

**Analyse molekularer Mechanismen der  
ER $\alpha$ - und ER $\beta$ -vermittelten Wirkung  
spezifischer Liganden und des  
Phytoestrogens Genistein**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
Doktor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)  
der Fakultät Mathematik und Naturwissenschaften  
an der Technischen Universität Dresden

vorgelegt von  
Torsten Hertrampf  
aus Aachen

Tag der Einreichung: 14. Februar 2007  
Tag der Verteidigung: 23. Mai 2007

Gutachter: **Prof. Dr. Günter Vollmer**  
(Institut für Zoologie, Technische Universität Dresden)  
**Prof. Dr. Gisela H. Degen**  
(Institut für Arbeitsphysiologie, Universität Dortmund)  
**PD Dr. rer. nat. habil. Patrick Diel**  
(Institut für Kreislaufforschung und Sportmedizin,  
Deutsche Sporthochschule Köln)

**meiner Familie und Christina**

*„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)*

## **Danksagungen**

Hiermit danke ich Herrn PD Dr. rer. nat. habil. P. Diel für die Bereitstellung des interessanten Themas dieser Doktorarbeit, sowie für die fachlich und menschlich kompetente und immer hilfsbereite Betreuung und Zusammenarbeit während der letzten Jahre.

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. G. Vollmer für die fruchtbare Kooperation mit seiner Arbeitsgruppe und besonders für seine Unterstützung bei der Vorlage dieser Doktorarbeit an der Technischen Universität Dresden.

Frau Ute Laudenschlager danke ich für ihre wertvolle Unterstützung während der vielen Stunden und Tage im Tierstall und bei der Durchführung und Organisation zahlreicher tierexperimenteller Studien.

Des Weiteren möchte ich meinem Mitspieler und geschätzten Kollegen Jan Seibel für seine fachliche Diskussions- und Hilfsbereitschaft während unserer gemeinsamen Zeit im Labor und auf Kongressen danken, aber auch für die zahlreichen, gemeinsam verbrachten und meist munteren Mittagspausen und „Kicker-Lehrstunden“ in der Mensa.

Ein weiterer Dank gilt Mojgan Ghilav und Anika Voß für ihre technische Unterstützung im Labor und für erfrischende, gemeinsam verbrachte Kaffeepausen.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. K. H. Fritzemeier (Schering AG, Berlin) für die Zusammenarbeit und die Bereitstellung verschiedener Untersuchungssubstanzen.

Mein Dank gilt auch Frau Prof. Dr. G. H. Degen (IFADO, Dortmund) für die wissenschaftlich kompetente Unterstützung bei der Einreichung von Publikationen und für die technische Durchführung der HPLC-Untersuchungen in ihrer Arbeitsgruppe.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen zuvor nicht genannten aktuellen und ehemaligen Diplomanden, Doktoranden und Mitarbeitern des Instituts für Kreislaufforschung und Sportmedizin, Abteilung molekulare und zelluläre Sportmedizin der Deutschen Sporthochschule Köln, für die Zusammenarbeit und Unterstützung.

Ganz besonders danken möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin Christina, die mich jederzeit unterstützt, motiviert, bereichert und auf ihre Art wesentlich zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben.

## **Versicherung**

Hiermit versichere ich, 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.

Dresden, den 14.02.2007

---

(Torsten Hertrampf)

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Estrogene und ihre Wirkmechanismen .....	2
1.1.1 Biosynthese und Vorkommen von Estrogenen.....	2
1.1.2 Physiologische Wirkungen der Estrogene .....	3
1.1.3 Struktur und klassische Wirkmechanismen der Estrogenrezeptoren.....	6
1.1.4 Alternative genomische und nicht-genomische Wirkungsweisen von Estrogenen.....	9
1.1.5 Estrogenrezeptor „crosstalk“ in Abwesenheit seines Liganden.....	11
1.1.6 Estrogenrezeptor Beta (ER $\beta$ ): Struktur und Funktion .....	12
1.2 Phytoestrogene .....	15
1.2.1 Epidemiologie der Phytoestrogene .....	15
1.2.2 Vorkommen, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Phytoestrogenen	17
1.2.3 Genomische und nicht-genomische physiologische Wirkungen von Phytoestrogenen .....	21
1.2.3.1 Mitogene und antikarzinogene Effekte von Phytoestrogenen .....	23
1.2.3.2 Phytoestrogene und Knochenstoffwechsel .....	25
1.2.3.3 Phytoestrogene und das kardiovaskuläre System .....	28
1.3 Untersuchte Markergene und estrogenresponsive Gene.....	31
1.3.1 Proliferating cell nuclear antigen .....	31
1.3.2 Aktive Caspase-3 .....	31
1.3.3 Bone morphogenic protein-2.....	32
1.3.4 Progesteronrezeptor.....	32
1.3.5 Cyclooxygenase-2.....	33
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	34
<b>2 Material.....</b>	<b>36</b>
2.1 Laborgeräte .....	36
2.2 Chemikalien .....	37
2.3 Verbrauchsmaterialien .....	38
2.4 Untersuchungs- und Referenzsubstanzen .....	39
2.5 Antikörper .....	40
2.6 Gewebe.....	40
2.7 Organisation und Durchführung der tierexperimentellen Studien.....	42
<b>3 Methoden .....</b>	<b>48</b>
3.1 Western Blot .....	48
3.1.1 Proteinisolierung .....	48
3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
3.1.3 SDS Gelelektrophorese .....	49
3.1.4 Coomassie Brilliant Blue Färbung.....	50
3.1.5 „Semi dry“ Blot des SDS-Gels .....	50
3.1.6 Antikörperinkubation .....	52
3.1.7 Proteinnachweis durch das Lumi-Light System .....	52
3.1.8 Densitometrische Auswertung der Western Blots .....	53
3.2 Histologie .....	54
3.2.1 Dehydrierung, Fixierung und Einbettung der Gewebe .....	54
3.2.2 Ausgießen und Ausrichten des Gewebes .....	55
3.2.3 Erstellen von Paraffinschnitten .....	55
3.2.4 Aufziehen der Paraffinschnitte.....	56
3.2.5 Entparaffinieren und Autoklavieren der Schnitte .....	56
3.2.6 Immundetektion .....	58

3.2.7 Azan-Bindegewebefärbung nach Heidenhain.....	61
3.2.8 Epithelhöhenvermessung .....	62
3.2.9 Bildliche Dokumentation der behandelten Schnittpräparate.....	63
3.3 Knochendichtemessungen mittels pQCT.....	63
3.4 Dokumentation des Bewegungsantriebs .....	65
3.5 Quantitative Bestimmung der Proliferationsrate im Uterusepithel.....	66
3.6 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration in Futter und Blutserum.....	66
3.6.1 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration im Futter .....	66
3.6.2 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration im Blutplasma.....	67
3.7 Statistik.....	67
<b>4 Ergebnisse .....</b>	<b>69</b>
4.1 Einflüsse von Genistein auf die Zellproliferation und die gewebespezifische Expression verschiedener estrogensensitiver Gene .....	69
4.1.1 Einflüsse von Genistein auf die Zellproliferation und die Genexpression in der Brustdrüse ovariectomierter Ratten .....	69
4.1.2 Gewebespezifische Einflüsse von Genistein auf die Genexpression von Cox-2.....	70
4.2 Untersuchung von Effekten einer phytoestrogenreichen Diät in Kombination mit körperlicher Aktivität.....	71
4.2.1 Bestimmung des Phytoestrogengehalts in Futter und Blutplasma.....	71
4.2.2 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf die Körpergewichtsentwicklung ovariectomierter Ratten .....	73
4.2.3 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf den Bewegungstrieb ovariectomierter Ratten.....	74
4.2.4 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf die Entwicklung der Knochendichte.....	75
4.3 Einflüsse von subkutan appliziertem Genistein auf die Zellproliferation im Uterus in Anwesenheit von Estrogenen.....	76
4.4 Gewebespezifische Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden.....	78
4.4.1 Uterotrophe Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden.....	79
4.4.1.1 Effekte auf das Uterusfeuchtgewicht ovariectomierter Ratten .....	79
4.4.1.2 Effekte auf die Uterusepithelhöhe ovariectomierter Ratten.....	80
4.4.2 Estrogene Einflüsse auf die Entwicklung des Körpergewichts ovariectomierter Ratten.....	81
4.4.3 Estrogene Einflüsse auf den Bewegungstrieb ovariectomierter Ratten.....	82
4.4.4 Estrogene Einflüsse auf die Knochenhomöostase ovariectomierter Ratten .....	83
4.4.5 Estrogene Einflüsse auf die Darmhomöostase ovariectomierter Ratten.....	85
4.5 Kombinatorische Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden.....	87
4.6 Einflüsse von körperlicher Aktivität auf knochenprotektive Effekte von Genistein .....	88
<b>5 Diskussion .....</b>	<b>90</b>
5.1 Das Tiermodell der ovariectomierten Ratte.....	91
5.2 Untersuchungen estrogenrezeptorsubtypspezifischer Wirkungen .....	93
5.3 Gewebeselektive Effekte des Phytoestrogens Genistein.....	96
5.4 Untersuchungen estrogener Effekte von Genistein in Uterus und Brustdrüse.....	98
5.4.1 Estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf Uterusfeuchtgewicht und Uterusepithelhöhe .....	99



5.4.2 Gewebespezifische Effekte des Phytoestrogens Genistein in der Brustdrüse .....	100
5.4.3 Kombinatorische Effekte von Genistein und Estradiol im Uterus.....	102
5.5 Estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf die Körpergewichtsentwicklung .....	105
5.6 Einflüsse estrogener Substanzen auf den Bewegungstrieb ovariectomierter Ratten .....	108
5.7 Analyse protektiver estrogener Effekte auf Knochendichteverluste nach einer Ovariectomie.....	110
5.8 Untersuchung estrogener Effekte auf homöostatische Prozesse im Dünndarm .....	116
<b>6 Schlussfolgerung und Ausblick.....</b>	<b>119</b>
<b>Literatur.....</b>	<b>122</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>149</b>
<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>152</b>

## Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
Abb.	Abbildung
a. dest.	destilliertes Wasser
AF-1	activation function 1
AF-2	activation function 2
Alpha	mit ERA (10 µg/kg KGW/T) substituierte Behandlungsgruppe
Alpha1	mit ERA (1 µg/kg KGW/T) substituierte Behandlungsgruppe
Apo	Apolipoprotein
Beta	mit ERB substituierte Behandlungsgruppe
BMP	bone morphogenic protein
BSA	bovine serum albumin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CoReg	Koregulatorprotein
Cox-2	Cyclooxygenase-2
DAI	Daidzein
DBD	DNA bindende Domäne
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E <sub>1</sub>	Estron
E <sub>2</sub> /E <sub>2</sub>	17β-Estradiol
E <sub>3</sub>	Estriol
EBP	estrogen binding protein
EE	Ethinylestradiol
EGF	epidermal growth factor
eNOS	endotheliale Stickoxid Synthase
ER	Estrogenrezeptor
ER $\alpha$	Estrogenrezeptor alpha
ER $\beta$	Estrogenrezeptor beta
ERA	Estrogenrezeptor alpha spezifischer Agonist (16 $\alpha$ -LE <sub>2</sub> )
ERA1	niedrig dosierte Behandlung mit 16 $\alpha$ -LE <sub>2</sub>
ERB	Estrogenrezeptor beta spezifischer Agonist (8 $\beta$ -VE <sub>2</sub> )
ERE	estrogen response element
ERKO <sub>s</sub>	Mäuse mit ausgeschaltetem Estrogenrezeptorsubtyp
ER $\alpha$ KO <sub>s</sub>	Mäuse mit ausgeschaltetem ER $\alpha$

---

ER $\beta$ KOs	Mäuse mit ausgeschaltetem ER $\beta$
g	Gramm
GEN/Gen	Genistein
HDL	high density lipoprotein
HET	Hormonersatztherapie
H <sub>2</sub> O	Wasser
HPLC	high performance liquid chromatography
HRP	horseradish peroxidase
hsp	Hitzeschockprotein
ICI	Antiestrogen
IGF-1	insulin-like-growth-factor-1
IL-6	Interleukin-6
kDa	Kilo dalton
kg	Kilogramm
KGW	Körpergewicht
LBD	ligand binding domain
LDL	low density lipoprotein
LOD	limit of detection
m	Stichprobe1
M	Mol pro Liter
mM	Millimolar
MAPK	mitogen activated protein kinase
mPOA	medial preoptic area
mRNA	messenger-RNA
n	Stichprobe2
N-CoR	nuclear receptor co-repressor
NF- $\kappa$ B	nuclear factor $\kappa$ B
NO	nitric oxide
NOS	nitric oxide synthase
$\mu$ g	Mikrogramm
$\mu$ l	Mikroliter
mg	Milligramm
OPG	Osteoprotegerin
OVX	Ovarektomie/ovarektomierte Kontrollgruppe

PAD	phytoestrogenarme Diät
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PGs	Prostaglandine
pH	pH-Wert
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKA	Proteinkinase A
PR	Progesteronrezeptor
PRD	phytoestrogenreiche Diät
Phyto	Behandlungsgruppe auf phytoestrogenreicher Diät
R	Rangzahl
RAL	Raloxifene
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	region of interest
SDS	Sodiumdodezylsulfat
SERM	selektiver Estrogenrezeptor Modulator
s.c.	subkutan
SHAM	scheinoperierte intakte Kontrollgruppe
SHGBs	Sexualhormon-bindende Globuline
SMRT	silencing mediator of retinoid and thyroid receptors
SRC-1	steroid Rezeptor Coaktivator 1
T	Tag
TAM	Tamoxifen
TGF- $\beta$	transforming growth factor- $\beta$
(TNFR)-1	(tumor necrosis factor receptor)-1
U	Umdrehungen
<i>U</i>	Prüfgröße
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel

## Zusammenfassung

Estrogene haben für den menschlichen Körper vielfältige physiologische Bedeutungen. Das Wirkspektrum dieser Steroidhormone erstreckt sich nahezu über den gesamten Organismus, denn nicht nur die Regulation von Wachstum und Funktion der reproduktiven Gewebe stehen unter ihrem Einfluss. Die Vielfalt estrogener Wirkungen wird erst in Abwesenheit dieser Hormone und bei der genauen Untersuchung verschiedener Erkrankungsursachen deutlich. So belegt z.B. die nähere Betrachtung postmenopausaler Beschwerden, dass Estrogene auch im Gehirn, im Knochen, im Fettgewebe und im Herzkreislaufsystem wichtige Vermittler unterschiedlicher physiologischer Mechanismen sind. Darüber hinaus können Estrogene in klassischen und nicht-klassischen Zielgeweben ein karzinogenes oder auch antikarzinogenes Potential entfalten. Nicht nur die Funktionen, auch die Wirkmechanismen von Estrogenen sind sehr vielfältig: Sie vermitteln in erster Linie gewebespezifische, genomische Einflüsse über die Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$ , aber Estrogene können auch über nicht-genomische Mechanismen Effekte in unterschiedlichen Zielgeweben hervorrufen.

Die gewebespezifischen molekularen Wirkmechanismen der Transkriptionsfaktoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  stehen vor dem Hintergrund verschiedenster Fragestellungen im Mittelpunkt des wissenschaftlichen Interesses: Dabei haben Untersuchungen mit estrogen wirksamen Substanzen wie selektiven Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs), Phyto-SERMs, Partialagonisten und Estrogenrezeptor(ER)-antagonisten, aber auch Studien an ER-knock-out Tieren (ERKO) zu neuen mechanistischen und pathophysiologischen Erkenntnissen geführt.

Ziel dieser Arbeit war es vor dem Hintergrund pathophysiologischer Fragestellungen estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf biologische Endpunkte hormoneller Wirkungen in verschiedenen Zielgeweben (Brustdrüse, Darm, Knochen und Uterus) zu untersuchen. Die vergleichende Analyse der Einflüsse estrogenrezeptorsubtypspezifischer Agonisten sollte darüber hinaus zu einem besseren Verständnis der mechanistischen und gewebespezifischen Einflüsse des Phytoestrogens Genistein beitragen.

Zur Analyse der Wirkungsweisen der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  wurden zwei selektive synthetische Estrogenrezeptoragonisten (ERA und ERB) sowie 17 $\beta$ -Estradiol im *in vivo* Modell der ovariectomierten Ratte eingesetzt. Neben gewebespezifischen Einflüssen der steroidal Substanzen wurden in diesem

Tiermodell, in sechs tierexperimentellen Studien zudem agonistische, antagonistische und kombinatorische Effekte des Phytoestrogens Genistein untersucht. Genistein wurde zumeist subkutan appliziert, aber auch oral verabreicht, um die Pfad-abhängige Bioverfügbarkeit dieses Phytoestrogens zu berücksichtigen.

Für alle Substanzen wurden, vor dem Hintergrund Rezeptorsubtypspezifischer Wirkungsweisen, deren Einflüsse auf Proteinexpressionsmuster geeigneter Markergene in Brustdrüse, *Vena cava* und Uterus, auf den Bewegungsantrieb, die Körpergewichtsentwicklung und auf homöostatische Prozesse im Darm und Knochen immunhistochemisch, molekularbiologisch bzw. computertomographisch analysiert und mit dem klassischen Parameter des Uterusfeuchtgewichts korreliert.

Bei Betrachtung der Ergebnisse wird deutlich, dass uterotrophe Dosen an Estradiol ( $E_2$ ) und ERA stimulierende Effekte auf den Bewegungsantrieb, hemmende Einflüsse auf die Körpergewichtszunahme, protektive Wirkungen auf die Knochenhomöostase sowie proliferative Effekte in Brustdrüse und Uterus über den ER $\alpha$  vermitteln. Über den ER $\beta$  werden hingegen antiestrogene Effekte von ERB und GEN auf den Bewegungsantrieb, sowie antiproliferative und proapoptische Effekte im Darm vermittelt.

Für das Phytoestrogen Genistein zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit ferner, dass es anabole Effekte im Knochen und stimulierende Einflüsse auf das Uterusfeuchtgewicht über seine schwache Affinität zum ER $\alpha$  vermittelt, während Genistein auf den Bewegungsantrieb und im Darm wie ein ER $\beta$ -spezifischer Agonist wirkt.

Die anabolen Einflüsse von Genistein im trabekulären Knochen ovariectomierter Ratten konnten bereits durch geringe körperliche Bewegungsumfänge signifikant verstärkt werden. Eine knochenprotektive Wirkung war bei subkutaner Applikation von Genistein feststellbar, aber nicht unter einer phytoestrogenreichen Diät. Dies spricht für eine eingeschränkte Bioverfügbarkeit des Phytoestrogens bei oraler Gabe. Des Weiteren konnte für Genistein gezeigt werden, dass es die Proteinexpression der Cyclooxygenase-2 (Cox-2) in der *Vena cava* und im Uterus gewebespezifisch und selektiv moduliert. In Anwesenheit von Steroidestrogenen wurden keine additiven Einflüsse des Phytoestrogens auf proliferative Mechanismen im Uterus beobachtet. Auch in der Brustdrüse konnte gezeigt werden, dass Genistein im Vergleich zu  $E_2$  die Proliferation nur marginal beeinflusst.

Die Ergebnisse dieser Arbeit charakterisieren Genistein als eine estrogen wirksame Substanz. Allerdings wurde auch deutlich, dass Genistein in Uterus und Brustdrüse, bedingt durch seine geringe proliferative Potenz, ein signifikant schwächeres karzinogenes Potential hat als Estradiol.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die molekularen Mechanismen der estrogenrezeptorvermittelten Effekte des Phytoestrogens Genistein äußerst komplex sind. Genistein wirkt gewebe- und estrogenrezeptorsubtypspezifisch. Hierbei spielen sowohl die Bindungsaffinitäten von Genistein zu den beiden Rezeptorsubtypen (ER $\alpha$ , ER $\beta$ ), als auch die Verteilungsmuster der Estrogenrezeptorsubtypen im jeweiligen Zielgewebe eine bedeutende Rolle. Vor diesem mechanistischen Hintergrund könnte man Genistein auch als „Estrogenrezeptorsubtyp-Partialagonisten“ bezeichnen.

Da Genistein im Modell der ovariectomierten Ratte auf die Proliferation in Brustdrüse und Uterus im Vergleich zu Estradiol nur gering wirkt, während es protektive Einflüsse auf Knochen- und Darmgewebe zeigt, deutet sich an, dass dieses Phytoestrogen eine mögliche Alternative zur klassischen HET darstellen könnte. Außerdem zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ER $\beta$ -selektive Agonisten und Partialagonisten mit hoher ER $\beta$ -Präferenz in der Darmkrebsprävention von Bedeutung sein könnten. Die Ergebnisse anderer Studien stellen derartige Substanzen auch für die Prävention und Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen zur Diskussion.

Zukünftige Untersuchungen sollten neben weiteren estrogenrezeptorsubtypspezifischen Einflüssen auch die Bedeutung von Rezeptor-Heterodimeren thematisieren. Die verfügbaren estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten könnten hierbei in Kombination mit dem Tiermodell der ovariectomierten Ratte das Verständnis der mannigfaltigen molekularen Wirkmechanismen von Estrogenen bedeutend erweitern.

## 1 Einleitung

Die Entdeckung des Estrogenrezeptors (ER)  $\beta$  (Kuiper et al. 1996) hat nicht nur das Wissen um die Komplexität der Wirkungsweise von Estrogenen um ein Vielfaches erweitert (Saunders 1998, Gustafsson 2006), sondern steigerte darüber hinaus auch das wissenschaftliche Interesse an verschiedenen Vertretern der Phytoestrogene. Der Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptorsubtyps folgten Rezeptorbindungsstudien die belegten, dass einige Phytoestrogene mit unterschiedlicher Affinität an die Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  binden. So hat das Phytoestrogen Genistein (GEN) eine deutlich höhere Affinität zum ER $\beta$  als zum ER $\alpha$ , während Estradiol (E<sub>2</sub>) an beide Rezeptorsubtypen mit gleicher Affinität bindet. Das Phytoestrogen Coumestrol bindet mit weitaus höherer Affinität an ER $\alpha$  als GEN, zeichnet sich jedoch ebenfalls durch eine höhere Präferenz für ER $\beta$  aus (Kuiper et al. 1998).

Inwiefern derartige selektive Bindungseigenschaften von Vertretern der Phytoestrogene für endokrinologische und vor allem pathophysiologische Fragestellungen von Bedeutung sind, ist längst noch nicht abschließend geklärt (Davis et al. 1999). Neben ihren selektiven Bindungseigenschaften und Parametern wie z.B. Ernährung, Metabolismus und Dosis-Wirkungsbeziehungen (Setchell und Cassidy 1999, Ososki und Kennelly 2003), stehen auch nicht-genomische Wirkungsweisen von Phytoestrogenen (Cos et al. 2003) im Mittelpunkt wissenschaftlicher Untersuchungen. Darüber hinaus erschweren gewebespezifische Verteilungsmuster (Kuiper et al. 1997) und ligandenabhängige Wirkungsweisen (Paech et al. 1997) von ER $\alpha$  und ER $\beta$ , sowie die An- oder Abwesenheit von Estrogenen die eindeutige Charakterisierung dieser endokrin wirksamen pflanzlichen Substanzen.

Vor diesem komplexen Hintergrund soll diese Arbeit dazu beitragen, die molekularen Wirkmechanismen von Estrogenen und die selektiven estrogenrezeptorsubtypspezifischen Eigenschaften des Phytoestrogens Genistein in estrogensensitiven Geweben besser verstehen und hinterfragen zu können.

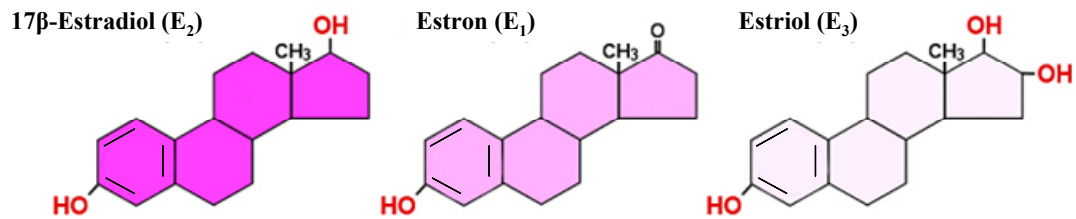


## 1.1 Estrogene und ihre Wirkmechanismen

### 1.1.1 Biosynthese und Vorkommen von Estrogenen

Das in der Leber über verschiedene Zwischenstufen aus Acetyl-CoA entstehende Cholesterin, welches die Basis für die Biosynthese der verschiedenen Steroidhormone bildet, wird durch Lipoproteine zu den endokrinen Drüsen transportiert. An ihren Produktionsorten (Nebennierenrinde, Ovar, Hoden, Plazenta, Fettgewebe) werden Steroide nur in sehr geringen Mengen gespeichert und bei Bedarf aus dem zellulären Cholesterinvorrat synthetisiert. Den Hauptbildungsort der Estrogene (95% des Serumestradiols und 99% des Estrons) stellt das Ovar dar. Hier entsteht zunächst in den Zellen der *Theka interna* aus Cholesterin über Pregnenolon das Gestagen Progesteron, welches nicht nur selbst hormonelle Wirkungen entfaltet, sondern aus dem auch alle anderen Steroidhormone synthetisiert werden können. Über das Zwischenprodukt 17 $\alpha$ -hydroxy-Progesteron entsteht schließlich Androstendion, welches in die Granulosazellen überführt und hier in einer durch die 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysierten Reaktion in das Androgen Testosteron umgewandelt wird. Androstendion und Testosteron stellen in den Granulosazellen der Follikel die Basis für die Synthese von Estrogenen dar. Über den Aromatase-Enzym-Komplex entstehen über eine Aromatisierung des Ringes A unter oxidativer Entfernung der C-19-Methylgruppe aus Androstendion Estron (E<sub>1</sub>) und aus Testosteron 17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>). Das Enzym 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase katalysiert ebenfalls die Synthese von E<sub>2</sub> aus E<sub>1</sub> in den Granulosazellen (Löffler und Petrides 2003).

17 $\beta$ -Estradiol (E<sub>2</sub>) ist das bedeutendste und physiologisch wirkstärkste Estrogen. Das ebenfalls in den Granulosazellen der Ovarien synthetisierte Estron (E<sub>1</sub>) und der Hauptmetabolit des Estradiols Estriol (E<sub>3</sub>) (Abb. 1.1) stellen zwei weitere natürliche, wenn auch bezogen auf die Rezeptorbindungsaffinität schwächere Liganden der Estrogenrezeptoren dar (Kuiper et al. 1997). Somit entfalten diese beiden natürlich vorkommenden Estrogene eine deutlich geringere Wirkung als E<sub>2</sub>. Estradiol ist zweimal wirkstärker als Estron und übersteigt die Wirksamkeit seines Metaboliten Estriol um etwa das Zehnfache (Silbernagel und Despopoulos 2003, Kuiper et al. 1997).



**Abb. 1.1:** Strukturformeln der körpereigenen Estrogene 17β-Estradiol, Estron und Estriol.

Estrogene werden im Blut zu einem sehr hohen Prozentsatz an sexualhormonbindende Globuline (SHBGs) gebunden, sodass nur ein sehr geringer Anteil der zirkulierenden Estrogene frei, d.h. in seiner physiologisch aktiven Form im Blut vorliegt. Bedingt durch die ausgeprägte Lipophilie können Estrogene in den unterschiedlichen Zielgeweben sehr gut Zellmembranen überwinden, um anschließend mit hoher Affinität an ihre spezifischen Rezeptoren zu binden. Daher sind Estrogene auch für die transdermale Applikation über Hautpflaster geeignet. Oral ist das natürlich vorkommende Estradiol, ganz im Gegensatz zum synthetischen Ethinylestradiol (EE) (Maier und Herman 2001, Coelingh Bennink 2004), nicht verfügbar, da es unmittelbar nach der Absorption aus dem Dünndarm ins Blut bereits bei der ersten Leberpassage fast vollständig aus dem Blut entfernt wird. Estradiol wird in der Leber mit seinen Hydroxylgruppen an Sulfat oder Glukuronsäure gekoppelt und mit dem Harn oder der Galle ausgeschieden. Hauptausscheidungsform der Estrogene ist ihr Metabolit Estriol (Silbernagel und Despopoulos 2003).

### 1.1.2 Physiologische Wirkungen der Estrogene

Estrogene beeinflussen neben der Ausprägung der sekundären Geschlechtsmerkmale der Frau in unterschiedlichen klassischen und nicht-klassischen estrogensensitiven Organen und Geweben verschiedene Stoffwechselfvorgänge, physiologische Parameter und Organfunktionen (Barkhem et al. 2004).

Eine der wichtigsten Funktionen erfüllt E<sub>2</sub> im Zusammenspiel mit Progesteron im Hypothalamus-Hypophysen-Ovar-System bei der Vorbereitung des Endometriums des Uterus auf die Implantation eines befruchteten Eies. Hier steuert es während des monatlichen Menstruationszyklus die Sequenz von Wachstum (proliferative Phase), Differenzierung (sekretorische Phase) und Rückbildung (Menstruation) des Endometriums. Auch die Expression der Estrogenrezeptoren (ERs) und des Progesteronrezeptors (PR) sind zyklischen Schwankungen unterworfen. Die Expressionsrate des ERα steigt zur Zyklusmitte hin an und erreicht seine maximale

Konzentration im späten Abschnitt der proliferativen Phase des Endometriums. Somit induzieren Estrogene den Aufbau der Uterusschleimhaut, tragen zur Verlängerung der uterinen Drüsen bei, sorgen für Wachstum und Vermehrung der Muskelfasern im Uterus und rufen eine entsprechend zunehmende Vaskularisierung hervor (Löffler und Petrides 2003).

Kommt es zur Befruchtung, so wird unter dem Einfluss der Steroidhormonproduktion des *Corpus luteum* die Schwangerschaft aufrechterhalten und sowohl Estradiol als auch Progesteron rufen verschiedene, den Embryo schützende physiologische und morphologische Wirkungen hervor.

Neben dem Uterus werden in weiteren klassischen estrogensensitiven Geweben wie den Mammæ und der Vagina die Estrogenrezeptoren verstärkt exprimiert. In der Brustdrüse bewirkt die Aktivierung der Estrogenrezeptoren eine Stimulation von Wachstum und Differenzierung des Gangepithels, eine Induktion der meiotischen Aktivität von Gangzylinderepithelien und das Wachstum des Bindegewebes. In der Vagina bewirken Estrogene eine Verdickung der Schleimhaut und eine vermehrte Abstoßung glykogenhaltiger Epithelzellen, was über eine vermehrte Milchsäureproduktion der Döderlein-Bakterien in der Vagina zu einem sauren Milieu führt, wodurch die Infektionsgefahr herabgesetzt wird (Silbernagel und Despopoulos 2003).

Estrogene haben zusätzlich in verschiedenen extragonadalen, nicht-klassischen Geweben spezifische Wirkungen. Sie beeinflussen den Fettstoffwechsel, indem sie u.a. die Plasmaspiegel von Apolipoprotein B (ApoB) und ApoE erhöhen und den Spiegel des high density Lipoproteins (HDL) senken (Windler et al. 1980, Srivastava et al. 1997, Srivastava et al. 2001).

Im Gehirn trifft man neben dem Hypothalamus auf weitere Areale, die Zielgewebe von Estrogenen darstellen. Estrogene regulieren und beeinflussen verschiedene Gehirnfunktionen positiv. Hierzu zählen der Gemütszustand, die neuronale Entwicklungsfähigkeit und die kognitive Funktion. Aufgrund ihrer neuroprotektiven Fähigkeiten werden Estrogene zur Behandlung von altersbedingten Krankheiten wie Alzheimer und Apoplexie diskutiert (Singh et al. 2006).

Neben den Einflüssen biomechanischer Belastung stellen die Wirkungen von Estrogenen wesentliche physiologische Mechanismen des Erhalts der Knochenmasse dar (Riggs et al. 2002). Estrogene unterdrücken die Abnahme der Knochendichte, indem sie einander ausgleichende Anteile des Knochenaufbaus und des

Knochenabbau, also die Knochenhomöostase, sicherstellen (Chow et al. 1992, Manolagas 2000). Auf zellulärer Ebene beeinflussen sie Bildung, Lebensdauer und funktionelle Aktivität von Osteoklasten (Hughes et al. 1996) und Osteoblasten (Majeska et al. 1994). Während der Menopause sinkt der Serumspiegel von E<sub>2</sub> auf 3-5% des prämenopausalen Levels und der E<sub>1</sub>-Serumspiegel wird auf 25-35% reduziert (Khosla et al. 1997, Khosla et al. 1998). Die Untersuchungen der Genexpression von verschiedenen Knochenmarkern haben ergeben, dass derart niedrige Estrogenspiegel zu einem um 90% verstärkten Knochenabbau führen, während die Expression der Marker des Knochenaufbaus nur um 45% ansteigt (Garnero et al. 1996). Daher führen sinkende Estrogenspiegel bereits während der Menopause zu einem Ungleichgewicht zwischen Knochenauf- und Knochenabbau, was einen verstärkten Knochenabbau und somit eine auf einem Estrogenmangel basierende Osteoporose zur Folge hat (Riggs et al. 2002). Neben den beschriebenen Einflüssen von Estrogenen auf den Knochenstoffwechsel gibt es noch weitere indirekte Mechanismen, die von Estrogenen beeinflusst werden und die Knochenarchitektur betreffen (Weitzmann und Pacifici 2006). So basieren Veränderungen in der Knochenhomöostase auch auf Interaktionen mit dem Immunsystem (Clowes et al. 2005, Weitzmann und Pacifici 2005), dessen Zellen ebenfalls Estrogenrezeptoren tragen (Cutolo et al. 1995, Lambert et al. 2005).

Die physiologischen Wirkungen von Estrogenen sind auch im Herz-Kreislaufsystem durch protektive Effekte gekennzeichnet. Frauen im fortpflanzungsfähigen Alter sind im Vergleich zu gleichaltrigen Männern wesentlich seltener von Herz-Kreislaufkrankungen wie Arteriosklerose oder Bluthochdruck betroffen. Nach der Menopause steigt die Erkrankungsrate bei Frauen jedoch beachtlich an (Baker et al. 2003, Ouyang et al. 2006). Ein wesentlicher Grund hierfür scheint der Estrogenmangel nach der Menopause zu sein, denn Estrogene senken nicht nur die Blutfette und die Cholesterinkonzentration, sondern verhindern auch Ablagerungen an den Gefäßwänden und beeinflussen die Vasodilatation (Smolders et al. 2003, Tostes et al. 2003). Zudem hemmen Estrogene als Antioxidanzien die Wirkung von Sauerstoffradikalen und mindern somit u.a. das Herzinfarkt-Risiko (Subbiah 1998, Maxwell 1998).

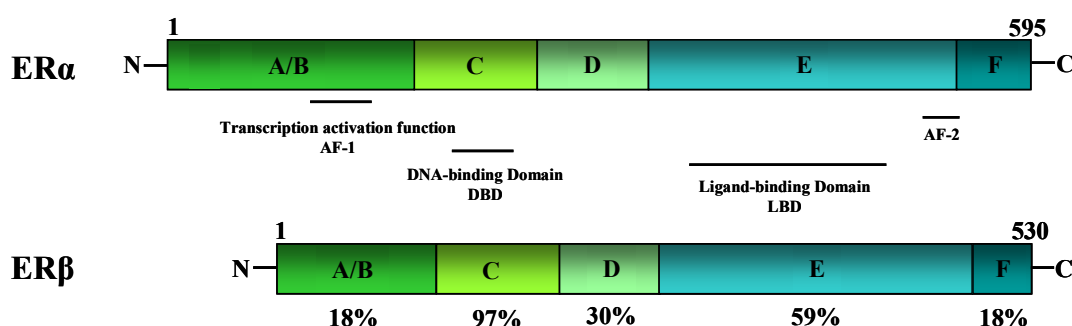
In weiteren Organen und Geweben wie z.B. in der Leber (Diel et al. 2004a, Diel et al. 2006) oder im Darm (Campbell-Thompson et al. 2001, English et al. 2001, Deroo

und Korach 2006) vermitteln Estrogenrezeptoren ebenso physiologische und pathophysiologische Wirkungen von Estrogenen.

### 1.1.3 Struktur und klassische Wirkmechanismen der Estrogenrezeptoren

Die Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  gehören zu der Superfamilie der primär kernständigen Rezeptoren („nuclear receptors“) (Weigel 1996). Sie stellen somit ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren dar (Tsai und O’Malley 1994), die gewebespezifische Antworten auf 17 $\beta$ -Estradiol vermitteln (Nilsson et al. 2001). Estrogenrezeptoren sind jedoch nicht ausschließlich im Zellkern lokalisiert, sondern haben auch im Zytoplasma und in der Plasmamembran spezifische Einflüsse auf Signaltransduktionskaskaden (Deroo and Korach 2006). Estrogene gelangen aus dem Blut über den interstitiellen Raum durch passive Diffusion in die Zielzellen. Begünstigt wird dieser Vorgang durch die ausgeprägte Lipophilie der Estrogene. In der Zielzelle binden sie hochspezifisch an die ERs, was eine Transaktivierung und mehrere Phosphorylierungen der Rezeptoren durch Proteinkinasen zur Folge hat und schließlich zur Dimerisierung der estrogen-aktivierten Rezeptoren führt (Chen et al. 1999a).

Molekulare und biochemische Analysen haben gezeigt, dass Estrogenrezeptoren, sowie andere Mitglieder der Superfamilie der primär kernständigen Rezeptoren auch, aus sechs Domänen (A-F) bestehen (Abb. 1.2) (Shao und Brown 2004).



**Abb. 1.2:** Vergleichende schematische Darstellung der sechs Domänen der Estrogenrezeptorsubtypen und ihrer Funktionen (nach: Shao und Brown 2004).

Im N-terminalen Abschnitt ist die A/B-Domäne lokalisiert, die einen Transaktivierungsbereich (AF-1) beinhaltet, welcher als ligandenunabhängiger Transkriptionsaktivator dient (El-Tanani et al. 1997, Smith et al. 1993, Dutertre und Smith 2003). Hieran schließt sich die DNA-Bindungsdomäne (DBD) des Rezeptors an, die der spezifischen Bindung an spezielle Bereiche der DNA dient und eine

Dimerisierungsregion beinhaltet (White et al. 1991, Kuntz et al. 1997). Die klassische, durch Estrogene hervorgerufene Aktivierung von spezifischen Genen durch wechselwirkende palindromische „estrogen responsive elements“ (EREs) (GGTCA(N)<sub>3</sub>TGACC) (Schwabe et al. 1993) setzt Interaktionen mit kernständigen ER $\alpha$  Homodimeren über Zinkfinger-Motive mit E<sub>2</sub>-responsiven Promotoren voraus (Schwabe et al. 1990, Luisi et al. 1991). Hierbei wird eine Vielzahl von anderen kernständigen Kofaktoren benötigt, die essenziell für die ligandenaktivierte Genexpression sind (Ichinose et al. 1997, Shibata et al. 1997, Zheng et al. 2005). Beispiele für klassisch regulierte Gene mit mindestens einem ERE in der Promotorregion sind Complement C3, dessen Promotor zwei EREs beinhaltet (Fan et al. 1997) oder das Gen des Progesteronrezeptors (Savouret et al. 1991).

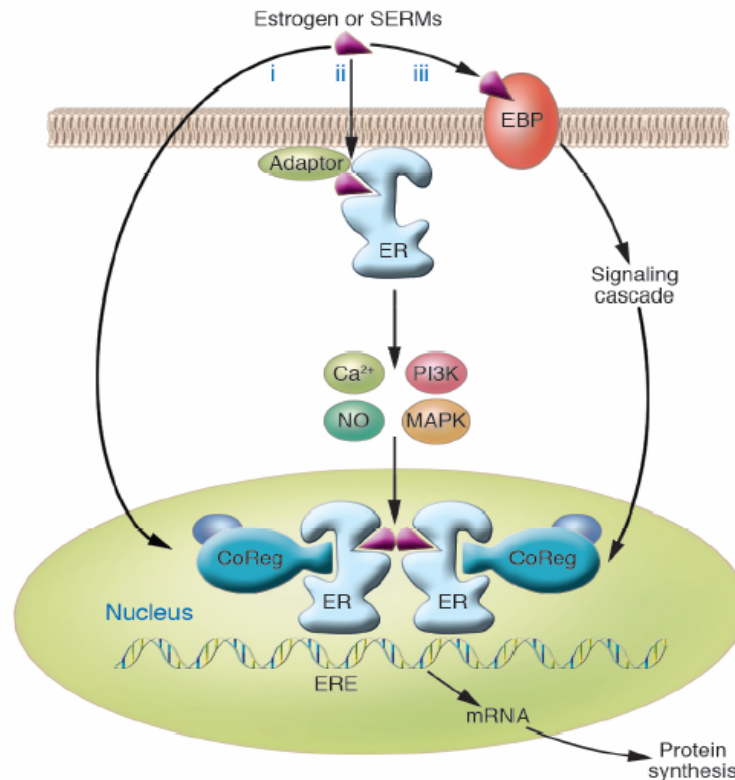
Domäne D stellt eine zentrale Gelenkregion des Proteins dar, an die sich unmittelbar die Ligandenbindungsdomäne (LBD) anschließt (Abb. 1.2). Diese Domäne beschreibt den Bereich des Rezeptorproteins, der verschiedene Estrogene und Antiestrogene spezifisch bindet, mit ihnen interagiert und eine Transaktivierung erfährt (Beekman et al. 1993, Fritsch et al. 1992). Die Aktivierung des ER beinhaltet außerdem eine Vielzahl an Phosphorylierungen von Serinen im Bereich der A/B Domäne (Arnold et al. 1994) und im Bereich der LBD (Arnold et al. 1995). Die relativ ausgeprägte Größe der LBD des ER $\alpha$  bietet vielfältige Bindungsmöglichkeiten für eine Vielzahl von verschiedenen estrogen und antiestrogen wirkenden Liganden (Anstead et al. 1997, Kuiper et al. 1997, Kuiper et al. 1998, Barkhem et al. 1998). Die LBD beinhaltet zusätzlich die zweite Transaktivierungsdomäne (AF-2), eine ligandeninduzierte Aktivierungsdomäne, die es ermöglicht, Koregulatoren (McKenna et al. 1999, Robyr et al. 2000) wie z.B. den Steroid Rezeptor Coaktivator 1 (SRC-1) zu binden (Henttu et al. 1997, Smith et al. 1996). SRC-1 ist Mitglied einer Familie von Koaktivatoren, die in phosphorylierter Form die Aktivierung der Genexpression durch kernständige Rezeptoren verstärken (Rowan et al. 2000). Die Bindung von koregulatorischen Proteinen, wie SRC-1 oder TIF-2 (transcription intermediary factor-2) an die ligandeninduzierte AF-2 des Estrogenrezeptors wird erst durch die Bindung von 17 $\beta$ -Estradiol an den Rezeptor ermöglicht.

Binden hingegen Antiestrogene wie z.B. Faslodex (ICI), Raloxifene (RAL) oder Tamoxifen (TAM) antagonistisch (Brzozowski et al. 1997, MacGregor und Jordan 1998, O'Regan et al. 1998), erfährt das Rezeptorprotein eine Konformations-

änderung, die eine entsprechende Bindung von Kofaktoren an die AF-2 verhindert. Koregulatoren wie N-CoR (nuclear receptor co-repressor) oder SMRT (silencing mediator of retinoid and thyroid receptors) (Lavinsky et al. 1998) binden ebenfalls an die AF-2, üben jedoch eine inaktivierende Wirkung auf den ER aus und stellen daher Korepressoren des Estrogenrezeptors dar.

Den sechsten und abschließenden Abschnitt des Rezeptorproteins bildet die C-terminale Domäne F.

Der ER $\alpha$  liegt im Zellkern zunächst in seiner inaktiven Form vor, die durch die Assoziation mit einer Vielzahl von „heat shock“ Proteinen (hsp) wie z.B. hsp 90 (Chambraud et al. 1990, Lahooti et al. 1990) oder hsp 56 charakterisiert ist (hsp-ER-Komplex). Diffundieren nun Estrogene in die Zelle, lagern sie sich an die hsp-Rezeptor-Komplexe an, wodurch diese dissoziieren und sich zu Dimeren verbinden. Außerdem werden die Rezeptorproteine nach Bindung an ihren Liganden an verschiedenen Positionen phosphoryliert, was zur Bindung verschiedener Kofaktoren führt (Eng et al. 1998). Die so entstandenen Homodimere interagieren über ein doppeltes Zinkfingermotiv mit EREs in der Promotorregion estrogensensitiver Gene. Nach Anlagerung von koregulierenden Proteinen an die AF-2 kann nun die Transkription der Zielgene beeinflusst werden (Abb. 1.3 (i)). Der hsp-ER-Komplex, die Dimerisierung oder auch die Phosphorylierung des Rezeptors bieten somit vielfältige Regulationsmöglichkeiten klassisch regulierter estrogensensitiver Gene.



**Abb. 1.3:** Klassische genomische (i) und alternative nicht-genomische (ii, iii) Wirkungsweisen von Estrogenen (übernommen aus: Deroo and Korach 2006).

#### 1.1.4 Alternative genomische und nicht-genomische Wirkungsweisen von Estrogenen

Neben der klassischen genomischen Wirkungsweise von Estrogenen über die Bindung von kernständigen Estrogenrezeptoren, die zur Dimerisierung der Rezeptoren und zu deren Bindung an EREs führt, worüber schließlich die Genexpression von estrogensensitiven Genen beeinflusst wird, gibt es verschiedene nicht-genomische und genomische, alternative Wirkmechanismen von Estrogenen (Deroo und Korach 2006). Etwa ein Drittel der Gene des Menschen, die von Estrogenrezeptoren reguliert werden, enthalten kein ERE im Promotor (O'Lone et al. 2004). In diesem Falle beeinflussen Estrogenrezeptoren im Zellkern die Genexpression, indem sie über Protein-Protein-Interaktionen Transkriptionsfaktoren aktivieren oder hemmen (Göttlicher et al. 1998). Ein Beispiel für einen solchen Regulationsmechanismus stellt die Regulation des Zytokins Interleukin-6 (IL-6) durch Estrogene dar (Horowitz 1993). Hier interagiert der durch Estradiol aktivierte ER mit dem Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B (Nuclear Factor kappa B), was zu einer verminderten Bindeaktivität des Transkriptionsfaktors an den IL-6 Promotor und daher zu einer reduzierten Expression des IL-6 Gens führt (Pottratz et al. 1994, Stein



und Yang 1995). Somit stellt das IL-6 Gen ein indirekt estrogensensitives Gen dar, welches ohne ERE durch aktivierte ERs negativ reguliert wird; ein Beispiel für einen ERE unabhängigen genomischen Signalweg von Estrogenen.

Einige durch Estrogene hervorgerufene physiologische Wirkungen ereignen sich innerhalb von wenigen Minuten, also so schnell, dass sie nicht von der Aktivierung von RNA- und Proteinsynthese abhängig sein können. Diese Effekte sind als nicht-genomische Wirkungsweisen bekannt (Warner und Gustafsson 2006) und man vermutet, dass hierfür membranständige ERs verantwortlich sein könnten (Razandi et al. 2004, Bjornstrom und Sjoberg 2005). Bei diesen nicht-genomischen Signalwegen setzen die aktivierten membranständigen ERs Proteinkinasekaskaden in Gang (Losel und Wehling 2003) oder beeinflussen Ionen Transporte über Zellmembranen (Warner und Gustafsson 2006) (Abb. 1.3). Ein Beispiel für einen solchen nicht-genomischen Einfluss von Estrogenen stellt die Aktivierung der endothelialen Stickoxid-Synthase (eNOS) durch Estradiol dar (Warner und Gustafsson 2006). Hierbei induziert der aktivierte ER $\alpha$  eine Proteinkinasekaskade, die schließlich zur Phosphorylierung der im Zytoplasma befindlichen eNOS und somit zu ihrer Aktivierung führt (Chambliss and Shaul 2002, Chen et al. 1999c). Weitere nicht-genomische Wirkungsweisen von Estradiol sind die Mobilisierung von intrazellulärem Kalzium (Improta-Brears et al. 1999), die Stimulation der Produktion von cAMP (Aronica et al. 1994), die Beeinflussung des MAPK Signalweges (Endoh et al. 1997) und des PI3-Kinase Signalweges (Castoria et al. 2001).

Estrogene können auch ohne Interaktionen mit Estrogenrezeptoren physiologische nicht-genomische Wirkungen in Zellen hervorrufen, indem sie an membranständige EBPs (estrogen binding proteins) binden und hierüber Signaltransduktionskaskaden beeinflussen (Abb. 1.3).

### 1.1.5 Estrogenrezeptor „crosstalk“ in Abwesenheit seines Liganden

Zusätzlich zu der oben beschriebenen klassischen ligandenabhängigen Einflussnahme der ERs auf die Genexpression von Genen mit mindestens einem ERE im Promotor, interagieren Estrogenrezeptoren oder ihre Koaktivatoren, Korepressoren und gebundenen Hitzeschockproteine auch mit nicht-steroidalen Molekülen aus verschiedenen Signaltransduktionskaskaden, wodurch die ERs durch Interaktionen („crosstalk“) mit anderen Signalwegen der Zelle ligandenunabhängig aktiviert werden (Weigel et al. 1998). So vermag z.B. eine Erhöhung des cAMP-Spiegels und eine Erhöhung der Aktivität der Proteinkinase A (PKA) den Einfluss von ER $\alpha$  auf verschiedene Signalwege zu stimulieren (Coleman und Smith 2001, Coleman et al. 2003), indem durch PKA hervorgerufene Phosphorylierungen in spezifischen Bereichen der ERs in Abwesenheit ihres Liganden zu deren Aktivierung führen.

Eine Behandlung von Zellen mit EGF (epidermal growth factor) oder mit IGF-1 (insulin-like-growth-factor-1) führt zu einer Steigerung der transkriptionellen Aktivität von ER $\alpha$  und ER $\beta$ , indem die Wachstumsfaktoren EGF und IGF-1 eine erhöhte Aktivität der MAPK (mitogen-activated protein kinase), durch eine Überexpression der MAPK-Kinase bewirken, was zu ER-Phosphorylierungen im Bereich der ligandenunabhängigen AF-1 an Serin 118 führt (Smith 1998, Tremblay et al. 1999b, Klotz et al. 2002). Somit wird die Aktivität der N-terminalen AF-1 des ER über eine Phosphorylierung durch die MAPK-Kaskade des Signaltransduktionsweges der Wachstumsfaktoren moduliert (Kato et al. 1995, Lannigan et al. 2003). Eine weitere mögliche Aktivierung des ER über den Signalweg der Wachstumsfaktoren EGF und IGF-1 in Abwesenheit von Estrogenen stellt die Interaktion von ER mit der Protein B Kinase (serine/threonine kinase (Akt)) dar (Martin et al. 2000). Die Aktivierung der Akt erfolgt über PI3-K (phosphatidylinositol 3-kinase). Wird die PI3-K spezifisch blockiert, so wird auch die transkriptionelle Aktivität des ER $\alpha$  in mit EGF oder IGF-1 behandelten Zellen gehemmt. Auch für die ligandenunabhängige Aktivierung des ER $\alpha$  durch die Proteinkinasen PKA und MAPK kann mit Hilfe einer Behandlung der Zellen mit ICI gezeigt werden, dass sie rezeptorvermittelt ist.

Somit interagiert der Estrogenrezeptor in Abwesenheit seiner spezifischen Liganden mit aktivierten Proteinkinasen aus Signaltransduktionskaskaden von Wachstums-

faktoren („crosstalk“), indem er an spezifischen Stellen (z.B. Serin 118) phosphoryliert und somit aktiviert wird, wodurch schließlich zellspezifische Effekte hervorgerufen werden.

### **1.1.6 Estrogenrezeptor Beta (ER $\beta$ ): Struktur und Funktion**

Für lange Zeit glaubte man, dass der ER $\alpha$  ein einzelner Vermittler der physiologischen Effekte von Estrogenen sei. 1996 wurde jedoch ein weiterer Estrogenrezeptorsubtyp in der Prostata von Ratten entdeckt (Kuiper et al. 1996). Homologe Proteine wurden später auch für den Menschen (Mosselman et al. 1996, Enmark et al. 1997), die Maus (Tremblay et al. 1997) und andere Spezies nachgewiesen. Die Entdeckung dieses ER $\beta$  hat mehr als ausreichenden Anlass gegeben, die Biologie von Estrogenen ganz neu zu hinterfragen, da die koordinierte und integrierte Aktivität zweier Estrogenrezeptorsubtypen weitaus komplexere und vielfältigere Regulationsmechanismen ermöglicht.

Wie der ER $\alpha$  hat auch der ER $\beta$  die für kernständige Rezeptoren typische Grundstruktur, bestehend aus sechs Domänen und den beiden Transaktivierungsdomänen AF-1 und AF-2 (Abb. 1.2). Dennoch unterscheiden sich die beiden Estrogenrezeptorsubtypen innerhalb der Domänen, abgesehen von der DBD, deutlich in ihrer Aminosäuresequenz. Die DBD von ER $\beta$  ist zu 97% identisch zu der des ER $\alpha$ , während die Aminosäuresequenzen der LBDs der beiden Estrogenrezeptorsubtypen nur zu 59% übereinstimmen (Shao und Brown 2004). Somit weisen die LBDs der beiden Estrogenrezeptorsubtypen eine ähnliche Homologie auf, wie die LBDs des Glukokortikoidrezeptors und des Mineralokortikoidrezeptors (Gustaffson 2000), was deutlich macht, wie unterschiedlich die Ligandenbindungseigenschaften der beiden Estrogenrezeptoren sind.

Die auf ihrer Expression basierenden Mengenverhältnisse der Transkriptionsfaktoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  variieren in den unterschiedlichen klassischen reproduktiven und nicht-klassischen ER-positiven Geweben (Hall et al. 2001, Diel 2002, Nilsson und Gustaffson 2002, Warner et al. 2003) (Abb. 1.4).

<b>klassische Zielzellen/ -organe/-gewebe</b>	<b>nicht-klassische Zielzellen/ -organe/-gewebe</b>
Ovarien <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Niere <b>ER<math>\alpha</math></b>
Vagina <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Leber ER $\alpha$
Uterus <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Lunge ER $\beta$
Mamma <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Langerhansche Inseln
Nebenniere ER $\alpha$	Knochen ER $\alpha$ / <b>ER<math>\beta</math></b>
Prostata ER $\alpha$ / <b>ER<math>\beta</math></b>	Blutgefäße ER $\alpha$ /ER $\beta$
Hypophyse <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Herz ER $\alpha$
Hypothalamus	Makrophagen
Leydig-Zellen	Thymus
Hoden <b>ER<math>\alpha</math></b> /ER $\beta$	Endothelzellen
Harnblase ER $\alpha$ / <b>ER<math>\beta</math></b>	Gliazellen bzw. Schwann-Zellen
	Rückenmark ER $\beta$
	Hirnstamm ER $\beta$
	Kleinhirn ER $\beta$
	Darm ER $\alpha$ / <b>ER<math>\beta</math></b>

**ER** = verhältnismäßig hohe mRNA-Expression  
**ER** = verhältnismäßig niedrige mRNA-Expression

**Abb. 1.4:** Estrogensensitive Gewebe, Organe und Zellen, sowie gewebespezifische quantitative Verteilungsmuster der Estrogenrezeptorsubtypen (nach: Kuiper et al. 1997, Setchell und Cassidy 1999, Diel 2002).

Seitdem molekulare Untersuchungen gezeigt haben, dass ER $\beta$  nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere mit ER $\alpha$  bildet (Pace et al. 1997, Petterson et al. 1997, Cowley et al. 1997, Monroe et al. 2005), ist deutlich geworden, wie komplex und vielfältig die über Estrogene, insbesondere über E<sub>2</sub>, vermittelten Regulationsmechanismen und Signalwege in verschiedenen Zielgeweben und Zielzellen sind. Welche Bedeutung ER $\alpha$ /ER $\beta$  Heterodimere bei der Signalisierung von E<sub>2</sub> haben, ist weitestgehend ungeklärt. Nur wenige Untersuchungen haben bisher begonnen, die Funktion und Bedeutung von ER Heterodimeren für den ERE-abhängigen Signalweg zu durchleuchten (Tremblay et al. 1999a).

Trotz der geringen Übereinstimmung in der Aminosäuresequenz der LBDs der ERs ER $\alpha$  und ER $\beta$  binden Estrogene wie E<sub>2</sub> mit gleicher Affinität an beide Rezeptoren (Kuiper et al. 1998), wohingegen die Affinitäten verschiedener anderer Liganden deutliche rezeptorsubtypspezifische Unterschiede zeigen. Für verschiedene synthetische Estrogene wurde bereits gezeigt, dass sie gewebespezifisch estrogen wirksam sind. So antagonisiert das SERM Tamoxifen die durch E<sub>2</sub> induzierte Proliferation im Brustdrüsengewebe (Reddel et al. 1983), indem es die LBD des ER für E<sub>2</sub> blockiert. Als eine Substanz mit der Eigenschaft wachstumsstimulierende Effekte von E<sub>2</sub> im Brustdrüsengewebe hemmen zu können, wurde Tamoxifen (TAM)

daher für sehr lange Zeit zum Mittel der Wahl für Brustkrebsprävention und Brustkrebstherapie in Betracht gezogen (Osborne 1988). Jedoch stellte sich bald heraus, dass TAM agonistische Effekte im Uterus bewirkt (Gielen et al. 2005). Daher ist die Möglichkeit gegeben, dass eine Applikation von TAM das Risiko, an einem Endometriumskarzinom zu erkranken, steigert (Assikis et al. 1996). Somit agiert TAM in unterschiedlichen Geweben entweder als Agonist oder als Antagonist. Eine weitere synthetische Substanz mit gewebespezifischen Eigenschaften ist Raloxifene (RAL). Im Gegensatz zu TAM wirkt RAL im Knochen agonistisch (Black et al. 1994), jedoch als ein Antagonist im Brustdrüsengewebe (Cummings et al. 1999) und im Uterus (Black et al. 1994). Derartige Substanzen, die gewebespezifische Wirkungen über den Estrogenrezeptor vermitteln, werden unter dem Begriff SERMs („selective estrogen receptor modulators“) zusammengefasst (Diel et al. 2001a, Diel 2002, Lewis-Wambi und Jordan 2005). Die Entwicklung neuer SERMs, die als Agonisten im Knochen, im kardiovaskulären System und in neuronalen Zellen, jedoch im Brustdrüsengewebe und im Uterus als Antagonisten wirken, würde neue Möglichkeiten für Brustkrebstherapien (Plouffe 2000, Gluck und Maricic 2003), sowie für die Prävention und Behandlung von menopausalen und postmenopausalen Symptomen eröffnen.

Mit der detaillierten Erforschung der Domänen des ER, die für die Interaktionen mit der DNA und den Liganden verantwortlich sind und mit der Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptorsubtypen (ER $\beta$ ), konnte ein besserer Einblick in die Rezeptorfunktionen in Zielzellen gewonnen werden. Die Möglichkeiten verschiedener Liganden, EREs, Transkriptionsfaktoren, Koaktivatoren und Korepressoren, sowie Proteinkinasen aus verschiedenen Signalwegen mit den Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  zu interagieren und ihre Aktivität zu verändern, rüstet Zielzellen mit einer enormen Vielfältigkeit aus, um auf hormonelle Signale antworten und zelluläre Funktionen regulieren zu können. Wie Estrogene in bestimmten Zielzellen wirken und ob ein SERM in einem Gewebe als Agonist, oder als Antagonist wirkt, hängt also ganz wesentlich von der Ausstattung der Zellen mit Koaktivatoren und Korepressoren, sowie von dem Mengenverhältnis der beiden Estrogenrezeptorsubtypen ab, welches in unterschiedlichen Zielgeweben sehr stark variiert (Abb. 1.4). Während die physiologischen Einflüsse der Aktivierung des ER $\alpha$  weitestgehend bekannt sind, haben die viel versprechenden gewebespezifischen Verteilungsmuster des ER $\beta$  und seine pathophysiologische Bedeutung für die

Behandlung verschiedener Erkrankungen in den letzten Jahren das Augenmerk wissenschaftlichen Bestrebens bei der Aufklärung estrogener Wirkungsweisen auf sich gezogen (Imamov et al. 2005).

## **1.2 Phytoestrogene**

### **1.2.1 Epidemiologie der Phytoestrogene**

Wechselnde und sinkende Estrogenspiegel, wie sie bei Frauen während und nach der Menopause auftreten, sind mit individuell verschiedenen Wechseljahrsbeschwerden verbunden (Greendale et al. 1999, Morris und Rymer 2005). Hierzu zählen u.a. Hitzewallungen (Haimov-Kochman und Hochner-Celnikier 2005), Antriebslosigkeit, Depressionen, (Schmidt 2005) und physiologische Veränderungen des Fettstoffwechsels (Carr 2003). Außerdem steigt mit einem sinkenden Estrogenspiegel das Risiko an Herz-Kreislaufkrankungen (Stramba-Badiale et al. 2006), Arteriosklerose (Arnal und Bayard 2001) und Osteoporose (Delaney 2006) zu erkranken. Da all diese Beschwerden und Krankheitsbilder auf einem Estrogenmangel beruhen oder zumindest hierdurch nachteilig beeinflusst werden, werden sie schon seit Jahrzehnten erfolgreich mit einer herkömmlichen Hormonersatztherapie (HET) behandelt (Gambrell 1982, Schindler 2006).

Seit jedoch die „Million Woman Study“ im Jahr 2003 gezeigt hat, dass Frauen mit HET einem deutlich höheren Brustkrebsrisiko ausgesetzt sind als solche, die keiner Hormonsubstitution unterliegen (Beral et al. 2003), ist die Verunsicherung bei den Patientinnen und der Bedarf an schonenden Alternativen zur herkömmlichen HET für die Behandlung von Wechseljahrsbeschwerden stark gewachsen (Fitzpatrick 1999).

Hinzu kommt, dass einige der bedeutendsten Erkrankungen der westlichen Welt wie verschiedene Krebserkrankungen und Herz-Kreislaufkrankungen mit estrogenen Wirkmechanismen in Zusammenhang gebracht werden (Adlercreutz 1990, Setchell und Cassidy 1999).

Somit wird, abgesehen von den Konsequenzen einer eingeschränkten und schließlich ausbleibenden Estrogenproduktion während und nach der Menopause, zusätzlich die vielfältige pathophysiologische Bedeutung von Estrogenen und ihren molekularen Wirkmechanismen bei der klinischen Therapie von verschiedenen Erkrankungen deutlich. Hier kommen bereits Estrogenrezeptorantagonisten und selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) bei der Therapie von Brustkrebs (Lewis-

Wambi und Jordan 2005, Sola und Renoir 2006) und Osteoporose (Close et al. 2006) zur Anwendung.

Vor diesem Hintergrund ist in den letzten Jahren das Interesse vieler Forschungsgruppen an natürlichen und in der Nahrung befindlichen sekundären Pflanzeninhaltsstoffen, die das Potential estrogener Wirksamkeit besitzen, gestiegen. Epidemiologische Datenerhebungen haben gezeigt, dass das verstärkte Auftreten hormonabhängiger Erkrankungen und Wechseljahrsbeschwerden mit westlichen Ernährungsgewohnheiten korreliert. Bewohner ostasiatischer Länder wie Japan und China zeigen deutlich niedrigere Raten von osteoporotischen Frakturen, Herz-Kreislaufkrankungen, postmenopausalen Symptomen und verschiedenen Krebserkrankungen wie z.B. Mamma- und Endometriumskarzinomen als Einwohner westlicher Länder (Adlercreutz und Mazur 1997, Yamamoto et al. 2003). Eine Ursache für das niedrigere Krebsrisiko könnte darin liegen, dass die Konzentrationen der mit dem Blutplasma im Körper zirkulierenden Estrogene bei asiatischen Frauen um 20-30% niedriger sind (Shimizu et al. 1990, Wang et al. 1991, Sowers et al. 2006) und die Menstruationszyklen 2-3 Tage länger andauern (Henderson et al. 1985, Wu et al. 1996) als bei Frauen aus westlichen Ländern. Für die niedrigeren Estrogenspiegel werden wiederum verschiedene Wirkungen von Phytoestrogenen als Ursache in Betracht gezogen (Nagata et al. 1998, Lu et al. 2000, Loukovaara et al. 1995, Pino et al. 2000). Hieraus resultiert, dass Frauen in ostasiatischen Ländern lebenslang einem deutlich niedrigeren Estrogeneinfluss ausgesetzt sind, worin viele Arbeitsgruppen einen Zusammenhang mit dem 4-5 mal niedrigeren Brustkrebsrisiko in asiatischen Ländern vermuten (Key und Pike 1988, Bernstein et al. 1990).

Für einen auf ostasiatischen Ernährungsgewohnheiten begründeten gesundheitlichen Vorteil in Bezug auf bestimmte Erkrankungen spricht auch die Tatsache, dass bei Asiaten, die westliche Ernährungsgewohnheiten adaptieren, das Erkrankungsrisiko auf ein westliches Niveau steigt (Adlercreutz und Mazur 1997), was genetische Unterschiede als Ursache ausschließt. Untersuchungen dieser Korrelation von Ernährungsgewohnheiten und gesundheitlichen Risiken haben verschiedene Forschungsgruppen daher zu der These geführt, dass das verstärkte Auftreten solcher Erkrankungen in westlichen Populationen mit der vergleichsweise deutlich reduzierten Aufnahme von Phytoestrogenen über die Nahrung einhergehen könnte (National academy of sciences 1982, Adlercreutz 1998, Setchell 1998).

### 1.2.2 Vorkommen, Bioverfügbarkeit und Metabolismus von Phytoestrogenen

Seit 1931 ist bekannt, dass die glykosidischen Formen der Isoflavone Genistein und Daidzein in großen Mengen (100-300 mg/100g) in Sojabohnen vorkommen (Walz 1931). In den 40er Jahren wurde man erstmals auf die hormonelle Wirkung von Phytoestrogenen aufmerksam. Man hat an Schafen, die in Gegenden grasten, in denen verschiedene Kleearten (*Trifolium sp.*) zahlreich vertreten waren, ein Unfruchtbarkeitssyndrom („*clover disease*“) beobachtet (Bennetts et al. 1946). Seither wurden immer wieder adverse physiologische Effekte an Tieren beobachtet, die mit der Nahrung große Mengen von Phytoestrogenen aufgenommen haben (Leopold et al. 1976, Kaldas und Hughes 1989).

Mit diesen Beobachtungen sind in Pflanzen enthaltene, phenolische Substanzen in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses geraten und nicht zuletzt die Entdeckung des ER $\beta$  und der Bindungspräferenzen vieler Phytoestrogene an diesen Rezeptor (Kuiper et al. 1996, Kuiper et al. 1998) haben zu einem enormen Anstieg der Zahl wissenschaftlicher Veröffentlichungen über Phytoestrogene in den letzten 10 Jahren geführt (Usui 2006).

Phytoestrogene sind sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe, die im Gegensatz zu Estrogenen nicht-steroidaler Herkunft sind, aber dennoch mit ihnen einige strukturelle Voraussetzungen teilen, die es ihnen erlauben, spezifisch an Estrogenrezeptoren zu binden (Abb. 1.7) (Price und Fenwick 1985, Setchell 1998).

Zu den verschiedenen Klassen von Phytoestrogenen gehören Flavonoide, Coumestane und Lignane (Abb. 1.5).

Isoflavone sind in erster Linie in Vertretern der Pflanzenfamilie der *Fabaceae* anzutreffen. In deren Hülsenfrüchten liegen sie an Zucker (z.B. D-Glucose, D-Galaktose oder D-Rhamnose) gebunden als Glykoside vor (Coward et al. 1993, Franke et al. 1995). Während Genistein und Daidzein in hohen Konzentrationen in Sojabohnen und Lebensmitteln aus Soja anzutreffen sind, findet man Biochanin A, Formonetin und Glycitein (Abb. 1.5) eher in Klee und Alfalfasprossen (Horn-Ross et al. 2000).

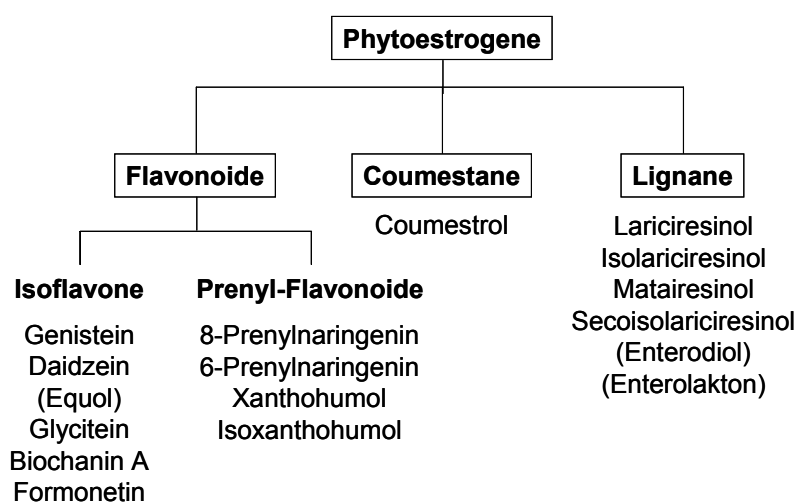
Coumestane sind strukturell verwandt mit den Isoflavonen und sind ebenfalls in hohen Konzentrationen in Klee- und Alfalfasprossen anzutreffen (Mazur 1998, Thompson et al. 2006).

Auch prenylierte Flavonoide ähneln in ihrer Struktur sehr den Isoflavonen und sind u.a. in Hopfen enthalten. Wichtige Vertreter dieser Flavonoide sind 6- und 8-



Prenylnaringenin, Xanthohumol und Isoxanthohumol. 8-Prenylnaringenin ist eine Substanz, die starke estrogene Aktivität zeigt (Milligan et al. 2000, Milligan et al. 2002).

Lignane befinden sich als Zellwandbestandteile vor allem in Kornprodukten, Gemüse, Früchten, Samen und Nüssen und ihre Metaboliten wurden schon vor geraumer Zeit im Urin von Mensch und Tier nachgewiesen (Setchell et al. 1980). Die wichtigsten Vertreter dieser Verbindungen, Secoisolariciresinol, Matairesinol, Pinoresinol und Lariciresinol (Abb. 1.5) sind in höheren Konzentrationen in Samen (Leinsamen, Sonnenblumenkerne) und in Nüssen anzutreffen (Milder et al. 2005).



**Abb. 1.5:** Wichtige Klassen von Phytoestrogenen. Die Substanzen in Klammern sind nicht als solche in Pflanzen vorhanden, sondern Stoffwechselprodukte. Das Schema enthält nicht alle pflanzlichen estrogen wirkenden Inhaltsstoffe wie z.B. Mykoestrogene oder Phytosterole.

Neben den ovariellen Estrogenen und den Phytoestrogenen existieren noch weitere Stoffklassen, deren Mitglieder eine Affinität zum Estrogenrezeptor aufweisen. Hierzu zählen von Pilzen synthetisierte Mycoestrogene, Pestizide (Hansen und Jansen 1994) und andere synthetisch hergestellte Xenoestrogene wie z.B. DDT (Murkies und Frydenberg 2003).

Die in Japan und China mit der Nahrung aufgenommenen täglichen Isoflavonmengen liegen zwischen 20-50 mg/Tag (Nagata et al. 1998b, Seow et al. 1998, Chen et al. 1999b, Arai et al. 2000, Nakamura et al. 2000, Wakai et al. 1999), während die geschätzte Isoflavonaufnahme in westlichen Ländern nur bei <1 mg/Tag liegt (Setchell and Cassidy 1999). Zum einen sind in Sojabohnen hohe Konzentrationen an Isoflavonen anzutreffen, aber auch andere Sojaprodukte westlichen und asiatischen Ursprungs enthalten noch Isoflavonkonzentrationen von

bis zu 2,5 mg/g (Setchell 1998). Für Daidzein, Genistein und Equol werden Plasmakonzentrationen von 50-800 ng/ml erreicht, wenn man mit der Nahrung ca. 50 mg an Isoflavonen zu sich nimmt (Adlercreutz et al. 1993). Da Phytoestrogene erst in Konzentrationen ab etwa 40-50 mg/Tag (Cassidy et al. 1994), nicht aber bei der Hälfte dieser Dosierung (23 mg/Tag) (Cassidy et al. 1995) beim Menschen signifikante endokrine Wirkungen zeigen und diese Konzentrationen im Gegensatz zu ostasiatischen Populationen bei westlichen Nahrungsgewohnheiten bei weitem nicht erreicht werden, liegt es nahe, hierin eine Ursache für die oben beschriebenen epidemiologischen Unterschiede zu vermuten. Hinzu kommt, dass bereits nach einer sojareichen Mahlzeit im Urin Isoflavonkonzentrationen nachweisbar sind, die die endogenen Estrogenplasmaspiegel um mindestens das hundertfache überschreiten (Axelson et al. 1984), was in Anbetracht der estrogenen und antiestrogenen Wirkungen von Phytoestrogenen ihre potentiellen hormonellen Einflussmöglichkeiten verdeutlicht (Setchell et al. 2001).

Da die Vertreter der unterschiedlichen Klassen von Phytoestrogenen in abweichenden Konzentrationen und Zusammensetzungen in verschiedenen Pflanzen und Nahrungsbestandteilen anzutreffen sind (Mazur 1998), ist auch zu berücksichtigen, dass das Ausmaß an aufgenommenen Phytoestrogenen in erster Linie von individuellen Nahrungsgewohnheiten abhängt. So sind bei Vegetariern deutlich höhere Phytoestrogenkonzentrationen im Blutplasma anzutreffen, als in Omnivoren (Adlercreutz et al. 1993).

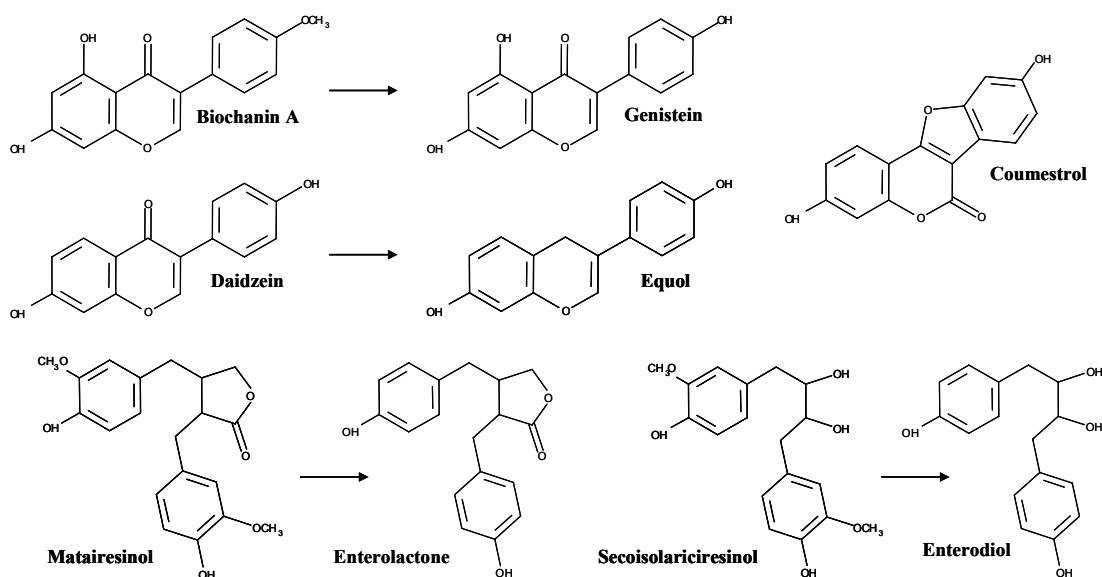
Isoflavone werden mit der Nahrung in erster Linie als nicht resorbierbare Glykoside und glykosidische Derivate (Genistin, Daidzin, etc.) aufgenommen (Setchell et al. 2002a), können jedoch auch in verschiedenen Nahrungsprodukten als Aglykone vorliegen (Setchell 1998, Setchell et al. 2002a). Werden die Isoflavonglykoside Genistin und Daidzin mit der Nahrung aufgenommen, können diese durch Magensäfte,  $\beta$ -Glykosidasen der Dünndarmschleimhaut und durch Enzyme der intestinalen Mikroflora zu den Aglykonen Genistein und Daidzein hydrolysiert werden (Setchell und Cassidy 1999). Die Isoflavone Formononetin und Biochanin A stellen natürliche Vorläufer von Daidzein und Genistein dar (Abb. 1.6). Vor der Absorption können die Isoflavone von der Mikroflora weiter metabolisiert werden, wobei z.B. Daidzein zu dem estrogen stärker aktiven Equol (Abb. 1.6) und dem nicht estrogenen O-Demethylangolensin reduziert wird (Axelson et al. 1984, Bannwart et al. 1984, Joannou et al. 1995, Kelly et al. 1993, Horn-Ross et al. 2000). Ob und in

welchem Ausmaß mit der Nahrung aufgenommene Phytoestrogene metabolisiert werden können, ist individuell verschieden und von Zustand und Beschaffenheit der Darmflora, sowie von der weiteren Zusammensetzung der Nahrung abhängig (Setchell et al. 1984, Kelly et al. 1995). So zeigen sich deutliche individuelle Unterschiede bei der Herstellung von Equol, dem physiologisch bedeutenden Metaboliten von Daidzein (Axelson et al. 1982, Setchell et al. 2002b), der von der Darmflora von Säugetieren hergestellt wird (Kelly et al. 1995). Eine ballaststoffreiche Ernährung begünstigt die bakterielle Metabolisierung von Phytoestrogenen, da hierdurch die intestinale Fermentierung gesteigert, und mit ihr die Biotransformation von Phytoestrogenen (z.B. auch die Herstellung des Metaboliten Equol aus Daidzein) deutlich erhöht wird (Setchell und Cassidy 1999).

Bevor sie ins periphere Blut gelangen, können die resorbierten Isoflavonmetaboliten in der Leber durch entsprechende enzymatische Reaktionen z.B. mit Sulfat oder Glukuronid konjugiert werden. Bei der Ausscheidung über die Galle (enterohepatischer Keislauf) können die in den Darm gelangten Konjugate von der Mikroflora wieder dekonjugiert und dann erneut resorbiert oder weiter verstoffwechselt werden (Axelson und Setchell 1980, Sfakianos et al. 1997, Setchell 1998).

Die Bioverfügbarkeit mit der Nahrung aufgenommener Lignane ist ebenfalls abhängig von intestinaler bakterieller Hydrolyse, Demethylierung und Dehydroxylierung zu resorbierbaren diphenolischen Verbindungen wie Enterolacton und Enterodiol (Abb. 1.6) (Borriello et al. 1985, Adlercreutz et al. 1981).

Will man allerdings die Wirkungsweise von Phytoestrogenen genauer charakterisieren, muss man nicht nur Nahrungsgewohnheiten, die Art der Applikation, die chemische Form des Phytoestrogens, seinen Metabolismus, seine Bioverfügbarkeit, seine Halbwertszeit und die zeitliche und quantitative Dosierung berücksichtigen, sondern auch die estrogenrezeptorsubtypspezifischen Wirkungsweisen von verschiedenen Phytoestrogenen und ihren Metaboliten untersuchen. Hierbei muss neben der Berücksichtigung von Bindungsaffinitäten und gewebe-spezifischen Verteilungsmustern der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  zwischen vielfältigen genomischen und nicht-genomischen Effekten von Phytoestrogenen unterschieden werden (Setchell und Cassidy 1999, Setchell et al. 2001).

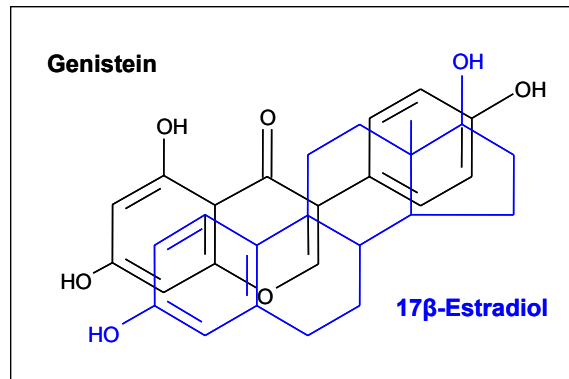


**Abb. 1.6:** Ausgewählte Phytoestrogene und physiologisch bedeutende Metaboliten. Daidzein, Biochanin A, Genistein, Matairesinol, Secoisolariciresinol und Coumestrol sind in verschiedenen Pflanzenvertretern anzutreffen. Equol, Enterolacton und Enterodiol sind Säugetiermetaboliten ihrer pflanzlichen Vorläufermoleküle (nach Horn-Ross et al. 2000).

### 1.2.3 Genomische und nicht-genomische physiologische Wirkungen von Phytoestrogenen

Die physiologischen Einflüsse dieser relativ wirkschwachen, aber bei einer soja-reichen Ernährung in großer Zahl im Blutplasma anzutreffenden Substanzen sind vielfältig und stehen daher im Kontext pathophysiologischer Fragestellungen im Mittelpunkt vieler wissenschaftlicher Untersuchungen.

Die verschiedenen Klassen von Phytoestrogenen teilen mit den steroidal-En Estrogenen u.a. die strukturelle Eigenschaft einer Phenolgruppe (Abb. 1.7). Dieser phenolische Ring und seine Hydroxylgruppe sind wesentliche Voraussetzungen für die Bindung an Estrogenrezeptoren (Leclercq und Heuson 1979, Anstead et al. 1997). Außerdem ist die räumliche Distanz zwischen den beiden aromatischen Hydroxylgruppen von Vertretern aus den verschiedenen Klassen von Phytoestrogenen nahezu identisch mit dem Abstand der C-3- und C-17-Hydroxylgruppe im 17 $\beta$ -Estradiolmolekül (Setchell und Cassidy 1999) (Abb. 1.7).



**Abb. 1.7:** Vergleichende Darstellung der Strukturformeln von 17 $\beta$ -Estradiol und Genistein.

Auch diese strukturelle Gemeinsamkeit ist eine Voraussetzung dafür, dass neben den natürlichen Estrogenrezeptorliganden ebenfalls einige Phytoestrogene eine, wenn auch deutlich geringere Affinität zum Estrogenrezeptor aufweisen. Somit können Phytoestrogene estrogenrezeptorvermittelte agonistische und/oder antagonistische Wirkungen vermitteln (Makela et al. 1995, Brzezinski und Debi 1999). In diesem Zusammenhang werden Phytoestrogene, die selektive estrogene Eigenschaften haben, auch als Phyto-SERMs bezeichnet (Setchell 2001, Wuttke et al. 2003). Als selektive Estrogenrezeptormodulatoren (SERMs) werden nicht steroidale Substanzen bezeichnet, die eine ähnliche Struktur wie E<sub>2</sub> und eine Affinität zum Estrogenrezeptor aufweisen und sowohl agonistisch als auch antagonistisch wirken können (Riggs und Hartmann 2003, Ohmichi et al. 2005). Phytoestrogene binden zwar mit einer deutlich niedrigeren Affinität an ERs als Estrogene, erreichen aber bei einer entsprechenden Nahrungsaufnahme bis zu 100fach höhere Plasmakonzentrationen. Außerdem zeigen Phytoestrogene eine deutlich schwächere Bindungsaffinität zu Serumproteinen, wodurch ebenfalls die Zahl der physiologisch aktiven Moleküle deutlich zu Gunsten dieser diphenolischen Substanzen steigt (Setchell 1998, Wang et al. 1996). Neben partialagonistischen, genomischen Effekten, die durch spezifische Bindungen an Estrogenrezeptoren hervorgerufen werden, zeigen Phytoestrogene auch vielfältige nicht-genomische Effekte (Kurzer und Xu 1997), wobei die Aktivierung der ERs keine Rolle spielt. Im Folgenden soll daher anhand einiger Beispiele ein Überblick über die vielfältigen genomischen und nicht-genomischen Wirkungsweisen von Phytoestrogenen in Tier- und Zellkulturmodellen, aber auch über Untersuchungen am Menschen gegeben werden.

### 1.2.3.1 Mitogene und antikarzinogene Effekte von Phytoestrogenen

Estrogene regulieren Wachstumsprozesse wie Proliferation und Differenzierung vor allem in klassisch estrogensensitiven Geweben wie Uterus- und Brustdrüsengewebe. In diesem Zusammenhang geht von diesen Hormonen z.B. auch ein karzinogenes Potential (Hulka und Stark 1995) bei der Entstehung von Mammakarzinomen aus (Thomas et al. 1997, Clemons und Goss 2001). Es konnte in einer Untersuchung an 14.000 Frauen im Alter zwischen 35 und 65 Jahren gezeigt werden, dass erhöhte Estrogenkonzentrationen in Blutserum und Urin mit einem erhöhten postmenopausalen Brustkrebsrisiko korrelieren (Toniolo et al. 1995). In Tier- und Zellkulturmodellen stimulieren Estrogene das Wachstum von Tumoren und Krebszellen (Dickson und Lippman 1995). Beral et al. (2003) haben gezeigt, dass die klassische HET ein erhöhtes Risiko für postmenopausale Frauen darstellt an Brustkrebs zu erkranken. Hinzu kommt, dass epidemiologische Datenerhebungen gezeigt haben, dass asiatische Frauen u.a. einem signifikant niedrigeren Brustkrebsrisiko ausgesetzt sind als Frauen westlicher Länder (Tominaga 1985). Die epidemiologische Korrelation von einer phytoestrogenreichen Diät und einem niedrigeren Brustkrebsrisiko bei Bewohnerinnen von Japan und China (Adlercreutz und Mazur 1997, Peeters et al. 2003) hat schließlich dazu geführt, dass agonistische und antagonistische, sowie nicht-genomische Wirkungen von Phytoestrogenen auf das Brustdrüsengewebe zum Inhalt vieler Untersuchungen und kontroverser Diskussionen geworden sind (Peeters et al. 2003, Adlercreutz 2003). Der Grund für inhomogene Forschungsergebnisse, die Anlass zu Diskussionen geben, scheint darin zu liegen, dass Phytoestrogene einerseits antikarzinogene Eigenschaften und andererseits ein deutliches estrogenes Potential aufweisen (Peeters et al. 2003). So werden für Genistein in Zellkulturmodellen und in tierexperimentellen Studien je nach Art des Versuchs sowohl karzinogene als auch antikarzinogene Wirkungen dokumentiert (Bouker und Hilakivi-Clarke 2000). Zum einen lassen die Daten vieler Forschungsgruppen vermuten, dass in Anwesenheit von Estrogenen, Phytoestrogene in der Brustdrüse antagonistische und somit protektive Effekte vermitteln (Bouker und Hilakivi-Clarke 2000). Andererseits wird diskutiert, ob Phytoestrogene in Abwesenheit von Estrogenen bei postmenopausalen Frauen das Brustkrebsrisiko über agonistische Effekte steigern (Bouker und Hilakivi-Clarke 2000). So gibt es Daten, die antiproliferative Effekte von Genistein und anderen Isoflavonen in Brustkrebszellen beschreiben (Peterson et al. 1996, Zava und Duwe 1997).

Allerdings wurden für Genistein *in vitro* in der Brustkrebszelllinie MCF-7 (Hsieh et al. 1999, Allred et al. 2001) und *in vivo* in Tumormodellen (Allred et al. 2004b, Allred et al. 2004a) karzinogene Effekte beschrieben. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass die karzinogenen Einflüsse von Genistein in bereits entarteten Zellen und Geweben dosisabhängig sind (Ju et al. 2001, Allred et al. 2001). In diesen Studien wurde durch Genistein in Abwesenheit von Estrogenen das Wachstum von Brustkrebszellen und Tumoren signifikant gesteigert. Hierfür werden ER-vermittelte proliferative Effekte von Genistein in ER-positiven Brustkrebszellen und Tumoren verantwortlich gemacht (Martin et al. 1978, Wang et al. 1996). Es ist allerdings zu beachten, dass Genistein die Proliferation nur in niedrigen Dosierungen stimuliert, sie in hohen Konzentrationen hingegen hemmt (Wang et al. 1996, Bouker und Hilakivi-Clarke 2000). Die Hemmung der Proliferation von Genistein nach Applikation von hohen Dosierungen wird durch nicht-ER-vermittelte Effekte hervorgerufen (Wang et al. 1996), während die Stimulation der Proliferation in niedrigen Dosen einen ER-abhängigen und genomischen Effekt darstellt, wie man ihn auch in stärkerem Ausmaß bei Estradiol beobachten kann (Wang et al. 1996). In diesem Zusammenhang sei auch zu erwähnen, dass Phytoestrogene im Uterus ebenfalls genomische Wirkungen hervorrufen. So wurden in verschiedenen Studien uterotrophe Effekte von Genistein gezeigt (Santell et al. 1997, Diel et al. 2006), die jedoch um ein vielfaches geringer sind, als die von Estradiol und nicht auf einer Steigerung der Zellproliferation (Bouker und Hilakivi-Clarke 2000), sondern auf Wassereinlagerungen beruhen (Diel et al. 2006).

Neben der These, dass Phytoestrogene protektive Effekte im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren haben, indem sie antagonistische Wirkungen durch kompetitive Bindung an den ER entfalten, sind auch verschiedene nicht-ER-vermittelte antikarzinogene Eigenschaften von Phytoestrogenen beschrieben worden. So wurde für Phytoestrogene gezeigt, dass sie als Antioxidantien wirken und die Angiogenese hemmen (Peterson 1995, Fotsis et al. 1998), was der Entstehung von Tumoren vorbeugt, bzw. deren Wachstum hemmt.

Außerdem beeinflussen Phytoestrogene den Estrogenmetabolismus und die mit dem Blut zirkulierenden physiologisch aktiven Estrogenkonzentrationen, indem sie die Serumkonzentrationen von Estradiol senken (Nagata et al. 1998a, Lu et al. 2000) und die SHBG (sex-hormone binding globulin) -Konzentration im Blut steigern (Loukovaara et al. 1995, Pino et al. 2000). Demnach ist der Organismus unter dem

Einfluss von Phytoestrogenen einem niedrigen Serumspiegel von physiologisch wirksamen Estrogenen ausgesetzt. Für einen Organismus, der ein Leben lang diesen protektiven Einflüssen ausgesetzt ist, können mit der Nahrung aufgenommene Phytoestrogene somit eine Brustkrebsprävention darstellen, worauf entsprechend niedrige Estrogenspiegel in Korrelation mit Brustkrebsrisiken in ostasiatischen Ländern hinweisen. Ob allerdings erstmals im Erwachsenenalter applizierte Phytoestrogene in Form von Nahrungsergänzungsmitteln, wie sie in Apotheken erhältlich sind und von manchen Gynäkologen zur Brustkrebsprävention und -therapie empfohlen werden, sinnvoll sind, ist äußerst fraglich und keineswegs erwiesen (Adlercreutz 2002).

Neben den Einflüssen von Phytoestrogenen auf Mamma- und Endometriumskarzinome, werden ihre Einflüsse auch im Zusammenhang mit anderen Krebsformen wie Prostatakrebs (Ganry 2005) und Kolonkrebs (Adlercreutz 2002) kontrovers diskutiert.

### **1.2.3.2 Phytoestrogene und Knochenstoffwechsel**

Estrogene haben vielfältige Einflüsse auf Knochenzellen und spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase in diesem Gewebe (Turner et al. 1994b). Hierunter fallen die Proliferation und die Differenzierung von Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten, die Regulation der Synthese und der Abgabe von Wachstumsfaktoren durch Osteoblasten, die die Aktivität von Osteoklasten beeinflussen und nicht zuletzt die Antagonisierung der Knochenresorption von Osteoklasten (Turner et al. 1994b).

Neben natürlichen Alterungsprozessen sind daher vor allem niedrige Estrogenspiegel die Hauptursache für die Ausprägung einer postmenopausalen Osteoporose (Richelson et al. 1984).

Im Hinblick auf die Behandlung einer hormonell bedingten Osteoporose, die in der klinischen Therapie immer mehr an Bedeutung gewinnt (Setchell und Lydeking-Olsen 2003), werden auch Phytoestrogene als Therapieansatz in Betracht gezogen (Arjmandi 2001, Branca 2003). Seit bekannt ist, dass Osteoblasten (Komm et al. 1988), Osteoklasten (Oursler et al. 1991) und Osteozyten (Tomkinson et al. 1998) Estrogenrezeptoren exprimieren, haben viele Studien zu einem immer besseren Verständnis der grundlegenden Rolle von Estrogenen bei Knochenhalt und Knochenhomöostase geführt (Weitzmann und Pacifici 2006). Für das SERM



Raloxifene konnte bereits im Tiermodell (Turner et al. 1994a, Black et al. 1994) und am Menschen (Ettinger et al. 1999) gezeigt werden, dass es im Knochen als Agonist positive Effekte bewirkt, während es im Uterus und in der Brustdrüse antagonistisch wirkt (Bryant et al. 1999). Diese Ergebnisse haben Grund zu der Annahme gegeben, dass auch Phytoestrogene solche selektiven Wirkungen auf den Knochenstoffwechsel haben könnten, da sie in einer mit Raloxifene vergleichbaren Weise an die LBD von Estrogenrezeptoren binden (Pike et al. 1999).

Mit Hilfe von cDNA-Microarrays konnte gezeigt werden, dass Genistein die Expressionsrate von mehr als 50 Genen des Knochenstoffwechsels beeinflusst (Pie et al. 2006). In verschiedenen Zellkulturexperimenten (Li und Yu 2003, Lieberherr et al. 2003) aber vor allem in der ovariectomierten Ratte (Arjmandi et al. 1996, Fanti et al. 1998, Picherit et al. 2000, Picherit et al. 2001, Ye et al. 2003, Lee et al. 2004, Kim und Lee 2005, Chanawirat et al. 2006), welche ein geeignetes Tiermodell zur Untersuchung der postmenopausalen Osteoporose darstellt (Kalu 1991, Turner et al. 1994b), wurden für verschiedene Phytoestrogene und Isoflavonextrakte knochenprotektive Effekte beschrieben. Einzelne Studien an Affen und Schweinen hingegen konnten derartige Effekte nicht nachweisen (Setchell und Lydeking-Olsen 2003), was auf Unterschiede zwischen verschiedenen Spezies hindeuten könnte.

Die Isoflavone Genistein und Daidzein beeinflussen *in vitro* ebenso wie Estradiol Proliferation, Differenzierung, Aktivität und Proteinexpression von Osteoblasten und Osteoklasten (Yamaguchi und Sugimoto 2000, Viereck et al. 2002, Kanno et al. 2004, Pan et al. 2005, Morris et al. 2006).

Verschiedene Untersuchungen gehen der Frage nach, ob die beschriebenen Effekte von Phytoestrogenen im Knochen, von genomischen und ER-vermittelten und/oder von nicht-genomischen Wirkmechanismen ausgehen. Und auch im Knochen scheinen sowohl genomische als auch nicht-genomische Wirkungsweisen für die protektiven Effekte von Phytoestrogenen verantwortlich zu sein (Fitzpatrick 2003).

Obwohl im kortikalen Knochen ER $\alpha$  und im trabekulären Knochen ER $\beta$  vermehrt exprimiert werden (Weitzmann und Pacifici 2006), ist es dennoch der ER $\alpha$ , der die meisten beschriebenen estrogenen Effekte im trabekulären und kortikalen Knochen vermittelt (Lindberg et al. 2001b, Lindberg et al. 2002a, Lindberg et al. 2002b). Für Genistein wurde gezeigt, dass es in Osteoblasten als Agonist beider Estrogenrezeptorsubtypen agiert und ebenso wie Estradiol, aber im Gegensatz zu Raloxifene,

die Genexpression des Progesteronrezeptors stimuliert und die Interleukin-6-Produktion hemmt (Rickard et al. 2003).

Osteoblasten exprimieren Osteoprotegerin (OPG), das *in vivo* eine bedeutende Rolle bei der Erhaltung der Knochendichte hat und *in vitro* die Differenzierung von Osteoklasten hemmt (Simonet et al. 1997). Sowohl in ovariectomierten Tieren als auch nach einer Behandlung intakter Tiere mit dem Antiestrogen ICI wird die Expression von OPG gehemmt (Setchell und Lydeking-Olsen 2003), während Estradiol die OPG-Expression in Osteoblasten über einen ER $\alpha$ -vermittelten Mechanismus stimuliert (Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Auch Genistein stimuliert die Expression dieses wichtigen Knochenmarkers in Osteoblasten (Viereck et al. 2002) über einen ER-vermittelten Signalweg (Chen et al. 2002).

Weitere Mechanismen, über die Phytoestrogene einem Knochenverlust vorbeugen oder ihm entgegenwirken, sind ihre hemmenden Einflüsse auf Osteoklasten, die zum Teil auf nicht-genomischen Wirkungsweisen beruhen (Fitzpatrick 2003). Hierzu zählen u.a. die Stimulation der Apoptose (Gao und Yamaguchi 1999) und die Beeinflussung von Enzymaktivitäten (Gao und Yamaguchi 2000) in diesen resorbierenden Zellen.

Neben den unmittelbaren Einflüssen auf Osteozyten ist in neueren Untersuchungen das Augenmerk auch auf knochenprotektive Interaktionen von Estrogenen mit Bewegungs-, bzw. Trainingsreizen gerichtet worden, wobei estrogenrezeptor-subtypspezifische Einflüsse eine Rolle zu spielen scheinen (Lee und Lanyon 2004, Saxon und Turner 2005). Körperliche Bewegung in Kombination mit Phytoestrogenen als ein möglicher Therapieansatz für die postmenopausale Osteoporose ist daher bereits in Untersuchungen am Tier (Wu et al. 2001, Wu et al. 2004a, Chilibeck 2004) und in Studien mit postmenopausalen Frauen (Lewis und Modlesky 1998, Wu et al. 2006) analysiert worden. Dieser Ansatz wurde mit Erfolg auch in Bezug auf Knochendichteverluste untersucht, die durch einen Androgenmangel hervorgerufen werden (Wu et al. 2003).

Somit geben die Existenz von ERs in Knochenzellen und die beschriebenen nicht-genomischen Effekte von Phytoestrogenen, aber auch die Kombination mit physischer Belastung, Anlass zu der Vermutung, dass mit der Nahrung aufgenommene Phytoestrogene eine Rolle bei der Knochenhomöostase spielen und der Grund für die beschriebenen epidemiologischen Unterschiede sein könnten (Setchell und Lydeking-Olsen 2003).

Bis auf vereinzelte Untersuchungen an menopausalen und postmenopausalen Frauen (Alekel et al. 2000, Morabito et al. 2002, Atkinson et al. 2004a) gibt es noch sehr wenige repräsentative Studien, die belegen, dass die im Tiermodell und in der Zellkultur für Phytoestrogene gezeigten knochenprotektiven Effekte auch auf den Menschen übertragbar sind (Anderson und Garner 1998). Bei den osteoprotektiven Effekten von Phytoestrogenen stellt sich ebenso wie bei den antikarzinogenen Effekten dieser Substanzen die Frage, ob ihr maximaler Nutzen nicht eher durch eine langfristige Prävention, als durch eine akute Behandlung erreicht werden kann (Setchell und Lydeking-Olsen 2003). Somit wird es eine wichtige Aufgabe zukünftiger Untersuchungen sein, die präventive Bedeutung einer bereits im Embryo oder im juvenilen Organismus einsetzenden Exposition gegenüber Phytoestrogenen für verschiedene pathophysiologische Fragestellungen zu untersuchen.

### **1.2.3.3 Phytoestrogene und das kardiovaskuläre System**

Ebenso wie hormonell bedingte Krebserkrankungen und Osteoporose, zählen auch Herz-Kreislaufkrankungen wie Herzinfarkte, Bluthochdruck und Arteriosklerose zu den bedeutendsten Krankheiten westlicher Gesellschaften. Auch für diese Erkrankungen belegen epidemiologische Datenerhebungen eine Korrelation zwischen deutlich reduzierter Inzidenz und den bereits beschriebenen Ernährungsgewohnheiten in asiatischen Ländern (Adlercreutz 1990).

Im Zusammenhang mit Herz-Kreislaufkrankungen spielen Geschlecht, Alter und vor allem die Sexualhormone eine bedeutende Rolle (Ogita et al. 2003, Czubryt et al. 2006). Einerseits wird durch eine HET für perimenopausale Frauen das Risiko Herz-Kreislaufkrankungen zum Opfer zu fallen gesenkt (Ouyang et al. 2006), auf der anderen Seite zeigen neuere Untersuchungen, dass ein erhöhtes Risiko an Thrombosen und Schlaganfällen zu erkranken mit einer langfristigen Hormonbehandlung postmenopausaler Frauen in Verbindung steht (Farquhar et al. 2005). Für Estrogene sind bereits sowohl positive als auch negative Einflüsse auf das Herz-Kreislaufsystem und auf entsprechende Erkrankungen beschrieben worden (Mendelsohn und Karas 1999, Mendelsohn und Karas 2005). Zu den positiven Einflüssen von Estrogenen gehören die Senkung von Lipoproteinspiegeln im Blutplasma (Ouyang et al. 2006), die Förderung der Vasodilatation durch Aktivierung der endothelialen Stickstoffmonoxid-Synthase (eNOS) (Chen et al. 1999c, Hisamoto und Bender 2005) und die Hemmung der Entstehung von

Arteriosklerose (Vischer 1997). Die Estrogenrezeptoren stellen im kardiovaskulären System bedeutende Vermittler verschiedener estrogener Wirkungen dar (Deroo und Korach 2006). Eine reduzierte Expressionsrate des ER $\alpha$  wurde bei an Arteriosklerose erkrankten Frauen beobachtet und es konnte gezeigt werden, dass das Gewebe geschädigter Arterien signifikant weniger ER $\alpha$ -Proteine aufwies als gesundes arterielles Gewebe (Losordo et al. 1994). Diese Untersuchungen gehen einher mit der Beobachtung, dass die Methylierung des ER $\alpha$ -Gens in arteriosklerotischen Plaques in menschlichen Herzkranzgefäßen deutlich stärker ausgeprägt ist als in gesunden Gefäßen (Post et al. 1999). Polymorphismen des ER $\beta$  konnten sowohl mit einer linksventrikulären Hypertrophie bei Frauen mit Bluthochdruck (Peter et al. 2005) als auch mit dem Blutdruck in gesunden japanischen postmenopausalen Frauen (Ogawa et al. 2000) korreliert werden. Neben verschiedenen genomisch vermittelten pathophysiologischen Effekten von Estrogenen im Herz-Kreislaufsystem (Deroo und Korach 2006) stellt der Einfluss von Estradiol auf die Vasodilatation über die Induktion der Abgabe von Stickstoffmonoxid (Vischer 1997, Deroo und Korach 2006) eine schnelle, nicht-genomische Reaktion von Endothelzellen auf Estrogene dar.

Estrogene und eine HET können also im Herzkreislaufsystem neben positiven Effekten auch negative Wirkungen induzieren. Die Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  sind hier wichtige Vermittler unterschiedlicher estrogener Effekte. Somit sind potentielle Wirkungen von SERMs und Phytoestrogenen auch in diesem Bereich von wissenschaftlichem Interesse (Nandur et al. 2004, Park et al. 2005, Cassidy und Hooper 2006).

In diesem Zusammenhang konnte für Sojaproteinextrakte gezeigt werden, dass sie die Cholesterinspiegel im Blutserum senken (Anderson et al. 1995). Verschiedene Mechanismen scheinen hier eine Rolle zu spielen (Potter 1995), es konnte jedoch noch nicht eindeutig gezeigt werden, dass es alleine die Phytoestrogene in den Sojaextrakten sind, die für die Beeinflussung der Lipoproteinkonzentrationen im Blutplasma verantwortlich sind (Setchell 1998). Genistein scheint ebenso wie Estradiol verschiedene Effekte bei Adipogenese und Lipogenese zu vermitteln (Cooke und Naaz 2005). Bei Frauen mit niedrigen Estrogenspiegeln konnte gezeigt werden, dass hohe Daidzein-Plasmaspiegel positive und womöglich ER-vermittelte Einflüsse auf die Lipoproteinspiegel im Blutplasma haben (Bailey Merz et al. 2006).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Isoflavone die Plaquebildung reduzieren, indem sie die Zelladhäsion verhindern (Raines und Ross 1995), was wiederum mit der Hemmung der Tyrosinkinase durch Phytoestrogene in Zusammenhang stehen könnte (Setchell 1998). Auch die antioxidativen Eigenschaften von Phytoestrogenen (Jha et al. 1985, Tikkanen und Adlercreutz 2000) könnten protektive Effekte auf das Herz-Kreislaufsystem vermitteln, da hohe Konzentrationen von Antioxidanzien im Blut das Risiko eines Herzinfarktes senken (Adlercreutz 1995, Setchell 1998). Darüber hinaus vermag Genistein die Erhöhung des Blutdrucks in ovariectomierten Ratten zu antagonisieren (Chanawirat et al. 2006).

Neben den beschriebenen Wirkungsweisen von Phytoestrogenen auf hormonell bedingte Krebserkrankungen, Osteoporosen und Erkrankungen des Herz-Kreislaufsystems wurden auch mögliche Einflüsse dieser sekundären Pflanzeninhaltsstoffe auf den Fettstoffwechsel (Cooke und Naaz 2005) und auf Wechseljahrsbeschwerden menopausaler Frauen untersucht und kontrovers diskutiert (Ososki und Kennelly 2003, Krebs et al. 2004).

Vor dem Hintergrund epidemiologischer Datenerhebungen (Adlercreutz und Mazur 1997) und aufgrund der fundamentalen pathophysiologischen Bedeutungen der Estrogenrezeptoren (Deroo und Korach 2006) haben auch die verschiedenen Einflüsse von Phytoestrogen an Bedeutung gewonnen. Die Entdeckung des Potentials von selektiver Estrogenrezeptormodulation als Therapieansatz für die Behandlung von Brustkrebs, Osteoporose und Herz-Kreislaufkrankungen (Jordan et al. 2001), hat dazu geführt, dass Phytoestrogene im Hinblick auf ihre vielfältigen physiologischen Interaktionen untersucht und wissenschaftlich hinterfragt worden sind. Die gewonnenen Erkenntnisse sind zum Teil viel versprechend, werden aber auch aufgrund inhomogener Ergebnisse kritisch hinterfragt (Cassidy et al. 2006). Gründe hierfür sind in den unterschiedlichen Substanzen und Dosierungen in Tierexperimenten und klinischen Studien zu suchen (Usui 2006). Hinzu kommt, dass der wirkstarke Metabolit Equol zwar durchweg von Tieren produziert wird, jedoch nur 30% der Menschen diesen Metaboliten herstellen können (Setchell et al. 2002b). In vielen Ergebnissen und epidemiologischen Untersuchungen zeichnet sich immer deutlicher ab, dass die Bedeutung von Phytoestrogenen eher in der lebenslangen Prävention als in der akuten Therapie von Brustkrebs oder postmenopausalen Beschwerden liegt.

### **1.3 Untersuchte Markergene und estrogenresponsive Gene**

#### **1.3.1 Proliferating cell nuclear antigen**

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) ist ein kernständiges, nicht zu den Histonen gehörendes Protein (36 kDa), dessen Proteinbiosynthese mit dem proliferativen Status der Zelle korreliert (Bravo et al. 1987). PCNA dient innerhalb des Zellzyklus als Kofaktor der DNA-Polymerase delta, wird während der frühen G1- und S-Phase exprimiert und dient daher sowohl auf mRNA-Ebene, als auch auf Proteinebene als anerkannter Marker für proliferierende Zellen (Hall et al. 1990, Iatropoulos und Williams 1996). Die Expression dieses Proliferationsmarkers unterliegt unter anderem dem Einfluss von Estrogenen (Lobenhovet et al. 2002).

#### **1.3.2 Aktive Caspase-3**

Die intrazelluläre Maschinerie, die für den Prozess der Apoptose verantwortlich ist, beruht auf einer Familie von Proteasen, die ein Cystein im aktiven Zentrum haben und ihre Zielproteine an spezifischen Aspartylresten scheiden, woher sich ihr Name „Caspase“ ableitet (Alberts et al. 2004).

An der Apoptose beteiligte Caspasen werden in zwei Kategorien unterteilt: Caspase-2, -8, -9 und -10 dienen als Initiatoren oder Aktivatoren, während Caspase-3, -6 und -7 als Effektoren apoptotischer Prozesse dienen (Launay et al. 2005). Initiator-Caspasen liegen in der Zelle als inaktive Procaspasen vor, die z.B. über den TNF-Rezeptor (TNFR)-1, oder über mitochondriale Mechanismen aktiviert werden können (Fan et al. 2005). Effektor-Caspasen werden in der Zelle ebenfalls als inaktive Vorläufer (Procaspasen) synthetisiert, die durch proteolytische Spaltung an Aspartylresten durch Initiator-Caspasen aktiviert werden (Shi 2002). Einmal aktiviert, spalten und aktivieren die Caspasen weitere Procaspasen. Eine sich selbst verstärkende proteolytische Kaskade entsteht. Sind die Effektor-Caspasen einmal aktiviert, beginnen sie mit der proteolytischen Spaltung eines breiten Spektrums von Schlüsselproteinen der Zelle (z.B. Strukturproteine wie Aktin oder Inhibitoren von DNAsen), was schließlich zum natürlichen Zelltod führt. Da die Caspase-3 zu den drei Effektor-Caspasen gehört, die schließlich für die proteolytische Spaltung wichtiger Zellbestandteile verantwortlich sind, gilt der Nachweis ihrer Aktivierung als ein Marker für ein fortgeschrittenes Stadium der Apoptose. Für die

Untersuchungen dieser Arbeit wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch nur an Epitope des 17 kDa großen Proteins der aktiven Caspase-3 bindet.

### **1.3.3 Bone morphogenic protein-2**

Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) ist ein Wachstumsfaktor, der der TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ) Familie angehört. Es sind bereits vielfältige Wirkungsweisen und Einflüsse von mehr als 15 verschiedenen BMPs beschrieben worden (Chen et al. 2004). BMP-2 ist maßgeblich an Prozessen des Knochenauf- und -umbaus beteiligt (Ghosh-Choudhury 1994).

Hier beeinflusst es vor allem die Vermehrung und Differenzierung von Knochenvorläuferzellen zu Osteoblasten (Chen et al. 1997, Harris et al. 2003b).

In der klinischen Anwendung spielt der Einfluss von BMP-2 auf die Differenzierung von Osteoblasten bei der Behandlung von Osteoporose (Jadhav und Jain 2006) und bei der Frakturheilung (de Biase und Capanna 2005) eine bedeutende Rolle. Die osteoinduktiven Effekte von BMP-2 und die Tatsache, dass Estradiol und das Phytoestrogen Genistein die Transkriptionsrate dieses Wachstumsfaktors über einen estrogenrezeptorvermittelten Mechanismus steigern (Zhou et al. 2003), bilden die Grundlage für die Untersuchung dieses Knochenmarkers in dem für diese Arbeit verwendeten Tiermodell der ovariectomierten Ratte.

### **1.3.4 Progesteronrezeptor**

Als ein Mitglied der Kernrezeptorsuperfamilie ist auch der Progesteronrezeptor ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der in der typischen Domänenstruktur aufgebaut ist (Evans 1988). In den meisten Spezies wird der Progesteronrezeptor in zwei Isoformen, PR-A und PR-B, exprimiert (Lessey et al. 1983). Die zwei Progesteronrezeptorsubtypen entstehen aus einem Gen, jedoch durch wechselnde Aktivität zweier Promotoren (Kastner et al. 1990). PR-A ist am N-terminalen Ende 164 Aminosäuren kürzer, hat ansonsten aber die gleiche Aminosäuresequenz wie PR-B. Die zwei Promotoren des Progesteronrezeptorgens sind estrogenresponsiv (Kastner et al. 1990, Savouret et al. 1991). Aus diesem Grund eignet sich die Untersuchung der Genexpression des PR als ein weiterer Marker für das estrogene Potential von Untersuchungssubstanzen.

### 1.3.5 Cyclooxygenase-2

Die Cyclooxygenase-2 (Cox-2) katalysiert die Synthese von Prostaglandinen (PGs). Als Prostaglandin-Synthase (Cox) wandelt sie Arachidonsäure über das instabile Zwischenprodukt Prostaglandin  $G_2$  in zyklische Endoperoxide (Prostaglandin  $H_2$ ) um, die wiederum eine Vorstufe von verschiedenen biologisch aktiven PGs und von Thromboxan  $A_2$  darstellen (Subbaramaiah und Dannenberg 2003). Prostaglandine sind in erster Linie an der Entstehung von Fieber, Schmerzen und entzündlichen Reaktionen beteiligt.

Im Menschen und beim Tier gibt es zwei Isoformen von Prostaglandinsynthasen, Cox-1 und Cox-2, die sich in ihrer Funktion und Genexpression unterscheiden. Cox-1 wird in den meisten Geweben konstitutiv exprimiert und ist verantwortlich für die Bildung von PGs, die normale physiologische Funktionen, wie z.B. die Aufrechterhaltung der Magenschleimhaut haben (Smith et al. 2000). Cox-2 hingegen kann unter normalen physiologischen Bedingungen in den meisten Geweben nicht oder nur in geringen Konzentrationen detektiert werden. Treten jedoch inflammatorische Reize wie z.B. Gewebeschädigungen auf, wird Cox-2 innerhalb von Minuten gebildet und über die Bildung von PGs kommt es zu Schmerz- und Entzündungsreaktionen (Subbaramaiah und Dannenberg 2003). Cox-2 scheint ebenfalls an der Entstehung von Tumoren beteiligt zu sein. Eine Überexpression von Cox-2 hat z.B. in transgenen Mäusen zu der Entstehung von Mammakarzinomen beigetragen (Liu et al. 2001). Die Beeinflussung der Genexpression von Cox-2 durch Estradiol oder durch andere estrogen wirksame Substanzen in Endothelzellen wurde bereits vielfach dokumentiert (Tamura et al. 2004, Hermenegildo et al. 2006) und ist auch in dieser Arbeit von Bedeutung. Cox-2 spielt bei Erkrankungen wie Arteriosklerose und bei Thrombosen, aber auch bei der Entstehung von Kolonkarzinomen eine bedeutende Rolle (Call et al. 2004, Dai und Kloner 2004). Die über Cox-2 Expression regulierte Überproduktion von Prostaglandin  $E_2$  (PGE<sub>2</sub>) führt zu einer verstärkten Zellproliferation (Yau und Zahradka 2003), zu einer lokalen Immunsuppression (Dinchuk et al. 1995) und zu einer Inhibition der Apoptose (Yagami et al. 2003). Somit konnte für eine Hemmung der Cox-2 gezeigt werden, dass sie der Entstehung von Kolonkarzinomen vorbeugt (Rigas und Kashfi 2004, Koehne und Dubios 2004) und vor der Ausbildung einer Arteriosklerose schützt (Paik et al. 2002, Linton und Fazio 2004).



## 1.4 Zielsetzung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit sollten vor dem Hintergrund estrogenassoziierter Erkrankungen und Beschwerden gewebe- und subtypspezifische Wirkmechanismen der Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  untersucht werden. Darüber hinaus war es das Ziel der Untersuchungen den molekularen Wirkmechanismus des Phytoestrogens Genistein mit Blick auf die Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  zu charakterisieren.

Konkret sollten in sechs verschiedenen tierexperimentellen Studien folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Welche gewebespezifischen, agonistischen und/oder antagonistischen Wirkungen haben die Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$ , und resultieren hieraus mögliche estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf hormonell bedingte Erkrankungen und Beschwerden?

Zur Klärung dieser Fragen sollten im Tiermodell die spezifischen Estrogenrezeptoragonisten 16 $\alpha$ -LE<sub>2</sub> und 8 $\beta$ -VE<sub>2</sub> (Schering AG, Berlin) zum Einsatz kommen. In verschiedenen tierexperimentellen Studien sollten Mechanismen, die im Zusammenhang mit verschiedenen molekularen Endpunkten estrogener Wirkungen stehen, für unterschiedliche Gewebe untersucht werden. Im Besonderen sollte geklärt werden, welche Wirkung die gezielte Aktivierung der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  auf die Gewebekomöostase in Knochen und Darm hat.

2. Welche gewebespezifischen Einflüsse gehen von dem Phytoestrogen Genistein vor dem Hintergrund estrogenrezeptorsubtypspezifischer Wirkungsweisen aus? Trifft hier die Bezeichnung „Phyto-SERM“ zu?

Um diese Frage beantworten zu können, sollten im Tiermodell gewebespezifische agonistische und antagonistische Wirkungen von Genistein untersucht werden. Außerdem sollten die verschiedenen tierexperimentellen Studien u.a. dazu genutzt werden, die Einflüsse von Genistein auf verschiedene molekulare Endpunkte estrogener Wirkungen mit estrogenrezeptorsubtypspezifischen Effekten der selektiven Agonisten zu vergleichen.

3. Kann körperliche Aktivität in Kombination mit einer phytoestrogenreichen Ernährung oder einer subkutanen Applikation von Genistein protektive Effekte auf den Knochenstoffwechsel und das Körpergewicht haben?

Hierzu wurde im Rahmen eines hochschulinternen Forschungsförderungsprojektes der Deutschen Sporthochschule Köln in einem Langzeitversuch der kombinierte Einfluss von körperlicher Bewegung und einer phytoestrogenreichen Diät im Tiermodell untersucht. In weiteren tierexperimentellen Studien wurde darüber hinaus die gegenseitige Einflussnahme der subkutanen Applikation von Genistein und den estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten und körperlicher Bewegung untersucht.

## 2 Material

### 2.1 Laborgeräte

Gerät	Hersteller
Ausgießstation Tissue-Tek <sup>®</sup> II	Ames Company Inc., Woodland, CA, USA
Autoklav 3870 ELV	Tuttnauer, Jerusalem
Computer Tomograph XCT Research SA+	StraTec Medizintechnik, Pforzheim
Digitale Mikroskopkamera 3CCD	Sony, Japan
Einbettautomat Tissue-Tek <sup>®</sup> VIP 2000	Miles Scientific, Naperville, IL, USA
Criterion <sup>®</sup> Elektrophoresekammer	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Eismaschine	Ziegra Eismaschinen GmbH, Isernhagen
Fluorchem <sup>™</sup> luminescent imager	Alpha Innotech, CA, USA
Homogenisator PT 1200 B	Bachofer GmbH, Reutlingen
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
Mikroskop KS 300 Axiophot	Carl Zeiss Vision GmbH, Hallbergmoos
pH-mV-Meter	Knick GmbH & Co., Berlin
Photometer (kinetic microplate reader)	MWG Biotech GmbH
Pipetten (10-5000µl)	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetman	Gilson Int. BV, Bad Camberg
Pipettierhilfe Pipetboy accu	Tecnomara GmbH, Fernwald
Rotationsmikrotom Modell 1140/Autocut	Reichert-Jung, Nussloch
Stromversorgung, Power Pack 3300	Biometra GmbH, Göttingen
Trockenschränke	Heraeus Instruments, Hanau
	Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach
Ultra-Tiefkühlgerät (-80°C)	Heraeus Instruments, Osterode
Genie 2 Vortex-2 <sup>™</sup> 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	Gerhard GmbH & Co. KG, Bonn
Zentrifugen:	
- Megafuge 3.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
- Centrifuge 5417 R	Eppendorf AG, Hamburg

## 2.2 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Ammoniumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Ampuwa®	Fresenius, Bad Homburg
Anilinblau	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Acetat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Azokarmin G	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Bovine Serum Albumin (Rinderserum)	Serva Feinbiochemicals, Heidelberg/New York
Citronensäure	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Coomassie Brilliant Blue r250	Merck, Darmstadt
N,N-Dimethylformamid	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Erdnussöl	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Essigsäure/Eisessig (96%ig)	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ethanol	Hoffmann GmbH & Co., Düsseldorf
2-Merkaptoethanol	Amresco, Solon, OH, USA
Formaldehydlösung (37%ig)	Merck, Darmstadt
D-Glucose	Merck, Darmstadt
Glucoseoxidase	Merck, Darmstadt
L-Glutamin	Gibco BRL-Life Technologies, Karlsruhe
Glycerol (87%ig)	Merck, Darmstadt
Glycin	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
NH <sub>4</sub> Cl	Merck, Darmstadt
NiSO <sub>4</sub>	Merck, Darmstadt
Natriumbisulfit	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumcitrat	Merck, Darmstadt
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Orange G	Merck, Darmstadt
Phosphat gepufferte Kochsalzlösung	Gibco™-Invitrogen Corporation, Paisley, UK
Phosphorwolframsäure	Merck Darmstadt
PIPES	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe
Saccharose (reinst)	Merck Darmstadt
Salzsäure 37%ig	Merck Darmstadt

Schwefelsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
SDS (Sodiumdodezylsulfat)	Amresco, Solon, OH, USA
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
Tween20	Merck-Schuchardt, Hohenbrunn
Ultraclear <sup>®</sup> (Xylol-Ersatz)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Diesenhofen
Wasserstoffperoxid (30%ig), Perhydrol <sup>®</sup>	Merck, Darmstadt
Xylidin-Ponceau	Chroma-Gesellschaft, Stuttgart-Untertürkheim

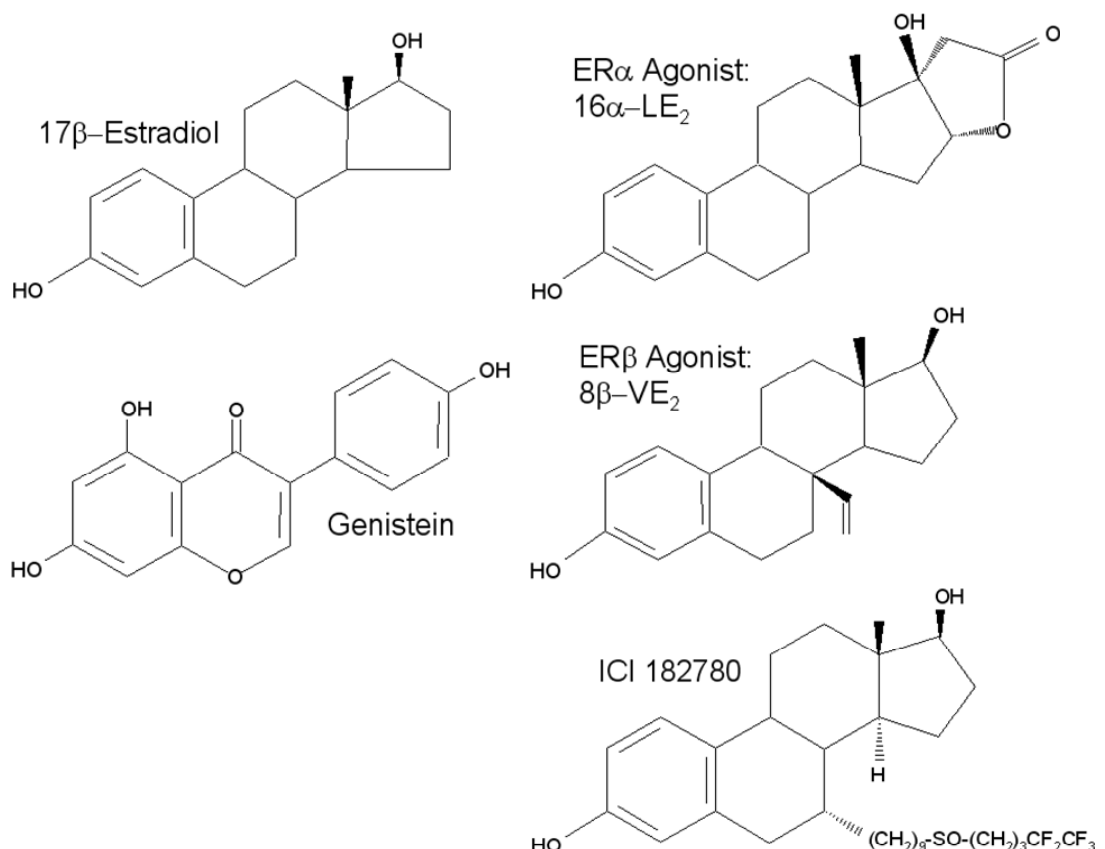
### 2.3 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller
Criterion <sup>™</sup> XT Precast Gel (4-12% Bis-Tris)	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
DC Protein ASSAY	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Deckgläser	VWR International GmbH, Darmstadt
Einbettungskasten Tissue-Tec <sup>®</sup>	Satura finetek Europe B.V., Zoeterwoude, NL
Einmalfilterhalter (Porengröße 0,2µm)	Schleicher & Schüll GmbH, Dassel
Einmalkanülen Neolus 20G (0,9mm)	Terumo Europe N.V., Leuven, B
Einmalspritzen Omnifix <sup>®</sup> Luer-Lock (10ml)	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
Entellan (Schnelleindeckmedium)	Merck, Darmstadt
Heparin Sodium Salt	ICN Biochemicals, OH, USA
Ketanest <sup>®</sup> S Injektionslösung 25 mg/ml	Pfizer GmbH, Karlsruhe
Mikrotiterplatten (96-well)	Nunc <sup>™</sup> , Roskilde, Dänemark
Objektträger SuperFrost <sup>®</sup> Plus	Menzel GmbH & Co. KG, Braunschweig
PAP-Pen	Polysciences Inc., Warrington, PA, USA
Paraffin/Histo-Comp <sup>®</sup> Gewebeeinbettmittel	Vogel GmbH & Co. KG, Giessen
Pipettenspitzen (10, 100, 1000, 5000 µl)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf Eppendorf AG Hamburg
POD Substrat Lumi-Light <sup>PLUS</sup>	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Precision Plus Proteinstandard	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Protean <sup>®</sup> Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schnell BioScience GmbH, Dassel
Reaktionsgefäße (200, 500, 1000, 2000 µl)	Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf Starlab GmbH, Ahrensburg
Rompun <sup>®</sup> Injektionslösung 2%ig	Bayer Vital GmbH, Leverkusen
Tramal <sup>®</sup> Injektionslösung 100mg	Grünenthal GmbH, Aachen
Whatmanfilter <sup>®</sup> (Faltenfilter)	Whatman GmbH, Dassel
XT MES Running Buffer 20x	BIO-RAD Laboratories GmbH, München
Zentrifugen-Röhrchen (15, 50 ml)	Nunc <sup>™</sup> , Roskilde, Dänemark

## 2.4 Untersuchungs- und Referenzsubstanzen

In den dieser Arbeit zugrundeliegenden tierexperimentellen Studien wurden folgende Substanzen (Abb. 2.1) entweder als Untersuchungs- oder als Referenzsubstanz subkutan verabreicht (siehe 2.7):

- 17 $\beta$ -Estradiol (Estra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\alpha$ ,17  $\beta$ -diol)
- 17 $\beta$ -Estradiol-Pellets (Estra-1,3,5(10)-trien-3,16 $\alpha$ ,17  $\beta$ -diol)-Pellets
- Fulvestrant (Faslodex<sup>TM</sup>; 7- $\alpha$ -[9-(4,4,5,5,5-Pentafluoropentylsulfinyl)nonyl]-estra-1,3,5(10)-trien-3,17  $\beta$ -diol)
- Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavon)
- ER $\alpha$ -spezifischer Agonist [(16 $\alpha$ -LE<sub>2</sub>), 3,17-dihydroxy-19-nor-17 $\alpha$ -pregna-1,3,5 (10)-triene-21,16 $\alpha$ -lactone.])
- ER $\beta$ -spezifischer Agonist [(8 $\beta$ -VE<sub>2</sub>), 8-vinylestra-1,3,5 (10)-triene-3,17 $\beta$ -diol]



**Abb. 2.1:** Strukturformeln der applizierten Substanzen.

17 $\beta$ -Estradiol und Genistein wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen) bezogen, und die estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten

ERA (16 $\alpha$ -LE<sub>2</sub>) und ERB (8 $\beta$ -VE<sub>2</sub>), sowie das Antiestrogen (ICI) wurden von Dr. K.H. Fritzemeier der Schering AG (Berlin) zur Verfügung gestellt. Die 17 $\beta$ -Estradiol-Pellets wurden von Innovative Research of America (Sarasota, FL, USA) bezogen.

## 2.5 Antikörper

Die für die immunhistochemischen Analysen und im Western Blot verwendeten primären und sekundären Antikörper, sowie die entsprechenden Zielproteine (mit Epitopen für die Antikörper) und ihre Immunogenität sind der folgenden Tabelle (Tab. 2.1) zu entnehmen.

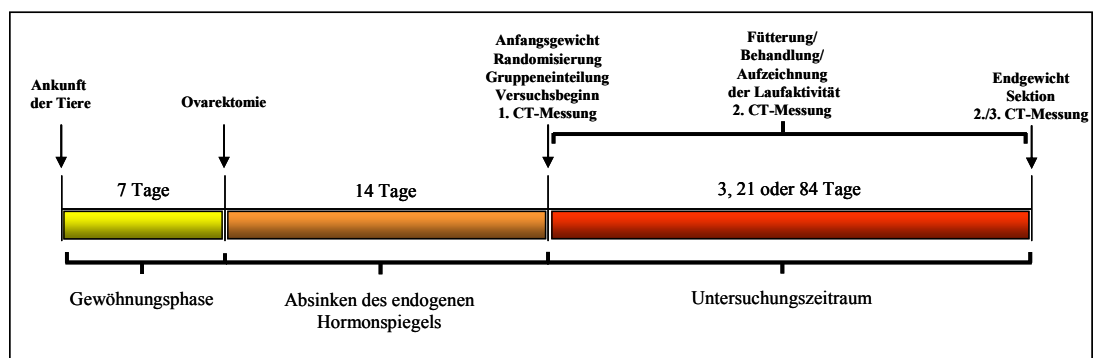
primäre Antikörper	Wirt	Proteingröße	Firma
Anti-Actin (20-33) IgG, A 5060	Rabbit	42 kDa.	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Anti-Active Caspase-3 polyclonal, 557035	Rabbit	17 kDa.	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-PCNA IgG monoclonal, M 0879	Mouse	36 kDa.	Dako, Glostrup, Dänemark
Anti-BMP-2 (N-14), sc-6895	Goat	18 kDa.	Santa Cruz Biotech., Heidelberg
Anti-COX-2, 160106	Rabbit	72 kDa.	Cayman Chemical, Biozol, Eching
Anti-PR, 1408	Mouse	115 kDa.	Immunotech, Marseille, Frankreich
sekundäre Antikörper	Wirt	Immunogen	Firma
Polyclonal Rabbit Anti-Mouse Immunglobulins/HRP, P0260	Rabbit	Mouse	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Swine Anti-Rabbit Immunglobulins/HRP, P0217	Swine	Rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunglobulins/HRP, P0160	Rabbit	Goat	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti-Mouse Immunglobulins/Biotinylated, E0433	Goat	Mouse	Dako, Glostrup, Dänemark
Polyclonal Goat Anti-Rabbit Immunglobulins/Biotinylated, E0432	Goat	Rabbit	Dako, Glostrup, Dänemark

**Tab. 2.1:** Für Immunhistochemie und Western Blot verwendete Antikörper.

## 2.6 Gewebe

Die in dieser Arbeit untersuchten Gewebeproben stammten von intakten SHAM-operierten oder ovariectomierten weiblichen Wistar Ratten (Züchter: Janvier, Le Genest St Isle, France), die die Grundlage für insgesamt 6 tierexperimentelle Studien bildeten. Hierbei wurden den Tieren die Untersuchungs- und Referenzsubstanzen über einen gewissen Zeitraum entweder über das Futter, über subkutan (s.c.) implantierte Pellets oder über subkutane Injektionen in definierten Mengen verabreicht. Die Tiere wurden einem konstanten Tagesrhythmus ausgesetzt, der aus einer jeweils zwölfstündigen Tag- und Nachtphase bestand. Kontroll- und Versuchstiere wurden permanent bei einer Raumtemperatur von 20-22°C und gleichbleibender Luftfeuchtigkeit (80%) gehalten. Die Nahrung bestand je nach Versuchsdesign entweder aus einer phytoestrogenarmen Standarddiät (SSniff GmbH,

Soest) oder einer explizit phytoestrogenreichen Diät (Harlan Winkelmann, Borchten). Außerdem erhielten die Tiere Leitungswasser *ad libitum*. Zum Zeitpunkt der Lieferung wogen die Tiere 101-125g und waren sechs Wochen alt. Die Ovariectomien bzw. SHAM-Operationen wurden nach einer siebentägigen Eingewöhnungsphase durchgeführt, woran sich eine vierzehntägige Erholungsphase anschloss (Abb. 2.2), die gleichzeitig für den Abbau der im ovariectomierten Organismus verbliebenen Hormone von Bedeutung war. Für die operativen Eingriffe und die *in vivo* Knochendichtemessungen wurden die Tiere mit einem Gemisch aus Rompun® und Ketanest® betäubt und nach dem Aufwachen drei Tage lang zweimal täglich mit einem Schmerzmittel (Tramal®) behandelt. Mit den eigentlichen Studien wurde somit erst nach drei Wochen begonnen (Abb. 2.2). Zu diesem Zeitpunkt wogen die Tiere zwischen 190 und 210g. Je nach Versuchsplan erstreckte sich der Versuchszeitraum über 3, 21, oder 84 Tage.



**Abb. 2.2:** Zusammenfassende Darstellung des Ablaufs der tierexperimentellen Studien.

Applizierte Untersuchungs- und Kontrollsubstanzen wurden innerhalb dieses Zeitraums an jedem Wochentag und immer zur gleichen Tageszeit verabreicht. Die Substanzen wurden zusammen mit Erdnussöl und dem Lösungsmittel Dimethylsulfoxid (DMSO) injiziert, wobei sie zunächst in DMSO (20% des Injektionsvolumens) gelöst und anschließend mit Erdnussöl (80% des Injektionsvolumens) gemischt wurden. DMSO diente hierbei als starkes Lösungsmittel und Erdnussöl als Trägersubstanz für die subkutan verabreichten Behandlungssubstanzen. Die Applikationsdosierung der Substanzen erfolgte immer in Relation zum Körpergewicht der Einzeltiere. Die Sektion der Tiere fand 22-24 Stunden nach der letzten subkutanen Behandlung mit den Untersuchungs- und Referenzsubstanzen statt. Die unterschiedlichen Behandlungszeiträume und Art und Menge der applizierten Substanzen sind den Tabellen 2.2 bis 2.7 zu entnehmen. Nach Versuchsende erfolgte die Dekapitation und die zu untersuchenden Gewebe



wurden freipräpariert und entnommen. Ein Teil der Gewebe wurde für molekularbiologische Untersuchungen unmittelbar in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend bei  $-80^{\circ}\text{C}$  in einem Gefrierschrank gelagert; der andere Teil wurde für histologische und immunologische Untersuchungen in einer Formalinlösung fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet (siehe 3.2). Neben Blutplasma und -serum wurden für die Untersuchungen in dieser Arbeit Gefäße (*Vena cava*, Aorta), Uterus, Mamma, Vagina, Femur, Tibia, Kolon und die Darmschleimhaut (Mucosa) entnommen. Die Uteri wurden nach ihrer Freipräparation zunächst gewogen. Das Uterusfeuchtgewicht stellte neben den später histologisch bestimmten Uterus- und Vaginaepithelhöhen ein valides Kriterium zur Bestimmung der estrogenen Wirksamkeit und Potenz der untersuchten Substanzen dar.

Zur Bestimmung des Phytoestrogengehalts im Blut wurden bei der Sektion sowohl Blutplasma als auch Blutserum von jedem Tier entnommen. Zur Gewinnung des Blutplasmas wurde das Blut mit Heparin gemischt. Anschließend wurden Blutserum und -plasma in Reaktionsgefäße gefüllt und bei 3000 U/min zentrifugiert. Die Überstände wurden abgenommen und schließlich bis zur Weiterverwendung bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

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

## **2.7 Organisation und Durchführung der tierexperimentellen Studien**

Unabhängig von Art und Aufbau des Tierexperiments wurde bei allen Versuchen unmittelbar vor und nach dem Untersuchungszeitraum das Körpergewicht der Tiere bestimmt. Neben der Bestimmung verschiedener Organgewichte (z.B. von Milz, Leber und Herz) wurde bei der Sektion das Uterusfeuchtgewicht bestimmt, um den hormonellen Einfluss der Behandlung, sowie die Wirksamkeit der applizierten Substanzen zu validieren, und um Ergebnisse aus weiterführenden molekularbiologischen und histologischen Untersuchungen hiermit korrelieren zu können. Das Uterusfeuchtgewicht gilt neben der Bestimmung der Uterus- und der Vaginaepithelhöhe als anerkannter Parameter uterotropher Assays (Kanno et al. 2001) zur *in vivo*-Bestimmung der Wirksamkeit und Wirkstärke von Substanzen mit

agonistischer oder antagonistischer estrogenen Potenz in ovariectomierten Ratten (OVX).

Ziel des ersten dreitägigen Experimentes war es, das Phytoestrogen Genistein (GEN) auf seine Estrogenität und auf seinen proliferativen Einfluss in Gewebeproben von Uterus- und Brustdrüsengewebe zu untersuchen. Hierfür sollte die Proteinexpression von PCNA (proliferating cell nuclear antigen) und des Progesteronrezeptors (PR) in den durch GEN beeinflussten Geweben molekularbiologisch und histologisch bestimmt und mit den Einflüssen von Estradiol (E<sub>2</sub>) verglichen werden. Zudem sollte histologisch die Proteinexpression des Entzündungsmarkers Cyclooxygenase-2 (Cox-2) vergleichend in Uterus und Gefäßen der behandelten Tiere untersucht werden. Hierzu wurden die Tiere 14 Tage nach der Ovariectomie drei Tage lang mit den entsprechenden Substanzen behandelt (Tab. 2.2). Ovariectomierte unbehandelte Tiere dienten als Kontrollen.

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung/kgKG/T	Behandlungsdauer
OVX	Trägersubstanz	s.c. Injektion	1 ml	3 Tage
E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub>	s.c. Injektion	4 µg	3 Tage
GEN	GEN	s.c. Injektion	10 mg	3 Tage

**Tab. 2.2:** Tierexperiment 1: Testung organspezifischer agonistischer Wirkungen von Genistein.

In einem zweiten dreitägigen Experiment sollten mögliche antagonistische Einflüsse von GEN auf die Proliferation im Uterus untersucht werden (Tab. 2.3). Hierzu wurden ovariectomierte Tiere mit einer kombinierten Applikation von GEN und zwei verschiedenen Dosierungen von E<sub>2</sub>, und SHAM-operierte intakte Ratten mit GEN behandelt. Als Referenzgruppen dienten eine mit GEN behandelte OVX-Gruppe, eine unbehandelte SHAM Gruppe, sowie zwei OVX-Gruppen, die jeweils mit einer der beiden E<sub>2</sub> Dosierungen ohne die Kombination mit GEN behandelt wurden (Tab. 2.3). OVX-Tiere ohne Behandlung dienten auch hier als Kontrollen. In den Uteri dieses Versuches wurden molekularbiologisch und histologisch die Einflüsse der Behandlungen bzw. der Behandlungskombinationen auf die Proliferation im Uterus untersucht.

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung/kgKG/T	Behandlungsdauer
OVX	Trägersubstanz (TS)	s.c. Injektion	1 ml	3 Tage
GEN	GEN + TS	s.c. Injektion	10 mg	3 Tage
SHAM	TS	s.c. Injektion	1 ml	3 Tage
SHAM + GEN	GEN + TS	s.c. Injektion	10 mg + 1 ml	3 Tage
E <sub>2</sub> 1	E <sub>2</sub>	s.c. Injektion	1 µg	3 Tage
E <sub>2</sub> 4	E <sub>2</sub>	s.c. Injektion	4 µg	3 Tage
E <sub>2</sub> 1 + GEN	E <sub>2</sub> + GEN	s.c. Injektion	1 µg + 10 mg	3 Tage
E <sub>2</sub> 4 + GEN	E <sub>2</sub> + GEN	s.c. Injektion	4 µg + 10 mg	3 Tage

**Tab. 2.3:** Tierexperiment 2: Untersuchung antagonistischer Effekte von Genistein.

Aufbauend auf Voruntersuchungen an OVX-Tieren und SHAM-Tieren, die ergaben, dass eine Ovariectomie den Bewegungsantrieb von Ratten signifikant reduziert und vor dem Hintergrund, dass verschiedene Untersuchungsergebnisse für Phytoestrogene ein knochenprotektives Potential postulieren, sollte in einer weiteren tierexperimentellen Studie der Einfluss einer phytoestrogenreichen Diät in Kombination mit körperlicher Aktivität auf diese Parameter untersucht werden. Neben dem Bewegungsantrieb und der Knochendichte stand zusätzlich der Parameter Körpergewicht im Mittelpunkt der Untersuchungen. In diesem dreimonatigen Versuch wurden eine explizit phytoestrogenarme und eine phytoestrogenreiche Diät verfüttert. Außerdem wurden den Tieren einer OVX-Gruppe Estradiolpellets unter die Haut transplantiert, die gleichmäßig über den gesamten Versuchszeitraum definierte Mengen von E<sub>2</sub> an den Organismus abgeben sollten. Bis auf eine OVX-Gruppe, die auf die phytoestrogenreiche Diät gesetzt wurde (Phyto-Gruppe), erhielten die anderen drei Gruppen (SHAM, OVX und OVX+E<sub>2</sub>-Pellet) die phytoestrogenarme Diät (Tab. 2.4). Jede Gruppe bestand aus elf Tieren, wovon jeweils fünf Tiere individuellen Zugang zu einem Laufrad hatten und sechs Tiere in einem Käfig ohne Laufradzugang gehalten wurden. Über den gesamten Versuchszeitraum hinweg wurde die Laufaktivität der Lauftiere aufgezeichnet. Zur Bestimmung der Knochendichte wurden *in vivo*-CT-Messungen vor, während (nach sechs Wochen) und nach dem Versuchszeitraum (nach zwölf Wochen) durchgeführt. Neben der Bestimmung der Konzentrationen von GEN und Daidzein (DAI) in den beiden verfütterten Diäten wurden ebenfalls die Serumkonzentrationen dieser beiden Phytoestrogene im Blutserum der OVX- und der Phyto-Gruppe bestimmt. Außerdem wurde die tägliche Futteraufnahme der Tiere quantitativ bestimmt. Anhand der ermittelten Daten konnte somit die tägliche

Aufnahme von GEN und DAI ermittelt und mit epidemiologischen Daten abgeglichen werden.

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung	Behandlungsdauer
OVX Lauf	PAD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage
OVX Kontrolle	PAD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage
SHAM Lauf	PAD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage
SHAM Kontrolle	PAD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage
E <sub>2</sub> Lauf	PAD+E <sub>2</sub> -Pellet	Diät + s.c.-Pellet	ca. 21g/T + 4µg/kgKG/T	84 Tage
E <sub>2</sub> Kontrolle	PAD+E <sub>2</sub> -Pellet	Diät + s.c.-Pellet	ca. 21g/T + 4µg/kgKG/T	84 Tage
Phyto Lauf	PRD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage
Phyto Kontrolle	PRD	Diät	ca. 21g/T	84 Tage

**Tab. 2.4:** Tierexperiment 3: Einflüsse einer phytoestrogenreichen Diät.

Um die Einflüsse einer phytoestrogenreichen Diät (Tierexperiment 3) auf Knochendichte, Bewegungstrieb und Körpergewicht mit den Effekten einer subkutanen Applikation von GEN auf diese Parameter vergleichen zu können, und um hierbei beteiligte estrogenrezeptorsubtypspezifische Mechanismen und Wirkungsweisen zu untersuchen, wurde ein weiteres Tierexperiment durchgeführt (Tab. 2.5). Hier kamen als zusätzliche Untersuchungssubstanzen estrogenrezeptorsubtypspezifische Agonisten (ERA, ERB) zum Einsatz, deren Effekte auf die Untersuchungsparameter mit dem Einfluss der subkutanen Applikation von GEN abgeglichen werden sollten. Eine weitere Referenzgruppe wurde mit E<sub>2</sub> substituiert. Neben einer OVX-Gruppe waren noch drei weitere Kontrollgruppen Bestandteil des Versuchs. Diese Gruppen wurden neben den jeweiligen Estrogenrezeptoragonisten, oder Genistein zusätzlich mit einem Antiestrogen (ICI) behandelt. Untersuchungsparameter dieses dreiwöchigen Experiments waren auch hier Knochendichte, Laufleistung und Körpergewicht. Zusätzlich wurde bei der Sektion, im Hinblick auf molekularbiologische Untersuchungen von Knochenmarkern, die Tibia der Tiere entnommen. Alle Tiere dieses Experiments hatten freien Zugang zu der Laufradapparatur und standen somit während des gesamten Untersuchungszeitraumes unter dem Einfluss von körperlicher Aktivität. Neben der Aufzeichnung der Laufaktivität wurden auch hier unmittelbar vor und nach dem Versuch *in vivo*-CT-Messungen durchgeführt (Abb. 2.2).

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung/kgKG/T	Behandlungsdauer
OVX	Trägersubstanz (TS)	s.c. Injektion	1 ml	21 Tage
E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> in TS	s.c. Injektion	4 µg	21 Tage
GEN	Genistein in TS	s.c. Injektion	10 mg	21 Tage
Alpha	ERA in TS	s.c. Injektion	10 µg	21 Tage
Beta	ERB in TS	s.c. Injektion	100 µg	21 Tage
GEN+ICI	GEN + ICI in TS	s.c. Injektion	10 mg + 3 mg	21 Tage
Alpha+ICI	ERA + ICI in TS	s.c. Injektion	10 µg + 3 mg	21 Tage
Beta+ICI	ERB + ICI in TS	s.c. Injektion	100 µg + 3 mg	21 Tage

**Tab. 2.5:** Tierexperiment 4: Vergleichende Einflüsse von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Effekten unter dem Einfluss von körperlicher Aktivität.

Aufbauend auf den Ergebnissen von Tierexperiment 4 wurde in einem weiteren Kontrollexperiment (Tab. 2.6) der gleiche Versuch erneut durchgeführt. Hier hatten die Tiere jedoch keinen Laufradzugang und als Kontrollgruppe diente in diesem Experiment nur eine OVX-Gruppe. Die Bedeutung von körperlicher Aktivität für die Ergebnisse aus Experiment 4 sollte mit diesem Kontrollversuch ermittelt werden.

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung/kgKG/T	Behandlungsdauer
OVX	Trägersubstanz (TS)	s.c. Injektion	1 ml	21 Tage
E <sub>2</sub>	E <sub>2</sub> in TS	s.c. Injektion	4 µg	21 Tage
GEN	GEN in TS	s.c. Injektion	10 mg	21 Tage
Alpha	ERA in TS	s.c. Injektion	10 µg	21 Tage
Beta	ERB in TS	s.c. Injektion	100 µg	21 Tage

**Tab. 2.6:** Tierexperiment 5: Vergleichende Einflüsse von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Effekten ohne den Einfluss von körperlicher Aktivität.

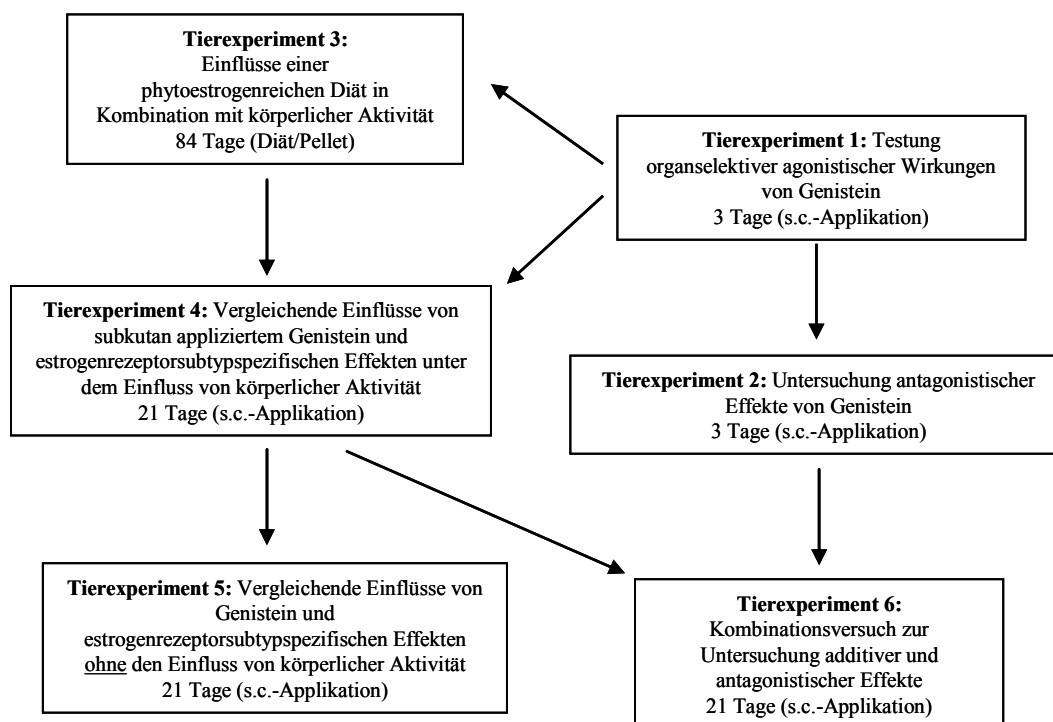
Die gewonnenen Erkenntnisse aus den beiden dreiwöchigen Experimenten 4 und 5 führten bezogen auf mechanistische Fragestellungen zu einem weiteren Experiment, in dem GEN und die beiden Agonisten ERA und ERB miteinander kombiniert verabreicht werden sollten (Tab. 2.7). Die Versuchsdurchführung entspricht der von Tierexperiment 4, jedoch wurden die Kombinationsbehandlungen der Versuchsgruppen so gewählt, dass mögliche additive und/oder antagonistische Effekte, sowie Einflüsse von Heterodimeren auf die gewählten Parameter untersucht werden konnten.

Bezeichnung	Behandlung	Behandlungsart	Dosierung/kgKG/T	Behandlungsdauer
OVX	Trägersubstanz (TS)	s.c. Injektion	1 ml	21 Tage
Gen + Alpha1	GEN + ERA in TS	s.c. Injektion	10 mg + 1 µg	21 Tage
Gen + Beta	GEN + ERB in TS	s.c. Injektion	10 mg + 100 µg	21 Tage
Alpha1 + Beta	ERA + ERB in TS	s.c. Injektion	1 µg + 100 µg	21 Tage
Alpha1	ERA in TS	s.c. Injektion	1 µg	21 Tage

**Tab. 2.7:** Tierexperiment 6: Kombinationsversuch zur Untersuchung additiver und antagonistischer Effekte.

Die beschriebenen Tierversuche dienten der Untersuchung von Phytoestrogenen, die entweder mit der Nahrung aufgenommen oder subkutan appliziert wurden. Im Mittelpunkt der Untersuchungen stand vor allem die Charakterisierung von Genistein im Hinblick auf organspezifische agonistische und/oder antagonistische Wirkungen, sowie der Vergleich dieses Phytoestrogens mit estrogenrezeptorsubtypspezifischen Einflüssen.

In Abbildung 2.3 sind alle aufeinander aufbauenden tierexperimentellen Studien, die die Grundlage für diese Arbeit darstellen zusammenfassend aufgeführt.



**Abb. 2.3:** Zusammenfassende Darstellung der Tierexperimente.

## 3 Methoden

### 3.1 Western Blot

#### 3.1.1 Proteinisolierung

Zur Isolation der Proteine aus den Gewebeproben wurden die Proben in tiefgefrorenem und weiter gekühltem Zustand bei 4°C zunächst mit einem Hammer grob zerkleinert. Die zerkleinerte Probe wurde in einen mit N<sub>2</sub> gekühlten Teflonzylinder überführt, der nach Zufügen einer gekühlten Wolframcarbidkugel verschlossen wurde. Nun wurde die Probe zwei Minuten in einem Dismembrator (B. Braun Melsungen AG, Melsungen) bei 1600 Schlägen pro Minute weiter zerkleinert. Die Probe wurde anschließend in ein gekühltes 50 ml Falcon-Röhrchen gegeben. Nun wurden 500-1000 µl „High Salt“ Präparationspuffer zur Probe gegeben. Anschließend wurden die Zellen der zerkleinerten Gewebeprobe mit einem auf Eis vorgekühlten Homogenisator (Bachover GmbH, Reutlingen) bei 24.500 u/min unter gekühlten Bedingungen aufgeschlossen. War die Probe homogen wurden 500-1000 µl Gefrierpuffer hinzugegeben. Das Gemisch wurde schließlich in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 min. bei 8000 rpm und 4°C zentrifugiert. Im Überstand befanden sich die gelösten Proteine.

#### **Präparationspuffer (pH 7,4):**

240 mM Saccharose (reinst)  
1 mM PMSF in 2-Propanol  
20 mM PIPES  
10 mM EDTA  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

#### **Gefrierpuffer (pH 7,2):**

400 mM Saccharose (reinst)  
5 mM PIPES  
5 mM Tris  
10 mM EDTA  
50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### 3.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration der Proteinlösung wurde mit dem DC Protein ASSAY der Firma BIO-RAD nach dem Lowry-Test ermittelt (Lowry et al. 1951, Peterson 1979). Zunächst wurden neun BSA-Proteinstandards von 0,0 µg/ml, 0,156 mg/ml, 0,312 mg/ml, 0,625 mg/ml, 1,25 mg/ml, 2,5 mg/ml, 5 mg/ml, 10 mg/ml und 20 mg/ml in einer zu gleichen Teilen aus Probenpuffer und Gefrierpuffer bestehenden Lösung hergestellt.

Nach dem vorgegebenen „Microplate Assay protocol“ von BIO-RAD wurden jeweils 5 µl der zu messenden Proben und der Standards in ein Well der Mikrotiterplatte pipettiert. Nun wurden 25 µl von Reagent A und 200 µl von Reagent B des DC Protein Assays in jedes Well gegeben.

Die Absorption wurde nach 15 Minuten im Kinetic microplate reader der Firma MWG Biotech GmbH bei 650 nm gemessen.

Nach der Messung wurden die Proteinproben aliquotiert und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung eingefroren.

### 3.1.3 SDS Gelelektrophorese

Zu 20 µl der Proteinextrakte wurde die gleiche Menge 2x SDS-Loading-Buffer zugegeben und im 1,5 ml Reaktionsgefäß bei 95°C für 5 Minuten denaturiert. Das anionische Detergens SDS (Sodium-Dodecylsulfate) wirkte hierbei zum einen stabilisierend auf die linear vorliegenden denaturierten Proteine und zum anderen überdeckte das stark negativ geladene SDS die Eigenladung der Proteine, was die elektrophoretische Auftrennung der Proteine erleichterte.

#### **2x SDS-Loading-Buffer (pH 6,8):**

(100 mM Tris; 4% SDS; 0,2% Bromphenolblau; 20% Glycerol)

5 ml 1M Tris

20 ml 10% SDS

0,1 g Bromphenolblau

11,5 ml 87% Glycerol

5 ml β-Merkaptoethanol

mit Ampuwa auf 50 ml auffüllen.

Anschließend wurden zuvor berechnete Mengen des denaturierten Proteinextrakts auf ein Criterion<sup>TM</sup>XT Precast Gel (4-12% Bis-Tris) der Firma BIO-RAD aufgetragen. Neben den Proteinextrakten wurden auch 10 µl eines zweifarbigen und aus 10 Proteinbanden von 10-250 kD bestehenden Precision Plus Protein<sup>TM</sup>



Standards der Firma BIO-RAD aufgetragen. Während der Elektrophorese wurden für 60 Minuten (zur besseren Auftrennung für manche Proteine über Nacht bei 4°C) eine Spannung von 200 V und eine Stromstärke von 90 mA während der Elektrophorese angelegt. Als Laufpuffer wurde ein verdünnter 20x XT MES Running Buffer für „mittelgroße“ Proteine der Firma BIO-RAD verwendet.

### 3.1.4 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Um Aufschluss darüber zu erlangen, ob die Auftrennung der Proteine während der Gelelektrophorese erfolgreich war und des Weiteren, um optisch kontrollieren zu können, ob die aufgetragenen Proteinkonzentrationen in den einzelnen Gruppen gleich groß waren, aber auch, um sicherzustellen, dass der Proteintransfer vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgreich war, wurde das Proteingel über Nacht mit einer 1x Coomassie Brilliant Blue-Lösung gefärbt. Nach 4-stündiger Inkubation in Entfärbelösung konnte das Gel für mehrere Tage in einer 7%igen Essigsäurelösung aufbewahrt werden. Der Vakuumgeltrockner der Firma Biometra ermöglichte die Trocknung des Gels zur Langzeitaufbewahrung.

#### **5x Coomassie Brilliant Blue Färbelösung:**

(0,25% Coomassie; 10% Eisessig; 45% Methanol)

0,25 g Coomassie Brilliant Blue r250

90 ml Methanol: a. dest. (1:1)

10 ml Eisessig

Lösung durch Whatmanfilter filtrieren.

#### **Entfärbelösung:**

(45% Methanol; 10% Eisessig)

45 ml Ampuwa

45 ml Methanol

10 ml Eisessig

### 3.1.5 „Semi dry“ Blot des SDS-Gels

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran übertragen (Towbin et al. 1979, Towbin et al. 1989). Hierzu wurde das Gel entnommen und auf eine Protean<sup>®</sup> Nitrozellulose-Membran (Schleicher & Schnell BioScience GmbH, Dassel, Germany) gelegt. Unter die Membran und auf das Gel wurden im Semi-dry-Blotter (Biomerta) jeweils drei Lagen Filterpapier gelegt, nachdem sie zuvor für mindestens 15 Minuten in Transferpuffer eingeweicht worden waren. Mit einem Glasstab wurden bei der Schichtung entstandene Luftblasen aus

dem Filterpapier ausgerollt und anschließend wurde das Filterpapier nochmals mit Transferpuffer angefeuchtet.

Der Transfer auf die Membran erfolgte mit Wasser gekühlt, bei  $5 \text{ mA/cm}^2$  für 15 Minuten. Um einen erfolgreichen Proteintransfer vom Gel auf die Membran zu überprüfen, und um das Ausmaß einer möglichen Blasenbildung beurteilen zu können, wurde die Membran für 10 Minuten in Ponceau-S Lösung gefärbt und anschließend mit destilliertem Wasser so lange gespült, bis die angefärbten Proteinbanden sichtbar wurden (Abb. 3.1).

**Ponceau-S Lösung:**

(0,1% Ponceau-S; 1% Essigsäure)

1 g Ponceau-S

10 ml Eisessig

mit a. dest. auf 1000 ml auffüllen.

**Transferpuffer:**

(25 mM Tris; 150 mM Glycin; 10% Methanol)

25 ml Tris

11,26 g Glycin

100 ml Methanol

mit a. dest. auf 1000 ml auffüllen.

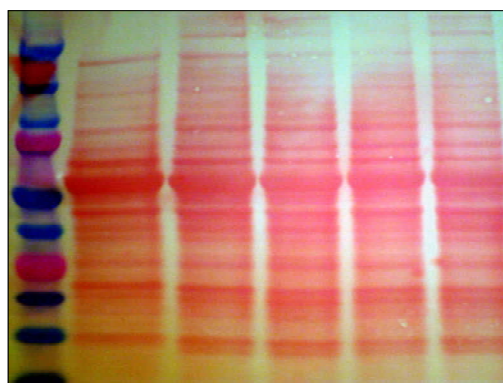
**Blocking-Buffer:**

(5% BSA; PBS- Tween)

20 ml PBS- 0,05% Tween20

1 g BSA

Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran anschließend bei  $4^\circ\text{C}$  unter Bewegung für eine Stunde mit Blocking-Buffer (Hauri und Bucher 1986) inkubiert. Hierbei wurde die Membran wieder entfärbt und unspezifische Bindungsstellen wurden blockiert.



**Abb. 3.1:** „Semy dry Blot“ gefärbt mit Ponceau S. Precision Plus Protein<sup>TM</sup>-Standard (10-250 kD) und gefärbte Proteinbanden.

### 3.1.6 Antikörperinkubation

Nach dem Blocken der Membran wurde sie zunächst bei 4°C unter leichter Bewegung 1x15 und 2x10 Minuten in PBS gewaschen. Danach erfolgte die Inkubation mit dem ersten Antikörper (Primärantikörper von Aktin und dem Zielprotein) bei 4°C über Nacht. Die Antikörper wurden nach Herstellerangaben mit PBS verdünnt.

#### **PBS (pH 7,4) Waschpuffer:**

(80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl, 0,05% Tween20 )

11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (Dinatriumhydrogenphosphat)

2,96 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (Natriumdihydrogenphosphat)

5,84 g NaCl (Natriumchlorid)

500 µl Tween20

mit a. dest. auf 1000 ml auffüllen.

#### **PBS (pH 7,4) (zur Verdünnung):**

(80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 100 mM NaCl)

11,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

2,96 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

5,84 g NaCl

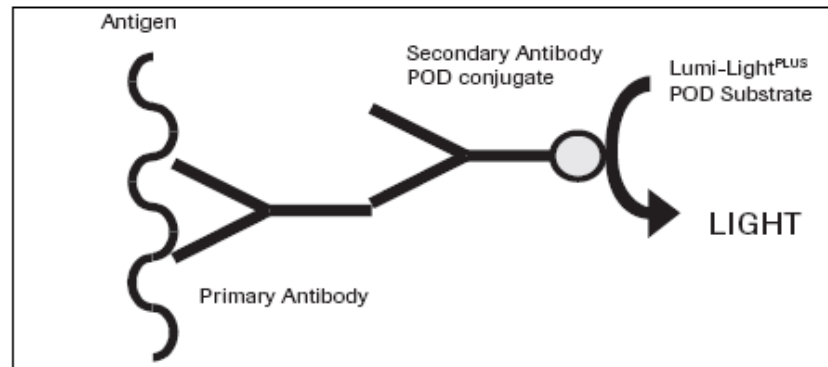
mit a. dest. auf 1000 ml auffüllen.

Nach 12 Stunden wurde die Membran erneut 1x15 und 2x5 Minuten mit PBS gewaschen, bevor sie mit dem zweiten Antikörper (Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter Antikörper gegen die Spezies des Primärantikörpers) für eine Stunde inkubiert wurde.

Nach der Inkubation mit dem Sekundärantikörper wurde die Membran 10x5 Minuten mit PBS-Tween gewaschen.

### 3.1.7 Proteinnachweis durch das Lumi-Light System

Zur Detektion der Proteine im Western-Blot wurde das Lumi-Light<sup>PLUS</sup> System der Firma Roche Diagnostics GmbH Mannheim verwendet. Dieses System beruht auf der Kopplung einer Peroxidase an den sekundären Antikörper (Abb. 3.2), welche das zugegebene POD Substrat umsetzte. Die hierbei entstehende Lumineszenz konnte nun mit Hilfe eines Lumineszenzimagers (Fluorchem<sup>TM</sup> luminescent imager, Alpha Innotech, CA, USA) detektiert werden.



**Abb. 3.2:** Prinzip der Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Detektion (übernommen aus Herstellerinformationen).

Bei diesem System wird kurz vor der Detektion eine 1:1 Mischung der „Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Luminol/ Enhancer Solution“ und der „Lumi-Light<sup>PLUS</sup> Stable Peroxide Solution“ je nach Oberflächengröße des Blots gemischt. Nach 15 Minuten Inkubationszeit in dieser Detektionslösung konnte die Lumineszenz mit einer entsprechenden Kamera detektiert und mit Hilfe eines Computerprogramms als digitales Bild festgehalten werden.

### 3.1.8 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Zur quantitativen Auswertung der spezifisch gefärbten Proteinbanden der Western Blots wurden die optisch festgehaltenen Proteinbanden mit Hilfe eines Bildanalyseprogramms (IMAGEJ 1.33u, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) densitometrisch ausgewertet. Hierbei wurde für jede Proteinbande, je nach Ausmaß der Färbeintensität, durch das Programm ImageJ ein Durchschnittsgrauwert zwischen 0 (weiss) und 240 (schwarz) berechnet. Dies wurde sowohl für die Proteinbande des Zielproteins, als auch für die Bande des Kontrollproteins (Aktin) eines repräsentativen Westernblots durchgeführt. Der schließlich grafisch dargestellte Wert ergab sich aus der Division der Messwerte von Zielprotein und Aktin. Bei dieser Art der Auswertung wurden somit inhomogen aufgetragene Proteinmengen berücksichtigt. War die Färbeintensität der Banden des Kontrollproteins nicht bei allen zu vergleichenden Behandlungsgruppen gleich ausgeprägt, so fand dies in der Auswertung Berücksichtigung. Die so berechneten densitometrischen Werte standen in direktem Verhältnis zur Proteinexpression des Zielproteins im untersuchten Gewebe.

## 3.2 Histologie

### 3.2.1 Dehydrierung, Fixierung und Einbettung der Gewebe

Für die Anfertigung von Gewebeschnitten wurden die Gewebe zunächst dehydriert. Dieser Wasserentzug erfolgte stufenweise, um Zerstörungen des Gewebes zu vermeiden.

Im ersten Schritt wurde das Gewebe mit einer 4%igen Formalinlösung fixiert und in den folgenden Schritten mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe bis zu 100% Ethanol dehydriert.

#### **4%ige gepufferte Formalinlösung**

4 g	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
6,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
100 ml	Formalin (35%ig)
900 ml	a. dest.

Das Diffusionsgefälle zwischen Wasser und Ethanol führte dazu, dass das Wasser durch das umgebende Ethanol aus den Zellen herausdiffundiert. Durch die aufsteigende Alkoholreihe wurde die Wasserkonzentration in den Zellen schrittweise reduziert und durch Alkohol ersetzt, bis die Zellen vollständig mit Ethanol gefüllt waren.

Im nächsten Schritt erfolgte die Paraffineinbettung, wobei die dehydrierten Gewebe mit 60°C warmem Paraffin durchtränkt wurden.

Dehydrierung und Einbettung des Gewebes erfolgten mit Hilfe eines Einbettautomaten (Miles Scientific: Tissue Tek VIP 2000, Naperville, IL, USA). Dieser Automat führte die beschriebenen Teilschritte innerhalb von 12,5 Stunden im Einkammerverfahren durch. Bei diesem Verfahren verblieb das Gewebe permanent in einem Behälter, in dem nur die verschiedenen Flüssigkeiten ausgetauscht wurden. Beginnend mit der Einfüllung einer 4%igen Formollösung (pH 7) über eine anschließende aufsteigende Alkoholreihe (70-100%) und Xylol wurde das Gewebe schließlich nach mehreren Paraffinspülungen vollständig mit Paraffin durchtränkt.

### 3.2.2 Ausgießen und Ausrichten des Gewebes

Im nächsten Schritt wurden die paraffinierten Gewebestücke in Ausgießförmchen (Polysciences, Warrington, USA) ausgegossen. Hierbei wurden sie je nach gewünschter Schnittorientierung senkrecht (für Querschnitte) oder waagrecht (für Längsschnitte) orientiert. Um Riss- und Blasenbildungen der Paraffinblöcke zu vermeiden, wurde das Paraffin auf einer Kühlplatte zur schnellen Aushärtung gebracht. Eingebettet in Paraffin konnten die Gewebestücke für einen unbegrenzten Zeitraum bei Raumtemperaturen gelagert werden. Das Ausgießen und Härten der Paraffinblöcke erfolgte mit Hilfe einer Ausgießstation (Ames Company, GB). Die Form der Ausgießförmchen war so gestaltet, dass die entstehenden Paraffinblöcke nach ihrer Aushärtung ohne weitere Arbeitsschritte schnittbereit für die Einspannung in ein Paraffin-Mikrotom waren.

### 3.2.3 Erstellen von Paraffinschnitten

Um von den Paraffinblöcken geeignete Schnitte anfertigen zu können, wurden sie zunächst auf einer Kühlplatte abgekühlt, wodurch das Paraffin eine für den Schneidevorgang optimale Festigkeit erhalten sollte. Hierfür erwies sich eine Lagerung der Blöcke für 10-15 Minuten auf der Kühlplatte bei  $-5^{\circ}\text{C}$  als optimal. Zur Herstellung von Schnittpräparaten in einer Dicke von  $7\ \mu\text{m}$  wurde ein Mikrotom verwendet. Präparat und Schnittmesser sind bei diesem Präzisionsgerät gegeneinander beweglich fest eingespannt. Das hier verwendete Mikrotom der Firma Reichert-Jung war ein Rotationsmikrotom. Bei diesem Modell war die Anschnittfläche dem Bedienenden gegenübergelegen. Das Präparat war fest im Objekthalter eingespannt und wurde an einem fest stehenden Messer vorbeigeführt. Der Vorschub des Präparats war zwischen 0 und  $35\ \mu\text{m}$  pro Umdrehung einstellbar und mit der entstehenden Schnittdicke gleichzusetzen. Um eine optimale Qualität der Schnitte zu erreichen, sollte die Schnittdicke möglichst klein sein. Dabei war jedoch darauf zu achten, dass die Gewebeschnitte zusammenhängend waren und beim Schneiden nicht gestaucht wurden. So wurden für die in dieser Arbeit untersuchten Gewebe Schnittdicken von  $5\text{-}10\ \mu\text{m}$  erreicht.

### 3.2.4 Aufziehen der Paraffinschnitte

Für den weiteren Untersuchungsverlauf wurden die instabilen Paraffindünnschnitte mit Hilfe der Warmwassermethode auf Objektträgern fixiert. Bei den verwendeten Objektträgern „Superfrost plus“ handelte es sich um 25x75x1mm große, geputzte und geschliffene Objektträger mit einer speziell haftunterstützenden Oberfläche und einem mattierten Schriftfeld (Menzel-Gläser, Hilden, D).

Die 5-10 µm dicken Schnitte wurden nun für 30 Minuten auf einer Heizplatte (Strecktisch) bei 30-35°C gestreckt. Durch die Erwärmung des Wassers und des Paraffins wurde eine Glättung des leicht gestauchten Schnittes erreicht. Nun wurden die Schnittpräparate zur Trocknung und Fixierung auf den Objektträgern in einer Glasküvette über Nacht in einem 37°C warmen Ofen (Heraeus Elektronik, Hanau, D) gelagert. Auf diese Weise wurden jeweils zwei Schnitte auf einem Objektträger fixiert. Dies ermöglichte im weiteren Untersuchungsverlauf einen direkten Vergleich von identischen Zellarealen anhand der nebeneinander liegenden Serienschnitte auf dem Objektträger.

### 3.2.5 Entparaffinieren und Autoklavieren der Schnitte

Nach dem Aufziehen der Schnitte konnte mit ihrer Vorbereitung auf immunhistochemische Nachweisverfahren und auf Gewebefärbungen fortgefahren werden. Hierzu mussten die Schnitte zunächst entparaffiniert und anschließend autoklaviert werden. Um die noch paraffinierten Gewebeschnitte wieder zu entparaffinieren und zu rehydrieren, wurden die Schnitte nach einem vorgegebenen Protokoll mit Hilfe von Xylol (Mallinckrodt Baker, Deventer, NL) und einer absteigenden Alkoholreihe in vorbereiteten Glasküvetten 65 Minuten lang entparaffiniert, nachdem sie zuvor bei 60°C für 30 Minuten erwärmt worden waren:

1. Xylol I	15 Minuten
2. Xylol II	10 Minuten
3. Xylol III	10 Minuten
4. Ethanol 100% I	5 Minuten
5. Ethanol 100% II	5 Minuten
6. Ethanol 96% I	5 Minuten
7. Ethanol 96% II	5 Minuten
8. Ethanol 70% I	5 Minuten
9. Ethanol 70% II	5 Minuten

Abschließend erfolgte noch eine fünfminütige Spülung in destilliertem Wasser, so dass die auf den Objektträgern befindlichen Schnitte nun in entparaffiniertem und rehydriertem Zustand vorlagen. Nach diesem Schritt konnten die Schnitte, eingelegt in destilliertem Wasser, über Nacht gelagert werden.

Im nächsten Schritt wurden die Schnitte auf den Objektträgern in einem 10 mM Citratpuffer autoklaviert.

**10 mM Citratpuffer (pH 6):**

9 ml	0,1M Citronensäure-Lösung (19,21 g $C_6H_8O_7$ in 1000 ml a.d.)
41 ml	0,1M Natrium-Citrat-Lösung (29,41 g $C_6H_5O_7Na_3 \times 2H_2O$ in 1000 ml a.d.)
450 ml	a. dest.

Die Behandlung der Schnitte im Autoklav beeinflusste die Sensitivität des Gewebes positiv und verhinderte ein Abschwimmen der Schnitte in weiteren Arbeitsschritten (Bier et al. 1995, Iwamura et al. 1994). Die hohe Temperatur in Verbindung mit dem hohen Druck demaskierte außerdem die Oberfläche des Gewebes, wobei das Gewebe erhalten blieb, die Formalinvernetzung jedoch aufgebrochen wurde. Hierbei wurden bei der Formalinfixierung entstandene Methylbrücken aufgelöst, die durch Quervernetzungen entstanden und zu Veränderungen der Proteinstruktur und somit zu einer Verdeckung der Epitope führten (Bourne). Der Vorgang des Autoklavierens ermöglichte also eine deutlich verbesserte Antigen-Antikörper-Reaktion durch die beschriebene Epitop-Demaskierung (Luttmann et al. 2004).

Der für diese Versuche zur Verfügung stehende Stand-Autoklav (Tuttnauer, 387 ELV, Jerusalem IL) stellte ein Programm zur Verfügung, welches eine Behandlung bei 121°C und 2 bar für 10 Minuten ermöglichte. Der Temperatur- und Druckanstieg erfolgte stufenweise in einem Zeitraum von 100 Minuten bis zur Abkühlung auf ca. 50°C. Anschließend wurden die Schnitte, im Citratpuffer verbleibend, für 30 Minuten bei Raumtemperatur weiter abgekühlt. Im letzten Schritt wurden die Objektträger aus dem Citratpuffer entnommen und 2x10 Minuten in 1x PBS-Waschpuffer (siehe 3.1.6) gewaschen. Auch alle weiteren Waschgänge wurden mit diesem Waschpuffer durchgeführt.



### 3.2.6 Immundetektion

Im Anschluss an die vorbereitenden Schritte Entparaffinierung, Rehydrierung und Epitop-Demaskierung folgte die eigentliche Immundetektion. Ziel immunhistochemischer Techniken sind Nachweis und Identifikation antigener Komponenten (Epitope) in Zellen und Gewebeschnitten durch spezifische Antikörper, die z.B. über Fluoreszenzfarbstoffe, oder durch enzymatische Reaktionen visualisierbar sind (Romeis 1989, Luttmann et al. 2004).

Für die *in situ*-Immunlokalisationen dieser Arbeit wurde ein Verfahren zur indirekten Antigenmarkierung verwendet, wobei ein spezies-spezifischer, gelabelter Sekundärantikörper an den „nackten“ antigenspezifischen Primärantikörper gebunden wurde. Zur Visualisierung der Antigen-Antikörper-Komplexe wurden (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Komplexe ((S)ABC) an den Sekundärantikörper gebunden und nach der Zugabe des Substrates 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) wurde dessen Umsatz durch eine Meerrettich-Peroxidase katalysiert (Hsu und Soban 1982). Das Produkt dieser katalysierten Reaktion konnte schließlich mittels lichtmikroskopischer Methoden detektiert werden.

Zunächst wurden hierzu die Gewebeschnitte auf den Objektträgern mit einem hydrophoben PAP-Pen Markierstift (Polysciences, Warrington, USA) als Flüssigkeitsbarriere umrandet, um im Folgenden nicht die gesamte Oberfläche des Objektträgers in die einzelnen Behandlungs- und Waschschrte mit einbeziehen zu müssen.

Da für die immunhistochemischen Untersuchungen in dieser Arbeit die beschriebenen Enzym-Markierungen zum Antigennachweis Verwendung fanden, mussten evtl. im Präparat vorhandene endogene Enzyme (endogene Peroxidasen) bedacht werden, da diese zur Gesamtumsetzung des Substrats beitragen und dadurch falsch positive Ergebnisse erzeugen (Luttmann et al. 2003). Hierzu wurden die Schnitte für 20 Minuten mit einer Methanol/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösung behandelt.

#### **Hemmung der endogenen Peroxidase:**

20 ml Methanol  
4500 µl a. dest.  
500 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)

Bevor es zur Aufschließung der Zellen kam, folgten zunächst zwei Waschschrte in PBS. Die Perforation der Zell- und Kernmembranen sollte die „Paratop-Epitop-

Findung“ ermöglichen oder vereinfachen. Hierzu folgte eine Inkubation der Gewebeschnitte mit einer Ammoniumchlorid/TritonX-Lösung für 10 Minuten.

**„Aufschließen“ der Zellen:**

(0,5 M Ammoniumchlorid + 0,25% Triton X/PBS)

0,59 g Ammoniumchlorid

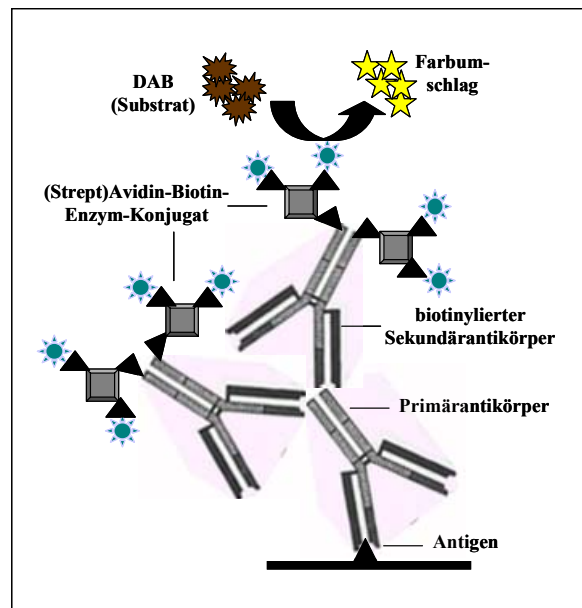
50 µl Triton X

20 ml PBS

Im Anschluss folgten erneut zwei Waschschrte in PBS und die Blockierung potentieller unspezifischer Antikörperbindestellen mit einer Block-Lösung für eine Stunde (5% BSA (Rinderalbumin) in PBS). Nach dieser einstündigen Blockierung unspezifischer Bindungsstellen war die Vorbehandlung der Präparate abgeschlossen und es konnte mit der eigentlichen Immundetektion begonnen werden.

Zunächst kam es zur Inkubation des Gewebes mit dem gewünschten Primärantikörper (Tab. 2.1), verdünnt in 0,8% BSA/PBS-Lösung bei 4°C über Nacht. Diese lange Inkubationsphase erfolgte in einer feuchten Kammer, um die Austrocknung des Präparates und hieraus resultierende verstärkte Hintergrundfärbungen zu vermeiden. Es folgten drei Waschschrte in PBS und die Inkubation mit dem spezies-spezifischen biotonylierten Sekundärantikörper (Tab. 2.1). Der Sekundärantikörper wurde in PBS verdünnt und das Präparat wurde für eine Stunde mit dieser Lösung inkubiert. Im Anschluss an vier Waschschrte in PBS folgte die Inkubation mit dem Meerrettich-Peroxidase-Komplex (ECL Streptavidin biotinylated Horseradish Peroxidase complex, Amersham Biosciences, Freiburg, Germany) in PBS für eine Stunde.

Nach diesem Schritt war das für die Immundetektion notwendige Konstrukt von Antikörpern und gekoppelten Enzymlabeln (Abb. 3.3) vollständig.



**Abb. 3.3:** Immundetektion (mit (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, biotinylierten Sekundärantikörpern und 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)) (nach Luttmann et al. 2004).

Im letzten Schritt folgte nun nach vier Waschschritten in PBS die Zugabe des umzusetzenden Substrates. Als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase wurde eine Lösung mit 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB) in Phosphatpuffer (PB) verwendet.

#### **1 M Phosphatpuffer (PB) (pH 7,4)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O 14,4g  
 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·xH<sub>2</sub>O 2,6g  
 mit a. dest. auf 1000 ml auffüllen.

#### **DAB-Lösung:**

[15 ml 0,1M PB (pH 7,4)]  
 150 µl DAB-Lösung (=7,5 mg)  
 150 µl NH<sub>4</sub>Cl (=6,0 mg)  
 300 µl NiSO<sub>4</sub> (=0,05 M)  
 300 µl 10%ige Glucose  
 50 µl Glucoseoxidase

#### **Stammlösungen der Substanzen für die DAB-Entwicklung:**

DAB: 5000 mg/100 ml a. dest.  
 NH<sub>4</sub>Cl 4000 mg/100 ml a. dest.  
 NiSO<sub>4</sub>·6 H<sub>2</sub>O 130 mg/ 10 ml a. dest.  
 10 % Glucose 1g β-D-Glucose/ 10 ml a. dest.  
 Glucose-Oxidase 1,2 mg/ 1 ml a. dest.

Im Hinblick auf die Auswertung und die Aussagekraft des Ergebnisses war in diesem Schritt ganz besonders darauf zu achten, dass die Katalysezeit, also die Verweildauer

des Substrates auf dem Gewebeschnitt für sämtliche Präparate eines Laufs identisch war.

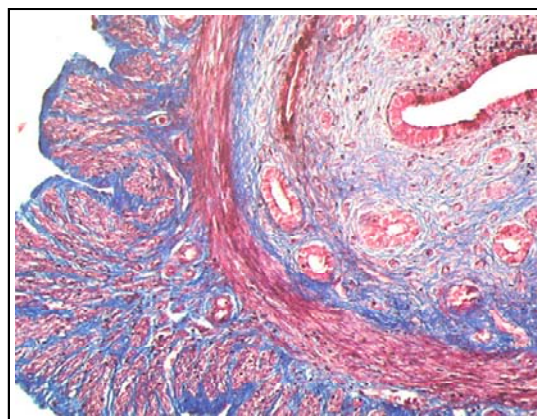
Die Katalyse wurde unter dem Lichtmikroskop verfolgt und bei Erreichung einer ausreichenden Farbtintensität durch Abklopfen der Substratlösung und Waschung in destilliertem Wasser abgestoppt. Schließlich wurde das Präparat mit einer aufsteigenden Alkoholreihe wieder dehydriert und mit dem Eindeckmedium Entellan (Merck, Darmstadt) unter einem Deckgläschen auf dem Objektträger fixiert.

**Aufsteigende Alkoholreihe zur Dehydrierung:**

2x2 min. spülen in 70% Ethanol  
2x2 min. spülen in 96% Ethanol  
2x2 min. spülen in 100% Ethanol  
2 min. Xylol

### **3.2.7 Azan-Bindegewebefärbung nach Heidenhain**

Um die Uterusepithelhöhen der unterschiedlichen Behandlungsgruppen vermessen und vergleichend auswerten zu können, wurden die Uteri der Tiere zunächst präpariert, fixiert, geschnitten, entparaffiniert (siehe 3.2.1 bis 3.2.5) und anschließend die einzelnen Gewebestrukturen angefärbt. Hierzu wurde eine Azan-Bindegewebsfärbung (Hagemann und Rosenmund 1989) gewählt. Die Färbelösung Anilinblau-Orange G färbte hierbei Strukturen wie Kollagen, bindegewebiges Hyalin und basophiles Zytoplasma blau, während durch Azokarmin Zellkerne, Erythrozyten, acidophiles Zytoplasma, Fibrin und epitheliales Hyalin rot gefärbt wurden (Luttmann et al. 2003). Somit führte diese Färbung in Gewebeschnitten von Uteri zu einer deutlichen Abgrenzung von Epithel und angrenzendem Bindegewebe, was eine genaue Epithelhöhenvermessung ermöglichte (Abb. 3.4).



**Abb. 3.4:** Azan-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Uterusquerschnitts. Vergrößerung: 100x.

Die entparaffinierten Gewebepreparate wurden zunächst in einer auf 56°C vorgewärmten Azokarminfarblösung für 15 Minuten gefärbt.

**Azokarminfärbelösung**

Azokarmin G      0,5 g  
Essigsäure (96%) 0,5 ml  
(in 100 ml a. dest. auflösen, aufkochen und filtrieren)

Im Anschluss wurden die Präparate für zwei Minuten in destilliertes Wasser getaucht und geschwenkt. Im nächsten Schritt folgte für 10 Minuten die Beizung der Bindegewebe in 5%iger Phosphorwolframsäure. Nach erneutem Waschen in destilliertem Wasser folgte für 15 Minuten ein zweiter Färbeschritt in einer 1x Anilinblau-Orange G Färbelösung.

**3x Anilinblau-Orange G Färbelösung**

Anilinblau          0,5 g  
Orange G            2 g  
Essigsäure (96%) 8 ml  
(in 100 ml a. dest. auflösen, aufkochen und filtrieren)

Nach dem zweiten Färbeschritt folgten ein weiterer Waschschriff, eine Entwässerungsreihe und die Eindeckung der Präparate mit Enthelan (siehe 3.2.6).

### **3.2.8 Epithelhöhenvermessung**

Die Epithelhöhen in der Vagina und im Uterus stellen neben dem Uterusfeuchtgewicht einen zuverlässigen Indikator für die estrogene Wirksamkeit von Substanzen dar, die in uterotrophen Assays (Odum et al. 1997, Diel et al. 2002, Tinwell und Ashby 2004) an ovariectomierten Ratten untersucht werden können (Diel et al. 2004c).

Für die Epithelhöhenvermessungen in dieser Arbeit wurden die Uteri zunächst einer Azan-Bindegewebsfärbung unterzogen (siehe 3.2.7). Anschließend wurden digitale Bilder der Uterusquerschnitte angefertigt. Hierzu wurden repräsentative und morphologisch intakte Areale der quergeschnittenen und gefärbten Uterusepithelien ausgewählt und bei einer 100fachen Vergrößerung bildlich festgehalten (Abb. 3.4). Diese Bilder wurden nun mit einem Bildanalyseprogramm (ImageJ 1.33u, National Institute of Health, USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) bearbeitet, wobei in jedem Uterusquerschnitt 20 beliebig ausgewählte Punkte des Uterusepithels vermessen wurden. Für eine Behandlungsgruppengröße von sechs Tieren erhielt man somit einen aus 120 Messwerten bestehenden mittleren Wert für die Epithelhöhe einer mit

einer spezifischen Substanz behandelten Versuchsgruppe, welcher sich statistisch auswerten und mit anderen Werten vergleichen ließ.

### **3.2.9 Bildliche Dokumentation der behandelten Schnittpräparate**

Die bildliche Dokumentation der Ergebnisse der *in situ*-Immunlokalisation und der Azan-Bindegewebsfärbung wurde mit einem Mikroskop der Firma Zeiss mit der Modellbezeichnung Axiophot durchgeführt, welches an eine digitale Kamera (Sony, 3CCD, Japan) und einen Computer (PC PIII, 450 MHz) angeschlossen war. Mit Hilfe dieser Gerätschaften war es möglich, unmittelbar nach der Eindeckung der Präparate die Färbeargebnisse festzuhalten. Hierbei war im Hinblick auf die weitere Auswertung besonders darauf zu achten, dass sämtliche Bilder eines Versuchs mit identischer Vergrößerung und Belichtung aufgenommen und mit identischen Bildeinstellungen abgespeichert wurden.

### **3.3 Knochendichtemessungen mittels pQCT**

Zur Untersuchung der Einflüsse von Estrogenen und estrogen wirksamen Substanzen auf Knochenhomöostase und –metabolismus wurden in den Untersuchungen dieser Arbeit die trabekuläre und die kortikale Knochendichte in der Tibia von Ratten bestimmt. Die Knochendichtemessungen erfolgten mittels pQCT (peripherer quantitativer Computertomographie). Hierbei kam ein Kleintiercomputertomograph (XCT Research SA+, Stratec Medizintechnik GmbH, Pforzheim) (Abb. 3.5A) und die entsprechende Software (V 5.50) zum Einsatz. Die Strahlenquelle besaß eine Gammaenergie von 48-50 kV und wurde von einer Halbleiterdetektoreinheit mit Vorverstärker und zwölf Detektoreinheiten detektiert. Die zu vermessenden Schnittebenen waren zwischen 0,12-0,7mm einstellbar.

Bei den Knochendichtemessungen dieser Arbeit wurde die rechte Tibia der Ratten ausgewählt. Für die *in vivo* Messungen wurden die Ratten zunächst betäubt (siehe 2.6). Nun wurde mit Hilfe einer digitalen Schieblehre die Länge der rechten Tibia bei angewinkeltem Kniegelenk und angezogenem Fuß bestimmt und anschließend wurden die Tiere mit Klebeband auf der Haltevorrichtung des CTs in der Messposition fixiert (Abb. 3.5A).



**Abb. 3.5:** *In vivo* Messung der Knochendichte in der Tibia von Ratten (A). Auszuwertende Querschnittsbilder der vermessenen Schnittebenen (B).

Zur Lokalisation des Messortes erfolgte zunächst ein „Übersichtsscan“ im Bereich des proximalen Femurs bis zum distalen Bereich der Tibia im antero-posterioren Strahlengang in 1mm Schritten. Zur Standardisierung und besseren Reproduzierbarkeit der Messungen wurden nun anhand des bei der Übersichtsmessung erstellten Bildes die Messebenen ausgerichtet. Hierbei wurde die „Basislinie“ so im Bereich des Kniegelenkspaltes orientiert, dass sie am proximalen Endpunkt der Tibia lag. Anhand der Orientierung dieser „Basislinie“ und der Angabe der zuvor gemessenen Länge der Tibia konnten nun reliable Messungen in definierten Messebenen durchgeführt werden. Somit konnten für jedes Tier Messebenen im proximalen trabekulären Bereich des Knochens bei 7 und 7,5% und im kortikalen Bereich bei 50% der Tibialänge festgelegt werden. In der nun folgenden eigentlichen Messung rotierten nun Strahlenquelle und Detektoreinheit in 15 Winkelschritten mit entsprechend definierten Winkelabständen um die Schnittebenen. Die Vermessung der drei Schnittebenen ( bei 7, 7,5 und 50% der Tibialänge) dauerte ca. 20 Minuten. Nach der Messung wurde nun in den erstellten Querschnittsbildern (Abb. 3.5B) der gewünschten Schnittebenen, die neben der Tibia u.a. auch die Fibula und den M. gastrocnemius enthielten, eine kreisförmige ROI (region of interest) um die Tibia festgelegt. Ein Schwellenwertprogramm definierte anschließend die Tibia-kontur, um dann konzentrisch den nicht zur Tibia gehörenden Bildinhalt rechnerisch zu eliminieren. Schließlich gab das Programm nach der Auswertung der ROIs u.a. die Knochendichte von trabekulärem und kortikalem Knochen getrennt als linearen Schwächungskoeffizienten ( $1/\text{cm}$ ) und als Mineralwert in  $\text{mg}/\text{cm}^3$  an.

Für den proximalen trabekulären Bereich der Tibia wurden zwei Messungen in kurzem Abstand bei 7 und 7,5% durchgeführt, da der trabekuläre Knochen aufgrund seiner, im Vergleich zum kortikalen Knochen, hohen Stoffwechselaktivität Knochendichteschwankungen ausgesetzt ist. Um die hierdurch bedingt eingeschränkte Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit zu optimieren, wurden zwei Messungen für jeden Knochen in diesem Bereich durchgeführt und für die zwei erzielten Werte der trabekulären Knochendichte wurde schließlich der Mittelwert gebildet.

### 3.4 Dokumentation des Bewegungsantriebs

Bestandteil von drei Tierversuchen dieser Arbeit war der Einfluss von hormonell wirksamen Substanzen auf den Bewegungsantrieb von ovariectomierten bzw. SHAM-operierten weiblichen Wistar Ratten. Für diese Untersuchungen standen 20 Laufräder zur Verfügung. Bei diesen Laufrädern (Abb. 3.6) handelte es sich um Spezialanfertigungen der Feinmechanikwerkstatt der Deutschen Sporthochschule Köln. Die Laufräder ( $\varnothing$  31,83 cm) waren für die Nutzung von Ratten konzipiert worden und über einen entsprechenden Zugang an einen Einzelkäfig angeschlossen. Außerdem konnte mit Hilfe eines angeschlossenen Computers über den gesamten Versuchszeitraum von drei bzw. zwölf Wochen, die von den nachtaktiven Nagern zurückgelegte Laufdistanz gemessen und festgehalten werden. Die Laufaktivität wurde somit über den gesamten Versuchszeitraum ununterbrochen für jedes Versuchstier individuell ermittelt.

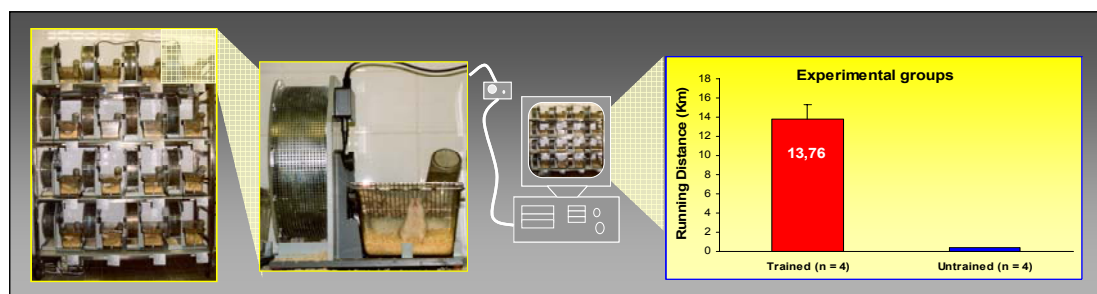


Abb. 3.6: Messapparatur zur Dokumentation des Bewegungsantriebs.



### **3.5 Quantitative Bestimmung der Proliferationsrate im Uterusepithel**

Um eine quantitative Aussage über die Proliferationsrate von Uterusepithelzellen treffen zu können, wurden zunächst Uterusquerschnitte angefertigt (siehe 3.2.3) und einer immunhistochemischen PCNA Färbung unterzogen (siehe 3.2.6). Bei dieser PCNA Färbung handelte es sich um eine immunologische Detektion eines Proliferationsmarkers, der im Zellkern teilungsaktiver Zellen anzutreffen ist. Anhand dieser Kernfärbung eines Proliferationsmarkers konnte nun die Zahl PCNA-positiver Zellen aus einer beliebigen Folge von 20 Zellen des Uterusepithels verschiedener Tiere bestimmt werden. Bei jedem Tier wurden drei Areale mit je 20 Zellen prozentual ausgewertet und gemittelt. Für jede Behandlungsgruppe konnte somit ein Mittelwert prozentual PCNA-positiver Zellen ermittelt und statistisch ausgewertet werden.

### **3.6 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration in Futter und Blutserum**

Die Bestimmung der Phytoestrogenkonzentrationen in den verwendeten Diäten und in den verschiedenen Plasmaproben wurden am Institut für Arbeitsphysiologie der Universität Dortmund (IFADO) in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. G. H. Degen durchgeführt. Hierzu wurde die Methode der HPLC (high performance liquid chromatographie) angewandt.

#### **3.6.1 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration im Futter**

Zur Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration in den verwendeten Nagerdiäten (PAD und PRD) wurden Proben dieser beiden Diäten zerkleinert, homogenisiert und hydrolysiert. Anschließend wurde in einer Dreifachbestimmung der Gehalt von GEN und DAI in beiden Probensorten mit Hilfe der Methode der HPLC ermittelt (Degen et al. 2002b, Hertrampf et al. 2006). Die untere Nachweisgrenze (LOD, limit of detection) dieser Phytoestrogene in den Diäten lag hier bei 10 µg Isoflavon/g Diät.

### 3.6.2 Bestimmung der Phytoestrogenkonzentration im Blutplasma

Am Ende des Versuchszeitraumes wurde den Tieren venöses Blut entnommen. Die heparinisierten Blutproben (n=5-6 pro Gruppe) wurden unmittelbar nach der Entnahme zentrifugiert und das gewonnene Blutplasma wurde schließlich bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert. Die Plasmakonzentrationen von DAI und GEN wurden nach der Methode der HPLC (Janning et al. 2000, Degen et al. 2002a, Degen et al. 2002b, Hertrampf et al. 2006) bestimmt. Hierzu wurden zunächst die Konjugate (Glukuronid und Sulfat) einer enzymatischen Hydrolyse unterzogen und schließlich die isolierten Isoflavonaglykone extrahiert und quantitativ bestimmt. Die untere Nachweisgrenze (LOD) für GEN und DAI lag hier bei 20 ng/ml Plasma.

### 3.7 Statistik

Die graphische und tabellarische Darstellung der Ergebnisse wurde mit dem Programm Excel 2003 der Firma Microsoft® erstellt. Die in den Abbildungen und Tabellen dargestellten Ergebnisse geben arithmetische Mittelwerte mit Standardabweichungen wieder.

Die Nullhypothese wurde mithilfe des Rangtestes für unabhängige Stichproben von Mann und Whitney (Mann-Whitney U Test) geprüft.

Zur Berechnung der Prüfgröße  $U$  wurden alle Werte beider Stichproben in einer aufsteigenden Reihe sortiert und jedem Wert wurde eine Rangzahl zugewiesen. Der größte Wert erhielt die höchste Rangzahl. Die sich ergebenden Rangzahlen der Einzelwerte wurden den jeweiligen Stichproben zugeordnet und addiert. Die Summe der auf Stichprobe 1 entfallenden Rangzahlen wurde 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 musste 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 wurde 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 wurde das Signifikanzniveau durch die folgenden Symbole veranschaulicht:

$p < 0.05$	*/+	leicht signifikant
$p < 0.01$	**/++	signifikant
$p < 0.001$	***/+++	hochsignifikant

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Einflüsse von Genistein auf die Zellproliferation und die gewebespezifische Expression verschiedener estrogensensitiver Gene**

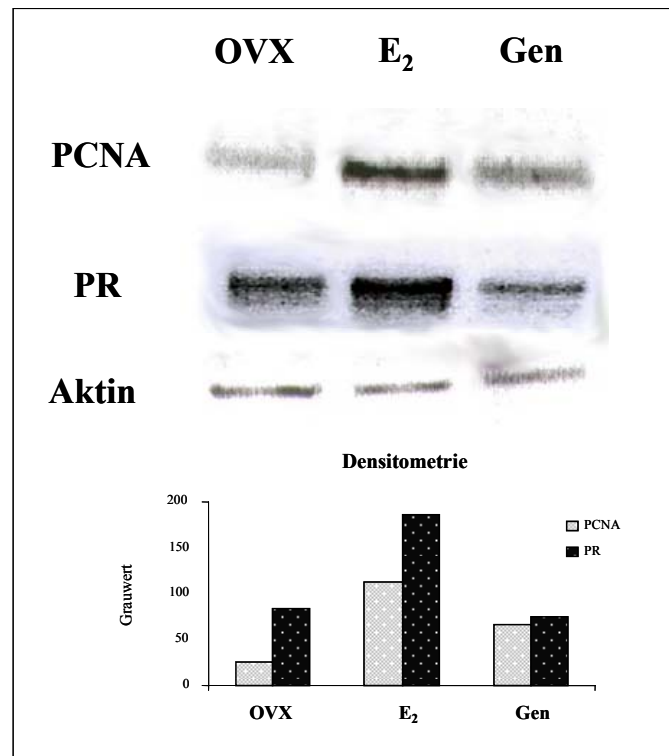
Um die Einflüsse von Genistein (GEN) in klassisch estrogensensitiven Geweben zu untersuchen, wurden die Einflüsse dieses Phytoestrogens in Gewebeproben des Tierexperiments 1 (siehe 2.7) analysiert. Hierbei wurden die Einflüsse von GEN und von Estradiol (E<sub>2</sub>) auf die Zellproliferation und die Proteinexpression eines estrogenresponsiven Gens (Progesteronrezeptor) in der Brustdrüse miteinander verglichen.

Des Weiteren wurde histologisch die Proteinexpression des Entzündungsmarkers Cyclooxygenase-2 (Cox-2) vergleichend im Uterus und im Gefäßsystem der behandelten Tiere untersucht. Ovariectomierte Tiere dienten als Kontrollen.

#### **4.1.1 Einflüsse von Genistein auf die Zellproliferation und die Genexpression in der Brustdrüse ovariectomierter Ratten**

Um Einflüsse auf die Zellproliferation in der Brustdrüse zu untersuchen, wurde die Expression des Proliferationsmarkers PCNA nach dreitägiger Applikation der Behandlungssubstanzen im Western Blot untersucht. Wie in Abbildung 4.1 zu sehen ist, führte eine Behandlung ovariectomierter Tiere mit E<sub>2</sub> zu einer deutlichen Erhöhung der Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA, während die Applikation von GEN zu einer weitaus schwächeren Induktion der PCNA-Expression in diesem Gewebe führte.

Die Proteinexpression des Progesteronrezeptors (PR) wurde durch die Behandlung mit E<sub>2</sub> ebenfalls deutlich erhöht, während GEN hier keinen Einfluss hatte (Abb. 4.1).



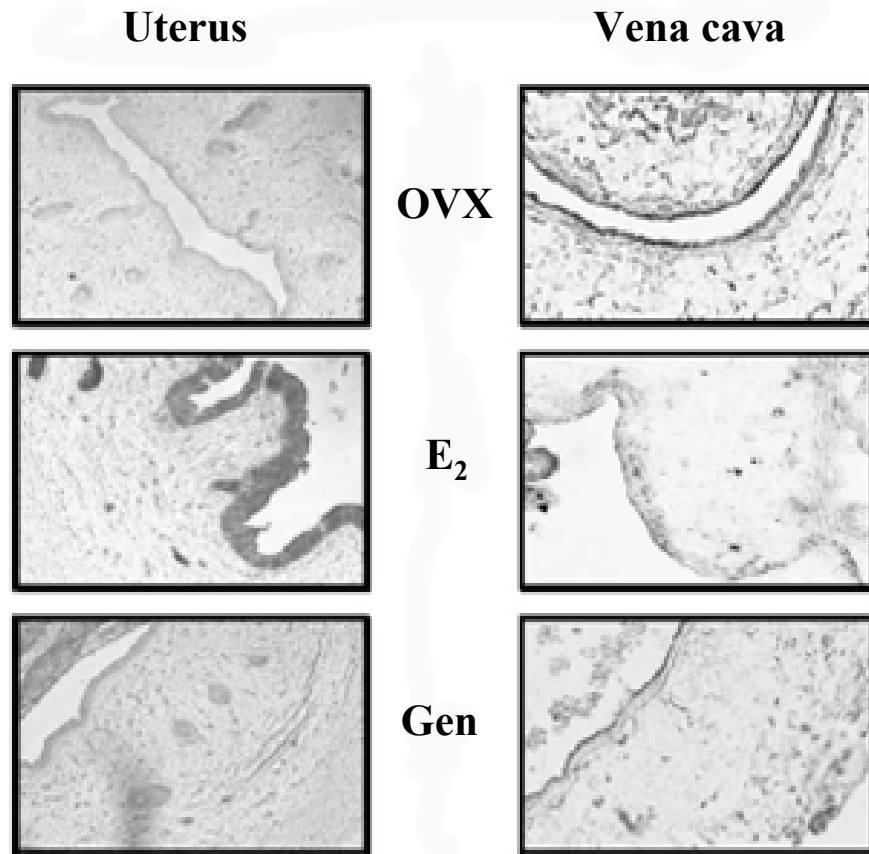
**Abb. 4.1:** Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA und des Progesteronrezeptors (PR) in der Brustdrüse ovariectomierter Ratten nach dreitägiger subkutaner Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen (siehe Tab. 2.2). Dargestellt sind ein repräsentativer Western Blot und die densitometrische Auswertung.

#### 4.1.2 Gewebespezifische Einflüsse von Genistein auf die Genexpression von Cox-2

Zur Analyse der Beeinflussung der gewebespezifischen Expression des Entzündungsmarkers Cox-2 durch die Behandlung ovariectomierter Tiere mit E<sub>2</sub> und GEN, wurden immunhistochemische Färbennachweise in Querschnitten von Uterus und *Vena cava* der unterschiedlichen Behandlungsgruppen durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Expression von Cox-2 im Uterus durch die Applikation von E<sub>2</sub> deutlich gesteigert wurde, während die Behandlung ovariectomierter Tiere mit E<sub>2</sub> in der *Vena cava* gleichzeitig zu einer Verminderung der Cox-2 Proteinexpression führte (Abb. 4.2).

Während die Behandlung der OVX-Tiere mit GEN in der *Vena cava* ebenfalls zu einer reduzierten Expressionsrate der Cox-2 führte, wurde die Proteinexpression dieses Entzündungsmarkers im Uterus, im Gegensatz zu E<sub>2</sub>, durch das Phytoestrogen GEN nicht beeinflusst (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2:** Proteinexpression des Entzündungsmarkers Cox-2 im Uterus und der *Vena cava* ovariectomierter Ratten nach dreitägiger subkutaner Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen (siehe Tab. 2.2). Dargestellt sind repräsentative immunohistochemische Färbungen von Querschnitten. Vergrößerung 100x.

#### 4.2 Untersuchung von Effekten einer phytoestrogenreichen Diät in Kombination mit körperlicher Aktivität

Die Durchführung eines Langzeitversuches (siehe 2.7, Tierexperiment 3) diente zur Untersuchung kombinatorischer Einflüsse einer phytoestrogenreichen Diät und körperlicher Aktivität auf verschiedene molekulare Endpunkte estrogener Einflüsse. Ovariectomierte Tiere, gehalten auf phytoestrogenarmer Diät (PAD) und solche die zusätzlich mit E<sub>2</sub> substituiert wurden, dienten als Kontrollen.

##### 4.2.1 Bestimmung des Phytoestrogengehalts in Futter und Blutplasma

Um die Ergebnisse dieser Studie mit denen anderer Studien vergleichen zu können und um mögliche Effekte objektiv einordnen zu können, wurde zunächst der Phytoestrogengehalt der verwendeten Diäten und die quantitative Futteraufnahme der einzelnen Versuchsgruppen analysiert. Außerdem wurden nach Beendigung des Versuchs die Phytoestrogenspiegel im Blutplasma bestimmt. Der Phytoestrogen-

gehalt in den Diäten und im Blutplasma wurde mittels HPLC ermittelt. Diese Untersuchungen wurden am Institut für Arbeitsphysiologie der Universität Dortmund (IFADO) in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. G.H. Degen durchgeführt.

Der Gehalt ausgewählter Phytoestrogene in der phytoestrogenreichen Diät (PRD) lag um ein Vielfaches über dem niedrigen Gehalt in der phytoestrogenarmen Diät (PAD) (Tab. 4.1).

<b><u>Konzentra- tion im Futter</u></b>	<b>Daidzein µg/g</b>	<b>Genistein µg/g</b>
<b>PAD</b>	<b>&lt;10</b>	<b>&lt;10</b>
<b>PRD</b>	<b>232 ± 10</b>	<b>240 ± 36</b>

**Tab. 4.1:** Konzentrationen von Genistein und Daidzein in den verwendeten Diäten. Ergebnisse einer quantitativen HPLC-Bestimmung.

Anhand der Ermittlung des Phytoestrogengehalts im Futter und der Bestimmung des durchschnittlichen täglichen Futterkonsums (etwa 21g/Tier/Tag) konnte somit die tägliche Aufnahme der gemessenen Phytoestrogene ermittelt werden. Die Tiere, die auf der PRD gehalten wurden, nahmen somit täglich 13 mg/kg KGW Daidzein und 14 mg/kg KGW Genistein auf.

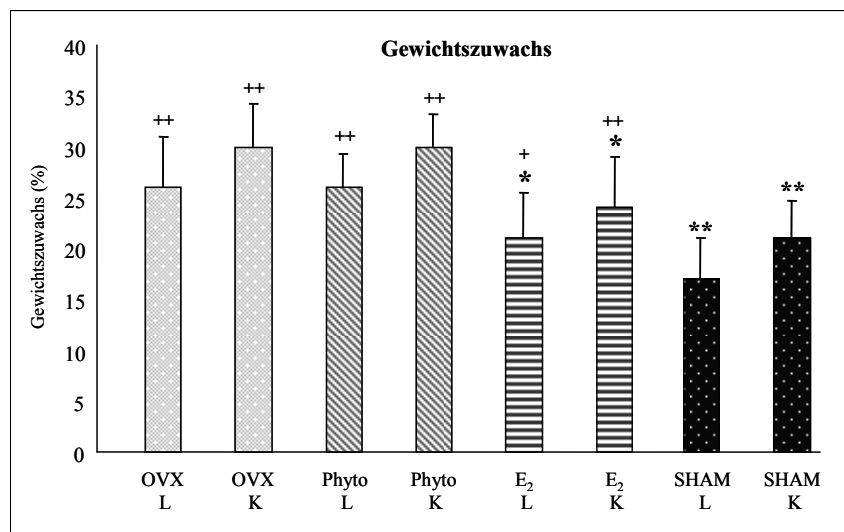
Die Untersuchung der Plasmaproben ergab, dass die Tiere auf PRD (Phyto-Gruppe) deutlich höhere Plasmaspiegel der untersuchten Phytoestrogene aufwiesen als die Tiere, die auf einer PAD gehalten wurden (OVX) (Tab. 4.2). Außerdem ergaben die HPLC-Messungen, dass die Individuen der Phyto-Laufgruppe deutlich höhere Genistein- und Daidzeinplasmaspiegel aufwiesen, als die Phyto-Kontrollen (Tab. 4.2).

<b><u>Plasmaspiegel</u></b>	<b>Genistein ng/ml</b>	<b>Daidzein ng/ml</b>
<b>OVX</b>	<b>&lt;20</b>	<b>23,1+/-2,2</b>
<b>Phyto- Laufgruppe</b>	<b>170,2 ± 80</b>	<b>132,3 ± 34,9</b>
<b>Phyto- Kontrollen</b>	<b>42,01 ± 19</b>	<b>61,25 ± 44,91</b>

**Tab. 4.2:** Genistein- und Daidzeinspiegel im Blutplasma. Ergebnisse einer quantitativen HPLC-Bestimmung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen.

#### 4.2.2 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf die Körpergewichtsentwicklung ovariectomierter Ratten

Zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraums von drei Monaten wurden die Gewichte der Tiere bestimmt. Hieraus wurde der in Abbildung 4.3 dargestellte prozentuale Gewichtszuwachs der unterschiedlichen Gruppen berechnet. Zunächst wurde deutlich, dass der Gewichtszuwachs nach drei Monaten bei den jeweiligen Laufgruppen etwa um 5% niedriger war, als bei den entsprechenden Kontrollen (Abb. 4.3). Außerdem war der Gewichtszuwachs der E<sub>2</sub>- und SHAM-Gruppen signifikant geringer, als der Gewichtszuwachs von 30% bei der OVX-Kontrollgruppe. Die Laufgruppe der intakten Gruppe zeigte den geringsten Gewichtszuwachs aller Gruppen, während die Behandlung ovariectomierter Tiere mit E<sub>2</sub> ebenfalls zu einem signifikant geringeren Gewichtszuwachs geführt hat. Für eine PRD konnte hier kein Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung in ovariectomierten Tieren verzeichnet werden.

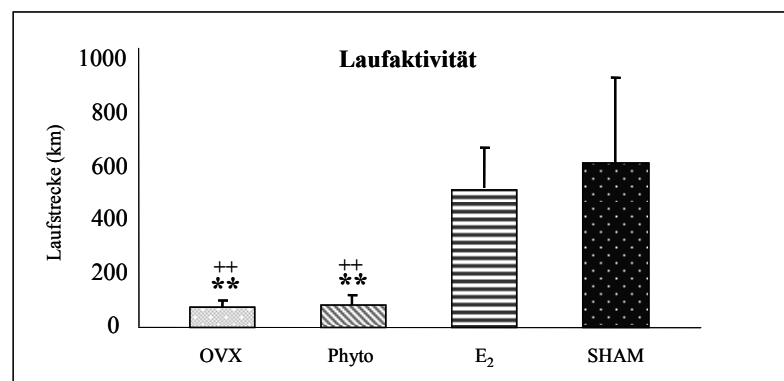


**Abb. 4.3:** Prozentualer Körpergewichtszuwachs nach drei Monaten. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX K), Mann-Whitney U Test (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ). + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Laufgruppe der intakten Tiere (SHAM L), Mann-Whitney U Test (+  $p < 0.05$ , ++  $p < 0.01$ ).



### 4.2.3 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf den Bewegungstrieb ovariectomierter Ratten

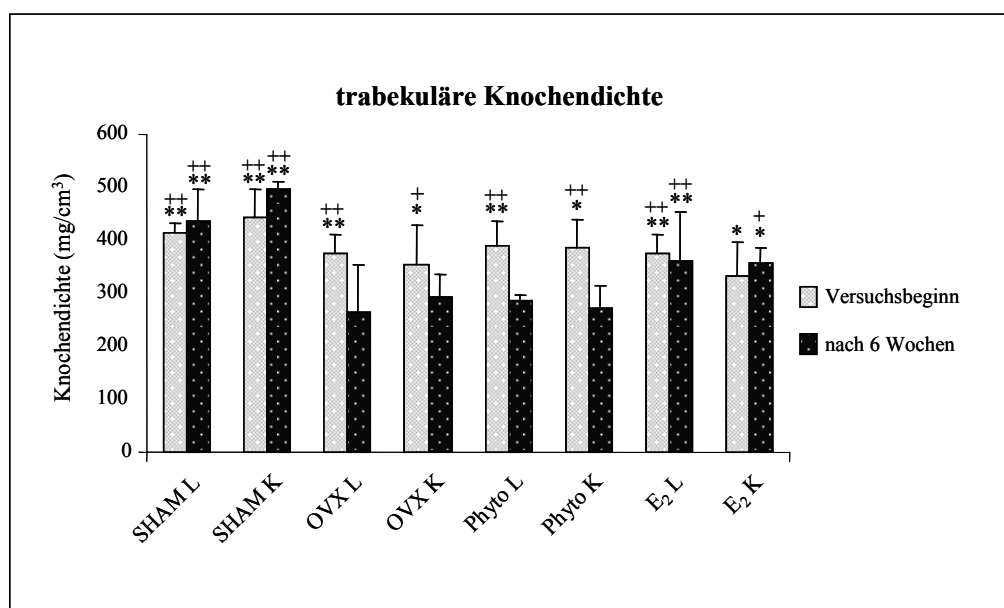
Während des Behandlungszeitraums von drei Monaten hatten die Tiere der Laufgruppen jeweils freien Zugang zu einem separaten Laufrad. Über eine entsprechende Versuchsanordnung (siehe 3.4) wurde über den gesamten Versuchszeitraum die Laufaktivität individuell für jedes Tier ermittelt. Die Auswertung der Daten der intakten SHAM-Lauftiere ergab für diese Tiere eine wesentlich höhere Laufaktivität (7x höher) als sie für die OVX-Laufgruppe ermittelt wurde (Abb. 4.4). Durch die Behandlung mit  $E_2$  konnte die Laufaktivität ovariectomierter Ratten deutlich (6x stärker) stimuliert werden, während die phytoestrogenreiche Ernährung keinen Einfluss auf die Laufaktivität ovariectomierter Tiere hatte (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4:** Darstellung des Bewegungstriebes der verschiedenen Versuchsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur intakten Laufgruppe (SHAM), Mann-Whitney U Test, mit  $p < 0.01$ . ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur mit Estradiol substituierten Laufgruppe ( $E_2$ ), Mann-Whitney U Test, mit  $p < 0.01$ .

#### 4.2.4 Einflüsse von Estradiol und einer phytoestrogenreichen Diät auf die Entwicklung der Knochendichte

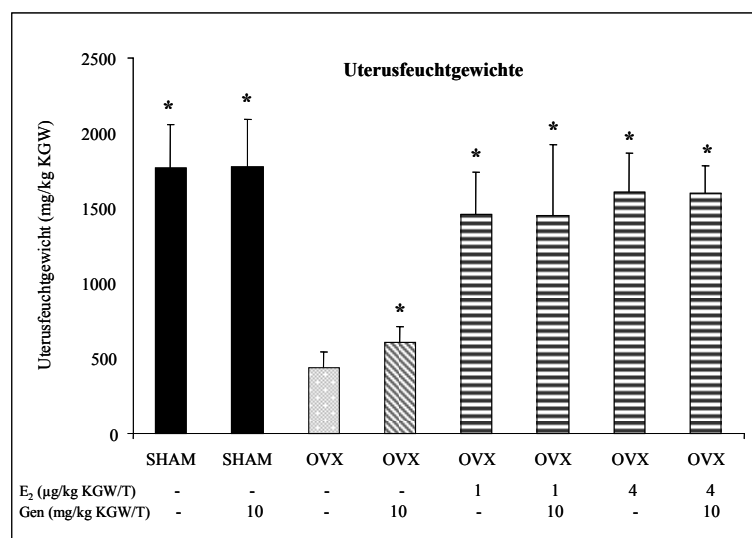
Unmittelbar nach der Ovariectomie, sechs Wochen danach und nach zwölf Wochen wurde die Knochendichte der Tiere in verschiedenen Bereichen der Tibia gemessen (siehe 3.3 und Abb. 2.2). Bereits nach 6 Wochen konnten für den proximalen trabekulären Bereich der Tibiae der ovariectomierten Tiere, trotz einer Zunahme des Körpergewichts (siehe Abb. 4.3), deutliche Knochendichteverluste verzeichnet werden, wohingegen die Knochendichte der intakten, scheinoperierten Tiere nach 6 Wochen leicht zugenommen hat (Abb. 4.5). Die Applikation von E<sub>2</sub> führte zu knochenprotektiven Effekten in ovariectomierten Ratten, während für die ovariectomierten Tiere auf PRD keine knochenprotektiven Effekte beobachtet wurden (Abb. 4.5).



**Abb. 4.5:** Entwicklung der trabekulären Knochendichte der Versuchsgruppen in 6 Wochen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der ovariectomierten Laufgruppe (OVX L), mit \*  $p < 0.05$  und \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der Phyto-Laufgruppe (Phyto L), mit +  $p < 0.05$  und ++  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

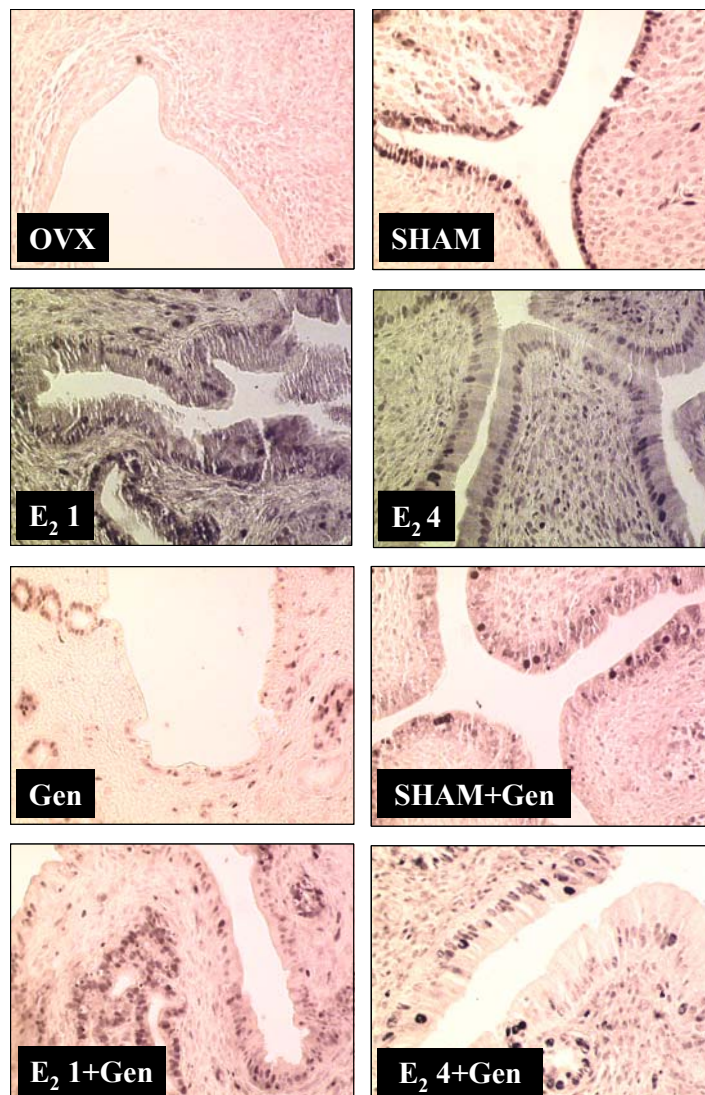
### 4.3 Einflüsse von subkutan appliziertem Genistein auf die Zellproliferation im Uterus in Anwesenheit von Estrogenen

Mit Hilfe einer immunhistochemischen Färbung wurden in den Uteri unterschiedlich behandelter OVX- und SHAM-Ratten (Tab. 2.3, Tierexperiment 2) agonistische und antagonistische Effekte von Genistein und E<sub>2</sub> auf die Zellproliferation untersucht. In Abbildung 4.6 ist das Uterusfeuchtgewicht der unterschiedlichen Gruppen dargestellt. Es wurde deutlich, dass die Applikation der verschiedenen estrogen wirksamen Substanzen in allen Gruppen zu einem signifikanten Anstieg des Uterusfeuchtgewichts gegenüber der OVX-Gruppe geführt hat. Zwischen der unbehandelten SHAM-Gruppe und der SHAM-Gruppe, die mit GEN behandelt wurde, zeigte sich kein Unterschied, während die Genisteinbehandlung in ovariectomierten Tieren zu einem leichten, aber dennoch signifikanten Anstieg gegenüber der ovariectomierten Kontrollgruppe geführt hat (Abb. 4.6). Innerhalb der vier mit Estradiol substituierten Behandlungsgruppen zeigte sich, den Parameter des Uterusfeuchtgewichts betreffend, ebenfalls kein signifikanter Unterschied. In diesen vier Gruppen kam es zu einer dreifachen Zunahme des Uterusfeuchtgewichts gegenüber den OVX-Tieren. Weder die unterschiedlichen Estradioldosen, noch die zusätzliche Behandlung mit Genistein führten zu Unterschieden innerhalb dieser vier Behandlungsgruppen (Abb. 4.6).



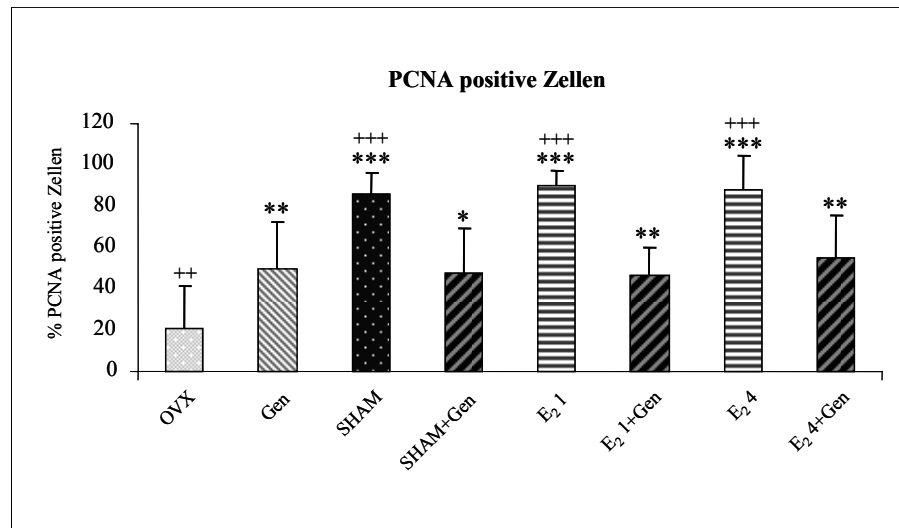
**Abb. 4.6:** Uterusfeuchtgewichte von ovariectomierten Ratten nach dreitägiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur unbehandelten ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.05$ , Mann-Whitney U Test.

In Abbildung 4.7 sind repräsentative immunhistochemische Kernfärbungen des Proliferationsmarkers PCNA in Uterusquerschnitten dieser Tiere dargestellt. Im Gegensatz zu den OVX-Tieren war fast jede Uterusepithelzelle der intakten Tiere PCNA positiv. Auch bei den mit E<sub>2</sub> substituierten OVX-Tieren war eine hohe Proliferationsrate zu verzeichnen, während die Proliferation nach der Applikation von GEN zu einer deutlich geringeren Steigerung der PCNA-positiven Zellen im Uterus ovariectomierter Tiere geführt hat. Nach einer Kobehandlung der Tiere mit GEN und E<sub>2</sub> in unterschiedlichen Dosen waren deutlich weniger proliferative Zellen zu verzeichnen als in den nur mit E<sub>2</sub> substituierten Tieren. Auch in SHAM-Tieren führte die Applikation von Genistein zu einer reduzierten Proliferationsrate (Abb. 4.7).



**Abb. 4.7:** Immunhistochemische PCNA-Kernfärbung in Uterusquerschnitten. Lichtmikroskopische Aufnahme bei 200facher Vergrößerung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen.

Betrachtet man den prozentualen Anteil der PCNA-positiven Zellen des Uterusepithels (Abb. 4.8), so wird auch hier deutlich, dass intakte Tiere und solche, die mit E<sub>2</sub> substituiert wurden, einen höheren Prozentsatz an PCNA-positiven Zellen im Uterusepithel aufwiesen als ovariectomierte Tiere.



**Abb. 4.8:** Prozentualer Anteil PCNA-positiver Zellen im Uterusepithel verschiedener Behandlungsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), Mann-Whitney U Test mit \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ . + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), Mann-Whitney U Test mit ++  $< 0.01$ , +++  $p < 0.001$ .

Für GEN wurde auch hier eine schwächere Induktion der Proliferation im Vergleich zu intakten und mit E<sub>2</sub> substituierten Tieren dokumentiert (Abb. 4.8). In SHAM-operierten intakten Tieren und in Kombination mit E<sub>2</sub> führte GEN zu einem reduzierten Prozentsatz PCNA-positiver Zellen (Abb. 4.8).

#### 4.4 Gewebespezifische Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden

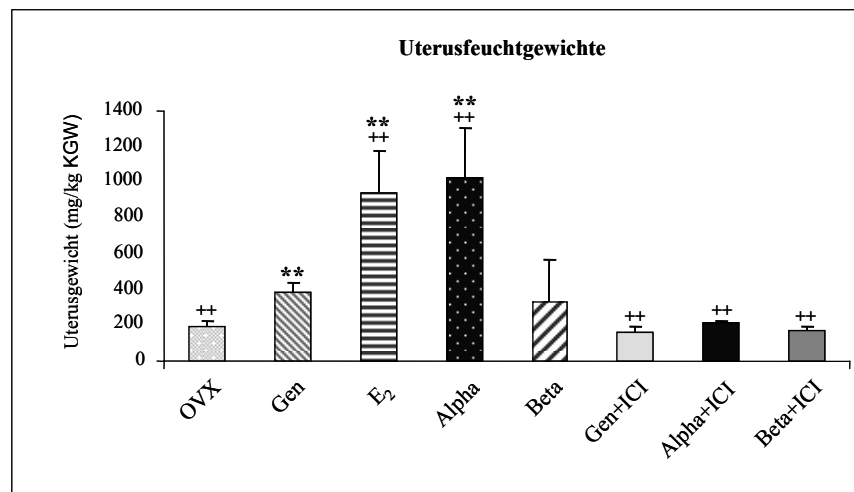
Zur Untersuchung gewebe- und estrogenrezeptorsubtypspezifischer Einflüsse von Genistein wurden ovariectomierte Ratten über einen Zeitraum von drei Wochen subkutan mit Genistein (GEN), estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten (ERA, ERB), Estradiol (E<sub>2</sub>) und einem Antiestrogen (ICI) behandelt (Tab. 2.5, Tierexperiment 4). Dieses Versuchsdesign sollte vor allem dazu dienen, Effekte von ERA und ERB auf die Parameter Körpergewichtsentwicklung, Knochenstoffwechsel, Bewegungstrieb und Darmhomöostase zu untersuchen. Die Wirkungen der estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden wurden mit denen von Genistein und Estradiol verglichen und mit der jeweiligen uterotrophen Potenz korreliert.

#### 4.4.1 Uterotrophe Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden

Zunächst wurde die estrogenische Wirksamkeit verschiedener Substanzen bestimmt, um darüber hinaus die uterotrophe Potenz der untersuchten Substanzen mit weiteren Einflüssen auf molekulare Endpunkte estrogenischer Wirkungen in anderen Geweben und Organen korrelieren zu können. Hierzu wurden estrogenrezeptorsubtypspezifische Effekte auf die sensitiven Parameter Uterusfeuchtgewicht und Uterusepithelhöhe in diesem klassisch estrogensensitiven Gewebe in ovariectomierten Ratten untersucht.

##### 4.4.1.1 Effekte auf das Uterusfeuchtgewicht ovariectomierter Ratten

Weibliche Wistar Ratten wurden ovariectomiert und drei Wochen lang mit verschiedenen Substanzen in definierten Konzentrationen subkutan behandelt (siehe Tab. 2.5). Während der Sektion wurden zunächst die freipräparierten Uteri der Tiere gewogen und anschließend ins Verhältnis zu dem jeweiligen Körpergewicht gesetzt. In Abbildung 4.9 sind die mittleren Uterusfeuchtgewichte der verschiedenen Behandlungsgruppen in Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht (mg/kg KGW) dargestellt.



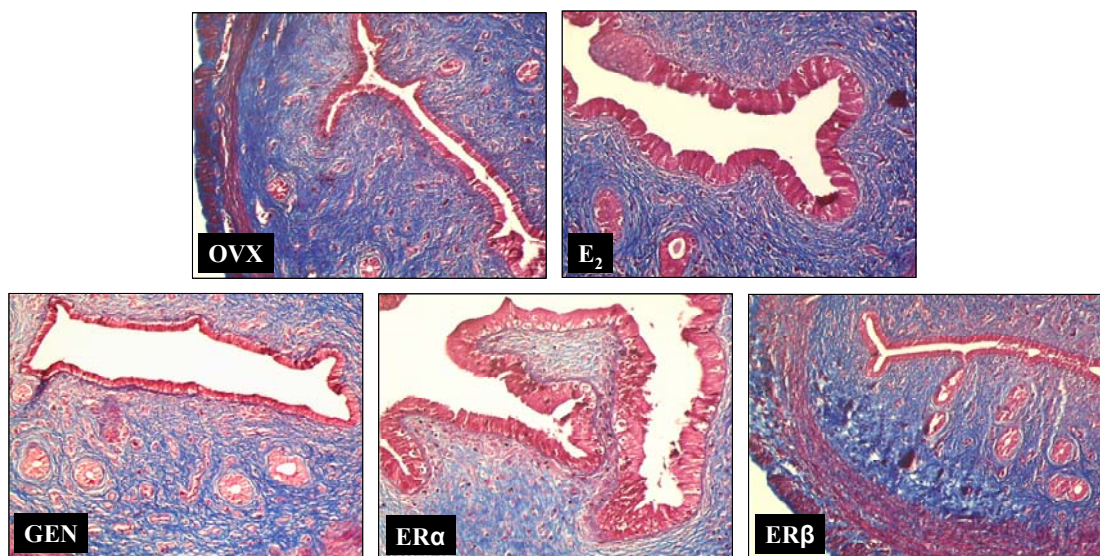
**Abb. 4.9:** Uterusfeuchtgewichte von ovariectomierten Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogenischer Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

Die Abbildung zeigt eine fünffache, signifikante Zunahme des Uterusfeuchtgewichts durch die Applikation von E<sub>2</sub> gegenüber der ovariectomierten Kontrolle. Die

Applikation des ERA führte ebenfalls zu einer etwa fünffachen, signifikanten Zunahme des Uterusfeuchtgewichts, während Genistein nur einen zweifachen, aber dennoch signifikanten Anstieg bewirkte. Der stimulierende Einfluss des ERA wurde durch das Antiestrogen (ICI) antagonisiert. Die Applikation des ERB bewirkte nur leichte, nicht signifikante Effekte auf diesen uterotrophen Parameter, die ebenfalls durch ICI antagonisiert werden konnten (Abb. 4.9).

#### 4.4.1.2 Effekte auf die Uterusepithelhöhe ovariectomierter Ratten

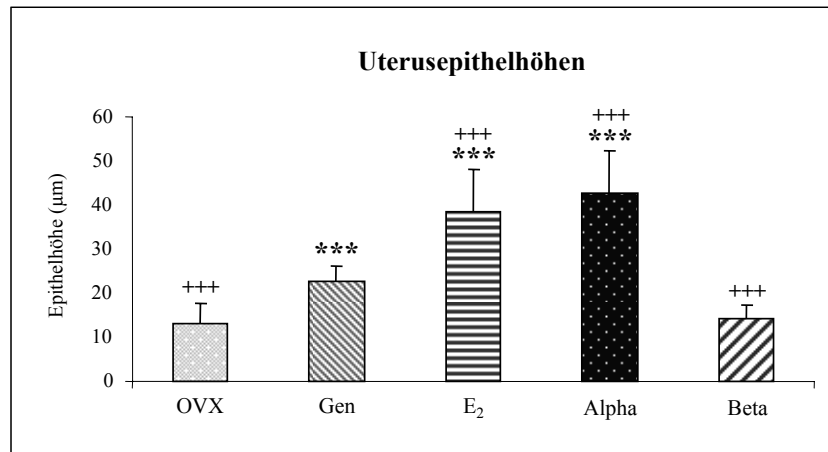
Querschnitte der entparaffinierten Uteri der unterschiedlich behandelten Tiere (Tab. 2.5, Tierexperiment 4) wurden mit einer Azan-Bindegewebsfärbung angefärbt (siehe 3.2.7), um das Uterusepithel morphologisch identifizieren und seine Höhe vermessen zu können. In Abbildung 4.10 sind lichtmikroskopische Aufnahmen repräsentativer, gefärbter Uterusquerschnitte der verschiedenen Behandlungsgruppen in 100facher Vergrößerung dargestellt.



**Abb. 4.10:** Azanfärbung von Uteri unterschiedlich behandelter OVX-Ratten. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten. Vergrößerung 100x.

Hier wurde deutlich, dass die Applikation von E<sub>2</sub> und ERA neben einer Zunahme des gesamten Uterusquerschnitts zu einer Erhöhung des Uterusepithels geführt hat, während der Einfluss von GEN deutlich schwächer war. Eine Behandlung der Tiere mit dem ERB hatte keinen Effekt auf die Uterusepithelhöhe ovariectomierter Ratten (Abb. 4.10). Betrachtete man die gemittelten Ergebnisse der Vermessung der Uterusepithelhöhen aller Gruppen (Abb. 4.11), wurde deutlich, dass neben der Applikation von E<sub>2</sub> und ERA auch die Behandlung von OVX-Ratten mit GEN zu

einer hochsignifikanten Erhöhung der Uterusepithelhöhe gegenüber den unbehandelten Tieren geführt hat. Allerdings war der Effekt von Genistein signifikant niedriger als der Einfluss von E<sub>2</sub> und ERA. Für die Behandlung mit dem ERB war auch hier kein Einfluss auf diesen Parameter zu verzeichnen (Abb. 4.11).



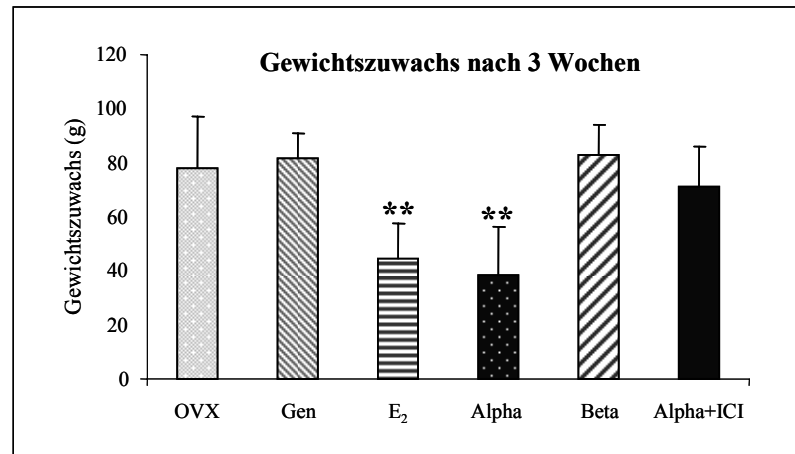
**Abb. 4.11:** Uterusepithelhöhen von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. \*\*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.001$ , Mann-Whitney U Test. +++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), mit  $p < 0.001$ , Mann-Whitney U Test.

#### 4.4.2 Estrogene Einflüsse auf die Entwicklung des Körpergewichts ovarektomierter Ratten

Vor der Ovariectomie und nach dem Behandlungszeitraum wurden die Körpergewichte der Tiere bestimmt. Hieraus konnte für den Versuchszeitraum der durchschnittliche Gewichtszuwachs für alle Behandlungsgruppen ermittelt werden (Abb. 4.12).

Bei Ovariectomie kam es innerhalb von drei Wochen zu einem durchschnittlichen Gewichtszuwachs von 80 g. Die Behandlung mit GEN und dem ERB hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter, während die Applikation von E<sub>2</sub> den Gewichtszuwachs signifikant reduzierte. Mit E<sub>2</sub> behandelte OVX-Tiere nahmen während des Behandlungszeitraumes im Durchschnitt nur 40 g zu. Auch die Applikation des ERA schränkte den Gewichtszuwachs nach einer Ovariectomie signifikant ein; ein Effekt, der mit ICI antagonisiert werden konnte (Abb. 4.12).

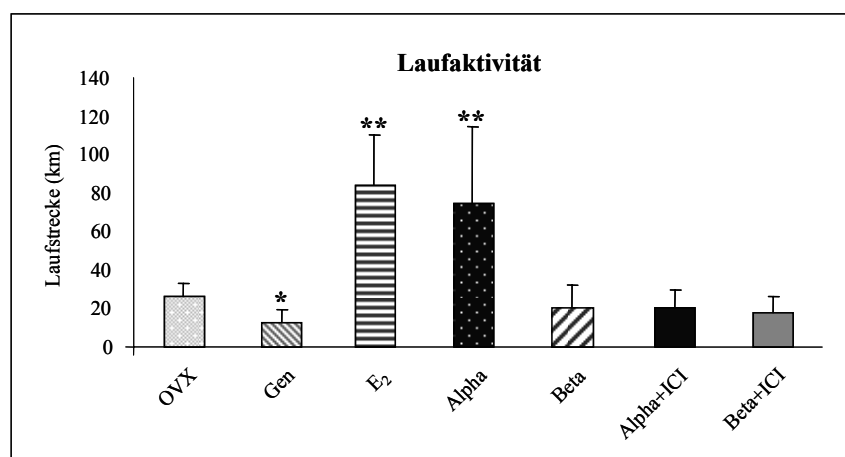




**Abb. 4.12:** Körpergewichtsentwicklung von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

#### 4.4.3 Estrogene Einflüsse auf den Bewegungstrieb ovariectomierter Ratten

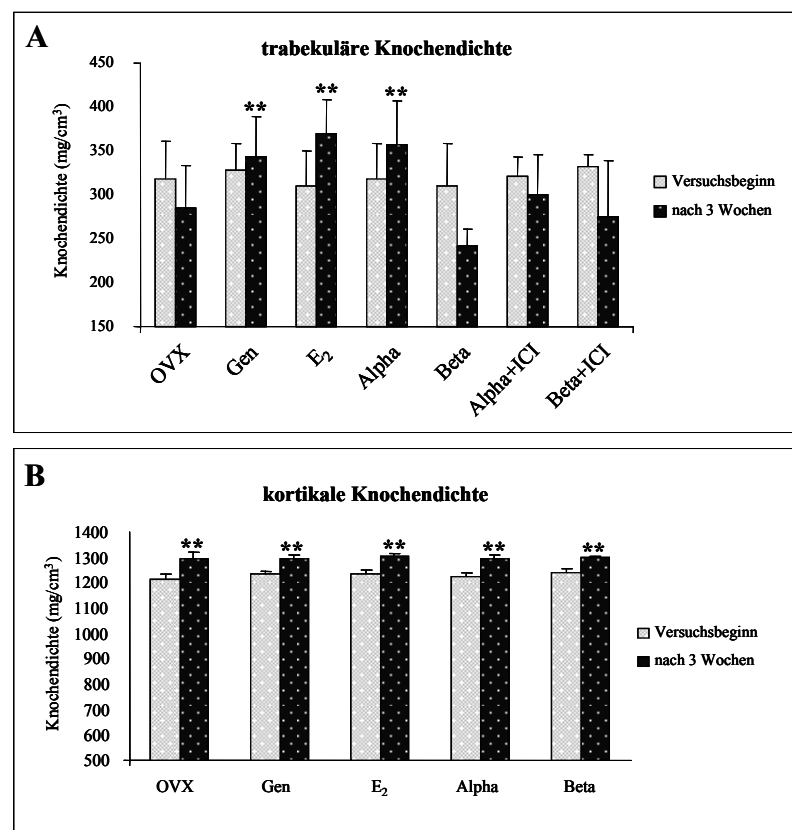
Durch die Behandlung mit E<sub>2</sub> und ERA konnte die Laufaktivität ovariectomierter Ratten deutlich (4x stärker) stimuliert werden, während die subkutane Applikation von GEN zu einer signifikanten Reduktion des Bewegungstriebes von ovariectomierten Ratten führte (Abb. 4.13). Auch die Behandlung mit ERB reduzierte schwach und nicht statistisch signifikant die Laufleistung nach einer Ovariectomie. Die beobachteten Effekte von ERA und ERB konnten mit ICI antagonisiert werden.



**Abb. 4.13:** Laufleistung ovariectomierter Ratten während dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

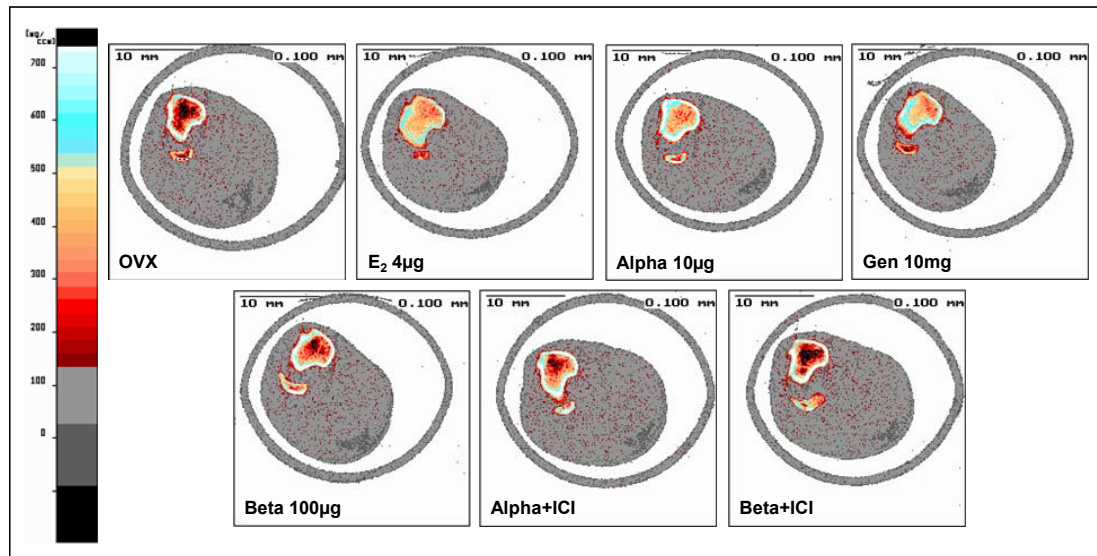
#### 4.4.4 Estrogene Einflüsse auf die Knochenhomöostase ovariectomierter Ratten

Mit einem Kleintiercomputertomographen (Kleintier-CT) wurden vor und nach dem dreiwöchigen Behandlungszeitraum die trabekuläre und die kortikale Knochendichte in der rechten Tibia aller Tiere der verschiedenen Behandlungsgruppen ermittelt (siehe 3.3). Eine Ovariectomie führte innerhalb von drei Wochen zu einem Knochendichteverlust, während die Applikation von E<sub>2</sub>, ERA und GEN zu signifikanten knochenprotektiven Effekten im trabekulären Bereich der Tibia führte (Abb. 4.14A). Der knochenprotektive Effekt des ERA konnte mit dem Antiestrogen ICI antagonisiert werden. Die Substitution der ovariectomierten Tiere mit ERB hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Entwicklung der trabekulären Knochendichte. Im kortikalen Bereich der Tibia konnte nach dem Versuchszeitraum in allen Behandlungsgruppen ein signifikanter Knochendichtezuwachs beobachtet werden (Abb. 4.14B). Innerhalb der Behandlungsgruppen konnten jedoch, die kortikale Knochendichte betreffend, keine unterschiedlichen Effekte beobachtet werden.



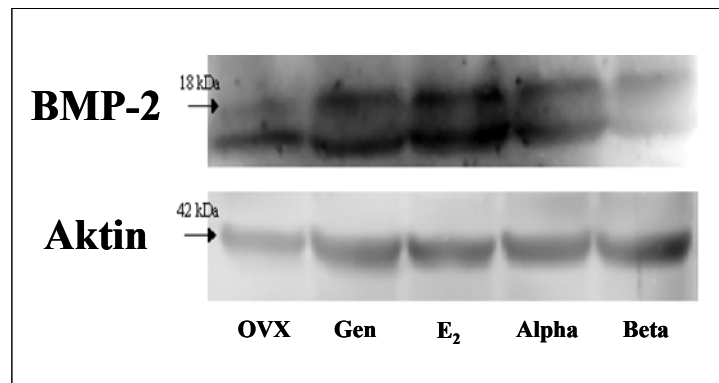
**Abb. 4.14:** Entwicklung der Knochendichte ovariectomierter Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Trabekuläre Knochendichte (A), kortikale Knochendichte (B) \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

Anhand repräsentativer computertomographischer Aufnahmen wurde der Einfluss estrogener Effekte auf die Knochenhomöostase ovariectomierter Tiere auch morphologisch deutlich (Abb. 4.15). Die knochenprotektiven Effekte der Behandlung ovariectomierter Ratten mit E<sub>2</sub>, ERA und GEN spiegeln sich hier im Querschnitt der Tibia in hohen Knochendichtewerten wider, während die Tibiae der OVX-Tiere insbesondere in den medialen Arealen deutliche Verluste an Knochensubstanz aufwiesen (Abb. 4.15).



**Abb. 4.15:** Computertomographische Aufnahmen von Beinquerschnitten in Höhe des proximalen Unterschenkels. Dargestellt sind Tibia, Fibula und muskuläre Areale (v.a. des M. gastrocnemius) von repräsentativen Vertretern der einzelnen OVX-Behandlungsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Knochendichtemessung sind farblich dargestellt.

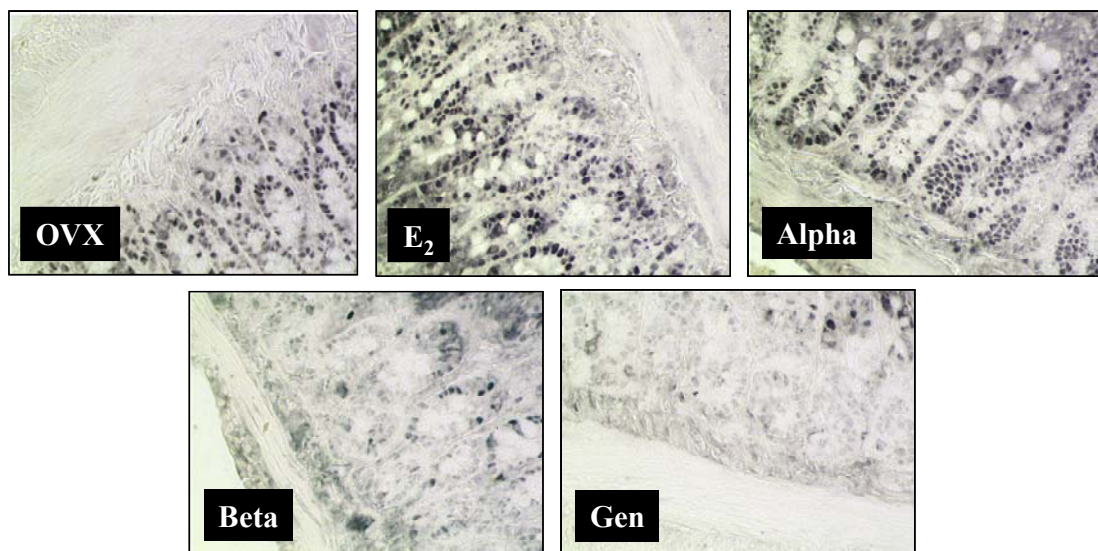
Neben den Knochendichtemessungen wurden mögliche estrogene Einflüsse der Behandlungssubstanzen auch molekularbiologisch in Hinblick auf die Expression von BMP-2 (bone morphogenic protein-2) untersucht. Im Western Blot konnte für die Expression von BMP-2 im trabekulären Bereich der Tibia auf Proteinebene gezeigt werden, dass eine hohe Knochendichte mit einer gegenüber ovariectomierten Tieren gesteigerten BMP-2-Expression korrelierte (Abb. 4.16). Die Behandlung mit E<sub>2</sub>, GEN und ERA bewirkte eine erhöhte Expression von BMP-2 in OVX-Tieren, während der ERB die Genexpression dieses Proteins nicht beeinflusste (Abb. 4.16).



**Abb. 4.16:** Untersuchung der Regulation der BMP-2 Expression im Western Blot. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. Aktin dient als Referenzprotein.

#### 4.4.5 Estrogene Einflüsse auf die Darmhomöostase ovariectomierter Ratten

Um mögliche estrogene Effekte auf die Gewebemöostase im Verdauungstrakt zu untersuchen, wurden immunhistochemisch und molekularbiologisch Proliferations- und Apoptosemarker in Dünndarm und Mukosa der ovariectomierten Behandlungsgruppen analysiert. Hierzu wurde zunächst ein immunhistochemischer Nachweis (siehe 3.2.6) der PCNA-Expression in Dünndarmquerschnitten durchgeführt. In Abbildung 4.17 ist die Proteinexpression dieses Proliferationsmarkers in Dünndarmquerschnitten repräsentativer Vertreter der unterschiedlich behandelten Gruppen dargestellt.

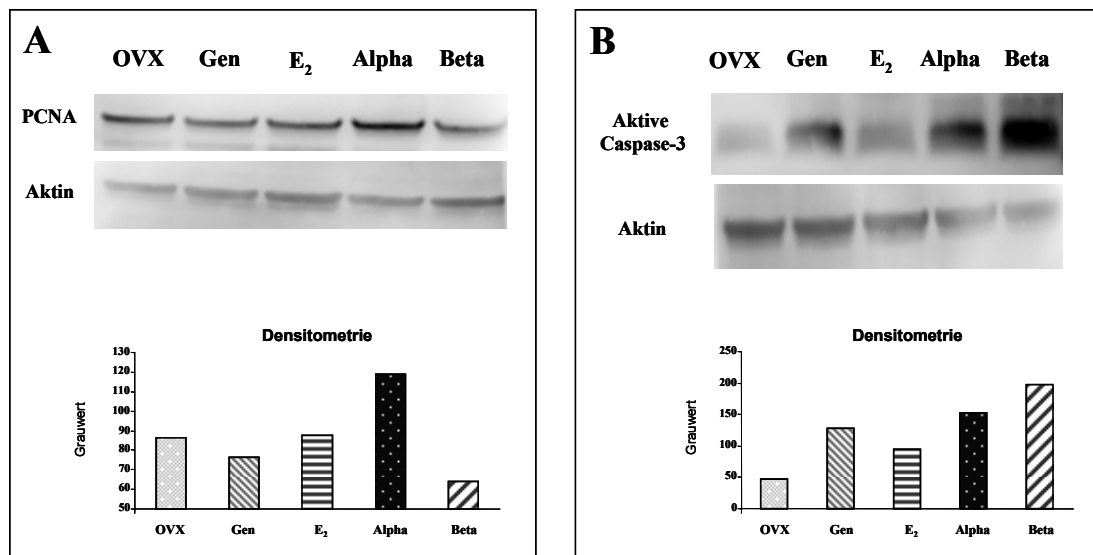


**Abb. 4.17:** Immunhistochemische PCNA Kernfärbung nach Behandlung mit verschiedenen estrogenen Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Dargestellt sind Dünndarmquerschnitte mit Serosa, Muskularis, Submukosa und Mukosa. Vergrößerung 100x.

Bei OVX-Tieren konnte eine hohe PCNA-Expression im Bereich von Submukosa und Mukosa beobachtet werden. Die Behandlung mit E<sub>2</sub> und ERA führte zu einer

leichten Steigerung der PCNA-Expression in diesen Dünndarmschichten, während die Applikation von GEN und ERB zu einer Reduktion der PCNA positiv gefärbten Kerne führte (Abb. 4.17).

Die PCNA-Proteinexpression wurde ebenfalls quantitativ für gepoolte Mukosaprobe der einzelnen Behandlungsgruppen bestimmt. Hierzu wurde ein Western Blot durchgeführt und densitometrisch ausgewertet (siehe 3.1). Neben der molekularbiologischen Untersuchung der PCNA-Proteinexpression (Abb. 4.18A) wurde zusätzlich im Western Blot die Aktivität der Caspase-3 untersucht (Abb. 4.18B). Hierzu wurde ein Antikörper verwendet, der spezifisch nur an Epitope der aktiven Caspase-3 bindet. In Abbildung 4.18 sind die Ergebnisse der Western Blots und der densitometrischen Auswertungen dargestellt. Die Densitometrie stellt Grauwertverhältnisse von Zielprotein zu Referenzprotein (Aktin) dar.



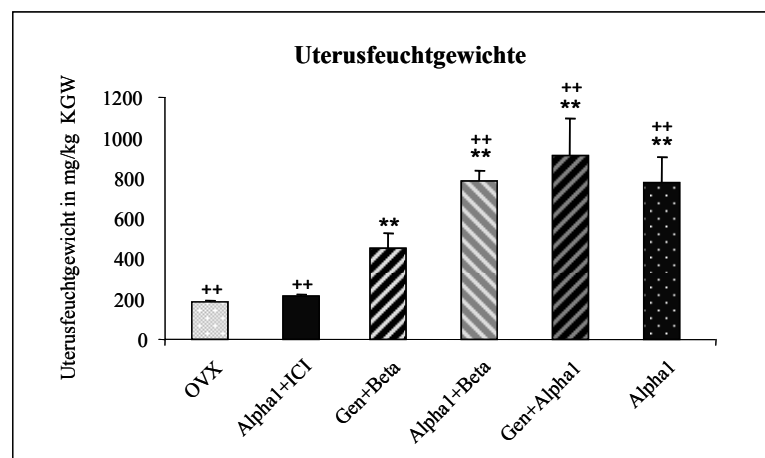
**Abb. 4.18:** Analyse der Proteinexpression von PCNA (A) und aktiver Caspase-3 (B) im Western Blot mit densitometrischer Auswertung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen.

In Abbildung 4.18A wird deutlich, dass die PCNA-Expression im Dünndarm ovariectomierter Ratten durch E<sub>2</sub> nicht beeinflusst wurde, während der ERA zu einer deutlichen Steigerung der Expressionsrate geführt hat. GEN und ERB senkten die Proteinexpression dieses Proliferationsmarkers in ovariectomierten Tieren. Die Aktivität der Caspase-3 wurde durch die Applikation von GEN und noch stärker durch die Behandlung mit ERB gesteigert (Abb. 4.18B). Auch der ERA bewirkte eine Aktivitätssteigerung dieses Apoptosemarkers in ovariectomierten Tieren, während E<sub>2</sub> nur zu einer marginalen Aktivitätssteigerung führte.

#### 4.5 Kombinatorische Effekte von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden

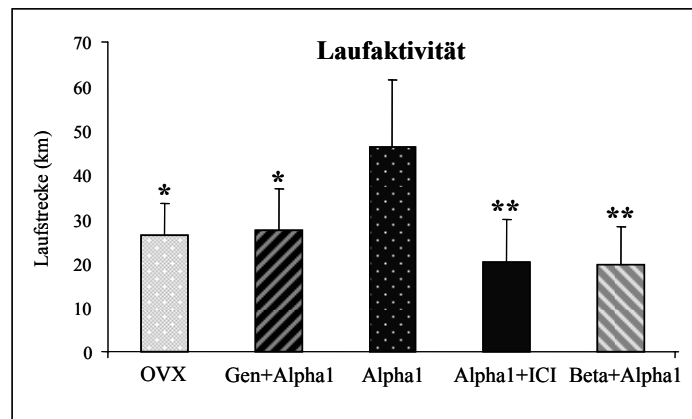
Im Tierexperiment 6 (siehe 2.7) sollten mögliche antagonistische und additive Effekte von GEN, ERA und ERB untersucht werden. Hierzu wurden diese Substanzen in verschiedenen Kombinationen appliziert. Der ERA wurde bei der Applikation in diesem Versuchsdesign niedrig dosiert (1 µg/kg KGW).

Betrachtete man die Uterusgewichte dieses Kombinationsversuches, war eine signifikante Zunahme dieses sensitiven Parameters in den Behandlungsgruppen GEN+ERB, ERA1+ERB, GEN+ERA1 und ERA1 gegenüber der OVX-Kontrollgruppe zu sehen (Abb. 4.19). Die Beeinflussung des Uterusgewichtes durch die Kombination von GEN+ERB unterschied sich signifikant von allen Gruppen und war deutlich geringer als in den Gruppen ERA1+ERB, GEN+ERA1 und ERA1. Die kombinierte Applikation von GEN und ERA1 führte zur höchsten Zunahme des Uterusgewichtes, die allerdings keine statistische Signifikanz gegenüber ERA1+Beta und ERA1 erreichte (Abb. 4.19).



**Abb. 4.19:** Uterusfeuchtgewichte von OVX-Ratten nach dreiwöchiger kombinierter s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.7 zu entnehmen. \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur GEN+Beta Gruppe, mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

In Abbildung 4.20 ist die durchschnittliche Laufaktivität der Behandlungsgruppen dargestellt. Die Laufaktivität der Tiere, die ausschließlich mit ERA1 behandelt wurden, übertraf signifikant die aller anderen Gruppen. Die Kombination von ERA1 mit GEN oder ERB führte somit zu einer signifikant reduzierten Laufaktivität gegenüber ovariectomierten Tieren, die nur mit ERA1 substituiert wurden (Abb. 4.20).

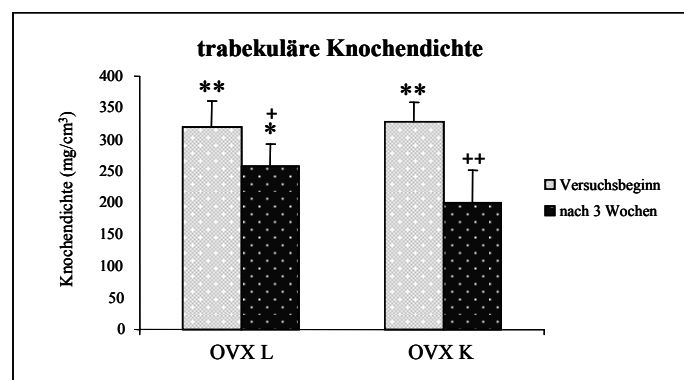


**Abb. 4.20:** Laufaktivität von OVX-Ratten nach dreiwöchiger kombinierter s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.7 zu entnehmen. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zu Alpha1, mit \*  $p < 0.05$  und \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

#### 4.6 Einflüsse von körperlicher Aktivität auf knochenprotektive Effekte von Genistein

Um den Einfluss körperlicher Aktivität auf die Knochendichteverluste nach einer Ovariectomie bei Ratten zu untersuchen, wurde ein dreiwöchiges Kontroll-experiment durchgeführt, in dem mögliche Unterschiede bei der Entwicklung der trabekulären Knochendichte in einer OVX-Kontrollgruppe und einer OVX-Laufgruppe evaluiert werden sollten.

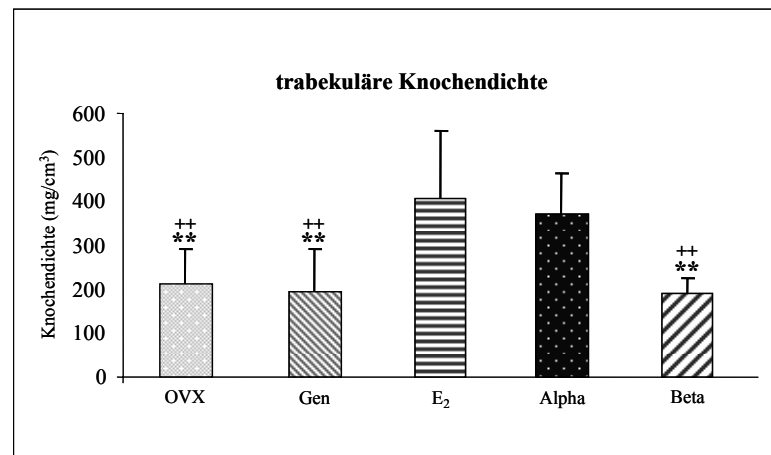
In Abbildung 4.21 sieht man, dass eine Ovariectomie in beiden Gruppen zu Knochendichteverlusten führte. Allerdings waren die Knochendichteverluste in der Laufgruppe signifikant niedriger, als in der Kontrollgruppe.



**Abb. 4.21:** Trabekuläre Knochendichte von ovariectomierten Ratten mit und ohne mechanischen Reiz. \* kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX K), mit \*  $p < 0.05$  und \*\*  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur jeweiligen Anfangsmessung in dieser Gruppe, mit +  $p < 0.05$  und ++  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.

Um valide Aussagen über die knochenprotektiven Effekte estrogener Substanzen in ovariectomierten Tieren treffen zu können, wurde aufbauend auf dem Vorversuch (Abb. 4.21) ein zusätzliches Kontrollexperiment (Tierexperiment 5, siehe 2.7) durchgeführt, in dem die Einzeltiere der Behandlungsgruppen keinen Zugang zu einem Laufrad hatten. Hier sollten ausschließlich die knochenprotektiven Einflüsse der Behandlungssubstanzen ohne den kombinierten Einfluss körperlicher Aktivität untersucht werden.

Die Applikation von E<sub>2</sub> und ERA hatte in Abwesenheit von körperlicher Aktivität signifikante, knochenprotektive Effekte zur Folge, während die Behandlung ovariectomierter Tiere mit GEN in diesem Versuchsdesign keine knochenprotektiven Effekte bewirkte (Abb. 4.22). Die Applikation des ERB hatte ebenfalls keinen Einfluss auf die trabekuläre Knochendichte nach einer Ovariectomie.



**Abb. 4.22:** Trabekuläre Knochendichte von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.6 zu entnehmen. \*\* kennzeichnet signifikante Unterschiede zu E<sub>2</sub>, mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zu Alpha, mit  $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test.



## 5 Diskussion

Estrogene sind an der Regulation eines breiten Spektrums physiologischer Prozesse beteiligt. Die vielfältige Bedeutung dieser Steroide wird deutlich, wenn man neben ihren Einflüssen in klassischen estrogensensitiven Geweben wie Ovarien, Uterus und Mammae auch ihre Bedeutung in nicht-klassischen Geweben, Zellen und Organen betrachtet. Die Einflussbereiche dieser Hormone erstrecken sich nahezu über den gesamten Organismus. Als wichtige Mediatoren regulativer und homöostatischer Prozesse spielen Estrogene im Herz-Kreislaufsystem, im Exkretionssystem, im Immunsystem und bei Stoffwechselprozessen bedeutende Rollen. Neben Effekten in verschiedenen Organen wie Leber, Milz und Lunge vermitteln diese Substanzen u.a. auch Wirkungen auf den Bewegungsapparat und das Verhalten.

Diese weitreichenden Einflussbereiche von Estrogenen im menschlichen Organismus machen auch ihre pathophysiologische Bedeutung bei hormonell bedingten Osteoporosen, Herz-Kreislauferkrankungen und Krebserkrankungen, aber auch bei Beschwerden, wie sie während und nach der Menopause auftreten, deutlich.

Die vielfältigen Wirkungsweisen der aktivierten Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$ , sowie ihre gewebespezifischen Verteilungsmuster sind hierbei von besonderer Bedeutung. Die Interaktion dieser Transkriptionsfaktoren mit verschiedenen Kofaktoren und ihre genomischen und nicht-genomischen Effekte auf Signaltransduktionskaskaden, sowie ihre gewebespezifischen Einflüsse auf die Genexpression, stehen daher seit geraumer Zeit im Mittelpunkt wissenschaftlichen Interesses.

Neben den molekularen Wirkmechanismen von Estrogenen haben auch verschiedene nicht-steroidale Substanzen an Bedeutung gewonnen, für die estrogene Effekte und Affinitäten zu den Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  beschrieben wurden. Hierzu zählen vor allem synthetische Substanzen, SERMs wie RAL und TAM, Antiestrogene aber auch wichtige Vertreter von Phytoestrogenen wie GEN, DAI und Equol.

Vor diesem Hintergrund war es Gegenstand dieser Arbeit, die komplexen über 17 $\beta$ -Estradiol vermittelten Einflüsse auf verschiedene molekulare Endpunkte estrogener Wirkungen in unterschiedlichen Geweben zu untersuchen, und die gewebespezifischen Wirkungen der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  näher zu charakterisieren. Hierbei sollten im Tiermodell agonistische und antagonistische

Effekte der estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden auf sensitive Parameter wie das Uterusfeuchtgewicht und die Uterusepithelhöhe, die Körpergewichtsentwicklung, den Knochenstoffwechsel, das Verhalten und die Darmhomöostase untersucht werden.

Zusätzlich sollten die hierbei gewonnenen Erkenntnisse dazu genutzt werden, das agonistische und antagonistische Potential von Genistein auf diese estrogensensitiven Parameter besser zu verstehen, und die estrogenen Wirkmechanismen dieses Phytoestrogens vor diesem Hintergrund näher definieren zu können.

### **5.1 Das Tiermodell der ovariectomierten Ratte**

Die Grundlage der tierexperimentellen Studien dieser Arbeit bildete das Tiermodell der ovariectomierten Ratte (OVX). Dieses Tiermodell eignete sich besonders für die Untersuchung von Effekten estrogenrezeptorsubtypspezifischer Liganden und von Genistein auf verschiedene molekulare Endpunkte estrogenen Wirkungen. Ovariectomierte Ratten dienen als Standardtestsyste für die Wirkstärke verschiedener estrogen wirksamer Untersuchungssubstanzen (Jefferson et al. 2002). Dieses Tiermodell eignet sich zur Untersuchung der estrogenen Einflussnahme verschiedener Untersuchungssubstanzen auf das Uterusfeuchtgewicht in uterotrophen Assays (Odum et al. 1997, Tinwell et al. 2000). Darüber hinaus ist die ovariectomierte Ratte für die Analyse weiterer estrogensensitiver Parameter wie der Uterusepithelhöhe und der Genexpression verschiedener estrogenresponsiver Gene (Diel et al. 2004b), die mit dem Parameter des Uterusfeuchtgewichts korrelieren (Padilla-Banks et al. 2001), geeignet. Weitere estrogensensitive Parameter stellen die Proliferation des Uterusepithels (Diel et al. 2006), die Zahl der uterinen Drüsen (Newbold et al. 2001a, Newbold et al. 2001b) und die Epithelhöhe der Vagina ovariectomierter Ratten dar (Diel et al. 2002). Für die Charakterisierung der proliferativen Potenz des Phytoestrogens Genistein im Rahmen dieser Arbeit waren derartige Wachstumsprozesse und entsprechende molekulare Mechanismen im Uterus von besonderer Bedeutung. Bei der vergleichenden Interpretation der physiologischen Reaktionen des Uterus auf die Applikation von Genistein und Estradiol wurde daher berücksichtigt, dass unterschiedliche und zeitlich aufeinander folgende physiologische Prozesse zu einer Stimulation des Uterusfeuchtgewichts führen. Nach 2-6 Stunden kommt es, bedingt durch eine erhöhte Permeabilität der Zellen, zu einer Stimulation des Uterusfeuchtgewichts nach einer Infiltration von

Wasser in das uterine Gewebe. Außerdem nimmt in diesem Zeitraum die mRNA-Expression spezifischer Markergene, die an der Regulation der Zellproliferation beteiligt sind, zu. In der zweiten Phase nach 10-16 Stunden kommt es zur DNA-Synthese und zur gesteigerten Zellproliferation, die dann ebenfalls zu einem weiteren Anstieg des Uterusfeuchtgewichts beiträgt (Hewitt et al. 2003). Somit ist die Stimulation des Uterusfeuchtgewichts ovariectomierter Ratten durch estrogen wirksame Substanzen nicht zwangsläufig durch eine gesteigerte Zellproliferation bedingt, sondern kann ebenso durch eine erhöhte Permeabilität der Zellen und eine hieraus resultierende Wasseraufnahme hervorgerufen werden, ohne das gleichzeitig proliferative Prozesse stattfinden. Für die Interpretation der proliferativen Potenz des Phytoestrogens Genistein, welches einen Teilaspekt dieser Arbeit darstellt, waren diese zeitlich aufeinander folgenden und von einander verschiedenen molekularen Mechanismen relevant.

Des Weiteren findet die ovariectomierte Ratte als Modellorganismus zur Untersuchung menopausaler und postmenopausaler Beschwerden Verwendung (Gallo et al. 2005). Die postmenopausale Osteoporose (Kalu et al. 1991, Arjmandi et al. 1996) und damit verbundene hormonell bedingte Veränderungen in der Knochenhomöostase (Gallo et al. 2005) können in diesem Kontext ebenfalls an ovariectomierten Ratten gut untersucht werden. Somit war dieses Tiermodell in dieser Arbeit auch für die Untersuchung von Einflüssen der subtypspezifischen ER-Agonisten und von Genistein auf die kortikale und trabekuläre Knochendichte sowie auf die Veränderung der Genexpression von Knochenmarkern in der Tibia von Bedeutung.

Neben der Untersuchung der proliferativen Potenz von Genistein und der Analyse von estrogenen Einflüssen auf die Knochenhomöostase eignete sich die ovariectomierte Ratte in Kombination mit estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden im Rahmen dieser Arbeit auch für die Untersuchung estrogenrezeptorsubtypspezifischer Effekte.

Die physiologische Bedeutung der Estrogenrezeptorsubtypen für molekulare Endpunkte estrogenen Wirkungen wurde bereits an Tieren untersucht, bei denen jeweils das Gen eines der beiden Estrogenrezeptorsubtypen ausgeschaltet wurde (ER $\alpha$ KOs, oder ER $\beta$ KOs) (Hewitt und Korach 2003, Korach et al. 2003).

## 5.2 Untersuchungen estrogenrezeptorsubtypspezifischer Wirkungen

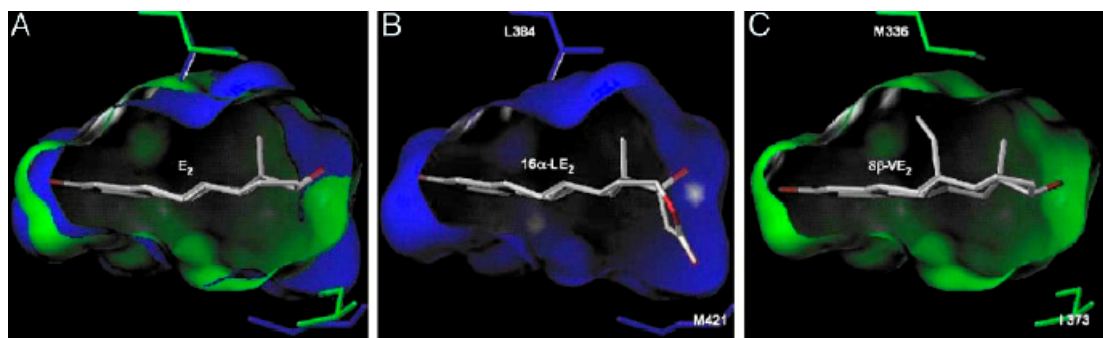
Im Rahmen der vorliegenden Arbeit stellten ovariectomisierte Ratten, die mit estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten behandelt wurden, die bevorzugte Alternative zu ERKOs dar (Mueller und Korach 2001, Korach et al. 2003, Hewitt und Korach 2003, Nilsson et al. 2004).

Experimente an ERKOs haben zu einem besseren Verständnis estrogenrezeptorsubtypspezifischer Wirkungsweisen beigetragen. Es konnte z.B. in diesem Tiermodell gezeigt werden, dass die durch Estradiol vermittelten proliferativen Effekte im Uterus (Weihua et al. 2000) und in der Brustdrüse (Cheng et al. 2004) über den ER $\alpha$  vermittelt werden. Der ER $\beta$  scheint hingegen im Uterus über die Modulation der proliferativen Effekte des ER $\alpha$ , antiproliferative Einflüsse auszuüben (Weihua et al. 2000), und über seine Effekte auf die Ausdifferenzierung von Brustdrüsengewebe das Krebsrisiko zu reduzieren (Forster et al. 2002). Auch selektive Estrogenrezeptorliganden stellen wichtige molekularbiologische Hilfsmittel dar, um zusätzliche Einblicke in die Funktionen der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  zu erhalten (Sun et al. 1999). Der Vorteil von spezifischen Liganden gegenüber genetisch veränderten Tiermodellen liegt darin, nicht auf Organismen zurückgreifen zu müssen, die während der gesamten Ontogenese ohne den Einfluss beider oder eines ERs sämtliche Entwicklungsstadien bis zum adulten Tier durchlaufen haben (Hillisch et al. 2004).

Für ERKOs und für estrogenrezeptorspezifische Liganden konnten übereinstimmende estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse in unterschiedlichen reproduktiven und nicht-reproduktiven Geweben beschrieben werden (Hillisch et al. 2004). So konnten mit Hilfe von ERKOs (Korach et al. 2003, Krege et al. 1998, Couse et al. 1999) und mit estrogenrezeptorsubtypspezifischen Agonisten (Harris et al. 2002, Harris et al. 2003a, Hegele-Hartung et al. 2004, Hillisch et al. 2004) estrogenrezeptorsubtypspezifische mRNA-Expressionsmuster beschrieben werden. Zudem konnte dokumentiert werden, dass der ER $\alpha$  nicht aber der ER $\beta$  für die Sicherstellung der Fruchtbarkeit, für die über E<sub>2</sub> vermittelte Hemmung der Ovulation, für Wachstumsprozesse in Uterus und Brustdrüse, für knochenprotektive Effekte und für Einflüsse auf LH-, Estradiol- und Testosteronspiegel bei weiblichen Tieren verantwortlich ist. Auch für den ER $\beta$  wurden in den letzten Jahren sowohl mit ERKOs als auch mit selektiven ER-Agonisten verschiedene Einflüsse beschrieben (Pettersson und Gustafsson 2001). Über den ER $\beta$  werden physiologische Effekte im

Kolon (Wada-Hiraike et al. 2006b), auf das Herzkreislaufsystem (Widder et al. 2003, Pelzer et al. 2005a, Pelzer et al. 2005b) und auf inflammatorische Prozesse (Harris 2006a, Harris 2006b) vermittelt.

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchungen estrogenrezeptor-subtypspezifischer Effekte auf biologische Endpunkte wurden mit den selektiven Estrogenrezeptoragonisten  $16\alpha$ -LE<sub>2</sub> (ERA) und  $8\beta$ -VE<sub>2</sub> (ERB) (Abb. 2.1) (Fritzemeier et al. 2004, Hillisch et al. 2004), die von Herrn Dr. K.H. Fritzemeier (Schering AG, Berlin) zur Verfügung gestellt wurden, durchgeführt. Bei diesen Substanzen handelt es sich um Derivate von  $17\beta$ -Estradiol (Hillisch et al. 2004). Strukturelle Modifikationen an der  $16\alpha$  und  $17\alpha$  Position des D-Rings verhindern eine Bindung an den ER $\beta$  ( $16\alpha$ -LE<sub>2</sub>). An der  $8\beta$  Position des B- und C-Rings wurde  $17\beta$ -Estradiol synthetisch so abgewandelt, dass es räumlich nicht mehr in die Bindungstasche des ER $\alpha$  passt ( $8\beta$ -VE<sub>2</sub>) (Abb. 5.1).



**Abb. 5.1:** Schematische Darstellung steroidaler Substanzen in der Bindungstasche der Estrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ . A: Darstellung von E<sub>2</sub> in der Bindungstasche von ER $\alpha$  (blau) und ER $\beta$  (grün), B:  $16\alpha$ -LE<sub>2</sub> füllt den zusätzlichen Freiraum in der Bindungstasche des ER $\alpha$  (nahe der Aminosäure M421), C:  $8\beta$ -VE<sub>2</sub> füllt den freien Raum in der Bindungstasche des ER $\beta$  (nahe der Aminosäure M336) (übernommen aus: Hillisch et al. 2004).

Rezeptorbindungstests mit diesen synthetischen ER-Agonisten zeigen, dass  $16\alpha$ -LE<sub>2</sub> bei ERs der Ratte eine 70 mal höhere Affinität zu ER $\alpha$  als zu ER $\beta$  hat, während  $8\beta$ -VE<sub>2</sub> eine 93 mal höhere Affinität zu ER $\beta$  als zu ER $\alpha$  hat (Hillisch et al. 2004). In Transaktivierungstests hat  $16\alpha$ -LE<sub>2</sub> eine 250fach induzierte Selektivität für ER $\alpha$  gegenüber ER $\beta$ , während  $8\beta$ -VE<sub>2</sub> eine 183fach induzierte Selektivität für ER $\beta$  gegenüber ER $\alpha$  zeigt (Hillisch et al. 2004). Die selektive Bindungsaffinität und Transaktivierung von ER $\alpha$  durch  $16\alpha$ -LE<sub>2</sub> und von ER $\beta$  durch  $8\beta$ -VE<sub>2</sub> entspricht annähernd den Eigenschaften des natürlichen Estrogenrezeptorliganden  $17\beta$ -Estradiol (Hillisch et al. 2004). Somit stellen diese Substanzen hoch selektive Estrogenrezeptoragonisten dar, die zur Analyse rezeptorsubtypspezifischer Wirkungsweisen eingesetzt werden können. Im Rahmen dieser Arbeit sollten mit

diesen Substanzen in erster Linie estrogenrezeptorsubtypspezifische agonistische Effekte bei der Knochen- und Darmhomöostase untersucht und mit den entsprechenden Einflüssen von Genistein verglichen werden.

Um analysieren zu können, ob die beschriebenen Einflüsse der Substanzen (ERA, ERB und GEN) tatsächlich über eine spezifische Bindung an die Estrogenrezeptorsubtypen vermittelt wurden, und um auszuschließen, dass andere molekulare Mechanismen hiermit in Verbindung gebracht werden müssen, wurde das Antiestrogen ICI 182780 (Abb. 2.1) eingesetzt. Bei dieser Substanz handelt es sich um einen reinen Estrogenrezeptorantagonisten, dessen antagonistische Effekte im Gegensatz zu SERMs wie TAM oder RAL nicht gewebespezifisch sind (Tab. 5.1) (Hermenegildo und Cano 2000). Somit gehört ICI 182780 neben ICI 164384 zu einer Gruppe von Substanzen, die eine hohe Affinität zu den Estrogenrezeptoren aufweist (Kuiper et al. 1997), für die jedoch weder *in vivo* noch *in vitro* agonistische, estrogenische Effekte nachgewiesen werden konnten (Hermenegildo und Cano 2000). ICI 182780 bindet kompetitiv an Estrogenrezeptoren und verhindert hierbei, dass diese in den Zellkern gelangen (Hermenegildo und Cano 2000) und an EREs binden können. Aufgrund seines antiestrogenen Potentials ist ICI 182780 zur Antagonisierung estrogenischer Effekte in verschiedenen klinischen Anwendungen von Bedeutung (Gradishar und Jordan 1997).

Substanz	Brustdrüse	Uterus	Knochen
17 $\beta$ -Estradiol Ethinylestradiol	Agonist	Agonist	Agonist
Tamoxifen	Antagonist	Partialagonist	Agonist
Raloxifene	Antagonist	Antagonist	Agonist
ICI 164384 ICI 182780	Antagonist	Antagonist	Antagonist

**Tab. 5.1:** Gewebespezifische Wirkungen verschiedener Estrogenrezeptorliganden; basierend auf präklinischen Studien (nach Bryant und Dere 1998).

In den Untersuchungen dieser Arbeit eignete sich ICI daher zur Antagonisierung estrogenrezeptorsubtypspezifischer Effekte von ERA, ERB und GEN, um die mechanistische Wirkungsweise dieser Substanzen genauer charakterisieren zu können.

### 5.3 Gewebeselektive Effekte des Phytoestrogens Genistein

Aufgrund der Tatsache, dass es zu den Einflüssen von Estrogenen und Phytoestrogenen im Gefäßsystem noch sehr wenige Untersuchungen gibt, sollten im Rahmen dieser Arbeit die gewebespezifischen Einflüsse von Estradiol und Genistein auf die Genexpression von Cox-2 analysiert werden.

Estradiol und Progesteron regulieren die Prostaglandinsynthese in Endometrium (Arosh et al. 2002) und Ovar (Arosh et al. 2004) und zwar über eine Veränderung der Expression von Cox-2 (Arosh et al. 2004). Auch im Herzkreislaufsystem scheint die Regulation der Expression von Cox-2 teil der über Estradiol vermittelten protektiven Effekte in Aorten zu sein, die hypercholesterinämischen physiologischen Bedingungen ausgesetzt sind (Ghanam et al. 2000).

Phytoestrogene scheinen ebenso wie Estrogene im Gefäßsystem protektive Effekte zu vermitteln. So konnte in tierexperimentellen und klinischen Studien gezeigt werden, dass das Phytoestrogen Genistein die endotheliale Funktion verbessert (Squadrito et al. 2003) und im Endothel schützende Einflüsse ausübt (Mäkelä et al. 1999).

Somit könnte die Regulation der Genexpression von Cox-2 und der Prostaglandinsynthese durch estrogen wirksame Substanzen eine Erklärung für die protektiven Effekte dieser Stoffe im Herz-Kreislaufsystem sein.

Die Einflüsse von Estradiol und Genistein auf die Proteinexpression von Cox-2 wurde in den Untersuchungen dieser Arbeit vergleichend im Uterus und der *Vena cava* betrachtet. Die *Vena cava* wurde ausgewählt, da dieses Gewebe sehr sensitiv auf eine Behandlung mit Estrogenen reagiert (Knauth et al. 1996, Hegele-Hartung et al. 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cox-2 Proteinexpression im Uterus ovariectomierter Ratten durch Estradiol gesteigert wurde (Abb. 4.2). Die Proteinexpression dieses Entzündungsmarkers in der *Vena cava* dieser Tiere wurde hingegen durch die Applikation von E<sub>2</sub> vermindert. Dieses Ergebnis war in Übereinstimmung mit der Analyse der mRNA-Expression von Cox-2 in den Geweben dieser Tiere. Auch hier kam es durch die Applikation von E<sub>2</sub> zu einer gesteigerten Genexpression von Cox-2 im Uterus, während gleichzeitig eine verminderte mRNA-Expression in der *Vena cava* zu beobachten war (Hertrampf et al. 2005). Im Gegensatz zu Estradiol konnte für Genistein im Uterus kein signifikanter Einfluss auf die Genexpression von Cox-2, weder auf Proteinebene

(Abb. 4.2), noch auf mRNA-Ebene (Hertrampf et al. 2005), gezeigt werden. In der *Vena cava* hingegen konnte für Genistein ein estrogener Einfluss auf die Genexpression von Cox-2 beobachtet werden. Hier kam es, ebenso wie nach einer Behandlung mit Estradiol, auch durch die Applikation von Genistein zu einer reduzierten Genexpression von Cox-2 (Abb. 4.2), was ebenfalls durch mRNA Analysen belegt werden konnte (Hertrampf et al. 2005).

Dies deutet darauf hin, dass bezogen auf die Genexpression von Cox-2 in diesen beiden Geweben unterschiedliche Mechanismen für den Einfluss von Estradiol von Bedeutung sind. Tatsächlich konnte bereits gezeigt werden, dass mindestens zwei verschiedene molekulare Regulationsmechanismen bei der Cox-2 mRNA Expression eine Rolle spielen. So kann Cox-2 über die Modulation der Transkriptionsrate (Dixon et al. 2000) und alternativ über posttranskriptionelle Regulationsmechanismen der mRNA-Stabilität (Dixon et al. 2001) reguliert werden. Ob diese unterschiedlichen Mechanismen als Erklärung für die gegensätzliche Regulation von Cox-2 durch Estradiol in den hier beschriebenen Untersuchungen dienen kann, sollte in weiterführenden Untersuchungen geklärt werden. An cerebralen Gefäßen konnte unter inflammatorischen Bedingungen gezeigt werden, dass die Hemmung der Cox-2 Expression in der *Vena cava* durch E<sub>2</sub> induziert wird (Ospina et al. 2004), was in Übereinstimmung mit den beschriebenen Ergebnissen dieser Arbeit ist (Abb. 4.2).

Im Gegensatz zu Estradiol führte eine Behandlung mit Genistein nicht zu einer gesteigerten Genexpression von Cox-2 im Uterus, allerdings zu einer effizienten Herabregulation dieses Gens in der *Vena cava* (Abb. 4.2). Interessanterweise konnte für das SERM Tamoxifen ebenfalls diese gegensätzliche Beeinflussung der Expression von Cox-2 in *Vena cava* und Uterus beobachtet werden (Hertrampf et al. 2005). Die effiziente Herabregulation von Cox-2 in der *Vena cava* durch GEN konnte sogar für sehr niedrige Dosierungen (0,5 mg/kg KGW) dieses Phytoestrogens beobachtet werden (Hertrampf et al. 2005). Bei dieser Dosierung konnten keine Effekte von GEN auf das Uterusfeuchtgewicht verzeichnet werden. Diese Beobachtungen stimmen mit Untersuchungen überein, in denen für GEN protektive Effekte im Gefäßsystem für Dosierungen beobachtet wurden, die keinerlei uterotrophe Effekte hervorriefen (Mäkelä et al. 1999). Verschiedene Studien belegen gewebespezifische Eigenschaften für GEN (Diel et al. 2001a, Diel et al. 2001b). Auch die hier untersuchten Effekte beschreiben für dieses Phytoestrogen die Eigenschaft, wie ein SERM zu wirken. Somit wäre bezogen auf die hier gezeigten



Ergebnisse die Bezeichnung Phyto-SERM für das Phytoestrogen Genistein eine zutreffende Charakterisierung.

#### **5.4 Untersuchungen estrogener Effekte von Genistein in Uterus und Brustdrüse**

Als klassischer Parameter zur Analyse der Estrogenität von Untersuchungssubstanzen dient ihr Einfluss auf das Uterusfeuchtgewicht und die Uterusepithelhöhe von ovariectomierten Ratten (Diel et al. 2006) oder Mäusen nach Applikation verschiedener Substanzen. Neben diesen klassischen Parametern wurden in dieser Arbeit auch die Effekte auf die Proliferation im Uterusepithel (Diel et al. 2006) und in der Brustdrüse (Hertrampf et al. 2006b) untersucht. Die Untersuchungen erfolgten an Gewebeproben von Ratten, die zuvor drei Tage oder drei Wochen mit den zu untersuchenden Substanzen behandelt wurden (siehe 2.7 und Abb. 2.2). Des Weiteren wurde in diesen Geweben als zusätzlicher Marker für Estrogenität molekularbiologisch die Genexpression des Progesteronrezeptors (Hertrampf et al. 2006b) herangezogen, und zur Analyse von gewebespezifischen Unterschieden wurde die Expression von Cox-2 immunhistochemisch untersucht (Hertrampf et al. 2005).

Ferner wurde in verschiedenen Untersuchungen der Einfluss von Genistein und Estradiol auf die Proliferation in den klassisch estrogensensitiven Geweben Uterus und Brustdrüse analysiert.

Die Modulation von Proliferation und Differenzierung in klassisch estrogensensitiven Geweben wie Uterus- und Brustdrüsengewebe wird über estrogene Wirkmechanismen gesteuert. Das hieraus resultierende hormonell bedingte karzinogene Potential (Hulka und Stark 1995), z.B. bei der Entstehung von Mammakarzinomen (Thomas et al. 1997, Clemons und Goss 2001), wird vor allem für Phytoestrogene kontrovers diskutiert (Peeters et al. 2003, Adlercreutz 2002). Auf der einen Seite können diese Substanzen anhand ihrer antikarzinogenen (Peeters et al. 2003) und chemopräventiven (Lamartiniere 2000, Cotroneo et al. 2002, Rowell et al. 2005) Eigenschaften charakterisiert werden. Andererseits darf nicht außer Acht gelassen werden, dass Phytoestrogene auch „estrogenes“ Potential besitzen. Dies erschwert die Einschätzung der karzinogenen Eigenschaften dieser Substanzen. Außerdem spielt in diesem Zusammenhang die hormonelle Situation des Organismus, in dem Phytoestrogene untersucht werden (Bouker und Hilakivi-Clarke

2000), eine wesentliche Rolle. Hierbei scheint es von Bedeutung zu sein, wie man diese Substanzen dosiert (Wang et al. 1996, Bouker und Hilakivi-Clarke 2000) und ob es sich um gesundes oder bereits entartetes Gewebe handelt, in dem man die Einflüsse von Phytoestrogenen behandelt. Hinzu kommt, dass man bei der Beurteilung dieser Substanzen neben ihren hormonellen Effekten auch ihre nicht-genomischen antikarzinogenen Eigenschaften berücksichtigen muss, was eine allgemeingültige Bewertung des karzinogenen Potentials dieser Pflanzeninhaltsstoffe weiter erschwert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zusätzlich zu gewebespezifischen Eigenschaften das karzinogene Potential des Phytoestrogens Genistein in den klassisch estrogensensitiven Geweben Uterus und Mamma untersucht. Hierbei sollten zum einen die agonistischen Einflüsse von Genistein auf die Proliferation in diesen Geweben mit denen von Estradiol verglichen, und darüber hinaus auch mögliche antagonistische Effekte von Genistein auf die durch Estradiol vermittelten Wachstumsprozesse im Endometrium untersucht werden.

#### **5.4.1 Estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf Uterusfeuchtgewicht und Uterusepithelhöhe**

Die für Estradiol allgemein bekannte starke Induktion uterotropher Wachstumsparameter und Genexpressionsmuster in ovariectomierten Ratten (Diel et al. 2004b, Diel et al. 2005, Diel et al. 2006) konnte auch in den uterotrophen Assays dieser Arbeit beobachtet werden.

Abbildung 4.9 zeigt, dass die Stimulation des Uterusfeuchtgewichts ovariectomierter Ratten durch Estradiol über den ER $\alpha$  vermittelt zu sein scheint. Eine Behandlung mit ERB führte im Gegensatz zu der Applikation des ERA zu keinem signifikanten Anstieg dieses Parameters. Der Effekt des ERA konnte durch das Antiestrogen ICI antagonisiert werden. Diese Ergebnisse bestätigen ähnliche Befunde einer früheren Untersuchung mit diesen selektiven Agonisten (Hillisch et al. 2004). Im Einklang mit anderen Untersuchungen (Diel et al. 2001b, Diel et al. 2004b, Diel et al. 2006) ist der stimulierende Einfluss von Genistein auf das Uterusgewicht deutlich schwächer als der von E<sub>2</sub>. Ebenso wie der Effekt des ERA konnte auch der Einfluss von GEN durch eine Koberbehandlung mit ICI antagonisiert werden (Abb. 4.9), was darauf schließen lässt, dass auch die für Genistein beobachteten Effekte über den ER $\alpha$  vermittelt wurden.

In Uterusquerschnitten wurde morphologisch deutlich, dass die Einflüsse der Untersuchungssubstanzen auf das Uterusfeuchtgewicht (Abb. 4.9) mit der Uterusepithelhöhe und dem Uterusquerschnitt korrelieren (Abb. 4.10), was auch die Ergebnisse der Vermessung der Uterusepithelhöhen (Abb. 4.11) widerspiegeln. Die Daten belegen, dass die Behandlung ovarektomierter Ratten mit  $E_2$  und ERA nicht nur zu einer signifikanten Erhöhung des Uterusepithels gegenüber OVX-Tieren, sondern auch zu einer signifikant stärkeren Ausprägung dieses Parameters gegenüber der GEN-Gruppe geführt hat (Abb. 4.11).

Eine Behandlung mit Genistein führte im Vergleich zu der Applikation von ERA und  $E_2$  zu einer geringeren Zunahme des Uterusfeuchtgewichts und zu einer signifikant schwächeren Induktion der Uterusepithelhöhe. Dies kann auf die deutlich schwächere Affinität von GEN zum  $ER\alpha$  und das gegenüber ERA und  $E_2$  reduzierte Transaktivierungspotential dieses Phytoestrogens zurückzuführen sein (Kuiper et al. 1997, Hillisch et al. 2004). Mechanistisch könnte dies zwar eine mit  $E_2$  vergleichbare Wassereinlagerung, aber eine deutlich reduzierte Stimulation der Proliferationsrate (Hertrampf et al. 2006b, Diel et al. 2006) zur Folge haben und sich somit in einer reduzierten Induktion der Parameter Uterusfeuchtgewicht und Uterusepithelhöhe widerspiegeln.

Bezogen auf den biphasischen Verlauf der Zunahme des Uterusfeuchtgewichts durch estrogene Substanzen (Hewitt et al. 2003) ist für die schwache Induktion des Uterusfeuchtgewichts durch Genistein beschrieben worden, dass es sich hierbei in erster Linie um eine Wassereinlagerung in das uterine Gewebe und weniger um eine Gewichtsinduktion durch eine gesteigerte Proliferation handelt (Diel et al. 2004b).

#### **5.4.2 Gewebespezifische Effekte des Phytoestrogens Genistein in der Brustdrüse**

Verschiedene Untersuchungen belegen, dass Estrogene eine Rolle bei der Entstehung und dem Wachstum von Mammakarzinomen spielen. Das Tumorstadium könnte hier in einem Gewebe, dessen Regulation von Wachstum und Funktion unter normalen Bedingungen der endokrinen Kontrolle unterliegt, durch eine verstärkte hormonelle Stimulation begünstigt und induziert werden (Henderson et al. 1982). Obwohl die genauen molekularen Mechanismen, die zur Entstehung von Brustkrebs führen, noch nicht genau untersucht sind, wird der Stimulation der Proliferation in diesem Gewebe eine Schlüsselrolle zugesprochen (Lupulescu 1995). Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass zusätzlich zu Estrogenen auch Xenoestrogene

und supraphysiologische Phytoestrogenapplikationen diesen Prozess begünstigen (Bouker und Hilakivi-Clarke 2000, Hu 2004).

Zur Charakterisierung des Phytoestrogens Genistein bezüglich seines karzinogenen Potentials in nicht-malignem Brustdrüsengewebe von Tieren mit niedrigen Estrogenspiegeln, die die Situation gesunder postmenopausaler Frauen widerspiegeln, wurden ovariectomierte Ratten im Rahmen dieser Arbeit über einen Zeitraum von drei Tagen subkutan mit Genistein oder mit E<sub>2</sub> behandelt. Im Western Blot wurde die Genexpression des Proliferationsmarkers PCNA (Iatropoulos und Williams 1996) und des estrogenresponsiven Gens des Progesteronrezeptors (Savouret et al. 1991) im Brustdrüsengewebe untersucht. Wie in Abbildung 4.1 deutlich wird, bewirkte die Behandlung ovariectomierter Ratten mit GEN und E<sub>2</sub> einen Anstieg der PCNA-Expression in diesem Gewebe. Der Einfluss von GEN (zweifache Induktion) war allerdings deutlich geringer als der von E<sub>2</sub> (vierfache Induktion) (Abb. 4.1). Auf mRNA-Ebene und immunhistochemisch konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die Proliferation im Brustdrüsengewebe dieser Tiere durch E<sub>2</sub> deutlich stärker induziert wurde als durch GEN (Hertrampf et al. 2006b). Im Gegensatz zur Untersuchung der Proteinebene (Abb. 4.1) konnte auf mRNA-Ebene für GEN eine Stimulation der Expression des Gens des Progesteronrezeptors gezeigt werden (Hertrampf et al. 2006b). Somit konnte ebenso wie nach einer dreiwöchigen Behandlung (Abb. 4.11), auch für eine dreitägige subkutane Applikation von Genistein in einer Dosierung von 10 mg/kg KGW gezeigt werden, dass dieses Phytoestrogen nicht nur im Uterus (Diel et al. 2004b, Hertrampf et al. 2005), sondern auch im Brustdrüsengewebe deutlich schwächere Einflüsse auf estrogen vermittelte Proliferationsprozesse hat als Estradiol (Hertrampf et al. 2006b).

Bei der Interpretation dieser Ergebnisse muss beachtet werden, dass die subkutan verabreichte Dosis von 10 mg/kg KGW ebenso starke Wirkungen auf die untersuchten Parameter in der ovariectomierten Ratte hervorgerufen hat, wie oral applizierte Dosen von 100 und 200 mg/kg KGW (Hertrampf et al. 2006b). Die Applikationsform (oral oder subkutan) hat also deutlichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit dieses Phytoestrogens (Ashby 2001). Demnach wurden den Tieren in diesen Untersuchungen deutlich höhere Dosen an Genistein verabreicht als sie mit einer isoflavonreichen Ernährung in ostasiatischen Ländern aufgenommen werden (Nagata et al. 1998a, Chen et al. 1999b, Nakamura et al. 2000, Degen et al. 2002a).

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass Genistein zwar die Genexpression in der Brustdrüse beeinflusste, sein Einfluss auf die Stimulation der Proliferation in nicht-malignem Brustgewebe allerdings sehr gering war. Genistein vermag scheinbar in gesundem Brustdrüsengewebe nicht in ausreichendem Maße die molekularen Mechanismen, die zu einer gesteigerten Proliferation führen, zu aktivieren. Eine mögliche Erklärung, warum Genistein in Tumormodellen bei Mäusen (Ju et al. 2001, Allred et al. 2004b) oder Ratten (Allred et al. 2004a) und in Brustkrebszelllinien (Hsieh et al. 1999, Allred et al. 2001) das Wachstum von Mammakarzinomen und Brustkrebszellen weiter fördert, könnte darin begründet sein, dass unter diesen pathophysiologischen Bedingungen die molekularen Mechanismen der Gewebemöostase verändert sind.

Ob das Phytoestrogen Genistein allerdings bei der Behandlung von postmenopausalen Beschwerden eine sichere Alternative zur HET darstellt, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht endgültig geklärt werden, denn im Gegensatz zu ovariectomierten Ratten sind im Blutserum postmenopausaler Frauen weiterhin physiologisch relevante Estrogenspiegel nachweisbar. Daher sollte in weiteren Untersuchungen die kombinierte Applikation von Estradiol und Genistein untersucht werden, um zu analysieren, ob es durch das Phytoestrogen Genistein in Kombination mit E<sub>2</sub> zu additiven oder antagonistischen Effekten auf Proliferationsprozesse in der Brustdrüse kommt.

#### **5.4.3 Kombinatorische Effekte von Genistein und Estradiol im Uterus**

Während der Menopause und darüber hinaus kommt es zwar zu einem Absinken der endogenen Estrogenproduktion in den Ovarien, aber ca. 3-5% der prämenopausalen Estradiolspiegel bleiben erhalten, da z.B. auch das Fettgewebe einen der peripheren Orte der endogenen Estradiolproduktion darstellt (Simpson et al. 1999, Meseguer et al. 2002, Purohit und Reed 2002). Bei der Untersuchung von Phytoestrogenen als alternative Behandlungssubstanzen für postmenopausale Beschwerden sollte daher die Anwesenheit von niedrigen Estrogenspiegeln berücksichtigt werden.

Da es kaum Studien gibt, die die Einflüsse von Genistein auf proliferative Prozesse im Endometrium in Anwesenheit von Estrogenen beschrieben haben, war es ebenfalls Teil der Untersuchungen dieser Arbeit, diesen physiologischen Zustand im Tiermodell zu untersuchen. Hierbei sollte der Frage nachgegangen werden, ob Genistein die durch Estradiol gesteigerte Proliferation des Endometriums additiv

stimuliert, reprimierend antagonisiert oder keinerlei Einfluss ausübt. Um dieser Frage nachzugehen, wurden zwei verschiedene Ansätze verfolgt. Zum einen wurden zyklussynchronisierte, SHAM-operierte intakte Tiere mit Genistein behandelt und zum anderen wurden ovariectomisierte Tiere in Kombination mit verschiedenen Dosen  $E_2$  und mit GEN behandelt. Als Kontrollen dienten unbehandelte SHAM- und OVX-Tiere und ovariectomisierte Tiere, die ausschließlich mit verschiedenen  $E_2$  Dosen substituiert wurden (siehe Tab. 2.3, Tierexperiment 2).

Betrachtete man zunächst den Einfluss auf das Uterusfeuchtgewicht (Abb. 4.6), wurde auch hier wieder deutlich, dass die Behandlung ovariectomierter Tiere mit Genistein (10 mg/kg KGW) zu einer messbaren Zunahme dieses Parameters führte (vgl. Abb. 4.9). Das Uterusfeuchtgewicht SHAM-operierter intakter Tiere wurde durch die Behandlung mit Genistein allerdings nicht beeinflusst. Auch in den mit Estradiol behandelten OVX-Gruppen führte die kombinierte Applikation mit Genistein zu keiner Veränderung (Abb. 4.6). Betrachtete man allerdings den weitaus sensitiveren Parameter der Uterusepithelhöhe innerhalb dieser Behandlungsgruppen, so wurde deutlich, dass GEN (10 mg/kg KGW) bei einer Kobehandlung mit  $E_2$  (4 $\mu$ g/kg KGW) einen antiestrogenen Einfluss hatte (Diel et al. 2006). Es kam zu einer signifikanten Antagonisierung der Stimulation der Uterusepithelhöhe, die bei einer niedrigen Estradioldosis (1 $\mu$ g/kg KGW/T) tendenziell stärker ausgeprägt war als bei der höheren Dosierung (4 $\mu$ g/kg KGW/T). Die Behandlung intakter und ovariectomierter Tiere mit GEN blieb hier ohne signifikanten Einfluss (Diel et al. 2006). Somit vermochte GEN teilweise den durch  $E_2$  induzierten Anstieg der Uterusepithelhöhe zu antagonisieren, während für den Parameter des Uterusfeuchtgewichts keine derartige Antagonisierung durch GEN zu beobachten war (Diel et al. 2006).

Betrachtete man darüber hinaus die PCNA-Proteinexpression im Uterusepithel der Behandlungsgruppen (Abb. 4.7 und 4.8), so wurde deutlich, dass eine Behandlung intakter Tiere mit GEN zu einer deutlich reduzierten PCNA-Expression führte. Auch bei der mRNA-Expression von PCNA vermittelte die Applikation von Genistein antiestrogene Effekte in intakten Tieren (Diel et al. 2006). Ebenso wie in intakten Tieren bewirkte die Kobehandlung ovariectomierter Tiere mit  $E_2$  und GEN eine Antagonisierung der durch Estradiol vermittelten Stimulation der Proliferation von Uterusepithelzellen auf Proteinebene (Abb. 4.7 und 4.8). In unbehandelten OVX-Tieren führte GEN zu einer leichten Erhöhung der Proliferation, die jedoch

signifikant schwächer war als in den mit E<sub>2</sub> substituierten und unbehandelten intakten Tieren (Abb. 4.8). Somit vermittelte das Phytoestrogen Genistein, wenn es alleine oder in Kombination mit Estradiol verabreicht wurde, je nach untersuchtem Parameter agonistische und antagonistische Effekte im Uterus. Diese *in vivo* Beobachtungen im Neger decken sich mit Untersuchungen an Epithelzellen des humanen Endometriums (Kayisli et al. 2002). Wurden die Zellen in diesen Untersuchungen nur mit GEN behandelt, wurde die Proliferation der in Kultur gehaltenen Zellen stimuliert. Wurden die Zellen in Kombination mit GEN und E<sub>2</sub> behandelt, so wurde die über E<sub>2</sub> vermittelte Stimulation der Zellproliferation durch die Anwesenheit von GEN antagonisiert (Kayisli et al. 2002).

Im Wesentlichen belegen diese Ergebnisse, dass GEN in Bezug auf Wachstum und Proliferation keine additiven, sondern ganz im Gegenteil sogar antagonistische Effekte neben Estradiol zeigt, was die Ergebnisse bereits durchgeführter Untersuchungen (Diel et al. 2001b, Diel et al. 2004b) stützt. Somit stellt Genistein in Bezug auf proliferative Prozesse im Endometrium im Gegensatz zu Estradiol eine Substanz mit deutlich eingeschränktem karzinogenem Potential dar. Durch Genistein werden lediglich zu einem frühen Zeitpunkt des biphasischen Verlaufs während des Wachstumsprozesses im Endometrium (Hewitt et al. 2003) leichte Effekte induziert, die nicht auf Mechanismen der Zellproliferation beruhen (Diel et al. 2001b, Diel et al. 2004b, Diel et al. 2006).

## **5.5 Estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf die Körpergewichtsentwicklung**

Bislang liegen nur sehr wenige Untersuchungen vor, die die genauen Mechanismen und Zusammenhänge estrogener Einflüsse auf den Fettstoffwechsel beschreiben. Es wurden in diesem Zusammenhang bereits verschiedene Einflüsse von Estrogenen auf die Körperfettverteilung und den Fettstoffwechsel untersucht (Bjorntorp 1997, Campbell und Febbraio 2001, Chen et al. 2005). Die Körpergewichtszunahme stellt ein bekanntes Resultat physiologischer Veränderungen menopausaler und postmenopausaler Frauen dar, deren Ursache im Estrogenmangel zu suchen ist und daher mit einer HET erfolgreich therapiert werden kann (Sorensen et al. 2001, Delibasi et al. 2006 ). Die aus einem Estrogenmangel resultierenden Veränderungen des Fettstoffwechsels stellen darüber hinaus eine wesentliche Ursache für das vermehrte Auftreten von Herz-Kreislaufkrankungen bei postmenopausalen Frauen dar (Stevenson 1995, Chen et al. 2005).

Vor diesem Hintergrund wurden auch im Rahmen dieser Arbeit die Einflüsse von estrogen wirksamen Substanzen auf die Körpergewichtszunahme untersucht. Hierbei wurde im Langzeitversuch deutlich, dass der Körpergewichtszuwachs von weiblichen Ratten durch eine Ovariectomie signifikant gesteigert wurde. Während die OVX-Tiere in diesem Versuchszeitraum um 30% schwerer wurden, lag der Körpergewichtszuwachs der SHAM-Tiere nur bei 20% (Abb. 4.3). Der Anstieg des Körpergewichts konnte ebenfalls durch körperliche Aktivität reduziert werden. In Abbildung 4.3 wird deutlich, dass die Lauftiere aller Behandlungsgruppen im Vergleich zur entsprechenden Kontrollgruppe einen um ca. 5-10% reduzierten Körpergewichtszuwachs aufwiesen. Somit kam es bedingt durch eine Ovariectomie zu einem um ca. 10% erhöhten signifikanten Körpergewichtszuwachs, der durch eine Substitution mit Estradiol und zusätzlich durch körperliche Aktivität antagonisiert werden konnte (Abb. 4.3) (Hertrampf et al. 2006a). Hierbei handelte es sich offensichtlich um zwei voneinander unabhängige Prozesse, die additiv den Parameter des Körpergewichtszuwachses beeinflussten.

Diese Beobachtungen gehen einher mit denen anderer Untersuchungen, die zeigen konnten, dass die signifikante Körpergewichtszunahme ovariectomierter Ratten gegenüber SHAM-Tieren durch eine Estradiolsubstitution aufgehoben werden kann (Wang et al. 2004, McCormick et al. 2004). Ein wesentlicher hormoneller Effekt



scheint in diesem Zusammenhang der Einfluss von Estradiol auf die Mobilisation von Fettsäuren in Fettzellen zu sein (Lacasa et al. 1991, Giudicelli et al. 1993), was ebenfalls indirekt bei der Analyse der Einflüsse einer HET auf die Lipidspiegel bei postmenopausalen Frauen deutlich wird (Sumino et al. 2003). Weitere estrogene Einflüsse konnten für die Genexpression auf mRNA-Ebene in braunem und weißem Fettgewebe und im Skelettmuskel von Ratten beschrieben werden (Pedersen et al. 2001). Estrogene erhöhen die Leptinserumspiegel und die Leptin mRNA-Expression im Fettgewebe von Ratten (Tanaka et al. 2001). Es konnte vor kurzem gezeigt werden, dass der hormonell bedingte Gewichtszuwachs nach einer Ovariectomie mit Genexpressionsmustern des Fettstoffwechsels im Fettgewebe und im Skelettmuskel korreliert (Kamei et al. 2005). Bezogen auf den gezeigten Einfluss von körperlicher Aktivität nach einer Ovariectomie konnten verschiedene Studien an Ratten einen antagonisierenden Einfluss auf den Gewichtszuwachs zeigen, der auch ohne den Einfluss von hormoneller Substitution zu beobachten war (Shinoda et al. 2002, Hertrampf et al. 2006a).

Neben den Einflüssen von Estradiol und körperlicher Aktivität wurden in den Untersuchungen dieser Arbeit ebenfalls estrogenrezeptorsubtypspezifische Einflüsse auf die Entwicklung des Körpergewichts beobachtet. In einem dreiwöchigen Experiment (siehe 2.7, Tierexperiment 4) konnte gezeigt werden, dass der Einfluss von Estradiol über den ER $\alpha$  vermittelt wird. Die Behandlung ovariectomierter Ratten mit ERA führte hier zu einer mit E<sub>2</sub> vergleichbaren Reduktion des Körpergewichtszuwachses und konnte durch ICI antagonisiert werden (Abb. 4.12). Eine Behandlung ovariectomierter Ratten mit ERB hatte keinen Einfluss auf diesen Parameter (Abb. 4.12).

Dieses Ergebnis wird durch Studien an Mäusen mit ausgeschaltetem Estrogenrezeptorsubtyp (ERKO) bestätigt. In diesen Tieren konnte gezeigt werden, dass der Lipidstoffwechsel, die hiermit verbundene Genexpression im Fettgewebe und der Körperfettanteil, sowie das Körpergewicht über ER $\alpha$ -spezifische Wirkmechanismen reguliert werden (Ohlsson et al. 2000, Heine et al. 2000, Mueller et al. 2001, Lemieux et al. 2005). Auch Studien mit anderen selektiven Estrogenrezeptoragonisten zeigten, dass der estrogene Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung ovariectomierter Ratten über den ER $\alpha$  vermittelt ist, während auch hier ER $\beta$ -selektive Agonisten keinen Effekt zeigten (Harris et al. 2002, Roesch 2006). Am Menschen konnte im Hinblick auf die Körperfettverteilung und

Mechanismen der Lipolyse *in vivo* und *in vitro* ebenfalls gezeigt werden, dass hier estrogene Einflüsse über den ER $\alpha$  vermittelt werden (Pedersen et al. 2004).

Die Tatsache, dass Genistein weder über die orale Aufnahme im Langzeitversuch (Abb. 4.3), noch nach dreiwöchiger subkutaner Applikation (Abb. 4.12) Effekte auf das Körpergewicht in OVX-Tieren hatte, stimmt mit Beobachtungen überein, die belegen, dass Isoflavone keine statistischen und klinischen Einflüsse auf Serumlipide haben (Yeung und Yu 2003). Andere Untersuchungen mit oralen Isoflavonapplikationen belegen ebenfalls und in Übereinstimmung mit den Ergebnissen dieser Arbeit für OVX-Tiere, dass eine tägliche Isoflavonaufnahme von ca. 10 mg/Tier/T (bestehend aus 1,3 mg Genistein, 5,6 mg Daidzein und 3,1 mg Glycitein) im Gegensatz zu der Applikation von Estradiol keinen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung ovariectomierter Ratten hat (Lee et al. 2004). Auch die Tatsache, dass der ER $\beta$  keinen Einfluss auf die Körpergewichtsentwicklung hatte (Abb. 4.12) und dass Genistein eine vielfach höhere Bindungsaffinität zum ER $\beta$  aufwies (Kuiper et al. 1997), könnte darauf schließen lassen, dass Genistein hier über seine geringere Affinität zum ER $\alpha$  keinen Einfluss auf diesen Parameter hatte.

Im Gegensatz zu jüngsten Untersuchungen an ovariectomierten Mäusen (Kim et al. 2006) wurde in dieser Arbeit an Ratten weder eine reduzierte Futteraufnahme (siehe 4.2.1), noch ein reduziertes Körpergewicht nach oraler Aufnahme von Genistein über das Futter beobachtet (Abb. 4.3). An Mäusen sind dagegen für hohe Genisteindosen signifikante protektive Einflüsse auf das Fettgewebe und den Fettstoffwechsel gezeigt worden (Naaz et al. 2003). Zukünftige Studien sollten daher untersuchen, ob diese unterschiedlichen Beobachtungen auf Speziesunterschiede oder die verschiedenen Dosierungen von Genistein innerhalb der unterschiedlichen Studien zurückzuführen sind. Für eine orale Aufnahme von 10 mg/Tier/T (Genistein, Daidzein, Glycitein) (Lee et al. 2004) und 27 mg/kg KGW/T (Genistein, Daidzein) (Hertrampf et al. 2006a) konnten an Ratten keine Effekte beobachtet werden, während eine orale Genisteinaufnahme von 1,5 mg/kg KGW/T in Mäusen zu signifikanten Effekten führte (Kim et al. 2006). Im Gegensatz zu den Untersuchungen an OVX-Tieren in dieser Arbeit konnte eine Studie mit postmenopausalen Frauen für die Ingestion von Genistein „protektive Einflüsse“ auf das Körpergewicht und den Körperfettanteil untersuchen (Goodman-Gruen und Kritz-Silverstein 2003).

## **5.6 Einflüsse estrogener Substanzen auf den Bewegungstrieb ovarektomierter Ratten**

Steroidhormone und ihre Rezeptoren vermitteln diverse neuroendokrinologische Einflüsse (Ozawa 2005). Vor diesem Hintergrund zählen zu den Beschwerden menopausaler und postmenopausaler Frauen auch Antriebslosigkeit und Depressionen. In Bezug auf den hormonell bedingten Gewichtszuwachs postmenopausaler Frauen ist daher auch der Einfluss von Estrogenen auf den Bewegungsantrieb von Bedeutung.

Der Bewegungsantrieb intakter SHAM-operierter Ratten wurde durch eine Ovariectomie um ca. 80% reduziert (Abb. 4.4). Diese signifikant reduzierte freiwillige Laufaktivität ovarektomierter Ratten konnte durch die Applikation von Estradiol wieder auf das Niveau von SHAM-Tieren angehoben werden (Abb. 4.4), was den estrogenen Einfluss auf den Bewegungsantrieb in diesem Tiermodell verdeutlicht. Mit dem Futter aufgenommene Phytoestrogene hatten in den hier verfütterten Mengen (siehe 4.2.1) keinen Einfluss auf die Laufaktivität von OVX-Tieren (Abb. 4.4).

Während der dreiwöchigen Applikation von verschiedenen estrogenen Substanzen konnte ebenfalls der stimulierende Einfluss von Estradiol auf den Laufantrieb ovarektomierter Tiere gezeigt werden (Abb. 4.13). Hier wurde zusätzlich deutlich, dass der Einfluss von Estradiol über den ER $\alpha$  vermittelt wird, denn die Applikation des ERA führte zu einer mit E<sub>2</sub> vergleichbaren Stimulation des Laufantriebes und konnte durch die Koapplikation mit ICI antagonisiert werden (Abb. 4.13). Die Applikation von ERB führte zu einer leichten, aber statistisch nicht signifikanten Reduktion der Laufaktivität von OVX-Tieren. Diese Beobachtungen werden durch Untersuchungen an ER $\beta$ KOs gestützt, die zeigen konnten, dass der Einfluss von Estradiol auf die Laufaktivität von Mäusen über den ER $\alpha$  vermittelt wird, während Estradiol in ER $\alpha$ KOs keinen stimulierenden Einfluss auf den Laufantrieb hatte (Ogawa et al. 2003). Da die Einflüsse von Estradiol auf die Laufaktivität über die mPOA (medial preoptic area) vermittelt werden, deren Neurone sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  exprimieren (Tanaka et al. 2003, Ogawa et al. 2003), sprechen die Ergebnisse dieser Arbeit dafür, dass ERA, ERB und GEN die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Im Gegensatz zu den oral aufgenommenen 14 mg/kg KGW Genistein (Abb. 4.4) hatte die subkutane Applikation von 10 mg/kg KGW einen signifikanten

reduzierenden Einfluss auf den Bewegungsantrieb ovariectomierter Ratten (Abb. 4.13). Eine Kobehandlung von Genistein und ERA führte zu einer vollständigen Antagonisierung des stimulierenden Einflusses von ERA auf die Laufaktivität (Abb. 4.20). Der ERB hatte hier ebenso wie ICI auch einen antagonistischen Einfluss auf die Stimulation des Bewegungsantriebs durch den ERA (Abb. 4.20). Somit wurde die über Estrogene vermittelte Induktion des Bewegungstriebes durch den ER $\alpha$  vermittelt, während Genistein und der ERB antagonistische Einflüsse vermittelten, die in ihrem Ausmaß mit dem Einfluss von ICI vergleichbar waren. Derartige antiestrogene Effekte konnten für ERB und GEN, bezogen auf das Uterusfeuchtgewicht, hingegen nicht beobachtet werden (Abb. 4.19). Untersuchungen an ovariectomierten Mäusen, die mit Estrogenen und dem Phytoestrogen Coumestrol behandelt wurden, konnten ebenfalls zeigen, dass Coumestrol den stimulierenden Einfluss von Estrogenen auf den Laufantrieb dieser Mäuse antagonisiert (Garey et al. 2001). Auch Coumestrol stellt eine Substanz dar, die eine höhere Affinität zum ER $\beta$  als zum ER $\alpha$  hat (Kuiper et al. 1997). Somit deuten die Ergebnisse darauf hin, dass der Bewegungsantrieb über die Aktivierung des ER $\alpha$  in den Neuronen der mPOA stimuliert wird, während durch die Aktivierung von ER $\beta$  über ER $\beta$ -selektive Agonisten und Phytoestrogene wie Genistein und Coumestrol die Stimulation des Bewegungsantriebes antagonisiert wird. Gestützt wird diese Hypothese durch Untersuchungen, die zeigten, dass Genistein im Gehirn antiestrogene Effekte über den ER $\beta$  vermittelt, während die zentralen Einflüsse von Genistein auf den ER $\alpha$  zu vernachlässigen sind (Patisaul et al. 2002). Außerdem konnte an ovariectomierten Ratten anhand von neuropsychopharmakologischen Studien gezeigt werden, dass ER $\beta$ -selektive Estrogenrezeptormodulatoren das ängstliche Verhalten dieser Tiere abschwächen (Walf und Frye 2005) und in einem Tiermodell, welches zur Untersuchung von depressivem Verhalten entwickelt wurde, antidepressive estrogene Effekte über den ER $\beta$  vermitteln (Walf et al. 2004). Zusammenfassend deuten diese Ergebnisse darauf hin, dass Genistein und ER $\beta$ -selektive Agonisten antiestrogene Effekte in der mPOA über den ER $\beta$  vermitteln und somit keinen stimulierenden Einfluss auf den Bewegungsantrieb haben. Allerdings werden über den ER $\beta$  im Hippocampus antidepressive agonistische Effekte vermittelt (Walf und Frye 2006). Genistein könnte daher aufgrund seiner hier gezeigten ER $\beta$ -selektiven Wirkung im Gehirn im Hinblick auf die Behandlung postmenopausaler Depressionen von Bedeutung sein.

## **5.7 Analyse protektiver estrogenen Effekte auf Knochendichteverluste nach einer Ovariectomie**

Estrogene spielen eine komplexe Rolle bei der Regulation homöostatischer Prozesse im Knochengewebe (Turner et al. 1994b, Riggs et al. 2002, Balasch 2003). Im Wesentlichen sind hier steroidale Einflüsse auf Knochenvorläuferzellen, aber auch Effekte auf ausdifferenzierte Osteoblasten, Osteoklasten und Osteozyten von Bedeutung (Turner et al. 1994b). Dies ist der Grund dafür, dass neben natürlichen Alterungsprozessen vor allem niedrige Estrogenspiegel zur Ausprägung einer postmenopausalen Osteoporose beitragen (Richelson et al. 1984). Mit der Erkenntnis, dass die verschiedenen Zelltypen des Knochengewebes Estrogenrezeptoren exprimieren und hierüber eine Vielzahl an protektiven Interaktionen zwischen Estrogenen und Knochenzellen vermittelt werden (Weitzmann und Pacifici 2006), gerieten auch estrogenrezeptorsubtypspezifische Wirkungsweisen und die Analyse der Einflüsse von Phytoestrogenen auf die Knochenhomöostase in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses vieler Endokrinologen.

Vor diesem Hintergrund und mit Berücksichtigung der Tatsache, dass auch mechanische Reize sowohl im Tiermodell (Yeh et al. 1993, Wu et al. 2004b), als auch beim Menschen (Balasch 2003, Borer 2005, Shipp 2006) Effekte auf die Knochenhomöostase haben, wurden in dieser Arbeit die Einflüsse von estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden und von Genistein in An- und Abwesenheit von körperlicher Aktivität untersucht. Die ovariectomierte Ratte, als Modellorganismus für Untersuchungen der postmenopausalen Osteoporose (Kalu 1991) war für diese Studien gut geeignet.

In Bezug auf den Einfluss von mechanischen Reizen (Proctor et al. 2000) konnte hier gezeigt werden, dass den durch eine Ovariectomie bedingten Knochendichteverlusten in diesem Tiermodell bereits durch moderate Bewegungsumfänge entgegengewirkt werden kann (Abb. 4.21). Diese Beobachtung geht einher mit der Untersuchung voneinander unabhängiger und verschiedener Einflüsse von Estradiol und mechanischen Reizen in der Tibia von ovariectomierten Ratten (Yeh et al. 1993). Zum einen wurden hier an diesem Tiermodell die knochenprotektiven Einflüsse einer phytoestrogenreichen Diät in An- und Abwesenheit von körperlicher Aktivität in einem Langzeitversuch analysiert (Tab. 2.4, Tierexperiment 3) und zusätzlich wurden die Effekte von körperlicher Aktivität in Kombination mit der subkutanen

Applikation von ERA, ERB und GEN in zwei weiteren Studien (Tab. 2.5: Tierexperiment 4, Tab. 2.6: Tierexperiment 5) untersucht.

Wie erwartet führte eine Ovariectomie im Gegensatz zu einer Scheinoperation (SHAM) innerhalb von sechs Wochen zu einem Verlust der trabekulären Knochendichte in der Tibia, während die Estradiolsubstitution über subkutane Estradiolpellets signifikante knochenprotektive Effekte bewirkte (Abb. 4.5). Lee et al. (2004b) konnten für die Knochendichteentwicklung in Tibia und Femur nach 16 Wochen die gleichen Beobachtungen an OVX- und SHAM-Tieren machen, allerdings konnten in dieser Studie ebenfalls knochenprotektive Effekte für eine orale Isoflavonaufnahme beobachtet werden. Die für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendete phytoestrogenreiche Diät hatte im Gegensatz zu dieser Studie keine Einflüsse auf die zu beobachtenden Knochendichteverluste nach einer Ovariectomie (Abb. 4.5). Auch die geringen Umfänge an körperlicher Aktivität (Abb. 4.4) in der Phyto-Laufgruppe hatten in Kombination mit der phytoestrogenreichen Diät keine knochenprotektiven Effekte (Abb. 4.5).

Bei der Diskussion dieser abweichenden Ergebnisse muss allerdings berücksichtigt werden, dass hier eine Isoflavonaufnahme von ca. 30 mg/kg KGW/Tag (Genistein, Daidzein, Glycitein) über einen Zeitraum von 16 Wochen knochenprotektive Effekte in Sprague-Dawley Ratten hatte (Lee et al. 2004), während nach sechs Wochen für 27 mg/kg KGW/Tag (Genistein, Daidzein) kein Einfluss auf die Knochendichte von Wistar Ratten zu beobachten war (Hertrampf et al. 2006a). Somit stimmen die verabreichten Isoflavonmengen, das Alter und das Gewicht der Tiere in diesen Studien überein, aber die Dauer der Behandlungszeiträume und die verwendeten Rattenstämme unterscheiden sich, was eine Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse sein könnte. Weitere Studien, die für oral aufgenommene Isoflavonextrakte in ovariectomierten Ratten knochenprotektive Effekte finden konnten, haben ebenfalls Sprague-Dawley Ratten für ihre Untersuchungen verwendet (Arjmandi et al. 1996, Kim und Lee 2005). Hinzu kommt, dass die Isoflavonextrakte der drei genannten Studien (Arjmandi et al. 1996, Lee et al. 2004, Kim und Lee 2005) große Mengen von Daidzein enthielten. Für dieses Phytoestrogen konnte gezeigt werden, dass es noch effektiver die Knochendichte ovariectomierter Ratten zu schützen vermag als Genistein (Picherit et al. 2000). In ovariectomierten Mäusen sind explizit für den Daidzeinmetaboliten Equol knochenprotektive Effekte beschrieben worden (Fujioka et al. 2004) und nach der Ingestion einer mit Daidzein

angereicherten Diät konnten vor kurzem im Knochengewebe der Tibia von Mäusen sowohl Daidzein als auch sein Metabolit Equol nachgewiesen werden (Fonseca und Ward 2006), was zeigt, dass diese Phytoestrogene das Potential haben, *in vivo* direkte Einflüsse auf Knochenzellen auszuüben. In diesem Zusammenhang konnte ebenfalls beobachtet werden, dass eine Verbesserung der oralen Bioverfügbarkeit von Phytoestrogenen im Hinblick auf die Metabolisierung von Daidzein zu Equol durch eine zusätzliche Anreicherung der Diät mit komplexen Kohlenhydraten zu einer verbesserten Mikroarchitektur im trabekulären Bereich der Tibia von ovariectomierten Ratten führt (Devareddy et al. 2006).

In Anbetracht dessen, dass die für die Untersuchungen dieser Arbeit verwendete phytoestrogenreiche Diät neben Genistein auch relativ große Mengen an Daidzein enthielt (Tab. 4.1) und dennoch nicht zu knochenprotektiven Effekten führte, muss hinterfragt werden, ob die intestinale Mikroflora der verwendeten Wistar Ratten ebenso effektiv Equol herzustellen vermag wie Ratten des Stammes Sprague-Dawley. Außerdem stellt sich die Frage, wie hoch der Kohlenhydratanteil in den Diäten der verschiedenen Studien im Vergleich zu dem Kohlenhydratanteil der hier verwendeten Diät war. Um zukünftige Studien, in denen die Effekte oral aufgenommener Isoflavone untersucht werden, besser miteinander vergleichen und erzielte Ergebnisse besser interpretieren zu können, sollten sowohl die in den Diäten enthaltenen Isoflavone und die mit der Diät aufgenommenen Kohlenhydratmengen dokumentiert, als auch die Konzentration des Metaboliten Equol im Blutserum der Versuchstiere analysiert werden. So würde die Bedeutung der Bioverfügbarkeit oral aufgenommener Phytoestrogene (Setchell et al. 2003) Berücksichtigung finden und die Ergebnisse unterschiedlicher Arbeitsgruppen könnten besser miteinander verglichen werden.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass die Ingestion der hier verwendeten phytoestrogenreichen Diät in dem verwendeten Rattenstamm zu Genisteinplasmakonzentrationen von 0,15-0,63  $\mu\text{M}$  und zu Daidzeinplasmakonzentrationen von 0,24-0,52  $\mu\text{M}$  (berechnet aus Tab. 4.2) geführt hat. Obwohl sich diese Plasmakonzentrationen in dem Bereich von Plasmakonzentrationen bewegen, die bei japanischen Männern und Frauen bestimmt wurden, die sich phytoestrogenreich ernährten (Adlercreutz und Mazur 1997, Morton et al. 2002), konnten hierfür keine knochenprotektiven Effekte beschrieben werden (Hertrampf et al. 2006a). Daher bleibt es in Anbetracht der hier gezeigten Ergebnisse und vor dem Hintergrund der Bioverfügbarkeit (Xu et al. 1995,

Setchell et al. 2003) weiterhin fraglich, ob oral aufgenommene Phytoestrogene in Bezug auf die Behandlung der postmenopausalen Osteoporose am Menschen von Bedeutung sind. Klinische Studien sollten sich in zukünftigen Untersuchungen insbesondere damit befassen, inwiefern ein geeigneter Metabolismus von Phytoestrogenen und die Fähigkeit Equol zu synthetisieren für protektive Effekte im menschlichen Knochengewebe von Bedeutung sind.

Im Gegensatz zu der sechswöchigen oralen Aufnahme von Phytoestrogenen über eine phytoestrogenreiche Diät, konnten für eine dreiwöchige subkutane Applikation von Genistein in Kombination mit moderater körperlicher Aktivität signifikante knochenprotektive Effekte im trabekulären Bereich der Tibia beobachtet werden (Hertrampf et al 2007). Vergleichbar mit dem Einfluss von  $E_2$  und ERA führte GEN trotz deutlich geringeren körperlichen Bewegungsumfängen (Abb. 4.13) zu einem in seinem Ausmaß identischen Erhalt der trabekulären Knochendichte in der Tibia ovariectomierter Ratten (Abb. 4.14A).

Ohne den zusätzlichen Einfluss von geringen Bewegungsumfängen konnte für die dreiwöchige subkutane Applikation von GEN im Gegensatz zu der Behandlung mit  $E_2$  und ERA allerdings kein Einfluss auf die Knochendichte beobachtet werden (Abb. 4.22), was auf kombinatorische Einflüsse von körperlicher Aktivität und der Substitution mit GEN schließen lässt (Chilibeck 2004, Hertrampf et al. 2007). Additive kombinatorische Einflüsse von Genistein und täglicher körperlicher Aktivität sind auch an ovariectomierten Mäusen untersucht worden. Hier führte die tägliche subkutane Applikation submaximaler Genisteindosierungen in Kombination mit einem täglichen dreißigminütigen Laufradtraining zu einer signifikant stärkeren Knochenprotektion als die Behandlung der Tiere mit GEN ohne zusätzliches Training (Wu et al. 2001). Diese kombinatorischen Effekte konnten auch in männlichen Mäusen beobachtet werden (Wu et al. 2004b). Wu et al. (2006) haben in ihrer jüngsten Studie die kombinatorischen Einflüsse von oral aufgenommenen Isoflavonen und Bewegung nun an postmenopausalen Frauen untersucht. Für die Körperfettverteilung und den Lipidstoffwechsel konnten sie kombinatorische Effekte beobachten, aber die bereits in Mäusen beschriebenen positiven Effekte auf die Knochendichte (Wu et al. 2001) sind für postmenopausale Frauen nicht gefunden worden (Wu et al. 2006). Die Autoren konnten dies mit der individuell unterschiedlichen intestinalen Metabolisierung der Isoflavone korrelieren. Somit zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit am Beispiel von Ratten, in Übereinstimmung mit



den Erkenntnissen aus Studien an Mäusen (Wu et al. 2001, Wu et al. 2004a) und postmenopausalen Frauen (Wu et al. 2006), dass körperliche Aktivität die knochenprotektiven Effekte von Genistein verstärkt und dass die Wirksamkeit von Phytoestrogenen im Hinblick auf den Knochenstoffwechsel von der Art der Applikation und der individuellen intestinalen Fermentierung oral aufgenommener Phytoestrogene abhängt.

Für die protektiven Einflüsse von Estradiol auf die Knochenhomöostase konnte gezeigt werden, dass sie über den ER $\alpha$  vermittelt werden. Durch die Behandlung ovariectomierter Ratten mit dem ERA konnten im trabekulären Knochengewebe der Tibia protektive Effekte erzielt werden, die in ihrem Ausmaß den Einflüssen von E<sub>2</sub> entsprachen (Abb. 4.14A). Zusätzlich konnte anhand der Antagonisierung des Effektes von ERA durch ICI gezeigt werden, dass der knochenprotektive Einfluss von Estradiol estrogenrezeptorvermittelt über den ER $\alpha$  bewirkt wird, zumal für den ER $\beta$  kein Einfluss auf diesen Parameter über den ER $\beta$  zu beobachten war (Abb. 4.14A). Abgesehen von den Ergebnissen der Messdatenauswertung zeigten sich diese Ergebnisse auch morphologisch in den computertomographischen Aufnahmen von einzelnen Vertretern der Behandlungsgruppen (Abb. 4.15). Hier wird im proximalen Bereich der Tibia deutlich, dass eine Ovariectomie zu ausgeprägten Knochendichteverlusten führt, während die Applikation von E<sub>2</sub>, ERA und GEN im Gegensatz zu ER $\beta$  den Erhalt der mineralisierten trabekulären Mikroarchitektur in diesem Bereich sichert (Abb. 4.15).

Die hier beschriebenen Einflüsse der spezifischen Estrogenrezeptoragonisten ERA und ER $\beta$  sind bereits in früheren Untersuchungen beschrieben worden (Hillisch et al. 2004). Auch mit anderen Estrogenrezeptoragonisten konnte gezeigt werden, dass der von Estradiol vermittelte Einfluss auf den Knochen über den ER $\alpha$  vermittelt wird (Harris et al. 2002). Auch die Tatsache, dass bei ER $\alpha$ KO Mäusen die Entstehung einer Osteoporose beobachtet wird (Lindberg et al. 2001a, Lindberg et al. 2001b, Lindberg et al. 2002a), steht im Einklang mit den hier gezeigten Ergebnissen, die auch in Anwesenheit beider Estrogenrezeptoren zeigten, dass Estradiol knochenprotektive Effekte über den ER $\alpha$  vermittelt (Abb. 4.14A und 4.15). Darüber hinaus belegen auch Korrelationen von Polymorphismen des ER $\alpha$  Gens mit der Knochendichte postmenopausaler Frauen die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors im Knochen (Mitra et al. 2005).

Da die hier untersuchten Tiere neben ERA, ERB und E<sub>2</sub> auch mit Genistein behandelt wurden und gezeigt werden konnte, dass Genistein, aber nicht der ERB, protektive Einflüsse im Knochen vermitteln konnte (Abb. 4.14A), eröffnen diese Ergebnisse wichtige Einblicke in die molekularen Wirkmechanismen von Genistein in diesem Gewebe. Vergleiche der Wirkungen von estrogenrezeptorsubtypspezifischen Liganden mit dem Einfluss von Genistein führen zu der These, dass Genistein seine knochenprotektiven Effekte nicht über seine starke Affinität zum ER $\beta$ , sondern über ER $\alpha$ -spezifische Mechanismen vermittelt hat (Hertrampf et al. 2007). Für diese These spricht auch die Analyse der Proteinexpression des Knochenmarkers BMP-2 (Abb. 4.16). Hier wurde deutlich, dass Genistein ebenso wie E<sub>2</sub> und ERA eine erhöhte Expression dieses Knochenmarkers im Knochengewebe der behandelten Tiere bewirken. Für BMP-2 konnte bereits gezeigt werden, dass es bedeutende Einflüsse auf die Zelldifferenzierung von Knochenvorläuferzellen hat (Chen et al. 1997, De Biase und Capanna 2005) und sowohl Estrogene (Zhou et al. 2003) als auch Phytoestrogene wie Daidzein (Jia et al. 2003) die Genexpression von BMP-2 aktivieren. Obwohl die genauen Mechanismen noch nicht bekannt sind, lassen die hier gezeigten Ergebnisse (Abb. 4.16) die These zu, dass BMP-2 ein geeigneter Marker für die estrogenische Wirkung im Knochen sein könnte. Für weitere bedeutende Knochenmarker wie z.B. Osteoprotegerin (OPG) (Hofbauer et al. 2004), konnten ebenfalls estrogenische Einflüsse über den ER $\alpha$  beobachtet werden (Lindberg et al. 2001b). Und auch für Genistein konnten Einflüsse auf die Genexpression von OPG gezeigt werden (Yamagishi et al. 2001). Ob die hier gezeigten knochenprotektiven Effekte von Genistein (Abb. 4.14A, Abb. 4.15, Abb. 4.16) tatsächlich das Resultat der über den ER $\alpha$  vermittelten Wirkungsweisen waren, oder ob es sich um nicht-genomische Einflüsse dieses Phytoestrogens handelte, sollten weitere Untersuchungen beleuchten, die mit Hilfe von Estrogenrezeptorantagonisten den endgültigen mechanistischen Beweis liefern könnten.

Im Gegensatz zum trabekulären Knochen (Abb. 14A) führte in den Untersuchungen dieser Arbeit weder eine Ovariectomie, noch die hormonelle Behandlung der Tiere zu Veränderungen der kortikalen Knochendichte (Abb. 4.14B). Die Ursache hierfür könnte in der unterschiedlich stark ausgeprägten Dichte der *Substantia compacta* und der *Substantia spongiosa* liegen (vgl. Abb. 14A und Abb. 14B). Eine dreiwöchige Behandlung der Tiere war möglicherweise zu kurz, um neben den Veränderungen im

trabekulären Knochen auch Veränderungen der deutlich dichteren Knochenstruktur der *Substantia compacta* zu induzieren, weil homöostatische Anpassungen, bedingt durch niedrigere Stoffwechselaktivität, in diesem Bereich des Knochens deutlich langsamer ablaufen.

## **5.8 Untersuchung estrogener Effekte auf homöostatische Prozesse im Dünndarm**

Für die langfristige Anwendung der HET wurden, im Gegensatz zu den klassisch estrogensensitiven Geweben von Brustdrüse und Endometrium, für den Darm protektive Einflüsse im Hinblick auf die Entstehung von Tumoren beschrieben. Somit ist die langfristige Einnahme von Estrogen/Progestin Präparaten mit einem reduzierten Risiko verbunden, an Kolonkarzinomen zu erkranken (Nelson et al. 2002, Chlebowski et al. 2004, Farquhar et al. 2005). Die genauen Mechanismen, über die derartige hormonell bedingte protektive Einflüsse im Darm vermittelt werden, sind noch nicht genau verstanden. Allerdings werden seit geraumer Zeit in diesem nicht-klassischen Gewebe die Einflüsse der Estrogenrezeptorsubtypen diskutiert (Gustaffson 2003) und insbesondere die über den ER $\beta$  vermittelten Einflüsse von Estrogenen im Darm scheinen von Bedeutung zu sein (Koehler et al. 2005). In diesem Kontext sind in den letzten Jahren auch präventive Einflüsse von Phytoestrogenen auf die Entstehung von Kolonkarzinomen untersucht und diskutiert worden (Lechner et al. 2005, Branca und Lorenzetti 2005).

Vor diesem Hintergrund wurden im Rahmen dieser Arbeit estrogenrezeptor-subtypspezifische Einflüsse im Darm untersucht, insbesondere die ernährungsphysiologische Bedeutung von Genistein für homöostatische Prozesse in diesem Gewebe. Das Darmgewebe des Tierexperiments 4 (Tab. 2.5) wurde hierzu immunhistochemisch und molekularbiologisch untersucht. In Abbildung 4.17 sind immunhistochemisch gefärbte Dünndarmquerschnitte von repräsentativen Vertretern der einzelnen Behandlungsgruppen dargestellt. Hier wurde zunächst deutlich, dass in der Mukosa der OVX-Tiere eine hohe PCNA-Expression zu verzeichnen war. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu der Expression dieses Proliferationsmarkers im Uterus (Abb. 4.7) oder in der Brustdrüse (Abb. 4.1) von ovariectomierten Tieren, wo in Abwesenheit von Estradiol eine deutlich reduzierte Genexpression dieses Proliferationsmarkers festgestellt werden konnte. Die Behandlung der OVX-Tiere mit E<sub>2</sub> oder mit ERA führte zu keiner signifikanten Veränderung der PCNA-

Expression im Dünndarm, während die Applikation des ERB zu einer deutlichen Reduktion der Zahl PCNA positiver Zellen in der Mukosa des Dünndarms führte (Abb. 4.17). Da auch diese Beobachtungen im Gegensatz zu den Einflüssen von Estradiol, ERA und ERB in klassisch estrogensensitiven Geweben stehen, scheinen hier unterschiedliche molekulare Mechanismen eine Rolle zu spielen. Auch in Bezug auf die Expressionsmuster der Estrogenrezeptorsubtypen ER $\alpha$  und ER $\beta$  im Darmgewebe wurden Unterschiede zu den Expressionsmustern dieser Rezeptorsubtypen in klassisch estrogensensitiven Geweben deutlich. Im Gegensatz zu Uterus und Brustdrüse überwiegt die Genexpression des ER $\beta$  im Vergleich zu der des ER $\alpha$  im Darmepithel (Campbell-Thompson et al. 2001, Konstantinopoulos et al. 2003), was die Bedeutung von ER $\beta$  im Darm unterstreicht.

Im Western Blot konnten die in der Immunhistochemie beobachteten Ergebnisse bestätigt und mittels Densitometrie genauer quantifiziert werden. Hier wurde deutlich, dass eine Behandlung mit E<sub>2</sub> gegenüber der OVX-Gruppe zu keiner Veränderung der PCNA-Expression führte, während die Applikation des ERA eine deutliche Steigerung der PCNA-Expression bewirkte (Abb. 4.18A). Die Applikation des ERB hingegen führte zu einer signifikant reduzierten PCNA-Expression. Darüber hinaus konnte im Western Blot gezeigt werden, dass die Aktivität der Caspase-3 durch die Applikation des ERB um ein vielfaches gesteigert werden konnte, während E<sub>2</sub> kaum Einfluss auf die Aktivität dieses Apoptosemarkers hatte (Abb. 4.18B). Es konnte allerdings auch eine gesteigerte Aktivität dieses Enzyms für die Behandlung mit ERA beobachtet werden (Abb. 4.18B).

Somit zeigen diese Ergebnisse, dass estrogene Wirkmechanismen auch im Dünndarm eine Rolle spielen und dass hier über den ER $\beta$  antiproliferative und proapoptotische Einflüsse vermittelt werden. Für den Dickdarm konnte kürzlich gezeigt werden, dass in ER $\beta$ KOs gegenüber dem Wildtyp die Proliferation gesteigert und die Aktivität der Caspase-3 reduziert wird (Wada-Hiraike et al. 2006b), was in Übereinstimmung mit den hier gezeigten Ergebnissen im Dünndarm ist. Auch *in vitro* konnte in ER $\alpha$ -negativen Kolonzellen gezeigt werden, dass die Aktivierung des ER $\beta$  die Proliferation deutlich reduziert (Martineti et al. 2005). Diese Beobachtungen verdeutlichen die präventive Rolle des aktivierten ER $\beta$  für die Entstehung von Darmkrebs. Für diese These spricht auch die Tatsache, dass die Expression des ER $\beta$  in Kolonkarzinomzellen und Darmtumoren deutlich reduziert ist (Konstantinopoulos et al. 2003, Xie et al. 2004, Martineti et al. 2005, Jassam et al. 2005). Am Menschen

konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass sich die Genexpression von ER $\alpha$  in gesunden und malignen Darmzellen nicht unterscheidet, während ER $\beta$  in gesunden Darmzellen signifikant stärker exprimiert wird als in entarteten Zellen (Campbell-Thompson et al. 2001, Konstantinopoulos et al. 2003), was die bedeutende Rolle dieses Estrogenrezeptorsubtyps für die Tumorentstehung im Darm verdeutlicht.

Für Genistein konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass es im Darm wie ein ER $\beta$ -spezifischer Agonist wirkt, da dieses Phytoestrogen ebenso wie der ERB antiproliferative (Abb. 4.17, Abb. 4.18A) und proapoptotische (Abb. 4.18B) Effekte vermittelte. In Anbetracht dessen, dass Genistein eine deutlich höhere Affinität zum ER $\beta$  hat (Kuiper et al. 1997) und hier in seinem Einfluss mit dem ERB vergleichbar ist, liegt die Vermutung nahe, dass Genistein die Darmhomöostase über den ER $\beta$  positiv zu beeinflussen vermag (Wada-Hiraike et al. 2006a). Die hier an Ratten beobachteten Effekte einer subkutanen Applikation von Genistein gehen einher mit Untersuchungen an Ferkeln. Hier konnte beobachtet werden, dass oral verabreichtes Genistein bereits nach 10 Tagen zu einer signifikanten Reduktion der PCNA-Expression im Dünndarm führte (Chen et al. 2005). Auch *in vitro* konnte für Genistein gezeigt werden, dass es die Proliferation von verschiedenen Darmzelllinien reduziert, während die Apoptose dieser Epithelzellen durch eine Behandlung mit Genistein gesteigert wurde (Booth et al. 1999).

Die hier beschriebenen Einflüsse von Genistein im Darm der ovariectomierten Ratte könnten somit übertragen auf den Menschen eine mögliche Ursache für das geringere Vorkommen von Kolonkarzinomen in ostasiatischen Ländern sein (Lechner et al. 2005, Branca und Lorenzetti 2005). Weitere Untersuchungen im Kolon sollten das möglicherweise vorhandene antikarzinogene Potential von GEN im Zusammenhang mit der Prävention von Kolonkarzinomen vor einem ER-spezifischen Hintergrund beleuchten. Denn auch hier liegt die Vermutung nahe, dass Phytoestrogene über den ER $\beta$  antikarzinogene Effekte vermitteln könnten (Wada-Hiraike et al. 2006a).

## 6 Schlussfolgerung und Ausblick

Zusammenfassend eröffnen die Ergebnisse dieser Arbeit wichtige Einblicke in die molekularen Mechanismen estrogener Wirkungsweisen und ermöglichen eine genauere Charakterisierung des Phytoestrogens Genistein in Bezug auf karzinogene Risiken und gewebespezifische partialagonistische Einflüsse.

In den Untersuchungen wurde deutlich, dass Estradiol stimulierende Effekte auf den Bewegungsantrieb, hemmende Einflüsse auf die Körperfettverteilung, protektive Wirkungen auf die Knochenhomöostase, sowie proliferative Effekte in Brustdrüse und Uterus über den ER $\alpha$  vermittelt. Für ER $\beta$ -spezifische Agonisten hingegen konnten neben antagonistischen Einflüssen auf den Bewegungsantrieb, anti-proliferative und proapoptotische Effekte im Dünndarm demonstriert werden.

Für Genistein belegen die Ergebnisse, dass es im Vergleich zu Estradiol eine deutlich schwächere proliferative Potenz in Uterus und Brustdrüse hat, was im Hinblick auf karzinogene Risiken von Bedeutung sein könnte. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass dieses Phytoestrogen in Anwesenheit von Estrogenen, deren proliferative Einflüsse im Uterus nicht additiv verstärkt, sondern sogar zu antagonisieren vermag. Diese Beobachtungen könnten als Erklärungsansatz epidemiologischer Unterschiede bei der Inzidenz von Krebserkrankungen in westlichen und ostasiatischen Ländern dienen und sollten daher bei der Krebsprävention Berücksichtigung finden. Darüber hinaus sind diese Erkenntnisse bei der Einschätzung von Genistein als mögliche Alternative zur Behandlung postmenopausaler Beschwerden und hieraus resultierender Erkrankungen von Bedeutung.

Mechanistisch konnte im Rahmen dieser Arbeit für Genistein gezeigt werden, dass es protektive Effekte im Knochen und stimulierende Einflüsse auf das Uterusfeuchtgewicht über seine schwache Affinität zum ER $\alpha$  vermittelt, während Genistein auf den Bewegungsantrieb und im Darm wie ein ER $\beta$ -spezifischer Agonist wirkt. Es wurde darüber hinaus deutlich, dass bereits geringe körperliche Bewegungsumfänge die knochenprotektiven Einflüsse von Genistein signifikant verstärken, und dass in Bezug auf die Knochenprotektion dieses Phytoestrogens deutliche Unterschiede zwischen oraler und subkutaner Applikation zu verzeichnen sind. Zudem konnte neben estrogenrezeptorsubtypspezifischen Wirkungsweisen für

Genistein gezeigt werden, dass es die Genexpression von Cox-2 gewebespezifisch und selektiv moduliert.

Somit zeigen die Ergebnisse dieser Untersuchungen für Genistein, dass es bezogen auf die endometriale Sicherheit im Vergleich mit Estradiol deutlich schwächer die Zellproliferation im Uterus stimuliert. Darüber hinaus belegen die Daten, dass Genistein estrogene Einflüsse wie z.B. homöostatische Prozesse im Knochen- und Darmgewebe sowohl über seine schwache Affinität zum ER $\alpha$ , als auch über seine stärkere Affinität zum ER $\beta$  bewirken kann. Im Knochen und im Uterus vermittelt es seine estrogenen Einflüsse über den ER $\alpha$ , im Gehirn und im Dünndarm wirkt es hingegen wie ein ER $\beta$ -spezifischer Agonist.

Daher wird Genistein bei der selektiven und gewebespezifischen Modulation der Cox-2-Expression dem Begriff „Phyto-SERM“ gerecht, ist aber anhand der hier gezeigten estrogenrezeptorsubtypspezifischen Wirkungsweisen und vor dem Hintergrund seiner Bindungsaffinitäten eher über seine Eigenschaften als Partialagonist definiert. Somit unterstreichen die hier gezeigten Ergebnisse, dass Genistein als ein bedeutender endokriner Disruptor anzusehen ist (Vollmer et al. 2002, Henley und Korach 2006), dessen genomische Einflüsse in erster Linie über seine partialagonistischen Eigenschaften geprägt sind.

Neben der Charakterisierung der molekularen Wirkungsweise von Genistein und der Analyse estrogenrezeptorsubtypspezifischer Einflüsse können die Ergebnisse dieser Arbeit auch in Bezug auf alternative Strategien bei der HET Berücksichtigung finden. Außerdem belegen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass ER $\beta$ -selektive Agonisten und Partialagonisten mit hoher ER $\beta$ -Präferenz in der Darmkrebsprävention von Bedeutung sein könnten (Koehler et al. 2005), ebenso wie Ergebnisse anderer Studien derartige Substanzen für die Prävention und Therapie von Herz-Kreislaufkrankungen zur Diskussion stellen.

Zukünftige Untersuchungen sollten neben weiteren estrogenrezeptorspezifischen Einflüssen und der pathophysiologischen Bedeutung des ER $\beta$  im Darm und im Herzkreislauf-System auch die Bedeutung von Heterodimeren thematisieren. Hierdurch könnte mit Hilfe von selektiven Estrogenrezeptoragonisten und dem Tiermodell der ovariectomierten Ratte das Verständnis der mannigfaltigen molekularen Wirkmechanismen von Estrogenen bedeutend erweitert werden. Darüber hinaus sollte das Potential von Phytoestrogenen für die langfristige Prävention von Erkrankungen wie Brustkrebs, Darmkrebs, Osteoporose und Herz-

Kreislaufkrankungen genauer untersucht werden, um die pathophysiologischen Einflüsse dieser natürlichen Substanzen auch aus dem Blickwinkel der Prävention besser verstehen zu können.



## Literatur

**Adlercreutz H:** Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12(4):605-23. Review.

**Adlercreutz H, Fotsis T, Heikkinen R, Dwyer JT, Goldin BR, Gorbach SL, Lawson AM, Satchell KD:** Diet and urinary excretion of lignans in female subjects. *Med Biol* 1981;59(4):259-61.

**Adlercreutz H, Fotsis T, Lampe J, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T:** Quantitative determination of lignans and isoflavonoids in plasma of omnivorous and vegetarian women by isotope dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* 1993;215:5-18.

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

**Adlercreutz H:** Phytoestrogens and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002;83(1-5):113-8. Review.

**Adlercreutz H:** Phytoestrogens: epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect* 1995;103 Suppl 7:103-12. Review.

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

**Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P:** *Molekularbiologie der Zelle*. (Übersetzung herausgegeben von Jaenicke L.) Weinheim: WILEY-VCH Verlag, 4. Aufl. 2004

**Alekel DL, Germain AS, Peterson CT, Hanson KB, Stewart JW, Toda T:** Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. *Am J Clin Nutr* 2000;72(3):844-52.

**Allred CD, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL, Korol DL, Wallig MA, Helferich WG:** Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 2004a;25(2):211-8.

**Allred CD, Allred KF, Ju YH, Goepfinger TS, Doerge DR, Helferich WG:** Soy processing influences growth of estrogen-dependent breast cancer tumors. *Carcinogenesis* 2004b;25(9):1649-57.

**Allred CD, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG:** Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 2001;61(13):5045-50.

**Anderson JJ, Garner SC:** Phytoestrogens and bone. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12(4):543-57. Review.

**Anderson JW, Johnstone BM, Cook-Newell ME:** Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. *N Engl J Med* 1995;333(5):276-82.

**Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA:** The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 1997;62(3):268-303. Review.

**Arai Y, Watanabe S, Kimira M, Shimoi K, Mochizuki R, Kinae N:** Dietary intakes of flavonols, flavones and isoflavones by Japanese women and the inverse correlation between quercetin intake and plasma LDL cholesterol concentration. *J Nutr* 2000;130(9):2243-50.

**Arjmandi BH, Alekel L, Hollis BW, Amin D, Stacewicz-Sapuntzakis M, Guo P, Kukreja SC:** Dietary soybean protein prevents bone loss in an ovariectomized rat model of osteoporosis. *J Nutr* 1996;126(1):161-7.

**Arjmandi BH:** The role of phytoestrogens in the prevention and treatment of osteoporosis in ovarian hormone deficiency. *J Am Coll Nutr* 2001;20(5 Suppl):398S-402S

**Arnal JF, Bayard F:** Vasculoprotective effects of oestrogens. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2001;28(12):1032-4. Review.

**Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC:** Phosphorylation of the human estrogen receptor by mitogen-activated protein kinase and casein kinase II: consequence on DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;55(2):163-72.

**Arnold SF, Obourn JD, Jaffe H, Notides AC:** Serine 167 is the major estradiol-induced phosphorylation site on the human estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1994;8(9):1208-14.

**Aronica SM, Kraus WL, Katzenellenbogen BS:** Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994;91(18):8517-21.

**Arosh JA, Banu SK, Chapdelaine P, Madore E, Sirois J, Fortier MA:** Prostaglandin biosynthesis, transport, and signaling in corpus luteum: a basis for autoregulation of luteal function. *Endocrinology* 2004;145(5):2551-60.

**Arosh JA, Parent J, Chapdelaine P, Sirois J, Fortier MA:** Expression of cyclooxygenases 1 and 2 and prostaglandin E synthase in bovine endometrial tissue during the estrous cycle. *Biol Reprod* 2002;67(1):161-9.

**Ashby J:** Testing for endocrine disruption post-EDSTAC: extrapolation of low dose rodent effects to humans. *Toxicol Lett* 2001;120(1-3):233-42. Review.

**Assikis VJ, Neven P, Jordan VC, Vergote I:** A realistic clinical perspective of tamoxifen and endometrial carcinogenesis. *Eur J Cancer* 1996;32A(9):1464-76. Review

**Atkinson C, Compston JE, Day NE, Dowsett M, Bingham SA:** The effects of phytoestrogen isoflavones on bone density in women: a double-blind, randomized, placebo-controlled trial. *Am J Clin Nutr* 2004a;79(2):326-33.

**Axelsson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KD:** The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J* 1982;201(2):353-7.

**Axelsson M, Setchell KD:** Conjugation of lignans in human urine. *FEBS Lett* 1980;122(1):49-53.

**Axelsson M, Sjoval J, Gustafsson BE, Setchell KD:** Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 1984;102(1):49-56.

**Bairey Merz CN, Johnson BD, Braunstein GD, Pepine CJ, Reis SE, Paul-Labrador M, Hale G, Sharaf BL, Bittner V, Sopko G, Kelsey SF:** Phytoestrogens and lipoproteins in women. *J Clin Endocrinol Metab* 2006;91(6):2209-13.

**Baker L, Meldrum KK, Wang M, Sankula R, Vanam R, Raiesdana A, Tsai B, Hile K, Brown JW, Meldrum DR:** The role of estrogen in cardiovascular disease. *J Surg Res* 2003;115(2):325-44. Review

**Balasch J:** Sex steroids and bone: current perspectives. *Hum Reprod Update* 2003;9(3):207-22. Review.

**Bannwart C, Adlercreutz H, Fotsis T, Wahala K, Hase T, Burunow G:** Identification of O-desmethylangolensin, a metabolite of daidzein and of matairesinol, one likely plant precursor of the animal lignan enterolactone in human urine. *Finn Chem Lett* 1984, 4-5:120-125.

**Barkhem T, Carlsson B, Nilsson Y, Enmark E, Gustafsson J, Nilsson S:** Differential response of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta to partial estrogen agonists/antagonists. *Mol Pharmacol* 1998;54(1):105-12.

- Barkhem T, Nilsson S, Gustafsson JA:** Molecular mechanisms, physiological consequences and pharmacological implications of estrogen receptor action. *Am J Pharmacogenomics* 2004;4(1):19-28. Review.
- Beekman JM, Allan GF, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW:** Transcriptional activation by the estrogen receptor requires a conformational change in the ligand binding domain. *Mol Endocrinol* 1993;7(10):1266-74.
- Bennetts HW, Underwood EJ, Shier FL:** A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust J Agric Res* 1946, 22:131-138.
- Beral V; Million Women Study Collaborators:** Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 2003;362(9382):419-27. Erratum in: *Lancet* 2003;362(9390):1160.
- Bernstein L, Yuan JM, Ross RK, Pike MC, Hanisch R, Lobo R, Stanczyk F, Gao YT, Henderson BE:** Serum hormone levels in pre-menopausal Chinese women in Shanghai and white women in Los Angeles: results from two breast cancer case-control studies. *Cancer Causes Control* 1990;1(1):51-8.
- Bier B, Bankfalvi A, Grote L, Blasius S, Ofner D, Bocker W, Jasani B, Schmid KW:** Wet autoclave pretreatment for immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routinely processed breast carcinoma tissue. *Histochem J* 1995;27(2):148-54.
- Bjornstrom L, Sjoberg M:** Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 2005;19(4):833-42. Review.
- Bjorntorp P:** Hormonal control of regional fat distribution. *Hum Reprod* 1997;12 Suppl 1:21-5. Review.
- Black LJ, Sato M, Rowley ER, Magee DE, Bekele A, Williams DC, Cullinan GJ, Bendele R, Kauffman RF, Bensch WR, et al:** Raloxifene (LY139481 HCl) prevents bone loss and reduces serum cholesterol without causing uterine hypertrophy in ovariectomized rats. *J Clin Invest* 1994;93(1):63-9.
- Booth C, Hargreaves DF, Hadfield JA, McGown AT, Potten CS:** Isoflavones inhibit intestinal epithelial cell proliferation and induce apoptosis in vitro. *Br J Cancer* 1999;80(10):1550-7.
- Borer KT:** Physical activity in the prevention and amelioration of osteoporosis in women : interaction of mechanical, hormonal and dietary factors. *Sports Med* 2005;35(9):779-830. Review.
- Borriello SP, Setchell KD, Axelson M, Lawson AM:** Production and metabolism of lignans by the human faecal flora. *J Appl Bacteriol* 1985;58(1):37-43.
- Bouker KB, Hilakivi-Clarke L:** Genistein: does it prevent or promote breast cancer? *Environ Health Perspect* 2000;108(8):701-8. Review.
- Bourne, JA:** Handbuch der Immunperoxidase Färbemethoden. Immunochemistry Laboratory, DAKO Corporation.
- Branca F:** Dietary phyto-oestrogens and bone health. *Proc Nutr Soc* 2003;62(4):877-87. Review.
- Branca F, Lorenzetti S:** Health effects of phytoestrogens. *Forum Nutr* 2005;(57):100-11. Review.
- Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H:** Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987;326(6112):515-7.
- Bryant HU, Dere WH:** Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217(1):45-52. Review.
- Bryant HU, Glasebrook AL, Yang NN, Sato M:** An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1999;69(1-6):37-44. Review.

- Brzezinski A, Debi A:** Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;85(1):47-51. Review.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M:** Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 1997;389(6652):753-8.
- Call JT, Deliargyris EN, Newby LK:** Focusing on inflammation in the treatment of atherosclerosis. *Cardiol Rev* 2004;12(4):194-200. Review.
- Campbell SE, Febbraio MA:** Effects of ovarian hormones on exercise metabolism. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2001;4(6):515-20. Review.
- Campbell-Thompson M, Lynch IJ, Bhardwaj B:** Expression of estrogen receptor (ER) subtypes and ERbeta isoforms in colon cancer. *Cancer Res* 2001 15;61(2):632-40.
- Carr MC:** The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 2003;88(6):2404-11. Review.
- Cassidy A, Albertazzi P, Lise Nielsen I, Hall W, Williamson G, Tetens I, Atkins S, Cross H, Manios Y, Wolk A, Steiner C, Branca F:** Critical review of health effects of soyabean phytoestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc* 2006;65(1):76-92. Review.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KD:** Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am J Clin Nutr* 1994;60(3):333-40.
- Cassidy A, Bingham S, Setchell KD:** Biological effects of isoflavones in young women: importance of the chemical composition of soyabean products. *Br J Nutr* 1995;74(4):587-601.
- Cassidy A, Hooper L:** Phytoestrogens and cardiovascular disease. *J Br Menopause Soc* 2006;12(2):49-56. Review.
- Castoria G, Migliaccio A, Bilancio A, Di Domenico M, de Falco A, Lombardi M, Fiorentino R, Varricchio L, Barone MV, Auricchio F:** PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *EMBO J* 2001;20(21):6050-9.
- Chambliss KL, Shaul PW:** Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev* 2002;23(5):665-86. Review.
- Chambraud B, Berry M, Redeuilh G, Chambon P, Baulieu EE:** Several regions of human estrogen receptor are involved in the formation of receptor-heat shock protein 90 complexes. *J Biol Chem* 1990;265(33):20686-91.
- Chanawirat A, Khemapech S, Patumraj S, Siriviriyakul P:** Genistein replacement therapy on endothelial dysfunction and bone loss in bilateral ovariectomized rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 2006;34(1-2):309-14.
- Chen AC, Berhow MA, Tappenden KA, Donovan SM:** Genistein inhibits intestinal cell proliferation in piglets. *Pediatr Res* 2005;57(2):192-200.
- Chen D, Harris MA, Rossini G, Dunstan CR, Dallas SL, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE:** Bone morphogenetic protein 2 (BMP-2) enhances BMP-3, BMP-4, and bone cell differentiation marker gene expression during the induction of mineralized bone matrix formation in cultures of fetal rat calvarial osteoblasts. *Calcif Tissue Int* 1997;60(3):283-90.
- Chen D, Pace PE, Coombes RC, Ali S:** Phosphorylation of human estrogen receptor alpha by protein kinase A regulates dimerization. *Mol Cell Biol* 1999a;19(2):1002-15.
- Chen D, Zhao M, Mundy GR:** Bone morphogenetic proteins. *Growth Factors* 2004;22(4):233-41. Review.

- Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA:** Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(11):3739-46.
- Chen XW, Garner SC, Anderson JJ:** Isoflavones regulate interleukin-6 and osteoprotegerin synthesis during osteoblast cell differentiation via an estrogen-receptor-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;295(2):417-22.
- Chen Z, Bassford T, Green SB, Cauley JA, Jackson RD, LaCroix AZ, Leboff M, Stefanick ML, Margolis KL:** Postmenopausal hormone therapy and body composition--a substudy of the estrogen plus progestin trial of the Women's Health Initiative. *Am J Clin Nutr* 2005;82(3):651-6.
- Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Gargova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW:** Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest*. 1999c;103(3):401-6. Erratum in: *J Clin Invest* 1999;103(9):1363.
- Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, Franke AA:** Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in Shanghai. *Nutr Cancer* 1999b;33(1):82-7.
- Chilibeck PD:** Exercise and estrogen or estrogen alternatives (phytoestrogens, bisphosphonates) for preservation of bone mineral in postmenopausal women. *Can J Appl Physiol* 2004;29(1):59-75. Review.
- Chlebowski RT, Wactawski-Wende J, Ritenbaugh C, Hubbell FA, Ascensao J, Rodabough RJ, Rosenberg CA, Taylor VM, Harris R, Chen C, Adams-Campbell LL, White E; Women's Health Initiative Investigators:** Estrogen plus progestin and colorectal cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med* 2004;350(10):991-1004.
- Chow J, Tobias JH, Colston KW, Chambers TJ:** Estrogen maintains trabecular bone volume in rats not only by suppression of bone resorption but also by stimulation of bone formation. *J Clin Invest* 1992;89(1):74-8.
- Clemons M, Goss P:** Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 2001 25;344(4):276-85. Review. Erratum in: *N Engl J Med* 2001;344(23):1804.
- Close P, Neuprez A, Reginster JY:** Developments in the pharmacotherapeutic management of osteoporosis. *Expert Opin Pharmacother* 2006;7(12):1603-15. Review.
- Clowes JA, Riggs BL, Khosla S:** The role of the immune system in the pathophysiology of osteoporosis. *Immunol Rev* 2005;208:207-27. Review.
- Coelingh Bennink HJ:** Are all estrogens the same? *Maturitas* 2004;47(4):269-75. Review.
- Coleman KM, Dutertre M, El-Gharbawy A, Rowan BG, Weigel NL, Smith CL:** Mechanistic differences in the activation of estrogen receptor-alpha (ER alpha)- and ER beta-dependent gene expression by cAMP signaling pathway(s). *J Biol Chem* 2003;278(15):12834-45.
- Coleman KM, Smith CL:** Intracellular signaling pathways: nongenomic actions of estrogens and ligand-independent activation of estrogen receptors. *Front Biosci* 2001;6:D1379-91. Review.
- Cooke PS, Naaz A:** Effects of estrogens and the phytoestrogen genistein on adipogenesis and lipogenesis in males and females. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 2005;73(7):472-3. Review.
- Cos P, De Bruyne T, Apers S, Vanden Berghe D, Pieters L, Vlietinck AJ:** Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 2003;69(7):589-99. Review.
- Cotroneo MS, Wang J, Fritz WA, Eltoum IE, Lamartiniere CA:** Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis* 2002;23(9):1467-74.
- Couse JF, Hewitt SC, Bunch DO, Sar M, Walker VR, Davis BJ, Korach KS:** Postnatal sex reversal of the ovaries in mice lacking estrogen receptors alpha and beta. *Science* 1999;286(5448):2328-31.

- Coward L, Barnes NC, Setchell KDR, Barnes S:** Geinsein and Daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J Agric Food Chem* 1993, 41:1961-7.
- Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG:** Estrogen receptors alpha and beta form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* 1997;272(32):19858-62.
- Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC:** The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women: results from the MORE randomized trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation. *JAMA* 1999;281(23):2189-97.
- Cutolo M, Sulli A, Serio B, Accardo S, Masi AT:** Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995;13(2):217-26. Review.
- Czubryt MP, Espira L, Lamoureux L, Abrenica B:** The role of sex in cardiac function and disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2006;84(1):93-109. Review.
- Dai W, Kloner RA:** Relationship between cyclooxygenase-2 inhibition and thrombogenesis. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2004;9(1):51-9. Review.
- Davis SR, Dalais FS, Simpson ER, Murkies AL:** Phytoestrogens in health and disease. *Recent Prog Horm Res* 1999;54:185-210.
- De Biase P, Capanna R:** Clinical applications of BMPs. *Injury* 2005;36 Suppl 3:S43-6. Review.
- Degen GH, Janning P, Diel P, Bolt HM:** Estrogenic isoflavones in rodent diets. *Toxicol Lett* 2002a;128(1-3):145-57.
- Degen GH, Janning P, Diel P, Michna H, Bolt HM:** Transplacental transfer of the phytoestrogen daidzein in DA/Han rats. *Arch Toxicol* 2002b;76(1):23-9.
- Delaney MF:** Strategies for the prevention and treatment of osteoporosis during early postmenopause. *Am J Obstet Gynecol* 2006;194(2 Suppl):S12-23. Review.
- Delibasi T, Berker D, Aydin Y, Pinar T, Ozbek M:** Effects of combined female sex hormone replacement therapy on body fat percentage and distribution. *Adv Ther* 2006;23(2):263-73.
- Deroo BJ, Korach KS:** Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 2006;116(3):561-70. Review.
- Devareddy L, Khalil DA, Korlagunta K, Hooshmand S, Bellmer DD, Arjmandi BH:** The effects of fructo-oligosaccharides in combination with soy protein on bone in osteopenic ovariectomized rats. *Menopause* 2006;13(4):692-9.
- Dickson RB, Lippman ME:** Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 1995;16(5):559-89. Review.
- Diel P, Geis RB, Caldarelli A, Schmidt S, Leschowsky UL, Voss A, Vollmer G:** The differential ability of the phytoestrogen genistein and of estradiol to induce uterine weight and proliferation in the rat is associated with a substance specific modulation of uterine gene expression. *Mol Cell Endocrinol* 2004b;221(1-2):21-32.
- Diel P, Hertrampf T, Seibel J, Laudenschlag-Leschowsky U, Kolba S, Vollmer G:** Combinatorial effects of the phytoestrogen genistein and of estradiol in uterus and liver of female Wistar rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;102(1-5):60-70.
- Diel P, Laudenschlag-Leschowsky U, Friedel A, Voss A, Roussel J:** Pulsed estradiol exposure has a limited ability to induce uterine proliferation in ovariectomized female Wistar rats. *Mol Cell Endocrinol* 2005 31;230(1-2):7-15.

- Diel P, Olf S, Schmidt S, Michna H:** Molecular identification of potential selective estrogen receptor modulator (SERM) like properties of phytoestrogens in the human breast cancer cell line MCF-7. *Planta Med* 2001a;67(6):510-4.
- Diel P, Smolnikar K, Schulz T, Laudenschlager U, Michna H, Vollmer G:** Phytoestrogens and carcinogenesis-differential effects of genistein in experimental models of normal and malignant rat endometrium. *Hum Reprod* 2001b;16(5):997-1006.
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G:** In vivo test systems for the quantitative and qualitative analysis of the biological activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;777(1-2):191-202. Review.
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G, Janning P, Upmeyer A, Michna H, Bolt HM, Degen GH:** Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch Toxicol* 2004c;78(4):183-93.
- Diel P, Thomae RB, Caldarelli A, Zierau O, Kolba S, Schmidt S, Schwab P, Metz P, Vollmer G:** Regulation of gene expression by 8-prenylnaringenin in uterus and liver of Wistar rats. *Planta Med* 2004a;70(1):39-44.
- Diel P:** Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicol Lett* 2002 28;127(1-3):217-24. Review.
- Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al:** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995;378(6555):406-9.
- Dixon DA, Kaplan CD, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM:** Post-transcriptional control of cyclooxygenase-2 gene expression. The role of the 3'-untranslated region. *J Biol Chem* 2000;275(16):11750-7.
- Dixon DA, Tolley ND, King PH, Nabors LB, McIntyre TM, Zimmerman GA, Prescott SM:** Altered expression of the mRNA stability factor HuR promotes cyclooxygenase-2 expression in colon cancer cells. *J Clin Invest* 2001;108(11):1657-65.
- Dutertre M, Smith CL:** Ligand-independent interactions of p160/steroid receptor coactivators and CREB-binding protein (CBP) with estrogen receptor- $\alpha$ : regulation by phosphorylation sites in the A/B region depends on other receptor domains. *Mol Endocrinol* 2003;17(7):1296-314.
- El-Tanani MK, Green CD:** Two separate mechanisms for ligand-independent activation of the estrogen receptor. *Mol Endocrinol* 1997;11(7):928-37.
- Endoh H, Sasaki H, Maruyama K, Takeyama K, Waga I, Shimizu T, Kato S, Kawashima H:** Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;235(1):99-102.
- Eng FC, Barsalou A, Akutsu N, Mercier I, Zechel C, Mader S, White JH:** Different classes of coactivators recognize distinct but overlapping binding sites on the estrogen receptor ligand binding domain. *J Biol Chem* 1998;273(43):28371-7.
- English MA, Stewart PM, Hewison M:** Estrogen metabolism and malignancy: analysis of the expression and function of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases in colonic cancer. *Mol Cell Endocrinol* 2001 22;171(1-2):53-60. Review.
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA:** Human estrogen receptor  $\beta$ -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(12):4258-65.

- Ettinger B, Black DM, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Gluer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR:** Reduction of vertebral fracture risk in postmenopausal women with osteoporosis treated with raloxifene: results from a 3-year randomized clinical trial. Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation (MORE) Investigators. *JAMA* 1999;282(7):637-45. Erratum in: *JAMA* 1999;282(22):2124.
- Evans RM:** The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 1988;240(4854):889-95. Review.
- Fan JD, Wagner BL, McDonnell DP:** Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol* 1996;10(12):1605-16. Erratum in: *Mol Endocrinol* 1997;11(3):341.
- Fanti P, Monier-Faugere MC, Geng Z, Schmidt J, Morris PE, Cohen D, Malluche HH:** The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporos Int* 1998;8(3):274-81.
- Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J:** Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;37(11):719-27. Review.
- Farquhar CM, Marjoribanks J, Lethaby A, Lamberts Q, Suckling JA; Cochrane HT Study Group:** Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. *Cochrane Database Syst Rev* 2005;(3):CD004143. Review.
- Fitzpatrick LA:** Phytoestrogens-mechanism of action and effect on bone markers and bone mineral density. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2003;32(1):233-52, viii. Review.
- Fitzpatrick LA:** Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal women. *Mayo Clin Proc* 1999;74(6):601-7. Review.
- Fonseca D, Ward WE:** Detection of isoflavones in mouse tibia after feeding daidzein. *J Med Food* 2006 Fall;9(3):436-9.
- Forster C, Makela S, Warri A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA:** Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99(24):15578-83.
- Fotsis T, Pepper MS, Montesano R, Aktas E, Breit S, Schweigerer L, Rasku S, Wahala K, Adlercreutz H:** Phytoestrogens and inhibition of angiogenesis. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12(4):649-66. Review.
- Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala K:** Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208(1):18-26.
- Fritsch M, Leary CM, Furlow JD, Ahrens H, Schuh TJ, Mueller GC, Gorski J:** A ligand-induced conformational change in the estrogen receptor is localized in the steroid binding domain. *Biochemistry* 1992;31(23):5303-11.
- Fritzemeier KH, Hillisch A, Elger W, Kaufmann U, Kollenkirchen U, Kosemund D, Lindenthal B, Muller G, Muhn P, Nubbemeyer R, Peters O, Siebel P, Hegele-Hartung C:** Biological effects of ERalpha- and ERbeta-selective estrogens. *Ernst Schering Res Found Workshop* 2004;(46):127-50. Review.
- Fujioka M, Uehara M, Wu J, Adlercreutz H, Suzuki K, Kanazawa K, Takeda K, Yamada K, Ishimi Y:** Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *J Nutr* 2004;134(10):2623-7.



- Gallo D, Zannoni GF, Apollonio P, Martinelli E, Ferlini C, Passetti G, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G:** Characterization of the pharmacologic profile of a standardized soy extract in the ovariectomized rat model of menopause: effects on bone, uterus, and lipid profile. *Menopause* 2005;12(5):589-600.
- Gambrell RD Jr:** The menopause: benefits and risks of estrogen-progestogen replacement therapy. *Fertil Steril* 1982;37(4):457-74. Review.
- Ganry O:** Phytoestrogens and prostate cancer risk. *Prev Med* 2005;41(1):1-6. Review.
- Gao YH, Yamaguchi M:** Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biol Pharm Bull* 1999;22(8):805-9.
- Gao YH, Yamaguchi M:** Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: involvement of protein kinase inhibition and protein tyrosine phosphatase activation. *Int J Mol Med* 2000;5(3):261-7.
- Garey J, Morgan MA, Frohlich J, McEwen BS, Pfaff DW:** Effects of the phytoestrogen coumestrol on locomotor and fear-related behaviors in female mice. *Horm Behav* 2001;40(1):65-76.
- Garnero P, Sornay-Rendu E, Chapuy MC, Delmas PD:** Increased bone turnover in late postmenopausal women is a major determinant of osteoporosis. *J Bone Miner Res* 1996;11(3):337-49.
- Ghanam K, Lavagna C, Burgaud JL, Javellaud J, Ea-Kim L, Oudart N:** Involvement of cyclooxygenase 2 in the protective effect of 17beta-estradiol on hypercholesterolemic rabbit aorta. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;275(2):696-703.
- Ghosh-Choudhury N, Harris MA, Feng JQ, Mundy GR, Harris SE:** Expression of the BMP 2 gene during bone cell differentiation. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 1994;4(2-3):345-55. Review.
- Gielen SC, Burger CW, Kuhne LC, Hanifi-Moghaddam P, Blok LJ:** Analysis of estrogen agonism and antagonism of tamoxifen, raloxifene, and ICI182780 in endometrial cancer cells: a putative role for the epidermal growth factor receptor ligand amphiregulin. *J Soc Gynecol Investig* 2005;12(7):e55-67.
- Giudicelli Y, Dieudonne MN, Lacasa D, Pasquier YN, Pecquery R:** Modulation by sex hormones of the membranous transducing system regulating fatty acid mobilization in adipose tissue. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1993;48(1):91-100. Review.
- Gluck O, Maricic M:** Skeletal and nonskeletal effects of raloxifene. *Curr Osteoporos Rep* 2003;1(3):123-8. Review.
- Goodman-Gruen D, Kritz-Silverstein D:** Usual dietary isoflavone intake and body composition in postmenopausal women. *Menopause* 2003;10(5):427-32.
- Göttlicher M, Heck S, Herrlich P:** Transcriptional cross-talk, the second mode of steroid hormone receptor action. *J Mol Med* 1998;76(7):480-9. Review.
- Gradishar WJ, Jordan VC:** Clinical potential of new antiestrogens. *J Clin Oncol* 1997;15(2):840-52. Review.
- Greendale GA, Lee NP, Arriola ER:** The menopause. *Lancet* 1999 13;353(9152):571-80. Review.
- Gustafsson JA:** An update on estrogen receptors. *Semin Perinatol* 2000;24(1):66-9. Review.
- Gustafsson JA:** ERbeta scientific visions translate to clinical uses. *Climacteric* 2006;9(3):156-60.
- Gustafsson JA:** What pharmacologists can learn from recent advances in estrogen signalling. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24(9):479-85. Review.
- Hagemann P, Rosenmund K. (Hrsg.):** Histotechnik: Ergänzungsheft zu: Laboratoriumsmedizin, ein Lehrbuch für medizinisch-technische Assistentinnen, Stuttgart: Hirzel, 3. Aufl. 1989.

- Haimov-Kochman R, Hochner-Celnikier D:** Hot flashes revisited: pharmacological and herbal options for hot flashes management. What does the evidence tell us? *Acta Obstet Gynecol Scand* 2005;84(10):972-9. Review.
- Hall JM, Couse JF, Korach KS:** The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001;276(40):36869-72. Review.
- Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R, et al:** Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990;162(4):285-94.
- Hansen LG, Jansen HT:** Environmental estrogens. *Science* 1994;266(5185):526.
- Harris HA, Albert LM, Leathurby Y, Malamas MS, Mewshaw RE, Miller CP, Kharode YP, Marzolf J, Komm BS, Winneker RC, Frail DE, Henderson RA, Zhu Y, Keith JC Jr:** Evaluation of an estrogen receptor-beta agonist in animal models of human disease. *Endocrinology* 2003a;144(10):4241-9.
- Harris HA:** Estrogen receptor- $\beta$ : Recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 2006a.
- Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS:** Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER $\alpha$  and ER $\beta$ , in estrogen target tissues in vivo through the use of an ER $\alpha$ -selective ligand. *Endocrinology* 2002;143(11):4172-7.
- Harris HA:** The unexpected science of estrogen receptor-beta selective agonists: a new class of anti-inflammatory agents? *Nucl Recept Signal* 2006b;4:e012.
- Harris SE, Guo D, Harris MA, Krishnaswamy A, Lichtler A:** Transcriptional regulation of BMP-2 activated genes in osteoblasts using gene expression microarray analysis: role of Dlx2 and Dlx5 transcription factors. *Front Biosci* 2003b;8:s1249-65. Review.
- Hauri HP, Bucher K:** Immunoblotting with monoclonal antibodies: importance of the blocking solution. *Anal Biochem* 1986;159(2):386-9.
- Hegele-Hartung C, Fritzeimer KH, Diel P:** Effects of a pure antiestrogen and progesterone on estrogen-mediated alterations of blood flow and progesterone receptor expression in the aorta of ovariectomized rabbits. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1997;63(4-6):237-49.
- Hegele-Hartung C, Siebel P, Peters O, Kosemund D, Muller G, Hillisch A, Walter A, Kraetzschmar J, Fritzeimer KH:** Impact of isotype-selective estrogen receptor agonists on ovarian function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(14):5129-34.
- Heine PA, Taylor JA, Iwamoto GA, Lubahn DB, Cooke PS:** Increased adipose tissue in male and female estrogen receptor-alpha knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(23):12729-34.
- Henderson BE, Ross RK, Judd HL, Krailo MD, Pike MC:** Do regular ovulatory cycles increase breast cancer risk? *Cancer* 1985;56(5):1206-8.
- Henderson BE, Ross RK, Pike MC, Casagrande JT:** Endogenous hormones as a major factor in human cancer. *Cancer Res* 1982;42(8):3232-9. Review.
- Henley DV, Korach KS:** Endocrine-disrupting chemicals use distinct mechanisms of action to modulate endocrine system function. *Endocrinology* 2006;147(6 Suppl):S25-32. Review.
- Henttu PM, Kalkhoven E, Parker MG:** AF-2 activity and recruitment of steroid receptor coactivator 1 to the estrogen receptor depend on a lysine residue conserved in nuclear receptors. *Mol Cell Biol* 1997;17(4):1832-9.
- Hermenegildo C, Cano A:** Pure anti-oestrogens. *Hum Reprod Update* 2000;6(3):237-43. Review.

- Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A:** Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des* 2006;12(2):205-15. Review.
- Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenschbach-Leschowsky U, Seibel J, Di Virgilio AL, Diel P:** Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 2006a;72(6):484-7.
- Hertrampf T, Gruca MJ, Seibel J, Laudenschbach U, Fritzemeier KH, Diel P:** The bone-protective effect of the phytoestrogen genistein is mediated via ERalpha-dependent mechanisms and strongly enhanced by physical activity. *Bone*. 2007 Feb 17; [Epub ahead of print]
- Hertrampf T, Schmidt S, Laudenschbach-Leschowsky U, Seibel J, Diel P:** Tissue-specific modulation of cyclooxygenase-2 (Cox-2) expression in the uterus and the v. cava by estrogens and phytoestrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2005;243(1-2):51-7.
- Hertrampf T, Schmidt S, Seibel J, Laudenschbach-Leschowsky U, Degen GH, Diel P:** Effects of genistein on the mammary gland proliferation of adult ovariectomised Wistar rats. *Planta Med* 2006b;72(4):304-10.
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Korach KS:** Estrogen receptor-dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol* 2003;17(10):2070-83.
- Hewitt SC, Korach KS:** Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 2003;125(2):143-9. Review.
- Hillisch A, Peters O, Kosemund D, Muller G, Walter A, Schneider B, Reddersen G, Elger W, Fritzemeier KH:** Dissecting physiological roles of estrogen receptor alpha and beta with potent selective ligands from structure-based design. *Mol Endocrinol* 2004;18(7):1599-609.
- Hofbauer LC, Kuhne CA, Viereck V:** The OPG/RANKL/RANK system in metabolic bone diseases. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 2004;4(3):268-75. Review.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, John EM, Smith M:** Assessing phytoestrogen exposure in epidemiologic studies: development of a database (United States). *Cancer Causes Control* 2000;11(4):289-98.
- Horowitz MC:** Cytokines and estrogen in bone: anti-osteoporotic effects. *Science* 1993;260(5108):626-7. Review.
- Hsieh CY, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG:** Estrogenic effects of genistein on the growth of estrogen receptor-positive human breast cancer (MCF-7) cells in vitro and in vivo. *Cancer Res* 1998;58(17):3833-8. Erratum in: *Cancer Res* 1999;59(6):1388.
- Hsu SM, Soban E:** Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. *J Histochem Cytochem* 1982;30(10):1079-82.
- Hughes DE, Dai A, Tiffie JC, Li HH, Mundy GR, Boyce BF:** Estrogen promotes apoptosis of murine osteoclasts mediated by TGF-beta. *Nat Med* 1996;2(10):1132-6.
- Hulka BS, Stark AT:** Breast cancer: cause and prevention. *Lancet* 1995;346(8979):883-7. Review.
- Hu SA:** Risks and benefits of soy isoflavones for breast cancer survivors. *Oncol Nurs Forum* 2004;31(2):249-63. Review.
- Iatropoulos MJ, Williams GM:** Proliferation markers. *Exp Toxicol Pathol* 1996;48(2-3):175-81. Review.
- Ichinose H, Garnier JM, Chambon P, Losson R:** Ligand-dependent interaction between the estrogen receptor and the human homologues of SWI2/SNF2. *Gene* 1997;188(1):95-100.
- Imamov O, Shim GJ, Warner M, Gustafsson JA:** Estrogen receptor Beta in health and disease. *Biol Reprod* 2005;73(5):866-71.

- Improta-Brears T, Whorton AR, Codazzi F, York JD, Meyer T, McDonnell DP:** Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(8):4686-91.
- Iwamura M, Abrahamsson PA, Benning CM, Cockett AT, di Sant'Agnese PA:** Androgen receptor immunostaining and its tissue distribution in formalin-fixed, paraffin-embedded sections after microwave treatment. *J Histochem Cytochem* 1994;42(6):783-8.
- Jadhav SB, Jain GK:** Statins and osteoporosis: new role for old drugs. *J Pharm Pharmacol* 2006;58(1):3-18. Review.
- Janning P, Schuhmacher US, Upmeier A, Diel P, Michna H, Degen GH, Bolt HM:** Toxicokinetics of the phytoestrogen daidzein in female DA/Han rats. *Arch Toxicol* 2000;74(8):421-30.
- Jassam N, Bell SM, Speirs V, Quirke P:** Loss of expression of oestrogen receptor beta in colon cancer and its association with Dukes' staging. *Oncol Rep* 2005;14(1):17-21.
- Jefferson WN, Padilla-Banks E, Clark G, Newbold RR:** Assessing estrogenic activity of phytochemicals using transcriptional activation and immature mouse uterotrophic responses. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2002;777(1-2):179-89.
- Jha HC, von Recklinghausen G, Zilliken F:** Inhibition of in vitro microsomal lipid peroxidation by isoflavonoids. *Biochem Pharmacol* 1985;34(9):1367-9.
- Jia TL, Wang HZ, Xie LP, Wang XY, Zhang RQ:** Daidzein enhances osteoblast growth that may be mediated by increased bone morphogenetic protein (BMP) production. *Biochem Pharmacol* 2003;65(5):709-15.
- Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C:** A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1995;54(3-4):167-84.
- Jordan VC:** The past, present, and future of selective estrogen receptor modulation. *Ann N Y Acad Sci* 2001;949:72-9. Review.
- Ju YH, Allred CD, Allred KF, Karko KL, Doerge DR, Helferich WG:** Physiological concentrations of dietary genistein dose-dependently stimulate growth of estrogen-dependent human breast cancer (MCF-7) tumors implanted in athymic nude mice. *J Nutr* 2001;131(11):2957-62.
- Kaldas RS, Hughes CL Jr:** Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. *Reprod Toxicol* 1989;3(2):81-9. Review.
- Kalu DN:** The ovariectomized rat model of postmenopausal bone loss. *Bone Miner* 1991;15(3):175-91. Review.
- Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y, Ezaki O:** Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)* 2005;51(2):110-7.
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W; Organisation for Economic Co-operation and Development:** The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase I. *Environ Health Perspect* 2001;109(8):785-94.
- Kanno S, Hirano S, Kayama F:** Effects of phytoestrogens and environmental estrogens on osteoblastic differentiation in MC3T3-E1 cells. *Toxicology* 2004;196(1-2):137-45.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P:** Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 1990;9(5):1603-14.

- Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, Masushige S, Gotoh Y, Nishida E, Kawashima H, Metzger D, Chambon P:** Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 1995;270(5241):1491-4.
- Kayisli UA, Aksu CA, Berkkanoglu M, Arici A:** Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87(12):5539-44.
- Kelly GE, Joannou GE, Reeder AY, Nelson C, Waring MA:** The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc Soc Exp Biol Med* 1995;208(1):40-3.
- Kelly GE, Nelson C, Waring MA, Joannou GE, Reeder AY:** Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta* 1993;223(1-2):9-22.
- Key TJ, Pike MC:** The role of oestrogens and progestagens in the epidemiology and prevention of breast cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 1988;24(1):29-43. Review.
- Khosla S, Atkinson EJ, Melton LJ 3rd, Riggs BL:** Effects of age and estrogen status on serum parathyroid hormone levels and biochemical markers of bone turnover in women: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82(5):1522-7.
- Khosla S, Melton LJ 3rd, Atkinson EJ, O'Fallon WM, Klee GG, Riggs BL:** Relationship of serum sex steroid levels and bone turnover markers with bone mineral density in men and women: a key role for bioavailable estrogen. *J Clin Endocrinol Metab* 1998;83(7):2266-74.
- Kim HK, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang JY, Zhang W, Duan J, Hartzell DL, Hamrick MW, Baile CA:** Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr* 2006;136(2):409-14.
- Kim MS, Lee YS:** Effects of soy isoflavone and/or estrogen treatments on bone metabolism in ovariectomized rats. *J Med Food* 2005 Winter;8(4):439-45.
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS:** Requirement of estrogen receptor-alpha in insulin-like growth factor-1 (IGF-1)-induced uterine responses and in vivo evidence for IGF-1/estrogen receptor cross-talk. *J Biol Chem* 2002;277(10):8531-7.
- Knauthe R, Diel P, Hegele-Hartung C, Engelhaupt A, Fritzscheier KH:** Sexual dimorphism of steroid hormone receptor messenger ribonucleic acid expression and hormonal regulation in rat vascular tissue. *Endocrinology* 1996;137(8):3220-7.
- Koehne CH, Dubois RN:** COX-2 inhibition and colorectal cancer. *Semin Oncol* 2004;31(2 Suppl 7):12-21. Review.
- Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA:** Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* 2005;26(3):465-78. Review.
- Komm BS, Terpening CM, Benz DJ, Graeme KA, Gallegos A, Korc M, Greene GL, O'Malley BW, Haussler MR:** Estrogen binding, receptor mRNA, and biologic response in osteoblast-like osteosarcoma cells. *Science* 1988;241(4861):81-4.
- Konstantinopoulos PA, Kominea A, VANDOROS G, Sykiotis GP, Andricopoulos P, Varakis I, Sotiropoulou-Bonikou G, Papavassiliou AG:** Oestrogen receptor beta (ERbeta) is abundantly expressed in normal colonic mucosa, but declines in colon adenocarcinoma paralleling the tumour's dedifferentiation. *Eur J Cancer* 2003;39(9):1251-8.
- Korach KS, Emmen JM, Walker VR, Hewitt SC, Yates M, Hall JM, Swope DL, Harrell JC, Couse JF:** Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2003;86(3-5):387-91. Review.
- Krebs EE, Ensrud KE, MacDonald R, Wilt TJ:** Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstet Gynecol* 2004;104(4):824-36. Review.

- Krege JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, Sar M, Korach KS, Gustafsson JA, Smithies O:** Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(26):15677-82.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA:** Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 1997;138(3):863-70.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA:** Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(12):5925-30.
- Kuiper GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA:** Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 1998;139(10):4252-63.
- Kuntz MA, Shapiro DJ:** Dimerizing the estrogen receptor DNA binding domain enhances binding to estrogen response elements. *J Biol Chem* 1997;272(44):27949-56.
- Kurzer MS, Xu X:** Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 1997;17:353-81. Review.
- Lacasa D, Agli B, Pecquery R, Giudicelli Y:** Influence of ovariectomy and regional fat distribution on the membranous transducing system controlling lipolysis in rat fat cells. *Endocrinology* 1991;128(2):747-53.
- Lahooti H, Thorsen T, Aakvaag A:** Estradiol increases phosphorylation of the 90 kDa heat shock protein not associated with estradiol receptor in MCF-7 cells in culture. *Mol Cell Endocrinol* 1990;74(1):33-43.
- Lamartiniere CA:** Protection against breast cancer with genistein: a component of soy. *Am J Clin Nutr* 2000;71(6 Suppl):1705-7.
- Lambert KC, Curran EM, Judy BM, Milligan GN, Lubahn DB, Estes DM:** 17beta-estradiol acts through ERalpha to increase IL-4 and GATA-3 expression in CD4+ T cells independent of antigen presentation. *J Immunol* 2005;175(9):5716-23.
- Lannigan DA:** Estrogen receptor phosphorylation. *Steroids*. 2003;68(1):1-9. Review.
- Launay S, Hermine O, Fontenay M, Kroemer G, Solary E, Garrido C:** Vital functions for lethal caspases. *Oncogene* 2005;24(33):5137-48. Review.
- Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzel T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R, Del-Rio AL, Ricote M, Ngo S, Gemsch J, Hilsenbeck SG, Osborne CK, Glass CK, Rosenfeld MG, Rose DW:** Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and SMRT complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(6):2920-5.
- Lechner D, Kallay E, Cross HS:** Phytoestrogens and colorectal cancer prevention. *Vitam Horm* 2005;70:169-98. Review.
- Leclercq G, Heuson JC:** Physiological and pharmacological effects of estrogens in breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1979;560(4):427-55. Review.
- Lee KC, Lanyon LE:** Mechanical loading influences bone mass through estrogen receptor alpha. *Exerc Sport Sci Rev* 2004;32(2):64-8. Review.
- Lee YB, Lee HJ, Kim KS, Lee JY, Nam SY, Cheon SH, Sohn HS:** Evaluation of the preventive effect of isoflavone extract on bone loss in ovariectomized rats. *Biosci Biotechnol Biochem* 2004;68(5):1040-5.
- Lemieux C, Phaneuf D, Labrie F, Giguere V, Richard D, Deshaies Y:** Estrogen receptor alpha-mediated adiposity-lowering and hypocholesterolemic actions of the selective estrogen receptor modulator acolbifene. *Int J Obes (Lond)* 2005;29(10):1236-44.

- Leopold AS, Erwin M, Oh J, Browning B:** Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science* 1976 9;191(4222):98-100.
- Lessey BA, Alexander PS, Horwitz KB:** The subunit structure of human breast cancer progesterone receptors: characterization by chromatography and photoaffinity labeling. *Endocrinology* 1983;112(4):1267-74.
- Lewis RD, Modlesky CM:** Nutrition, physical activity, and bone health in women. *Int J Sport Nutr* 1998;8(3):250-84. Review.
- Lewis-Wambi JS, Jordan VC:** Treatment of Postmenopausal Breast Cancer with Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Breast Dis* 2005;24:93-105.
- Li B, Yu S:** Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biol Pharm Bull* 2003;26(6):780-6.
- Lieberherr M, Cournot G, Robins SP:** Guidelines for using in vitro methods to study the effects of phyto-oestrogens on bone. *Br J Nutr* 2003;89 Suppl 1:S59-73. Review.
- Lindberg MK, Alatalo SL, Halleen JM, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C:** Estrogen receptor specificity in the regulation of the skeleton in female mice. *J Endocrinol* 2001a;171(2):229-36.
- Lindberg MK, Erlandsson M, Alatalo SL, Windahl S, Andersson G, Halleen JM, Carlsten H, Gustafsson JA, Ohlsson C:** Estrogen receptor alpha, but not estrogen receptor beta, is involved in the regulation of the OPG/RANKL (osteoprotegerin/receptor activator of NF-kappa B ligand) ratio and serum interleukin-6 in male mice. *J Endocrinol* 2001b;171(3):425-33.
- Lindberg MK, Moverare S, Eriksson AL, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C:** Identification of estrogen-regulated genes of potential importance for the regulation of trabecular bone mineral density. *J Bone Miner Res* 2002a;17(12):2183-95.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Alatalo S, Halleen J, Mohan S, Gustafsson JA, Ohlsson C:** Two different pathways for the maintenance of trabecular bone in adult male mice. *J Bone Miner Res* 2002b;17(4):555-62.
- Linton MF, Fazio S:** Cyclooxygenase-2 and inflammation in atherosclerosis. *Curr Opin Pharmacol* 2004;4(2):116-23. Review.
- Liu CH, Chang SH, Narko K, Trifan OC, Wu MT, Smith E, Haudenschild C, Lane TF, Hla T:** Overexpression of cyclooxygenase-2 is sufficient to induce tumorigenesis in transgenic mice. *J Biol Chem* 2001;276(21):18563-9.
- Lobenhofer EK, Bennett L, Cable PL, Li L, Bushel PR, Afshari CA:** Regulation of DNA replication fork genes by 17beta-estradiol. *Mol Endocrinol* 2002;16(6):1215-29.
- Löffler G, Petrides PE:** *Biochemie und Pathobiochemie*. Heidelberg: Springer Medizin Verlag, 7. Aufl. 2003
- Losel R, Wehling M:** Nongenomic actions of steroid hormones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003;4(1):46-56. Review.
- Losordo DW, Kearney M, Kim EA, Jekanowski J, Isner JM:** Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of premenopausal women. *Circulation* 1994;89(4):1501-10.
- Loukovaara M, Carson M, Palotie A, Adlercreutz H:** Regulation of sex hormone-binding globulin production by isoflavonoids and patterns of isoflavonoid conjugation in HepG2 cell cultures. *Steroids* 1995;60(9):656-61.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ:** Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193(1):265-75.

- Luisi BF, Xu WX, Otwinowski Z, Freedman LP, Yamamoto KR, Sigler PB:** Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA. *Nature* 1991;352(6335):497-505.
- Lu LJ, Anderson KE, Grady JJ, Kohen F, Nagamani M:** Decreased ovarian hormones during a soya diet: implications for breast cancer prevention. *Cancer Res* 2000;60(15):4112-21.
- Lupulescu A:** Estrogen use and cancer incidence: a review. *Cancer Invest* 1995;13(3):287-95. Review.
- Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D:** *Der Experimentator: Immunologie*. München: Spektrum akademischer Verlag, 1. Aufl. 2004.
- MacGregor JI, Jordan VC:** Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 1998;50(2):151-96. Review.
- Maier WE, Herman JR:** Pharmacology and toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. *Regul Toxicol Pharmacol* 2001;34(1):53-61. Review.
- Majeska RJ, Ryaby JT, Einhorn TA:** Direct modulation of osteoblastic activity with estrogen. *J Bone Joint Surg Am* 1994;76(5):713-21.
- Mäkelä SI, Pylkkanen LH, Santti RS, Adlercreutz H:** Dietary soybean may be antiestrogenic in male mice. *J Nutr* 1995;125(3):437-45.
- Mäkelä S, Savolainen H, Aavik E, Myllarniemi M, Strauss L, Taskinen E, Gustafsson JA, Hayry P:** Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(12):7077-82.
- Manolagas SC:** Birth and death of bone cells: basic regulatory mechanisms and implications for the pathogenesis and treatment of osteoporosis. *Endocr Rev* 2000;21(2):115-37. Review.
- Martineti V, Picariello L, Tognarini I, Carbonell Sala S, Gozzini A, Azzari C, Mavilia C, Tanini A, Falchetti A, Fiorelli G, Tonelli F, Brandi ML:** ERbeta is a potent inhibitor of cell proliferation in the HCT8 human colon cancer cell line through regulation of cell cycle components. *Endocr Relat Cancer*. 2005;12(2):455-69. Erratum in: *Endocr Relat Cancer* 2005;12(3):682.
- Martin MB, Franke TF, Stoica GE, Chambon P, Katzenellenbogen BS, Stoica BA, McLemore MS, Olivo SE, Stoica A:** A role for Akt in mediating the estrogenic functions of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I. *Endocrinology* 2000;141(12):4503-11.
- Martin PM, Horwitz KB, Ryan DS, McGuire WL:** Phytoestrogen interaction with estrogen receptors in human breast cancer cells. *Endocrinology* 1978;103(5):1860-7.
- Maxwell SR:** Women and heart disease. *Basic Res Cardiol* 1998;93 Suppl 2:79-84. Review.
- Mazur W:** Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 1998;12(4):729-42. Review.
- McCormick KM, Burns KL, Piccone CM, Gosselin LE, Brazeau GA:** Effects of ovariectomy and estrogen on skeletal muscle function in growing rats. *J Muscle Res Cell Motil* 2004;25(1):21-7.
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW:** Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 1999;20(3):321-44. Review.
- Mendelsohn ME, Karas RH:** The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999;340(23):1801-11. Review.
- Mendelsohn ME, Karas RH:** Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 2005;308(5728):1583-7. Review.
- Meseguer A, Puche C, Cabero A:** Sex steroid biosynthesis in white adipose tissue. *Horm Metab Res* 2002;34(11-12):731-6. Review.



- Milder IE, Arts IC, van de Putte B, Venema DP, Hollman PC:** Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr* 2005;93(3):393-402.
- Milligan S, Kalita J, Pocock V, Heyerick A, De Cooman L, Rong H, De Keukeleire D:** Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction* 2002;123(2):235-42.
- Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, Van De Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, De Keukeleire D:** The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop (*Humulus lupulus* L.) flavonoids. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(12):4912-5.
- Mitra S, Desai M, Khatkhatay MI:** Association of estrogen receptor alpha gene polymorphisms with bone mineral density in postmenopausal Indian women. *Mol Genet Metab* 2005.
- Monroe DG, Secreto FJ, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Spelsberg TC:** Estrogen receptor alpha and beta heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol* 2005;19(6):1555-68.
- Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M, Altavilla D, Ientile R, Squadrito F:** Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J Bone Miner Res* 2002;17(10):1904-12.
- Morris C, Thorpe J, Ambrosio L, Santin M:** The soybean isoflavone genistein induces differentiation of MG63 human osteosarcoma osteoblasts. *J Nutr* 2006;136(5):1166-70.
- Morris E, Rymer J:** Menopausal symptoms. *Clin Evid* 2005;(13):2392-406. Review.
- Morton MS, Arisaka O, Miyake N, Morgan LD, Evans BA:** Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age. *J Nutr* 2002;132(10):3168-71.
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R:** ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392(1):49-53.
- Mueller SO, Korach KS:** Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice. *Curr Opin Pharmacol* 2001;1(6):613-9. Review.
- Murkies AL, Frydenberg M:** Phytoestrogens. *Encyclopedia of Hormones* 2000; 3:192-201.
- Naaz A, Yellayi S, Zakroczymski MA, Bunick D, Doerge DR, Lubahn DB, Helferich WG, Cooke PS:** The soy isoflavone genistein decreases adipose deposition in mice. *Endocrinology* 2003;144(8):3315-20.
- Nagata C, Takatsuka N, Inaba S, Kawakami N, Shimizu H:** Effect of soymilk consumption on serum estrogen concentrations in premenopausal Japanese women. *J Natl Cancer Inst* 1998a;90(23):1830-5.
- Nagata C, Takatsuka N, Kurisu Y, Shimizu H:** Decreased serum total cholesterol concentration is associated with high intake of soy products in Japanese men and women. *J Nutr* 1998b;128(2):209-13.
- Nakamura Y, Tsuji S, Tonogai Y:** Determination of the levels of isoflavonoids in soybeans and soy-derived foods and estimation of isoflavonoids in the Japanese daily intake. *J AOAC Int* 2000;83(3):635-50.
- Nandur R, Kumar K, Villablanca AC:** Cardiovascular actions of selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens. *Prev Cardiol* 2004 Spring;7(2):73-9. Review.
- National Academy of Sciences:** Diet, nutrition, and cancer. Washington DC: National Academy Press 1982.

- Nelson HD, Humphrey LL, Nygren P, Teutsch SM, Allan JD:** Postmenopausal hormone replacement therapy: scientific review. *JAMA* 2002;288(7):872-81. Review.
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E:** The mouse uterotrophic assay: other end points. *Environ Health Perspect* 2001a;109(12):A569-70.
- Newbold RR, Jefferson WN, Padilla-Banks E, Walker VR, Pena DS; Developmental Endocrinology Studies Group:** Cell response endpoints enhance sensitivity of the immature mouse uterotrophic assay. *Reprod Toxicol* 2001b;15(3):245-52.
- Nilsson M, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA:** Nuclear receptors in disease: the oestrogen receptors. *Essays Biochem* 2004;40:157-67. Review.
- Nilsson S, Gustafsson JA:** Estrogen receptor action. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2002;12(4):237-57. Review.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA:** Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81(4):1535-65. Review.
- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J:** The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 1997;25(2):176-88.
- Ogawa S, Chan J, Gustafsson JA, Korach KS, Pfaff DW:** Estrogen increases locomotor activity in mice through estrogen receptor alpha: specificity for the type of activity. *Endocrinology* 2003;144(1):230-9.
- Ogawa S, Emi M, Shiraki M, Hosoi T, Ouchi Y, Inoue S:** Association of estrogen receptor beta (ESR2) gene polymorphism with blood pressure. *J Hum Genet* 2000;45(6):327-30.
- Ogita H, Node K, Kitakaze M:** The role of estrogen and estrogen-related drugs in cardiovascular diseases. *Curr Drug Metab* 2003;4(6):497-504. Review.
- Ohlsson C, Hellberg N, Parini P, Vidal O, Bohlooly M, Rudling M, Lindberg MK, Warner M, Angelin B, Gustafsson JA:** Obesity and disturbed lipoprotein profile in estrogen receptor-alpha-deficient male mice. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;278(3):640-5.
- Ohmichi M, Tasaka K, Kurachi H, Murata Y:** Molecular mechanism of action of selective estrogen receptor modulator in target tissues. *Endocr J* 2005;52(2):161-7. Review.
- O'Lone R, Frith MC, Karlsson EK, Hansen U:** Genomic targets of nuclear estrogen receptors. *Mol Endocrinol* 2004;18(8):1859-75. Review.
- O'Regan RM, Cisneros A, England GM, MacGregor JI, Muenzner HD, Assikis VJ, Bilimoria MM, Piette M, Dragan YP, Pitot HC, Chatterton R, Jordan VC:** Effects of the antiestrogens tamoxifen, toremifene, and ICI 182,780 on endometrial cancer growth. *J Natl Cancer Inst* 1998;90(20):1552-8.
- Osborne CK:** Effects of estrogens and antiestrogens on cell proliferation: implications for the treatment of breast cancer. *Cancer Treat Res* 1988;39:111-29. Review.
- Ososki AL, Kennelly EJ:** Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 2003;17(8):845-69. Review.
- Ospina JA, Brevig HN, Krause DN, Duckles SP:** Estrogen suppresses IL-1beta-mediated induction of COX-2 pathway in rat cerebral blood vessels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286(5):H2010-9.
- Oursler MJ, Osdoby P, Pyfferoen J, Riggs BL, Spelsberg TC:** Avian osteoclasts as estrogen target cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88(15):6613-7.

- Ouyang P, Michos ED, Karas RH:** Hormone replacement therapy and the cardiovascular system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol* 2006;47(9):1741-53. Review.
- Ozawa H:** Steroid Hormones, their receptors and neuroendocrine system. *J Nippon Med Sch* 2005;72(6):316-25.
- Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S:** Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 1997;272(41):25832-8.
- Padilla-Banks E, Jefferson WN, Newbold RR:** The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotrophic bioassay. *Environ Health Perspect* 2001;109(8):821-6.
- Paeck K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS:** Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997;277(5331):1508-10.
- Paik J, Lee JY, Hwang D:** Signaling pathways for TNFalpha-induced COX-2 expression: mediation through MAP kinases and NFkB, and inhibition by certain nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Adv Exp Med Biol* 2002;507:503-8.
- Pan W, Quarles LD, Song LH, Yu YH, Jiao C, Tang HB, Jiang CH, Deng HW, Li YJ, Zhou HH, Xiao ZS:** Genistein stimulates the osteoblastic differentiation via NO/cGMP in bone marrow culture. *J Cell Biochem* 2005;94(2):307-16.
- Park D, Huang T, Frishman WH:** Phytoestrogens as cardioprotective agents. *Cardiol Rev* 2005 - Feb;13(1):13-7. Review.
- Patisaul HB, Melby M, Whitten PL, Young LJ:** Genistein affects ER beta- but not ER alpha-dependent gene expression in the hypothalamus. *Endocrinology* 2002;143(6):2189-97.
- Pedersen SB, Bruun JM, Kristensen K, Richelsen B:** Regulation of UCP1, UCP2, and UCP3 mRNA expression in brown adipose tissue, white adipose tissue, and skeletal muscle in rats by estrogen. *Biochem Biophys Res Commun* 2001;288(1):191-7.
- Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, Richelsen B:** Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89(4):1869-78.
- Peeters PH, Keinan-Boker L, van der Schouw YT, Grobbee DE:** Phytoestrogens and breast cancer risk. Review of the epidemiological evidence. *Breast Cancer Res Treat* 2003;77(2):171-83. Review.
- Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzscheier KH, Hegele-Hartung C, Ertl G, Neyses L:** The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 2005a;67(4):604-12.
- Pelzer T, Loza PA, Hu K, Bayer B, Dienesch C, Calvillo L, Couse JF, Korach KS, Neyses L, Ertl G:** Increased mortality and aggravation of heart failure in estrogen receptor-beta knockout mice after myocardial infarction. *Circulation* 2005b;111(12):1492-8.
- Peter I, Shearman AM, Vasan RS, Zucker DR, Schmid CH, Demissie S, Cupples LA, Kuvin JT, Karas RH, Mendelsohn ME, Housman DE, Benjamin EJ:** Association of estrogen receptor beta gene polymorphisms with left ventricular mass and wall thickness in women. *Am J Hypertens* 2005;18(11):1388-95.
- Peterson G:** Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr* 1995;125(3 Suppl):784S-789S. Review.
- Peterson GL:** Review of the Folin phenol protein quantitation method of Lowry, Rosebrough, Farr and Randall. *Anal Biochem* 1979;100(2):201-20. Review.

- Peterson TG, Coward L, Kirk M, Falany CN, Barnes S:** The role of metabolism in mammary epithelial cell growth inhibition by the isoflavones genistein and biochanin A. *Carcinogenesis* 1996;17(9):1861-9.
- Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA:** Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 1997;11(10):1486-96.
- Pettersson K, Gustafsson JA:** Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 2001;63:165-92. Review.
- Picherit C, Chanteranne B, Bennetau-Pelissero C, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP, Coxam V:** Dose-dependent bone-sparing effects of dietary isoflavones in the ovariectomised rat. *Br J Nutr* 2001;85(3):307-16.
- Picherit C, Coxam V, Bennetau-Pelissero C, Kati-Coulibaly S, Davicco MJ, Lebecque P, Barlet JP:** Daidzein is more efficient than genistein in preventing ovariectomy-induced bone loss in rats. *J Nutr* 2000;130(7):1675-81.
- Pie JE, Park JH, Park YH, Ryu YM, Kim KN, Suh SW, Becker KG, Cho-Chung YS, Kim MK:** Effect of genistein on the expression of bone metabolism genes in ovariectomized mice using a cDNA microarray. *J Nutr Biochem* 2006;17(3):157-64.
- Pike AC, Brzozowski AM, Hubbard RE, Bonn T, Thorsell AG, Engstrom O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M:** Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *EMBO J* 1999;18(17):4608-18.
- Pino AM, Valladares LE, Palma MA, Mancilla AM, Yanez M, Albala C:** Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 2000;85(8):2797-800.
- Plouffe L Jr:** Selective estrogen receptor modulators (SERMs) in clinical practice. *J Soc Gynecol Investig* 2000;7(1 Suppl):S38-46. Review.
- Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP:** Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res* 1999;43(4):985-91.
- Potter SM:** Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *J Nutr*. 1995;125(3 Suppl):606S-611S. Review.
- Pottratz ST, Bellido T, Mocharla H, Crabb D, Manolagas SC:** 17 beta-Estradiol inhibits expression of human interleukin-6 promoter-reporter constructs by a receptor-dependent mechanism. *J Clin Invest* 1994;93(3):944-50.
- Price KR, Fenwick GR:** Naturally occurring oestrogens in foods--a review. *Food Addit Contam* 1985;2(2):73-106.
- Proctor DN, Melton LJ, Khosla S, Crowson CS, O'Connor MK, Riggs BL:** Relative influence of physical activity, muscle mass and strength on bone density. *Osteoporos Int* 2000;11(11):944-52.
- Purohit A, Reed MJ:** Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. *Steroids* 2002;67(12):979-83. Review.
- Raines EW, Ross R:** Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role of growth factors in lesion development and the potential impact of soy. *J Nutr* 1995;125(3 Suppl):624S-630S. Review.
- Razandi M, Pedram A, Merchanthaler I, Greene GL, Levin ER:** Plasma membrane estrogen receptors exist and functions as dimers. *Mol Endocrinol* 2004;18(12):2854-65.

**Reddel RR, Murphy LC, Sutherland RL:** Effects of biologically active metabolites of tamoxifen on the proliferation kinetics of MCF-7 human breast cancer cells in vitro. *Cancer Res* 1983;43(10):4618-24.

**Richelson LS, Wahner HW, Melton LJ 3rd, Riggs BL:** Relative contributions of aging and estrogen deficiency to postmenopausal bone loss. *N Engl J Med* 1984;311(20):1273-5.

**Rickard DJ, Monroe DG, Ruesink TJ, Khosla S, Riggs BL, Spelsberg TC:** Phytoestrogen genistein acts as an estrogen agonist on human osteoblastic cells through estrogen receptors alpha and beta. *J Cell Biochem* 2003;89(3):633-46.

**Rigas B, Kashfi K:** Nitric-oxide-donating NSAIDs as agents for cancer prevention. *Trends Mol Med* 2004;10(7):324-30. Review.

**Riggs BL, Hartmann LC:** Selective estrogen-receptor modulators -- mechanisms of action and application to clinical practice. *N Engl J Med* 2003;348(7):618-29. *N Engl J Med*. 2003;348(12):1192. Review.

**Riggs BL, Khosla S, Melton LJ:** Sex steroids and the construction and conservation of the adult skeleton. *Endocr Rev* 2002;23(3):279-302. Review.

**Robyr D, Wolffe AP, Wahli W:** Nuclear hormone receptor coregulators in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol* 2000;14(3):329-47. Review.

**Roesch DM:** Effects of selective estrogen receptor agonists on food intake and body weight gain in rats. *Physiol Behav* 2006;30(1):39-44.

**Romeis B:** *Mikroskopische Technik*. Oldenburg Verlag München Wien 1989.

**Rowan BG, Weigel NL, O'Malley BW:** Phosphorylation of steroid receptor coactivator-1. Identification of the phosphorylation sites and phosphorylation through the mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* 2000;275(6):4475-83.

**Rowell C, Carpenter DM, Lamartiniere CA:** Chemoprevention of breast cancer, proteomic discovery of genistein action in the rat mammary gland. *J Nutr* 2005;135(12 Suppl):2953S-2959S.

**Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG:** Dietary genistein exerts estrogenic effects upon the uterus, mammary gland and the hypothalamic/pituitary axis in rats. *J Nutr* 1997;127(2):263-9.

**Saunders PT:** Oestrogen receptor beta (ER beta). *Rev Reprod* 1998;3(3):164-71. Review.

**Savouret JF, Bailly A, Misrahi M, Rauch C, Redeuilh G, Chauchereau A, Milgrom E:** Characterization of the hormone responsive element involved in the regulation of the progesterone receptor gene. *EMBO J* 1991;10(7):1875-83.

**Saxon LK, Turner CH:** Estrogen receptor beta: the antimechanostat? *Bone* 2005;36(2):185-92. Review.

**Schindler AE:** Climacteric symptoms and hormones. *Gynecol Endocrinol* 2006;22(3):151-4.

**Schmidt PJ:** Mood, depression, and reproductive hormones in the menopausal transition. *Am J Med* 2005;118(12 Suppl 2):54-8.

**Schwabe JW, Chapman L, Finch JT, Rhodes D:** The crystal structure of the estrogen receptor DNA-binding domain bound to DNA: how receptors discriminate between their response elements. *Cell* 1993;75(3):567-78.

**Schwabe JW, Neuhaus D, Rhodes D:** Solution structure of the DNA-binding domain of the oestrogen receptor. *Nature* 1990;348(6300):458-61.

**Seow A, Shi CY, Franke AA, Hankin JH, Lee HP, Yu MC:** Isoflavonoid levels in spot urine are associated with frequency of dietary soy intake in a population-based sample of middle-aged and older Chinese in Singapore. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1998;7(2):135-40.

**Setchell KD, Borriello SP, Hulme P, Kirk DN, Axelson M:** Non-steroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 1984;40(3):569-78. Review.

**Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Brashear WT, Kirschner AS, Cassidy A, Heubi JE:** Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* 2001;131(4 Suppl):1362S-75S.

**Setchell KD, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe B, Jakate AS, Creutzinger V, Heubi JE:** Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *J Nutr* 2003;133(4):1027-35.

**Setchell KD, Brown NM, Lydeking-Olsen E:** The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *J Nutr* 2002b;132(12):3577-84. Review.

**Setchell KD, Brown NM, Zimmer-Nechemias L, Brashear WT, Wolfe BE, Kirschner AS, Heubi JE:** Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am J Clin Nutr* 2002a;76(2):447-53.

**Setchell KD, Cassidy A:** Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr* 1999;129(3):758S-767S. Review.

**Setchell KD, Lawson AM, Mitchell FL, Adlercreutz H, Kirk DN, Axelson M:** Lignans in man and in animal species. *Nature* 1980;287(5784):740-2.

**Setchell KD, Lydeking-Olsen E:** Dietary phytoestrogens and their effect on bone: evidence from in vitro and in vivo, human observational, and dietary intervention studies. *Am J Clin Nutr* 2003;78(3 Suppl):593S-609S. Review.

**Setchell KD:** Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr* 1998;68(6 Suppl):1333S-1346S. Review.

**Setchell KD:** Soy isoflavones—benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 2001;20(5 Suppl):354S-362S; discussion 381S-383S. Review.

**Sfakianos J, Coward L, Kirk M, Barnes S:** Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J Nutr* 1997;127(7):1260-8.

**Shao W, Brown M:** Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res* 2004;6(1):39-52.

**Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW:** Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 1997;52:141-64.

**Shimizu H, Ross RK, Bernstein L, Pike MC, Henderson BE:** Serum oestrogen levels in postmenopausal women: comparison of American whites and Japanese in Japan. *Br J Cancer* 1990;62(3):451-3.

**Shinoda M, Latour MG, Lavoie JM:** Effects of physical training on body composition and organ weights in ovariectomized and hyperestrogenic rats. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2002;26(3):335-43.

**Shipp KM:** Exercise for people with osteoporosis: translating the science into clinical practice. *Curr Osteoporosis Rep* 2006;4(4):129-33.

**Shi Y:** Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis. *Mol Cell* 2002;9(3):459-70. Review.

**Silbernagel S, Despopoulos A:** Taschenatlas der Physiologie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 5. Aufl. 2003.

**Simonet WS, Lacey DL, Dunstan CR, Kelley M, Chang MS, Luthy R, Nguyen HQ, Wooden S, Bennett L, Boone T, Shimamoto G, DeRose M, Elliott R, Colombero A, Tan HL, Trail G, Sullivan J, Davy E, Bucay N, Renshaw-Gegg L, Hughes TM, Hill D, Pattison W, Campbell P, Sander S, Van G, Tarpley J, Derby P, Lee R, Boyle WJ:** Osteoprotegerin: a novel secreted protein involved in the regulation of bone density. *Cell* 1997;89(2):309-19.

**Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, Jones M:** Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 1999;6(2):131-7. Review.

**Singh M, Dykens JA, Simpkins JW:** Novel mechanisms for estrogen-induced neuroprotection. *Exp Biol Med (Maywood)* 2006;231(5):514-21.

**Smith CL, Conneely OM, O'Malley BW:** Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(13):6120-4.

**Smith CL:** Cross-talk between peptide growth factor and estrogen receptor signaling pathways. *Biol Reprod* 1998;58(3):627-32. Review.

**Smith CL, Onate SA, Tsai MJ, O'Malley BW:** CREB binding protein acts synergistically with steroid receptor coactivator-1 to enhance steroid receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(17):8884-8.

**Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM:** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000;69:145-82. Review.

**Smolders RG, van der Mooren MJ, Sipkema P, Kenemans P:** Estrogens, homocysteine, vasodilatation and menopause: basic mechanisms, interactions and clinical implications. *Gynecol Endocrinol* 2003;17(4):339-54. Review.

**Sola B, Renoir JM:** Antiestrogenic therapies in solid cancers and multiple myeloma. *Curr Mol Med* 2006;6(4):359-68.

**Sorensen MB, Rosenfalck AM, Hojgaard L, Ottesen B:** Obesity and sarcopenia after menopause are reversed by sex hormone replacement therapy. *Obes Res* 2001;9(10):622-6.

**Sowers MR, Jannausch ML, McConnell DS, Kardia SR, Randolph JF Jr:** Endogenous estradiol and its association with estrogen receptor gene polymorphisms. *Am J Med* 2006;119.

**Squadrito F, Altavilla D, Crisafulli A, Saitta A, Cucinotta D, Morabito N, D'Anna R, Corrado F, Ruggeri P, Frisina N, Squadrito G:** Effect of genistein on endothelial function in postmenopausal women: a randomized, double-blind, controlled study. *Am J Med* 2003;114(6):470-6.

**Srivastava N, Chowdhury PR, Averna M, Srivastava RA:** Estrogen increases hepatic lipase levels in inbred strains of mice: a possible mechanism for estrogen-dependent lowering of high density lipoprotein. *Mol Cell Biochem* 2001;220(1-2):87-93.

**Srivastava RA, Krul ES, Lin RC, Schonfeld G:** Regulation of lipoprotein metabolism by estrogen in inbred strains of mice occurs primarily by posttranscriptional mechanisms. *Mol Cell Biochem* 1997;173(1-2):161-8.

**Stein B, Yang MX:** Repression of the interleukin-6 promoter by estrogen receptor is mediated by NF-kappa B and C/EBP beta. *Mol Cell Biol* 1995;15(9):4971-9.

**Stevenson JC:** The metabolic and cardiovascular consequences of HRT. *Br J Clin Pract* 1995;49(2):87-90. Review.

- Stramba-Badiale M, Fox KM, Priori SG, Collins P, Daly C, Graham I, Jonsson B, Schenck-Gustafsson K, Tendera M:** Cardiovascular diseases in women: a statement from the policy conference of the European Society of Cardiology. *Eur Heart J* 2006;27(8):994-1005.
- Subbaramaiah K, Dannenberg AJ:** Cyclooxygenase 2: a molecular target for cancer prevention and treatment. *Trends Pharmacol Sci* 2003;24(2):96-102. Review.
- Subbiah MT:** Mechanisms of cardioprotection by estrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 1998;217(1):23-9. Review.
- Sumino H, Ichikawa S, Yoshida A, Murakami M, Kanda T, Mizunuma H, Sakamaki T, Kurabayashi M:** Effects of hormone replacement therapy on weight, abdominal fat distribution, and lipid levels in Japanese postmenopausal women. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2003;27(9):1044-51.
- Sun J, Meyers MJ, Fink BE, Rajendran R, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS:** Novel ligands that function as selective estrogens or antiestrogens for estrogen receptor-alpha or estrogen receptor-beta. *Endocrinology* 1999;140(2):800-4.
- Tamura M, Deb S, Sebastian S, Okamura K, Bulun SE:** Estrogen up-regulates cyclooxygenase-2 via estrogen receptor in human uterine microvascular endothelial cells. *Fertil Steril* 2004;81(5):1351-6.
- Tanaka M, Nakaya S, Kumai T, Watanabe M, Tateishi T, Shimizu H, Kobayashi S:** Effects of estrogen on serum leptin levels and leptin mRNA expression in adipose tissue in rats. *Horm Res* 2001;56(3-4):98-104.
- Tanaka T, Shiina T, Hayashi S, Okamura H, Kamomae H, Kaneda Y:** Estrogen receptor alpha expression in the medial preoptic area and the medial basal hypothalamus under different physiological conditions in cattle. *J Reprod Dev* 2003;49(1):55-60.
- Thomas HV, Reeves GK, Key TJ:** Endogenous estrogen and postmenopausal breast cancer: a quantitative review. *Cancer Causes Control* 1997;8(6):922-8. Review.
- Thompson LU, Boucher BA, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N:** Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol. *Nutr Cancer* 2006;54(2):184-201.
- Tikkanen MJ, Adlercreutz H:** Dietary soy-derived isoflavone phytoestrogens. Could they have a role in coronary heart disease prevention? *Biochem Pharmacol* 2000;60(1):1-5. Review.
- Tinwell H, Ashby J:** Sensitivity of the immature rat uterotrophic assay to mixtures of estrogens. *Environ Health Perspect* 2004;112(5):575-82.
- Tominaga S:** Cancer incidence in Japanese in Japan, Hawaii, and western United States. *Natl Cancer Inst Monogr* 1985;69:83-92.
- Tomkinson A, Gevers EF, Wit JM, Reeve J, Noble BS:** The role of estrogen in the control of rat osteocyte apoptosis. *J Bone Miner Res* 1998;13(8):1243-50.
- Toniolo PG, Levitz M, Zeleniuch-Jacquotte A, Banerjee S, Koenig KL, Shore RE, Strax P, Pasternack BS:** A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women. *J Natl Cancer Inst* 1995;87(3):190-7.
- Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH:** Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res* 2003;36(9):1143-58. Review.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1979;76(9):4350-4.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J:** Immunoblotting in the clinical laboratory. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27(8):495-501. Review.



- Tremblay A, Tremblay GB, Labrie F, Giguere V:** Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol Cell* 1999b;3(4):513-9.
- Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, Giguere V:** Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor beta. *Mol Endocrinol* 1997;11(3):353-65.
- Tremblay GB, Tremblay A, Labrie F, Giguere V:** Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol Cell Biol* 1999a;19(3):1919-27.
- Tsai MJ, O'Malley BW:** Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu Rev Biochem* 1994;63:451-86. Review.
- Turner CH, Sato M, Bryant HU:** Raloxifene preserves bone strength and bone mass in ovariectomized rats. *Endocrinology* 1994a;135(5):2001-5.
- Turner RT, Riggs BL, Spelsberg TC:** Skeletal effects of estrogen. *Endocr Rev* 1994b;15(3):275-300. Review.
- Usui T:** Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocr J* 2006;53(1):7-20. Review.
- Viereck V, Grundker C, Blaschke S, Siggelkow H, Emons G, Hofbauer LC:** Phytoestrogen genistein stimulates the production of osteoprotegerin by human trabecular osteoblasts. *J Cell Biochem* 2002;84(4):725-35.
- Vischer U:** Estrogens and atherosclerosis: a direct protective effect on the vascular wall? *Eur J Endocrinol* 1997;137(4):343-4. Review.
- Vollmer G, Starcke S, Wober J, Zierau O:** Endocrine modulation and the fragile balance of homeostasis--an overview. *Neuro Endocrinol Lett* 2002;23 Suppl 2:37-42. Review.
- Wada-Hiraike O, Imamov O, Hiraike H, Hultenby K, Schwend T, Omoto Y, Warner M, Gustafsson JA:** Role of estrogen receptor beta in colonic epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(8):2959-64. Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006a;103.
- Wada-Hiraike O, Warner M, Gustafsson JA:** New developments in oestrogen signalling in colonic epithelium. *Biochem Soc Trans* 2006b;34(Pt 6):1114-6.
- Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y, Nakayama T, Wada M, Ohno Y:** Dietary intake and sources of isoflavones among Japanese. *Nutr Cancer* 1999;33(2):139-45.
- Walf AA, Frye CA:** Administration of estrogen receptor beta-specific selective estrogen receptor modulators to the hippocampus decrease anxiety and depressive behavior of ovariectomized rats. *Pharmacol Biochem Behav* 2006.
- Walf AA, Frye CA:** ERbeta-selective estrogen receptor modulators produce antianxiety behavior when administered systemically to ovariectomized rats. *Neuropsychopharmacology* 2005;30(9):1598-609.
- Walf AA, Rhodes ME, Frye CA:** Antidepressant effects of ERbeta-selective estrogen receptor modulators in the forced swim test. *Pharmacol Biochem Behav* 2004;78(3):523-9.
- Walz E:** Isoflavon- and saponin-glucoside in Soja hispida. *Justus Liebigs Annal chem* 1931;498:118-155.
- Wang DY, Key TJ, Pike MC, Boreham J, Chen J:** Serum hormone levels in British and rural Chinese females. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18 Suppl 1:S41-5.
- Wang JF, Guo YX, Niu JZ, Liu J, Wang LQ, Li PH:** Effects of Radix Puerariae flavones on liver lipid metabolism in ovariectomized rats. *World J Gastroenterol* 2004;10(13):1967-70.

- Wang TT, Sathyamoorthy N, Phang JM:** Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. *Carcinogenesis* 1996;17(2):271-5.
- Warner M, Gustafsson JA:** Nongenomic effects of estrogen: why all the uncertainty? *Steroids* 2006;71(2):91-5.
- Warner M, Wang L, Weihua Z, Cheng G, Sakaguchi H, Saji S, Nilsson S, Kiesselbach T, Gustafsson JA:** Analysis of estrogen receptor expression in tissues. *Methods Enzymol* 2003;364:448-63.
- Weigel NL:** Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochem J* 1996;319 ( Pt 3):657-67. Review.
- Weigel NL, Zhang Y:** Ligand-independent activation of steroid hormone receptors. *J Mol Med* 1998;76(7):469-79. Review.
- Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA:** Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000 May;97(11):5936-41.
- Weitzmann MN, Pacifici R:** Estrogen deficiency and bone loss: an inflammatory tale. *J Clin Invest* 2006;116(5):1186-94.
- Weitzmann MN, Pacifici R:** The role of T lymphocytes in bone metabolism. *Immunol Rev* 2005;208:154-68. Review.
- White R, Fawell SE, Parker MG:** Analysis of oestrogen receptor dimerisation using chimeric proteins. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1991;40(1-3):333-41.
- Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzeimer KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J:** Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor-alpha stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension* 2003;42(5):991-6.
- Windler EE, Kovanen PT, Chao YS, Brown MS, Havel RJ, Goldstein JL:** The estradiol-stimulated lipoprotein receptor of rat liver. A binding site that membrane mediates the uptake of rat lipoproteins containing apoproteins B and E. *J Biol Chem* 1980;255(21):10464-71.
- Wu AH, Ziegler RG, Pike MC, Nomura AM, West DW, Kolonel LN, Horn-Ross PL, Rosenthal JF, Hoover RN:** Menstrual and reproductive factors and risk of breast cancer in Asian-Americans. *Br J Cancer* 1996;73(5):680-6.
- Wu J, Oka J, Higuchi M, Tabata I, Toda T, Fujioka M, Fuku N, Teramoto T, Okuhira T, Ueno T, Uchiyama S, Urata K, Yamada K, Ishimi Y:** Cooperative effects of isoflavones and exercise on bone and lipid metabolism in postmenopausal Japanese women: a randomized placebo-controlled trial. *Metabolism* 2006;55(4):423-33.
- Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Nakatani T, Ezaki O, Cui H, Yamada K, Ishimi Y:** Combined intervention of soy isoflavone and moderate exercise prevents body fat elevation and bone loss in ovariectomized mice. *Metabolism* 2004a;53(7):942-8.
- Wu J, Wang X, Chiba H, Higuchi M, Takasaki M, Ohta A, Ishimi Y:** Combined intervention of exercise and genistein prevented androgen deficiency-induced bone loss in mice. *J Appl Physiol* 2003;94(1):335-42.
- Wu J, Wang X, Higuchi M, Yamada K, Ishimi Y:** High bone mass gained by exercise in growing male mice is increased by subsequent reduced exercise. *J Appl Physiol* 2004b;97(3):806-10.
- Wu J, Wang X, Takasaki M, Ohta A, Higuchi M, Ishimi Y:** Cooperative effects of exercise training and genistein administration on bone mass in ovariectomized mice. *J Bone Miner Res* 2001;16(10):1829-36.

- Wuttke W, Jarry H, Becker T, Schultens A, Christoffel V, Gorkow C, Seidlova-Wuttke D:** Phytoestrogens: endocrine disrupters or replacement for hormone replacement therapy? *Maturitas* 2003 14;44 Suppl 1:S9-20. Review.
- Xie LQ, Yu JP, Luo HS:** Expression of estrogen receptor beta in human colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2004 15;10(2):214-7.
- Xu X, Harris KS, Wang HJ, Murphy PA, Hendrich S:** Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J Nutr* 1995;125(9):2307-15.
- Yagami T, Nakazato H, Ueda K, Asakura K, Kuroda T, Hata S, Sakaeda T, Sakaguchi G, Itoh N, Hashimoto Y, Hiroshige T, Kambayashi Y:** Prostaglandin E2 rescues cortical neurons from amyloid beta protein-induced apoptosis. *Brain Res* 2003 10;959(2):328-35.
- Yamaguchi M, Sugimoto E:** Stimulatory effect of genistein and daidzein on protein synthesis in osteoblastic MC3T3-E1 cells: activation of aminoacyl-tRNA synthetase. *Mol Cell Biochem* 2000;214(1-2):97-102.
- Yamagishi T, Otsuka E, Hagiwara H:** Reciprocal control of expression of mRNAs for osteoclast differentiation factor and OPG in osteogenic stromal cells by genistein: evidence for the involvement of topoisomerase II in osteoclastogenesis. *Endocrinology* 2001;142(8):3632-7.
- Yamamoto S, Sobue T, Kobayashi M, Sasaki S, Tsugane S:** Soy, isoflavones, and breast cancer risk in Japan. *J Natl Cancer Inst* 2003;95(12):906-13.
- Yau L, Zahradka P:** PGE(2) stimulates vascular smooth muscle cell proliferation via the EP2 receptor. *Mol Cell Endocrinol* 2003;203(1-2):77-90.
- Yeh JK, Liu CC, Aloia JF:** Additive effect of treadmill exercise and 17 beta-estradiol replacement on prevention of tibial bone loss in adult ovariectomized rat. *J Bone Miner Res* 1993;8(6):677-83.
- Ye SF, Saga I, Ichimura K, Nagai T, Shinoda M, Matsuzaki S:** Coumestrol as well as isoflavones in soybean extract prevent bone resorption in ovariectomized rats. *Endocr Regul* 2003;37(3):145-52.
- Yeung J, Yu TF:** Effects of isoflavones (soy phyto-estrogens) on serum lipids: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Nutr J* 2003;2:15.
- Zava DT, Duwe G:** Estrogenic and antiproliferative properties of genistein and other flavonoids in human breast cancer cells in vitro. *Nutr Cancer* 1997;27(1):31-40.
- Zheng FF, Wu RC, Smith CL, O'Malley BW:** Rapid estrogen-induced phosphorylation of the SRC-3 coactivator occurs in an extranuclear complex containing estrogen receptor. *Mol Cell Biol* 2005;25(18):8273-84.
- Zhou S, Turgeman G, Harris SE, Leitman DC, Komm BS, Bodine PV, Gazit D:** Estrogens activate bone morphogenetic protein-2 gene transcription in mouse mesenchymal stem cells. *Mol Endocrinol* 2003;17(1):56-66.

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abb. 1.1:</b> Strukturformeln der körpereigenen Estrogene 17 $\beta$ -Estradiol, Estron und Estriol.....	3
<b>Abb. 1.2:</b> Vergleichende schematische Darstellung der sechs Domänen der Estrogenrezeptorsubtypen und ihrer Funktionen (nach: Shao und Brown 2004).....	6
<b>Abb. 1.3:</b> Klassische genomische (i) und alternative nicht-genomische (ii, iii) Wirkungsweisen von Estrogenen (übernommen aus: Deroo and Korach 2006).....	9
<b>Abb. 1.4:</b> Estrogensensitive Gewebe, Organe und Zellen, sowie gewebespezifische quantitative Verteilungsmuster der Estrogenrezeptorsubtypen (nach: Kuiper et al. 1997, Setchell und Cassidy 1999, Diel 2002).....	13
<b>Abb. 1.5:</b> Wichtige Klassen von Phytoestrogenen. Die Substanzen in Klammern sind nicht als solche in Pflanzen vorhanden, sondern Stoffwechselprodukte. Das Schema enthält nicht alle pflanzlichen estrogen wirkenden Inhaltsstoffe wie z.B. Mykoestrogene oder Phytosterole.....	18
<b>Abb. 1.6:</b> Ausgewählte Phytoestrogene und physiologisch bedeutende Metaboliten. Daidzein, Biochanin A, Genistein, Matairesinol, Secoisolariciresinol und Coumestrol sind in verschiedenen Pflanzenvertretern anzutreffen. Equol, Enterolacton und Enterodiol sind Säugetiermetaboliten ihrer pflanzlichen Vorläufermoleküle (nach Horn-Ross et al. 2000).....	21
<b>Abb. 1.7:</b> Vergleichende Darstellung der Strukturformeln von 17 $\beta$ -Estradiol und Genistein.....	22
<b>Abb. 2.1:</b> Strukturformeln der applizierten Substanzen.....	39
<b>Abb. 2.2:</b> Zusammenfassende Darstellung des Ablaufs der tierexperimentellen Studien.....	41
<b>Abb. 2.3:</b> Zusammenfassende Darstellung der Tierexperimente.....	47
<b>Abb. 3.1:</b> „Semy dry Blot“ gefärbt mit Ponceau S. Precision Plus Protein <sup>TM</sup> -Standard (10-250 kD) und gefärbte Proteinbanden.....	51
<b>Abb. 3.2:</b> Prinzip der Lumi-Light <sup>PLUS</sup> Detektion (übernommen aus Herstellerinformationen).....	53
<b>Abb. 3.3:</b> Immundetektion (mit (Strept)Avidin-Biotin-Enzym-Komplex, biotinylierten Sekundärantikörpern und 3,3'-Diaminobenzidine-tetrahydrochloride (DAB)) (nach Luttmann et al. 2004).....	60
<b>Abb. 3.4:</b> Azan-Färbung. Lichtmikroskopische Aufnahme eines Uterusquerschnitts. Vergrößerung: 100x.....	61
<b>Abb. 3.5:</b> <i>In vivo</i> Messung der Knochendichte in der Tibia von Ratten (A). Auszuwertende Querschnittsbilder der vermessenen Schnittebenen (B).....	64
<b>Abb. 3.6:</b> Messapparatur zur Dokumentation des Bewegungsantriebs.....	65
<b>Abb. 4.1:</b> Proteinexpression des Proliferationsmarkers PCNA und des Progesteronrezeptors (PR) in der Brustdrüse ovariectomierter Ratten nach dreitägiger subkutaner Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen (siehe Tab. 2.2). Dargestellt sind ein repräsentativer Western Blot und die densitometrische Auswertung.....	70
<b>Abb. 4.2:</b> Proteinexpression des Entzündungsmarkers Cox-2 im Uterus und der <i>Vena cava</i> ovariectomierter Ratten nach dreitägiger subkutaner Behandlung mit den Untersuchungssubstanzen (siehe Tab. 2.2). Dargestellt sind repräsentative immunhistochemische Färbungen von Querschnitten. Vergrößerung 100x.....	71
<b>Abb. 4.3:</b> Prozentualer Körpergewichtszuwachs nach drei Monaten. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX K), Mann-Whitney U Test	

(* p<0.05, ** p<0.01). + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Laufgruppe der intakten Tiere (SHAM L), Mann-Whitney U Test (+ p<0.05, ++ p<0.01).....	73
<b>Abb. 4.4:</b> Darstellung des Bewegungstriebes der verschiedenen Versuchsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur intakten Laufgruppe (SHAM), Mann-Whitney U Test, mit p<0.01. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur mit Estradiol substituierten Laufgruppe (E <sub>2</sub> ), Mann-Whitney U Test, mit p<0.01. ....	74
<b>Abb. 4.5:</b> Entwicklung der trabekulären Knochendichte der Versuchsgruppen in 6 Wochen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der ovariectomierten Laufgruppe (OVX L), mit * p< 0.05 und ** p< 0.01, Mann-Whitney U Test. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der Phyto-Laufgruppe (Phyto L), mit + p< 0.05 und ++ p< 0.01, Mann-Whitney U Test. ....	75
<b>Abb. 4.6:</b> Uterusfeuchtgewichte von ovariectomierten Ratten nach dreitägiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zur unbehandelten ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit p< 0.05, Mann-Whitney U Test.....	76
<b>Abb. 4.7:</b> Immunhistochemische PCNA-Kernfärbung in Uterusquerschnitten. Lichtmikroskopische Aufnahme bei 200facher Vergrößerung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. ....	77
<b>Abb. 4.8:</b> Prozentualer Anteil PCNA-positiver Zellen im Uterusepithel verschiedener Behandlungsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), Mann-Whitney U Test mit * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001). + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), Mann-Whitney U Test mit ++ <0.01, +++ p<0.001. ....	78
<b>Abb. 4.9:</b> Uterusfeuchtgewichte von ovariectomierten Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit p< 0.01, Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), mit p< 0.01, Mann-Whitney U Test. ....	79
<b>Abb. 4.10:</b> Azanfärbung von Uteri unterschiedlich behandelte OVX-Ratten. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Lichtmikroskopische Aufnahmen von Querschnitten. Vergrößerung 100x. ....	80
<b>Abb. 4.11:</b> Uterusepithelhöhen von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. *** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit p< 0.001, Mann-Whitney U Test. +++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Genisteingruppe (GEN), mit p< 0.001, Mann-Whitney U Test. ....	81
<b>Abb. 4.12:</b> Körpergewichtsentwicklung von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit p< 0.01, Mann-Whitney U Test. ....	82
<b>Abb. 4.13:</b> Laufleistung ovariectomierter Ratten während dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante	

Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit * $p < 0.05$ , ** $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	82
<b>Abb. 4.14:</b> Entwicklung der Knochendichte ovariectomierter Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Trabekuläre Knochendichte (A), kortikale Knochendichte (B) ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	83
<b>Abb. 4.15:</b> Computertomographische Aufnahmen von Beinquerschnitten in Höhe des proximalen Unterschenkels. Dargestellt sind Tibia, Fibula und muskuläre Areale (v.a. des M. gastrocnemius) von repräsentativen Vertretern der einzelnen OVX-Behandlungsgruppen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Die Ergebnisse der Knochendichtemessung sind farblich dargestellt. ...	84
<b>Abb. 4.16:</b> Untersuchung der Regulation der BMP-2 Expression im Western Blot. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.3 zu entnehmen. Aktin dient als Referenzprotein. ....	85
<b>Abb. 4.17:</b> Immunhistochemische PCNA Kernfärbung nach Behandlung mit verschiedenen estrogenen Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. Dargestellt sind Dünndarmquerschnitte mit Serosa, Muskularis, Submukosa und Mukosa. Vergrößerung 100x. ....	85
<b>Abb. 4.18:</b> Analyse der Proteinexpression von PCNA (A) und aktiver Caspase-3 (B) im Western Blot mit densitometrischer Auswertung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.5 zu entnehmen. ....	86
<b>Abb. 4.19:</b> Uterusfeuchtgewichte von OVX-Ratten nach dreiwöchiger kombinierter s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.7 zu entnehmen. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zur ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX), mit $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zur GEN+Beta Gruppe, mit $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	87
<b>Abb. 4.20:</b> Laufaktivität von OVX-Ratten nach dreiwöchiger kombinierter s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.7 zu entnehmen. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zu Alpha1, mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	88
<b>Abb. 4.21:</b> Trabekuläre Knochendichte von ovariectomierten Ratten mit und ohne mechanischen Reiz. * kennzeichnet signifikante Unterschiede zur Endmessung der ovariectomierten Kontrollgruppe (OVX K), mit * $p < 0.05$ und ** $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. + kennzeichnet signifikante Unterschiede zur jeweiligen Anfangsmessung in dieser Gruppe, mit + $p < 0.05$ und ++ $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	88
<b>Abb. 4.22:</b> Trabekuläre Knochendichte von OVX-Ratten nach dreiwöchiger s.c. Applikation verschiedener estrogener Substanzen. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.6 zu entnehmen. ** kennzeichnet signifikante Unterschiede zu $E_2$ , mit $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ++ kennzeichnet signifikante Unterschiede zu Alpha, mit $p < 0.01$ , Mann-Whitney U Test. ....	89
<b>Abb. 5.1:</b> Schematische Darstellung steroidalster Substanzen in der Bindungstasche der Estrogenrezeptoren $\alpha$ und $\beta$ . A: Darstellung von $E_2$ in der Bindungstasche von $ER\alpha$ (blau) und $ER\beta$ (grün), B: $16\alpha$ - $LE_2$ füllt den zusätzlichen Freiraum in der Bindungstasche des $ER\alpha$ (nahe der Aminosäure M421), C: $8\beta$ - $VE_2$ füllt den freien Raum in der Bindungstasche des $ER\beta$ (nahe der Aminosäure M336) (übernommen aus: Hillisch et al. 2004). ....	94

**Tabellenverzeichnis**

<b>Tab. 2.1:</b> Für Immunhistochemie und Western Blot verwendete Antikörper.....	40
<b>Tab. 2.2:</b> Tierexperiment 1: Testung organspezifischer agonistischer Wirkungen von Genistein.....	43
<b>Tab. 2.3:</b> Tierexperiment 2: Untersuchung antagonistischer Effekte von Genistein.....	44
<b>Tab. 2.4:</b> Tierexperiment 3: Einflüsse einer phytoestrogenreichen Diät.....	45
<b>Tab. 2.5:</b> Tierexperiment 4: Vergleichende Einflüsse von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Effekten unter dem Einfluss von körperlicher Aktivität.....	46
<b>Tab. 2.6:</b> Tierexperiment 5: Vergleichende Einflüsse von Genistein und estrogenrezeptorsubtypspezifischen Effekten ohne den Einfluss von körperlicher Aktivität.....	46
<b>Tab. 2.7:</b> Tierexperiment 6: Kombinationsversuch zur Untersuchung additiver und antagonistischer Effekte.....	47
<b>Tab. 4.1:</b> Konzentrationen von Genistein und Daidzein in den verwendeten Diäten. Ergebnisse einer quantitativen HPLC-Bestimmung.....	72
<b>Tab. 4.2:</b> Genistein- und Daidzeinspiegel im Blutplasma. Ergebnisse einer quantitativen HPLC-Bestimmung. Die Behandlung der Untersuchungsgruppen ist Tab. 2.4 zu entnehmen.....	72
<b>Tab. 5.1:</b> Gewebespezifische Wirkungen verschiedener Estrogenrezeptorliganden; basierend auf präklinischen Studien (nach Bryant und Dere 1998).....	95