen und Borresen-Dale, 2000). Jedoch kann die beobachtete Kanzerogenität nicht hinreichend mit der proliferationsstimulierenden Wirkung der Estrogene erklärt werden (Liehr, 2000).

Für den Menschen vermutet man heute, dass eine sehr frühe erste Regelblutung (Menarche), Kinderlosigkeit bzw. ein höheres Alter bei der ersten Geburt, eine späte letzte Regelblutung (Menopause) sowie eine Hormonersatztherapie um und nach der Menopause das Risiko für eine Brustkrebserkrankung erhöhen, weil die zirkulierenden Estrogene über einen sehr langen Zeitraum auf den Körper der Frau einwirken können (Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, 2002).

### 1.2.2 Aktivierung des Estrogenrezeptors

Der Estrogenrezeptor (ER) zählt zu den primär kernständigen Rezeptoren („*nuclear receptors*“) und wird nach der zytoplasmatischen Translation in den Nukleus transferiert (King und Greene, 1984). Bei genauerer Analyse des ER und anderer Steroidhormonrezeptoren wurde deutlich, dass diese Proteine aus mehreren

funktionellen Domänen zusammengesetzt sind (Beato *et al.*, 1995). Hierbei handelt es sich um die N-terminale A/B-Domäne, die einen Transaktivierungsbereich beinhaltet (AF-1), die DNA-Bindungsdomäne (DBD), die D-Domäne, die zur Flexibilität des Rezeptors beiträgt, die Ligandenbindungsdomäne (LBD), die abgesehen von der Ligandenbindung eine Rolle bei der Dimerisierung des Rezeptors und der Lokalisation des ER im Kern spielt, und schließlich die C-terminale Transaktivierungsdomäne (AF-2).

Der ER liegt im Zellkern zunächst in einer inaktivierten Form vor, die durch die Assoziation mit einer Vielzahl von „*heat shock*“ Proteinen (hsp) - wie z. B. hsp 90 und hsp 56 (Rossini, 1994) - charakterisiert ist. Lagert sich nun ein Estrogen an den hsp-Rezeptor-Komplex an, so dissoziiert dieser und es kommt zur Dimerisierung zweier frei gewordener Estrogenrezeptoren. Anschließend kann dieses Homodimer über ein Zinkfingermotiv mit „*estrogen responsive elements*“ (ERE) in der Promotorregion der Ziel-DNA interagieren (Beato *et al.*, 1996) und schließlich nach Anlagerung coaktivierender Proteine wie z. B. SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) an AF-2 (Onate *et al.*, 1995) die Transkription spezifischer Gene beeinflussen (Tsai und O'Malley, 1994; Beato *et al.*, 1996; Jensen, 1996).

Welche Gene in einer Zelle aktiviert werden, hängt nicht nur von der Art und Konzentration der aktivierten Steroidrezeptoren, sondern auch von zahlreichen anderen die Genaktivität regulierenden Faktoren ab (Mueller und Korach, 2001).

### 1.2.3 Klassische Wirkmechanismen

Unter einem klassischen Wirkmechanismus versteht man die Transkriptionskontrolle von Genen mit mindestens einem ERE in ihrem Promotorbereich. Dieses ERE kann wie oben beschrieben mit der DNA-Bindungsdomäne des dimerisierten Estrogenrezeptors interagieren. Im Anschluss an die Bindung an die DNA treten spezielle Transkriptionsfaktoren wie z. B. SRC-1 (*steroid receptor coactivator-1*) und pCIP (*p300/CBP interacting protein*) mit den Transaktivierungsbereichen der Steroidrezeptoren in Verbindung, und die Transkription des Zielgens wird aktivierend oder reprimierend beeinflusst (Abb. 12).

Ein Beispiel für ein solches klassisch reguliertes Gen ist das des Progesteronrezeptors (PR), das mit zunehmender Estrogenkonzentration verstärkt transkribiert wird (Read *et al.*, 1988). Die Regulation solcher klassisch regulierter Gene ist über eine Vielzahl von Parametern beeinflussbar, so stellen z. B. die Dissoziation des

hsp-ER-Komplexes (Gronemeyer *et al.*, 1992), die Dimerisierung des Rezeptors (Furlow *et al.*, 1993) oder auch die Phosphorylierung des ERs (Weigel, 1996) weitere Regulationsmöglichkeiten dar.

#### 1.2.4 Alternative Wirkmechanismen

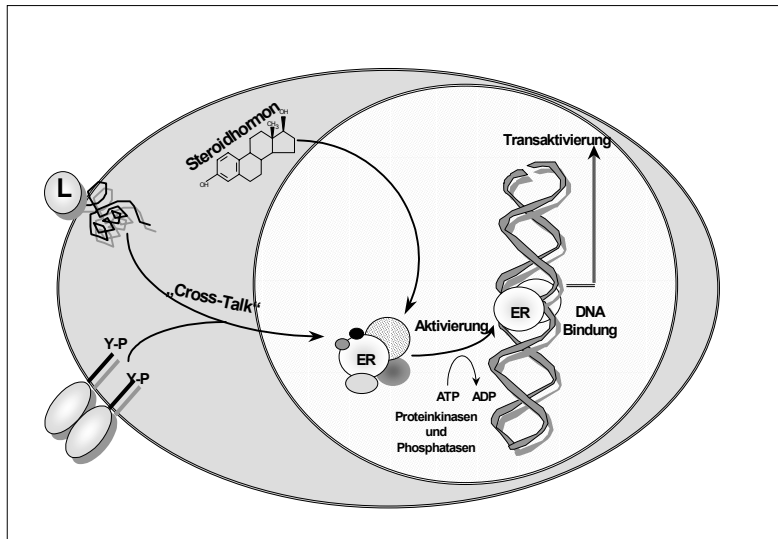
Neben den vorstehend genannten klassischen Wirkmechanismen hat man jedoch in den letzten Jahren vielfältige andere molekulare Mechanismen entdeckt, über die Estrogene ihre Wirkungen entfalten können (Brann *et al.*, 1995). Diese Mechanismen basieren häufig auf einer Interaktion des ERs mit anderen Transkriptionsfaktoren (Blobel *et al.*, 1995). So weiß man inzwischen, dass Estrogene auch die Transkription von Genen beeinflussen können, die über keine EREs in ihrem Promotor verfügen. Als Beispiel soll hier lediglich die Regulation des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) durch Estrogene genannt werden. Horowitz beschrieb 1993 die indirekte Hemmung des IL-6 Promotors durch Estradiol, welches an den ER bindet, der dann aber nicht mit dem ERE, sondern stattdessen mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (**Nuclear Factor kappa B**) interagiert. Dies hat eine verminderte Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors an den IL-6 Promotor zur Folge und somit eine reduzierte Expression des IL-6 Gens (Pottratz *et al.*, 1994; Stein und Yang, 1995). Das IL-6 Gen kann demnach als ein indirekt estrogensensitives Gen angesehen werden.

Eine weitere physiologische Bedeutung des IL-6 liegt neben der Funktion als Entzündungsmarker in der Regulation von Knochenabbauprozessen. Osteoblasten sekretieren u. a. IL-6, welches durch Estrogene reprimiert werden kann. Osteoporotische Prozesse bei postmenopausalen Frauen sind also über die mangelnde Estrogenproduktion und somit über die ungehinderte Expression von IL-6 zu erklären (Manolagas *et al.*, 1995).

Eine weitere Beobachtung der letzten Jahre beschreibt die Dissoziation des hsp-Rezeptor-Komplexes und die darauf folgende Dimerisierung zweier Estrogenrezeptoren nicht nur als Folge der Anlagerung von Estrogenen an den Rezeptor, sondern auch als Folge von Signaltransduktionskaskaden (Abb. 12). Beispielsweise aktiviert der Wachstumsfaktor EGF (**epidermal growth factor**) den ER, ohne dass dieser ein entsprechendes Estrogen gebunden hat. Man bezeichnet diese Art der Regulation auch als „*cross-talk*“-Mechanismus mit anderen Signaltransduktionskaskaden (Smith *et al.*, 1993; Ignar-Trowbridge *et al.*, 1995). Weiterhin

gibt es verschiedene Hinweise, dass Estrogene auch ohne Interaktion mit dem ER wirken können, beispielsweise bei der Erregung von Nervenzellen (Moss *et al.*, 1997).

Auch für die Phytoestrogene wären diese alternativen Wirkmechanismen denkbar.



**Abb. 12: Klassische und alternative Wirkmechanismen**

L = Ligand, der an einen membranständigen Rezeptor bindet, welcher über die cAMP-Signalkaskade wirkt; Y-P = aktive Form eines Wachstumsfaktor-Rezeptors (nach Diel *et al.*, 1999)

### 1.2.5 Estrogenrezeptor-Subtypen

Vor einigen Jahren konnten Kuiper und Mitarbeiter zeigen, dass der Estrogenrezeptor der Ratte in Form zweier Subtypen ( $ER\alpha$ ,  $ER\beta$ ) vorliegt (Kuiper *et al.*, 1996). Auch für die Maus (Tremblay *et al.*, 1997) und für den Menschen (Mosselman *et al.*, 1996; Enmark *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1998) bestätigte sich das Vorhandensein dieser beiden Subtypen. Bei genaueren Untersuchungen zeigte sich, dass sich  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  hinsichtlich der N-terminalen A/B-Domäne und der Ligandenbindungsdomäne (LBD) deutlich voneinander unterscheiden.

Die Affinität des natürlichen, körpereigenen Estrogens Estradiol zeigt keinerlei Unterschiede zwischen den beiden Subtypen; ebenso vermögen beide aktivierten Rezeptorformen die Transkription von Reportergenen, welche unter Kontrolle eines EREs stehen, estrogenabhängig zu beeinflussen (Kuiper *et al.*, 1997). Betrachtet man aber nun die Affinitäten einzelner Phytoestrogene zu diesen beiden Subtypen  $ER\alpha$  und  $ER\beta$ , so stellt man deutliche Unterschiede fest (Abb. 13).

Substanz	relative molare Bindungsaffinität	
	Estrogenrezeptor $\alpha$	Estrogenrezeptor $\beta$
17 $\beta$ -Estradiol	100	100
Coumestrol	20	140
Genistein	4	87
Daidzein	0,1	0,5

**Abb. 13: Relative molare Bindungsaffinitäten verschiedener Phytoestrogene**  
(nach Kuiper *et al.*, 1998)

Darüber hinaus ist inzwischen bekannt, dass die beiden Rezeptorsubtypen in unterschiedlicher Stärke in verschiedenen Geweben exprimiert werden (Pfaffl *et al.*, 2001). Zusätzlich sind entscheidende Unterschiede in Bezug auf die Verteilung zwischen Mensch und Nagern bekannt. Die größten Unterschiede kennt man aus der Prostata; die Ratte zeigt eine hohe Expression an ER $\beta$ , wohingegen der Mensch verhältnismäßig wenig ER $\beta$  exprimiert (Enmark und Gustafsson, 1999).

Betrachtet man nun einzelne Gewebe bzw. Organe des Menschen, so stellt man fest, dass in den klassischen Zielorganen für Estrogene wie z. B. dem Uterus und dem Mammagewebe der ER $\alpha$  der vorherrschende Subtyp ist. Dahingegen findet man im Immunsystem, im Urogenitaltrakt, im Gastrointestinaltrakt, der Niere und der Lunge den ER $\beta$  Subtyp in großer Menge (Gustafsson, 1999).

Critchley und Mitarbeiter zeigten 2001, dass bei genauerer Untersuchung des Gefäßendothels von Blutgefäßen nur der ER $\beta$  nachgewiesen werden konnte. Sie folgerten daraus, dass eine estrogene Wirkung von Substanzen im Gefäßendothel direkt über den ER $\beta$  vermittelt werden muss. Im Gegensatz dazu beschrieb Cassidy im Jahr 1999 das Vorhandensein des ER $\alpha$  in Gefäßzellen, allerdings zitierte er eine Studie von Lindner und Mitarbeitern, die eine vermehrte mRNA-Expression des ER $\beta$  nach Verletzungen in den Gefäßen zum Thema hatte (Lindner *et al.*, 1998).

Durch das Vorhandensein von zwei verschiedenen Estrogenrezeptorsubtypen wird es in Zukunft eventuell möglich sein, rezeptorspezifische Liganden, die die Grundlage für neue Therapeutika mit einer höheren *in vivo* Effizienz und einem günstigeren Nebenwirkungsprofil darstellen, zu entwickeln (Barkhem *et al.*, 1998). Für eine organspezifische Wirkung der Phytoestrogene spielen neben den schon erwähnten Subtypen des ERs und der Vielzahl physiologischer Splicevarianten der beiden Subtypen, deren Aktivität nach Hormonbindung sich wiederum deutlich

von der des jeweiligen Wildrezeptors unterscheiden kann (Inoue *et al.*, 2000; Price *et al.*, 2001), auch die zell- und organspezifische Ausstattung mit Coaktivatoren und Corepressoren eine wichtige Rolle.

Zusätzlich sollte berücksichtigt werden, dass die Rezeptoren sowohl als Homo- als auch als Heterodimere aktiv sein können (Cowley *et al.*, 1997; Pettersson *et al.*, 1997) und jeder Rezeptor in Abhängigkeit von dem gebundenen Liganden in mehreren räumlichen Konformationen vorliegen kann (Brzozowski *et al.*, 1997; Pike *et al.*, 1999). Diese geschilderten molekularen Gegebenheiten sind die Grundlage für die organspezifischen Wirkspektren von synthetischen und natürlichen Hormonen, die im Falle von Estrogenen wie bereits erwähnt SERMs genannt werden.



### 1.3 Beschreibungen der untersuchten Gene

#### 1.3.1 Clusterin

Clusterin (syn.: TRPM-2 = *testosteron-repressed prostate message 2, dimeric acidic glycoprotein, sulfated glycoprotein-2* u. a. m.) ist ein heterodimeres Glykoprotein mit einer Molmasse von ca. 80 kDa, das je nach Forschungsgruppe und zunächst beobachtetem Vorkommen unterschiedliche Namen trägt (Redondo *et al.*, 2000).

Es wird in verschiedenen Gewebetypen des menschlichen und tierischen Organismus (z. B. Uterus) als Reaktion auf unterschiedliche Stimuli synthetisiert und ist in nahezu allen Körperflüssigkeiten anzutreffen. Die genauen vielfältigen Aufgaben, die Clusterin im Organismus erfüllt, sind bis heute noch nicht abschließend geklärt.

Bekannt sind Einflüsse von Clusterin u. a. auf den Fetttransport, die Einleitung der Apoptose, die Spermienreifung, die Hormonsekretion, den Membranschutz und die Förderung von Zellinteraktionen (Rosenberg und Silkensen, 1995). Da aber auch in verschiedenen Tumoren eine Überexpression von Clusterin gefunden wurde, so z. B. in Tumoren der Blase (Miyake *et al.*, 2002) und der weiblichen Brust (Redondo *et al.*, 2000), und auch ein Zusammenhang zwischen Clusterin und verschiedenen Erkrankungen wie beispielsweise Morbus Alzheimer und Arteriosklerose zur Zeit diskutiert wird, stellt die Genexpression von Clusterin in den einzelnen Geweben einen interessanten Untersuchungsparameter dar.

Die Bildung von Clusterin wird u. a. durch Estrogeneinflüsse reguliert; ein Effekt, der in der vorliegenden Arbeit als estrogensensitiver Parameter von Bedeutung ist. Dabei bewirkt die Gabe eines Estrogens bzw. einer Substanz mit einer estrogenartigen Wirkung die Reprimierung des Proteins und seiner mRNA im Uterus. Clusterin zählt zu der Klasse von Genen, deren Expression unter der Vermittlung von „*immediate early genes*“ auf scheinbar indirektem Wege durch Estradiol reguliert werden (Rosembliit *et al.*, 1996; Wunsche *et al.*, 1998).

#### 1.3.2 Cyclin D1

Cyclin D1 (CD1) zählt zu der Gruppe der Cycline, die wichtige Aufgaben in der Regulation des Zellzyklus erfüllen; dem Vorgang, bei dem aus einer Ausgangszelle zwei Tochterzellen hervorgehen. Die Cycline führen dabei die Zellen

durch die verschiedenen Phasen - nämlich durch die G<sub>1</sub>-, S-, G<sub>2</sub>- und M-Phase. Je nach Zelltyp kann dieser Zyklus zwischen einigen Stunden oder aber wie bei einer Nervenzelle auch viele Jahre betragen. Die einzelnen Phasen lassen sich durch folgende Ereignisse charakterisieren:

- G<sub>1</sub>-Phase: postmitotische Ruhephase; Zeitraum zwischen der letzten mitotischen Teilung und der DNA-Synthese (auch G<sub>0</sub>-Phase falls sich keine S-Phase anschließt)
- S-Phase: DNA-Synthesephase; kontinuierlicher Anstieg des DNA-Gehaltes bis zum Erreichen einer originalgetreuen Kopie der gesamten DNA
- G<sub>2</sub>-Phase: prämitotische Ruhephase; Synthese mitotisch aktiver Enzyme; postreplikative Reparaturmechanismen am neu synthetisierten DNA-Strang
- M-Phase: Mitosephase; Halbierung des Chromosomensatzes und Entstehung zweier diploider Tochterzellen (Pschyrembel, 1990; Knippers, 2001)

Genau betrachtet handelt es sich bei Cyclin D1 um eine Kinase, die über eine Phosphorylierung u. a. des Retinoblastoma-Proteins und der daraus resultierenden Freisetzung von Transkriptionsfaktoren die Replikation von S-Phase-Genen einleitet. Durch die Bindung der Cycline an spezifische, cyclinabhängige Kinasen (*cyclin dependent kinases* = CDKs) und die daraus entstehenden Cyclin D1-CDK-Komplexe kommt es zur Phosphorylierung entscheidender Schlüsselsubstrate, die für die Zellproliferation zuständig sind (Castro-Rivera *et al.*, 2001). Eine weitere Regelung erfolgt durch die Phosphorylierung und Dephosphorylierung der CDK-Proteine mittels spezifischer Proteinkinasen und Phosphatasen (Weinstein, 2000). Cyclin D1 zeigt seine Wirkung am Übergang von der G<sub>1</sub>- in die S-Phase des Zellzyklus, bei der es Einfluss auf die Häufigkeit, mit der sich eine Zelle teilt, nehmen kann.

Die Cyclin D1 Genexpression ist u. a. durch 17β-Estradiol induzierbar (Castro-Rivera *et al.*, 2001), weshalb dieses Gen als Untersuchungsparameter für die vorliegende Arbeit von Bedeutung ist. Die entscheidende Rolle bei dieser über Estrogene vermittelten Proliferation, die über die Induktion von Cyclin D1 abläuft, spielt der Estrogenrezeptor α. Allerdings zeigt der Cyclin D1 Promotor kein klassisches ERE (*estrogen responsive element*), so dass die Induktion durch ERα über ein alternatives *responsive element* ablaufen muss. Die genaue Funktion des ERβ am

Cyclin D1 Promotor ist noch nicht abschließend aufgeklärt. Man vermutet allerdings, dass der ER $\beta$  die proliferative Wirkung des ER $\alpha$  hemmen kann. Diese Beobachtung wäre damit ein weiterer Aspekt in der Annahme, dass der ER $\beta$  die proliferativen Wirkungen der Estrogene modulieren könnte (Liu *et al.*, 2002).

### 1.3.3 Cyclooxygenase-2

Menschliche und tierische Zellen besitzen Gene, die für mindestens zwei Isoformen der Cyclooxygenase kodieren, nämlich Cyclooxygenase-1 und -2 (COX-1, COX-2). Bei den Cyclooxygenasen handelt es sich um Prostaglandin-Synthasen, die Arachidonsäure in zyklische Endoperoxide (Prostaglandin H<sub>2</sub>) umwandeln, die wiederum eine Vorstufe von Prostaglandinen, von Thromboxan A<sub>2</sub> und von Prostacyclin darstellen. Prostaglandine selbst sind im Wesentlichen an der Entstehung von Fieber, Schmerzen und entzündlichen Reaktionen beteiligt (Mutschler *et al.*, 2001).

Bei COX-1 handelt es sich um ein konstitutiv exprimiertes Enzym mit einer Größe von 22 kb (Dannenberg und Zakim, 1999), das u. a. in Magen, Niere und Thrombozyten vorhanden ist und dort die physiologische Synthese von Prostaglandinen veranlasst.

Im Gegensatz dazu ist die Expression von COX-2 mit einer Größe von 8,3 kb (Dannenberg und Zakim, 1999) in erster Linie durch verschiedene Faktoren induzierbar - besonders nach Gewebeschädigungen kommt es innerhalb von Minuten zur Bildung von COX-2 („*immediate early gene*“). Dieses veranlasst dann die Synthese von Prostaglandinen, die wie oben bereits beschrieben z. B. als Schmerz- und Entzündungsmediatoren fungieren. Jedoch haben jüngere Untersuchungsergebnisse gezeigt, dass COX-2 in verschiedenen Geweben und Organen (z. B. Rückenmark, Niere und Uterus) auch konstitutiv exprimiert wird (Mutschler *et al.*, 2001).

Pharmazeutisch spielen Cyclooxygenase-Hemmstoffe schon seit vielen Jahren in der Therapie von Schmerzen und Fieber eine bedeutende Rolle. Durch die nicht-selektive Wirkung vieler Substanzen (z. B. Acetylsalicylsäure) sind unerwünschte Effekte wie beispielsweise Störungen bis hin zu Erosionen im Gastrointestinaltrakt nicht überraschend. Aus diesem Grund stellte die Einführung von selektiven Hemmstoffen der COX-2 (z. B. Rofecoxib, Celecoxib) vor einigen Jahren einen entscheidenden Fortschritt dar, da diese Substanzen kaum mehr in die physiologi-

schen Wirkungen der Prostaglandine, die über COX-1 vermittelt werden, eingreifen.

#### 1.3.4 Komplement C3

Das Komplement C3 (C3) Gen ist ein aus zwei Untereinheiten bestehendes Protein mit einer Molmasse von ca. 180 kDa (Sundstrom *et al.*, 1989). Als Bestandteil des Komplementsystems übernimmt es wichtige Aufgaben bei der Inaktivierung von in den Organismus eingedrungenen Fremdstoffen. Die Aktivierung von C3 erfolgt über den „klassischen Weg“ durch einen Antigen-Antikörper-Komplex, aber auch für den „alternativen Weg“ mit der unspezifischen Aktivierung an der Oberfläche von Fremdmolekülen spielt C3 eine bedeutende Rolle (Pschyrembel, 1990).

Komplement C3 wird u. a. estrogenabhängig von den luminalen Epithelzellen des Uterus gebildet, so dass die Gabe eines Estrogens oder einer Substanz mit einer estrogenartigen Wirkung zu einer Induzierung des Proteins bzw. seiner mRNA führt (Sundstrom *et al.*, 1989). Das Komplement C3 Gen, das ausschließlich im Uterus unter Estradiolkontrolle steht, zählt zu den direkt estrogenregulierten Genen, da es in seinem Promotor drei „*estrogen responsive elements*“ (ERE) enthält (Vik *et al.*, 1991; Fan *et al.*, 1996).

Das C3 Gen diente in der vorliegenden Arbeit als sehr sensitiver Parameter zur Untersuchung von estrogenen Effekten im Uterus.

#### 1.3.5 Progesteronrezeptor

Das Gen des Progesteronrezeptors (PR) kodiert in sehr vielen Spezies für zwei verschiedene Proteine - den PR-A und den PR-B. Eine Ausnahme bildet jedoch z. B. das Kaninchen mit nur einem Protein, welches der B-Form des Menschen stark ähnelt. Beide Proteine wurden in menschlichen Brustkrebszellen mit einer Molmasse von ca. 81 und 115 kDa bestimmt. Sie bilden zusammen als Dimer den Progesteronrezeptor (Graham und Clarke, 1997), der zu den ligandaktivierten kernständigen Rezeptoren zählt und durch die Wirkung von Estrogenen vermehrt gebildet wird. Nach der Bindung des Estrogens an den Estrogenrezeptor kommt es nach dessen Aktivierung zur Expressionsinduktion des PRs. Im Gegensatz dazu bewirkt Progesteron eine verminderte Bildung des PRs (Bouchard,

1999). Somit handelt es sich auch bei diesem Parameter um eine direkte Messgröße für die estrogene Potenz einer Untersuchungssubstanz, denn durch Estrogenwirkung kommt es wie oben beschrieben zu einer Induktion auf mRNA-Ebene.

#### 1.4 Zielsetzungen der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die molekularen Wirkmechanismen der Phytoestrogene Genistein (Gen), Daidzein (Dai) und Coumestrol (Cou) im Vergleich zum natürlichen Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol und zum synthetischen Estrogen Ethinylestradiol analysiert werden.

Konkret sollen folgende Fragestellungen mithilfe verschiedener *in vitro* und *in vivo* Testsysteme bearbeitet werden:

1. Zeigen die ausgewählten Phytoestrogene Einfluss auf die Apoptose- und Proliferationsrate *in vitro*? Besteht dabei womöglich eine Dosis-Wirkungsbeziehung? Wie ist die Wirkstärke dieser Substanzen im Vergleich zu 17 $\beta$ -Estradiol und sind agonistische oder antagonistische Effekte zu beobachten?

Zur Klärung dieser Fragen werden die Substanzen in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 in verschiedenen Dosierungen im Vergleich zu 17 $\beta$ -Estradiol getestet. Darüber hinaus werden die Einzelsubstanzen in Kombination mit dem natürlichen Estrogen verabreicht, um mögliche agonistische oder antagonistische Effekte zu analysieren. Die Analyse der verschiedenen Zellzyklusphasen erfolgt durchflusszytometrisch.

2. Wie beeinflussen die verschiedenen Phytoestrogene estrogenabhängige Parameter *in vivo* im Rattenmodell? Zeigen die Untersuchungssubstanzen in Kombination mit dem natürlichen Hormon agonistische oder antagonistische Effekte?

Um diese Fragen beantworten zu können, werden die Untersuchungssubstanzen im Rattenmodell getestet. Neben der Gabe von Einzelsubstanzen soll in der Kombination mit Estradiol die möglicherweise agonistische bzw. antagonistische Wirkweise der Phytoestrogene analysiert werden. Als Untersuchungsparameter werden neben dem Uterusfeuchtgewicht, die Uterus- und die Vaginalepithelhöhen histologisch sowie die Expression des Progesteronrezeptors in der Mamma im-

munhistochemisch bestimmt. Die endogene Genexpression von Komplement C3 und Clusterin wird mithilfe der semiquantitativen PCR bestimmt.

3. Sind nach der Applikation der genannten Phytoestrogene organspezifische bzw. gewebe selektive Effekte nachweisbar?

Zur Beantwortung dieser Frage wird die endogene Genexpression der verschiedenen estrogenregulierten Gene Cyclin D1, Cyclooxygenase-2, Komplement C3 und Progesteronrezeptor in der Mamma, im Uterus und in der *Vena cava* von Wistar Ratten mittels semiquantitativer und *Real-Time* PCR bestimmt.

Abschließend soll eine pharmakologische Charakterisierung der eingesetzten Substanzen Genistein, Daidzein und Coumestrol in Bezug auf ihre Eigenschaften als Agonist, Antagonist oder Partialagonist getroffen werden.

## 2 MATERIAL

### 2.1 Laborgeräte

Ausgießstation Tissue-Tek® II	Ames Company Inc., Woodland, CA, USA
Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer, Jerusalem, IL
Begasungsbrutschrank Hera cell	Kendro Laboratory Products, Hanau
Bildverarbeitungsanlage Gel Print 2000 I	MWG-Biotech AG, Ebersberg
Durchflusszytometer Coulter Epics XL	Coulter GmbH, Krefeld
Einbettautomat Tissue-Tek® VIP 2000	Miles Scientific, Naperville, IL, USA
Elektrophoresekammern Agagel Mini, Midi, Maxi	Biometra, Göttingen
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Kühlschrank glass line (4°C/-20°C)	Liebherr GmbH, Biberach a. d. Riß
Mikro-Dismembrator	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Mikroskop Dialux 20 EB	Leitz AG, Wetzlar
Mikrowellengerät Optimo	Moulinex, Paris, F
pH-mV-Meter	Knick GmbH & Co., Berlin
Photometer Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech, Cambridge, UK
Pipetten (variabel und Fixvolumen)	
• Eppendorf	Eppendorf AG, Hamburg
• Pipetman	Gilson Int. BV, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Tecnomara GmbH, Fernwald
Präzisionsküvette (Quarzglas) Suprasil®	Hellma Optik GmbH, Jena
Rotationsmikrotom Modell 1140/Autocut	Reichert-Jung, Nußloch
Sterilbank HS 12	Heraeus Instruments, Hanau
<i>Thermocycler</i>	
• GeneAmp 9600	Perkin Elmer, Weiterstadt
• UNO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
• iCycler	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Trockenschränke	Heraeus Instruments, Hanau
	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Ultra-Tiefkühlgerät (-80°C)	Heraeus Instruments, Osterode
Genie 2 Vortex-2™ Genie Mischer	Scientific Industries Inc., Bohemia, NY, USA
Waagen	
• MC 1, Analytic AC 210 S	Sartorius AG, Göttingen
• Scaltec SBA 52	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Wärmeplatte	Gerhardt GmbH & Co. KG, Bonn
Bürker Zählkammer	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Zentrifuge	
• Megafuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
• Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg

### 2.2 Chemikalien

Die Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, von den Firmen in analytischer Qualität bezogen.

Aceton	Merck, Darmstadt
Agarose (DNA > 500 bp)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf



Aktivkohle	Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA
3-Amino-9-ethylcarbazol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampuwa <sup>®</sup>	Fresenius, Bad Homburg
Anilinblau	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Anilinöl	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Azokarmin G	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)	Serva Feinbiochemicals, Heidelberg/New York
Chloroform	Merck, Darmstadt
Citronensäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Diethylpyrocarbonat	Amresco Inc., Solon, OH, USA
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Dithiothreitol	Amresco Inc., Solon, OH, USA
Erdnussöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure/Eisessig	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethanol	Amresco Inc., Solon, OH, USA
Ethidiumbromid	Hoffmann GmbH & Co., Düsseldorf
Ethylendiamintetraessigsäure	Merck, Darmstadt
Fluorescein	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Formaldehyd-Lösung (37 %ig)	Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe
Fuchsin	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Glycerol-Gelatine	Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe
Insulin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe
Kaliumpermanganat	Merck, Darmstadt
Kristallviolett	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Lichtgrün	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Methanol	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumazid	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
Paraffin/Histo-Comp <sup>®</sup> Gewebeeinbettmittel	Merck, Darmstadt
Paraldehyd-Lösung	Vogel GmbH & Co. KG, Giessen
Penicillin-Streptomycin	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung	Gibco Corporation, Karlsruhe
Phosphorwolframsäure	Gibco <sup>™</sup> -Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Propidiumiodid	Merck, Darmstadt
Propylenglykol (1,2-Propandiol)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
RPMI 1640 Medium	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Saccharose	Gibco <sup>™</sup> -Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt
SYBR <sup>®</sup> Green I ( <i>Nucleic Acid Gel Stain</i> )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Thiomersal (Thimerosal)	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan, Trizma <sup>®</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Tris-HCl, Trizma <sup>®</sup> -HCl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Triton-X	Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA
TRIZOL <sup>®</sup> Reagent	Life Technologies, Gaithersburg, MD, USA
Ultraclear <sup>®</sup> (Xylol-Ersatz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen
Wasserstoffperoxid (30 %ig), Perhydrol <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Xylencyanol	Merck, Darmstadt
Xylidin-Ponceau	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim

### 2.3 Verbrauchsmaterialien

Auslaufpipetten, wattiert, steril (5, 10, 25 ml)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Durchflusszytometer-Röhrchen	Corning GmbH, Kaiserslautern
Einbettungskassetten Tissue-Tek <sup>®</sup>	Satura Finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Einmalfilterhalter (Porengröße 0,2 µm)	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Einmalkanülen Neolus 20G (0,9 mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, B
Einmalspritzen Omnifix <sup>®</sup> Luer-Lock (10 ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
iCycler iQ <sup>™</sup> Abdeckfolie (optische Qualität)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Mikrotiterplatten (96-well)	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
PAP-Pen	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
Pipettenspitzen (10, 100, 1.000, 5.000 µl)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (200, 500, 1.500, 2.000 µl)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf
	Starlab GmbH, Ahrensburg
Zellkulturflaschen, steril (75 cm <sup>3</sup> )	TPP AG, Trasadingen, CH
Zellkulturplatten Nunclon <sup>™</sup> Surface, steril (6-well)	Nunc GmbH & Co. KG, Wiesbaden
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Zentrifugen-Röhrchen (15, 50 ml)	TPP AG, Trasadingen, CH

### 2.4 Enzyme, Kits und weitere Substanzen

- Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- SuperScript<sup>™</sup> *First-Strand-System for RT-PCR* (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- DNase I (Desoxyribonuklease I, *Amplification Grade*) (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- RNase H (*E. coli*) (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- 100 bp DNA-Leiter (1µg/µl) (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- Taq DNA-Polymerase (rekombinant) (Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe)
- dNTP-Mix (Desoxyribonukleosid-Triphosphat) (Epicentre Technologies, Madison, WI, USA)

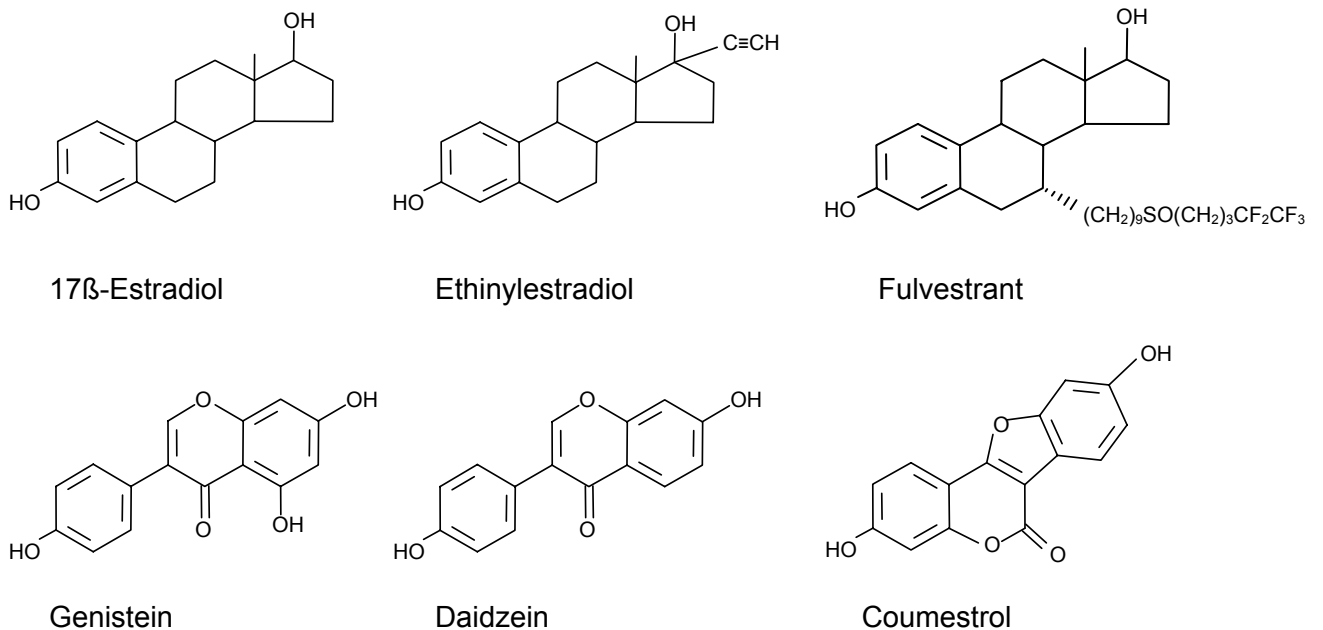
Nach der Übernahme der Firmen Gibco BRL und Life Technologies durch Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) wurden einige Reagenzien und Enzyme anschließend von Invitrogen bezogen.

## 2.5 Estrogene, Antiestrogene und Phytoestrogene

Für die Behandlungen von Zellen und Tieren wurden in den einzelnen Versuchen folgende Substanzen eingesetzt:

- 17 $\beta$ -Estradiol (1,3,5(10)-Estratrien-3,17 $\beta$ -diol)
- Ethinylestradiol (19-Nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5(10)-trien-20-in-3,17-diol)
- Fulvestrant (Faslodex™; 7- $\alpha$ -[9-(4,4,5,5,5-Pentafluoro-pentylsulfinyl)nonyl]estra-1,3,5(10)-trien-3,17 $\beta$ -diol)
- Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon)
- Daidzein (4',7-Dihydroxyisoflavon)
- Coumestrol (7,12-Dihydroxycoumestan)

Abbildung 14 zeigt die Strukturformeln der Untersuchungssubstanzen.



**Abb. 14: Strukturformeln der eingesetzten Substanzen**

17 $\beta$ -Estradiol und Ethinylestradiol wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim), Genistein und Coumestrol über die Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Steinheim) von der Firma Fluka BioChemika (Buchs, CH) und Daid-

zein von der Firma Biomol GmbH (Hamburg) bezogen. Fulvestrant wurde freundlicherweise von Dr. A. Wakeling, Astra Zeneca (Zeneca Pharmaceuticals, Macclesfield, UK), zur Verfügung gestellt.

## 2.6 Primer

Die Primer 1A, C3, CD1, Clusterin, COX-2 und PR wurden von der Firma Gibco BRL-Life Technologies (Karlsruhe) bzw. Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) synthetisiert.

1A 1A	Ratte	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 267 bp	5' CGT CAC AGC CCA TGC ATT CG 3' 5' CGT TTC ATC CTG TTC CAG CTC 3'
C3 C3	Ratte	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 720 bp	5' CAG CCC GAA GAG TGC CAG TAG TC 3' 5' CCA TCC TCC TTT CCA TCA ACT GC 3'
CD1 CD1	Ratte	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 237 bp	5' GTG CCA CAG ATG TGA AGT TC 3' 5' TGG CGC AGG CTT GAC TCC AG 3'
Clusterin Clusterin	Human	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 550 bp	5' CCC TTC TAC TTC TGG ATG AA 3' 5' GAA CAG TCC ACA GAC AAG AT 3'
COX-2 COX-2	Ratte	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 342 bp	5' ATG ATG TAT GCT ACC ATC TGG 3' 5' GGA GTT GTT GTA GAG AAA CTG 3'
PR PR	Human/ Ratte	<i>forward</i> <i>reverse</i> Amplikon: 420 bp	5' CAT GTC AGT GGA CAG ATG CT 3' 5' ACT TCA GAC ATC ATT TCC GG 3'

Die Primer wurden in sterilem Wasser (Ampuwa<sup>®</sup>) gelöst und auf eine Konzentration von 100 pmol/μl verdünnt.

## 2.7 Antikörper und Seren

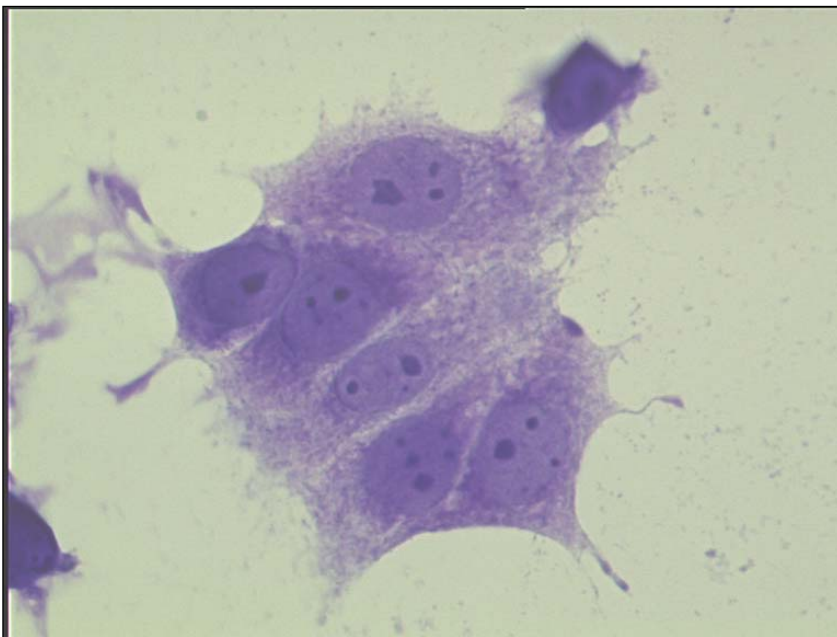
- *Goat Serum, normal* (DAKO, Glostrup, DK)
- *Progesterone Receptor, mouse monoclonal antibody* (Immunotech, Marseille, F)
- *Anti-Mouse, IgG Fraction of Antiserum, developed in goat* (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim)
- *Monoclonal Mouse PAP, horseradish peroxidase and mouse monoclonal anti-horseradish peroxidase, IgG* (DAKO, Glostrup, DK)

## 2.8 Zellen

Bei den untersuchten Zellen handelte es sich um humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7. Diese bestehen aus epithelialen Adenokarzinomzellen und sind Estrogenrezeptor-positiv.

MCF-7 Brustkrebszellen wurden vor einigen Jahrzehnten der 69-jährigen Ordensschwester Catherine Frances aus einem Pleuraerguss entnommen. In dem Namen MCF-7 steht MCF für *Michigan Cancer Foundation*, der Institution in Detroit, die den Bezug dieser Zellen für Forschungseinrichtungen in der ganzen Welt ermöglichte. Die Zahl 7 gibt die erforderliche Anzahl von Versuchen bzw. Biopsien an, die notwendig waren, um die der Patientin entnommenen Zellen im Labor weiterzuzüchten. Dies gelang schließlich nach dem siebten Versuch (Steingraber).

MCF-7 Zellen wachsen einschichtig (als *Monolayer*) und adhären auf dem Boden von Zellkulturflaschen.



**Abb. 15: MCF-7 Zellen**  
(angefärbt mit 0,5 % Kristallviolett in 20 %iger Methanol-Lösung)

## 2.9 Gewebe

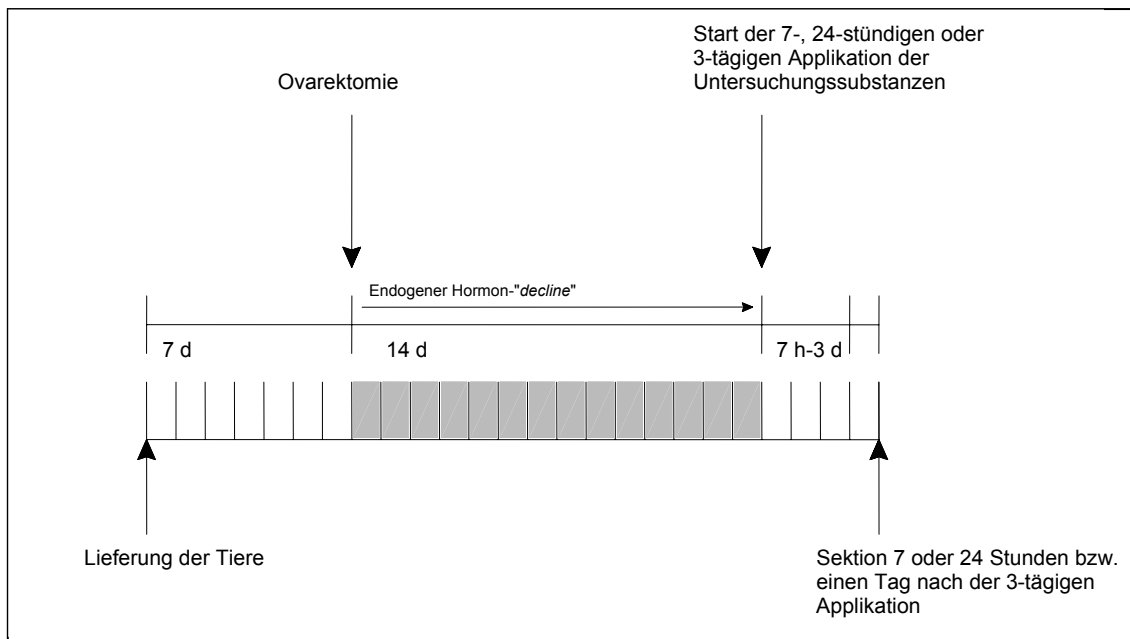
Die untersuchten Gewebe stammen von mit Lösungsmittel, mit Estrogen (17 $\beta$ -Estradiol oder Ethinylestradiol) oder mit den zu untersuchenden Substanzen (Genistein und Daidzein) behandelten weiblichen ovariectomierten Ratten der Stämme Da/Han, Wistar oder Sprague-Dawley (Charles River Wiga GmbH, Sulzfeld oder Moellegard *breeding and research*, Lille Skensved, Dänemark).

Die Tiere wurden unter einem konstanten Tag-Nacht-Rhythmus (12 h) bei 22°C gehalten. Die Fütterung erfolgte mit einer standardisierten Pellet Ssniff Diät (Ssniff Spezialdiäten, Soest) *ad libitum*. Leitungswasser wurde den Tieren ebenfalls *ad libitum* gegeben. Sieben Tage nach der Lieferung der Tiere wurde eine Ovariectomie durchgeführt, an die sich vierzehn Tage später die Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen anschloss. Zum Zeitpunkt der Lieferung wiesen die Tiere ein Körpergewicht von ca. 101 bis 125 g auf, zum Zeitpunkt der Tötung erreichte das Körpergewicht Werte von ca. 180 bis 250 g - je nach Rattenstamm.

Die Untersuchungssubstanzen wurden den Tieren über einen gewissen Zeitraum in definierten Mengen per Schlundsondierung (p. o.) oder subkutan (s. c.) verabreicht. Die verschiedenen Behandlungszyklen sind in den Tabellen 1 bis 5 dargestellt. Bei einem 7- bzw. 24-Stundenwert wurde die Untersuchungssubstanz einmalig verabreicht und die Tiere nach 7 bzw. 24 Stunden getötet. Bei einem 3-Tage wert hingegen erfolgte die Verabreichung an 3 aufeinander folgenden Tagen zur gleichen Uhrzeit, und die Tötung schloss sich ca. 24 Stunden an die letzte Applikation an. Nach Versuchsende erfolgte die Dekapitation, anschließend wurden die zu untersuchenden Gewebe entnommen. Zur molekularbiologischen Weiterbearbeitung wurden die Gewebe in flüssigem Stickstoff schockartig gekühlt und in einem Gefrierschrank bei -80°C gelagert. Bei den Untersuchungsgeweben handelte es sich um Teile von Uterus, Mamma und *Vena cava*.

Material für die histologischen und immunhistochemischen Analysen wurde im Anschluss an die Dekapitation entnommen, in Formol fixiert und in Paraffin eingebettet. Bei den Untersuchungsgeweben handelte es sich um Teile von Uterus, Vagina und Mamma.

Für alle beschriebenen Tierexperimente wurde ein Antrag auf Genehmigung von Versuchsvorhaben gemäß § 8 Abs. 1 Tierschutzgesetz bei der zuständigen Behörde (Regierungspräsidium Köln) gestellt, dem stattgegeben wurde.



**Abb. 16: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs**

Um eine Dosis-Wirkungskurve für die Untersuchungssubstanzen erstellen zu können, wurde bei weiblichen Wistar Ratten ein uterotropher Assay über drei Tage durchgeführt. Die Tiere wurden vierzehn Tage nach der Ovarektomie peroral mit Ethinylestradiol und Genistein in verschiedenen Dosierungen behandelt.

Ethinylestradiol zeigt einen mit  $17\beta$ -Estradiol vergleichbaren Wirkmechanismus mit einer bei oraler Applikation deutlich höheren Wirkstärke (Reel *et al.*, 1996) und ist auch das Steroid der Wahl in den OECD-Versuchen (*Organization for Economic Cooperation and Development*) zur Validierung des uterotrophen Assays (Kanno *et al.*, 2001).

Ziel war es, für das synthetische Hormon die Dosierungen mit der halbmaximalen und der maximalen Stimulation herauszufinden. Für Genistein sollte festgestellt werden, ob mit steigender Dosis eine Steigerung der Wirkung zu beobachten ist. Untersucht wurde in diesem Versuch das Uterusfeuchtgewicht der Tiere.

Die Expression und Lokalisation des Progesteronrezeptors in Mammagewebe wurde in einem anderen Versuch mit gleichem Versuchsaufbau bei Da/Han Ratten analysiert.

Hierzu wurde den Tieren EE (100  $\mu\text{g}/\text{kg KG}$ ), Genistein (100  $\text{mg}/\text{kg KG}$ ) und Daidzein (500  $\text{mg}/\text{kg KG}$ ) in den jeweils höchsten Dosierungen verabreicht, die sich aus Vorversuchen ergaben und diejenigen Dosierungen mit den stärksten Effekten darstellten.

Behandlungsgruppe	Behandlungsdauer
Kontrolle (Propylenglykol)	3 Tage
EE (20 µg/kg KG)	3 Tage
EE (50 µg/kg KG)	3 Tage
EE (100 µg/kg KG)	3 Tage
Gen (25 mg/kg KG)	3 Tage
Gen (50 mg/kg KG)	3 Tage
Gen (100 mg/kg KG)	3 Tage

**Tab. 1: Versuch I zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung von EE und Genistein**  
(Applikation p. o.; Wistar Ratten)

Zur Feststellung, ob es bei verschiedenen Rattenstämmen stammspezifische Unterschiede in Bezug auf die estrogene Wirkung einzelner Untersuchungssubstanzen und die Ansprechrate der Tiere darauf gibt, wurden Ratten drei verschiedener Stämme mit Ethinylestradiol und Genistein in verschiedenen Konzentrationen sowie mit dem Lösungsmittel als Kontrolle peroral behandelt.

Als Stämme standen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley Ratten zur Verfügung. Bei dem Da/Han Stamm handelt es sich um einen Inzuchtstamm; ca. 65 % der Tiere dieses Stammes entwickeln spontan ein endometriales Adenokarzinom des Uterus. Die Stämme Wistar und Sprague-Dawley zählen beide zu den Auszuchtstämmen und zu den am häufigsten eingesetzten Laborrattenstämmen. Zur Untersuchung der estrogenen Potenz der Substanzen wurden in diesem Versuch das Uterusfeuchtgewicht sowie die Uterus- und Vaginalepithelhöhen bestimmt.

Behandlungsgruppe	Behandlungsdauer
Kontrolle (Propylenglykol)	3 Tage
EE (100 µg/kg KG)	3 Tage
Gen (25 mg/kg KG)	3 Tage
Gen (50 mg/kg KG)	3 Tage
Gen (100 mg/kg KG)	3 Tage

**Tab. 2: Versuch II zur Ermittlung von stammspezifischen Unterschieden zwischen einzelnen Rattenstämmen**  
(Applikation p. o.; Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley Ratten)

Zur Untersuchung einer möglichen agonistischen oder antagonistischen Wirkung der Phytoestrogene wurde exemplarisch Genistein in Kombination mit dem synthetischen Estrogen Ethinylestradiol und der Industriechemikalie Bisphenol A, die



z. B. in CDs oder auch in Konservendosenbeschichtungen zu finden ist und der ebenfalls eine estrogene Wirkkomponente nachgesagt wird, verabreicht.

Bisphenol A wurde in der breiten Öffentlichkeit durch Pressemitteilungen bekannt, die von seiner Migration aus Kronkorken oder den Auskleidungen von Konservendosen berichteten (Brotons *et al.*, 1995).

Nach den Ergebnissen aus Versuch II (Stammvergleich) wurden zur Untersuchung der Kombinationseffekte und auch zur Überprüfung einer möglichen organselektiven Wirkung der Substanzen (Versuch IV) Wistar Ratten ausgewählt. Bei Durchsicht der Literatur und den dargestellten Versuchen findet sich ein leichtes Überwiegen von Wistar gegenüber Sprague-Dawley Ratten. Dies und die damit verbundene bessere Übertragbarkeit der Ergebnisse auf Versuche anderer Laboratorien sowie die einfachere Haltung der weniger aggressiven Tiere spielten die entscheidende Rolle bei der Wahl dieses Rattenstammes.

Die Dosierung für Ethinylestradiol von 30 µg/kg KG ergab sich aus der halbmaximalen Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes in Versuch I. Diese halbmaximale Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes lässt sowohl agonistische als auch antagonistische Effekte der zu untersuchenden Substanzen zu. Zur Bewertung von antagonistischen Effekten wurde die Kombination von Ethinylestradiol mit dem reinen Antiestrogen Fulvestrant (Ful) eingesetzt.

Die Dosierungen für Genistein (100 mg/kg KG) und Bisphenol A (200 mg/kg KG) ergaben sich ebenfalls aus vorhergegangenen Versuchen und stellten jeweils die Dosierungen mit den größten Effekten dar.

Als Endpunkte der estrogenen Wirkung wurden das Uterusfeuchtgewicht, die Uterus- und Vaginalepithelhöhen sowie die Genexpression der estrogensensitiven Gene Komplement C3 und Clusterin im Uterus bestimmt.

Behandlungsgruppe	Behandlungsdauer
EE (30 µg/kg KG)	3 Tage
EE (30 µg/kg KG) + Ful (3 mg/kg KG)	3 Tage
EE (30 µg/kg KG) + Gen (100 mg/kg KG)	3 Tage
EE (30 µg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)	3 Tage
EE (30 µg/kg KG) + Gen (100 mg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)	3 Tage
Gen (100 mg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)	3 Tage

**Tab. 3: Versuch III zur Testung auf agonistische oder antagonistische Effekte in Kombination mit dem synthetischen Estrogen**  
(Applikation p. o.; Wistar Ratten)

Zur Feststellung einer häufig spekulierten Organselektivität der Phytoestrogene wurden abschließend Wistar Ratten subkutan mit Genistein und Daidzein im Vergleich zum natürlichen Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol und zum synthetischen Ethinyl-estradiol behandelt.

Ziel dieses Versuches war es zusätzlich - durch die Applikation der Substanzen über verschiedene Zeiträume - eine mögliche Zeitabhängigkeit in der Wirkung der Phytoestrogene nachzuweisen. Die Dosierungen für die subkutane Applikation wurden durch Vorversuche bestimmt. Als Untersuchungsparameter wurden das Uterusfeuchtgewicht sowie die Genexpression verschiedener Gene in Mamma (PR, CD1), Uterus (C3, COX-2) und *Vena cava* (PR, COX-2) bestimmt.

Behandlungsgruppe	Behandlungsdauer
Kontrolle (8 % Ethanol, 20 % DMSO, 72 % Erdnussöl)	3 Tage
E <sub>2</sub> (3 $\mu$ g/kg KG)	7 Stunden
	24 Stunden
	3 Tage
EE (3 $\mu$ g/kg KG)	7 Stunden
	24 Stunden
	3 Tage
Gen (10 mg/kg KG)	7 Stunden
	24 Stunden
	3 Tage
Dai (40 mg/kg KG)	3 Tage

**Tab. 4: Versuch IV a zur Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen**  
(Applikation s. c.; Wistar Ratten)

Da die Ausbeute an mRNA je nach Gewebetyp sehr gering ist und nicht zur Analyse aller geplanten Gene ausreicht, wurde eine Versuch IV b nachgezogen, in dem lediglich die Kontrolle, E<sub>2</sub> 7 Stunden und Genistein 7 Stunden eingesetzt wurden.

Behandlungsgruppe	Behandlungsdauer
Kontrolle (8 % Ethanol, 20 % DMSO, 72 % Erdnussöl)	7 Stunden
E <sub>2</sub> (3 $\mu$ g/kg KG)	7 Stunden
Gen (10 mg/kg KG)	7 Stunden

**Tab. 5: Versuch IV b zur Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen**  
(Applikation s. c.; Wistar Ratten)

In der folgenden Grafik sind alle durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zusammengefasst dargestellt.

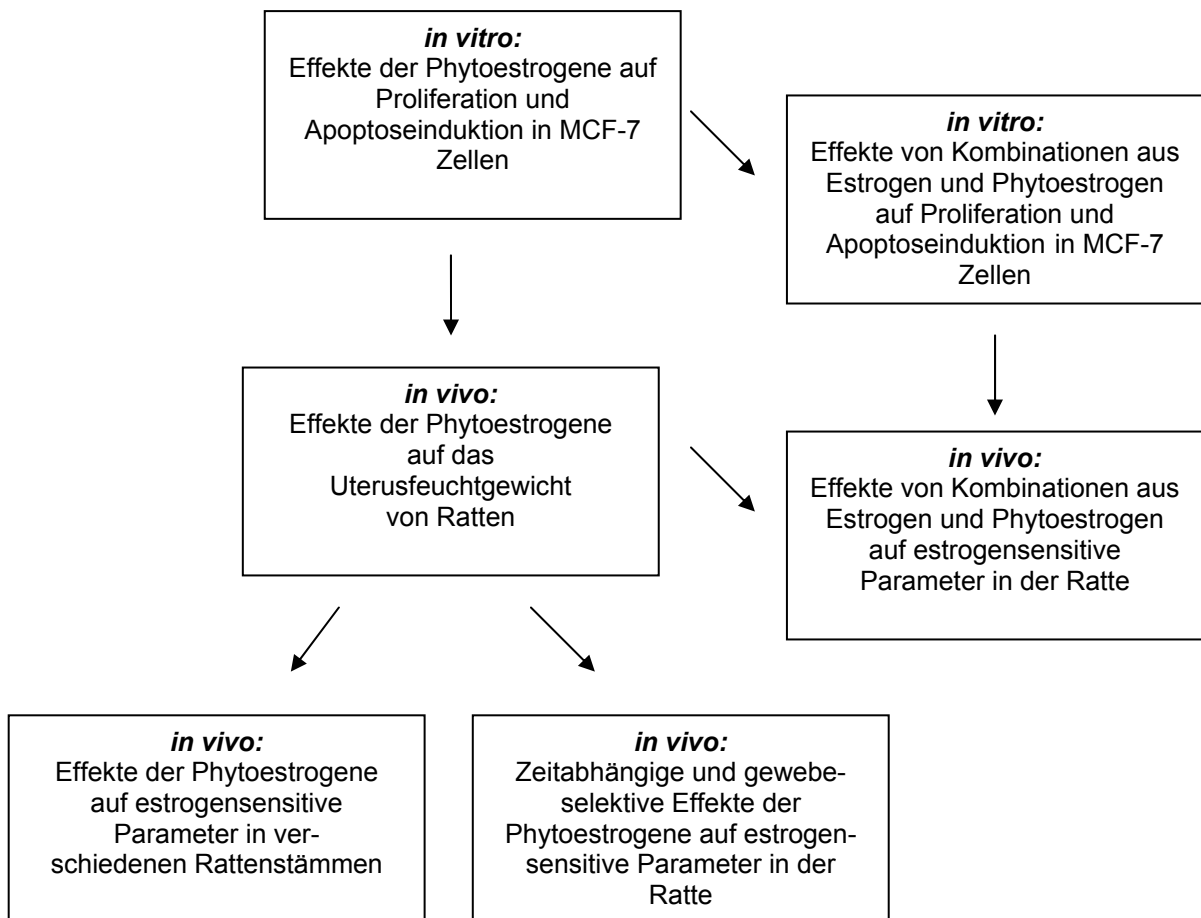


Abb. 17: Darstellung aller durchgeführten *in vitro* und *in vivo* Versuche

## **3 METHODEN**

### **3.1 Zellkultur**

#### **3.1.1 Zelllinie**

Bei der untersuchten Zelllinie handelte es sich um humane Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7, die bereits in Kapitel 2.8 genauer beschrieben wurden.

#### **3.1.2 Kulturbedingungen**

MCF-7 Zellen wurden in 75 cm<sup>3</sup> Zellkulturflaschen mit 20 ml RPMI 1640 Medium bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> in einem Brutschrank kultiviert. Dem Medium wurden zusätzlich 10 % FKS, 1 % Glutamin, 2 % Penicillin-Streptomycin [5.000 Einheiten/ml Penicillin + 5.000 µg/ml Streptomycin] und 0,2 % Insulin [10 µg/ml] zugesetzt.

Ein Mediumswechsel erfolgte je nach Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen zwei- bis dreimal pro Woche. Konfluent bewachsene Zellkulturflaschen wurden nach ca. sieben Tagen passagiert.

Alle Arbeitsschritte erfolgten in einer Sterilbank unter ebensolchen Bedingungen.

#### **3.1.3 Passagieren der Zellen**

Zunächst wurde das Medium abgesaugt und der Zellrasen mit ca. 5 ml PBS gewaschen, welches dann ebenfalls entfernt wurde. Nach Zugabe von 3 ml Trypsin (0,5 %)-EDTA (2,0 %)-Lösung und einer Inkubationszeit von ca. 30 sec wurde das Trypsin bis auf einen kleinen Rest abgesaugt, so dass der Zellrasen gerade bedeckt blieb. Die Inkubation im Brutschrank bei 37°C für ca. 5 min gewährleistete die Ablösung der Zellen vom Boden der Zellkulturflasche. Unter mehrmaligem Abspülen des Flaschenbodens wurden die Zellen mithilfe von 5 bis 10 ml Medium in ein 50 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Zur Vereinzelung der Zellen wurde das Röhrchen gründlich gevortext. Von diesem Trypsinat wurde eine definierte Zellzahl in eine neue Zellkulturflasche mit 20 ml Vollmedium und Estra-

diol [ $10^{-10}$  M] gegeben. Durch vorsichtiges Schwenken des Gefäßes fand eine gleichmäßige Verteilung der Zellen statt.

Für alle Versuche, bei denen eine definierte Zellzahl erforderlich war, wurden 8  $\mu$ l Zellsuspension in einer Bürker-Zählkammer (Tiefe 0,1 mm; 0,0025 mm<sup>2</sup>) unter dem Mikroskop bei einer 160-fachen Vergrößerung ausgezählt.

#### **3.1.4 Einfrieren und Auftauen der Zellen**

Die Zellen wurden für die Langzeitaufbewahrung bei -80°C eingefroren und bei -180°C in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die Zellsuspension wurde bei 1.500 rpm und Raumtemperatur (RT) für 8 min zentrifugiert. Die Resuspendierung des Zellpellets erfolgte mit Medium (Zusatz von 10 % DMSO als Gefrierschutz), anschließend wurden von dieser Zellsuspension je 1 ml in Kryo-Röhrchen der Firma Sarstedt aliquotiert. Für das Einfrieren der Zellen wurde der NALGENE™ *Cryo 1°C Freezing Container* verwendet, der eine Kühlung der Zellen um -1°C pro Minute ermöglicht. Nach der Inkubation der Kryo-Röhrchen im Container über Nacht bei -80°C war eine Lagerung der Zellen für mehrere Monate bei -180°C in flüssigem Stickstoff möglich.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryo-Röhrchen unter Schütteln für einige Minuten in ein 37°C warmes Wasserbad gegeben und die Zellsuspension dann in eine Zellkulturflasche mit 20 ml warmem Medium überführt.

Der Erfolg der Neukultivierung wurde täglich kontrolliert.

#### **3.1.5 Aktivkohlebehandlung des Kälberserums**

Versuche, bei denen ein möglicher estrogenen Effekt über das Medium ausgeschlossen werden musste, wurden mit CCS-Medium anstelle von Vollmedium angesetzt. Zur Entfernung möglicher Hormone wurde das Kälberserum mit Aktivkohle behandelt. Dazu wurde es zunächst für 30 min auf 56°C erhitzt (Hitzeinaktivierung des Komplementsystems), um anschließend nach der Zugabe von 10 mg Aktivkohle/ml Serum unter Schütteln 1 h inkubiert zu werden. Nach der Sedimentation der Aktivkohle über Nacht bei 4°C wurde für 20 min bei 4°C und 10.000 rpm zentrifugiert und das Serum vorsichtig dekantiert.

Anschließend wurde das Kälberserum sterilfiltriert, in Aliquots von 50 ml aufgeteilt und bei -20°C gelagert.

### 3.1.6 Hormonbehandlung

Für die Zellzyklusanalysen wurden folgende Substanzen verwendet:

17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>), Genistein (Gen), Daidzein (Dai), Coumestrol (Cou) und Fulvestrant (Ful).

Die Stammlösungen von 17 $\beta$ -Estradiol und Fulvestrant wurden in 100 %igem Ethanol und die der Phytoestrogene in DMSO in Konzentrationen von [10<sup>-3</sup> M] angesetzt und bei -20°C aufbewahrt. Für alle Versuchsansätze wurden die benötigten Konzentrationen über eine Verdünnungsreihe aus diesen Stammlösungen mit Medium frisch angesetzt. Die endgültigen DMSO-Konzentrationen in den einzelnen Versuchsansätzen überschritten 0,1 % nicht.

### 3.1.7 Propidiumiodid-Färbung

Die Bestimmung der einzelnen Zellzyklusphasen bzw. der *sub* G<sub>0</sub>-Population (apoptotische Zellen) erfolgte nach der Methode von Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991) durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid (PI). Propidiumiodid besitzt die Fähigkeit, in die DNA zu interkalieren und bei Anregung durch UV-Licht zu fluoreszieren.

Variationen des DNA-Gehaltes der Zelle im Laufe des Zellzyklus ermöglichen mithilfe dieser Methode eine Unterscheidung der Phasen in eine G<sub>1</sub>-Phase, S-Phase und eine G<sub>2</sub>-Phase. Apoptotische Zellen, die sich in der *sub* G<sub>0</sub>-Phase befinden, unterscheiden sich in ihrem DNA-Gehalt deutlich von den Zellen in den übrigen Zellzyklusphasen. Charakteristisch für den apoptotischen Zelltod ist u. a. das extensive Schneiden der DNA durch DNasen, welches eine Fragmentierung in Untereinheiten bewirkt. Durch den Zusatz verschiedener Detergentien (z. B. Alkohol oder PBS) kommt es nach dem Herausdiffundieren der DNA-Fragmente aus dem Zellkern in das Zytoplasma zu einem anschließenden Extrahieren der niedermolekularen DNA durch die porös gewordene Zytoplasmamembran und somit zu einem insgesamt „reduzierten“ DNA-Gehalt der apoptotischen Zellen (Loo und Rillema, 1998; Genzlinger, 1999).

Die Anzucht der Zellen erfolgte in Zellkulturplatten („6-well“). Dabei wurde eine definierte Zellzahl (15.000 Zellen/ml) in 3 ml Vollmedium, dem E<sub>2</sub> [10<sup>-10</sup> M] zugesetzt war, ausgestreut. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank, um ein Anwachsen der Zellen am Plattenboden zu ermöglichen. Nach zwei Tagen wurde ein Medi-

umswechsel durchgeführt, und nach weiteren drei Tagen erfolgte die Behandlung der Zellen mit den Untersuchungssubstanzen.

In den Tabellen 6 und 7 sind die Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen bei der Behandlung der Zellen angegeben.

Versuchsteil I zeichnete sich dadurch aus, dass die Zellen nach dem zweitägigen Anwachsen nicht mit Vollmedium inklusive  $E_2$  [ $10^{-10}$  M] versorgt wurden, sondern anstelle dessen erfolgte der Mediumswechsel mit CCS-Medium, um einen möglichen estrogenen Effekt über das Medium ausschließen zu können. Die Zellen wurden mit  $E_2$  sowie den Phytoestrogenen in den angegebenen Konzentrationen behandelt.

Gruppe	Konzentration der Untersuchungssubstanz
1	CCS
2	Estradiol [ $10^{-13}$ M]
3	Estradiol [ $10^{-12}$ M]
4	Estradiol [ $10^{-11}$ M]
5	Estradiol [ $10^{-10}$ M]
6	Genistein [ $10^{-8}$ M]
7	Genistein [ $10^{-7}$ M]
8	Genistein [ $10^{-6}$ M]
9	Genistein [ $10^{-5}$ M]
10	Daidzein [ $10^{-8}$ M]
11	Daidzein [ $10^{-7}$ M]
12	Daidzein [ $10^{-6}$ M]
13	Daidzein [ $10^{-5}$ M]
14	Coumestrol [ $10^{-8}$ M]
15	Coumestrol [ $10^{-7}$ M]
16	Coumestrol [ $10^{-6}$ M]
17	Coumestrol [ $10^{-5}$ M]

**Tab. 6: Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen (Versuchsteil I)**

Im Versuchsteil II kamen anstelle von Einzelsubstanzen Kombinationen eines Phytoestrogens mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen zum Einsatz. Hier erfolgte der Mediumswechsel nach zweitägigem Anwachsen mit Vollmedium inklusive  $E_2$  [ $10^{-10}$  M].

Gruppe	Konzentration der Untersuchungssubstanz
1	CCS
2	Estradiol [ $10^{-13}$ M]
3	Estradiol [ $10^{-12}$ M]
4	Estradiol [ $10^{-11}$ M]
5	Estradiol [ $10^{-10}$ M]
6	Genistein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-12}$ M]
7	Genistein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-11}$ M]
8	Genistein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-10}$ M]
9	Daidzein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-12}$ M]
10	Daidzein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-11}$ M]
11	Daidzein [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-10}$ M]
12	Coumestrol [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-12}$ M]
13	Coumestrol [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-11}$ M]
14	Coumestrol [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-10}$ M]
15	Fulvestrant [ $10^{-7}$ M] + Estradiol [ $10^{-10}$ M]
16	Fulvestrant [ $10^{-6}$ M] + Estradiol [ $10^{-10}$ M]

**Tab. 7: Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen (Versuchsteil II)**

Die Zellen wurden dann fünf Tage nach der Behandlung mit den oben angegebenen Untersuchungssubstanzen durch Zugabe von jeweils 300  $\mu$ l Trypsin und einer ca. drei- bis fünfminütigen Inkubationszeit im Brutschrank bei 37°C vom Boden der „6-well“-Platte gelöst und in jeweils 3 ml PBS aufgenommen. Mithilfe eines Zellschabers wurde der Plattenboden möglichst komplett von den Zellen befreit und die Zellsuspension in 15 ml Zentrifugen-Röhrchen überführt. Es folgte eine Zentrifugation für 8 min bei 4°C und 1.500 rpm. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und die Zellpellets in jeweils 2 ml PBS resuspendiert. Von diesen Zellsuspensionen wurden jeweils 500  $\mu$ l in Durchflusszytometer-Röhrchen überführt und erneut unter gleichen Bedingungen zentrifugiert. Nach Absaugen der Überstände wurden jeweils 500  $\mu$ l der PI-Färbelösung auf die Zellpellets gegeben und diese durch vorsichtiges Vortexen gelöst. Es erfolgte eine Inkubation bei 4°C und Dunkelheit für ca. 1,5 bis 2 Stunden. An die Inkubation schloss sich die Messung der Zellzyklusphasen am Durchflusszytometer an.



Bei dieser Messung wurde das Propidiumiodid durch eine Strahlung von 535 nm zur Fluoreszenz angeregt. PI-markierte Zellen emittieren das Fluoreszenzlicht bei einer Wellenlänge von 580 bis 650 nm.

PI-Färbelösung:

50	µg/ml	Propidiumiodid
0,1	%	Triton-X
0,1	%	Na-citrat

### 3.1.8 Durchflusszytometrie

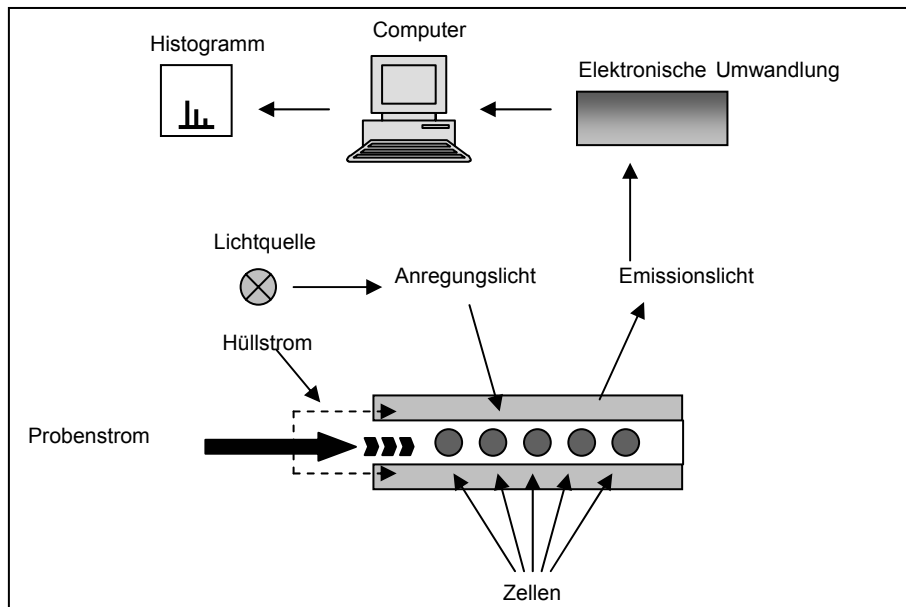
Das Durchflusszytometer stellt ein opto-elektronisches Messsystem für einzelne in einem Flüssigkeitsstrom fokussierte Partikel dar. Es basiert dabei auf dem Prinzip der quantitativen Fluorochromierung, d. h. der Färbung einzelner Komponenten mit geeigneten Fluorochromen. Neben der Detektion von Fluoreszenzsignalen wird auch eine Lichtstreuung (in der Vorwärts- und rechtwinkligen Richtung) registriert. Dies bedeutet, dass das Durchflusszytometer optische Signale unterschiedlicher Qualität verarbeiten kann (Genzlinger, 1999). Hierbei entsprechen die relative Bestimmung des Streulichts in der Vorwärtsrichtung der Partikelgröße und die relative Bestimmung des seitlichen Streulichts der Granularität der Zelle (Coulter Electronics GmbH, 1989).

Neben vielen weiteren Anwendungsbereichen (z. B. Lymphozytentypisierung) ist es möglich, mithilfe der Durchflusszytometrie festzustellen, in welchen Zellzyklusphasen sich die Zellen einer Zellpopulation befinden und ob eher proliferative oder apoptotische Prozesse vorherrschen.

Messprinzip:

Die mit einem speziellen Fluoreszenzfarbstoff (Propidiumiodid) angefärbten Zellen werden kontinuierlich hintereinander an einer Lichtquelle (luftgekühlter Argonlaser) vorbeigeführt. Mithilfe von Pressluft gelangen die in Suspension vereinzelt vorliegenden Zellen in eine Kapillare, aus der sie in die Probenkammer geschleust werden. Dabei erzeugt ein Hüllstrom aus entgastem Wasser in der Kapillare eine laminare Strömung, mit der die Zellen zentriert und mit hoher Geschwindigkeit auf das Messelement zugeführt werden. Dadurch wird jede Zelle einzeln durch die optimale Fokussierungsebene des Objektivs geschleust. Jede einzelne Zelle emit-

tiert - aufgrund der Fluoreszenzanregung des Farbstoffes (PI) - ein Lichtsignal, das proportional zur stöchiometrisch gebundenen Fluorochrommenge ist. Dieses Lichtsignal wird in einem *Photomultiplier* verstärkt und in ein elektrisches Signal umgewandelt. Die eingehenden Signale führen zur Berechnung der Durchflussrate. Die auf diesem Wege gewonnenen Daten werden in Form von Histogrammen visualisiert (Genzlinger, 1999).



**Abb. 18: Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers**  
(nach Genzlinger, 1999)

Im Anschluss an die durchflusszytometrische Messung, die mithilfe der Coulter Durchflusszytometer-Software lediglich die *sub G<sub>0</sub>*-Population (apoptotische Zellen) anzeigte, wurde eine Zellzyklusanalyse mit der *MultiCycle-Software* für *Windows* (Phoenix flow systems, San Diego, CA, USA) durchgeführt. Hiermit war es nun möglich, genau festzustellen, wie viel Prozent der Zellen sich in welcher Phase des Zyklus befanden. Die Beschreibung der einzelnen Zyklusphasen findet sich in Kapitel 1.3.2.

Von besonderem Interesse für die Auswertung der beiden Versuchsteile waren sowohl die Zellen, die sich in der *sub G<sub>0</sub>*-Phase, als auch diejenigen, die sich in der S-Phase befanden, denn Estrogene und estrogenartig wirkende Substanzen stellen einen entscheidenden Wachstumsstimulus für MCF-7 Zellen dar. Wurde durch eine Untersuchungssubstanz eine Stimulation der S-Phase festgestellt, so konnte von einer estrogenartigen Wirkung ausgegangen werden.

## 3.2 mRNA-Analytik

### 3.2.1 RNA-Isolierung

Für die geplanten Untersuchungen wurde Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben gewonnen. Als Gewebe standen wie bereits in Kapitel 2.9 erläutert Uterus, Mamma und *Vena cava* von weiblichen Ratten verschiedener Stämme zur Verfügung. Die Behandlungsschemata sind den Tabellen 1 bis 5 (Kapitel 2.9) zu entnehmen.

Zur RNA-Isolierung kann man sich verschiedener Methoden bedienen, je nach Verwendungszweck der RNA und nach Zelltyp, aus dem die RNA gewonnen wird. Bei der zugrunde liegenden Methode wurde die RNA mittels TRIZOL<sup>®</sup> Reagent isoliert.

Das Gewebe wurde zunächst durch Mörsern mit einem Mikro-Dismembrator in Teflon-Gefäßen unter Kühlung mit flüssigem Stickstoff ca. 30 sec pulverisiert. Im Anschluss wurde 1 ml TRIZOL<sup>®</sup> pro 50 bis 100 mg Gewebe direkt in die Teflon-Gefäße gegeben und bei RT inkubiert, bis das TRIZOL<sup>®</sup>-Gewebe Gemisch wieder aufgetaut war. Nachdem dieses Gemisch in ein Reaktionsgefäß überführt und dreimal mithilfe einer Spritze mit aufgesetzter Kanüle geschert worden war, folgte ein Zentrifugationsschritt bei 4°C und 12.000 x g für 10 min, um unlösliche Bestandteile - insbesondere Extrazellulärmembranen, Polysaccharide und hochmolekulare DNA - zu entfernen. Dieser Schritt spielt gerade bei Mammagewebe eine wichtige Rolle. Nach einer Inkubationszeit von 5 min bei RT, dem Abnehmen der flüssigen Phase und Überführen in ein neues Reaktionsgefäß wurden 0,2 ml Chloroform/ml TRIZOL<sup>®</sup> hinzugegeben, 15 sec geschüttelt und bei RT für 2 bis 3 min inkubiert. Anschließend wurden die Proben 15 min bei 4°C und 12.000 x g zentrifugiert, um eine Phasentrennung zu erzielen. Die RNA-enhaltende wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, und durch Zugabe von 0,5 ml Isopropanol/ml TRIZOL<sup>®</sup> wurde die RNA gefällt. Dabei erfolgte zunächst eine zehnminütige Inkubation bei RT und im Anschluss daran bei 4°C und 12.000 x g eine zehnminütige Zentrifugation. Der Überstand wurde abgenommen und das entstandene Pellet mit 1 ml 75 %igem Ethanol/ml TRIZOL<sup>®</sup> gewaschen. Nach erneutem Zentrifugieren bei 4 °C und 7.500 x g für 5 min wurde der Ethanolüberstand abgenommen und das Pellet für ca. 20 min bei RT getrocknet. Abschließend

erfolgte das Resuspendieren des Pellets in 30 bis 50 µl DEPC-Wasser. Von nun an wurden alle weiteren Arbeitsschritte im Eisbad bei 0° bis 4°C durchgeführt. Eine Langzeitaufbewahrung der Proben war bei -80°C möglich.

DEPC-behandeltes *aqua bidest.*:

0,1 % Diethylpyrocarbonat  
über Nacht bei 37°C (Brutschrank)  
anschließend autoklavieren

### 3.2.2 Quantifizierung von Nukleinsäuren

Zur photometrischen Bestimmung der RNA-Konzentration und des Reinheitsgrades der RNA wurden jeweils 3 µl der RNA-Proben mit 997 µl DEPC-Wasser verdünnt und die Absorptionen bei Wellenlängen von 260 und 280 nm in Quarzglasküvetten gemessen. Der Quotient aus den gemessenen Absorptionen gibt Auskunft über den Reinheitsgrad der RNA und sollte zwischen 1,5 und 2,0 liegen.

Um auch visuell die Qualität der gewonnenen RNA zu überprüfen, wurden 3 µg der RNA mit 2 µl 40 %iger Saccharoselösung versetzt, mit TAE-Puffer auf insgesamt 12 µl aufgefüllt und auf ein 2 %iges Agarosegel, das mit EtBr [0,3 µg/ml] versetzt war, aufgetragen. In einer Elektrophoresekammer wurde die RNA bei einer anliegenden Spannung von 4,5 V/cm in 1 x TAE-Puffer aufgetrennt. Die Dokumentation des Gels erfolgte wie unter Punkt 3.2.6.1.2 beschrieben.

Das Bandenmuster und die Bandenintensität geben Auskunft über mögliche Degradierung der RNA und eventuelle Konzentrationsunterschiede zwischen den einzelnen RNA-Proben.

### 3.2.3 DNA-Verdau

Während der RNA-Isolierung mittels TRIZOL<sup>®</sup> kann es zu Kontaminationen mit DNA kommen. Mithilfe einer Test-PCR konnte das Vorliegen einer solchen Kontamination überprüft werden.

Hierzu wurde in einen PCR-Ansatz (wie unter Punkt 3.2.6 beschrieben) anstelle von cDNA 1 µl RNA-Mix (1 µg RNA 1:20 mit Ampuwa<sup>®</sup> verdünnt) eingesetzt. Als Primerpaar wurde der interne Standard 1A gewählt. Bei einer Amplifikation und somit einem Signal auf dem 2 %igen Agarosegel befand sich DNA in der RNA-

Probe. Um die Ergebnisse nicht zu verfälschen, sollte diese dann durch einen DNA-Verdau mithilfe von Desoxyribonuklease I abgebaut werden.

DNA-Verdau-Ansatz:

3 µg	RNA
1 µl	10 x DNase Reaktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 20 mM MgCl <sub>2</sub> ; 500 mM KCl)
1 µl	DNase I [1 U/µl]
mit DEPC-Wasser <i>ad</i> 10 µl	

Nach 15-minütiger Inkubation bei RT wurde 1 µl EDTA-Lösung [25 mM] hinzugefügt und für 15 min bei 65°C inkubiert. Die Zugabe von EDTA und die Erwärmung auf 65°C inaktivierten überschüssige DNase I.

Dieser Reaktionsansatz konnte sofort in die cDNA-Synthese eingesetzt werden.

### 3.2.4 cDNA-Synthese

Bei der Synthese der cDNA nutzt man eine charakteristische Eigenschaft von eukaryontischen mRNAs aus - nämlich die Aneinanderreihung von Adeninresten am 3'-Ende der mRNA. Mithilfe eines so genannten Oligo(dT)-Primers, der ein Oligonukleotid aus Desoxythymidin-Nukleotiden darstellt und der komplementär an das poly(A)-Ende der mRNA bindet, gelingt diese Synthese meist problemlos (Knippers, 2001).

Für die cDNA-Synthese wurde das SuperScript™ *First-Strand-System for RT-PCR* verwendet und je nach verfügbarer Menge und Qualität 3 bis 5 µg RNA eingesetzt. Zu jedem Ansatz wurde 1 µl Oligo(dT)-Primer (0,5 µg/µl) gegeben und dieser mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Die Proben wurden zunächst bei 70°C für eine Dauer von 10 min denaturiert und anschließend 1 min auf 4°C abgekühlt. Nun folgte der Zusatz von je 7 µl Reaktionspuffer, der sich wie folgt zusammensetzte:

Reaktionspuffer (pro Ansatz):

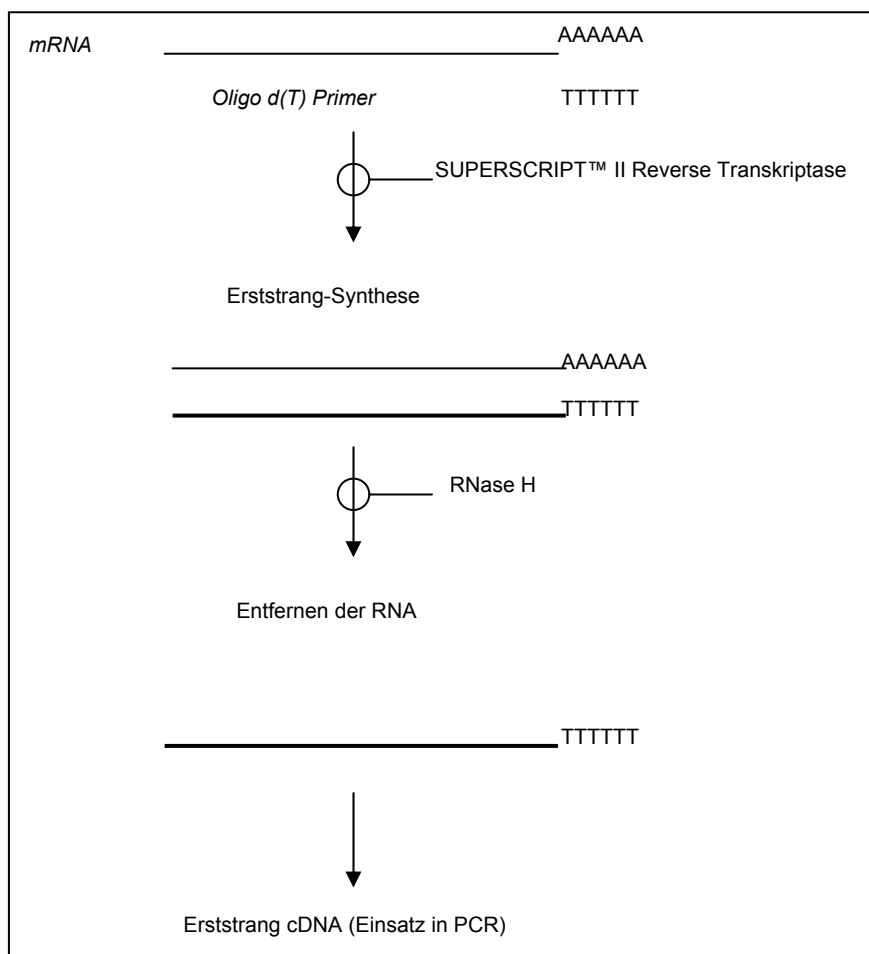
2 µl	10 x RT Puffer (200 mM Tris-HCl (pH 8,4); 500 mM KCl)
2 µl	25 mM MgCl <sub>2</sub>
1 µl	10 mM dNTP-Mix (jeweils 10 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
2 µl	0,1 M DTT

---

7 µl

Die Anlagerung der Primer fand für 5 min bei 42°C statt, anschließend wurden jeder Probe 0,8 µl SuperScript™ II RT (200 U/µl) zugesetzt. Nach einer Inkubationszeit von 50 min bei 42°C und 15 min bei 70°C wurden die Proben zur Abkühlung kurz auf Eis gestellt und 0,8 µl *E. coli* RNase H (2 U/µl) zugegeben. Es schloss sich eine Inkubation von 20 min bei 37°C an, bei der das überschüssige RNA-„*Template*“ (Matrize) verdaut wurde.

Die Aufbewahrung der cDNA erfolgte bei -20°C.



**Abb. 19: Schematische Darstellung der cDNA-Synthese**

### 3.2.5 Ableiten der Primer

Die Sequenzen der Primer leiten sich von den Sequenzen der entsprechenden Gene ab. Die Sequenzinformationen wurden der EMBL-Gendatenbank entnommen. Bei der Auswahl der Primer waren folgende Aspekte zu berücksichtigen:

- Die Länge der Primer soll ca. 20 Basenpaare betragen.
- Die Bindungsstelle der Primer soll nahe am 3'-Ende des Gens liegen, weil in der cDNA-Synthese Oligo(dT)-Primer eingesetzt werden.
- Das Verhältnis der Nukleotide G und C zu A und T soll ungefähr gleich sein.
- Die Primer sollen möglichst keine repetitiven Sequenzen enthalten.
- Der Abstand beider Primer und somit die Länge des Amplikons (DNA-Abschnitt) soll zwischen 200 und 400 Basenpaaren liegen.

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (Mullis und Faloona, 1987)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein Verfahren zur selektiven *in vitro* Amplifikation von DNA-Fragmenten und für die heutige molekulare Genetik unentbehrlich. Man nutzt hierbei bestimmte Eigenschaften der DNA-Replikation. Das für den Replikationsvorgang eingesetzte Enzym - die DNA-Polymerase - benötigt eine einzelsträngige DNA-Matrize (*Template*) zur Synthese eines neuen komplementären Stranges, die vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende verläuft. Diese DNA-Einzelstränge lassen sich *in vitro* durch Erhitzen der doppelsträngigen DNA auf Temperaturen von ca. 94°C erzeugen (Denaturierung). Wichtige Voraussetzung für die Synthese des komplementären Stranges ist ein kurzes doppelsträngiges DNA-Stück. Dies nutzt man aus, indem man den Startpunkt der DNA-Synthese durch Zugabe von synthetisierten kurzen Oligonukleotid-Einzelsträngen, so genannten Primern, die sich an der gewünschten Stelle anlagern, selbst wählen kann. Durch Hinzufügen eines Primers für den Gegenstrang lässt sich indirekt auch das Ende der Replikation festlegen. Demzufolge wird nur der Bereich zwischen diesen beiden Primern amplifiziert, indem die DNA-Polymerase freie Desoxynukleosid-Triphosphate (dNTPs) entsprechend der Matrize an das unmodifizierte 3'-Ende dieser Primer anlagert.

Dadurch ist es möglich, nach  $n$  Zyklen theoretisch  $2^n$  Kopien dieses gewünschten DNA-Abschnittes zu erzeugen. Allerdings lässt sich diese 100 %ige Effizienz der PCR in der Praxis nicht umsetzen.

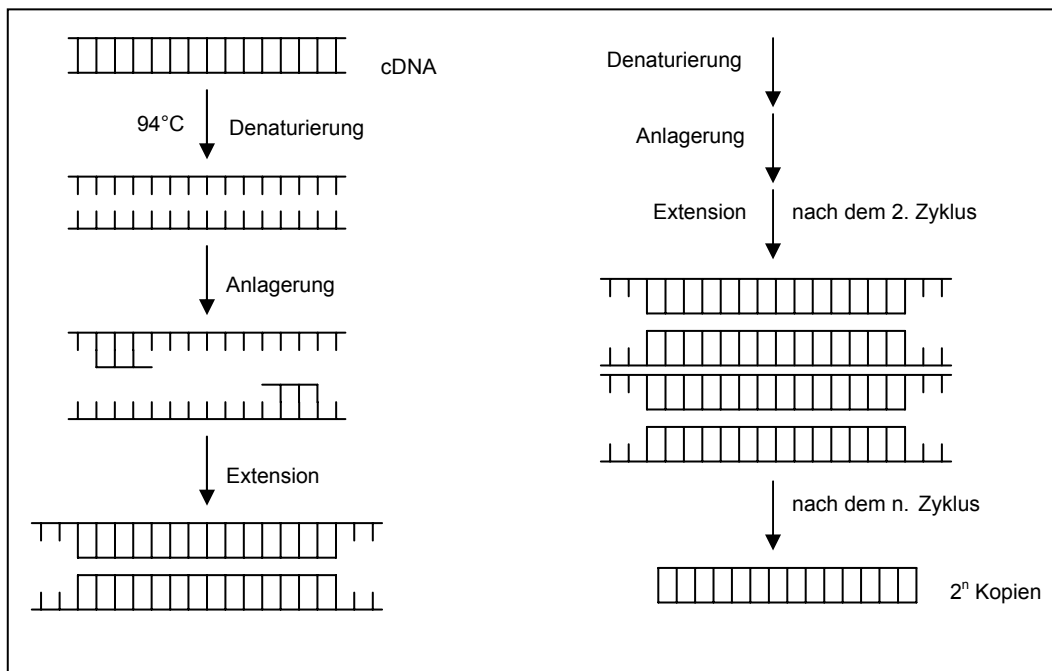
Zwar findet zu Beginn einer PCR-Reaktion eine weitgehend exponentielle Vermehrung der DNA-Fragmente statt, jedoch führen verschiedene Faktoren zu einer Verlangsamung des Prozesses bis hin zu einem linearen Wachstum und schließlich dem Erreichen eines Plateaus. Beispiele für diese limitierenden Faktoren sind z. B. zur Neige gehende Primer oder dNTPs, eine Denaturierung dieser bei anhaltend hohen Temperaturen sowie eine mögliche Hemmung der Reaktion durch eine Anhäufung von entstehenden Produkten. Aus diesen Gründen ist es entscheidend, dass die PCR während dieser exponentiellen Phase gestoppt wird, um eine Verfälschung des Ergebnisses zu verhindern. Für jeden einzelnen Primer ergibt sich somit u. U. eine andere Zyklenzahl.

Ein Zyklus setzt sich dabei aus drei einzelnen Schritten zusammen, die - gesteuert durch einen *Thermocycler* - durch verschiedene Temperaturbereiche charakterisiert sind. Ein Zyklus beginnt mit der bereits oben beschriebenen Denaturierung des *Templates* bei  $94^\circ\text{C}$  für üblicherweise 45 bis 60 sec. Die folgende Primeranlagerung (*Annealing*) erfolgt bei Temperaturen, die durch den G/C-Gehalt der Primer bestimmt werden und durch empirische Formeln zu berechnen sind. Für die Praxis orientiert man sich an den Temperaturangaben der Oligonukleotid-Hersteller, die einen ersten Anhaltspunkt liefern, der aber meist experimentell optimiert werden muss. Der letzte Schritt des Zyklus, die eigentliche Polymerisation (*Elongation*, *Extension*), wird bei  $72^\circ\text{C}$  für 1 min ausgeführt.

Vor Beginn des ersten Zyklus ist es ratsam, die u. U. stark verknäuelte DNA-Doppelhelix durch ein mehrminütiges Erhitzen bei  $94^\circ\text{C}$  zu denaturieren. Nach Beendigung des letzten Zyklus empfiehlt es sich, durch eine einmalige Haltezeit von ca. 4 min bei  $72^\circ\text{C}$  eventuell unvollständig synthetisierte Amplikons zu vervollständigen.

Eine normalerweise eintretende Denaturierung der Polymerasen in den gerade beschriebenen Temperaturbereichen verhindert man durch den Einsatz von thermostabilen Polymerasen. Solche thermostabilen Polymerasen konnten aus verschiedenen Bakterien, die in heißen Quellen vorkommen, wie z. B. *Thermus aquaticus* (*Taq*) oder auch *Pyrococcus furiosus* (*Pfu*) isoliert werden.





**Abb. 20: Übersichtsschema zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Im Falle dieser Arbeit erfolgte die Durchführung der PCR mittels einer thermostabilen *Taq* DNA-Polymerase. Obwohl die optimale Polymerisationstemperatur der *Taq* DNA-Polymerase bei 72°C liegt, ist es durchaus möglich, dass auch bei niedrigeren Temperaturen Polymeraseaktivitäten auftreten. Problematisch ist hierbei, dass sich bei diesen niedrigeren Temperaturen die Primer vermehrt unspezifisch an die DNA anlagern bzw. Oligomere bilden, welche dann von der Polymerase zu unerwünschten Nebenprodukten polymerisiert werden können.

Um die Spezifität und Sensitivität der PCR-Reaktion zu erhöhen, wurde deshalb mit einem „hot start“ begonnen (Faloona *et al.*, 1990). Dies bedeutet, dass die Proben erst dann in den *Thermocycler* gestellt wurden, wenn dieser die Starttemperatur von 94°C erreicht hatte. Zusätzlich erfolgten alle Arbeitsschritte im Eisbad bei 0° bis 4°C.

Gesamtansatz für die PCR (pro Reaktion):

28,8	µl	steriles <i>aqua bidest.</i> (Ampuwa®)
5	µl	10 x PCR Puffer (1 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4 M Ammoniumsulfat)
3	µl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
4	µl	2,5 mM dNTP-Mix
0,2	µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/µl]

---

41 µl

Der Gesamtansatz für die PCR wurde in einem 200 µl Reaktionsgefäß vorgelegt und mit jeweils 1 µl Primer-Mix (bestehend aus „forward“- und „reverse“-Primer) und 8 µl cDNA-Mix (1 µl cDNA + 7 µl Ampuwa®) versetzt.

Die PCR-Reaktionen wurden entweder in einem *Thermocycler* der Firma Perkin Elmer (Typ 9600) oder der Firma Biometra (Typ UNO-Thermoblock) durchgeführt.

Das Standard-PCR-Protokoll hatte folgenden Ablauf:

	Temperatur	Zeit	Anzahl der Zyklen
<b>Initiale Denaturierung</b>	94°C	4 min	1
<b>Denaturierung</b>	94°C	1 min	20-35
<b>Anlagerung der Primer</b>	58°C	1 min	20-35
<b>Verlängerung der Primer</b>	72°C	1 min	20-35
<b>Finale Verlängerung der Primer</b>	72°C	4 min	1
<b>Kühlen der Proben</b>	4°C	∞	1

**Tab. 8: Standard-PCR-Protokoll mit variierenden Zykluszahlen für die einzelnen Primerpaare**

Die Anzahl der Zyklen variierte je nach Primerpaar zwischen 20 und 35 Zyklen (siehe Tab. 9). Die optimale Zykluszahl (PCR im linearen Bereich) wurde für jeden einzelnen Primer in Vorversuchen bestimmt. Weitere Einflussgrößen für optimale Primerbedingungen können die Anlagerungstemperatur und die Magnesiumchloridkonzentration im Reaktionsansatz sein. Alle verwendeten Primer zeigten optimale Eigenschaften bei 58°C und einer Magnesiumchloridkonzentration von 3 µl 50 mM Lösung pro Probe.

Primerpaar	Zykluszahl	Anlagerungstemperatur der Primer
1A	20	58°C
C3	32	58°C
CD1	32 bzw. 50 (iCycler)	58°C
Clusterin	26	58°C
COX-2	35	58°C
PR	32	58°C

**Tab. 9: Zykluszahlen und Anlagerungstemperaturen für die einzelnen Primerpaare**

### 3.2.6.1 Semiquantitative PCR

Mithilfe der semiquantitativen PCR werden Regulationen auf mRNA-Ebene untersucht (Murphy *et al.*, 1990; Knauth *et al.*, 1996). Bei diesem Verfahren vergleicht man das zu untersuchende Gen mit einem gleichzeitig amplifizierten Standard, der keiner Regulation unterliegen darf. Da die PCR wie oben beschrieben eine exponentielle Reaktion darstellt, kann dies nur im linearen Bereich der Reaktion erfolgen. Die Zyklenzahl, bei der sich die Reaktion im linearen Bereich befindet, muss für jeden Primer einzeln ermittelt werden (siehe oben).

In den meisten Untersuchungen wird das Gen der GAPDH (**G**lycerinaldehyd**p**hosphat-**D**e**h**ydrogenase) als interner Standard verwendet. Dieses wird jedoch durch Estrogene reguliert (Diel *et al.*, 2000), so dass im Falle dieser Arbeit die Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase (1A) als interner Standard diente.

Die durch die semiquantitative PCR gelieferten PCR-Produkte wurden wie unter 3.2.6.1.1 beschrieben mittels der Gelelektrophorese und der anschließenden densitometrischen Auswertung analysiert.

#### 3.2.6.1.1 Agarosegelelektrophorese der PCR-Fragmente

Bei einer Gelelektrophorese werden Nukleinsäuren bzw. PCR-Fragmente ihrer Größe nach aufgetrennt. Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatreste wandern Nukleinsäuren dabei in einem elektrischen Feld zur Anode. Mit 2 %igen Agarosegelen lassen sich dabei Auftrennungen im Bereich von 150 bis 1.000 bp durchführen.

Hierzu wurden den 50 µl PCR-Produkt 10 µl 6 x Probenpuffer hinzugefügt. Von dieser Lösung wurden 20 µl auf das Gel aufgetragen.

Eine Lagerung der Proben war bei -20°C für 2 bis 3 Monate möglich.

##### 6 x Probenpuffer:

4	g	Saccharose
1	Spatelspitze	Bromphenolblau
1	Spatelspitze	Xylencyanol

mit *aqua bidest.* ad 10 ml

Die Agarose wurde in 1 x TAE-Puffer durch Erhitzen auf 100°C gelöst und beim Erkalten mit EtBr (0,3 µg/ml) versetzt. Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und kann durch UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt werden.

50 x TAE-Puffer (pH 7,0):

121 g Tris-Base  
28,55 ml Eisessig  
50 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)  
mit *aqua bidest.* ad 500 ml

Das Gel wurde in die Laufkammer gegossen und der Kamm eingeführt. Nach dem Erstarren des Gels wurde zusätzlich auf jedes Analysengel eine 100 bp DNA-Leiter (1 µg/µl) als DNA-Größenstandard aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte in 1 x TAE-Puffer als Laufpuffer bei 4,5 V/cm und wurde gestoppt, wenn die vordere Farbfront ca. 7 bis 8 cm gelaufen war.

#### **3.2.6.1.2 Dokumentation der Gele**

Die PCR-Gele wurden unter UV-Licht mit einer elektronischen Bildverarbeitungsanlage der Firma MWG aufgenommen. Durch die Speicherung der Bilder in einem für Computer üblichen Format (TIF-Datei; *Tagged Image File Format*) auf externen Datenträgern wurde die weitere Bearbeitung mit speziellen Auswertungsprogrammen ermöglicht.

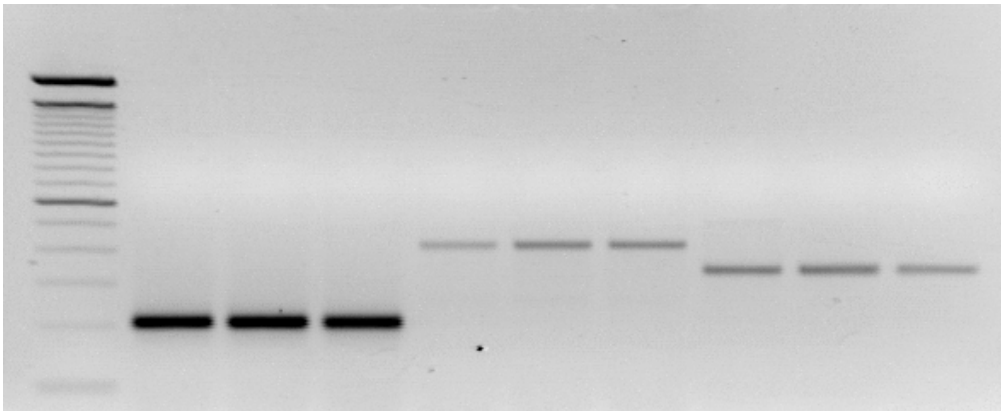
#### **3.2.6.1.3 Densitometrische Auswertung**

Das densitometrische Programm ZeroDscan<sup>®</sup> der Firma MWG (MWG-Bio-tech AG, Ebersberg) diente zur Bestimmung der optischen Dichte der Gelbanden verschiedener PCR-Reaktionen.

Um das Expressionsmuster in Form eines Balkendiagrammes darstellen zu können, wurde der Quotient aus den optischen Dichten der Bande des untersuchten Gens und der Referenzbande (1A) gebildet. Der Wert der Kontrollgruppe wurde als Basiswert (= 1) definiert und die anderen Ergebnisse in Relation dazu berechnet.

Die im Ergebnisteil abgebildeten Diagramme zeigen den Mittelwert aus mindestens drei verschiedenen PCR-Reaktionen pro cDNA. Es wurden mindestens zwei

cDNA-Synthesen pro RNA-Probe durchgeführt. Der Fehler entspricht der allgemeinen Standardabweichung.



**Abb. 21: Beispiel eines 2 %igen Agarosegels der PCR-Produkte von zwei Untersuchungen und dem internen Standard 1A**

Das Gel wurde mit EtBr gefärbt und die Aufnahme invertiert.

### 3.2.6.2 *Real-Time* PCR

Die *Real-Time* PCR (Echtzeit-PCR) ist die zurzeit modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Im Vergleich zu herkömmlichen PCR-Verfahren, bei denen eine Messung bzw. Bestimmung von Endprodukten im besten Falle semiquantitativ stattfindet, ist es während der *Real-Time* PCR möglich, Fluoreszenzsignale während oder nach jedem Zyklus zu messen und damit auch Aussagen über die anfängliche DNA-Menge zu treffen. Dies ist möglich, da der Ablauf der PCR im *Thermocycler* mit der gleichzeitigen Datenanalyse kombiniert ist.

Higuchi und Mitarbeiter legten 1992 die Grundlage für die heutzutage angewandte *Real-Time* PCR, indem sie einen *Thermocycler* mit einer UV-Lampe und einer CCD-Kamera ausstatteten und dem PCR-Ansatz direkt Ethidiumbromid zufügten, welches nach dem Einbau in doppelsträngige DNA durch Anregung mit UV-Licht fluoresziert (Higuchi *et al.*, 1992; Higuchi *et al.*, 1993).

Neben der bereits oben erwähnten quantitativen Bestimmung der anfänglichen DNA-Menge ist als weiterer Vorteil der Wegfall von zum Teil aufwendigen Gelaufteilungen, die auch ein gewisses Risiko für Kontaminationen durch PCR-Produkte bergen, zu nennen. Darüber hinaus kann über die Messung der während der PCR gebildeten DNA jederzeit überprüft werden, ob sich die PCR noch im linearen Bereich befindet. Ein weiterer Vorteil dieses Verfahrens ist der mögliche große Probendurchsatz in sehr kurzer Zeit.

Heutzutage hat sich an der Methode von Higuchi und Mitarbeitern wenig verändert; im Gegensatz zu Ethidiumbromid verwendet man jedoch andere empfindlichere interkalierende Farbstoffe, die ein besseres Signal-Hintergrund-Verhältnis liefern.

Im Falle dieser Arbeit handelte es sich um SYBR<sup>®</sup> Green I, das in doppelsträngige DNA interkaliert und dessen Fluoreszenz durch den Detektor kontinuierlich erfasst wird. In gelöster Form zeigt SYBR<sup>®</sup> Green I eine schwächere Leuchtkraft, die sich jedoch in gebundener Form drastisch erhöht. Die Anregung von SYBR<sup>®</sup> Green I erfolgte mit einer Wolfram-Halogenlampe maximal bei 497 nm, mit einer zweiten Anregung bei ca. 290 und ca. 380 nm. Die Detektion der emittierten Fluoreszenz erfolgte bei 520 nm. SYBR<sup>®</sup> Green I besitzt die Fähigkeit, sich in so genannte „*minor grooves*“ (= kleine Furchen) von doppelsträngiger DNA einzulagern. Diese Bindung verstärkt die emittierte Fluoreszenz bei gleicher Anregungsintensität um ein Vielfaches und ist direkt proportional zu der Zahl der vorhandenen Doppelstränge (Roche Diagnostics).

Die Quantifizierung der *Real-Time* PCR basiert auf der Berechnung des Fluoreszenz-Schwellenwertes (*Threshold Cycle* oder C<sub>T</sub>-Wert), denn zu diesem Zeitpunkt verläuft die Vermehrung exponentiell. Der C<sub>T</sub>-Wert ist jener PCR-Zyklus, bei dem das Fluoreszenzsignal der Produkte die Hintergrundfluoreszenz signifikant übersteigt. Zu Beginn einer *Real-Time* PCR wird nur diese Hintergrundfluoreszenz gemessen, da aufgrund der geringen „*Template*“-Menge das Fluoreszenzsignal der Proben noch nicht detektierbar ist.

Die Berechnung des *Threshold Cycles* erfolgte computergestützt durch die *iCycler Software*.

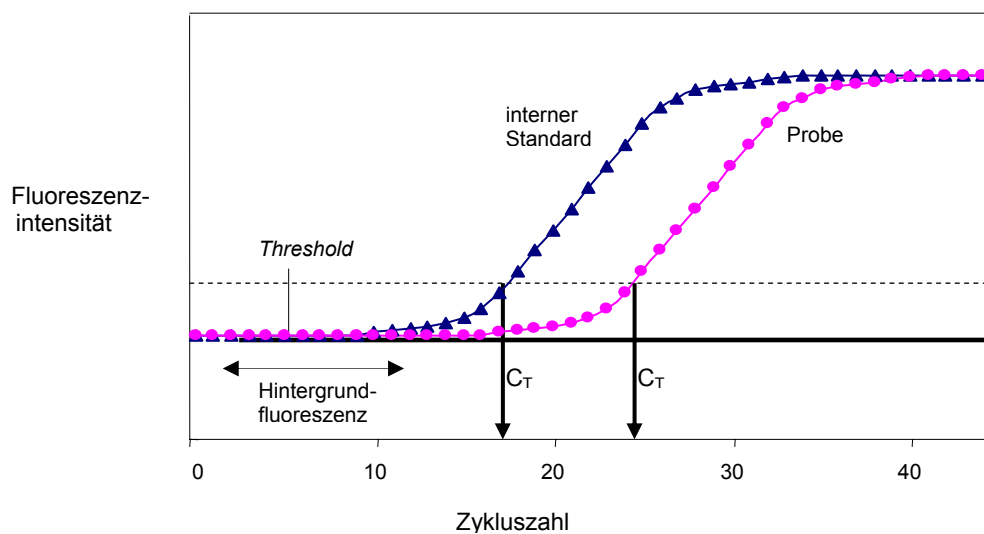
Genau wie bei der semiquantitativen PCR wurde auch bei der *Real-Time* PCR das zu untersuchende Gen mit einem gleichzeitig amplifizierten Standard (1A) verglichen. Pro PCR wurden Drei- bis Vierfachbestimmungen des untersuchten Gens durchgeführt; von diesen C<sub>T</sub>-Werten wurden dann Mittelwerte und Standardabweichungen bestimmt. Anschließend wurde der ΔC<sub>T</sub>-Wert berechnet als die Differenz aus dem untersuchten Gen und dem internen Standard:

$$\Delta C_T\text{-Wert} = C_T\text{-Wert (Gen)} - C_T\text{-Wert (Standard)}$$

Zur Untersuchung der Wirkung der einzelnen Substanzen auf die Genexpression wurden  $\Delta\Delta C_T$ -Werte bestimmt, die sich aus der Differenz der  $\Delta C_T$ -Werte der Untersuchungssubstanz minus der  $\Delta C_T$ -Werte der Kontrolle ergeben:

$$\Delta\Delta C_T\text{-Wert} = \Delta C_T\text{-Wert (Substanz)} - \Delta C_T\text{-Wert (Kontrolle)}$$

Abschließend wurde  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  errechnet, um einen direkten Vergleich zwischen Kontrolle und der behandelten Gruppen zu erhalten und diese Unterschiede graphisch in Form von Diagrammen darstellen zu können. Durch diese Umrechnung wurde die Kontrollgruppe gleich 1 gesetzt und die anderen Gruppen auf diese bezogen.



**Abb. 22: Real-Time PCR**  
(nach PE Applied Biosystems, 1998)

Durch die Zugabe des Fluoreszenzfarbstoffes SYBR<sup>®</sup> Green I und den für die interne Kalibrierung des iCyclers notwendigen Farbstoff Fluorescein ergab sich folgender Reaktionsansatz für die *Real-Time PCR*:

Gesamtansatz für die *Real-Time PCR* (pro Reaktion):

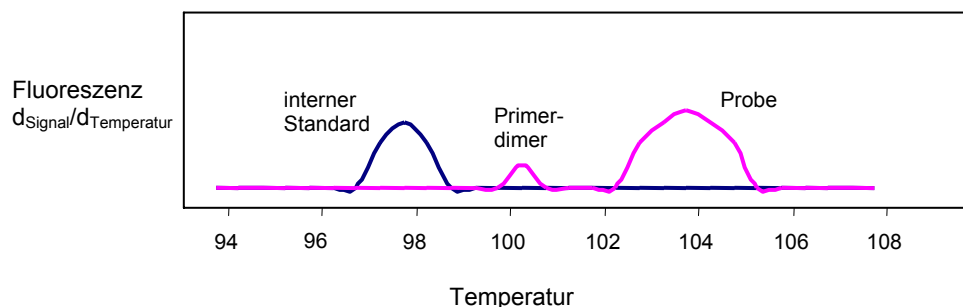
22,55	μl	steriles <i>aqua bidest.</i> (Ampuwa <sup>®</sup> )
5	μl	10 x PCR Puffer (1 M Tris-HCl (pH 9,0); 0,4 M Ammoniumsulfat)
3	μl	50 mM MgCl <sub>2</sub>
4	μl	2,5 mM dNTP-Mix
0,2	μl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase [5 U/μl]
1,25	μl	Fluorescein
5	μl	SYBR <sup>®</sup> Green I
<hr/>		
41	μl	

Der Gesamtansatz wurde in einer speziell für die *Real-Time* PCR geeigneten „96-well“-Platte vorgelegt und mit jeweils 1 µl Primer-Mix (bestehend aus „forward“- und „reverse“-Primer) versetzt. Jeder Probe wurden anstelle von 1 µl cDNA 1 µl einer 1:10 cDNA-Verdünnung mit PCR-Puffer zugesetzt, der dann noch 7 µl Ampuwa<sup>®</sup> zugefügt wurden. Alle Arbeitsschritte erfolgten im Eisbad bei 0° bis 4°C. Anschließend wurde die „96-well“-Platte direkt in den iCycler gestellt, der zunächst eine interne Kalibrierung mit Fluorescein durchführte.

Im Anschluss an die PCR wurde durch den iCycler von jeder Probe eine Schmelzkurve erstellt, denn jedes Amplikon besitzt einen spezifischen Schmelzpunkt. Dieser ist u. a. von der Amplikonlänge, dem Guanin- und Cytosinanteil und von möglichen Basenfehlpaarungen abhängig. Mithilfe dieser Schmelzkurven können Aussagen über die Qualität der gebildeten Produkte getroffen werden.

Zur Erstellung der Schmelzkurve wurde in 0,5°C-Schritten die Temperatur beginnend von 58° auf 100°C erhöht und die emittierte Fluoreszenz kontinuierlich erfasst. Durch die eintretende Denaturierung nimmt die Fluoreszenz deutlich ab, da der Interkalator SYBR<sup>®</sup> Green I an denaturierten Strängen deutlich schwächer fluoresziert als im DNA-Doppelstrang.

Die Steigung der Kurvenverläufe wurde über die erste Ableitung ( $d_{\text{Signal}}/d_{\text{Temperatur}}$ ) errechnet, so dass sich für die einzelnen Amplikons charakteristische Maxima ergaben, über die sich spezifische von eventuellen unspezifischen Produkten (z. B. Primeroligomeren) trennen und auch die Identität der spezifischen Produkte nachweisen ließen.



**Abb. 23: Beispiel einer Schmelzkurve**



### 3.3 Histologische Techniken

#### 3.3.1 Fixierung, Dehydrierung und Einbettung

Als Voraussetzung für den immunhistochemischen Nachweis von Antigenen in Geweben gilt ein Aufrechterhalten der strukturellen Details und somit eine Erhaltung der antigenen Regionen, die für die Antikörperlösungen zugänglich sein müssen (Coulter-Immunotech Diagnostics, 1998). Die im Falle der vorliegenden Arbeit als Fixierungsmittel verwendete 4 %ige gepufferte Formalinlösung verhindert als quervernetzendes Fixativ die Diffusion des Antigens.

##### 4 %ige gepufferte Formalinlösung (pH 7):

4	g	Natriumdihydrogenphosphat
6,5	g	Dinatriumhydrogenphosphat, wasserfrei
900	ml	<i>aqua bidest.</i>
100	ml	Formalin (35 %ig)

An die Fixation mit Formalinlösung schloss sich eine Dehydrierung an, die stufenweise mit steigenden Alkoholkonzentrationen erfolgte, um eine Schrumpfung und ein mögliches Zerreißen des Gewebes zu vermeiden. Jedoch führt auch eine schonende Entwässerung von Gewebe über die steigende Alkoholreihe zu einer Schrumpfung von ca. 10 bis 15 % (Romeis, 1989). Diese Dehydrierung erfolgte beginnend mit der Fixierung in niedrigprozentiger Formalinlösung in einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu 100 %igem Ethanol. Danach wurde das Gewebe in 60°C warmes Paraffin eingebettet.

All diese Arbeitsschritte wurden von einem Einbettautomaten übernommen, der nach dem Einkammersystem arbeitet und nur die entsprechenden Lösungsmittel austauscht. An die Entwässerung mit bis zu 100 %igem Ethanol schlossen sich eine Xylol- bzw. Ultraclear®- und mehrere Paraffinspülungen bis zur vollständigen Durchtränkung des Gewebes an.

#### 3.3.2 Aufblocken, Erstellen und Aufziehen der Schnitte

Zur einfacheren Handhabung wurden die Präparate direkt mit Paraffin auf Einbettungskassetten aus Plastik aufgeblockt und nach Kühlung auf einer Kühlplatte am Rotationsmikrotom mit einer Dicke von 7 µm geschnitten. Die Schnitte

wurden mittels der Warmwassermethode auf SuperFrost® Plus Objektträger aufgezogen, die eine speziell haftunterstützende Oberfläche besitzen. Der dünne Gewebeschnitt wurde dabei mithilfe eines Pinsels auf den Objektträger aufgebracht und mit einem Tropfen *aqua bidest.* unterspült, was zu einer sofortigen Streckung des Schnittes führte. Auf einer regulierbaren Wärmeplatte glättete sich das geschnittene Paraffin bei 30° bis 35°C weiter. Nach Verdunstung des Wassers wurden die Schnitte zur vollständigen Trocknung für mindestens 12 Stunden bei 37°C oder für 30 Minuten bei 60°C im Trockenschrank getrocknet.

### 3.3.3 Entparaffinieren und Autoklavieren der Schnitte

Zum Entparaffinieren der Schnitte, also zum Entfernen des Einbettungsmittels, wurden diese in einer absteigenden Alkoholreihe gespült. Tabelle 10 zeigt die jeweiligen Lösungen und die Verweildauer der Schnitte in diesen.

Lösung	Dauer
Ultra Clear I	15 Minuten
Ultra Clear II	10 Minuten
Ultra Clear III	10 Minuten
Ethanol 100% I	5 Minuten
Ethanol 100% II	5 Minuten
Ethanol 96% I	5 Minuten
Ethanol 96% II	5 Minuten
Ethanol 70% I	5 Minuten
Ethanol 70% II	5 Minuten
<i>aqua bidest.</i>	5 Minuten

Tab. 10: Entparaffinierung der Gewebeschnitte

Die Zellstrukturen befanden sich nun in einem vollständig entparaffinierten Zustand und waren mit Wasser gefüllt. Um das Austrocknen der Schnitte zu vermeiden, wurden diese immer in *aqua bidest.* oder TBS-Puffer gelagert.

#### TBS-Puffer:

100	ml	0,5 M Tris-HCl-Lösung (pH 7,2)
100	ml	1,5 M Natriumchlorid-Lösung
800	ml	<i>aqua bidest.</i>

Um die noch bestehenden Formalinvernetzungen der Proteine aufzubrechen und dadurch eine verbesserte Antigen-Antikörper-Reaktion durch freiliegende Bindungsstellen zu ermöglichen, wurden die Gewebeschnitte in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) autoklaviert.

10 mM Citratpuffer (pH 6,0):

9	ml	0,1 M Citronensäure-Lösung
41	ml	0,1 M Na-citrat-Lösung
450	ml	<i>aqua bidest.</i>

Das Autoklavieren zeigt gegenüber der Mikrowellenbehandlung und der Vorbereitung im Schnellkochtopf bessere Ergebnisse bezüglich der Sensitivität und verhindert ein Abschwimmen der Schnitte vom Objektträger (Iwamura *et al.*, 1994; Bier *et al.*, 1995). Hierbei wird die Oberfläche des Gewebes durch die hohe Temperatur und den hohen Druck demaskiert. Das Gewebe bleibt erhalten, lediglich die Formalinvernetzung wird aufgebrochen - genauer gesagt, kommt es zu einer Auflösung der unter der Formalinfixierung entstandenen Methylbrücken. Diese entstehen bei der Fixierung durch Quervernetzungen und führen zu Strukturveränderungen von Proteinen mit einer Verdeckung der entscheidenden Antigene (Bourne).

Bei dem verwendeten Standautoklaven wurde ein Programm gewählt, welches die Gewebeproben für die Dauer von 10 min einer Temperatur von 121°C und einem Druck von 2 bar aussetzte. Der Temperaturanstieg und der Druckaufbau erfolgten dabei langsam und stetig; nach der durch das Gerät vorgegebenen Druckminderung und Abkühlung von ca. 100 min, folgte eine weitere 30-minütige Abkühlung der Proben außerhalb des Gerätes bei RT. Hierdurch erfuhren die aufgezogenen Schnitte eine so langsame Abkühlung, dass kein Abspülen oder Verzerren zu befürchten war.

### **3.3.4 Färbungen des Uterus- und des Vaginalepithels**

Zur Bestimmung der Epitheldicken von Uterus und Vagina, welche unter Estrogeneinfluss deutlich zunehmen, kann man sich der Färbung mit verschiedenen Reagenzien bedienen. Im Falle der vorliegenden Arbeit wurde das Uterusepithel mithilfe einer Azan-Lösung angefärbt. Das Vaginalepithel wurde mithilfe

von Scotts-Reagenz gefärbt, das auch die Verhornung des Epithels sichtbar machte. Die oben angegebene Autoklavierung wurde für die im Folgenden beschriebenen Färbungen nicht durchgeführt, sondern spielte nur bei den unten erläuterten immunhistochemischen Färbungen eine bedeutende Rolle. Für die Azan- und Scott-Färbung wurden die Gewebeschnitte im Anschluss an die Entparaffinierung direkt weiterbehandelt.

### **Azan-Färbung**

Die Schnitte der Uteri wurden in einer vorgewärmten Azokarmin-Lösung für 10 bis 15 min in einen Wärmeschrank bei 56°C gestellt. Danach wurden sie bei RT abgekühlt und mit *aqua bidest.* gespült. Hieran schloss sich eine Differenzierung in Anilin-Alkohol (1 ml Anilinöl auf 1.000 ml 96 %igen Ethanol) unter mikroskopischer Kontrolle an, solange bis die Zellkerne scharf hervortraten. Anschließend wurde der Anilin-Alkohol mit Essigsäure-Alkohol (1 ml Eisessig auf 100 ml 96 %igen Ethanol) 30 bis 60 sec ausgewaschen und die Schnitte dann für 1 bis 3 Stunden in 5 %iger Phosphorwolframsäure-Lösung gebeizt. Nach einem kurzen Abspülen mit *aqua bidest.* wurde mit Anilinblau-Orange G-Essigsäure gefärbt. Abschließend wurden die Schnitte mit *aqua bidest.* gewaschen und mit 96 %igem Ethanol differenziert.

#### Azokarmin-Färbelösung:

0,1	g	Azokarmin G
100	ml	<i>aqua bidest.</i>

—————  
aufschwemmen, kurz aufkochen, nach dem Abkühlen filtrieren

1	ml	Eisessig
---	----	----------

#### Anilinblau-Orange G-Färbelösung:

0,5	g	Anilinblau (wasserlöslich)
2	g	Orange G
100	ml	<i>aqua bidest.</i>
8	ml	Eisessig

—————  
kurz aufkochen, nach dem Abkühlen filtrieren

Diese Stammlösung wurde zur Färbung 1:1 bis 1:3 mit *aqua bidest.* verdünnt.

Die Schnitte wurden mit Kaisers Glycerol-Gelatine und Deckgläschen abgedeckt, um ein Austrocknen und Veränderungen des Zellgewebes zu vermeiden.

### Scott-Färbung

Das Gewebe wurde zunächst mit einem Gemisch bestehend aus einer 0,5 %igen Kaliumpermanganat-Lösung und einer 0,5 %igen Schwefelsäure-Lösung für 5 min oxidiert. Hieran schloss sich ein 6-minütiges Wässern in *aqua bidest.* an. Die anschließende Entfärbung erfolgte mit einer 2 %igen Natriumbisulfit-Lösung für eine Minute und einer Wässerung unter dem Wasserhahn für 10 min. Mit einer gereiften 0,5 %igen Paraldehydfuchsin-Lösung wurde 20 min gefärbt. Nach der Färbung wurde dreimal mit Isopropanol gespült, solange bis sich keine Farbe mehr löste. Die Schnitte wurden dann für 30 sec in eine 0,5 %ige Xylidin-Ponceau-Lösung getaucht und mit *aqua bidest.* gespült. Nun wurde eine 5 %ige Phosphorwolframsäure-Lösung für eine Minute auf den Schnitten belassen und anschließend mit Leitungswasser abgespült. Hieran schloss sich noch eine einminütige Färbung mit 0,2 %iger Lichtgrün-Lösung an, die abschließend zunächst zweimal mit 96 %igem und dann zweimal mit 100 %igem Ethanol von den Schnitten gespült wurde.

#### gereifte 0,5 %ige Paraldehydfuchsin-Lösung:

1	g	basisches Fuchsin
200	ml	70 %iger Ethanol
2	ml	Paraldehyd-Lösung
2	ml	konzentrierte Salzsäure

\_\_\_\_\_

24 Stunden bei RT reifen lassen

### 3.3.5 Progesteronrezeptorfärbung mittels Immunhistochemie

Das dieser Arbeit zugrunde liegende immunhistochemische Verfahren wird als PAP-Methode (Peroxidase-Anti-Peroxidase) bezeichnet. Hierbei kommt es zu Reaktionen zwischen einem Primärantikörper, einem Sekundärantikörper und dem so genannten PAP-Komplex. Grundvoraussetzung für diese Reaktion ist die natürliche Affinität zwischen dem Antigen und dem spezifischen Antikörper. Dieser Primärantikörper ist spezifisch gegen das Antigen gerichtet - im Falle dieser Arbeit gegen den Progesteronrezeptor - und bindet sich über einen so genannten sekun-

dären Brückenantikörper an den PAP-Komplex, der schließlich eine Farbstoffreaktion auslöst. Entscheidend ist, dass Primärantikörper und PAP-Komplex in derselben Tierspezies hergestellt wurden und dass der Brückenantikörper gegen Immunglobuline dieser Tierart gerichtet ist (z. B. Ziege-anti-Maus).

Das Enzym Peroxidase - als ein Bestandteil des PAP-Komplexes - wird dann wie oben bereits erwähnt durch eine Substrat-Chromogenreaktion sichtbar gemacht. Die PAP-Methode zählt zu den indirekten Verfahren und hat gegenüber anderen Verfahren den Vorteil einer erhöhten Sensitivität (Romeis, 1989).

An den oben beschriebenen Autoklaviervorgang schloss sich ein mehrmaliges Spülen in TBS-Puffer für jeweils 5 min an. Um eine zu großflächige Verteilung der zu inkubierenden Reagenzien auf dem Objektträger zu vermeiden, wurden die Gewebeschnitte mit einem speziell für die Immunhistochemie geeigneten Markierstift (*PAP-Pen*) umrandet.

Im ersten Schritt wurden alle Gewebeschnitte für 30 min mit einem 10 %igen *normal goat serum* (Normal-Ziegenserum) bei RT inkubiert. Dieses wurde nach Ablauf der Zeit lediglich abgeklopft, die Schnitte wurden jedoch nicht gespült. Dieses Ziegenserum dient zur Blockade von unspezifischen Bindungsstellen, so dass nur der tatsächlich gesuchte Rezeptor angefärbt wird und keine Präzipitate sichtbar werden. Als nächstes schloss sich die Inkubation mit dem Antikörper anti-Progesteronrezeptor (Primärantikörper) an, der in einer gebrauchsfertigen Lösung vorlag.

Die Objektträger wurden über Nacht im Kühlschrank in einer feuchten Kammer bei 4°C gelagert. Am darauf folgenden Tag wurden die Schnitte zweimal für 5 min mit TBS-Puffer gespült. Nun erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper, also dem Brückenantikörper. Dieser Antikörper - ein Ziege-anti-Maus-Serum - wurde in einer Konzentration von 1:100 in einem PAV-Verdünnungspuffer aufgetragen.

PAV-Verdünnungspuffer:

6	ml	0,01 M TBS-Lösung (pH 7,4)
1	ml	10 %iges Normal-Ziegenserum
1	ml	0,1 %ige BSA -Lösung
1	ml	0,05 %ige Thiomersal-Lösung
1	ml	0,01 %ige Natriumazid-Lösung

Der angegebene PAV-Verdünnungspuffer soll eine mögliche Verpilzung des Objektes verhindern, die Reaktionsfreudigkeit erhöhen und unspezifische Bindungen des Sekundärantikörpers reduzieren. Die Objektträger wurden für eine Stunde in einer feuchten abgedunkelten Kammer bei RT inkubiert. Auch hieran schloss sich ein Spülen mit TBS-Puffer für zweimal 5 min an.

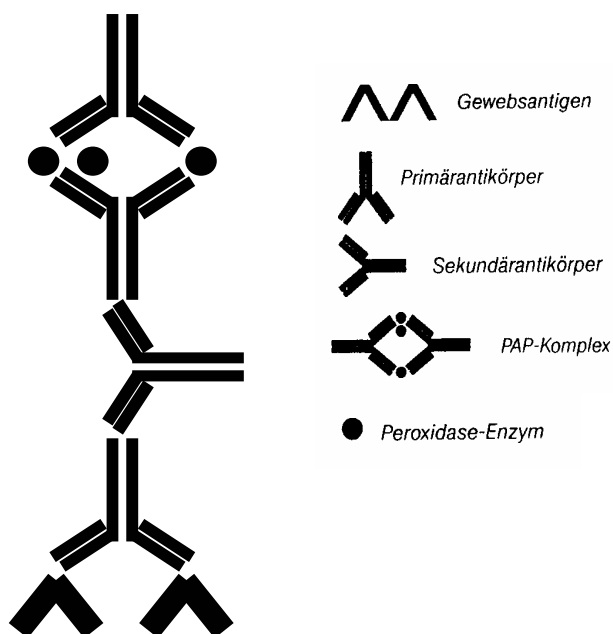
Abschließend wurde nun der oben bereits erwähnte PAP-Komplex auf die Gewebeschnitte aufgetragen. Dieser PAP-Komplex wurde im vorgegebenen Verhältnis 1:100 mit einem PCV-Komplexverdünner gemischt.

PCV-Komplexverdünner:

8	ml	0,01 M TBS-Lösung (pH 7,4)
1	ml	0,1 %ige BSA -Lösung
1	ml	0,05 %ige Thiomersal-Lösung

Der PAP-Komplex wurde für eine Stunde bei RT abgedunkelt in einer feuchten Kammer inkubiert und anschließend durch das oben bereits erwähnte Spülen mit TBS-Puffer entfernt.

Abbildung 24 zeigt schematisch die PAP-Methode:



**Abb. 24: PAP-Methode**  
(nach Bourne)

### AEC-Färbung

Zuletzt folgte die Anfärbung des an den Sekundärantikörper konjugierten PAP-Komplexes mittels AEC-Entwicklerlösung.

#### AEC-Entwicklerlösung:

2,8	ml	0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5,2)
200	µl	AEC-Lösung (4 mg 3-Amino-9-ethylcarbazol gelöst in 1 ml N,N-Dimethylformamid)
30	µl	3 %ige H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Lösung

---

durch grobes Filterpapier filtrieren

Die Inkubationszeit betrug 5 bis 20 min unter mikroskopischer Kontrolle. Die Inkubation wurde mit *aqua bidest.* gestoppt, sobald eine deutliche Färbung der Zellkerne zu erkennen war.

Grundlage der AEC-Färbung ist ein Vorgang, bei dem die Antigen-Antikörper-Reaktion durch eine Enzym-Substratreaktion als Farbreaktion sichtbar gemacht wird (Bourne). Man versucht hierbei eine möglichst intensive Farbreaktion zu erzielen, ohne eine unspezifische Hintergrundfärbung (Rauschen) zu erhalten.

Die Schnitte wurden ebenfalls mit Kaisers Glycerol-Gelatine und Deckgläschen abgedeckt. Dieses Eindeckmedium gewährt eine Farbstabilität der mit AEC-Entwickler sichtbar gemachten Kerne.

Die photographische Auswertung der angefärbten Gewebeschnitte erfolgte im Anschluss an das Eindecken mit Glycerol-Gelatine bei 80- bzw. 250-facher Vergrößerung mit einem Mikroskop der Firma Zeiss (Typ Axiophot), welches mit einer digitalen Kamera (Sony, 3CCD, Japan) und einem Personalcomputer gekoppelt war. Als Softwareprogramm zur Speicherung und möglichen Bearbeitung der Aufnahmen diente die *Software KS 300 Imaging System, Release 3.0* der Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos.

### 3.4 Statistik

Die statistische Auswertung der Untersuchungsergebnisse erfolgte computergestützt mithilfe des Software-Statistikprogrammes „STATISTICA<sup>®</sup> for windows“ (Release 4.5, 1993, Fa. StatSoft, Tulsa, OK, USA). Weiterhin wurde für die tabellarische und graphische Darstellung der Versuchsergebnisse das Programm Excel 2000 der Firma Microsoft<sup>®</sup> herangezogen. Die in den Abbildungen und Tabellen



dargestellten Ergebnisse geben arithmetische Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit Standardabweichung wieder ( $\pm s$ ).

Die Nullhypothese wurde mithilfe des Rangtestes von Mann und Whitney (Mann-Whitney U Test) geprüft. Dieser Test setzt keine Normalverteilung der zu vergleichenden Kollektive voraus; er prüft zwei Gruppen hinsichtlich ihrer Lokation - eine abhängige mit einer unabhängigen Variablen.

Zur Berechnung der Prüfgröße  $U$  werden alle Werte beider Stichproben in einer aufsteigenden Reihe sortiert und jedem Wert wird ein Rangplatz zugewiesen - der größte Wert erhält den höchsten Rangplatz. Die sich ergebenden Rangzahlen der Einzelwerte werden den jeweiligen Stichproben zugeordnet und addiert. Die Summe der auf Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen wird als  $R_1$  bezeichnet, die auf Stichprobe 2 entfallenden Rangzahlen als  $R_2$ . Die Anzahl der Werte aus Stichprobe 1 sei  $m$  und die aus Stichprobe 2 sei  $n$ .

$$U_1 = mn + \frac{m(m+1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = mn + \frac{n(n+1)}{2} - R_2$$

Dabei muss die Summe der beiden Werte  $U_1$  und  $U_2$  dem Produkt der Anzahl der Werte beider Stichproben entsprechen.

$$U_1 + U_2 = mn$$

Mithilfe dieser Teststatistik wird berechnet, ob der Unterschied in den errechneten Rangsummen so groß ist, dass man es als sicher ansehen kann, dass die beiden verglichenen Gruppen nicht aus derselben Population stammen.

In den graphischen Darstellungen wird das Signifikanzniveau durch die folgenden Symbole veranschaulicht:

zur Kontrolle:	$p < 0,001$	***	sehr hochsignifikant
	$p < 0,01$	**	hochsignifikant
	$p < 0,05$	*	signifikant

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1 Wirkungen der Phytoestrogene auf Proliferation und Apoptoseinduktion in der Zelllinie MCF-7

#### 4.1.1 Effekte nach Verabreichung von Einzelsubstanzen

Die Einflüsse der Phytoestrogene Genistein (Gen), Daidzein (Dai) und Coumestrol (Cou) auf die Verteilung der einzelnen Zellzyklusphasen - insbesondere auf Proliferation und Apoptoseinduktion - wurde in humanen Mammakarzinomzellen der Linie MCF-7 untersucht. Die Analyse erfolgte nach fünftägiger Behandlung der Zellen durchflusszytometrisch durch Färbung der DNA mit Propidiumiodid nach Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991) und anschließender Analyse der einzelnen Phasen mit einer geeigneten Computer-Software.

Tabelle 6 in Kapitel 3.1.7 zeigt die Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen bei Behandlung der Zellen. Das natürliche Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) wurde dabei in Konzentrationen von [10<sup>-13</sup> M] bis [10<sup>-10</sup> M] und die zu untersuchenden Phytoestrogene jeweils in Konzentrationen von [10<sup>-8</sup> M] bis [10<sup>-5</sup> M] verabreicht.

Die Besonderheit dieses Versuchsteils lag in der Gabe eines CCS-Mediums anstelle eines Vollmediums schon zwei Tage vor der Behandlung mit den Substanzen, um mögliche estrogene Effekte über das Medium ausschließen zu können. Die folgende Tabelle zeigt jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus mindestens drei verschiedenen Versuchen.

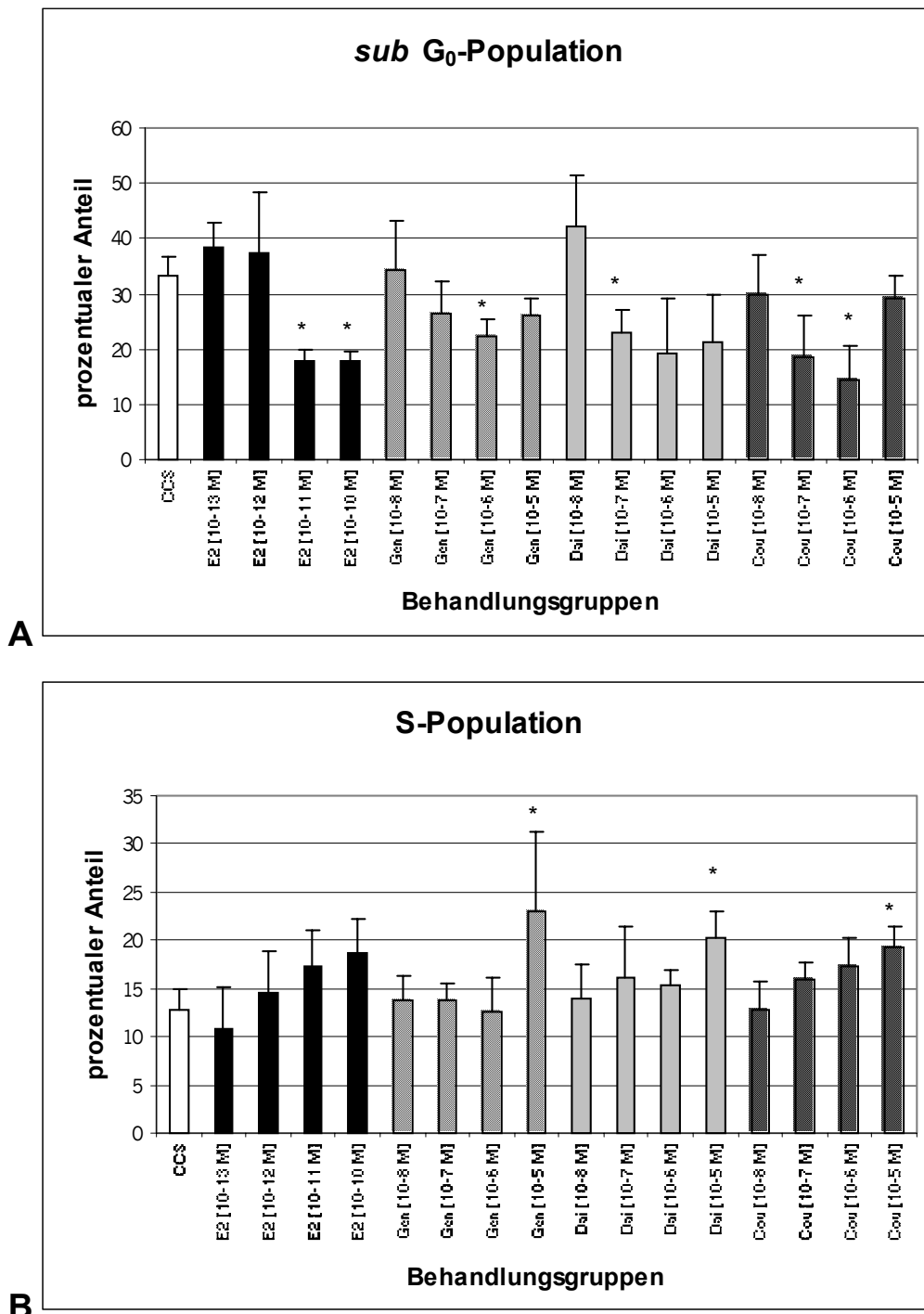
Die Phasen S, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> ergeben zusammengenommen ca. 100 %. Die *sub G<sub>0</sub>*-Werte zeigen den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtheit der Zellen.

	Apoptose		Zellzyklus		
	[M]	sub G <sub>0</sub> [%]	S [%]	G <sub>1</sub> [%]	G <sub>2</sub> [%]
<b>CCS</b>		33,1 ± 3,6	12,7 ± 2,2	70,3 ± 1,6	17,1 ± 1,6
<b>E<sub>2</sub></b>	10 <sup>-13</sup>	38,4 ± 4,3	10,8 ± 4,4	71,4 ± 3,9	17,8 ± 2,6
	10 <sup>-12</sup>	37,4 ± 11,0	14,5 ± 4,5	70,2 ± 3,5	15,5 ± 2,9
	10 <sup>-11</sup>	17,8 ± 2,1	17,2 ± 3,7	65,2 ± 2,7	17,6 ± 2,0
	10 <sup>-10</sup>	17,8 ± 1,6	18,6 ± 3,6	62,4 ± 1,2	19,0 ± 2,7
<b>Gen</b>	10 <sup>-8</sup>	34,2 ± 9,2	13,8 ± 2,4	69,9 ± 2,8	16,3 ± 2,2
	10 <sup>-7</sup>	26,2 ± 6,0	13,7 ± 1,9	70,4 ± 3,4	16,0 ± 3,9
	10 <sup>-6</sup>	22,4 ± 3,1	12,7 ± 3,5	69,6 ± 3,5	17,8 ± 4,1
	10 <sup>-5</sup>	26,2 ± 2,9	23,1 ± 8,2	61,4 ± 2,1	15,6 ± 6,6
<b>Dai</b>	10 <sup>-8</sup>	42,2 ± 9,2	14,0 ± 3,5	72,5 ± 2,2	13,6 ± 2,5
	10 <sup>-7</sup>	23,0 ± 4,0	16,2 ± 5,3	66,3 ± 4,2	17,6 ± 3,3
	10 <sup>-6</sup>	19,2 ± 10,0	15,3 ± 1,6	67,3 ± 3,9	17,5 ± 3,3
	10 <sup>-5</sup>	21,4 ± 8,3	20,2 ± 2,8	60,9 ± 2,4	18,9 ± 2,6
<b>Cou</b>	10 <sup>-8</sup>	29,8 ± 7,3	12,9 ± 2,8	70,0 ± 1,2	17,2 ± 1,8
	10 <sup>-7</sup>	18,6 ± 7,6	16,0 ± 1,7	67,0 ± 3,3	17,1 ± 3,5
	10 <sup>-6</sup>	14,4 ± 6,2	17,4 ± 2,9	65,8 ± 2,6	16,9 ± 4,4
	10 <sup>-5</sup>	29,3 ± 3,9	19,3 ± 2,1	62,1 ± 2,7	18,7 ± 3,1

**Tab. 11: Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (Versuchsteil I)**

x ± s, n ≥ 3

Die für die Arbeit entscheidenden Phasen - die *sub G<sub>0</sub>*- und die S-Phase - sind in Abbildung 25 einzeln dargestellt und in Abbildung 26 zusätzlich zusammengefasst. In diesem Diagramm sind alle Werte auf die CCS-Kontrollgruppe (=1) bezogen, um direkt Aussagen bezüglich der Wirkungen im Vergleich zur Kontrolle und zum natürlichen Estrogen treffen zu können.



**Abb. 25: Graphische Darstellung der sub G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil I)**  
 \* signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (\* p < 0,05)

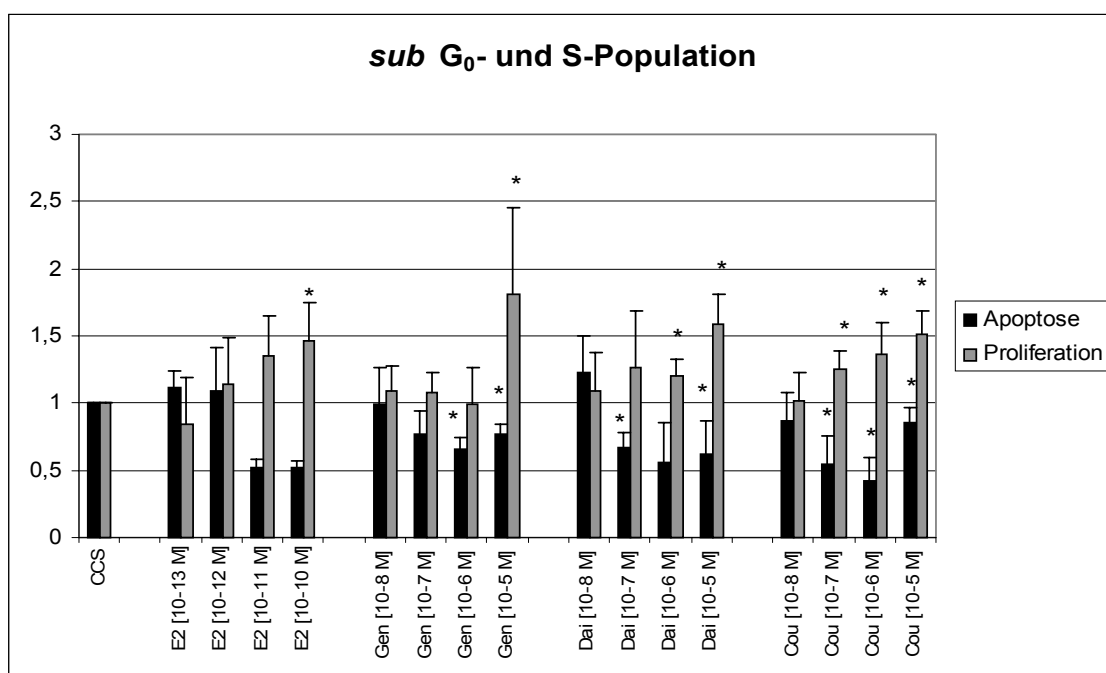
A: sub G<sub>0</sub>-Population

B: S-Population

Bei der Analyse der sub G<sub>0</sub>-Population (siehe Abb. 25 A) ist eine signifikante Reduktion dieser nach Verabreichung des natürlichen Hormons E<sub>2</sub> in Konzentrationen von [10<sup>-11</sup> M] und [10<sup>-10</sup> M] zu erkennen. Die Phytoestrogene reduzieren die Zahl der Zellen, die sich in der sub G<sub>0</sub>-Population befinden, entweder bei einer

Konzentration von  $[10^{-7}$  M] oder bei  $[10^{-6}$  M] signifikant gegenüber der Kontrollgruppe. Coumestrol zeigt eine signifikante Reduktion bei beiden genannten Konzentrationen.

Die Behandlung der Zellen mit  $E_2$  bewirkt eine dosisabhängige Zunahme der S-Population (Abb. 25 B), die jedoch in keiner der eingesetzten Konzentrationen signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ist. Alle drei Phytoestrogene führen in der jeweils höchsten Konzentration von  $[10^{-5}$  M] zu einer signifikanten Zunahme der S-Population. Daidzein und insbesondere Coumestrol lassen eine Dosisabhängigkeit erkennen.



**Abb. 26: Graphische Darstellung der sub G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil I)**

Zum direkten Vergleich wurde die CCS-Gruppe gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet.

\* signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (\* p < 0,05)

Aus Abbildung 26 wird ersichtlich, dass es unter der Gabe des natürlichen Estrogens 17β-Estradiol zu einer dosisabhängigen Zunahme der Proliferation und zu einer Abnahme der Apoptose kommt. Alle drei Phytoestrogene zeigen ebenfalls dosisabhängige Effekte. Bei den höchsten Konzentrationen von  $[10^{-5}$  M] liegen die Proliferationswerte über denen von  $E_2 [10^{-10}$  M]. Die Abnahme der Apoptoseinduktion verläuft biphasisch. Mit steigender Konzentration der Phytoestrogene kommt es zunächst zu einer Abnahme der Apoptose; bei einer Konzentration von  $[10^{-5}$  M] steigt diese jedoch wieder leicht an.

### 4.1.2 Effekte nach Verabreichung von Kombinationen aus Estrogen und Phytoestrogen

Der anschließend durchgeführte Versuchsteil II zeichnete sich durch die Gabe von Kombinationen aus jeweils 17β-Estradiol [10<sup>-12</sup> M] bis [10<sup>-10</sup> M] und einem Phytoestrogen in der Konzentration von [10<sup>-6</sup> M] aus.

Tabelle 7 in Kapitel 3.1.7 zeigt die eingesetzten Kombinationen. Um auch mögliche antagonistische Effekte bewerten zu können, wurde ein Teil der Zellen sowohl mit E<sub>2</sub> als auch mit dem reinen Antiestrogen Fulvestrant behandelt.

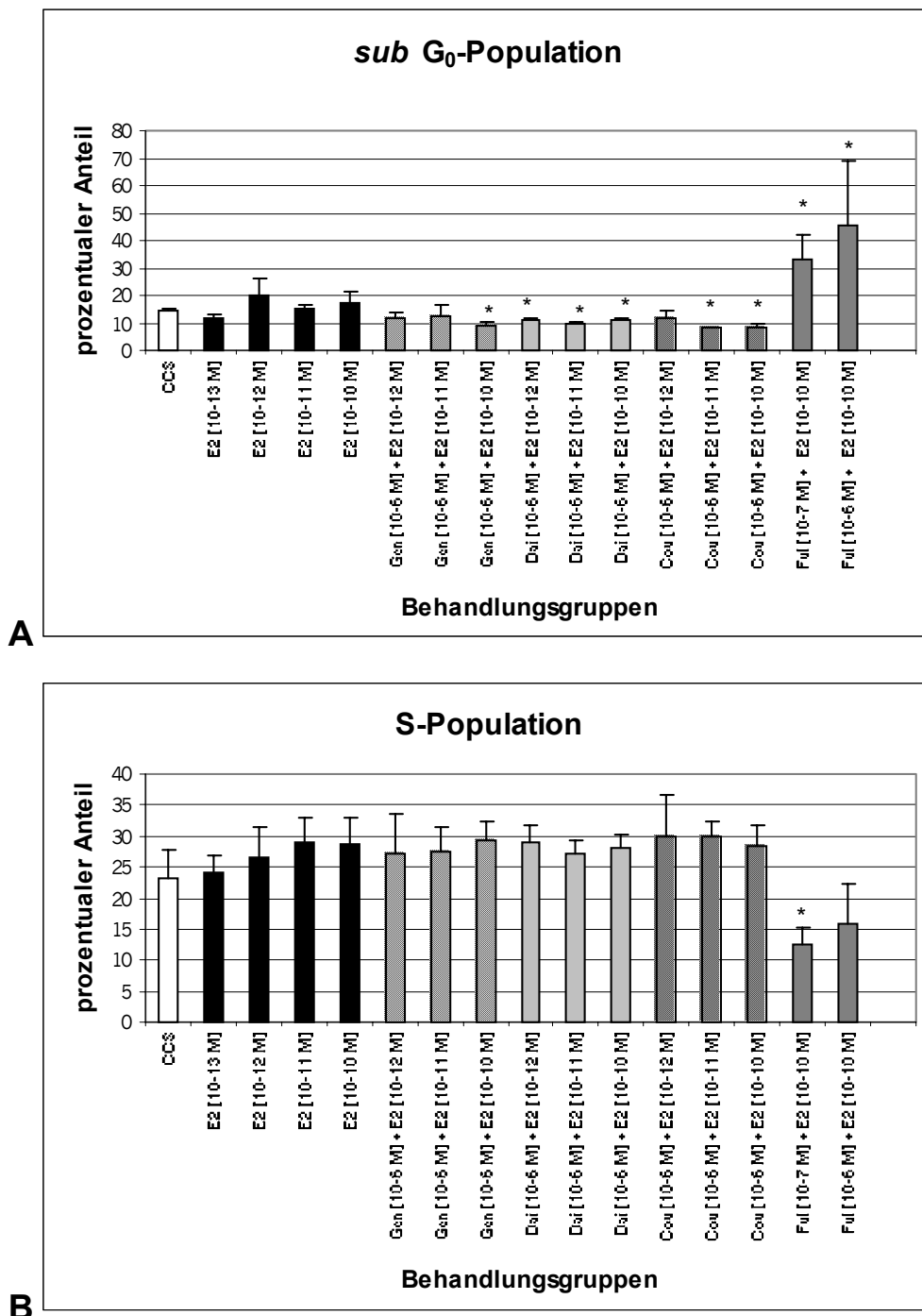
In der folgenden Tabelle sind jeweils die Mittelwerte und die Standardabweichungen aus mindestens drei verschiedenen Versuchen dargestellt. Auch hier ergeben die Phasen S, G<sub>1</sub> und G<sub>2</sub> zusammengenommen ca. 100 %. Die *sub G<sub>0</sub>*-Werte zeigen den prozentualen Anteil der apoptotischen Zellen an der Gesamtheit der Zellen.

	Apoptose		Zellzyklus		
	[M]	<i>sub G<sub>0</sub></i> [%]	S [%]	G <sub>1</sub> [%]	G <sub>2</sub> [%]
<b>CCS</b>		14,5 ± 1,0	23,3 ± 4,4	63,7 ± 5,5	13,0 ± 1,2
<b>E<sub>2</sub></b>	10 <sup>-13</sup>	11,4 ± 1,5	24,2 ± 2,7	59,7 ± 4,8	16,0 ± 3,1
	10 <sup>-12</sup>	19,7 ± 6,4	26,5 ± 4,9	60,8 ± 5,6	12,7 ± 0,7
	10 <sup>-11</sup>	14,9 ± 1,8	29,0 ± 4,1	58,6 ± 6,6	12,4 ± 2,6
	10 <sup>-10</sup>	17,0 ± 4,1	28,7 ± 4,1	56,4 ± 6,8	14,9 ± 2,8
<b>Gen</b>	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-12</sup> ]	11,4 ± 2,3	27,3 ± 6,3	59,0 ± 8,0	13,8 ± 2,5
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-11</sup> ]	12,4 ± 4,4	27,5 ± 4,0	58,6 ± 5,8	13,9 ± 1,7
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-10</sup> ]	9,0 ± 1,5	29,3 ± 3,1	57,3 ± 4,6	13,5 ± 2,1
<b>Dai</b>	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-12</sup> ]	11,3 ± 0,7	28,9 ± 2,7	57,9 ± 4,3	13,2 ± 2,2
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-11</sup> ]	9,7 ± 0,6	27,3 ± 2,1	59,6 ± 4,3	13,1 ± 2,6
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-10</sup> ]	10,9 ± 0,6	28,2 ± 1,9	55,6 ± 4,2	16,1 ± 2,3
<b>Cou</b>	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-12</sup> ]	11,6 ± 3,1	30,0 ± 6,6	59,6 ± 5,7	11,3 ± 3,0
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-11</sup> ]	8,1 ± 0,4	29,9 ± 2,6	56,9 ± 5,9	13,2 ± 3,4
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-10</sup> ]	8,4 ± 1,0	28,3 ± 3,5	57,6 ± 6,8	14,1 ± 3,5
<b>Ful</b>	10 <sup>-7</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-10</sup> ]	33,0 ± 9,2	12,7 ± 2,7	73,9 ± 1,3	13,5 ± 3,6
	10 <sup>-6</sup> + E <sub>2</sub> [10 <sup>-10</sup> ]	45,9 ± 23,0	16,0 ± 6,3	73,6 ± 6,2	10,4 ± 3,3

**Tab. 12: Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (Versuchsteil II)**  
 x ± s, n ≥ 3

Die entscheidenden *sub G*<sub>0</sub>- und S-Phasen sind in Abbildung 27 einzeln dargestellt (Teil A und B) und in Abbildung 28 zusätzlich zusammengefasst.

Hierbei sind ebenfalls wie in Versuchsteil I alle Werte auf die CCS-Kontrollgruppe (=1) bezogen, um direkt Aussagen bezüglich der Wirkungen im Vergleich zur Kontrolle und zum natürlichen Estrogen treffen zu können.



**Abb. 27: Graphische Darstellung der *sub G*<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil II)**

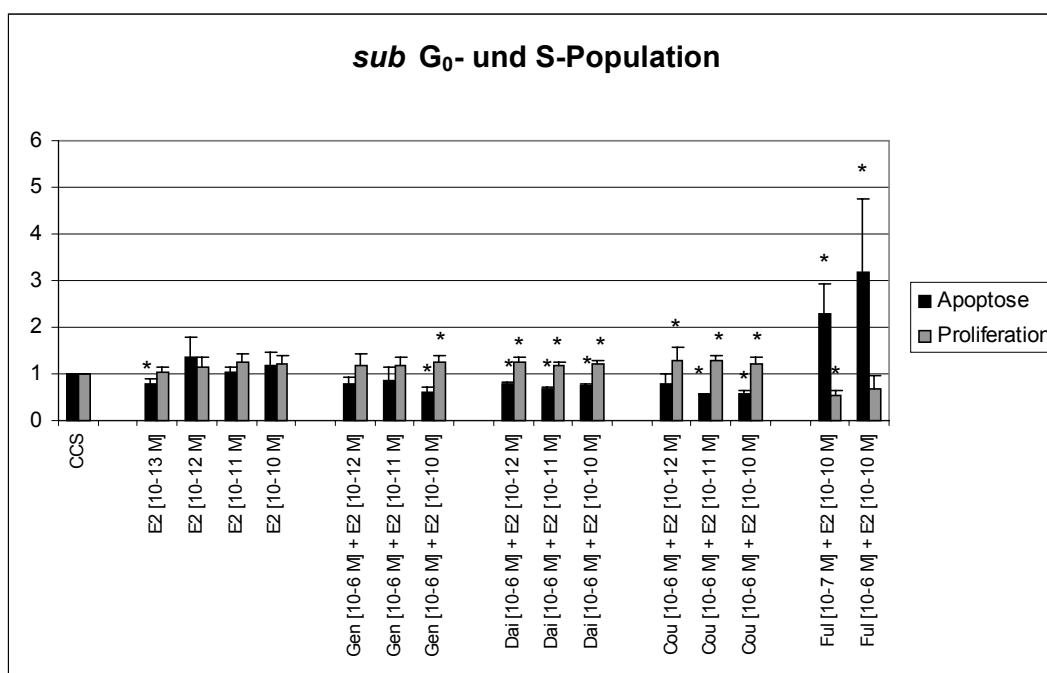
\* signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (\* p < 0,05)

A: *sub G*<sub>0</sub>-Population

B: S-Population

Die Behandlung der Zellen mit den Kombinationen aus E<sub>2</sub> und Phytoestrogenen bewirkt in der jeweils höchsten E<sub>2</sub>-Konzentration von [10<sup>-10</sup> M] im Vergleich zur CCS-Kontrollgruppe eine signifikante Abnahme der *sub* G<sub>0</sub>-Population - für Daidzein ist dieser Effekt in allen drei eingesetzten E<sub>2</sub>-Dosierungen zu beobachten. Die Kombination von E<sub>2</sub> mit dem reinen Antagonisten Fulvestrant führt in beiden Gruppen zu einer signifikanten Zunahme der apoptotischen Zellen.

Die S-Population steigt nach Behandlung mit E<sub>2</sub> wie in Versuchsteil I dosisabhängig an. Die Kombination mit Genistein zeigt ebenfalls eine tendenziell dosisabhängige Zunahme, wohingegen die Kombination mit Coumestrol eher zu einer Abnahme des Anteils von proliferierenden Zellen führt. Allerdings ist keiner der gemessenen Effekte signifikant gegenüber der CCS-Gruppe. Fulvestrant hebt den stimulierenden Effekt des natürlichen Hormons auf die Proliferation der Zellen auf und führt stattdessen zu einer sehr starken Reduktion der S-Phase.



**Abb. 28: Graphische Darstellung der *sub* G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil II)**

Zum direkten Vergleich wurde die CCS-Gruppe gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet.

\* signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (\* p < 0,05)

Durch die Behandlung der Zellen mit dem reinen Estrogen 17β-Estradiol kommt es dosisabhängig zu einer Zunahme der Proliferation. Die Apoptoserate steigt bei den eingesetzten Konzentrationen wider Erwarten ebenfalls leicht an.



Die gleichzeitige Applikation eines Phytoestrogens zusammen mit  $17\beta$ -Estradiol [ $10^{-12}$  M] bis [ $10^{-10}$  M] führt zu einer Abnahme der Apoptoserate in allen Behandlungsgruppen. Für die jeweilige Kombination von  $E_2$  [ $10^{-10}$  M] mit einem der drei Phytoestrogene ist dieser Effekt signifikant gegenüber der CCS-Kontrolle. Daidzein zeigt in allen drei eingesetzten Kombinationen eine signifikante Reduktion. Bei der Behandlung der Zellen mit Coumestrol zeigt sich tendenziell eine dosisabhängige Abnahme der Apoptoserate, je nach verabreichter  $E_2$ -Dosis.

Dosisabhängige Einflüsse der Kombinationen von Estradiol und Phytoestrogenen auf die Proliferation der MCF-7 Zellen können nach diesem Versuchsteil nicht beobachtet werden, jedoch steigt die Proliferation deutlich und auch signifikant gegenüber der CCS-Kontrollgruppe an. Allerdings unterscheiden sich die gemessenen Effekte kaum von denen nach alleiniger  $E_2$ -Behandlung.

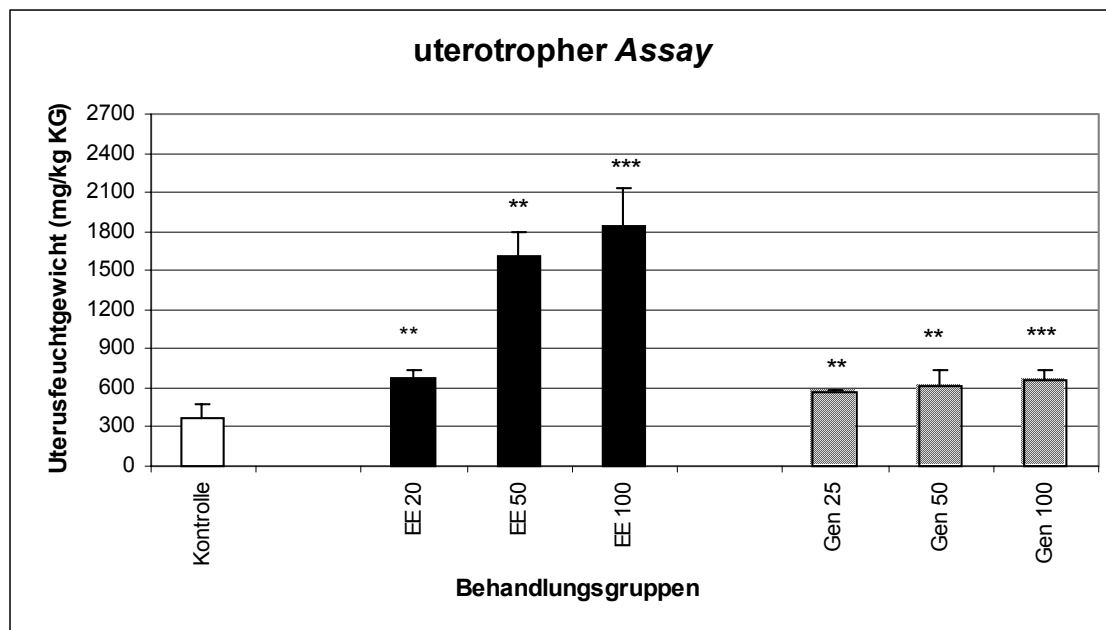
Die Applikation des reinen Antiestrogens Fulvestrant in Kombination mit  $E_2$  bewirkt eine starke und signifikante Zunahme der Apoptoserate sowie eine Reduktion der Zellproliferation im Vergleich zur CCS-Kontrolle.

## 4.2 Wirkungen der Phytoestrogene *in vivo* im Rattenmodell

Zur weiteren Untersuchung der Phytoestrogenwirkungen wurden die Substanzen Genistein und Daidzein sowie die Kontrollgruppen (Lösungsmittel und Estrogen) weiblichen ovariectomierten Ratten peroral bzw. subkutan (siehe unten) verabreicht. Zur Analyse einer estrogenen Wirkung wurden verschiedene Parameter betrachtet (vergleiche Kapitel 2.9).

### 4.2.1 Uterotropher Assay in Wistar Ratten nach Behandlung mit Ethinylestradiol und Genistein

Weibliche ovariectomierte Wistar Ratten wurden zur Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve von Ethinylestradiol (EE) und Genistein (Gen) drei Tage mit den genannten Substanzen in verschiedenen Konzentrationen (EE 20, 50, 100 µg/kg KG; Gen 25, 50, 100 mg/kg KG) sowie mit der Lösungsmittelkontrolle (Propylenglykol) peroral behandelt (siehe auch Kapitel 2.9).



**Abb. 29: Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein in verschiedenen Dosierungen**

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

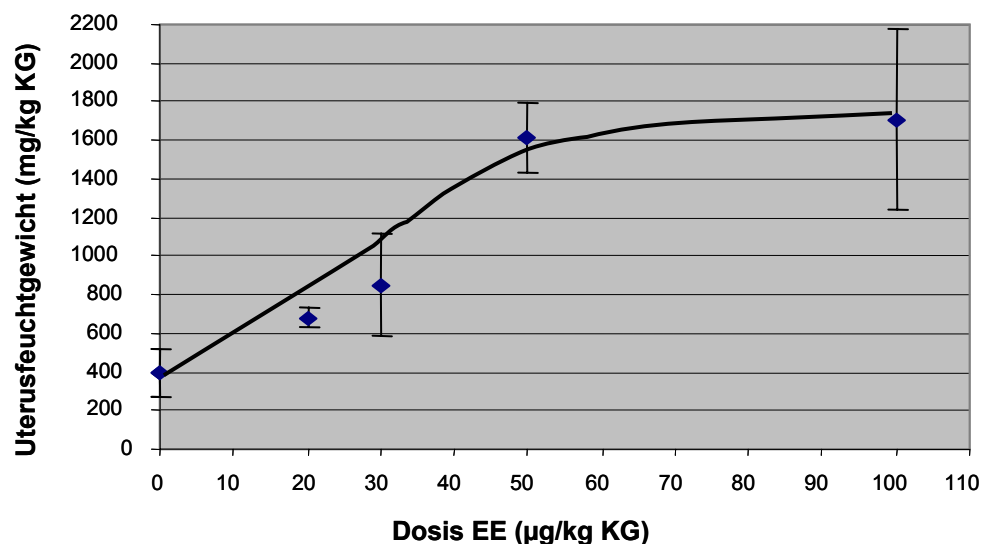
\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Die Abbildung zeigt eine dosisabhängige Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes nach der Behandlung der Tiere mit EE. Alle drei eingesetzten Konzentrationen

bewirken eine hochsignifikante (bzw. EE 100 sehr hochsignifikante) Zunahme des Uterusgewichtes gegenüber der Kontrollgruppe.

Genistein weist deutlich schwächere Wirkungen auf den Parameter Uterusfeuchtgewicht aus. Eine Dosisabhängigkeit lässt sich kaum erkennen. Jedoch zeigt sich auch hier eine hochsignifikante Zunahme des Messparameters bei Dosierungen von 25 und 50 mg/kg KG Genistein gegenüber der Kontrollgruppe und eine sehr hochsignifikante Zunahme bei 100 mg/kg KG.

Für EE konnte durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve die Konzentration mit der halbmaximalen Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes herausgefunden werden. Dies stellte eine wichtige Voraussetzung für die späteren Kombinationsversuche dar (siehe auch Kapitel 4.2.4).



**Abb. 30: Dosis-Wirkungskurve für die Induktion des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach p. o. Applikation von Lösungsmittel und von EE (20, 30, 50 und 100 µg/kg KG)**  
 $\bar{x} \pm s, n \geq 6$

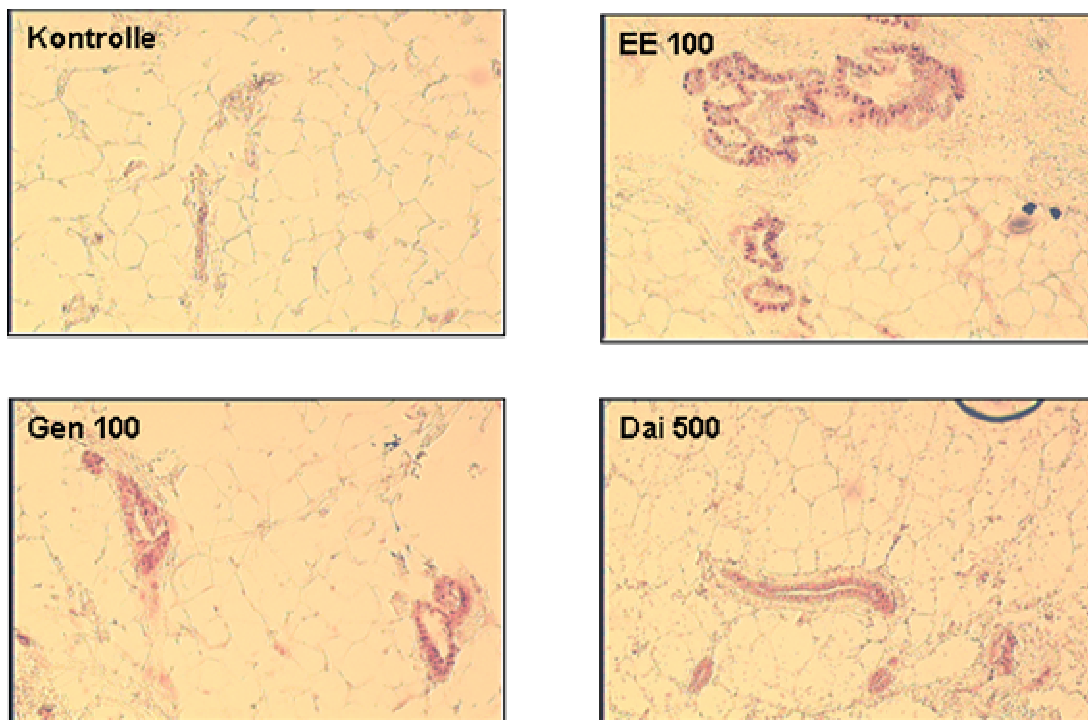
Abbildung 30 zeigt, dass nach der Applikation von ca. 30 µg/kg KG EE das Uterusfeuchtgewicht von weiblichen ovariectomierten Wistar Ratten halbmaximal stimuliert ist.

#### 4.2.2 Analyse der Expression und Lokalisation des Progesteronrezeptors in Mammagewebe von Da/Han Ratten nach Applikation der Untersuchungssubstanzen

Die immunhistochemische Untersuchung des Brustdrüsengewebes liefert Auskünfte über die Expression und Lokalisation des Progesteronrezeptors.

Abbildung 31 zeigt die Expression und Lokalisation des PRs in Brustdrüsengewebe untersuchter Da/Han Ratten nach dreitägiger peroraler Behandlung mit Ethinylestradiol (100 µg/kg KG), Genistein (100 mg/kg KG) und Daidzein (500 mg/kg KG) in der jeweils höchsten Dosierung.

Hierbei wird eine deutliche Zunahme der immunhistochemischen Färbung in den Brustdrüsengängen der Tiere nach der Behandlung mit EE ersichtlich. Auch die Behandlung mit Genistein und Daidzein zeigt gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Propylenglykol) estrogenartige Expressionsveränderungen.



**Abb. 31: Expression des Progesteronrezeptors im Brustdrüsengewebe von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE, Genistein und Daidzein**  
Vergrößerung 250x

#### **4.2.3 Vergleich der estrogenen Wirkstärke der Untersuchungssubstanzen in verschiedenen Rattenstämmen**

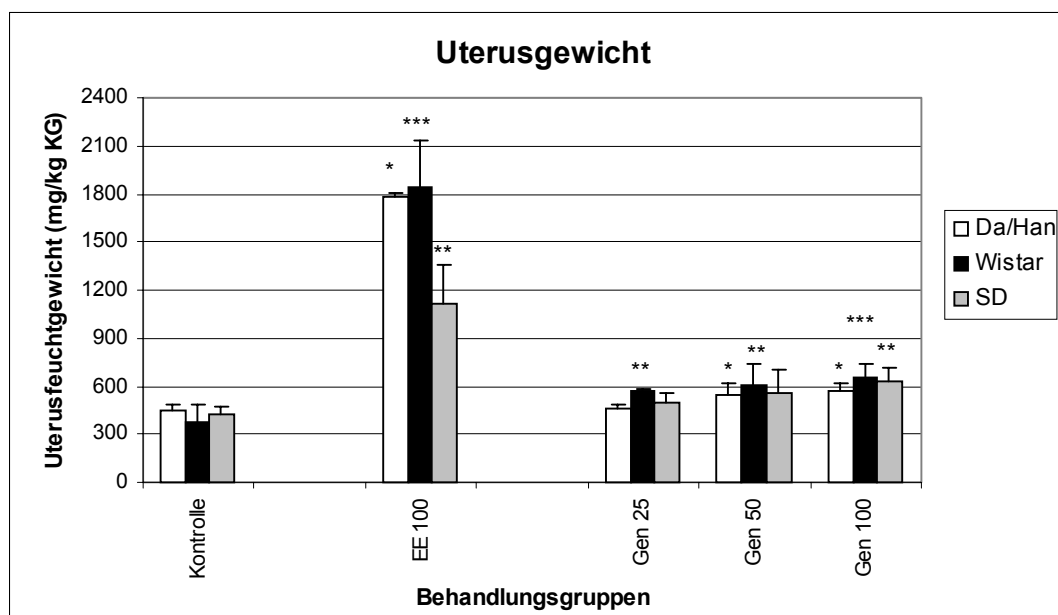
Basierend auf den Ergebnissen der oben beschriebenen Untersuchungen sollte im folgenden Versuch überprüft werden, ob es bei Ratten verschiedener Stämme Unterschiede in der Ansprechrate gegenüber estrogenen Substanzen gibt.

Tiere der Stämme Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) wurden mit Ethinylestradiol (20, 50, 100 µg/kg KG) und Genistein (25, 50, 100 mg/kg KG) für die

Dauer von drei Tagen peroral behandelt. Untersuchungsparameter für die estrogenische Wirkung der Substanzen waren das Uterusfeuchtgewicht sowie die Uterus- und Vaginalepithelhöhen.

In den Abbildungen 32, 34 und 36 sind die Uterusfeuchtgewichte, die Uterusepithelhöhen sowie die Vaginalepithelhöhen der einzelnen Rattenstämme zusammengefasst in jeweils einem Diagramm graphisch dargestellt. Für die Parameter Uterusepithelhöhe und Vaginalepithelhöhe wurden die Behandlungsgruppen mit den höchsten Dosierungen (EE 100 µg/kg KG, Gen 100 mg/kg KG) gewählt, da hier die stärksten Effekte zu erwarten waren.

Die Abbildungen 33 und 35 zeigen jeweils exemplarisch die Anfärbung des Uterusepithels mittels Azan- und des Vaginalepithels mittels Scott-Färbung eines Tieres des Stammes Da/Han.



**Abb. 32: Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein**

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

\* signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ;

\*\*\*  $p < 0,001$ )

Bei Betrachtung des Parameters Uterusfeuchtgewicht sind leichte Unterschiede bezüglich der Sensitivität der einzelnen Stämme beim Vergleich der Intensitäten der uterotrophen Wirkung in Relation zu der jeweiligen Kontrolle zu erkennen. Sprague-Dawley Ratten reagieren nach EE-Behandlung mit einer etwas geringeren Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes als die beiden anderen Stämme, wohingegen die Effekte nach Applikation von Genistein vergleichbar sind. Alle drei

Stämme zeigen nach Applikation von EE 100 µg/kg KG und Gen 100 mg/kg KG zumindest signifikante Effekte gegenüber der Kontrolle.

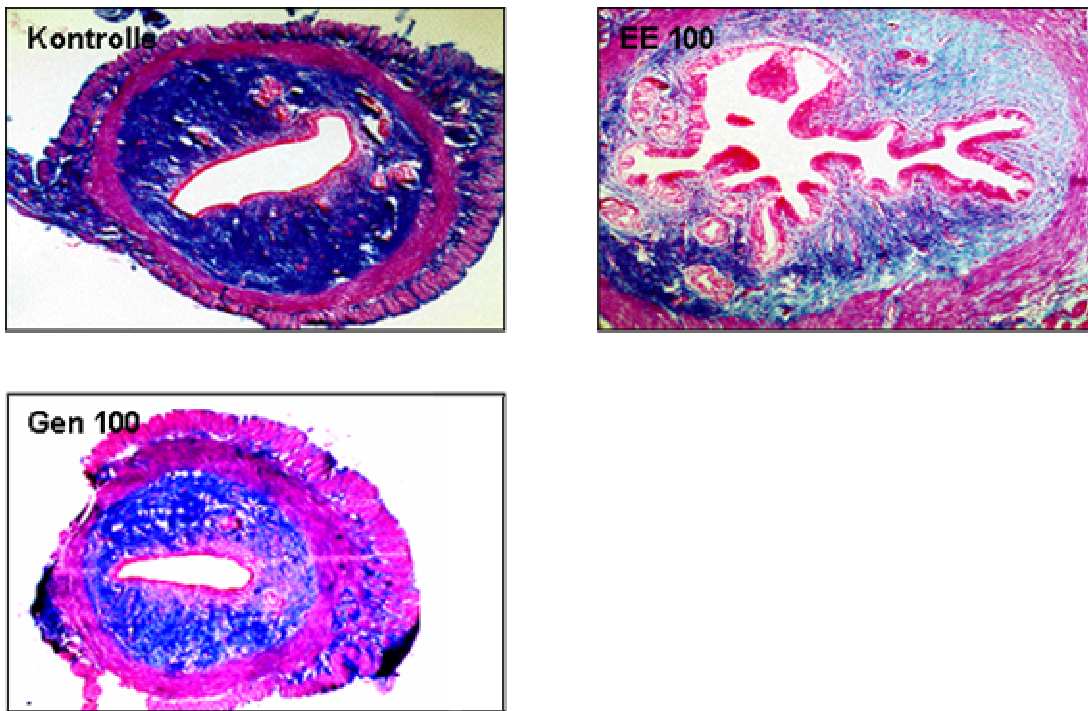


Abb. 33: Histologische Analyse der Uterusepithelhöhen von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE und Genistein mittels Azanfärbung  
Vergrößerung 250x

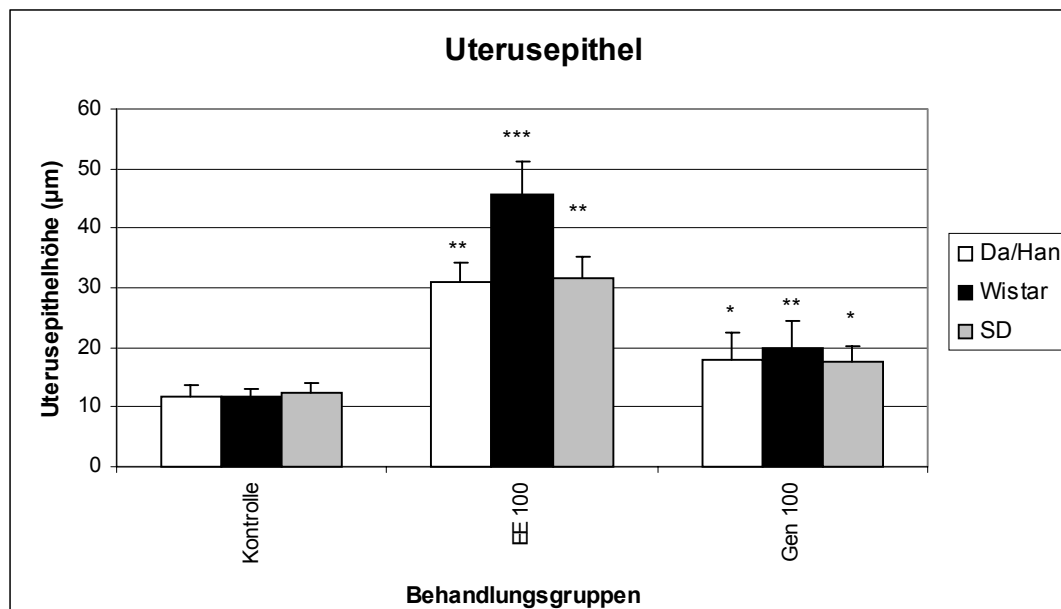
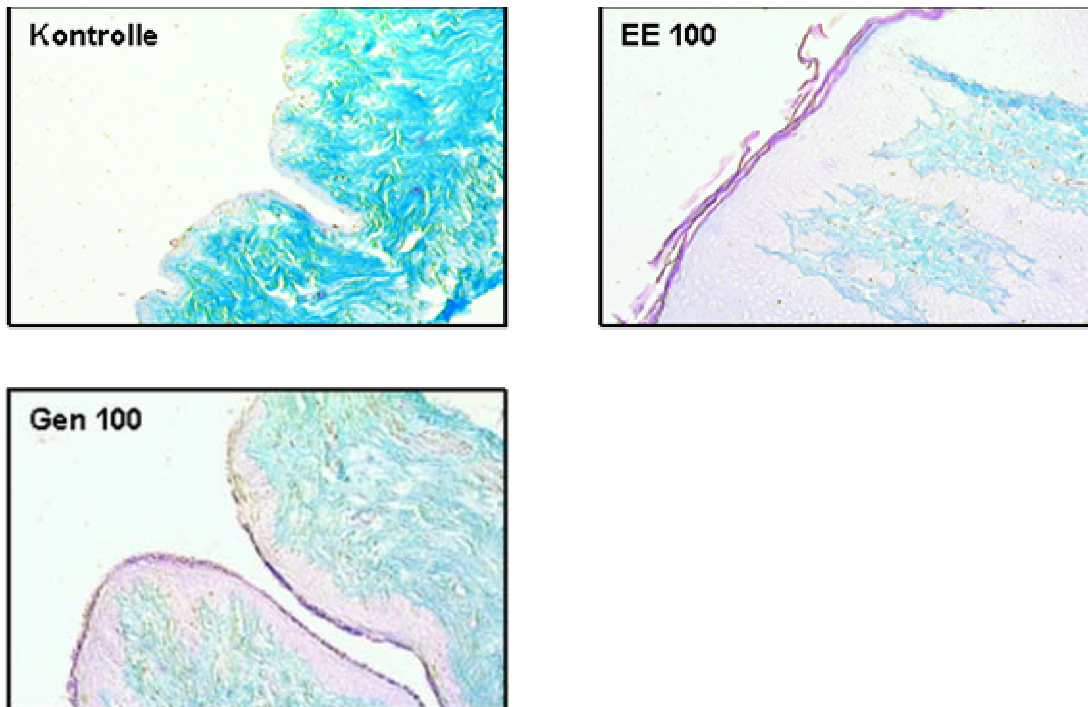


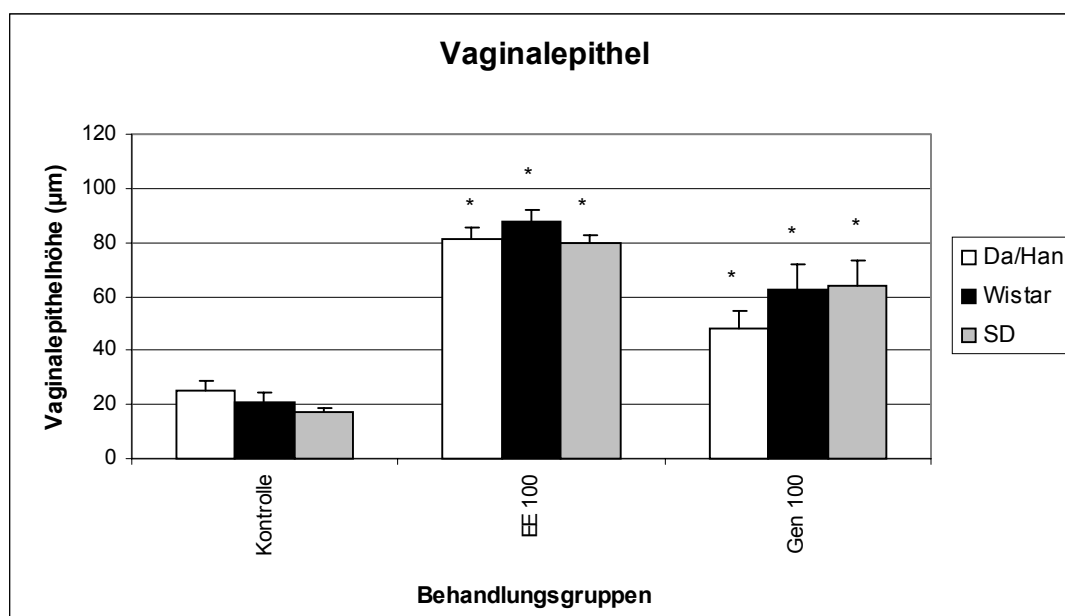
Abb. 34: Stimulation der Uterusepithelhöhen in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein

$\bar{x} \pm s, n \geq 6$

\* signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )



**Abb. 35: Histologische Analyse der Vaginalepithelhöhen von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE und Genistein mittels Scottfärbung**  
Vergrößerung 80x



**Abb. 36: Stimulation der Vaginalepithelhöhen in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein**

$\bar{x} \pm s, n \geq 6$

\* signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (\*  $p < 0,05$ )

Bei den Parametern Uterusepithelhöhe und Vaginalepithelhöhe reagieren Tiere des Stammes Wistar auf die Gabe von EE mit einer etwas stärkeren Zunahme der Epithelhöhen im Vergleich zu Tieren der Stämme Da/Han und Sprague-Dawley.

Bei der Reaktion der Rattenstämme auf die Gabe von Genistein sind auch hier keine nennenswerten Unterschiede festzustellen. In allen drei Stämmen kommt es zu einer zumindest signifikanten Zunahme der beiden Epithelhöhen im Vergleich zur Kontrollgruppe - sowohl nach Applikation von EE als auch nach Genisteingabe.

#### 4.2.4 Untersuchungen von Kombinationswirkungen in Wistar Ratten

Ein weiterer Aspekt zur Beurteilung der Eigenschaften von Phytoestrogenen ist die Kombinationswirkung bei gleichzeitiger Gabe mit natürlichen oder synthetischen Estrogenen.

Zur Überprüfung möglicher agonistischer oder antagonistischer Eigenschaften der Untersuchungssubstanzen wurden weibliche ovariectomierte Wistar Ratten für drei Tage mit verschiedenen Kombinationen dieser peroral behandelt.

Die eingesetzten Dosierungen der Substanzen werden in Kapitel 2.9 erläutert. Sie sind in Tabelle 13 noch einmal zusammengefasst dargestellt.

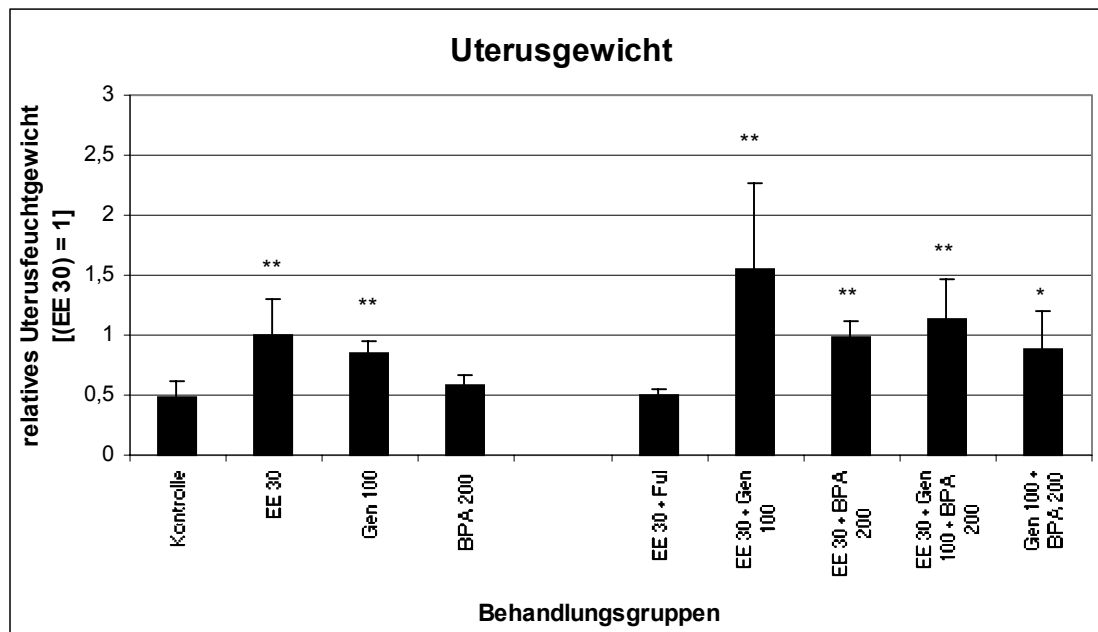
EE (30 µg/kg KG)
EE (30 µg/kg KG) + Ful (3 mg/kg KG)
EE (30 µg/kg KG) + Gen (100 mg/kg KG)
EE (30 µg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)
EE (30 µg/kg KG) + Gen (100 mg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)
Gen (100 mg/kg KG) + BPA (200 mg/kg KG)

**Tab. 13: Eingesetzte Kombinationen des synthetischen Estrogens Ethinylestradiol, des Phytoestrogens Genistein, der Industriechemikalie Bisphenol A und des Antiestrogens Fulvestrant bei dreitägiger Behandlung (p. o.) von Wistar Ratten**

Als Untersuchungsparameter wurden auch in diesem Versuchsteil das Uterusfeuchtgewicht, die Uterus- und die Vaginalepithelhöhen sowie die Expression der estrogensensitiven Gene Komplement C3 und Clusterin auf mRNA-Ebene im Uterus analysiert.

Abbildung 37 zeigt nun zunächst den Messparameter Uterusfeuchtgewicht. Für die Auswertung der Gewichte wurde zur vereinfachten Darstellung auf die mit EE (30 µg/kg KG) erzielten relativen Uterusfeuchtgewichte normiert.





**Abb. 37: Relative Uterusfeuchtgewichte von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**

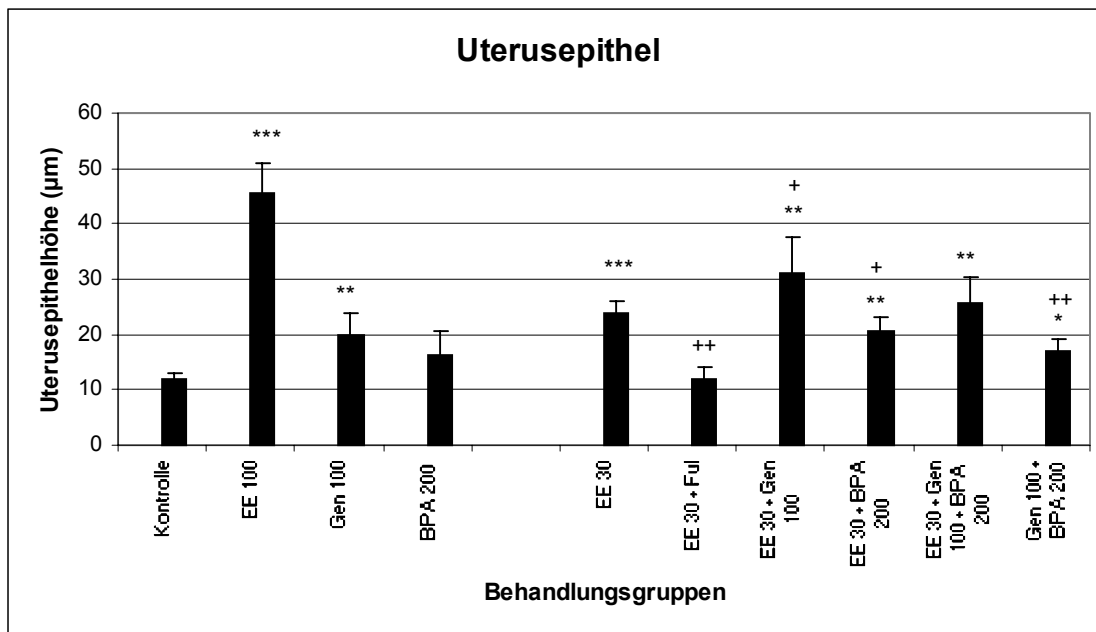
Zum direkten Vergleich wurde EE (30 µg/kg KG) gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet.

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Aus der Abbildung wird ersichtlich, dass nach der Gabe von EE im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle eine Erhöhung des Uterusgewichtes etwa um den Faktor zwei eintritt. Die Kombination von EE mit dem Antiestrogen Fulvestrant bewirkt eine vollständige Antagonisierung der EE-Wirkung, so dass sich dieser Messwert nicht von dem Kontrollwert unterscheidet.

Die gleichzeitige Gabe von EE und Genistein führt scheinbar zu rein additiven Effekten, eine Potenzierung ist nicht zu erkennen. Allerdings ist es schwierig, aufgrund der großen Streubreite der Messwerte eine genaue Aussage zu treffen. Betrachtet man die Werte für EE kombiniert mit Bisphenol A, so erkennt man keine Steigerung der uterotrophen Wirkung von EE. Die Dreierkombination aus EE, Genistein und Bisphenol A zeigt höchstens eine additive Wirkung wie sie schon bei der Kombination aus EE und Genistein zu erkennen war. Die gleichzeitige Applikation von Genistein mit Bisphenol A unterscheidet sich kaum von der alleinigen Genisteingabe.



**Abb. 38: Uterusepithelhöhen von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

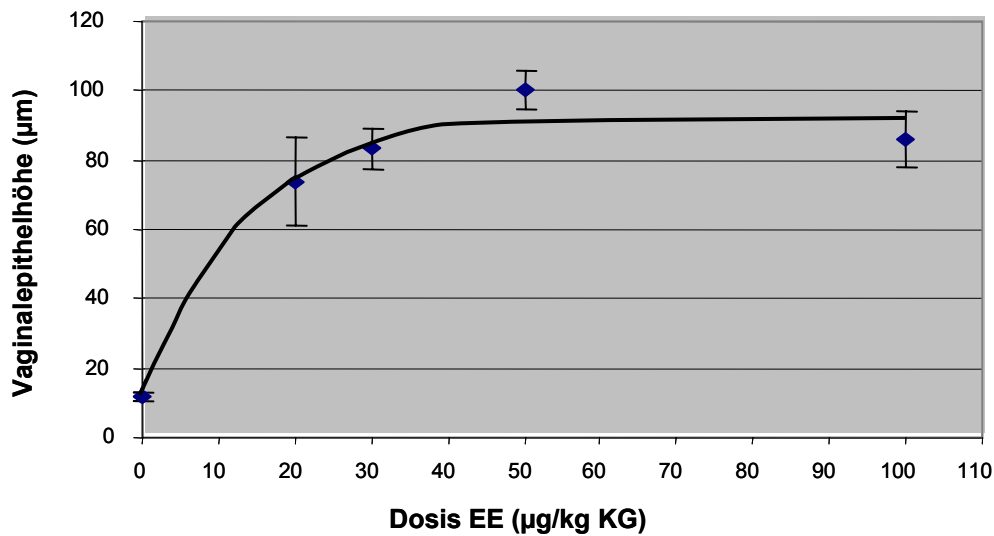
+ Kombinationen signifikant gegen EE 30 (+  $p < 0,05$ ; ++  $p < 0,01$ )

Der Untersuchungsparameter Uterusepithelhöhe liefert für die Einzelsubstanzen die bereits bekannten estrogenen Effekte (vergleiche Abb. 34). Bisphenol A zeigt nur einen sehr geringen und nicht signifikanten Einfluss auf die Uterusepithelhöhe. Durch die gleichzeitige Verabreichung von EE mit Fulvestrant kommt es auch bei diesem Untersuchungsparameter zu einer vollständigen Aufhebung der EE-Wirkung. Die Kombination von EE mit Genistein ergibt ebenso wie beim Uterusfeuchtgewicht rein additive Effekte.

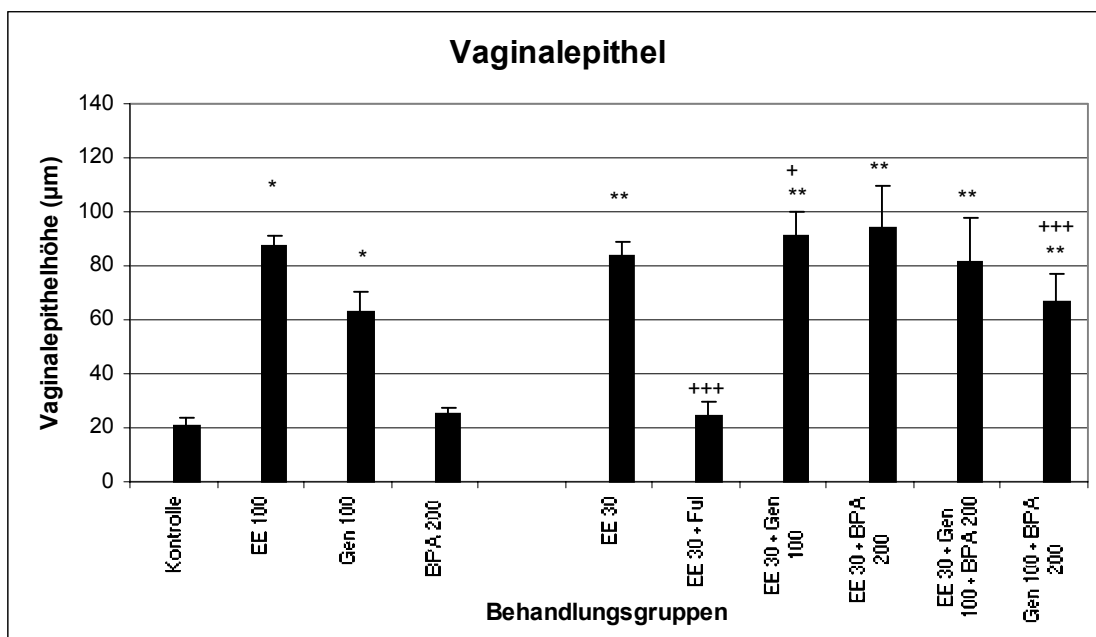
Allerdings zeigt sich nach der kombinierten Gabe von EE und Bisphenol A bei der Analyse des Uterusepithels eine schwache, aber statistisch signifikante antagonistische Wirkung von Bisphenol A im Vergleich zu der EE 30 Gruppe. Auch bei der gleichzeitigen Verabreichung von Genistein und Bisphenol A ist eine statistisch signifikante Abnahme der Epithelhöhe gegenüber der EE 30 Gruppe auszumachen.

Als weiterer Endpunkt der estrogenen Wirkung wurde die Vaginalepithelhöhe der Tiere nach Substanzgabe ausgewertet. Die Dosis-Wirkungskurve für EE in Abbildung 39 zeigt, dass bereits nach der Gabe von 30 µg/kg KG eine vergleichbare

Stimulation des Vaginalepithels wie nach der Verabreichung von 100 µg/kg KG zu erkennen ist.



**Abb. 39: Dosis-Wirkungskurve für die Induktion der Vaginalepithelhöhe von Wistar Ratten nach p. o. Applikation von Lösungsmittel und von EE (20, 30, 50 und 100 µg/kg KG)**  
 $\bar{x} \pm s, n \geq 6$



**Abb. 40: Vaginalepithelhöhen von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
 $\bar{x} \pm s, n \geq 6$   
 \* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )  
 + Kombinationen signifikant gegen EE 30 (+  $p < 0,05$ ; +++  $p < 0,001$ )

Abbildung 40 zeigt für die Substanzen EE und Genistein die bereits bekannten Einflüsse auf die Vaginalepithelhöhe (vergleiche Abb. 36). Bisphenol A übt auch

auf den Parameter Vaginalepithelhöhe nur einen sehr schwachen und nicht signifikanten Effekt aus.

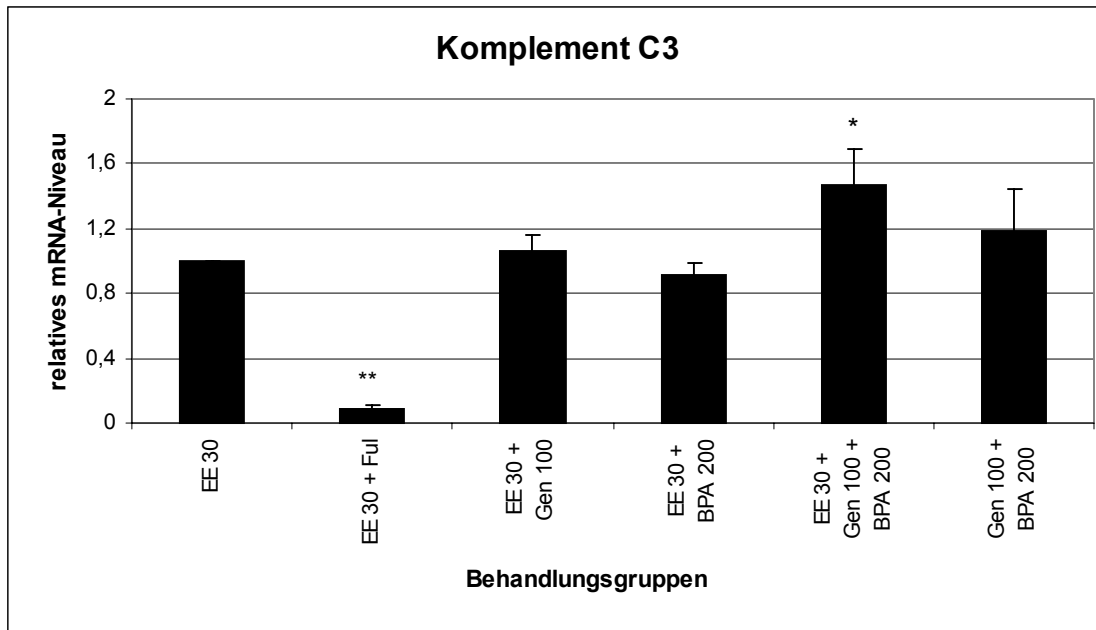
Bei allen eingesetzten Kombinationen mit 30 µg/kg KG EE (außer derjenigen mit Fulvestrant) wird die maximal mögliche Vaginalepithelhöhe erreicht (Abb. 40). Fulvestrant kompensiert auch bei diesem Messwert die EE-Wirkung komplett.

Die Kombination von Genistein mit Bisphenol A zeigt einen vergleichbaren Messwert für die Epithelhöhe wie nach alleiniger Gabe von Genistein. Diese Kombination kann in Einklang mit den zuvor dargestellten Ergebnissen bestenfalls als schwach additiv angesehen werden, aber ebenso mit einer schwach antagonistischen Wirkung von Bisphenol A erklärt werden.

In den folgenden Abbildungen 41 und 42 sind die Auswertungen der relativen mRNA-Expressionen von Komplement C3 und Clusterin dargestellt. Bei beiden handelt es sich um estrogenregulierte Gene (siehe Kapitel 1.3.1 und 1.3.4).

Zur Analyse wurde das Gewebematerial von Tieren gleicher Behandlungsgruppen „gepoolt“ ( $n \geq 6$ ) - also zusammengefasst - und anschließend nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode präpariert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus mindestens drei voneinander unabhängigen PCR-Reaktionen pro cDNA-Synthese; es wurden mindestens zwei cDNA-Synthesen durchgeführt.

Versuchsbedingt standen keine unter identischen Bedingungen gewonnenen RNA-Proben nach Einzelgabe von Genistein (100 mg/kg KG) und Bisphenol A (200 mg/kg KG) für eine RT-PCR zur Verfügung.

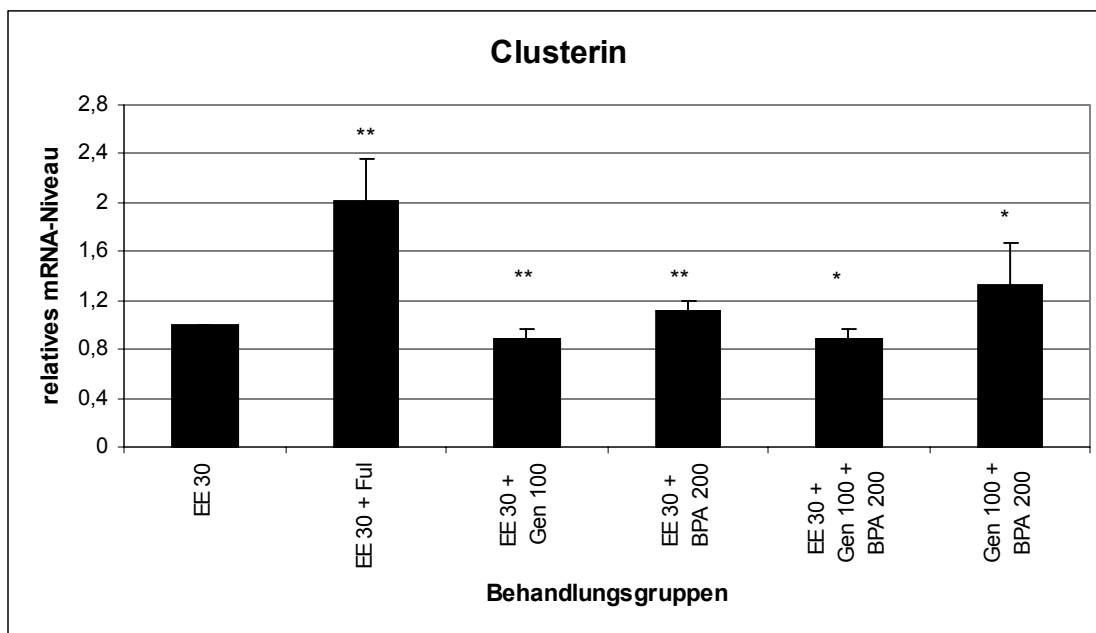


**Abb. 41: Relative uterine mRNA-Expression von Komplement C3 in Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**

Gezeigt sind die semiquantitativen densitometrischen Evaluationen der PCR-Produkte.

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

EE 30 wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen EE 30 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )



**Abb. 42: Relative uterine mRNA-Expression von Clusterin in Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**

Gezeigt sind die semiquantitativen densitometrischen Evaluationen der PCR-Produkte.

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

EE 30 wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen EE 30 (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Betrachtet man zunächst die Ergebnisse für Komplement C3 (Abb. 41), so bewirkt die Behandlung der Tiere mit EE und Fulvestrant die erwartete starke Reprimierung des Gens auf mRNA-Ebene.

Die Kombination von EE mit Genistein zeigt tendenziell eine sehr schwache Verstärkung der Genexpression, wohingegen bei der Kombination von EE mit Bisphenol A eher eine sehr leichte Abschwächung festzustellen ist. Allerdings sind beide gemessenen Effekte nicht signifikant gegenüber der EE 30 Gruppe. Die gleichzeitige Gabe aller drei Substanzen (EE, Gen, BPA) resultiert in einer signifikanten Zunahme der Genexpression. Bei Kombination von Genistein mit Bisphenol A wird eine leicht verstärkte Expression gegenüber der alleinigen Gabe von EE erreicht, allerdings ist auch dieser gemessene Effekt nicht signifikant.

Die Genexpression von Clusterin (Abb. 42) zeigt ein umgekehrtes Bild. Da Clusterin durch Estrogengabe auf mRNA-Ebene reprimiert wird, bewirkt die kombinierte Gabe von EE und Fulvestrant eine starke Zunahme der Clusterin Expression.

Genistein und Bisphenol A verhalten sich wie schon bei Komplement C3 beobachtet. Genistein führt hier zu einer leicht abgeschwächten Genexpression, während Bisphenol A diese leicht verstärkt. Beide gemessenen Effekte sind hochsignifikant. Bei der Dreierkombination (EE, Gen, BPA) wird der Effekt, der nach alleiniger Verabreichung von EE beobachtet wird, ebenfalls schwach verstärkt, jedoch nicht stärker als nach Kombination von EE mit Genistein alleine.

Die Gabe von Genistein und Bisphenol A führt im Gegensatz zur Expression von Komplement C3 bei Clusterin eher zu einer schwach antagonistischen Wirkung im Vergleich zu der Positivkontrolle (EE 30) und zu der Antagonisierungsgruppe (EE + Ful). In diesem Fall wird die EE-Wirkung nicht übertroffen.

Abschließend bleibt festzustellen, dass auch die untersuchten Veränderungen der Genexpression von Komplement C3 und Clusterin trotz ihrer hohen Sensitivität gegenüber einer Estrogenwirkung keine grundsätzlich anderen Effekte aufzeigen als die übrigen Parameter.

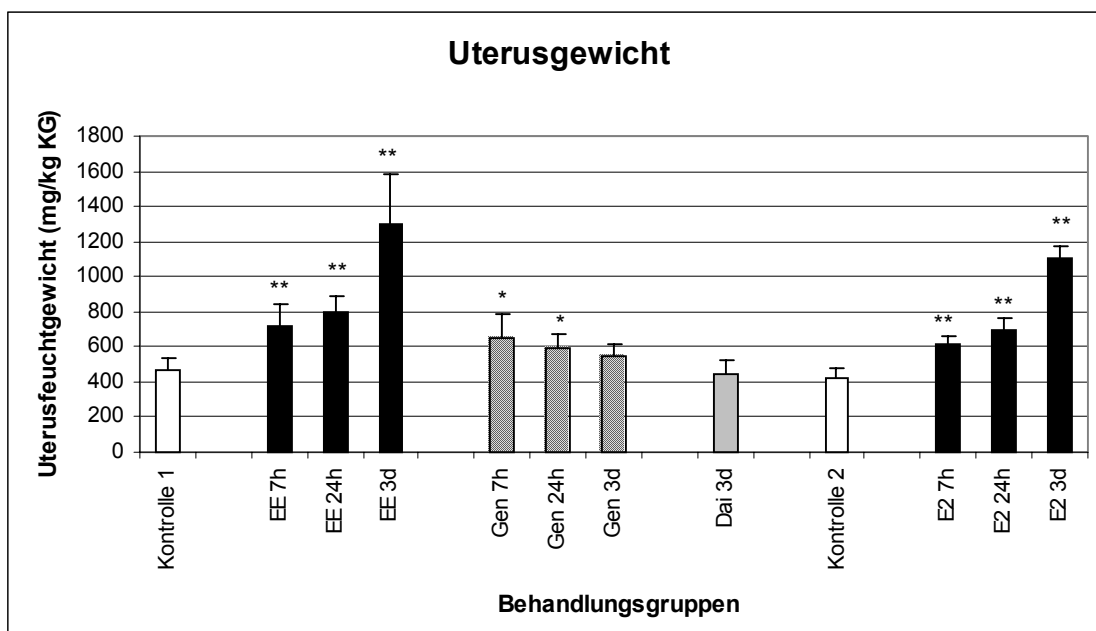
#### 4.2.5 Analyse einer möglichen Organselektivität der Phytoestrogene

Nachdem in den vorhergegangenen Versuchen die Fragen nach einer generellen Wirkung der Phytoestrogene auf estrogensensitive Parameter sowie agonistische bzw. antagonistische Effekte untersucht wurden, sollte im nun folgenden Versuchsteil die Frage zur möglichen Organselektivität und zur Zeitabhängigkeit der Phytoestrogenwirkung beantwortet werden.

Weibliche ovariectomized Wistar Ratten wurden mit Ethinylestradiol (3 µg/kg KG), 17β-Estradiol (3 µg/kg KG), Genistein (10 mg/kg KG), Daidzein (40 mg/kg KG) sowie mit dem Lösungsmittel (8 % Ethanol, 20 % DMSO, 72 % Erdnussöl) als Kontrolle subkutan behandelt. Es wurde eine einmalige Applikation der Substanzen mit anschließender Tötung der Tiere nach 7 bzw. 24 Stunden gewählt. Ergänzend dazu wurden Tiere über 3 Tage mit den Untersuchungssubstanzen behandelt und ca. 24 Stunden nach der letzten Applikation getötet.

Versuchsbedingt wurde diese Untersuchung in zwei Abschnitte geteilt, so dass in den abgebildeten Diagrammen jeweils zwei Kontrollen dargestellt sind.

Die folgende Abbildung zeigt den Einfluss der Substanzen auf das Uterusfeuchtgewicht von Wistar Ratten.



**Abb. 43: Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen EE, E<sub>2</sub>, Genistein und Daidzein**

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

\* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ )

Aus Abbildung 43 wird eine hochsignifikante Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes nach Applikation von EE und E<sub>2</sub> ersichtlich. Diese Zunahme erfolgt zeitabhängig (Vergleich 7 und 24 Stunden) und ist nach der dreimaligen Applikation der Substanzen am stärksten. Die Effekte des synthetischen Hormons übersteigen die des natürlichen leicht.

Genistein induziert eine sehr rasche, allerdings nicht langfristige Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes (Vergleich 7 und 24 Stunden). Diese Gewichtszunahmen sind gegenüber der Kontrollgruppe allerdings signifikant. Eine dreitägige Applikation von Genistein bewirkt - im Gegensatz zu EE und E<sub>2</sub> - keine weitere Stimulation dieses Messparameters; hierbei ist im Gegenteil sogar eine Abnahme des Uterusfeuchtgewichtes zu beobachten. Daidzein zeigt nach der dreitägigen Verabreichung keine signifikante Änderung des Uterusfeuchtgewichtes gegenüber der Kontrolle.

Im Anschluss an die Analyse des Uterusfeuchtgewichtes soll nun der Einfluss der Substanzen auf das mRNA-Niveau verschiedener Gene in Mamma, Uterus und *Vena cava* vorgestellt werden.

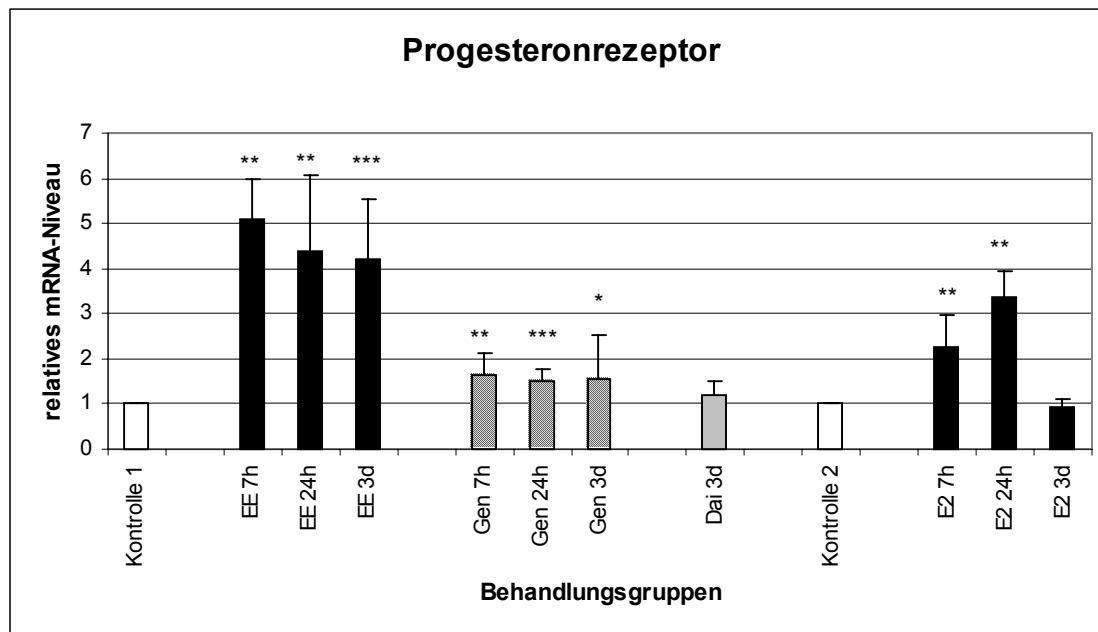
#### **4.2.5.1 Genexpression des Progesteronrezeptors und von Cyclin D1 in der Mamma**

Das Brustdrüsengewebe der weiblichen Tiere wurde hinsichtlich der Expression des **Progesteronrezeptors** nach der Methode der semiquantitativen RT-PCR untersucht.

Hierzu wurde das Gewebematerial von Tieren gleicher Behandlungsgruppen „gepoolt“ und anschließend nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode präpariert.

Abbildung 44 zeigt die Ergebnisse aus mindestens drei PCR-Reaktionen pro cDNA-Synthese; es wurden mindestens zwei Synthesen pro Probe durchgeführt.





**Abb. 44: Relative mRNA-Expression des Progesteronrezeptors im Brustdrüsengewebe von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**

$x \pm s$ ,  $n \geq 6$

Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, resultiert die Behandlung mit dem synthetischen Ethinylestradiol in einer sehr raschen und sehr starken Zunahme des relativen mRNA-Niveaus des PRs in der Mamma. Die Effekte sind zu allen drei untersuchten Zeitpunkten hoch- bzw. sehr hochsignifikant. Eine Zeitabhängigkeit der Wirkung ist allerdings aufgrund der großen Streuung der Messwerte nicht zu erkennen.

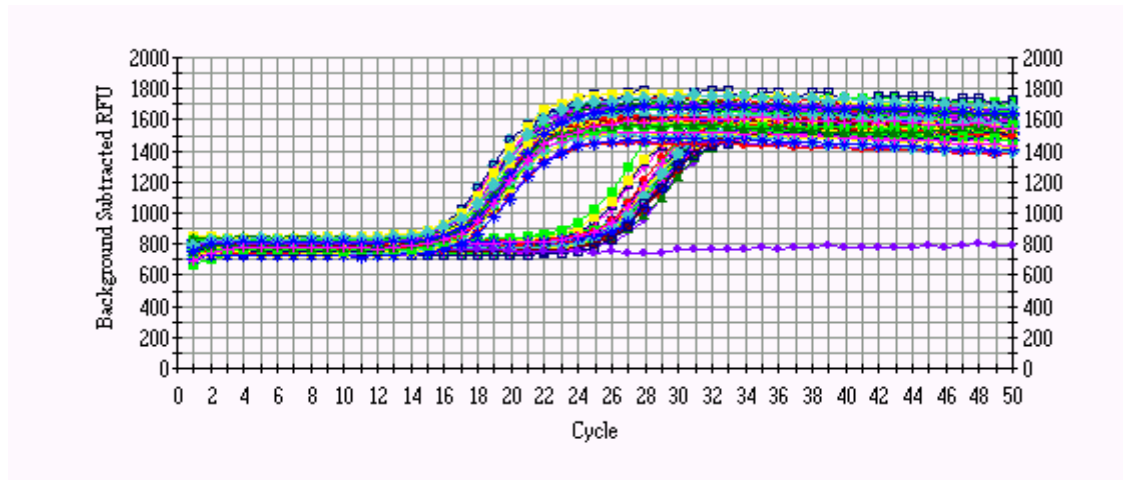
Der Effekt des natürlichen Hormons  $17\beta$ -Estradiol fällt im Vergleich zu EE deutlich schwächer aus und erreicht nach drei Tagen wieder den Ausgangswert der Kontrollgruppe.

Genistein bewirkt ebenfalls eine - wenn auch deutlich schwächere - Zunahme des PRs im Brustdrüsengewebe, die zu allen drei Zeitpunkten zumindest signifikant ist. Eine Zeitabhängigkeit der Genisteinwirkung ist nicht auszumachen. Daidzein zeigt eine schwache, jedoch nicht signifikante Zunahme des relativen mRNA-Niveaus des PRs in der Mamma.

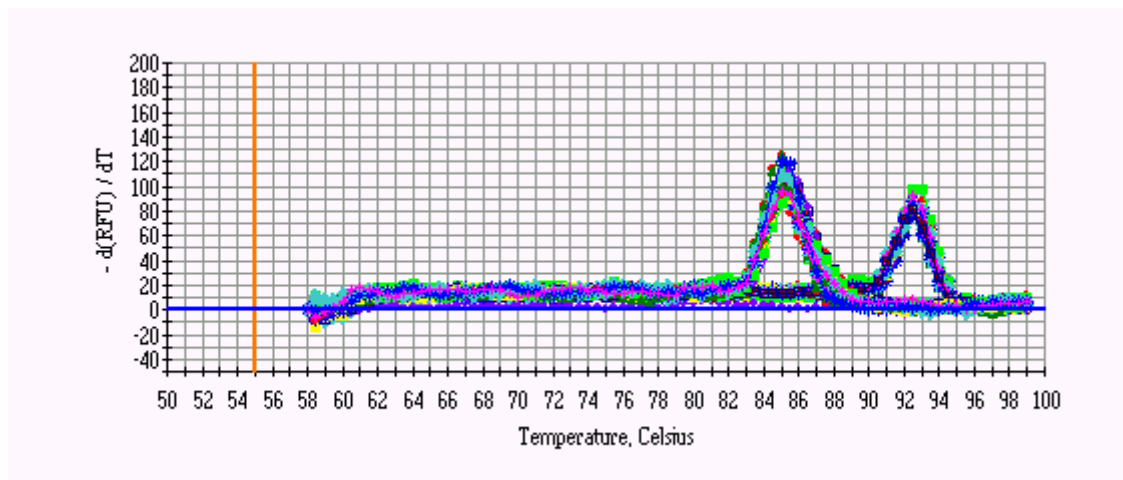
Die relative mRNA-Expression von **Cyclin D1** wurde im Brustdrüsengewebe mittels *Real-Time* PCR analysiert. Abbildung 45 zeigt exemplarisch ein Diagramm, das der iCycler zeitgleich schon während der PCR liefert. Hierbei wird die Zyklen-

zahl gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Aus dem Diagramm wird der *Threshold Cycle* ersichtlich, der für die weitere Berechnung der Genexpression von großer Bedeutung ist (siehe Kapitel 3.2.6.2).

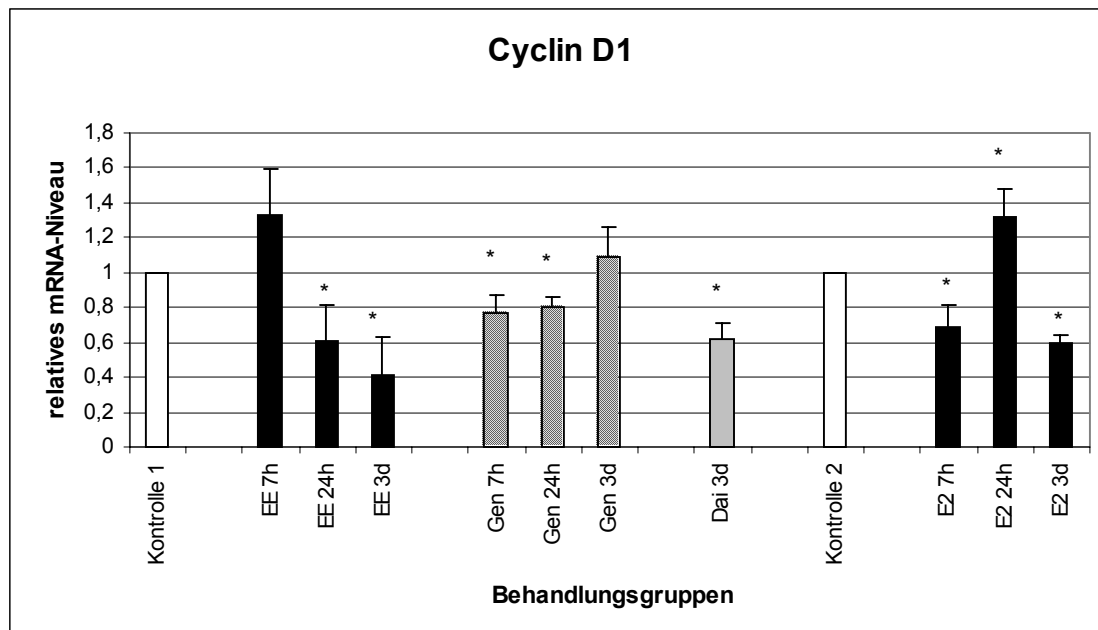
In Abbildung 46 ist exemplarisch eine Schmelzkurve dargestellt. Diese dient in erster Linie zur Qualitätsüberprüfung der in der PCR gebildeten Produkte. In beiden Abbildungen sind die einzelnen Proben in unterschiedlichen Farben dargestellt. Zu erkennen sind jeweils die Werte für zwei verschiedene Gene (1A und CD1).



**Abb. 45: Exemplarische Darstellung einer *Real-Time* PCR im iCycler zur Untersuchung der relativen mRNA-Expression von Cyclin D1 in der Mamma von Wistar Ratten**  
Als interner Standard diente die Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase (1A).



**Abb. 46: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve im Anschluss an eine *Real-Time* PCR im iCycler zur Untersuchung der relativen mRNA-Expression von Cyclin D1 in der Mamma von Wistar Ratten**  
Zu erkennen sind die Kurven für 1A und Cyclin D1.



**Abb. 47: Relative mRNA-Expression von Cyclin D1 im Brustdrüsengewebe von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels *Real-Time PCR* im *iCycler*  $x \pm s$ ,  $n \geq 6$**

Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ )

Bei Betrachtung der Abbildung 47 stellt man auf den ersten Blick deutliche Unterschiede in der Genexpression von Cyclin D1 nach Applikation von EE und  $E_2$  fest. Während es nach der Verabreichung von EE zunächst zu einer Zunahme der Expression nach 7 Stunden und dann zu einem zeitabhängigen, signifikanten Abfall kommt, bewirkt  $E_2$  diese Zunahme erst nach 24 Stunden. Nach 3 Tagen sinkt der gemessene Wert unter den 7-Stundenwert ab.

Genistein bewirkt nach 7 und 24 Stunden eine leichte, aber dennoch signifikante Reprimierung von Cyclin D1 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach 3 Tagen steigt der Wert wieder leicht an und erreicht in etwa den Kontrollwert. Daidzein zeigt nach 3 Tagen eine signifikante Reprimierung von Cyclin D1 auf mRNA-Ebene ähnlich wie EE 24 h.

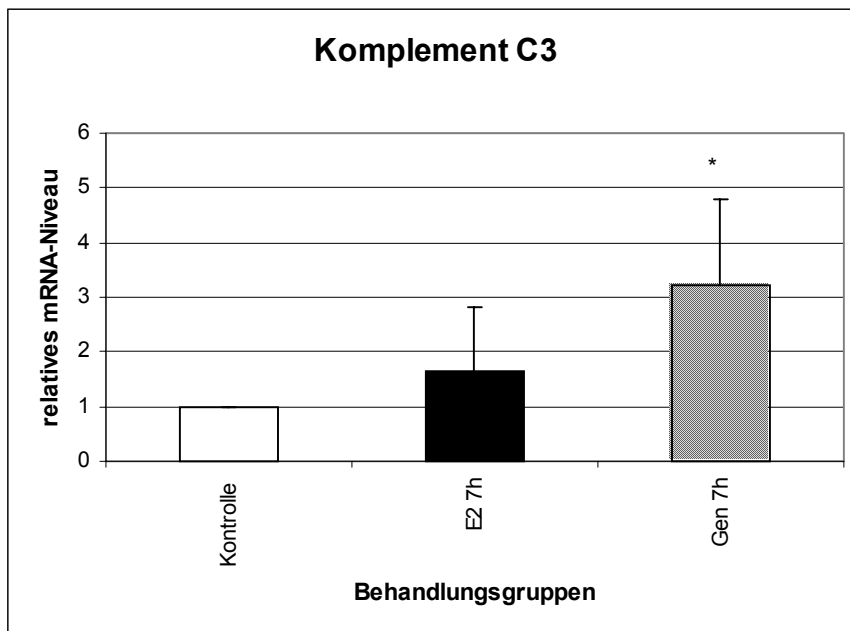
#### 4.2.5.2 Genexpression von Komplement C3 und der Cyclooxygenase-2 im Uterus

Das Material für die Untersuchung des Uterusgewebes stammte aus dem in Kapitel 2.9 beschriebenen Versuchsteil IV b und beinhaltete eine Kontrolle, eine  $E_2$ - und eine Genisteingruppe (jeweils 7 Stunden). Dieser Versuchsteil IV b war

notwendig, da die Ausbeute an mRNA aus verschiedenen Geweben sehr begrenzt ist und nicht zur Untersuchung mehrerer Gene ausreicht.

Zur Bestimmung der Genexpression mittels PCR wurde das Gewebematerial von Tieren gleicher Behandlungsgruppen „gepoolt“ und nach der in Kapitel 3.2.1 beschriebenen Methode präpariert.

In den beiden folgenden Abbildungen sind die Ergebnisse aus mindestens drei PCR-Reaktionen pro cDNA-Synthese dargestellt; es wurden mindestens zwei Synthesen pro Probe durchgeführt. Die Expression von Komplement C3 wurde mittels der *Real-Time* PCR analysiert und die der Cyclooxygenase-2 mithilfe der RT-PCR.



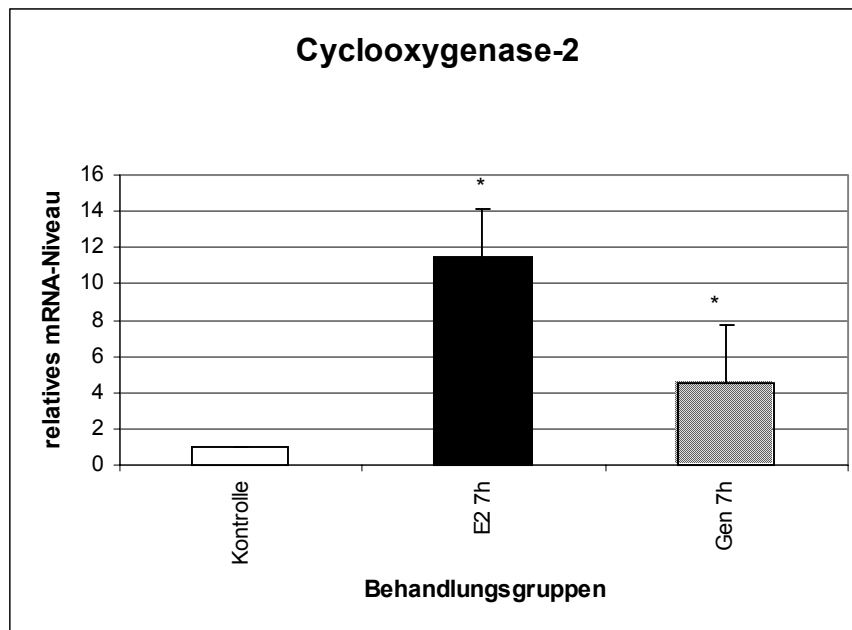
**Abb. 48: Relative mRNA-Expression von Komplement C3 im Uterus von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels *Real-Time* PCR im iCycler**

$x \pm s, n \geq 6$

Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ )

In Abbildung 48 ist eine leichte, jedoch aufgrund der großen Streuung der Messwerte nicht signifikante Zunahme der Expression von **Komplement C3** auf mRNA-Ebene 7 Stunden nach Behandlung mit E<sub>2</sub> zu erkennen.

Genistein führt nach 7 Stunden zu einer signifikanten Zunahme der Expression gegenüber der Kontrollgruppe.



**Abb. 49: Relative mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 im Uterus von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**  
 $x \pm s$ ,  $n \geq 6$

Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ )

Betrachtet man die Expression der **Cyclooxygenase-2** im Uterus (Abb. 49), so bewirkt  $E_2$  nach 7 Stunden eine sehr starke, signifikante Zunahme des Gens auf mRNA-Ebene.

Die Gabe von Genistein führt nach 7 Stunden zu einer gegenüber  $E_2$  zwar deutlich schwächeren, jedoch trotzdem signifikanten Zunahme der Cyclooxygenase-2 gegenüber der Kontrollgruppe.

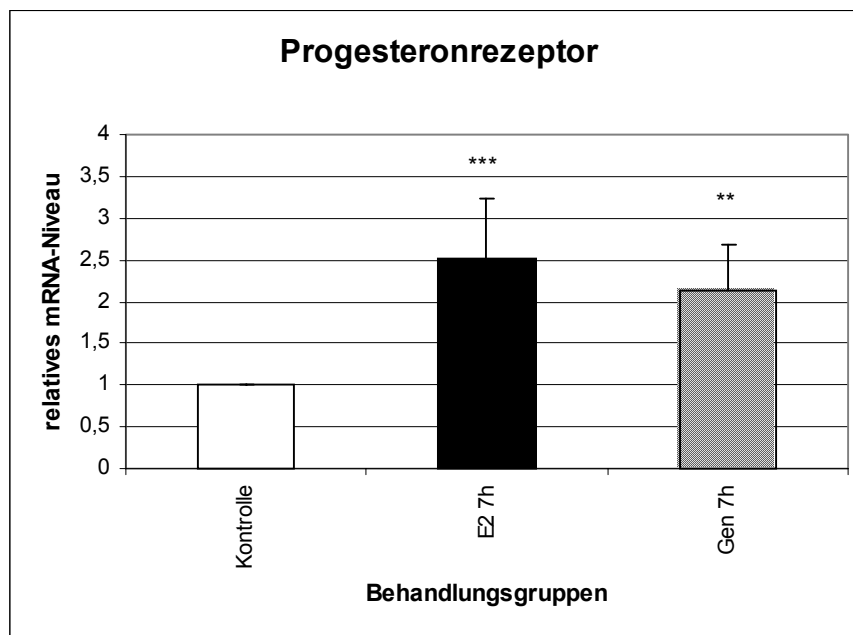
#### 4.2.5.3 Genexpression des Progesteronrezeptors und der Cyclooxygenase-2 in der *Vena cava*

Zusätzlich zu den Organen Mamma und Uterus, die als klassische Zielorgane für eine Estrogenwirkung gelten, wurde die Genexpression des Progesteronrezeptors und der Cyclooxygenase-2 in der *Vena cava* als Bestandteil des kardiovaskulären Systems und nicht direkt typischem Zielorgan für eine Estrogenwirkung untersucht.

Ebenso wie in den vorangegangenen Experimenten wurde auch in diesem Fall das Gewebematerial mehrerer Tiere gleicher Behandlungsgruppen „gepoolt“ und wie bereits oben erläutert weiter behandelt.

In Abbildung 50 sind zunächst die Ergebnisse des **Progesteronrezeptors** dargestellt. Die Proben für die Analyse stammten aus dem erwähnten nachgezogenen Versuch IV b, in dem lediglich die Kontrolle, 17 $\beta$ -Estradiol 7 Stunden und Genistein 7 Stunden eingesetzt wurden.

Sowohl die Applikation des natürlichen Estrogens E<sub>2</sub> als auch die Gabe von Genistein führen bereits nach 7 Stunden zu einer sehr hochsignifikanten bzw. hochsignifikanten Zunahme der Genexpression des PRs in der *Vena cava*.



**Abb. 50: Relative mRNA-Expression des Progesteronrezeptors in der *Vena cava* von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**

$\bar{x} \pm s$ ,  $n \geq 6$

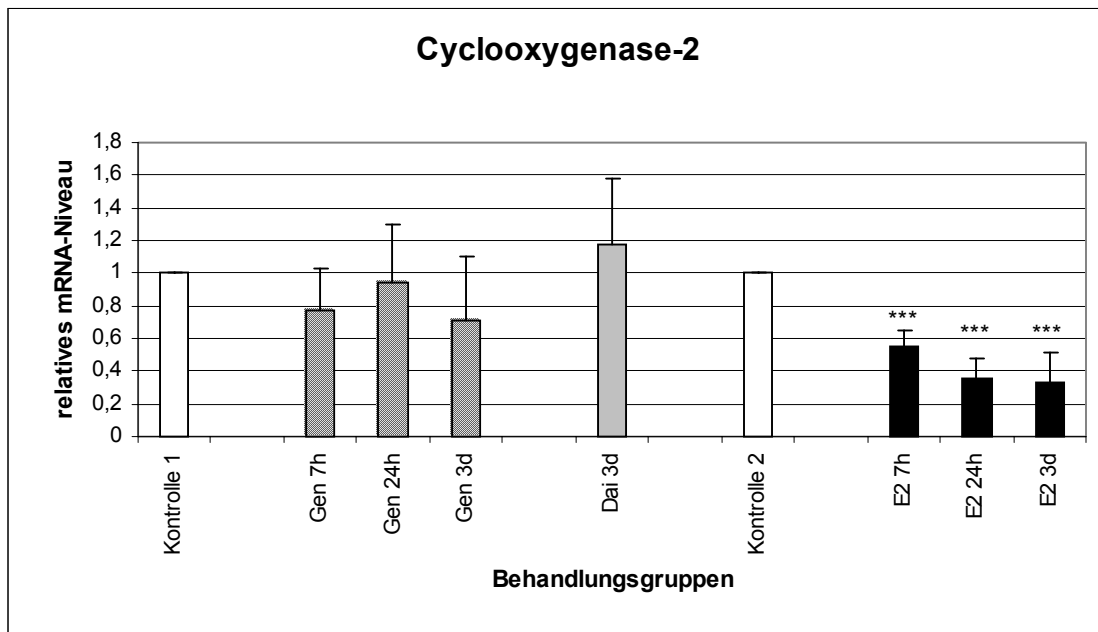
Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ )

Das Material zur Expressionsuntersuchung der **Cyclooxygenase-2** stammte aus dem Hauptversuch IV a. Versuchsbedingt stand kein Material der Behandlungsgruppen Ethinylestradiol 7 Stunden, 24 Stunden und 3 Tage zur Verfügung.

Betrachtet man die Genexpression der Cyclooxygenase-2 auf mRNA-Niveau in der *Vena cava* (Abb. 51), so stellt man eine deutliche zeitabhängige Reprimierung in den E<sub>2</sub>-Gruppen fest, die zu allen drei untersuchten Zeitpunkten sehr hochsignifikant ist.

Auch nach Behandlung mit Genistein kommt es bei allen drei Messwerten zu einer Abnahme der Expression der COX-2 in der *Vena cava*. Allerdings ist der beobachtete Effekt deutlich schwächer als in den E<sub>2</sub>-Gruppen. Lediglich die mit Daidzein

behandelte Gruppe zeigt eine Zunahme der Expression, allerdings ebenfalls sehr schwach und nicht signifikant.



**Abb. 51: Relative mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 in der Vena cava von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**

$x \pm s, n \geq 6$

Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*\*\*)  $p < 0,001$

## 5 DISKUSSION

Pharmakologische und toxikologische Wirkungen so genannter Phytoestrogene (Pflanzeninhaltsstoffe mit Affinität zum Estrogenrezeptor) sind Gegenstand intensiver Diskussionen unter Fachleuten und auch der Öffentlichkeit. Insgesamt wurden in den letzten Jahrzehnten mehr als 300 Verbindungen pflanzlichen Ursprungs identifiziert (Murkies *et al.*, 1998), die eine Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor aufweisen und damit in zellulären Systemen oder Organismen potentiell estrogenartige Reaktionen auslösen können.

Zu den wirkstärksten Verbindungen dieser Phytoestrogene sind die Isoflavonoide (z. B. Genistein und Daidzein) zu zählen. Auch wenn ihre Wirkstärke im Vergleich zu endogenen und synthetischen Estrogenen (z. B. 17 $\beta$ -Estradiol und Ethinyl-estradiol) deutlich schwächer ist, sei an dieser Stelle jedoch darauf verwiesen, dass nennenswerte Mengen dieser Substanzen sowohl im menschlichen Urin (Adlercreutz *et al.*, 1982) als auch in Gewebeproben (Olea *et al.*, 1999) und somit im Organismus nachweisbar sind.

Einschätzungen der Phytoestrogene umfassen ein sehr gegensätzliches Spektrum. So bezeichnete z. B. die EDSTAC (*Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee*) der US-Umweltbehörde EPA (*United States Environmental Protection Agency*) 1997 diese Substanzen mit dem Begriff „*Endocrine Disruptors*“ und definierte ihn folgendermaßen: „Unter einem in der Umwelt relevanten endokrinen Disruptor versteht man eine körperfremde Substanz, die mit der Synthese, der Ausscheidung, dem Transport, der Bindung, der Wirkung oder dem Abbau der natürlichen Hormone im Körper konkurriert, welche für die Aufrechterhaltung der physiologischen Körperfunktionen, die Fortpflanzung, die Entwicklung und/oder das Verhalten verantwortlich sind.“ Durch den Namen und die zitierte Definition wird somit eine mögliche schädigende Wirkung impliziert.

Im Gegensatz dazu finden jedoch phytoestrogenhaltige Produkte in zunehmendem Maße Einzug in die Regale von Apotheken, Reformhäusern und Drogeriemärkten und werden dort als „gesundheitsfördernd und frei von Nebenwirkungen“ angepriesen und sehr stark beworben. Auch vor der Nahrungsmittelindustrie macht der Einzug der Soja- und Rotkleeprodukte und den damit verbundenen postulierten positiven Effekten auf die Gesundheit nicht halt. Eine Vielzahl von Koch-



und Backrezepten zählen phytoestrogenhaltige Nahrungsmittel zu den Hauptbestandteilen, trotz einer bisher prinzipiell an Phytoestrogenen sehr armen Ernährung in unseren Breiten.

So beschrieben Setchell und Cassidy eine tägliche Aufnahme von unter 1 mg Isoflavonen in westlichen, im Gegensatz zu ca. 20 bis 40 mg in asiatischen Ländern (Setchell und Cassidy, 1999). Die höchsten Plasmakonzentrationen an Phytoestrogenen wurden bei Säuglingen ermittelt, die mit Babynahrung auf Sojabasis ernährt wurden. Säuglinge mit einer Milcheiweiß-Unverträglichkeit erhalten seit ca. 40 Jahren Ersatzdiäten auf der Basis von Sojamehl. Dabei resultieren aufgrund des hohen Verzehrs und des hohen Gehaltes an Phytoestrogenen Aufnahmemengen von 28 bis 47 mg Isoflavonen. Aufnahmemengen dieser Größenordnung konnten bislang nur bei erwachsenen Asiaten und Vegetariern gemessen werden. Dies bedeutet, dass bezogen auf das Körpergewicht die tägliche Dosis von 6 bis 9 mg/kg KG für solche Säuglinge um den Faktor 10 über der für Asiaten geschätzten Dosis lag. Die mittleren Plasmaspiegel aus der Summe der Substanzen Genistein, Daidzein und Equol betragen ca. 4 µM gegenüber einem Plasmaspiegel von 0,01 µM bei mit Kuhmilch ernährten oder gestillten Säuglingen (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000).

Obwohl inzwischen unter Fachleuten aufgrund von Beobachtungen in der Natur Einigkeit besteht, dass solche Stoffe in hohen Dosen in endokrine Regelkreise eingreifen und entwicklungs- und reproduktionsbiologische Effekte in verschiedenen Tierspezies und auch dem Menschen verursachen können (McLachlan und Newbold, 1987; Setchell *et al.*, 1987), herrscht in Bezug auf ihre positiven Effekte wie Schutz vor malignen (Rose *et al.*, 1986; Adlercreutz *et al.*, 1990 b) oder kardiovaskulären Erkrankungen sowie Osteoporose (Adlercreutz *et al.*, 1990 b; Adlercreutz und Mazur, 1997) Unklarheit, inwieweit solche Beobachtungen an verschiedenen Volksgruppen (z. B. Japanerinnen) tatsächlich auf estrogenartige Wirkungen der Substanzen zurückzuführen sind. Nach intensiven Untersuchungen der in Frage kommenden Phytoestrogene - wie den Isoflavonen und den Coumestanen - kennt man inzwischen auch antioxidative Effekte (Djuric *et al.*, 2001), hemmende Einflüsse auf die Angiogenese (Fotsis *et al.*, 1995) und Wirkungen auf verschiedene Enzyme (z. B. Topoisomerase II und Tyrosinkinase) (Boersma *et al.*, 2001) sowie eine induzierende Wirkung auf die Differenzierung von Krebszellen

(Cassidy, 1999). Es wird vermutet, dass die zuletzt genannten Eigenschaften unabhängig vom Estrogenrezeptor verlaufen.

Jedoch reichen diese bisher bekannten zell- und organspezifischen Wirkmechanismen für eine fundierte wissenschaftliche Bewertung der sehr heterogenen Klasse von Phytoestrogenen nicht aus.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte die molekulare Wirkweise der Phytoestrogene Genistein, Daidzein und Coumestrol auch im Hinblick auf mögliche agonistische bzw. antagonistische Wirkungen in Kombination mit dem natürlichen Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol analysiert werden.

Diese Fragestellung wurde zunächst *in vitro* in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durch Analyse der Proliferations- und Apoptoserate - bzw. allgemein formuliert durch Analyse der Zellzyklusphasen - durchflusszytometrisch untersucht. Als Referenzsubstanzen wurden das natürliche Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol und das reine Antiestrogen Fulvestrant eingesetzt. Fulvestrant zeigt weder *in vitro* noch *in vivo* estrogene Wirkung (Howell *et al.*, 2000; Elkak und Mokbel, 2001), so dass sich die alleinige Gabe von Fulvestrant erübrigte.

Daraufhin wurden *in vivo* im Rattenmodell Versuche mit den Substanzen Genistein und Daidzein in weiblichen ovariectomierten Ratten verschiedener Stämme (Da/Han, Wistar, Sprague-Dawley) durchgeführt. Verschiedene Parameter für eine estrogenen Wirkung von Substanzen wie z. B. der Einfluss auf das Uterusfeuchtgewicht und die Uterus- sowie Vaginalepithelhöhen wurden untersucht. Zusätzlich wurde das Augenmerk auf die mRNA-Expression einzelner estrogenregulierter Gene (Komplement C3, Clusterin) im Uterus und die Proteinexpression des Progesteronrezeptors in der weiblichen Brustdrüse gerichtet. Additive oder antagonisierende Effekte wurden durch die kombinierte Applikation der Phytoestrogene mit dem reinen Estrogen analysiert.

Darüber hinaus sollte in weiteren tierexperimentellen Untersuchungen geklärt werden, ob nach der Applikation der oben genannten Phytoestrogene Genistein und Daidzein organspezifische bzw. gewebelektive sowie zeitabhängige Effekte nachweisbar sind. Hierzu wurde die Genexpression verschiedener estrogenregulierter Gene in Brustdrüsengewebe (Progesteronrezeptor und Cyclin D1), im Uterus (Komplement C3 und Cyclooxygenase-2) und in der *Vena cava* als Bestandteil des kardiovaskulären Systems (Progesteronrezeptor und Cyclooxygenase-2) mittels semiquantitativer RT-PCR oder *Real-Time* PCR untersucht.

## **5.1 Analyse der Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7**

### **5.1.1 Wahl des Modellsystems MCF-7**

Alle *in vitro* Analysen der vorliegenden Arbeit wurden mit humanen Brustkrebszellen der Linie MCF-7 durchgeführt. Hierbei handelt es sich um epitheliale Adenokarzinomzellen, deren Proliferation durch Estrogene induziert wird (Huang *et al.*, 1997). Die Expression des kernständigen Estrogenrezeptors wird durch die Konzentration des endogenen Estrogens 17 $\beta$ -Estradiol reguliert. Neben dem Estrogenrezeptor exprimieren MCF-7 Zellen den Progesteronrezeptor, der in Anwesenheit des Estrogens verstärkt transkribiert und damit zu den klassisch estrogenregulierten Genen gezählt wird (Read *et al.*, 1988).

Durch die Applikation von Antiestrogenen kommt es in den Zellen zu Veränderungen der molekularen Mechanismen der apoptotischen Signalkaskade, die z. B. durch eine erhöhte Sensitivität gegenüber bestimmten Zytokinen zu einer erhöhten Apoptoserate führen können.

Die MCF-7 Zelllinie zählt zu den am weitesten verbreiteten und auch am besten erforschten Modellsystemen zur Untersuchung solcher Zusammenhänge und eignet sich somit sehr gut zur Analyse von agonistischen und antagonistischen Effekten der Phytoestrogene. Aus diesen genannten Gründen wurden MCF-7 Zellen für die Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit gewählt.

### **5.1.2 Zellzyklusverteilung und Apoptoseinduktion in der Zelllinie MCF-7 nach Applikation von Einzelsubstanzen und Kombinationen**

Die Analyse der Zellzyklusverteilung bzw. der *sub* G<sub>0</sub>-Population durchflusszytometrisch mittels Propidiumiodidfärbung nach Nicoletti (Nicoletti *et al.*, 1991) und anschließender computergestützten Auswertung der einzelnen Phasen liefert genaue Auskünfte über den jeweiligen Zustand der MCF-7 Zellen nach Behandlung mit verschiedenen Untersuchungssubstanzen. Die prozentualen Anteile der Zellen in den einzelnen Phasen *sub* G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S und G<sub>2</sub> und die Zu- bzw. Abnahme dieser Werte nach Behandlung mit dem reinen Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol, den Phytoestrogenen und dem Antiestrogen Fulvestrant im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (CCS-Kontrolle) lassen Aussagen über eine estrogenartige Wirkung der Untersuchungssubstanzen zu.

Darüber hinaus können durch die gleichzeitige Applikation eines Phytoestrogens mit dem natürlichen Estrogen prinzipiell folgende Kombinationswirkungen auftreten:

- Verminderung der Wirkung (Antagonismus)
- keine Beeinflussung
- Addition der Einzelwirkungen (Additivität)
- mehr als eine reine Addition der Einzelwirkungen (Potenzierung)

Zunächst sollen kurz die Effekte des natürlichen Estrogens  $17\beta$ -Estradiol auf die *sub* G<sub>0</sub>- und die S-Phase erläutert werden. Zellen in der *sub* G<sub>0</sub>-Phase zeichnen sich durch ein extensives Schneiden der DNA, Herausdiffundieren der DNA-Fragmente aus dem Zellkern in das Zytoplasma und somit einen „reduzierten“ DNA-Gehalt aus (vgl. Kapitel 3.1.7).

Die Applikation von E<sub>2</sub> bewirkte eine dosisabhängige Abnahme der *sub* G<sub>0</sub>-Population, also der apoptotischen Zellen. Dies erklärt sich vor dem Hintergrund, dass Estrogenrezeptor-positive MCF-7 Zellen für ihr Wachstum zwingend auf Estrogene angewiesen sind. Da man davon ausgehen kann, dass bei einer Estradiolkonzentration von  $[10^{-13} \text{ M}]$  kaum noch estrogene Effekte auftreten, sollten die jeweiligen Werte in diesen Gruppen in etwa denen der CCS-Kontrollgruppe entsprechen (siehe Abb. 25 A in Kapitel 4.1.1). Darüber hinaus stellt man bei Betrachtung der genannten Abbildung (Teil A) keine weitere Reduktion der *sub* G<sub>0</sub>-Population nach der Applikation von E<sub>2</sub>  $[10^{-11} \text{ M}]$  im Vergleich zu  $[10^{-10} \text{ M}]$  fest. Dies lässt sich über ein zu starkes Wachstum der Zellen nach der Behandlung mit E<sub>2</sub>  $[10^{-10} \text{ M}]$  und somit einem Mangel an Nährstoffen und Raum auf der Zellkulturplatte nach dem Ausstreuen einer zu hohen Zellzahl erklären.

Als nächstes soll der Einfluss von E<sub>2</sub> auf die Zellen der S-Population erläutert werden. Während der S-Phase kommt es zu einem kontinuierlichen Anstieg des DNA-Gehaltes bis zum Erreichen einer originalgetreuen Kopie der Gesamt-DNA. Abbildung 25 B zeigt für E<sub>2</sub> einen dosisabhängigen Anstieg der S-Population mit steigender E<sub>2</sub>-Dosis und bestätigt damit die bereits oben erläuterte Estrogenabhängigkeit der MCF-7 Zellen.

Vor dem Hintergrund der Effekte des natürlichen Liganden am Estrogenrezeptor, dem  $17\beta$ -Estradiol, soll im nun Folgenden auf die Effekte der Phytoestrogene Genistein, Daidzein und Coumestrol auf die *sub* G<sub>0</sub>- und S-Phase der MCF-7 Zellen

eingegangen werden. Der Einfluss der einzelnen Phytoestrogene auf die *sub G<sub>0</sub>*-Population unterschied sich kaum von dem des E<sub>2</sub>. Bei allen drei Substanzen kam es zu einer dosisabhängigen Abnahme der Zahl an apoptotischen Zellen, die bei Genistein tendenziell etwas schwächer und bei Coumestrol etwas stärker erschien als bei E<sub>2</sub>. Jedoch sind die bei den Phytoestrogenen eingesetzten Konzentrationen von [10<sup>-8</sup> M] bis [10<sup>-5</sup> M] zu berücksichtigen.

Auch bei der Behandlung der Zellen mit den Phytoestrogenen kam es in den Gruppen mit den höchsten Konzentrationen ([10<sup>-5</sup> M]) wiederum zu einer deutlichen Zunahme derjenigen Zellen, die sich in der *sub G<sub>0</sub>*-Population befanden. Erklären lässt sich dieser Effekt einerseits mit der bereits für E<sub>2</sub> beschriebenen zu hohen Zellzahl bei Versuchsbeginn und somit einer zu starken Konkurrenz der Zellen um Nährstoffe und Platz auf der Versuchsplatte. Andererseits sind bei diesen hohen Konzentrationen der verabreichten Untersuchungssubstanzen leichte zytotoxische Wirkungen nicht auszuschließen (Maggiolini *et al.*, 2001).

Betrachtet man die Zellen in der S-Population, so findet man ebenso wie bei E<sub>2</sub> ein umgekehrtes Bild, d. h. unter der Behandlung mit den Substanzen kommt es zu einer Zunahme der S-Population. Genistein zeigte nur in der höchsten Konzentration ([10<sup>-5</sup> M]) einen deutlichen Effekt auf die Zunahme der Proliferation. Dieser Effekt fiel hierbei sogar stärker aus als bei E<sub>2</sub> [10<sup>-10</sup> M]. Daidzein und Coumestrol verhielten sich bei diesem Parameter sehr ähnlich; für Coumestrol bestätigte sich auch bei der Untersuchung der S-Population die sehr starke Ähnlichkeit mit E<sub>2</sub>.

Während verschiedene Arbeitsgruppen dem Genistein (als dem mit am häufigsten untersuchten Phytoestrogen) einen deutlich hemmenden Einfluss auf das Wachstum von MCF-7 Zellen attestierten (Verma *et al.*, 1997; Choi *et al.*, 1998; Fioravanti *et al.*, 1998), beschrieben andere Gruppen eine deutliche Zunahme der Zellproliferation durch Genistein (Zava *et al.*, 1997; Allred *et al.*, 2001). Entscheidend für die Wirkung des Genisteins sind einigen Forschergruppen zufolge die eingesetzte Konzentration des Phytoestrogens und die jeweilige Zelllinie, in der untersucht wird. Dees und Mitarbeiter postulierten 1997, dass Genistein in hoher Dosierung das Wachstum von Brustkrebszellen tatsächlich hemmt wie es von den erwähnten Arbeitsgruppen ebenfalls beobachtet wurde - in niedriger Dosierung stimuliert es im Gegensatz dazu jedoch die Proliferation (Dees *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1998). Untersuchungen von Le Bail und Mitarbeitern führten 1998 zu der Schlussfolge-

rung, dass Phytoestrogene ihre mögliche antiproliferative Aktivität bei hohen Konzentrationen über andere Estrogenrezeptor-unabhängige Mechanismen entwickeln.

Im Gegensatz dazu beschrieben Ju und Mitarbeiter im Jahr 2000 den Effekt von Pflanzenextrakten aus Kreuzblütlern als bifunktional - in niedriger Konzentration antiestrogen und in hohen Konzentrationen estrogenartig. Almstrup und Mitarbeiter gaben eine Hemmung des Enzyms Aromatase bei niedrigen Phytoestrogenkonzentrationen als mögliche Ursache für die antiestrogene Wirkung dieser an. Auch sie beschrieben eine estrogenartige Wirkung bei höheren Konzentrationen; lediglich für Genistein konnten sie die erwähnte Aromatasehemmung nicht bestätigen (Almstrup *et al.*, 2002).

Zur weiteren Überprüfung der Phytoestrogenwirkungen wurden im Anschluss an die oben beschriebenen Versuche mit Einzelgaben Kombinationsexperimente durchgeführt. Bei diesen Kombinationsversuchen wurden die Phytoestrogene jeweils in einer Konzentration von  $[10^{-6} \text{ M}]$  eingesetzt - also einer Dosierung, bei der zumindest für Daidzein und Coumestrol nach den Ergebnissen der Einzelgaben deutliche Effekte nachweisbar waren und mögliche zytotoxische Effekte noch nicht auftraten. Das Estrogen  $17\beta$ -Estradiol wurde in Konzentrationen von  $[10^{-12} \text{ M}]$  bis  $[10^{-10} \text{ M}]$  in Kombination zum jeweiligen Phytoestrogen appliziert, um einen möglichen Antagonismus oder eine Potenzierung der Effekte schon bei einer niedrigeren  $E_2$ -Dosierung aufzudecken.

Zunächst soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass sich die MCF-7 Zellen in diesem zweiten Versuchsteil aus nicht zu erklärenden Gründen weniger gut vermehrten. Somit fielen die Referenzwerte der Einzelgaben von  $E_2$  ( $[10^{-13} \text{ M}]$  bis  $[10^{-10} \text{ M}]$ ) insbesondere in Bezug auf die Apoptoseinduktion nicht so eindeutig aus wie im Versuchsteil I (Applikation von Einzelsubstanzen). Allerdings konnte durch den Einsatz des reinen Antiestrogens Fulvestrant in Kombination mit dem reinen Estrogen  $E_2$   $[10^{-10} \text{ M}]$  gezeigt werden, dass das Antiestrogen die Estrogenwirkung komplett kompensieren konnte. Diese Ergebnisse kann man als ein eindeutiges Anzeichen dafür sehen, dass sich sowohl die Kontrollen als auch das gesamte Testsystem erwartungsgemäß verhalten haben. Bei Durchsicht der Literatur fällt häufig ein Fehlen dieser Kontrollgruppen in verschiedenen Dosierungen

auf. Um jedoch das Verhalten bzw. die Effekte in den Zellen beurteilen zu können, sind solche Positiv- und auch Negativkontrollen unerlässlich.

Betrachtet man nun die Effekte der eingesetzten Kombinationen (vgl. Abb. 28), so war für alle drei Phytoestrogene eine deutliche Reduktion der *sub* G<sub>0</sub>-Population nachweisbar. Diese beobachteten Effekte der Kombinationen waren stärker als nach alleiniger E<sub>2</sub>-Behandlung. Coumestrol verstärkte den Einfluss von E<sub>2</sub> auf die Reduktion der Apoptoserate der MCF-7 Zellen am deutlichsten. Allerdings waren keine überadditiven Effekte, sondern lediglich additive Wirkungen zu erkennen.

Auch die S-Population wurde von den Kombinationen nicht im Sinne einer Potenzierung beeinflusst. Hier schien es so, als ob die Phytoestrogene die E<sub>2</sub>-Effekte eher nicht veränderten. Eine in Fachkreisen spekulierte Wirkungsabschwächung von E<sub>2</sub> durch Besetzung der Estrogenrezeptoren zu einem großen Teil durch die Phytoestrogene und somit einem Schutz vor den vollen E<sub>2</sub>-Effekten konnte nicht bestätigt werden.

Diese Wirkungsabschwächung ist ein Grund, weshalb schwach estrogen wirksame Substanzen gelegentlich auch als „antiestrogen“ oder als „partiell antiestrogen“ bezeichnet werden. Es wird vermutet, dass die Wirkung eines potenten Estrogens (z. B. 17β-Estradiol) durch eine schwächere Substanz vermindert werden kann, wenn diese kompetitiv das potentere Estrogen vom Estrogenrezeptor verdrängt. Im Falle der vorliegenden Versuchsergebnisse hätte man allerdings einen deutlich stärkeren Einfluss durch die Kombinationen erwarten können. Diese unterschieden sich in der Praxis nur sehr schwach von der entsprechenden E<sub>2</sub>-Kontrolle, lediglich bei Genistein und Daidzein war eine minimale und nicht signifikante Reduktion der S-Population in einzelnen Kombinationen zu erkennen. Coumestrol zeigte diese mögliche Wirkungsabschwächung von E<sub>2</sub> jedoch definitiv nicht.

Zusammenfassend ließ sich nach der kombinierten Applikation von E<sub>2</sub> mit einem Phytoestrogen eine Wirkungsverstärkung in Bezug auf die Senkung der Apoptoserate und eher keine Veränderung der E<sub>2</sub>-Wirkung bezüglich der Effekte auf die Proliferation feststellen. Genistein und Daidzein unterschieden sich in diesem Versuchsteil kaum voneinander. Das nach Versuchsteil I dem E<sub>2</sub> sehr ähnliche Coumestrol beeinflusste dessen Wirkung auf die *sub* G<sub>0</sub>-Population im Sinne einer Wirkungsverstärkung; Effekte auf die S-Population waren nicht zu beobachten. Dies erklärt sich eventuell mit der starken Ähnlichkeit zwischen den beiden Substanzen - auch in der Wirkstärke bei den im Versuch eingesetzten Konzentratio-

nen. Sowohl eine Besetzung des Estrogenrezeptors mit E<sub>2</sub> als auch Coumestrol führte in etwa zu gleich starken Effekten. Ein Schutz vor einer zu starken E<sub>2</sub>-Wirkung wie sie bei Genistein und Daidzein theoretisch denkbar wäre, kommt bei Coumestrol nicht in Frage.

An dieser Stelle soll nun auf frühere Untersuchungen der Arbeitsgruppe am Institut für Morphologie und Tumorforschung der DSHS Köln (Olf, 1999; Diel *et al.*, 2001) eingegangen werden, bei denen der Einfluss der Phytoestrogene Genistein, Daidzein und Coumestrol auf die Gen- und Proteinexpression ausgewählter estrogenregulierter Gene in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 analysiert wurde.

Nach siebentägiger Behandlung der MCF-7 Zellen wurde die Genexpression des Progesteronrezeptors als klassisch estrogenreguliertem Gen mittels semiquantitativer RT-PCR nach RNA-Isolation und cDNA-Synthese bestimmt.

Der PR, dessen Transkription über ein ERE (*estrogen responsive element*) in dessen Promotor reguliert wird (Savouret *et al.*, 1991), zeigt nach Applikation von Estradiol eine verstärkte Expression (Read *et al.*, 1988). Dieser Effekt konnte auch *in vivo* in verschiedenen Geweben wie z. B. in venösen Gefäßen von Ratten nachgewiesen werden (Knauthe *et al.*, 1996).

Zusätzlich wurde die Expression verschiedener durch Estrogene indirekt regulierter Gene untersucht. Ihre Regulation ist somit nicht über den klassischen, sondern über alternative Wirkmechanismen zu erklären (vergleiche Kapitel 1.2.3 und 1.2.4). Diese alternativen Wirkmechanismen können wie im Falle des Interleukin-6 Gens bereits aufgeklärt sein (Regulation über NF-κB) oder aber wie z. B. bei den Estrogenrezeptoren α und β, welche beide von MCF-7 Zellen exprimiert werden, noch weitgehend unbekannt sein. Als gesichert anzusehen ist heutzutage allerdings, dass die Gabe von E<sub>2</sub> in MCF-7 Zellen eine Reprimierung der ERα mRNA als auch des zugehörigen Proteins bewirkt (Saceda *et al.*, 1988). Dieses Regulationsmuster zeigt jedoch eine starke Abhängigkeit von der Behandlungsdauer mit E<sub>2</sub> und deutliche Unterschiede bei Betrachtung verschiedener Zelllinien. Ähnliches kann auch für die Regulation der ERβ mRNA als sicher angenommen werden (Mitchner *et al.*, 1998; Mitchner *et al.*, 1999).

Die Ergebnisse der oben beschriebenen Untersuchungen - speziell die mRNA-Expression des PRs und des ERα sowie die Proteinexpression des ERα - sollen an dieser Stelle kurz vorgestellt werden. Als Vergleichssubstanzen wurden das



reine Estrogen 17 $\beta$ -Estradiol, das Antiestrogen Fulvestrant sowie der selektive Estrogenrezeptor-Modulator Raloxifen eingesetzt.

Die Analyse des PRs auf mRNA-Ebene zeigte eine starke Zunahme der Expression nach Applikation von E<sub>2</sub> und Coumestrol um mehr als 60 %. Auch Genistein und Daidzein stimulierten die Genexpression, allerdings in geringerem Maße, wohingegen Fulvestrant und Raloxifen eine Reprimierung bewirkten. Der Effekt der Untersuchungssubstanzen auf die mRNA-Expression des ER $\alpha$  konnte allgemein als relativ schwach bezeichnet werden. E<sub>2</sub> und Coumestrol bewirkten eine Reduktion der ER $\alpha$  mRNA um ca. 25 % ebenso wie Fulvestrant. Genistein, Daidzein und Raloxifen zeigten keinen nennenswerten Effekt. Bei Betrachtung der Proteinexpression des ER $\alpha$  (mittels Western Blotting) stellte man eine starke Reprimierung des Proteins nach der Behandlung mit Genistein fest, die in vergleichbarer Intensität nur bei dem reinen Antiestrogen Fulvestrant und dem SERM Raloxifen zu beobachten war. E<sub>2</sub> und Coumestrol zeigten nur eine sehr schwache Reduktion, während Daidzein erstaunlicherweise eine Erhöhung des ER $\alpha$  Gehaltes der Zellen bewirkte (Olf, 1999).

In der folgenden Abbildung sind diese Ergebnisse zum leichteren Verständnis in Form eines *Fingerprints* dargestellt.

	E <sub>2</sub>	Ful	Ral	Gen	Dai	Cou
PR mRNA	↑↑↑	↓	↓	↑↑	↑↑	↑↑↑
ER $\alpha$ mRNA	↓	↓	-	-	-	↓
ER $\alpha$ Protein	↓	↓↓↓	↓↓↓	↓↓↓	↑	↓

**Abb. 52: Molekularer *Fingerprint***

Relative Regulation der PR und ER $\alpha$  mRNA-Expression und ER $\alpha$  Proteinexpression nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit E<sub>2</sub> [10<sup>-10</sup> M], Ful [10<sup>-7</sup> M], Ral [10<sup>-7</sup> M] und den Phytoestrogenen [10<sup>-6</sup> M] ↑↑↑ = sehr starke Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↑↑ = starke Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↑ = schwache Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↓ = Repression der mRNA bzw. des Proteins, die Bedeutung der Intensität ist der Legende für die Induktion zu entnehmen, - = keine Regulation; Unterschiede zu E<sub>2</sub> sind durch die weiße Farbe dargestellt (nach Diel *et al.*, 2001)

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse, die eine vollkommene Übereinstimmung in der untersuchten Gen- und Proteinexpression zwischen 17 $\beta$ -Estradiol und Coumestrol aufweisen und den bereits oben näher erläuterten Ergebnissen aus der

der Zellzyklusanalyse, kann man für Coumestrol auf einen dem Estradiol zugrunde liegenden ähnlichen molekularen Wirkmechanismus schließen. Auch Genistein scheint aufgrund der Expressionsergebnisse (PR mRNA) eine deutliche Ähnlichkeit mit  $E_2$  zu besitzen, die allerdings nach den Resultaten der Zellzyklusanalyse eindeutig schwächer ausfällt als bei Coumestrol. Deutliche Effekte auf die Proliferation zeigen sich erst bei einer Konzentration von  $[10^{-5} \text{ M}]$ . Bei Betrachtung der Daten für die Expression des  $ER\alpha$  (mRNA und Protein) scheint es nahe zu liegen, dass Genistein partialagonistische Eigenschaften besitzt wie beispielsweise Raloxifen. Die Charakterisierung dieser beiden Substanzen Coumestrol und Genistein in anderen als den hier vorgestellten *in vitro* Testsystemen führte zu ähnlichen Schlussfolgerungen (Makela *et al.*, 1994; Kuiper *et al.*, 1998).

Aufgrund der Ergebnisse von Olf aus dem Jahr 1999, die einen deutlichen Unterschied in der Expression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene (z. B. IL-6,  $ER\beta$ , NF- $\kappa$ B) zwischen  $E_2$  und Daidzein gezeigt haben, liegt es nahe, dass die Regulation dieser estrogensensitiven Gene in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 durch Daidzein auf anderen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen beruht als bei Coumestrol und Genistein. Obwohl durch die Analyse der Zellzyklusverteilungen in den MCF-7 Zellen nach fünftägiger Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen eine solche Differenz zwischen Genistein und Daidzein nicht zu erkennen ist, scheint es dennoch möglich, dass Unterschiede in der Struktur des Estrogenrezeptors, welcher die Substanzen gebunden hat, zu solch unterschiedlichen Effekten auf die Gen- und Proteinexpression der nicht klassisch, sondern über alternative Mechanismen regulierten Gene führen können.

Abschließend soll an dieser Stelle noch einmal darauf hingewiesen werden, dass sich bei Durchsicht der Literatur eine sehr große Diskrepanz bezüglich der Effekte von Phytoestrogenen in der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zeigt.

Die Behandlungsdauer, die eingesetzten Konzentrationen der Substanzen und auch die Vitalität der Zellen selber spielen eine wichtige Rolle bei den Versuchen und haben großen Einfluss auf die entstehenden Ergebnisse. Es ist denkbar, dass sich im Laufe der Jahre, seit denen es MCF-7 Zellen in Laboratorien weltweit gibt, die eine oder andere Linie verändert hat - auch bezüglich ihrer Ansprechrate gegenüber Estrogenen. Denn neben den ursprünglichen Zellen existieren inzwischen auch sehr viele gegenüber einzelnen Substanzen (z. B. Tamoxifen) resistente Zellen.

## 5.2 Analyse der Phytoestrogenwirkungen im Rattenmodell

Da es sich wie oben erläutert bei der Analyse von MCF-7 Zellen - ähnlich wie bei anderen Zellsystemen auch - um ein artifizielles *in vitro* Testsystem handelt, das von vielen Faktoren abhängig und auch sehr leicht beeinflussbar ist, wurden die Phytoestrogene in den darauf folgenden Untersuchungen im lebenden Organismus getestet. Dadurch wurden auch pharmakokinetische Effekte mitberücksichtigt.

Zur Untersuchung einer estrogenen Wirkung durch die Phytoestrogene im Tier wurde das Rattenmodell gewählt. Als Untersuchungsparameter dienten sowohl Uterusfeuchtgewichte und Epithelhöhen estrogenempfindlicher Gewebe als auch die Expression estrogenregulierter Gene auf mRNA-Ebene in den Organen Uterus, Mamma und *Vena cava*.

### 5.2.1 Effekte der Phytoestrogene *in vivo* auf Uterusgewicht und Uterus- sowie Vaginalepithelhöhen

Zur Charakterisierung von Substanzen mit möglichen estrogenen oder antiestrogenen Wirkungen kann man die Analyse verschiedener Untersuchungsparameter heranziehen, die durch Estrogengabe deutlich beeinflusst werden.

#### Uterusfeuchtgewicht

Als klassischer Parameter zur Bestimmung von Estrogenität dient die Analyse des Uterusfeuchtgewichtes von Ratten oder Mäusen *post mortem* nach Applikation der Substanzen. Diese auch als *uterotropher Assay* bezeichnete Analyse findet in der Literatur häufig Erwähnung und liefert schnell und ohne aufwendige Laborarbeit zuverlässige Ergebnisse (Odum *et al.*, 1997; Tinwell *et al.*, 2000; Yamasaki *et al.*, 2000). Hierzu werden die Uterusgewichte der Untersuchungstiere zu ihren Körpergewichten in Relation gesetzt und mit einer Kontrollgruppe verglichen.

In der vorliegenden Arbeit wurden Tiere der Kontrollgruppe lediglich mit den Lösungsmitteln peroral oder subkutan behandelt.

Zunächst wurde der Effekt von Ethinylestradiol (20, 50 und 100 µg/kg KG) und Genistein (25, 50 und 100 mg/kg KG) in steigenden Konzentrationen auf das Uterusfeuchtgewicht bestimmt. Neben der erwarteten starken und z. T. sehr hochsignifikanten, dosisabhängigen Gewichtszunahme der Uteri nach Behandlung mit EE

zeigte Genistein trotz der um den Faktor 1.000 höheren Konzentration deutlich schwächere Effekte. Eine Dosisabhängigkeit ließ sich kaum erkennen. Für darauf folgende Experimente lieferte dieser Versuch die Erkenntnis, dass die Genisteinkonzentration bei einer peroralen Applikation bei ca. 100 mg/kg KG liegen sollte, um eine ausreichende Wirkung zu erzielen.

Die erstellte Dosis-Wirkungskurve für EE verdeutlichte, dass bei einer Konzentration von ca. 30 µg/kg KG mit einer halbmaximalen Erhöhung des Uterusfeuchtgewichtes zu rechnen ist. Dieser Wert spielte für die später durchgeführten Experimente, bei denen Genistein mit dem reinen Estrogen kombiniert verabreicht wurde, eine wichtige Rolle.

Ein Problem des dargestellten Messparameters Uterusfeuchtgewicht liegt in der fehlenden Unterscheidung zwischen einer tatsächlichen Zunahme des Uterusgewichtes durch Zellneubildung und einer lediglich eintretenden Wassereinlagerung in das Uterusgewebe. Zu Beginn einer Estrogenwirkung kommt es zunächst zu der erwähnten Wassereinlagerung in das Uterusgewebe, bis sich dann mit deutlicher Zeitverzögerung eine tatsächliche Gewichtszunahme durch Zellproliferation einstellt.

Durch Versuchsteil IV und der darin vorgenommenen Untersuchung der Zeitabhängigkeit der Estrogenwirkung konnte nachgewiesen werden, dass die Phytoestrogene Genistein und Daidzein eine rasche, aber keine langfristige Zunahme des Uterusgewichtes in ovariectomierten Ratten induzierten. Sie unterscheiden sich somit bezüglich der Schnelligkeit und der Stärke mit denen dieser Effekt eintritt nicht von den reinen Estrogenen. Allerdings weisen die Unterschiede in der Dauer des Effektes auf mechanistische Unterschiede in der Wirkung der Phytoestrogene Genistein und Daidzein einerseits und EE bzw. E<sub>2</sub> andererseits hin.

Es ist zu vermuten, dass der messbare Effekt der Phytoestrogene auf den Parameter Uterusfeuchtgewicht lediglich durch die beschriebene Wassereinlagerung zustande kommt. Abbildung 43 zum Einfluss der Substanzen auf das Uterusgewicht nach subkutaner Applikation bestätigt diese Theorie. Während die Gabe von EE und E<sub>2</sub> nach 7 und 24 Stunden eine mäßige Wirkung zeigte, stieg das Uterusgewicht nach 3 Tagen sehr stark an. Dies scheint vor dem Hintergrund der oben gegebenen Erklärung nicht zu verwundern, denn bis es zu einer deutlichen Gewichtszunahme durch Zellneubildung kommen kann, muss eine gewisse Zeit vergehen.

Genistein bewirkte nach 7 Stunden den stärksten Effekt auf das Uterusgewicht; die anfänglich deutliche Zunahme lag nach 3 Tagen nur noch leicht über der Kontrollgruppe und war nicht mehr signifikant. Der Daidzeinwert (3 Tage) unterschied sich nicht von der Kontrolle.

Kommt es nach kurzer Zeit zu der postulierten Wassereinlagerung durch die Phytoestrogene, so wird dieses Wasser nach einem gewissen Zeitraum wieder aus dem Uterusgewebe entfernt. Die mehrmalige Applikation der Substanzen an aufeinander folgenden Tagen scheint diese Entfernung des eingelagerten Wassers zu beschleunigen. Ebenso scheint eine weitere Einlagerung von Wasser nach einigen Tagen eventuell durch das zum Erliegen kommen bestimmter Transportmechanismen wie z. B. der Ionenkanäle verhindert zu werden.

Zusammengefasst bedeutet dies, eine rasche Zunahme des Uterusgewichtes durch die vermutete Wassereinlagerung wurde nach Applikation aller Substanzen (EE, E<sub>2</sub>, Gen und Dai) erreicht. Eine langfristige Zunahme des Gewichtes, gekoppelt an die Neusynthese von Zellen, wurde hingegen nur von EE und E<sub>2</sub> induziert. Diese Hypothese wird durch die Expressionsanalyse relevanter Gene unterstützt. Die in Kapitel 5.2.2 aufgeführten Untersuchungen zeigen, dass Komplement C3 im Uterus sowohl auf die Applikation von E<sub>2</sub> als auch auf Genistein ansprach (vgl. Diel *et al.*, 2000), wohingegen die Expression anderer estrogensensitiver Gene - bevorzugt solcher Gene, die an der Einleitung oder Kontrolle von proliferativen Prozessen beteiligt sind (z. B. COX-2) - durch die Substanz Genistein nur sehr schwach beeinflusst wurde.

Zukünftige Untersuchungen sollten demnach ein Augenmerk auf die Expression von klassischen Proliferationsmarkern wie z. B. PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) und Ki-67 legen. Darüber hinaus sollten Verfahren etabliert werden, die sowohl das Uterusfeucht- und das Uterustrockengewicht bestimmen als auch anschließende Analysen der Genexpression ermöglichen. Durch die Untersuchung des Uterustrockengewichtes im Vergleich zum Uterusfeuchtgewicht können Wassereinlagerungen ebenfalls erkannt werden.

Da in der vorliegenden Arbeit jedoch die molekularbiologischen Verfahren (Genexpressionsanalyse) im Vordergrund standen, war es methodisch nicht möglich, das Uterustrockengewicht zu bestimmen. Bei der Trocknung der Uteri würden eintretende Gewebeveränderungen eine spätere RNA-Präparation unmöglich machen.

### **Uterus- und Vaginalepithelhöhe**

Eine weitere Methode zur Untersuchung der Estrogenität verschiedener Substanzen ist die Bestimmung von Epithelhöhen estrogenabhängiger Gewebe. Zu den klassischen Zielorganen für eine Estrogenwirkung (vergleiche Abb. 11, Kapitel 1.2.1) zählt neben dem bereits erwähnten Uterus auch die Vagina.

Durch die Wirkung von Estrogenen kommt es nach deren Bindung an den Estrogenrezeptor in den Zielorganen zu einer Stimulation der Zellproliferation, die u. a. eine Volumenzunahme einzelner Gewebeschichten mit sich zieht. Mithilfe von histologischen Methoden ist es durch Anfärbung der jeweiligen Gewebeschnitte mit Färbereagenzien möglich, diese Gewebezunahme sichtbar zu machen und mikroskopisch zu vermessen.

Betrachtet man die Anfärbungen der Uterusschnitte in Abbildung 33, so erkennt man eine starke Volumenzunahme des Epithels (violette innere Schicht) nach Applikation von EE. Auch das Myometrium (violette äußere Schicht) reagierte mit einer eindeutigen Verdickung. Genistein zeigte auf das Epithel nur sehr schwache Effekte, wohingegen die Dicke des Myometriums deutlich zunahm.

Die zu messende Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes nach Genisteinbehandlung erklärt sich eventuell durch diese deutliche Zunahme des Myometriums - ob durch Zellproliferation oder lediglich Wassereinlagerung ist an dieser Stelle nicht zu bestimmen. Diese Frage könnte in zukünftigen Versuchen durch die immunhistochemische Färbung von Uterusschnitten mit Antikörperlösungen, die eine Zellproliferation anzeigen (wie z. B. PCNA = *proliferating cell nuclear antigen*), beantwortet werden.

Neben der bereits für das Uterusepithel erläuterten Volumenzunahme, die auch beim Vaginalepithel zu beobachten ist, zeigt sich in der Vagina zusätzlich eine verstärkte Verhornung nach Einwirken eines Estrogens. In Abbildung 35 ist exemplarisch die Anfärbung des Vaginalepithels von Da/Han Ratten nach Behandlung mit EE und Genistein dargestellt. EE bewirkte die beschriebene starke Zunahme der Verhornung (violett) und ein deutliches Dickenwachstum des Epithels (hellviolett). Genistein scheint sich bezüglich dieses Parameters dem EE sehr ähnlich zu verhalten. Neben einer verstärkten Verhornung war auch hier eine Zunahme der Epitheldicke messbar.

Wie durch die Erstellung einer Dosis-Wirkungskurve für EE (Abb. 39) gezeigt werden konnte, stellt das Vaginalepithel einen deutlich sensitiveren Untersuchungspara-

parameter für Estrogenwirkungen dar als das meist zitierte Uterusfeuchtgewicht. Bereits bei Konzentrationen, die auf das Uterusgewicht noch keinerlei Effekte ausüben (EE 30 µg/kg KG), kommt es zu einer deutlichen Zunahme der Vaginal-epitheldicke.

Bei Zusammenfassung der Analysen von Uterus- und Vaginalepithel kann man feststellen, dass sich Genistein deutlich von der Kontrolle abhebt. Auf die genannten Parameter (Uterus- und Vaginalepithelhöhe) nimmt es messbaren Einfluss, allerdings nicht in dem gleichen Maße wie das synthetische Hormon Ethinylestradiol. Unterschiede sind sowohl in der Quantität als auch in der Qualität der Effekte auszumachen.

### **Vergleich verschiedener Rattenstämme**

In der vorliegenden Arbeit wurden als Versuchstiere zumeist Wistar Ratten eingesetzt, die sich nach Untersuchungen an verschiedenen Rattenstämmen (vgl. Kapitel 4.2.3) als die auf Estrogengabe am sensitivsten reagierenden Tiere herausstellten.

In den angesprochenen Versuchen wurde der Effekt von Ethinylestradiol und Genistein in verschiedenen Dosierungen nach peroraler dreitägiger Applikation auf das Uterusfeuchtgewicht und die Uterus- und Vaginalepithelhöhen in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley bestimmt.

Die angesprochene höhere Sensitivität der Wistar Ratten zeigte sich bei der Untersuchung der Uterusepithelhöhe nach Applikation von EE. Sprague-Dawley Ratten reagierten beim Parameter Uterusfeuchtgewicht deutlich weniger empfindlich auf die Gabe von EE, was beim Vergleich zu der jeweiligen Kontrolle zu erkennen war. Allerdings soll an dieser Stelle nicht unerwähnt bleiben, dass diese beobachteten Unterschiede verhältnismäßig schwach ausgeprägt waren und nur nach Gabe von EE auftraten. Auf die Applikation von Genistein zeigten die verschiedenen Rattenstämme vergleichbare Reaktionen.

Ausschlaggebend für die Wahl der Wistar Ratten als Versuchstiere war - neben den geschilderten Ergebnissen - das leichte Überwiegen dieses Stammes gegenüber dem Sprague-Dawley Stamm in der Literatur und der damit besseren Übertragbarkeit der ermittelten Ergebnisse auf die von anderen Forschungsgruppen erhobenen Resultate sowie die einfachere Handhabung der weniger aggressiven Tiere.

### 5.2.2 Effekte der Phytoestrogene *in vivo* auf die Expression verschiedener estrogensensitiver Gene in einzelnen Geweben

Eine sehr exakte Methode zur Bestimmung einer möglichen Estrogenität von Untersuchungssubstanzen liegt in der Analyse der Expression estrogensensitiver Gene auf mRNA-Ebene in verschiedenen Geweben oder Organen. Neben den klassischen Zielorganen für eine Estrogenwirkung, die in dieser Arbeit untersucht werden sollten - dem Brustdrüsengewebe und dem Uterus - stand mit der *Vena cava* als Bestandteil des kardiovaskulären Systems ein nichtklassisches Zielgewebe zur Verfügung (vgl. Abb. 11, Kapitel 1.2.1).

Bereitete die Präparation der mRNA aus Uterusgewebe und aus der *Vena cava* eher keine Schwierigkeiten, so erwies sich die Präparation aus Brustdrüsengewebe als sehr schwierig. Ein Grund hierfür könnte in dem hohen Fettgehalt des Brustgewebes liegen und in Problemen bei der genauen Präparation der Tiere. Diese Tatsache wird eine wichtige Rolle spielen, weshalb bei Durchsicht der Literatur verhältnismäßig wenige Publikationen die Genexpression verschiedener Gene auf mRNA-Ebene in Mammagewebe zum Thema haben.

Als zu untersuchende Gene wurden neben den klassisch regulierten Genen des Progesteronrezeptors und von Komplement C3 (beide ERE-reguliert) verschiedene nichtklassisch regulierte, aber dennoch estrogensensitive Gene ausgewählt. Beispielsweise wird das Cyclin D1 Gen nicht über den klassischen Mechanismus reguliert. Der Cyclin D1 Promotor enthält kein ERE (*estrogen responsive element*), so dass die Induktion von Cyclin D1 durch den Estrogenrezeptor  $\alpha$  über ein alternatives *responsive element* ablaufen muss.

Eine einführende Charakterisierung der einzelnen Gene Clusterin, Cyclin D1, Cyclooxygenase-2, Komplement C3 und Progesteronrezeptor erfolgte in Kapitel 1.3.

Ein deutlicher Vorteil dieser Untersuchungsmethode gegenüber der Analyse des Uterusfeuchtgewichtes liegt auf der Hand. Effekte einer Untersuchungssubstanz auf das Uterusfeuchtgewicht, die lediglich durch Wassereinlagerung zustande kommen, würden keinerlei Unterschiede in der Genexpression spezifischer Gene, die eine Proliferation anzeigen, erkennen lassen.

Allerdings darf der deutlich höhere versuchstechnische und finanzielle Aufwand im Vergleich zur Bestimmung von Uterusgewichten und Uterus- sowie Vaginal-epithelhöhen nicht unerwähnt bleiben.



Die Ergebnisse der einzelnen untersuchten Gene sollen im Folgenden nun genauer vorgestellt werden.

### **Komplement C3**

Das Komplement C3 Gen, das in seinem Promotor drei „*estrogen responsive elements*“ enthält (Vik *et al.*, 1996) und somit zu den direkt estrogenregulierten Genen zu rechnen ist, diente in dieser Arbeit als analytischer Parameter, um eine Estrogenwirkung anzuzeigen. Nach Estrogengabe kommt es zu einer verstärkten Expression von Komplement C3 auf mRNA- und Proteinebene (Sundstrom *et al.*, 1989).

Die Expression des Gens, die im Versuchsteil III (Testung auf agonistische oder antagonistische Effekte in Kombination mit dem synthetischen Estrogen) analysiert wurde, wird in Kapitel 5.2.4 genauer beschrieben.

Auch in Versuchsteil IV (Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen) wurde die Expression von Komplement C3 als analytischer Parameter herangezogen. Die Analyse der mRNA-Expression im Uterus der Tiere zeigte, dass nach Behandlung mit 17 $\beta$ -Estradiol eine verstärkte Expression zu beobachten war. Die Gabe von Genistein äußerte sich in einer sehr starken und signifikanten Zunahme der Expression. Zu berücksichtigen ist an dieser Stelle, dass es sich bei beiden Substanzen um Einmalapplikationen mit anschließender Analyse nach sieben Stunden handelt. Erfahrungsgemäß reagiert Komplement C3 bereits auf eine Einmalapplikation, jedoch sind stärkere Effekte auf die mRNA-Expression nach Applikation von E<sub>2</sub> erst nach längeren Zeiträumen zu erwarten (Diel *et al.*, 2000).

Während in Brustdrüsengewebe die Expression des Progesteronrezeptors als klassischer Nachweis für Estrogenität angesehen werden kann, ist die Analyse des PRs im Gesamtuterus nicht möglich. Eine unterschiedlich differenzierte Regulation in verschiedenen Kompartimenten des Uterus (z. B. Epithel, Stroma) lässt keine eindeutige Aussage zu. Aus diesem Grund wurde wie oben erläutert zur Untersuchung des Uterus das ebenfalls klassisch regulierte Gen von Komplement C3 herangezogen.

### **Clusterin**

Auch die Analyse der Genexpression von Clusterin diene zur Bestimmung von Estrogenität einzelner Untersuchungssubstanzen. Clusterin zählt zu den Genen, die indirekt durch Estrogene reguliert werden (Rosembliit *et al.*, 1996). Die Verabreichung eines Estrogens bewirkt eine Reprimierung auf mRNA- und Proteinebene im Uterus, weshalb dieses Gen in der vorliegenden Arbeit als Untersuchungsparameter eingesetzt wurde. Auf die in verschiedenen Tumoren beobachtete Überexpression von Clusterin soll im Zuge dieser Arbeit nicht eingegangen werden. Neben der Expression von Komplement C3 wurde auch die von Clusterin in Versuchsteil III (Testung auf agonistische oder antagonistische Effekte in Kombination mit dem synthetischen Estrogen) analysiert. Die Ergebnisse werden in Kapitel 5.2.4 erläutert.

### **Progesteronrezeptor**

Der Progesteronrezeptor zählt zu den direkt estrogenregulierten Genen und wird nach Bindung eines Estrogens an den Estrogenrezeptor vermehrt exprimiert. Dieser Parameter diene in der vorliegenden Arbeit ebenfalls dazu, Estrogenität anzuzeigen.

In Versuchsteil IV (Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen) zeigte die Expressionsanalyse in Brustdrüsengewebe eine deutliche Zunahme des PRs nach Behandlung der Tiere mit Ethinylestradiol und 17 $\beta$ -Estradiol. Die gemessenen Effekte waren nach subkutaner Applikation des synthetischen Hormons deutlich stärker als nach Gabe von E<sub>2</sub>. Anscheinend sind toxikokinetische Unterschiede zwischen EE und E<sub>2</sub> nicht nur nach peroraler Applikation, sondern auch nach subkutaner Verabreichung auszumachen. Gründe hierfür können in unterschiedlichen Metabolisierungsvorgängen in der Leber zu suchen sein und somit in einer verlängerten Wirkdauer für EE resultieren.

Nach einer Gabe der beiden Substanzen über die Dauer von drei Tagen ließ die beobachtete Expressionszunahme deutlich nach. Auch Genistein induzierte die Expression des PRs signifikant, jedoch deutlich schwächer als die beiden reinen Hormone. Auch hier wäre ein Abfall der Effekte nach dreitägiger Behandlung denkbar; dies ließ sich aber aufgrund der großen Streuung der Messwerte nicht mit Sicherheit feststellen. Daidzein führte nach dreitägiger Behandlung ebenfalls zu einer leicht vermehrten, jedoch nicht signifikanten Zunahme der Expression.

Bei Betrachtung des PRs in der *Vena cava* zeigte sich für E<sub>2</sub> nach 7 Stunden eine starke Expressionszunahme, die sehr hochsignifikant war. Der induzierende Effekt von Genistein fiel etwas schwächer aus, war aber ebenfalls hochsignifikant.

Zusätzlich zu der Feststellung einer Estrogenwirkung durch E<sub>2</sub> in beiden untersuchten Geweben durch die vermehrte Expression des PRs konnte nachgewiesen werden, dass auch die Applikation von Genistein zu einer verstärkten Expression in Mamma und *Vena cava* führt. Für weitere Studien könnte die Analyse von Genen, die eine Proliferation anzeigen (z. B. PCNA oder Ki-67), von großem Interesse sein. Mithilfe dieser Marker könnte man überprüfen, ob Phytoestrogene neben ihrem dem E<sub>2</sub> sehr ähnlichen Einfluss auf die Expression des PRs in der Mamma ebenso wie E<sub>2</sub> auch zu einer Proliferation führen.

### **Cyclin D1**

Die Expression des Cyclin D1 Gens, das wichtige Aufgaben bei der Steuerung des Zellzyklus übernimmt, wurde in Brustdrüsengewebe der weiblichen ovariectomierten Wistar Ratten mittels *Real-Time* PCR untersucht.

Cyclin D1 zählt nicht zu den klassisch estrogenregulierten Genen, da es kein ERE in seinem Promotor besitzt. Castro-Rivera und Mitarbeiter beschrieben eine durch 17β-Estradiol induzierbare Expression von Cyclin D1 (Castro-Rivera *et al.*, 2001), die durch die vorliegenden Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden konnte. Allerdings erscheint diese Induktion zeitabhängig zu verlaufen. Während das synthetische Hormon Ethinylestradiol bereits nach 7 Stunden eine verstärkte Expression hervorruft, tritt diese nach E<sub>2</sub>-Behandlung erst nach 24 Stunden ein. Beachtlich ist bei beiden Substanzen die starke Reprimierung des Gens nach drei Tagen. Auch die beiden Phytoestrogene Genistein und Daidzein führen zu einer verminderten Expression von Cyclin D1 gegenüber der Kontrolle.

Es ist inzwischen bekannt, dass Cyclin D1 in Kolonkarzinomzellen (Arber *et al.*, 1996; Sutter *et al.*, 1997) und in vielen Zellen anderer Krebsarten wie z. B. des Ösophagus (Arber *et al.*, 1999) und der Prostata (Han *et al.*, 1998) überexprimiert vorhanden ist (Weinstein *et al.*, 1997). Eine Beobachtung, die nach dem in Kapitel 1.3.2 beschriebenen Eigenschaften (Induktion der Proliferation) nicht verwundert. Diese vermehrte Expression von Cyclin D1 zählt zu einer der am häufigsten vorkommenden Veränderungen in humanen Krebszellen.

Verschiedene Studien beweisen, dass Cyclin D1 in der Karzinogenese eine kritische Rolle spielt, weil es bei Überexpression 1. die Zelltransformation und die Tumorgenese steigert, 2. die Amplifikationsrate anderer Gene steigern kann und 3. konnte durch die Einführung einer Cyclin D1 „*antisense* cDNA“ in menschliche Ösophagus- oder Kolonkarzinomzellen ihr maligner Phänotyp wieder umgekehrt werden (Weinstein *et al.*, 1997).

So findet man beispielsweise in bis zu 40 % der Kolorektalkarzinome (Arber *et al.*, 1996) und je nach Literatur in bis zu 50 bzw. 60 bis 80 % der Mammakarzinome eine solche Überexprimierung des Proteins (Joe *et al.*, 2001; Umekita *et al.*, 2002), das wie bereits oben erwähnt in humanen ER-positiven Brustkrebszelllinien durch 17 $\beta$ -Estradiol induziert wird (Castro-Rivera *et al.*, 2001). Allerdings darf nicht außer Acht gelassen werden, dass bei Brustkrebs zusätzlich der Hormonrezeptorstatus (ER-positiv, ER-negativ) und andere Faktoren eine wichtige Rolle spielen, um z. B. Aussagen für die Prognose treffen zu können. So stellten Gillett und Mitarbeiter überraschenderweise fest, dass Brusttumore, die bei immunhistochemischen Färbungen weder Cyclin D1 noch ER färbten, die schlechtesten Prognosen für die Patientinnen bedeuteten (Gillett *et al.*, 1996). Auch Barnes und Gillett erklärten 1998, dass die Überexpression von Cyclin D1 derzeit mit einer besseren Prognose auch in Hinblick auf die endokrine Therapie verknüpft ist.

Darüber hinaus soll nicht unerwähnt bleiben, dass Versuche an Mäusen gezeigt haben, dass Cyclin D1 auch für die „normale“ Entwicklung der Brust eine entscheidende Rolle spielt, so z. B. für die Ausbildung der Alveolen während der Schwangerschaft oder auch für die Laktation (Sutherland und Musgrove, 2002). Jedoch wurde bei diesen Versuchen auch beobachtet, dass eine Überexpression - auch in Kombination mit einer Überexpression anderer Onkogene - zu einem schnelleren Fortschreiten bei der Tumorbildung bzw. -entstehung führt (Castro-Rivera *et al.*, 2001). Cyclin D1 *Knockout* Mäuse zeigten gegenüber verschiedenen Onkogenen, deren Brustkrebs-induzierende Effekte bekannt sind, eine deutliche Resistenz (Yu *et al.*, 2001).

Die vermehrte Expression von Cyclin D1 stellt einen sehr frühen Schritt bei der Stimulation der Mitose durch Wachstumsfaktoren und Estrogene dar, und die Hemmung der Cyclin D1 Expression erfolgt als frühzeitige Antwort auf die Wachstumshemmung durch Antiestrogene (Sutherland *et al.*, 1995; Alle *et al.*, 1998).

Aufgrund der beschriebenen Erkenntnisse wären Therapeutika, die die Aktivität von Cyclin D1 oder der CDKs (*cyclin dependent kinases*) hemmen, für die Chemoprävention und auch für die Therapie von Krebserkrankungen von großem Interesse (Arber *et al.*, 1997; Weinstein, 2000). Cyclin D1 würde sich auch sehr gut als prognostischer Parameter in molekularepidemiologischen Studien eignen, um verschiedene präventive Maßnahmen auszutesten (Weinstein, 2000).

Die in den Untersuchungen beobachtete Reprimierung von Cyclin D1 durch Genistein und Daidzein könnte somit ein Anhaltspunkt sein für die in Studien beobachtete schützende Wirkung der Phytoestrogene vor Brustkrebs. Allerdings stünde der ebenfalls reprimierende Effekt nach dreitägiger Hormonbehandlung mit EE und E<sub>2</sub> hiermit im Widerspruch. Die Eigenschaften dieses Gens scheinen zu komplex, als dass an dieser Stelle eine abschließende Beurteilung der erhobenen Ergebnisse möglich ist. Die schlechte Prognose von Brustkrebspatientinnen mit erniedrigten Cyclin D1 Spiegeln auf der einen Seite und die fehlenden konkreten Aussagen über die Funktion des ER $\alpha$  und ER $\beta$  beim Cyclin D1 Gen auf der anderen Seite erfordern weitere Untersuchungen sowohl im Tier als auch im Patienten. Im Gegensatz zu den eindeutigen Ergebnissen der Expressionsuntersuchung des PRs scheint die Analyse von Cyclin D1 deutlich komplizierter. Denkbar wären auch hier - wie bereits beim PR im Uterus erläutert - Unterschiede in der Expression von Cyclin D1 je nach untersuchter Region der Mamma. Eventuell weisen verschiedene Gewebeverbände in der Brustdrüse unterschiedliche Expressionen des untersuchten Gens auf. Immunhistochemische Analysen könnten an dieser Stelle Aufschluss über die räumlichen Gegebenheiten in der Mamma liefern.

### **Cyclooxygenase-2**

Das Gen der Cyclooxygenase-2 (COX-2) stellt eine der beiden Isoformen des Enzyms Cyclooxygenase dar. Diese Enzyme spielen eine wichtige Rolle bei der Synthese von Prostaglandinen, die wiederum an einer Vielzahl von Reaktionen und Vorgängen im menschlichen und tierischen Körper beteiligt sind (z. B. Fieber, Entzündungen, Wehen u. a. m).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der COX-2 als derjenigen Isoform, die in erster Linie an pathologischen Geschehnissen beteiligt ist, im Uterus und in der *Vena cava* als Bestandteil des kardiovaskulären Systems untersucht. Die Applikation des natürlichen Hormons 17 $\beta$ -Estradiol bewirkte nach 7 Stunden

eine signifikante Zunahme der Expression auf mRNA-Ebene. Auch Genistein führte nach 7 Stunden zu einer signifikanten Induktion, die jedoch sehr deutlich hinter dem E<sub>2</sub>-Effekt zurückblieb.

In der *Vena cava* resultierte die Behandlung mit E<sub>2</sub> zu allen drei gemessenen Zeitpunkten in einer sehr hochsignifikanten Reprimierung des Gens auf mRNA-Ebene. Auch die Applikation des Phytoestrogens Genistein verursachte eine tendenzielle, jedoch nicht signifikante Reprimierung des Gens sowohl nach 7 und 24 Stunden als auch nach 3 Tagen. Lediglich Daidzein zeigte eine leichte Induktion nach 3 Tagen, die jedoch aufgrund der großen Streuung der Messwerte ebenfalls nicht signifikant war und ebenso gut eine leichte Reprimierung darstellen könnte. Bevor auf die Bedeutung dieser Ergebnisse eingegangen wird, soll das COX-2 Gen genauer charakterisiert werden.

Von besonderem Interesse sind Untersuchungsergebnisse verschiedener Tumore, bei denen eine hohe Prostaglandinsynthese bzw. erhöhte COX-2 Spiegel beobachtet wurden (Howe *et al.*, 2001). So zeigten Untersuchungen von Pankreastumoren, dass ca. in jedem zweiten Tumor eine deutlich erhöhte Expression sowohl des COX-2 Proteins als auch der COX-2 mRNA vorlag (Okami *et al.*, 1999). Ähnliche Ergebnisse zeigten Uotila und Mitarbeiter 2001 für das Prostatakarzinom. Auch beim Blasenkarzinom (Bostrom *et al.*, 2001; Moyad, 2001) und beim Lungen- und Zervixkarzinom mit einer Wahrscheinlichkeit von ca. 90 % (Soslow *et al.*, 2000; Kulkarni *et al.*, 2001) sahen die Untersuchungsergebnisse nicht anders aus. Hinzu kommt, dass durch epidemiologische Studien ein Zusammenhang zwischen der Einnahme von Acetylsalicylsäure und dem Kolonkarzinom gezeigt werden konnte. So beobachtete man, dass Patienten, die nichtselektive Cyclooxygenase-Hemmstoffe (allg. nichtsteroidale Antiphlogistika) in großen Mengen konsumierten, ein deutlich erniedrigtes Risiko für bösartige Entartungen des Kolons aufwiesen (Thun *et al.*, 1991; Giovannucci *et al.*, 1994; Giovannucci *et al.*, 1995). Auch im Rattenmodell ließen sich diese Beobachtungen bestätigen. Dabei wurde Prostaglandin E<sub>2</sub> als mitentscheidendes Agens gefunden (Inaba *et al.*, 1999).

Diese Erkenntnisse legen eine mögliche tumorfördernde oder tumorunterstützende Funktion der COX-2 nahe. Mögliche Gründe für diese Einflüsse von COX-2 auf die Karzinogenese könnten a) allgemein eine vermehrte Bildung von Prostaglandinen, b) eine Umwandlung von Prokarzinogenen in Karzinogene, c) eine Hemmung der Apoptose, d) eine geförderte Angiogenese, e) eine modulierte Entzün-

dungs- und Immunfunktion und schließlich f) ein vermehrtes Einwandern von Tumorzellen in Gewebe sein (Xu, 2002).

Gately nannte als Erklärung ebenfalls eine vermehrte Expression des „proangiogenetischen“ Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*), die Bildung von Thromboxan A<sub>2</sub>, Prostaglandin E<sub>2</sub> und Prostaglandin I<sub>2</sub>, die direkten Einfluss auf die Angiogenese nehmen, sowie möglicherweise die Apoptosehemmung von Endothelzellen durch die Stimulation von BCL-2 (*B cell lymphoma 2*) (Gately, 2000). Auch Prescott und Fitzpatrick erklärten im Jahr 2000, dass die Hemmung von COX-2 zu einem sehr frühen Zeitpunkt die Entwicklung eines Tumors hemmt und auch „pre maligne“ Gewebe sich zurückbilden können. Als Gründe nannten sie die Beobachtung, dass chronische Entzündungen als Vorstufe von verschiedenen Krebsarten angesehen werden können und somit durch die Einnahme von nichtsteroidalen Antiphlogistika chronische Entzündungen ausgeheilt werden.

Eine mögliche Erklärung für den Einfluss von COX-2 auf die Apoptose könnte in der Apoptose-induzierenden Wirkung der Arachidonsäure zu finden sein, denn durch die vermehrte Expression von COX-2 findet eine verstärkte Umwandlung von Arachidonsäure zu Prostaglandin G<sub>2</sub> statt, und die Förderung der Apoptose entfällt.

Die Rolle von COX-2 in der Brust und beim Mammakarzinom ist jedoch weniger eindeutig. Auch wenn Versuche an Ratten und Mäusen klar belegen, dass Mammatumore mit einem erhöhten COX-2 Spiegel einhergehen und dass Hemmstoffe der Cyclooxygenase (z. B. Celecoxib) sowohl chemopräventiv als auch chemotherapeutisch wirken (Abou-Issa *et al.*, 2001; Kundu und Fulton, 2002; Ristimaki *et al.*, 2002), so scheint die Lage beim Menschen deutlich komplizierter zu sein. Mitentscheidend ist hierbei die Art des Brustkrebses einschließlich des Hormonrezeptorstatus (ER-positiv, ER-negativ), des HER-2 Status (*human epidermal growth factor receptor-2*) sowie einer Metastasenbildung (Howe *et al.*, 2001; Ristimaki *et al.*, 2002).

Aus den oben genannten Gründen hat die FDA (*Food and Drug Administration*, die für das Lebens- und Arzneimittelwesen zuständige Behörde der USA) die Behandlung von familiär bedingten adenomatösen Polypen, die als eine Krebsvorstufe angesehen werden, mit Celecoxib gestattet, und eine Reihe verschiedener Prä-

ventions- und Behandlungsversuche von Kolonkrebs und anderen Krebsarten (Prostata- und Brustkrebs) wurde gestartet (Giercksky, 2001).

Vor dem Hintergrund der hier vorgestellten Literaturdaten wäre es denkbar, dass das bei einem Estrogenmangel (z. B. in Folge des Klimakteriums) beobachtete vermehrte Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse wie z. B. Herzinfarkt, Hirnschlag und Arteriosklerose mit dem fehlenden Einfluss der Estrogene auf die COX-2 zusammenhängt. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen eindeutig die verstärkte Reprimierung des COX-2 Gens durch 17 $\beta$ -Estradiol. Somit scheint es naheliegend, dass nach Absinken der Estrogenspiegel der hemmende Effekt des E<sub>2</sub> auf die Expression des COX-2 Gens wegfällt bzw. nur noch abgeschwächt vorliegt. Auch die bei ausreichender Sojazufuhr und somit Phytoestrogenaufnahme beobachtete Senkung des Risikos für kardiovaskuläre Erkrankungen (vgl. Kapitel 1.1.2) kann mit dem Einfluss der pflanzlichen Estrogene auf die Expression des COX-2 Gens zusammenhängen.

So beobachteten verschiedene Arbeitsgruppen eine deutlich verstärkte Expression von COX-2 in arteriosklerotischen Plaques (Stemme *et al.*, 2000) und vermuteten einen direkten Einfluss der COX-2 auf die Entzündung dieser Plaques (McGeer *et al.*, 2002). McGeer und Mitarbeitern zufolge ist es demnach denkbar, dass selektive Hemmstoffe der COX-2 den Entzündungsgrad senken und vor kommenden kardiovaskulären Ereignissen schützen können.

Allerdings soll an dieser Stelle darauf hingewiesen werden, dass die Regulation der COX-2 durch Estrogene und Phytoestrogene sehr viel komplexer ist als sie auf den ersten Blick erscheint. Eine Beeinflussung der COX-2 Regulation sowohl transkriptionell als auch posttranskriptionell ist hinlänglich bekannt (Dannenbergh und Zakim, 1999). Spezielle Sequenzen der COX-2 mRNA (so genannte Shaw-Kamen-Sequenzen), die sich in der 3'-untranslatierten Region der mRNA befinden und ein AU-reiches 116 Nukleotide umfassendes Element darstellen (als ARE bezeichnet), regulieren die Stabilität der mRNA teilweise negativ und üben dämpfenden Einfluss auf die Translation aus (Dixon *et al.*, 2000).

Es wird spekuliert, dass die Stabilität der COX-2 mRNA durch ARE-bindende Proteine maßgeblich beeinflussbar ist. Für die Estrogene und Phytoestrogene wäre ein gewebespezifischer Einfluss auf die Expression derartiger Faktoren und somit auf die Stabilität der COX-2 mRNA denkbar. Da jedoch auch der Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B bei der Regulation des COX-2 Promotors eine bedeutende Rolle



spielt (Yan *et al.*, 2002), wird es für die Klärung der Phytoestrogenwirkungen u. a. im Gefäßsystem von großer Bedeutung sein, die molekularen Mechanismen der COX-2 Regulation weiter zu entschlüsseln.

### **5.2.3 Effekte der Phytoestrogene *in vivo* auf die Expression des estrogen-sensitiven Proteins des Progesteronrezeptors**

Neben der Untersuchung der Genexpression des Progesteronrezeptors auf mRNA-Ebene wurde die Expression seines Proteins in Brustdrüsengewebe weiblicher Ratten immunhistochemisch mittels einer Antikörperlösung analysiert (vgl. Kapitel 3.3.5).

Nach der Behandlung der Tiere mit dem synthetischen Estrogen Ethinylestradiol in einer Konzentration von 100 µg/kg KG war eine starke Färbung des Progesteronrezeptors in den Brustdrüsengängen der präparierten Mammae zu erkennen (Abbildung 31, Kapitel 4.2.2). Die Applikation der Phytoestrogene Genistein und Daidzein in den jeweils höchsten Dosierungen von 100 bzw. 500 mg/kg KG zeigte eindeutig estrogenartige Expressionsveränderungen in den Brustdrüsengängen - was auch hier durch die deutliche Rotfärbung mittels AEC-Reagenz angezeigt wurde. Unterschiede in der Lokalisation des PRs gegenüber der EE-Gruppe waren nicht auszumachen, jedoch war die Expressionsstärke nach Behandlung mit einem Phytoestrogen etwas geringer.

Die deutlich höhere Dosierung von Daidzein (500 mg/kg KG) rief in etwa die gleiche Farbintensität hervor wie nach Applikation des schwächer dosierten Genisteins (100 mg/kg KG). Diese deutliche Differenz in der Wirkstärke zwischen Genistein (Trihydroxyisoflavon) und Daidzein (Dihydroxyisoflavon), die sich chemisch lediglich durch eine Hydroxygruppe in Position 5 unterscheiden, zeigte sich bereits in Vorversuchen und führte zu der vierfach höheren eingesetzten Daidzeinmenge (Dai 40 mg/kg KG, Gen 10 mg/kg KG) in Versuchsteil IV.

Vergleicht man die Ergebnisse dieser Untersuchung mit denen, die die Analyse des PRs auf mRNA-Ebene in der Ratte und in den MCF-7 Zellen zum Inhalt hatten (vgl. Abb. 52, Kapitel 5.1.2), so stellt man einen deutlichen Einfluss von Genistein und Daidzein auf den PR bei allen drei untersuchten Parametern fest. Auch wenn durch die unterschiedlichen Dosierungen und Applikationsarten ein direkter Vergleich nicht möglich ist, so zeigen die Phytoestrogene eindeutig estrogenartige Effekte auf den PR - sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene. Allerdings sind

diese messbaren Effekte schwächer als die des natürlichen 17 $\beta$ -Estradiols und des synthetischen Ethinylestradiols.

In der Brustdrüse und in den MCF-7 Zellen verhalten sich die beiden Phytoestrogene Genistein und Daidzein bezüglich der Induktion des PRs in den vorgestellten Ergebnissen wie Agonisten. Dies scheint vor dem Hintergrund des beobachteten Schutzes vor einer Brustkrebserkrankung zunächst erstaunlich. Man nimmt jedoch an, dass auch hier die genaue Wirkweise der Phytoestrogene sehr viel komplizierter abläuft als es zunächst erscheint. Cotroneo und Mitarbeiter vermuteten, dass Genistein seinen Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung der Brustdrüse über eine komplexe Interaktion u. a. mit dem Signaltransduktionsweg des EGF (*epidermal growth factor*) ausübt (Cotroneo *et al.*, 2002).

Wie bereits oben erwähnt, wäre es für weitere Versuche von großem Interesse, ob die Analyse von Proliferationsmarkern (z. B. PCNA, Ki-67) einen Unterschied zwischen reinen Estrogenen und verschiedenen Phytoestrogenen bezüglich der Proliferationsinduktion in Brustdrüsengewebe erkennen ließe.

#### **5.2.4 Analyse der kombinatorischen Effekte von Phytoestrogenen nach gleichzeitiger Applikation mit reinen Estrogenen**

Nach der Untersuchung möglicher agonistischer bzw. antagonistischer Effekte der Phytoestrogene *in vitro* in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 sollten diese Eigenschaften auch *in vivo* im Rattenmodell überprüft werden. In der Literatur finden sich Berichte über erhebliche potenzierende Kombinationseffekte mit Xenoestrogenen (körperfremde Substanzen chemischen oder natürlichen Ursprungs mit Affinität zum Estrogenrezeptor) (Arnold *et al.*, 1996), die jedoch von anderen Arbeitsgruppen nicht bestätigt werden konnten (Ashby *et al.*, 1997; Gaido *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 1997 a/b). Insbesondere vor dem Hintergrund endogener Hormonspiegel, wie sie beim Menschen natürlicherweise vorliegen, sind die Untersuchungen von kombinatorischen Wirkungen *in vivo* nach gemeinsamer Applikation der Untersuchungssubstanzen mit reinen Estrogenen von sehr großer Bedeutung.

In der vorliegenden Arbeit wurden weibliche ovariectomierte Wistar Ratten eingesetzt, die gleichzeitig mit 30  $\mu$ g/kg KG Ethinylestradiol sowie den entsprechenden Untersuchungssubstanzen im *Bioassay* über drei Tage behandelt wurden.

Versuch I (Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung von EE und Genistein) ergab, dass bei einer Dosis von 30 µg/kg KG EE das Uterusfeuchtgewicht halbmaximal stimuliert wurde, so dass theoretisch sowohl antagonistische als auch agonistische bzw. potenzierende Effekte der Kombinationen erfassbar waren.

Aufgrund der größeren Komplexität der *in vivo* Versuche war es nicht möglich alle drei Phytoestrogene im Tier zu testen, so dass sich die Untersuchungen auf das Phytoestrogen Genistein und die Industriechemikalie Bisphenol A (siehe auch Kapitel 2.9) beschränkten. Für diese beiden Substanzen ergaben sich die eingesetzten Dosierungen aus den entsprechenden Daten für die Einzelstoffe.

Die Analyse des Uterusfeuchtgewichtes zeigte weder für das Phytoestrogen Genistein noch für die Industriechemikalie Bisphenol A in Kombination mit EE potenzierende oder antagonistische Effekte. Lediglich bei der Kombination von EE mit dem reinen Antiestrogen Fulvestrant war ein Antagonismus eindeutig festzustellen. Bisphenol A schien weder in Kombination mit EE noch mit Genistein die Wirkung dieser beiden Substanzen zu verstärken. Eine additive Wirkung des Bisphenol A konnte jedoch aufgrund der großen Streubreite der Messwerte nicht endgültig ausgeschlossen werden. Das Phytoestrogen Genistein führte in Kombination mit EE zu rein additiven Effekten auf das Uterusfeuchtgewicht und auch die Kombination aus allen drei Substanzen (EE + Gen + BPA) zeigte den additiven Effekt des Genisteins und den fehlenden Effekt von Bisphenol A.

Die Analyse der Uterusepithelhöhe lieferte für Genistein ebenfalls rein additive Effekte in Kombination mit EE. Jedoch ergab sich nach Auswertung dieses Parameters für Bisphenol A eine sehr schwache, aber statistisch signifikante Tendenz in Richtung Antagonismus, insbesondere in Kombination mit EE.

Die Vaginalepithelhöhe, die sich in Vorversuchen als ein sehr sensitiver Untersuchungsparameter herausstellte, zeigte für EE und die Kombinationen von EE mit Genistein und Bisphenol A bereits die maximal stimulierten Epithelien an. Additive Effekte konnten aus diesem Grund nicht mehr beobachtet werden. Die leicht antagonistische Tendenz des Bisphenol A bestätigte sich bei diesem Messwert jedoch nicht; auch hier zeigte es scheinbar keinerlei Effekt.

Die Analyse der Genexpression von Komplement C3, einem klassisch estrogenregulierten Gen, zeigte lediglich bei der Kombination der drei Substanzen (EE + Gen + BPA) eine signifikante Zunahme der mRNA-Expression. Genistein und Bisphenol A übten in der jeweils alleinigen Kombination mit EE nur sehr geringen

Einfluss auf die Expression aus. Genistein führte tendenziell zu einer leicht additiven Wirkung und Bisphenol A zeigte tendenziell einen schwach antagonisierenden Effekt. Zu erwähnen sei an dieser Stelle noch die Tatsache, dass die Kombination von Genistein und Bisphenol A eine gleich starke Expression von Komplement C3 hervorrief wie die Gabe von EE allein.

Die Genexpression des Clusterin Gens, als einem indirekt estrogenregulierten Gen, führte zu sehr ähnlichen Resultaten. Genistein verstärkte die Wirkung von EE tendenziell, jedoch nicht signifikant. Bisphenol A zeigte wiederum eine leichte Wirkungsabschwächung.

Abschließend bleibt festzustellen, dass Genistein einen leicht additiven Effekt auf die gemessenen Untersuchungsparameter ausübte. Eine Abschwächung der Wirkung von EE etwa durch ein kompetitives Verdrängen des reinen Estrogens vom Estrogenrezeptor durch Genistein konnte auch in diesem Versuch nicht nachgewiesen werden. Somit bestätigen diese Ergebnisse die bereits nach den *in vitro* Versuchen erhobenen Daten. Die für Genistein in Fachkreisen spekulierte Eigenschaft (Verdrängung von E<sub>2</sub> bzw. EE vom Estrogenrezeptor) trifft nach den dargestellten Versuchsergebnissen eher für die Industriechemikalie Bisphenol A zu.

#### **5.2.5 Analyse der organselektiven bzw. gewebespezifischen Effekte der Phytoestrogene durch Vergleich der Genexpression einzelner Gene in verschiedenen Geweben**

Molekulare Grundlagen organselektiver bzw. gewebespezifischer Eigenschaften der Phytoestrogene bzw. deren Zustandekommen sind zum heutigen Zeitpunkt wenig bekannt (Lonard und Smith, 2002). Altersbedingte Erkrankungen und Beschwerden, die mit einem Absinken der endogenen Hormonproduktion in Verbindung gebracht werden, manifestieren sich nicht systemisch, sondern in einzelnen Organen - beispielsweise bei der Osteoporose oder bei kardiovaskulären Ereignissen. Theoretisch sollte es möglich sein, mithilfe von SERMs diese sich einstellenden Beschwerden organselektiv zu behandeln, ohne den gesamten Organismus mit Estrogenen zu belasten und dadurch mögliche Risiken (z. B. Tumorentstehung) in Kauf nehmen zu müssen (Sherman, 2001). Ein Beispiel für einen selektiven Estrogenrezeptor-Modulator, der bereits in der Therapie der Osteoporose Einsatz findet, ist das bereits in Kapitel 1.1.2 erwähnte Raloxifen.

Ziel einer optimalen Therapie von Estrogenmangel-Erkrankungen sollte es jedoch sein, mithilfe der Gewebeselektivität einer Substanz alle positiven Eigenschaften der Estrogene (Schutz vor Herz-Kreislaufkrankungen, Schutz vor Osteoporose, Linderung von klimakterischen Beschwerden) ohne ihre negativen Aspekte (ungewollte Veränderungen in Brust- und Endometriumsgewebe) in einer neuen Verbindung zu vereinen (Cassidy, 1999).

Darüber hinaus ist für jeden Lebensabschnitt eines Organismus (z. B. Embryo, Fetus, Kind, Pubertierender, Erwachsener im reproduktionsfähigen Alter, postmenopausale Frau) mit einem völlig unterschiedlichen Wirkspektrum der Phytoestrogene zu rechnen.

Vor dem Hintergrund dieser Ausführungen sollten im Zuge dieser Arbeit die Effekte der Phytoestrogene (insbesondere von Genistein) auf die mRNA-Expression ausgesuchter Gene in verschiedenen Organen bzw. Geweben verglichen werden, um somit Rückschlüsse auf gewebespezifische Effekte ziehen zu können.

Hierzu wurde die Genexpression des Progesteronrezeptors in der Mamma und in der *Vena cava*, die des Komplement C3 Gens im Uterus sowie des Cyclooxygenase-2 Gens im Uterus und in der *Vena cava* von Wistar Ratten analysiert. Die hierbei im Vergleich zu E<sub>2</sub> beobachteten interessanten gewebespezifischen Unterschiede sollen nun genauer beschrieben werden.

Die Behandlung der Tiere mit EE bzw. E<sub>2</sub> führte in Brustdrüsengewebe eindeutig zu einer verstärkten (sehr) hochsignifikanten Expression des PRs auf mRNA-Ebene. Genistein zeigte auf die Expression in der Mamma einen messbaren zumindest signifikanten Effekt, der jedoch deutlich unter dem des natürlichen und des synthetischen Hormons lag. Auch bei Betrachtung der Expression des PRs in der *Vena cava* stellte man eine deutliche Induktion sowohl nach Behandlung mit E<sub>2</sub> als auch mit Genistein fest. Beide Substanzen unterschieden sich somit nicht in ihren Effekten auf die Expression des PRs in Mamma und *Vena cava*. Unterschiede waren lediglich in der Intensität der Wirkung auszumachen.

Die Expression von Komplement C3 zeigte sowohl für E<sub>2</sub> als auch für Genistein eine Induktion. Da es sich bei den untersuchten Substanzen wie bereits in Kapitel 5.2.2 erläutert um 7-Stundenwerte handelte, zeigte insbesondere E<sub>2</sub> eine verhältnismäßig schwache Induktion, die nach einem längeren Zeitraum deutlich stärker ausfallen würde. Aus den ebenfalls bereits in Kapitel 5.2.2 erwähnten organspezifischen Gründen musste bei der Untersuchung des Uterusgewebes anstelle der

Expression des PRs die Expression von Komplement C3 herangezogen werden. Komplement C3 zählt jedoch ebenso wie der PR zu den direkt estrogenregulierten Genen, da es über drei ERE (*estrogen responsive elements*) in seinem Promotor verfügt.

Von besonderem Interesse ist die Analyse der Expression der Cyclooxygenase-2 in Uterus und *Vena cava* der Tiere. Zunächst einmal muss festgestellt werden, dass die Regulation der COX-2 durch Estrogene in diesen Geweben für sich selbst genommen schon sehr überraschend ist. Bei genauerer Betrachtung stellt man fest, dass die Expression der COX-2 im Uterus durch die Behandlung der Tiere mit E<sub>2</sub> dramatisch stimuliert wurde, während es in der *Vena cava* zu einer signifikanten Unterdrückung der COX-2 Expression kam. Auch Genistein zeigte diese Effekte, wenn auch deutlich schwächer.

Dies bedeutet, dass die Expression eines Genes in zwei verschiedenen Geweben durch ein Hormon gegenläufig gesteuert wird. Für weitere Studien könnte es von großer Bedeutung sein, herauszufinden, welche Zellen in Uterus bzw. im Gefäßsystem für die Produktion der COX-2 verantwortlich sind.

Fasst man diese Ergebnisse aus Mamma, Uterus und *Vena cava* zusammen, so kann man erstens zwischen Genistein und dem natürlichen Hormon 17β-Estradiol keine nennenswerten Unterschiede bezüglich ihrer Wirkung auf einzelne Gene in verschiedenen Geweben feststellen. Lediglich in der Wirkstärke sind Unterschiede auszumachen. Weitere noch nicht reproduzierte Ergebnisse der Arbeitsgruppe am Institut für Morphologie und Tumorforschung der DSHS Köln weisen jedoch darauf hin, dass die Phytoestrogene auf klassisch estrogenregulierte Gene (Komplement C3, Progesteronrezeptor) einen deutlich stärkeren Effekt ausüben als auf alternativ regulierte Gene (Cyclooxygenase-2, IGF-1 = *insulin-like growth factor 1*).

Darüber hinaus wird spekuliert, dass diese Verbindungen pflanzlichen Ursprungs zwar estrogenregulierte Gene ebenso wie das reine Estrogen beeinflussen, dass sie jedoch keinen nennenswerten Einfluss auf die Proliferation von Geweben wie Brustdrüse und Uterus nehmen.

Zweitens zeigen die Ergebnisse eine organspezifische Wirkung von Genistein in verschiedenen Geweben. Die Unterschiede in der Expression des COX-2 Gens in Uterus und *Vena cava* können einen wichtigen Hinweis auf eine mögliche pharmakologische Verwendbarkeit der Phytoestrogene darstellen. Darüber hinaus

weisen die dargestellten Ergebnisse das kardiovaskuläre System als ein sehr sensibles Zielgewebe für Estrogene, aber auch für Phytoestrogene aus.

### 5.2.6 Schlussbetrachtung

Die Schlussbetrachtung soll zum einen die in der Einleitung formulierten Fragestellungen beantworten und zum anderen die gewählten Methoden der vorliegenden Untersuchung kritisch beleuchten.

Insgesamt zeigen die dargestellten Ergebnisse der *in vitro* Untersuchungen in MCF-7 Zellen, dass es sich bei den eingesetzten Isoflavonoiden Genistein, Daidzein und dem Coumestan Coumestrol um Pflanzeninhaltsstoffe mit eindeutig estrogenen Wirkungen handelt. Alle drei Substanzen bewirken eine Senkung der Apoptose- und eine Steigerung der Proliferationsrate. Dosisabhängige Effekte sind insbesondere bei Coumestrol auszumachen. Bei den gewählten Phytoestrogenkonzentrationen von  $[10^{-8} \text{ M}]$  bis  $[10^{-5} \text{ M}]$  sind vergleichbare Effekte wie nach Behandlung mit  $17\beta$ -Estradiol  $[10^{-13} \text{ M}]$  bis  $[10^{-10} \text{ M}]$  zu beobachten. Coumestrol erweist sich nach diesen Analysen als die potenteste Untersuchungssubstanz. Durch die kombinierte Applikation der Phytoestrogene zusammen mit  $E_2$  konnte für alle drei Substanzen ein Antagonismus ausgeschlossen werden. Eine vermehrte Senkung der Apoptoserate beruhte auf rein additiven Wirkungen der Substanzen; potenzierende Effekte konnten ebenfalls ausgeschlossen werden.

MCF-7 Zellen eignen sich sehr gut, um Einflüsse von Untersuchungssubstanzen auf Zellzyklusveränderungen nachzuweisen. Allerdings stellen sie ein artifizielles Testsystem dar, das von sehr vielen äußeren Faktoren abhängig ist. Eine direkte Übertragbarkeit der Ergebnisse auf die Gegebenheiten in einem lebenden Organismus ist zumeist nicht möglich.

Zur weiteren Überprüfung der Phytoestrogenwirkungen wurden die Effekte *in vivo* in weiblichen ovariectomierten Ratten untersucht. Die Analyse verschiedener estrogensensitiver Parameter (Uterusfeuchtgewicht, Epithelhöhen von Uterus und Vagina sowie die mRNA- und Proteinexpression estrogensensitiver Gene) belegte ebenfalls estrogenartige Effekte der Substanzen. In der Wirkstärke lagen die Phytoestrogene jedoch deutlich hinter den reinen Estrogenen  $17\beta$ -Estradiol und Ethinylestradiol zurück. Die kombinierte Applikation eines Phytoestrogens zusammen

mit EE lieferte ebenso wie die *in vitro* Untersuchungen lediglich additive Effekte. Antagonistische Eigenschaften konnten auch hier ausgeschlossen werden.

Die Untersuchung der mRNA-Expression einiger Gene in verschiedenen Geweben zeigte für Genistein ebenso wie für E<sub>2</sub> eine entgegengesetzte Regulation der Cyclooxygenase-2 in Uterus und *Vena cava*.

Unterschiede zwischen E<sub>2</sub> und den Phytoestrogenen zeigten sich bei den gewählten Untersuchungsparametern kaum.

Für weitere Analysen der Phytoestrogenwirkungen sollten in Zukunft Verfahren etabliert werden, die sowohl die Bestimmung von Uterusfeucht- und Uterustrockengewicht ermöglichen als auch die sich anschließende Präparation von mRNA zur Untersuchung von Genexpressionen.

Neben klassisch estrogenregulierten Genen sollten bevorzugt über alternative Mechanismen regulierte Gene und ihre Expression nach Behandlung mit Phytoestrogenen analysiert werden. Die genauen Regulationsmechanismen solcher Gene müssen zum Verständnis der eintretenden Effekte genauer charakterisiert werden. Darüber hinaus stellt die *in vitro* Untersuchung von geeigneten Proliferationsmarkern (z. B. PCNA, Ki-67) eine Möglichkeit dar, um einen Einfluss der Phytoestrogene auf die Zellneubildung zu analysieren.

Abschließend soll an dieser Stelle erwähnt werden, dass neben den weiblichen Tieren zukünftig auch männliche Tiere in die Untersuchungen einbezogen werden müssen.



## 6 ZUSAMMENFASSUNG

Phytoestrogene (pflanzliche Inhaltsstoffe mit Affinität zum Estrogenrezeptor) haben in den vergangenen Jahrzehnten in zunehmendem Maße aufgrund ihrer pharmakologischen Eigenschaften wissenschaftliches Interesse geweckt. Darüber hinaus sind diese Substanzen in den letzten Jahren auch zunehmend in das Interesse der breiten Bevölkerung gerückt. Durch die teilweise aggressive Bewerbung von phytoestrogenhaltigen Produkten (z. B. Nahrungsergänzungsmitteln und Arzneimitteln) erscheinen diese als die „effektivste und nebenwirkungsfreie“ Alternative zu synthetischen Hormonen, so z. B. zur Behandlung von klimakterischen Beschwerden. Als weiterer pharmakologischer Nutzen der Verbindungen werden der Schutz vor hormonabhängigen Krebserkrankungen (z. B. Brust- oder Prostatakrebs), Osteoporose und kardiovaskulären Erkrankungen in die Diskussion eingebracht.

Diese Erkenntnisse zum möglichen Wirkspektrum der Phytoestrogene beruhen jedoch in erster Linie auf Beobachtungen einzelner Völkergruppen und ihrer Ernährungsgewohnheiten.

Auf der anderen Seite werden gerade von Wissenschaftlern Befürchtungen geäußert, dass die genannten Pflanzeninhaltsstoffe natürliche hormonelle Regelkreise stören und dadurch die Entstehung von Unfruchtbarkeit, Fehlbildungen bei Embryonen und auch Krebserkrankungen fördern können.

Ziel dieser Arbeit mit dem Titel „Charakterisierung ausgesuchter Pflanzeninhaltsstoffe im Hinblick auf ihre estrogene Wirkung“ war es demnach, die Phytoestrogene Genistein, Daidzein und Coumestrol *in vitro* in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 und *in vivo* im Rattenmodell genauer zu charakterisieren und einen Beitrag zu der Aufklärung ihrer molekularen Wirkmechanismen zu leisten. Insbesondere sollte die Frage geklärt werden, ob sich die genannten Substanzen wie reine Estrogene verhalten oder ob sie eher der Klasse der selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERM) zuzurechnen sind. Als Beispiel für synthetische Verbindungen mit Affinität zum Estrogenrezeptor, die ihre estrogenartige Wirkung jedoch nur in bestimmten Geweben entfalten, seien Tamoxifen und Raloxifen genannt.

Zunächst wurden die Substanzen in MCF-7 Zellen - einem seit vielen Jahren etablierten *in vitro* Testsystem - auf Estrogenität untersucht. Die Analyse der Zellkulturexperimente belegte für die drei ausgewählten Phytoestrogene eindeutig eine dem Estrogen sehr ähnliche Wirkung. Analog zu  $17\beta$ -Estradiol stimulierten die Untersuchungssubstanzen Genistein, Daidzein und Coumestrol die Proliferation der Zellen und hemmten ihre Apoptose. In Kombination mit dem natürlichen Estrogen zeigten die Phytoestrogene keine Tendenz zum Antagonismus. Bezogen auf den Parameter Apoptosehemmung verstärkten sie die  $E_2$ -Wirkung; ein Einfluss auf die gesteigerte Proliferation durch  $E_2$  war nicht auszumachen. Von den drei untersuchten Pflanzeninhaltsstoffen erwies sich Coumestrol am potentesten und zeigte die größte Ähnlichkeit mit dem natürlichen Estrogen.

Die Analyse der Tierexperimente in weiblichen ovariectomierten Ratten verschiedener Stämme (Wistar, Da/Han, Sprague-Dawley) lieferte ein sehr komplexes Bild an Informationen. Durch die kombinierte Applikation des synthetischen Estrogens Ethinylestradiol zusammen mit dem Phytoestrogen Genistein konnte für das Phytoestrogen auch *in vivo* kein Hinweis auf einen Antagonismus erbracht werden. Die Analyse der Parameter Uterusfeuchtgewicht, Uterus- und Vaginalepithelhöhen sowie die Genexpression estrogensensitiver Gene im Uterus lieferte ebenfalls lediglich additive Effekte. Somit konnte keine Bestätigung der häufig postulierten These erbracht werden, Phytoestrogene verdrängen das deutlich potentere natürliche Estrogen  $17\beta$ -Estradiol (oder das synthetische Ethinylestradiol) vom Estrogenrezeptor und schützen somit vor dessen Wirkungen.

Im uterotrophen Assay induzierten die Substanzen Genistein und Daidzein im Gegensatz zu Estradiol nur eine sehr schwache Zunahme des Uterusfeuchtgewichtes, die nach kurzer Zeit wieder verschwand. Jedoch zeigte die Analyse der mRNA-Expression des estrogensensitiven Gens Komplement C3 im Uterus ein deutliches Ansprechen sowohl auf die Applikation des natürlichen und synthetischen Estrogens ( $E_2$  und EE) als auch auf die Gabe von Phytoestrogenen. Im Gegensatz dazu induzierte das Phytoestrogen Genistein die Expression der Cyclooxygenase-2 im Uterus nur verhältnismäßig schwach.

Auch die Analyse der Brustdrüse der weiblichen Tiere und hierbei insbesondere die Expression des Progesteronrezeptors (PR) auf mRNA- und Proteinebene lieferte durch die Induktion des PRs Beweise für einen eindeutig estrogenen Effekt durch Genistein und Daidzein.

Abschließend zeigte die Untersuchung der *Vena cava* als Bestandteil des kardiovaskulären Systems durch Analyse der mRNA-Expression des Progesteronrezeptors und der Cyclooxygenase-2 für Genistein ebenso wie für E<sub>2</sub> eine Induktion des PRs und eine Reprimierung der COX-2.

Zusätzlich konnte durch Vergleich der Expressionen der COX-2 in den beiden Organen bzw. Geweben (Uterus und *Vena cava*) eine entgegengesetzte Regulation des Gens auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. Während sowohl das natürliche Estrogen als auch das Phytoestrogen im Uterus die Expression der COX-2 induzierten, wurde sie in der *Vena cava* reprimiert.

Zusammenfassend liefern die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Arbeit die Erkenntnis, dass es sich bei Phytoestrogenen um durchaus wirksame Verbindungen handelt, die in ihrer Wirkstärke jedoch je nach Untersuchungsparameter deutlich hinter den reinen Estrogenen (E<sub>2</sub>, EE) zurückbleiben. Sie lassen sich ebenso wie endogene und synthetische Verbindungen als Agonisten, Antagonisten und Partialagonisten klassifizieren und greifen vielfältig in molekulare Wirkmechanismen ein.

Auch wenn sich die in dieser Arbeit untersuchten Phytoestrogene Genistein, Daidzein und Coumestrol scheinbar als Agonisten darstellen, zeigen andere vorgestellte Versuchsergebnisse, dass jede einzelne Substanz einer individuellen Prüfung ihrer pharmakologischen Eigenschaften in verschiedenen *in vivo* und *in vitro* Testsystemen bedarf. Viel versprechende neue, jedoch noch nicht veröffentlichte Ergebnisse weisen darauf hin, dass insbesondere Genistein zwar eine Vielzahl klassisch regulierter Gene ebenso wie E<sub>2</sub> induziert, alternativ regulierte Gene sowie Gene, die eine Proliferation anzeigen (PCNA, Ki-67), jedoch nicht beeinflusst. Falls sich diese Untersuchungsergebnisse in Zukunft bestätigen ließen, wäre für Genistein eine eindeutig partialagonistische Wirkweise belegt.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

**Abou-Issa, H. M., Alshafie, G. A., Seibert, K., Koki, A. T., Masferrer, J. L. & Harris, R. E. (2001):** Dose-response effects of the COX-2 inhibitor, celecoxib, on the chemoprevention of mammary carcinogenesis.  
*Anticancer Res* 21(5): 3425-3432

**Adams, N. R. (1995 a):** Organizational and activational effects of phytoestrogens on the reproductive tract of the ewe.  
*Proc Soc Exp Biol Med* 208(1): 87-91

**Adams, N. R. (1995 b):** Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle.  
*J Anim Sci* 73(5): 1509-1515

**Adlercreutz, H., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J. T., Woods, M., Goldin, B. R. & Gorbach, S. L. (1982):** Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer.  
*Lancet* 2(8311): 1295-1299

**Adlercreutz, H. (1990 a):** Western diet and Western diseases: some hormonal and biochemical mechanisms and associations.  
*Scand J Clin Lab Invest Suppl* 201: 3-23

**Adlercreutz, H. (1990 b):** Diet, breast cancer, and sex hormone metabolism.  
*Ann N Y Acad Sci* 595: 281-290

**Adlercreutz, H. & Mazur, W. (1997):** Phyto-oestrogens and Western diseases.  
*Ann Med* 29(2): 95-120

**Alexandersen, P., Haarbo, J., Breinholt, V. & Christiansen, C. (2001):** Dietary phytoestrogens and estrogen inhibit experimental atherosclerosis.  
*Climacteric* 4(2): 151-159

**Alle, K. M., Henshall, S. M., Field, A. S. & Sutherland, R. L. (1998):** Cyclin D1 protein is overexpressed in hyperplasia and intraductal carcinoma of the breast.  
*Clin Cancer Res* 4(4): 847-854

**Allred, C. D., Allred, K. F., Ju, Y. H., Virant, S. M. & Helferich, W. G. (2001):** Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner.  
*Cancer Res* 61(13): 5045-5050

**Almstrup, K., Fernandez, M. F., Petersen, J. H., Olea, N., Skakkebaek, N. E. & Leffers, H. (2002):** Dual effects of phytoestrogens result in u-shaped dose-response curves.  
*Environ Health Perspect* 110(8): 743-748

**Anderson, J. J. & Garner, S. C. (1998):** Phytoestrogens and bone.  
*Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12(4): 543-557

**Andlauer, W., Kolb, J., Stehle, P. & Furst, P. (2000 a):** Absorption and metabolism of genistein in isolated rat small intestine.  
*J Nutr* 130(4): 843-846

**Andlauer, W., Kolb, J. & Furst, P. (2000 b):** Isoflavones from tofu are absorbed and metabolized in the isolated rat small intestine.  
*J Nutr* 130(12): 3021-3027

**Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland, in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch Institut (2002):** Krebs in Deutschland - Häufigkeiten und Trends.  
Saarbrücken

**Arber, N., Hibshoosh, H., Moss, S. F., Sutter, T., Zhang, Y., Begg, M., Wang, S., Weinstein, I. B. & Holt, P. R. (1996):** Increased expression of cyclin D1 is an early event in multistage colorectal carcinogenesis.  
*Gastroenterology* 110(3): 669-674

**Arber, N., Doki, Y., Han, E. K., Sgambato, A., Zhou, P., Kim, N. H., Delohery, T., Klein, M. G., Holt, P. R. & Weinstein, I. B. (1997):** Antisense to cyclin D1 inhibits the growth and tumorigenicity of human colon cancer cells.  
*Cancer Res* 57(8): 1569-1574

**Arber, N., Gammon, M. D., Hibshoosh, H., Britton, J. A., Zhang, Y., Schonberg, J. B., Rotterdam, H., Fabian, I., Holt, P. R. & Weinstein, I. B. (1999):** Overexpression of cyclin D1 occurs in both squamous carcinomas and adenocarcinomas of the esophagus and in adenocarcinomas of the stomach.  
*Hum Pathol* 30(9): 1087-1092

**Arnold, S. F., Klotz, D. M., Collins, B. M., Vonier, P. M., Guillette, L. J. Jr. & McLachlan, J. A. (1996):** Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals.  
*Science* 272(5267): 1489-1492  
→ zurückgezogen: siehe McLachlan 1997

**Ashby, J., Lefevre, P. A., Odum, J., Harris, C. A., Routledge, E. J. & Sumpter, J. P. (1997):** Synergy between synthetic oestrogens?  
*Nature* 385(6616): 494

**Barkhem, T., Carlsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J. & Nilsson, S. (1998):** Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists.  
*Mol Pharmacol* 54(1): 105-112

**Barnes, S., Sfakianos, J., Coward, L. & Kirk, M. (1996):** Soy isoflavonoids and cancer prevention. Underlying biochemical and pharmacological issues.  
*Adv Exp Med Biol* 401: 87-100

- Barnes, D. M. & Gillett, C. E. (1998):** Cyclin D1 in breast cancer.  
*Breast Cancer Res Treat* 52(1-3): 1-15
- Beato, M., Herrlich, P. & Schutz, G. (1995):** Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot.  
*Cell* 83(6): 851-857
- Beato, M., Chavez, S. & Truss, M. (1996):** Transcriptional regulation by steroid hormones.  
*Steroids* 61(4): 240-251
- Bennetts, H. W., Underwood, E. J. & Shier, F. L. (1946):** A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia.  
*Aust Vet J* 22: 2-12
- Bergan, R. C., Waggle, D. H., Carter, S. K., Horak, I., Slichenmyer, W. & Meyers, M. (2001):** Tyrosine kinase inhibitors and signal transduction modulators: Rationale and current status as chemopreventive agents for prostate cancer.  
*Urology* 57(4 Suppl 1): 77-80
- Bier, B., Bankfalvi, A., Grote, L., Blasius, S., Ofner, D., Bocker, W., Jasani, B. & Schmid, K. W. (1995):** Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue.  
*Histochem J* 27(2): 148-154
- Blobel, G. A., Sieff, C. A. & Orkin, S. H. (1995):** Ligand-dependent repression of the erythroid transcription factor GATA-1 by the estrogen receptor.  
*Mol Cell Biol* 15(6): 3147-3153
- Boersma, B. J., Barnes, S., Kirk, M., Wang, C. C., Smith, M., Kim, H., Xu, J., Patel, R. & Darley-Usmar, V. M. (2001):** Soy isoflavonoids and cancer - metabolism at the target site.  
*Mutat Res* 480-481: 121-127
- Bouchard, P. (1999):** Progesterone and the progesterone receptor.  
*J Reprod Med* 44(2 Suppl): 153-157
- Bostrom, P. J., Aaltonen, V., Soderstrom, K. O., Uotila, P. & Laato, M. (2001):** Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in urinary bladder carcinomas in vivo and in vitro and prostaglandin E2 synthesis in cultured bladder cancer cells.  
*Pathology* 33(4): 469-474
- Bourne, J. A.:** Handbuch der Immunperoxidase Färbemethoden.  
Immunochemistry Laboratory, DAKO Corporation
- Brann, D. W., Hendry, L. B. & Mahesh, V. B. (1995):** Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones.  
*J Steroid Biochem Mol Biol* 52(2): 113-133

**Brotons, J. A., Olea-Serrano, M. F., Villalobos, M., Pedraza, V. & Olea, N. (1995):** Xenoestrogens released from lacquer coatings in food cans.  
*Environ Health Perspect* 103(6): 608-612

**Brzozowski, A. M., Pike, A. C., Dauter, Z., Hubbard, R. E., Bonn, T., Engstrom, O., Ohman, L., Greene, G. L., Gustafsson, J. A. & Carlquist, M. (1997):** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor.  
*Nature* 389(6652): 753-758

**Cassidy, A., Bingham, S. & Setchell, K. D. (1994):** Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women.  
*Am J Clin Nutr* 60(3): 333-340

**Cassidy, A. (1999):** Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens.  
*Curr Opin Lipidol* 10(1): 47-52

**Castro-Rivera, E., Samudio, I. & Safe, S. (2001):** Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements.  
*J Biol Chem* 276(33): 30853-30861

**Choi, Y. H., Zhang, L., Lee, W. H. & Park, K. Y. (1998):** Genistein-induced G2/M arrest is associated with the inhibition of cyclin B1 and the induction of p21 in human breast carcinoma cells.  
*Int J Oncol* 13(2): 391-396

**Colditz, G. A. (1993):** Epidemiology of breast cancer. Findings from the nurses' health study.  
*Cancer* 71(4 Suppl): 1480-1489

**Constantinou, A. I., Mehta, R. G. & Vaughan, A. (1996):** Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mammary tumors in rats by the soybean isoflavones.  
*Anticancer Res* 16(6A): 3293-3298

**Cotroneo, M. S., Wang, J., Fritz, W. A., Eltoum, I. E. & Lamartiniere, C. A. (2002):** Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model.  
*Carcinogenesis* 23(9): 1467-1474

**Coulter Electronics GmbH (1989):** Bedienungsanleitung des Coulter Epics® Profile II.  
Krefeld

**Coulter-Immunotech Diagnostics (1998):** Immunhistologie Handbuch.  
Krefeld

**Cowley, S. M., Hoare, S., Mosselman, S. & Parker, M. G. (1997):** Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA.  
*J Biol Chem* 272(32): 19858-19862

**Critchley, H. O., Brenner, R. M., Henderson, T. A., Williams, K., Nayak, N. R., Slayden, O. D., Millar, M. R. & Saunders, P. T. (2001):** Estrogen receptor beta, but not estrogen receptor alpha, is present in the vascular endothelium of the human and nonhuman primate endometrium.

*J Clin Endocrinol Metab* 86(3): 1370-1378

**Dannenbergh, A. J. & Zakim, D. (1999):** Chemoprevention of colorectal cancer through inhibition of cyclooxygenase-2.

*Semin Oncol* 26(5): 499-504

**Dees, C., Foster, J. S., Ahamed, S. & Wimalasena, J. (1997):** Dietary estrogens stimulate human breast cells to enter the cell cycle.

*Environ Health Perspect* 105(Suppl 3): 633-636

**Diel, P., Smolnikar, K. & Michna, H. (1999):** In vitro test systems for the evaluation of the estrogenic activity of natural products.

*Planta Med* 65(3):197-203

**Diel, P., Schulz, T., Smolnikar, K., Strunck, E., Vollmer, G. & Michna, H. (2000):** Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity.

*J Steroid Biochem Mol Biol* 73(1-2): 1-10

**Diel, P., Olf, S., Schmidt, S. & Michna, M. (2001):** Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7.

*Planta Med* 67(6): 510-514

**Diel, P. (2002):** Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms.

*Toxicol Lett* 127(1-3): 217-224

**Dixon, D. A., Kaplan, C. D., McIntyre, T. M., Zimmerman, G. A. & Prescott, S. M. (2000):** Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region.

*J Biol Chem* 275(16): 11750-11757

**Dixon, R. A. & Ferreira, D. (2002):** Genistein.

*Phytochemistry* 60(3): 205-211

**Djuric, Z., Chen, G., Doerge, D. R., Heilbrun, L. K. & Kucuk, O. (2001):** Effect of soy isoflavone supplementation on markers of oxidative stress in men and women.

*Cancer Lett* 172(1): 1-6

**Eldridge, A. C. (1982):** Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates.

*J Agri Food Chem* 30(2): 353-355

**Elkak, A. E. & Mokbel, K. (2001):** Pure antiestrogens and breast cancer.

*Curr Med Res Opin* 17(4): 282-289



**Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjold, M. & Gustafsson, J. A. (1997):** Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern.  
*J Clin Endocrinol Metab* 82(12): 4258-4265

**Enmark, E. & Gustafsson, J. A. (1999):** Oestrogen receptors – an overview.  
*J Intern Med* 246(2): 133-138

**Faloona, F., Weiss, S., Ferre, F. & Mullis, K. (1990):** Direct detection of HIV sequences in blood: high gain polymerase chain reaction.  
Abstract #1019, 6<sup>th</sup> Int. Conf. on AIDS, San Francisco, CA, USA

**Fan, J. D., Wagner, B. L. & McDonnell, D. P. (1996):** Identification of the sequences within the human complement C3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity.  
*Mol Endocrinol* 10(12): 1605-1616

**Fillit, H., Weinreb, H., Cholst, I., Luine, V., McEwen, B., Amador, R. & Zabriskie, J. (1986):** Observations in a preliminary open trial of estradiol therapy for senile dementia-Alzheimer's type.  
*Psychoneuroendocrinology* 11(3): 337-345

**Fioravanti, L., Cappelletti, V., Miodini, P., Ronchi, E., Brivio, M. & Di Fronzo, G. (1998):** Genistein in the control of breast cancer cell growth: insights into the mechanism of action in vitro.  
*Cancer Lett* 130(1-2): 143-152

**Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R. & Schweigerer, L. (1993):** Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis.  
*Proc Natl Acad Sci USA* 90(7): 2690-2694

**Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Hase, T., Montesano, R. & Schweigerer, L. (1995):** Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis.  
*J Nutr* 125(3 Suppl): 790S-797S

**Freni-Titulaer, L. W., Cordero, J. F., Haddock, L., Lebron, G., Martinez, R. & Mills, J. L. (1986):** Premature thelarche in Puerto Rico. A search for environmental factors.  
*Am J Dis Child* 140(12): 1263-1267

**Furlow, J. D., Murdoch, F. E. & Gorski, J. (1993):** High affinity binding of the estrogen receptor to a DNA response element does not require homodimer formation or estrogen.  
*J Biol Chem* 268(17): 12519-12525

**Gaido, K. W., McDonnell, D. P., Korach, K. S. & Safe, S. H. (1997):** Estrogenic activity of chemical mixtures: is there synergism?  
*CIIT Activities* 17(2): 1-7

**Gately, S. (2000):** The contributions of cyclooxygenase-2 to tumor angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev* 19(1-2): 19-27

**Genzlinger, A. (1999):** Apoptosebestimmung mittels 2-Parameter-Durchflusszytometrie, Agarose-Gelelektrophorese und Fluoreszenzmikroskopie nach Induktion durch alpha, beta-ungesättigte Aldehyde und Ketone. Dissertation des FB Biologie, Universität Kaiserslautern

**Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hg.)(2000):** Genistein - Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen. BUA-Stoffbericht 222 Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft S. Hirzel

**Giercksky, K. E. (2001):** COX-2 inhibition and prevention of cancer. *Best Pract Res Clin Gastroenterol* 15(5): 821-833

**Gillett, C., Smith, P., Gregory, W., Richards, M., Millis, R., Peters, G. & Barnes, D. (1996):** Cyclin D1 and prognosis in human breast cancer. *Int J Cancer* 69(2): 92-99

**Giovannucci, E., Rimm, E. B., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Ascherio, A. & Willett, W. C. (1994):** Aspirin use and the risk for colorectal cancer and adenoma in male health professionals. *Ann Intern Med* 121(4): 241-246

**Giovannucci, E., Egan, K. M., Hunter, D. J., Stampfer, M. J., Colditz, G. A., Willett, W. C. & Speizer, F. E. (1995):** Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333(10): 609-614

**Graham, J. D. & Clarke, C. L. (1997):** Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* 18(4): 502-519

**Gronemeyer, H., Benhamou, B., Berry, M., Bocquel, M. T., Gofflo, D., Garcia, T., Lerouge, T., Metzger, D., Meyer, M. E., Tora, L., et al. (1992):** Mechanisms of antihormone action. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41(3-8): 217-221

**Gustafsson, J. A. (1999):** Estrogen receptor beta – a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163(3): 379-383

**Han, E. K., Lim, J. T., Arber, N., Rubin, M. A., Xing, W. Q. & Weinstein, I. B. (1998):** Cyclin D1 expression in human prostate carcinoma cell lines and primary tumors. *Prostate* 35(2): 95-101

**Henderson, B. E., Ross, R. K., Paganini-Hill, A. & Mack, T. M. (1986):** Estrogen use and cardiovascular disease. *Am J Obstet Gynecol* 154(6): 1181-1186

- Henderson, B. E., Paganini-Hill, A. & Ross, R. K. (1988):** Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction.  
*Am J Obstet Gynecol* 159(2): 312-317
- Higuchi, R., Dollinger, G., Walsh, P. S. & Griffith, R. (1992):** Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences.  
*Biotechnology (NY)* 10(4): 413-417
- Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G. & Watson, R. (1993):** Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reactions.  
*Biotechnology (NY)* 11(9): 1026-1030
- Hofmann, W., Schlag, P. M. & Scherneck, S. (1998):** Genetische Prädisposition beim Mammakarzinom.  
*Onkologie* 4(10): 868-877
- Horowitz, M. C. (1993):** Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects.  
*Science* 260(5108): 626-627
- Horwitz, K. B., Koseki, Y. & McGuire, W. L. (1978):** Estrogen control of progesterone receptor in human breast cancer: role of estradiol and antiestrogen.  
*Endocrinology* 103(5): 1742-1751
- Howe, L. R., Subbaramaiah, K., Brown, A. M. & Dannenberg, A. J. (2001):** Cyclooxygenase-2: a target for the prevention and treatment of breast cancer.  
*Endocr Relat Cancer* 8(2): 97-114
- Howell, A., Osborne, C. K., Morris, C. & Wakeling, A. E. (2000):** ICI 182,780 (Faslodex): development of a novel, "pure" antiestrogen.  
*Cancer* 89(4): 817-825
- Hsieh, C. Y., Santell, R. C., Haslam, S. Z. & Helferich, W. G. (1998):** Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo.  
*Cancer Res* 58(17): 3833-3838
- Huang, Y., Ray, S., Reed, J. C., Ibrado, A. M., Tang, C., Nawabi, A. & Bhalla, K. (1997):** Estrogen increases intracellular p26Bcl-2 to p21Bax ratios and inhibits taxol-induced apoptosis of human breast cancer MCF-7 cells.  
*Breast Cancer Res Treat* 42: 73-81
- Hunnius (1998):** Pharmazeutisches Wörterbuch.  
Berlin, New York: Walter de Gruyter
- Ignar-Trowbridge, D. M., Pimentel, M., Teng, C. T., Korach, K. S. & McLachlan, J. A. (1995):** Cross talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling systems.  
*Environ Health Perspect* 103(Suppl 7): 35-38

**Inaba, A., Uchiyama, T. & Oka, M. (1999):** Role of prostaglandin E2 in rat colon carcinoma.

*Hepatogastroenterology* 46(28): 2347-2351

**Inoue, S., Ogawa, S., Horie, K., Hoshino, S., Goto, W., Hosoi, T., Tsutsumi, O., Muramatsu, M. & Ouchi, Y. (2000):** An estrogen receptor beta isoform that lacks exon 5 has dominant negative activity on both ERalpha and ERbeta.

*Biochem Biophys Res Commun* 279(3): 814-819

**Iwamura, M., Abrahamsson, P. A., Benning, C. M., Cockett, A. T. & di Sant'Agnese, P. A. (1994):** Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment.

*J Histochem Cytochem* 42(6): 783-788

**Jensen, E. V. (1996):** Steroid hormones, receptors, and antagonists.

*Ann N Y Acad Sci* 784: 1-17

**Joe, A. K., Arber, N., Bose, S., Heitjan, D., Zhang, Y., Weinstein, I. B. & Hishoosh, H. (2001):** Cyclin D1 overexpression is more prevalent in non-Caucasian breast cancer.

*Anticancer Res* 21(5): 3535-3539

**Ju, Y. H., Carlson, K. E., Sun, J., Pathak, D., Katzenellenbogen, B. S., Katzenellenbogen, J. A. & Helferich, W. G. (2000):** Estrogenic effects of extracts from cabbage, fermented cabbage, and acidified brussels sprouts on growth and gene expression of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) cells.

*J Agric Food Chem* 48(10): 4628-4634

**Kallela, K. (1964):** The incidence of plant oestrogens in Finnish pasture and fodder plants with special reference to their possible effects in cases of sterility in/of ruminants.

*Thesis – College of Veterinary Medicine, Helsinki* 132

**Kallela, K., Heinonen, K. & Saloniemi, H. (1984):** Plant oestrogens; the cause of decreased fertility in cows. A case report.

*Nord Vet Med* 36(3-4): 124-129

**Kallela, K. & Ettala, E. (1984):** The oestrogenic Fusarium toxin (zearalenone) in hay as a cause of early abortions in the cow.

*Nord Vet Med* 36(9-10): 305-309

**Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J. & Owens, W. (2001):** The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1.

*Environ Health Perspect* 109(8): 785-794

**Keung, W. M. (1993):** Biochemical studies of a new class of alcohol dehydrogenase inhibitors from *Radix puerariae*.

*Alcohol Clin Exp Res* 17(6): 1254-1260

- Keung, W. M. & Vallee, B. L. (1993):** Daidzin: a potent, selective inhibitor of human mitochondrial aldehyde dehydrogenase.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4): 1247-1251
- Kim, H., Peterson, T. G. & Barnes, S. (1998):** Mechanisms of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor beta signaling pathways.  
*Am J Clin Nutr* 68(6 Suppl): 1418S-1425S
- King, W. J. & Greene, G. L. (1984):** Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells.  
*Nature* 307(5953): 745-747
- Knauthe, R., Diel, P., Hegele-Hartung, C., Engelhaupt, A. & Fritzemeier, K. H. (1996):** Sexual dimorphism of steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid expression and hormonal regulation in rat vascular tissue.  
*Endocrinology* 137(8): 3220-3227
- Knippers, R. (2001):** Molekulare Genetik.  
Stuttgart, New York: Thieme
- Kristensen, V. N. & Borresen-Dale, A. L. (2000):** Molecular epidemiology of breast cancer: genetic variation in steroid hormone metabolism.  
*Mutat Res* 462(2-3): 323-333
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. (1996):** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12): 5925-5930
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. & Gustafsson, J. A. (1997):** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta.  
*Endocrinology* 138(3): 863-870
- Kuiper, G. G., Lemmen, J. G., Carlsson, B., Corton, J. C., Safe, S. H., van der Saag, P. T., van der Burg, B. & Gustafsson, J. A. (1998):** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta.  
*Endocrinology* 139(10): 4252-4263
- Kulkarni, S., Rader, J. S., Zhang, F., Liapis, H., Koki, A. T., Masferrer, J. L., Subbaramaiah, K. & Dannenberg, A. J. (2001):** Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer.  
*Clin Cancer Res* 7(2): 429-434
- Kundu, N. & Fulton, A. M. (2002):** Selective cyclooxygenase (COX)-1 or COX-2 inhibitors control metastatic disease in a murine model of breast cancer.  
*Cancer Res* 62(8): 2343-2346
- Lamartiniere, C. A., Moore, J. B., Brown, N. M., Thompson, R., Hardin, M. J. & Barnes, S. (1995):** Genistein suppresses mammary cancer in rats.  
*Carcinogenesis* 16(11): 2833-2840

- Lamartiniere, C. A. (2000):** Protection against breast cancer with genistein: a component of soy.  
*Am J Clin Nutr* 71(6 Suppl): 1705S-1707S
- Lamartiniere, C. A. (2002):** Timing of exposure and mammary cancer risk.  
*J Mammary Gland Biol Neoplasia* 7(1): 67-76
- Le Bail, J. C., Varnat, F., Nicolas, J. C. & Habrioux, G. (1998):** Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids.  
*Cancer Lett* 130(1-2): 209-216
- Liehr, J. G. (2000):** Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?  
*Endocr Rev* 21(1): 40-54
- Lindner, V., Kim, S. K., Karas, R. H., Kuiper, G. G., Gustafsson, J. A. & Mendelsohn, M. E. (1998):** Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury.  
*Circ Res* 83(2): 224-229
- Liu, M. M., Albanese, C., Anderson, C. M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R. M., Price, R. H. Jr., Pestell, R. G. & Kushner, P. J. (2002):** Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression.  
*J Biol Chem* 277(27): 24353-24360
- Lock, M. (1986):** Ambiguities of aging: Japanese experience and perceptions of menopause.  
*Cult Med Psychiatry* 10(1): 23-46
- Lonard, D. M. & Smith, C. L. (2002):** Molecular perspectives on selective estrogen receptor modulators (SERMs): progress in understanding their tissue-specific agonist and antagonist actions.  
*Steroids* 67(1): 15-24
- Loo, D. T. & Rillema, J. R. (1998):** Measurement of cell death.  
*Methods Cell Biol* 57: 251-264
- Maggiolini, M., Bonofiglio, D., Marsico, S., Panno, M. L., Cenni, B., Picard, D. & Ando, S. (2001):** Estrogen receptor alpha mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells.  
*Mol Pharmacol* 60(3): 595-602
- Makela, S., Davis, V., Tally, W. C., Korkman, J., Salo, L., Vihko, R., Santti, R. & Korach, K. S. (1994):** Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells.  
*Environ Health Perspect* 102(6-7): 572-578
- Manolagas, S. C., Bellido, T. & Jilka, R. L. (1995):** New insights into the cellular, biochemical, and molecular basis of postmenopausal and senile osteoporosis: roles of IL-6 and gp130.  
*Int J Immunopharmacol* 17(2): 109-116

- McGeer, P. L., McGeer, E. G. & Yasojima, K. (2002):** Expression of COX-1 and COX-2 mRNAs in atherosclerotic plaques.  
*Exp Gerontol* 37(7): 925-929
- McLachlan, J. A. & Newbold, R. R. (1987):** Estrogens and development.  
*Environ Health Perspect* 75: 25-27
- McLachlan, J. A. (1997):** Synergistic effect of environmental estrogens: report withdrawn.  
*Science* 277(5325): 462-463
- Miksicek, R. J. (1995):** Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity.  
*Proc Soc Exp Biol Med* 208(1): 44-50
- Mitchner, N. A., Garlick, C. & Ben-Jonathan, N. (1998):** Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland.  
*Endocrinology* 139(9): 3976-3983
- Mitchner, N. A., Garlick, C., Steinmetz, R. W. & Ben-Jonathan, N. (1999):** Differential regulation and action of estrogen receptors alpha and beta in GH3 cells.  
*Endocrinology* 140(6): 2651-2658
- Miyake, H., Gleave, M., Kamidono, S. & Hara, I. (2002):** Overexpression of clusterin in transitional cell carcinoma of the bladder is related to disease progression and recurrence.  
*Urology* 59(1): 150-154
- Moss, R. L., Gu, Q. & Wong, M. (1997):** Estrogen: nontranscriptional signaling pathway.  
*Recent Prog Horm Res* 52: 33-68
- Mosselman, S., Polman, J. & Dijkema, R. (1996):** ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor.  
*FEBS Lett* 392(1): 49-53
- Moyad, M. A. (2001):** An introduction to aspirin, NSAids, and COX-2 inhibitors for the primary prevention of cardiovascular events and cancer and their potential preventive role in bladder carcinogenesis: part II.  
*Semin Urol Oncol* 19(4): 306-316
- Mueller, S. O. & Korach, K. S. (2001):** Mechanism of estrogen receptor-mediated agonistic and antagonistic effects.  
In: Metzler, M. (Hg.) *Endocrine Disruptors, The Handbook of Environmental Chemistry* 3: 3-25  
Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction.  
In: Wu, R. (Hg.) *Methods in Enzymology* 155: 335-350  
San Diego: Academic Press Inc.

- Murkies, A. L., Lombard, C., Strauss, B. J., Wilcox, G., Burger, H. G. & Morton, M. S. (1995):** Dietary flour supplementation decreases post-menopausal hot flashes: effect of soy and wheat.  
*Maturitas* 21(3): 189-195
- Murkies, A. L., Wilcox, G. & Davis, S. R. (1998):** Clinical review 92: Phytoestrogens.  
*J Clin Endocrinol Metab* 83(2): 297-303
- Murphy, L. D., Herzog, C. E., Rudick, J. B., Fojo, A. T. & Bates, S. E. (1990):** Use of the polymerase chain reaction in the quantitation of mdr-1 gene expression.  
*Biochemistry* 29(45): 10351-10356
- Murphy, P. A. (1982):** Phytoestrogen content of processed soybean products.  
*Food Tech* 34: 60-64
- Murrill, W. B., Brown, N. M., Zhang, J. X., Manzolillo, P. A., Barnes, S. & Lamartiniere, C. A. (1996):** Prepubertal genistein exposure suppresses mammary cancer and enhances gland differentiation in rats.  
*Carcinogenesis* 17(7): 1451-1457
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H. K. & Schäfer-Korting, M. (2001):** Mutschler Arzneimittelwirkungen: Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft
- Nandi, S., Guzman, R. C. & Yang, J. (1995):** Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 92(9): 3650-3657
- Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. & Riccardi, C. (1991):** A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry.  
*J Immunol Methods* 139(2): 271-279
- Odum, J., Lefevre, P. A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E. J., Beresford, N. A., Sumpter, J. P. & Ashby, J. (1997):** The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay.  
*Regul Toxicol Pharmacol* 25(2): 176-188
- Ogawa, S., Inoue, S., Watanabe, T., Hiroi, H., Orimo, A., Hosoi, T., Ouchi, Y. & Muramatsu, M. (1998):** 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* 243(1): 122-126
- Okami, J., Yamamoto, H., Fujiwara, Y., Tsujie, M., Kondo, M., Noura, S., Oshima, S., Nagano, H., Dono, K., Umeshita, K., Ishikawa, O., Sakon, M., Matsuura, N., Nakamori, S. & Monden, M. (1999):** Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas.  
*Clin Cancer Res* 5(8): 2018-2024



- Okamoto, F., Okabe, K. & Kajiya, H. (2001):** Genistein, a soybean isoflavone, inhibits inward rectifier k(+) channels in rat osteoclasts.  
*Jpn J Physiol* 51(4): 501-509
- Olea, N., Olea-Serrano, F., Lardelli-Claret, P., Rivas, A. & Barba-Navarro, A. (1999):** Inadvertent exposure to xenoestrogens in children.  
*Toxicol Ind Health* 15(1-2): 151-158
- Oiff, S. (1999):** Analyse der molekularen Wirkmechanismen ausgewählter Phyto- und Xenoestrogene.  
Diplomarbeit des FB Biologie, Universität Köln
- Ologhobo, A. D. & Fetuga, B. L. (1984):** Distribution of phosphorus and phytate in some Nigerian varieties of legumes and some effects of processing.  
*J Food Sci* 49(1): 199-207
- Onate, S. A., Tsai, S. Y., Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1995):** Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.  
*Science* 270(5240): 1354-1357
- PE Applied Biosystems - Perkin-Elmer Corporation (1998):** SYBR<sup>®</sup> Green PCR and RT-PCR Reagents - Protocol  
USA
- Pettersson, H. & Kiessling, K. H. (1984):** Liquid chromatographic determination of the plant oestrogens coumestrol and isoflavones in animal feed.  
*J Assoc Off Anal Chem* 67(3): 503-506
- Pettersson, K., Grandien, K., Kuiper, G. G. & Gustafsson, J. A. (1997):** Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha.  
*Mol Endocrinol* 11(10): 1486-1496
- Pfaffl, M. W., Lange, I. G., Daxenberger, A. & Meyer, H. H. (2001):** Tissue-specific expression pattern of estrogen receptors (ER): quantification of ER alpha and ER beta mRNA with real-time RT-PCR.  
*APMIS* 109(5): 345-355
- Pike, A. C., Brzozowski, A. M., Hubbard, R. E., Bonn, T., Thorsell, A. G., Engstrom, O., Ljunggren, J., Gustafsson, J. A. & Carlquist, M. (1999):** Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist.  
*EMBO J* 18(17): 4608-4618
- Polkowski, K. & Mazurek, A. P. (2000):** Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data.  
*Acta Pol Pharm* 57(2): 135-155

- Potter, S. M., Pertile, J. & Berber-Jimenez, M. D. (1996):** Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters.  
*J Nutr* 126(8): 2007-2011
- Pottratz, S. T., Bellido, T., Mocharla, H., Crabb, D. & Manolagas, S. C. (1994):** 17 beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism.  
*J Clin Invest* 93(3): 944-950
- Prescott, S. M. & Fitzpatrick, F. A. (2000):** Cyclooxygenase-2 and carcinogenesis.  
*Biochim Biophys Acta* 1470(2): M69-78
- Price, R. H. Jr., Butler, C. A., Webb, P., Uht, R., Kushner, P., & Handa, R. J. (2001):** A splice variant of estrogen receptor beta missing exon 3 displays altered subnuclear localization and capacity for transcriptional activation.  
*Endocrinology* 142(5): 2039-2049
- Pschyrembel (1990):** Klinisches Wörterbuch.  
Berlin, New York: Walter de Gruyter
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I. C., Norris, J. D., McDonnell, D. P., Leonard, L. S., Gaido, K. W., Bocchinfuso, W. P., Korach, K. S. & Safe, S. (1997 a):** 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* 138(4): 1520-1527
- Ramamoorthy, K., Wang, F., Chen, I. C., Safe, S., Norris, J. D., McDonnell, D. P., Gaido, K. W., Bocchinfuso, W. P. & Korach, K. S. (1997 b):** Potency of combined estrogenic pesticides.  
*Science* 275(5298): 405-406
- Read, L. D., Snider, C. E., Miller, J. S., Greene, G. L. & Katzenellenbogen, B. S. (1988):** Ligand-modulated regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein in human breast cancer cell lines.  
*Mol Endocrinol* 2(3): 263-271
- Redondo, M., Villar, E., Torres-Munoz, J., Tellez, T., Morell, M. & Petito, C. K. (2000):** Overexpression of clusterin in human breast carcinoma.  
*Am J Pathol* 157(2): 393-399
- Reel, J. R., Lamb IV, J. C. & Neal, B. H. (1996):** Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization.  
*Fundam Appl Toxicol* 34(2): 288-305
- Ristimaki, A., Sivula, A., Lundin, J., Lundin, M., Salminen, T., Haglund, C., Joensuu, H. & Isola, J. (2002):** Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer.  
*Cancer Res* 62(3): 632-635

**Roche Diagnostics Corporation (2000-2002):** Introduction to the LightCycler® System.  
Idaho Technology Inc., Idaho Falls, ID, USA.

**Romeis, B. (1989):** Mikroskopische Technik.  
München, Wien, Baltimore: Urban und Schwarzenberg

**Rose, D. P., Boyar, A. P. & Wynder, E. L. (1986):** International comparisons of mortality rates for cancer of the breast, ovary, prostate, and colon, and per capita food consumption.  
*Cancer* 58(11): 2363-2371

**Roseblit, N., Feng, Z. M. & Chen, C. L. (1996):** Analysis of the rat clusterin gene promoter and cyclic AMP-regulated mRNA stability in testicular cells.  
*J Mol Endocrinol* 16(3): 287-296

**Rosenberg, M. E. & Silkensen, J. (1995):** Clusterin: physiologic and pathophysiologic considerations.  
*Int J Biochem Cell Biol* 27(7): 633-645

**Rossini, G. P. (1994):** The quaternary structures of untransformed steroid hormone receptors: an open issue.  
*J Theor Biol* 166(3): 339-353

**Saceda, M., Lippman, M. E., Chambon, P., Lindsey, R. L., Ponglikitmongkol, M., Puente, M. & Martin, M. B. (1988):** Regulation of the estrogen receptor in MCF-7 cells by estradiol.  
*Mol Endocrinol* 2(12): 1157-1162

**Sandstrom, B., Almgren, A., Kivisto, B. & Cederblad, A. (1989):** Effect of protein level and protein source on zinc absorption in humans.  
*J Nutr* 119(1): 48-53

**Savouret, J. F., Bailly, A., Misrahi, M., Rauch, C., Redeuilh, G., Chauchereau, A. & Milgrom, E. (1991):** Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene.  
*EMBO J* 10(7): 1875-1883

**Schultze-Mosgau, M. H., Dale, I. L., Gant, T. W., Chipman, J. K., Kerr, D. J. & Gescher, A. (1998):** Regulation of c-fos transcription by chemopreventive isoflavonoids and lignans in MDA-MB-468 breast cancer cells.  
*Eur J Cancer* 34(9): 1425-1431

**Seo, A. & Morr, C. V. (1984):** Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products.  
*J Agri Food Chem* 32: 530-533

**Setchell, K. D., Gosselin, S. J., Welsh, M. B., Johnston, J. O., Balistreri, W. F., Kramer, L. W., Dresser, B. L. & Tarr, M. J. (1987):** Dietary estrogens--a probable cause of infertility and liver disease in captive cheetahs.  
*Gastroenterology* 93(2): 225-233

**Setchell, K. D. & Cassidy, A. (1999):** Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health.  
*J Nutr* 129(3): 758S-767S

**Severson, R. K., Nomura, A. M., Grove, J. S. & Stemmermann, G. N. (1989):** A prospective study of demographics, diet, and prostate cancer among men of Japanese ancestry in Hawaii.  
*Cancer Res* 49(7): 1857-1860

**Sherman, S. (2001):** Preventing and treating osteoporosis: strategies at the millennium.  
*Ann N Y Acad Sci* 949: 188-197

**Shimizu, H., Ross, R. K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B. E. & Mack, T. M. (1991):** Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County.  
*Br J Cancer* 63(6): 963-966

**Smith, C. L., Conneely, O. M. & O'Malley, B. W. (1993):** Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone.  
*Proc Natl Acad Sci U S A* 90(13): 6120-6124

**Soslow, R. A., Dannenberg, A. J., Rush, D., Woerner, B. M., Khan, K. N., Masferrer, J. & Koki, A. T. (2000):** COX-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors.  
*Cancer* 89(12): 2637-2645

**Stein, B. & Yang, M. X. (1995):** Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta.  
*Mol Cell Biol* 15(9): 4971-4979

**Steingraber, S.:** Living Downstream.  
Oakland, CA, USA: WCRC (Women's Cancer Resource Center) Featured Articles (<http://www.wcrc.org/bkinsert.htm>)

**Stemme, V., Swedenborg, J., Claesson, H. & Hansson, G. K. (2000):** Expression of cyclooxygenase-2 in human atherosclerotic carotid arteries.  
*Eur J Vasc Endovasc Surg* 20(2): 146-152

**Sundstrom, S. A., Komm, B. S., Ponce-de-Leon, H., Yi, Z., Teuscher, C. & Lytle, C. R. (1989):** Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3.  
*J Biol Chem* 264(28): 16941-16947

**Sutherland, R. L., Hamilton, J. A., Sweeney, K. J., Watts, C. K. & Musgrove, E. A. (1995):** Expression and regulation of cyclin genes in breast cancer.  
*Acta Oncol* 34(5): 651-656

- Sutherland, R. L. & Musgrove, E. A. (2002):** Cyclin D1 and mammary carcinoma: new insights from transgenic mouse models.  
*Breast Cancer Res* 4(1): 14-17
- Sutter, T., Doi, S., Carnevale, K. A., Arber, N. & Weinstein, I. B. (1997):** Expression of cyclins D1 and E in human colon adenocarcinomas.  
*J Med* 28(5-6): 285-309
- Teuscher, E. (1990):** Pharmazeutische Biologie.  
Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg
- Thun, M. J., Namboodiri, M. M. & Heath, C. W. Jr. (1991):** Aspirin use and reduced risk of fatal colon cancer.  
*N Engl J Med* 325(23): 1593-1596
- Tinwell, H., Soames, A. R., Foster, J. R. & Ashby, J. (2000):** Estradiol-type activity of coumestrol in mature and immature ovariectomized rat uterotrophic assays.  
*Environ Health Perspect* 108(7): 631-634
- Tominaga, S. (1985):** Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States.  
*Natl Cancer Inst Monogr* 69: 83-92
- Torre, M., Rodriguez, A. R. & Saura-Calixto, F. (1991):** Effects of dietary fiber and phytic acid on mineral availability.  
*Crit Rev Food Sci Nutr* 30(1): 1-22
- Tremblay, G. B., Tremblay, A., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Labrie, F. & Giguere, V. (1997):** Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta.  
*Mol Endocrinol* 11(3): 353-365
- Tsai, M. J. & O'Malley, B. W. (1994):** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members.  
*Annu Rev Biochem* 63: 451-486
- Turner, R. T., Riggs, B. L. & Spelsberg, T. C. (1994):** Skeletal effects of estrogen.  
*Endocr Rev* 15(3): 275-300
- Umekita, Y., Ohi, Y., Sagara, Y. & Yoshida, H. (2002):** Overexpression of cyclinD1 predicts for poor prognosis in estrogen receptor-negative breast cancer patients.  
*Int J Cancer* 98(3): 415-418
- Uotila, P., Valve, E., Martikainen, P., Nevalainen, M., Nurmi, M. & Harkonen, P. (2001):** Increased expression of cyclooxygenase-2 and nitric oxide synthase-2 in human prostate cancer.  
*Urol Res* 29(1): 23-28

**Verma, S. P., Salamone, E. & Goldin, B. (1997):** Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides.

*Biochem Biophys Res Commun* 233(3): 692-696

**Vik, D. P., Amiguet, P., Moffat, G. J., Fey, M., Amiguet-Barras, F., Wetsel, R. A. & Tack, B. F. (1991):** Structural features of the human C3 gene: intron/exon organization, transcriptional start site, and promoter region sequence.

*Biochemistry* 30(4): 1080-1085

**von Bruchhausen, F. (1993):** Hagers Handbuch der pharmazeutischen Praxis.

Berlin, Heidelberg, New York, London: Springer

Band 5: Drogen E-O; R. Hänsel (Hrsg.)

**Walz, E. (1931):** Isoflavon- und Saponinglucoside in Soja Hispida.

*Justus Liebigs Ann Chem* 489: 118-155

**Weigel, N. L. (1996):** Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation.

*Biochem J* 319(Pt 3): 657-667

**Weinstein, I. B., Begemann, M., Zhou, P., Han, E. K., Sgambato, A., Doki, Y., Arber, N., Ciaparrone, M. & Yamamoto, H. (1997):** Disorders in cell circuitry associated with multistage carcinogenesis: exploitable targets for cancer prevention and therapy.

*Clin Cancer Res* 3(12 Pt 2): 2696-2702

**Weinstein, I. B. (2000):** Disorders in cell circuitry during multistage carcinogenesis: the role of homeostasis.

*Carcinogenesis* 21(5): 857-864

**White, L. R., Petrovitch, H., Ross, G. W., Masaki, K., Hardman, J., Nelson, J., Davis, D. & Markesbery, W. (2000):** Brain aging and midlife tofu consumption.

*J Am Coll Nutr* 19(2): 242-255

**Wunsche, W., Tenniswood, M. P., Schneider, M. R. & Vollmer, G. (1998):** Estrogenic regulation of clusterin mRNA in normal and malignant endometrial tissue.

*Int J Cancer* 76(5): 684-688

**Xu, X., Harris, K. S., Wang, H. J., Murphy, P. A. & Hendrich, S. (1995):** Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women.

*J Nutr* 125(9): 2307-2315

**Xu, X. C. (2002):** COX-2 inhibitors in cancer treatment and prevention, a recent development.

*Anticancer Drugs* 13(2): 127-137

**Yamasaki, K., Sawaki, M. & Takatsuki, M. (2000):** Immature rat uterotrophic assay of bisphenol A.

*Environ Health Perspect* 108(12): 1147-1150

**Yan, X., Wu Xiao, C., Sun, M., Tsang, B. K. & Gibb, W. (2002):** Nuclear factor B activation and regulation of cyclooxygenase type-2 expression in human amnion mesenchymal cells by interleukin-1 beta.

*Biol Reprod* 66(6): 1667-1671

**Yu, Q., Geng, Y. & Sicinski, P. (2001):** Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation.

*Nature* 411(6841): 1017-1021

**Zava, D. T., Blen, M. & Duwe, G. (1997):** Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture.

*Environ Health Perspect* 105(Suppl 3): 637-645

**Websites:**

<http://www.mpiz-koeln.mpg.de/pr/garten/schau/Glycinemax/Sojabohne.html>

[http://wald.heim.at/urwald/540187/pf\\_klee\\_1.html](http://wald.heim.at/urwald/540187/pf_klee_1.html)

## 8 ANHANG

### 8.1 Abkürzungsverzeichnis

<b>A</b>	Adenin
1A	Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase
Abb.	Abbildung
Abs.	Absatz
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
Al <sup>3+</sup>	Aluminiumion (dreifach positiv geladen)
Ampuwa <sup>®</sup>	steriles <i>aqua bidest.</i>
<i>aqua bidest.</i>	zweifach destilliertes Wasser
<b>bp</b>	Basenpaare
BPA	Bisphenol A
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
<b>C</b>	Cytosin
°C	Grad Celcius
C3	Komplement C3
ca.	circa
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
C-Atome	Kohlenstoffatome
CCS	<i>charcoal-treated calf serum</i> (mit Aktivkohle behandeltes Kälberserum)
CD	<i>Compact Disk</i>
CD1	Cyclin D1
cDNA	komplementäre DNA
cm	Zentimeter
cm <sup>3</sup>	Kubikzentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
Cou	Coumestrol
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
<b>d</b>	Tage
d. h.	das heißt
Dai	Daidzein
dATP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Desoxycytidin-5'-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	2'-Desoxyguanosin-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	2'-Desoxynukleosid-5'-triphosphat
d(T)	Desoxythymidin
DTT	Dithiothreitol
dTTP	2'-Desoxythymidin-5'-triphosphat
E <sub>2</sub> /E2	17β-Estradiol



<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EE	Ethinylestradiol
EMBL	<i>European Molecular Biology Laboratory</i>
ER	Estrogenrezeptor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Estrogenrezeptor beta
ERE	<i>estrogen responsive element</i>
Estradiol	17 $\beta$ -Estradiol
<i>et al.</i>	<i>et alii</i> (und andere)
EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
Fe <sup>3+</sup>	Eisenion (dreifach positiv geladen)
FKS	Fetales Kälberserum
Ful	Fulvestrant (Faslodex™)
<b>G</b>	Guanin
g	Gramm
g	Fallbeschleunigung (g= 9,81 m/s <sup>2</sup> )
GAPDH	Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase
Gen	Genistein
<b>h</b>	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
hsp	<i>heat shock</i> Protein
IL-6	Interleukin-6
kb	Kilobasenpaare
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
<b>M</b>	Molarität (mol/l)
m	Meter
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mM	Millimol(ar)
mRNA	<i>messenger</i> RNA
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromol(ar)
<b>n</b>	Platzhalter für eine beliebige Zahl
Na-citrat	Natriumcitrat
NF-κB	<i>Nuclear Factor kappa B</i>
nm	Nanometer
Oligo(dT)	Oligo(Desoxythymidin)
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)

PI	Propidiumiodid
pmol	Picomol(ar)
p. o.	<i>per os</i> , peroral
PR	Progesteronrezeptor
<b>R</b>	Bezeichnung für organischen Rest
Ral	Raloxifen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
<b>s. c.</b>	<i>subcutaneus</i> (subkutan)
sec	Sekunde(n)
SERM	selektiver Estrogenrezeptor-Modulator
syn.	Synonym
<b>T</b>	Thymin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i> Polymerase	Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	<i>TRIS Buffered Saline</i> (Tris-gepufferte Kochsalzlösung)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tris-HCl	Tris-Hydrochlorid
<b>U</b>	<i>Unit(s)</i>
U	Uracil
u. a.	unter anderem
u. Ä.	und Ähnliche(s)
u. a. m.	und andere mehr
u. U.	unter Umständen
UV	Ultraviolett
<b>V</b>	Volt
vgl.	vergleiche
<b>z. B.</b>	zum Beispiel
<b>z. T.</b>	zum Teil
§	Paragraph
%	Prozent
∞	unendlich

Weitere Abkürzungen werden im Text bei ihrer ersten Verwendung erklärt.

## 8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	<b>Flavangrundgerüst (2-Phenylchroman)</b> .....	2
Abb. 2:	<b>Biosynthese der Phenylchromanderivate</b> R <sup>1</sup> , R <sup>2</sup> , R <sup>3</sup> = verschiedene organische Reste (nach Teuscher, 1990).....	3
Abb. 3:	<b>Biogenese der Isoflavane durch Arylwanderung</b> R = organischer Rest .....	5
Abb. 4:	<b>Strukturformeln der Isoflavonoidderivate Genistein, Daidzein und Coumestrol</b> .....	5
Abb. 5:	<b><i>Glycine max (L.) MERR.</i></b> (aus <a href="http://www.mpiz-koeln.mpg.de/pr/garten/schau/Glycinemax/Sojabohne.html">http://www.mpiz-koeln.mpg.de/pr/garten/schau/Glycinemax/Sojabohne.html</a> ).....	6
Abb. 6:	<b><i>Trifolium repens L.</i></b> (aus <a href="http://wald.heim.at/urwald/540187/pf_klee_1.html">http://wald.heim.at/urwald/540187/pf_klee_1.html</a> ) .....	7
Abb. 7:	<b>Strukturformel von Equol</b> .....	7
Abb. 8:	<b>Strukturformeln der Lignane Enterodiol und Enterolakton</b> .....	10
Abb. 9:	<b>Strukturformeln von Estradiol, Estron und Estriol</b> .....	17
Abb. 10:	<b>Biosynthese von Estradiol aus Testosteron</b> .....	18
Abb. 11:	<b>Estrogensensitive Gewebe und Zellen</b> (nach Diel, 2002).....	19
Abb. 12:	<b>Klassische und alternative Wirkmechanismen</b> L = Ligand, der an einen membranständigen Rezeptor bindet, welcher über die cAMP-Signaltransduktionskaskade wirkt; Y-P = aktive Form eines Wachstumsfaktor-Rezeptors (nach Diel <i>et al.</i> , 1999).....	22
Abb. 13:	<b>Relative molare Bindungsaffinitäten verschiedener Phytoestrogene</b> (nach Kuiper <i>et al.</i> , 1998) .....	23
Abb. 14:	<b>Strukturformeln der eingesetzten Substanzen</b> .....	35
Abb. 15:	<b>MCF-7 Zellen</b> (angefärbt mit 0,5 % Kristallviolett in 20 %iger Methanol-Lösung).....	37
Abb. 16:	<b>Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs</b> .....	39
Abb. 17:	<b>Darstellung aller durchgeführten <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Versuche</b> .....	43
Abb. 18:	<b>Schematischer Aufbau eines Durchflusszytometers</b> (nach Genzlinger, 1999) .....	50
Abb. 19:	<b>Schematische Darstellung der cDNA-Synthese</b> .....	54
Abb. 20:	<b>Übersichtsschema zur Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</b> .....	57
Abb. 21:	<b>Beispiel eines 2 %igen Agarosegels der PCR-Produkte von zwei Untersuchungsgenen und dem internen Standard 1A</b> Das Gel wurde mit EtBr gefärbt und die Aufnahme invertiert.....	61

<b>Abb. 22:</b>	<b>Real-Time PCR</b> (nach PE Applied Biosystems, 1998) .....	63
<b>Abb. 23:</b>	<b>Beispiel einer Schmelzkurve</b> .....	64
<b>Abb. 24:</b>	<b>PAP-Methode</b> (nach Bourne) .....	71
<b>Abb. 25:</b>	<b>Graphische Darstellung der <i>sub</i> G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil I)</b> * signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (* p < 0,05) A: <i>sub</i> G <sub>0</sub> -Population B: S-Population .....	76
<b>Abb. 26:</b>	<b>Graphische Darstellung der <i>sub</i> G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil I)</b> Zum direkten Vergleich wurde die CCS-Gruppe gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet. * signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (* p < 0,05) .....	77
<b>Abb. 27:</b>	<b>Graphische Darstellung der <i>sub</i> G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil II)</b> * signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (* p < 0,05) A: <i>sub</i> G <sub>0</sub> -Population B: S-Population .....	79
<b>Abb. 28:</b>	<b>Graphische Darstellung der <i>sub</i> G<sub>0</sub>- und S-Population (Versuchsteil II)</b> Zum direkten Vergleich wurde die CCS-Gruppe gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet. * signifikant gegen die CCS-Kontrollgruppe (* p < 0,05) .....	80
<b>Abb. 29:</b>	<b>Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein in verschiedenen Dosierungen</b> x ± s, n ≥ 6 * signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (** p < 0,01; *** p < 0,001) .....	82
<b>Abb. 30:</b>	<b>Dosis-Wirkungskurve für die Induktion des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach p. o. Applikation von Lösungsmittel und von EE (20, 30, 50 und 100 µg/kg KG)</b> x ± s, n ≥ 6 .....	83
<b>Abb. 31:</b>	<b>Expression des Progesteronrezeptors im Brustdrüsengewebe von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE, Genistein und Daidzein</b> Vergrößerung 250x .....	84
<b>Abb. 32:</b>	<b>Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein</b> x ± s, n ≥ 6 * signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) .....	85
<b>Abb. 33:</b>	<b>Histologische Analyse der Uterusepithelhöhen von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE und Genistein mittels Azanfärbung</b> Vergrößerung 250x .....	86
<b>Abb. 34:</b>	<b>Stimulation der Uterusepithelhöhen in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein</b> x ± s, n ≥ 6 * signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (* p < 0,05; ** p < 0,01; *** p < 0,001) .....	86

- Abb. 35: Histologische Analyse der Vaginalepithelhöhen von Da/Han Ratten nach dreitägiger p. o. Behandlung mit EE und Genistein mittels Scottfärbung**  
Vergrößerung 80x..... 87
- Abb. 36: Stimulation der Vaginalepithelhöhen in den Rattenstämmen Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley (SD) nach dreitägiger p. o. Applikation von EE und Genistein**  
x ± s, n ≥ 6  
\* signifikant gegen die jeweilige Lösungsmittelkontrolle des Rattenstammes (\* p < 0,05)..... 87
- Abb. 37: Relative Uterusfeuchtgewichte von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
Zum direkten Vergleich wurde EE (30 µg/kg KG) gleich 1 definiert und die anderen Gruppen in Relation dazu berechnet.  
x ± s, n ≥ 6  
\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)..... 89
- Abb. 38: Uterusepithelhöhen von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
x ± s, n ≥ 6  
\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)  
+ Kombinationen signifikant gegen EE 30 (+ p < 0,05; ++ p < 0,01) ..... 90
- Abb. 39: Dosis-Wirkungskurve für die Induktion der Vaginalepithelhöhe von Wistar Ratten nach p. o. Applikation von Lösungsmittel und von EE (20, 30, 50 und 100 µg/kg KG)**  
x ± s, n ≥ 6. .... 91
- Abb. 40: Vaginalepithelhöhen von Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
x ± s, n ≥ 6  
\* signifikant gegen die Lösungsmittelkontrolle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01)  
+ Kombinationen signifikant gegen EE 30 (+ p < 0,05; +++ p < 0,001) ..... 91
- Abb. 41: Relative uterine mRNA-Expression von Komplement C3 in Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
Gezeigt sind die semiquantitativen densitometrischen Evaluationen der PCR-Produkte.  
x ± s, n ≥ 6  
EE 30 wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen EE 30 (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01) ..... 93
- Abb. 42: Relative uterine mRNA-Expression von Clusterin in Wistar Ratten nach dreitägiger p. o. Applikation der Untersuchungssubstanzen**  
Gezeigt sind die semiquantitativen densitometrischen Evaluationen der PCR-Produkte.  
x ± s, n ≥ 6  
EE 30 wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen EE 30 (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01) ..... 93
- Abb. 43: Stimulation des Uterusfeuchtgewichtes von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen EE, E<sub>2</sub>, Genistein und Daidzein**  
x ± s, n ≥ 6  
\* signifikant gegen die Kontrolle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01) ..... 95
- Abb. 44: Relative mRNA-Expression des Progesteronrezeptors im Brustdrüsengewebe von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**  
x ± s, n ≥ 6  
Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\* p < 0,05; \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,001)..... 97

- Abb. 45: Exemplarische Darstellung einer *Real-Time* PCR im iCycler zur Untersuchung der relativen mRNA-Expression von Cyclin D1 in der Mamma von Wistar Ratten**  
Als interner Standard diente die Untereinheit I der Cytochrom C-Oxidase (1A). ..... 98
- Abb. 46: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurve im Anschluss an eine *Real-Time* PCR im iCycler zur Untersuchung der relativen mRNA-Expression von Cyclin D1 in der Mamma von Wistar Ratten**  
Zu erkennen sind die Kurven für 1A und Cyclin D1..... 98
- Abb. 47: Relative mRNA-Expression von Cyclin D1 im Brustdrüsengewebe von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels *Real-Time* PCR im iCycler**  
 $x \pm s, n \geq 6$   
Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ) ..... 99
- Abb. 48: Relative mRNA-Expression von Komplement C3 im Uterus von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels *Real-Time* PCR im iCycler**  
 $x \pm s, n \geq 6$   
Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ) ..... 100
- Abb. 49: Relative mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 im Uterus von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT- PCR**  
 $x \pm s, n \geq 6$   
Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*  $p < 0,05$ ) ..... 101
- Abb. 50: Relative mRNA-Expression des Progesteronrezeptors in der *Vena cava* von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**  
 $x \pm s, n \geq 6$   
Die Kontrollgruppe wurde als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ) ..... 102
- Abb. 51: Relative mRNA-Expression der Cyclooxygenase-2 in der *Vena cava* von Wistar Ratten nach s. c. Applikation der Untersuchungssubstanzen; mittels semiquantitativer RT-PCR**  
 $x \pm s, n \geq 6$   
Die Kontrollgruppen wurden als 1 definiert. \* signifikant gegen die Kontrolle (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) ..... 103
- Abb. 52: Molekularer *Fingerprint***  
Relative Regulation der PR und ER $\alpha$  mRNA-Expression und ER $\alpha$  Proteinexpression nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit E $_2$  [ $10^{-10}$  M], Ful [ $10^{-7}$  M], Ral [ $10^{-7}$  M] und den Phytoestrogenen [ $10^{-6}$  M]  
↑↑↑ = sehr starke Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↑↑ = starke Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↑ = schwache Induktion der mRNA bzw. des Proteins, ↓ = Repression der mRNA bzw. des Proteins, die Bedeutung der Intensität ist der Legende für die Induktion zu entnehmen, – = keine Regulation; Unterschiede zu E $_2$  sind durch die weiße Farbe dargestellt  
(nach Diel *et al.*, 2001)..... 113

### 8.3 Tabellenverzeichnis

<b>Tab. 1:</b>	<b>Versuch I zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehung von EE und Genistein</b> (Applikation p. o.; Wistar Ratten) .....	40
<b>Tab. 2:</b>	<b>Versuch II zur Ermittlung von stammspezifischen Unterschieden zwischen einzelnen Rattenstämmen</b> (Applikation p. o.; Da/Han, Wistar und Sprague-Dawley Ratten) .....	40
<b>Tab. 3:</b>	<b>Versuch III zur Testung auf agonistische oder antagonistische Effekte in Kombination mit dem synthetischen Estrogen</b> (Applikation p. o.; Wistar Ratten) .....	41
<b>Tab. 4:</b>	<b>Versuch IV a zur Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen</b> (Applikation s. c.; Wistar Ratten) .....	42
<b>Tab. 5:</b>	<b>Versuch IV b zur Testung auf Organselektivität der Untersuchungssubstanzen</b> (Applikation s. c.; Wistar Ratten) .....	42
<b>Tab. 6:</b>	<b>Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen (Versuchsteil I) .....</b>	47
<b>Tab. 7:</b>	<b>Konzentrationen der Untersuchungssubstanzen (Versuchsteil II) .....</b>	48
<b>Tab. 8:</b>	<b>Standard-PCR-Protokoll mit variierenden Zykluszahlen für die einzelnen Primerpaare .....</b>	58
<b>Tab. 9:</b>	<b>Zykluszahlen und Anlagerungstemperaturen für die einzelnen Primerpaare .....</b>	58
<b>Tab. 10:</b>	<b>Entparaffinierung der Gewebeschnitte .....</b>	66
<b>Tab. 11:</b>	<b>Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (Versuchsteil I)</b> $x \pm s, n \geq 3$ .....	75
<b>Tab. 12:</b>	<b>Messergebnisse der Zellzyklusanalyse (Versuchsteil II)</b> $x \pm s, n \geq 3$ .....	78
<b>Tab. 13:</b>	<b>Eingesetzte Kombinationen des synthetischen Estrogens Ethinyl-estradiol, des Phytoestrogens Genistein, der Industriechemikalie Bisphenol A und des Antiestrogens Fulvestrant bei dreitägiger Behandlung (p. o.) von Wistar Ratten .....</b>	88

## **DANKSAGUNG**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Besonders Herrn Prof. Dr. Dr. H. Michna danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die ausgezeichneten Arbeitsbedingungen im Labor, für die Anregungen und für die Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. K. Mohr, Institut für Pharmakologie und Toxikologie der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, danke ich für die Unterstützung meiner Arbeit und für hilfreiche Diskussionen des Themas.

Besonderer Dank gilt Dr. Patrick Diel für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für die vielen Diskussionen und Anregungen zur Durchführung und Darstellung der Arbeit.

Ute Laudenbach-Leschowsky danke ich für die Arbeit und Unterstützung bei der Durchführung der Tierversuche.

Vielen herzlichen Dank an Mady Asmus und Margot Maskus für die Einführung in die Molekularbiologie und für die Hilfe beim Erlernen verschiedener Verfahren - insbesondere der PCR und der Immunhistochemie.

Besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Morphologie und Tumorforschung der DSHS Köln, für viele anregende Diskussionen, eine angenehme Arbeitsatmosphäre und kurzweilige Unterhaltung. Mein besonderer Dank gilt dabei: Stefanie Löffek, Dr. Thorsten Schulz und Dr. Kai Smolnikar.

Abschließend möchte ich meinen Eltern danken, die mir diese Ausbildung ermöglicht und für Rückhalt im privaten Bereich gesorgt haben. Meinem Bruder Achim danke ich für seine motivierende Unterstützung und dafür, dass er mich an die „Spoho“ gelockt hat. Ganz besonderen Dank meinem Freund Jörg für seine Geduld, Hilfsbereitschaft und Unterstützung.



## PUBLIKATIONEN

### Originalarbeiten

**Diel, P., Olf, S., Schmidt, S. & Michna, M. (2001):** Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7.  
*Planta Med* 67(6): 510-514

**Diel, P., Olf, S., Schmidt, S. & Michna, H. (2002):** Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7.  
*J Steroid Biochem Mol Biol* 80(1): 61-70

### Übersichtsartikel

**Diel, P., Schmidt, S. & Vollmer, G. (2002):** In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens.  
*J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777(1-2): 191

### Als Abstract publizierte Poster-Präsentationen (als Erstautorin)

**Schmidt, S., Schulz, T., Diel, P. & Michna, H. (2000):** Analysis of steroid-hormone receptor expression and localisation in the rat uterus after administration of the phytoestrogen genistein and the xenoestrogen bisphenol A.  
*Abstractband: P 20*  
(International conference on the female reproductive tract)

**Schmidt, S., Diel, P. & Michna, H. (2001):** Comparative analysis of the sensitivity of different strains of the rat (Wistar, Sprague Dawley, Da/Han) to phyto- and xenoestrogen treatment.  
*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 109 (Suppl. 1): S 31  
(45. Symposium der DGE, Magdeburg 2001)

**Schmidt, S., Diel, P. & Michna, H. (2001):** Morphological and molecular reactions of estrogen dependent parameters in the female reproductive tract of different rat strains (Wistar, Sprague Dawley, Da/Han) in response to phyto- and xenoestrogens.  
*Ann Anat* 183 (Suppl.-H.): 153  
(96. Versammlung der Anatomischen Gesellschaft, Münster, 2001)

**Schmidt, S., Schulz, T., Diel, P., Degen, G. H., Bolt, H. M. & Michna, H. (2001):** Phyto- and xenoestrogens: Uterine growth reaction and molecular and morphological response in different rat strains (Da/Han, Sprague-Dawley, Wistar).  
*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 363 (Suppl. 4): R 145  
(42. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2001)

**Schmidt, S., Michna, H. & Diel, P. (2002):** Effects of phytoestrogens and industrial chemicals on cell cycle distribution and apoptosis induction in human MCF-7 breast cancer cells.

*Exp Clin Endocrinol Diabetes* 110 (Suppl. 1): S 57  
(46. Symposium der DGE, Göttingen 2002)

**Schmidt, S., Degen, G. H., Laudénbach, U., Michna, H. & Diel, P. (2002):** Analysis of combinatory actions of xenoestrogens in the female Wistar rat.

*Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 365 (Suppl. 1): R 134  
(43. Frühjahrstagung der DGPT, Mainz, 2002)

**Schmidt, S., Michna, H. & Diel, P. (2002):** Phytoestrogens and industrial chemicals: Influence on cell cycle distribution and apoptosis induction in human MCF-7 breast cancer cells.

*Abstractband:* 151-P

(15<sup>th</sup> International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, München, 2002)

**Schmidt, S., Degen, G. H., Laudénbach, U., Michna, H. & Diel, P. (2002):** Xenoestrogens: Analysis of their combinatory action in female Wistar rats.

*Abstractband:* 251-P

(15<sup>th</sup> International Symposium of the Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology, München, 2002)

**Schmidt, S., Vollmer, G. & Diel, P. (2002):** Effects of phytoestrogens on cell cycle distribution and apoptosis induction in human MCF-7 breast cancer cells.

*Abstractband*

(Proceedings of the AACR, Frontiers in Cancer Prevention Conference, Boston, USA)

### **Andere Veröffentlichungen**

**Schmidt, S., Löffek, S. & Michna, M. (2001):** Das Internet: eine gefahrenvolle Apotheke für Athleten!

*F.I.T.- Wissenschaftsmagazin der Deutschen Sporthochschule* 1: 16-19

**Müller-Platz, C. & Schmidt, S. (2001):** Side Effects of Narcotics and Diuretics: Review of Literature.

In: Peters, C., Schulz, T. & Michna, H. (Hg.) *Biomedical Side Effects of Doping*: 47-58

Köln: Sport und Buch Strauß

(Wissenschaftliche Berichte und Materialien des Bundesinstituts für Sportwissenschaft; Bd. 13)