

### **Steroide als immunchemische Sonden und Immunglobuline als steroidanalytische Reagenzien**

*R. Goebel  
Frauenklinik am Evangelischen Krankenhaus  
Oberhausen*

Im Jahre 1970/1971 wurden im Laboratorium für Klinische Chemie und Biochemie der I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München Anti-Östrogen-C6-Konjugat-Antiseren entwickelt, die im Rahmen der Schwangerenüberwachung als entscheidendes Reagenz bei der radioimmunologischen Östrogenbestimmung bis heute Bedeutung haben. Die bis dahin verwendeten Antiseren zur Bestimmung von Plasma- oder Serumöstrogenen im Radioimmunoassay zeigten eine deutliche Kreuzreaktivität mit anderen Steroiden. Aufgrund der praktisch zu vernachlässigenden Kreuzreaktivität der neuen Anti-Östrogen-Antisera mit anderen Steroiden bestand die Möglichkeit, ohne vorherige Chromatographie die einzelnen klassischen Östrogene zu bestimmen. Die Vorteile der Serum-Östrogen-Bestimmung gegenüber der Urin-Östrogen-Bestimmung bestehen darin, daß keine Verzögerung bei der Bestimmung der Östrogene im 24-Stunden-Urin durch die 24stündige Sammelzeit und die möglichen Sammelfehler eintritt. Von wenigen Ausnahmen abgesehen, dürfte es keine Rolle spielen, ob das Gesamtöstriol oder das unkonjugierte Östriol im Serum bestimmt wird.

Der diagnostische Wert der Östriolbestimmung im klinischen Entscheidungsprozeß: Am häufigsten werden erniedrigte Östriolkonzentrationen bei Schwangerschaften mit intrauteriner fetaler Wachstumsretardierung gefunden; häufig auch bei Patientinnen, bei denen eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie zu einer intrauterinen fetalen Wachstumsretardierung geführt hat. Allerdings ist der prädiktive Wert des unkonjugierten Östriols zur Erkennung einer fetalen Dystrophie nicht sehr hoch (positiver prädiktiver Wert liegt bei 35%). Auch wenn die Östriolbestimmung im mütterlichen Serum im Konzert der heutigen Überwachungsmethoden zur

Bewertung einer Risikoschwangerschaft nicht mehr die hohe Rangordnung hat, wie es noch vor etwa 15 Jahren der Fall war, stellt sie dennoch im Vergleich mit anderen chemischen Überwachungsmethoden die zuverlässigste chemische Methode zur Überwachung von Risikoschwangerschaften dar.

Anschrift des Verfassers:  
Prof. Dr. R. Goebel, Evangelisches Krankenhaus,  
Frauenklinik, Virchowstraße 20,  
D-W 4200 Oberhausen

### **Kinetik der Assoziation von Östrogenen mit ihren korrespondierenden Antiöstrogen-Antikörpern**

*K.-P. Gloning  
I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-  
Universität München*

In Fortsetzung des Forschungsvorhabens "Steroide als immunchemische Sonden" wurde die Kinetik der Assoziation von Östrogenen mit ihren korrespondierenden Antiöstrogen-Antikörpern und die der Dissoziation der jeweiligen Komplexe untersucht, und es wurden die Reaktionsenergien und -enthalpien ermittelt. Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefaßt werden:

1. Im Gleichgewicht wurde die Bindung von  $^3\text{H-E}_2$  an die Antikörper durch alle unmarkierten Liganden, die getestet wurden, signifikant gehemmt. Die Non-Parallelität der Hemmungskurven ist wahrscheinlich bedingt durch die Heterogenität der Antikörper. Unter der Annahme, daß der Einfluß der Heterogenität der Bindungsenergie ein Minimum bei einer Hemmung von 50% erreicht, wurde die Dosis, die 50% Hemmung bewirkt, gewählt, um eine Rangordnung der Haptene entsprechend ihrer  $\text{ID}_{50}$  anzugeben. Diese Abfolge war gleich bei allen untersuchten Antisera (Tab. 1).
2. Die geringe Hemmung durch  $\text{E}_2-\Delta^7$  kann durch den Verlust der Koplanarität des Mole-

Tab. 1: Bindung von unmarkierten Östradiol-C6-Derivaten durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiserum  
Relative Hemmung der  $^3\text{H-E}_2$  Bindung  
Die Konzentrationen, die erforderlich sind, die Bindung von  $^3\text{H-E}_2$  durch das Antiserum um 75%, 50% und 25% von  $B_0$  zu hemmen ( $ID_{75}$ ,  $ID_{50}$ ,  $ID_{25}$ ), sind in bezug zu  $E_2=100\%$  Hemmung angegeben.

	$ID_{75}$	$ID_{50}$	$ID_{25}$
$E_2-\Delta^7$	3	0,6	0,1
$E_2-\Delta^6$	112	95	85
$E_2$	100	100	100
$E_2-6\alpha\text{-ol}$	50	52	54
$E_2-6\beta\text{-ol}$	26	26	26
$E_2-6\text{-on}$	169	166	162
$E_2-6\text{-oxim-O-ME}$	73	121	200
$E_2-6\text{-CMO}$	58	93	150
$E_2-6\text{-CMO-histamin}$	67	121	219
$E_2-6\text{-CMO-ACA}$	77	128	219
$E_2-6\text{-CMO-Lys}$	67	121	219

küls nach Einfügen einer C7-C8-Doppelbindung leicht erklärt werden. Die Koplanarität des Östrogenmoleküls ist nicht gestört durch die Doppelbindung an C6-C7. Demgemäß zeigte  $E_2-\Delta^6$  eine Hemmung entsprechend  $E_2$ .

3. Die Hemmung von  $E_2-6\alpha\text{-OH}$  übersteigt die von  $E_2-6\beta\text{-OH}$ . Die äquatoriale  $6\alpha\text{-OH}$ -Gruppe paßt offenbar besser in die Bindungsstelle am Antikörper als die axiale  $6\beta\text{-OH}$ -Gruppe.

4. Bei  $E_2-6\text{-on}$  war die Hemmung eindeutig höher als bei  $E_2$ , und dieses Hapten zeigte die höchste Hemmung der Bindung, die in dieser Untersuchung beobachtet wurde.  $E_2-6\text{-on}$  wird für identisch mit dem steroidalern Kern der Immundeterminante gehalten, einschließlich der  $sp^2$ -Hybridisierung an C6. Das Ausmaß der Hemmung ist abhängig von der Assoziationskonstante. Es ist daher bei Beachtung der steroidspezifischen Antikörperfraktion sehr un-

wahrscheinlich, daß der Wert eines steroidalern Haptens für K, selbst wenn in der Brückenregion mit einem großen Jodatom markiert wird, den K-Wert des reinen Steroids übersteigen würde, falls die molekulare Konformation der Immundeterminante entspricht.

5. Die Werte für K hängen von beiden Geschwindigkeitskonstanten, der Assoziations- und der Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{12}$  und  $k_{21}$ , ab. Weil sich die Geometrie von  $E_2-6\text{-on}$  von  $E_2-6\text{-CMO-Lys}$  deutlich unterscheidet, mag der niedrigere Wert für K des letzteren mehr von der niedrigeren Assoziationsgeschwindigkeit bestimmt werden als von einer höheren Dissoziation, die Ausdruck der Affinität ist.

6. Offenbar kann die Assoziationsreaktion unmarkierter Haptene mit Antikörpern durch die "Methode der sequentiellen Inkubation" zutreffend verfolgt werden:  $E_2-6\text{-on}$  lagert sich schneller an als die Haptene mit längeren Brückengliedern. Unter diesem Gesichtspunkt sind die absoluten Werte der Geschwindigkeitskonstanten weniger wichtig (Tab. 2).

7. Die Dissoziationsreaktion des unmarkierten Hapten-Antikörper-Komplexes, beobachtet durch "sequentielle Inkubation", ist in einem Bereich bis 90% der anfänglichen Konzentration des Komplexes offenbar monophasisch. Die Ergebnisse zeigen eindeutig, daß  $E_2-6\text{-oxim-O-ME}$  durch den Antikörper am dichtesten gebunden wird, im Vergleich zum  $E_2-6\text{-on}$ -Komplex mit der doppelten Halbwertszeit. Die Zuverlässigkeit der Reihenfolge der Affinität wird unterstützt durch die Halbwertszeit der Komplexe von  $E_2-6\alpha\text{-OH}$ ,  $E_2-6\beta\text{-OH}$  und  $E_2$ , deren Reihenfolge mit den Werten für die Hemmung dieser Haptene übereinstimmt. Es kann angenom-

	$k_{12} \times 10^{-6}$ (litre $\times$ mol $^{-1}$ $\times$ s $^{-1}$ )		
	Anti- $E_2$ -AS D2	Anti- $E_2$ -As E2	Anti- $E_2$ -As F2
$E_2-6\text{-on}$	1,07	0,83	0,70
$E_2-6\text{-oxim-O-ME}$	0,45	0,45	0,43
$E_2-6\text{-CMO}$	0,45	0,32	0,34
$E_2-6\text{-CMO-Lys}$	0,36	0,36	0,35

Tab. 2: Bindung von unmarkierten Östradiol-C6-Derivaten durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiserum  
Assoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{12}$

	$k_{21} \times 10^4$ (s <sup>-1</sup> )			$t_{1/2}$ (min)
	Anti-E <sub>2</sub> -As	Anti-E <sub>2</sub> -As	Anti-E <sub>2</sub> -AS	
	D2	E2	F2	
E <sub>2</sub> -6β-OH	4,04	4,15	3,91	28
E <sub>2</sub> -6α-OH	3,21	3,34	3,32	35
E <sub>2</sub>	2,59	2,64	2,64	45
E <sub>2</sub> -6-on	1,36	1,18	1,43	80
E <sub>2</sub> -6-oxim-O-ME	0,58	0,61	0,59	200
E <sub>2</sub> -6-CMO	0,64	0,68	0,64	180
E <sub>2</sub> -6-CMO-histamin	0,64	0,64	0,66	180
E <sub>2</sub> -6-CMO-Lys	0,93	0,92	0,90	130

Tab. 3: Bindung von unmarkierten Östradiol-C6-Derivaten durch Anti-Östradiol-C6-Konjugat-Antiserum  
Dissoziationsgeschwindigkeitskonstante  $k_{21}$  und Halbwertszeiten

men werden, daß die Assoziationsgeschwindigkeiten gleich sind, da Unterschiede in der Geometrie dieser Moleküle nicht von Bedeutung sind (Tab. 3).

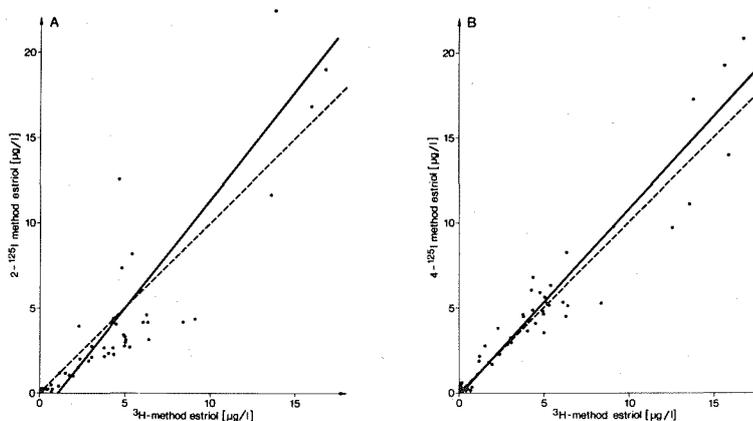
Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die "Methode der sequentiellen Inkubation" zur Bestimmung von Reaktionsgeschwindigkeiten eine zuverlässige Möglichkeit für immunchemische Affinitätsstudien darstellt.

Die praktische Nutzenanwendung der Ergebnisse dieses mehr theoretischen Konzeptes ergab sich bei der Suche nach einem geeigneten <sup>125</sup>J-markierten Indikator-Hapten für die radioimmunologische Östrogen-Bestimmung. <sup>125</sup>J als Indikator-Atom erleichtert als gamma-Strahler die Meßtechnik, es vermindert aber infolge seiner räumlichen Ausdehnung die Affinität des korrespondierenden Antikörpers, sofern es ein H-Atom im immundominanten Bereich des Li-

ganden substituiert. Zur Markierung kann das Brückenglied des Immunogens herangezogen werden ("homologe Markierung"). Dies ist relativ einfach und wurde deswegen häufig praktiziert.

Diese Technik ist jedoch, wie oben gezeigt, mit mindestens einem Nachteil behaftet. Der korrespondierende Antikörper bindet Liganden mit Brückenglied mit höherer Affinität als Liganden ohne Brückenglied, zu denen im allgemeinen der Analyt gehört. Der Nachteil resultiert in verminderter analytischer Sensitivität der Bestimmung. Selektive Jodierung von Östrogenmolekülen ohne Brückenglied ist in der Nachbarschaft ihrer phenolischen Hydroxylgruppe an C2 und C4 relativ einfach zu erreichen. Nach den oben erwähnten Ergebnissen ist anzunehmen, daß ein J-Atom an C4 des Steroids vom Antikörper weniger gut "erkannt" wird als

Abb. 1: Östrial-Konzentration im Serum in der späten Schwangerschaft, bestimmt durch Radioimmunoassay  
Korrelation der Ergebnisse mit 2-<sup>125</sup>J (A) oder 4-<sup>125</sup>J (B) und <sup>3</sup>H-Östrial als Indikatorliganden



ein J-Atom an C2, daß also für den Indikator C4-J-Östrogen eine etwa gleiche Affinität zu erwarten ist wie für den Analyt Östrogen, woraus optimale analytische Sensitivität resultiert. Die Ergebnisse der jeweiligen Bindungsexperimente (Auswertung über logit-log-Standardkurven) und die Vergleiche mit anderen Analyseverfahren (Auswertung über standardisierte Hauptkomponente) brachten die empirische Bestätigung der theoretischen Ableitungen (Abb. 1).

#### Literatur

- 1 Kuss, E., Dirr, W., Goebel, R., Gloning, K., Hötzing, H., Link, M., Thoma, H. Steroids as immunochemical probes. Thermodynamic and kinetic data with special regard to the "bridge problem" in estrogen radioimmunoassay. In: Radioimmunoassay and Related Procedures in Medicine, International Atomic Energy Agency, 1978; 1: 69-89
- 2 Gloning, K., Dibbelt, L., Kuss, E. 2- and 4-iodinated estriol as indicator ligands for estriol radioimmunoassays with anti-estriol-C6 conjugate antiserum. J. Immunol. Methods 1989; 122: 185-193

Anschrift des Verfassers:

Dr. K.-P. Gloning, I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität, Maistraße 11, D-W 8000 München 2

#### Katecholöstrogene: Nur Objekte des Laboratoriums oder Effektoren des Organismus?

*F.D. Berg*

*I. Frauenklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München*

Katecholöstrogene (2-Hydroxyöstrogene, 4-Hydroxyöstrogene) und ihre Methyläther sind Metabolite des Follikelhormons Östradiol-17 $\beta$ . Als ortho-Diphenole ähneln sie den Katecholaminen. Sie können also, zumindest formal, als Bindeglied zwischen den Östrogenen des Ovars und den Neurotransmittern des zentralen Nervensystems angesehen werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Etablierung zuverlässiger Analyseverfahren für serielle Bestimmungen dieser alkali- und oxidationsempfindlichen Substanzen und die Erstellung von Referenzbereichen ihrer Konzentrationen in Serum und Urin von Frauen im Menstruationszyklus, in der Schwangerschaft und in der Postmenopause als Beitrag zur näheren Charakterisierung ihrer bisher unklaren physiologischen Bedeutung.

Nach Synthese geeigneter Immunogene und <sup>125</sup>J-markierter Indikatorliganden wurden Antikörper induziert und radioimmunologische Analyseverfahren mit hoher Spezifität, Empfindlichkeit und Präzision entwickelt.

Die Ergebnisse der Bestimmungen zeigten, daß die o-Hydroxylierung des aromatischen Ringes einen wichtigen Schritt im Stoffwechsel der Östrogene darstellt. Die Konzentrationsverläufe der Katecholöstrogene ähneln dem der "klassischen" Östrogene (Östradiol, Östron, Östriol) im Zyklus und im ersten und zweiten Trimenon der Schwangerschaft. Im dritten Trimenon der Schwangerschaft steigt die Konzentration der Katecholöstrogene nicht mehr an, wohl aber die des Östradiol und des Östriols. In der Postmenopause werden mehr Katecholöstrogene gebildet als Östriol.

Mit der Erstellung von Referenzbereichen für Katecholöstrogene waren die Voraussetzungen dafür geschaffen, die physiologische Bedeutung der Katecholöstrogene beim Menschen abzuschätzen. Während in zahlreichen Tierversuchen eine pharmakologische Wirkung der 2- und 4-Hydroxyöstrogene auf die Regulation der Gonadotropinfreisetzung nachgewiesen werden konnte, lassen die vorliegenden Ergebnisse der Bestimmungen beim Menschen aufgrund großer Streubreiten eher den Schluß zu, daß Katecholöstrogene hauptsächlich Abbauprodukte des physiologisch wirksamen Östradiols sind und daß sie selbst wahrscheinlich keine eigenen spezifischen Wirkungen ausüben. Diese Annahme wird zusätzlich dadurch gestützt, daß offenbar auch extrem hohe oder niedrige Konzentrationen keine pathophysiologischen Wirkungen verursachen.