Transgene und endogene Reportersysteme *in vitro* zur Erfassung endokriner Effekte

Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D386)

vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Daniela Seng

Betreuer: **Prof. Dr. G. Eisenbrand**

Kaiserslautern 2000

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 15. Mai 2000

Prüfungskommission:

Vorsitzender:	Prof. Dr. D. Wortmann
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand in der Zeit zwischen Januar 1997 und September 1999 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten Themas sowie für seine Anregungen und wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk danke ich für die Übernahme des Koreferates.

Bei Herrn Prof. Dr. R. Wortmann möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

Inhaltsverzeichnis

1 **EINLEITUNG** 1

2 **THEORETISCHE GRUNDLAGEN** 4

2.1 Estrogenaktive Verbindungen 4

2.1.1 Estrogene 4

2.1.2 Antiestrogene 5
2.1.2.1 Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM) 5
2.1.2.2 Mögliche Wirkmechanismen der SERMs 6
2.1.2.3 Tamoxifen 7
2.1.2.4 Raloxifen 7
2.1.2.5 ICI 182 780 8
2.1.2.6 Vergleich der Bindung von Raloxifen und Estradiol an den Estrogenrezeptor 9

2.1.3 Stilbenderivate 10
2.1.3.1 Diethylstilbestrol 10
2.1.3.2 Resveratrol 10

2.1.4 Phyto-/Mykoestrogene und Phytosterole 11
2.1.4.1 Phyto- und Mykoestrogene 11
2.1.4.2 Phytosterole 13

2.1.5 Alkylphenolethoxylate 14

2.1.6 Bisphenol A 15

2.1.7 Pflanzenschutzmittel 16

2.2 Steroidhormonrezeptoren 17
2.2.1 Allgemeines 17
2.2.2 Struktur von Steroidhormonrezeptoren 18
2.2.2.1 Hormonbindende Domäne (HBD, Region, E) 19
2.2.2.2 DNA-bindende Domäne (DBD, Region, C) 20
2.2.2.3 Genaktivierende Domäne (Region A/B) 21
2.2.2.4 Region D und F 21
2.2.2.5 Transaktivierungsfunktion AF1/2 22

2.3 Estrogenrezeptor β 22

2.4 Promotor und Enhancer Elemente 25

2.5 Hormon Responsive Elemente 26

2.6 Estrogeninduzierbare Gene 27
2.6.1 Vitellogenin A2 27
2.6.2 pS2-Protein 29

2.7 Mechanismus der Transkriptionsaktivierung 30

2.8 Steroidhormonrezeptorlokalisierung 32

2.9 Steroidhormonrezeptor-Coaktivatoren 33

2.10 Steroidhormonrezeptor-assoziierte Proteine 36

2.11 Modell der Estrogenrezeptorsignaltransduktion 37

2.12 Estrogenrezeptorphosphorylierung 38

2.13 Regulationsmechanismen von Hormonen 39

2.14 Testsysteme 40
2.14.1 *in vivo* Testsysteme 41
2.14.2 *in vitro* Testsysteme 42
2.14.2.1 RBA-Wert 42
2.14.2.2 Polymeraseseitenkettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Polymeraseseitenkettenreaktion (RT-PCR) 42
2.14.2.2.1 PCR 42
2.14.2.2.2 RT-PCR 43
2.14.2.3 Immunradiometrischer Assay 45
2.14.2.4 Estrogenic-Screening-Assay 46
2.14.2.5 Transgene Reportergensysteme 47
2.14.2.5.1 Luciferase 49
2.14.2.5.2 Alkalische Phosphatase (AP) 51
2.14.2.6 Band-Shift-Assay 52

2.15 Zellen 53
2.15.1 COS-7 Zellinie 53
2.15.2 MCF-7 Zellinie 53
2.15.3 MCF-7-Luciferase (MVLN-C15) Zellinie 54
2.15.4 HaCaT- Zellinie 54
2.15.5 CV-1 Zellinie 55
2.15.6 CHO-K1-Zellinie 55
2.15.7 HEK-293-Zellinie 55

3 PROBLEMSTELLUNG 56

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION 58

4.1 Aufbau von *in vitro* Testsystemen zur Untersuchung potentieller endokriner Disruptoren 58

4.2 SEAP-Reportergensystem 60
4.2.1 SEAP-Plasmid (pSEAP2) 60
4.2.2 Einzelschritte der Konstruktion 63
4.2.3 Gewinnen des VITA2-Promotors 64
4.2.4 Vorbereitung des pSEAP2-Vektors 65
4.2.5 Ligation von VITA2 und pSEAP2 65

4.2.6 Überprüfung des Promotoreinbaus 65
4.2.7 Funktionsprüfung des pSEAP2/VITA2-Plasmides 66

4.3 pGL2-Reportergensystem 68
4.3.1 pGL2-Enhancer Vektor 68
4.3.2 Einzelschritte der Konstruktion 71
4.3.3 Gewinnen des VITA2-Wildtyp-Promotors 71
4.3.4 Vorbereiten des Vektors für die Ligation mit dem Promotor 72
4.3.5 Ligation von VITA2 und pGL2 73
4.3.6 Überprüfung des Promotoreinbaus 73
4.3.7 Funktionsprüfung des pGL2/VITA2-Plasmides 75

4.4 Diskussion des Promotors 76

4.5 Etablierung und Validierung eines Estrogenrezeptor α bzw. β Reportergensystems 78
4.5.1 Expressionsplasmide der humanen Estrogenrezeptorsubtypen α und β 78
4.5.2 Plasmid pCMV5-hERbeta 79
4.5.3 Vorbereitung der Vektoren 80

4.6 Transiente Cotransfektion der Reportergenplasmide und Estrogenrezeptorexpressionsplasmide in verschiedene Zellinien 81
4.6.1 Transiente Transfektion von COS-7 und CV-1 Zellen 82
4.6.2 Transiente Transfektion der Zellinie CHO 85
4.6.3 Transiente Transfektion der Zellinie HEK 293 87

4.7 Untersuchung der Zellinien MCF-7 und HaCaT auf Estrogenrezeptor α und β 108

4.8 Luciferase-Reportergensystem 110
4.8.1 Validierung und Inbetriebnahme des Luminometergerätes 111
4.8.2 Einzelergebnisse 113
4.8.2.1 Phytosterole 113
4.8.2.2 Stilbenderivate 116
4.8.2.3 Zimtsäureanaloga 120
4.8.2.4 Parabene 122
4.8.2.5 Tamoxifenanaloga 124

4.9. Kombinationsexperimente *in vitro* 125

4.10 MCF-7/pSEAP2VITA2 Testsystem 132
4.10.1 Transiente Transfektion der MCF-7 Zellen mit pSEAP2/VITA2 133
4.10.2 Selektion der MCF-7/pSEAP2VITA2/pSV2neo Zellen 136

4.11 Bestimmung des endogenen Reporters pS2 137
4.11.1 Nachweis des pS2 Proteins 137
4.11.2 Bestimmung der pS2 Induktion mittels RT-PCR 143

4.12 Band-Shift-Assay 146

4.13 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Testsysteme zur Charakterisierung estrogenaktiver Substanzen 148

4.14 Auswerteverfahren 151

5 ZUSAMMENFASSUNG 152

6 **EXPERIMENTELLER TEIL** 155

6.1 Zellkultur 155
6.1.1 Lösungen und Chemikalien 155
6.1.2 Kultivierungsbedingungen 156
6.1.3 Mediumwechsel 157
6.1.4 Passagieren 157
6.1.5 Einfrieren von Zellen 157
6.1.6 Auftauen von Zellen 157
6.1.7 Auszählen von Zellen 158

6.2 BCA-Protein-Assay 158
6.2.1 Prinzip 158
6.2.2 Lösungen und Chemikalien 158
6.2.3 Durchführung 159

6.3 Luciferase-Assay 159
6.3.1 Prinzip 159
6.3.2 Lösungen und Chemikalien 159
6.3.3 Durchführung 160

6.4 Sekretierbare Alkalische Phosphatase (SEAP)-Reportergenassay 162
6.4.1 Prinzip 162
6.4.2 Lösungen und Chemikalien 162
6.4.3 Durchführung 162

6.5 Cytosol-Aufarbeitung für pS2 Protein 164
6.5.1 Prinzip 164
6.5.2 Lösungen und Chemikalien 164
6.5.3 Durchführung 164

6.6 Immunradiometrischer Assay für pS2-Protein 165
6.6.1 Prinzip 165
6.6.2 Lösungen und Chemikalien 165
6.6.3 Durchführung 165

6.7 Isolierung von Kernproteinen 166
6.7.1 Prinzip 166
6.7.2 Lösungen und Chemikalien 166
6.7.3 Durchführung 166

6.8 Band-Shift-Assay 167
6.8.1 Prinzip 167

6.8.2 Lösungen und Chemikalien für die native Polyacrylamid-Elektrophorese 168
6.8.3 Durchführung 169
6.8.4 Lösungen und Chemikalien für das Semidry-Blotting 169
6.8.5 Durchführung 170

6.9 3´-Endmarkierung von Oligonukleotiden 171
6.9.1 Prinzip 171
6.9.2 Lösungen und Chemikalien 171
6.9.3 Durchführung 172

6.10 E-Screen-Assay (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay) 173
6.10.1 Prinzip 173
6.10.2 Lösungen und Chemikalien 173
6.10.3 Durchführung 173

6.11 Polymerasekettenreaktion (PCR) 174
6.11.1 Prinzip 174
6.11.2 Lösungen und Chemikalien 175
6.11.3 Durchführung 175

6.12 Gelelektrophorese 177
6.12.1 Prinzip 177
6.12.2 Lösungen und Chemikalien 177
6.12.3 Durchführung 177

6.13 DNA-Extraktion aus Agarosegelen 178
6.13.1 Prinzip 178
6.13.2 Isolation der DNA mittels Glasmilchmethode 178
6.13.2.1 Prinzip 178
6.13.2.2 Lösungen und Chemikalien 178
6.13.2.3 Durchführung 179
6.13.3 DNA-Extraktion nach „Sqeeze-Freeze-Methode“ 179
6.13.3.1 Materialien und Chemikalien 179
6.13.3.2 Durchführung 180
6.13.4 Ethanol-Fällung 180
6.13.4.1 Prinzip 180
6.13.4.2 Lösungen und Chemikalien 180
6.13.4.3 Durchführung 181

6.14 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren 181

6.15 DNA-Verdau 181
6.15.1 Prinzip 181
6.15.2 Lösungen und Chemikalien 182
6.15.3 Durchführung 182

6.16 Isolation der Gesamt-RNA 182
6.16.1 Prinzip 182
6.16.2 Lösungen und Chemikalien 182
6.16.3 Durchführung 183

6.17 RT-PCR-Reaktion 184
6.17.1 Prinzip 184
6.17.2 Lösungen und Chemikalien 184
6.17.3 Durchführung 185

6.18 RNA-Verdau 186
6.18.1 Prinzip 186
6.18.2 Lösungen und Chemikalien 187
6.18.3 Durchführung 187

6.19 Bakterienkultivierung 187
6.19.1 Lösungen und Chemikalien 187
6.19.2 Übernachtkultur von E. coli 188
6.19.3 Anlegen einer Glycerinkultur 188
6.19.3.1 Lösungen 188
6.19.3.2 Durchführung 188

6.20 Transformation 188
6.20.1 Prinzip 188
6.20.2 Lösungen und Chemikalien 189
6.20.3 Durchführung 189

6.21 Isolierung von Plasmiden 190
6.21.1 Minipräparation 190
6.21.1.1 Prinzip 190
6.21.1.2 Lösungen und Chemikalien 190
6.21.1.3 Durchführung 191
6.21.2 Maxipräparation 192
6.21.2.1 Prinzip 192
6.21.2.2 Lösungen und Chemikalien 192
6.21.2.3 Durchführung 193

6.22 Restriktionsverdau 193
6.22.1 Prinzip 193
6.22.2 Lösungen und Chemikalien 194
6.22.3 Durchführung 194

6.23 Dephosphorylierung linearisierter DNA 194
6.23.1 Prinzip 194
6.23.2 Lösungen und Chemikalien 195
6.23.3 Durchführung 195

6.24 Ligation von DNA-Fragmenten 196
6.24.1 Prinzip 196
6.24.2 Lösungen und Chemikalien 197
6.24.3 Durchführung 197

6.25 Transfektion von DNA in Eukaryonten und Selektion 197
6.25.1 Prinzip 197
6.25.2 Elektroporation 198
6.25.2.1 Prinzip 198

6.25.2.2 Lösungen und Chemikalien 198
6.25.2.3 Durchführung 199
6.25.3 Polybrene-Dimethylsulfoxid-Technik 199
6.25.3.1 Prinzip 199
6.25.3.2 Lösungen und Chemikalien 200
6.25.3.3 Durchführung 200
6.25.4 Liposomale Transfektion 200
6.25.4.1 Prinzip 200
6.25.4.2 Lösungen und Chemikalien 201
6.25.4.3 Durchführung 201
6.25.5 Nicht-liposomale Transfektion 202
6.25.5.1 Prinzip 202
6.25.5.2 Lösungen und Chemikalien 202
6.25.5.3 Durchführung 202

6.26 Selektion transfizierter MCF-7 Zellen 203
6.26.1 Prinzip 203
6.26.2 Lösungen 203
6.26.3 Durchführung 203

6.27 Einzelklon-Selektion 204
6.27.1 Prinzip 204
6.27.2 Chemikalien und Materialien 204
6.27.3 Durchführung 204

6.28 Deglucosidierung von Rhapontin 205
6.28.1 Lösungen und Chemikalien 205
6.28.2 Durchführung 205

6.29 Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen 205
6.29.1 Detektion von Mycoplasmen 206
6.29.1.1 Prinzip 206
6.29.1.2 Chemikalien und Geräte 206
6.29.1.3 Durchführung 206
6.29.2 Eliminierung von Mycoplasmen 207
6.29.2.1 Reagenzien 207
6.29.2.2 Durchführung 207

7 **LITERATURVERZEICHNIS** 211

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF	Aktivierungsfunktion
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APEO	Alkylphenolethoxylate
AR	Androgenrezeptor
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BCA	Bicinchonic-Acid
C	Celsius
CBP	CREB-Bindungsprotein
CDFKS	Charcoal Dextran FKS
cDNA	komplementäre DNA
CM	Chloramphenicol
CMV	Cytomegalo Virus
CoA	Coenzym A
CRE	cAMP Responsive Element
CREB	cAMP Responsive Element Bindungsprotein
CSPD	Dinatrium 3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxethan-3,2´-(5´-chloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]-decan]-4-yl)phenylphosphat
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBD	DNA binding domain
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)-ethan
DEAE-dextran	Diethylaminoethyl-dextran
DES	Diethylstilbestrol
DIG	Digoxygenin
DIG-11-ddUTP	Digoxygenin-11-2'-didesoxyuridin-5'-triphosphat
DMBA	7,12- Dimethylbenz(a)anthracen
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
E_2	17β-Estradiol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	Enzym linked Immuno Sorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ERα	Estrogenrezeptor alpha
ERβ	Estrogenrezeptor beta
ERE	Estrogen Responsives Element
FKS	Fötales Kälberserum
fmol	femtomol
g	Erdbeschleunigung
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GITC	Guanidiniumisothiocyanat
GR	Glucocorticoidrezeptor
HBD	Hormone Binding Domain
hER	humaner Estrogenrezeptor

HRE	Hormone Responsive Element
Hsp	heat shock protein
IGF	Insulin like growth factor
IRMA	immunradiometrischer Assay
kb	Kilobasen
kDa	Kilo-Dalton
Luc	Luciferase
MCS	Multiple Cloning Site
MMTV-LTR	Mouse Mammary Tumor Virus Long Terminal Repeat
mg	Milligramm
µg	Mikrogramm
MR	Mineralcorticoidrezeptor
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NF-1	Nuklear Faktor 1
NLS	Nuclear Localisation Signal
nM	Nanomolar
PBS	Phosphat Buffer Saline
PCR	Polymeraseseitenkettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PgR	Progesteronrezeptor
pmol	Pikomol
RAP	rezeptorassoziiertes Protein
RAR	Retinolsäurerezeptor
RBA	Relative Bindungsaffinität
RE	Relative Effektivität
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RP	Relative Potenz
RRE	Raloxifen Responsive Element
RIP-140	Receptor Interacting Protein 140
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymeraseseitenkettenreaktion
RXR	Retinoid X Rezeptor
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEAP	sekretierbare alkalische Phosphatase
SERM	selektive Estrogenrezeptormodulatoren
SHBG	Steroid Hormon Binding Globulin
SRC-1	Steroidreceptorcoactivator 1
SV 40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
TAF	Transcription Activation Function
TAM	Tamoxifen
TCA	Trichloressigsäure
TIF-1	Transcriptional Intermediary Factor 1
tk	Thymidinkinasegen
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TR	Thyroidrezeptor
U	Units
UV	Ultraviolett
VITA2	Vitellogenin A2

1 EINLEITUNG

In den vergangenen Jahren ergaben Beobachtungen, daß verschiedene anthropogene Umweltkontaminanten, auch als endokrine Disruptoren bezeichnet, nachteilige Effekte auf wildlebende Tierpopulationen haben können. Nach einer Definition der Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD [OECD, 1996] sind endokrine Disruptoren Fremdstoffe, die schädliche Wirkungen auf die Gesundheit in einem unversehrten Organismus oder seiner Nachkommenschaft verursachen, die auf Änderungen von endokrinen Funktionen zurückgeführt werden können. Für einige dieser Verbindungen wird vor allem eine estrogene Wirkung auf den Organismus diskutiert. In diesem Zusammenhang wird auch eine mögliche Störung der hormonellen Regulation und daraus folgende gesundheitliche Schäden beim Menschen durch die Exposition mit Xenoestrogenen befürchtet. [Colborn et al, 1993]

Aus verschiedenen Ökosystemen sind bereits seit Anfang der 80er Jahre erste Hinweise bekannt, die negative Einflüsse von Chemikalien auf die strukturelle und funktionelle Entwicklung von endokrinen Geweben ergaben. Für die beobachtete Intersexentwicklung mariner Schnecken werden organische Tributylzinnverbindungen verantwortlich gemacht, die in Schiffs- und Bootsfarben zum Schutz vor Verrotten der Holzteile durch marine Kleinorganismen zugesetzt werden. [Miljoprojekt, 1995]

Des weiteren ergaben Hinweise aus der Literatur, daß verschiedene Organochlorverbindungen potentielle estrogene Wirkungen hervorrufen. Beobachtungen in hochbelasteten Ökosystemen wie dem Lake Apopka in Florida, der infolge eines Chemieunfalls stark mit DDT und Dicofol kontaminiert wurde, zeigten eine vermehrte Veränderung der primären Geschlechtsorgane bei Alligatoren und damit einen deutlichen nachteiligen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit der Population. [Guillette, 1994]

Bei Fischen, die in Kläranlagen-Vorflutern beobachtet wurden, wurde die Vitellogenin-Synthese untersucht. Die Synthese dieses Eigelbproteins erfolgt unter Estrogen-Kontrolle, Vitellogenin wird daher in Männchen nur in geringen Mengen gebildet. Einige der untersuchten männlichen Fische zeigten allerdings eine so hohe Vitellogenin-Konzentration, wie sie sonst nur bei Weibchen während der Eiproduktion zu finden ist. *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, daß Abbauprodukte von Alkylphenolethoxylaten, z. B. Nonylphenol für die beobachteten Effekte verantwortlich sind. [Soto et al, 1991; Jobling und Sumpter, 1993]

Zusätzlich zu den ökotoxikologischen Beobachtungen werden bestimmte epidemiologische Befunde mit dem Einfluß estrogenaktiver Verbindungen auf das endokrine System des Menschen in Verbindung gebracht.
In den letzten Jahren konnte eine deutliche Zunahme der Inzidenz von Brust- und Hodenkrebs verzeichnet werden. [Davis et al, 1993; Sharpe und Skakkebeck, 1993] Mögliche Ursachen für das vermehrte Auftreten dieser Krebsarten sind weitgehend ungeklärt. Die Vermutung, daß diese Beobachtungen auf die zunehmende Exposition des Menschen gegenüber hormonell aktiven Stoffen zurückzuführen sind, ist bislang nicht bestätigt. Gegenwärtig offen ist die Frage, ob ein vermehrtes Auftreten von Entwicklungsstörungen der männlichen Fortpflanzungsorgane wie Hypospadie und Kryptorchismus sowie eine verminderte Spermienzahl und –qualität mit einer möglichen Exposition durch endokrine Disruptoren in utero in Verbindung steht. [Sharpe und Skakkebeck, 1993; Carlsen und Skakkebeck, 1992]
Die Hypothese, daß die beobachteten nachteiligen Einflüsse auf das menschliche Fortpflanzungssystem möglicherweise auf eine in utero Exposition zurückzuführen sind, werden durch die seit langem bekannten Erfahrungen mit DES unterstützt. So wird bei Töchtern von Frauen, die mit DES behandelt wurden, ein vermehrtes Auftreten eines seltenen Scheidenkarzinoms beobachtet. Bei männlichen Nachkommen traten Entwicklungsstörungen der Geschlechtsorgane sowie eine Erhöhung der Wahrscheinlichkeit an Hodenkrebs zu erkranken auf. [Sharpe und Skakkebeck, 1993]

Um nun Effekte von potentiellen endokrinen Disruptoren auf die menschliche Gesundheit und auf Tierpopulationen abschätzen und erkennen zu können, sind umfassende Untersuchungen erforderlich. Zusätzlich zu agonistischen bzw. antagonistischen Wirkungen an zellulären Hormonrezeptoren sind spezies-, gewebe-, zell- und geschlechtsspezifische Effekte denkbar.
Die bisherigen Anhaltspunkte aus der Epidemiologie und Ökotoxikologie ergeben vielfältige Fragen in Bezug auf eine Risikoabschätzung potentieller endokriner Disruptoren. So sehen verschiedene internationale und nationale Expertengremien vor allem in der Entwicklung und Validierung funktioneller *in vitro* Systeme Forschungsbedarf. [OECD, 1996; DFG, 1998]
Untersuchungen, die z.B. den Einfluß auf die Expression und die Funktion hormonabhängiger Proteine, Ligand-Rezeptor-Interaktionen sowie die Quantifizierung der Wirkung im Vergleich zum physiologischen Liganden erfassen, können hier von erheblichen Interesse sein. Zusätzlich ist die genauere Untersuchung potentieller Kombinationseffekte wie additive, überadditive oder antagonistische Wirkungen von Bedeutung. Schließlich müssen *in vivo* Versuche das hormonelle Potential potentiell relevanter Substanzen nachprüfen. Hier müssen

gegebenenfalls neue bzw. modifizierte Versuchsanordnungen für den Nachweis hormonell aktiver Verbindungen etabliert werden.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, verschiedene *in vitro* Testsysteme zu etablieren und zu validieren. Mit Hilfe dieser Testsysteme ist ein Screening von Substanzen mit unterschiedlichsten Strukturen auf eine potentielle estrogene Aktivität möglich. Der Einsatz von sensitiven Testsystemen läßt Rückschlüsse auf Strukturelemente zu, die für das hormonelle Potential verantwortlich sein können. Da durch die Heterogenität der Verbindungsklassen mit hormonellen Effekten bislang keine Vorhersage der Wirkung alleine aufgrund der Strukturkenntnis möglich ist, können diese funktionellen *in vitro* Assays zur Charakterisierung essentieller Strukturelemente beitragen.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 Estrogenaktive Verbindungen

2.1.1 Estrogene

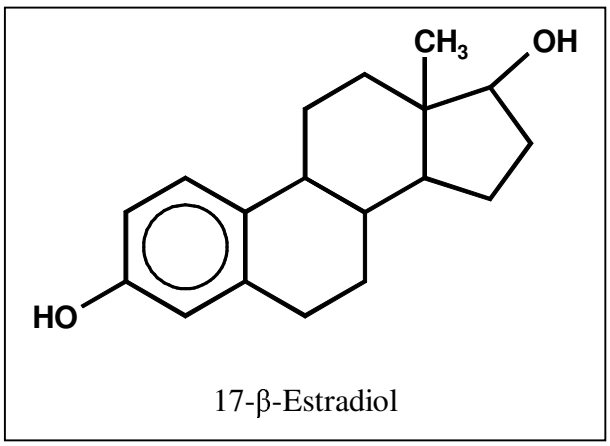
Zu den Estrogenen, endogenen weiblichen Sexualhormonen, zählen neben dem potentesten Vertreter 17-β-Estradiol (vgl. Abb. 1) auch Estron und Estriol. Estrogen-Synthese erfolgt durch Aromatisierung von Androgenen hauptsächlich im Ovar und während der Schwangerschaft in der Placenta. Geringe Mengen werden auch in Nebennieren und Hoden sowie im Fettgewebe synthetisiert. [Forth et al, 1996; Spindler, 1997]

Im Zusammenspiel mit Gestagenen regulieren Estrogene bei der Frau nahezu alle Vorgänge der Reproduktion. Neben den sexualspezifischen Wirkungen kommt den Estrogenen eine wichtige Rolle bei weiteren physiologischen Vorgängen zu, beispielsweise bei der Knochencalcifizierung. Wesentliche Zielorgane können neben den Reproduktionsorganen, je nach Tierspezies, noch andere Organe sein, z.B. die Leber bei Vertebraten, die dotterreiche Eier produzieren. Unter Estrogeneinfluß wird hier das eidotterspezifische Protein Vitellogenin produziert

Estradiol unterliegt in der Leber einem vielfältigen Metabolismus durch Hydroxylierungen und Dehydrierungen. Estradiol wird zu Estriol metabolisiert und nach Glucuronidierung und Sulfatierung renal ausgeschieden.

Die tägliche Sekretionsphase von Estrogenen beträgt bei der Frau je nach Zyklusphase 25 – 100 µg. Der Transport der Estrogene im Blut erfolgt vor allem gebunden an Steroid-Hormon-Binding-Globulin (SHBG), aber auch an Albumin. In der Leber stimulieren Estrogene die Synthese von SHBG. [Mutschler, 1997; Forth et al, 1996; Wellhöner, 1997]

In der vorliegenden Arbeit wurde 17-β-Estradiol in den Testsystemen als Positivkontrolle eingesetzt.



17-β-Estradiol

Abb. 1: Struktur des endogenen Estrogens 17-β-Estradiol

2.1.2 Antiestrogene

2.1.2.1 Selektive Estrogenrezeptor Modulatoren (SERM)

Antiestrogene wurden bisher in zwei Hauptklassen, Typ I und II unterteilt. Tamoxifen und Tamoxifen-Metabolite mit partiell estrogenen Eigenschaften gehörten zur Klasse Typ I. Reine Antiestrogene, wie z.B. ICI 182 780, zählten zur Klasse Typ II, diese rufen in allen Geweben antiestrogene Wirkungen hervor. [McGregor und Jordan, 1998]
Da jedoch Verbindungen, wie beispielsweise Tamoxifen und Raloxifen nicht eindeutig als Estrogenrezeptor-Agonist bzw. –Antagonist bezeichnet werden können, wurde die neue Bezeichnung, „Selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren“ , SERM eingeführt.
SERM umfasst eine Gruppe strukturell verschiedener Verbindungen, die sich von den endogenen Estrogenen darin unterscheiden, daß sie, abhängig von Zielgewebe, Spezies und hormonellem Milieu, als ER-Agonist bzw. -Antagonist wirken. Substanzen, die bisher als Antiestrogen bezeichnet wurden, werden nun unter der Bezeichnung SERM zusammengefasst. [Mitlak und Cohen, 1997; Franks und Steinberg, 1999]

Ein ideales SERM sollte folgende Eigenschaften haben. In Brust und Uterus sollte es als potentes Antiestrogen wirken und somit die estrogenabhängige Zellproliferation verhindern.
Gleichzeitig sollten ausgeprägte estrogene Effekte in Knochen, cardiovaskulärem System und Zentralen Nervensystem (ZNS) vorliegen und damit einer Vielzahl postmenopausaler Wirkungen entgegenwirken. [McNeil, 1998; Gustafsson, 1998a; Poletti, 1999]

In der folgenden Tabelle sind einige bekannte Estrogenrezeptor-Liganden sowie ihre Wirkungen in verschiedenen Zielgeweben dargestellt.

Tab. 1: Zusammenfassung der gewebeassoziierten Aktivitäten von verschiedenen Estrogenrezeptor-Liganden [Bryant und Dere, 1998]

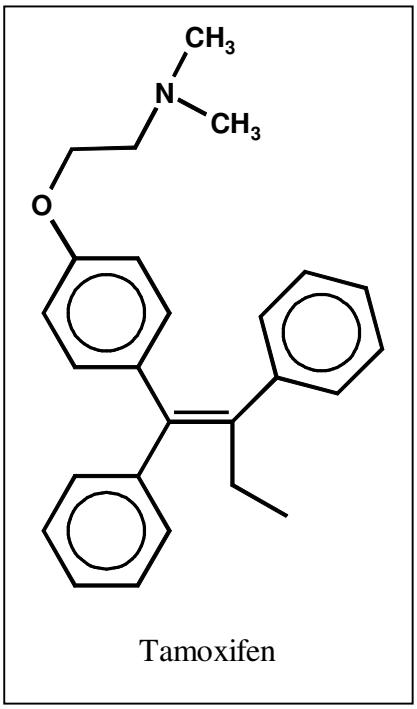
Verbindung	**Profil im Knochen**	**Profil im Cholesterinmetabolismus**	**Profil im Uterus**	**Profil im Brustgewebe**
17-β-Estradiol	Agonist	Agonist	Agonist	Agonist
Tamoxifen	Agonist	Agonist	partieller Agonist	Antagonist
Raloxifen	Agonist	Agonist	Antagonist	Antagonist
ICI 182 780	Antagonist	Antagonist	Antagonist	Antagonist

2.1.2.2 Mögliche Wirkmechanismen der SERMs

Der Mechanismus, der den gewebespezifischen Effekten der SERMs zugrunde liegt, ist bisher noch nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise spielen dabei mehrere Faktoren eine Rolle, wie z.B. unterschiedliche Effekte der Liganden auf die Transaktivierungsdomäne des Estrogenrezeptors (ER), Rezeptor-gebundene Coaktivatoren sowie Zell- und Promotor-Struktur. Als potentielle Mechanismen werden die Induktion unterschiedlicher ER-Konformationsänderungen und die Interaktion des Ligand-Rezeptor-Komplexes mit spezifischen DNA-Sequenzen, die sich vom klassischen ERE unterscheiden, diskutiert. In neueren Untersuchungen konnte im Promotor des Transforming Growth Factors β3 ein Raloxifen Responsive Element (RRE) identifiziert werden. Die Genaktivierung des TGF β3 ist ein denkbarer Mechanismus, der die Raloxifen-vermittelten Effekte im Knochen bewirkt. Die Interaktion zwischen Estrogenrezeptor (ER) und RRE wird durch ein zelluläres Adapterprotein vermittelt, die DNA-Bindungsdomäne des ER ist zur RRE-Aktivierung nicht notwendig. Die Beobachtung, daß estrogenwirksame Verbindungen unterschiedliche Responsive Elemente der DNA modulieren, wäre eine mögliche Erklärung für die gewebespezifischen Effekte von Verbindungen wie Raloxifen. [Goldfrank et al, 1999; Yang et al, 1996]

2.1.2.3 Tamoxifen

Tamoxifen (vgl. Abb. 2) wird aufgrund seiner antiestrogenen Wirkung im Brustgewebe zur Brustkrebstherapie bei Frauen in der Menopause eingesetzt. Positive Wirkungen von Tamoxifen, die sich auf die estrogene Komponente zurückführen lassen, sind in Bezug auf das cardiovaskuläre System sowie auf die Mineraldichte der Knochen zu beobachten. Nachteilig wirkt sich dagegen der estrogene Effekt auf das Endometrium aus, wo es infolge einer Tamoxifen-Behandlung zu Endometriumkrebs kommen kann. [England und Jordan, 1997; Franks und Steinberg, 1999]



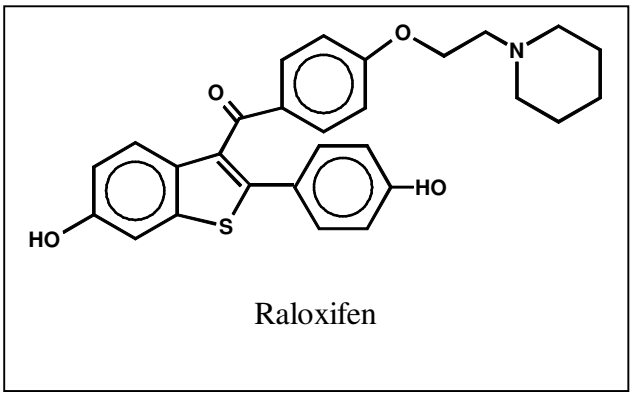
Tamoxifen

Abb. 2: Struktur von Tamoxifen

2.1.2.4 Raloxifen

Raloxifen (vgl. Abb. 3) zählt zur zweiten SERM-Generation. Es antagonisiert die Wirkung von Estradiol in Brustgewebe und Uterus. Im Knochen kommt es aufgrund der estrogenen Effekte von Raloxifen zur Erhaltung der Mineraldichte. Daneben zeigt Raloxifen positive Wirkungen auf cardiovaskuläre Risikofaktoren wie dem Serumlipidspiegel. Raloxifen erscheint daher zur Prävention von Osteoporose und Herzkrankheiten geeignet, ohne das

Risiko von Brust- und Endometriumkrebs zu erhöhen. [Khovidhunkit et al, 1999; Bryant et al, 1999; Gustafsson, 1998b; Jordan, 1998; Balfour und Goa, 1998]

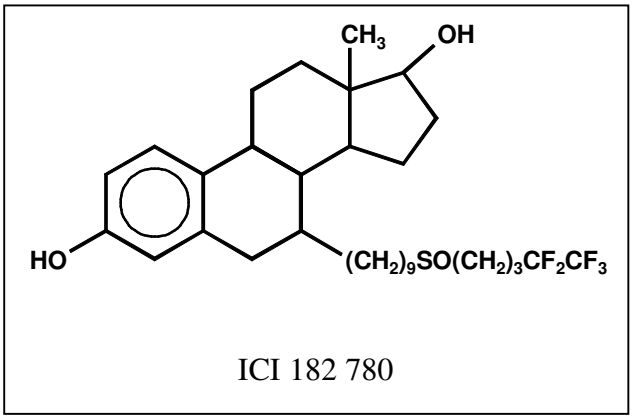


Raloxifen

Abb. 3: Struktur von Raloxifen

2.1.2.5 ICI 182 780

ICI 182 780 (vgl. Abb. 4) ist ein 7α-substituiertes Derivat von Estradiol. ICI 182 780 zeigt bei keinem der untersuchten Gewebe *in vivo* oder *in vitro* agonistische Eigenschaften. Dieses reine Antiestrogen findet bei der Brustkrebstherapie bei Versagen einer Tamoxifen-Behandlung Anwendung. In der vorliegenden Arbeit wurde ICI 182 780 zur Etablierung und Validierung der Testsysteme als Estrogenrezeptorantagonist eingesetzt. [McGregor und Jordan, 1998]



ICI 182 780

Abb. 4: Struktur von ICI 182 780

2.1.2.6 Vergleich der Bindung von Raloxifen und Estradiol an den Estrogenrezeptor

Die Bindung von Estradiol an den ER führt dazu, daß sich die Helix 12 des Rezeptors quer über das gebundene Estradiol legt. Durch diese Umlagerung ändern bestimmte Aminosäuren ihre Position, damit sie mit spezifischen Cofaktoren interagieren können. Durch die Verschiebung des helikalen Abschnittes 12 kommt es zum Freilegen der AF-2 Region, die zur Bindung der Coaktivator-Proteine essentiell ist. (vgl. Abb. 5A) Nach Bindung des Rezeptordimers an entsprechende Responsive Elemente kommt es zur Transkriptionsaktivierung.

Die Raloxifen-Bindung an den ER führt nicht zur Rotation der Helix 12, da die Aminoethoxyseitenkette von Raloxifen an die Aminosäure 351 des ER bindet. Die AF-2 Region bleibt maskiert. Damit wird kein Transkriptionskomplex formiert, da die Bindung der entsprechenden Coaktivatoren ausbleibt und die Signaltransduktion somit blockiert ist. (vgl. Abb. 5B) [Brzozowski et al, 1997; Jordan, 1998; McGregor und Jordan, 1998; Shiau et al, 1998]

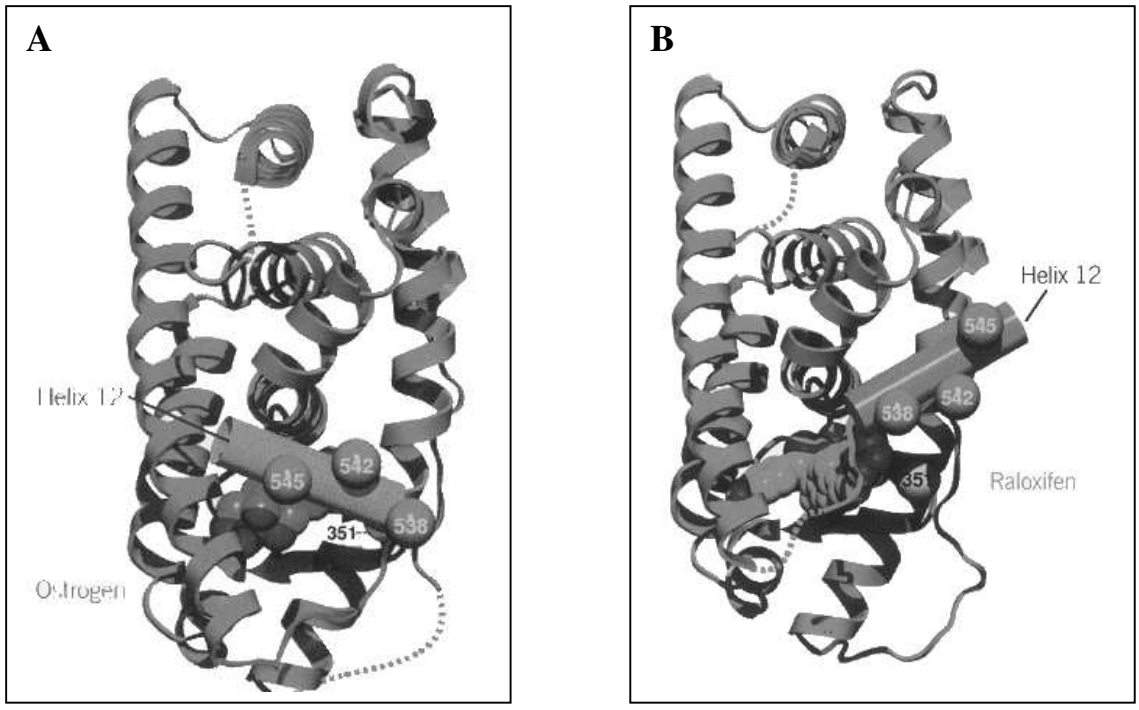
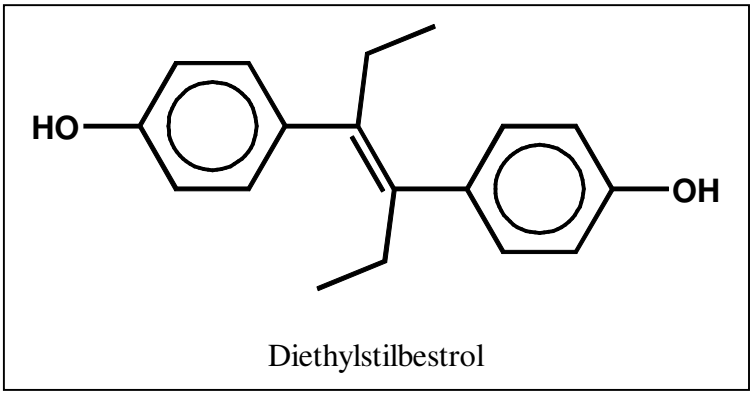


Abb. 5: Interaktion von Estradiol (A) und Raloxifen (B) mit der Ligand-Bindungsdomäne des ER (Erklärung im Text) [Brzozowski et al, 1997]

2.1.3 Stilbenderivate

2.1.3.1 Diethylstilbestrol

Das Stilbenderivat Diethylstilbestrol (DES) (vgl. Abb. 6) zählt zu den wirksamsten nichtsteroidalen Estrogenen. Die estrogene Aktivität von DES ist mit der von Estradiol (E_2) vergleichbar. In den 50- und 60iger Jahren wurde DES in den USA als Abortprophylaxe und später auch als postkoitales Kontrazeptivum eingesetzt. Anfang der 70iger Jahre wurde bei Töchtern der mit DES behandelten Frauen ein vermehrtes Auftreten eines relativ seltenen Scheidenkarzinoms beobachtet. Bei männlichen DES-exponierten Nachkommen wurde ebenfalls eine erhöhte Tumorinzidenz nachgewiesen. Die DES-Wirkung wird auf die Entstehung reaktiver Metabolite zurückgeführt, die eine hohe Estrogenrezeptoraffinität aufweisen. [Metzler, 1981; Korach et al, 1985; Marquardt und Schäfer, 1994]



Diethylstilbestrol

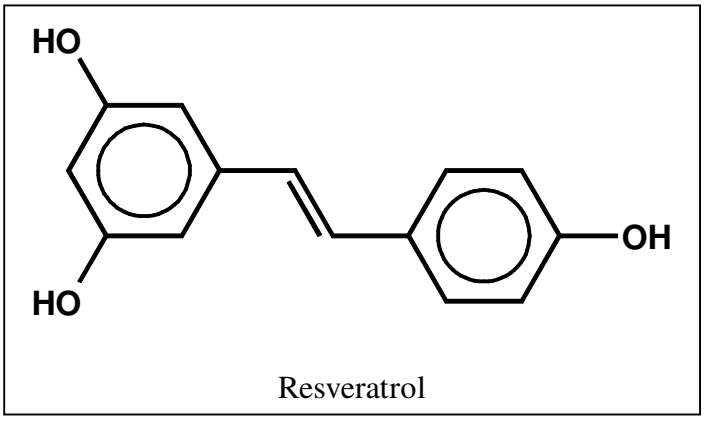
Abb. 6: Struktur von Diethylstilbestrol (DES)

2.1.3.2 Resveratrol

Resveratrol (vgl. Abb. 7) kommt natürlicherweise in frischen Trauben, Traubensaft und Wein vor. Die Konzentration ist abhängig von Traubensorte, Klima und Anbaubedingungen der Trauben. In Rotweinen sind im allgemeinen höhere Konzentrationen als in Weißweinen zu finden. Resveratrol ist ein Phytoalexin, das die Pflanze gegen Pilzbefall schützen soll.
Die Strukturähnlichkeit von Resveratrol zum synthetischen Estrogen DES ließ ein estrogenes Potential vermuten. Gehm et al (1997) konnten eine estrogene Aktivität *in vitro* nachweisen.

Daneben wurden weitere Untersuchungen zur estrogenen Aktivität von Resveratrol durchgeführt. [Ashby et al, 1999; Gehm et al, 1997]

Resveratrol wird des weiteren in Zusammenhang mit dem sogenannten „French Paradox“ gebracht. Es zeigte sich, daß verschiedene Bevölkerungsgruppen mit gemäßigtem Rotweinkonsum seltener an koronaren Herzerkrankungen leiden. Vermutlich spielt dabei Resveratrol eine Rolle, da für diese Verbindung bereits antioxidnative Eigenschaften nachgewiesen wurden. [Kopp, 1998; Jang et al, 1997]



Resveratrol

Abb. 7: Struktur von Resveratrol

2.1.4 Phyto-/Mykoestrogene und Phytosterole

2.1.4.1 Phyto- und Mykoestrogene

Phytoestrogene sind nichtsteroidale Verbindungen in Pflanzen oder in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs, denen eine estrogene Wirkung zugeschrieben wird. Sie werden strukturell in drei Hauptklassen eingeteilt, Flavonoide, Coumestane und Lignane. Isoflavone sind hauptsächlich in Sojabohnen zu finden, Flavone in vielen Gemüsesorten und Früchten. Coumestrol ist vor allem in Alfalfa und verschiedenen Bohnensorten, Lignane in faserreichen Produkten, wie z.B. Roggen und einigen Beeren, vorhanden. (vgl. Abb. 8) [Strauss et al, 1998; Santti et al, 1998; Mäkela et al, 1994]

Aus der Tierhaltung sind seit langem negative Einflüsse von Phytoestrogenen auf das Endometrium bekannt. In Australien wurde bei Schafen und Kühen, die Roten Klee als Futter verzehrten, ein Beeinflussung der Fertilität beobachtet („red clover desease“). Bei Tieren die

Futter mit hohen Phytoestrogengehalten konsumieren, werden typische estrogene Wirkungen beschrieben, beispielsweise Hypertrophy der Vulva, der Vagina und des Uterus bei weiblichen Tieren sowie Atrophy der Gonaden in beiden Geschlechtern. [Stob, 1983]
Zahlreiche epidemiologische Studien ließen einen Zusammenhang zwischen dem Verzehr einer sojahaltigen Diät und positiven gesundheitlichen Effekten, wie Reduktion der Brustkrebs- oder Hodenkrebsrate vermuten. Bisher konnte jedoch keine der Studien einen direkten Zusammenhang zwischen Phytoestrogenen und einer Reduktion der Krebsraten herstellen. [Strauss et al, 1998]
Phytoestrogene können beim Menschen sowohl positive als auch schädigende Effekte hervorrufen. Als Estrogenagonisten können sie vorteilhafte Effekte in Bezug auf Herzkrankheiten und Knochenzusammensetzung bei Frauen in der Postmenopause zeigen, aber gleichzeitig als Risikofaktor für Brust- und Endometriumkrebs angesehen werden. Andererseits könnten antiestrogene Wirkungen der Phytoestrogene bei der Prävention von Brustkrebs eine Rolle spielen. Als endokrine Disruptoren wäre eine Einflußnahme auf die sexuelle Differenzierung denkbar, hervorgerufen durch die Änderung der sexualspezifischen Entwicklungsmuster. [Strauss et al, 1998]

Eine weitere Klasse mit estrogenen Eigenschaften sind Mykoestrogene. Sie sind Sekundärmetaboliten von Pilzen, vor allem *Fusarium roseum* und *Fusarium graminearum*. Die bekannteste Verbindung aus dieser Gruppe mit estrogenem Potential ist Zearalenon. (vgl. Abb. 8) [Stob, 1983; Price und Fenwick, 1985]

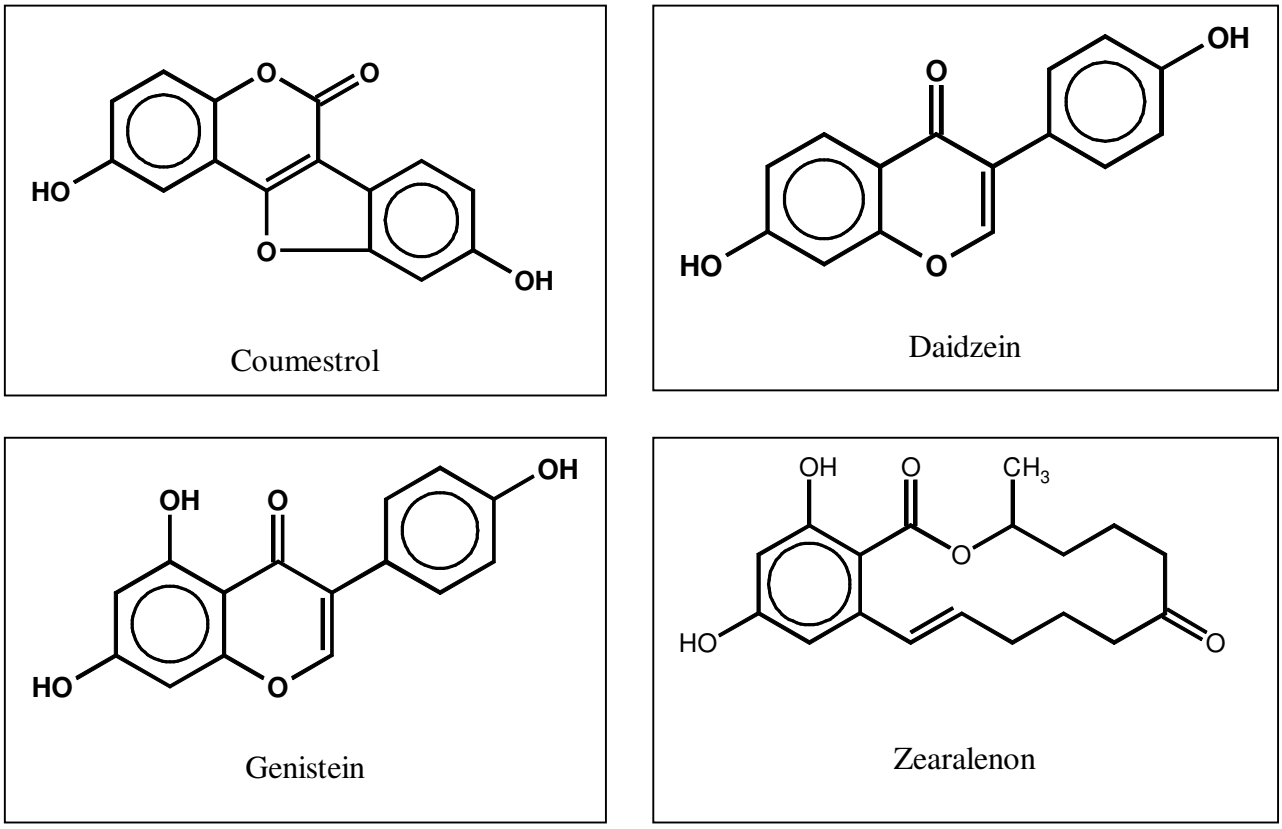
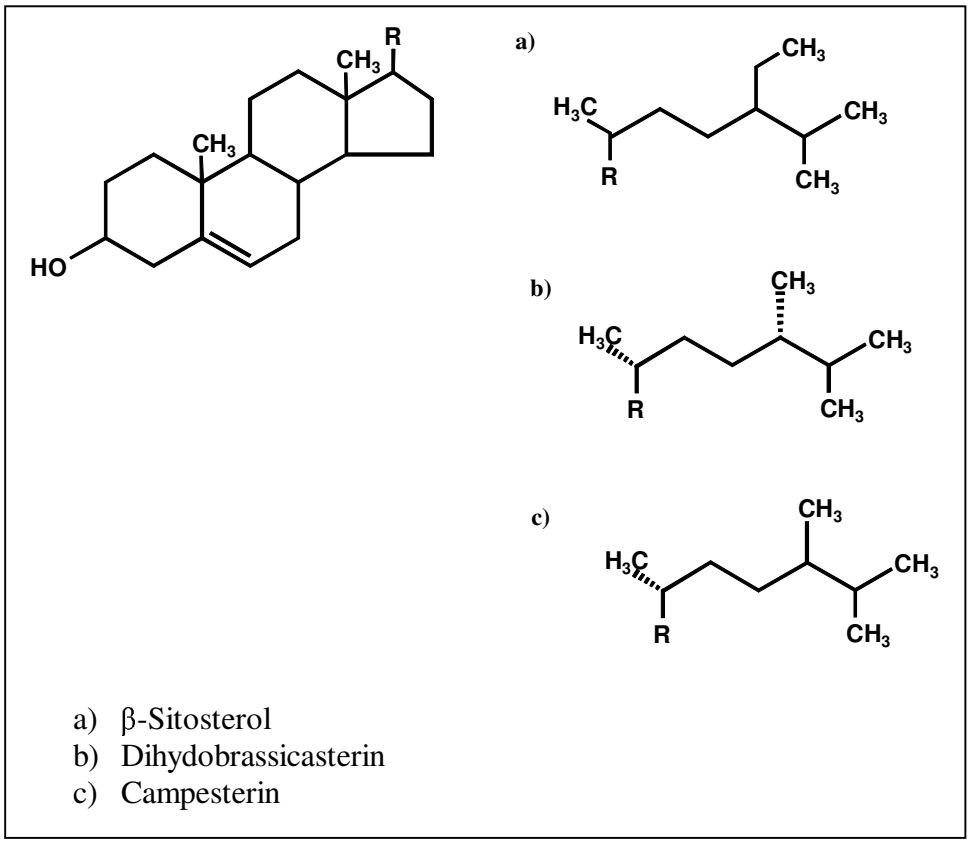


Abb. 8: Strukturen einiger Phyto- und Mykoestrogene

2.1.4.2 Phytosterole

Phytosterole sind natürlicherweise in der menschlichen Nahrung vorhanden und Bestandteil von vielen pflanzlichen Speiseölen. Phytosterole sind strukturell mit Cholesterol verwandt und unterscheiden sich in ihrer Seitenkette. In der Natur am häufigsten vorkommende Phytosterole sind β-Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol (vgl. Abb. 9). Die Strukturähnlichkeit zu Estradiol läßt ein estrogenes Potential vermuten. Verschiedene Untersuchungen ergaben Hinweise auf estrogene Eigenschaften der Phytosterole. Neueste Untersuchungen mit Hefezellen konnten diese Befunde nicht bestätigen. [Baker et al, 1999]



a) β-Sitosterol
b) Dihydobrassicasterin
c) Campesterin

Abb. 9: Strukturen einiger Phytosterole

2.1.5 Alkylphenolethoxylate und Alkylphenole

Alkylphenolethoxylate (APEO) sind nichtionische, oberflächenaktive Verbindungen, die in vielen kommerziellen Produkten vorkommen. Sie werden in Waschmitteln, Kosmetikartikeln, Farben, Pestiziden und Herbiziden eingesetzt. 1988 lag die weltweite Jahresproduktion von APEOs bei über 360000 Tonnen. Über 60% der APEOs sind im aquatischen System zu finden, wo sie zu relativ stabilen Metaboliten abgebaut werden. [Soto et al, 1991; White et al, 1994; Nimrod und Benson, 1996] Im ersten Metabolisierungsschritt wird die Ethoxylatgruppe hydrolytisch abgespalten. Dieser Schritt vollzieht sich relativ schnell und als Abbauprodukte entstehen Alkylphenole, Alkylphenolmonoethoxylate und Alkylphenoldiethoxylate. Der weitere Abbau dieser Verbindungen erfolgt aufgrund der geringeren Wasserlöslichkeit nur sehr langsam. Die höhere Lipophilie und der verlangsamte Abbau der Metabolite führen zur Akkumulation in Sedimenten und Abwasserschlamm. [Nimrod und Benson, 1996]

Alkylphenole werden in der Kunststoffindustrie als Antioxidantien eingesetzt. Sie können aus den Kunststoffverpackungen, die in der Lebensmittelverpackungsindustrie verwendet werden, entweichen. Nach ersten beobachteten estrogenen Effekten bei Fischen in Abwässern vermutete man zuerst, daß Rückstände oraler Kontrazeptiva, vor allem Ethinylestradiol, verantwortlich sind. Arbeiten von Soto et al, 1991 zeigten jedoch, daß diese beobachteten estrogenen Wirkungen auch auf Alkylphenole zurückzuführen sein können, die als potentielle Xenoestrogene identifiziert sind. [Soto et al, 1991; White et al, 1994]

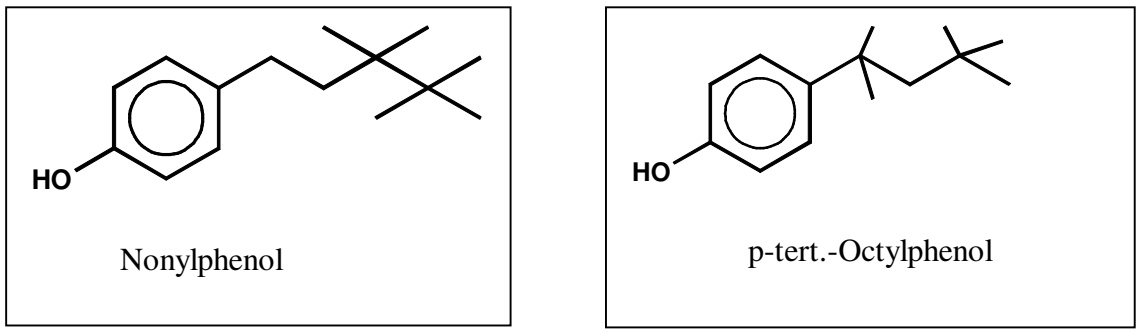


Abb. 10: Strukturen von Nonylphenol und p-tert.-Octylphenol

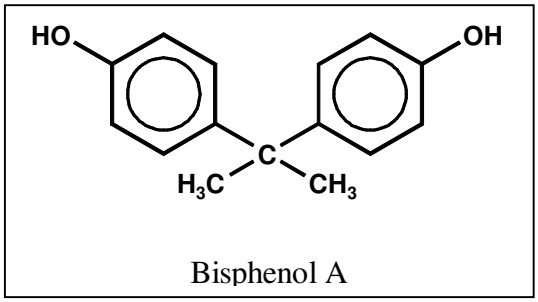
2.1.6 Bisphenol A

Bisphenol A (vgl. Abb. 11) wird zur Herstellung von Polycarbonaten, Epoxy- und Phenolharzen, Polyester und Polycarbonaten eingesetzt. [Perez et al, 1998] Zur Synthese der Polycarbonate werden jährlich weltweit ca. 700 000 t Bisphenol A hergestellt. Durch die Reaktion von Bisphenol A mit Epichlorhydrin entstehen Epoxyharze, die für einen breiten technischen Einsatz hervorragende Eigenschaften besitzen. Sie sind transparent, behalten über einen weiten Temperaturbereich ihre Formbeständigkeit und zeigen eine hohe mechanische Widerstandsfähigkeit. Auf BisphenolA-Epoxyharz-basierende Beschichtungen werden, neben vielen anderen Anwendungen, für die Innenlackierung von Konservendosen, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, verwendet. Daneben finden sie eine breite Anwendung als Kunststoffmaterialien, vor allem als Zahnfüllungen. [Perez et al, 1998; Olea et al, 1996; Gould et al, 1998]

Die Polymerisierungsreaktion der Epoxidharze ist oft unvollständig. In vielen Lebensmitteln, die beispielsweise in Dosen mit Plastiküberzügen verpackt waren, konnten signifikante

Mengen der nicht umgesetzten Epoxy-Verbindungen nachgewiesen werden. Bisphenole sind daher als Bestandteile der Kunststoffpolymere von toxikologischem Interesse. Eine Untersuchung zum „carry over“ Effekt hat eine erhebliche Freisetzung von Bisphenol A aus Konservenlackdosen in die Lebensmittelmatrix ergeben. [Krisnan et al, 1993; Brotons et al, 1995]

Die estrogene Wirkung von Bisphenol A ist in der Literatur bereits beschrieben. Bereits 1936 konnten Dodds and Lawson erste Hinweise auf ein estrogenes Potential von hydroxylierten Diphenylalkanen aufzeigen. [Perez et al, 1998; Nagel et al, 1997; Ashby und Tinwell, 1997]



Bisphenol A

Abb. 11: Struktur von Bisphenol A

2.1.7 Pflanzenschutzmittel

Die als Pestizide eingesetzten Organochlorverbindungen sind hochlipophile Substanzen, die eine hohe Persistenz aufweisen. Sie akkumulieren im menschlichen und tierischen Fettgewebe. Obwohl für die meisten Organochlorverbindungen bereits Anwendungsverbote bestehen, sind sie bzw. ihre Metabolite noch immer in der Umwelt und in Lebensmitteln nachweisbar. Für einige Vertreter der Pflanzenschutzmittel sind bereits endokrine Wirkungen nachgewiesen. Eine Verbindung mit bekannter estrogener Wirkung ist das Insektizid o,p`-DDT (vgl. Abb. 12). p,p`-DDE, der Hauptmetabolit von technischem DDT, ist dagegen ein sehr wirksames Antiandrogen. [Sharpe, 1995; Kelce et al, 1995; Nimrod und Benson, 1996; Ahlborg et al, 1995]

Für die Pestizide Dieldrin, Toxaphen, Kepon und Endosulfan konnte ein estrogenes Potential aufgezeigt werden. Endosulfan wird seit 1954 eingesetzt, die Jahresproduktion beträgt gegenwärtig 10000 t. Die Anwendung von Toxaphen in den westlichen Industrieländern ist

mittlerweile verboten, in Zentral- und Südamerika, Afrika und Asien ist es noch immer im Einsatz. [Soto et al, 1994; Bonefeld et al, 1997]

Methoxychlor (vgl. Abb. 12), eine weitere Organochlorverbindung wurde aufgrund der Strukturähnlichkeit zu DDT und der geringeren Persistenz als DDT-Ersatz eingesetzt. In der Literatur ist eine estrogene Wirkung für Methoxychlor beschrieben. [Cummings, 1997]

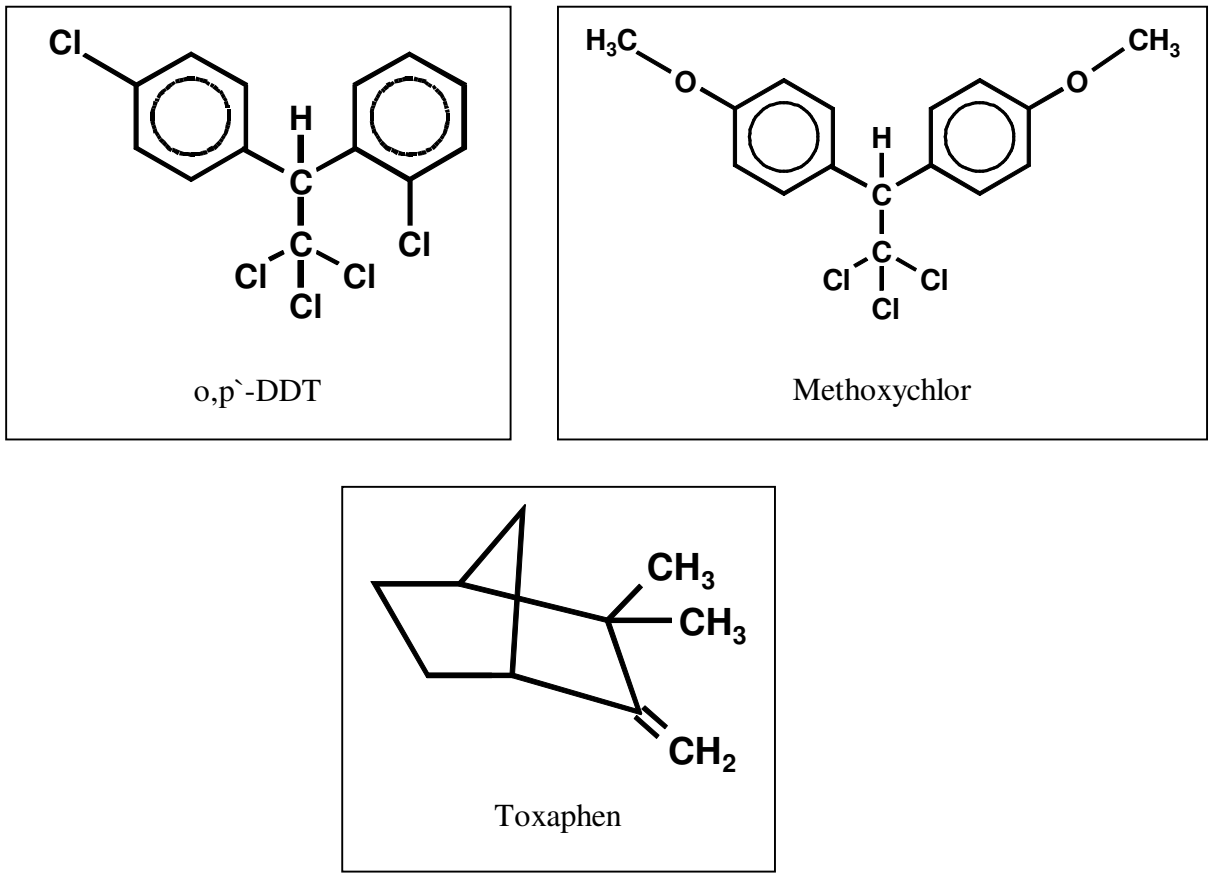


Abb. 12: Strukturen einiger Pflanzenschutzmittel

2.2 Steroidhormonrezeptoren

2.2.1 Allgemeines

Steroidhormonrezeptoren sind wichtige Schlüsselelemente der endokrinen Signaltransduktion. Sie besitzen als Signalverstärker und ligandinduzierbare Transkriptionsfaktoren zwei wesentliche Funktionen. Die Bindung der Steroidhormonrezeptoren an spezifische DNA-Sequenzen reguliert deren Transkription in Abhängigkeit vom Zielgewebe positiv oder negativ. Diese regulatorischen Faktoren spielen eine entscheidende Rolle bei der embryonalen

Entwicklung, der Zelldifferenzierung, der Zellproliferation und der hormonellen Homöostase. [Carson-Jurica et al, 1990; Church-Landel et al, 1995; Gronemeyer, 1992; Meyer et al, 1989]
Steroidhormonrezeptoren zählen zu einer ganzen Familie von zellulären Rezeptoren, zu der auch die Retinolsäurerezeptoren, der Vitamin-D3-Rezeptor und der Thyroidrezeptor gehören. Zusätzlich wurde eine Vielzahl sogenannter Orphan- (Waise) Rezeptoren identifiziert, deren physiologische Liganden bisher noch nicht bekannt sind. [Beato, 1989; Gronemeyer, 1992] Steroidhormonrezeptoren sind spezifische DNA-Bindungsproteine, die bevorzugt an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte Responsive Elemente (RE) binden. *In vitro* konnte eine spezifische Bindung des Rezeptors ohne Ligand-Zugabe beobachtet werden, was als basale Transkription bezeichnet wird. Im Gegensatz zu diesen Befunden konnte *in vivo* eine Protein-DNA-Interaktion des Glucocorticoidrezeptors (GR) an das Responsive Element (RE) des Thyrosinaminotransferase-Gens nur nach Hormonzugabe festgestellt werden. [Tsai und Gustafsson, 1988]

2.2.2 Struktur von Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren weisen alle einen ähnlichen strukturellen Aufbau auf. Sie sind in verschiedene Domänen unterteilt, die die Funktionen der DNA- und Hormonbindung, der nuklearen Translokation und der Interaktion mit Heat-Shock-Proteinen erfüllen. Die Unterteilung erfolgt in sechs Regionen, die im allgemeinen als Region A bis F bezeichnet werden (vgl. Abb. 13). Die Aminosäuresequenzen der einzelnen Rezeptoren weisen deutliche Homologien auf. Entsprechend lassen sich die Rezeptoren in zwei Gruppen einteilen. Der ER ist der Hauptvertreter der größeren Untergruppe, zu der auch der Vitamin-D3-Rezeptor, der Thyroidrezeptor sowie die Retinolsäurerezeptoren zählen. Die kleinere Untergruppe besteht aus Progesteron-, Glucocorticoid- und Androgenrezeptor. Untersuchungen zur strukturellen Homologie der Rezeptoren weisen darauf hin, daß sich die Rezeptoren alle auf ein Gen zurückführen lassen, das vor der Trennung der Lebewesen in Vertebraten und Invertebraten existierte. [Gronemeyer, 1992; Wahli und Martinez, 1991]

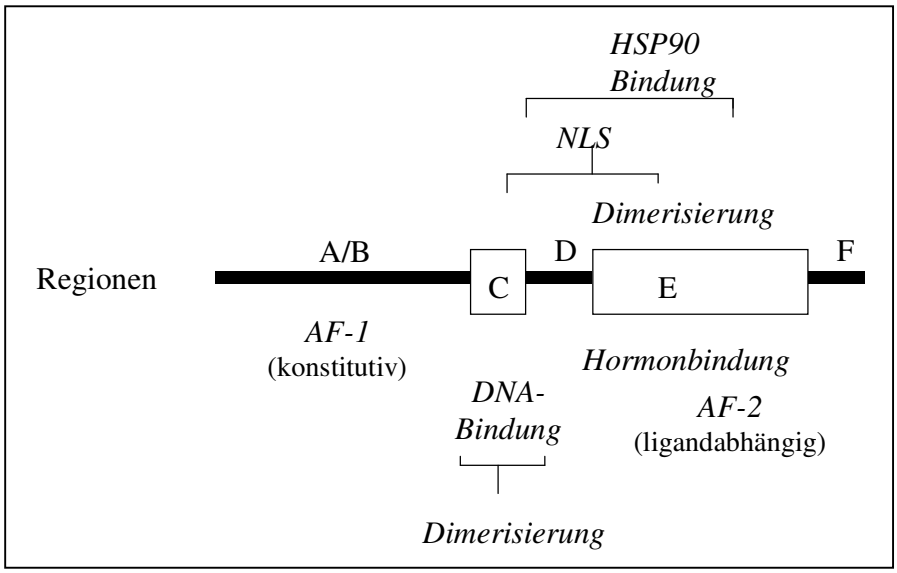
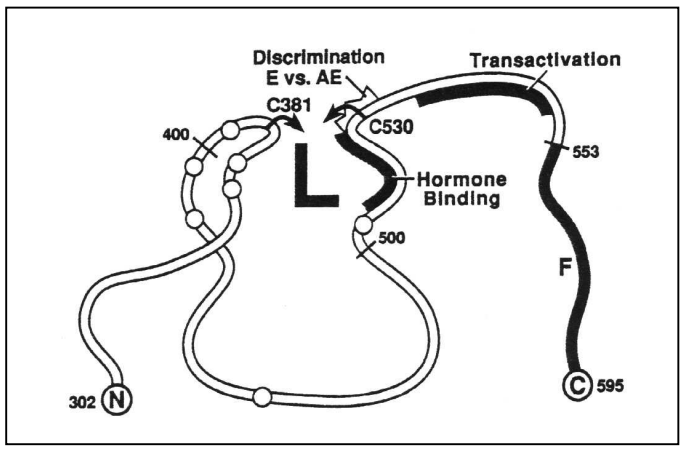


Abb. 13: Schematische Darstellung eines Steroidhormonrezeptors [nach Gronemeyer, 1992]

2.2.2.1 Hormonbindende Domäne (HBD, Region E)

Die HBD ist am carboxyterminalen Ende des Rezeptors lokalisiert und ist ca. 25 kDa groß (vgl. Abb. 14). Sie ist verantwortlich für die Ligandbindung und von den anderen Domänen des Rezeptors unabhängig. Die hochkonservierten Aminosäuren sind für die Bildung einer hydrophoben Tasche von Bedeutung, die für die Bindung eines Liganden eine wichtige Rolle spielt. Die HBD ist zusätzlich an weiteren Funktionen wie Rezeptor-Dimerisierung, nukleare Translokation, hormonabhängige Transkriptionsaktivierung und Interaktion mit den Heat-Shock-Proteinen beteiligt. Die Aminosäuren 381 und 520-530 sind möglicherweise mitentscheidend für die Diskriminierung von Estrogenen und Antiestrogenen. [Green und Chambon, 1988; Gronemeyer, 1992; Katzenellenbogen, 1996]



L: Ligand
E: Estrogen
AE: Antiestrogen

Abb. 14: Mögliche Struktur der HBD des humanen ER [Katzenellenbogen, 1996]

2.2.2.2 DNA-bindende Domäne (DBD, Region C)

Die DNA-bindende Domäne des Steroidhormonrezeptors ist reich an basischen Aminosäuren und Cystein. Sie enthält eine hochkonservierte Sequenz von 66-68 Aminosäuren, die in zwei Hälften C I und C II unterteilt werden kann. C I enthält vier konservierte Cysteinreste und eine große Anzahl hydrophober Aminosäuren, während C II fünf Cysteinreste und basische Aminosäuren aufweist. Beide Regionen bilden sogenannte Zinkfinger aus, in denen je vier Cysteinreste ein Zinkatom tetraedrisch koordiniert binden (vgl. Abb. 15). Die Schleifen der Zinkfinger enthalten 12-13 Aminosäuren und sind durch einen Linker bestehend aus 15-17 Aminosäuren verbunden. Der erste Zinkfinger C I ist für die spezifische Interaktion des Rezeptors mit dem Hormon Responsiven Element verantwortlich. C II stabilisiert diese Rezeptor-DNA-Bindung durch Wechselwirkung mit dem Phosphat-Rückgrat und ist vermutlich auch an Protein-Protein-Wechselwirkungen wie z.B. der Rezeptor-Dimerisierung beteiligt. [Slater et al, 1994; Wahli und Martinez, 1991; Carson-Jurica et al, 1990; Green und Chambon, 1988]

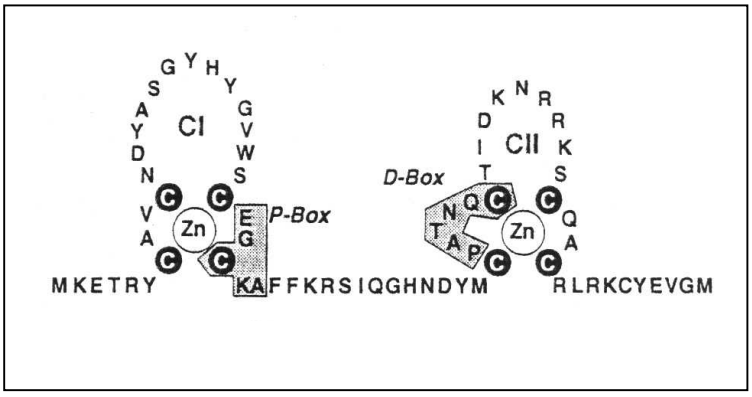


Abb. 15: Mögliche Struktur der DBD des humanen ER [Grandien et al, 1997]

Die Aminosäuren in der Nähe des C-Terminus des 1. Zn-Fingers werden als P-Box bezeichnet. Die D-Box, bestehend aus den Aminonsäuren nahe des 2. Zn-Fingers, vermitteln die wichtigen Protein-Protein-Wechselwirkungen im Rezeptordimer. [Pace et al, 1997]

2.2.2.3 Genaktivierende Domäne (Region A/B)

Die genaktivierende Domäne oder Modulatordomäne ist die variabelste Region des Rezeptors. Ihre Länge reicht von 25 Aminosäuren im Vitamin-D3-Rezeptor bis zu 603 Aminosäuren im Mineralcorticoidrezeptor. Sie ist verantwortlich für die Affinität des Rezeptors zur DNA und Regulation der Genexpression. Des weiteren wird ihr eine ligandunabhängige Funktion zugeschrieben. [Beato, 1989; Slater et al, 1994]

2.2.2.4 Region D und Region F

Region D befindet sich zwischen DBD und HBD. Sie enthält Informationen zur nuklearen Lokalisation des Rezeptors. Die Funktion der carboxyterminalen Region F ist gegenwärtig nicht bekannt. [Wahli und Martinez, 1991]

2.2.2.5 Transaktivierungsfunktionen der Steroidhormonrezeptoren

Die vom Estrogenrezeptor vermittelte Transkription wird durch sogenannte Transaktivierungsdomänen vermittelt. Der Estrogenrezeptor besitzt zwei autonome Transaktivierungsdomänen, AF-1 und AF-2 (frühere Bezeichnung TAF-1 und TAF-2). AF-1 ist in der N-terminalen A/B-Region lokalisiert, AF-2 in der carboxyterminalen HBD. Beide Regionen sind für eine maximale Transkriptionsaktivität notwendig. AF-2 ist eine ligandinduzierbare Transaktivierungsdomäne, die AF-1-Domäne eine konstitutive Transaktivierungsdomäne. Beide Domänen können unabhängig oder auch abhängig voneinander fungieren, je nach Anwesenheit gewebespezifischer Faktoren oder Pomotoren. [Brown, 1994; Patrone et al, 1998; Tremblay et al, 1999b] Die unterschiedliche Aktivität von AF-1 und AF-2 wird durch Adaptoren oder Coaktivatoren vermittelt, die spezifisch für die jeweilige Domäne sind. [Halachmi et al, 1994]

2.3 Estrogenrezeptor β

Estrogene vermitteln ihre Effekte hauptsächlich über Estrogenrezeptoren, die als ligandinduzierbare Transkriptionsfaktoren zu den Steroidhormonrezeptoren gehören. Zu Aufbau und Struktur der Steroidhormonrezeptoren sei auf Kapitel 2.2 verwiesen.
Der Estrogenrezeptor ERα wurde 1958 von E. Jensen entdeckt und 1986 von Green et al aus humanem Uterusgewebe kloniert. Mehrere Jahre ging man davon aus, daß es keine weiteren ER-Subtypen gibt. Erst 1996 konnten Kuiper et al in der Ratte einen zweiten Estrogenrezeptor, ERβ identifizieren. [Kuiper et al, 1996; Enmark und Gustafsson, 1999] Gegenwärtig wurde dieser zweite ER-Subtyp nur noch in zwei weiteren Spezies, Mensch [Mosselman et al, 1996] und Maus [Tremblay et al, 1997] nachgewiesen.

ERβ setzt sich aus 485 Aminosäuren zusammen und hat ein Molekulargewicht von 54,2 kDa. Die Einteilung des ERβ in verschiedene Domänen ist analog zu ERα und anderen Steroidhormonrezeptoren. ERα und ERβ weisen vor allem in DNA- (95%) und Ligandbindungsdomäne (60%) eine hohe Homologie auf (vgl. Abb. 16). [Kuiper et al, 1996; Kuiper et al, 1998a; Chang und Prins, 1999]

Sequenzvergleiche beider Rezeptoren zeigen, daß die AF2-Region hoch konserviert ist, während im Gegensatz dazu die AF1-Region keine Homologie aufweist. Die Sequenz-Unterschiede in der AF1-Transaktivierungsdomäne könnten verschiedene Genaktivierungen zur Folge haben. [Giguere et al, 1998; Chang und Prins, 1999]

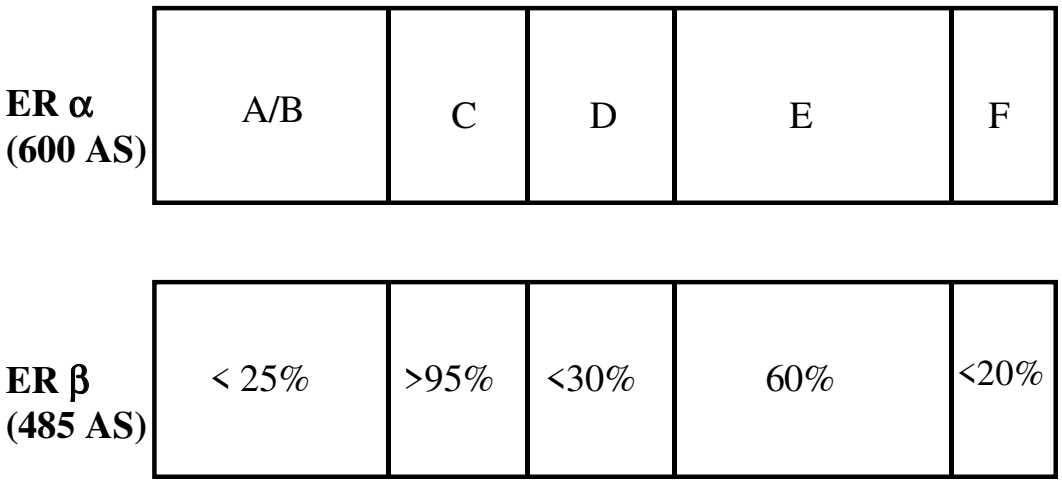


Abb. 16: Vergleich der Estrogenrezeptor-Subtypen (Angabe der Aminosäurehomologie in Prozent für die jeweilige Domäne) [nach Kuiper et al, 1996]

Unterschiede bestehen in der Gewebeverteilung der beiden Rezeptoren. In der Ratte konnte eine hohe ERα-Expression in Uterus, Hoden, Hirnanhangdrüse, Ovar, Niere und Epididymis, eine hohe ERβ-Expression in Prostata, Ovar, Lunge, Blase, Gehirn und Hoden aufgezeigt werden. Die höchsten Expressionsraten des ERβ beim Menschen sind in Ovar und im Hoden. Zusätzlich ließ sich eine hohe Expression in Brustdrüse, Thymusdrüse und Gastrointestinaltrakt nachweisen. [Kuiper und Gustafsson, 1997; Enmark und Gustafsson, 1999]

Durch die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptors wurde ersichtlich, daß ER-vermittelte Mechanismen weitaus komplexer und komplizierter sind, als bisher angenommen wurde. ERβ ist deshalb Gegenstand vieler unterschiedlichster Untersuchungen, die neue Hinweise auf ER-gesteuerte Mechanismen geben sollen. Einige wichtige bisher erhaltene Ergebnisse werden nachfolgend kurz dargestellt.

Beide ER-Rezeptoren zeigen in Ligandbindungsexperimenten eine hohe Affinität zu Estradiol sowie ähnliche Affinitäten zu Tamoxifen und ICI 182 780. Unterschiedliche Bindungsaffinitäten konnten bezüglich verschiedener Phyto- und Xenoestrogene beobachtet werden. In Transfektionsversuchen mit estrogenrezeptorkontrollierten Reportergenen und dem jeweiligen ER-Subtyp ergab sich in Verbindung mit ERβ für einige Phytoestrogene eine signifikante estrogene Wirkung. [Kuiper et al, 1998b]

In vitro Versuche mit endogenen Hormon Responsiven Elementen, HRE (Vitellogenin A2, pS2, c-Fos und c-Jun), an die bereits eine ERα-Bindung gezeigt wurde, konnten ebenfalls eine Bindung von ERβ nachweisen. [Hyder et al, 1999]

Bisher wurden verschiedene Transfektionsexperimente mit Reportergenplasmiden, deren Reportergenexpression von verschiedenen Promotoren kontrolliert wird, durchgeführt. Dabei wurde beispielsweise beobachtet, daß in transienten Transfektionsversuchen mit dem AP1-Enhancer-Element als Rezeptorbindungsstelle, die induzierte Genexpression je nach Ligand und Rezeptortyp variiert. So zeigt Estradiol keinen Effekt mit ERβ und wirkt als ERα-Agonist. Ein entgegengesetztes Verhalten wurde mit Tamoxifen und Raloxifen beobachtet. Beide wirken als ERβ-Agonisten, während Tamoxifen als ERα-Antagonist und Raloxifen als partieller ERα-Agonist beschrieben wurde. [Warner et al, 1999; Cassidy, 1999; Paech et al, 1997]

Die Entdeckung des zweiten Estrogenrezeptors eröffnet neue potentielle Estrogenrezeptorsignalwege. Es werden zwei mögliche Signalwege diskutiert (vgl. Abb. 17) Die Dimerisierung der beiden ER-Subtypen ist *in vitro* in mehreren Kombinationen möglich. In Zellen, die jeweils nur einen Rezeptor exprimieren, werden Homodimere des jeweiligen Subtyps ausgebildet, die mit dem entsprechenden ERE interagieren. In Zellen, die beide Subtypen aufweisen, kommt es, je nach Expressionsmuster, zur Ausbildung von Hetero- oder Homodimeren. [Cowley et al, 1997; Kuiper und Gustafsson, 1997]

Zusätzlich wurde auch eine Splice-Variante des ERβ isoliert, die in der Ligandbindungsdomäne 18 weitere Aminosäuren enthält. Vermutlich führt diese Änderung zu einer geringeren Estradiol-Affinität im Vergleich zur kürzeren Isoform. [Chu und Fuller, 1997]

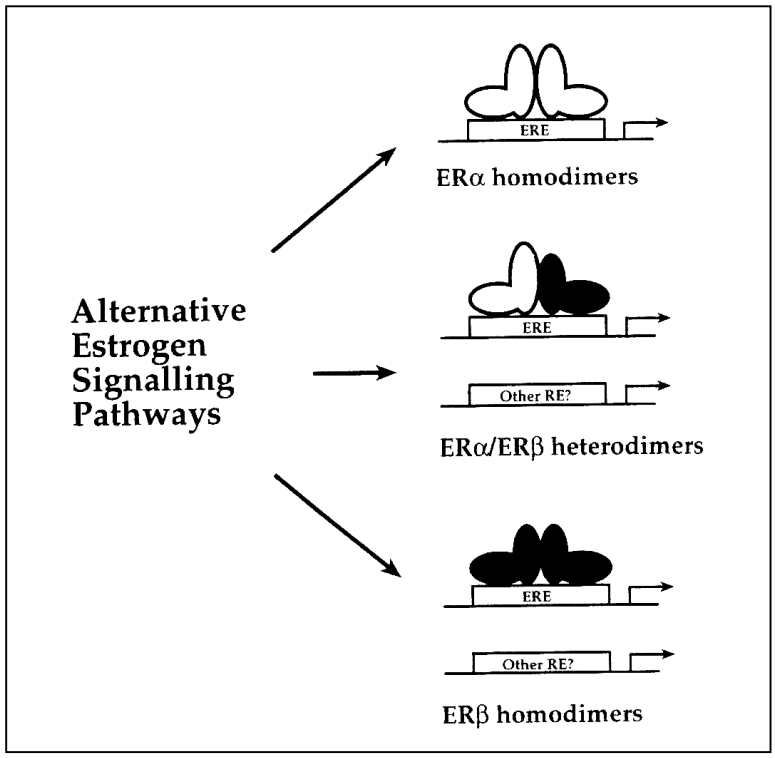


Abb. 17: Mögliche Estrogenrezeptorsignalwege [Kuiper und Gustafsson, 1997]

2.4 Promotor und Enhancer Elemente

Promotoren und Enhancer sind Kontrollelemente der Transkription, die in unterschiedlichen Zelltypen beträchtlich variieren. Sie bestehen aus kurzen DNA-Sequenzen (cis-Elementen), die spezifisch mit zellulären Proteinen, z.B. Transkriptionsfaktoren, interagieren. Eukaryontische Promotoren bestehen in der Regel aus zwei Arten von Erkennungssequenzen, der TATA-Box und den upstream gelegenen Promotor-Elementen. Die TATA-Box befindet sich 25-30 bp vom Transkriptionsstartpunkt upstream gelegen. Sie ist vermutlich an der Steuerung der RNA-Polymerase II beteiligt, damit die RNA-Synthese an der richtigen Stelle beginnt. Im Gegensatz dazu bestimmen die upstream gelegenen Promotor-Elemente die Geschwindigkeit der Transkriptionsinitiation. Diese Elemente nehmen ihre Funktion unabhängig von ihrer Orientierung auf dem Gen war, sie müssen jedoch 100-200 bp upstream der TATA-Box lokalisiert sein. Enhancer-Elemente können eine Transkription zusätzlich 1000fach verstärken. Sie grenzen entweder direkt an den Transkriptionsstartpunkt oder liegen bis zu einigen kb davon entfernt. [Maniatis et al, 1989; Mader und White, 1996; Grandien et al, 1997]

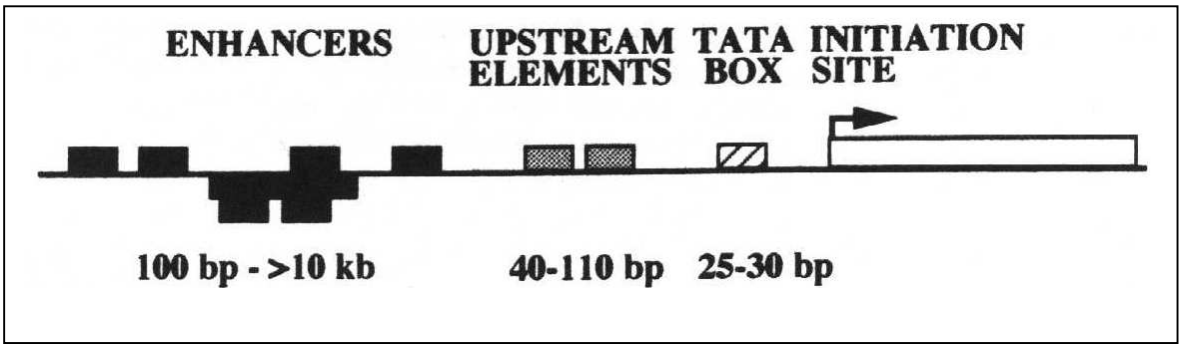


Abb. 18: Schematische Darstellung eines eukaryontischen Promotors [Mader und White, 1996]

2.5 Hormon Responsive Elemente (HRE)

Die DNA-bindende Domäne des Rezeptors bindet an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannten Hormon Responsiven Elementen, die innerhalb des Promotors für das entsprechende Gen lokalisiert sind. HREs sind palindromische Sequenzen, die aus je zwei sechs bp langen Armen bestehen und durch einen Linker aus drei bp verbunden sind. Der symmetrische Aufbau des HRE ermöglicht die Bindung des Rezeptors als Dimer, je ein Arm des HRE bindet ein Rezeptormolekül. Entsprechend der Einteilung der Rezeptoren in Untergruppen, sind auch die HREs in Gruppen eingeteilt (vgl. Abb. 19). Die GRE/PRE-Gruppe wird von Glucocorticoid-, Androgen-, Mineralcorticoid- und Progesteronrezeptor erkannt, die ERE-Gruppe von Estrogen-, Thyroid-, Vitamin D3- und Retinolsäurerezeptor. Wichtigster Unterschied der beiden Gruppen ist dabei die Base an dritter Position, Thymidin bei der GRE/PRE-Gruppe, Adenin bei der ERE-Gruppe. [Slater et al, 1994; Beato, 1991; Green und Chambon, 1988; Gronemeyer, 1992]

	1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
GRE/PRE-Gruppe	**G G T A C A nnn T G T Y C T**
ERE-Gruppe	**A G G T C A nnn T G A C C T**

Abb. 19: Consensus Sequenzen der Hormone Responsiven Elemente [Slater et al, 1994] (Y = C oder T)

Für den Estrogenrezeptor wurden unter anderem zwei EREs charakterisiert, VIT-ERE aus dem Vitellogenin A2 Gen des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* und pS2-ERE, ein humanes, estrogeninduzierbares Gen. Die Sequenzen beider EREs unterscheiden sich nur in zwei Basenpaaren, der Estrogenrezeptor bindet an beide EREs. Es zeigte sich, daß der ER *in vitro* eine geringere Affinität an das pS2-ERE zeigt und *in vivo* zu einer schwächeren Induktion als bei der Bindung an VIT-ERE führt. [Green und Chambon, 1988]

2.6 Estrogeninduzierbare Gene

2.6.1 Vitellogenin

Vitellogenin, ein Lipoglycophosphoprotein, ist ein Vorläufer der Eigelbproteine, das in der Leber von Amphibien und anderen eierlegenden Vertebraten synthetisiert wird. Die Expression erfolgt estrogenabhängig bei geschlechtsreifen Weibchen, bei Männchen wird kein bzw. nur geringe Mengen an Vitellogenin synthetisiert. Die Vitellogenin-Synthese kann jedoch nach Estrogengabe in der männlichen Leber induziert werden. [Walker et al, 1983; Gerber-Huber et al, 1981]

Vitellogenin wird bereits in der Leber posttranslational modifiziert und in den Blutkreislauf sezerniert. Nach selektiver Aufnahme durch heranwachsende Oozyten wird es in die Eigelbproteine Lipovitellin und Phosvitin gespalten, die in Form von Granula oder Plättchen gespeichert werden. Sie dienen als Nahrungsquelle in der frühen Embryogenese. [Wahli et al, 1981; Gerber-Huber et al, 1987]

Der afrikanische Krallenfrosch *Xenopus laevis* besitzt vier strukturell eng verwandte Gene, Vitellogenin A1, A2, B1 und B2, die für vier verschiedene Varianten des Proteins codieren. [Wahli und Dawid, 1980]

Sequenzanalysen der 5´flankierenden Region der Vitellogenin-Gene ergaben vier Bereiche mit großer Homologie sowie eine palindromische Sequenz, 5´-GGTCANNNTGACC-3´, die in 1-3 Kopien in der jeweiligen Promotorregion der Gene vorliegt. [Klein-Hitpass et al, 1986; Walker et al, 1984]

Die Promotoren von Vitellogenin A1 und A2 enthalten ein funktionsfähiges perfektes Palindrom, während B1 und B2 jeweils zwei imperfekte Palindrome aufweisen, die aufgrund synergistischer Effekte wirken. Ein imperfektes Palindrom unterscheidet sich vom perfekten in einem oder mehreren Nukleotiden. [Klein-Hitpass et al, 1988b; Nardulli et al, 1996]

In der vorliegenden Arbeit wurde als estrogeninduzierbarer Promotor in den entsprechenden Reportergensystemen der Vitellogenin A2 Promotor eingesetzt. Die Struktur dieses Promotors wird daher im folgenden näher beschrieben. (vgl. auch Kapitel 4.4)

Die Position des konservierten ERE (Position –331 bis –319) des Vitellogenin A2 Gens wurde durch Sequenzanalysen bestimmt. 7 bp downstream zu diesem ERE wurde ein weiteres potentielles ERE (AGTTANNNTAACC) identifiziert, das sich in nur drei bp-Positionen von oben genanntem ERE unterscheidet. Untersuchungen mit beiden ERE-Sequenzen, zeigten, dass ihr gleichzeitiges Vorliegen zu einer 2-3fach erhöhten Induktion durch Estradiol führt. [Klein-Hitpass et al, 1988a; Klein-Hitpass et al, 1988b]

In Transfektionsversuchen mit humanen Zellen konnte gezeigt werden, daß die 5´-flankierende Region des Vitellogenin A2 gekoppelt mit einem starken Promotor wie dem *Herpes Simplex Virus* nachgeschaltete Gene estrogenabhängig kontrollieren kann. [Klein-Hitpass et al, 1986]

Diese Eigenschaft wird bei der Konstruktion von Reportergenplasmiden, die zur Untersuchung einer estrogenabhängigen Genexpression eingesetzt werden, ausgenutzt. (vgl. Kapitel 4.2 bis 4.4)

2.6.2 pS2-Protein

Das pS2-Protein ist ein sekretorisches Protein, bestehend aus 84 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von ca. 7 kDa. Die pS2-Expression unterliegt ebenfalls einer Estrogenkontrolle, andere Steroidhormone zeigen keinen Effekt. [Stack et al, 1988]

Das pS2-Gen wurde zuerst in der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7 entdeckt, eine Expression wurde aber auch in den Mucosazellen des Darms beobachtet. Da im Gastrointestinaltrakt keine Estrogenrezeptoren lokalisiet sind, wird vermutet, daß die pS2-Expression in diesem Gewebe unter der Kontrolle des epidermalen Wachstumsfaktors EGF steht. Des weiteren ergaben Hinweise aus neueren Untersuchungen, daß pS2 essentiell für die normale Differenzierung der Darmmucosazellen ist und als potentielles gastrointestinales Tumorsuppressorgen fungiert. [Rio und Chambon, 1990; Martin et al, 1998]

Die physiologische Funktion von pS2 ist aber weiter ungeklärt. pS2 weist Gemeinsamkeiten mit den Wachstumsfaktoren IGFI und II auf. Dies sind ebenfalls kleinere sekretorische Proteine, die wie pS2 cysteinreiche Stellen aufweisen und Disulfidbrücken ausbilden können. Vermutlich handelt es sich bei pS2 um einen estrogeninduzierbaren Wachstumsfaktor oder Mediator. Untersuchungen, die diese Annahme bestätigen sollten, lieferten allerdings keine Hinweise für diese Hypothese. [Stack et al, 1988; Rio und Chambon, 1990]

Die 5´-flankierende Region des pS2-Gens enthält upstream vom Transkriptionsstartpunkt ein ERE (Position –405 bis –393) [Berry et al, 1989]. Dabei handelt es sich um eine imperfekte palindromische Sequenz bestehend aus 13 bp. Weiter upstream gelegen wurden Enhancer-Elemente des EGF sowie der Proonkogene c-H-*ras* und c-*jun* identifiziert. Die pS2-Expression wird somit möglicherweise je nach Zell- oder Gewebetyp über verschiedene Signalwege reguliert. [Roberts et al, 1988; Nunez et al, 1989; Martin et al, 1998]

In der Klinik findet die pS2-Diagnosik Anwendung zur Prognose in der Brustkrebstherapie. Da pS2 nur in estrogenrezeptorpositiven Tumoren identifiziert wurde, dient es als Marker für den Einsatz einer möglichen Hormontherapie. Untersuchungen an Brustkrebspatientinnen zeigten eine direkte Assoziation zwischen pS2-Sekretion im Primärtumor und positiver Ansprechbarkeit einer adjuvanten bzw. palliativen Hormontherapie bei gleichzeitig erhöhter Überlebenschance der Patienten. [Rio und Chambon, 1990; Pichon und Milgrom, 1993]

Die Detektion von pS2 auf RNA- oder Proteinebene kann für den Nachweis einer estrogenabhängigen Genexpression herangezogen werden.

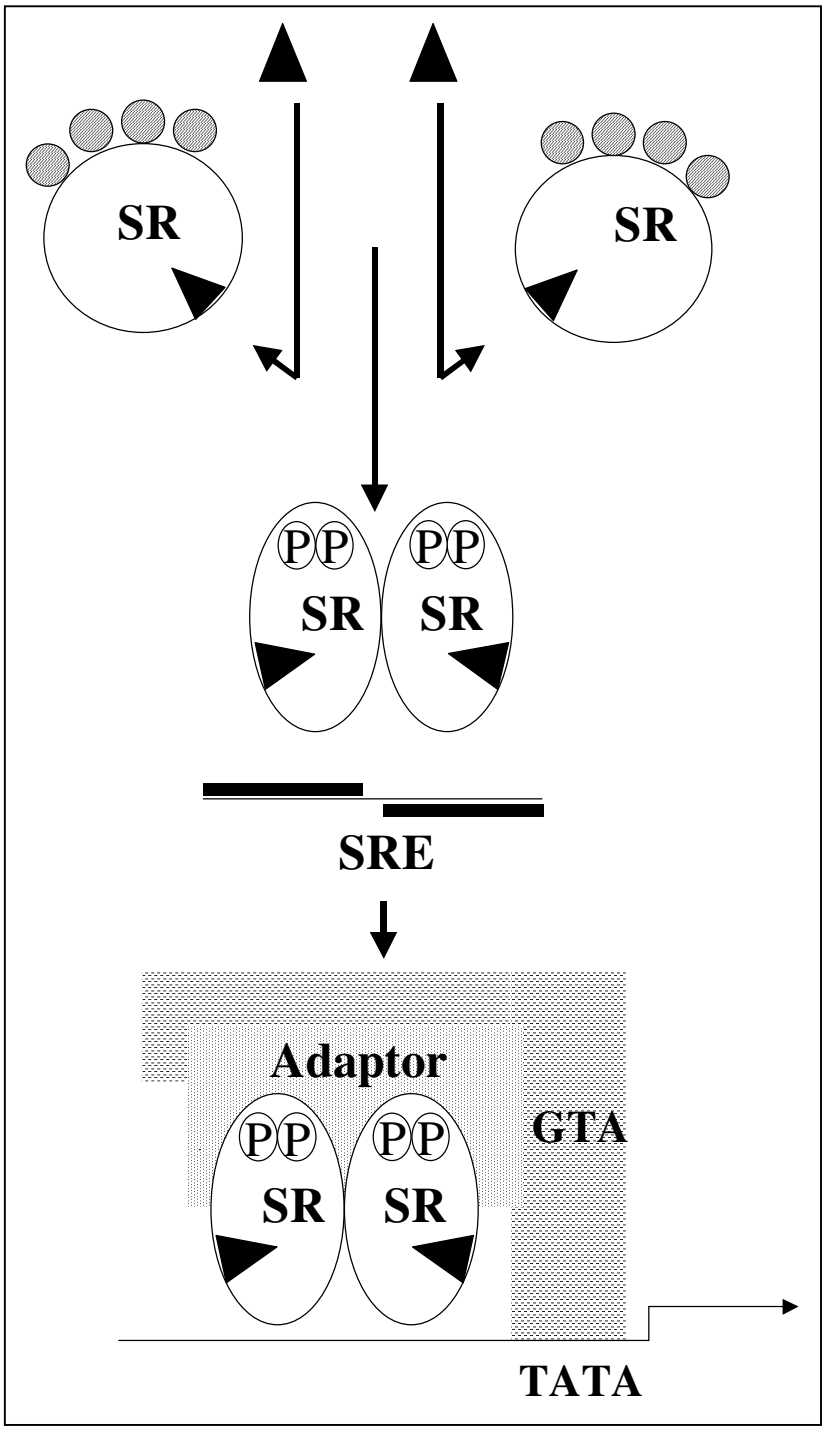
2.7 Mechanismus der Transkriptionsaktivierung

Steroidhormonrezeptoren fungieren in verschiedenen Spezies als Transkriptionsfaktoren spezifischer Gene. Im folgenden Abschnitt wird der Mechanismus der Transkriptionsaktivierung kurz erläutert (vgl. Abb. 20).

In Abwesenheit des Hormons liegen Steroidhormonrezeptoren als Oligomerkomplex mit einer Reihe anderer Proteine gebunden vor. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die Heat-Shock-Proteine Hsp 90, Hsp 70, Hsp 59 und p23. Diese blockieren die DBD und verhindern somit eine DNA-Bindung des Rezeptors. Zusätzlich stabilisieren sie eine Rezeptorkonformation, die eine Ligandbindung ermöglicht. [White und Parker, 1998; Beato et al, 1996b]

Steroidhormone können die Zellmembran durch passive Diffusion passieren und je nach Rezeptorlokalisierung in Cytosol oder Nukleus an den spezifischen Rezeptor binden. Die Interaktion des Liganden an den Rezeptor setzt eine Reaktionskaskade in Gang. Ligandinduzierte Konformationsänderung und Phosphorylierung des Rezeptors führen zur Abdissoziation der Heat-Shock-Proteine und zur Rezeptordimerisierung. Cytosolische Rezeptoren unterliegen einer Translokation in den Zellkern, während kernlokalisierte Rezeptoren stärker mit Kernstrukturen assoziiert werden. Nächster Schritt ist die Interaktion des Rezeptordimers mit spezifischen Hormon Responsiven Elementen des zu kontrollierenden Gens. Die Rezeptor-DNA-Interaktion bewirkt den Zusammenschluß mit sogenannten Adapterproteinen, dies führt nachfolgend zur Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat. Der Transkriptionsstart erfolgt nach Bindung der RNA-Polymerase II an die TATA-Box. [White und Parker, 1998; McDonell et al, 1995; Beato et al, 1996a; Beato et al, 1996b]

Die Interaktion zwischen HRE und Transkriptionskomplex kann entweder direkt erfolgen oder durch Coaktivatoren vermittelt werden, die als „Brücke“ zwischen HRE und Transkriptionsapparat fungieren. Der Abstand zwischen Transkriptionsapparat und HRE kann bis zu mehreren Kilobasen betragen. Um diesen zu verkleinern, kann es infolge der Interaktion des Rezeptors mit dem Transkriptionsapparat zur Bildung eines DNA-Loops kommen. Diese Looping-Bildung führt vermutlich zu einer Änderung der Chromatinstruktur, was möglicherweise den Zugang weiterer Transkriptionsfaktoren erleichtert. [Wahli und Martinez, 1991; Church-Landel et al, 1995]



- Transport der Steroide in die Zelle
- Bindung an den Rezeptor (SR)

- Konformationsänderung
- Phosphorylierung

- Abdissoziieren der Heat-Shock-Proteine

- Rezeptordimerisierung

- Nukleare Translokation

- Interaktion mit der DNA (SRE)

- Phosphorylierung (P)

- Rekrutierung von Adapterproteinen

- Interaktion mit GTA (allgemeiner Trans-kriptionsapparat)

- Modulation der RNA-Polymerase-Aktivität

Abb. 20: Mechanismus der Transkriptionsaktivierung [nach McDonnell et al, 1995]

2.8 Steroidhormonrezeptorlokalisierung

Proteine können die Zellmembran entweder passiv durch freie Diffusion oder durch aktiven Transport passieren. Proteine mit einem Molekulargewicht größer als 60 kDa, können die Kernmembran nicht passiv passieren. Sie benötigen für einen aktiven Transport in den Kern sogenannte „nuclear Localization Signals“ (NLS). Eines der am besten charakterisierten NLS ist das Nuclear Targeting Signal des Simian Virus 40 (SV 40) large T Antigen. Ein ähnliches Signal wurde bei den Steroidhormonrezeptoren identifiziert. [Jenster et al, 1993]

Untersuchungen zur Lokalisation des ER ergaben, daß hier das Modell der Rezeptor-Transformation, d.h. Translokation des Rezeptors in den Zellkern nach der Ligandbindung so nicht vorliegt. Bei Hormonabwesenheit unterliegt der ER vermutlich, wie auch die anderen Steroidhormonrezeptoren, einem „Shuttle“ zwischen Cytoplasma und Zellkern. Die Menge im jeweiligen Kompartiment ist vom Rezeptortyp abhängig. ER und PgR sind vor allem im Zellkern lokalisiert, AR und GR hauptsächlich im Cytoplasma. [Weigel, 1996; Beato et al, 1996a] Der ER ist im Kern bereits lose an Kernstrukturen assoziiert, die Ligandbindung erhöht in diesem Fall die Affinität zu bestimmten Kernelementen. [King und Green, 1984; Welshons, 1984]

In der Modellvorstellung des Rezeptor-Shuttles ist der Kernimport und –export ein kontinuierlicher Prozeß, bei dem der Rezeptor aus dem Kern diffundiert und aktiv zurücktransportiert wird. Wichtig für die Verteilung zellulärer Rezeptoren ist unter anderem das Gleichgewicht zwischen der Bindung an Kern- und Cytoplasmastrukturen wie Heat-Shock-Proteine und Cytoskelett. Der Kerntransport wird nicht direkt über die Ligandbindung reguliert. Über zwei potentielle Mechanismen könnte der Ligand dennoch direkten Einfluß auf den Transport nehmen. Zum einen durch Induktion der Phosphorylierung in oder nahe der NLS-Region. Die Phosphorylierung könnte an der Wechselwirkung des NLS mit Kernporen und am Kernimport beteiligt sein. Zum anderen kann mittels ligandinduzierter Konformationsänderung die zuvor maskierte NLS freigelegt werden und somit zur Translokation führen. [Jenster et al, 1993; Cadepond et al, 1992]

In ER und PgR konnten verschiedene proto-NLS identifiziert werden, die nur zusammen die Translokation des Rezeptors bewirken. Im ER wurde ein ligandinduzierbares NLS in der HBD sowie drei konstitutive NLS identifiziert. [Cadepond et al, 1992; Ylikomi et al, 1992]

2.9 Steroidhormonrezeptor-Coaktivatoren

Die Gentranskription basiert auf der Bildung eines sogenannten Präinitiationskomplexes, bestehend aus basalem Transkriptionsapparat und Transkriptionsaktivatoren.
Neuere Untersuchungen führten zur Identifizierung von Proteinen, die mit den zellulären Rezeptoren ligandabhängig interagieren und eine essentielle Rolle bei der Transkriptionsaktivierung spielen. Es konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die mit der AF-2 Region interagieren und als Transkriptionsaktivatoren fungieren. [Mak et al, 1999]
Rezeptorinteragierende Proteine lassen sich vorerst in zwei Klassen unterteilen. Eine Klasse besteht aus der p160-Familie (RIP160), sowie dem CREB-Bindungsprotein (CBP) und dem Adenovirus-verwandten E1A-assoziierten p300 Protein. Zur p160 Familie zählen SRC-1, TIF2 und pCIP1 mit einem Molekulargewicht von je 160 kDa. [Lanz et al, 1999; Mak et al, 1999]

Der Steroid-Rezeptor-Coaktivator 1 SRC-1, auch als p160 bzw. ERAP-160 bezeichnet, ist allgemein ein Coaktivator für Steroidhormonrezeptoren. SRC-1 interagiert mit einer Reihe von Transkriptionsfaktoren und beeinflusst deren Transkriptionsaktivität ligand- und AF-2-abhängig. [Tremblay et al, 1999] SRC-1 erhöht die Transaktivierung nur bei Estrogen-Rezeptoren, die einen Agonisten gebunden haben. SRC-1 interagiert nicht mit Rezeptoren, die als Liganden einen Antagonisten gebunden haben.
Vermutlich interagieren die p160-Proteine mit Seitenketten, die sich in der Nähe von Helix 3 bzw. Helix 12 des Rezeptors befinden. Wichtig für die Interaktion zwischen Rezeptor und p160-Protein scheint dabei ein LXXLL-Motiv (L=Leucin; X=Aminosäure) des Coproteins zu sein, von denen je drei konserviert bei allen Proteinen der p160-Familie vorliegen. SRC-1 kann mit den Coproteinen CREB-Bindungsprotein, CBP und p300 interagieren, die direkt mit dem basalen Transkriptionsapparat verbunden sind. [Mak et al, 1999; Schwartz und Brooks, 1998; Halachmi et al, 1994; Onate et al, 1995; Anzick et al, 1997]

Das CREB-Bindungs-Protein (CBP) und das eng verwandte Adenovirenassoziierte E1A p300 Protein sind Coaktivatoren, die mit vielen kernständigen Rezeptoren interagieren, aber auch mit einer Reihe weiterer Transkriptionsfaktoren, die an verschiedenen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. [Lanz et al, 1999] Beide Proteine sind Coaktivatoren des CREB (cAMP responsive element binding protein). [Hanstein et al, 1996]

CBP und p300 besitzen ein großes Molekulargewicht und sind in ihrer Struktur und Funktion in Säugetieren konserviert.
Die Assoziation von p300 an den ER erfolgt ligandabhängig und zusammen mit dem Coaktivator SRC-1. Der Komplex aus p300 und SRC-1 fungiert als Coaktivator für eine ER-vermittelte Transkriptionsregulation. [Hanstein et al, 1996; Glass et al, 1997; Edwards, 1999] Eine Überexpression von p300 und CBP in Zellen führt zur Erhöhung der ligandinduzierten Transkriptionsaktivierung. [Edwards, 1999]

Die zweite Klasse rezeptorinteragierender Proteine setzt sich aus verschiedenen Proteinen zusammen, die nicht näher miteinander verwandt sind. Ihnen wird ebenfalls eine Rolle als Transkriptionsaktivatoren zugeschrieben.
TIF-1 (Transcriptional intermediary factor 1) besitzt ein Molekulargewicht von 112 kDa und enthält mehrere konservierte Domänen, die in unterschiedlichen Transkriptionsfaktoren zu finden sind. TIF-1 ist mit verschiedenen zellulären Rezeptoren assoziiert. [Glass et al, 1997]
TIF-1 interagiert ligandabhängig mit der konservierten AF-2-Domäne der HBD des ER, bindet jedoch nicht an mutierte AF-2-Domänen. [Horwitz et al, 1996]
RIP140 (receptor-interacting protein 140) hat eine Größe von 127 kDa. RIP140 interagiert nur in Anwesenheit von Estrogenen mit der E-Region des ER. [Peters und Khan, 1999] Bei einer minimalen Erhöhung des RIP140-Gehaltes ist die ER-abhängige Transkription leicht erhöht, während bei höheren Gehalten die ER-vermittelte Transkription inhibiert wird.
Es wird vermutet, daß TIF-1 und RIP140 Bestandteil eines Komplexes sind, der bei der Transkriptionsaktivierung eine Rolle spielt. [Glass et al, 1997] Die Interaktion beider Proteine ist vom Ligand und der funktionell intakten AF-2-Region abhängig. [Edwards, 1999]

Die komplexen Zusammenhänge zwischen den einzelnen Coproteinen sind gegenwärtig noch nicht komplett erforscht. Damit ist ersichtlich, welche Ansprüche an ein zu etablierendes funktionelles Testsystem gestellt werden müssen.
In der folgenden Tabelle sind die wichtigsten Coaktivatoren der Steroidhormonrezeptoren zusammengefasst.

Tab. 2: Proteine, die ligandabhängig mit kernständigen Rezeptoren interagieren [nach Glass et al, 1997]

Protein	Rezeptor	Funktion des Proteins
p140 (ERAP140,RIP140)	**ER**,RAR	schwache Stimulation der ER-vermittelten Transkription bei geringer Überexpression, hohe Überexpression unterdrückt die ER-Aktivität
TIF1	**ER**,RAR,RXR	Maus-Protein, interagiert ligand-abhängig mit konservierter AF-2-Region des Rezeptors
SRC-1/N-CoA1 (=ERAP160, RIP 160)	PR,**ER**,RAR,RXR,TR,GR	bindet nur an aktivierte ER-Konformation; vermittelt estrogen-abhängige Transkription des ER über AF-2-Region; Mitglied der p160-Familie, verwandt mit TIF2/GRIP1
TIF2/GRIP1	PR,**ER**,RAR,RXR	Aktivität verschiedener zellulärer Rezeptoren durch TIF2 vermittelt, Mitglied der p160-Familie, verwandt mit SRC-1/N-CoA1
CBP/p300	RAR,RXR,**ER**,TR	essentieller Coaktivator für zelluläre Rezeptoren und verschiedene Klassen regulatorischer Transkriptionsfaktoren, Interaktion mit Rezeptor im Komplex mit SRC-1
ARA_{70}	AR	spezifische Interaktion mit AR; vermittelt AR-Aktivität

2.10 Steroidhormonrezeptor-assoziierte Proteine

Steroidhormonrezeptoren liegen vor der Ligandbindung als große oligomere Komplexe, bestehend aus dem Rezeptormolekül und verschiedenen rezeptorassoziierten Proteinen (RAPs) vor. Als erstes RAP wurde das Heat-Shock-Protein Hsp 90 entdeckt. In den letzten Jahren wurde eine Reihe weiterer RAPs, z.B. Hsp 70, p60, p59, Hsp 56, p54, p50, p48 und p23, die an dem Komplex beteiligt sind, identifiziert. [Ylikomi et al, 1998]

Die Proteine der Hsp-Familie werden bevorzugt nach einem Hitzeschock exprimiert und sind in praktisch allen Zellen vorhanden. Ihre Aminosäuresequenz ist hochkonserviert und sie weisen in ihrer Promotorregion eine spezifische DNA-Sequenz auf, die durch Hitzeschock-Transkriptionsfaktoren aktiviert wird. Hsp-Proteine sind jedoch nicht nur nach einem Hitzeschock oder unter Stressbedingungen aktiv, sie spielen auch bei normalen physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle. Sie sind verantwortlich für Proteinfaltung, Zusammenschluß von Proteinen, Translokation von Proteinen in intrazelluläre Kompartimente sowie für Sekretion und Abbau fremder Proteine. [Ciocca et al, 1993]

Hsp 90

Hsp 90 ist ein hochkonserviertes und weit verbreitetes Protein, das im Oligomerkomplex als Homodimer vorliegt. Hsp 90 besitzt eine ATPase-Aktivität sowie ein Autophosphorylierungspotential. [Ylikomi et al, 1998; Pratt et al, 1989] Als Chaperone ist Hsp 90 an der Proteinfaltung, der Zusammenlagerung des Oligomerkomplexes und dem Transport von Proteinen in andere Zellkompartimente beteiligt. [Bose et al, 1996]

Hsp 70

Die Hsp 70-Familie setzt sich aus hochkonservierten, weit verbreiteten Proteinen zusammen. Hsp 70 Proteine spielen vermutlich eine wichtige Rolle beim Proteinmetabolismus. Sie sind ebenfalls an der Proteinfaltung und –entfaltung sowie am Proteintransport in verschiedene Zellkompartimente beteiligt. In Zellextrakten liegt Hsp 70 im Komplex mit Hsp 90 und p60 vor. [Church-Landel et al, 1995; Ylikomi et al, 1998; Pratt, 1993]

Hsp 56

Hsp 56 zählt zur Klasse der Immunophiline, die Immunsuppressiva wie z.B. Cyclosporin A und Rapamycin mit hoher Affinität und Spezifität binden. Die Bindung von Hsp 56 im Steroidhormonrezeptoroligomerkomplex erfolgt an Hsp 90 und wird durch Molybdationen stabilisiert. [Ylikomi et al, 1998; Pratt, 1993]

p60

p60 ist ein konserviertes Protein, das in vielen Spezies vorkommt. Die physiologische Funktion von p60 ist bisher nicht bekannt. In Gewebeextrakten wurde Hsp 70 zusammen im Komplex mit Hsp 90 und p60 gefunden. p60 ist für die Zusammenlagerung der Hsp-Proteine von Bedeutung und erhöht deren Aktivität. [Ylikomi et al, 1998; Freeman, 1996]

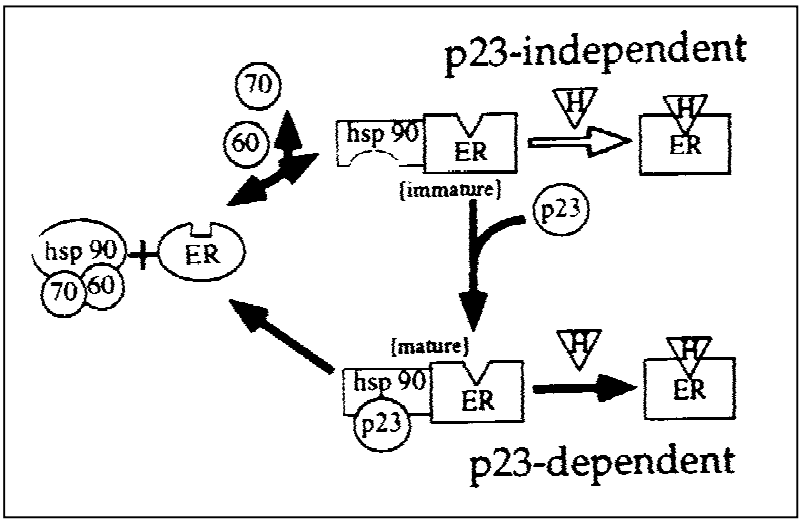
p23

p23 ist in nahezu allen Spezies zu finden. Es wurde am Anfang den niedermolekularen Hsp-Proteinen zugeordnet. Inzwischen hat sich jedoch gezeigt, daß es nicht durch Hitzeschock induziert wird und keine Sequenzhomologien zu den Hsp-Proteinen aufweist. p23 ist ein acides Protein, das mehrere potentielle Phosphorylierungsstellen enthält. Es ist ebenso wie Hsp 70 und p60 mit Hsp 90 assoziiert, unabhängig davon ob der Rezeptor vorliegt oder nicht. p23 scheint eine wesentliche Rolle bei der Zusammenlagerung dieses Komplexes und bei der Regulation der ER-Funktion zu spielen. [Ylikomi et al, 1998; Knoblauch und Garabedian, 1999]

2.11 Modell der Estrogenrezeptor-Signaltransduktion

Die Funktion von p23 im Steroidhormonrezeptorsignalweg liegt vermutlich darin, daß es mit Hsp 90 interagiert und somit die Stabilisierung des Rezeptors gewährleistet. Hsp 90, p60, Hsp 70 und möglicherweise auch Hsp 40 bilden in dieser Modellvorstellung einen Komplex. In diesem liegt Hsp 90 in einer Konformation vor, die eine p23-Bindung verhindert. Der Hsp-Komplex bindet an den Rezeptor, der aufgrund seiner Konformation eine geringe Affinität zum Liganden zeigt. In einem ATP- und Kationen-abhängigen Prozeß dissoziieren Hsp 70 und p60 ab. Dabei kommt es zur Konformationsänderung von Hsp 90 und des Rezeptors. p23 kann an Hsp 90 binden und der Rezeptor weist nun eine hohe Affinität zum Liganden auf.

Vermutlich führt die Bindung von p23 an Hsp 90 zur Stabilisierung der Rezeptor-Proteine. In Abwesenheit von p23 ist der Rezeptor-Komplex instabil und die Hsp-Proteine dissoziieren schnell vom Rezeptor ab. Ein zweiter, p23-unabhängiger Weg wird ebenfalls diskutiert. Der Ligand bindet direkt an den Rezeptor-Hsp 90-Komplex ohne daß p23 am Hsp 90 gebunden ist. Dies scheint vor allem bei hohen ER-Gehalten oder erhöhten Estradiolkonzentrationen bevorzugt zu sein. [Knoblauch und Garabedian, 1999; Sabbah et al, 1996; Pratt, 1993]



Hsp 90: Hsp 90-Dimer

70: Hsp 70

60: p60

p23: humanes p23

ER: Estrogenrezeptor

H: Hormon

Immunophiline z.B. Hsp 56, sind in dieser Abbildung nicht eingezeichnet, *in vivo* sind diese aber mit den Hsp-Proteinen verbunden

Abb. 21: Modell der p23-abhängigen und -unabhängigen ER-Signaltransduktion [Knoblauch und Garabedian, 1999]

2.12 Estrogenrezeptor-Phosphorylierung

Eine weitere Möglichkeit zur Aktivierung bzw. Regulierung von Steroidhormonrezeptoren besteht in deren Phosphorylierung. Untersuchungen haben gezeigt, daß die Phosphorylierung eine wichtige Rolle bei DNA-Bindung, Interaktion mit anderen Proteinen und Transaktivierung spielen kann. Die Phopshorylierung von Transkriptionsfaktoren kann deren Affinität zu spezifischen DNA-Sequenzen erhöhen oder verringern. [Chen et al, 1999; Le Goff et al, 1994; Denton et al, 1992]

Die Rezeptorphosphorylierung kann ligandinduziert sein, es liegen aber auch konstitutive Phosphorylierungsstellen vor. [Ali et al, 1993]

Phosphorylierungsstellen des ERα sind z.B. die Serinreste 106, 118, 167, 236, 305 und der Tyrosinrest 537. Untersuchungen zeigten, daß die Phosphorylierung von Tyrosin 537 wichtig

für die ER-Dimerisierung und die Bindung des Dimers an die DNA ist. [Arnold at al, 1995; Weigel, 1996]
Eine wichtige Rolle für die Aktivität der AF-1-Region in der A/B-Domäne des hER spielt die Phosphorylierung von Serin 118, die durch Estradiol-Bindung induziert wird. Ein Austausch gegen andere Aminosäuren führt zur Änderung der Transkriptionsfunktion. [Kato et al, 1995]

2.13 Regulationsmechanismen von Hormonen

Endokrine Disruptoren können auch Einfluß auf die hormonelle Regulation im Organismus nehmen. Diese feinen Regulationsmechanismen spielen *in vivo*, jedoch nicht *in vitro* eine Rolle. Bei der Betrachtung einer potentiell hormonaktiven Verbindung ist die Berücksichtigung der hormonellen Regelkreise jedoch wichtig. Im folgenden werden daher die Zusammenhänge der hormonellen Regulation kurz beschrieben.
Hormonvermittelte Reaktionen laufen im allgemeinen nach einem einheitlichen Schema ab, das einen dreistufigen, hierarchischen Aufbau zeigt (vgl. Abb. 22). Zentrales Steuerorgan ist der Hypothalamus, der sogenannte Releasinghormone freisetzt. Diese führen in der Hypophyse zur Bildung und Ausschüttung eines zweiten Hormons, dem glandotropen Hormon, das eine periphere, endokrine Drüse beeinflusst. In dieser kommt es durch den Einfluß des glandotropen Hormons zur Produktion und Sekretion eines effektorischen Hormons. Dieses verteilt sich mit dem Blutstrom über den gesamten Organismus und löst in den Zellen, die entsprechende Hormonrezeptoren besitzen, die eigentliche Reaktion aus. Chemorezeptoren in den Hypothalamuszentren registrieren die Hormonkonzentration im Blut und entsprechend dieser Konzentration wird die Ausschüttung des Releasinghormons gesteuert. Ein Ansteigen der Hormonkonzentration führt zu verminderter, ein Abfallen zu erhöhter Abgabe des Releasinghormons. Dies wird als negative Rückkopplung bezeichnet. [Mutschler, 1997]

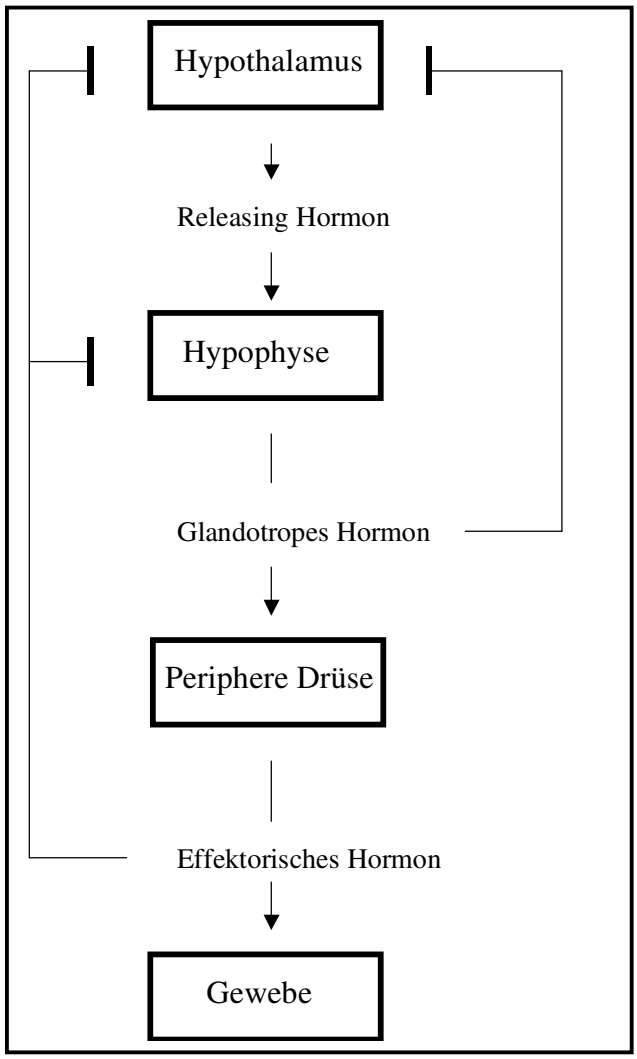


Abb. 22: Hormonaler Regelkreis mit dreistufigem, hierarchischen Aufbau [nach Mutschler, 1997]

2.14 Testsysteme

Die Erfassung potentieller endokriner Disruptoren kann sowohl *in vivo* als auch *in vitro* erfolgen. In Abbildung 23 ist eine schematische Übersicht möglicher Testsysteme dargestellt. Im folgenden Kapitel soll nur kurz auf *in vivo* Methoden eingegangen werden, während die im Schema aufgeführten *in vitro* Testsysteme genauer erläutert werden.

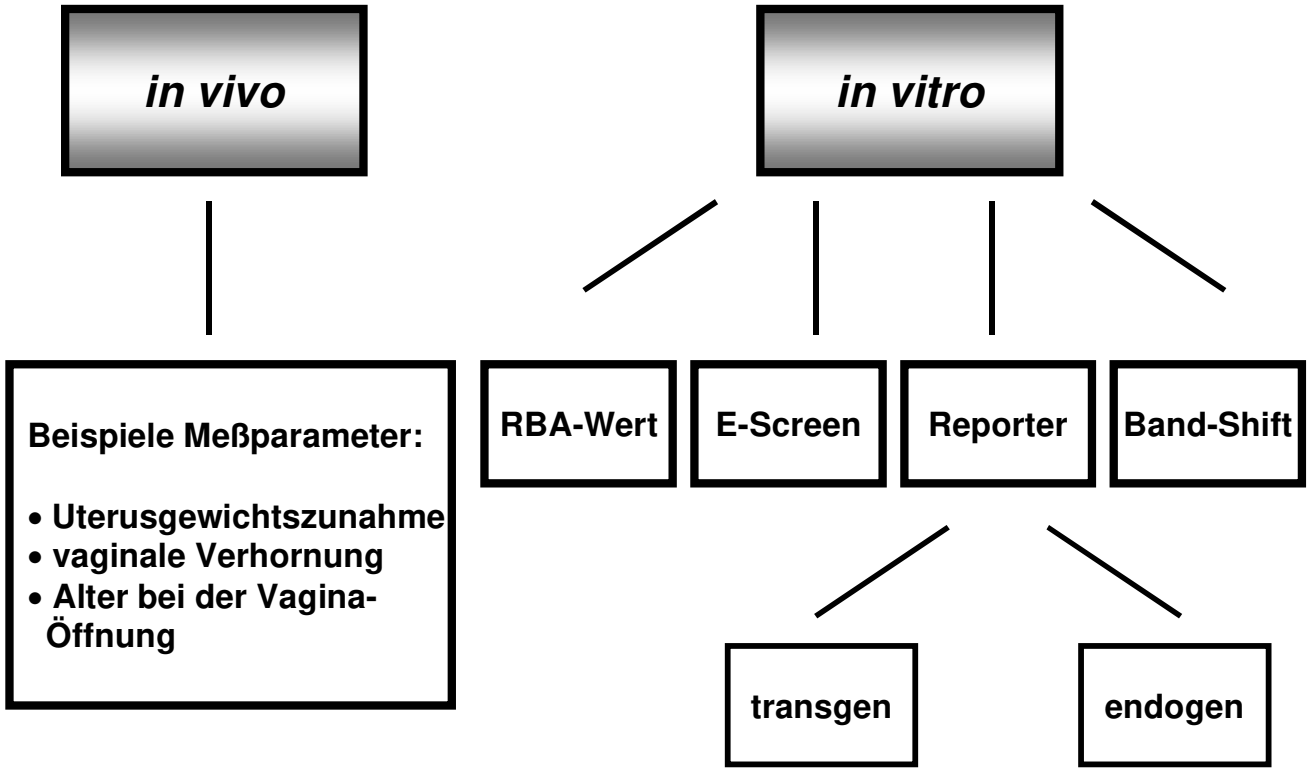


Abb. 23: Schematische Übersicht von Testsystemen zur Erfassung endokriner Disruptoren

2.14.1 *In-vivo* Testsysteme

Die Identifizierung einer estrogenaktiven Verbindung kann *in vivo* beispielsweise mit dem uterotrophen Assay erfolgen. Dieser basiert auf dem Anstieg der mitotischen Aktivität in Geweben des Genitaltraktes von weiblichen juvenilen oder ovariektomierten Nagetieren. Meßgröße ist dabei die Uterusgewichtszunahme nach Behandlung mit der Testsubstanz. Die Bestimmung der vaginalen Verhornung bei weiblichen Nagern wird ebenfalls als *in vivo* Test eingesetzt. Dieser Messparameter wird ebenfalls durch Estrogene beeinflusst. [Villalobos et al, 1995; Nimrod und Benson, 1996; Zacharewski, 1998]

Als Vorteil der *in vivo* Assays ist die Berücksichtigung von Pharmakokinetik, Metabolismus und Plasmaproteinbindung zu nennen. Die Durchführung dieser *in vivo* Assays erfordert jedoch hohen technischen Aufwand, teure und zeitaufwendige Versuchsdurchführung sowie hohe Tierzahlen. [Safe et al, 1998; Andersen et al, 1999]

Es wird daher nach neuen Screening-Verfahren gesucht, mit denen in möglichst kurzer Zeit eine Vielzahl von Verbindungen untersucht werden kann.

2.14.2 *In vitro* Testsysteme

2.14.2.1 RBA-Wert

Der RBA-Wert einer Substanz gibt an, ob diese an den ER bindet und dabei ^{3}H-Estradiol vom Rezeptor verdrängt. ^{3}H-Estradiol und die Testsubstanz werden zusammen mit einem Extrakt, das den ER enthält oder mit dem aufgereinigten Rezeptor über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Gebundenes ^{3}H-Estradiol und freier Ligand werden mittels Charcoal-Dextran-Methode getrennt und im Scintillationszähler das am Rezeptor gebundene ^{3}H-Estradiol vermessen. Der RBA-Wert gibt die Substanzkonzentration an, die zu einer 50%igen Hemmung der ^{3}H-Estradiol-Rezeptorbindung notwendig ist. Der RBA-Wert von Estradiol beträgt definitionsgemäß 100. [Korenman, 1970]
Nachteil des Assays ist die geringe Sensitivität gegenüber anderen *in vitro* Testsystemen. Eine Unterscheidung zwischen Agonist und Antagonist kann ebenfalls nicht erfolgen und die Bindung einer Substanz an den Rezeptor führt nicht in jedem Fall zu dessen Aktivierung und nachfolgender Transkription. [EDSTAC, 1998]

2.14.2.2 Polymeraseseitenkettenreaktion (PCR) und Reverse Transkriptase Polymerase-seitenkettenreaktion (RT-PCR)

2.14.2.2.1 PCR

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren (vgl. Abb. 24 A). Als Reaktionsprinzip liegt die Replikation der DNA in der Zelle zugrunde. DNA-Polymerasen synthetisieren aus freier DNA einen komplementären DNA-Strang zu einer vorhandenen Matrize. Die DNA-Polymerase benötigt für die DNA-Synthese sogenannte Primer, bestehend aus kurzen Nukleotidsequenzen, die mit den flankierenden Bereichen der Matrize hybridisieren können und der Polymerase als Starthilfe dienen.
Die PCR-Reaktion beruht auf drei Einzelschritten, die einen Reaktionszyklus darstellen. Im ersten Schritt erfolgt die Denaturierung des Reaktionsansatzes bei 94°C, hierbei kommt es zum Lösen bestehender Wasserstoffbrücken zwischen gepaarten Basen und zum Aufschmelzen von DNA-Doppelsträngen in Einzelstränge. Anschließend erfolgt im zweiten

Schritt bei einer Temperatur von ca. 50-55°C das Annealing, d.h. die spezifische Anlagerung der Primer an die DNA-Matrize. Im letzten Schritt erfolgt die Verlängerung durch die DNA-Polymerase zu kompletten Kopien der Matrize bei ca. 70°C. Im nächsten Reaktionszyklus stehen diese Kopien als zusätzliche Matrizen zur Verfügung. Die Anzahl der verfügbaren Fragmente und damit die Menge des zu amplifizierenden Fragmentes verdoppelt sich mit jedem Reaktionszyklus. Die exponentielle Amplifikation des spezifischen Fragmentes ist allerdings begrenzt. Mit steigender Produktmenge wird im Verlauf der Reaktion eine 100%ige Ausbeute durch verschiedene Faktoren verhindert. Abhängig von der Ausgangsmenge liegen nach 25-30 Zyklen so viele Matrizenmoleküle vor, daß deren Rehybridisierung zur Konkurrenzreaktion gegenüber der Primeranlagerung wird. Limitierender Faktor ist auch die Enzymmenge bei molarem Überschuß der Ziel-DNA sowie eine Aktivitätsverringerung der Polymerase mit steigender Zyklenzahl durch beginnende Denaturierung.
Das bei PCR-Reaktionen am häufigsten verwendete Enzym ist die Taq-DNA-Polymerase, ein hitzestabiles Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*. Ihr Temperaturoptimum liegt bei 70-80°C. Bei dieser Temperatur synthetisiert die Polymerase aus einzelnen Desoxynukleotidtriphosphaten Polynukleotidketten. Die Synthese erfolgt immer in 5`-3`-Richtung und als Starthilfe werden entsprechende Primer benötigt. Die Taq-DNA-Polymerase besitzt keine 3`-5`-Exonukleaseaktivität, 3`-fehlgepaarte Basen werden somit nicht von ihr herausgeschnitten. Eine Möglichkeit zur Fehlerkorrektur besteht damit nicht, pro 5000 Nukleotide wird ein falsches Nukleotid eingebaut, was einer Fehlerquote von 0,25% entspricht. [Gassen et al, 1994]

2.14.2.2.2 RT-PCR

Neben der Amplifikation von DNA-Molekülen besteht auch die Möglichkeit RNA als Matrize einzusetzen, die schließlich in Form von DNA vervielfältigt wird (vgl. Abb. 24 B). Vor der eigentlichen Amplifikation muß zuvor die RNA in einzelsträngige cDNA überführt werden. Dieser erste Schritt bei einer RT-PCR-Reaktion erfolgt mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase. Reverse Transkriptasen konnten aus verschiedenen RNA-Viren isoliert werden, z.B. aus dem Affen-Myeloblastosis-Virus (AMV) oder dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MMLV). Diese RNA-abhängigen DNA-Polymerasen synthetisieren eine

komplementäre cDNA in 5`-3`-Richtung und benötigen ebenso Primer zum Start der Reaktion. [Newton und Graham, 1994]

Eukaryontische Zellen enthalten 80-85% ribosomale RNA, 10-15% tRNA und nur 2-4% mRNA. Die klassische Methode zur Untersuchung von Genexpressionen in Zellen oder Geweben auf der mRNA-Stufe war die Northern-Blot-Analyse. Die Entwicklung der RT-PCR bietet dazu im Vergleich eine wesentlich sensiblere und schnellere Methode zur Erfassung geringer mRNA Mengen.

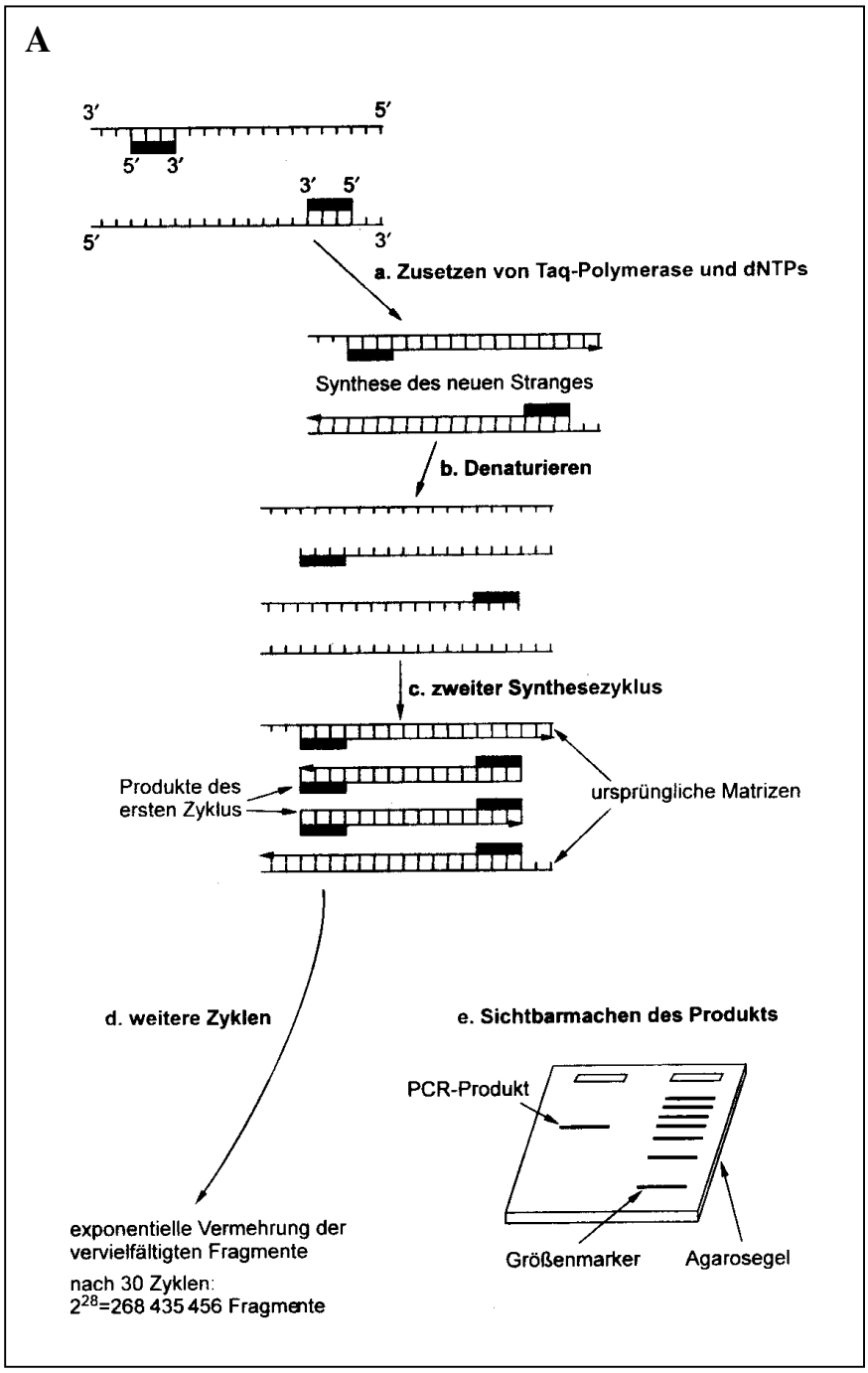


Abb. 24 A: Schematische Darstellung der PCR [Brown, 1996]

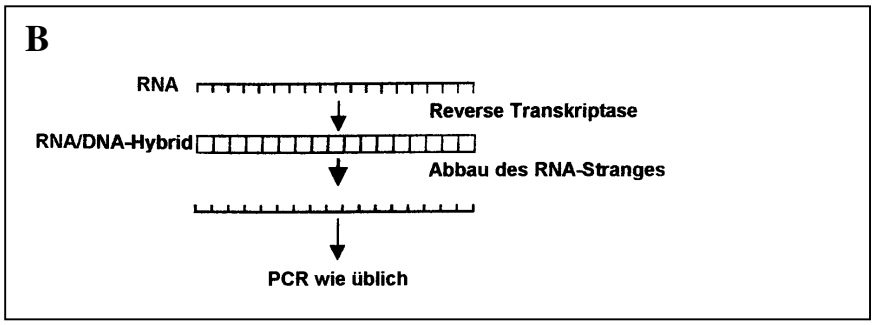


Abb. 24 B: Schematische Darstellung der RT-PCR [Brown, 1996]

2.14.2.3 Immunradiometrischer Assay (IRMA)

Die Detektion estrogen-induzierter Gene kann neben dem Nachweis der mRNA mittels RT-PCR auch auf Proteinebene erfolgen. Das zu detektierende Protein wird durch den Einsatz spezifischer Antikörper mittels ELISA nachgewiesen.

Beim immunradiometrischen Assay (IRMA) (vgl. Abb. 25) wird im Gegensatz zum klassischen Radioimmunoassay nicht das Antigen, sondern der Antikörper markiert. Zusätzlich kommt hier eine besondere Trennung von freiem und gebundenem Antigen zur Anwendung, die sogenannte solid phase sandwich Technik. Ein Überschuß des ersten Antikörpers liegt an der Oberfläche einer festen Phase gebunden vor. Nach Zugabe der zu analysierenden Probe reagiert das Antigen mit dem ersten Antikörper, wobei alle Antigene vom Antikörper gebunden werden. Nach Absaugen der Reaktionslösung und waschen der Festphase wird der zweite, radioaktiv markierte Antikörper im Überschuß zugegeben. Dieser bindet an das am ersten Antikörper gebundene Antigen. Das nachzuweisende Antigen wird somit „sandwichartig“ zwischen beiden Antikörpern gebunden. Voraussetzung für einen IRMA ist damit, daß das Antigen mindestens zwei Bindungsstellen für das Antikörpermolekül aufweist. Nach der zweiten Inkubation wird die Antikörperlösung abgesaugt, die Festphase erneut gewaschen und die an der Festphase gebundene Radioaktivität gemessen. Im Gegensatz zum Radioimmunoassay steigt beim IRMA mit höherer Antigenkonzentration in der Probe der Anteil des radioaktiv gebundenen Antikörpers. Vorteile des IRMA sind eine hohe Empfindlichkeit und ein großer Messbereich sowie eine einfache Durchführung. Des weiteren ist der IRMA vorteilhaft, wenn das Antigen schwer zu markieren oder zu instabil für eine Markierung ist. Zusätzlich ist der IRMA für Matrixeffekte weniger anfällig, da nach der ersten Inkubationsphase eventuell vorhandene Störfaktoren

entfernt werden. Die Verwendung zweier unterschiedlicher Antikörper, die gegen verschiedene antigene Determinanten des Antigens gerichtet sind, erhöht die Spezifität. [Chard, 1990]

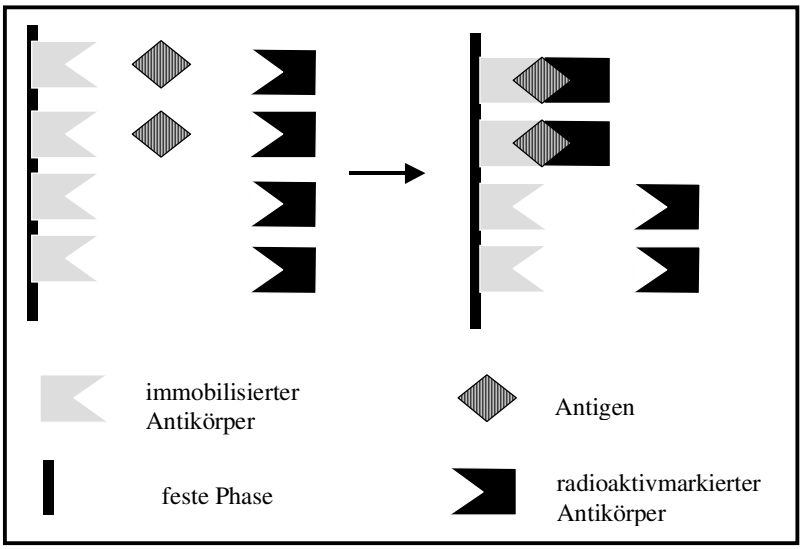


Abb. 25: Prinzip des immunradiometrischen Assays [nach Chard, 1990]

2.14.2.4 Estrogenic Screening Assay (E-Screen-Assay)

Der Proliferationseffekt von Estrogenen wird oft zur Detektion einer estrogenen Aktivität herangezogen. Auch Xenoestrogene können diese physiologische Wirkung der Estrogene hervorrufen. [Soto et al, 1991]

Die proliferationsfördernde Wirkung von Estradiol auf humane ER-positive Brustkrebszellen dient als Grundlage für den sogenannten Estrogenic Screening Assay (E-Screen-Assay), der von Soto und Sonnenschein entwickelt wurde. [Soto und Sonnenschein, 1985]

Maximale Zellproliferation wird durch Kultivierung der MCF-7 Zellen in 10% FKS Medium erreicht. Behandlung des Serums mit Charcoal-Dextran führt zu einer deutlichen Verringerung der Zellproliferation, da durch diese Serum-Behandlung die endogenen Hormone aber möglicherweise auch viele niedermolekulare Komponenten, wie Wachstumsfaktoren entzogen werden. Eine Kultivierung der Zellen in CDFKS-Medium und zusätzliche Inkubation mit Estradiol führt zur maximalen Proliferationsrate der Zellen. [Soto und Sonnenschein, 1985] Im E-Screen-Assay wird CDFKS-Medium als Kulturmedium verwendet, um den Einfluß der im Serum endogen enthaltenen Hormone zu minimieren.

Der E-Screen-Assay basiert auf der dosisabhängigen Beziehung zwischen der Proliferation von MCF-7 Zellen und der Estradiol-Konzentration, mit der die Zellen über einen bestimmten Zeitraum inkubiert werden. Die Lebendzellzahl, die bei gleicher Inkubationsdauer mit Estradiol als Positivkontrolle, ohne Estradiol als Negativkontrolle und verschiedenen Testsubstanzen erhalten wird, dient als wesentlicher Meßparameter. [Soto und Sonnenschein, 1995]

Die Bestimmung der Lebendzellzahl erfolgt durch Anfärben der Zellen mit Sulforhodamin B, der proteingebundene Farbstoff wird photometrisch vermessen und die erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und somit der Lebendzellzahl proportional. [Skehan et al, 1990]

Nachteil des E-Screen Assays ist die lange Versuchsdauer von 7-10 Tagen, sodaß die Zellen jeden zweiten Tag inkubiert werden müssen. Das Inkubationsmedium muß dafür steril filtriert werden, um eine mikrobielle Kontamination der Zellen zu vermeiden. Ein möglicher Metabolismus der Ausgangsverbindung über den langen Inkubationszeitraum muß ebenfalls in Betracht gezogen werden. Auch können toxische Effekte der Verbindung und der Metabolite das Versuchergebnis stark beeinträchtigen.

Das Wachstumsverhalten der humanen Brustkrebszellinie MCF-7 galt lange als „golden standard“ für *in vitro* Methoden. Neueste Entwicklungen zeigen, dass aus heutiger Sicht transgene Reportergensysteme aufgrund ihrer höheren Spezifität und schnelleren Testdurchführung dem Proliferationsassay überlegen sind.

2.14.2.5 Transgene Reportergensysteme

Transgene Reportergensysteme können zur Untersuchung der Genexpression und –regulation in Eukaryonten herangezogen werden. Reportergene werden oft als Indikatoren der Transkriptionsaktivität in der Zelle eingesetzt. Die cDNA wird zusammen mit einem entsprechenden Promotor in einem Expressionsvektor in die Zellen transfiziert. Nachweis des Reportergens erfolgt entweder über die Menge an exprimierter mRNA oder über das Reporterprotein selbst bzw. dessen enzymatische Aktivität. Anwendungsbereich der Reportergene ist beispielsweise die Untersuchung von Promotor- und Enhancer-Sequenzen und von Transkriptionsfaktoren sowie Überprüfung der Transfektionseffizienz. [Tuan, 1997]

Der Einsatz von Reportergensystem erfordert folgende Voraussetzungen:
[Alam und Cook, 1990; Tuan, 1997; Yang et al, 1997]

- Das Reportergen sollte für ein Protein codieren, das eine einmalige enzymatische Aktivität besitzt oder im Gemisch der intra- und extrazellulären Proteine leicht detektierbar ist.
- Das zu detektierende Protein sollte endogen nicht vorkommen.
- Die Transfektion des Reportergenkonstruktes in unterschiedliche Wirtszellen ist möglich, sofern keine posttranskriptionale Modifikation notwendig ist.
- Eine Störung durch andere enzymatische Reaktionen, die z.B. um die gleichen Substrate oder Co-Substrate konkurrieren, sollte nicht vorliegen.
- Das Reportergen sollte über einen großen linearen Bereich detektierbar sein, damit geringe bzw. größere Änderungen in der Genexpression detektiert werden können.
- Der Reportergenassay sollte schnell, leicht durchführbar, sensitiv und reproduzierbar sein.

Die Reportergenkonstrukte werden mit unterschiedlichsten Transfektionstechniken in die Wirtszellen eingeführt. Zu den häufigsten Transfektionstechniken zählen die Calcium-Phosphatmethode, die DEAE (Diethylaminoethyl)-Methode sowie die Elektroporation. Nach der Transfektion muß das DNA-Fragment in das zelluläre Chromatin integriert werden, damit das Reportergen exprimiert werden kann. Die Integration erfolgt innerhalb der ersten 12 Stunden nach der Transfektion und in den meisten Fällen wird die Fremd-DNA bereits nach 72 Stunden wieder ausgestoßen. Eine stabile Transfektion, bei der die Fremd-DNA im Genom integriert bleibt, tritt lediglich mit einer Häufigkeit von 0,001-1% auf. [Alam und Cook, 1990]
Die Identifizierung und Isolierung stabil transfizierter Zellen erfordert effektive Selektionssysteme. Als Selektionsmarker dient hierfür oft das antibakterielle Antibiotikum Geneticinsulfat (G418). Die Antibiotikaselektion ermöglicht, daß nur Zellen die Behandlung überleben, die die eingeschleuste DNA in ihr Genom eingebaut haben.
Der Vorteil der stabilen Transfektion gegenüber der transienten liegt darin, daß die Zellen über einen längeren Zeitraum kultiviert werden können, ohne daß eine neue Transfektion erforderlich ist. Die ist vor allem bei umfangreicher Substanztestung wünschenswert. Ein weiterer Vorteil liegt im Einbau der DNA-Sequenzen in eine „natürliche“ Chromatinumgebung. Ein Vorteil der transienten Transfektion besteht dagegen darin, daß bereits 1-3 Tage nach der Transfektion ohne Selektion der Zellen der entsprechende

Reportergenassay durchgeführt werden kann. Bei Wiederholung der Analysen muß allerdings eine erneute Transfektion durchgeführt werden, was die Reproduzierbarkeit im Vergleich zur stabilen Transfektion beeinflusst. Bei transienten Transfektionen sollte daher der Einsatz von konstitutiven Reportergensystemen in Betracht gezogen werden. [Alam und Cook, 1990; Koch-Brandt, 1993; Tuan, 1997]

2.14.2.5.1 Luciferase

Luciferasen sind Enzyme, die effektive Biolumineszenz-Reaktionen katalysieren. Die bekanntesten Luciferasen wurden aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer *Photinus pyralis* und Bakterien isoliert.

Die Luciferase der nordamerikanischen Feuerfliege besteht aus einer einzelsträngigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 62 kDa. Posttranslationale Modifikationen sind nicht notwendig, das Enzym enthält keine prosthetischen Gruppen, Metallionen oder Disulfidbrücken. Die Expression kann aufgrund der relativ einfachen Struktur in jedem Wirtsorganismus erfolgen.

Eine wesentlich komplexere Struktur besitzt das bakterielle Luciferaseenzym, das sich auch hinsichtlich der Substratspezifität von den Leuchtkäferluciferasen unterscheidet. [Hartmann, 1991; Wood, 1990]

Zur Beschreibung des Luciferase-Zellsystem siehe Kapitel 4.8.

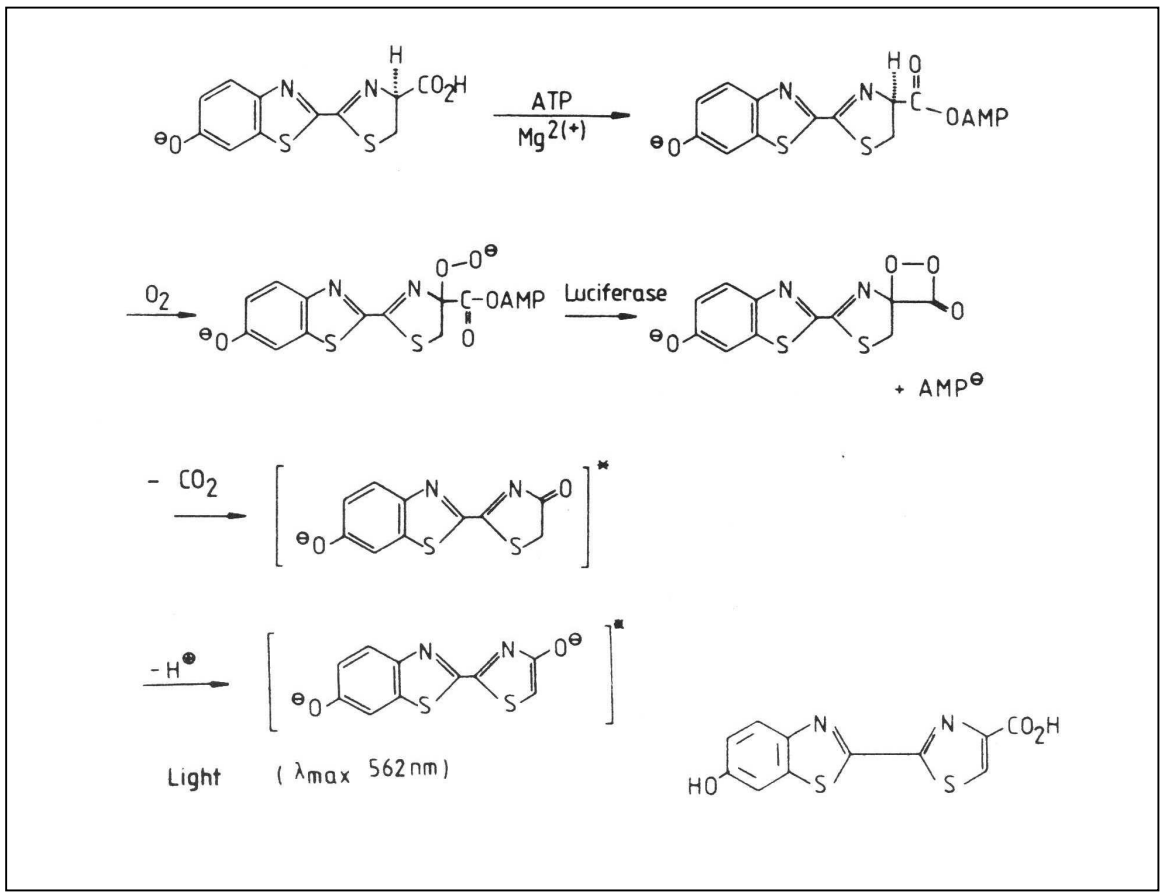


Abb. 26: Mechanismus der enzymatischen Reaktion der Leuchkäfer-Luciferase [Gundermann und McCapra, 1987]

Die enzymkatalysierte Reaktion der Luciferase beruht auf der Oxidation des Käfer-Luciferins, einer heteropolycyclischen Säure. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt ATP- und Mg^{2+}-abhängig die Aktivierung von Luciferin zu einem Enzym-Luciferyladenylat-Komplex, der im zweiten Schritt mit molekularem Sauerstoff reagiert. Nach Decarboxylierung entsteht Oxyluciferin im elektronisch angeregten Zustand, das bei Rückkehr in den Grundzustand Photonen emittiert. Die Quantenausbeute beträgt 0,88, das bedeutet, daß 88% aller oxidierten Luciferin-Moleküle auch Licht emittieren. Der optimale pH-Wert der Reaktion liegt bei 7,75, bei diesem weist der Emissionspeak bei 560 nm ein breites Maximum auf.

Der Luciferase-Assay besitzt im Vergleich zu anderen Reportergenassays wesentliche Vorteile. Aufgrund der größeren Sensitivität werden weniger Zellen benötigt, in den Zellen ist keine endogene Lumineszenz vorhanden und somit eine Signalverfälschung durch die Probe ausgeschlossen. Der Einsatz radioaktiver Substrate ist nicht erforderlich. [Albrecht et al, 1992; Kricka und Leach, 1989; Hartmann, 1991]

2.14.2.5.2 Alkalische Phosphatase (AP)

Alkalische Phosphatasen (AP) sind weit verbreitete Orthophosphormonoesterphosphohydrolasen, die ein alkalisches pH-Optimum aufweisen. Es sind stabile Enzyme, die viele Anwendungsmöglichkeiten bieten.
Bei der in dieser Arbeit verwendeten sekretierbaren alkalischen Phosphatase (SEAP) handelt es sich um eine spezielle Form der humanen plazentaren AP. Das Fehlen von 24 Aminosäuren am Carboxyende des Enzyms, aufgrund einer Mutation der codierenden Region der Membranlokalisierungsdomäne, verhindert die Verankerung in der Plasmamembran, was die Sekretion des Enzyms ins Kulturmedium zur Folge hat. [Tuan, 1997; Bronstein et al, 1994a; Berger et al, 1988]

Vorteile der AP liegen in ihrer hohen Affinität zu verschiedenen Substraten, einem hohen Substratumsatz sowie einer guten enzymatischen Stabilität. [Berger et al, 1988]
Die SEAP wird direkt ins Kulturmedium der transfizierten Zellen abgegeben. Zur Messung der SEAP-Aktivität müssen somit keine Zellextrakte angefertigt werden, da dafür ein Aliquot des Kulturmediums verwendet werden kann. Die Zellen sind damit für weitere Untersuchungen verfügbar und können außerdem für Kinetikuntersuchungen der Genexpression verwendet werden. SEAP ist im Vergleich zu anderen Isoenzymen extrem hitzestabil und resistent gegenüber dem AP-Inhibitor L-Homoarginin. Ein Background durch endogene AP´s wird vermieden, indem die Probe auf 65°C erhitzt wird und zusätzlich mit L-Homoarginin behandelt wird.
Für einen spezifischen SEAP-Nachweis hat sich die Chemilumineszenz-Detektion als besonders effizient erwiesen. Neben einer hohen Sensitivität weist sie einen großen dynamischen Messbereich sowie eine gut handhabbare Testdurchführung auf. Als Substrat wird CSPD®, ein 1,2-Dioxethan-Chemilumineszenzsubstrat verwendet, welches durch SEAP dephosphoryliert wird. Es entsteht ein instabiles Dioxethan-Anion, welches unter Lichtemission zerfällt. Die Zugabe eines Enhancerreagenz ist für die Erzeugung eines intensiven Lichtsignals notwendig und erhöht das Signal 500 bis 1000fach. Mittels Chemilumineszenzassay können noch 0,33 pg SEAP detektiert werden. Die eigentliche Messung erfolgt in einem Luminometergerät. Eine Chemilumineszenz-Quantifizierung der SEAP wird zur Analyse von Kulturmedium transfizierter Zellen sowie nicht-sekretierter AP in Zellextrakten eingesetzt. Aufgrund einer möglichen Automatisierung des SEAP-Systems

ist deren Einsatz in High-Throughput Systemen denkbar. [Bronstein et al, 1994b ; Bronstein et al, 1996; Berger et al, 1988; Yang et al, 1997]

2.14.2.6 Band-Shift

Der Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay, kurz Band-Shift-Assay, bietet eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung estrogenaktiver Substanzen. Dieses *in vitro* System ermöglicht die direkte Beobachtung einer Ligand-Rezeptor-Interaktion mit dem spezifischen Responsiven Element.

Die Detektion der spezifischen DNA-Interaktion erfordert markierte Oligonukleotide. Diese können radioaktiv markiert oder alternativ dazu am 3`-Ende mit Digoxygenin endgelabelt sein. Vorteil der Digoxygenin-Markierung besteht zum einen in der Vermeidung des Umgangs mit radioaktivem ^{32}P, zum anderen wird die begrenzte Lebensdauer des radioaktiven Oligonukleotids umgangen. Die digoxygeninmarkierten Oligonukleotide sind unbegrenzt haltbar, die ^{32}P-markierten dagegen lediglich zwei Wochen. [Ikeda und Oda, 1993]

Voraussetzung für den Band-Shift-Assay ist eine native Aufarbeitung des benötigten Rezeptors. Die spezifische Interaktion des Rezeptors mit seinem Responsiven Element erfordert einen Transkriptionsapparat, bestehend aus Proteinen, Ionen und Transkriptionsfaktoren. Diese Co-Faktoren dürfen während der Rezeptoraufarbeitung nicht vom Rezeptor abgetrennt werden. [Garner und Revzin, 1986]

Bei der nativen Präparation ist daher darauf zu achten, daß der Rezeptor seine Fähigkeit an die DNA zu binden, nicht verliert. Dies muß bei der Puffer-Zusammensetzung beachtet werden. Bei nicht-nativen Aufarbeitungen für Western-Blots wird dem Aufarbeitungspuffer ein Molybdatsalz zugesetzt. Molybdat bindet an den Rezeptor und verhindert damit dessen Selbstverdau. Die Molybdat-Bindung an den Rezeptor verhindert das Abdissoziieren des Hsp-Komplexes und damit eine Bindung des Rezeptors an die DNA. Molybdat wird zum nativen Aufarbeitungspuffer nicht dazugegeben.

Die mit den zu untersuchenden Substanzen inkubierten Zellen werden lysiert und durch entsprechende Lösungs-, Präzipitations- und Zentrifugationsschritte der Rezeptor isoliert.

Durch schnelles Arbeiten bei niedrigen Temperaturen sollte ein Selbstverdau des Rezeptors weitgehend vermieden werden. [Robidoux et al, 1992; Cato, pers. Mitteilung]

Der Inkubationsansatz bestehend aus Rezeptor und endmarkiertem Oligonukleotid wird nach der Inkubation auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Der stabil assoziierte Protein-DNA-Komplex hat im Vergleich zur freien DNA eine geringere Mobilität, was in einer Bandenverschiebung deutlich wird. [Crothers, 1987; Novak und Paradiso, 1995; Ramanujam et al, 1990; Schneider et al, 1986]
Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese wird das Gel mittels Semidry-Blotting auf eine Nylon-Membran geblottet. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle sind damit für höhermolekulare Liganden, beispielsweise Antikörper zugänglich. Nachweis der DIG-markierten Oligonukleotide erfolgt mittels Chemilumineszenzreaktion. [Westermeier, 1993]

2.15 Zellinien

2.15.1 COS-7 Zellinie

Die CV-1 Zellinie, eine etablierte Affennierenzellinie, wurde mit einer SV 40 Mutante transfiziert. Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich drei Zellpopulationen: COS-1, 3 und 7. Alle drei COS-Zellinien exprimieren das SV40-T Antigen. COS-7 Zellen entsprechen im Hinblick auf den Sicherheitsstandard etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben. Im Gegensatz zu den beiden ersten Zellinien entstehen bei der COS-7 Zellinie keine neuen Populationen an SV 40 Viren, sondern nur das T-Antigen des Virus. Eine Transfektion dieser COS-7 Zellen mit Plasmiden, die einen SV 40 Promotor enthalten, führt zur Akkumulation der Plasmide (> 10^5 Kopien), sodaß es 70 – 90 Stunden nach der Transfektion zum Absterben der Zellen kommt, da eine derart hohe Plasmid-Kopienzahl nicht toleriert wird. COS-7-Zellen eignen sich daher besonders für transiente Transfektionen. [ZKBS, 1994]

2.15.2 MCF-7 Zellinie

Eine als MCF-7 bezeichnete humane Mammacarcinom-Zellinie wurde 1973 aus einem pleuralen Erguß einer Patientin mit metastasierendem Mammacarcinom gewonnen. [Soule, 1973]

Die MCF-7 ist eine gut differenzierte Zellinie und stellt ein etabliertes *in vitro* Testsystem dar. Sie ist die am Besten charakterisierte steroidhormonrezeptorpositive Mammacarcinom-Zellinie. Neben der *in vitro* Kultivierung wachsen MCF-7 Zellen auch als Xenograft-Modell auf immundefizienten Nacktmäusen. [Gotthardis und Jordan, 1988]
Der Steroidhormonrezeptorgehalt der MCF-7 schwankt je nach Aufarbeitungsmethode und Nachweisverfahren. Die stark schwankenden Rezeptorgehalte machen Positiv- und Negativkontrollen notwendig. [Jager, 1992] Des weiteren beeinflussen eine Reihe von endogenen biochemischen Faktoren den Steroidhormonrezeptorgehalt, beispielsweise Mutationen in der ligandbindenden Domäne, sonstige posttranskriptionale Modifikationen sowie die Anzahl der Passagen, denen die Zellen unterworfen waren.

2.15.3 MCF-7-Luciferase (MVLN-C15) Zellinie

Der im Luciferase-Assay eingesetzte Subklon der MCF-7 wurde mit dem Plasmid pVIT-tk-Luc stabil transfiziert. In dem Plasmid ist die 5'-flankierende Region des Vitellogenin A2-Promotors, welche das ERE enthält, gekoppelt an einen starken Enhancer, dem Thymidinkinasegen (tk) des Herpes Simplex Virus enthalten. Das Strukturgen der Luciferase wird durch diese regulatorische Sequenz kontrolliert. Die Luciferase selbst kann mit Hilfe einer Enzymreaktion detektiert werden.
Neben dem oben beschriebenen Plasmid wurde ein zusätzliches Plasmid pAG 60 in die Zellen cotransfiziert. Dieses enthält die bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase unter Kontrolle des tk-Promotors, was eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin ermöglicht. [Pons et al, 1990]

2.15.4 HaCaT-Zellinie

Bei der Zellinie HaCaT handelt es sich um Keratinozyten eines Erwachsenen, die spontan immortal geworden sind, aber dennoch vollständig ausdifferenzieren. Der Unterschied zu anderen immortalen Zellinien besteht darin, daß sie keine Ähnlichkeit mit Tumorgewebe aufweist. Die Transplantierung der HaCaT in immundefiziente Nacktmäuse führt zur Bildung epidermalen Gewebes, das wie normale Keratinozyten strukturiert und ausdifferenziert ist. [Boukamp et al, 1988]

2.15.5 CV-1-Zellinie

CV-1 oder CCL-70 Zellen sind Nierenzellen des männlichen afrikanischen Grünaffen *(Cercopethecus aethiopis)* mit fibroblastenähnlicher Morphologie. Die Zellinie eignet sich vor allem zur Transfektion mit Plasmiden auf der Grundlage von SV40 Vektoren sowie Plasmiden auf der Basis von Poliovirus-1 und Herpes Simplex Virus. [Hay, 1994]

2.15.6 CHO-K1 Zellinie

Die Zellinie CHO-K1 ist ein Subklon der Parentalzellinie CHO, die aus Ovarialzellen des chinesischen Hamsters gewonnen wurde. Diese gut charakterisierte Zellinie eignet sich besonders für die Transfektion mit Polybrene und exprimiert rekombinante Proteine in hoher Ausbeute. [Chaney et al, 1986]

2.15.1.7 HEK-29-Zellinie

Die Zellinie HEK-293 wurde aus menschlichen embryonalen Nierenzellen gewonnen, die mit Fragmenten des Adenovirus vom Typ 5 transfiziert wurden. Sie sind vor allem zur Transfektion mit Vektoren auf der Basis von Adenoviren geeignet. [Graham und Smiley, 1977]

3 PROBLEMSTELLUNG

Die Erkenntnis, daß nicht nur endogene Hormone und strukturverwandte Pharmaka, sondern auch Substanzen anthropogenen Ursprungs Einfluß auf das endokrine System nehmen können, erfordert effektive und sensitive Testsysteme zum Nachweis einer potentiellen hormonellen Aktivität. Die Tatsache, daß *in vivo* Modelle wie beispielsweise der uterotrophe Assay für ein weitgefächertes und schnelles Screening nur begrenzt einsetzbar sind, macht den Einsatz von funktionellen Testsystemen erforderlich. Diese können zum spezifischen Nachweis hormoneller/antihormoneller Effekte von Substanzen unterschiedlichster Strukturen aus Nahrungsmitteln und Umweltproben dienen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden verschiedene *in vitro* Testsysteme zum Nachweis einer estrogenen Aktivität eingesetzt. Neben einem bereits etablierten Proliferationsassay mit einer estrogenabhängig wachsenden humanen Mammacarcinomzellinie (E-Screen-Assay) [Mußler, 1999] sollten ergänzend dazu sowohl endogene als auch transgene Reporter bestimmt werden. Für den Vergleich zwischen E-Screen-Assay und Reportergenassay wurde ein etabliertes Reportergensystem mit stabil transfizierten humanen Mammacarcinomzellen herangezogen. Dieses Reportergensystem erlaubt im Gegensatz zum E-Screen-Assay einen schnelleren Probendurchsatz bei hoher Sensitivität und Spezifität.

Ein Hauptziel der vorliegenden Arbeit lag in der Etablierung und Validierung transgener Reportergensysteme. Als transgene Reporter wurden hierfür die Enzyme Luciferase und Alkalische Phosphatase verwendet. Dazu sollten entsprechende Reportergenplasmide konstruiert werden, wobei die Expression des Reportergens unter der Kontrolle des estrogenabhängigen Vitellogenin A2 Promotors stehen sollte. Schließlich wurden mittels Transfektion in geeignete Zellinien spezifische Reportergensysteme zur Prüfung potentieller endokriner Disruptoren aufgebaut.

Neben transgenen Systemen wurde ein Nachweisverfahren für einen endogenen Reporter etabliert und validiert. Als geeigneter Parameter wurde das pS2-Protein ausgewählt, das in der humanen Brustkrebszellinie MCF-7 estrogenabhängig exprimiert wird. Der Nachweis auf Proteinebene erfolgte mittels immunradiometrischem Assay, auf RNA-Ebene mittels RT-PCR.

Die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptors in Ratte [Kuiper et al, 1996], Mensch [Mosselman et al, 1996] und Maus [Tremblay et al, 1997] verdeutlicht, daß estrogenrezeptor-vermittelte Mechanismen weitaus komplexer und komplizierter sind, als bisher angenommen. Die unterschiedliche Gewebeverteilung der beiden Subtypen wird in Zusammenhang mit den selektiven Wirkungen der Estrogene auf verschiedene Zielgewebe gebracht. Des weiteren konnte insbesondere für einige Phytoestrogene, z.B. Genistein, Apigenin und Kaempferol eine höhere Bindungsaffinität an ERβ beobachtet werden. Da in der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7 beide Subtypen vorliegen, lag ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit in der Etablierung und Validierung eines Reportergensystems, in dem der entsprechende Estrogenrezeptor in geeigneten Zellinien separat exprimiert wurde. Damit besteht die Möglichkeit, potentielle endokrine Disruptoren am jeweiligen Rezeptorsubtyp getrennt zu untersuchen und mögliche Unterschiede bezüglich der Genaktivierung zu erkennen.

4 ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1 Aufbau von *in vitro* Testsystemen zur Untersuchung potentieller endokriner Disruptoren

Ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Etablierung und Validierung von *in vitro* Testsystemen, insbesondere Reportergensystemen, die zur Untersuchung potentieller endokriner Disruptoren herangezogen werden können. Die dafür notwendigen Reportergenplasmide sollten für diese Anwendung entsprechend konstruiert werden. In der folgenden Abbildung sind schematisch die wichtigsten Schritte, die zur Konstruktion eines Reportergensystems notwendig sind, dargestellt. Zu Beginn steht die Amplifikation des Reportergenplasmides und gegebenenfalls des Expressionsplasmides für den entsprechenden Rezeptor. Diese erfolgt durch Transformation in E.coli und Selektion der transformierten E.colis mit einem Antibiotikum, häufig Ampicillin. Nach Aufreinigung der Plasmide und Überprüfung durch Restriktionsverdau und Agarosegelanalyse werden die Vektoren mittels Maxipräparation in ausreichender aufgereinigter Menge gewonnen. Diese Präparation wird dann zur Transfektion in geeignete eukaryontische Zellen eingesetzt. Nach entsprechender Substanzinkubation wird das exprimierte Reportergen in einer spezifischen Nachweisreaktion detektiert. Bei einer transienten Transfektion geben die Zellen den Vektor nach ca. einer Woche wieder ins Medium ab, was eine erneute Transfektion erforderlich macht. Sind auf den eingeführten Vektoren entsprechende Antibiotikaresistenzen, z.B. für Geneticin, zur Selektion von Eukaryonten lokalisiert, besteht die Möglichkeit einen stabilen bzw. semistabilen Klon zu erhalten.

Die Amplifikation der Plasmide wurde im Rahmen dieser Arbeit mit den Bakterienstämmen E. coli DH5α und E. coli sure durchgeführt.

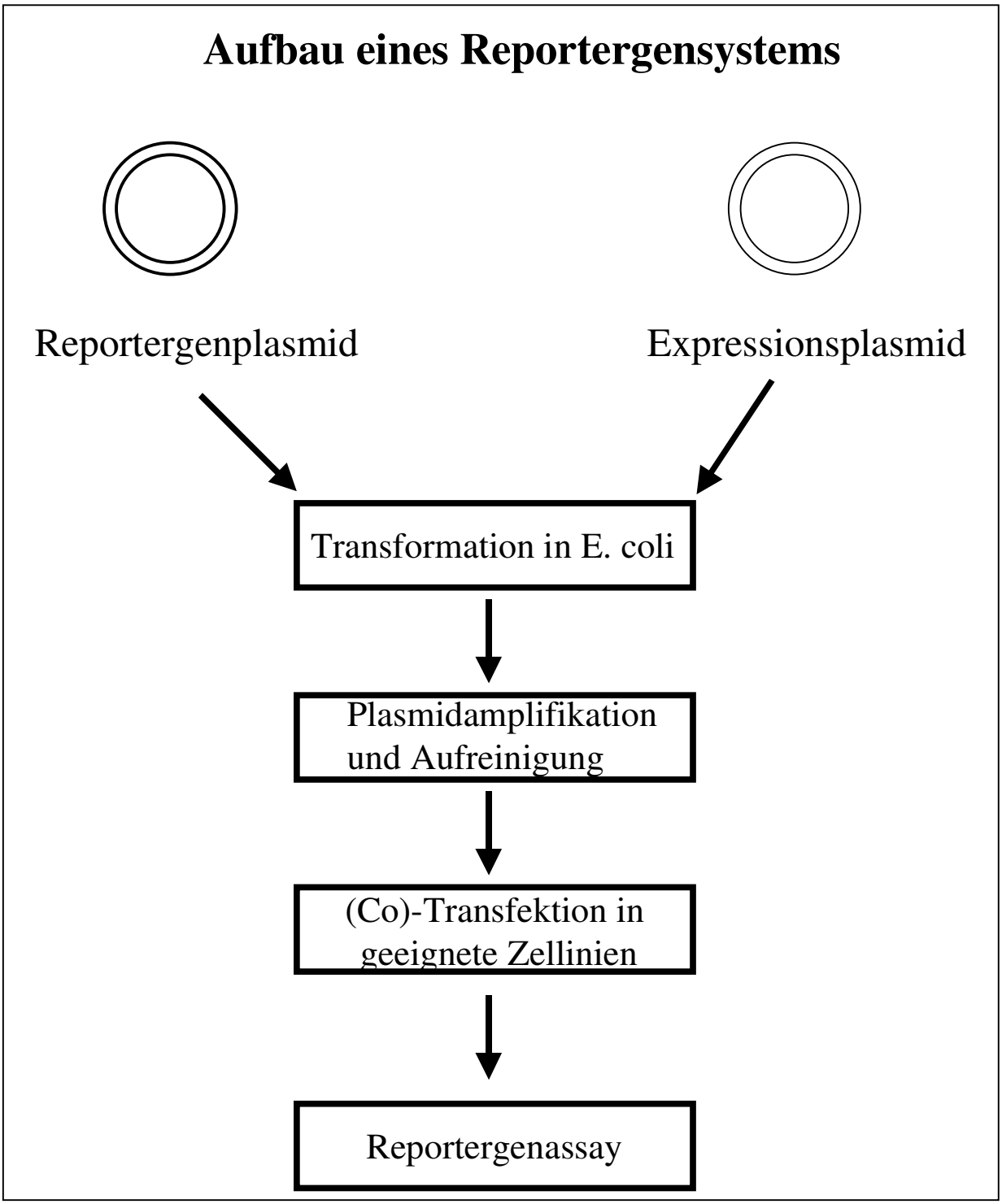


Abb. 27: Schematische Darstellung zum Aufbau eines Reportergensystems

4.2 SEAP-Reportergensystem

Zusätzlich zu dem bereits etablierten stabilen MCF-7-Luc-Reportergensystem sollte ein weiteres Reportergen eingesetzt werden, das unter anderem für die Cotransfektion mit den Estrogenrezeptorexpressionsplasmiden in unterschiedliche Zellinien angewendet werden sollte. Die Wahl fiel hier auf das Reportergen sekretierbare alkalische Phosphatase, zu den Vorteilen dieses Enzyms sei auf Kapitel 2.14.2.5.2 verwiesen.

Ziel war die Konstruktion eines Reportergenplasmides, in der die Expression der sekretierbaren alkalischen Phosphatase unter der Kontrolle des ERE-enthaltenden Vitellogenin A2 (VITA2) Promotors liegt. Dabei sollte der Wildtyp des VITA2-Promotors eingesetzt werden. (vgl. Kapitel 4.4)
Das Reportergenkonstrukt ermöglicht nach Transfektion in geeignete Zellinien die Untersuchung einer estrogenen Aktivität.

4.2.1 SEAP-Plasmid (pSEAP2)

Das Reportergenplasmid pSEAP2-Enhancer trägt die codierende Sequenz der sekretierbaren alkalischen Phosphatase, SEAP und ist zur Untersuchung von Promotorsequenzen geeignet. Der Promotor muß in die Multiple Cloning Site (MCS) upstream der SEAP-Sequenz eingebaut werden, die Expression der SEAP erfolgt somit unter der Kontrolle des Promotors. Der Vektor enthält den SV40 Promotor, der die Transkriptionseffizienz verschiedener Promotoren erhöhen soll. Direkt nach der SEAP-Sequenz ist das SV40 late Polyadenylierungssignal, poly A, lokalisiert, das die korrekte und effiziente Expression des SEAP-Transkriptes in eukaryontischen Zellen gewährleistet. Der Einbau eines synthetischen Transkriptionsblockers soll eine unspezifische Background-Transkription minimieren. Der Vektor enthält zusätzlich eine f1 origin-Stelle für die Synthese einzelsträngiger DNA sowie ein Ampicillinresistenzgen zur Amplifikation und Selektion in Prokaryonten. Die kompakte Plasmidgröße von 4,9 kb ist zur Transfektion in Eukaryonten gut geeignet. [Clontech, 1996]

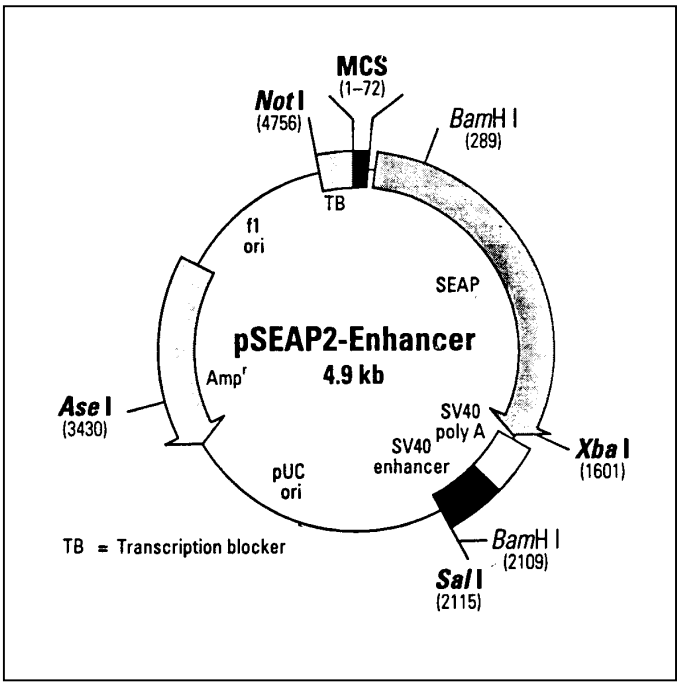


Abb. 28: Schematische Darstellung des pSEAP2-Enhancer Vektors [Clontech, 1996]

In Abbildung 29 ist eine Übersicht zur Konstruktion des Reportergenplasmides pSEAP2/VITA2 schematisch dargestellt. Als Ausgangsvektor diente das kommerziell erhältliche pSEAP2-Enhancer-Plasmid, das keinen Promotor enthält. In die MCS dieses Vektors sollte nun der Wildtyp-Promotor des Vitellogenin A2 Gens eingebaut werden. Die Expression des SEAP-Gens erfolgt dann ausschließlich unter der Kontrolle des VITA2-Promotors und kann zur Untersuchung einer estrogenen Aktivität eingesetzt werden. Der Promotor wurde aus dem Plasmid pSVO-CAT gewonnen. Nach Transformation und Amplifikation der Plasmide in E. coli sure wurde der pSEAP2 Vektor mit HindIII linearisiert, dephosphoryliert und mittels Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Der VITA2-Promotor wurde aus dem pSVO-CAT Plasmid durch HindIII-Verdau herausgeschnitten und nach Elution aus dem Agarosegel zur Ligation eingesetzt. Linearisierter Vektor und VITA2-Promotor wurden ligiert und der Ansatz direkt zur Transformation in E. coli eingesetzt. Die Überprüfung des Inserteinbaus erfolgte mittels Minipräparation mit anschließendem Restriktionsverdau und Agarosegelanalyse. Eine Funktionsprüfung erfolgte nach der Transfektion des Vektors in geeignete Zellen und anschließender Detektion des Reportergens nach entsprechender Substanzinkubation. (siehe Kapitel 4.2.7)

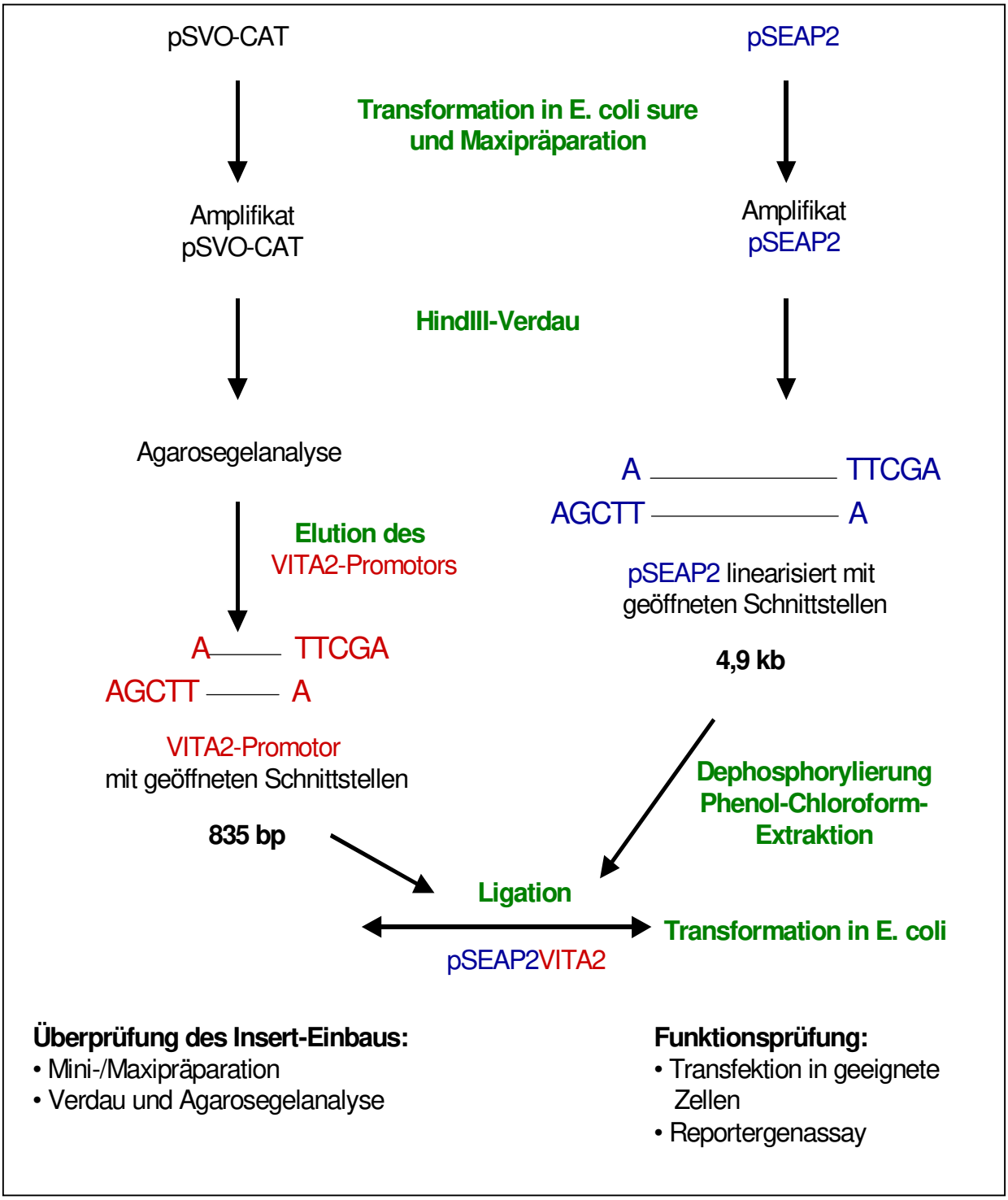


Abb. 29: Konstruktion des Reportergenplasmides pSEAP2/VITA2

4.2.2 Einzelschritte der Konstruktion

Die Plasmide pSEAP2 und pSVO-CAT wurden zur Amplifikation in E. coli sure transformiert und mittels Mini- bzw. Maxipräparation aufgereinigt. Die Überprüfung erfolgte durch Verdau mit dem Restriktionsenzym HindIII und Agarosegelanalyse. Der VITA2-Promotor wird durch HindIII aus dem pSVO-CAT Plasmid herausgeschnitten. Auf dem Agarosegel des Ansatzes sollten somit zwei Banden sichtbar sein, die des Promotors bei 835 bp sowie die Bande des Vektorbackbones bei ca. 4,5 kb. Abbildung 30 B zeigt, daß beide Fragmente im richtigen Größenbereich identifiziert werden konnten. Das pSEAP2 Plasmid muß für den Einbau die gleichen Schnittstellen aufweisen wie der Promotor und wurde deshalb ebenfalls mit HindIII linearisiert. Die HindIII-Schnittstelle befindet sich in der MCS von pSEAP2, was Voraussetzung für den Promotoreinbau ist. Da keine weiteren HindIII-Schnittstellen im Plasmid vorliegen wurde nur ein Fragment erwartet. Auf dem Agarosegel in Abbildung 30 A ist die entsprechende Bande des linearisierten Plasmids bei 4,9 kb zu sehen.

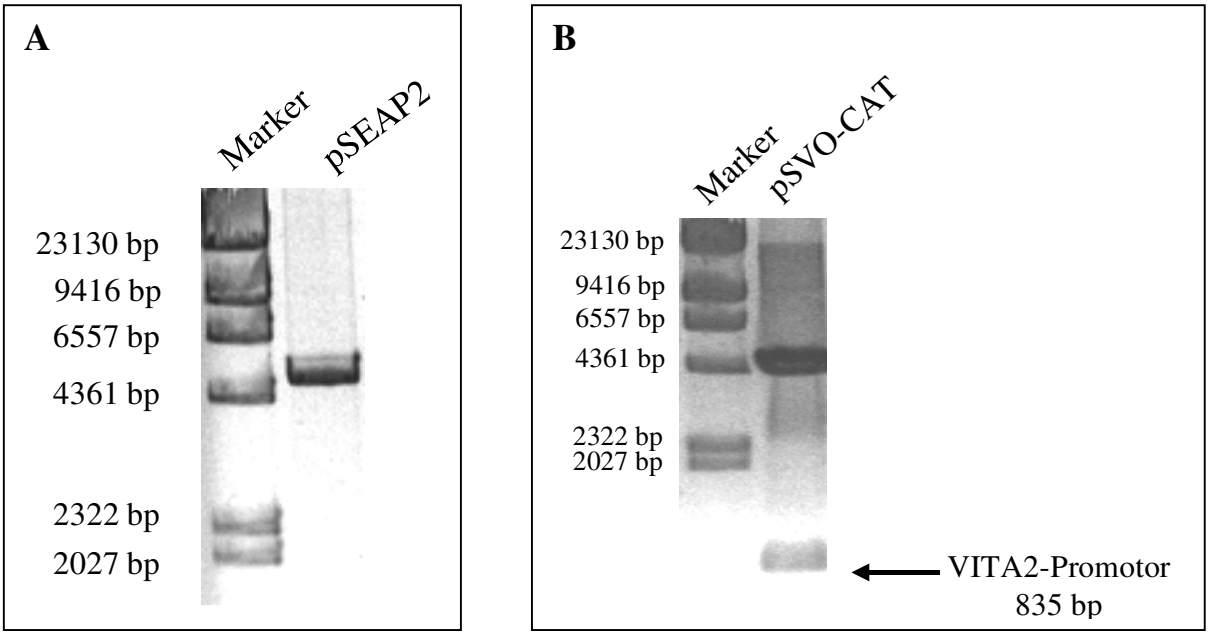


Abb. 30: HindIII-Verdau von pSEAP2 (A) und pSVO-CAT (B)

4.2.3 Gewinnen des VITA2-Promotors

Zur Klonierung des VITA2-Promotor in pSEAP2 mußte dieser nach dem HindIII-Verdau aus dem Agarosegel eluiert werden. Dazu wurde ein spezielles low-melting-Agarosegel angefertigt, auf das der entsprechende Ansatz aufgetragen wurde. Die Elution erfolgte mittels Elutionskit, dadurch wurde der Promotor gleichzeitig aufgereinigt. Bei der Elution aus einem Agarosegel ist ein DNA-Verlust unvermeidbar. Es zeigte sich, daß die erhaltene Promotor-Menge nach einer Minipräparation zur Elution nicht genügte. Daher wurde eine Maxipräparation des pSVO-CAT angefertigt, die damit erhaltene Menge des Promotors war für Elution und anschließende Ligation ausreichend. Die Kontrolle der Elution erfolgte ebenfalls mittels Agarosegelanalyse. Die Bande des VITA2-Promotors konnte an der erwarteten Stelle identifiziert werden. (vgl. Abb. 31)

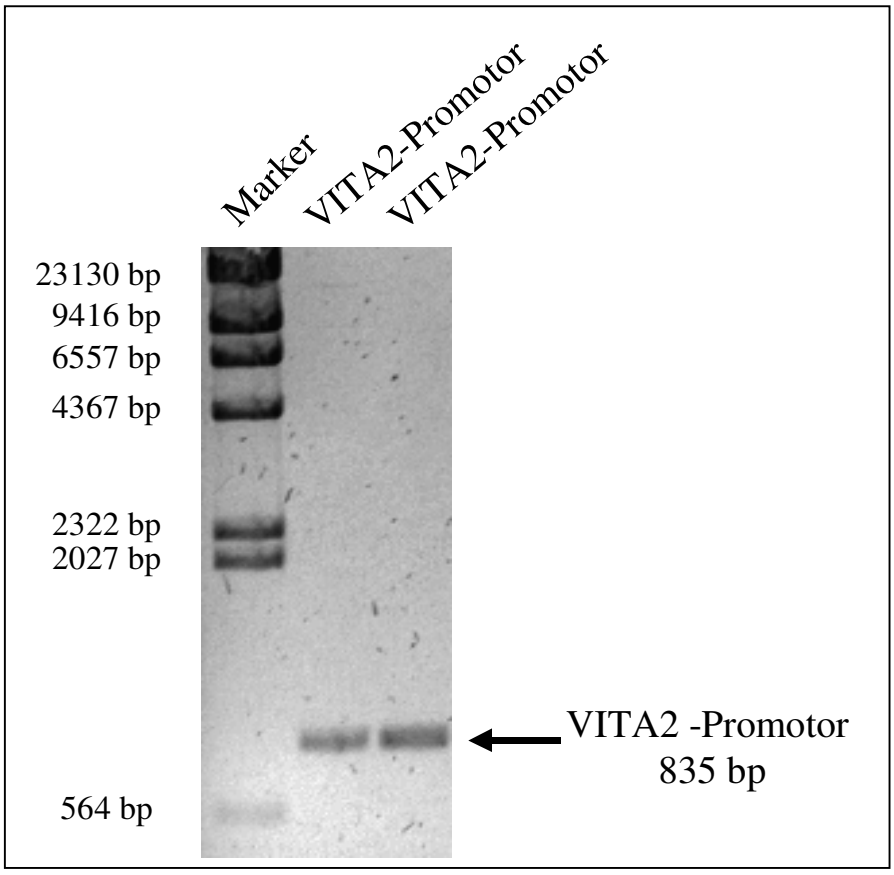


Abb. 31: Eluierter VITA2-Promotor nach HindIII-Verdau von pSVO-CAT

4.2.4 Vorbereitung des pSEAP2-Vektors

Der Vektor mußte für die Ligation mit dem Insert ebenfalls entsprechend vorbereitet werden. Da das linearisierte Plasmid an beiden Enden eine HindIII-Schnittstelle aufweist, sollte bei der intermolekularen Ligation die Rezirkularisierung des Vektors weitgehend verhindert werden. Die Ligation soll vor allem zwischen Promotor, der zwei Phosphatgruppen für die Ausbildung der Phosphodiesterbindung liefert und dephosphoryliertem Plasmid erfolgen. Dazu wurden die HindIII-Schnittstellen des linearisierten Plasmides dephosphoryliert, das Plasmid durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt und für die Ligation eingesetzt. Da bei diesem Verfahren eine bestimmte Plasmid-Menge verloren ging, musste auch hier eine Maxipräparation des pSEAP2 eingesetzt werden.

4.2.5 Ligation von VITA2 und pSEAP2

Der letzte Schritt bei der Konstruktion des rekombinierten DNA-Moleküls war die Verknüpfung des Vektors mit dem Insert. Die Ligation wurde mit dem Enzym T4-DNA-Ligase durchgeführt, das die dephosphorylierten Schnittstellen des pSEAP2-Plasmides mit den Schnittstellen des VITA2-Promotors verknüpft. Direkt nach der Ligation erfolgte die Transformation in E. coli, da das Ligationsprodukt in dem vorliegenden Puffersystem instabil ist.

4.2.6 Überprüfung des Promotoreinbaus

Nach Transformation und Amplifikation wurde zur Überpüfung des Promotoreinbaus eine Minipräparation des Plasmidkonstruktes angefertigt. Nach Verdau mit dem Restriktionsenzym HindIII wurde der Ansatz auf ein Agarosegel aufgetragen. Es wurden zwei Fragmente erwartet, der VITA2-Promotor bei 835 bp, der durch HindIII aus dem pSEAP2 herausgeschnitten wird, sowie das pSEAP2-Plasmid bei 4,9 kb. Zusätzlich wurden beide Ausgangsplasmide, pSVO-CAT und pSEAP2, mit HindIII linearisiert, um die Fragmente des konstruierten Vektors mit diesen zu vergleichen. In Abbildung 32 ist zu sehen, daß die Fragmente des pSEAP2-Plasmides im richtigen Größenbereich liegen. Die obere Bande bei 4,9 kb stimmmt mit dem pSEAP2-Fragment überein, die untere Bande bei 835 bp mit dem VITA2-Promotor-Fragment des pSVO-CAT. Der Einbau des Inserts in das Reportergenplasmid war somit erfolgreich. Als nächstes stand die Funktionsprüfung des

Konstruktes an. Dies sollte durch Transfektion des Vektors in eine geeignete Zellinie erfolgen.

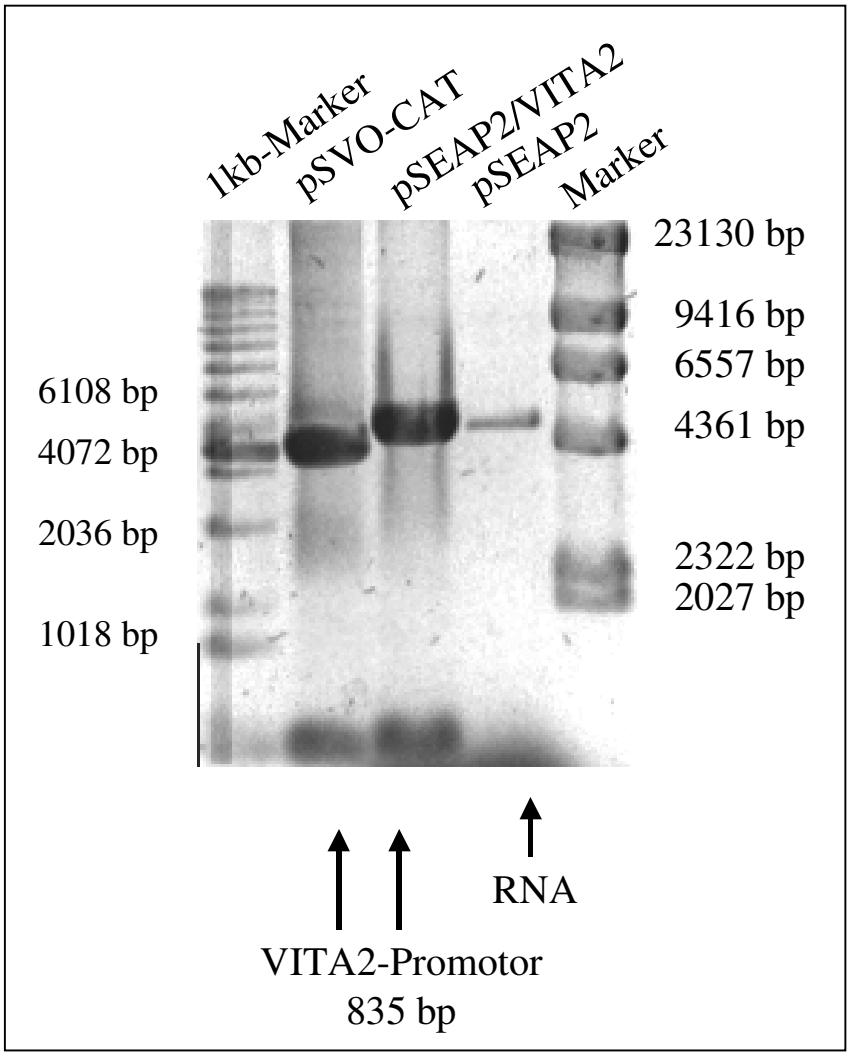


Abb. 32: Ligiertes pSEAP2/VITA2 im Vergleich mit pSVO-CAT und pSEAP2 nach HindIII-Verdau

4.2.7 Funktionsprüfung des pSEAP2/VITA2-Plasmides

Da sowohl Vektor als auch Insert an beiden Enden gleiche Restriktionsschnittstellen aufweisen, mußte der korrekte Einbau des Promotors durch Transfektion in Eukaryonten mit geeigneter Substanzinkubation und Detektion der alkalischen Phosphatase überprüft werden. Als geeignete Zellinie wurde die humane Mammacarcinomzellinie MCF-7 ausgewählt, die endogen beide Estrogenrezeptorsubtypen enthält. 24 Stunden nach Transfektion der Zellen wurden diese mit Estradiol, ICI 182 780 sowie der Kombination Estradiol und ICI 182 780

inkubiert. Maximale SEAP-Sekretion erfolgte 72 Stunden nach der Transfektion. Zur Untersuchung der SEAP-Expression wurde das Medium von den Zellen abgenommen und ein Aliquot davon im SEAP-Assay eingesetzt. Zur Testdurchführung sei auf Kapitel 6.4 hingewiesen. In Abbildung 33 ist zu sehen, daß die Inkubation der transfizierten Zellen mit 0,1 µM Estradiol den typischen Kurvenverlauf der alkalischen Phosphatase zeigte, der auch mit der mitgeführten AP-Kontrolle erhalten wurde (nicht dargestellt). Da die Aktivität der endogenen Phosphatasen durch Hitzebehandlung des Versuchsansatzes auf 65°C und Zugabe des AP-Inhibitors L-Homoarginin eliminiert wurde, ist die hier beobachtete AP-Aktivität auf die Estradiol-Inkubation und dadurch induzierte SEAP-Expression zurückzuführen. Die Kombination von Estradiol mit ICI 182 780 ergab erwartungsgemäß keine AP-Aktivität, d.h. die Estradiol-Aktivität wird durch ICI 182 780 antagonisiert. Ebenso zeigte die Inkubation mit ICI 182 780 alleine sowie die Inkubation ohne Testsubstanz als Kontrolle keine AP-Aktivität. Damit war bestätigt, daß der Einbau des VITA2 Promotors in die MCS des pSEAP2 in der richtigen Orientierung erfolgt war.

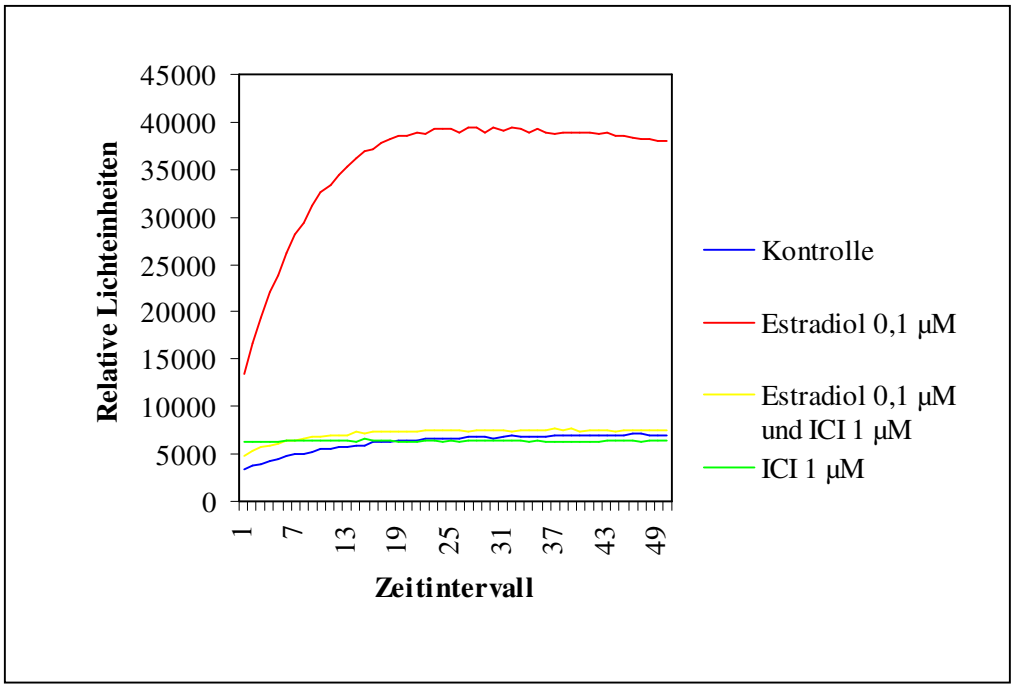


Abb. 33: Funktionsprüfung des pSEAP2/VITA2 nach transienter Transfektion in MCF-7 Zellen

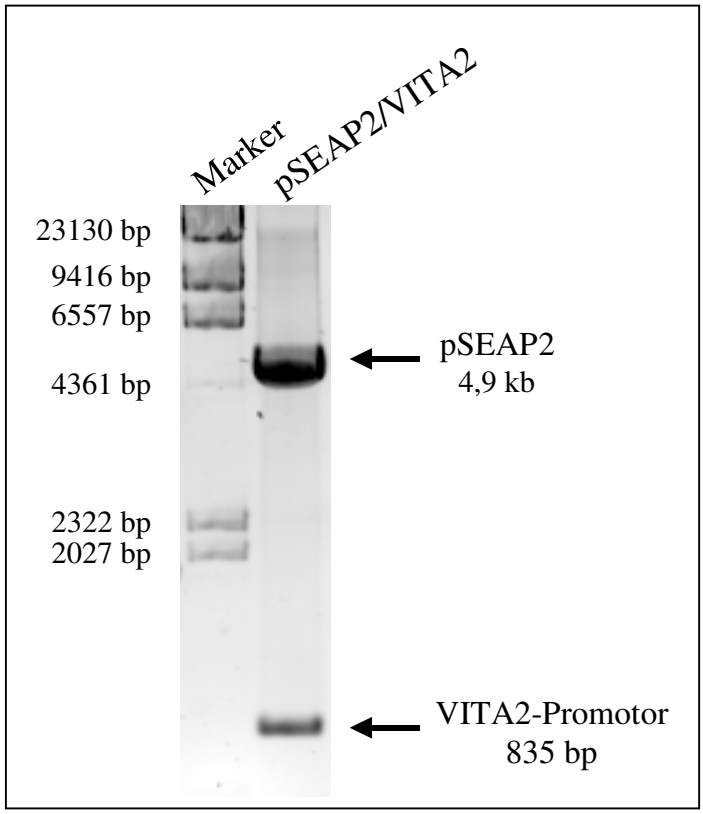


Abb. 34: HindIII-Verdau von pSEAP2/VITA2 (Maxipräparation)

4.3 pGL2-Reportergensystem

Als zweites Reportergenplasmid sollte ein Vektor mit Luciferase als Reportergen und dem VITA2-Promotor konstruiert werden. Dieses sollte ebenfalls für die Cotransfektionen mit den Estrogenrezeptorexpressionsplasmiden eingesetzt werden. Die Verwendung der Luciferase als Reportergen bietet eine bessere Vergleichbarkeit zwischen der stabil transfizierten Zellinie MCF-7-Luc und den transienten Systemen mit dem jeweiligen ER-Subtypen. Auch hier sollte der Wildtyp des VITA2-Promotors verwendet werden.

4.3.1 pGL2-Enhancer Vektor

Der pGL2-Vektor ist zur Analyse verschiedener Faktoren, die Einfluß auf die Regulation der Genexpression nehmen, geeignet. Als Faktoren kommen sogenannte cis-acting-Elemente, wie Promotoren oder Enhancer sowie trans-acting-Elemente, z.B. Transkriptionsfaktoren in Frage.

Der pGL2 Vektor enthält die codierende Sequenz der Luciferase aus der Feuerfliege *Photinus pyralis*, die die Transkriptionsaktivität in transfizierten eukaryontischen Zellen anzeigen kann. Downstream der Luciferasesequenz ist das Polyadenylierungssignal polyA lokalisiert, direkt danach der SV40 Enhancer, der die Transkriptionseffizienz einklonierter Promotoren in der MCS erhöht. Zusätzlich ist für die Amplifikation und Selektion des Plamides in Prokaryonten ein Ampicillinresistenzgen vorhanden. Die MCS upstream der Luciferase-Sequenz enthält Einzel-Schnittstellen zum Einbau von DNA-Fragmenten. Die Plasmidgröße von 5,5 kb ist für die Transfektion in Eukaryonten von Vorteil. [Promega, 1996]

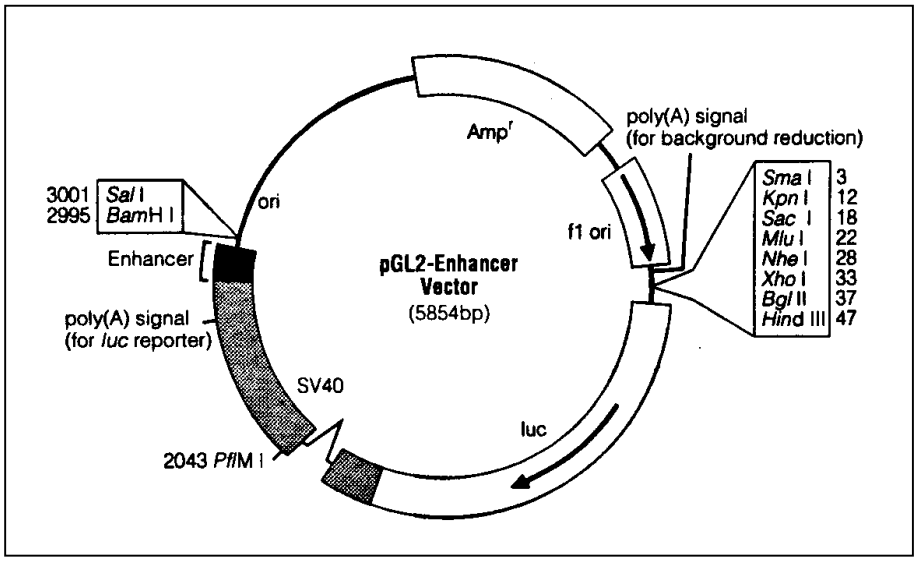


Abb. 35: Schematische Darstellung des pGL2-Enhancer Vektors [Promga, 1996]

In Abbildung 36 ist eine verkürzte Darstellung der wichtigsten Schritte zur Konstruktion des pGL2/VITA2-Vektors dargestellt. Als Ausgangvektor diente auch hier ein kommerziell verfügbares Plasmid, pGL2-Enhancer, das keinen Promotor enthält. In die MCS des pGL2 sollte der komplette ERE-enhaltende VITA2-Wildtyp-Promotor eingebaut werden. Die Expression der Luciferase erfolgt dann ausschließlich unter Kontrolle des Promotors. Dieser wurde aus dem Plasmid pSVO-CAT mittels PCR erhalten. Der Vektor wurde in E.coli amplifiziert und mittels Maxipräparation aufgereinigt. Eluierter Promotor und aufgereinigtes Plasmid wurden mit den entsprechenden Restriktionsenzymen verdaut und zur Ligation eingesetzt. Der Ligationsansatz wurde direkt in E.coli DH5α transformiert. Der Insert-Einbau wurde durch Minipräparation, anschließendem Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen sowie einer PCR mit spezifischen Primern für den VITA2-Promotor überprüft. Die Funktionskontrolle erfolgte durch Transfektion des Konstruktes in MCF-7-Zellen, geeigneter Substanzinkubation und Detektion des Reportergens mittels spezifischer Nachweisreaktion.

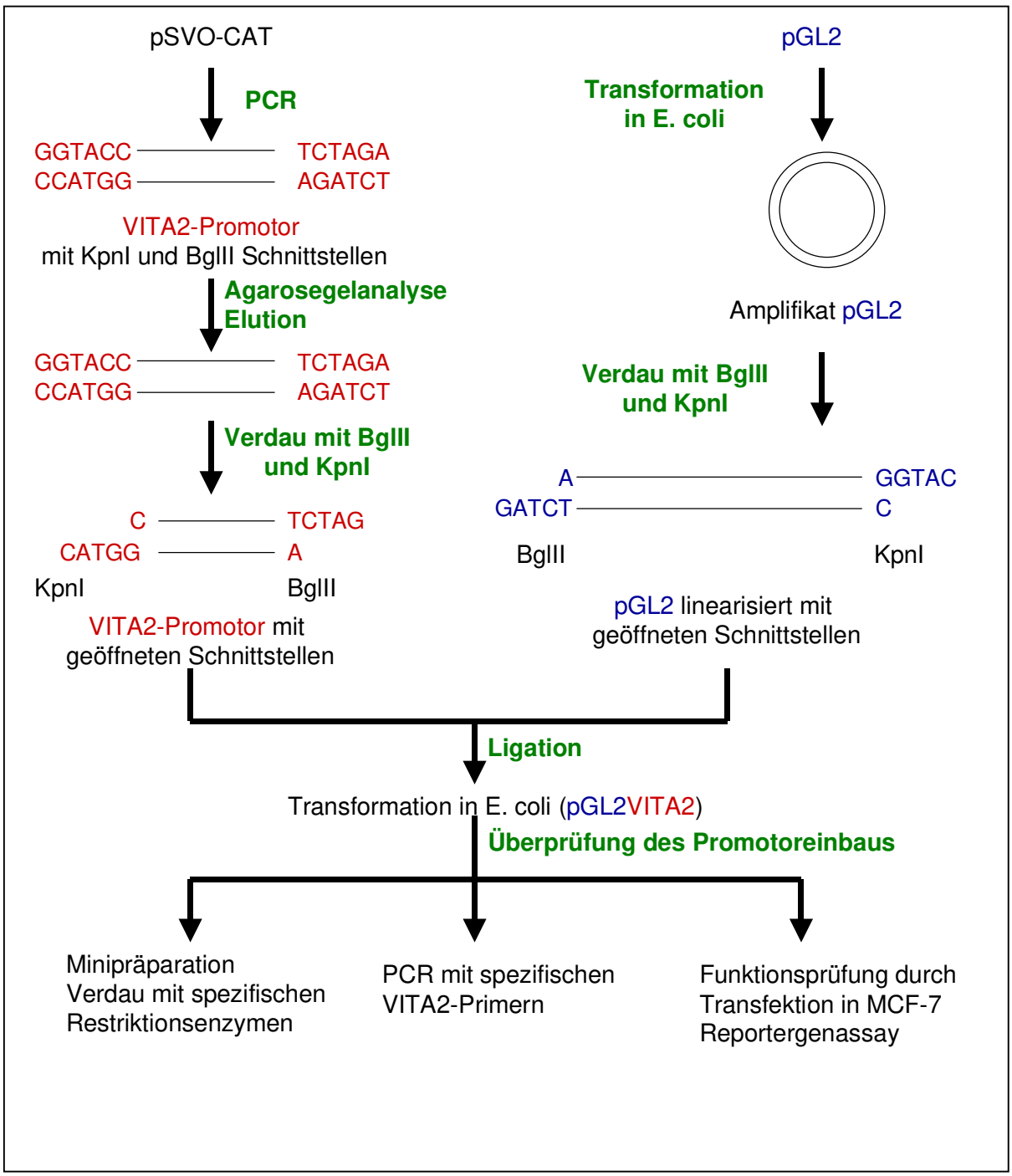


Abb. 36: Konstruktion des Reportergenplasmides pGL2/VITA2

4.3.2 Einzelschritte der Konstruktion

Die Plasmide pGL2 und pSVO-CAT wurden zur Amplifikation in E. coli DH5α transformiert und mittels Maxipräparation aufgereinigt. Die Überprüfung erfolgte durch Restriktionsverdau mit geeigneten Enzymen und Agarosegelanalyse. Der pGL2 Vektor wurde mit KpnI linearisiert, das Fragment konnte im richtigen Größenbereich bei 5,5 kb identifiziert werden (vgl. Abb. 37).

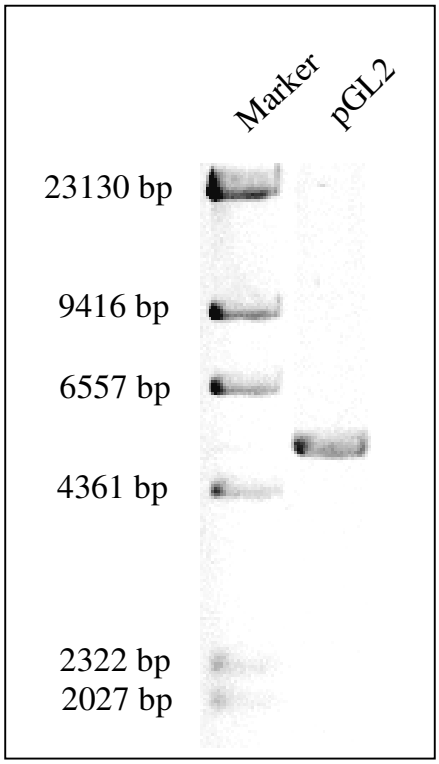


Abb. 37: KpnI-Verdau von pGL2

4.3.3 Gewinnen des VITA2-Wildtyp-Promotors

Zur Amplifikation des Promotors wurde hier ein anderer Weg als bei der pSEAP2/VITA2-Konstruktion gewählt. Um zwei unterschiedliche Schnittstellen für den Einbau zur Verfügung zu haben, wurden für die PCR-Reaktion des VITA2-Promotors geeignete Primer gewählt, die an den Enden zusätzliche Basen mit einer Schnittstelle für BglII bzw. KpnI aufwiesen. Eine wichtige Voraussetzung war das Anfügen der Schnittstellen an den richtigen Primer, um die VITA2-Sequenz in der korrekten 5`-3`Richtung in den Vektor einzuklonieren. Als Template für die PCR-Reaktion wurde das pSVO-CAT Plasmid eingesetzt. Die PCR-Amplifikation ergab das Fragment des VITA2-Promotors bei 859 bp, da hier noch die Schnittstellen der

Restriktionsstellen sowie weitere Basenpaare angehängt waren. Nach Elution des Promotors aus dem Agarosegel mittels Squeeze-and-Freeze-Technik wurde dieser mit KpnI und BglII verdaut, um die Schnittstellen für die Ligation mit dem Vektor zu öffnen. Der Ansatz wurde erneut auf ein Agarosegel aufgetragen und der VITA2-Promotor mit den nun geöffneten Schnittstellen daraus isoliert.

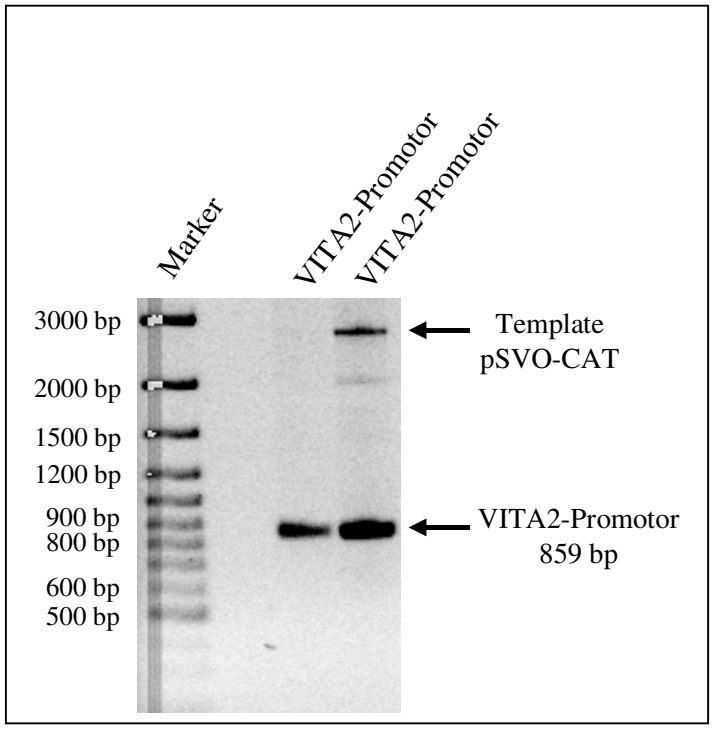


Abb. 38: Amplifikation von VITA2 aus pSVO-CAT mittels PCR (Primer mit BglII bzw. KpnI-Schnittstelle)

4.3.4 Vorbereiten des Vektors für die Ligation mit dem Promotor

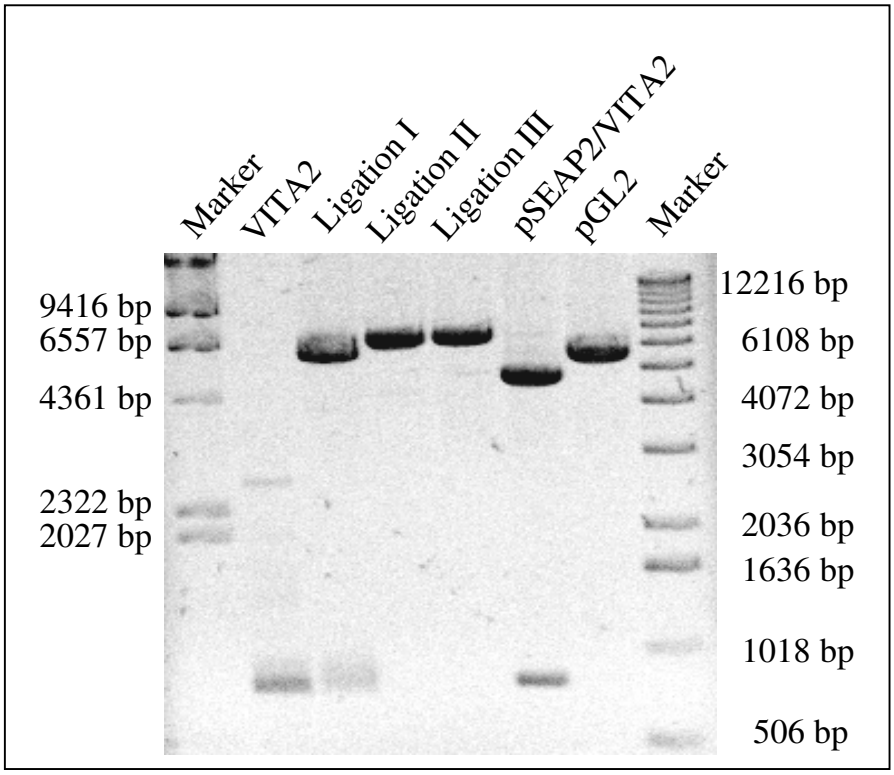
Der durch Transformation in E. coli amplifizierte und mittels Maxipräparation aufgereinigte pGL2-Vektor mußte für die Ligation mit dem Insert ebenfalls entsprechenden Arbeitsschritten unterzogen werden. Dazu wurde der Vektor mit den Restriktionsenzymen KpnI und BglII linearisiert. Durch diesen Verdau wurden 24 bp aus der MCS des Plasmids herausgeschnitten, die allerdings auf dem Agarosegel aufgrund der geringen Basengröße nicht detektiert werden können. An dieser Stelle sollte der Promotor eingebaut werden. Der linearisierte pGL2-Vektor wurde aus dem Agarosegel mittels Sqeeze-and-Freeze-Technik eluiert und zur Ligation mit dem VITA2-Promotor eingesetzt. Auf die Dephosphorylierung des Vektors wurde hier verzichtet, da dieser mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen linearisiert wurde, was eine Rezirkularisierung des Vektors minimiert.

4.3.5 Ligation von VITA2 und pGL2

Im letzten Schritt der Konstruktion erfolgte die Verknüpfung des Vektors mit dem Insert. Die Ligation wurde durch das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert. Der Ligationsansatz wurde aufgrund der geringen Haltbarkeit wieder direkt zur Transformation in E. coli DH5α eingesetzt.

4.3.6 Überprüfung des Promotoreinbaus

Der Einbau des VITA2-Promotors wurde mit zwei verschiedenen Methoden kontrolliert. Nach Transformation und Amplifikation des Konstruktes in E. coli wurde das Plasmid mittels Minipräparation aufgereinigt. Die Präparation wurde in unterschiedlichen Ansätzen mit entsprechenden Restriktionsenzymen linearisiert. Der erste Ansatz wurde mit BglII und KpnI geschnitten, hier waren zwei Banden zu erwarten, die des Promotors bei 841 bp und die des Vektorbackbones bei 5,5 kb. Ein zweiter Ansatz wurde nur mit KpnI, ein anderer nur mit HindIII verdaut, bei beiden Ansätzen wurde nur ein Fragment bei ca. 6,2 kb erwartet. Zusätzlich wurden das pSEAP2/VITA2 sowie das pGL2-Ausgangsplasmid linearisiert, um die jeweiligen Fragmentgrößen gegenüberzustellen. Des weiteren wurde auf das Agarosegel das PCR-Amplifikat von VITA2 aufgetragen, um die Promotorbanden zu vergleichen. In Abbildung 39 ist die Agarosegelanalyse der oben beschriebenen Ansätze dargestellt. Die Fragmente des Ansatzes 1 (Ligation I) liegen im richtigen Größenbereich, die untere Bande stimmt mit der Bande der VITA2-PCR-Amplifikation, die obere Bande mit dem pGL2-Ausgangsplasmid überein. Der Verdau des Ligationsproduktes mit nur einem Restriktionsenzym ergab erwartungsgemäß nur ein Fragment, das im Vergleich zu pGL2-Bande etwas höher liegt, aufgrund der zusätzlich 841 bp des Promotors.
Der Promotoreinbau wurde auch mittels PCR untersucht. Es wurden spezifische Primer für den VITA2-Promotor eingesetzt. Als Kontrolle diente das pSEAP2/VITA2-Plasmid. Bei beiden Ansätzen konnte nach anschließender Agarosegelelektrophorese die Bande des VITA2-Promotors im richtigen Größenbereich nachgewiesen werden. (vgl. Abb. 40)
Die Klonierung des VITA2-Wildtyp-Promotors in das pGL2-Reportergenplasmid war somit erfolgreich. Im nächsten Schritt stand die Funktionsprüfung durch Transfektion in geeignete Zellen an.



Ligation I: pGL2/VITA2 mit KpnI und BglII linearisiert
Ligation II: pGL2/VITA2 mit KpnI linearisiert
Ligation III: pGL2/VITA2 mit HindIII linearisiert

Abb. 39: Ligiertes pGL2/VITA2 im Vergleich mit pGL2 und pSEAP2/VITA2

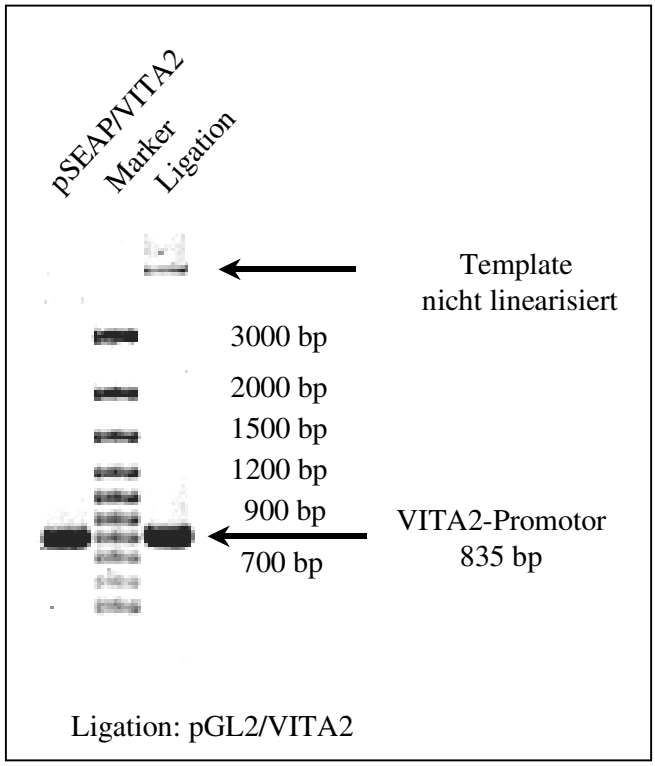


Abb. 40: PCR von VITA2 aus pGL2/VITA2

4.3.7 Funktionsprüfung des pGL2/VITA2-Plasmides

Zur Funktionsprüfung des Reportergenplasmidkonstruktes wurde dieses in die humane Mammacarcinomzellinie MCF-7 transfiziert. Eine Cotransfektion mit dem Estrogenrezeptorexpressionsplasmid war somit nicht notwendig. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die transfizierten Zellen mit Estradiol, ICI 182 780 sowie der Kombination Estradiol und ICI 182 780 inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubation wurden die Zellen lysiert und das Zelllysat im Luciferaseassay eingesetzt. Das Luciferase-Enzym wurde mittels spezifischer Chemilumineszenzreaktion detektiert (genaue Testdurchführung vgl. Kapitel 6.3). Abbildung 41 zeigt die Kurvenverläufe der jeweiligen Inkubationsansätze. Die Inkubation mit 0,1 µM Estradiol zeigt den typischen Kurvenverlauf der Luciferasereaktion mit hoher Aktivität im Vergleich zur Kontrolle. Bei der Kombination Estradiol und ICI 182 780 wurde die Aktivität von Estradiol erwartungsgemäß von ICI 182 780 inhibiert. Die Inkubation mit ICI 182 780 und ohne Testsubstanz als Kontrolle zeigten ebenfalls keine Aktivität. Die Versuche ergaben, daß der Promotor in der korrekten Orientierung in die MCS eingebaut wurde. Des weiteren konnte gezeigt werden, daß die Luciferase-Expression unter der Kontrolle des VITA2-Promotors steht.

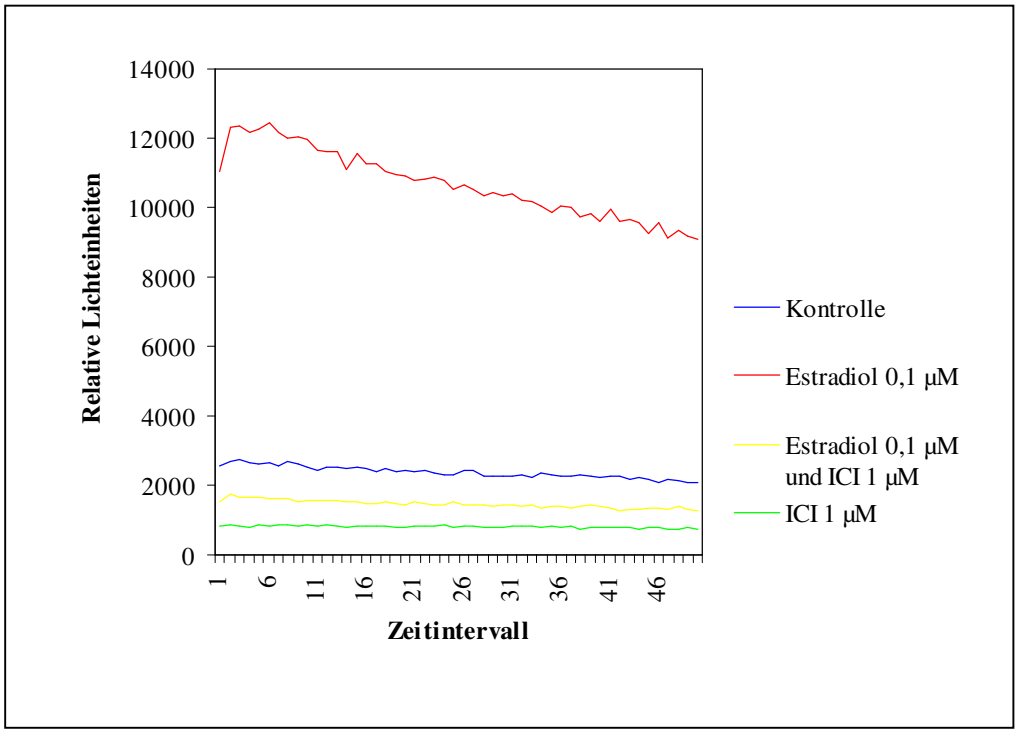


Abb. 41: Funktionsprüfung von pGL2/VITA2 nach Transfektion in MCF-7 Zellen

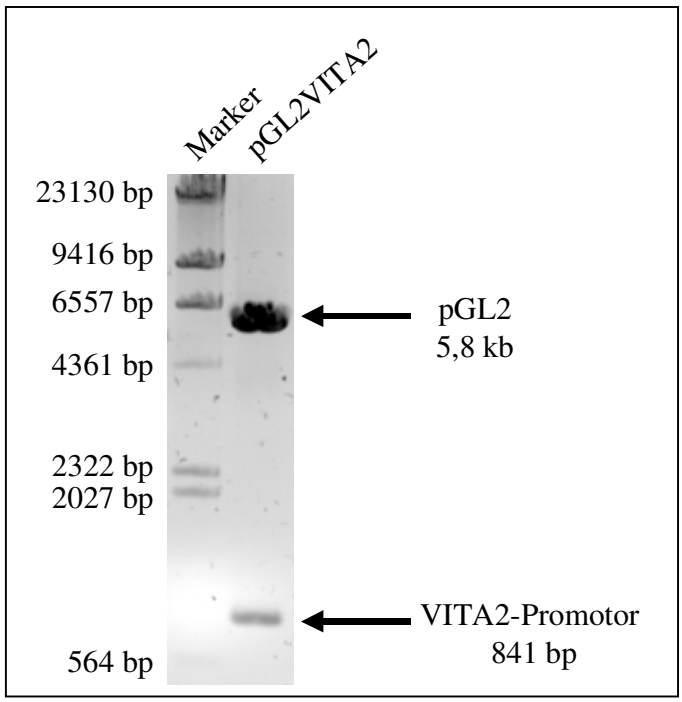


Abb. 42: BglII- und KpnI-Verdau von pGL2/VITA2 (Maxipräparation)

4.4 Diskussion des Promotors

In vielen Reportergenkonstrukten, die in der Literatur beschrieben sind, werden als DNA-Sequenzen zur Kontrolle der Reportergenexpression nicht die natürlich in Genen vorkommenden Wildtyp-Promotoren eingesetzt, sondern synthetische Oligonukleotide, die eine bzw. mehrere Kopien des Hormon Responsiven Elementes (ERE) enthalten. ERE-Sequenzen und TATA-Box werden zusammen mit dem Reportergen verknüpft und in unterschiedlichen Testansätzen eingesetzt, wie beispielsweise Transfektion eukaryontischer Zellen zur Untersuchung von Estrogenrezeptorliganden. Die Sequenz des ERE entspricht in den meisten Fällen der perfekten palindromischen Consensus-Sequenz des Vitellogenin A2 Gens, in Einzelfällen der imperfekten pS2-Sequenz. [Kuiper et al, 1998b; Barkhem et al, 1998; Tremblay et al, 1997; Meyer et al, 1994]

Am Beispiel des VITA2-Promotors soll im folgenden erläutert werden, weshalb der Einsatz des Wildtyp-Promotors für die im Rahmen dieser Arbeit bearbeitete Fragestellung als geeigneter anzusehen ist. In Kapitel 2.4 wurde bereits die Organisation der Promotorelemente beschrieben. Wichtige Punkte, die für den Einsatz des Wildtyppromotors von Bedeutung sind, sollen kurz erwähnt werden.

Estrogenabhängige Gene enthalten normalerweise eine oder mehrere Kopien eines EREs, einer perfekten oder imperfekten palindromischen Sequenz. Im Wildtyp des Vitellogenin A2 Promotors ist als ERE (entspricht dem cis-acting-Element) eine 13 bp lange perfekte palindromische Sequenz lokalisiert. [Nardulli et al, 1996; Murdoch et al, 1995] In einigen anderen estrogenabhängigen Genen sind oft imperfekte EREs zu finden, die weniger potente Aktivatoren der Transkription darstellen. Im Vitellogenin B1 Gen liegen zwei imperfekte EREs vor, die synergistisch wirken, im pS2-Gen ein imperfektes ERE. Beide EREs unterscheiden sich vom VITA2-ERE in einem Nukleotid. [Nardulli et al, 1996]
Tremblay et al konnten zeigen, daß die Bindung von ERα und ERβ sowohl an das ERE des VITA2-Gens als auch an das ERE des pS2-Gens erfolgt. Die Effizienz der Bindung an das ERE-pS2 ist allerdings geringer. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung wäre das Vorliegen der imperfekten palindromischen Sequenz des ERE-pS2. Diese Beobachtung zeigt, daß bereits die Wahl des eingesetzten Promotors Einfluß auf die Transkription nehmen kann. [Tremblay et al, 1997]

Die Kernpromotorregion eines eukaryontischen Gens zeigt selbst nur eine sehr schwache Transkriptionsaktivität. Diese wird im allgemeinen durch DNA-Regionen reguliert, die in einiger Entfernung von der Kernpromotorregion lokalisiert sind. Diese spezifischen Sequenzen, als sogenannte cis-acting Elemente bezeichnet, enthalten Bindungsstellen für regulierende Transkriptionsfaktoren. Die upstream-Promotor-Region, die meistens aus 200-300 bp besteht, enthält häufig mehrere dieser cis-acting-Elemente, von denen einige gewebespezifische Effekte auf die Transkription ausüben. Enhancer-Elemente sind ebenfalls regulatorische Promotorregionen, die die Transkriptionsaktivität über längere Distanzen regulieren können. Innerhalb der Enhancer-Region sind mehrere Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren lokalisiert. In unterschiedlichen Untersuchungen hat sich gezeigt, daß nicht die Bindung eines einzelnen Transkriptionsfaktors die Gen-Transkription auslöst, sondern das Zusammenwirken von mehreren gleichzeitig gebundenen Transkriptionsfaktoren, weshalb das Vorliegen aller Bindungsstellen für eine Transkription von Bedeutung ist. [Grandien et al, 1997]
Im Wildtyp-Promotor sind die oben beschriebenen für die Transkription wichtigen Elemente enthalten. Diese können zumindest teilweise in den synthetischen Sequenzen vorliegen, dabei fehlt jedoch der natürlich vorkommende Kontext der Promotoren, was zu einer veränderten Transkriptionseffizienz führen könnte.

Des weiteren konnte in Untersuchungen gezeigt werden, daß zur Transkriptionsaktivierung estrogenabhängiger Gene „Minimal-Promotoren“, bestehend aus einer einzelnen ERE-Sequenz und einer TATA-Box ausreichen. Eine maximale Transkriptionsaktivierung wird jedoch nur durch natürlich vorkommende estrogenresponsive Gene, die die DNA-flankierenden Sequenzen und spezifischen Bindungsstellen für andere Proteine enthalten, erreicht. Weiter konnte festgestellt werden, daß die hohe Affinität des Estradiol-ER-Komplexes zum ERE von den flankierenden AT-Sequenzen und zusätzlich von gebundenen Proteinen abhängt. Diese stabilisieren die Ligandbindung in der HBD des Estrogenrezeptors (ER). Vermutlich bindet der ER über das entsprechende ERE schwach an die akzessorischen Proteine. Bei ER-gebundenem Agonist hat dies eine erhöhte ER-DNA-Bindungsaffinität zur Folge. [Anolik et al, 1996]
Zusätzlich konnte in Transfektionsversuchen nachgewiesen werden, daß Reportergenplasmide mit drei bzw. vier Tandem-Kopien aneinanderhängender EREs eine synergistische Wirkung in Bezug auf die Estradiol-abhängige Reportergenaktivierung aufweisen. Bei ein oder zwei Tandem-Kopien konnte dies nicht beobachtet werden. Die höchste Aktivität konnte mit vier aneinanderhängenden EREs verzeichnet werden. [Klinge, 1999]

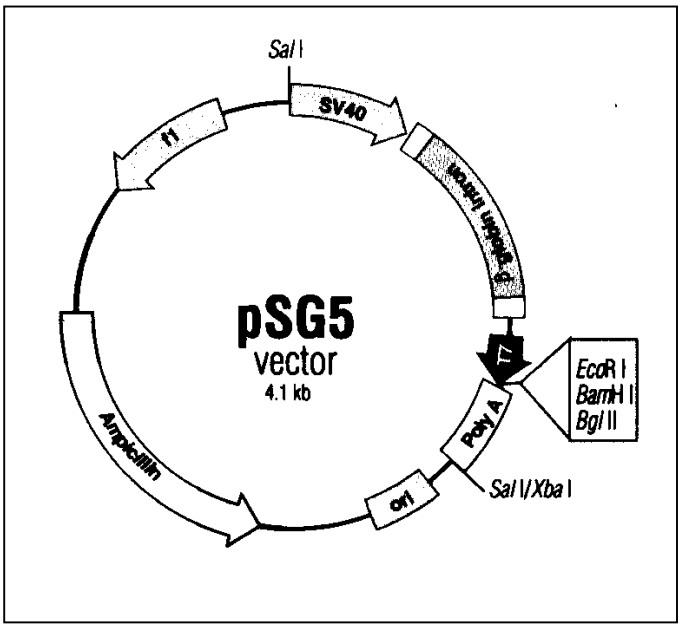
Die genannten Punkte zeigen, wie wichtig die Wahl des Promotors für die Konstruktion eines Reportergenplasmides ist. Um möglichst nahe am natürlichen System zu bleiben, ist der Einsatz des Wildtyp-Promotors Voraussetzung, denn nur so ist sichergestellt, daß alle für die Transkription notwendigen regulatorischen Promotor-Elemente vorliegen. Eine Beeinflussung der Transkriptionseffizienz, wie sie bei der Verwendung von hintereinanderhängenden ERE-Kopien beobachtet wurde, kann dann ebenfalls ausgeschlossen werden.

4.5 Etablierung und Validierung eines Estrogenrezeptor α bzw. β- Reportergensystems

4.5.1 Expressionsplasmide der humanen Estrogenrezeptorsubtypen α und β

Die codierende Sequenz der beiden Estrogenrezeptorsubtypen ist in die MCS des Expressionsvektors pSG5 einkloniert, ca. 1,8 kb des ERα in die EcoRI-Schnittstelle und ca. 1,4 kb des ERβ in die BamHI-Schnittstelle. Die MCS befindet sich downstream des Simian Virus 40 (SV 40) Promotors, somit wird der entsprechende Rezeptor nach Transfektion in Eukaryonten konstitutiv exprimiert. Das Polyadenylierungssignal poly A erhöht die Proteinexpression. Zusätzlich befindet sich zur Amplifikation in Prokaryonten das

Ampicillinresistenzgen auf dem Plasmid, das die Selektion nach der Transformation ermöglicht. [Stratagene, 1998]



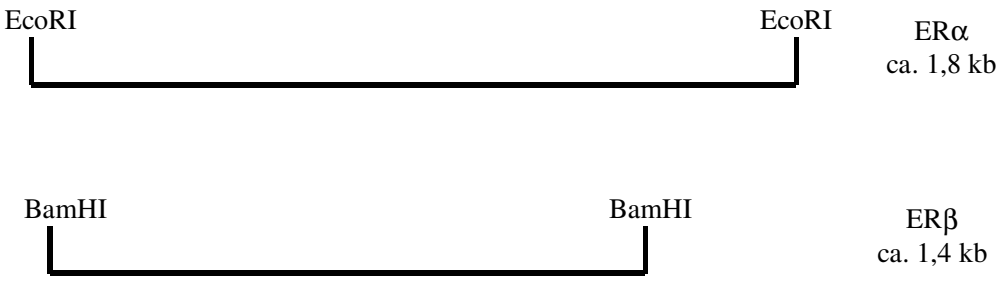


Abb. 43: Expressionsvektor pSG5 [Stratagene, 1998]

4.5.2 Plasmid pCMV5-hERbeta

In einem zweiten Expressionsplasmid des humanen ERβ erfolgt die konstitutive Expression des Estrogenrezeptors unter der Kontrolle des Promotors des humanen Cytomegalovirus (CMV). In Abbildung 44 ist der Vorgängervektor des pCMV5-Plasmides, pCMV4 dargestellt. Das Plasmid enthält zur Amplifikation und Selektion in Prokaryonten ebenfalls das Ampicillinresistenzgen. Die Gesamtplasmidgröße liegt bei ca. 6,2 kb, die Insertgröße der hERβ-Sequenz bei 1,46 kb.

Im folgenden werden für die Expressionsvektoren die Bezeichnungen ERα für pSG5-hERα, ERβS für pSG5-hERβ und ERβ für pCMV5-hERbeta verwendet.

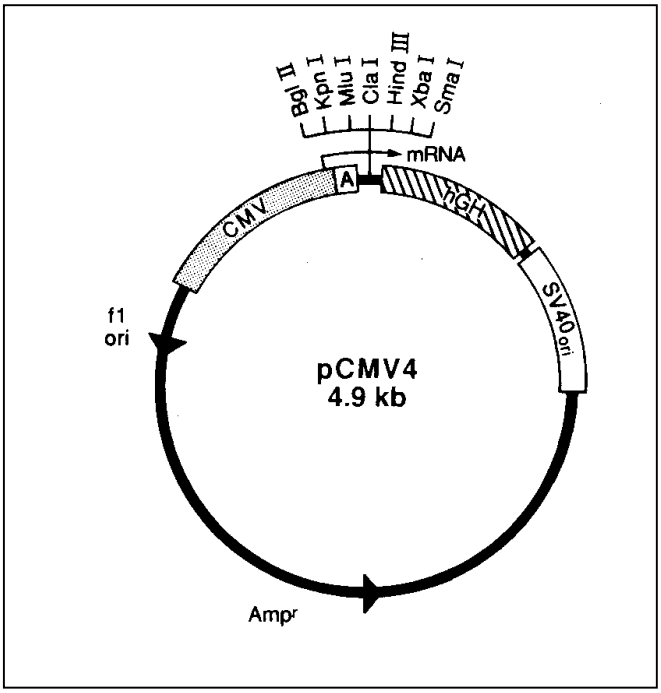


Abb. 44: pCMV4-Expressionsvektor [Andersson et al, 1989]

4.5.3 Vorbereitung der Vektoren

Da für eine Transfektion in Eukaryonten, insbesondere mittels Elektroporation, große Plasmidmengen benötigt werden, mußten die Estrogenrezeptorexpressionsplasmide entsprechend amplifiziert und aufgereinigt werden. Hierfür wurden die Plasmide in E. coli DH5α transformiert und nach Selektion die Plasmide mittels Restriktionsverdau und Agarosegelanalyse kontrolliert. Zur Herstellung größerer Plasmidmengen ist eine Maxipräparation notwendig, bei der die Vektoren für die nachfolgende Transfektion bereits entsprechend aufgereinigt werden. In Abbildung 45 ist die Agarosegelanalyse der Estrogenrezeptorexpressionsplasmide nach Verdau mit spezifischen Restriktionsenzymen dargestellt. Die erhaltenen Fragmente der einzelnen Ansätze konnten im erwarteten Größenbereich identifiziert werden.

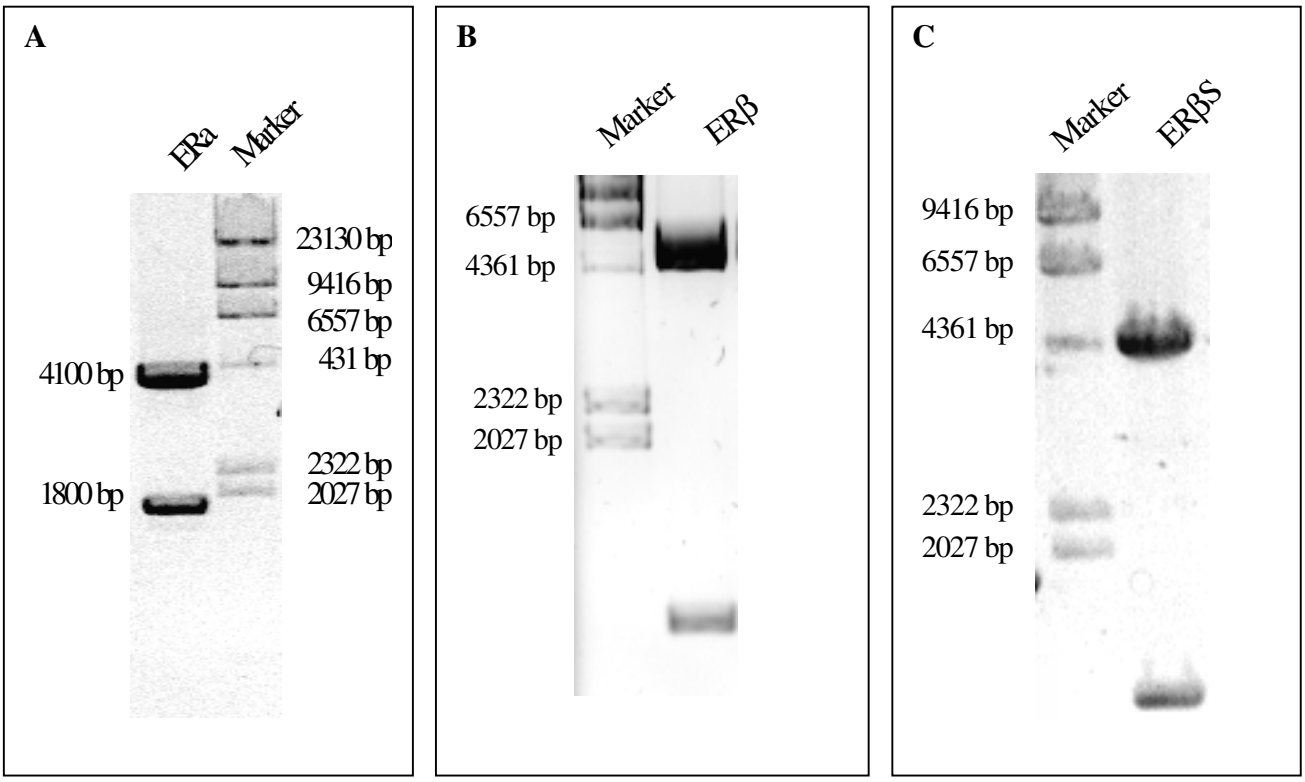


Abb. 45: EcoRI-Verdau von ERα (A), ERβ (B) und ERβS (C)

4.6 Transiente Cotransfektion der Reportergenplasmide und Estrogenrezeptor-expressionsplasmide in verschiedene Zellinien

Die transiente Cotransfektion der Estrogenrezeptorexpressionplasmide und der Reportergen-plasmide erfolgte in unterschiedliche Zellinien. In Abbildung 46 ist schematisch das transiente Reportergensystem dargestellt.

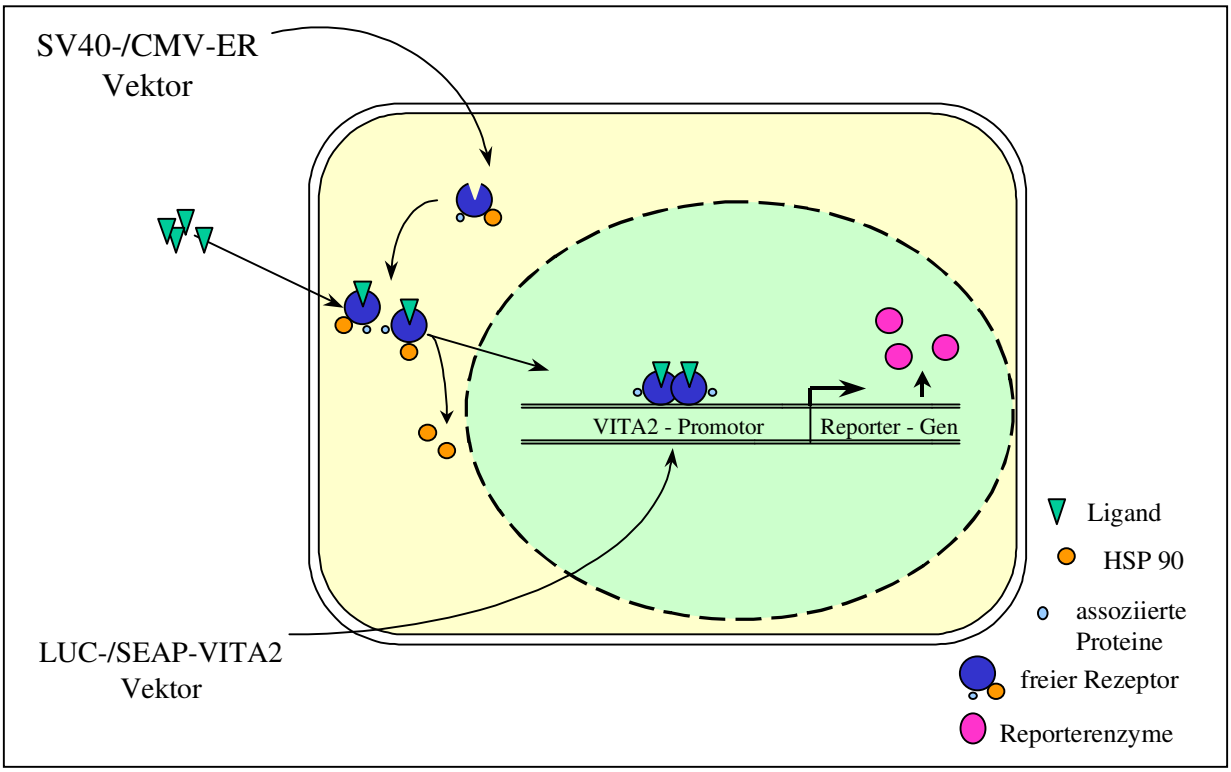


Abb. 46: Schematische Darstellung des transienten Reportergensystems mit Expressionvektoren für ERα bzw. ERβ

4.6.1 Transiente Transfektion von COS-7 und CV-1 Zellen

In ersten Versuchen wurden für die Transfektion die Zellinien COS-7 und CV-1 ausgewählt. Beide exprimieren endogen keinen Estrogenrezeptor. Durch Transfektion der CV-1-Zellinie mit Mutanten des SV 40 Virus, deren Replikationsursprung Deletionen aufweist, entstanden drei Zellinien, COS-1, COS-3 und COS-7. Bei der Zellinie COS-7 entstehen keine neue Populationen an SV 40 Viren. Werden diese Zellen mit Plasmiden transfiziert, die einen SV40 Promotor enthalten, so werden diese in sehr hoher Kopienzahl gebildet, was eine hohe Expression des entsprechenden Proteins zur Folge hat. Die erhöhte Akkumulation der Plasmide führt allerdings dazu, daß die Zellen 70 bis 90 Stunden nach der Transfektion absterben, da sie die große Menge extrachromosomaler DNA nicht tolerieren. Die COS-7 Zellinie ist daher besonders für transiente Transfektionen mit SV-40 Promotor abgeleiteten Plasmiden geeignet.

Die Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem Reportergenplasmid pSEAP2/VITA2 und dem entsprechenden Expressionsvektor transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden

die Zellen mit geeigneten Testsubstanzen inkubiert, und zwar 1 µM Estradiol, 0,1 µM ICI 182 780, der Kombination 1 µM Estradiol und 0,1 µM ICI182 780 sowie ohne Testsubstanz als Kontrolle. Nach weiteren 48 Stunden wurde das Medium entnommen und ein Aliquot im SEAP-Assay eingesetzt. Die Detektion der AP erfolgt mittels spezifischer Chemilumineszenzreaktion im Luminometer.

In Abbildung 47 und 48 sind Ergebnisse der transient transfizierten COS-7 Zellinie dargestellt. Die höchste AP-Aktivität konnte bei ERα und ERβ jeweils nach Inkubation mit Estradiol 0,1 µM nachgewiesen werden. Die Estradiol-Aktivität wurde auch hier erwartungsgemäß durch die Kombination mit ICI 182 780 1 µM antagonisiert. Keine Aktivität konnte dagegen in beiden Fällen nach Inkubation mit ICI 182 780 1 µM bzw. bei der Kontrolle detektiert werden.
Verschiedene Transfektionsversuche der CV-1 Zellen ergaben nach entsprechender Substanzinkubation keine detektierbare AP-Aktivität (nicht dargestellt).
Die Expression der ER-Rezeptoren wurde zusätzlich durch RT-PCR mit spezifischen Primern überprüft (vgl. Abb. 49). Dazu wurde die Gesamt-RNA aus den transfizierten Zellen isoliert und nach RT-PCR-Reaktion die DNA mittels Agarosegelanalyse detektiert. Bei der Zellinie COS-7 konnten die Fragmente beider Estrogenrezeptoren identifiziert werden. Im Gegensatz dazu ist in den transfizierten CV-1 Zellen keine Estrogenrezeptorexpression zu beobachten, was die Ergebnisse des SEAP-Assays bestätigt. Ein Grund für die ausgebliebene Expression der Estrogenrezeptoren in den CV-1 Zellen ist vermutlich deren geringe Überlebensrate nach der Transfektion. In den COS-7 Zellen liegen die Expressionsplasmide aus oben genannten Gründen in höherer Kopienzahl vor. Es findet damit eine stärkere Rezeptorexpression und damit effizientere Reportergenantwort statt. In den CV-1 Zellen wird weniger AP gebildet, das Chemilumineszenzsignal nach Estradiol-Inkubation ist deshalb möglicherweise nicht von der Kontrolle zu unterscheiden.
Die COS-7 Zellinie ist prinzipiell für transiente Transfektionsversuche einsetzbar, die AP-Aktivität war jedoch insgesamt relativ niedrig und es wurde nach weiteren geeigneten Zellinien gesucht.

Kuiper et al verwendeten für Transfektionsversuche mit den Estrogenrezeptor-expressionsplamiden die humane embryonale Nierenzellinie HEK 293, die mittels verschiedener chemischer Methoden transfiziert wurde. [Kuiper et al, 1998b] Da der Expressionsvektor des ERβ von dieser Gruppe zur Verfügung gestellt wurde, wurde in

weiteren Versuchen die HEK 293 Zellinie eingesetzt, was prinzipiell eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse mit den Literaturdaten bietet. Zusätzlich wurde die CHO-Zellinie in ersten Transfektionsuntersuchungen verwendet. Beide Zellinien enthalten endogen keine Estrogenrezeptoren.

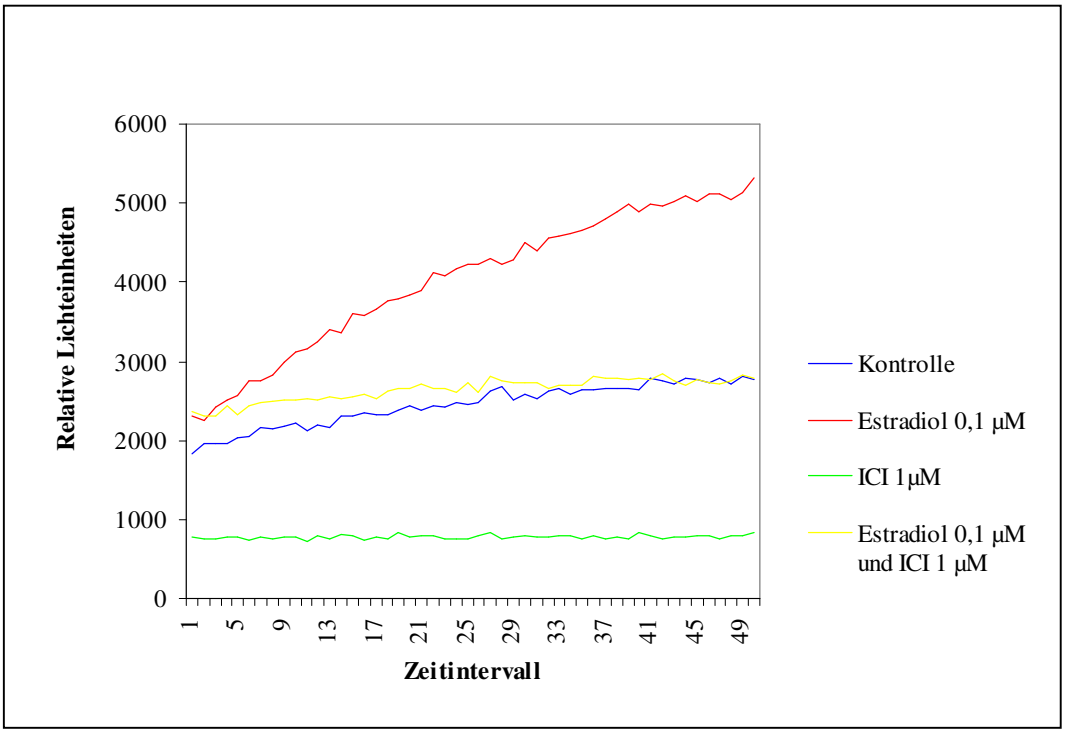


Abb. 47: Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit ERβ und pSEAP2/VITA2

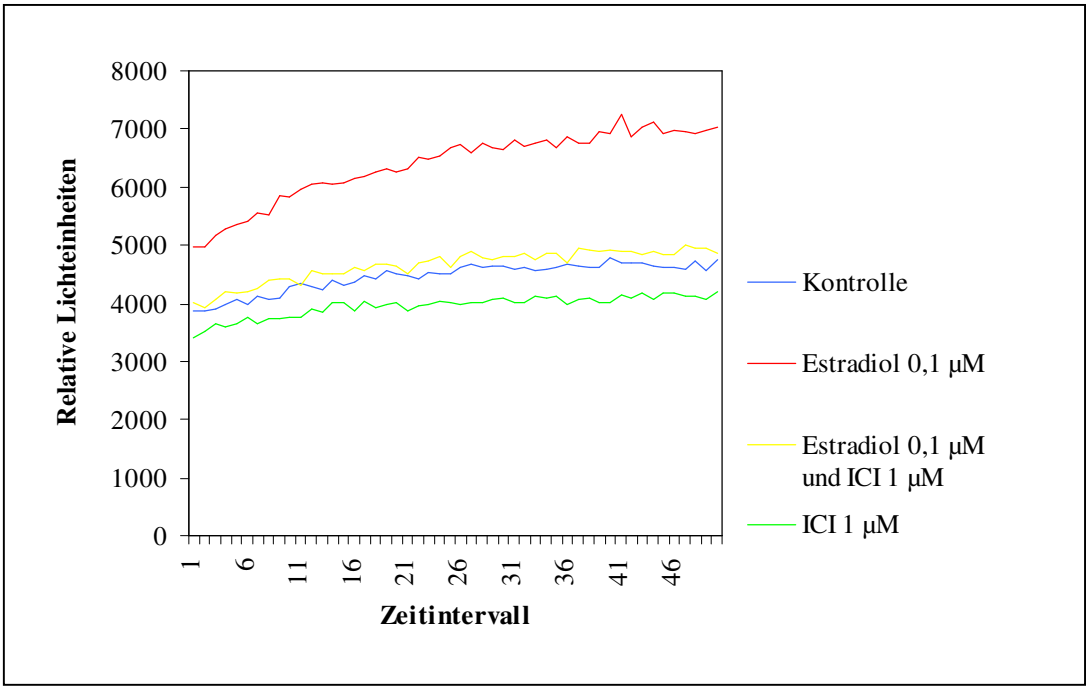


Abb. 48: Transiente Transfektion von COS-7 Zellen mit ERα und pSEAP2/VITA2

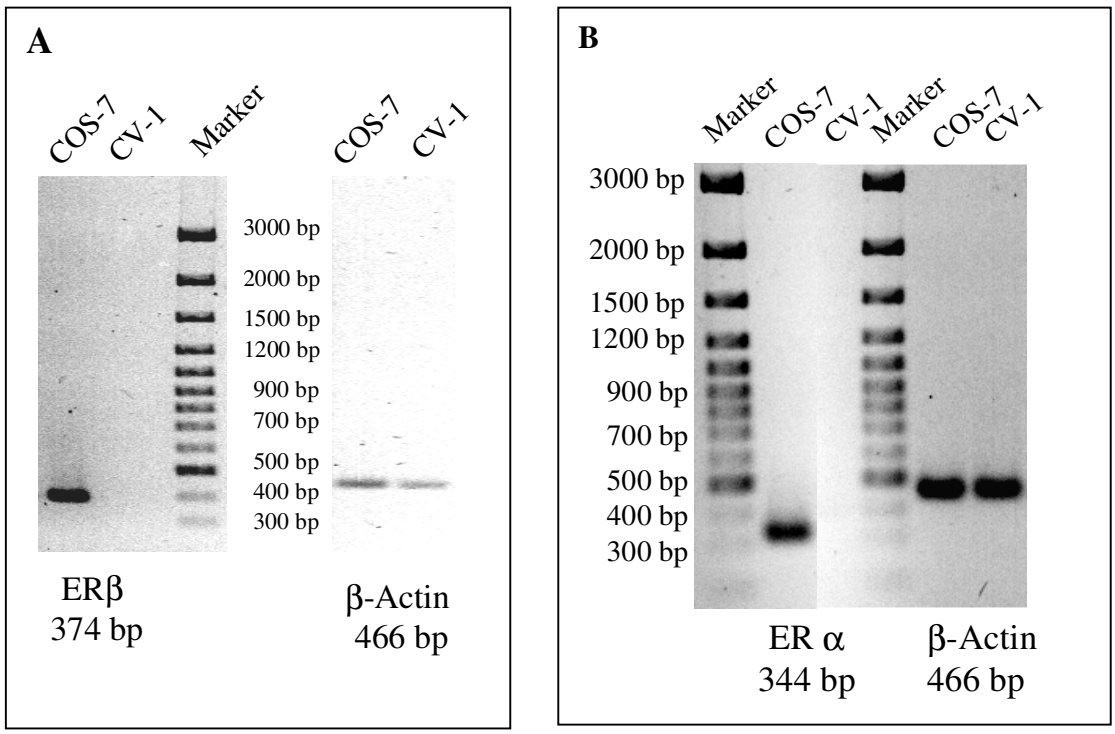


Abb. 49: RT-PCR der transient transfizierten Zellinien COS-7 und CV-1

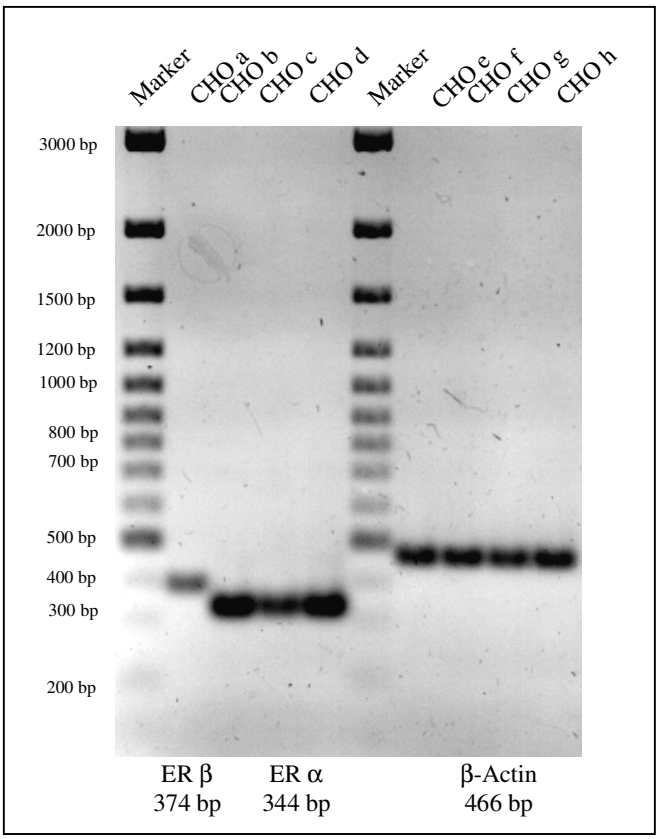
4.6.2 Transiente Transfektion der Zellinie CHO

Die Zellinie CHO-K1 wurde mittels unterschiedlicher chemischer Transfektionsmethoden mit den Estrogenrezeptorexpressionsplasmiden und dem Reportergenplasmid pSEAP2/VITA2 transfiziert. Der Vorteil der chemischen Transfektionsmethoden liegt darin, daß wesentlich mehr Zellen die Transfektion überleben als bei der Elektroporation. Eingesetzt wurde die Polybrene-Methode, liposomale Transfektionsreagenzien (Lipofectin und Lipofectamin) sowie als nicht-liposomales Transfektionsreagenz Fugene6. Da von den liposomalen Transfektionsreagenzien nur geringe Mengen zur Verfügung standen, konnten diese nur für die Transfektion mit ERα eingesetzt werden. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion inkubiert und 48 Stunden später das Medium von den Zellen abgenommen. Dieses wurde entweder bei –20°C gelagert oder direkt von einem Aliquot die AP-Aktivität bestimmt. Es zeigte sich teilweise eine sehr hohe AP-Aktivität, was bedeutet, daß die Transfektion funktioniert hat. Allerdings schwankten die Werte zwischen den einzelnen Platten sehr, sodaß nicht in jedem Fall das erwartete Ergebnis erhalten wurde. Möglicherweise waren die transfizierten Platten bei Abnahme des Mediums bereits zu voll gewachsen. Aus den Erfahrungen mit der stabil transfizierten Zellinie MCF-7-Luc ist bekannt,

daß bei zu dicht bewachsenen Platten die gemessene Luciferase-Aktivität nicht mehr proportional zur Estradiolkonzentration ansteigt, sondern sehr uneinheitliche Werte ergibt. Ein weiterer möglicher Grund für die erhaltenen Ergebnisse könnte die getrennte Transfektion jeder einzelnen Platte sein, was zu einer unterschiedlichen Transfektionseffizienz führen kann. Bei diesen Transfektionsmethoden sollte daher zur Kontrolle der Transfektionseffizienz ein Kontrollplasmid, z.B. mit dem Enzym β-Galactosidase, das konstitutiv exprimiert wird, in Betracht gezogen werden. Die β-Galactosidase dient zur Normierung der erhaltenen Reportergenaktivität.

Zusätzlich wurde die Transfektion mittels RT-PCR auf die Expression der Estrogenrezeptoren untersucht. In Abbildung 50 sind die Ergebnisse der RT-PCR dargestellt, die entsprechenden Banden der Estrogenrezeptoren konnten im richtigen Größenbereich identifiziert werden. Die Transfektion der CHO-Zellen mittels verschiedener chemischer Transfektionsmethoden war somit erfolgreich.

Exemplarisch für die Transfektion der CHO-Zellen ist in Abbildung 51 das Ergebnis der Fugene6 Transfektion mit ERα und pSEAP2/VITA2 dargestellt. Die Inkubation mit Estradiol 0,1 µM ergab die höchste AP-Aktiviät, die Kombination Estradiol 0,1 µM und ICI 182 780 1 µM zeigte wie die Kontrolle keine Aktivität, da ICI 182 780 die Estradiol-Aktivität inhibiert.



CHO a: Transfektion CHO mit Fugene6
RT-PCR auf ERβ
CHO b: Transfektion CHO mit Fugene6
RT-PCR auf ERα
CHO c: Transfektion CHO mit Lipofectin
RT-PCR auf ERα
CHO d: Transfektion mit Lipofectamin
RT-PCR auf ERα
CHO e: Transfektion CHO mit Fugene6 (ERβ)
RT-PCR auf β-Actin
CHO f: Transfektion CHO mit Fugene6 (ERα)
RT-PCR auf β-Actin
CHO g: Transfektion mit Lipofectin (ERα)
RT-PCR auf β-Actin
CHO h: Transfektion mit Lipofectamin (ERα)
RT-PCR auf β-Actin

Abb. 50: RT-PCR der transient transfizierten Zellinie CHO

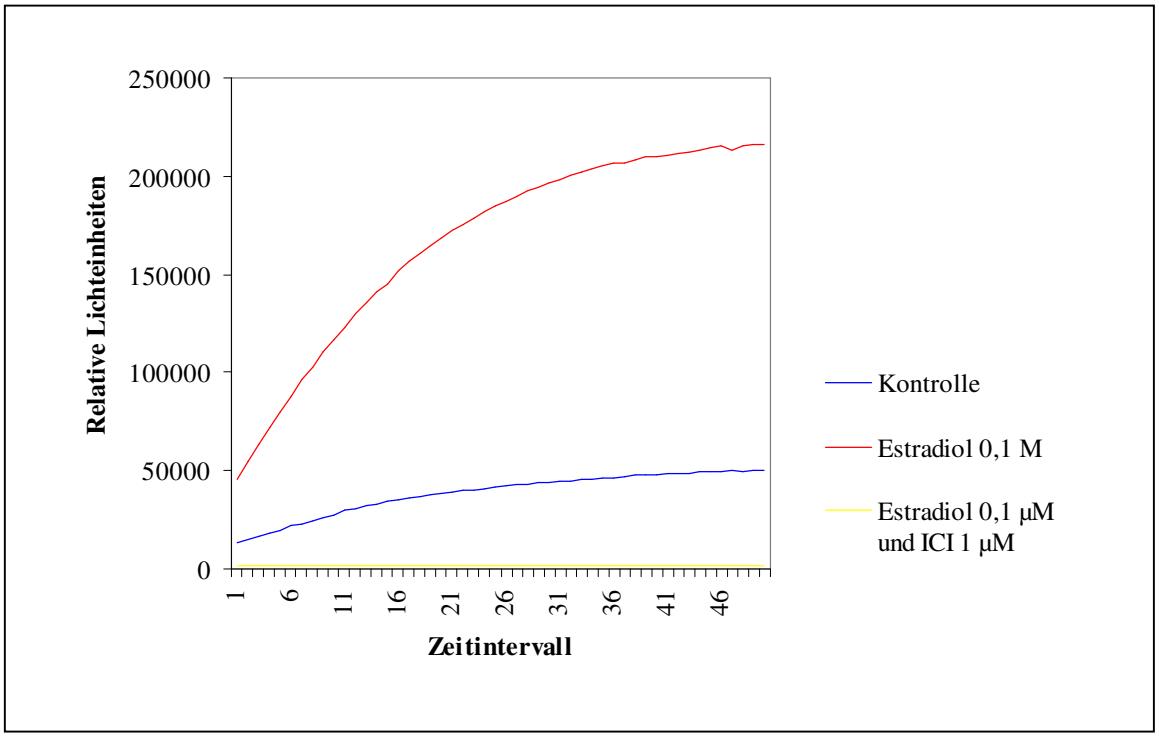


Abb. 51: Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit ERα und pSEAP2/VITA2 mittels chemischer Transfektion (Fugene6)

4.6.3 Transiente Transfektion der Zellinie HEK 293

Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde zur Transfektion mit den Estrogenrezeptoren die humane embryonale Nierenzellinie HEK 293 eingesetzt. In der Literatur ist die Transfektion dieser Zellinie mit den humanen Estrogenrezptorexpressionsplasmiden und entsprechenden Reportergenplasmiden mittels chemischer Methoden, z.B. Calciumphosphat beschrieben. [Kuiper et al, 1998b]

In dieser Arbeit wurden unterschiedliche Transfektionsmethoden, Elektroporation sowie liposomale und nicht liposomale Transfektionsreagenzien, eingesetzt. Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit Estradiol sowie der Kombination Estradiol und ICI 182 780 inkubiert. Bei Verwendung der AP als Reportergen, wurde nach weiteren 48 Stunden das Medium entnommen und im SEAP-Assay vermessen. Für den Luciferase-Assay mußten dagegen 48 Stunden nach der Inkubation Zellextrakte angefertigt werden, um die Luciferase im Zellextrakt detektieren zu können.

In den Abbildungen 52 bis 57 sind die Ergebnisse der unterschiedlichen Transfektionsmethoden von HEK 293 mit ERα bzw. ERβ und pSEAP2/VITA2 nach

Inkubation mit Estradiol bzw. Estradiol und ICI 182 780 dargestellt. Aus Kostengründen konnte die liposomale Transfektion nur mit ER α durchgeführt werden.

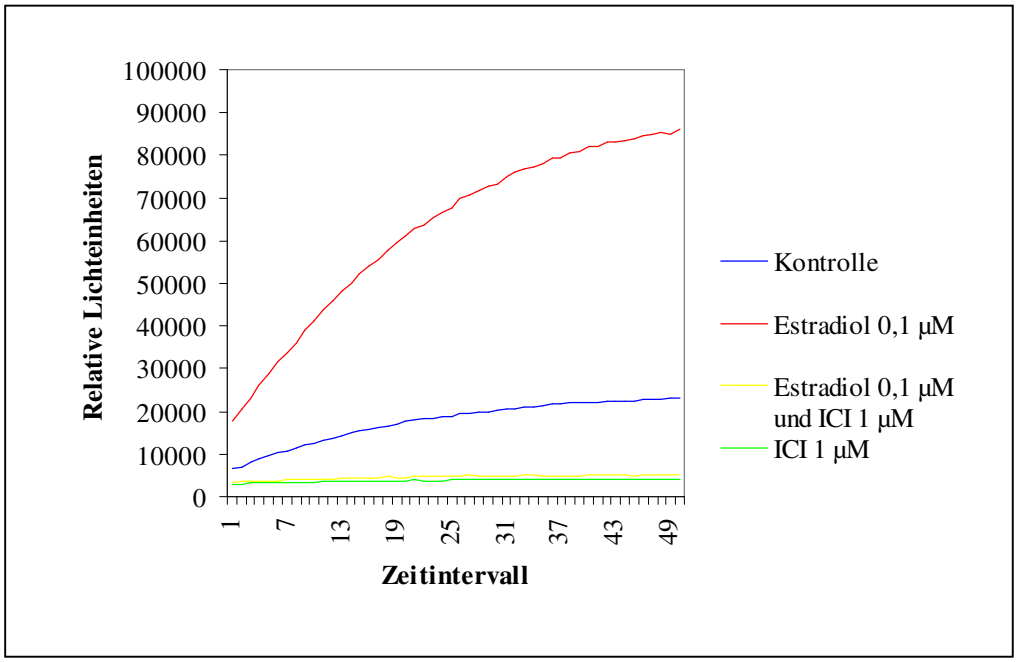


Abb. 52: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mittels Elektroporation (ERα und pSEAP2/VITA2)

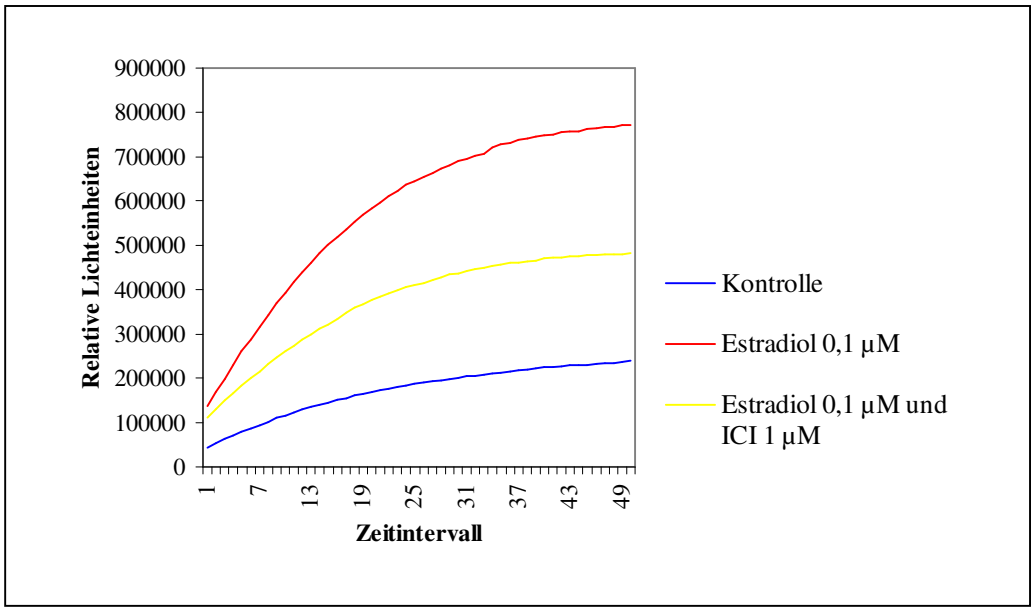


Abb. 53: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mittels Fugene6 (ERα und pSEAP2/VITA2)

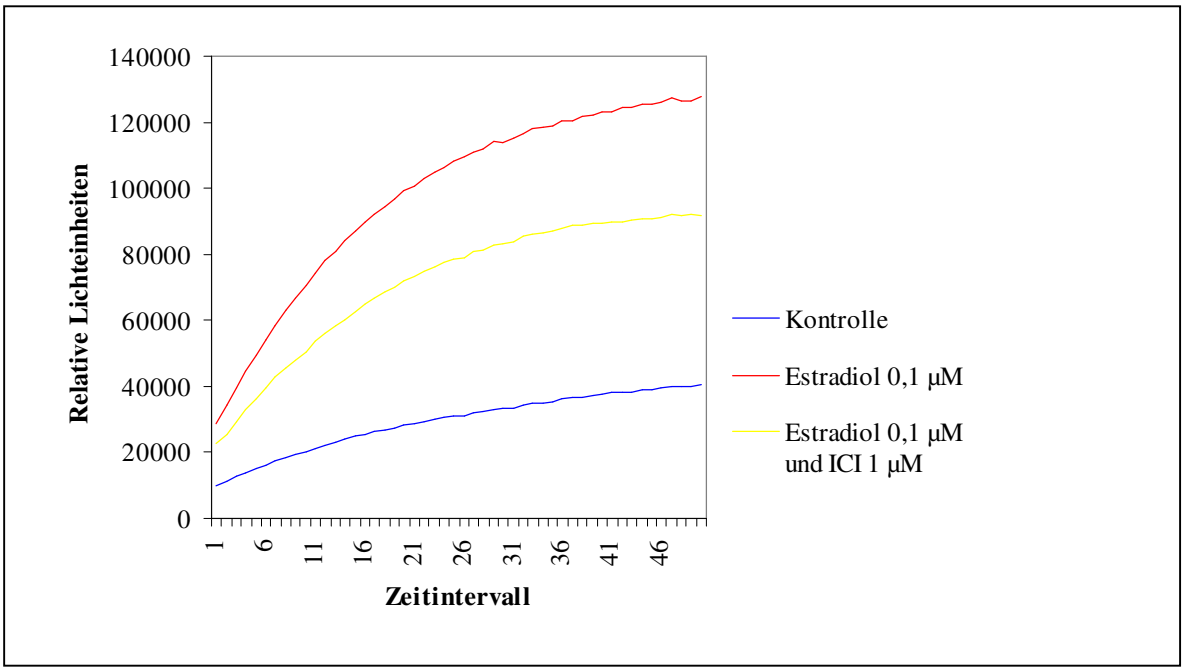


Abb. 54: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mittels Lipofectin (ERα und pSEAP2/VITA2)

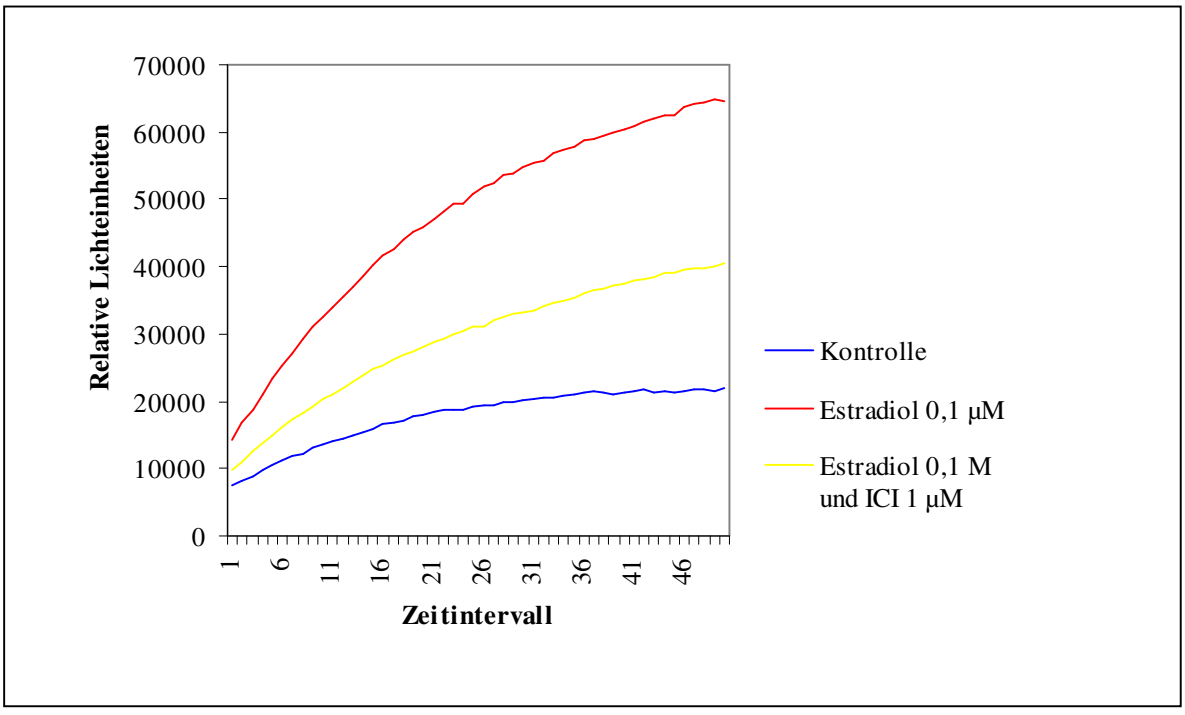


Abb. 55: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mittels Lipofectamin (ERα und pSEAP2/VITA2)

Die Transfektion der HEK 293 Zellen mit ERα und pSEAP2/VITA2 gelang mit allen angewanden Transfektionsmethoden, wie in den Abbildungen 53 bis 56 ersichtlich. In allen Fällen wurde die höchste SEAP-Aktivität nach Inkubation mit 0,1 µM Estradiol verzeichnet, die deutlich über der Kontrolle lag. Die Aktivität von Estradiol wurde erwartungsgemäß durch die Kombination mit ICI 182 780 1 µM antagonisiert. Die absolute Aktivität von Estradiol zwischen den einzelnen Methoden war unterschiedlich hoch. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, daß vor allem bei der Elektroporation nur eine geringe Anzahl von Zellen überlebt, was im Vergleich zu chemischen Transfektionsmethoden zu einer entsprechend niedrigen Aktivität führen kann. Von den hier angewandten Methoden war das nicht liposomale Transfektionsreagenz Fugene6 für die Zellen am wenigsten toxisch, mit diesem wurden die höchsten Aktivitäten gemessen.

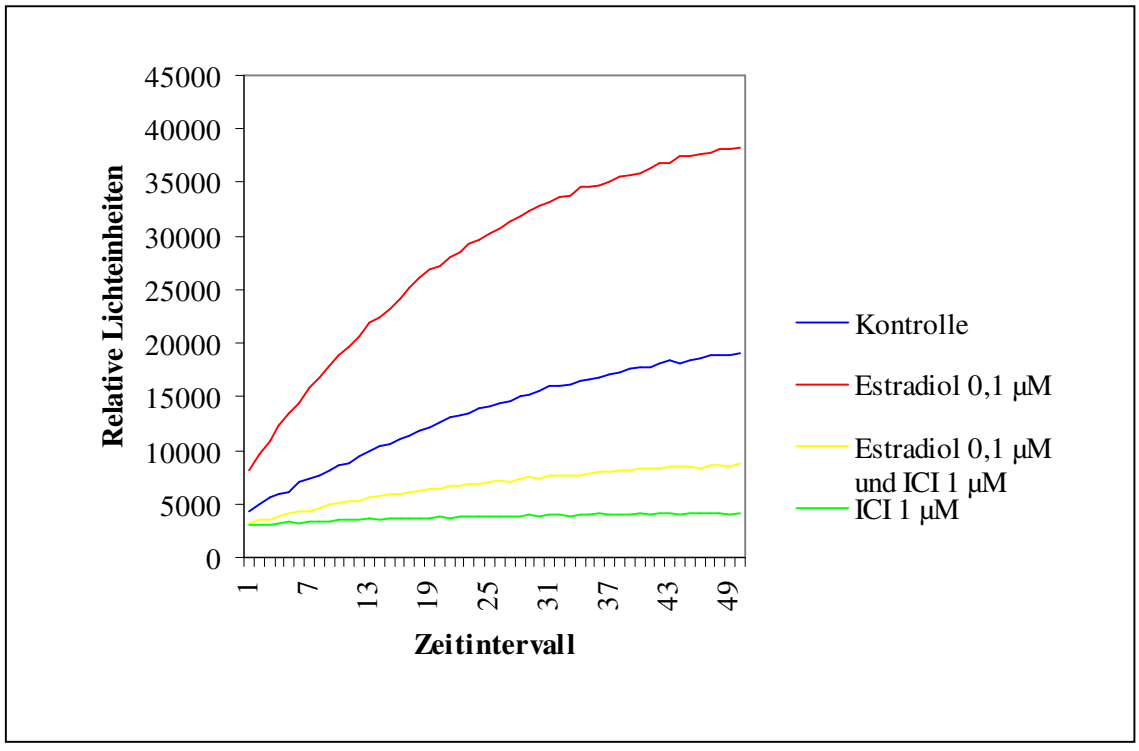


Abb. 56: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mittels Elektroporation (ERβ und pSEAP2/VITA2)

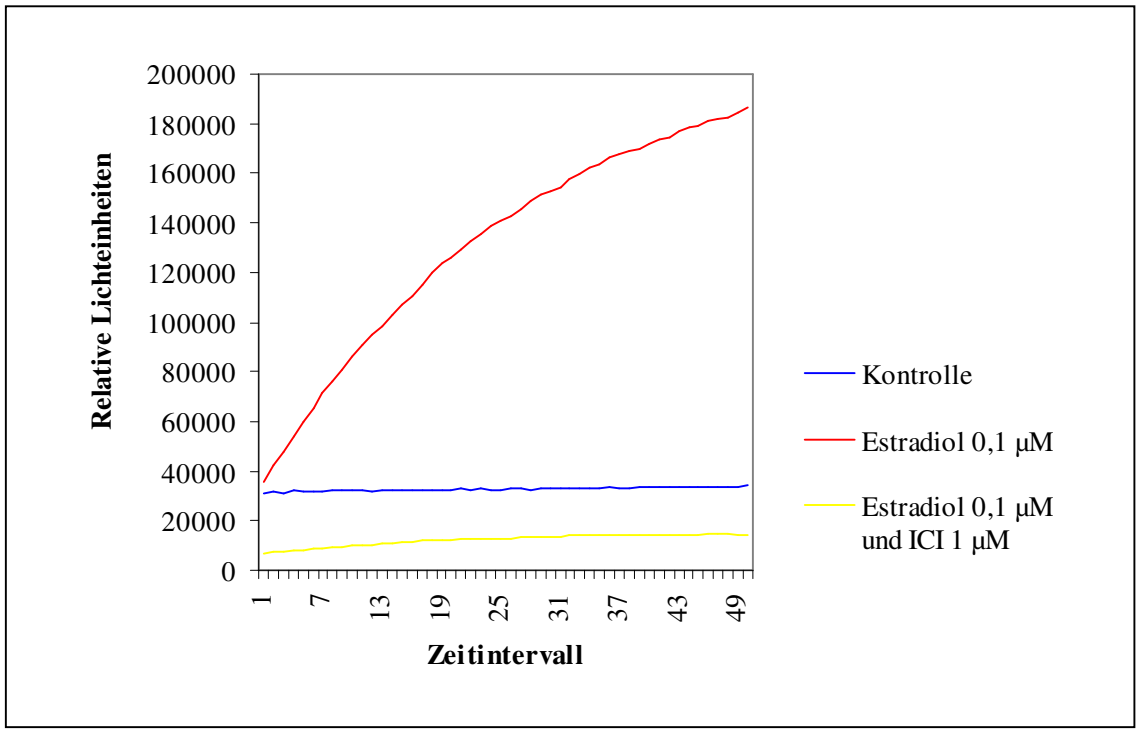


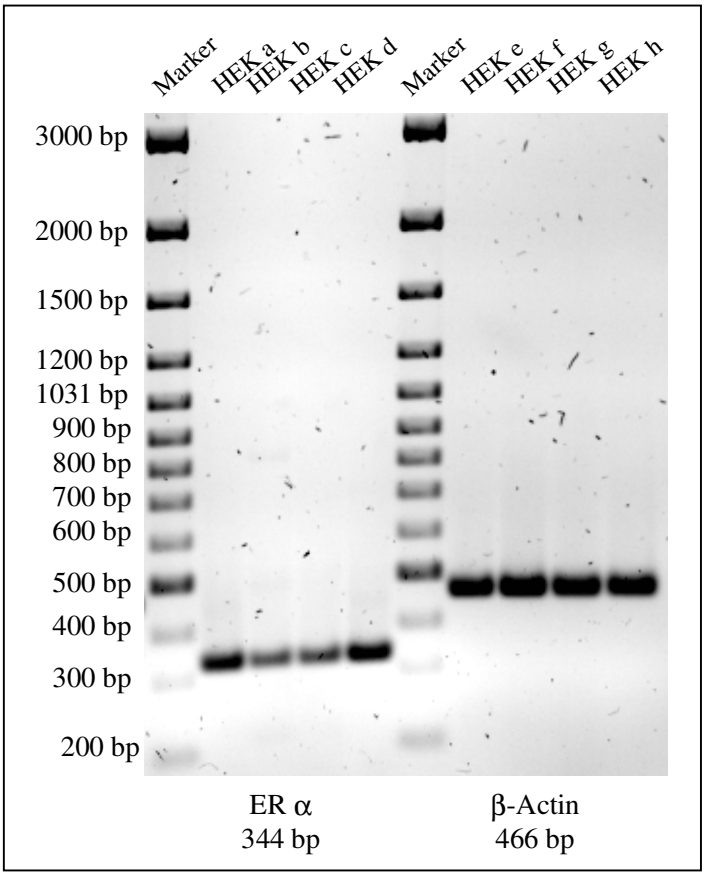
Abb. 57: SEAP-Assay nach transienter Transfektion von HEK 293 mit Fugene6 (ERβ und pSEAP2/VITA2)

Auch die Transfektion der HEK 293 Zellen mittels Elektroporation und dem nicht liposomalem Transfektionsreagenz Fugene6 mit den Plasmiden ERβ und pSEAP2/VITA2 war erfolgreich (vgl. Abbildung 56 und 57). Die Inkubation mit Estradiol 0,1 µM zeigte auch hier die höchste SEAP-Aktivität, die ebenfalls durch die Kombination mit ICI 182 780 1 µM gehemmt wurde.

Die Transfektion mit Fugene6 ergab wie bei der Transfektion mit ERα höhere Aktivitäten als bei der Elektroporation. Grund dafür ist vermutlich ebenfalls die geringere Überlebensrate der Zellen bei der Elektroporation im Vergleich zur nicht liposomalen Transfektion mit Fugene6.
Im weiteren Verlauf der Arbeit wurde als Transfektionsmethode dennoch die Elektroporation eingesetzt, da diese im Vergleich zur chemischen Transfektion mit Fugene6 kostengünstiger ist. Des weiteren ist bei der Anwendung chemischer Reagenzien die Transfektion jeder einzelnen Petrischale erforderlich, was zu unterschiedlichen Transfektionseffizienzen führen kann. Bei der Elektroporation wird im Gegensatz dazu eine bestimmte Anzahl von Zellen in der Küvette mit den Plasmiden gemischt und transfiziert und diese dann nach Durchmischung

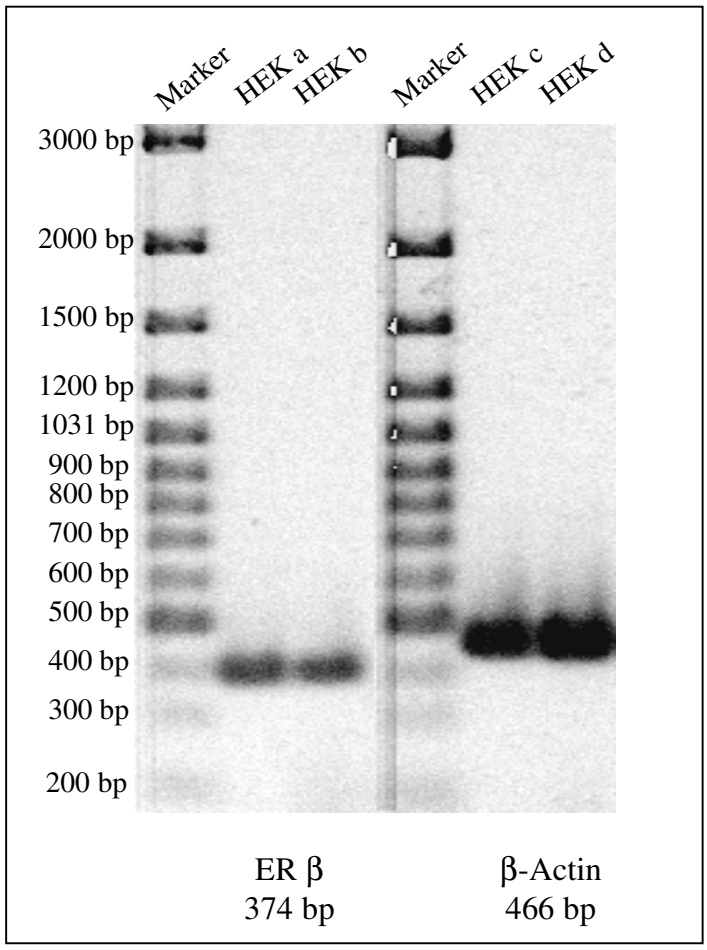
auf Petrischalen verteilt. Somit ist eine gleichmäßigere Verteilung transfizierter bzw. nicht transfizierter Zellen auf die einzelnen Petrischalen gewährleistet.

Zusätzlich wurde die Expression der Estrogenrezeptoren mittels RT-PCR überprüft. Dazu wurde die Gesamt-RNA der transfizierten Zellen isoliert und einer RT-PCR-Reaktion unterzogen. Hierfür wurden die spezifischen Primer für beide Estrogenrezeptorsubtypen sowie für das Housekeeping-Gen β-Actin eingesetzt. Nach der RT-PCR wird die erhaltene DNA einer Agarosegelanalyse unterzogen und die erhaltenen Fragmente mit geeigneten Markern identifiziert. In Abbildung 58 sind die Ergebnisse der RT-PCR für die verschiedenen Transfektionsmethoden dargestellt. Die Expression des jeweiligen Estrogenrezptorsubtypen in den transfizierten HEK 293 Zellen konnte für alle Methoden nachgewiesen werden, was die Ergebnisse des SEAP-Assays bestätigt. Das Fragment für ERα konnte im Bereich von 344 bp identifiziert werden, das für ERβ im Bereich von 374 bp. Auch die Expression des Housekeeping-Gens β-Actin war in allen Fällen positiv, das Fragment wurde bei 466 bp zugeordnet.



HEK a: Transfektion mit Elektroporation
RT-PCR auf ERα
HEK b: Transfektion mit Fugene6
RT-PCR auf ERα
HEK c: Transfektion mit Lipofectin
RT-PCR auf ERα
HEK d: Transfektion mit Lipofectamin
RT-PCR auf ERα
HEK e: Transfektion mit Elektroporation
RT-PCR auf β-Actin
HEK f: Transfektion mit Fugen6
RT-PCR auf β-Actin
HEK g: Transfektion mit Lipofectin
RT-PCR auf β-Actin
HEK h: Transfektion mit Lipofectamin
RT-PCR auf β-Actin

Abb. 58 A: RT-PCR der transient transfizierten Zellinie HEK 293



HEK a: Transfektion mit Elektroporation
RT-PCR auf ER β
HEK b: Transfektion mit Fugene6
RT-PCR auf ER β
HEK c: Transfektion mit Elektroporation
RT-PCR auf β-Actin
HEK d: Transfektion mit Fugene6
RT-PCR auf β-Actin

Abb. 58 B: RT-PCR der transient transfizierten Zellinie HEK 293

Die Etablierung mit dem Reportergensystem pGL2/VITA2 erfolgte analog. Die HEK 293 Zellen wurden mit den Plasmiden mittels Elektroporation transfiziert. 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Estradiol 0,1 µM , der Kombination Estradiol 0,1 µM und ICI 182 780 1 µM sowie Medium ohne Testsubstanz als Kontrolle inkubiert. 48 Stunden danach wurden zur Detektion der Luciferase Zellextrakte angefertigt und die Luciferase-Aktivität bestimmt. Estradiol zeigte auch hier die höchste Aktivität, die durch die Kombination mit dem Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182 780 gehemmt wurde. (vgl. Abb. 59 und 60)

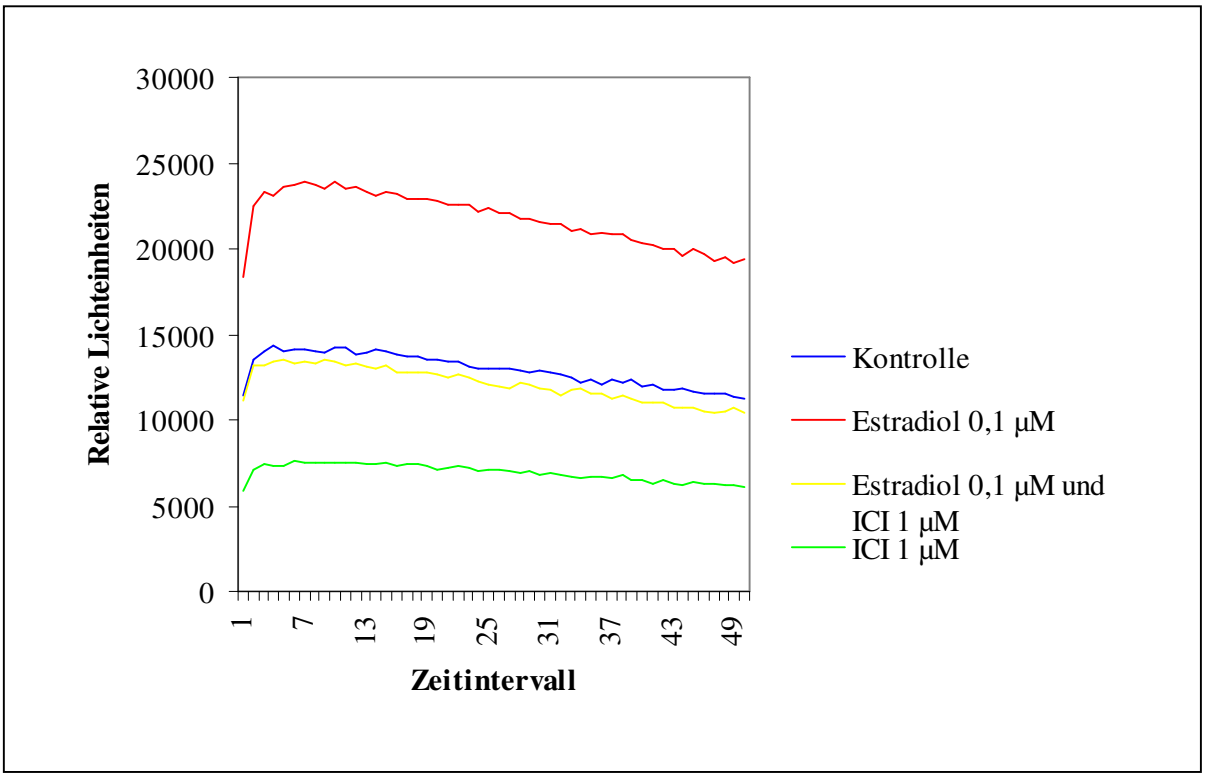


Abb. 59: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

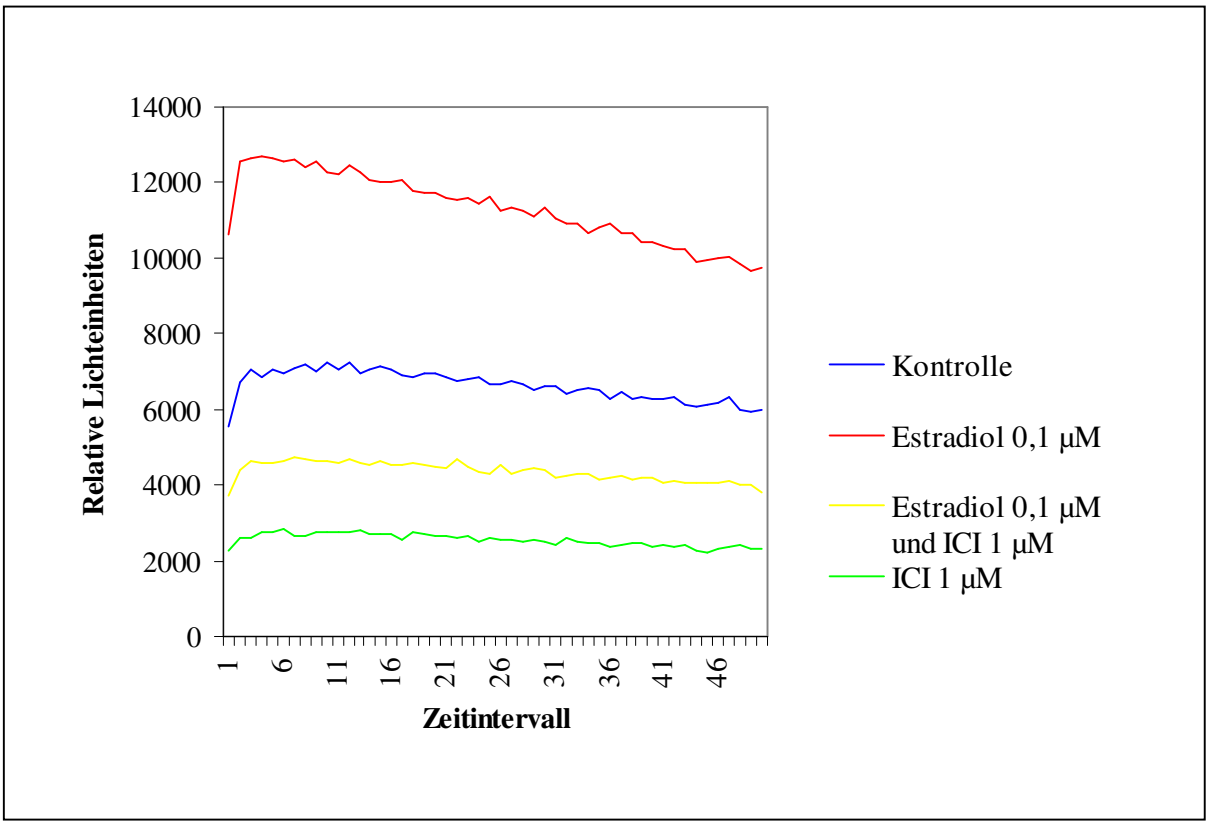


Abb. 60: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

Nach der Etablierung der Reportergensysteme mit den transient transfizierten HEK 293 Zellen erfolgte die Validierung des Systems durch Inkubation der Zellen mit Estradiol in verschiedenen Konzentrationen. Dazu wurden beide Estrogenrezeptorsubtypen mit den Reportergenplasmiden pSEAP2/VITA2 bzw. pGL2/VITA2 cotransfiziert. Durch Inkubation der Zellen ergab sich die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung über einen mehrere Größenordnungen umfassenden Dosisbereich. (vgl. Abbildung 61 bis 64) Die Darstellung der Ergebnisse in halblogarithmischer Auftragung zeigt die klassische sigmoidale Form. Dieser Kurvenverlauf beschreibt die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor bis zum Sättigungsbereich des Rezeptors. Der Wendepunkt der Kurve repräsentiert die effektive Konzentration (EC_{50}), die die halbmaximale rezeptorvermittelte Induktion des Reportergens hervorruft.
Zusätzlich wurde der physiologische Ligand Estradiol in Kombination mit dem reinen Estrogenrezeptorantagonisten ICI 182 780 inkubiert. ICI 182 780 (1 µM) bewirkt in allen vier Testsystemen eine vollständige Hemmung der Reportergeninduktion durch Estradiol. (siehe Abbildung 61 bis 64)

Des weiteren wurden die HEK 293 Zellen mit dem jeweiligen Reportergen pSEAP2/VITA2 bzw. pGL2/VITA2 alleine transfiziert. Die Zellen wurden nach der Transfektion mit Estradiol inkubiert und die Reportergenaktivität bestimmt. Es konnte jedoch keine Aktivität detektiert werden, somit ist die HEK 293 Zellinie für Untersuchungen von potentiell estrogenaktiven Verbindungen, die über den ERα bzw. ERβ wirken, geeignet (Ergebnisse nicht dargestellt). Die Ergebnisse von Barkhem et al konnten somit bestätigt werden. [Barkhem et al, 1998]

Tab. 3: Vergleich der ermittelten EC_{50}-Werte von Estradiol mit Literaturdaten

Testsystem	**EC_{50}-Wert von Estradiol in [nM]**
HEK 293 ERα/pSEAPVITA2	0,52
HEK 293 ERβ/pSEAPVITA2	0,67
HEK 293 ERα/pGL2VITA2	0,38
HEK 293 ERβ/pGL2VITA2	0,27
HEK 293 ERα/ 3xERE-TATA-Luc [Kuiper et al, 1998]	0,05
HEK 293 ERβ/3xERE-TATA-Luc [Kuiper et al, 1998]	0,2
HEK 293 ERα/pΔERE2-ALP [Barkhem et al, 1998]	0,005
HEK 293 ERβ/pΔERE2-ALP [Barkhem et al, 1998]	0,05
MCF-7 Luc	0,42

In Tabelle 3 sind die EC_{50}-Werte der einzelnen transienten Testsysteme und Literaturdaten zusammengefasst. Die von Kuiper et al und Barkhem et al beschriebenen Unterschiede der EC_{50}-Werte zwischen ERα und ERβ konnten in der vorliegenden Arbeit nicht beobachtet werden. [Barkhem et al, 1998; Kuiper et al, 1998b] Während bei Kuiper et al und Barkhem et al der EC_{50}-Wert von Estradiol bei ERα im Vergleich zu ERβ um eine Größenordnung niedriger ist, lagen hier beide EC_{50}-Werte im gleichen Größenbereich. In dieser Arbeit wurden jedoch Reportergenplasmide mit dem Wildtyp-Promotor verwendet, Kuiper et al verwendeten das Reportergenplasmid 3xERE-TATA-Luc, bestehend aus drei Kopien des ERE gekoppelt mit dem Luciferasegen und Barkhem et al das Reportergenplasmid pΔERE2-ALP mit nur einem ERE und dem Reportergen Alkalische Phosphatase. Die Unterschiede der EC_{50}-Werte sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Promotoren zurückzuführen. Bezüglich der Wahl des Promotors und der daraus resultierenden Unterschiede in der Reportergenaktivität sei auf die Diskussion in Kapitel 4.4 verwiesen. Die hier erhaltenen

Daten können somit nicht direkt mit den Literaturdaten verglichen werden, diese können lediglich als Anhaltspunkte dienen. Des weiteren sei auf die unterschiedlichen Transfektionsmethoden hingewiesen, Kuiper et al und Barkhem et al verwendeten chemische Transfektionsmethoden, während hier mittels Elektroporation transfiziert wurde.

Die beobachteten Unterschiede bezüglich der Potenz (Aktivitätshöhe) zwischen ERα und ERβ können nicht direkt auf den Rezeptorsubtyp zurückgeführt werden. Zum einen kann keine Aussage darüber gemacht werden, wie stark der jeweilige Rezeptor exprimiert in den Zellen vorliegt, zum anderen liegt die Expression des ERα unter der Kontrolle des SV 40 Promotors, die des ERβ unter der des CMV Promotors. Aussagen über die jeweilige Transfektionseffizienz können ebenfalls nicht getroffen werden, möglicherweise überlebt eine unterschiedlich hohe Anzahl von Zellen die Transfektion, was einen Vergleich zusätzlich erschwert. Dies bedeutet, daß das ERα- und das ERβ-System jeweils für sich getrennt betrachtet werden müssen. Bei der Untersuchung von potentiell estrogenaktiven Verbindungen muß die Untersuchung im jeweiligen Testsystem erfolgen, die erhaltenen EC_{50}-Werte der Verbindungen können nur mit dem des mitgeführten Agonisten Estradiol verglichen werden.

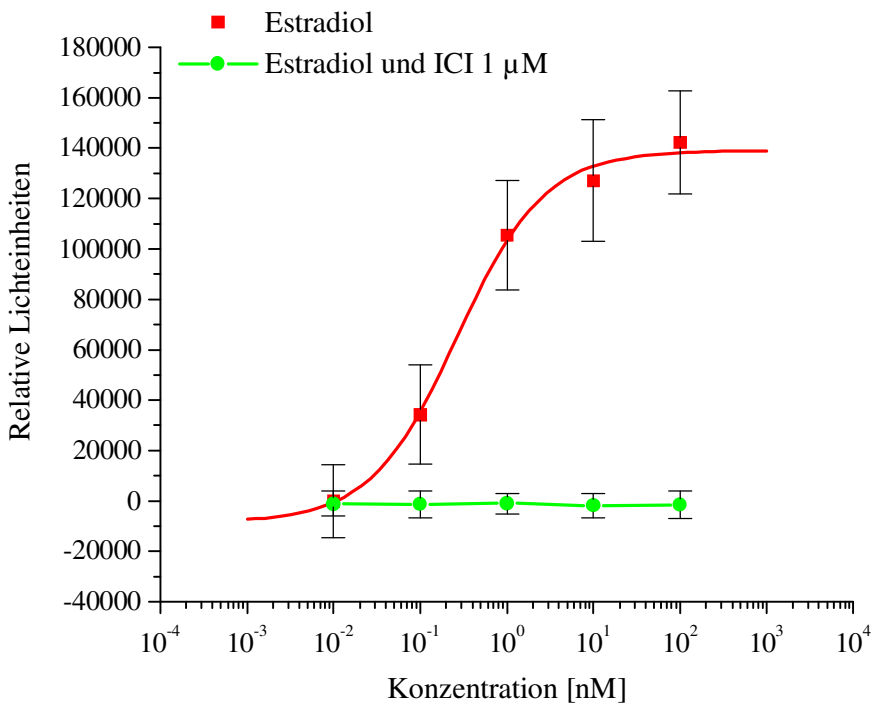


Abb. 61: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

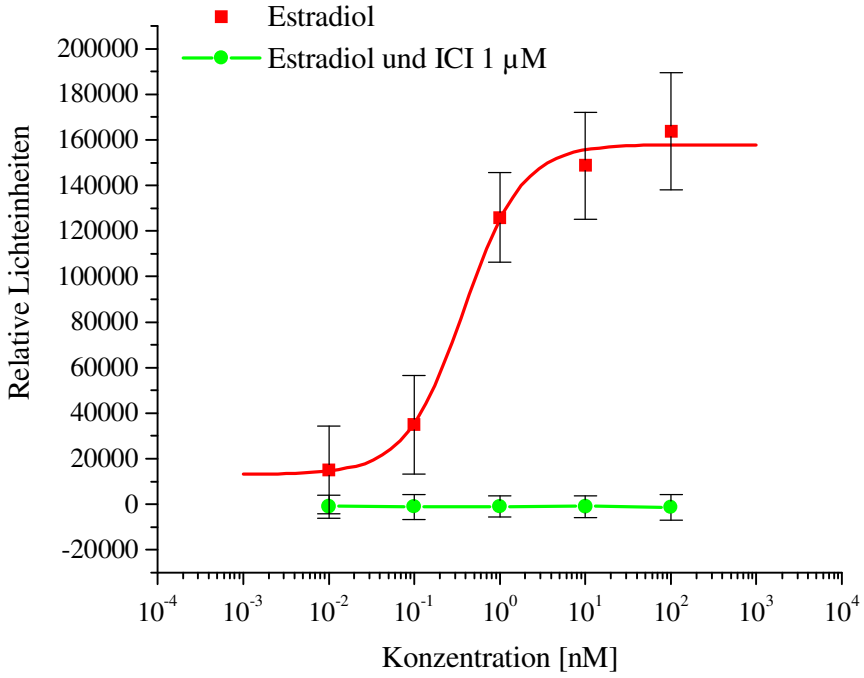


Abb. 62: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

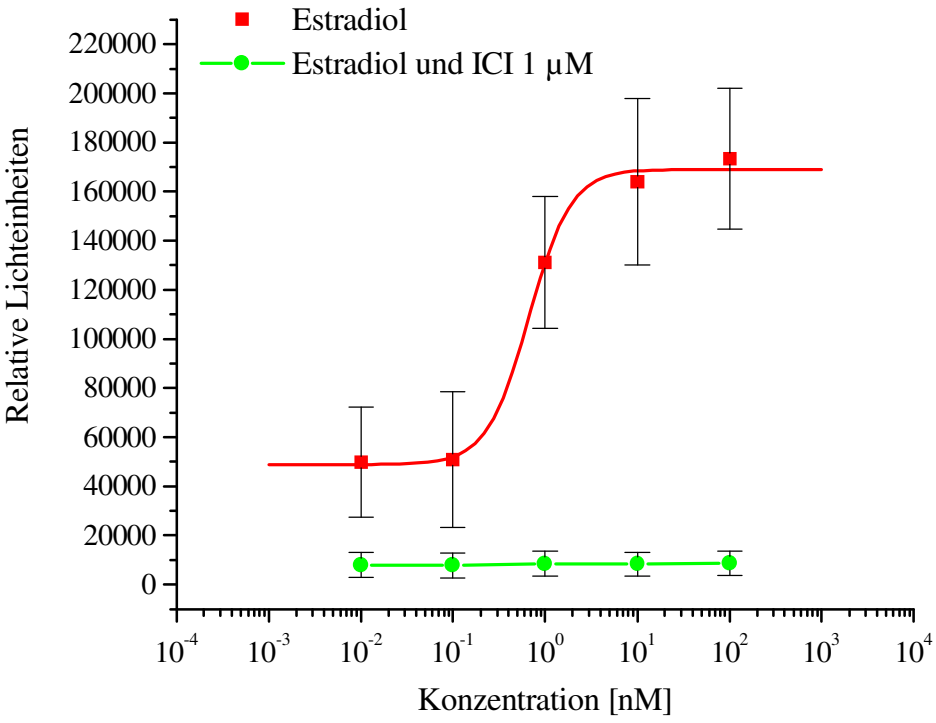


Abb. 63: SEAP-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

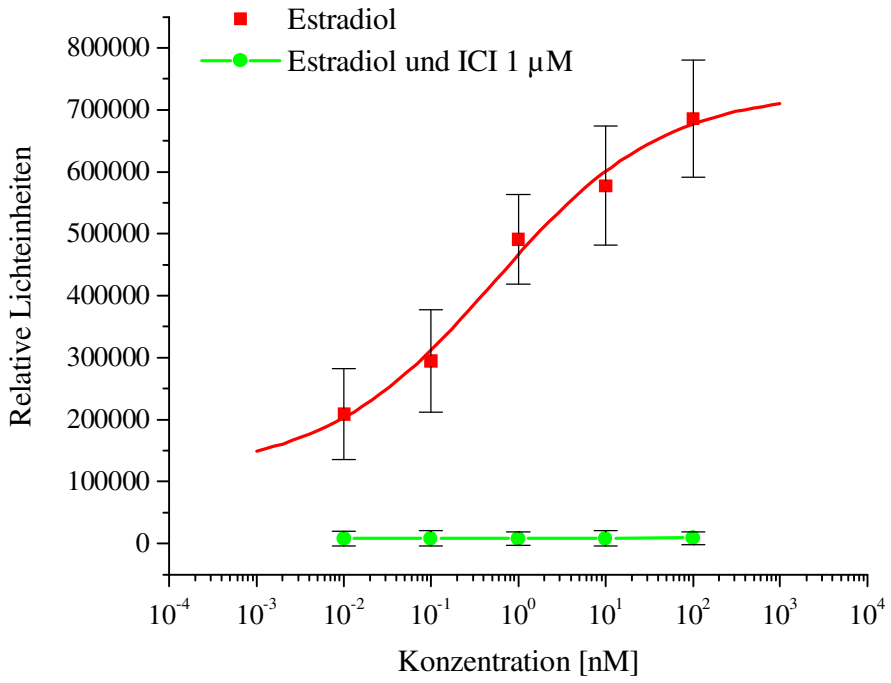


Abb. 64: SEAP-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

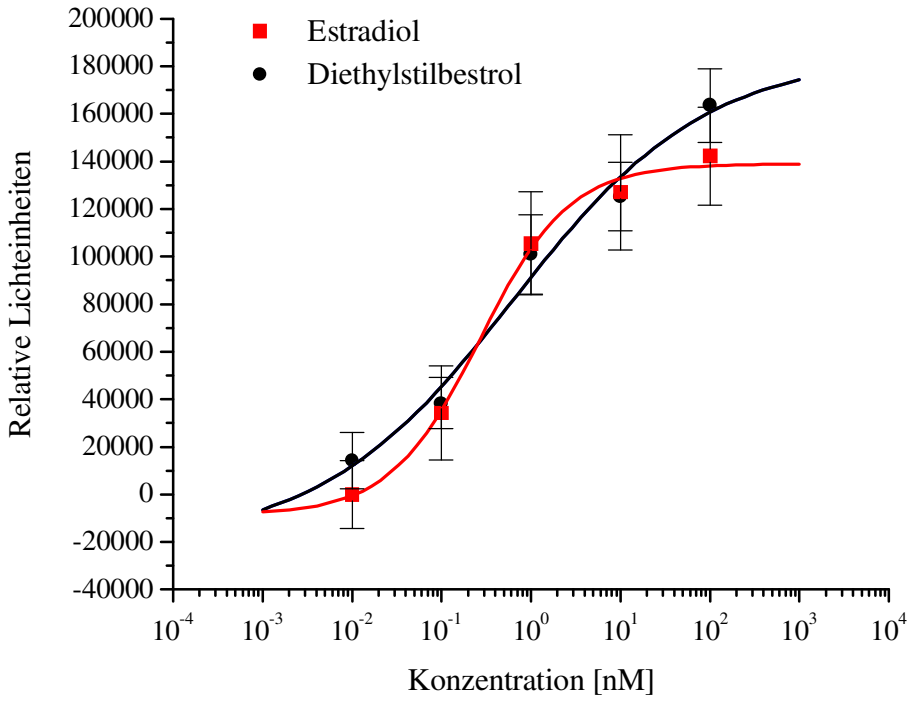


Abb. 65: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

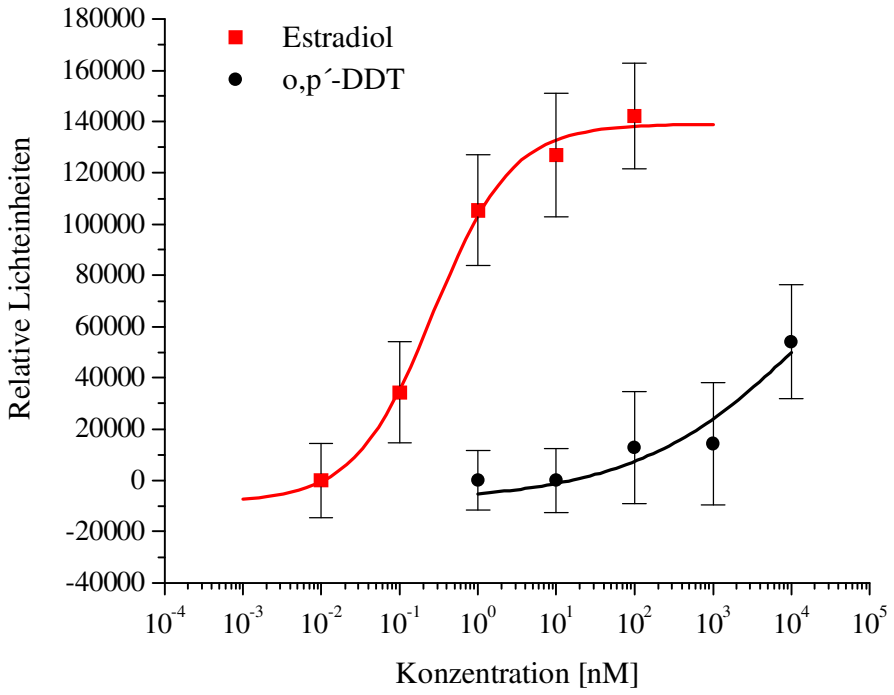


Abb. 66: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

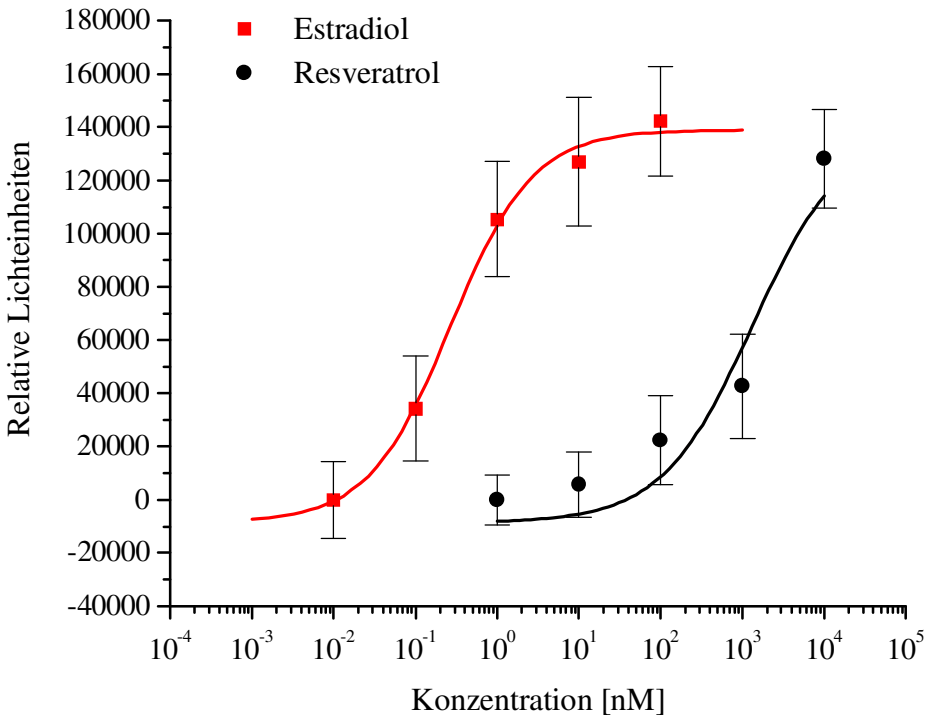


Abb. 67: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERβ)

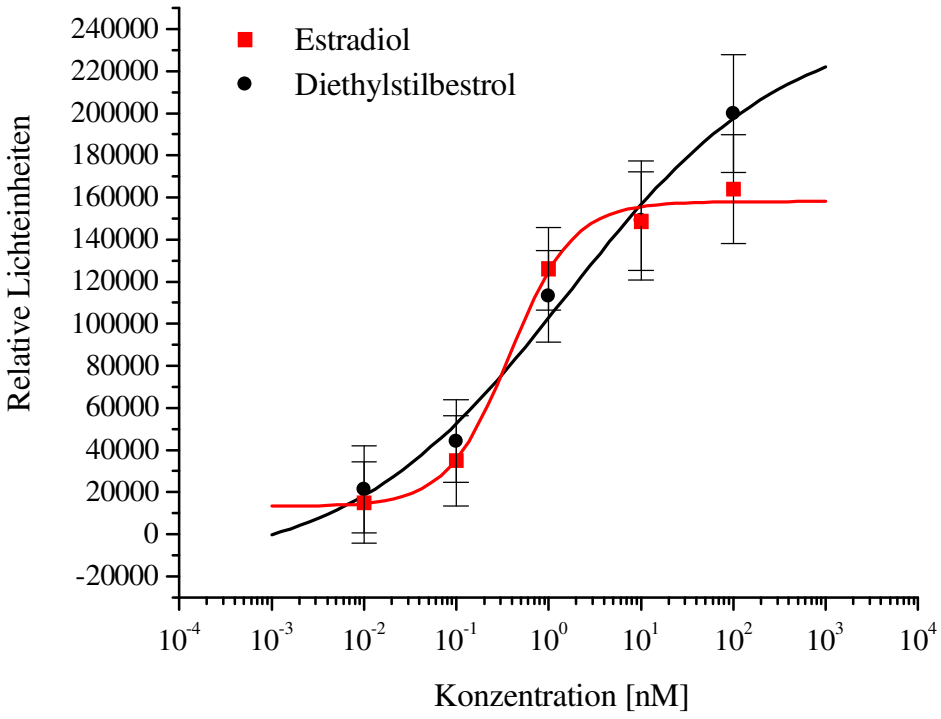


Abb. 68: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

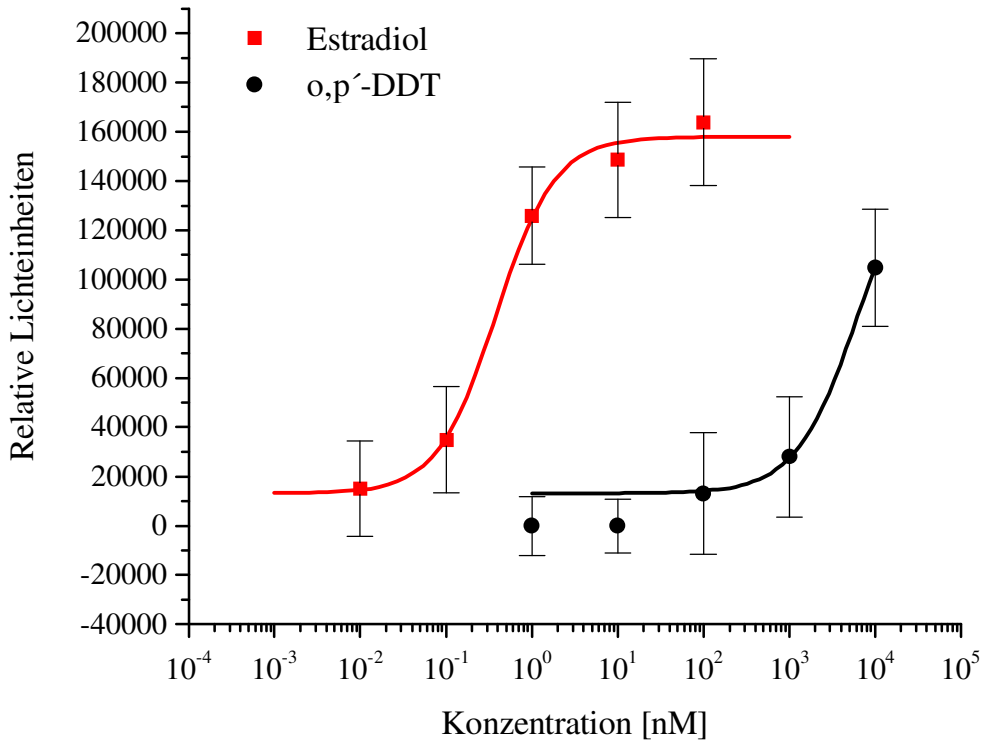


Abb. 69: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

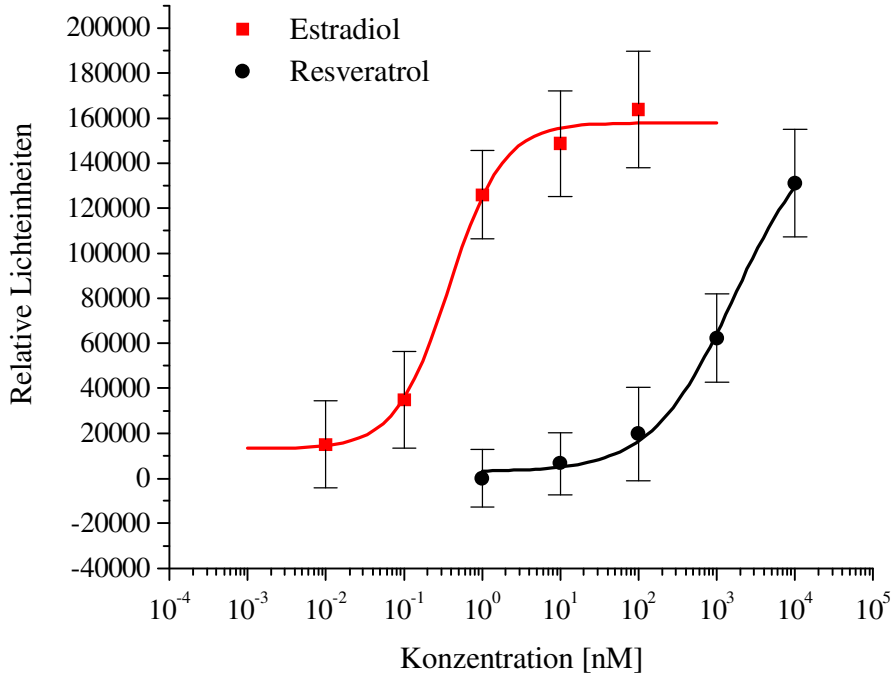


Abb. 70: Luciferase-Assay mit transient transfizierten HEK 293 Zellen (ERα)

Nach der Validierung der beiden Testsysteme mit dem physiologischen Liganden Estradiol sowie dem reinen Antagonisten ICI 182 780 sollten ausgewählte Verbindungen, die bereits in der stabil transfizierten Zellinie MCF-7 Luc untersucht worden sind, auf ihr estrogenes Potential am jeweiligen Estrogenrezeptorsubtyp getestet werden. Dazu wurden DES, ein potenter ER-Agonist, das Stilbenderivat Resveratrol sowie o,p`-DDT ausgesucht. Alle drei Verbindungen wurden hinsichtlich ihres estrogenen Potentials in den Testsystemen ERα bzw. ERβ/pGL2VITA2 untersucht. Die Graphen der jeweiligen Untersuchungen sind in Abbildung 66 bis 70 dargestellt. In Tabelle 4 wurden die nach logistischem Fit erhaltenen EC_{50}-Werte zusammengefasst, sowie die daraus resultierenden RP-Werte und wenn möglich RE-Werte berechnet.

DES zeigte sowohl bei ERα als auch bei ERβ bei der höchsten untersuchten Konzentration von 100 nM eine höhere Reportergeninduktion als Estradiol. Bei ERβ liegt der EC_{50}-Wert in der gleichen Größenordnung von Estradiol, bei ERα um eine Größenordnung höher. Im Vergleich zu den Ergebnissen von DES in der Zellinie MCF-7-Luc unterscheiden sich die EC_{50}-Werte um eine bzw. zwei Größenordnungen. Entsprechend sind auch die RP-Werte um eine Zehnerpotenz kleiner. (vgl. Tab. 4)

Resveratrol zeigte bei beiden Testsystemen in der höchsten Konzentration von 10 µM eine höhere Reportergeninduktion als bei der stabil transfizierten Zellinie MCF-7 Luc. Die höchste Aktivität wurde dort bei 0,1 µM verzeichnet, bei höheren Konzentrationen knickte die Kurve jedoch wieder ab. Die EC_{50}-Werte bei den hier verwendeten Testsystemen liegen allerdings im Vergleich zum MCF-7 Luc-Testsystem um eine Größenordnung höher. Der RE-Wert konnte für keines der Testsysteme berechnet werden, da Resveratrol nur bis 10 µM getestet wurde und keine Angaben darüber gemacht werden können, ob hier bereits das Plateau erreicht ist. Die berechneten RP-Werte unterscheiden sich zu dem erhaltenen des MCF-7 Luc-Testsystems um eine Größenordnung. (vgl. Tab. 4)

Bei o,p´-DDT konnte in der höchsten untersuchten Konzentration von 10 µM im Vergleich zur MCF-7-Luc Zellinie eine höher Reportergeninduktion detektiert werden. Auch hier konnten, wie bei der stabilen Zellinie keine RE-Werte ermittelt werden, da nur bis 10 µM getestet wurde und nicht ersichtlich ist, ob dieser Wert bereits im Plateau liegt. Die mittels logistischem Fit berechneten EC_{50}-Werte liegen bei den Testsystemen ERα/pGL2VITA2 und MCF-7-Luc in der gleichen Größenordnung, während der EC_{50}-Wert von ERβ um eine Zehnerpotenz höher liegt. Die aus den EC_{50}-Werten ermittelten RP Werte unterscheiden sich um je eine Größenordnung. (vgl. Tab. 4)

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Verbindungen DES und o,p´-DDT wurden auch von Kuiper et al in Transfektionsversuchen mit HEK 293 Zellen und den Estrogenrezeptoren α und β getestet. DES zeigte bei der Konzentration von 1000 nM bei ERα eine höhere Reportergenaktivität als Estradiol bei dieser Konzentration, während bei ERβ Estradiol eine höhere Induktion bewirkte. [Kuiper et al, 1998b] DES führte bei den hier verwendeten transienten Systemen sowohl bei ERα als auch bei ERβ bei einer Konzentration von 100 nM zu einer höheren Reportergeninduktion als Estradiol. Kuiper et al fanden eine stärkere Affinität von DES zu den beiden Estrogenrezeptoren im Bindungsassay im Vergleich zu Estradiol, entsprechend sind die RBA-Werte von DES höher, was die in dieser Arbeit im Reportergenassay erhaltenen Ergebnisse unterstützt. [Kuiper et al, 1997]
Die Verbindung o,p`-DDT wurde von Kuiper et al ebenfalls getestet. Hier zeigte sich bei beiden Rezeptoren bei einer Konzentration von 1000 nM eine geringere Reportergeninduktion als bei Estradiol, wobei diese bei ERα etwas höher lag als bei ERβ. o,p`-DDT zeigte bei den hier durchgeführten Reportergenversuchen bei der Konzentration von 10000 nM eine deutlich geringere Aktivität als Estradiol bei 100 nM. Dabei lag die Reportergenantwort von o,p`-DDT bei ERα höher als bei ERβ, was mit den Ergebnissen von Kuiper et al übereinstimmt. [Kuiper et al, 1998b]

Das Antiestrogen ICI 182 780 zeigte in Transaktivierungsassays bei beiden Estrogenrezeptorsubtypen keine agonistische Aktivität, während Tamoxifen bei ERβ antagonistisch dagegen bei ERα als partieller Agonist wirkt. [Kuiper et al, 1998b; Barkhem et al, 1998] Durch Kombination von ICI 182 780 1 µM mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen konnte die Reportergenaktivität von Estradiol antagonisiert werden. (vgl. Abb. 61 bis 64)

In verschiedenen Untersuchungen wurde die relative Bindungsaffinität (RBA) von Substanzen am jeweiligen Estrogenrezeptorsubtyp untersucht. Die RBA-Werte von verschiedenen Verbindungen, wie beispielsweise o,p´-DDT, Bisphenol A, Nonylphenol lagen bei beiden Estrogenrezeptoren mindestens 1000fach niedriger als bei Estradiol. Im Gegensatz dazu zeigten die untersuchten Phytoestrogene bei ERβ eine signifikant höhere Affinität als bei ERα. [Kuiper et al, 1997; Kuiper et al, 1998b] Dies wurde durch die Untersuchung der Phytoestrogene im Reportergenassay bestätigt. Der EC_{50}-Wert von Genistein ist beispielsweise bei ERα um eine Zehnerpotenz größer als bei ERβ, was mit den Beobachtungen im Zusammenhang mit den RBA-Werten übereinstimmt. [Kuiper et al,

1998b; Barkhem et al, 1998] Im Rahmen dieser Arbeit konnte ein Untersuchung der Phytoestrogene in den Systemen nicht erfolgen. Die Untersuchung der Reportergenaktivität verschiedener Phytoestrogene im ERβ bzw. ERα-Testsystem werden im Rahmen einer Diplomarbeit bearbeitet.

Die Unterschiede in Bezug auf EC_{50}- und RP-Werte zwischen den einzelnen Systemen können verschiedene Ursachen haben. Es wurden verschiedene Zellinien in den Testsystemen eingesetzt. Die transient transfizierten HEK 293 Zellen müssen für jeden Versuch erneut transfiziert werden, was zu anderen Ergebnissen als bei der stabil transfizierten Zellinie MCF-7-Luc führen kann. In der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7-Luc liegt eine Mischpopulation beider Estrogenrezeptorsubtypen vor. Nach der Aktivierung des Estrogenrezeptors durch den Liganden kommt es zur Ausbildung von Rezeptordimeren, je nach Expressionsmuster zu Hetero- oder Homodimeren, die zur Transkriptionsaktivierung führen. Möglicherweise spielen hier auch Einflüsse auf andere Signaltransduktionswege eine Rolle. Im Gegensatz dazu wurden bei den transienten Testsystemen humane embryonale Nierenzellen HEK 293 verwendet, die endogen keinen Estrogenrezeptor enthalten. Nach Transfektion mit dem jeweiligen Estrogenrezeptorexpressionsplasmid wird der entsprechende Subtyp exprimiert und es können nur Homodimer-Komplexe ausgebildet werden. Die Homodimere des ERβ könnten außer mit den bekannten EREs auch mit anderen noch unbekannten Responsiven Elementen interagieren und somit Einfluß auf bisher nicht betrachtete Signalwege nehmen. [Kuiper und Gustafsson, 1997] In Untersuchungen wurden die Transaktivierungseigenschaften von ERα und ERβ mit dem AP1-Promotor untersucht. Estradiol führte mit ERα zu einer hohen Reportergeninduktion, während bei ERβ die Reportergenaktivität durch Estradiol inhibiert wurde. Die Antiestrogene Tamoxifen, Raloxifen und ICI 182 780 waren dagegen potente Agonisten mit ERβ und AP1-Promotor als Responsives Element. Die beiden Estrogenrezeptorsubtypen beeinflussen je nach Ligand und Promotor verschiedene Signalwege. [Peach et al, 1997; Webb et al, 1999] In Transfektionversuchen mit ERα und ERβ und unterschiedlichen Responsiven Elementen, ERE des VITA2 bzw. des luteinisierenden Hormons β (LH ERE) wurden abhängig vom eingesetzten ERE des Reportergenkonstruktes unterschiedliche Transkriptionsaktivitäten gefunden. Nach Inkubation mit Estradiol zeigte sich bei ERα eine höhere Transkriptionsaktiviät mit LH ERE als mit VITA2 ERE, während für ERβ das Gegenteil, also eine höhere Aktivität zusammen mit VITA2 ERE beobachtet werden konnte. Diese Beobachtungen konnten ebenfalls nach Inkubation mit Bisphenol A, Octylphenol sowie DES

bestätigt werden. Die Ergebnisse zeigen, daß ERα und ERβ unterschiedlich mit spezifischen Estrogen Responsiven Elementen interagieren können. [Pennie et al, 1998]
In weiteren Versuchen konnte gezeigt werden, daß bei Einsatz eines Reportergens mit Wildtyp-Promotor beide Estrogenrezeptoren in ähnlichem Ausmaß zur Reportergeninduktion führen. Im Gegensatz dazu führte ERα bei Verwendung von Reportergenkonstrukten, die als Promotor synthetische ERE-Sequenzen enthalten, z.B. 3ERE-TATA-Luc oder 2ERE pS2-CAT zu einer höheren Transkription des Reportergens als ERβ. Dabei scheinen die unterschiedlichen Aktivitäten der Transaktivierungsfunktionen AF-1 und AF-2 eine Rolle zu spielen, die vom Zielgen und Zelltyp abhängen. Die durch bestimmte Promotoren vermittelte Transkription, wie beispielsweise die des pS2-Promotors, ist von beiden Transaktivierungsdomänen abhängig. Dagegen ist die Aktivierung anderer Promotoren, z.B. die des Vitellogenin A2 entweder von AF-1 oder AF-2 abhängig. Die AF-2 Sequenz, die in der Ligand-Bindungs-Domäne des Estrogenrezeptors lokalisiert ist, weist eine hohe Homologie zwischen ERα und ERβ auf. [Cowley und Parker, 1999] Im Gegensatz dazu ist die Homologie der beiden Estrogenrezeptorsubtypen in der N-terminalen Domäne, in der die AF-1 Region des ERα lokalisiert ist, sehr gering. Eine gleichartige AF-1 Region, wie sie bei ERα vorliegt, konnte bei ERβ nicht identifiziert werden. [Cowley und Parker, 1999] Es wurde daher vermutet, daß ERβ nur zur Aktivierung von Promotoren führt, bei denen dazu keine AF-1 Domäne benötigt wird. Dies konnte in Transfektionsversuchen mit unterschiedlichen Reportergenplasmiden bestätigt werden. ERα und ERβ induzierten die Transkription mit Reportergenplasmiden, die einen kompletten Promotor besitzen und deren Aktivierung durch AF-1 oder AF-2 erfolgen kann. ERα induziert dagegen die Transkriptionsaktivierung bei Reportergenplasmiden, die synthetische ERE-Sequenzen bzw. pS2-basierende Promotoren enthalten stärker als ERβ, da beide Transaktivierungsdomänen erforderlich sind. [Cowley und Parker, 1999] Damit wird deutlich, daß die Transaktivierung durch den jeweiligen Estrogenrezptorsubtyp entscheidend vom gewählten Promotor abhängt und bei unterschiedlich eingesetzten Promotoren im Reportergenplasmid jedes Testsystem getrennt betrachtet werden muß.

Zusammenfassend ist anzumerken, daß keine signifikanten Unterschiede für ERα und ERβ bezüglich EC_{50}-Werte und Reportergenresponse beobachtet werden konnten. Bei Estradiol lagen die EC_{50}-Werte für beide Estrogenrezeptorsubtypen im gleichen Größenbereich, ebenso bei Resveratrol. Bei DES lag der EC_{50}-Wert für ERα um eine Größenordnung höher als für ERβ, bei o,p´-DDT ergab sich bei ERβ ein um eine Zehnerpotenz höherer EC_{50}-Wert als bei

ERα. Die bei Kuiper et al beschriebenen höheren Aktivitäten einiger Phytoestrogene bei ERβ konnten im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr untersucht werden.

Die Literaturdaten lassen sich aus verschiedensten Gründen nicht direkt mit den hier erhaltenen Ergebnissen vergleichen. Zum einen wurden verschiedene Transfektionsmethoden eingesetzt und als wichtigster Punkt wurden Reportergenplasmide mit unterschiedlichen Promotoren verwendet. Bei den in dieser Arbeit verwendeten Reportergenplasmiden wurde der VITA2-Wildtyp-Promotor eingesetzt, was einen direkten Vergleich mit den Literaturergebnissen erschwert. Auf die damit in Zusammenhang stehenden möglichen Unterschiede und Konsequenzen wurde bereits hingewiesen. (vgl. auch Kapitel 4.4)

Tab. 4: Zusammenfassung der EC_{50}-Werte sowie daraus resultierender RP- bzw. RE-Werte

Verbindung	**Testsystem**	**EC $_{50}$-Wert in [nM]**	**RP[1]**	**RE[2]**
DES	MCF-7 Luc[3]	23	5×10^{-2}	82
DES	HEK 293 ERα /pGL2VITA2	1,5	0,25	-
DES	HEK 293 ERβ /pGL2VITA2	0,64	0,42	-
Resveratrol	MCF-7 Luc[3]	162	$7,4 \times 10^{-3}$	-
Resveratrol	HEK 293 ERα /pGL2VITA2	1657	$2,3 \times 10^{-4}$	-
Resveratrol	HEK 293 ERβ /pGL2VITA2	1315	2×10^{-4}	-
o,p´-DDT	MCF-7 Luc	2722	$1,5 \times 10^{-4}$	-
o,p´-DDT	HEK 293 ERα /pGL2VITA2	6317	6×10^{-5}	-
o,p´-DDT	HEK 293 ERβ /pGL2VITA2	31281	$8,6 \times 10^{-6}$	-

1) EC_{50}Estradiol/EC_{50}Testverb. 2) Plateau Testverb. x 100/ Plateau Estradiol
3) [Mußler, 1999]

Die EC_{50}-Werte für die einzelnen Testsysteme von Estradiol siehe Tabelle 3. RP-Wert von Estradiol ist jeweils 1, RE-Wert jeweils 100.

4.7 Untersuchung der Zellinien MCF-7 und HaCaT auf Estrogenrezeptor α/β

Die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptorsubtypen und unterschiedliche Gewebeverteilung der beiden Estrogenrezeptoren führte zu verschiedenen Untersuchungen bezüglich ihrer humanen Gewebeverteilung und ihrem Vorkommen in verschiedenen humanen Zellinien bzw. Brustkrebstumoren. [Enmark et al, 1997; Vladusic et al, 1998; Dotzlaw et al, 1996] Enmark et al zeigten, daß in der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7 beide Subtypen exprimiert werden, wobei die ERα- Expression im Vergleich zu ERβ etwas höher zu sein scheint. [Enmark et al, 1997]. Da unterschiedliche MCF-7-Klone existieren, sollte die in dieser Arbeit verwendete MCF-7-Zellinie ebenfalls auf die Estrogenrezeptorexpression untersucht werden. Des weiteren sollte die Zellinie HaCaT, eine humane Keratinozytenzellinie auf eine potentielle Estrogenrezeptorexpression untersucht werden. Band-Shift-Versuche mit Zellextrakten dieser Zellinie ergaben eine Bindung an eine 27 mer ERE-Sequenz (pers. Mitteilung Guth). Aus diesem Grund sollte überprüft werden, ob diese Zellinie einen der beiden ER-Subtypen exprimiert und diese somit für Transfektionsversuche mit entsprechenden Reportergenplasmiden geeignet ist.

Für die RT-PCR-Untersuchungen wurden von den Zellinien Gesamt-RNA-Aufarbeitungen angefertigt, die schließlich für die eigentliche RT-PCR eingesetzt wurden. Die Isolierung der Gesamt-RNA erfolgte aus Zellen, die in Gegenwart von denaturierendem Guanidinium-Isothiocyanat-enthaltenden Puffer zur Inaktivierung von RNase lysiert wurden. Nach Zugabe von Ethanol wurde das Zelllysat auf eine RNA-bindende Säule gegeben, die Begleitsubstanzen durch Waschen entfernt und die Gesamt-RNA mit Wasser eluiert. (vgl. Kapitel 6.16)

Die isolierte Gesamt-RNA wurde für die RT-PCR-Reaktion eingesetzt. Die spezifischen Primer für die Estrogenrezeptoren wurden aus der Literatur entnommen [Enmark et al, 1997], um die Ergebnisse mit den Literaturdaten vergleichen zu können. Als Kontrolle wurden Primer für das Housekeeping-Gen β-Actin mitgeführt. Die nach der RT-PCR erhaltene DNA wurde mittels Agarosegelanalyse detektiert und die Größe der erhaltenen Banden mit geeigneten Markern identifiziert.

In Abbildung 71 A und B sind die Ergebnisse der RT-PCR beider Zellinien dargestellt. Zusätzlich wurden Präparationen der Expressionsplasmide ERα, ERβ und ERβS einer PCR-Reaktion unterzogen, um zu überprüfen, ob es sich bei den amplifizierten Plasmiden tatsächlich um die Expressionsplasmide handelt. Damit war auch die Möglichkeit gegeben, die Fragmente der Vektoren mit denen der Zellaufarbeitungen zu vergleichen. Die Fragmente der Plasmide konnten im erwarteten Größenbereich identifiziert werden. Die Zellinie MCF-7

exprimiert beide Estrogenrezeptor-Subtypen, ein deutlicher Unterschied in der Expressionsstärke zwischen beiden Subtypen konnte nicht festgestellt werden. Allerdings wurde in früheren Arbeiten bereits gezeigt, daß der Estrogenrezeptorgehalt durch die Zellpassage beeinflusst wird. [Jager, 1992] Dies könnte eine mögliche Erklärung für das vorliegende Ergebnis sein.

Die Zellinie HaCaT exprimiert weder ERα noch ERβ, wie die folgende Abbildung zeigt. Die oben beschriebenen Beobachtungen im Band-Shift-Assay lassen sich daher vermutlich nicht auf eine Estrogenrezeptor-vermittelte sondern auf eine unspezifische Bindung zurückführen.

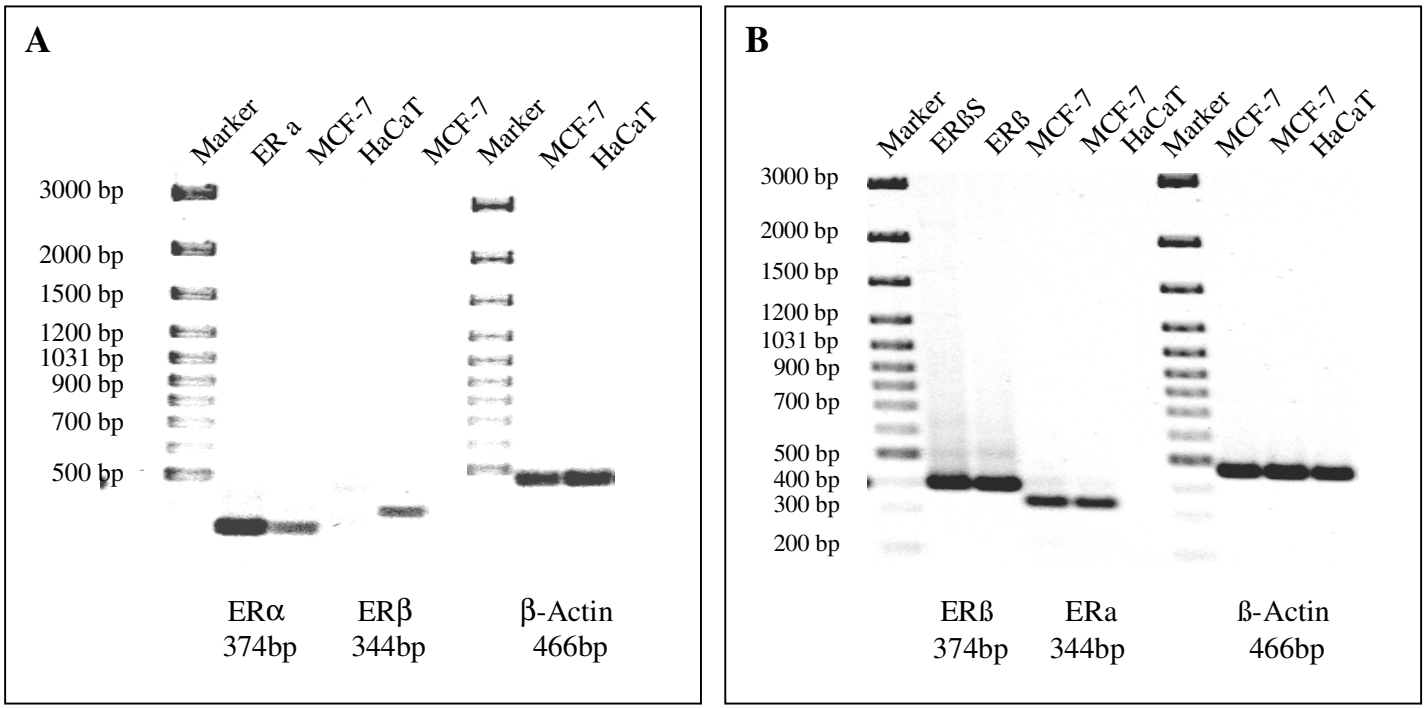


Abb. 71: RT-PCR der Zellinien MCF-7 und HaCaT sowie PCR der Expressionsplasmide ERα, ERβ und ERβS

4.8 Luciferase-Reportergensystem

Das transgene Reportergensystem wird zur Untersuchung von Steroidhormonen eingesetzt. Zellen, die den entsprechenden Rezeptor endogen enthalten, werden mit dem Plasmid für das Reportergen stabil transfiziert. Die Expression des Reportergens erfolgt unter der Kontrolle des endogenen Rezeptors. [Gagne et al, 1994]

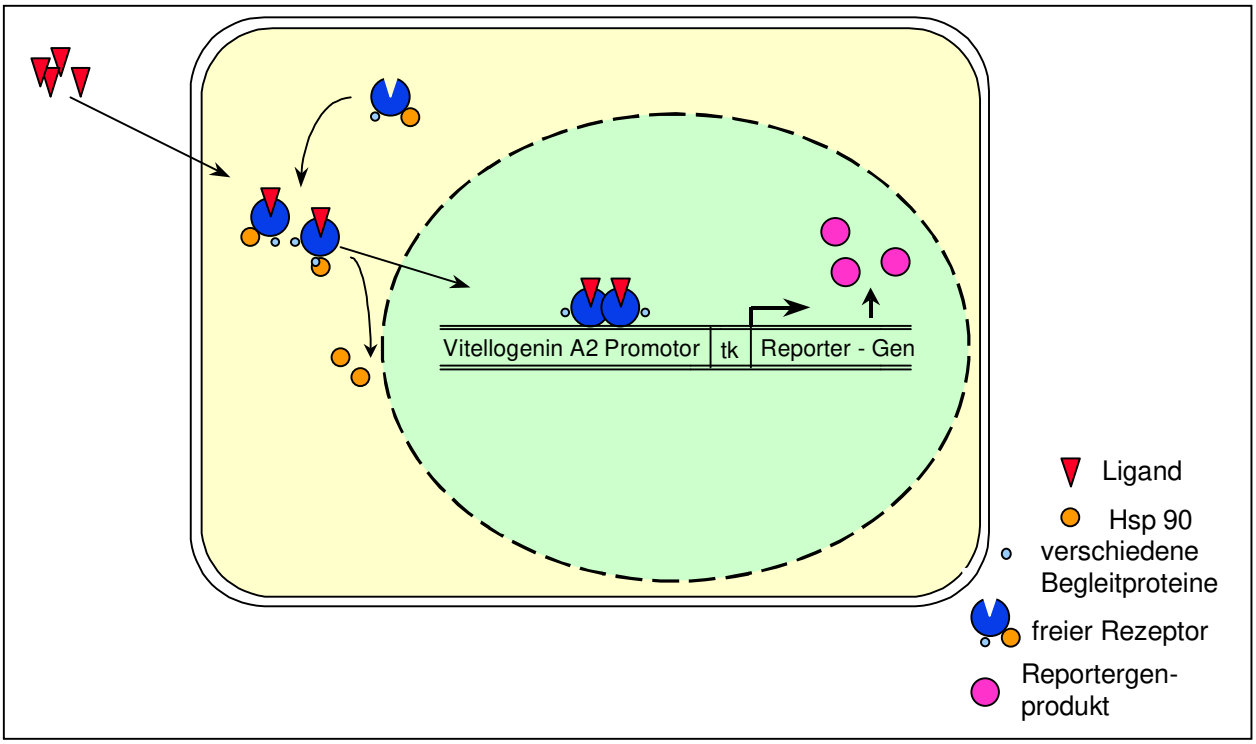


Abb. 72: Schematische Darstellung des transgenen Reportergensystems MCF-7-Luciferase

Die MCF-7-Luc-Zellinie ist eine stabil transfizierte Zellinie. In ihr werden endogen beide Subtypen des humanen Estrogenrezeptors exprimiert. Die Zellen wurden mit dem Plasmid pVIT-tk-Luc transfiziert. [Pons et al, 1990] Das Plasmid enthält die 5`-flankierende Region des Vitellogenin A2, gekoppelt an einen starken Promotor, dem Thymidinkinasegen (tk) des Herpes Simplex Virus. Die Expression der Luciferase steht unter der Kontrolle des ERE enthaltenden Promotors des Vitellogenin A2 Gens aus *Xenopus laevis*. Estradiol bzw. die Testsubstanz bindet in der Zelle an den hER und führt somit zu dessen Aktivierung. Nach der Dimerisierung des Rezeptors bindet das Dimer an das ERE innerhalb des Vitellogenin A2

Promotors und führt zur Expression der Luciferase. Die Detektion der Luciferase erfolgt mittels spezifischer enzymatischer Chemilumineszenzreaktion im Luminometer. Hierbei ist die Menge des produzierten Lichtes proportional zur vorhandenen Luciferasemenge. [Demirpence et al, 1993; Pons et al, 1990]

4.8.1 Validierung und Inbetriebnahme des Luminometergerätes

Zu Beginn der Arbeit stand die Inbetriebnahme und Validierung eines neuen Plattenluminometergerätes an. Der bereits eingesetzte Luciferase-Assay sollte an dieses Gerät angepasst werden, bisher wurde dieser mittels Küvettenluminometer vermessen. Das Plattenluminometergerät bietet die Option, 96-Loch-Mikrotiterplatten einzusetzen, wodurch ein schnelleres Screening ermöglicht wird. Des weiteren kann das Substrat über eine Pumpe zur Probe zugegeben werden, was ein Zupipettieren per Hand ersetzt und eventuelle Fehler durch Pipettierungenauigkeiten ausschließt. Die Messung der entstehenden Photonen beginnt direkt nach Substratzugabe. Die Anwendung des Gerätes für den Luciferase-Assay erfordert jedoch die Anpassung und Abstimmung verschiedener Parameter, wie Plattenart, Zellzahl, Substratmenge und Gesamtmesszeit je Probe.

Plattenart

Zur Lumineszenzmessung empfiehlt sich der Einsatz weißer Lochplatten, da die Messung der Photonenintensität nur senkrecht zur Platte erfolgt. Bei vollständig transparenten Lochplatten werden die Photonen nach allen Seiten hin abgestrahlt und lediglich ein Bruchteil der Photonen kann erfasst werden, was einen Intensitätsverlust zur Folge hat. Der Einsatz von weißen Lochplatten führte im Vergleich zu transparenten Platten zu einer besseren Photonenausbeute und damit erhöhten Sensitivität.

Zellzahl

Die eingesetzte Zellzahl pro Platte hat ebenfalls Einfluß auf die Lichtintensität. Je höher die Zellzahl, desto mehr Luciferase-Enzym kann, je nach vorangegangener Substanzinkubation exprimiert werden. Es zeigte sich, daß bei unzureichend bewachsenen Platten die Photonenintensität gering ist und diese mit größerer Zellzahl entsprechend zunimmt. Da bei zu dicht bewachsenen Petrischalen das gemessene Signal nicht mehr proportional zur Konzentration ist, kann die Zellzahl nicht beliebig erhöht werden. Nach Austesten

unterschiedlicher Zellzahlen konnte auch dieser Parameter für die Versuchsbedingungen optimiert werden.

Substratmenge

Die eingesetzte Substratmenge ist von Bedeutung, da der Nachweis der Luciferase auf einer enzymatischen Reaktion beruht und es muß gewährleistet sein, daß genügend Substrat für die Nachweisreaktion vorhanden ist. Die exprimierte Luciferase soll quantitativ erfasst werden, daher ist bei höheren Zellzahlen mehr Substrat zu verwenden. Die Substratmenge konnte entsprechend der eingesetzten Zellzahl bzw. Zellextraktmenge angepasst werden.

Messzeit

Die Messzeit kann zwischen 1 und 1250 Sekunden frei gewählt werden. Zusätzlich kann die Anzahl der Intervalle pro Well auf maximal 50 eingestellt werden, innerhalb der gewählten Messdauer werden dann 50 Messpunkte registriert, die zusammen eine Signalkurve für jedes Well ergeben. Durch die maximale Zahl der Messintervalle werden eventuelle Intensitätsschwankungen besser berücksichtigt. Eine Erhöhung der Sensitivität konnte mittels Integration aller Messpunkte der Signalkurve bei einer Messdauer von 250 Sekunden pro Well erreicht werden.

Für die im folgenden beschriebenen Untersuchungen (vgl. Kapitel 4.8.2 und 4.9) wurden alle Parameter gleich gewählt, $7{,}5 \times 10^{-5}$ Zellen pro Petrischale, 60 µl Zellextrakt, 180 µl Substrat bei einer Messzeit von 250 Sekunden und 50 Intervallen je Messpunkt.

4.8.2 Einzelergebnisse

4.8.2.1 Phytosterole

Phytosterole sind Komponenten vieler pflanzlicher Öle. Sie sind Cholesterol strukturell ähnlich, unterscheiden sich von diesem nur in ihrer Seitenkette. Die am häufigsten vorkommenden Phytosterole sind β-Sitosterol, Campesterol und Stigmasterol, in freier Form oder verestert mit Fettsäuren. Die tägliche Phytosterolaufnahme in Nordeuropa liegt bei 200 bis 300 mg/Tag, bei Vegetariern und in Japan bei 300 bis 450 mg/Tag. Da den Phytosterolen eine Cholesterin-senkende Wirkung zugeschrieben wird, wird ihr Zusatz zu Margarine-Produkten in Deutschland diskutiert. Die Zulassung erfolgte bereits in Finnland, USA, Schweiz und den Niederlanden. [Baker et al, 1999]

Aufgrund einer Reihe unterschiedlichster Untersuchungen wurden estrogene Effekte der Phytosterole vermutet. Die in der Literatur beschriebenen Untersuchungen ergaben jedoch teilweise widersprüchliche Ergebnisse.

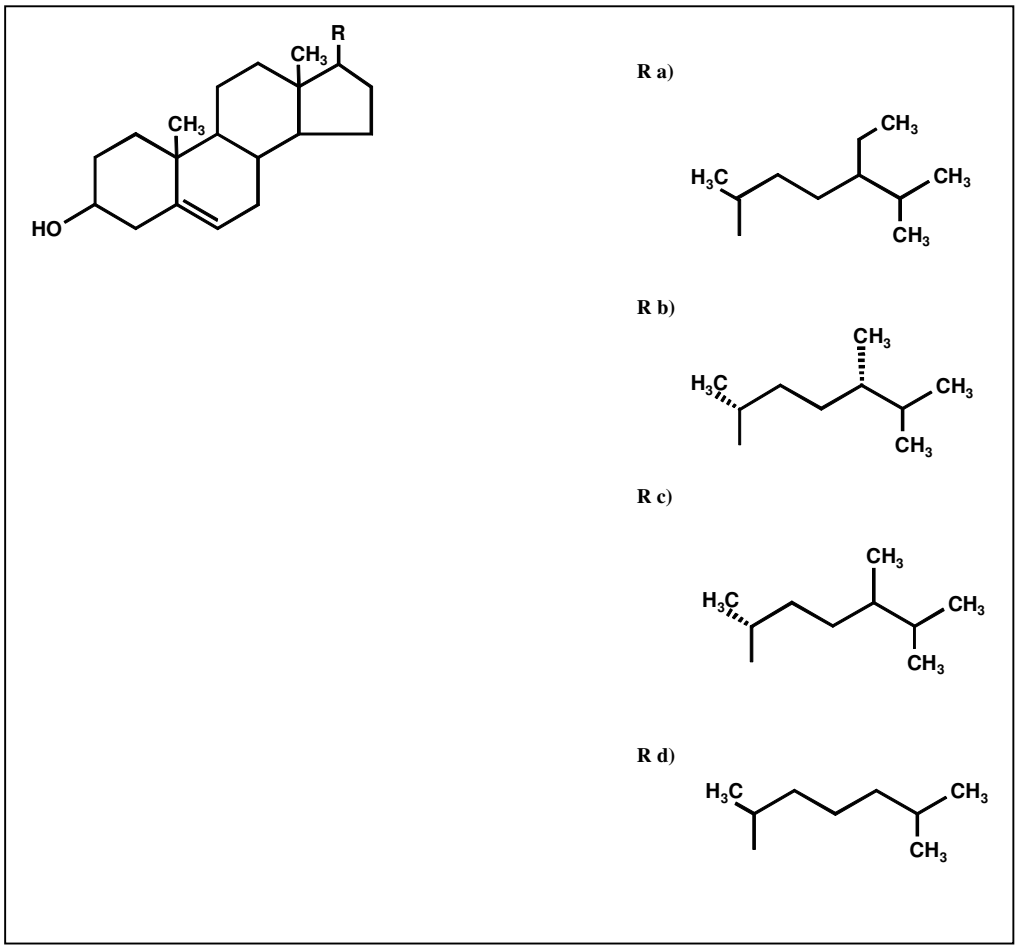
In Studien zur Bindungsaffinität am Estrogenrezeptor konnte beispielsweise eine Bindung von β-Sitosterol beobachtet werden, die jedoch 100000fach geringer war, als die von Estradiol. [Rosenblum et al, 1993] Andere *in vitro* Studien konnten einen Proliferationseffekt von β-Sitosterol in T-47D Zellen, jedoch nicht in MCF-7 Zellen nachweisen. [Mellanen et al, 1996]

Baker et al führten weitere Versuche zur Prüfung möglicher estrogener Effekte der Phytosterole durch. In Estrogenrezeptor-Bindungsstudien und im estrogeninduzierbaren Yeast-Screen-Assay wurde keine estrogene Aktivität detektiert. Im uterotrophen Assay konnte nach oraler Gabe der Phytosterole keine Erhöhung des Uterusgewichtes und damit ebenfalls kein estrogener Response nachgewiesen werden. Baker et al schlossen aus diesen Beobachtungen, daß die von ihnen untersuchten Phytosterole nicht an den Estrogenrezeptor binden und die Transkriptionsaktivität des humanen Estrogenrezeptors in dem verwendeten rekombinanten Hefestamm nicht induzieren. Im uterotrophen Assay wurde zusätzlich als Negativkontrolle Cholesterol getestet, das keine estrogenen Effekte zeigte. [Baker et al, 1999]

In der vorliegenden Arbeit wurde β-Sitosterol in zwei verschiedenen Reinheitsgraden, als technisches β-Sitosterol mit einem Reinheitsgrad von 97% und in Form eines gereinigten Extraktes aus Sojabohnen, sowie Cholesterol im MCF-7-Luc Reportergenassay geprüft. β-Sitosterol technisch und β-Sitosterol aus Sojaextrakt zeigten eine signifikante Reportergeninduktion, wobei das Sojaextrakt das Plateau des maximalen Estradiolresponse

bereits ab einer Konzentration von 10 nM erreicht. (vgl. Abb. 74) Der EC_{50}-Wert liegt im gleichen Größenbereich wie der von Estradiol, entsprechend ist kein deutlicher Unterschied des RP-und RE-Wertes festzustellen. (vgl. Tab. 5) Bei β-Sitosterol technisch liegt der EC_{50}-Wert ca. 2 Größenordnungen höher als bei Estradiol, ebenfalls der RP-Wert. Ein RE-Wert konnte nicht bestimmt werden, da nur bis zu einer Konzentration von 0,1 µM getestet wurde. Auffallend ist der Unterschied zwischen den beiden β-Sitosterolen. Ursache für die Diskrepanz der EC_{50}-Werte könnte in dem Reinheitsgrad der beiden Sitosterole liegen. In dem aus Sojabohnen gewonnen Extrakt sind neben β-Sitosterol weitere Verbindungen als Verunreinigungen enthalten. Als Hauptkomponenten konnten (laut Hersteller) die zu β-Sitosterol strukturverwandten Sterole Dihydrobrassicasterin und Campesterin identifiziert werden (vgl. Abb. 73). Eine Erklärung wäre, daß diese Sterole ebenfalls eine estrogene Aktivität besitzen, die zu additiven Effekten führen. Ein denkbarer Ansatz wäre die Untersuchung des jeweiligen Sterols im Transaktivierungsassay als Einzelsubstanz bzw. in unterschiedlichen Mischungen, um so eine mögliche additive Wirkung zu überprüfen. Diese Untersuchungen stehen noch an, dabei könnte sich der Reinheitsgrad der Einzelverbindungen als Problem herausstellen.
Ein wichtiger Befund, daß es sich bei den beobachteten Effekten um estrogenrezeptorvermittelte handelt, war die Antagonisierung der β-Sitosterol-Aktivität in Kombination mit ICI 182 780 1 µM.
In Übereinstimmung mit den im uterotrophen Assay erhaltenen Ergebnissen von Baker et al zeigte Cholesterol im MCF-7-Luc Reportergenassay keine Aktivität. [Baker et al, 1999]

Die von Baker et al beschriebenen Ergebnisse stehen im Gegensatz zu den hier erhaltenen. Ein möglicher Grund könnte der Einsatz unterschiedlicher *in vitro* Testsysteme sein (die humane Mammacarcinomzellinie MCF-7-Luc in dieser Arbeit und die bei Barker et al verwendeten Hefezellen). Es ist davon auszugehen, daß Enzymausstattung und Metabolisierungswege der MCF-7 Zellen und der Hefezellen unterschiedlich sind. Zusätzlich ist zu berücksichtigen, daß die Zellwände der Hefen einen anderen Aufbau besitzen. Es wäre deshalb möglich, daß die Aufnahme der Phytosterole in die Hefezellen nicht ausreichend gegeben ist. Die Inkubationsdauer kann ebenfalls eine Rolle spielen, die MCF-7-Luc Zellen werden 24 Stunden, die Hefezellen 4 Tage inkubiert. Nicht zu vernachlässigen ist auch der Reinheitsgrad der eingesetzten Phytosterole. Während β-Sitosterol mit einem Reinheitsgrad von 99 % keine estrogene Aktivität zeigte [Baker et al, 1999], konnte mit β-Sitosterol aus Sojaextrakt bzw. einem Reinheitsgrad von 97% eine deutliche estrogene Wirkung nachgewiesen werden.



R a) β-Sitosterol

R b) Dihydrobrassicasteri

R c) Campesterin

R d) Cholesterol

Abb. 73: Strukturen einiger Phytosterole und Cholesterol

Tab. 5: Zusammenfassung der berechneten RP- und RE-Werte der Phytosterole

Testverbindung	RP-Wert[1]	RE-Wert[2]
Estradiol	1	100
β-Sitosterol (Soja)	0,8	101
β-Sitosterol (technisch)	0,05	-
Cholesterol	-	-

1) RP-Wert: EC_{50} Estradiol/EC_{50} Testverb. 2) RE-Wert: Plateau Testverb. x 100/Plateau Estradiol

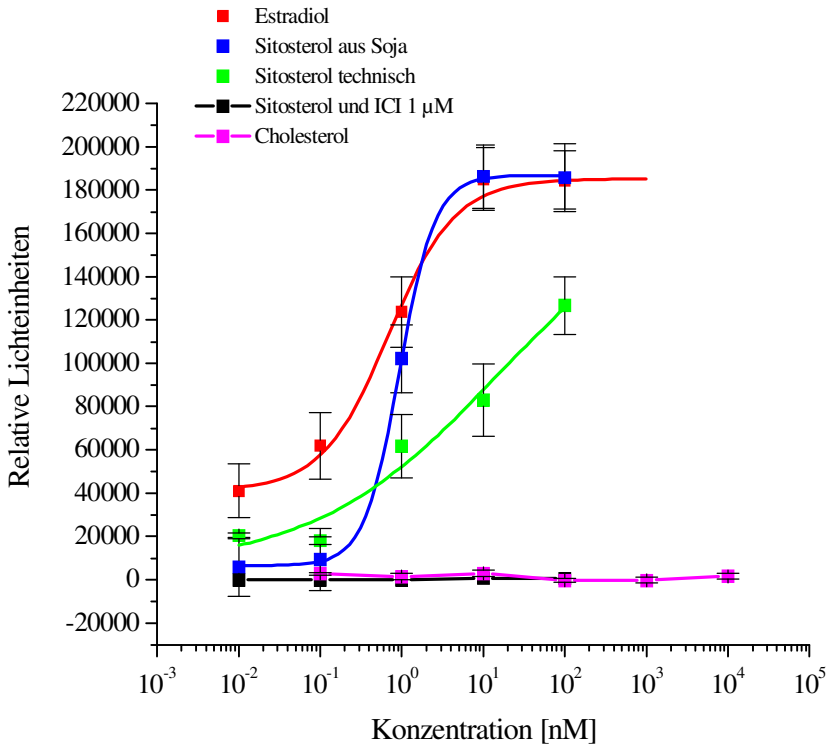


Abb. 74: Reportergeninduktion in MCF-7-Luc Zellen nach Inkubation mit β-Sitosterol und Cholesterol

4.8.2.2 Stilbenderivate

Diethylstilbestrol (DES) ist seit langem als potentes Estrogen bekannt. In den frühen 40er Jahren fand es Einsatz als Abortprophylaxe und postkoitales Kontrazeptivum. Nachdem DES als transplazentares Cancerogen identifiziert wurde, findet es heute nur noch in der Therapie hormonabhängiger Prostatacarcinome Anwendung. [Marquardt und Schäfer, 1994; Korach et al, 1985]

In den letzten Jahren waren vor allem Stilbenanaloga aus Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs aufgrund potentieller gesundheitlicher Effekte von Interesse.

Besonders Resveratrol ist derzeit Gegenstand vieler Untersuchungen da, neben antioxidativen Eigenschaften, weitere chemopräventive Wirkungen vermutet werden. Untersuchungen von Jang et al zeigten, daß Resveratrol einen wirksamen Hemmstoff der Cyclooxygenase II darstellt. Zusätzlich konnte im Dimethylbenzanthracen-induzierten Mäusehauttumormodell eine anticancerogene Aktivität von Resveratrol gezeigt werden. Die Cyclooxygenase II stellt

in diesem Modell ein wichtiges Schlüsselenzym für die Tumorpromotion in der Haut dar. [Jang et al, 1997]

Die bekannte estrogene Wirkung von DES veranlasste zur Prüfung weiterer Stilbene in dafür geeigneten Testsystemen. Die für Resveratrol in der Literatur beschriebenen Ergebnisse sind allerdings teilweise unterschiedlich.

Resveratrol induzierte die Proliferation von estrogenabhängigen T-47D Zellen in Konzentrationen von 3–10 µM. In Reportergenassays mit MCF-7 Zellen wurde eine superagonistische Wirkung von Resveratrol beobachtet, die maximale Reportergeninduktion war höher als bei Estradiol. In anderen Zellinien war keine superagonistische Wirkung nachweisbar. [Gehm et al, 1997]

Im Yeast-Assay zeigte Resveratrol eine schwache estrogene Aktivität. In transient transfizierten COS-1 Zellen, die entweder das Expressionplasmid für ERα oder ERβ sowie ein Reportergenplasmid mit Tandemkopien des Vitellogenin A2- oder luteinisierenden Hormon β- Promotors als ERE enthalten, konnte ebenfalls nur eine schwache estrogene Wirkung von Resveratrol detektiert werden. Eine hormonelle Wirkung von Resveratrol im uterotrophen Assay konnte nicht aufgezeigt werden. Im Gegensatz dazu zeigte DES in allen Testsystemen eine mit Estradiol vergleichbare estrogene Aktivität. [Ashby et al, 1999] Die Befunde des uterotrophen Assay wurden durch Turner et al unterstützt, die selbst bei hoher Resveratrol-Dosierung keine agonistischen Effekte nachweisen konnten. [Turner et al, 1999]

Lu und Serrero diskutieren einen gegensätzlichen, antiestrogenen Effekt von Resveratrol. Sie konnten eine dosisabhängige Hemmung der durch Estradiol induzierten Progesteronrezeptor-Expression durch Resveratrol in MCF-7 Zellen nachweisen. [Lu und Serrero, 1999]

Die Stilbene Resveratrol und Piceatannol wurden bereits im Proliferations- und Transaktivierungsassay auf ein estrogenes Potential im Vergleich zu den potenten Agonisten DES und Estradiol untersucht. Der maximal durch Resveratrol induzierte Stimulus im Transaktivierungsassay wurde bei einer Konzentration von 0,1 µM erzielt. Piceatannol zeigte eine schwächere Reportergeninduktion bei 0,1 µM. Im E-Screen-Assay konnte der beim Reportergenassay beobachtete Kurvenverlauf von Resveratrol mit einem Maximum bei der Konzentration von 10 µM nicht beobachtet werden. Die Proliferation der MCF-7 Zellen wurde hier erst ab einer Konzentration von 10 µM induziert. [Mußler, 1999] In den transienten Reportergensystemen HEK/ERα bzw. ERβ/pGL2VITA2 zeigte Resveratrol im Gegensatz zum stabilen Zellsystem bei einer Konzentration von 10 µM maximale Aktivität.

Der maximale durch Resveratrol erhaltene Response erreichte 80% (ERα) bzw. 90 % (ERβ) des Estradiolplateaus. (vgl. Kapitel 4.6.3)
Eine neue Verbindung mit stilbenoider Struktur ist das in Rhababer vorkommende Rhapontin bzw. dessen Deglucosid Rhaponticin. Rhapontin und Rhaponticin wurden im MCF-7-Luc-Reportergenassay untersucht. In Abbildung 76 sind die erhaltenen Ergebnisse dargestellt. Das Glucosid Rhapontin zeigt keine estrogene Aktivität, Rhaponticin bei hohen Konzentrationen (5 und 50 µM) 30 % der maximal durch Estradiol induzierten Reportergenantwort. In Tabelle 6 sind die aus den EC_{50}-Werten berechneten RP-Werte der verschiedenen Stilbene [Mußler, 1999] im Vergleich mit Rhaponticin zusammengefasst.

Betrachtet man die RP-Werte der einzelnen Verbindungen, so spielen vermutlich Anzahl und Position der Hydroxygruppen bei der Induktion des estrogenen Effektes im Transaktivierungsassay eine entscheidende Rolle. Von den bisher getesteten Stilbenen induziert Rhaponticin die Reportergenaktivität am schwächsten, eventuell hat darauf die in 4´-Position methylierte Hydroxygruppe Einfluß.
Durch Strukturvergleiche weiterer Stilbenanaloga könnten genauere Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden. Zukünftig wären damit eventuelle Voraussagen aufgrund von Struktureigenschaften nicht geprüfter Substanzen denkbar.

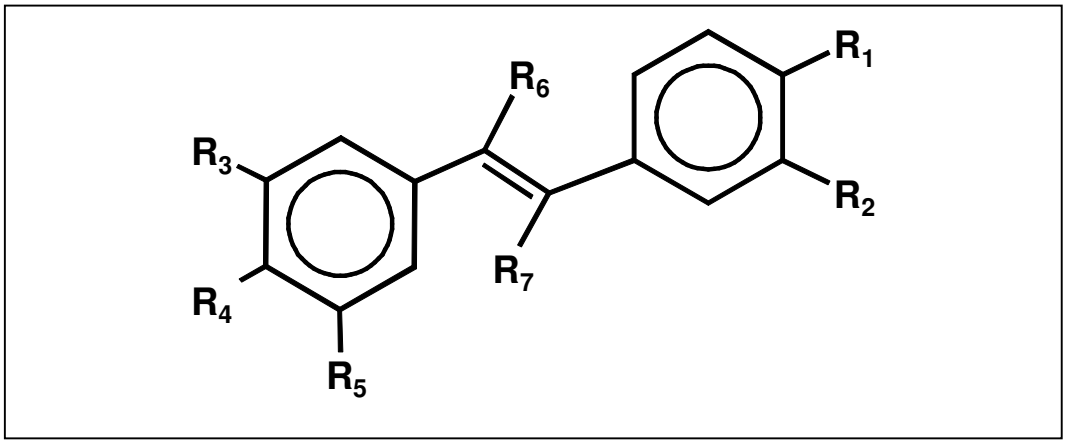


Abb. 75: Strukturen verschiedener Stilbene

DES:	R_1, R_4:OH	R_2, R_3,R_5:H	R_6,R_7:C_2H_5	
Resveratrol:	R_1, R_3, R_5: OH	R_2, R_4; R_6, R_7: H		
Piceatannol:	R_1, R_2, R_3, R_5: OH	R_4; R_6, R_7: H		
Rhaponticin:	R_2, R_3, R_5: OH	R_4; R_6, R_7: H	R_1: OCH_3	
Rhapontin:	R_2, R_5: OH	R_4; R_6, R_7: H	R_1: OCH_3	R_3: Glucose

Tab. 6: Zusammenfassung der berechneten RP- und RE-Werte verschiedener Stilbene (Reportergenassay)

Testverbindung	RP-Wert[1]	RE-Wert[2]
Estradiol	1	100
DES[3]	$5{,}9 \times 10^{-2}$	80
Resveratrol[3]	$7{,}4 \times 10^{-3}$	-
Piceatannol[3]	3×10^{-5}	-
Rhaponticin	$1{,}6 \times 10^{-6}$	-
Rhapontin	-	-

1) EC_{50} Estradiol/EC_{50} Testverb. 2) Plateau Testverb. x 100/Plateau Estradiol

3) [Mußler, 1999]

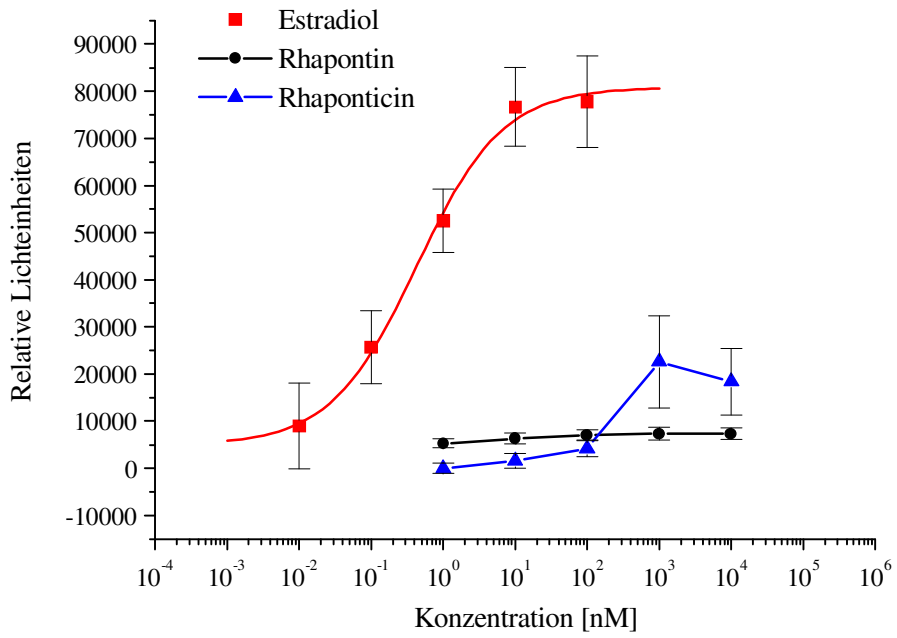
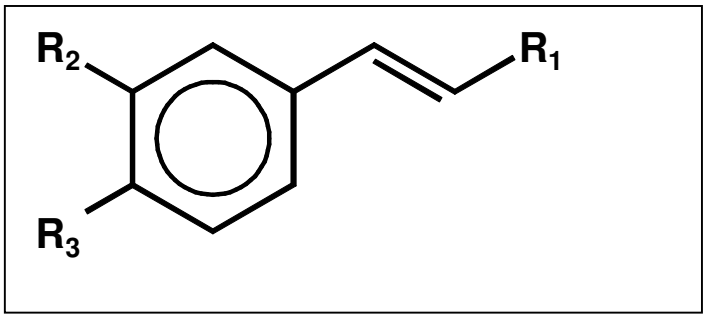


Abb. 76: Reportergeninduktion in MCF-7-Luc-Zellen nach Inkubation mit Rhapontin und Rhaponticin

4.8.2.3 Zimtsäureanaloga

Durch Strukturvergleiche der Alkylphenole Nonyl- und Octylphenol mit strukturähnlichen Substanzen ergaben sich Hinweise auf weitere estrogenaktive Verbindungen *in vitro*. Diese können natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sein. Als mögliche estrogenaktive Verbindung wurde Zimtsäuremethylester bereits im Transaktivierungsassay untersucht. Zimtsäuremethylester zeigte bei einer Konzentration von 100 nM die gleiche Reportergeninduktion wie Estradiol ab einer Konzentration von 10 nM. Im Gegensatz dazu konnte bei der freien Säure keine Reportergeninduktion beobachtet werden. [Mußler, 1999] Zimtsäure und Zimtsäuremethylester weisen beide ähnlich den Stilbenverbindungen eine Doppelbindung auf. Im Rahmen dieser Arbeit wurden nun weitere Strukturhomologe der Zimtsäure (vgl. Abb. 77) im Transaktivierungsassay untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 zusammengefasst und zeigen, daß Kaffee-, Ferula- und p-Cumarsäure analog Zimtsäure keine estrogene Aktiviät im transgenen Reportergensystem besitzen. Das könnte unter Umständen auf das Vorliegen einer Carboxylgruppe zurückgeführt werden, die leicht decarboxyliert. Modifizierende Einflüsse anderer funktioneller Gruppen (Nitro-, Halogen-, etc.) müßten deshalb eingehender untersucht werden, um vertiefende Aussagen über Struktur-Wirkungsbeziehungen machen zu können.

Untersuchungen anderer strukturähnlicher Verbindungen, Vanillin, Eugenol und Anethol im Reportergenassay ergaben ebenfalls keine Hinweise auf ein estrogenes Potenial. Diese Substanzen enthalten im Gegensatz zu oben beschriebenen keine Säurefunktion, und außer Anethol auch keine stilbenoide Struktur, worauf das Ausbleiben einer estrogenen Aktivität zurückgeführt werden könnte.



Zimtsäure:	R1: COOH R2, R3: H
Zimtsäuremethylester:	R1: COOCH3 R2, R3: H
Kaffeesäure:	R1: COOH R2, R3: OH
Ferulasäure:	R1: COOH R2: CH3 R3: OH
p-Cumarsäure:	R1: COOH R2 : H R3 : OH

Abb. 77: Strukturen von Zimtsäure und strukturähnlichen Verbindungen

Tab. 7: Vergleichende Darstellung der relativen Potenz von Zimtsäure und Zimtsäureanaloga sowie strukturähnlichen Verbindungen

Testsubstanz	**RP-Wert[1]**
Estradiol	1
Zimtsäure[2]	-
Zimtsäuremethylester[2]	$2{,}5 \times 10^{-2}$
Kaffeesäure	-
Ferulasäure	-
p-Cumarsäure	-
Vanillin	-
Eugenol	-
Anethol	-

1) RP-Wert: EC_{50} Estradiol/EC_{50} Testverb.

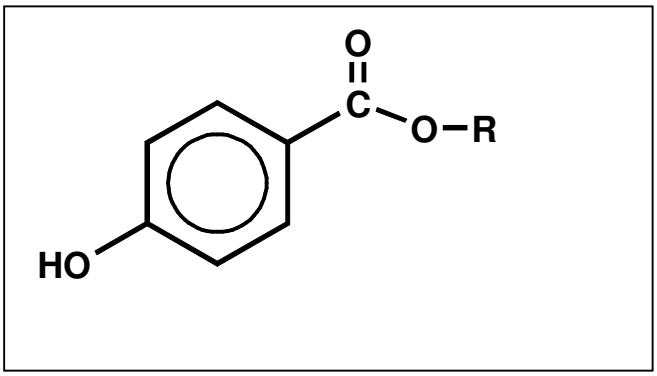
2) [Mußler, 1999]

4.8.2.4 Parabene

Parabene werden als Konservierungsmittel in pharmazeutischen und kosmetischen Produkten eingesetzt. Sie weisen eine geringe akute Toxizität, eine hohe Stabilität gegenüber pH- und Temperatur-Schwankungen, ein breites Wirkungsspektrum sowie gute Bioabbaubarkeit auf und sind daher weltweit im Einsatz. Die tägliche Paraben-Aufnahme des Menschen liegt bei 4-6 mg/kg. *In vivo* Untersuchungen lassen vermuten, daß Parabene im allgemeinen einer schnellen Metabolisierung und Exkretion unterliegen. Möglicherweise zirkulieren allerdings niedrige Level nicht metabolisierter Parabene im Blut. [Routledge et al, 1998] Aufgrund ihrer vielfältigen und weitverbreiteten Anwendung sowie ihrer Strukturähnlichkeit zu den bekannten estrogenaktiven Alkylphenolen wurden verschiedene Parabene auf eine potentielle estrogene Aktivität untersucht [Routledge et al, 1998] Untersuchungen der Parabene im Estrogenrezeptorbindungsassay ergaben, daß Butylparaben eine fünfach niedrigere Affinität im Vergleich zu DES besitzt. Weiter zeigte sich im *in vitro* Hefeassay, daß alle getesteten Parabene (Methyl-, Ethyl-, Propyl- und Butylester) eine geringe estrogene Aktivität aufwiesen. Dabei war Butylparaben das potenteste mit einer 10000fach geringeren Aktivität als Estradiol. [Routledge et al, 1998] Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die beobachtete Aktivität aller Parbene durch Kombination mit 4-Hydroxytamoxifen inhibiert werden kann, was darauf hinweist, daß die beobachteten Effekte estrogenrezeptorvermittelt sind. Im uterotrophen Assay wurde ein 100000fach geringere Wirksamkeit von Butylparaben im Vergleich zu Estradiol nachgewiesen. [Routledge et al, 1998]

Unterstützt durch diese Befunde sollten verschiedene Parabene (Methyl-, Ethyl-; Propyl- und Butylester sowie die freie Säure; vgl. Abb. 78) im Transaktivierungsassay mit der stabil transfizierten MCF-7-Luc Zellinie untersucht werden. Die Inkubation erfolgte serumfrei in Konzentrationen von 0,1 µM bis 0,01 nM. Als Positivkontrolle wurde Estradiol in verschiedenen Konzentrationen mitgeführt, es ergab sich die erwartete Dosis-Wirkungskurve. Die detektierten Lichtsignale der Parabene lagen in allen untersuchten Konzentrationen unterhalb Estradiol 0,01 nM (vgl. Abb. 79). Im hier verwendeten *in vitro* Reportergensystem konnte eine estrogene Aktivität der Parabene nicht bestätigt werden.
Ein Grund für die mit Routledge et al nicht übereinstimmenden Ergebnisse könnte die Verwendung verschiedener Testsysteme sein, die sich hinsichtlich ihrer Enzymausstattung unterscheiden. Die in den MCF-7 Zellen vorhandenen Esterasen könnten möglicherweise die Esterbindungen spalten, so daß schließlich freie Säuren vorliegen, die schnell decarboxylieren. Über die Enzymausstattung der Hefen, speziell über vorhandene Esterasen

ist nichts bekannt. Des weiteren sind keine Aussagen dahingehend zu treffen, ob eine Aufnahme der Parabene in die MCF-7 Zellen erfolgt. Zusätzlich könnte die unterschiedliche Inkubationsdauer zwischen Yeast-Assay und MCF-7-Luc-System eine Rolle spielen. Die MCF-7-Luc Zellen werden 24 Stunden mit den Testsubstanzen inkubiert, die Hefezellen 84 Stunden. Die Inkubationsdauer in den MCF-7 Zellen könnte für eine ausreichende Expression der Luciferase damit auch zu kurz sein. Im Gegensatz zum Yeast-Assay ist der hier eingesetzte Transaktivierungsassay durch den Einsatz menschlicher Brustkrebszellen jedoch näher am Menschen.



Paraben:	R:H
Methyl-Paraben:	R:CH_3
Ethyl-Paraben:	R:C_2H_5
Propylparaben:	R:C_3H_7
Butyl-Paraben:	R:C_4H_9

Abb. 78: Strukturen der Parabene

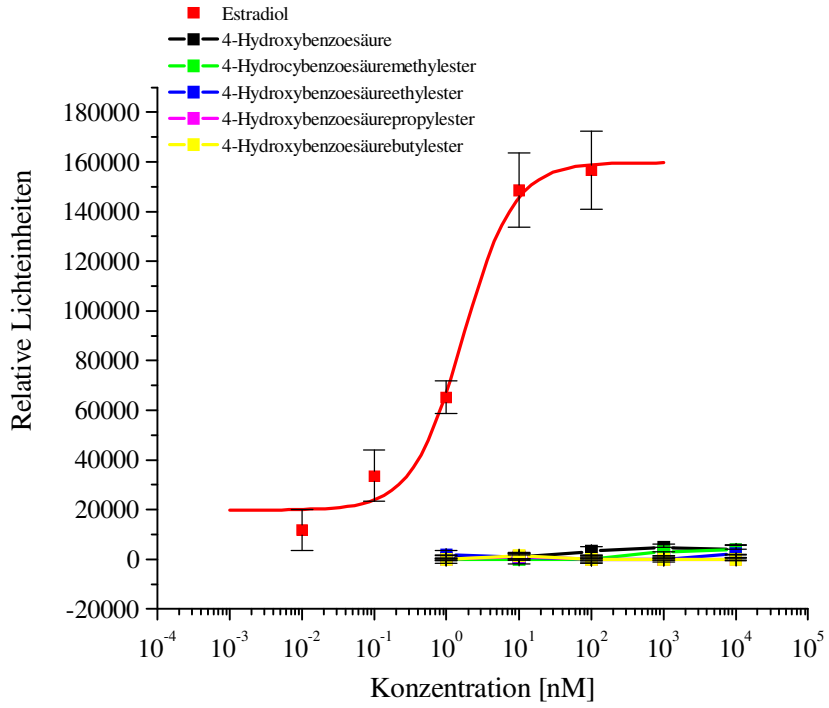


Abb. 79: Reportergeninduktion in MCF-7-Luc Zellen durch Parabene

4.8.2.5 Tamoxifenanaloga

Die Validierung des MCF-7-Luc Systems erfolgte mit dem reinen Antiestrogen ICI 182 780 sowie dem partiellen Agonisten Tamoxifen. Tamoxifen und ICI 182 780 können in Kombination mit Estradiol die Reportergeninduktion antagonisieren. Während ICI 182 780 keine agonistische Aktivität zeigt, verhält sich Tamoxifen je nach Konzentration als potentieller Agonist bzw. Antagonist am Estrogenrezeptor. [Mußler, 1999]

Es sollten Phosphotriesteranaloge des 4-Hydroxytamoxifens (4-Hydroxytamoxifen ist die eigentliche Wirkkomponente von Tamoxifen), AMG 172 und AMG 173 (vgl. Abb. 80) in der MCF-7-Luc Zellinie auf ein potentielles antagonistisches Potential hin untersucht werden. Die Inkubation erfolgte in Kombination mit Estradiol 1 nM, Abbildung 81 zeigt die erhaltenen Ergebnisse. In diese Darstellung wurde zum Vergleich die Kurve der Kombination Estradiol 1 nM und Tamoxifen 1 bis 10000 nM aufgenommen. [Mußler, 1999] Es ergab sich für AMG 172 und 173 ein sehr ähnlicher Kurvenverlauf wie für Tamoxifen, beide Verbindungen führen ebenfalls zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung des Estradiolsignals.

Partielle und vollständige Antiestrogene bieten für *in vitro* Testsysteme eine optimale Möglichkeit zur Validierung. Testansätze, die mit der Kombination Estradiol im physiologischen Konzentrationsbereich und den Antagonisten in therapeutischer Dosierung durchgeführt werden, führen zu einer vollständigen Inhibierung der hormonellen Antwort. Für das MCF-7-Luc Reportergensystem konnte gezeigt werden, daß antagonistische und kompetitive Effekte ebenfalls erfassbar sind.

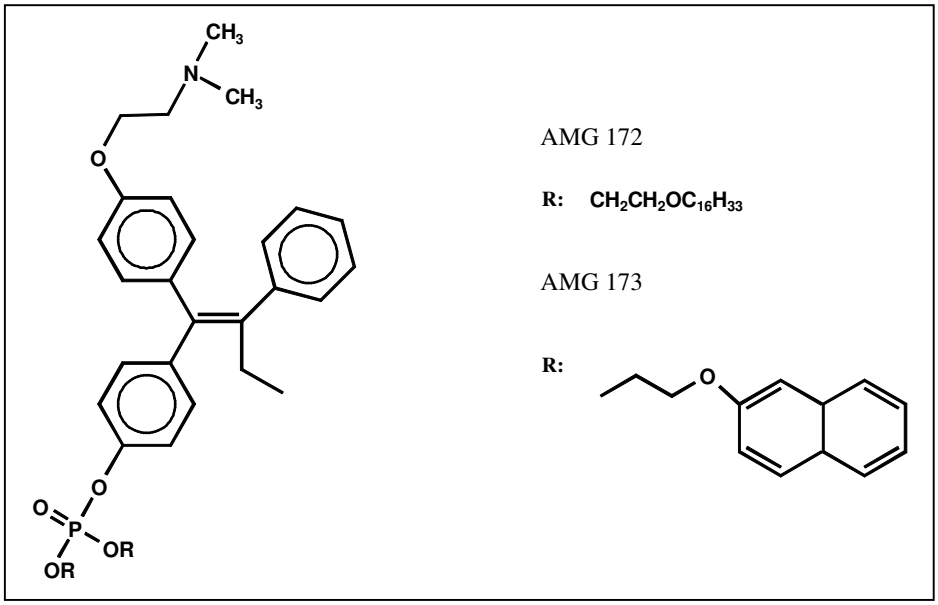


Abb. 80: Strukturen der 4-Hydroxytamoxifen-Analoga

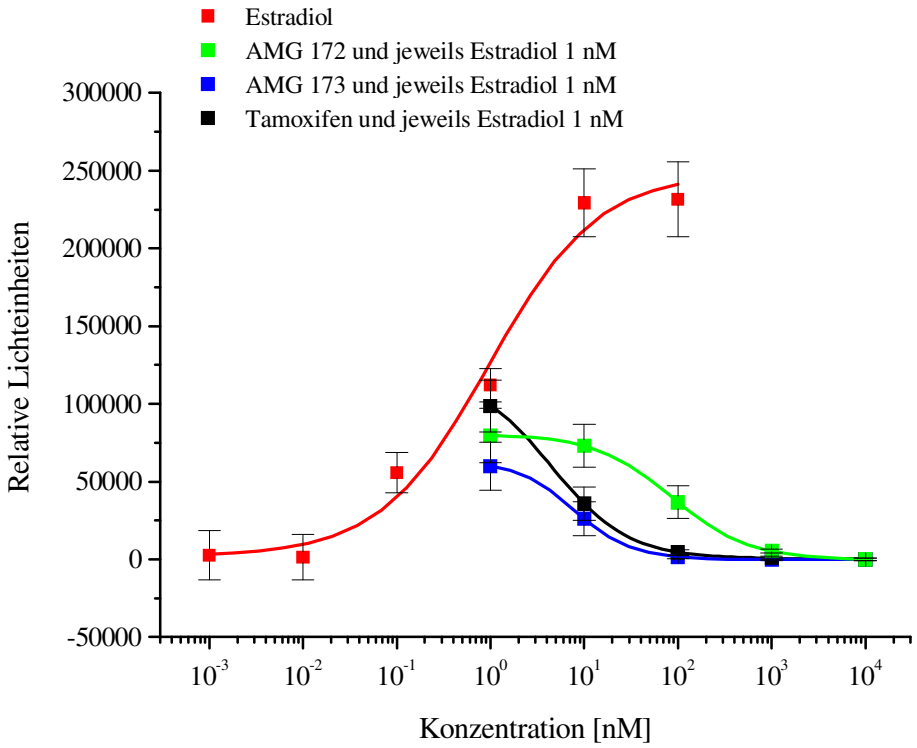


Abb. 81: Reportergeninduktion in MCF-7-Luc Zellen durch Kombination von AMG 172 zw. 173 und Estradiol 1 nM

4.9 Kombinationsexperimente *in vitro*

Im Vergleich zu Estradiol sind viele Fremdstoffe meist nur schwache Estrogenrezeptoragonisten. Dies führte zu der Annahme, daß diese lediglich einen geringen Einfluß auf das endokrine System nehmen. In Kombinationsexperimenten verschiedener Organochlorverbindungen in Hefezellen, die den Estrogenrezeptor exprimieren, wurden synergistische Wirkungen der eingesetzten Mischungen beschrieben. [Arnold et al, 1996] Diese Untersuchungen wurden von anderen Gruppen wiederholt, die zwar keine synergistischen Effekte zeigen konnten, teilweise konnten aber additive Wirkungen der Kombinationen beobachtet werden. [Gaido et al, 1997; Ramamoorthy et al, 1997; Graumann et al, 1999] Aufgrund der bisherigen Untersuchungen stellt sich nun weiter die Frage, ob die schwache estrogene Potenz der Einzelverbindungen unterschätzt wird bzw. inwiefern die gleichzeitige Exposition gegenüber einer Mischung der Einzelverbindungen bzw. in

Kombination mit dem physiologischen Liganden Estradiol zu additiven bzw. überaddditiven Effekten führen kann.
Im Rahmen dieser Arbeit sollten daher die vom Projektgeber ausgewählten Substanzen in Kombination mit dem endogenen Hormon Estradiol auf mögliche additive bzw. überadditive Wirkungen getestet werden.

Für die Bestimmung des hormonellen Potentials von Kombinationen der physiologischen Estradiolkonzentration (1nM) mit Fremdstoffkonzentrationen von 1-1000 nM wurde die stabil transfizierte humane Mammacarcinomzellinie MCF-7-Luciferase (MVLN-Zellen) verwendet. Dieses Testsystem ermöglicht im Vergleich zu anderen Methoden eine sehr effiziente Testdurchführung. So kann beispielsweise mittels E-Screen-Assay ein weitaus geringerer Probendurchsatz erreicht werden. Zudem ist bei dieser Methode zu berücksichtigen, daß weitere Signaltransduktionswege durch Estradiol bzw. die Substanz beeinflusst werden können.
In Abbildung 82 bis 86 sind die Ergebnisse der einzelnen Kombinationsmessungen dargestellt. Jedes Einzelergebnis repräsentiert jeweils mindestens vier unabhängige Einzelmessungen. Die Schwankungsbreiten der Kombinationsversuche sind deutlich höher als die bei Einzelmessungen beobachteten. Die Ergebnisse sind in den folgenden Abbildungen einheitlich dargestellt. Die schwarzen Balken (Nummer 1 bis 5) repräsentieren die Reportergeninduktion durch Estradiol in den Konzentrationen 0,01 bis 100 nM, die grünen Balken (Nummer 10 bis 13) die Reportergeninduktion durch die Einzelsubstanzen, während die blauen Balken die Kombination Estradiol 1 nM mit dem Fremdstoff in zunehmender Konzentration von 1 bis 1000 nM darstellen (Nummer 6 bis 9).

Die Reportergeninduktion von Estradiol ist deutlich konzentrationsabhängig und zeigt nach Transfer in eine Konzentrations-Wirkungskurve den typischen sigmoidalen Verlauf mit einem EC_{50}-Wert (Wendepunkt der Kurve) bei etwa 1 nM. Bisphenol A besitzt bei niedrigen Konzentrationen (1-10 nM) einen geringen Effekt (unter 20 % der maximalen Response von Estradiol), bei höheren Konzentrationen (100–1000 nM) wird eine ungefähr halbmaximale Reportergeninduktion beobachtet. Die Kombinationen von Bisphenol A und Estradiol (1 nM) erreichen alle das Sättigungsplateau, das auch durch unphysiologisch hohe Estradiolkonzentrationen erreicht wird. Die Kombination von Estradiol und Bisphenol A führt vor allem bei niedrigen Bisphenol A Konzentrationen (1-10 nM) zu einer hohen

Reportergeninduktion, die das Plateau der hohen Estradiolkonzentrationen jedoch nicht überschreitet. (vgl. Abb. 82)

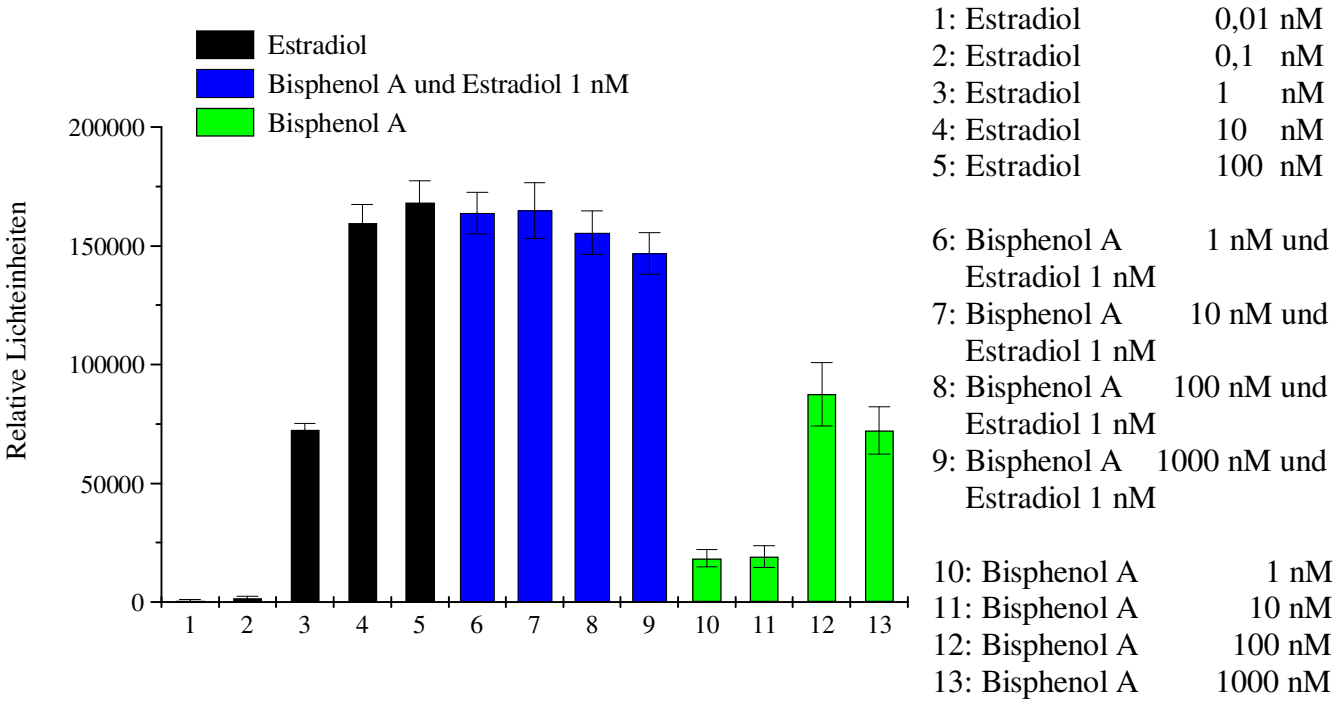


Abb. 82: Reportergeninduktion durch Estradiol, Bisphenol A und Kombination von Estradiol und Bisphenol A

o,p´-DDT zeigt als Einzelsubstanz im Bereich von 1 bis 100 nM eine geringe Reportergeninduktion, bei einer Konzentration von 1000 nM ergibt sich als Response etwa ein Drittel der maximalen Reportergenantwort durch Estradiol. Bei Kombination von Estradiol (1nM) und o,p´-DDT in Konzentrationen von 1 bis 100 nM konnte eine annähernd maximale Reportergeninduktion beobachtet werden, während sich bei der Kombination mit 1000 nM eine Additivität beider Einzelaktivitäten ergibt. Eine Induktion über das Estradiolplateau ist auch hier bei keiner Kombination erkennbar. Die bei der Kombination Estradiol (1 nM) und o,p´-DDT 100 bzw. 1000 nM aufgetretene Abnahme des Reportergensignals könnte auf partiell antagonistische Wirkungen hoher o,p´-DDT-Konzentrationen zurückzuführen sein. (vgl. Abb. 83)

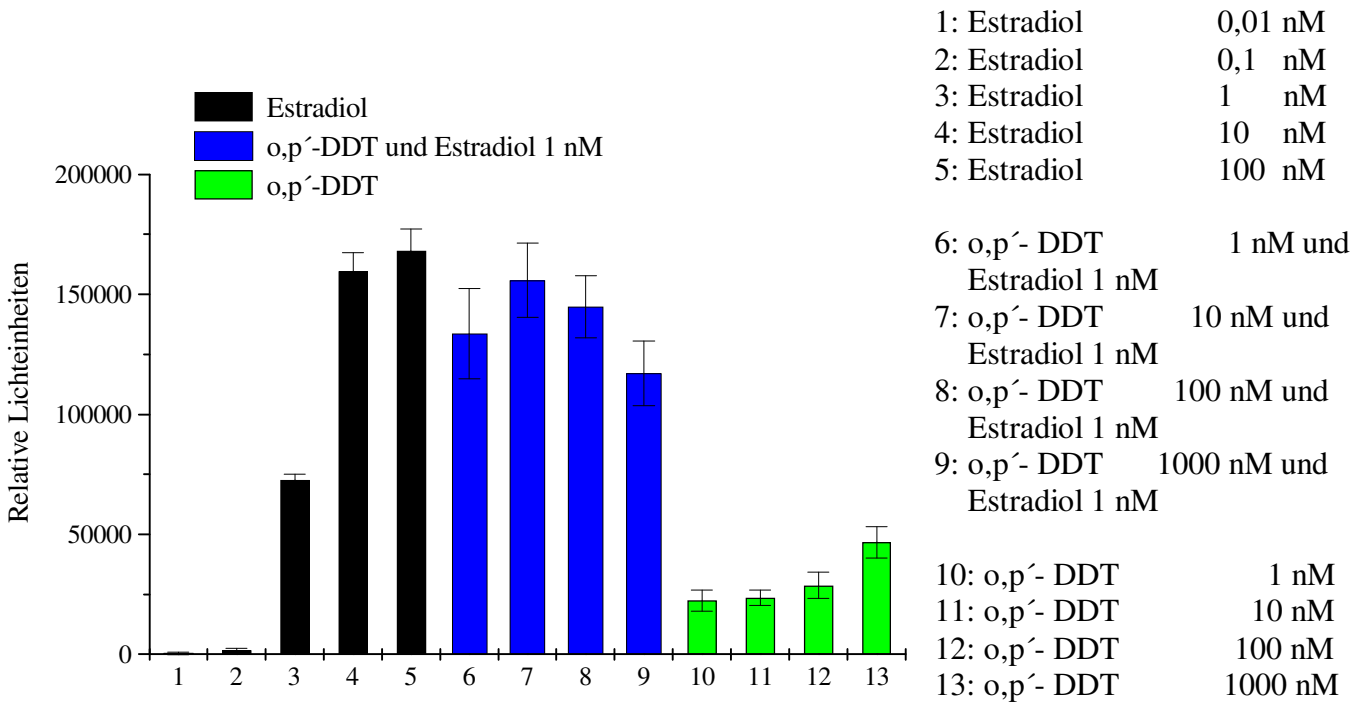
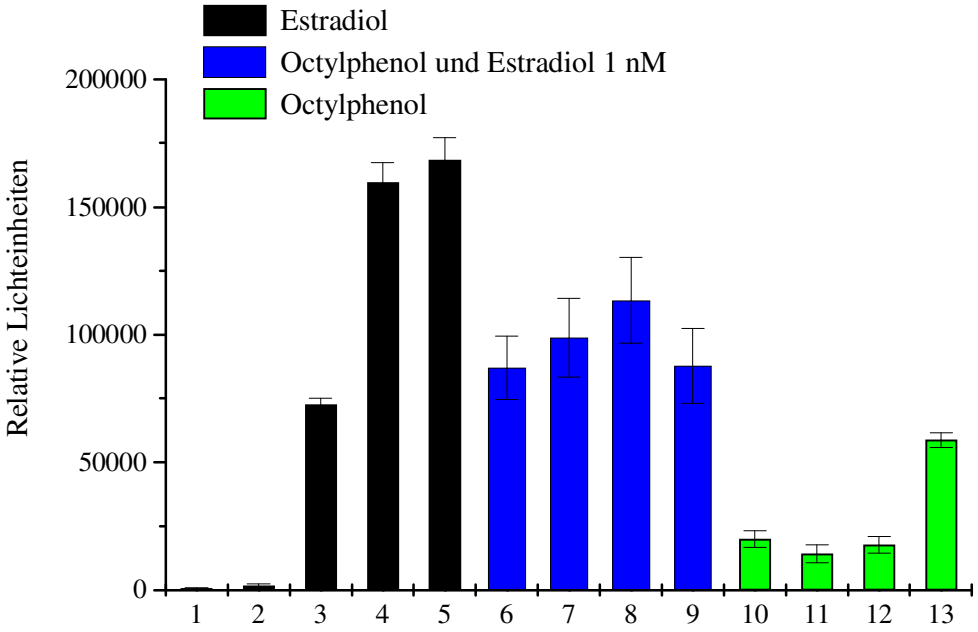


Abb. 83: Reportergeninduktion durch Estradiol, o,p´-DDT und Kombination von Estradiol und o,p´-DDT

Isomerenreines p-tert.-Octylphenol und Nonylphenol (technisch) induzieren als Einzelverbindung nur geringe Reportergeninduktionen. In Kombination mit Estradiol (1nM) konnte bei beiden Verbindungen eine hohe Reportergenantwort beobachtet werden, die ebenfalls nicht über das maximal durch Estradiol induzierte Plateau reicht. Die Ergebnisse der Kombinationen werden durch cytotoxische Effekte beeinflusst, die vor allem bei hohen Substanzkonzentrationen der Alkylphenole zum Tragen kommen. Bei hohen p-tert.-Octylphenol- bzw. Nonylphenolkonzentrationen könnten sich gemischt agonistische/antagonistische Wirkungen der Verbindungen mit cytotoxischen Effekten, die Einfluß auf die Reportergenstimulation nehmen, überlagern.

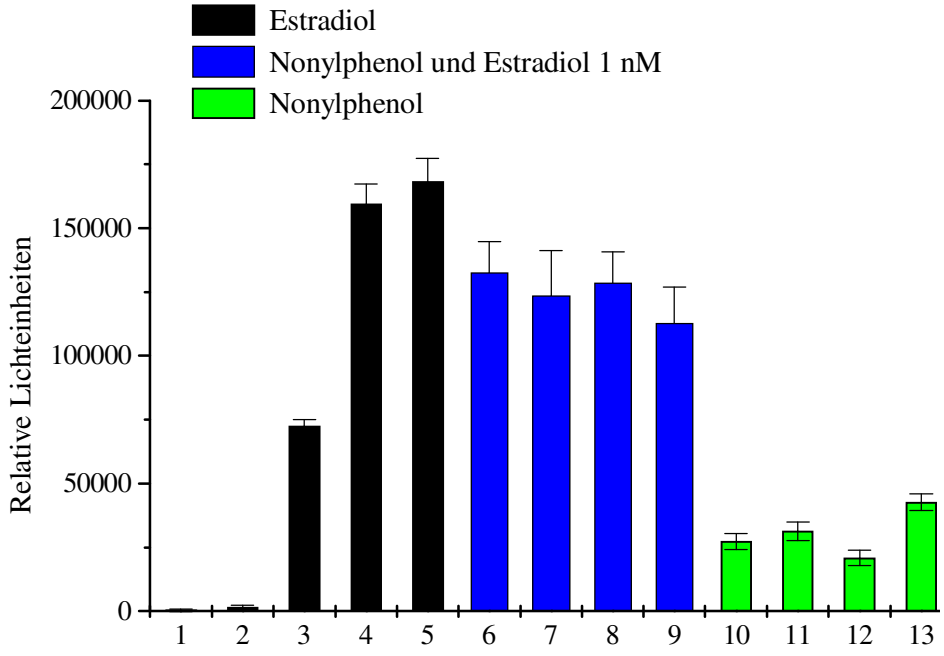


1: Estradiol 0,01 nM
2: Estradiol 0,1 nM
3: Estradiol 1 nM
4: Estradiol 10 nM
5: Estradiol 100 nM

6: Octylphenol 1 nM und Estradiol 1 nM
7: Octylphenol 10 nM und Estradiol 1 nM
8: Octylphenol 100 nM und Estradiol 1 nM
9: Octylphenol 1000 nM und Estradiol 1 nM

10: Octylphenol 1 nM
11: Octylphenol 10 nM
12: Octylphenol 100 nM
13: Octylphenol 1000 nM

Abb. 84: Reportergeninduktion durch Estradiol, Octylphenol und Kombination von Estradiol und Octylphenol



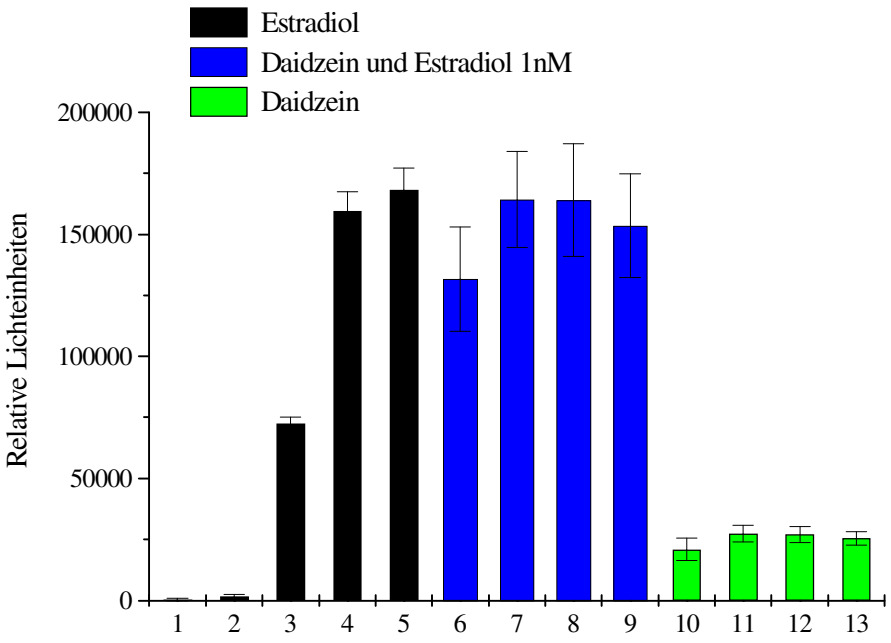
1: Estradiol 0,01 nM
2: Estradiol 0,1 nM
3: Estradiol 1 nM
4: Estradiol 10 nM
5: Estradiol 100 nM

6: Nonylphenol 1 nM und Estradiol 1 nM
7: Nonylphenol 10 nM und Estradiol 1 nM
8: Nonylphenol 100 nM und Estradiol 1 nM
9: Nonylphenol 1000 nM und Estradiol 1 nM

10: Nonylphenol 1 nM
11: Nonylphenol 10 nM
12: Nonylphenol 100 nM
13: Nonylphenol 1000 nM

Abb. 85: Reportergeninduktion durch Estradiol, Nonylphenol und Kombination von Estradiol und Nonylphenol

Daidzein zeigt als Einzelverbindung in den Konzentrationen von 1 bis 1000 nM eine relativ schwache estrogene Aktivität (kleiner als 20% der maximalen Estradiolinduktion). In Kombination mit Estradiol 1 nM wurden Reportergeninduktionen bis in das maximale Plateau der unphysiologischen Estradiolkonzentrationen beobachtet. Eine Induktion über das Sättigungplateau konnte auch hier nicht verzeichnet werden. (vgl. Abb. 86)



1: Estradiol 0,01 nM
2: Estradiol 0,1 nM
3: Estradiol 1 nM
4: Estradiol 10 nM
5: Estradiol 100 nM

6: Daidzein 1 nM und Estradiol 1 nM
7: Daidzein 10 nM und Estradiol 1 nM
8: Daidzein 100 nM und Estradiol 1 nM
9: Daidzein 1000 nM und Estradiol 1 nM

10: Daidzein 1 nM
11: Daidzein 10 nM
12: Daidzein 100 nM
13: Daidzein 1000 nM

Abb. 86: Reportergeninduktion durch Estradiol, Daidzein und Kombination von Estradiol und Daidzein

Die durchgeführten Kombinationsexperimente zeigten durchgehend hohe Reportergeninduktionen der Kombination Estradiol 1 nM und Testsubstanz (Konzentration 1 nM bis 1000 nM). Die beobachteten Effekte führten in allen Fällen maximal bis zum Wirkunkungsplateau von Estradiol. Die höchsten Konzentrationen der Testsubstanzen könnten sich als partiell antagonistische Wirkungen der Verbindungen auswirken. Weiter ist zu berücksichtigen, daß die für die Kombinationsversuche verwendete Konzentration von 1

nM dem EC_{50}-Wert der Estradiol-Kurve entspricht. Bei dieser Konzentration ist bereits 50% der Rezeptorpopulation besetzt. Der extrem steile Anstieg der Kurve kann möglicherweise dazu führen, daß schon geringe zusätzliche Wirkstoffkonzentrationen am Rezeptor zu einem scheinbar überadditiven und somit nicht linearen Effekt führen. Weitere Untersuchungen in diesem steil verlaufenden Kurvenbereich könnten Aufschluß über die beobachteten überadditiven Effekte der Kombination Estradiol und Testsubstanz geben.

Die Kombinationsexperimente wurden durch weiterführende Untersuchungen ergänzt. Hierzu sollte überprüft werden, ob durch die zusätzliche Inkubation mit dem kompletten Antagonisten ICI 182 780 das Reportergensignal der Kombination Estradiol 1 nM und Fremdstoff 1 bis 1000 nM vollständig antagonisiert werden kann. Aus Gründen der Übersicht wurden diese Ergebnisse nicht in die oben dargestellten Abbildungen aufgenommen. Die Kombination von ICI 182 780 1µM, Estradiol 1nM und Fremdstoff 1 bis 1000 nM zeigte bei allen untersuchten Verbindungen einheitliche Ergebnisse. Durch die zusätzliche Gabe von ICI 182 780 konnte in allen Versuchen die Reportergeninduktion antagonisiert werden, die Reportergenantwort lag im Bereich des Kontrollwertes bzw. darunter. Diese Ergebnisse bestätigen die bei den Untersuchungen der Einzelverbindungen erhaltenen, in denen das Antiestrogen ICI 182 780 ab einer Konzentration von 1 µM die Reportergeninduktion potenter Agonisten vollständig inhibiert.

Für weitere Experimente mit einer Estradiolkonzentration, die zu eine Reportergeninduktion knapp oberhalb der Signifikanzschwelle führt, wurde die Konzentration von 0,1 nM Estradiol ausgewählt. Es wurden die gleichen Konzentrationen der Einzelverbindungen mit Estradiol 0,1 nM kombiniert. Die durchgeführten Kombinationsversuche zeigten hier alle lediglich eine Addition der jeweiligen einzelnen Reportergeninduktion (nicht dargestellt). [pers. Mitteilung Knerr]

Bei ersten Versuchen wurde eine Kombination von Estradiol 10 nM und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanzen eingesetzt. Hier konnte keine höhere Reportergeninduktion beobachtet werden, da die Konzentration von 10 nM Estradiol bereits im Plateau der Dosis-Wirkungskurve liegt, die Rezeptorpopulation also bereits gesättigt ist und der Effekt durch eine zusätzliche Substanzgabe nicht mehr gesteigert werden kann.

Diese Ergebnisse verdeutlichen, welchen Einfluß die gewählte Estradiolkonzentration im verwendeten Testsystem einnehmen kann.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß eine genaue Analyse von Kombinationseffekten bzw. eine exakte Unterscheidung von additiven, synergistischen oder antagonistischen Effekten mittels Isobolen-Methode möglich ist. Zur Auswertung von Kombinationseffekten mit Hilfe der Isobolen-Darstellung müssen die jeweiligen Dosis-Wirkungskurven der beiden Einzelsubstanzen A und B vorliegen sowie die Dosis-Wirkungskurve, für die die Substanzen A und B in äquimolaren Konzentrationen kombiniert wurden. Nach Darstellung der Isobolen bei einem bestimmten Effekt kann, ausgehend von der erhaltenen Isobolen-Form, eine genaue Unterscheidung von additiven, synergistischen oder antagonistischen Kombinationseffekten getroffen werden. [Kortenkamp und Altenburger, 1998]
Aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Datenlage ist eine Auswertung nach der Isobolen-Methode nicht möglich. Somit kann keine Entscheidung darüber getroffen werden, ob es sich bei den beobachteten Kombinationseffekten um additive, synergitische oder antagonistische Effekte handelt. Als wichtigste Aussage, die anhand der Datenlage möglich ist, ist festzustellen, daß keine der durch die Kombinationen induzierten Reportergenantworten das maximal durch Estradiol induzierte Wirkungsplatau übersteigt.

4.10 MCF-7/pSEAP2VITA2 Testsystem

Da Bedarf an der Entwicklung neuer Testsysteme besteht, sollte neben dem bereits bestehenden MCF-7-Luc Zellsystem ein eigenes Reportergenmodell aufgebaut werden. Als Reportergen wurde die sekretierbare alkalische Phosphatase (SEAP) gewählt, die im Vergleich zu anderen Reportergenen eine höhere Sensitivität aufweist. Die Sekretion der SEAP ins Kulturmedium gewährleistet zusätzlich eine einfache Testdurchführung, da keine Zellextrakte benötigt werden. Die spezifische Nachweisreaktion der SEAP kann mittels Chemilumineszenzreaktion im Luminometer erfolgen. [Berger et al; 1988; Bronstein et al; 1994b] Das Lichtsignal der SEAP ist über bis zu fünf Zehnerpotenzen linear, der Konzentration der SEAP proportional und über eine Stunde annähernd konstant. [Boehringer, 1997] In ersten Versuchen wurde das Lichtsignal über 20 Minuten, dann über 10 Minuten gemessen, da das Signal schnell ein Plateau erreicht und die Verkürzung der Messdauer pro Probe einen erheblichen Zeitgewinn bedeutete.

4.10.1 Transiente Transfektion der MCF-7 Zellen mit pSEAP2/VITA2

Die MCF-7 Zellen wurden mittels Elektroporation mit dem pSEAP2/VITA2-Vektor transfiziert. In den SEAP2-Vektor wurde der Vitellogenin A2 Promotor kloniert (siehe Kapitel 4.2). 24 Stunden später wurden die Zellen mit den Testsubstanzen inkubiert. Das Medium wurde 72 Stunden nach der Transfektion von den Zellen abgenommen, da zu diesem Zeitpunkt die maximale Expression der SEAP erreicht ist. [Bronstein et al, 1994b; Yang et al, 1997] Eine zweite Inkubation der Zellen ergab, daß diese das Plasmid nach acht Tagen wieder ins Medium abgeben, da eine SEAP-Aktivität nach diesem Zeitraum nicht mehr detektiert werden konnte.

Die Etablierung und Validierung des Modells wurde ebenfalls durch Inkubation mit verschiedenen Estradiol-Konzentrationen sowie der Kombination aus Estradiol und ICI 182 780 durchgeführt.

Die SEAP-Aktivität nahm mit steigender Estradiolkonzentration zu, in Kombination mit Estradiol 0,1 µM antagonisiert ICI 182 780 1 µM die Estradiol-Aktivität. (vgl. Abb. 87) Kombinationen von Estradiol 1 nM und ICI 182 780 (1 nM bis 1 µM) führten zu einer konzentrationsabhängigen Hemmung von Estradiol (nicht dargestellt).

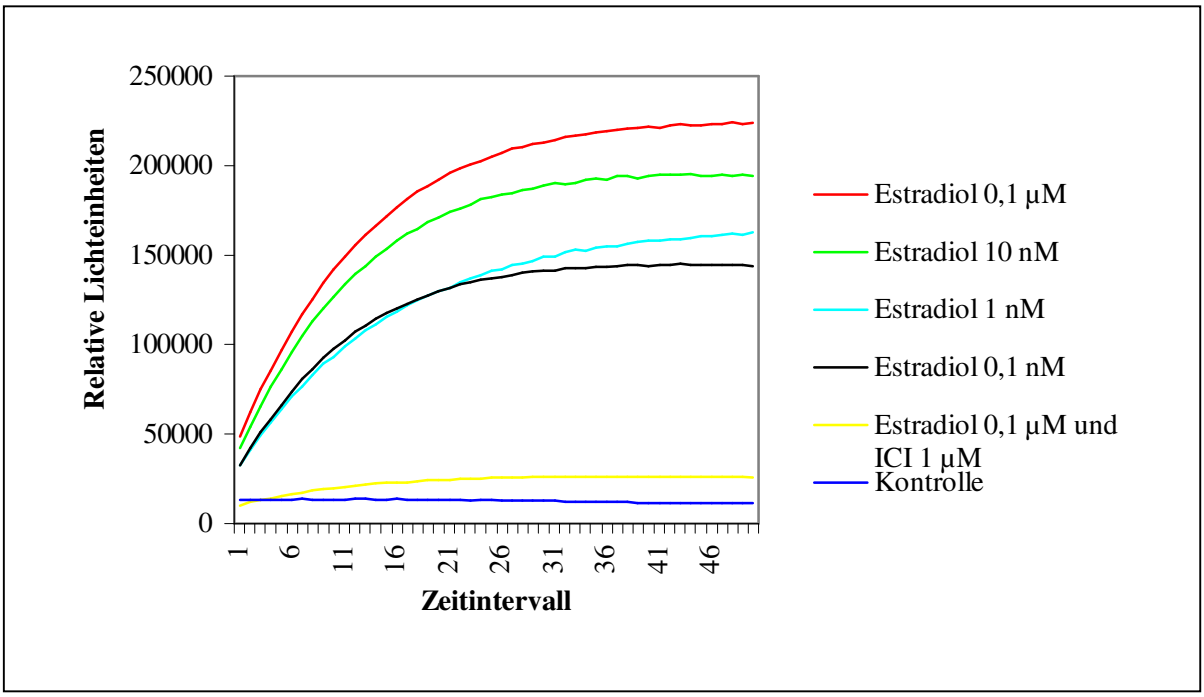


Abb. 87: SEAP-Assay mit transient transfizierten MCF-7/pSEAP2VITA2 Zellen

Die Messung der Proben zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Durchführung des Assays ergab, daß auch nicht-enzymatische Reaktionen durch den Chemilumineszenznachweis erfasst werden. Es wurden von unterschiedlichen Proben mehrere Ansätze erstellt und diese direkt bzw. nach 20, 40, 60, 120 oder 180 Minuten vermessen. Die Proben wurden jeweils im Dunkeln bis zur Messung gelagert. Dabei zeigte sich, daß die nicht-enzymatische Chemilumineszenz mit zunehmender Zeit abnimmt, d.h. je später die Probe vermessen wurde, desto geringer war deren Einfluß. Das gemessene Lichtsignal nach 120 und 180 Minuten zeigte den gleichen Kurvenverlauf, die nicht-enzymvermittelte Chemilumineszenz ist nach 120 Minuten abgeklungen ist. Für weitere Messungen wurden die Proben vor der Messung für 120 Minuten dunkel gestellt, um eine unspezifische Chemilumineszenz und damit Verfälschung der Messergebnisses auszuschließen.
Weiter konnte festgestellt werden, daß das CSPD-Substrat selbst eine hohe Chemilumineszenz aufweist. Das Vermessen des Substrates ohne Probe im Luminometer ergab ein hohes Lichtsignal, das als Background bei den Messungen berücksichtigt werden muß. (vgl. dazu Abb. 88 und 89)

Als Nachteil des Testsystems stellte sich heraus, daß das automatische Zuführen des Substrates zur Probe über die Pumpe ungeeignet ist. Verschiedene Messungen, bei denen die automatische Substratzufuhr gewählt wurde, ergaben im Vergleich zu Messungen bei denen das Substrat von Hand zu pipettiert wurde, unabhängig von der Probe, eine außergewöhnlich hohe Chemilumineszenz. Ursache könnte das starke Schäumen nach Einspritzen des Substrates zur Probe und die daraus resultierende Chemilumineszenz sein. Ein spezifischer Nachweis der SEAP war so nicht möglich. Im weiteren Verlauf mußte das CSPD-Substrat deshalb manuell zu den Proben pipettiert werden, was im Vergleich zur automatischen Zufuhr einen erheblichen Zeitaufwand bedeutet.

Nach der Validierung des Systems wurden exemplarisch zwei Estrogenrezeptoragonisten, DES und β-Sitosterol (Sojaextrakt) getestet.
Die Ergebnisse sind in halblogarithmischer Form dargestellt (Abb. 88 und 89). Die Berechnung der EC_{50}-Werte mittels logistischem Fit ergab für Estradiol und DES EC_{50}-Werte, in genau der gleichen Größenordnung wie die im Luciferase-Assay ermittelten. In

Übereinstimmung mit dem E-Screen-Assay induzierte DES ab einer Konzentration von 1 µM den maximal durch Estradiol erreichten Response.

Ein Vergleich der EC_{50}-Werte von β-Sitosterol zeigte, daß der im Luciferase-Assay erhaltene EC_{50}-Wert um zwei Zehnerpotenzen höher liegt. Die erhaltene Kurve im SEAP-Assay ist nach rechts zu höheren Konzentrationen verschoben, was den Unterschied in den EC_{50}-Werten erklärt. Eine maximale Reportergeninduktion wird erst bei einer Konzentration von 1 µM erreicht. (vgl. auch Kapitel 4.8.2.1) Als parallele Gerade zur x-Achse wurde in beiden Abbildungen die durch das CSPD-Substrat hervorgerufene Chemilumineszenz eingetragen.

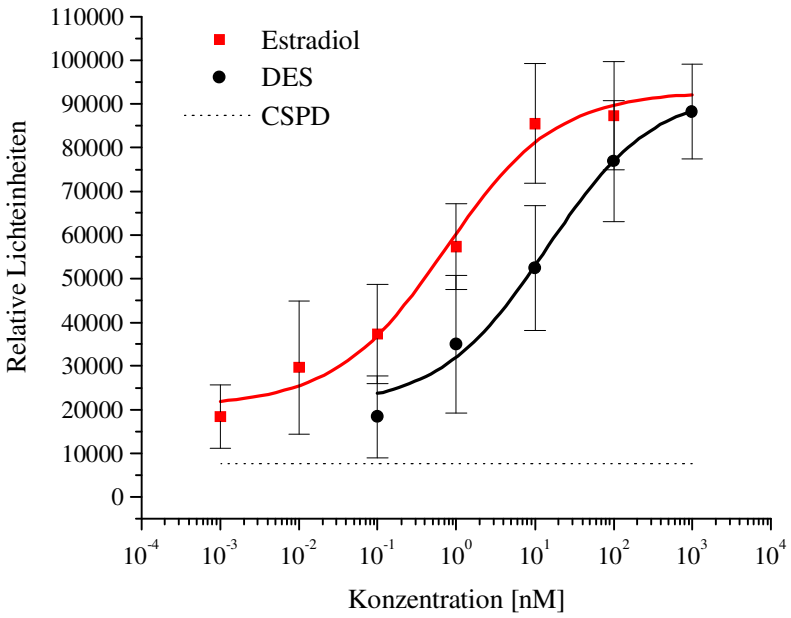


Abb. 88: SEAP-Assay mit transient transfizierten MCF-7/pSEAP2VITA2 Zellen

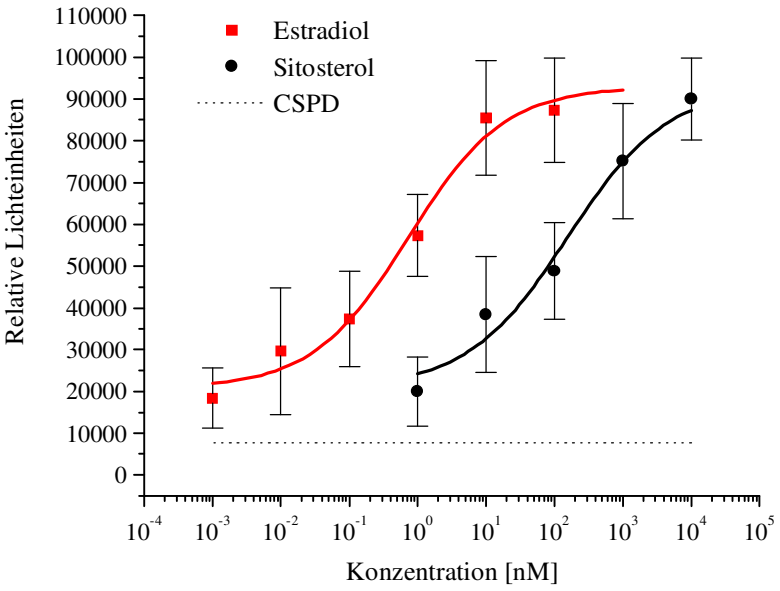


Abb. 89: SEAP-Assay mit transient transfizierten MCF-7/pSEAP2VITA2 Zellen

4.10.2 Selektion der MCF-7/pSEAP2VITA2/pSV2neo Zellen

Die Selektion stabil transfizierter Zellen bzw. Zellen, die über einen längeren Zeitraum stabil sind, kann mittels dominanter Markergene erfolgen. Aus diesem Grund wurden das pSEAP2/VITA2-Plasmid und das Selektionsplasmid pSV2neo in MCF-7 Zellen mittels Elektroporation cotransfiziert. Der Vektor pSV2neo enthält das Neomycinresistenzgen zur Selektion transfizierter eukaryontischer Zellen mit Geneticinsulfat (G418). [Clontech, 1995; Hermann et al, 1994]
24 Stunden nach der Transfektion wird mit der G418-Behandlung begonnen, und zwar mit einer Konzentration von 200-300 µg Geneticin/ml Medium. [Maniatis et al, 1989] Die G418-Konzentration wurde kontinuierlich auf 1000 µg G418/ml Medium erhöht, erst bei dieser hohen Konzentration konnten cytotoxische Effekte beobachtet werden. Als Kontrolle mitgeführte nicht-transfizierte MCF-7 Zellen zeigten bei den geringen G418-Konzentrationen keine Effekte, bei der Konzentration von 1000 µg G418/ml Medium starben die Zellen nach zweiwöchiger Behandlung ab.

Die MCF-7 Zellen wurden direkt nach der Transfektion in klonaler Dichte ausgesät und direkt mit G418 wie oben beschrieben behandelt. Das Wachstum der Einzelzellen wurde mittels Mikroskop verfolgt und nach Koloniebildung schließlich einzelne Kolonien getrennt in Petrischalen überführt. Die SEAP-Expression wurde durch entsprechende Inkubation in regelmäßigen Abständen überprüft. Nach sechs Monaten konnte eine SEAP-Aktivität bei keinem Zellklon mehr detektiert werden. Da die Zellen die Behandlung mit der hohen G418-Konzentration überlebten, ist davon auszugehen, daß diese das pSV2neo-Plasmid noch im Genom integriert haben, den Reportergenvektor aber nicht mehr.
Die Selektion der MCF-7 Zellen mit G418 gelang, die Zellen können in einem bestimmten Zeitraum für Reportergenuntersuchungen herangezogen werden. Eine wiederholte Transfektion und Selektion der Zellen muß jedoch in bestimmten Abständen erfolgen.

Als weitere Alternative wurden MCF-7 Zellen ohne Klonierung direkt nach der Transfektion mit G418 selektioniert. Im Gegensatz zu oben lag hier eine Mischpopulation transfizierter und nicht-transfizierter Zellen vor. Entsprechend wurden auch diese Zellen über mehrere Wochen

auf eine vorliegende SEAP-Expression nach Inkubation mit Estradiol überprüft. Eine SEAP-Aktivität war nach sechs Monaten ebenfalls nicht mehr nachweisbar.
Ein Nachteil der Cotransfektion von Reportergenplasmid und Selektionsvektor liegt darin, daß bei der Selektion über einen längeren Zeitraum vermehrt Zellen vorliegen, die nur den Selektionsvektor integriert haben. Zellen, die beide Vektoren beinhalten liegen vermutlich in geringerer Anzahl vor, die exprimierte SEAP-Rate ist für einen spezifischen Nachweis zu niedrig.

Als Einsatzgebiet der SEAP wäre neben der Anwendung *in vitro* auch deren Einsatz *in vivo* denkbar. MCF-7/pSEAP2VITA2 Zellen können in immundefiziente Nacktmäuse implantiert werden. Die Behandlung mit Estradiol bzw. estrogenaktiven Verbindungen führt zur Tumorentwicklung auf den Nacktmäusen. Eine Quantifizierung der SEAP im Serum ist möglich. Im Vergleich zu anderen Tiermodellen würde ein relativ einfaches und schnell durchzuführendes *in vivo* System zur Verfügung stehen.

4.11 Bestimmung des endogenen Reporters pS2

4.11.1 Nachweis des pS2-Proteins

Als Ergänzung zu den transgenen *in vitro* Testsystemen sollte zusätzlich ein endogener Reporter für den Nachweis einer estrogenen Aktivität herangezogen werden. Die Bestimmung endogener Reporter besitzt den Vorteil, daß die Zellen nicht gentechnisch verändert sind und es sich damit um weniger artifizielle Systeme handelt. Es wird ein in den Zellen natürlich ablaufender Vorgang betrachtet. Dazu wird die estogenrezeptorabhängige Expression eines endogenen Proteins auf RNA- oder Proteinebene nach Inkubation mit dem physiologischen Liganden bzw. den Testsubstanzen detektiert.
Als Bestimmungsparameter wurde das pS2-Protein gewählt. Dieses Protein wurde ursprünglich aus der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7 isoliert. Die Expression erfolgt in diesen Zellen estrogenabhängig unter der Kontrolle des ERE-enthaltenden pS2-Promotors. [Stack et al, 1988]
Das pS2-Protein wurde mittels Radioimmunoassay bestimmt. Dazu wurden humane MCF-7 Zellen 48 Stunden mit den Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert. Anschließend wurde die Cytosolfraktion durch entsprechende Aufarbeitungsschritte gewonnen. [McGuiere und

DeLaGarza, 1973] Nach Einstellen eines bestimmten Proteingehaltes wurde das Cytosol zur pS2-Bestimmung eingesetzt. [Nunez et al, 1987; Goussard et al, 1991] Das pS2-Protein wird sandwichartig zwischen zwei monoklonalen Antikörpern gebunden. Mittels mehrer Waschschritte wird der zweite überschüssige ^{125}J-markierte Antikörper entfernt. Die danach auf der Festphase gebundene Radioaktivität ist proportional zur pS2-Konzentration. Als Standard wurde bei jeder Messung humanes pS2-Protein in verschiedenen Konzentrationen mitgeführt. Nach linearer Regression können dann die Absolut-Werte der Proben bestimmt werden. Nachteile dieses Assays liegen in der kurzen Halbwertszeit des ^{125}J ($t_{1/2}$ = 60 Tage) sowie der begrenzten Haltbarkeit des Antikörpers von maximal 2 Wochen. [ELSA pS2 CIS Bio International, Gif sur Yvette, France]

Die Validierung des Testsystems erfolgte durch Inkubation mit Estradiol, ICI 182 780 und der Kombination aus Estradiol und ICI 182 780 (1 µM). Die Inkubation mit Estradiol ergab die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung über einen mehrere Größenordnungen umfassenden Konzentrationsbereich. Die halblogarithmische Darstellung ergab, wie auch bei den transgenen Reportergensystemen, eine sigmoidale Form. Der für die Wechselwirkung von Ligand und Rezeptor charakteristische Kurvenverlauf reicht vom subphysiologischen Bereich (0,1 pM) bis hin zum Sättigungsbereich ab einer Konzentration von 10 nM. Der Radioimmunoassay zeigt eine sehr gute Sensitivität, der mittels logistischem Fit berechnete EC_{50}-Wert von Estradiol liegt im Vergleich zum Luciferase-Reportergensystem um eine Zehnerpotenz niedriger. Die Inkubation mit ICI 182 780 ergab keine über den Kontrollwert erhöhte pS2-Induktion, in Kombination mit Estradiol wurde die Aktivität von Estradiol durch ICI 182 780 inhibiert (Ergebnisse nicht dargestellt).
Nach Validierung und Etablierung sollten die Substanzen, die im Rahmen des VCI-Projektes bearbeitet wurden, ebenfalls in diesem Testsystem untersucht werden. Die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen sind in Abbildung 90 bis 94 dargestellt. Die aktivierende Wirkung aller Fremdstoffe konnte durch gleichzeitige Inkubation mit ICI 182 780 (1 µM) in allen Versuchsansätzen vollständig antagonisiert werden (nicht dargestellt). Der durch die Einzelverbindungen hervorgerufene Verlauf der Proteininduktion ist mit den Ergebnissen des Transaktivierungsassays vergleichbar. Teilweise konnte eine stärkere intrinsische Potenz der Verbindungen im Vergleich zum Transaktivierungsassay beobachtet werden.

Im Proliferationsassay und Transaktivierungsassay konnte bei hoher p-tert.-Octylphenol–Konzentration (1000 nM) ein Abknicken der Kurve beobachtet werden. Im Gegensatz dazu

wurde bei der pS2-Induktion bereits bei 10 nM der Sättigungsbereich der Kurve verzeichnet, der fast das Plateau der maximalen Estradiolinduktion erreicht. (vgl. Abb. 90)

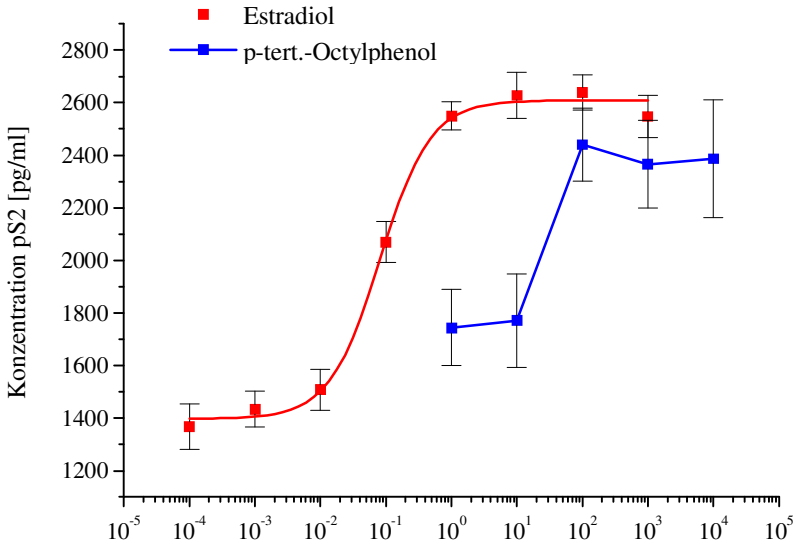


Abb. 90: pS2-Protein-Induktion durch p-tert.-Octylphenol in MCF-7 Zellen

Im Luciferase-Reportergenassay wurde bei niedrigen Nonylphenolkonzentrationen keine Aktivität detektiert, erst bei der höchsten getesteten Konzentration von 10000 nM induzierte Nonylphenol etwa 60% der maximalen Estradiolinduktion. Die pS2-Induktion erreicht wie bei Octylphenol einen Sättigungsbereich, jedoch erst ab 1000 nM. (vgl. Abb. 91) Nonylphenol induziert im pS2-Assay einen höheren Response als im Luciferase-Assay.

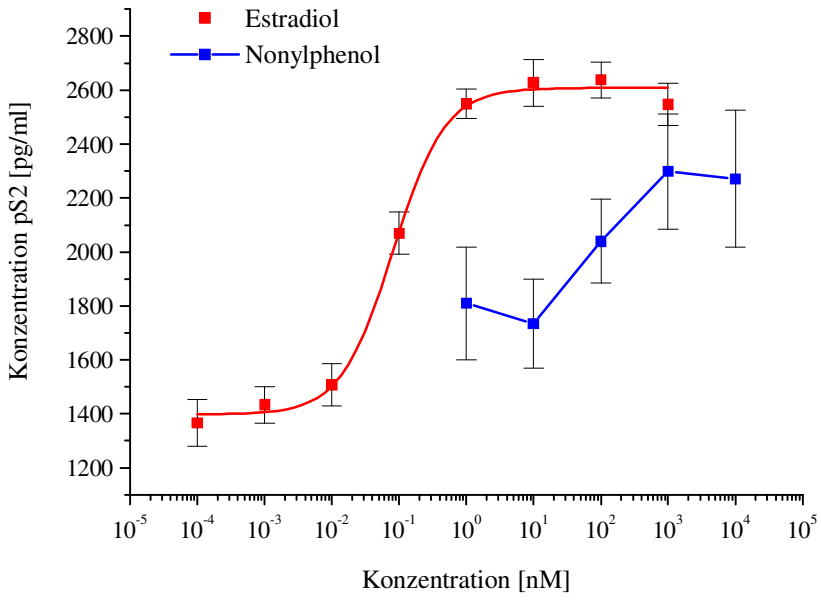


Abb. 91: pS2-Protein-Induktion durch Nonylphenol in MCF-7 Zellen

o,p`-DDT zeigte im Transaktivierungsassay im Bereich von 1 – 100 nM einen gleichbleibend geringen Response (unter 20 % des maximalen Estradiolresponse), ab 1000 nM etwa 30 % der maximalen durch Estradiol ausgelösten Aktivität. Im Proliferationsassay wurde bei 1000 nM ein Aktivitätsmaximum beobachtet, daß das durch Estradiol erhaltene Sättigungsplateau erreicht. Bei höherer Konzentration (10000 nM) ist ein Abknicken der Kurve zu verzeichnen. Im pS2-Radiomimmunoassay konnte ein solcher Kurvenverlauf nicht detektiert werden, bei einer Konzentration von 10000 nM wurden über 90% der maximalen Estradiol-Response erhalten. (vgl. Abb. 92) Ob diese Konzentration bereits im Sättigungsbereich liegt, konnte nicht geklärt werden.

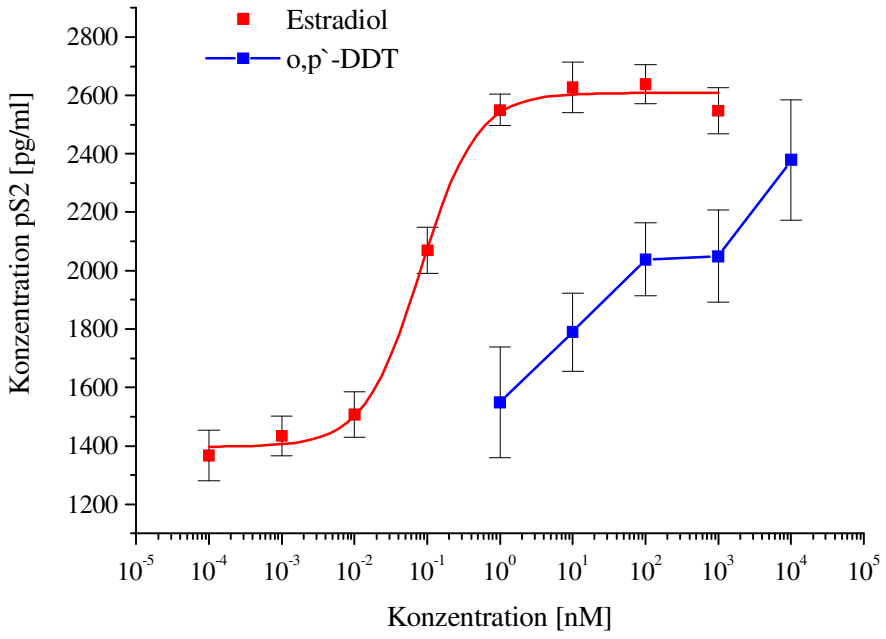


Abb. 92: pS2-Protein-induktion durch o,p´-DDT in MCF-7 Zellen

Der beim Reportergenassay aufgetretene untypische Kurvenverlauf mit einem Aktivitätsmaximum bei 100 nM und Abknicken der Kurve bei höheren Konzentrationen wurde auch bei der Induktion des pS2-Proteins nach Inkubation mit Bisphenol A beobachtet. Auch hier wurde, wie beim Transaktivierungsassay bei 100 nM Induktionsmaximum erreicht. (vgl. Abb. 93) Da bei sehr hohen unphysiologischen Estradiolkonzentrationen ebenfalls ein leichtes Abknicken der Kurve beobachtet werden kann, könnten möglicherweise bei diesen sehr hohen Konzentrationen Veränderungen am Estrogenrezeptor eine Rolle spielen, die zu einem Abfallen der Kurve führen. Beim Proliferationsassay wurde nach Inkubation mit

Bisphenol A ein anderer Kurvenverlauf erhalten, auch hier wurde ein maximaler Response durch Bisphenol A induziert, jedoch erst bei hohen Konzentrationen ab 1000 nM.

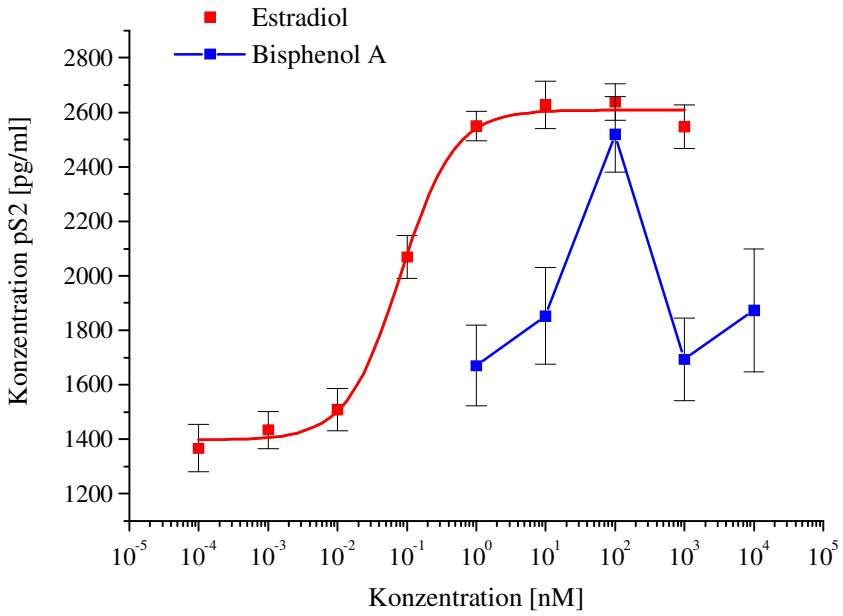


Abb. 93: pS2-Protein-Induktion durch Bisphenol A in MCF-7 Zellen

Daidzein induziert im Transaktivierungsassay im Bereich von 1-100 nM eine geringe Reportergenantwort (unter 20% der maximalen Estradiolresponse), bei höheren Konzentrationen 1000 bzw. 10000 nM konnte ein Induktion von etwa 30 % detektiert werden. Im Gegensatz dazu erreicht die Inkubation mit Daidzein ca. 80% der maximal durch Estradiol induzierten pS2-Expression. (vgl. Abb. 94)

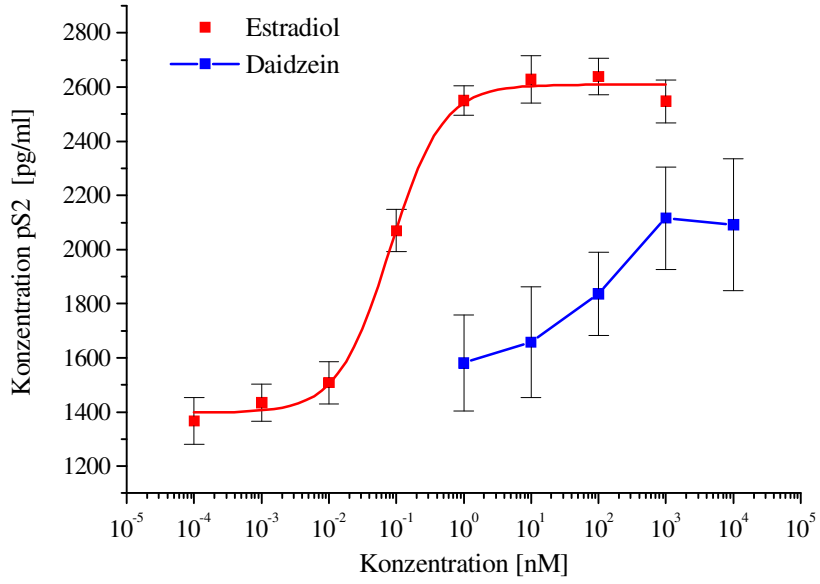


Abb. 94: pS2-Protein-Induktion durch Daidzein in MCF-7 Zellen

Zur Untersuchung potentiell estrogen aktiver Verbindungen wurden verschiedene, sich z.T. ergänzende *in vitro* Testsysteme eingesetzt, die u.a. Vergleiche zwischen Proliferationsstimulus sowie transgenen und endogenen Reportern erlauben. Für p-tert.-Octyl- und Nonylphenol, o,p´-DDT, Bisphenol A und Daidzein wurden die EC_{50}-Werte mittels logistischem Fit für die eingesetzten Testsysteme berechnet und in der nachfolgenden Tabelle zusammengefasst. Daraus wurde die sogenannte relative Potenz berechnet und wenn möglich zusätzlich die relative Effektivität bestimmt.

Tab. 8: Zusammenfassung der EC_{50}-Werte verschiedener *in vitro* Testsysteme sowie RP- bzw. RE-Werte

Testverbindung	**Testsystem**	**EC_{50}-Wert in [nM]**	**RP[1]**	**RE[2]**
Estradiol	MCF-7 Luc	0,42	1	100
	pS2-ELISA	0,08	1	100
	E-Screen	1,55	1	100
Bisphenol A	MCF-7 Luc	17	3×10^{-2}	-
	pS2-ELISA	12	$6{,}6 \times 10^{-3}$	-
	E-Screen	30	5×10^{-2}	107
o,p´-DDT	MCF-7 Luc	161	$2{,}6 \times 10^{-3}$	32
	pS2-ELISA	218	$3{,}6 \times 10^{-4}$	-
	E-Screen	137	$8{,}3 \times 10^{-3}$	-
p-tert.-Octylphenol	MCF-7 Luc[3]	1063	4×10^{-4}	-
	pS2-ELISA	15	$5{,}3 \times 10^{-3}$	92
	E-Screen	244	$6{,}4 \times 10^{-3}$	-
Nonylphenol	MCF-7 Luc[3]	9354	$4{,}5 \times 10^{-5}$	-
	pS2-ELISA	54	$1{,}5 \times 10^{-3}$	88
Daidzein	MCF-7 Luc[3]	2979	4×10^{-4}	-
	pS2-ELISA	400	2×10^{-4}	81

1) EC_{50} Estradiol/EC_{50} Testverb. 2) Plateau Testverb. x 100/Plateau Estradiol

3) [Mußler, 1999]

Die mittels pS2-Radioimmunoassay ermittelten EC_{50}-Werte liegen bei Estradiol, p-tert.-Octylphenol, Nonylphenol und Daidzein um mindestens eine Zehnerpotenz niedriger als beim E-Screen- bzw. Transaktivierungsassay. Für Estradiol hat sich der pS2-Radioimmunoassay als sensitivste Methode erwiesen, der EC_{50}-Wert liegt um eine bis zwei Größenordnungen unter denen der anderen Methoden. Die EC_{50}-Werte von p-tert.-Octyl- und Nonylphenol liegen im pS2-ELISA zwei Zehnerpotenzen unter denen des Transaktivierungsassays. Bei Bisphenol A und o,p´-DDT liegen die EC_{50}-Werte aller Testsysteme im gleichen Größenbereich. Die aus den EC_{50}-Werten erhaltenen RP-Werte liegen für alle Testverbindungen um maximal eine Zehnerpotenz auseinander. RE-Werte konnten nur in Ausnahmefällen bestimmt werden. Für p-tert.-Octyl- und Nonylphenol sowie Daidzein liegen die im pS2-Radioimmunoassay berechneten RE-Werte größer 80, die getesteten Verbindungen zeigten in diesem System durchweg eine hohe intrinsische Potenz.

Die Bestimmung des endogenen pS2-Proteins ist als Ergänzung der transgenen Reportergensysteme gut geeignet. Des weiteren bietet die Bestimmung dieses Parameters die Option, MCF-7 Zellen subkutan in immundefiziente Nacktmäuse zu implantieren. Nach Inkubation mit Estradiol bzw. den entsprechenden Testsubstanzen kann das sezernierte pS2-Protein im Serum detektiert werden. Damit wäre ein Übergang von den bestehenden *in vitro* Testsystemen zu *in vivo* Systemen geschaffen. Erste Vorversuche mit Serumproben von Nacktmäusen zeigten, daß die Bestimmung des pS2-Proteins im Serum mittels Radioimmunoassay prinzipiell möglich ist.

4.11.2 Bestimmung der pS2-Induktion mittels RT-PCR

Die Bestimmung des pS2-Proteins ist auf RNA-Ebene mittels RT-PCR möglich und es sollte dafür ein geeignetes System etabliert werden. Um die pS2-Expression nach Inkubation der MCF-7 Zellen mit unterschiedlichen Estradiolkonzentrationen quantifizieren zu können, muß die mRNA-Menge auf einen Standard bezogen werden. Als Standard wurde zunächst das Enzym Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), ein sogenanntes „Housekeeping-Gen“, das konstitutiv in den Zellen exprimiert wird, verwendet. Die GAPDH wurde als interner Standard mitgeführt, um Fehler wie Temperaturschwankungen oder Pipettierungenauigkeiten zu minimieren.

In ersten Versuchen wurden MCF-7 Zellen mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen inkubiert und nach 24 Stunden eine Gesamt-RNA-Aufarbeitung erstellt. Für die anschließende RT-PCR wurde von jeder Probe das gleiche Volumen eingesetzt (5 – 20 µl). In Vorversuchen wurden pS2- und GAPDH-Sequenz in getrennten Reaktionsgefäßen amplifiziert. Die Auftrennung der Proben nach der RT-PCR mittels Agarosegel ergab die erwarteten Banden. Durch die Wahl der spezifischen Primer für das pS2-Protein ergibt sich ein 396 bp großes Fragment, für die GAPDH-Sequenz ein 983 bp großes Fragment. (nicht dargestellt)
Die zu Beginn aufgetretenen unspezifischen Banden ließen sich auf die Anlagerung der Primer an genomische DNA erklären, die bei der RNA-Aufarbeitung mitisoliert wurde. Durch DNAse-Behandlung der Proben vor der RT-PCR konnten unspezifische Banden verhindert werden. Des weiteren wurden für jeden Ansatz nun genau 1 µg Gesamt-RNA eingesetzt, da die Bestimmung des RNA-Gehaltes einzelner Aufarbeitungen zeigte, daß der RNA-Gehalt erheblichen Schwankungen unterliegt.

Im weiteren Verlauf wurden beide Sequenzen im gleichen Reaktionsgefäß amplifiziert, sodaß bei der Agarosegelanalyse entsprechend zwei Banden zu erwarten waren. Die Fragmente des pS2-Proteins und der GAPDH-Sequenz konnten im richtigen Größenbereich identifiziert werden. (vgl. Abb. 95). Es wurden verschiedene Inkubationsansätze überprüft, dazu wurden die Zellen u.a. unterschiedlich lange mit Estradiol und Nonylphenol inkubiert. Dabei wurde entweder die Inkubationsdauer (2, 4, 8, 12 und 24 Stunden) oder die eingesetzte Substanz-Konzentration variiert. In Abbildung 95 sind die Ansätze nach 8 und 12 stündiger Inkubation mit 0,1 µM Estradiol dargestellt. Bei den im Anschluß an die RT-PCR-Reaktion durchgeführten Agarosegelanalysen konnten die pS2-Banden detektiert werden, es zeigten sich jedoch keine signifikanten Intensitätsunterschiede zwischen den einzelnen Ansätzen. In einigen Fällen konnte keine GAPDH-Bande identifiziert werden bzw. die Intensität der Banden war sehr uneinheitlich. (nicht dargestellt)

Da gezeigt werden konnte, daß die Expression der GAPDH ebenfalls unter Estrogenkontrolle liegt, sollte als neuer Standard β-Actin eingesetzt werden. [pers. Mitteilung Diel, Sporthochschule Köln] Bei β-Actin handelt es sich ebenfalls um ein Housekeeping-Gen, dessen Expression konstitutiv in den Zellen erfolgt. In ersten Versuchen gelang die Amplifikation von pS2 und β-Actin in einem Reaktionsgefäß, es konnten beide spezifischen Banden nach der Agarosegelelektrophorese im erwarteten Größenbereich detektiert werden.

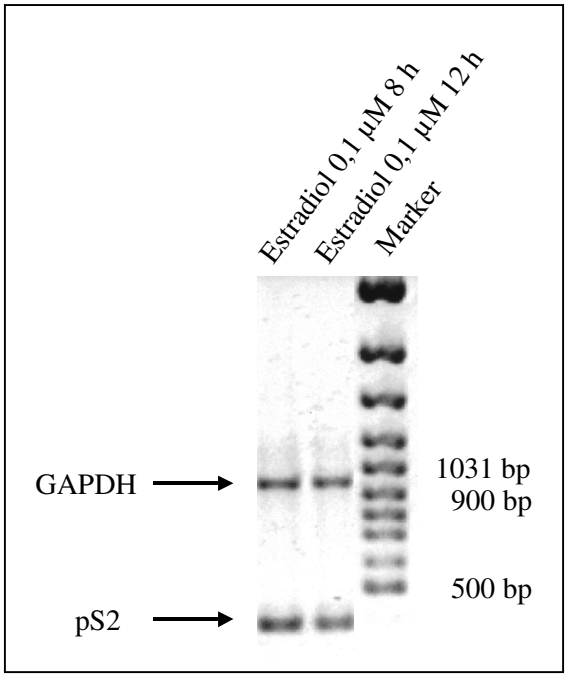


Abb. 95: Agarosegel nach RT-PCR mit spezifischen Primern für pS2 und GAPDH

Im Rahmen einer Diplomarbeit wurden weiterführende Untersuchungen durchgeführt. [Gensler, 1999] So zeigte sich, daß der interne genomische Standard β-Actin für eine mRNA-Quantifizierung nicht geeignet ist, da die Amplifikation von β-Actin gegenüber pS2 bevorzugt stattfindet.

Zur Quantifizierung der mRNA wurde daher der Einsatz eines nicht-genomischen Standards, der in beliebiger Konzentration eingesetzt werden kann, in Betracht gezogen. Dazu wurde ein pS2-Fragment in einen Vektor einkloniert, das sich durch Deletion einiger Basenpaare vom ursprünglichen pS2-Fragment unterscheidet. Die Amplifikation des Standards erfolgt mit den gleichen Primern wie die Amplifikation der pS2-Sequenz, es ergibt sich hier lediglich ein kleineres Fragment. Vorteil dieser Methode ist, daß durch die Wahl identischer Primer die Anlagerung an eines der beiden Templates nicht begünstigt wird und die fast identische Sequenz von Standard und Probe eine bevorzugte Amplifikation einer Sequenz ausschließt. Ein Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die Quantifizierung mittels DNA-Standard die Effizienz der RT-Reaktion der einzelnen Proben nicht berücksichtigt. In ersten Versuchen konnte eine deutliche Trennung von Standard- und pS2-Bande gezeigt werden. [Gensler, 1999]

4.12 Band-Shift-Assay

Der Band-Shift-Assay kann zur Untersuchung spezifischer Protein-DNA-Interaktionen herangezogen werden und zur mechanistischen Untersuchung estrogener Effekte beitragen. Die Inkubation estrogenrezeptorhaltiger Zellextrakte mit ERE-enthaltenden Nukleotidsequenzen führt zur Bindung des Rezeptors an das spezifische ERE. Während einer im Anschluß stattfindenden nativen Gelelektrophorese besitzt der Protein-DNA-Komplex im Vergleich zum freien Nukleotid eine geringere Mobilität, was als Bandenverschiebung sichtbar wird. Der Band-Shift-Assay ist im Vergleich zu anderen *in vitro* Methoden ein sehr artifizielles System, da wesentliche Vorgänge mit Zellextrakten und oft nur kurzen synthetischen ERE-Sequenzen durchgeführt werden.

Vor der Aufarbeitung der Zellen für den Band-Shift-Assay wurden die Zellen mit entsprechenden Substanzen inkubiert und ein Zellextrakt hergestellt, das mit der spezifischen ERE-Sequenz inkubiert wurde. Bei dem verwendeten ERE handelte es sich um eine 27 Bp lange Sequenz, die die palindromische Sequenz des Vitellogenin A2 Promotors enthält und am 3´-Ende mit Digoxygenin endgelabelt ist. Damit ist eine Detektion mittels Chemilumineszenz-Reaktion möglich.

Nach Wiederaufnahme des Band-Shift-Assay wurde in ersten Versuchen verschiedene Parameter modifiziert. Der Estrogenrezeptor besitzt wie alle Steroidhormonrezeptoren als wichtiges Strukturelement zwei Zink-Finger, die für die Interaktion des Rezeptors mit der DNA von Bedeutung sind und daher auch beim Band-Shift-Assay eine wichtige Rolle spielen. Um zu gewährleisten, daß im Inkubationsansatz eine ausreichende Menge an Zink-Ionen zur Ausbildung der Zink-Finger zur Verfügung steht, wird dem Ansatz Zinkchlorid zugegeben. In älteren Arbeiten lag die Konzentration im pmol Bereich, weshalb zu Beginn 60 pmol Zinkchlorid zum Inkubationsansatz gegeben wurden. Höhere Konzentrationen erschienen nicht geeignet, da negative Effekte, beispielsweise eine Denaturierung des Rezeptors zu erwarten waren. In neueren Arbeiten wurden jedoch Zinkkonzentrationen im mmol Bereich zugegeben. [Pink et al, 1997] Aus diesem Grund wurden unterschiedliche Konzentrationen Zinkchlorid im Band-Shift-Assay eingesetzt. Dabei wurden Konzentrationen von 0,1 mmol bis 1 nmol geprüft, wobei die Estradiol-Konzentration nicht variiert wurde, die Zellen wurden vor der Aufarbeitung mit 1 nmol Estradiol inkubiert. Bei allen verwendeten Zinkkonzentrationen konnten entsprechende Banden detektiert werden, sowohl die Banden der freien Oligonukleotide als auch die Banden des Rezeptor-DNA-Komplexes. Die hohen Zinkkonzentrationen hatten also keinen Einfluß auf die Rezeptorstabilität. Im weiteren Versuchsverlauf wurde daher die Zinkkonzentration auf 10 nmol erhöht.

Als weitere Parameter wurde für das Blotting eine neue Membran verwendet. Bei der neu eingesetzten Membran handelte es sich um eine positiv geladene Nylonmembran mit einer Porengröße von 0,45 µm, die zuvor eingesetzte Membran hatte eine Porengröße von 0,2 µm. Des weiteren wurde das Filmmaterial modifiziert, bei dem neuen Material handelte es sich um speziell zur Detektion von Chemilumineszenz-Reaktionen geeignete Filme. Es wurden verschiedene Band-Shift-Versuche durchgeführt, wobei jeweils ein Parameter verändert wurde. Die erhaltenen Blots der einzelnen Versuche zeigten, daß das neue Film- und Membranmaterial zu einer Verbesserung der Blotqualität führte.

Weiterführende Untersuchungen zum Band-Shift-Assay wurden von Guth und Gensler im Rahmen ihrer Diplomarbeiten vorgenommen. [Guth, 1998; Gensler, 1999] Während Untersuchungen von Kumar et al [Kumar et al, 1988] eine spezifische hormonabhängige Bindung des Estrogenrezeptors nach *in vitro* und *in vivo* Inkubation an ein 34 mer ERE zeigen konnten, konnten diese Ergebnisse von anderen Gruppen nicht bestätigt werden. [Metzger, 1995; Katzenellenbogen, 1991] Eine eindeutig hormonabhängige Bindung des Rezeptors an ein 27 mer endgelabeltes ERE konnte ebenfalls nicht beobachtet werden, da auch bei Hormonabwesenheit die Bande des DNA-Protein-Komplex detektiert wurde. [Guth, 1998] Die geringe Spezifität des eingesetzten 27 mer Oligonukleotids kann allerdings zu unspezifischen Bindungen anderer Proteine führen, sodaß schließlich auf dem Blot mehrere Banden auftreten. Um unspezifische Reaktionen dieser Art weitgehend zu vermeiden, wurde der Promotor des Vitellogenin A2 eingesetzt. Die 834 bp große Nukleotidsequenz wurde ebenfalls am 3´-Ende mit Digoxygenin endgelabelt und für weitere Untersuchungen verwendet. In ersten Versuchen konnte eine hormonabhängige Bindung des ligandaktivierten Rezeptors nach Inkubation mit Estradiol an den Promotor beobachtet werden. Die DNA-Bindung konnte durch Inkubation mit ICI 182 780 gehemmt werden. [Guth, 1998] Anschließende Untersuchungen mit dem markierten Vitellogenin A2 Promotor von Gensler konnten die Beobachtungen zunächst bestätigen, weitere Versuche führten jedoch zu stark unterschiedlichen, nicht reproduzierbaren Ergebnissen. [Gensler, 1999]

Insgesamt erwies sich der Band-Shift-Assay für die Untersuchung estrogenaktiver Verbindungen als ungeeignet. Nach persönlicher Mitteilung von Herrn Dr. Klein-Hitpass, Essen, ist eine hormon- bzw. konzentrationsabhängige Bindung des Estrogenrezeptors an spezifische ERE-Sequenzen nicht nachweisbar. Dies scheint jedoch nur für den

Estrogenrezeptor der Fall zu sein, für Androgen- sowie Progesteronrezeptor kann sich die Untersuchung der Ligand-Rezeptor-DNA-Wechselwirkung als geeignetes Testsystem erweisen. [pers. Mitteilung, Dr. Klein-Hitpass, Institut für Zellbiologie, Tumorforschung; Essen]

4.13 Vergleich der *in vivo* und *in vitro* Testsysteme zur Charakterisierung estrogenaktiver Substanzen

Die seit einigen Jahren bestehenden Bedenken, daß estrogenakive Substanzen, natürlichen oder anthropogenen Ursprungs, nachteilige Effekte auf die menschliche Gesundheit und auf Wildtierpopulationen haben können, haben der Forderung nach standardisierten und akzeptierten Methoden, die eine zuverlässige Charakterisierung dieser Verbindungen ermöglichen, Nachdruck verliehen. Es sind mittlerweile eine Reihe unterschiedlicher *in vivo* und *in vitro* Testmethoden im Einsatz, von einigen werden im folgenden Vor- bzw. Nachteile erläutert. [Shelby et al, 1996]

Allgemein kann man sagen, daß aufgrund der Vielzahl der möglichen, estrogenvermittelten biologischen Effekte jeder einzelne Test nur eine begrenzte Information gewährleisten kann. *In vitro* Assays können dabei wertvolle Einblicke in Wirkmechanismen geben, bieten jedoch eingeschränkte Möglichkeiten in Bezug auf Metabolismus und Verteilung der Testsubstanz. *In vivo* Assays ermöglichen den Nachweis von Effekten, die das Resultat vielfältiger Mechanismen sind, detailliertere Aussagen über mögliche Wirkmechanismen können jedoch nicht getroffen werden. [Shelby et al, 1996]

In vivo Assays haben gegenüber *in vitro* Assays den Nachteil, daß sie sehr zeitaufwendig und in der Durchführung sehr teuer sind. Als wesentliche Vorteile sind allerdings die Erfassung von Pharmakokinetik, Metabolismus sowie Interaktion mit Serum-Transportproteinen, die die Aufnahme der Substanzen in Zielzellen und Organe beeinflussen, zu nennen. [Safe et al, 1998; Andersen et al, 1999]

Als klassische *in vivo* Assays werden der uterotrophe Assay und der Vaginalverhornungstest eingesetzt. Beim uterotrophen Assay werden standardisierte Protokolle benötigt, in denen Spezies, Stamm, Alter und Verabreichungsroute der Substanz festgelegt werden. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, daß je nach Spezies eine unterschiedliche Empfindlichkeit besteht, so ist beispielsweise der Uterus der Maus sensitiver gegenüber Estrogenen als der Rattenuterus. [Zacharewski, 1998]

Die vaginale Verhornung als *in vivo* Assay bietet im Gegensatz zum uterotrophen Assay eine einfachere Testdurchführung. Weiterer Vorteil ist, daß die Tiere nicht getötet werden müssen und daher mehrfach eingesetzt werden können. Nachteil dieses Tests ist die hohe erforderliche Tierzahl und der nur grob qualitativ erfassbare Endpunkt. [Zacharewski, 1998]
In der Literatur wird diskutiert, daß die Kurzzeit *in vivo* Nagerassays keine ausreichende Sensitivität haben, um Substanzen bzw. Mischungen mit schwachen estrogenen Effekten nachzuweisen. Das Erkennen und Bewerten dieser Effekte wird zusätzlich dadurch erschwert, daß viele Substanzen spezies-, zell- und gewebespezifische Effekte zeigen. Es erscheint daher notwendig, eine größere Anzahl verschiedener Endpunkte zu erfassen. [Zacharewski, 1998]
Eine Reihe von *in vitro* Assays basieren auf bekannten Mechanismen der Steroidhormone, wie Bestimmung der Aktivität von Enzymen, die in die Steroidhormonsynthese involviert sind, kompetitive Ligand-Bindungsassays mit dem Rezeptor oder die Detektion der Genexpression in Säuger- oder Hefezellen. [Zacharewski, 1998]
Seit langem ist die Bestimmung der Relativen Bindungsaffinität eine schnelle und kostengünstige Methode. Der sogenannte RBA-Wert gibt an, ob die Testsubstanz an den Estrogenrezeptor bindet und dabei Estradiol von diesem verdrängt. Die Identifizierung von Substanzen, die an den Estrogenrezeptor binden, ist möglich. Der RBA-Assay kann zwischen einzelnen Labors standardisiert werden. Nachteil dieses Assays ist, daß eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten nicht möglich ist. Die Bindung einer Substanz an den Estrogenrezeptor muß nicht in jedem Fall zu einer Transkriptionsaktivierung führen. Als limitierender Faktor muß auch die fehlende metabolische Kapazität des Systems angesehen werden. [EDSTAC, 1998]
Als geeignet für den Einsatz in *in vitro* Assays hat sich die humane Mammacarcinomzellinie MCF-7 gezeigt, die eine Reihe estrogenabhängiger Endpunkte bietet, wie Zellproliferation, Gen- bzw. Proteinexpression und Reportergenaktivität transient oder stabil transfizierter Zellen mit entsprechenden Reportergenkonstrukten. [Safe, 1998]
Im Proliferationsassay mit MCF-7 Zellen, dem sogenannten E-Screen-Assay, wird ein zellulärer Response gemessen, der estrogenabhängig verläuft. Dieser lässt aber keine Rückschlüsse auf dabei beteiligte Mechanismen zu. Als Nachteil kann zusätzlich die relative lange Versuchsdauer von 8-10 Tagen sowie die aufwendige Testdurchführung angesehen werden. Cytotoxische Effekte der Testsubstanzen erschweren eine Auswertung des Testes. Eine Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten ist im E-Screen-Assay möglich. [Andersen et al, 1999]

Transaktivierungsasssays mit transient oder stabil transfizierten Zellen ermöglichen die Erfassung einer hormonellen Aktivität auf zellulärer Ebene. Die ligandinduzierte Expression des entsprechenden Reportergens unter der Kontrolle des estrogenrezeptorinduzierbaren Promotors erlaubt Rückschlüsse auf die Wirkung der Testsubstanz bezüglich der Rezeptor-DNA-Ebene. Die Differenzierung von agonistischen bzw. antagonistischen Effekten ist mittels Reportergenassay ebenfalls möglich. Es handelt sich außerdem um einen schnell durchzuführenden und sensitiven Assay. [EDSTAC, 1998] Vorteil gegenüber dem E-Screen-Assay liegt in der kürzeren Versuchsdauer, damit können cytotoxische Effekte der Testsubstanz das Ergebnis kaum beeinflussen. Der Einsatz stabil transfizierter Zellinien, wie beispielsweise der in dieser Arbeit verwendeten MCF-7-Luc Zellinie, ermöglicht eine Standardisierung der Testprotokolle und deren Einsatz im High Throughput Screening. [EDSTAC, 1998]

Im Yeast-Assay ist eine Unterscheidung zwischen Estrogenen und Antiestrogenen nicht immer gegeben. Zusätzlich reagieren die Hefen gegenüber cytotoxischen Substanzen sehr empfindlich, womit zumindest teilweise die unterschiedlichen Ergebnisse zu anderen *in vitro* Assays erklärbar sind. [Andersen et al, 1999] Zellwände und Transportsysteme in den Zellmembranen der Hefen beeinflussen die Aufnahme bestimmter Fremdstoffe, was z.T. zu geringen Effekten führt. In einigen Hefe-Modellen ist die Anzahl falsch negativer Ergebnisse daher sehr hoch. [Sonnenschein und Soto, 1998]

Ein zukünftiges Ziel bleibt weiter die Entwicklung neuer Kurzzeit-Tests, die standardisiert werden müssen. Der Einsatz verschiedener Methoden, die unterschiedliche Endpunkte abdecken, ist sinnvoll, um erhaltene Ergebnisse vergleichen zu können. So konnten Andersen et al zeigen, daß je nach Substanz und verwendetem Testsystem andere Ergebnisse beobachtet werden können [Andersen et al, 1999], was die Prüfung potentiell estrogenaktiver Verbindungen mit Testbatterien sinnvoll macht.

4.14 Auswerteverfahren zur Interpretation der experimentellen Ergebnisse

Die in den Abbildungen aufgeführten Messdaten wurden mittels logistischem Fit dargestellt. Der für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen typische Kurvenverlauf lässt sich mathematisch durch folgende logistische Formel allgemein beschreiben.

$$Y = \frac{A1-A2}{1+(X/X_0)^p} + A2$$

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

p: Power; Übergang zwischen unterem und oberem Plateau

X_0: x-Wert bei 50% von Y, Wendepunkt der Kurve; entspricht der effektiven Konzentration 50 % (EC_{50})

Diese vier Parameter beschreiben die dargestellten sigmoidalen Kurven. Das untere Plateau (A1) beschreibt den Nulleffekt bei nicht aktiviertem Rezeptor, der hauptsächlich von der experimentellen Nachweismethode und den äußeren Versuchsbedingungen abhängt. Das obere Plateau (A2) gibt den Sättigungsbereich der Rezeptorpopulation an, der Exponent p beschreibt die Steigung im Übergangsbereich. Der Wert X_0 entspricht dem X-Wert bei 50 % Aktivierung (EC_{50}-Wert).

Um eine bessere Vergleichbarkeit der Daten zu gewährleisten, sollte die Ergebnisdarstellung auf zwei wesentliche Parameter beschränkt werden. Aus dem X-Wert des Wendepunktes (EC_{50}-Wert) der Kurve erhält man durch den Vergleich des Quotienten aus dem EC_{50}-Wert von Estradiol und dem EC_{50}-Wert der jeweiligen Testverbindung die relative Potenz der Verbindung. Als zweiter Parameter kann der Wert des maximal induzierbaren Plateaus herangezogen werden. Bei einigen Verbindungen kann aufgrund toxischer Effekte oder durch die in sehr hohen Konzentrationsbereichen unvollständige Löslichkeit bzw. sonstiger bisher nicht aufgeklärter Mechanismen allerdings experimentell kein Plateau ermittelt werden. [Mußler, 1999]

Relative Potenz (RP): EC_{50}Estradiol/EC_{50}Testverbindung

Relative Effektivität (RE): Plateau Testverbindung x 100/ Plateau Estradiol

5 ZUSAMMENFASSUNG

Der Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit lag in der Etablierung und Validierung transgener und endogener Reporter zur Erfassung und Charakterisierung estrogenartiger Fremdstoffe.

Für den Aufbau transgener Reportergensysteme sollten eigene Reportergenplasmide konstruiert werden. Als transgene Reporter wurden die sekretierbare Alkalische Phosphatase sowie das Luciferase Enzym ausgewählt. Die Expression der Reportergene sollte unter der Kontrolle des estrogenrezeptorinduzierbaren Wildtyp Promotors Vitellogenin A2, der im Gegensatz zu synthetischen Tandemkopien alle Vorteile eines natürlichen Promotors aufweist, stehen. Dazu wurde der Vitellogenin A2 Promotor in die Multiple Cloning Site des Reportergenvektors vor die codierende Sequenz des Reportergens kloniert. Es gelang die Konstruktion beider Reportergenplasmide mit Hilfe zweier unterschiedlicher Verfahren. Die Zwischenschritte der Konstruktion wurden jeweils überprüft. Die abschließende Funktionsprüfung der Plasmide nach Transfektion in geeignete estrogenrezeptorpositive Zellinien durch entsprechende Inkubation der Zellen und Nachweis der Reportergene mittels spezifischer enzymatischer Reaktion war erfolgreich.

Für den Aufbau eines neuen Reportergensystems wurde die humane Mammacarcinomzellinie MCF-7 mit dem Reportergenkonstrukt pSEAP2/VITA2 transfiziert. Die Etablierung und Validierung erfolgte mit bekannten Estrogenrezeptoragonisten und Antagonisten. Exemplarisch wurden zwei Estrogenrezeptoragonisten, Diethylstilbestrol (DES) und β-Sitosterol geprüft. Der nach DES-Inkubation aus den erhaltenen Kurven berechnete RE-Wert (RE=Relative Effektivität) lag, wie in der Literatur beschrieben, in der gleichen Größenordnung wie der von Estradiol. Zusätzlich gelang die Cotransfektion der Plasmide pSEAP2/VITA2 und pSV2neo in MCF-7 Zellen und die Selektion der transfizierten Zellen mit Geneticinsulfat (G418). Untersuchungen der Alkalischen Phosphatase Aktivität der Zellen nach entsprechender Substanzinkubation ergaben, daß die Zellen bis zu einem halben Jahr beide Plasmide integriert haben und zur Charakterisierung potentiell hormonaktiver Verbindungen verwendet werden können. Danach ist eine erneute Transfektion erforderlich.

Die Entdeckung eines zweiten Estrogenrezeptors, ERβ, in Ratte, Maus und Mensch verdeutlicht, daß estrogenrezeptorvermittelte Mechanismen sehr komplex sind. Da beide Subtypen eine unterschiedliche Gewebeverteilung aufweisen, wird ein Zusammenhang mit den selektiven Wirkungen der Estrogene auf deren Zielgewebe diskutiert. Durch den Einsatz spezifischer Primer für ERα und ERβ konnte mittels RT-PCR gezeigt werden, daß in der humanen Mammacarcinomzellinie MCF-7 beide Subtypen exprimiert werden, was mit den Literaturergebnissen übereinstimmt. Aus diesem Grund sollten Reportergensysteme mit dem jeweiligen Estrogenrezeptorsubtyp in geeigneten Zellinien etabliert werden, um potentielle estrogenaktive Fremdstoffe am entsprechenden Subtyp getrennt zu untersuchen und so mögliche Unterschiede bezüglich der Genaktivierung zu erkennen. Es wurden verschiedene Zellinien, die endogen keinen Estrogenrezeptor exprimieren, mit den Rezeptorexpressionsplasmiden und den Reportergenplasmiden mit Hilfe unterschiedlicher Transfektionsmethoden transfiziert. Als geeignetste Zellinie erwies sich hierbei die embryonale Nierenzellinie HEK 293, als effektive und daneben auch kostengünstigste Transfektionsmethode wurde die Elektroporation gewählt. Die Etablierung und Validierung dieser Systeme konnte sowohl für Alkalische Phosphatase als auch für Luciferase erfolgreich abgeschlossen werden. Erste Substanzen wurden an beiden Subtypen durch Nachweis des Luciferasereportergens getestet. Signifikante Unterschiede wie von Kuiper et al [Kuiper et al, 1997] für die Phytoestrogene Coumestrol und Genistein beschrieben, konnte für die untersuchten Verbindungen (DES, Resveratrol und o,p´-DDT) nicht beobachtet werden.

Neben transgenen Nachweismethoden sollte ein Verfahren zur Detektion eines endogenen Reporters etabliert und validiert werden. Dafür wurde das in der MCF-7 Zellinie estrogenabhängig exprimierte pS2 Protein als geeigneter Parameter ausgewählt. Zur Detektion des pS2-Proteins wurden zwei Nachweisverfahren eingesetzt. Auf Protein-Ebene ein immunradiometrischer Assay, auf mRNA-Ebene die RT-PCR. Der Nachweis des pS2-Proteins mittels immunradiometrischem Assay zeigte eine gute Sensitivität, der EC_{50}-Wert von Estradiol lag im Vergleich zur stabilen MCF-7-Luc Zellinie eine Zehnerpotenz niedriger. Ergänzend wurden die Substanzen Bisphenol A, o,p´-DDT, Daidzein sowie p-tert.-Octyl- bzw. Nonylphenol untersucht. Der durch die jeweilige Verbindung hervorgerufene Verlauf der Proteininduktion ist mit den Ergebnissen des MCF-7-Luc-Systems vergleichbar. Im Vergleich zum MCF-7-Luc System konnte eine höhere intrinsische Potenz beobachtet werden.

Die Etablierung der RT-PCR-Methode zum Nachweis der mRNA mit pS2 spezifischen Primern war erfolgreich. Weiterführende Untersuchungen zur Quantifizierung der pS2 mRNA mittels nicht-genomischem Standard wurden von Gensler durchgeführt. [Gensler, 1999]

Verbindungen unterschiedlichster Herkunft wurden mit dem stabilen MCF-7-Luc System auf ein eventuell hormonelles Potential untersucht. Das Phytosterol β-Sitosterol (aus Soja und technisch erzeugtes) zeigte eine signifikante estrogene Wirkung, das als Negativkontrolle mitgeführte Cholesterol führte nicht zur Reportergeninduktion. Verschiedene Parabene wurden aufgrund der in der Literatur beschriebenen estrogenen Wirkung untersucht. Eine Expression der Luciferase durch die Parabene konnte im Transaktivierungsassay nicht nachgewiesen werden. Die Untersuchung verschiedener natürlich vorkommender Zimtsäureanaloga ergab, im Gegensatz zu Zimtsäuremethylester, keine Hinweise auf eine estrogene Aktivität. Neben der Prüfung von Einzelverbindungen kann dieses etablierte System auch zur Prüfung von Kombinationseffekten herangezogen werden. Kombinationen von Bisphenol A, o,p´-DDT, Daidzein, p-tert.-Octyl- oder Nonylphenol unterschiedlicher Konzentrationen mit Estradiol 1 nM ergaben hohe Reportergeninduktionen, die maximal bis zum Wirkungsplateau von Estradiol reichten. Zusätzliche Kombination mit ICI 182 780 1 µM führte zur Antagonisierung der beobachteten Effekte, was darauf hinweist, daß diese estrogenrezeptorvermittelt ablaufen.

Es konnten neue funktionelle Testsysteme und Methoden zur effektiven Prüfung potentiell hormonell aktiver Verbindungen etabliert und validiert werden, die auf der Detektion transgener oder endogener Reporter beruhen. Diese können sowohl zur Wirkstofffindung als auch zur Erkennung und Charakterisierung möglicher toxikologisch relevanter Wirkungen dienen.

6 EXPERIMENTELLER TEIL

6.1 Zellkultur

6.1.1 Lösungen und Chemikalien

- Fötales Kälberserum (FKS) (Gibco)

- Charcoal Dextran FKS (CDFKS)

0,5 % Norrit A (Serva) und 0,05 % Dextran (Sigma) werden in einer 0,14 M NaCl-Lösung gelöst. 50 ml hiervon werden zu 500 ml FKS gegeben und 45 Minuten bei 50°C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (800 g, 20 min) wird der Überstand bei -20 °C gelagert.

- 2 x CDFKS

Das nach obiger Vorschrift hergestellte CDFKS wird erneut mit der Norrit A/Dextran-Lösung versetzt und nach Inkubation im Wasserbad bei 45°C für 45 Minuten zweimal bei 800 g und 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird bei -20°C gelagert.

- Penicillin/Streptomycin (Gibco)
  10000 I.E./ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin
- L-Glutamin (Gibco)
  200 mM Lösung von L-Glutamin
- Kulturmedien für MCF-7, MVLN, CHO, HaCat, HEK 293, CV-1 und COS-7 Zellen serumhaltig:
  - RPMI 1640 mit Phenolrot und L-Glutamin (Gibco)
    500 ml Kulturmedium; 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin
  - Dulbecco's DMEM ohne Phenolrot und L-Glutamin (Gibco)
    500 ml Kulturmedium; 50 ml CDFKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin

- Dulbecco´s MOD Eagle Medium mit Phenolrot und Glucose, ohne Natrium-Pyruvat (Gibco)
  500 ml Kulturmedium, 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin
- Minimun Essential Medium, mit Phenolrot (Sigma)
  500 ml Kulturmedium, 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin

serumfrei:

- Dulbecco's DMEM ohne Phenolrot und L-Glutamin (Gibco)
  500 ml Kulturmedium; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin

- Phosphate Buffer Saline (PBS)
  5 g NaCl; 0,72 g $Na_2 HPO_4$, pH 7,3-7,4; 0,25 g KCl; 0,125 $KH_2 PO_4$
  mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen, autoklavieren
- Trypsin-Lösung
  125 mg Trypsin; 62,5 mg EDTA; mit PBS auf 250 ml auffüllen; über Nacht gekühlt rühren; sterilfiltrieren
- DMSO Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie (Merck)
- Trypanblau-Lösung
  0,4 g Trypanblau (Serva); 0,81 g NaCl; 0,06 g $KH_2 PO_4$, pH 7,2; mit H_2O bidest. auf 100 ml auffüllen

6.1.2 Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zellinien wachsen adhärent und werden unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen oder Petrischalen bei 37°C, 5% Kohlendioxidgehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert. [Lindl und Bauer, 1987]
In der Regel wird serumhaltiges Medium verwendet. Dem Medium wird nach Temperieren auf 37°C Penicillin/Streptomycin (5 ml) zugesetzt. Pen/Strep dient zur Kontaminationsprophylaxe gegen Prokaryonten. [Lindl und Bauer, 1987]

6.1.3 Mediumwechsel

Alle 3-4 Tage wird das Medium gewechselt, um eine Übersäuerung zu vermeiden. Als Indikator hierfür kann bei phenolrothaltigen Medien der Farbumschlag von rot nach orange-gelb herangezogen werden.
Nach Abgießen oder Absaugen des alten Mediums wird mit PBS gewaschen und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

6.1.4 Passagieren

Ist eine Kulturflasche zu 70 bis 80% konfluent bewachsen, werden die Zellen auf eine oder mehrere größere Flaschen aufgeteilt. Der Boden der Kulturflasche wird nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS mit Trypsinlösung bedeckt. Nach 3 bis 5 Minuten Inkubation im Brutschrank kommt es zum Ablösen der Zellen. Das Trypsin wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert.
Sollen die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert werden, werden sie steril abzentrifugiert (200 g, 10 min) und im entsprechenden Medium aufgenommen. Nach Überführung in neue Flaschen wird mit Medium aufgefüllt.

6.1.5 Einfrieren von Zellen

Zellen sind in flüssigem Stickstoff lange lagerfähig. Es werden ca. 10^6 abzentrifugierte Zellen in 1 ml Kulturmedium, das 10 % DMSO enthält, langsam eingefroren (-20 °C, -70 °C, flüssiger Stickstoff).

6.1.6 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen werden im Wasserbad bei 37°C möglichst schnell aufgetaut, zu FKS-haltigem Medium dazugegeben und bei 200×g eine Minute zentrifugiert, um das cytotoxische DMSO zu entfernen. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in Medium aufgenommen und gut vereinzelt. Das in FKS-haltigem

Medium resuspendierte Zellsediment wird zur Kultivierung eingesetzt. [Lindl und Bauer, 1987]

6.1.7 Auszählen von Zellen

Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer sterilen Pasteurpipette lassen sich die Zellen vereinzeln. Die Zellen werden mit Trypanblaulösung angefärbt. Lebende Zellen färben sich hellgelb, tote Zellen erscheinen blau gefärbt.
Unter dem Mikroskop wird mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei ein Feld einem Volumen von 0,1 µl entspricht (Verdünnung durch Färbelösung berücksichtigen!). [Lindl und Bauer, 1987]

6.2 BCA-Protein-Assay

6.2.1 Prinzip

Bicinchoninsäure (BCA) ist ein hochspezifisches und stabiles Komplexierungsreagenz für Kupfer(I)-ionen. Nach vorangegangener Biuretreaktion, bei der Kupfer(II)-ionen im alkalischen Milieu durch Proteine zu Kupfer(I)-ionen reduziert werden, reagiert BCA zu einem violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann so photometrisch quantifiziert werden. [Pierce, 1996]

6.2.2 Lösungen und Chemikalien

- BCA-Protein Assay Reagenz (Pierce)
- Reagenz A (Na_2CO_3, Bicinonic Acid (BCA), Natriumtartrat); Reagenz B (4% $CuSO_4$); 50:1 mischen
- Proteinstandard (Pierce): 2mg/ml BSA in 0,9% NaCl und 0,05% Natriumazid; Verdünnungen von 100-1200 µg/ml
- UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)
- Halbmikroeinmalküvetten, Polystyrol (Hellma)

6.2.3 Durchführung

50 µl Probe oder eine Verdünnung werden mit 1ml BCA-Reagenz 30 Minuten bei 37°C inkubiert und die Extinktionen gegen den Blindwert (als Probe 50 µl H_20 bidest. eingesetzt) bei 562nm gemessen. Mit Hilfe der linearen Regression aus den Werten der Proteinstandardverdünnungen lassen sich die Konzentrationen der Proben ermitteln. [Pierce, 1996]

6.3 Luciferase-Assay

6.3.1 Prinzip

Das Reportergen wird durch die Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an das Responsive Element der DNA (in diesem Fall das Estrogen Responsive Element) exprimiert. Das Reportergen Luciferase ist mittels Chemilunineszenz-Assay detektierbar. Dazu werden die Zellen lysiert und das Zelllysat mit dem Substratreagenz der Luciferase, Luciferin, inkubiert. Die bei der Reaktion entstehenden Photonen werden mittels Platten-Luminometer quantifiziert.

6.3.2 Lösungen und Chemikalien

- 30 ml Zellkultur Lysis-Puffer 5x(Promega)
  Zusammensetzung des Zell-Lysis-Puffer (1xReagenz):
  25 mM Tris-Phosphat; pH 7,8; 2 mM DTT; 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan, N,N,N`,N`-tetraessigsäure; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100
- 10 ml Luciferase Assay Puffer (Promega)
  Zusammensetzung des rekonstituierten Puffers:
  20 mM Tricine; 1,07 mM $(MgCO_3)_4Mg(OH)_2 * 5H_2O$; 2,67 mM $MgSO_4$; 0,1 mM EDTA; 33,3 mM DTT; 270 µM Coenzym A; 470 µM Luciferin; 530 µM ATP; pH 7,8

- 7 mg Luciferase Assay Substrat (Promega)
- PBS
- Platten-Luminometer (BMG)
- weiße 96-Lochplatten (Nunc)

6.3.3 Durchführung

1. Inkubation der Zellkultur

Die in Petrischalen in CDFKS-Medium wachsende Zellkultur wird zweimal mit PBS gewaschen und für 24 Stunden mit Estradiol und verschiedenen Testverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wird zweimal mit PBS gewaschen und erneut für 16-24 Stunden in hormonfreiem, serumhaltigem Medium nachinkubiert.

2. Herstellung der Zellextrakte

Das Kulturmedium wird abgezogen und die Petrischalen zweimal mit PBS gewaschen. Die am Boden der Petrischalen anhaftenden Zellen werden mit Lysis-Puffer (250 µl bei einem Durchmesser von 6 cm) versetzt und bei Raumtemperatur für 10-15 Minuten inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Eppendorfprobengefäß überführt. Nach Zentrifugieren für 1 Minute bei 13000 U/min (Minifuge Fresco) wird direkt die Luciferaseaktivität bestimmt bzw. die Zellextrakte bei -70°C bis zur Messung gelagert. Es sollte jedoch beachtet werden, daß sich die Luciferase-Aktivität beim Einfrier- und Auftauprozeß verringert, weshalb alle Proben gleich behandelt werden sollten.

3. Durchführung des Luciferase-Assays

Vor der Messung sollten sowohl die Zellextrakte als auch die Substrat-Lösung auf Raumtemperatur temperiert werden, da eine Temperatur von 0-4°C die Enzymaktivität um 5-10 % verringern würde. [Promega, 1996]

Für die Bestimmung der Luciferase-Aktivität mittels Plattenluminometer werden jeweils 60 µl Zelllysat eingesetzt. Die Proben werden in eine weiße 96-Lochplatte einpipettiert und die nachfolgend aufgeführten Parameter am Gerät eingestellt. Das Reagenz wird nach Primen der Pumpe über diese unmittelbar vor der Einzelmessung direkt in das entsprechende Well injiziert.
Die Messung der Photonenintensität kann über einen Zeitraum von 5 Sekunden bis 20 Minuten erfolgen. Die Lichtintensität der Reaktion bleibt für ungefähr 20 Sekunden konstant und nimmt dann nur langsam ab (Halbwertszeit von ca. 5 Minuten). Die Messung der erzeugten Photonen beginnt direkt nach Einspritzen des Reagenz zur Probe. Pro Well werden 50 Intervalle a 5 Sekunden gemessen.

Geräteparameter

Parameter	Einstellung
Empfindlichkeit	127
Shaking Diameter	1
Schüttelzeit	0
Anzahl der Intervalle	50
Intervallzeit	5,0 sec
Gesamtmesszeit	250 sec
Injektion 1	1
Injektion 2	0
Start der Messung	0
Start der Integration	1
Ende der Integration	1
Einspritzvolumen	180 µl

6.4 Sektretierbare Alkalische Phosphatase (SEAP) Reportergenassay

6.4.1 Prinzip

Beim SEAP-Reportergenassay handelt es sich um einen Chemiluminescentassay, der zur quantitativen Bestimmung der sekretierten alkalischen Phospahatase Aktivität im Kulturmedium transfizierter Zellen herangezogen werden kann.
CSPD wird durch Alkalische Phosphatase dephosphoryliert. Das hieraus resultierende instabile Dioxetananion zerfällt und emittiert Licht mit einer maximalen Wellenlänge von 477 nm. Das Lichtsignal, quantifiziert in einem Mikroplattenluminometer ist über 60 Minuten stabil und proportional zur Konzentration der Alkalischen Phosphatase. Es können bis zu 10^{-15} g Alkalische Phosphatase detektiert werden. Die Lichtsignale werden in 50 Intervallen à 25 Sekunden detektiert. [Boehringer, 1997; Tuan, 1997]

6.4.2 Lösungen und Chemikalien

- Alkalische Phosphatase Substrat CSPD [3-(4-methoxyspiro[1,2-dioxetane-3,2`(5`-chloro)-tricyclo(3.3.1.1)decane]-4-yl)phenylphosphate, Endkonzentration im Assay 1,25 mM (Stocklösung 25 mM)
- Substrate Puffer (Hersteller): enthält den Luminescence-Enhancer Emerald-II^{TM}
- Inaktivierungspuffer: 2 M Diethanolamin, 1 mM $MgCl_2$; 20 mM l-Homoarginin; pH 9,8
- Verdünnungspuffer: 0,75 M NaCl; 0,2 M Tris-HCl; pH 7,2
- Positivkontrolle Alkalische Phosphatase: humane Alkalische Phosphatase aus der Plazenta; Konzentration 4u/ml entspricht ca. 0,1 mg/ml
  [Boehringer,1997]

6.4.3 Durchführung

Einen Tag nach der Transfektion mit den entsprechenden Reportergenplasmiden werden die Zellen mit den Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert. Nach 48 Stunden wird das Medium entnommen und bis zur Messung der Alkalischen Phosphatase Aktivität bei -20°C

gelagert. Zur Messung werden 100 µl Medium mit 100 µl Verdünnungspuffer im Reaktionsgefäß versetzt und für 30 Minuten bei 65°C inkubiert. Nach Zentrifugieren bei 13000 U/min (Minifuge, Fresco), 1 Minute bei Raumtemperatur werden 80 µl in ein neues Reaktiosngefäß überführt und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 80 µl Inaktivierungspuffer und 5 MinutenInkubationszeit werden die Proben nach Zugabe von 80 µl Substratpuffer im Luminometer vermessen. Das Lichtsignal der Alkalischen Phosphatase ist nahezu 60 Minuten stabil, es werden 50 Intervalle à 25 sec gemessen. [Boehringer, 1997]

Geräteparameter

Parameter	Einstellung
Empfindlichkeit	127
Shaking Diameter	1
Schüttelzeit	0
Anzahl der Intervalle	50
Intervallzeit	12,0 sec
Gesamtmesszeit	600 sec
Injektion 1	1
Injektion 2	0
Start der Messung	0
Start der Integration	1
Ende der Integration	1
Einspritzvolumen	0

6.5 Cytosol-Aufarbeitung für pS2-Protein

6.5.1 Prinzip

Die Aufarbeitung des Cytosols zur Bestimmung des pS2-Proteins wird mit Hilfe eines Thiolreagenzhaltigen Puffers (hier Dithiothreithol, DTT) und bei 4°C durchgeführt. Damit ist eine höhere Stabilität des pS2-Proteins gewährleistet.

6.5.2 Lösungen und Chemikalien

- TED-Puffer: 0,01 M Tris-HCl; 0,0015 M EDTA; 0,5 mM DTT; pH 7,4 mit Protease-Inhibitoren: 0,5 mM PMSF; 1 µM Pepstatin; 1 µM Leupeptin

6.5.3 Durchführung

10^6 Zellen werden zum Anwachsen in 10 cm Petrischalen in CDFKS-Medium für 24 Stunden ankultiviert. Nach 48 Stunden Inkubation der MCF-7 Zellen mit den Testsubstanzen in CDFKS werden diese abtrypsiniert und bei 1080 U/min (MinifugeT), 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet 1x mit PBS gewaschen (Zentrifugation 1080 U/min,5 min, 2°C) und in TED-Puffer aufgenommen. Die Zellen werden 3x in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei 40000 U/min (Ultrazentrifuge), 50 Minuten bei 2°C zentrifugiert. Die Cytosolfraktion wird abpipettiert und in Aliquots bei -70°C bis zur pS2-Bestimmung gelagert. Von der Cytosolfraktion wird zusätzlich eine Proteinbestimmung durchgeführt. [McGuire und DeLaGarza, 1973]

6.6 Immunradiometrischer Assay für pS2-Protein

6.6.1 Prinzip

Beim pS2-ELSA handelt es sich um einen Festphasen-immunoradiometrischen Assay zur quantitativen Bestimmung von pS2-Protein im Cytosol. Das zu messende pS2 Protein wird „sandwichartig" zwischen beiden monoklonalen Antikörpern gebunden. Der erste Antikörper ist am ELSA-Festkörper gebunden, der zweite ist mit ^{125}J radioaktiv markiert und dient als Tracer. Nach Bildung des entsprechenden Antikörper-Antigen-markierter Antikörper-Komplex wird der ungebundene Tracer mittels geeigneter Waschschritte entfernt. Die auf der ELSA-Festphase gebundene Radioaktivtät ist proportional der pS2-Konzentration in der Probe. [Cis Diagonstics, 1998]

6.6.2 Lösungen und Chemikalien

- Diluent
- ^{125}J-Anti-pS2
- pS2-Standards (0-200-400-800-1400-2200 pg/ml)
- Kontrollzytosol (700 pg/ml)

6.6.3 Durchführung

In jedes ELSA-Röhrchen werden 200 µl ^{125}J-Anti-pS2 monoklonaler Antikörper, 200 µl Standard/Kontrollcytosol/Proben-Cytosol (Kontroll-Cytosol und Proben-Cytosol 1:20 mit Diluent verdünnt) pipettiert. Die ELSA-Röhrchen werden vorsichtig gevortext und 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Horizontalschüttler inkubiert. Dann wird der Röhrcheninhalt vollständig abgesaugt und 3x mit jeweils 3 ml H_2O bidest. gewaschen. Die gebundene Radioaktivität wird mittels γ-Counter ermittelt. Die in der Probe enthaltene pS2-Konzentration wird nach linearer Regression der pS2-Eichgeraden ermittelt. [CIS Diagnostics, 1998]

6.7 Isolierung von Kernproteinen

6.7.1 Prinzip

Die Zellen werden lysiert und die Kernproteine durch mehrere Lösungs-, Präzipitations- und Zentrifugationsschritte isoliert. [Wong et al, 1993]

6.7.2 Lösungen und Chemikalien

- PBS
  Phosphate Buffer Saline; pH 7,4
- Extraktionspuffer mit hohem Salzgehalt
  0,5 M KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% (v/v) Glycerin; 10 mM Tris;
  Proteaseinhibitoren: 0,5 mM PMSF; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin; 1 µM Benzamidin; pH 7,4
- Extraktionspuffer mit niedrigem Salzgehalt
  50 mM KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% (v/v) Glycerin; 10 mM Tris;
  Proteaseinhibitoren:0,5 mM PMSF; 0,1 µM Aprotinin; 1 µM Leupeptin; 1 µM Pepstatin; 1 µM Benzamidin; pH 7,4

6.7.3 Durchführung

Für die Gewinnung der Kernproteine werden ca. 4 Millionen Zellen in CDFKS-Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wird ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 24 Stunden in 2 x CDFKS kultiviert. Am dritten Tag werden die Zellen mit den entsprechenden Testsubstanzen in serumfreien Medium für 5 Stunden inkubiert. (Aufarbeitung nach Wilson)
Die einzelnen Arbeitsschritte werden unter Eiskühlung durchgeführt. Das Medium wird verworfen und die Zellen mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Zellen werden abgeschabt und zentrifugiert (200×g, 2°C für 10 Minuten). Das Sediment wird zweimal mit dem zehnfachen Volumen der gepackten Zellen zentrifugiert (bei 200×g, 2°C, 10 Minuten).

Das Zellpellet wird in 50 µl Extraktionspuffer mit hohem Salzgehalt aufgenommen und anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut.
Danach wird 30 Minuten bei 4°C auf einem Rotator inkubiert und ebenfalls 30 Minuten bei 4°C mit 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird 1:10 mit Extraktionspuffer mit niedrigem Salzgehalt verdünnt. Die Proben werden bei -70°C eingefroren. Dieses Präzipitat wird für die Band-Shift-Assays eingesetzt. [Wong et al, 1993]

6.8 Band-Shift-Assay

6.8.1 Prinzip

Band-Shift, auch Gel-Retardation oder Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) genannt, ist eine relativ einfache und schnelle Methode zur Identifizierung von Protein-DNA-Interaktionen. Mit Hilfe des Band-Shift können sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, detektiert werden.
Ein Protein-DNA-Komplex wandert in einem nativen (nichtdenaturierenden) Polyacrylamidgel langsamer als freie, ungebundene DNA-Fragmente bzw. Oligonukleotide.
Es werden nichtradioaktiv markierte Oligonukleotide zur Detektion der spezifischen DNA-bindenden Proteine verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide sind am 3'-Ende mit Digoxygenin markiert. Das Rohextrakt des zellulären Proteins, gegebenenfalls das gereinigte Proteinextrakt, wird mit dem endmarkierten Oligonukleotid (dies entspricht der spezifischen DNA-Bindungsstelle für das Protein) inkubiert. Das Gemisch wird auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und durch native Elektrophorese aufgetrennt.
Nach der Elektrophorese wird das Gel durch Semidry-Blotting auf eine Nylonmembran geblottet. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle sind nun für höhermolekulare Liganden (z.B. Antigene, Antikörper) frei zugänglich. Mit Hilfe der Blotting-Methode wird daher die Nachweismöglichkeit von elektrophoretisch getrennten Molekülen erweitert. Die DIG-markierten Oligonukleotide werden in einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen.
Zelluläre Rohextrakte enthalten eine große Zahl DNA-bindender Proteine, die nicht spezifisch an das markierte Oligonukleotid binden. Es wird deshalb ein Überschuß unspezifischer Oligonukleotide zugegeben, um diese nichtspezifischen Proteine zu binden.

Mit dem Band-Shift kann die Wanderungsgeschwindigkeit einer DNA-Doppelstrang-Sequenz, z.B. des „Hormone Responsive Element“, mit und ohne Zugabe eines Agonisten oder Antagonisten des steroidhormonbindenden Liganden untersucht werden. Eine Verschiebung der Bande bedeutet, daß der entsprechende Testsubstanz-Rezeptor-Komplex an die DNA bindet. [Berger et al, 1993; Promega, 1992; Westermeier, 1993; Winter et al, 1994]

6.8.2 Lösungen und Chemikalien für die native Polyacrylamidelektrophorese

- 5 × Gel-Shift-Binding Puffer
  20% (v/v) Glycerin; 5 mM $MgCl_2$; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 250 mM NaCl;
  50 mM Tris-HCL; 0,25 mg/ml poly (dI-dC)• poly (dI-dC); pH 7,5
- Zellulärer Extrakt aus MCF-7 Zellen
- ungelabeltes ERE (entnommen aus Vitellogenin A2 Promotor-Sequenz)
  5’ -AAA GTC AGG TCA CAG TGA CCT GAT CAA- 3’
  5’ –TTG ATC AGG TCA CTG TGA CCT GAC TTT- 3’
- Annealing der Einzelstränge

Die ERE-Sequenzen wurden aus einer ERE-Sequenz des Vitellogenin A2 entnommen. Die Herstellung der Sequenzen erfolgte durch die Firma MWG. Die Oligostränge wurden als Lyophylisat geliefert, entsprechend in TE-Puffer aufgenommen (Endkonzentration 100 pmol/µl) und zusammengelagert. Dazu werden je 300 pmol beider Einzelstränge in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und für 90 min bei 37°C im Thermomixer unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Doppelstrang wird schließlich für das End-Labeling mit Digoxygenin eingesetzt.

- gelabeltes ERE
  nichtradioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Sequenz (ERE), die unter Verwendung des Enzyms Terminale Transferase mit Digoxygenin-11-ddUTP (DIG-11-ddUTP) 3'-endmarkiert wurde
- Gel-Ladungs-Puffer (10×)
  250 mM Tris-HCl; 0,2% Bromphenolblau; 0,2% Xylencyanol; 40 % (v/v) Glycerin;
  pH 7,5
- 10×TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer)
  1 M Tris-Base; 0,85 M Borsäure; 0,01 M EDTA; pH 8,0

- Elektrophoresepuffer
  0,25×TBE-Puffer, pH 8,0
- Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung
  73g Acrylamid; 2g Bisacrylamid; mit H_20 bidest. auf 250 ml auffüllen
- APS-Lösung, 40%
  1g Ammoniumpersulfat in 100 ml H_20 bidest
- TEMED
  N, N, N', N'- tetramethylethylendiamin
- natives Polyacrylamidgel (5%)
  2,49 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung; 1,5 ml TBE-Puffer (10×); 10,95 ml H_20 bidest; diese Mischung 10-15 Minuten unter Wasserstrahlvakuum entgasen; dann Zugabe von 0,075 ml APS; 6µl TEMED

6.8.3 Durchführung

Das polymerisierte Gel wird vor dem Einbringen der Proben eine Stunde bei 100 V und 4°C vorbehandelt, um einen möglichen Überschuß von Persulfat bzw. nicht polymerisiertem Acrylamid zu entfernen und um den Salzgradienten einzustellen. [Rickwood, 1990]
Es werden verschiedene Probenansätze vorbereitet [Promega, 1992] und nach Zugabe des Ladungspuffers jeweils bis zu 10 µl in die Geltaschen pipettiert.
Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 100 V und 4°C bis die Xylencyanol-Bande ca. 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist. Das Gel wird anschließend direkt zum Semidry-Blotting verwendet.

6.8.4 Lösungen und Chemikalien für das Semidry-Blotting

- Membran
  - Membranfilter Nytran-N 12 N, amphotere Nylonmembran, Porengröße 0,2 µm, Schleicher
  - Nylon Membran, positiv geladen , Boehringer
- Blotting-Puffer
  0,25 × TBE-Puffer, pH 8,0

- Blockierstammlösung

  10 g Blockierreagenz werden in 100 ml Puffer 1 für 2 Stunden auf 50°C erhitzt
- Puffer 1

  100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5
- Puffer 2

  1% (v/v) Blockierstammlösung in Puffer 1
- Puffer 3

  100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM $MgCl_2$; pH 9,5
- TE-Puffer

  10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0
- Anti-DIG-Alkalin-Phosphatase, Boehringer
- CSPD

  Dinatrium 3-(4-methoxyspiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenylphosphat; Chemilumineszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase, Boehringer
- Schwarzweiß-Negativ-Filme
  - Kodak X-OMAT RP Film; Hyperfilm MP, High Performance Autoradiography Film, Amersham
  - Kodak BioMax Light Film für Chemilumineszenz Detektion, Kodak
  - Lumi-Film Chemiluminescent Detection Film, Boehringer

6.8.5 Durchführung

Das native Gel sowie die Nylonmembran werden ca. 30 Minuten in Blotting-Puffer äquilibriert. Für den Blottvorgang wird folgende Anordnung aufgebaut: Graphitanode, 8 Blatt Filterpapier, Nylonmembran, Gel, 8 Blatt Filterpapier, Graphitkathode. Die Übertragung findet bei 50 mA über 12 Minuten statt. Nach Beendigung des Blott wird die Membran mit UV-Licht fixiert (bei 254 nm für 5 Minuten).
Die Membran wird dann 1 Minute lang in Puffer 1 + 0,3% Tween gelegt. Danach läßt man die Blockierlösung (= Puffer 2) für 1 Stunde auf die Membran einwirken. Anschließend wird die Membran für 30 Minuten mit dem Antikörper Anti-DIG-Alkalin-Phosphatase in Puffer 2 inkubiert.

Die Membran wird dann zweimal mit Puffer 1 + 0,3% Tween für jeweils 15 Minuten gewaschen. Nun wird die Membran für 2 Minuten in Puffer 3 inkubiert, bevor sie in die Detektionslösung (CSPD in Puffer 3, Verdünnung 1:100) gelegt wird. Nach 5-10 Minuten wird die Membran in eine Plastiktüte eingeschweißt, für 5 Minuten bei 37°C inkubiert und ein Röntgenfilm 3-48 Stunden in einer Filmkassette belichtet.
Die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Chemilumineszenzsubstrat CSPD. Es entsteht ein instabiles Intermediat (Phenolat-Anion), das zerfällt. Das Zerfallsprodukt liegt im angeregten Zustand vor, beim Rückgang in den Grundzustand wird Licht emittiert. [Berger et al, 1993; Boehringer, 1994]

6.9 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mit Digoxygenin-11-ddUTP

6.9.1 Prinzip

Zur Markierung von Nukleinsäuren mit Hilfe des DIG-Systems wird Digoxygenin-11-ddUTP (DIG-11-ddUTP) verwendet.
Bei der DIG-Oligonukleotid-3'-Endmarkierung wird nur ein Molekül des DIG-11-ddUTP an das Oligonukleotid angehängt. Dieser Schritt wird durch die Verwendung des Enzyms Terminale Transferase gewährleistet, die immer nur ein Molekül DIG-11-ddUTP pro Nukleotid angekoppelt. Eine Kettenverlängerung nach dem Dideoxynukleotid kann nicht stattfinden.
Diese Methode ermöglicht eine nichtradioaktive Markierung von Oligonukleotiden, die zudem eine hohe Spezifität aufweist. [Boehringer, 1994; Schmitz et al, 1990]

6.9.2 Lösungen und Chemikalien

- 5×Reaktionspuffer
  1M Na-Cacodylat; 125 mM Tris; 1,25 mg/ml Rinderserumalbumin; pH 6,6
- $CoCl_2$ -Lösung
  25 mM $CoCl_2$
- 1mM Digoxygenin-11-ddUTP (DIG-11-ddUTP, Digoxygenin-11-2'-didesoxyuridin-5'-triphosphat) in H_20 bidest

- Terminale Transferase
  50 U/ml terminale Transferase in 200 mM Na-Cacodylat; 1 mM EDTA; 200 mM KCl; 0,2 mg/ml Rinderserumalbumin; 50% (v/v) Glycerol; pH 6,5
- Glykogen-Lösung
  20 mg/ml Glykogen in H_20 bidest
- EDTA
  200 mM EDTA; pH8,0
- LiCl
  4M LiCl-Lösung; 3M Na-Acetat; pH 5,5
- Ethanol p.A.
- H_2O bidest., sterilisiert

6.9.3 Durchführung

Es werden folgende Reagenzien nacheinander in ein Eppendorfgefäß auf Eis pipettiert: 5×Reaktionspuffer, $CoCl_2$ -Lösung, das zu markierende Oligonukleotid, DIG-11-ddUTP, Terminale Transferase und Wasser. Nach erfolgter Inkubation des Reaktionsgemischs bei 37°C für 15 Minuten wird die Inkubation durch Eiskühlung gestoppt und Glykogen- sowie EDTA-Lösung zur Mischung zugegeben. Die anschließende Fällung mit Ethanol dient zur Entfernung von nichtmarkierten Nukleotiden.
Die markierten Oligonukleotide werden mit 4 M $LiCl_2$ -Lösung und vorgekühltem absolutem Ethanol ausgefällt und gut durchmischt. Die Inkubation erfolgt entweder bei -70°C für 30 Minuten oder bei -20°C für 2 Stunden. Danach wird bei 13000×g für 15 Minuten bei -4°C zentrifugiert. Der Ethanol wird abdekantiert und das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 13000×g, 4°C für 15 Minuten). Das Pellet wird im Vakuum getrocknet und in sterilem H_20 bidest aufgenommen. Die DIG-markierten Oligonukleotide werden bei -20°C eingefroren. [Boehringer, 1994]

6.10 E-Screen-Assay (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay)

6.10.1 Prinzip

Beim Sulforhodamin-B-Assay werden die mit Trichloressigsäure am Boden der Titerplatten fixierte Zellmonolayer mit dem anionischen Farbstoff Sulforhodamin-B angefärbt. Sulforhodamin-B bindet unter milden sauren Bedingungen durch seine anionischen Sulfitgruppen an basische Aminosäuren in Proteinen. Im schwach Basischen wird der Farbstoff quantitativ aus den Zellen extrahiert. Die Extinktion der Farbstofflösung, die proportional der Zellzahl im Monolayer ist, wird photometrisch quantifiziert. [Skehan et al, 1990]

6.10.2 Lösungen und Chemikalien

- Sulforhodamin B (Sigma)
- 50 %ige Trichloressigsäure (TCA, Merck)
- 1 %ige Essigsäure (aus Eisessig, Merck)
- Tris-Base, 10 mM, pH 10,5 (Sigma)
- 24-Loch-Titerplatten (Greiner)
- Einwegküvetten (Fischer)

6.10.3 Durchführung

In jedes Loch der 24-Loch-Titerplatte werden 5000-6000 Zellen unter Kreisenlassen der Platten eingesät. Nach 24-stündiger Kultivierung in CDFKS-Medium erfolgt die Inkubation mit unterschiedlichen Testsubstanzen (je Konzentration vier Einzelbestimmungen), gelöst in CDFKS-Medium. Aufgrund der langen Inkubationszeit der Zellen mit den Substanzen müssen die einzelnen Inkubationsansätze (auch das Kontrollmedium) direkt vor der Inkubation steril filtriert werden. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen, die nur mit CDFKS-Medium inkubiert werden, als Positiv-Kontrolle Zellen, die mit verschiedenen E_2-Konzentrationen behandelt werden. Jeden zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Substratkonzentrationen, in der Regel über 5-7 Tage.

Zum Abbruch des Testansatzes werden die lebenden Zellen am Boden der Titerplatten durch Zugabe von 250 µl 4°C kalter 50 %iger TCA (10% TCA Endkonzentration) und 60 min. Inkubation bei 4°C fixiert und die Zellproteine ausgefällt. Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit kaltem Leitungswasser werden die Platten an der Luft getrocknet.
Die Platten werden dann mit jeweils 250 µl 0,4 %iger Sulforhodamin-B-Lösung in 1 %iger Essigsäure pro Loch angefärbt. Nach 30 min. wird der überschüssige Farbstoff abgegossen und die Platten vier bis fünfmal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, bis kein Farbstoff mehr an das Waschwasser abgegeben wird. Der proteingebundene Farbstoff wird nach erneutem Trocknen an der Luft in 1 ml 4°C kaltem Tris-Puffer (pH 10,5) pro Well solubilisiert und innerhalb von 15 min. bei 562 nm photometrisch vermessen. Überschreiten die Extinktionen einen Wert von 1,5 werden die Lösungen entsprechend mit Tris-Puffer verdünnt, bis die gemessenen Extinktionen im linearen Bereich liegen. Die erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und somit der Lebendzellzahl proportional.

6.11 Polymerasekettenreakrion (PCR)

6.11.1 Prinzip

PCR (polymerase chain reaction) ist eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäuren, d.h. spezifische DNA-Sequenzen können in vitro in einem Reaktionszyklus mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. Das Reaktionsprinzip der PCR entspricht der DNA-Replikation in der Zelle, eine DNA-Polymerase synthetisiert neue DNA an eine vorhandene Nukleinsäure-Matrize. Als Starter der Polymerase dienen Primer, die mit dem Matrizenstrang hybridisieren. Diese Primer sind aus den flankierenden Bereichen der Matrize abgeleitet, somit liegt das zu amplifizierende Fragment zwischen ihnen. Die Reaktion basiert auf drei Teilschritten mit unterschiedlichen Temperaturen. Denaturierung der DNA-Doppelstänge bei ca. 90°C, bei der die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen wird, Annnealing bei ca. 50°C zur Hybridisierung der Primer mit den DNA-Matrizen und Polymerisation bei ca. 70°C zur DNA-Kopierung durch die Polymerase. [Gassen, 1994; Newton und Graham, 1994]

6.11.2 Lösungen und Chemikalien

- Taq PCR Core Kit (Qiagen):
  10 x PCR Puffer : Tris-Cl, KCl, $(NH_4)_2SO_4$, 15 mM $MgCl_2$, pH 8,7
  Enzym: Qiagen Taq DNA Polymerase
  dNTP-Mix: je 10 mM dATP, dCTP, dGTP und dTTP
- Primer
  VIT A2 forward:
  5' –CTC GGT ACC GCC GAG ACA AGA ACT GAT G- 3'
  VIT A2 reverse:
  5' –GAA AGA TCT CAC TGA ACC CAG AAA AGC CTG- 3'
- Template
- Programmable Thermal Controller PTC-100^{TM} (Biozym)

6.11.3 Durchführung

Zur PCR-Amplifikation werden die benötigten Lösungen aufgetaut, gut durchmischt, zentrifugiert und anschließend auf Eis gestellt. Gemäß nachfolgendem Pipettierschema werden alle Komponenten in sterile dünnwandige PCR-Gefäße pipettiert. Nach Durchlaufen eines Hot-Start Programms bei dem im Thermocycler auf 94°C erhitzt wird, um unspezifische inter- und intramolekulare Bindungen von DNA und Primern zu minimieren, wird ein optimiertes Temperaturprogramm durchlaufen. Dazu wird die Taq-Polymerase zum Reaktionsgemisch zupipettiert und das PCR-Programm gestartet. Nach Amplifikation der entsprechenden Sequenzen werden die Proben bei -20°C gelagert bzw. direkt mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. [Qiagen, 1997b]

Pipettierschema:

Komponente	Endkonz./Reaktion
10 x PCR-Puffer	1x
dNTP-Mix (je 10 mM)	je 200 µM
Primer forward (10 µM)	0,1 µM
Primer reverse (10 µM)	0,1 µM
Template DNA	150 ng
H_2O bidest. steril (DEPC)	ad 50 µl
Taq-Polymerase	2,5 units
Gesamtvolumen	50 µl

Temperaturprogramm:

Hot Start Cycle	5 min	94°C	ohne Taq
1. Cycle			mit Taq
Denature	1 min	94°C	
Annealing	2 min	60°C	
Extension	3 min	72°C	

2. Cycle (30xWiederholung)		
Denature	40 sek	94°C
Annealing	2 min	60°C
Extension	3 min	72°C

Final Extension	10 min	72°C
Store		4°C

6.12 Gelelektrophorese

6.12.1 Prinzip

Zum Nachweis der erhaltenen Amplifikate werden die PCR-Produkte im Agarosegel aufgetrennt. Nach Färben mit dem Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid werden die entsprechenden Banden im UV-Licht detektiert. Für die Färbung mit Ethidiumbromid können zwei mögliche Verfahren angewendet werden:

6.12.2 Lösungen und Chemikalien

- 50 x TAE-Puffer: 242g Tris, 57,1 ml Essigsäure, 100 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0), ad 1l H_20 bidest
- Gelladepuffer: 0,2 % Bromphenolblau, 60 % Glycerin; 60 mM EDTA
- Ethidiumbromidbad: 2,5 µg Ethidiumbromid/ml
- Ethidiumbromidstocklösung: 10 mg Ethidiumbromid/ml H_20 bidest.
- Elektrophorese MiniProtean II und SubCell Biorad

6.12.3 Durchführung

<u>Auftrennung der DNA-Produkte im Agarosegel ohne Ethidiumbromid und anschließender Färbung (Verfahren 1)</u>

Zur Herstellung des Agarosegels wird die entsprechende Menge Agarose eingewogen und mit 1 x TAE-Puffer unter Rühren aufgekocht. Das Gel wird in einer Gelkammer gegossen und nach Abkühlen zur Gelelektrophorese eingesetzt.

Die Proben und der entsprechende Marker werden mit Ladepuffer versetzt und in die Ladungstaschen des auspolymerisierten Gels einpipettiert. Anschließend wird das Gel vollständig mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Die Auftrennung erfolgt bei konstanter Voltzahl je nach Gelgröße bei 40 bzw. 70 V. Das Gel wird in einem Ethidiumbromidbad gefärbt, kurz im Wasserbad gespült und die DNA-Banden im UV-Licht detektiert. Die Detektion kann mittels UV-Bank bzw. Lumi-Imager erfolgen.

Auftrennung der DNA-Produkte im Agarosegel mit Ethidiumbromid (Verfahren 2)

Zur Herstellung des Agarosegels wird die entsprechende Menge an Agarose mit 1xTAE-Puffer unter Rühren aufgekocht und nach Abkühlen mit Ethidiumbromidstammlösung versetzt. Die Lösung wird durch Rühren gut durchmischt und das Gel in die Gelkammer gegossen. Nach Auftrennung der DNA-Produkte erfolgt die Detektion direkt im UV-Licht bei 600 nm.

6.13 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

6.13.1 Prinzip

Eine DNA-Extraktion aus Agarosegelen wird aus unterschiedlichen Gründen durchgeführt, zur Reinigung und Entsalzung der DNA, Eliminierung von RNA- und Proteinverunreinigungen sowie zur Entfernung von Ethidiumbromid. [Dianova, 1995]
Die DNA-Isolation aus Agarosegelen wurde mit zwei verschiedenen Methoden durchgeführt.

6.13.2 Isolation der DNA mittels Glasmilchmethode

6.13.2.1 Prinzip

Die DNA-Exrraktion basiert hier auf der Bindung von einzel- und doppelsträngiger DNA (300 bp bis 15 kb) an eine spezielle Silika-Matrix (Glasmilk). [Dianova, 1995]

6.13.2.2 Lösungen und Chemikalien

Geneclean II Kit (Bio 101 Inc.) [Dianova, 1995]:

- NaI-Lösung: 6 M NaI-Lösung
- New Wash-Konzentrat: konzentrierte Waschlösung zur Herstellung einer NaCl/Ethanol/Wasser-Waschlösung

Dazu werden 14 ml des New Wasch-Konzentrates mit 280 ml H_2O bidest. steril und 310 ml 100% Ethanol gemischt und bei -20°C gelagert. Der Waschpuffer ist durch Tris-HCl und Tris-Base gepuffert, so daß der pH-Wert zwischen 7,0 und 8,5 liegt.

- Glasmilch: spezielle Silika-Matrix in H_20 bidest. gelöst

6.13.2.3 Durchführung

Die DNA wird in einem low-melting Gel aufgetrennt und nach Färben mit Ethidiumbromid werden die gewünschten Banden auf der UV-Bank mit Hilfe eines Skalpells herausgeschnitten. Die Gelbanden werden in Eppendorfgefäße überführt und nach Gewichtsbestimmung das dreifache des Gewichts in Form einer NaJ-Stammlösung zugegeben. Die Lösung wird im Wasserbad bei 45-55°C inkubiert, dabei kommt es zum Schmelzen der Agarose. Die Glamilchlösung wird gründlich gevortext, um eine gleichmäßige Suspension zu erhalten. Von dieser Suspension werden 5-10 µl zur DNA-haltigen Lösung pipettiert. Anschließend werden die Reaktionsgefäße 5 Minuten auf Eis gestellt und alle 1-2 Minuten gemischt. Im Verlauf der Inkubation bindet die DNA an die Glaspartikel. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min, 5 Minuten wird der Überstand verworfen. Das Pellet wird 3 x mit New Wash-Lösung (200 µl) gewaschen, 5 Sekunden zentrifugiert (13000 U/min, 1 min) und der Überstand jeweils verworfen. Nach den Waschschritten wird das Pellet in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer aufgenommen, 2-3 Minuten bei 45-55°C inkubiert und zentrifugiert (13000 U/min, 5 min). Der Überstand enthält die isolierte DNA und wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Lagerung erfolgt bei –20°C. [Dianova, 1995]

6.13.3 DNA-Extraktion nach „Sqeeze-Freeze-Methode“

6.13.3.1 Materialien und Chemikalien

- PCR-Reaktionsgefäß, durchstochen und mit silanisierter Glaswolle gefüllt
- fl. Stickstoff

6.13.3.2 Durchführung

Die gewünschten Banden werden nach Auftrennung im Agarosegel ausgeschnitten und in flüssigem Stickstoff gefroren.
Ein PCR-Reaktionsgefäß wird am Boden durchstochen und bis zu einem Viertel mit silanisierter Glaswolle gefüllt. Das gefrorene Gelstück wird in das PCR-Gefäß überführt und dieses in ein größeres Reaktionsgefäß, das als Auffanggefäß dient, gestellt. Bei der Zentrifugation bei 13000 U/min, 10 Minuten kann die im Elektrophoresepuffer gelöste DNA in das Auffangbehältnis fließen, die Agarose wird durch die Glaswolle zurückgehalten. Die so extrahierte DNA wird einer Ethanol-Fällung unterworfen. [Kunz, 1997]

6.13.4 Ethanol-Fällung

6.13.4.1 Prinzip

Zur Reinigung der DNA von Salzen und Ethidiumbromid und zur Aufkonzentrierung der DNA wird diese einer Ethanol-Fällung unterworfen. In Gegenwart einwertiger Kationen wie z.B. Na^+ und bei Temperaturen unter –20°C fällt Ethanol Nukleinsäurepolymere sehr wirksam aus. Der dabei entstehende Niederschlag kann durch Zentrifugation abgetrennt werden. Vorteil der Ethanolpräzipitation liegt darin, dass kurze Ketten und monomere Bausteine der Nukleinsäuren in Lösung bleiben, somit wird in diesem Stadium auch die RNA abgetrennt. [Brown, 1996]

6.13.4.2 Lösungen und Chemikalien

- Ethanol p.A.
- Natriumacetat-Lösung: 3 M Natriumacetat, pH 5,6
- TE-Puffer: 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8,0, steril

6.13.4.3 Durchführung

Zur DNA-Lösung werden 1/10 des Ausgangsvolumens einer Natriumacetat-Lösung und das 2-3fache an absolutem Ethanol zugegeben. Die DNA-Fällung wird bei -20°C für mindestens 1 Stunde, besser über Nacht durchgeführt. Nach Zentrifugation bei 13000 U/min, 10 Minuten wird der Überstand abpipettiert und das Pellet im Wasserstrahlvakuum 5-10 Minuten getrocknet. Die DNA wird dann in einem entsprechenden Volumen TE-Puffer bzw. H_2O bidest. aufgenommen. [Kunz, 1995; Genetik, 1997]

6.14 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch Messung der UV-Absorption bei 260 nm bestimmt werden. Dabei entspricht

1 A_{260}-Einheit (1,0)	50 µg/ml doppelsträngiger DNA
	40 µg/ml einzelsträngiger RNA

Die Nukleinsäure-Proben werden mit H_2O so verdünnt, daß der Extinktionsunterschied gegen H_2O mindestens 0,1 beträgt.
Der Reinheitsgehalt der Nukleinsäuren wird durch Ermittlung des Quotienten A_{260nm}/A_{280nm} bestimmt und sollte > 1,7 sein. [Brown, 1996; Maniatis et al, 1989]

6.15 DNA-Verdau

6.15.1 Prinzip

Um auszuschließen, dass bei der RT-PCR-Reaktion neben der RNA auch noch DNA im Reaktionsansatz vorliegt, wird die Probe direkt vor der RT-PCR einem DNase-Verdau unterworfen.

6.15.2 Lösungen und Chemikalien

- DNase 10000 units/ml (Pharmacia)

6.15.3 Durchführung

Die zur RT-PCR einzusetzende RNA-Menge wird mit der entsprechenden Menge H_2O und Dnase 10 Minuten bei 37°C und danach für weitere 10 Minuten bei 80°C inkubiert, um die DNase zu denaturieren. Dieser Ansatz kann direkt für die nachfolgende RT-PCR eingesetzt werden. [Amersham, 1997]

6.16 Isolation der Gesamt-RNA

6.16.1 Prinzip

Die Isolierung der Gesamt-RNA aus Zellen ist mittels RNeasy-Kit möglich. Mittels eines speziellen Hochsalzpuffersystems ist die Isolierung von bis zu 100 µg RNA mit einer Nukleotidlänge > 200 bp möglich. Die Zellen werden in Gegenwart eines denaturierenden Guanidiniumisothiocyanat (GITC) enthaltenen Puffers lysiert und homogenisiert. Der GITC-Puffer inaktiviert RNasen und gewährleistet somit die Isolation intakter RNA. Die Probe wird dann auf eine RNeasy-Spin-Säule gegeben, die RNA bindet an eine Silikalgel-Membran und Kontaminanten werden mit Hilfe verschiedener Puffer ausgewaschen. Die RNA wird mit RNase-freiem sterilen H_2O bidest. eluiert. [Qiagen, 1997a]

6.16.2 Lösungen und Chemikalien

- Diethylpyrocarbonat (DEPC); Sigma
- H_2O DEPC steril:
  Diethylpyrocarbonat wird 0,1 %ig in H_20 bidest. steril angesetzt, über Nacht bei Raumtemperatur gerührt und dann autoklaviert.
- 2-Mercaptoethanol mindestens 99%, Promega

- 70 % Ethanol: Ethanol p.A. und H_2O DEPC steril
- RLT-Puffer: Lysepuffer
  enthält Guanidiniumisothiocyanat und nicht-ionisches Detergenz Nonidet 40(NP-40), Zugabe von ß-Mercaptoethanol (10 µl/ml Puffer) direkt vor Gebrauch, Qiagen
- RW1-Puffer: Waschpuffer, keine näheren Angaben zur Pufferzusammensetzung seitens des Herstellers, Qiagen
- RPE-Puffer: Waschpuffer, als Konzentrat geliefert, vor Gebrauch Zugabe von 4 Volumen Ethanol p.A., keine näheren Angaben seitens des Herstellers, Qiagen

6.16.3 Durchführung

Es werden $1x10^6$ Zellen in Petrischalen (6 cm) in CDFKS Medium ausgesät und nach 48 Stunden eine RNA-Aufarbeitung durchgeführt.
Die Gesamt-RNA wird mittels RNeasy Mini Kit isoliert. Nach Absaugen des Mediums werden die Zellen mit einem Guanidiniumisothiocyanathaltigen Puffer versetzt, der RNasen inaktiviert und damit einen RNA-Abbau verhindert. Die Zellen werden abgeschabt, auf eine Qiashredder-Säule gegeben und abzentrifugiert, um eine Homogenisierung und Viskositätsverringerung der Probe zu erreichen. Nach Zugabe von 70%igem Ethanol wird die Probe auf eine RNeasy Spin Säule (Qiagen) gegeben, abzentrifugiert und die RNA somit an das Silikagel-Säulenmaterial adsorbiert. Durch mehrere Zentrifugationsschritte mit unterschiedlichen Waschpuffern wird die RNA von Kontaminanten befreit und schließlich mit RNase freiem H_2O bidest. steril eluiert. [Qiagen, 1997a]

6.17 RT-PCR Reaktion

6.17.1 Prinzip

Eine empfindliche Technik zur Bestimmung der Gegenwart oder Abwesenheit von RNA-Molekülen bzw. Stärke einer Genexpression, bietet die RT-PCR.
Bei der Ein-Schritt-RT-PCR werden cDNA-Synthese und PCR mit einem optimierten Puffer und einem entsprechenden Enzym zwar nacheinander, aber ohne erneute Reagenzien-Zugabe durchgeführt. Bei dem hier eingesetzten Titan^{TM}One Tube RT-PCR System wird die Reverse Trankriptase AMV für die Erststrangsynthese und der Expand^{TM}High Fidelity Enzym-Mix, bestehend aus Taq DNA Polymerase und Pwo DNA Polymerase, für den PCR-Teil der Reaktion eingesetzt. [Boehringer, 1998]

6.17.2 Lösungen und Chemikalien

- H_2OEPC behandelt 0,1 ml DEPC ad 100 ml H_2Obidest., über Nacht bei RT rühren, Lösung autoklavieren
- DEPC Diethylpyrocarbonat (Sigma)
- Titan^{TM}One Tube RT-PCR System (Boehringer Mannheim)
    - Nukleotidmix dATP, dCTP, dGTP, dTTP je 10 mM
    - DTT-Lösung: Dithiothreitol-Lösung 100 mM
    - 5 x RT-PCR Puffer: 7,5 mM $MgCl_2$; 1,0 ml DMSO
    - Enzym-Mix Expand^{TM}High Fidelity Enzym-Mix; Reverse Transkriptase, AMV in Lagerpuffer
- Primer
    - ß-Actin forward:
      5´- TGA AGG TCG GAG TCA ACG GAT TTG GT-3
    - ß-Actin reverse:
      5´- CAT GTG GGC CAT GAG GTC CAC CAC-3´
    - ERα forward:
      5’ –AAT TCA GAT AAT CGA CGC CAG- 3’
    - ERα reverse:

5’ –GTG TTT CAA CAT TCT CCC TCC TC- 3’

- ERß forward:

  5’ –TAG TGG TCC ATC GCC AGT TAT- 3’

- ERß reverse:

  5’ –GGG AGC CAC ACT TCA CCA T- 3’

- RNase-Inhibitor 10-50 x 10^3 Einheiten/ml (Boehringer Mannheim)

6.17.3 Durchführung

Zur Vermeidung der Kontamination mit RNasen werden die folgenden Pipettierschritte mit sterilen, DNase- und RNase-freien Filterspitzen sowie DEPC-behandeltem H_2O (RNase-frei) durchgeführt. Die zur RT-PCR benötigten Reagenzien werden nach Auftauen, Vortexen und Zentrifugation eisgekühlt. Die benötigten Komponenten werden in der Reihenfolge des folgenden Pipettierschema in sterile, DNase- und RNase-freie PCR-Gefäße pipettiert. Der nach vorgegebenem Pipettierschema erstellte Mastermix wird erst direkt vor Starten der RT-Reaktion zu den Proben gegeben. RT- und PCR-Reaktion werden mit nachfolgendem Temperaturprogramm durchgeführt. Die Proben werden nach Beendigung auf einem 1,3-1,5% igen Agarosegel analysiert und bei -20°C gelagert.

Pipettierschema:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H_2O (DEPC-behandelt)	variabel	
Nukleotidmix (je 10 mM)	1 µl	0,4 mM
Primer forward (5 µM)	3 µl	0,6 µM
Primer reverse (5 µM)	3 µl	0,6 µM
DTT (100 mM)	2,5 µl	5 mM
RNase-Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	20 U
Template RNA	variabel	1 pg - 1 µg
Mastermix		

Mastermix:

Komponente	Volumen	Endkonzentration
H_2O (DEPCbehandelt)	14 µl	
5 x RT-PCR-Puffer	10 µl	2 x
Enzym-Mix	1 µl	
Total	25 µl	

Temperaturprogramm:

1 x	RT-Reaktion bei 50 °C, 30 min
1 x	Template-Denaturierung bei 94 °C, 2 min
10 x	Denaturierung bei 94 °C, 30 sec Anlagerung bei 55 °C, 1 min Verlängerung bei 68 °C, 3 min
25 x	Denaturierung bei 94°C, 30 sec Anlagerung bei 55 °C, 1 min + Zyklusverlängerung von 5 sec für jeden Zyklus
1 x	im letzten Zyklus Verlängerung bei 68°C, 10 min

6.18 RNA-Verdau

6.18.1 Prinzip

Plasmidproben die durch Minipräparation gewonnen wurden, werden vor einem Restriktionsverdau, RT-PCR-Proben vor der Agarose-Gelelektrophorese einem RNA-Verdau unterzogen, um noch im Ansatz vorhandene RNA zu entfernen.

6.18.2 Lösungen und Chemikalien

- RNase Stammlösung: 0,1 mg RNase in TE-Puffer (zusätzlich 1,5 mM NaCl)
  Ansatz 15 min auf Magnetrührer kochen; nach Abkühlen aliquotieren und bei –20°C lagern

6.18.3 Durchführung

Die einzusetzende Probe (Minipräparation vor Restriktionsverdau) wird mit einer entsprechenden RNase-Menge versetzt und für 30 Minuten bei 37°C inkubiert.

6.19 Bakterienkultivierung

6.19.1 Lösungen und Chemikalien

- Ampicillinstammlösung: 50 mg Ampicillin/ml H_2O bidest.; steril filtrieren und nach portionieren bei –20°C lagern
- Nährmedien:
  - LB-Medium: 1g Caseinhydrolysat
    1g NaCl
    0,5 g Hefe
    ad 100 ml H_2O bidest.; pH 7,5; autoklavieren
  - LB-Agar: 1 g Caseinhydrolysat
    1 g NaCl
    0,5 g Hefe
    2 g Bacto Agar
    ad 100 ml H_2O bidest.; pH 7,5; autoklavieren
- Selektivmedien: Nach Autoklavieren und Abkühlen auf Handwärme wurde bei den Selektivmedien Ampicillin zugegeben.

6.19.2 Übernachtkultur von E. coli

Dazu werden 5 ml LB-Medium in ein Übernachtkulturröhrchen pipettiert und mit E.coli sure bzw. E. coli DH5α eines Glycerolstocks angeimpft. Die Inkubation im Schüttelinkubator erfolgt bei 37°C, 160 U/min über Nacht. [Genetik, 1997]

6.19.3 Anlegen einer Glycerinkultur

6.19.3.1 Lösungen

- 86-88% Glycerollösung, steril

6.19.3.2 Durchführung

Zu 0,85 ml einer E. coli Übernachtkultur werden 0,15 ml einer 86%igen sterilen Glycerollösung gegeben, vorsichtig gemischt und bei -20 bzw. -70 °C gelagert. [Genetik, 1997]

6.20 Transformation

6.20.1 Prinzip

Zur Aufnahme von Plasmiden und ihrer nachfolgenden Amplifikation in Bakterien, muß deren Zellwand durchlässig (transformationskompetent) gemacht werden. Dies wird durch Inkubation der Zellen mit eiskalter CaCl-Lösung erreicht. Die Plasmid-DNA wird mit einer Effizienz bis zu 10^5-10^6 Transformanten pro µg DNA aufgenommen. Zur Selektion der Zellen, die das Plasmid aufgenommen haben, werden Antibiotikaresistenzgene für Ampicillin oder Tetracyclin verwendet. [Gassen und Bertram, 1991; Gassen und Minol, 1996]

6.20.2 Lösungen und Materialien

- Zentrifugenbecher (50 ml), steril
- Erlenmeyerkolben (250 ml), steril
- 50 mM $CaCl_2$-Lösung, eiskalt
- Übernachtkulturröhrchen
- LB-Medium
- LB-Agarplatten mit bzw. ohne Ampicillin
- Schüttelinkubator
- Brutschrank

6.20.3 Durchführung

Kompetente E. coli Zellen

300 µl einer Übernachkultur werden in 30 ml LB-Medium überführt und für 2,5 Stunden bei 37 °C und 160 U/min im Schüttelinkubator inkubiert. Die Zellen werden dann in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und bei 5000 U/min (Zentrifuge Beckmann), 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird abgegossen und verworfen, das Bakterienpellet in 12,5 ml kalter $CaCl_2$-Lösung aufgenommen und vorsichtig mehrmals vereinzelt. Die Bakteriensuspension wird für 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend bei 5000 U/min, 4°C 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird erneut verworfen. Das Pellet wird in 2,5 ml kalter $CaCl_2$-Lösung resuspendiert. Die nun kompetenten E. coli Zellen können entweder direkt zur Transformation verwendet werden bzw. nach Anlegen eines Glycerolstockes bei -70°C für ca. 2-3 Monate gelagert werden.

Transformation mittels Hitze-Schock-Methode

200 µl der kompetenten E.coli Suspension werden in einem sterilen Eppendorfgefäß mit ca. 1 ng des zu amplifizierenden Plasmids gemischt. Parallel wird ein Kontrollansatz ohne Plasmid mitgeführt. Die Ansätze werden 30 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend einem Hitze-Schock bei 42°C für 2 Minuten ausgesetzt. Nach Abkühlen auf Eis für 5 Minuten wird 1 ml

LB-Medium zugegeben und 30 bis 60 Minuten bei 37°C inkubiert. Von beiden Ansätzen werden entsprechende Mengen auf LB-Agarplatten mit Ampicillin bzw. als Kontrolle ohne Ampicillin ausplattiert. Die Platten werden über Nacht bei 37°C inkubiert.

6.21 Isolierung von Plasmiden

Plasmide sind extrachromosomale ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle mit einer Größe von 2 bis 100 kb, die sich autonom vom Chromosom der Wirtszelle replizieren können. Plasmide können als Vektoren für die Klonierung von DNA-Sequenzen eingesetzt werden. Wird ein DNA-Fragment in ein Expressionsplasmid eingebaut, so sind die Zellen in der Lage, das klonierte Gen zu exprimieren. Neben den Verfahren zur Transformation der Plasmide in die Prokaryonten sind auch Methoden, die zur Rückgewinnung der Plasmide aus den Zellen dienen, von Bedeutung. Zur schnellen Gewinnung kleinerer Plasmidmengen wird die sogenannte Minipräparation eingesetzt, während die Maxipräparation der Isolation von größeren Plasmidmengen dient. [Gassen und Bertram, 1991; Brown, 1996]

6.21.1 Minipräparation

6.21.1.1 Prinzip

Die Minipräparation dient einer schnellen und quantitativen Überprüfung der Transformation von E. coli sure bzw. E. coli DH5α.

6.21.1.2 Lösungen und Chemikalien

- TE-Puffer: 10 mM Tris/HCL
  1mM EDTA
  pH 8,0; autoklavieren

- Lösung I: 1,66 ml 0,3 M Glucose
  0,25 ml 1 M Tris/HCl pH 8,0
  0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0
  ad 10 ml H_2O bidest. steril, autoklavieren
- Lösung II: 0,2 ml 10 M NaOH
  1 ml 10% SDS
  ad 10 ml H_2O bidest. steril
- Lösung III: 6,0 ml 5 M Kaliumacetat
  1,15 ml Eisessig (99,7%)
  ad 10 ml H_20 bidest. steril, autoklavieren

Löungen I bis III vor Gebrauch immer frisch ansetzen

6.21.1.3 Durchführung

Mit einem sterilen Zahnstocher bzw. einer sterilen Pipettenspitze wird vom Selektionsagar eine Kolonie der transformierten E. coli gepickt und in 5 ml LB-Medium mit entsprechender Ampicillinkonzentration überimpft. Die Inkubation erfolgt über Nacht im Schüttelinkubator bei 37°C und 160 U/min. Von der Übernachtkultur wird ein Glycerolstock angelegt und 1,5 ml der Bakteriensuspension in ein steriles Eppendorfgefäß überführt und bei 13000 U/min (Minifuge Freco) 1 Minute zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 µl Lösung I resuspendiert und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend werden 200 µl Lösung II zum Ansatz zupipettiert, kurz gevortext und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl Lösung III wird die Probe schnell gemischt und sofort für weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Dabei bildet sich ein weißer Niederschlag, der bei 13000 U/min 10 Minuten abzentrifugiert wird. Der plasmidhaltige Überstand wird in ein neues steriles Reaktionsgefäß überführt und mit 800 µl Ethanol p.A. versetzt. Die Ethanolfällung erfolgt für mindestens 1 Stunde bei -20°C. Die DNA wird nach der Ethanol-Fällung bei 13000 U/min 10 Minuten abzentrifugiert, das Pellet mit 100 µl 70%igem vorgekühltem Ethanol gewaschen und bei 13000 U/min 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig entfernt und das Pellet im Vakuum für ca. 7 Minuten getrocknet. Die DNA wird in TE-Puffer über Nacht bei 4°C gelöst und schließlich bei -20°C gelagert. [Gassen und Bertram, 1991; Genetik, 1997]

6.21.2 Maxipräparation

6.21.2.1 Prinzip

Die Plasmidaufreinigung basiert hier auf einer modifizierten alkalischen Lyse, Bindung der Plasmid-DNA an eine Säule bestehend aus Anionen-Austausch-Harz unter geeigneten Niedersalz- und pH-Bedingungen. RNA, Proteine und andere Verunreinigungen werden mittels Mittelsalzpuffer herausgewaschen, die Plasmid-DNA mit einem Hochsalzpuffer von der Säule eluiert und durch Isopropanol entsalzt und aufkonzentriert. [Qiagen, 1998]

6.21.2.2 Lösungen und Chemikalien

- Qiagen-Tip — Anionen-Austausch-Säule
- Puffer P1 /Resuspension) — 50 mM Tris/HCl; pH 8,0
10 mM EDTA
100 µg/ml RNase A
- Puffer P2 (Lyse) — 200 mM NaOH
1% SDS
- Puffer P3 (Neutralisation) — 3,0 M Kalium-Acetat; pH 5,5
- Puffer QBT (Equilibrierung) — 750 mM NaCl
50 mM 3-[N-Morpholino]propansulfonsäure (MOPS); pH 7,0
15% Isopropanol
0,15% Triton X-100
- Puffer QC (Waschen) — 1,0 M NaCl
50 mM MOPS, pH 7,0
15% Isopropanol
- Puffer QF (Elution) — 1,25 M NaCl
50 mM Tris, Tris/HCl; pH 8,0
15% Isopropanol

6.21.2.3 Durchführung

Die Maxipräparation der Plasmide erfolgt mittels Qiagen Maxipräparationskit. Dazu wird eine Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte mit Ampicillin in Selektionsmedium überführt und bei 37°C für ca. 8 Stunden im Schüttelinkubator bei ca. 160 U/min inkubiert. Diese Starterkultur wird 1:1000 in 200 ml Selektionsmedium verdünnt und ebenfalls bei 37°C im Schüttelinkubator bei ca. 160 U/min für 12-16 Stunden inkubiert. Die Zellsuspension wird in einen sterilen Zentrifugenbecher überführt und bei 6000 U/min, 4°C für 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 10 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer P2 wird 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgt eine Inkubation auf Eis für 15 Minuten nach Zugabe von 10 ml Puffer P3 und anschließend eine Zentrifugation bei 12000 U/min für 30 Minuten und bei 4°C. Der plasmidhaltige Überstand wird erneut bei 4°C, 12000 U/min für 15 Minuten zentrifugiert.
Nach Equilibrieren einer Qiagen-Säule mit 10 ml Puffer QBT wird der Überstand der letzten Zentrifugation auf die Säule gegeben, zweimal mit Puffer QC gewaschen und die am Säulenmaterial gebundene DNA mit 15 ml Puffer QF eluiert. Die DNA-Fällung erfolgt durch Zugabe von 10,5 ml Isopropanol und Zentrifugation bei 11000 U/min für 30 Minuten bei 4°C. Das Pellet wird mit 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 11000 U/min, Minifuge Fresco, 10 Minuten, 4°C). Die Plamid-DNA wird für ca. 10 Minten im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer aufgenommen. Die DNA-Lösung wird über Nacht bei 4°C belassen und dann bei -20°C gelagert.
Der DNA-Gehalt wird mittels UV-Spektrometer bestimmt. Die Maxipräparation wird mittels Restriktionsverdau und anschließender Agarosegelelektrophorese kontrolliert. [vgl. Kapitel 6.12 und 6.22]

6.22 Restriktionsverdau

6.22.1 Prinzip

Eine erfolgreiche Plasmidpräparation wird durch Restriktionsverdau des Plasmids mit entsprechenden Restriktionsenzymen und anschließender Detektion nach Auftragen auf ein Agarosegel nachgewiesen. [Gassen und Bertram, 1991; Maniatis et al, 1989]

6.22.2 Lösungen und Chemikalien

- Hind III (Pharmacia) 10000 units/ml
- EcoRI (Pharmacia) 5000 units/ml
- BglII (Pharmacia) 8000 units/ml
- KpnI (Pharmacia) 8000 units/ml
- One for all Puffer Plus (10x) 100 mM Tris-Acetat pH 7,5
  100 mM Magnesium-Acetat
  500 mM Kalium-Acetat
  (Pharmacia)
- DNA-Marker:
  - Lambda DNA/Hind III Marker (MBI)
  - Gene Ruler^{TM}100bp DNA Ladder Plus (MBI)

6.22.3 Durchführung

Dazu wird eine entsprechende Menge Plasmid, Puffer, Enzym und H_2O bidest. steril in ein Eppendorfgefäß gegeben. Der Ansatz wird 3-4 Stunden beim jeweiligen Temperaturoptimum (25 oder 37°C) des Enzyms inkubiert, direkt zur Gelelektrophorese eingesetzt oder nach Inaktivierung des Enzyms bei 65°C bei -20°C gelagert.

6.23 Dephosphorylierung linearisierter DNA

6.23.1 Prinzip

Mit Hilfe der alkalischen Phosphatase (CIAP) können die 5`-Phosphatgruppen linearer DNA-Moleküle abgespalten werden. Die Dephosphorylierung linearisierter DNA sollte durchgeführt werden, wenn bei einer intermolekularen Ligation die Rezirkularisierung des Plasmids verhindert werden soll. Eine Ligation kann dann nur noch zwischen Insert-DNA, die zwei Phosphatgruppen für die Ausbildung der Phosphodiesterbindungen liefert und dephosphorylierter Vektor-DNA erfolgen. [Manitis et al, 1989]

6.23.2 Lösungen und Chemikalien

- Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP); 1,3 units/µl
- 10 x Reaktionspuffer: 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0); 1 mM $MgCl_2$; 10 mM 4-Nitrophenylphosphat
- Phenol-Chloroform (Roth)
- Chloroform-Isoamylalkohol 25:1
- 3 M Natriumacetat

6.23.3 Durchführung

Vorbereiten des Vektors

Der Vektor wird mit dem entsprechenden Restriktionsenzym verdaut, sodaß ein Einbau des gewünschten Inserts erfolgen kann. Anschließend erfolgt eine Phenol-/Chloroform-Extraktion, zur Abtrennung des Restriktionsenzyms und zur Aufreinigung des Vektors.

Aufreinigung der DNA mittels Phenol-/Chloroformextraktion

Die DNA-Lösung wird mit 1 Volumen Phenol/Chloroform versetzt, für 30 Sekunden gevortext und 10 Minuten bei 13000 U/min (Minifuge Fresco) zentrifugiert. Die obere Phase wird in ein neues Eppendorfgefäß überführt. Die Extraktion wird so lange wiederholt, bis die obere Phase klar ist. Die obere Phase wird schließlich mit 1 Volumen Chloroform-Isoamylalkohol versetzt, für 15 Sekunden gevortext und bei 13000 U/min 10 Minuten zentrifugiert. Die in der oberen Phase enthaltene DNA wird mittels Ethanol gefällt. [Gassen und Bertram, 1991]

Ethanol-Fällung

Die DNA wird mit 0,1 Volumen 3 M Natriumacetat und 2,5 Volumen 100% Ethanol versetzt. Zur Präzipitation der DNA wird diese mindestens für 2 Stunden bei -20°C gelagert. Anschließend wird bei 13000 U/min und 4°C für 30 Minuten zentrifugiert. Der Überstand

wird verworfen und das Pellet mit 1 Volumen 70%igem eiskaltem Ethanol gewaschen (Zentrifugation 13000 U/min, 5 Minuten). Der Überstand wird erneut verworfen, das Pellet im Vakuum getrocknet und in TE-Puffer oder H_2O bidest. aufgenommen. [Gassen und Bertram, 1991]

Phosphatasebehandlung

Reaktionsansatz:
Zur Dephosphorylierung wird folgender Inkubationsansatz in ein Eppendorfgefäß pipettiert:

Plasmid-DNA	10-40 µl
10 x Reaktionspuffer	5 µl
CIAP (0,05–1 unit)	1 µl
ad 50 µl H_2O bidest. steril	

Die Inkubation erfolgt bei 37°C für 30 Minuten und wird dann durch Erhitzen des Ansatzes auf 75°C, für 10 Minuten abgestoppt. Zur Aufreinigung der Plasmid-DNA wird erneut eine Phenol-Chloroform-Reaktion mit anschließender Ethanol-Fällung durchgeführt.

6.24 Ligation von DNA-Fragmenten

6.24.1 Prinzip

Der letzte Schritt bei der Konstruktion eines rekombinierten DNA-Moleküls ist die Verknüpfung des Vektors mit dem zu klonierenden Fragment. Dieser Vorgang wird als Ligation bezeichnet.
Die Ligationen wurden mit T4-DNA-Ligase durchgeführt. Das Enzym katalysiert die Verknüpfung zwischen zwei benachbarten 3`-Hydroxy- und 5`-Phosphat-Enden doppelsträngiger DNA, wobei ATP als Energieträger benötigt wird. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich überhängende Enden (sticky ends) ligiert, mit T4-DNA-Ligase können jedoch auch blunt ends ligiert werden.
Für die Ligation kohäsiver Enden sollte das molare Verhältnis von Insert zu Vektor 1:1 oder 2:1 betragen.

Falls ein Fragment mit zwei gleichen Enden in einen Vektor einkloniert werden soll, sollte vor der Ligation eine Dephosphorylierung des Vektors durchgeführt werden. Dadurch soll eine Rezirkularisieung des Vektors verhindert werden. Es empfiehlt sich die Dephosphorylierung des Vektors, da regenerierte Plasmide bei der Transformation sowie der Selektion der Transformanten mit den rekombinanten Plasmiden konkurrieren würden. [Maniatis et al, 1989; Brown, 1996]

6.24.2 Lösungen und Chemikalien

- T4 DNA Ligase; 5 units/µl (MBI)
- 10 x Ligationspuffer: 400 mM Tris-HCl, 100 mM $MgCl_2$; 100 mM DTT ; 5 mM ATP; pH 7,8 (MBI)

6.24.3 Durchführung

Plasmid, Insert, Ligationspuffer und T4 DNA Ligase (2u) werden in ein steriles Eppendorfgefäß pipettiert und 1 Stunde bei 22°C inkubiert. Nach Inaktivierung der Ligase bei 65°C, 10 Minuten wird der Ansatz direkt zur Transformation in E.coli eingesetzt. [MBI, 1997]

6.25 Transfektion von DNA in Eukaryonten und Selektion

6.25.1 Prinzip

Die Einschleusung fremder Gene in höhere Zellen, z.B. Säugerzellen wird als Transfektion bezeichnet. Die Insertion von Genen ermöglicht deren Expression in der Zelle aber auch die Untersuchung der Genexpression. Man unterscheidet zwischen chemischen und physikalischen Transfektionsmethoden. Wird die transfizierte DNA nicht ins Chromosom der Wirtszelle integriert und kann sie sich extrachromosomal nicht vermehren, so geht diese im Verlauf fortschreitender Zellteilungen verloren. Dies bezeichnet man als transiente Transfektion.

Ein geringer Teil der Zellen, etwa 1 Zelle unter 10^5, integriert die aufgenommene DNA stabil ins Genom. Die Selektion dieser Transfektanten lässt sich vereinfachen, wenn gleichzeitig ein Markergen cotransfiziert wird. Das Markergen verleiht der Zelle einen neuen Phänotyp, der die Unterscheidung zu anderen Zellen ermöglicht. Als Markergene kommen oft Antibiotikaresistenzgene zum Einsatz. [Gassen und Minol, 1996]

6.25.2 Elektroporation

6.25.2.1 Prinzip

Bei der Elektroporation handelt es sich um eine rein physikalische Methode. Sie beruht auf dem Prinzip, daß biologische Membranen durch Einwirkung kurzer elektrischer Impulse oberhalb der kritischen Feldstärke vorübergehend permeabilisiert werden, ohne daß die Membranstruktur zerstört wird. In der Phase der erhöhten Permeabilität ist ein Stofftransport durch die Membran möglich. Als erfolgreich hat sich diese Transfektionsmethode bei Zelltypen erwiesen, bei denen die Calciumphosphat-Technik versagte. Nachteil der Methode ist, daß wesentlich mehr Zellen und DNA eingesetzt werden müssen. [Koch-Brandt, 1993]
Die angelegte Spannung und die elektrischen Impulse beeinflussen die Viabilität der Zellen negativ, d.h. ein Großteil der Zellen stirbt im Verlauf der Elektroporation ab.

6.25.2.2 Lösungen und Chemikalien

- Plasmid-DNA
- Elektroporationsküvetten (in vitrogen)
- eisgekühltes PBS

6.25.2.3 Durchführung

Die bis zu 80% konfluent gewachsenen Zellen werden abtrypsiniert und bei 1500U/min (Minifuge T), 5 Minuten, 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen das Pellet mit PBS gewaschen. Das Pellet wird in eiskaltem PBS resuspendiert (Zelldichte: 5 x 10^6 Zellen/500 µl PBS) und 500 µl dieser Suspension in eine Elektroporationsküvette gegeben. Es werden die entsprechenden Plasmide in gewünschter Konzentration zupipettiert und der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Vor der Elektroporation wird die Küvette noch einmal kurz geschüttelt, um die abgesetzten Zellen zu resuspendieren. Die Elektroporation wird (optimiert für die hier eingesetzten Zellinien) bei folgenden Parametern durchgeführt.

Elektroporationsparameter:	Spannung	330 V
	Stromstärke	25 mA
	Leistung	25 W
	Elektrisches Feld	500 bzw. 1000 µF
	Widerstand	∞ Ω

Nach weiteren 10 Minuten Inkubation auf Eis wird die Zellsuspension mit ca. 1 ml CDFKS-Medium versetzt und in 6 cm Petrischalen in CDFKS-Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wird das Medium abgesaugt, um abgestorbene Zellen und Zellreste zu entfernen. Die transfizierten Zellen werden dann mit den entsprechenden Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert.

6.25.3 Polybrene-Dimethylsulfoxid-Technik

6.25.3.1 Prinzip

In Anwesenheit von Polykationen wird die DNA-Adsorption an die Zelloberfläche erhöht. Die nachfolgende Behandlung mit DMSO erleichtert die Aufnahme der adsorbierten DNA in die Zelle. Als Polykationen werden unter anderem Diethanolaminoethyl-(DEAE-)-Dextran und Polybrene verwendet. Vorteil der Polykationen gegenüber der Calciumphosphat-Transfektion liegt in der größeren Toleranz hinsichtlich geringfügiger Änderungen

experimenteller Bedingungen wie z.B. pH-Wert oder DNA-Konzentration. [Koch-Brandt, 1993]

6.25.3.2 Lösungen und Chemikalien

- DMSO-Lösung: 30%ig Dimethylsulfoxid in RPMI-Medium
- Polybrene-Lösung: 10 mg Hexadimethrin-bromid/ml in H_2O bidest.

6.25.3.3 Durchführung

Die zu transfizierenden Zellen werden in 6 cm Petrischalen eingesät und in RPMI-Medium kultiviert. Nach ca. 18 Stunden wird das Medium durch RPMI-Medium, das 20 µg Plasmid-DNA und 5 µl einer Polybrene-Lösung enthält, ersetzt. Die DNA wird vor der Polybrene-Zugabe mit dem Medium gemischt. Die Petrischalen werden bei 37°C inkubiert und jeweils nach 1,5 Stunden vorsichtig geschwenkt, um eine gleichmäßige Durchmischung der Zellen mit der Polybrene-DNA-Mischung zu erreichen. Nach 6 Stunden wird die Mischung entfernt und die Zellen mit 5 ml DMSO-Lösung für genau 4 Minuten inkubiert. Nach weiteren 12 Stunden werden die Zellen mit den entsprechenden Testsubstanzen in CDFKS-Medium inkubiert. [Chaney et al, 1986.]

6.25.4 Liposomale Transfektion

6.25.4.1 Prinzip

Bei dieser Transfektionsmethode kommen polykationische Lipidmoleküle wie Lipofectamin oder monokationische Moleküle wie Lipofectin, die in wässriger Lösung nach Ultraschallbehandlung postiv geladene Liposomen bilden, zum Einsatz. Kationische Lipide haben sich als sehr geeignet für die Transfektion in Eukaryonten herausgestellt. Die Lipide bilden mit der zu transfizierenden DNA spontan einen Lipid-DNA-Komplex. Es erfolgt eine Fusion dieses Komplexes mit den Zellen, die in der Aufnahme der DNA resultiert. Die Effizienz der liposomalen Transfektionsmethoden im Vergleich zur DEAE-Dextran-Transfektion ist im Vergleich zu dieser 5-10mal höher. [Gibco, 1998]

6.25.4.2 Lösungen und Chemikalien

- Lipofectin: 1:1 liposomale Formulierung des kationischen Lipids N-[1-(2,3-dioleyloxy)propyl]-n,n,n-trimethylammoniumchlorid (DOTMA) und Dioleoylphosphatidylethanolamin (DOPE) in H_2O bidest. [Gibco]
- Lipofectamin: 3:1 liposomale Formulierung des polykationischen Lipids 2,3-dioleyloxy-N-[2(sperminecarboxamido)ethyl]-N,N-dimethy-l-propanaminiumtrufluoracetat (DOSPA) und des neutralen Lipids Dioleylphosphatidylethanolamin (DOPE) in H_2O bidest. [Gibco]
- 20 % CDFKS-Medium

6.25.4.3 Durchführung

In 6 cm Petrischalen werden $1x10^6$ Zellen in RPMI-Medium ausgesät. Nach 24 Stunden wird die Transfektion durchgeführt. Dazu werden 2 Lösungen, A und B, nach folgendem Pipettierschema hergestellt.

Lösung A	**Lösung B**
7 ml CDFKS-Medium	1 ml CDFKS-Medium
20 µg Plasmid	25 µl Transfektionsreagenz

1 ml Lösung A wird mit Lösung B vorsichtig gemischt und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen des Mediums von den Zellen werden diese mit serumfreiem Medium gespült und mit der DNA-Lipid-Komplex-Lösung überschichtet. Die Zellen werden 6 Stunden bei 37°C inkubiert und dann 1 ml 20% CDFKS-Medium zu den Platten gegeben. Nach weiteren 24 Stunden erfolgt die Inkubation mit den Testsubstanzen für 24-48 Stunden.

6.25.5 Nicht-liposomale Transfektion

6.25.5.1 Prinzip

Das nicht-liposomale Transfektionsreagenz Fugene6 zeigt bei vielen eukaryontischen Zellinien eine hohe Transfektionseffizienz bei minimaler Toxizität. Die Transfektion kann sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Serum durchgeführt werden.

6.25.5.2 Lösungen und Chemikalien

- serumfreies Medium
- Fugene6: Gemisch von Lipiden (nicht liposomale Formulierung) und anderen Komponenten in Ethanol

6.25.5.3 Durchführung

Die Durchführung erfolgt weitgehend analog der liposomalen Transfektion. Die Lösungen A und B werden nach folgendem Pipettierschema angesetzt:

Lösung A	**Lösung B**
	182 µl serumfreies Medium
3 µg DNA	18 µl Fugene 6

Um Adsorptionen des Transfektionsreagenzes an das Eppendorfgefäß zu vermeiden, wird das Transfektionsreagenz direkt in serumfreies Medium pipettiert (Lösung B) und 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fugene-Lösung wird tropfenweise zur DNA zugegeben und nach 15 Minuten Inkubation tropfenweise gleichmäßig auf den Zellen verteilt. Nach 24 Stunden werden die Zellen mit den Testsubstanzen für 24-48 Stunden inkubiert.

6.26 Selektion transfizierter MCF-7-Zellen

6.26.1 Prinzip

Zur Selektion stabil transfizierter Zellen bzw. Zellen, die über einen längeren Zeitraum stabil sind, kann die Selektion mittels dominanter Markergene erfolgen. Dabei wird die Fremd-DNA zusammen mit dem Markergen in die Zellen cotransfiziert. Die Expression des Markergens ermöglicht das Überleben der Zellen unter cytotoxischen Bedingungen. Diese Methode ist daher auf praktisch jede Zellart anwendbar und wird deshalb häufig eingesetzt. Verwendung finden oft Expressionsvektoren, in deren Multiple Cloning Site die Fremd-DNA kloniert wurde. Die Vektoren enthalten neben dem Gen, das für die Selektion in Eukaryonten codiert, ein Ampicillinresistenzgen, das die Amplifikation des Vektors in Prokaryonten ermöglicht. Zur Selektion von transfizierten Säugerzellen hat sich Geniticinsulfat, G418 als ideal erwiesen, das an 80S Ribosomen in Eukaryonten bindet und so die Proteinbiosynthese inhibiert. Durch Cotransfektion eines Selektionsvektors mit den entsprechenden Expressionsvektoren ist eine Selektion transfizierter Zellen in Gegenwart hoher G418-Konzentrationen möglich.
Da die in dieser Arbeit eingesetzten Expressionsplasmide keine G418-Resistenz vermittelen, wurden die Vektoren mit dem Selektionvektor pSV_2neo cotransfiziert. [Maniatis et al, 1989; Koch-Brand, 1993]

6.26.2 Lösungen

- Geneticinsulfat-Lösung: 1 g Geneticinsulfat (G418)/20 ml H_2O bidest. steril
  G418 in H_2O bidest. steril lösen und durch sterilen Membranfilter (Porengröße 0,22 µm) filtrieren

6.26.3 Durchführung

24 Stunden nach der Transfektion wurden die MCF-7 Zellen mit 400 µg G418/ml Kulturmedium versetzt. Da sich nach weiteren 48 Stunden kein Effekt zeigte, wurde die G418

Konzentration auf 1000µg/ml erhöht. Erst nach weiteren 72 Stunden konnten erste selektive Effekte beobachtet werden. Die Zellen wurden im weiteren mit 1000 µg G418/ml selektiert.

6.27 Einzelklon-Selektion

6.27.1 Prinzip

Die oben beschriebene Selektion kann mit einem Gemisch aus Zellen, die die entsprechenden Plasmide enthalten bzw. bereits wieder abgegeben haben, durchgeführt werden. Besser und effektiver ist jedoch die Selektion von Einzelklonen, die im folgenden beschrieben wird.

6.27.2 Chemikalien und Materialien

- Sterile Metallringe
- Steriles Silikonfett
- Geneticinsulfat-Lösung

6.27.3 Durchführung

Zur Selektion der nach 6.25 behandelten und erfolgreich transfizierten Zellen werden diese gut vereinzelt, sehr dünn in 10 cm Petrischalen ausgesät und entsprechend mit G418 (1000 µg/ml) selektiert. Unter dem Mikroskop werden die Einzelzellen markiert und deren Wachstum beobachtet. Sobald die Einzelzellen zu einem Zellhaufen herangewachsen sind, werden diese abtrypsiniert. Dazu werden zuvor sterilisierte Metallringe durch steriles Silikonfett gezogen und mittels steriler Pinzette auf die Petrischalen um den markierten Zellhaufen gesetzt. In diesen Metallring wird wenig Trypsin gegeben, somit ist gewährleistet, dass nur der zuvor markierte Klon passagiert wird. Die Zellen werden vorsichtig vereinzelt und in eine 6 cm Petrischale überführt. Nach Kultivierung der Zellen im Selektionsmedium werden die Zellen schließlich im entsprechenden Reportergenassay auf ihre Reportergenaktivität untersucht und damit überprüft, ob die Zellen die zuvor transfizierten Plasmide noch enthalten.

6.28 Deglucosidierung von Rhapontin

6.28.1 Lösungen und Chemikalien

- 0,1 M Natriumacetat-Puffer ; pH 5,0
- ß-Glucosidase aus süßen Mandeln, Aktivität: 8,3 u/mg
  Definition der Unit für die hier verwendete ß-Glucosidase:
  1 Unit des Enzyms hydrolisiert 1 µmol Saligenin (entsprechend hydrolisieren 1,4 u Enzym 1µmol Rhapontin) pro Minute bei 37°C; pH 5,0.
- Stammlösung ß-Glucosidase: 1 mg/ml (bzw. 10 mg/ml) in 0,1 M Natriumacetat-Puffer; pH 5,0

6.28.2 Durchführung

Es wird eine entsprechende Stammlösung von Rhapontin in DMSO und der ß-Glucosidase in Natriumacetat angesetzt und wie oben angegeben bei 37°C unter Schütteln im Wasserbad für 20-25 Minuten inkubiert. Diese Lösung wird dann gegebenenfalls entsprechend verdünnt und zur Inkubation im Reportergenassay eingesetzt.

6.29 Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen

Die Kontamination mit Mycoplasmen stellt ein Hauptproblem in der Zellkulturtechnik dar, wobei ihr Einfluß sehr unterschiedlich sein kann, beispielsweise Inhibition der Kohlenhydrat-, Protein- und Nukleinsäurensynthesen, Beeinflussung der Makrophagenaktivität etc.. Bis zu 80% aller Zellkulturen sind von Mycoplasmeninfektionen betroffen. Es konnten bisher bis zu 20 unterschiedliche Mycoplasmenarten aus verschiedenen kontaminierten Zellkulturen isoliert werden. Mycoplasmen wachsen oft nur langsam und zerstören die befallenen Zellen nicht. Sie üben jedoch vielfältige negative Effekte auf die infizierten Zellen aus, was vor allem bei permanenten Zellen Probleme mit sich bringt. [Lindl und Bauer, 1987; Boehringer Mannheim Biochemica, 1996]

6.29.1 Detektion von Mycoplasmen

6.29.1.1 Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an doppelsträngige DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit einer hohen Spezifität. In wäßriger Lösung besitzt DAPI ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und ein Emissionsmaximum bei 488 nm. DAPI wird von den Zellen sehr schnell in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, eine cytoplasmatische Fluoreszenz ist dagegen nicht nachweisbar. Ist eine Zellkultur mit Mycoplasmen kontaminiert, so findet man einzelne fluoreszierende Punkte im Cytoplasma und z.T. auch im interzellulären Raum. [Boehringer Mannheim Biochemica, 1996]

6.29.1.2 Chemikalien und Geräte

- 4',6- Diamidin- 2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)
- Fluoreszenzmikroskop

6.29.1.3 Durchführung

Man lässt die Zellkultur wachsen, bis ca. 50-70% des Objektträger bedeckt sind. Eine vollständige Konfluenz würde die Visualisierung der Mycoplasmen stark herabsetzten. Der Objektträger wird mit einer sterilen Pinzette aus dem Quadriperm herausgenommen und mit 1 ml eiskaltem Methanol (-20°C) Mediumreste abgespült.
Der Objektträger wird in -20°C kaltes Methanol gestellt, bei -20°C gelagert oder für 15 Minuten fixiert. Nachdem der Objektträger an der Luft getrocknet wurde, lässt man ca. 40 µl Färbelösung auftropfen. Es wird mit einem Deckglas abgedeckt, mit handelsüblichem Kosmetik-Nagellack abgedichtet und unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 340/380 Anregungsfilter und LP 430 Sperrfilter untersucht. Die besten Ergebnisse erzielt man mit einem Ölimmersions-Objektiv bei einer 100fachen Vergrößerung.

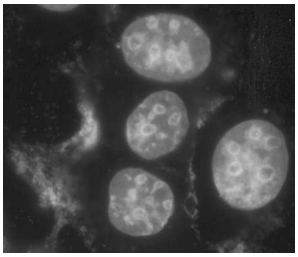
6.29.2 Eliminierung von Mycoplasmen

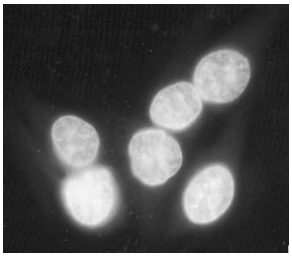
6.29.2.1 Reagenzien

- Mycoplasma Removal Agent: enthält 50 µg 4-oxo-chinolin-3carboxylsäure-Derivate in 1 ml H_20 bidest [ICN Biomedicals]

6.29.2.2 Durchführung

Die Zellen werden über eine Woche mit Mycoplasma Removal Agent behandelt (100µg/ml). Danach wird die Zellkutur erneut auf Mycoplasmen überprüft.





A: MCF-7 Zellen mit Mycoplasmen B: MCF-7 Zellen ohne Mycoplasmen

Abb. 96: MCF-7-Zellen mit Mycoplasmen (Abb. A) und ohne Mycoplasmen (Abb. B)

Allgemein verwendete Geräte

Analysenwaage (AE 163 Mettler)
Biofreezer (Heraeus)
Biofuge fresco (Heraeus)
Blotting-Apparatur (Mulitphor Pharmacia)
Brutschrank Cytoperm 8088 (Heraeus)
Brutschrank Köttermann 2737
Elektrophorese (Mini Protean II und SubCell Biorad)
Elektroporator II (Invitrogen)
Grobwaage (Sartorius)
Lumi-Imager (Boehringer Mannheim)
Luminometer LUMIstar (BMG)
Minifuge T (Heraeus)
pH-Meter (pH 521 WTW)
Pipettierhilfe (Roth)
Programmable Thermal Controller PTC-100^{TM} (MJ Research, Inc, Biozym)
Powersupply (Power Pac 300 Biorad, Electrophoresis Power Supply EPS 3500 Pharmacia)
Rotator (Pharmacia)
Rotationsverdampfer Rotavapor R110 (Büchl)
Rüttler (Thermomixer 5432 Eppendorf)
Schüttelinkubator
Sterile Werkbank (Lamin-Air HLB 2472 BS und HBB 2448 Heraeus)
Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Trockenschrank (Memmert)
Ultrazentrifuge (Centrikon T-2055 Kontron)
Umkehrmikroskop (Zeiss)
UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)
Vakuumsaugpumpe
Varioklav Dampfsterilisator (H + P Labortechnik)
Vortex (Genie Bender und Hobein)
Wasserbad
Zentrifuge Mode J2-21 (Beckmann)

Allgemein verwendete Materialien

Cryotubes (Greiner)
DNase und RNase freie Filterspitzen (Greiner)
DNase und RNase freie Reaktionsgefäße (Biozym)
Eppendorfgefäße (Greiner)
Kulturflaschen (Greiner, Nunc)
96 Lochplatten, weiß (Nunc)
Neubauerzählkammer (Braun)
Petrischalen (Greiner, Nunc)
Sterile Einwegröhren (Greiner, Sarstedt)
Sterile Einwegspritzen (Braun)
Sterile Einwegkanülen (Braun)
Titerplatten, 96 Loch (Nunc)
Zellschaber (Greiner)

Kits

BCA-Protein-Assay (Pierce)
DIG-DNA-Labeling and Detection Kit (Boehringer)
Gel-Shift-Assay System (Promega)
Gesamt-RNA-Aufarbeitungskit (Qiagen)
Luciferase-Kit (Promega)
Maxipräparationskit (Qiagen)
Nukleinsäure-Elutionskit (Dianova)
pS2-Kit (Cis Diagnostics)
SEAP-Kit (Boehringer)
Titan-RT-PCR-Kit (Boehringer)

Chemikalien

Agarose (Serva, Gibco)
Agarose Low Melting Point (Biozym)
Ammoniumpersulfat, APS (Serva)

Borsäure (Sigma)

Bromphenolblau (Serva)

Cyanblau (Serva)

Dextran (Sigma)

Dimethylsulfoxid, DMSO für Spektroskopie (Fluka)

4´,6 Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid, DAPI (Boehringer Mannheim)

Dulbecco`s MOD Eagle Medium mit Phenolrot und Glucose, ohne Natrium-Pyruvat, Gibco

Dulbecco`s MOD Eagle Medium ohne Phenolrot, mit Natrium-Pyruvat und Glucose, Gibco

Ethylendiamintetraessigsäure, EDTA (Boehringer Mannheim)

Ethanol p.A. (Roth)

Ethidiumbromid (Sigma)

Fötales Kälberserum, FKS (Gibco)

Glycerin (Riedel de Häen)

Glycin (Serva)

L-Glutamin (Gibco)

Magnesiumchlorid Hexahydrat (Riedel de Häen)

Maleinsäureanhydrid (Riedel de Häen)

Methanol (Riedel de Häen)

Minimum Essential Medium Eagle, mit Phenolrot, Sigma

Natriumhydrogencarbonat (Gibco)

Norrit A (Serva)

Penicillin/Streptomycin (Gibco)

Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF (Boehringer Mannheim)

Phenol (Roth)

Poly (dI-dC)*poly(dI-dC) (Boehringer Mannheim)

Polyoxyethylensorbitan-monolauryat, Tween 20 (Sigma)

RPMI-Medium 1640

Sulforhodamin B (Sigma)

N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin, TEMED (Biorad)

Trishydroxymethylaminomethan, Tris (Boehringer)

7 LITERATURVERZEICHNIS

Ahlborg, U.G.; Lipworth, L.; Tus-Ernstoff, L.; Hsieh C.C.; Hanberg, A.; Baron, A.; Baron, J.; Trichopoulos, D. und Adami, H.O. (1995): Organochlorine compounds in relation to breast cancer, endometrial cancer and endometriosis: an assessment of the biological and epidemiological evidence; Critical Reviews in Toxicology **25** (6), 463-531.

Alam, J. und Cook, J. (1990): Reporter genes: Application to the study of mammalian gene transcription; Analytical Biochemistry **188**, 245-254.

Albrecht, S.; Brandl, H.; Schönfels, C. und Adam, W. (1992): Angewandte Biolumineszenz: Luciferasen in der biochemischen Analytik; Chemie in unserer Zeit **26**, 63-69.

Ali, S.; Metzger, D.; Bornert, J.M. und Chambon, P. (1993): Modulation of transcriptional phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region; The EMBO Journal **12** (3), 1153-1160.

Amersham (1997): DNase I Application, Amersham Pharmacia.

Andersen, H.R.; Andersson, A.M.; Arnold, S.F.; Autrup, H.; Barfoed, M.; Beresford N.A.; Bjerregaard, P.; Christiansen, L.B.; Gissel, B.; Hummel, R.; Jorgensen, E.B.; Korsgaard, B.; Le Guevel, R.; Leffers, H.; McLachlan, J.; Moller, A.; Nielsen, J.B.; Olea, N.; Oles-Karasko, A.; Pakdel, F.; Pedersen,K.L.; Perez, P.; Skakkebeck, N.E.; Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Sumpter, J.P.; Thorpe, S.M. und Grandjen, P. (1999): Comparison of short-term estrogenicity for identification of hormone-disrupting chemicals; Environmental Health Perspectives **107** Suppl. 1, 89-108.

Andersson, S.; Davis, D.L.; Dahlback, H.; Jornvall, H. und Russell, D.W. (1989): Cloning, structure and expression of the mitochondrial cytochrome p-450 sterol 26-hydroxylase, a bile acid biosynthetic enzyme; Journal of Biological Chemistry **264** (14), 8222-8229.

Anolik, H.; Klinge, C.M.; Brolly, C.L.; Bambara, A. und Hilf, R. (1996): Stability of the ligand-estrogen receptor interaction on estrogen response element flanking sequences and cellular factors; Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **59** (5/6), 413-429.

Anzick, S.L.; Kononen, J.; Walker, R.L.; Azoro, D.O.; Tanner, M.M.; Guan, X.Y.; Sauter, G.; Kallionemie, O.P.; Trent, J.M. und Meltzer, P.S. (1997): AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer; Science **277**, 965-968.

Arnold, S.; Vorojeikina, D.P. und Notides, A.C. (1995): Phosphorylation of tyrosine 537 on the human estrogen receptor is required for binding to an estrogen response element; The Journal of Biological Chemistry **270** (50), 30205-30212.

Arnold, S. und McLachlan, J. (1996): Synergistic effects of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals; Science **272**, 1489-1492.

Ashby, J. und Tinwell H. (1997): Uterotrophic activity of Bisphenol A in the immature rat; Environmental Health Perspectives **106** (11), 719-720.

Ashby, J.; Tinwell, H.; Pennie, W.; Brooks A.N.; Lefevre, P.A.; Beresford, N. und Sumpter, J.P. (1999): Partial and weak oestrogenicity of the red wine constituent resveratrol: consideration of its superagonist activity in MCF-7 cells and its suggested cardiovascular protective effects; Journal of applied Toxicology **19** (1), 39-45.

Baker, V.A.; Hepburn, P.A.; Kennedy, S.J.; Jones, P.A.; Lea, L.J.; Sumpter, J.P. und Ashby, J. (1999): Safety evaluation of phytosterol esters. Part1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo an din vitro assays; Food and Chemical Toxicology **37**, 13-22.

Balfour, J.A. und Goa K.L. (1998): Raloxifene; Drug and Aging **12** (4), 335-341.

Barkhem, T.; Carlsson, B.; Nilsson, Y.; Enmark, E.; Gustafsson, J.A. und Nilsson, S. (1998): Differential response of estrogen receptor α and estrogen receptor β to partial agonists/antagonists; Molecular Pharmacology **54**, 105-112.

Beato, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones; Cell **56**, 335-344.

Beato, M. (1991): Transcriptional control by nuclear receptors; The FASEB Journal **5**, 2044-2051.

Beato, M; Chavez, S. und Truss, M. (1996a): Transcriptional regulation by steroid hormones; Steroids **61**, 240-251.

Beato, M; Truss, M. und Chavez, S. (1996b): Control of transcription by steroid hormones; Annals of the New York Academy of Sciences, **784**, 93-123.

Berger, J.; Hauber, J; Geiger, R. und Cullen, B.R. (1988): Secreted alkaline phosphatase: a powerful new quantitative indicator of gene expression in eukaryotic cells, Gene **66**, 1-10.

Berger, R.; Duncan, M.R. und Berman, B. (1993): Nonradioactive Gel Mobility Shift Assay using Chemiluminescent Detection, BioTechniques **15**, 650-651.

Berry, M.; Nunez, A.M. und Chambon, P. (1989); Estrogen-responsive element of the human pS2 gene is an imperfectly palindromic sequence; Proc. Natl. Acad. Sci. **86**, 1212-1222.

Boehringer Mannheim Biochemica (1994): The DIG System User's Guide for filter Hybridization.

Boehringer Mannheim Biochemica (1996): Mycoplasmen Detection.

Boehringer Mannheim Biochemica (1997): SEAP Reporter Gene Assay, chemiluminescent.

Boehringer Mannheim (1998): Titan^{TM} One Tube RT-PCR System.

Bonefeld Jorgensen, E.C.; Autrup, H. und Hansen, J.C. (1997): Effect of toxaphen on oestrogen receptor functions in human breast cancer cells; Carcinogenesis **18** (8), 1651-1654.

Bose S.; Weikl, T.; Bügl, H. und Buchner, J. (1996): Chaperone function of Hsp 90-associated proteins; Science **274**, 1715-1717.

Boukamp, P.; Petrussevka, R.T.; Breitkreutz, D.; Hornung, J.; Markham, A. und Fusening, N.E. (1988): Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line; The Journal of Cell Biology **106**, 761-771.

Bronstein, I.; Fortin, J.; Stanley, P.E.; Steward, G.S.A.B. und Kricka, L.J. (1994a): Chemiluminescent and bioluminescent reporter gene assays; Analytical Biochemistry **219**, 169-181.

Bronstein, I.; Fortin, J.J.; Voyta, J.C.; Juo, R.R.; Edwards, B.; Olesen, C.E.M.; Lijam, N. und Kricka, L.J. (1994b): Chemiluminescent reporter gene assays: sensitive detection of the GUS and SEAP gene products, BioTechniqes **17** (1), 172-177.

Bronstein, I.; Martin, C.S.; Fortin, J.J.; Olesen, C.E.M. und Voyta, J.C. (1996): Chemiluminescence: sensitive detection technology for reporter gene assays; Clinical Chemistry **42** (9), 1542-1546.

Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.A.; Villobos, M.; Pedraza, V. und Olea, N. (1995): Xenoestrogens released from laquere coatings in food cans; Environmental Health Perspectives, **103** (6), 608-612.

Brown, M. (1994): Estrogen receptor molecular biology, Breast Cancer **8** (1), 101-112.

Brown, T.A. (1996): Gentechnologie für Einsteiger; Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin , Oxford.

Brzozowski, A.M.; Pike, A.C.W.; Dauter, Z.; Hubbard, R.E.; Bonn, T.; Engström, O.; Öhman, L.; Green, G.L.; Gustafsson, J.A. und Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor; Nature **389**, 753-758.

Bryant, H.U. und Dere, W.D. (1998): Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy; Society for Experimental Biology and Medicine **217**, 45-52.

Bryant, H.U.; Glasebrook, A.L.; Yang, N.N. und Sato M. (1999): An estrogen receptor basis for raloxifene action in bone; The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **69**, 37-44.

Cadepond, F.; Gasc, J.M.; Delahaye, F.; Jibrard, N.; Schweitzer-Groyer, G.; Segard-Maurel, I.; Evans, R. und Baulieu, E.E. (1992): Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor, Experimental Research **201**, 99-108.

Carlsen, E. und Skakkebaek, N. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years; BMJ **305**, 609-613.

Carson-Jurica, M.; Schrader, W.T. und O´Malley, B.W. (1990): Steroid receptor family: structure and functions; Endocrine Reviews **11** (2), 201-220.

Casidy, A. (1999): Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens; Current Opinion in Lipidology **10** (1), 47-52.

Chaney, W.G.; Howard, D.R.; Pollard, J.W.; Sallustio, S. und Stanley, P. (1986): High-frequency transfection of CHO cells using polybrene; Somat. Cell. Mol. Genet. **12**, 237-244.

Chang, W.Y. und Prins, G.S. (1999): Estrogen receptor-β: implications for the prostate gland; The Prostate **40**, 115-124.

Chard, T. (1990): An introduction to radioimmunoassay and related techniques; in Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology Volume **6** Teil 2, 4. Auflage, Elsevier Verlag Amsterdam New York Oxford.

Chen, D.; Pace, P.E.; Coombes, C. und Ali, S. (1999): Phosphorylation of human estrogen receptor α by protein kinase A regulates dimerization: Molecular and Cellular Biology **19** (2), 1002-1015.

Chu, S. und Fuller, P.J. (1997): Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene; Molecular and Cellular Endocrinology **132** (1-2), 195-199.

Church-Landel, C.; Kushner, P. und Greene, G. (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA-interactions; Environmental Health Perspectives **103** (7), 23-29.

Ciocca, D.R.; Oesterreich, S.; Chamness, G.C.; McGuiere, W.L. und Fuqua, S.A.W. (1993): Biological and clinical implications of heat shock protein 27 000 (Hsp 27). A review; Journal of the National Cancer Institute **85** (19), 1558-1568.

CIS Diagnostics (1998): ELSA pS2 immunoradiometric assay; CIS Bio International, Gif-sur-Yvette, France.

Clontech (1995): Sequence and restriction site information, pSV2neo helper plasmid; Clontech Laboratories Palo Alto USA.

Clontech (1996): pSEAP2-Enhancer Vector information; Clontech Laboratories Palo Alto USA.

Colborn, T; Saal, F. und Soto, A. (1993); Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans; Environmental Health Perspectives **101** (3), 378-384.

Cowley, S.M.; Hoare, S.; Mosselman, S. und Parkers, M.G. (1997): Estrogen receptor α and β form heterodimers on DNA; The Journal of Biological Chemistry **272** (32), 19858-19862.

Cowley, S.M. und Parker, M.G. (1999): A comparison of transcriptional activation by ERα and ERβ; Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology **69**, 165-175.

Crothers, D.M. (1987): Gel electrophoresis of protein-DNA-complexes; Nature **325**, 464-465.

Cummings, A.M. (1997): Methoxychlor as a model for environmental estrogens; Critical reviews in Toxicology **27** (4), 367-379.

Davis, D.; Bradlow, H.L.; Wolff, M.; Woodruff, T.; Hoel, G. und Anton-Culver, H. (1993): Medical hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer; Environmental Health Perspectives **101** (5), 372-377.

Demirpence, E.; Duchesne, M.J.; Badia, E.; Gagne, D. und Pons, M. (1993): MVLN cells: A bioluminescent MCF-7-derived cell line to study the modulation of estrogen activity; Steroid Biochem Molec **46**, 335-364.

Denton, R.R.; Koszewski, N.J. und Notides, A.C. (1992): Estrogen receptor phosphorylation; The Journal of Biological Chemistry **267** (11), 7263-7268.

DFG (1998): Hormonally active agents in food, Symposium der Deutschen Forschungsgemeinschaft, Eisenbrand G. Editor, Wiley-VCH Weinheim.

Dianova (1995): Datenblatt und Protokoll, DNA Reinigung Geneclean.

Dotzlaw, H.; Leygue, E.; Watson, P.H. und Murphy, L. (1996): Expression of estrogen receptor–beta in human breast tumors; Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism **82** (7), 2371-2374.

EDSTAC (1998): Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC) Final Report; United States Environmental Protection Agency.

Edwards, D.P. (1999): Coregulatory proteins in nuclear hormone receptor action; Vitamines and Hormones **55**, 165-218.

England, G.M. und Jordan, V.C. (1997): Pure antiestrogens as a new therapy for breast cancer; Oncology Research **9**, 397-402.

Enmark, E.; Pelto-Huikko, M.; Grandien, K.; Lagercrantz, S.; Lagercrantz, J.; Fried, G.; Nordenskjöld, M. und Gustafsson, J.A. (1997): Human estrogen receptor β-gene structure, chromosomal localization and expression pattern; Journal of Endocrinology and Metabolism **82** (12), 4258-4265.

Enmark, E. und Gustafsson, J.A. (1999): Oestrogen receptors-an overview; Journal of Internal Medicine **246**, 133.138.

Forth, W.; Henschler, D.; Rummel, W. und Starke, K. (1996): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 7. völlig neubearbeitete Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford.

Franks, A.D. und Steinberg, K.K. (1999): Encouraging news from the SERM frontier; The Journal of the American Medical Association **281** (23), 2243-2244.

Freeman, B.C.; Toft, D.O. und Morimoto, R.I. (1996): Molecular chaperone machines: chaperone activities of the cyclophilin cyp-40 and the steroid aporeceptor-associated protein p23; Science **274**, 1718-1720.

Gagne, D.; Balaguer, P.; Demirpence, E.; Chabret, C.; Trousse, F.; Nicolas, J.C. und Pons, M. (1994): Stable luciferase transfected cells for studying steroid receptor biological activity; Journal of bioluminescence and Chemiluminescence **9**, 201-209.

Gaido, K.W:, McDonnell, D.P.; Korach, K.S. und Safe, S.H. (1997): Estrogenic activity of mixtures: is there synergism?; Chemical Industry Institute of Toxicology **17** (2); S. 1-7.

Garner, M. und Revzin, A. (1986): The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid protein interactions; TIBS **11**, 395-396.

Gassen, H.G. und Bertram, S. (1991): Gentechnische Methoden; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Gassen, H.G.; Sachse, G.E. und Schulte, A. (1994): PCR: Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion; Gustav Fischer Verlag Stuttgart.

Gassen, H.G. und Minol, K. (1996): Gentechnik; 4. Auflage Gustav Fischer Verlag Stuttgart Jena.

Gehm D.B.; McAndrew, J.M.; Chien, P.Y. und Jameson, L. (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine is an agonist for the estrogen receptor; Proc. Natl. Acad. Sci. **94**, 14138-14143.

Genetik (1997): Praktikumskript Genetik, Universität Kaiserslautern.

Gensler, M. (1999): *in vitro* Untersuchungen estrogener Effekte mit Hilfe der zell- und molekularbiologischen Methoden RT-PCR, Reportergenassay und Bandshiftassay; Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Gerber-Huber, S.; Felber, B.K.; Weber, R. und Ryffek, G.U. (1981): Estrogen induces tissue specific changes in the chromatin conformation of the vitellogenin gene in Xenopus; Nucleic Acids Research 9 (11), 2475-2494.

Gerber-Huber, S.; Nardelli, D.; Haefliger, J.A.; Cooper, D.N.; Givel, F.; Germond, J.E.; Engel, J.; Green, N.M. und Wahli, W. (1987): Precursor-product relationship between vitellogenin and the yolk protein derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene; Nucleic Acids Research **15** (12), 4737-4760.

Gibco (1998): Transfection Reagent Sample Pack, Life Technologies.

Giguere, V.; Tremblay, A. und Tremblay, G.B. (1998): Estrogene receptor β: Re-evaluation of estrogen and antiestrogen signaling; Steroids **63**, 335-339.

Glass, C.K.; Rose, D.W. und Rosenfeld, M.G.(1997): Nuclear receptor coactivators; Current Opinion in Cell Biology **9**, 222-232.

Goldfrank, D.; Haytoglu, T.; Frishman, W.D. und Mohammed, Z. (1999): Raloxifene, a new selective estrogen receptor modulator; Journal of Clinical Pharmacology **39**, 767-774.

Gorman, C. (1982): Recombinant genomes which express Chloramphenicolacetyltransferase in mammalian cells; Molecular and Cellular Biology **2**, 1044-1051.

Gotthardis, M. und Jordan, C. (1988): Development of Tamoxifen stimulated growth of MCF-7 tumors in thymic mice after long-term antiestrogen administration; Cancer Research **48**, 5183-5187.

Gould, J.C.; Leonard, L.S.; Maness, S.C.; Wagner, B.L.; Conner, K.; Zacharewski, T.; Safe, S.; McDonnell, D.P. und Gaido, K.W. (1998): Bisphenol A interacts with the estrogen receptor α in a distinct manner from estradiol; Molecular and Cellular Endocrinology **142**, 203-214.

Goussard, J.; Lechevrel, C.; Roussel, G.; Cren, H.; Bera, O. und Sala, M. (1991): Immunoradiometric assay of pS2 protein in breast cancer cytosols; Clinical Chemistry **37** (19), 1759-1762.

Graham, F.L. und Smiley, J. (1977): Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5; Journal of genetic Virology **36**, 59-74.

Grandien, K.; Berkenstamm, A. und Gustafsson, J.A. (1997): The estrogen receptor gene: Promotor organization and expression; International Journal of Biochemistry & Cell Biology **29** (12), 1343-1369.

Graumann, K.; Breithofer, A. und Jungbauer A. (1999): Monitoring of estrogen mimics by a recombinant yeast assay: synergy between natural and synthetic compounds?; The Science of the Total Environment **225**, S. 69-79.

Green, S. und Chambon, P. (1988): Nuclear receptor enhance our understanding of transcription regulation; Trends in Genetic (TIG) **4**, 309-314.

Gronemeyer, H. (1992): Control of transcription activation by steroid hormone receptors; The FASEB Journal **6**, 2524-2529.

Guilette, L.J.; Gross, T.S.; Masson, G.R.; Matter, J.M; Percival, H.F. und Woodward, A.R. (1994): Development abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone in concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida; Environmental Health Perspectives **102**, 680-688.

Gundermann und Mc Capra (1987): Chemiluminescence in Organic Chemistry; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo.

Gustafsson, J.A. (1998a): Therapeutical potential of selective estrogen receptor modulators; Current Opinion in Chemical Biology **2** (4), 508-511.

Gustafsson, J.A. (1998b): Raloxifene: Magic bullet for heart and bone?; Nature Medicine **4** (2), 152-153.

Guth, S. (1998): Mechanistische Untersuchungen zur Wirkung von Estrogenrezeptor-Agonisten und -Antagonisten mittels Band-Shift-Assay und Shift-Westernblot-Analysen; Diplomarbeit, Universität Kaiserlautern.

Guth, S. (1999): pers. Mitteilung

Halachmi, S.; Marden, E.; Martin, G.; MacKay, H.; Abbondanza, C. und Brown, M. (1994): Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription; Science **264**, 1455-1458.

Hanstein, B.; Eckner, R.; Direnzo, J.; Halachmi, S.; Liu, H.; Searcy, B.; Kurokawa, R. und Brown, M. (1996): p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex; Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 11540-11545.

Hay (1994): American cell type culture collection (ATCC), Cell lines and hybridomas, 8. edition.

Hartmann, A. (1991): Luciferasen als Reportergene der genetischen Regulation; Bio Tec Biotechnologie **5**, Sonderdruck.

Hermann, C.; Gärtner, E.; Weidle, U.H. und Grummt, F. (1994): High-copy expression vector based on amplification-promoting sequences; DNA and Cell Biology **13** (4), 437-445.

Horwitz, K.B.; Jackson, T.A.; Bain, D.L.; Richer, J.K.; Takimoto, G.S. und Tung, L. (1996): Nuclear receptor coactivators and corepressors; Molecular Endocrinology **10**, 1167-1177.

Hyder, S.M.; Chiappetta, C. und Stancel, G.M. (1999): Interaction of human estrogen receptors α and β with the same naturally occuring estrogen responsive elements; Biochemical Pharmacology **55**, 597-601.

Ikeda, S. und Oda, T. (1993): Nonisotopic Gel-Mobility-Shift-Assay using chemiluminescent detection system; BioTechniques **14**, 878-880.

Jager, M. (1992): Untersuchungen zum Wirkmechanismus und zum pharmakokinetischen Verhalten von n-(2-Chlorethyl)-N-nitrosocarbamoyl-L-alanyl-17-dihydrotestosteron; Dissertation Universität Kaiserslautern.

Jang, M.; Cai, L.; Udeani, G.O.; Slowing, K.V.; Thomas, C.F.; Beecheer, C.W.W.; Fong, H.H.S.; Farnsworth, N.R.; Kinghorn, D.; Metha, R.G.; Moon, R.C. und Pezzuto, J.M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes; Science **275**, 218-220.

Jenster, G.; Trapman, J. und Brinkman, A.O. (1993): Nuclear Import of the human androgen receptor; Biochemical Journal **293**, 761-768.

Jobling, S. und Sumpter, J.P. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an in vitro study using rainbow trout hepatocytes; Aquatic Toxicology **27**, 361.

Jordan, V.C. (1998): Antiestrogenic action of raloxifene and tamoxifen: Today and tomorrow; Journal of the National Cancer Institute **90** (13) 967-971.

Kato, S.; Endoh, H.; Masuhiro, Y.; Kitamoto, T.; Uchiyama, S.; Sasaki, H.; Masushige, S.; Gotoh, Y.; Nishida, E.; Kawashima, H.; Metzger, D. und Chambon, P. (1995): Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase; Science **270**, 1491-1494.

Katzenellenbogen, B.S. und Reese, J. (1991): Differential DNA-Binding abilities of estrogen receptor occupied with two classes of antiestrogens: studies using human estrogen receptor overexpressed in mammalian cells; Nucleic Acids Research **19** (23), 6595-6602.

Katzenellenbogen, B.S. und Reese, J.C. (1992): Examination of the DNA-Binding ability of estrogen receptor in whole cells. Implications for hormone-independent transactivation and the actions of antiestrogens; Molecular and Cell Biology **12** (10), 4531-4538.

Katzenellenbogen, B.S. (1996): Estrogen receptors: bioactivities and interactions with cell signaling pathways, Biology of reproduction **2** (2), 287-293.

Kelce, W.R.; Stone, C.R.; Laws, S.C.; Gray, L.E.; Kemppainen, J.A. und Wilson, E. (1995): Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist; Nature **375**, 581-585.

King, W. und Green, C. (1984): Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells; Nature **307**, 745-747.

Khovidhunkit, W. und Shoback, D. (1999): Clinical effects of raloxifene hydrochloride in women; Annals of Internal Medicine **130** (5), 431-439.

Klein-Hitpass, L; Schorpp, M; Wagner, U. und Ryffel, G.U. (1986): An estrogen-responsive element derived from the 5`flanking region of the Xenopus vitellogenin A2 functions in transfected human cells; Cell **46**, 1053-1061.

Klein-Hitpass, L.; Ryffel, G.U.; Heitlinger, E. und Cato, C.B. (1988a): A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor; Nucleic Acids Research **16** (2), 647-663.

Klein-Hitpass, L.; Kaling, M. und Ryffel, G.U. (1988b): Synergism of closely adjacent estrogen-responsive elements increases their regulatory potential; Journal of Molecular Biology **201**, 537-544.

Klein-Hitpass, L. (1998): pers. Mitteilung

Klinge, C.M. (1999): Estrogen receptor binding to estrogen response elements slow ligand dissociation and synergistically activates reporter gene expression; Molecular and Cellular Endocrinology **150**, 99-111.

Knerr, C. (1999): pers. Mitteilung

Knoblauch, R. und Garabedian, M. J. (1999): Role for the Hsp90-asociated cochaperone p23 in estrogen receptor signal transduction; Molecular and Cellular Biology **19** (5), 3748-3759.

Koch-Brandt, C. (1993): Gentransfer: Prinzipien-Experimente-Anwendungen bei Säugern, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kopp, P. (1998): Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation fot the conundrum of the “French Paradox”?; European Journal of Endocrinology **138**, 619-620.

Korach, K.S.; Levy, L.A. und Sarver, P. J. (1985): Steriochemical analysis of stilbene estrogens: receptor binding and hormone responsiveness; Estrogens in the Environment II, Elsevier-Verlag, New York, Amsterdam, Oxford.

Korenman, S.G. (1970); Relation between estrogen inhibitory activity and binding to cytosol of rabbit and human uterus; Endocrinology **87**, 1119-1123.

Kortenkamp, A. und Altenburger, R. (1998): Synergims with mixtures of xenoestrogens: a reevaluation using the method of isoboles; The Science of the Total Environment 221, 59-73.

Kricka, L. und Leach, F. (1989): Firefly Luciferase: mechanism of action, cloning and expression of the active enzyme; Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence **3** (1), 1-5.

Krishnan, V.; Stathis, P.; Permuth, S.F.; Tokes, L. und Feldman, D. (1993): Bisphenol A: An estrogenic substance is released from polycarbonat flasks during autoclaving; Endocrinology **132** (6), 2279-2286.

Kuiper, G.; Enmark, E.; Pelto-Huikko, M; Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary; Proc. Natl. Acad. Sci. **93**, 5925-5930.

Kuiper, G. und Gustafsson, J.A. (1997): The novel estrogen receptor-β subtype: potential role in the cell- and promotor-specific actions of estrogens and anti-estrogens; FEBS Letters **410**, 87-90.

Kuiper, G.; Carlsson, B.; Grandien, K.; Enmark, E.; Häggblad, J.; Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. (1997): Comparison of the ligand binding specifity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β; Endocrinology **138** (3), 863-870.

Kuiper, G.; Shughrue, P.J.; Merchenthaler, I. und Gustafsson, J.A. (1998a): The estrogen receptor β subtype: a novel mediator of estrogen action in neuroendocrine Systems; Frontiers in Neuroendocrinology **19** (4), 253-286.

Kuiper, G.; Lemmen, J.G.; Carlsson, B.; Corton, J.C.; Safe, S.H.; van der Saag, P.T.; van der Burg, B. und Gustafsson, J.A. (1998b): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β; Endocrinology **139** (10), 4252-4263.

Kumar, V. und Chambon, P. (1988): The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer, Cell **55**, 145-156.

Kunz, C. (1997): Untersuchung der Transkription des tms1-Gens der Spalthefe *Schizosaccharomyces pombe*; Diplomarbeit Universitätsklinik Homburg.

Lanz, R.B.; McKenna, N.J.; Onata, S.A.; Albrecht, U.; Wong, J.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. und O´Malley, B.W. (1999): A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex; Cell **97**, 17-27.

Le Goff, P.; Montano, M.M.; Schodin, D.J. und Katzenellenbogen, B.S. (1994): Phosphorylation of the human estrogen receptor; The Journal of Biological Chemistry **269** (6), 4458-4466.

Lindl, T. und Bauer, J. (1987): Zell- und Gewebekultur; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

Lu, R. und Serrero, G. (1999): Resveratrol a natural product derived from grape, exhibit antiestrogenic activity and inhibits the growth of human breast cancer cells; Journal of Cellular Physiology **179**, 297-304.

Mader, S. und White, J.H. (1996): Steroid receptors and steroid-inducible promoters; Editorial Comments **20** (3), 57-62.

Maniatis, T.; Sambrook, J. und Fritsch, E. (1989): Molecular cloning; 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview.

Mäkela, S.; Davis, V.L.; Tally, W.C.; Korkman, J.; Salo, L.; Vihko, R.; Santti, R. und Korach, K.S. (1994): Dietary estrogens act through estrogen receptor-mediated processes and show no antiestrogenicity in cultured breast cancer cells; Environmental Health Perspectives **102**, 572-578.

Mak, H.Y.; Hoare, S.; Henttu, M.A. und Parker, M.G. (1999): Molecular determinants of the estrogen receptor-coactivator interface; **19** (5), 3895-3903.

Marquardt, H. und Schäfer, S. (1994): Lehrbuch der Toxikologie; Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.

Martin, V.; Ribieras, S.; Rio, M.C. und Dante, R. (1998): The estrogen responsive element of the pS2 gen is recognized by a methylation sensitive DNA binding protein; Biological Chemistry **379**, 409-416.

MBI (1997): MBI Fermentas; T4 DNA Ligase.

McDonnell, D.P.; Dana, S.L.; Hoener, P.A.; Lieberman, B.A.; Imhof, M.O. und Stein, R.B. (1995): Cellular Mechanisms which distinguish between Hormone- and Antihormone-activated Estrogen receptor; Annals of the New York Academy of Sciences **761**, 121-137.

McGregor, J.I. und Jordan, V.C. (1998): Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action; Pharmacological Review **50** (2), 151-196.

McGuire, W.L. und DeLaGarza, M. (1973): Improved sensitivity in the human measurement of estrogen receptor in human breast cancer; Journal of the Clinical Endocrinology Metabolism **37**, 986-989.

McNeil, C. (1998): In search of the perfect SERM: Beyond Tamoxifen and Raloxifen; Journal of the National Cancer Institute **90** (13), 956-957.

Mellanen, P.; Petänen, T.; Lehtimäki, J.; Mäkela, S.; Bylund, G.; Holmbom, B.; Mannila, E.; Oikari, A. und Santti, R. (1996): Wood-derived estrogens: studies in vitro with breast cancer cell lines and in vivo trout; Toxicology and Applied Pharmacology **136**, 381-388.

Metzler, M. (1981): The metabolism of Diethylstilbestrol; Critical Reviews in Biochemistry, 171-205.

Metzger, D.; Berry, M.; Ali, S. und Chambon, P. (1995): Effect of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro and in vivo; Molecular Endocrinology **9** (7), 814-825.

Meyer, M.; Gronemeyer, H.; Turcotte, B.; Bocquel, M.T.; Tasset, D. und Chambon, P. (1989): Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function; Cell **52**, 433-442.

Meyer, T.; Koop, R.; von Angerer, E.; Schöneberger, H. und Holler, E. (1994): A rapid luciferase transfection assay for transcription activation effects and stability control of estrogenic drugs in cell cultures; Journal of Cancer Research in Clinical Oncology **120**, 359-364.

Miljoprojekt Nr. 290 (1995): Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects; Ministry of Environment and Energy, Denmark and Danish Environmental Protection Agency.

Mitlak, B.H. und Cohen, F.C. (1997): In search for the optimal long-term female hormone replacement: The potential of selective estrogen receptors modulators; Hormone Research **48** (4) 155-163.

Murdoch, F.E.; Byrne, L.M.; Ariazi, E.A.; Furlow, J.D.; Meier, D.A. und Gorski, J. (1995): Estrogen receptor binding to DNA: affinity for nonpalindromic elements from the rat prolactin gene; Biochemistry **34**, 9144-9150.

Mußler, B. (1999): Etablierung von in vitro Methoden zur Erfassung von endokrinen Disruptoren; Dissertation Universität Kaiserlautern.

Mosselman, S.; Polman, J. und Dijkema, R. (1996): ERβ: identification and characterization of a novel human estrogen receptor; FEBS Letters **392**, 49-53.

Mutschler, E. (1997): Arzneimittelwirkungen, Lehrbuch der Pharmakologie und Toxikologie, 7. völlig neubearbeitete und erweiterte Auflage, Wissenschaftlicher Verlag mbH, Stuttgart.

Nagel, S.C.; vom Saal, F.S.; Thayer, K.A.; Dhar, M.G.; Boechler, M. und Wade, V. (1997): Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo binding bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and Octylphenol; Environmental Health Perspectives **105** (1), 70-76.

Nardulli, A.M.; Romine, L.E.; Carpo, C.; Greene, G.L. und Rainish, B. (1996): Estrogen receptor affinity and location of consensus and imperfekt estrogen reponsive elements influence transcription activation of simplified promotors; Molecular Endocrinology **10** (6), 694-703.

Newton, C.R. und Graham, A. (1994): PCR, 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg.

Novak, U. und Paradiso, L. (1995): Identification of Proteins in DNA-Protein Complexes after Blotting of EMSA Gels; BioTechniques **19** (1), 54-55.

Nimrod, A. und Benson, W. (1996): Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates; Critical Reviews in Toxikology **26** (3), 335-364.

Nishikawa, J.I.; Saito, K.; Goto, J.; Dakeyama, F.; Matsuo, M. und Nishihara, T. (1999): New screening methods for chemicals with hormonal activities using interaction of nuclear hormone receptor with coactivator; Toxicology and Applied Pharmacology **154**, 76-83.

Nunez, A.M.; Jakowlev, S.; Briand, J.P.; Gaire, M.; Krust, A.; Rio, M.C. und Chambon, P. (1987): Characterisation of the estrogen-induced pS2 protein secreted by the human breast cancer cell line MCF-7; Endocrinology **121** (5), 1759-1764.

Nunez, A.M.; Berry, M.; Imler, J.L. und Chambon, P. (1989): The 5´-flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumor promotor (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein; The EMBO Journal **8** (3), 823-829.

OECD (1996): European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife; Report of Proceedings 2-4 December, Weybridge UK.

Olea, N.; Pulagr, R.; Perez, P; Olea-Serrano, F.; Rivas, A.; Novillo-Fertrell, A.; Pedraza, V.; Soto, A.M. und Sonnenschein, C. (1996): Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry; Environmental Health Perspectives **104** (3), 298-305.

Onate, S.A.; Tsai, S.Y.; Tsai, M.J. und O´Malley, B.E. (1995): Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily; Science **270**, 1354-1357.

Pace, P.; Taylor, J.; Suntharalingam, S.; Coombes, R.C. und Ali, S. (1997): Human estrogen receptor β binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor α; The Journal of Biological Chemistry **272** (41), 25832-25838.

Patrone, C.; Gianazza, E.; Santagati, S; Agrati, P. und Maggi, A. (1998): Divergent pathways regulate ligand-independent activation of ER α in SK-N-BE neuroblastoma and COS-1 renal carcinoma cells; Endocrinology **12** (6), 835-841.

Peach, K.; Webb, P.; Kuiper, G.; Nilsson, S.; Gustafsson, J.A.; Kushner, P.J. und Scalan, T.S. (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ERα and ERβ at AP1 sites; Science **277**, 1508-1510.

Pennie, W.D.; Aldridge, T.C. und Brooks, A.N. (1998): Differential activation by xenoestrogens of ERα and ERβ when linked to different responsive elements; Journal of Endocrinology **158**, 11-14.

Perez, P.; Pulgar, R.; Olea-Serrano, F.; Villalobos, M.; Rivas, A.; Metzler, M.; Pedraza, V. und Olea, N. (1998): The estrogenicity of bisphenol A-related diphenylalkanes with various substituents at the central carbon and the hydroxy group; Environmental Health Perspectives **106** (3), 167-174.

Peters, G.A. und Khan, S.A. (1999): Estrogen receptor domains E and F: Role in dimerization and interaction with coactivator RIP-140; Molecular Endocrinology **13** (2), 286-296.

Pichon, M.F. und Milgrom, E. (1993): Clinical significance of the estrogen regulated pS2 protein in mammary tumors; Critical reviews in Oncology/Hematology **15**, 13-21.

Pierce (1996): Instructions BCA Protein Assay Reagent.

Pink, J.J.; Fritsch, M.; Bilimoria, M.M.; Assikis, V.J. und Jordan, V.C. (1997): Cloning and characterization of a 77-kDa oestrogen receptor isolated from a human breast cancer cell line; British Journal of Cancer **75** (1), 17-27.

Poletti, A. (1999): Searching for the ideal SERM; Pharmacological Research 39 (5), 333.

Pons, M.; Gagne, D.; Nicolas, J.C. und Mehtali, M. (1990): A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules; BioTechniques **9**, 450-459.

Pratt, W.; Sanchez, E.R.; Bresnick, E.H.; Meshinchi, S.; Scherrer, L.C.; Dalman, F.C. und Welsh, M.J. (1989): Interaction of the Glucocorticoid Receptor with the M_R 90000 Heat Shock Protein: An evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation; Cancer Research **49**, 2222s-2229s.

Pratt, W. (1993): The role of Heat Shock Proteins in regulating the function, folding and trafficking of the Glucocorticoid Receptor **268**, 21455-21458.

Price, K.R. und Fenwick, G.R. (1985): Naturally occuring oestrogens in foods- a review; Food additives and Contaminants **2** (2), 73-106.

Promega (1992): Gel Mobility Shift Assay Systems; Technical Bulletin.

Promega (1996): pGL2 Luciferase Reporter Vectors; Technical Manual.

Ptashne, M. und Gann, A. (1990): Activators and Targets; Nature **346**, 324-331.

Qiagen (1997a): RNeasy Mini Handbook, 2. Auflage.

Qiagen (1997b): Taq PCR Handbook for Taq DNA Polymerase.

Qiagen (1998): Plasmid Purification Handbook for Qiagen Plasmid Midi, Maxi, Mega and Giga Kits.

Ramamoorthy, K.; Wang, F.; Chen, C.I.; Safe, S.; Norris, J.D.; McDonnell, D.P.; Gaido, K.W.; Bocchinfuso, W.P. und Korach, K.S. (1997): Potency of combined estrogenic pesticides; Science **275**, 405-406.

Ramanujam, P.; Fogerty, S.; Heiser, W. und Jolly, J. (1990): Fast electrophoresis to analyze DNA-protein interactions; BioTechniques **8**, 556-563.

Rickwood, D. (1990): Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, A pratical approach, 2. Auflage, Oxford University Press.

Rio, M.C. und Chambon, P. (1990): The pS2 gene, mRNA and protein: a potential marker for human breast cancer; Cancer Cells, Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 269-274.

Roberts, M.; Wallace, J.; Jeltsch, J.M. und Berry, M. (1988): The 5´-flanking region of the human pS2 gene mediates its transcriptional activation by estrogen in MCF-7 cells; Biochemical and Biophysical Research and Communications **151** (1), 306-312.

Robidoux, S.; Guerin, S.L.; Eskild, W.; Kroeplin, C.F. und Hansson, V. (1992): Salt-dependent formation of DNA/protein complexes in vitro as viewed by the gel-mobility shift assay; BioTechniques **13**, 136-140.

Rosenblum, E.R.; Stauber, R.E.; van Diehl, D.H.; Cambell, I.M. und Gavaler, J.S.(1993): Assessment of the estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer; Alcohol Clinical Experimental Research **17** (6), 1207-1209.

Routledge, E.J.; Parker, J.; Odum, J.; Ashby, J. und Sumpter, J.P. (1998): Some alkyl hydroxy benzoate preservatives (parabene) are estrogenic; Toxicology and Applied Pharamcology **153**, 12-19.

Sabbah, M.; Radanyi, C.; Redeuilh, G. und Baulieu, E.E. (1996): The 90 kDa heat-shock protein (hsp 90) modulates the binding of the oestrogen receptor to its cognate DNA; Biochemistry Journal **314**, 205-213.

Safe, S.; Connor, K. und Gaido, K. (1998): Methods for estrogen testing; Toxicology Letters **102-103**, 665-670.

Santti, R.; Mäkela, S.; Strauss, L.; Korkman, J. und Kostian, M.J. (1998): Phytoestrogens: potential endocrine disruptors in males, Toxicology and Industrial Health **14** (1/2), 223-237.

Schneider, R.; Gander, I.; Mertz, R. und Winnacker, E.L. (1986): A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts; Nucleic Acids Research **14**, 1303-1317.

Schmitz, G.; Walter, T.; Seibl, R. und Kessler, C. (1990): Nonradioactive Labeling of Oligonucleotids in vitro with the hapten Digoxygenin by Tailing with Terminal Transferase; Analytical Biochemistry **192**, 222-231.

Schwartz, J.A. und Brooks, C.S. (1998): Changes in the structure of the ligand or substitutions to AF2 residues in the estrogen receptor make independent contributions to coactivator sensitivity by SRC-1; Journal of the Steroid Biochemistry and Molecular Biology **67** (3), 223-232.

Sharpe, R. M. und Skakkebaek, N. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?; The Lancet **341**, 1392-1395.

Sharpe, R.M. (1995): Another DDT connection; Nature **375**, 538-539.

Shelby, M.D.; Newbold, R.R.; Tully, D.B.; Chae, K. und Davis, V.L. (1996): Assessing environmental chemicals using a combination of in vitro and in vivo assays; Environmental Health Perspectives **104** (12),1296-1300.

Shiau, A.K.; Barsted, D.; Loria, P.M.; Cheng, L.; Kushner P.J.; Agard, D.A. und Greene G.L. (1998): The structural basis of estrogen receptor/coactivator recognition and the antagonism of this interaction by tamoxifen; Cell **95**, 927-937.

Skehan, P.; Storeng, R.; Scudiero, D.; Monks, A.; McMahon, J.; Vistica, D.; Warren, J.T.; Bokesch, H.; Kenny, S. und Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening; Journal of the National Cancer Institute **872**, 1107-1112.

Slater, E.P.; Hesse, H. und Beato, M. (1994): Regulation of transcription by steroid hormones; Annals of the New York Academy of Sciences **733**, 103-112.

Sonnenschein, C.; Soto, A.M.; Fernandez, M.F.; Olea, N.; Olea-Serrano, M.F. und Ruiz-Lopez, M.D. (1995): Developement of a marker of estrogenic exposure in human serum; Clinical Chemistry **41**, 1888-1895.

Sonnenschein, C. und Soto, A.M. (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists; Journal of Steroid Biochemistry **65** (1-6), 143-150.

Soto, A.M. und Sonnenschein, C. (1985): The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7); Journal of steroid Biochemistry **23**, 87-94.

Soto, A.M.; Justicia, H.; Wray, J.W. und Sonnenschein, C. (1991): p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene; Environmental Health Perspectives **92**, 167-173.

Soto, A.M.; Chung, K.L. und Sonnenschein, C. (1994): The pesticides endosulfan, toxaphene and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells; Environmental Health Perspectives **102**, 380-383.

Soto, A.M. und Sonnenschein, C. (1995): The E-Screen-Assay as a tool to identify Estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants; Environmental Health Perspectives **103**, 113-122.

Soule, H. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma; Journal of the National Cancer Institute **51**, 1409-1413.

Spindler, K.D. (1997): Vergleichende Endokrinologie, Georg Thieme Verlag, Stuttgart New York.

Stack, G.; Kumar, V.; Green, S.; Ponglikitmongkol, M.; Berry; M.; Rio, M.C.; Nunez, A.M.; Roberts, M.; Koehl, C.; Bellocq, P.; Gairard, B.; Renaud, R. und Chambon, P. (1988): Structure and function of the pS2 gene and estrogen receptor in human breast cancer cells; in Breast Cancer: Cellular and Molecular Biology, Kluwer Academic Publishers, Boston, Dordrecht, London.

Stob, M. (1983): Naturally occuring food toxicants: Estrogens; Handbook of naturally occuring food toxicants, CRC Press, 81-100.

Stratagene (1998): Stratagene Produktkatalog.

Strauss, L.; Santti, R.; Saarinen, N.; Joshi, S. und Mäkela, S. (1998): Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease, Toxicology Letters **102-103**, 349-354.

Tremblay, G.B.; Tremblay, A.; Copeland, N.G.; Gilbert; D.J.; Jenkins, N.A.; Labrie, F. und Giguere, V. (1997): Cloning, chromosomal localisation and functional analysis of the murine estrogen receptor β; Molecular Endocrinology **11** (13), 353-365.

Tremblay A.; Tremblay, G.B.; Labrie, F. und Giguere, V. (1999): Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor β through phosphorylation of activation function AF-1; Molecular Cell **3** (4), 513-519.

Tremblay, G.B.; Tremblay, A.; Labrie, F. und Giguere, V. (1999): Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and –2 in the estrogen receptor α-β heterodimeric complex; Molecular and Cellular Biology **19** (3), 1919-1927.

Tsai, S. und Gustafsson, J.A. (1988): Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation; Cell **55**, 361-369.

Tsai, M.J. und O´Malley, B.W. (1994): Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members; Annual Reviews Biochemistry **63**, 451-486.

Tuan, R.S. (1997): Overview of experimental strategies for the detection and isolation of recombinant proteins and their application, in: Recombinant Protein Protocols, Detection and Isolation, Human Press, Totowa, New Jersey.

Turner, R.T.; Evans, G.L.; Zhang, M.; Maran, A. und Sibonga, J.D. (1999): Is resveratrol an estrogen agonist in growing rat?; Endocrinology **140** (1), 50-54.

Villalobos, M.; Olea, N.; Brotons, J.A.; Olea-Serrano, M.; Ruiz de Almodovar, J.M. und Pedraza, V. (1995): The E-Screen-Assay: A comparison of different MCF-7 cell stocks; Environmental Health Perspectives **103**, 844-850.

Vladusic, E.A.; Hornby, A.E.; Guerra-Vladusic, F.K. und Lupu, R. (1998): Expression of estrogen receptor β messenger RNA variant breast cancer; Cancer Research **58**, 210-214.

Wahli, W. und Dawid, I.B. (1980): Isolation of two closely related vitellogenin genes, including their flanking regions, from a *Xenopus laevis* gene library; Proc. Natl. Acad. Sci. **77** (3), 1437-1441.

Wahli, W.; Dawid, I.B.; Ryffel, G.U. und Weber, R. (1981): Vitellogenesis and the Vitellogenin gene family; Science **212**, 298-304.

Wahli, W. und Martinez, E. (1991): Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression; The FASEB Journal **5**, 2243-2249.

Walker, P.; Brown-Luedi, M.; Germond, J.E.; Wahli, W.; Meijlink, F.; van het Schip, A.D.; Roelink, H.; Gruber, M. und Ab, G. (1983): Sequence homologies within the 5`end region of the estrogen-controlled gene in Xenopus and chicken; The EMBO **2** (12), 2271-2279.

Walker, P.; Germond, J.E.; Brown-Luedi, M.; Givel, F. und Wahli, W. (1984): Sequence homologies in the region preceding the transcription initiation site of the liver estrogen-responsive vitellogenin and apo-VLDLII genes; Nucleic Acids Research **12** (22), 8611-8626.

Warner, M.; Nilsson, S. und Gustafsson, J.A. (1999): The estrogen receptor family; Current Opinion in Obstetrics and Gynecology **11**, 249-254.

Webb, P.; Nguyen, P.; Valentine, C.; Lopez, G.N.; Kwok, G.R.; McInerney, E.; Katzenellenbogen, B.S.; Enmark, E.; Gustafsson, J.A.; Nilsson, S. und Kushner, P.J. (1999): The estrogen receptor enhances AP-1 activity by two distinct mechanisms with different requirements for receptor transactivation functions; Molecular Endocrinology **13** (10), 1672-1685.

Weigel, N.L. (1996): Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation; Journal of Biochemistry **319**, 109-119.

Wellhöhner, H.H. (1997): Allgemeine und systemische Pharmakologie und Toxikologie; 6. komplett korrigierte und erweiterte Auflage, Springer Verlag, Berlin Heidelberg.

Welshons, W. (1984): Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors; Nature **307**, 747-749.

Westermeier, R. (1990): Gelelektrophorese-Praktikum, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

White, R.; Hoare, S.A.; Sumpter, J.P. und Parker, M.G. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic; Endocrinology **135** (1), 175-182.

White, R. und Parker, M.G. (1998): Molecular mechanisms of steroid hormone action; Journal of Endocrinology **5**, 1-14.

Winter, H.; Siry, P. und Schweizer, J. (1994): Nachweis spezifischer DNA-Proteinkomplexe mit Hilfe eines nichtradioaktiven Gel-Shift-Assays, Boehringer Mannheim Biochemica Information **93**, 19-20.

Wong, C.; Zhou, Z.; Sar, M. und Wilson, E. (1993): Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding; The Journal of Biological Chemistry **268**, 19004-19012.

Yang, N.N.; Venugopalan, M.; Hardikar, S. und Glasebrook, A. (1996): Identification of an estrogen responsive element activated by metabolites of 17β-estrdaiol and raloxifen; Science **273**, 1222-1225.

Yang, T.; Sinai, P.; Kitts, P.A. und Kain, S.R. (1997): Quantification of gene expression with a secreted alkaline phosphatase reporter system; BioTechniques **23** (6), 1110-1114.

Ylikomi, T.; Bocquel, M.T.; Berry, M.; Gronemeyer, H. und Chambon, P. (1992): Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesteron receptors; The EMBO Journal **11** (10), 3681-3694.

Ylikomi, T.; Wurtz, J.M.; Syväla, H.; Passinen, S.; Peki, A.; Haverinen, M.; Bläuer, M.; Tuohimaa, P. und Gronemeyer, H. (1998): Reappraisal of the role of the heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity; Critical reviews in Biochemistry and Molecular Biology **33** (6), 437-466.

Zacharewski, T. (1998): Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays; Environmental Health Perspectives **106** Suppl.2, 577-582.

ZKBS (1994): Stellungnahmen der zentralen Kommission für die biologische Sicherheit; Bundesgesundheitsblatt 319/320.

Poster und Publikationen

Untersuchungen zur hormonellen/antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe in funktionellen *in vitro* Assays
Seng, D.; Yusuf, A.; Böhm, S.; Guth, S.; Mußler, B. und Eisenbrand, G.
Lebensmittelchemie 52, 34, 1998

Erfassung der hormonellen Aktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen und Umweltkontaminanten mittels funktioneller Reportergenassays
Eisenbrand, G.; Seng, D. und Mußler, B.
Projekt Umwelt und Gesundheit Baden Württemberg
http://bwplus.fkz.de/pug

Endokrin wirksame Stoffe in der Nahrung: Erkenntnisse und Kenntnislücken für die Risikobewertung
Mußler, B.; Hofer, M.; Seng, D. und Eisenbrand, G.
Eds. Kochen; in press

Untersuchungen zur hormonellen/antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittel-Inhaltsstoffe in funktionellen *in vitro* Assays
Seng, D.; Yusuf, A.; Böhm, S.; Guth, S.; Mußler, B. und Eisenbrand, G.
Deutscher Lebensmittelchemikertag, Berlin, 16. bis 18. September 1997

Weak estrogenic effects of Chrysene-Metabolites in stably transfected cells
Seng, D.; Guth, S.; Böhm, S.; Mußler, B. und Eisenbrand, G.
DFG-Symposium der SKLM: Carcinogenic/anticarcinogenic factors in food: novel concepts?
Kaiserslautern, 4. bis 7. Oktober 1998

Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Bernd Mußler danke ich besonders für die sehr gute Zusammenarbeit, seine ausgezeichnete Unterstützung, Hilfe und seinen Anregungen während der Promotionszeit sowie seinen jederzeit aufmunternden Worte. Des weiteren für seine stetige Diskussionsbereitschaft und für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Susanne Meiers danke ich vor allem für die Freundschaft und Hilfe während unserer gemeinsamen Jahre in Kaiserslautern.

Volker Glaab danke ich für die gute Zusammenarbeit im Zellabor, viele lustige und ernste Unterhaltungen, für seine Hilfe sowie für die Postzustelldienste der letzten Monate.

Meinen Laborkollegen Sonja von Blücher, Sabine Guth und Akani Yusuf danke ich für die gute Zusammenarbeit.

Den Forschungspraktikanten Sigrid Follmann, Anette Höll und Karsten Müller danke ich für ihre engagierte und zuverlässige Mitarbeit im Rahmen ihrer wissenschaftlichen Abschlußarbeiten.

Matthias Baum und Volker Glaab danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ingrid Hemm und Ingrid Romani danke ich für organisatorische Arbeiten und Unterstützung in Verwaltungsangelegenheiten.

Herrn Prof. Chambon, Straßburg, Herrn Prof. Gustafsson, Schweden und der Firma Schering, Berlin danke ich für die zur Verfügung gestellten Expressionsplasmide des humanen Estrogenrezeptors α bzw. β sowie Herrn Dr. Klein-Hitpass, Essen für das pSVO-CAT Plasmid.

Meinen beiden Brüdern Markus und Olaf danke ich für ihre zu jeder Zeit aufmunternden und hilfreichen Worte und Taten, Thomas danke ich für Alles.

Der größte Dank gilt jedoch meinen Eltern, ohne deren Hilfe und Unterstützung diese Arbeit nie zustande gekommen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Daniela Seng
Adresse:	Auf dem Schönwasen 12
	79261 Gutach
Geburtsdatum:	09.08.1970
Geburtsort:	Waldkirch
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch

Schulbildung:

1977 bis 1981	Grundschule in Gutach
1981 bis 1990	Geschwister-Scholl-Gymnasium in Waldkirch
	allgemeine Hochschulreife

Auslandsaufenthalt:

8/1990 bis 4/1991	Au Pair in London; Besuch des Kingsway-College

Studium:

10/1991 bis 3/1996	Universität Kaiserslautern
	Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie
	Erste Staatsprüfung
4/1996 bis 11/1996	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand;
	Universität Kaiserslautern
seit 1/1997	Promotion im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern

Praktika:

8/1995 bis 9/1995	Wissenschaftliche Hilfskraft im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand, Universität Kaiserslautern