

**Aus der Arbeitsgruppe Endokrinologie
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

**Effekte von Estradiol und Raloxifen sowie der pflanzlichen
Substanzen Agnus castus, Belamcanda chinensis und Silybum
marianum im Brustgewebe der ovariectomierten Ratte im Hinblick auf
das Mammakarzinomrisiko**

**INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Georg - August - Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von
Jasmin Jaheda Ebrahimkhil,
geb. Farman aus Kabul, Afghanistan**

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

I. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke

II. Berichterstatter/in: Priv. Doz. Dr. rer. nat. Müller

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. rer. nat. Virsik-Köpp

Tag der mündlichen Prüfung: 4.03.2013

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	3
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	5
1 EINLEITUNG.....	8
1.1 KLIMAKTERIUM	8
1.2 PHYTOÖSTROGENE.....	9
1.3 SIND PHYTOÖSTROGENE SELEKTIVE ÖSTROGENREZEPTOR-MODULATOREN?.....	9
1.4 SYNTHETISCH HERGESTELLTE SELEKTIVE ÖSTROGENREZEPTOR-MODULATOREN	10
1.4.1 <i>Raloxifen</i> :.....	11
1.5 DIE UNTERSUCHTEN PFLANZENEXTRAKTE	12
1.5.1 <i>Mariendistel (Silybum marianum)</i>	12
1.5.2 <i>Mönchspfeffer (Vitex agnus castus)</i>	13
1.5.3 <i>Belamcanda chinensis (BC)</i>	14
1.6 ANATOMIE UND HISTOLOGIE DER BRUSTDRÜSE DER WEIBLICHEN RATTE	15
1.7 UNTERSCHIEDE ZWISCHEN DER HUMANEN UND MURINEN BRUSTDRÜSE.....	16
1.8 BRUSTKREBS UND STATISTIK.....	17
1.9 BRUSTKREBS UND STEROIDHORMONE	17
1.10 STEROIDHORMONE UND STEROIDHORMONREZEPTOREN	18
1.10.1 <i>Östrogenrezeptoren</i>	19
1.10.2 <i>Progesteronrezeptor</i>	20
1.10.3 <i>Einfluss der Hormone in der Brustdrüse der Ratte</i>	21
1.10.4 <i>Die Wirkung von Östrogenen und Gestagenen im humanen Mammagewebe</i>	22
1.11 ÜBERSICHT ÜBER DIE AUF IHRE RNA-EXPRESSION UNTERSUCHTEN GENE	23
1.11.1 <i>Östrogenrezeptoren alpha und beta (ER $\alpha\beta$)</i>	23
1.11.2 <i>Progesteronrezeptor (PR)</i>	24
1.11.3 <i>Insulin-like growth factor (IGF-1)</i>	24
1.11.4 <i>Vascular endothelial growth factor (VEGF)</i>	26
1.11.5 <i>Aromatase</i>	27
1.12 ZIELSETZUNG	28
2 MATERIAL UND METHODEN	30
2.1 VERSUCHSTIERE UND VERSUCHSAUFBAU	30
2.2 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	31
2.3 PRÄPARATION DER GEWEBEPROBEN.....	31
2.4 RNA-ISOLIERUNG.....	32
2.5 KONZENTRATIONS- UND REINHEITSBESTIMMUNG DER RNA	32
2.6 REVERSE TRANSKRIPTION	32
2.7 QUANTITATIVE REVERSE-TRANSKRIPTASE-POLYMERASEKETTENREAKTION	34
2.8 TAQMAN™-PCR	36

2.9	AUSWAHL DER PRIMER UND TAQMAN™-SONDEN.....	37
2.10	ABI PRISM™ 7700 SEQUENCE DETECTION SYSTEM	40
2.11	STATISTISCHE AUSWERTUNG	40
3	ERGEBNISSE	42
3.1	GENEXPRESSION VON ER α	42
3.2	GENEXPRESSION VON ER β	43
3.3	GENEXPRESSION VON PR	44
3.4	GENEXPRESSION VON IGF-1	45
3.5	GENEXPRESSION VON VEGF	46
3.6	GENEXPRESSION VON AROMATASE.....	47
3.7	ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE S. C. VERSUS P. G.	48
3.7.1	<i>Genexpression von ERα, ERβ, PR, IGF-1, VEGF und Aromatase nach s. c. Applikation von E2, MD, AC, BC und Raloxifen</i>	<i>48</i>
3.7.2	<i>Genexpression von ERα, ERβ, PR, IGF-1, VEGF und Aromatase nach p. g. Applikation von E2, MD, AC, BC und Raloxifen</i>	<i>49</i>
4	DISKUSSION	50
4.1	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON ER α IN DER MAMMA.....	50
4.2	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON ER β IN DER MAMMA	53
4.3	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON PR IN DER MAMMA	55
4.4	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON IGF-1 IN DER MAMMA.....	57
4.5	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON VEGF IN DER MAMMA	59
4.6	EINFLUSS DER VERSCHIEDENEN FUTTERSUBSTANZEN AUF DIE GENEXPRESSION VON AROMATASE IN DER MAMMA	61
4.7	ABSCHLIEßENDE BEURTEILUNG	64
5	ZUSAMMENFASSUNG	65
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	70
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	83
8	TABELLENVERZEICHNIS	83

Abkürzungsverzeichnis

ABs	Aveolar buds
AC	Agnus castus
AF	Aktivatorfunktion
AP	Aktivatorprotein
Aro	Aromatase
ATP	Adenosintriphosphat
BC	Belamcanda chinensis
C3	Komplementfaktor 3
Co	Kontrollgruppe
COX2	Cyclooxygenase 2
DNA	Desoxyribonucleic Acid
E2	17 β -Östradiol
EGFR	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
ER	Östrogenrezeptor
ERα	Östrogenrezeptor α
ERβ	Östrogenrezeptor β
ERE	Estrogen-Response-Element
ERKO	Östrogen-Rezeptor- knock- out
FSH	follikelstimulierendes Hormon
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
h	Stunde
HbEGF	heparin-binding EGF-like growth factor
HCF	human uterine cervical canal fibroblast
HKS	Herz-Kreislaufsystem
hPRA	human Progesteronrezeptor A
hPRB	human Progesteronrezeptor B

HRT	Hormonersatztherapie
IGF-1	Insulin-like growth factor
LBA	ligandbindendes Assay
LH	luteinisierendes Hormon
LN	lymph nodes
LOB	Lobuli
Mamma-Ca	Mammakarzinom(e)
MAPK	mitogen-activated protein kinases
MCF-7	Brustkrebszellen
Min.	Minuten
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
MORE-Studie	Multiple Out- comes of Raloxifen Evaluation
mRNA	Messenger- Ribonukleinsäure
MUX	Multiplexer
NF-κB	Nuclear Factor <i>kappa</i> B
Nm	Nanometer
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project P-1 Study
4-OH E2	4-Hydroxyöstradiol
ovx	Ovariectomie, ovariectomiert
PBS	Phosphat-Pufferlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
p. g.	per gavage
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PR	Progesteronrezeptor
PRE	progesteronresponsives Element
Ral	Raloxifen
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonucleic Acid

RNase	Ribonuklease
RUTH-Studie	Raloxifene Use for the Heart
s. c.	subkutan
SD	Sprague-Dawley
SERM(s)	Selektive Östrogenrezeptormodulator(en)
SM	Silybum marianum
SP	stimulating protein
S-Phase	Synthesephase
SSRI	Selektive Serotonin- Wiederaufnahmehemmer
STAR	Study of Tamoxifen and Raloxifene
TDLE	terminale duktulo-lobuläre Einheit
TDs	terminal ducts
TEBs	terminal end buds
TGFβ1	Transforming-Growth-Factor- β 1
VAC	Vitex agnus castus
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHI	Women`s Health Initiative
ZNS	zentrales Nervensystem

1 Einleitung

1.1 Klimakterium

Mit dem Versiegen der ovariellen Östrogenproduktion beginnt für jede Frau die Menopause. Weltweit geschieht dies im Durchschnitt zwischen dem 45. und 55. Lebensjahr. Für Europäerinnen konnte ein engerer Zeitraum ermittelt werden, welcher zwischen dem 50. und 52. Lebensjahr lag (Lasek und Müller-Oerlinghausen 2003).

Das Auftreten und der Schweregrad von klimakterischen Beschwerden sind stark von der gesellschaftlichen Stellung der Frau in einem Land und der Bewertung dieser Lebensphase der Frau in der Öffentlichkeit abhängig. In Ländern, in denen sich der gesellschaftliche Status von Frauen mit zunehmendem Alter erhöht, wird kaum über Beschwerden in der Menopause berichtet (z. B. China, Indien). In den entwickelten Industrieländern Europas und Nordamerikas wiederum ist der positive Einfluss einer befriedigenden Berufstätigkeit und einer positiven Lebensgestaltung auf einen beschwerdefreien Verlauf und eine konstruktive Bewältigung der Wechseljahre durch einige wissenschaftliche Studien bewiesen (Borde und David 2004).

Vor, während und nach der Menopause leiden 50 bis 75% der Frauen in unterschiedlichem Maße an Symptomen, die unter dem Begriff des klimakterischen Syndroms zusammengefasst sind. Die Intensität dieser Symptome ist bei 10-20 % der Frauen so stark, dass sie als behandlungsbedürftig anzusehen sind (Powell et al. 2008). Es kann außer zu uterinen Blutungsstörungen vor allem zu durch Östrogenmangel bedingter Klinik kommen. Darunter fallen vegetativ-vasomotorische Störungen (Hitzewallungen, profuses Schwitzen, Herzklopfen, -rasen, Schwindel, Erröten, Erblassen, Schlafstörungen, Parästhesien, Tinnitus), Atrophie an Haut und Schleimhäuten, Inkontinenzerscheinungen, Osteoporose und zunehmende kardiovaskuläre Erkrankungen.

Hierdurch kann das Allgemeinbefinden von Frauen stark negativ beeinflusst werden. Dies gilt nicht nur für Patientinnen in der natürlichen oder chirurgischen Menopause, sondern insbesondere für jene, die sich wegen eines Mammakarzinoms einer anti-hormonellen Therapie mit Tamoxifen oder Aromatase-Hemmern +/- GNRH-Analoga oder einer Chemotherapie unterziehen müssen.

Eine Hormonersatztherapie beispielsweise mit Östrogenpräparaten oder Kombinationspräparaten aus Östrogenen und Progesteron führt neben einer Reihe von anderen unerwünschten Nebenwirkungen insbesondere zu einem erhöhten Risiko für das Auftreten von Mammakarzinomen.

Aufgrund der negativen Resultate der zwei Studien (WHI and Million Women Study) stellt sich in der Praxis somit heute mehr denn je die Frage, ob nicht Phytoöstrogene, pflanzliche Extrakte, die eine Östrogen-ähnliche Wirkung haben, in der Lage wären, Wechselbeschwerden auf „natürliche Weise“ zu reduzieren, ohne dabei einen proliferativen Effekt auf das Brustgewebe auszuüben.

1.2 Phytoöstrogene

Der Trend in der Therapie der peri- bzw. postmenopausalen Symptome geht zu alternativen Behandlungsmethoden und zur Verwendung pflanzlicher Substanzen. Zunehmend mehr Frauen weichen aus Angst vor dem Mammakarzinom auf als ungefährlich angenommene pflanzliche Stoffe wie z.B. den Phytoöstrogenen aus. Phytoöstrogene sind pflanzliche Substanzen, die eine östrogen-ähnliche Wirkung aufweisen.

Aufgrund ihrer chemischen Struktur können die Phytoöstrogene in vier Hauptgruppen eingeteilt werden: Isoflavone, Flavonoide, Stilbene und Lignane (Cos et al. 2003). Im Blickpunkt der Forschung stehen vor allem Isoflavonoide, Lignane und Coumestane. Die Struktur der meisten Phytoöstrogene ist der des Östrogens sehr ähnlich. Somit kommt es zu unterschiedlich starker Bindung an die ER (Branham et al. 2002). Eine auffallende Eigenschaft der meisten Phytoöstrogene ist das Vorhandensein eines Phenolrings in der chemischen Struktur, der mit wenigen Ausnahmen die Voraussetzung für die Bindung an den ER darstellt (Setchell 1998).

Leider erlaubt die momentane Datenlage keine abschließende Aussage bezüglich des Risikos und des Nutzens von Phytoöstrogenen bei Mammakarzinomen (Messina et al. 2006, Trock et al. 2006, Wuttke et al. 2007). Während viele Studien einen protektiven Effekt der Phytoöstrogene im Mammagewebe nachweisen konnten (Duffy et al. 2007, Mense et al. 2008), gibt es auch Studien, die beweisen, dass es keine Assoziationen zwischen der Einnahme von Phytoöstrogenen und des Mammakarzinomrisikos gibt. Es existieren auch Studien, die vermuten lassen, dass Phytoöstrogene dosisabhängig bezüglich der Mammakarzinogenese einen nachteiligen Effekt haben könnten (Allred et al. 2001a, Zhang et al. 2003, Ju et al. 2006, Mense et al. 2008).

1.3 Sind Phytoöstrogene selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren?

Phytoöstrogenen, vornehmlich Isoflavonen, werden selektive Östrogenrezeptor-modulator(SERM)-Eigenschaften zugesprochen. Sie besitzen fehlende östrogene Wirkung in der Mamma und im Endometrium, während sie im Hypothalamus (Prävention von *hot flushes*), Skelettsystem (Prävention von Osteoporose) und im Herzkreislaufsystem (Prävention von Arteriosklerose) östrogen wirken.

Dass Phytoöstrogene präventiv auf die Entstehung bestimmter Tumore wirken können, beruht hauptsächlich darauf, dass es sich bei ihnen um so genannte SERM handelt (Messina et al. 2006). Andere Autoren hingegen verweisen auf Untersuchungen ohne Nachweis positiver Wirkungen von SERMs pflanzlicher Herkunft (Den Tonkelaar et al. 2001, Horn-Ross et al. 2001).

Die SERMs stellen einen weiteren Schwerpunkt bei der Entwicklung neuer Formen der Hormonersatztherapie dar. Ihre Wirkung ist in Abhängigkeit vom Zielorgan entweder östrogen oder antiöstrogen. Dadurch können unerwünschte Nebenwirkungen beispielsweise die Stimulierung des Wachstums des Endometriums oder auch ein erhöhtes Brustkrebsrisiko verhindert werden. Dies erklärt sich durch die Tatsache, dass es zwei Östrogenrezeptoren gibt ($ER\alpha$ und $ER\beta$), die primär verschiedene Strukturen und daher unterschiedliche Genfunktionen haben. Zudem weisen sie verschiedene organspezifische und auch gewebespezifische Verteilungsmuster auf. Es wird vermutet, dass $ER\alpha$ und $ER\beta$ gegensätzliche Funktionen besitzen. Während $ER\alpha$ eine wachstumsfördernde Aktivität zeigt, wirkt $ER\beta$ wachstumshemmend (Jordan und O'Malley 2007).

Die Konzentration des zirkulierenden endogenen Östrogens spielt ebenso eine Rolle. Isoflavone wirken bei hoher 17β -Östradiol (E_2)-Konzentration (zum Beispiel prämenstruell) östrogenantagonistisch. Bei niedrigem E_2 -Spiegel einer postmenopausalen Frau können sie einen gegenteiligen Effekt haben und östrogenagonistisch agieren (Zittermann 2003).

Viele Phytoöstrogene wie Resveratrol, Genistein, Daidzein and Quercetin können dosisabhängig sowohl an $ER\alpha$ als auch an $ER\beta$ binden. Allerdings haben sie, verglichen mit E_2 , eine deutlich geringere Affinität zu den beiden Rezeptoren.

Anders als E_2 , welches sowohl $ER\alpha$ - Rezeptoren als auch $ER\beta$ -Rezeptoren mit gleicher Affinität bindet, zeigen viele Phytoöstrogene eine höhere Affinität zu $ER\beta$ (Kuiper et al. 1997 und 1998, Mense et al. 2008).

1.4 Synthetisch hergestellte selektive Östrogenrezeptor-Modulatoren

Bei den meisten SERMs handelt es sich um synthetisch hergestellte Stoffe, die medizinische Anwendung finden. Das erste zugelassene Medikament dieser Art war das Triphenylethylen-Derivat Tamoxifen, ein SERM der 1. Generation.

Ursprünglich als Östrogen-Antagonist entwickelt und auch als solcher zur Behandlung Östrogen-abhängig wachsender Mamma-Ca eingesetzt, zeigt er jedoch auch östrogen-agonistische Effekte im Knochen und im Gefäßsystem. Eine noch höhere Affinität

zum ER als Tamoxifen besitzt Raloxifen. Dies wird im folgenden Kapitel näher beschrieben (Dadak 2008b).

1.4.1 Raloxifen:

Raloxifen (Ral) ist ebenfalls wie Tamoxifen ein SERM. Hierbei handelt es sich um ein nichtsteroidales Benzothiophen. Es bindet ebenfalls am Östrogenrezeptor, was zu einem Östrogen-agonistischen und antagonistischen Effekt in verschiedenen Geweben führt. Die Cholesterin-, Fibrinogen- und Homozysteinplasmaspiegel werden gleichermaßen positiv beeinflusst. Wegen seiner östrogenen Wirkung auf den Knochen ist Raloxifen bei postmenopausalen Frauen ein gängiges Mittel gegen Osteoporose.

Raloxifen hat eine antiöstrogene Wirkung auf die Brust, indem es kompetitiv die Östrogen-induzierte DNA-Transkription blockiert und dadurch das Wachstum von Östrogenrezeptor-positiven Brustzellen im Tierversuch hemmt (Dadak 2008 b). Ebenfalls an der humanen Mamma (Dowsett et al. 2001) und in In-vitro-Untersuchungen von humanen Mammakarzinomzelllinien (Glaeser et al. 2006) haben sich unter Raloxifeneinfluss im Brustgewebe antiöstrogene Effekte ohne Änderungen in der ER α Expression nachweisen lassen (Dowsett et al. 2001, Glaeser et al. 2006).

Die bislang umfangreichste Studie mit Raloxifen ist die MORE-Studie ("Multiple Outcomes of Raloxifene Evaluation"), in der primär die Häufigkeit von Knochenfrakturen in postmenopausalen Frauen verfolgt wurde (Dadak 2008 b). Mit den Daten der MORE-Studie wurde unter anderem untersucht, ob Raloxifen das Mamma-Ca-Risiko beeinflusst. Diese ergaben eine 72%ige Risikoreduktion des Mamma-Ca's (Dadak 2008 b).

Eine weitere Analyse der MORE-Daten konnte trotz der positiven Auswirkungen auf den Cholesterin-, Fibrinogen- und Homozysteinplasmaspiegel jedoch keinen Einfluss auf das kardiovaskuläre System zeigen, außer bei einem primär erhöhten Risiko (Dadak 2008 b).

In der internationalen, multizentrischen, randomisierten, doppelblinden RUTH (Raloxifene Use for the Heart)-Studie mit 11101 postmenopausalen Frauen konnte unter Raloxifen, verglichen mit der Placebogruppe, ein um 55% vermindertes Risiko für Östrogenrezeptorpositive, invasive Brustkarzinome nachgewiesen werden, jedoch ohne Effekte auf die Inzidenz von Östrogen-Rezeptor-negativen Tumoren (Barrett-Connor et al. 2006).

Die STAR-Studie untersuchte die Verträglichkeit und Wirksamkeit von Raloxifen im Vergleich zu Tamoxifen in der Prävention eines invasiven Mammakarzinoms in einem Kollektiv von knapp 20.000 Patientinnen mit einem erhöhten Brustkrebsrisiko (Fahrtner-Pammer 2007). Ähnliche Ergebnisse zeigten beide Substanzen in Hinblick auf die Inzidenz invasiver Mammakarzinome, Schlaganfälle, kardiovaskulärer Ereignisse,

Gesamtmortalität, Lebensqualität und Frakturhäufigkeit. Nicht signifikant besser schnitt Tamoxifen lediglich in Bezug auf die Prävention nicht-invasiver Mammakarzinome ab, während unter Raloxifen es seltener zum Auftreten von Katarakten, Thrombosen, Hysterektomien, Uterushyperplasien und Uteruskarzinomen kam (Fahrleitner-Pammer 2007).

1.5 Die untersuchten Pflanzenextrakte

1.5.1 Mariendistel (*Silybum marianum*)

Die Mariendistel auch unter dem Namen Christi Krone, Fieberdistel, Frauendistel, Heilandsdistel, Marienkörner, Stechkörner bekannt, gehört zur Unterfamilie der *Carduoideae*. Der Name der Mariendistel entstammt einer alten Legende, nach der die weißen Flecken auf ihren Blättern von der Milch der Jungfrau Maria stammen.

Zubereitungen aus den Samen der Mariendistel wurden bereits im Altertum bei verschiedenen Leiden eingesetzt, zum Beispiel gegen Schlangenbisse, um Galle abzuleiten, gegen Gelbsucht und Verstopfung der Leber und der Milz und anderes mehr (Flora et al. 1998).

Silymarin, ein Bestandteil der Mariendistel, ist ein weit verbreitetes Gemisch von Flavolignanen. Es enthält ein Silibiningemisch aus Silibinin (Hauptbestandteil), Silichristin, Isosilibin und Silidianin sowie Quercetin.

Silibinin bindet an zytosolische ER. In einer Studie konnte demonstriert werden, dass sie eine SERM-Wirkung mit ausschließlicher ER β -Bindungsspezifität hat. Anhand der ovx Ratten, die Silymarin und E2 erhielten, konnten die biologischen Effekte, die über ER α und ER β vermittelt werden, differenziert werden. Während E2 den Lipoproteinspiegel im Blut senkte (günstiger Effekt im Herzkreislaufsystem) und die Genexpression von IGF-1, *heparin-binding EGF-like growth factor* (HbEGF) und Komplementfaktor 3 (C3) im Uterus erhöhte, zeigte Silymarin diesbezüglich entweder keine Effekte oder wirkte antagonistisch. Beide Substanzen hemmten die Expression von ER β -Gen im Uterus. Auf den Knochen kam es unter SM zu einem östrogenen, antiosteoporotischen Effekt. Überraschenderweise war dort jedoch kein ER β nachzuweisen, was dazu veranlasste, entweder das Vorkommen einer ER β -Splice-Variante oder eines anderen Wirkungsmechanismus anzunehmen, wie beispielsweise über einen fraglichen ERY (Seidlová-Wuttke et al. 2003a).

Auch in einer anderen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Silymarin dem Knochenabbau in ovx Ratten signifikant vorbeugt. Hier konnte man leichte proliferative Effekte im Uterus beobachten. Dies könnte ebenfalls für die SERM-Eigenschaft von

Silymarin sprechen. Auch in dieser Studie wurde die höhere Affinität von Silymarin gegenüber ER β nachgewiesen (El-Shitany et al. 2010).

Es wurde gezeigt, dass Silymarin in vitro eine antioxidative Wirkung hat und somit für einen möglichen Benefit sorgen könnte (Koksal et al. 2008).

1.5.2 Mönchspfeffer (*Vitex agnus castus*)

Der Mönchspfeffer wächst in gemäßigten europäischen Breiten als Busch, dessen Früchte denen von Pfeffer ähneln und einen ähnlich pfeffrigen Geruch und Geschmack haben. Da im Mittelalter der Pfeffer ein teures Gewürz war, verwendeten Mönche zerschrotete Agnus-castus-Früchte als Pfefferersatz und nannten es daher Mönchspfeffer. Aus mittelalterlicher Quelle verlautet auch, dass dem Mönchspfeffer libidoinhibierende Eigenschaften zukommen sollen. Aus diesem Grund heißt die Pflanze auch Keuschlamm.

Extrakte aus der getrockneten Frucht des Mönchspfeffers (*Vitex agnus-castus* = VAC) enthalten dopaminerge Substanzen, die die hypophysäre Prolaktinsekretion hemmen. Die prämenstruelle Mastodynie, aber auch – wie in jüngster Zeit wissenschaftlich belegt – die fibrozystische Mastopathie werden durch Prolaktin in ihrer Entstehung gefördert, sodass viele Patientinnen, die unter Stresssituationen oder Tiefschlafbedingungen vermehrt Prolaktin ausschütten, diese Mammasympomatik entwickeln, die durch VAC günstig beeinflusst wird. Diese so genannte latente Hyperprolaktinämie kann auch zur Corpus-luteum-Insuffizienz und damit zur Sterilität führen. In diesen Fällen kann die Agnus-castus-Therapie fertilitätsfördernd wirken (Wuttke et al. 2010).

Zusätzlich binden Extrakte aus *Vitex agnus-castus* in vitro an Opioid- und Östrogenrezeptoren. Inzwischen verdichten sich die Hinweise auf eine östrogene Wirkung des Extrakts auch im Tierversuch (Rensen 2010).

Liu et al. (2004) untersuchten den methanolischen Extrakt des VAC auf eine östrogene Wirkung und wiesen im ER-Bindungstest eine Verdrängung gegenüber den beiden Östrogenrezeptoren nach. Dabei konnten sie die Linolensäure als einen Liganden der Östrogenrezeptoren isolieren und fanden für diese eine signifikante Stimulation der Expression von ER β -mRNA in ER-positiven Hormon-abhängigen T47D:A18- Brustkrebszellen und PR-mRNA-Expression in Ishikawa-Endometrium-Karzinomzellen (Liu et al. 2004).

Mehrere Studien haben gezeigt, dass Extrakte des *Vitex agnus castus* Phytoöstrogene enthalten. Dies konnte mit Hilfe eines ligandbindenden Assays (LBA) für das Flavonoid Apigenin, ein Bestandteil dieser Pflanze bestätigt werden. Es zeigte sich zu dem noch, dass Apigenin die meiste ER β -selektive Aktivität im VAC besitzt (Jarry et al. 2003). Es konnte anhand gewonnener Erkenntnisse aus einer Fall-Kontroll-Studie die Hypothese

unterstützt werden, dass pflanzliche Präparate, insbesondere *Vitex agnus*, die gegen Wechseljahresbeschwerden eingesetzt werden, auch bei einer längeren Anwendung vor dem Auftreten eines invasiven Brustkrebses in der Postmenopause schützen können (Obi et al. 2009).

Außerdem hat man die Zytotoxizität eines Extraktes des VAC, der mit Ethanol präpariert wurde, auf menschliche Fibroblasten des uterinen Cervix-Kanals (*human uterine cervical canal fibroblast*, HCF), Cervix- Karzinome, Brustkarzinome, Siegelring-Karzinome des Magens, Kolonkarzinome und kleine Lungenzellkarzinome untersucht. Nach Kultivierung für 24h (logarithmische Phase) und 72h (stationäre Phase) wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen des Vitex-Extraktes versetzt. In beiden Wachstumsphasen konnte eine hohe zytotoxische Aktivität durch Vitex-Extrakt für die proliferative Population festgestellt werden.

Aus diesen Ergebnissen erschließt sich, dass die zytotoxische Aktivität des Vitex-Extraktes möglicherweise Einfluss auf das Zellwachstum hat. Durch die Behandlung mit Vitex-Extrakt könnte die intrazelluläre Oxidation gefördert und zelluläre Apoptose bewirkt werden (Ohyama et al. 2003).

1.5.3 Belamcanda chinensis (BC)

Die in China, Japan und Korea beheimatete, zu den Iridaceen gehörende Leopardblume, *Belamcanda sinensis*, wird als „She Gan“ in der Traditionellen Chinesischen Medizin u. a. zur Behandlung entzündlicher und gynäkologischer Erkrankungen eingesetzt.

Die Droge stellt der geschnittene und getrocknete Wurzelstock dar. Als wirksame Hauptbestandteile sind neben vielen anderen die Isoflavonoide Belamcandinin, Iridin, Iridigenin, Tectoridin und Tectorigenin sowie Flavonoide, Ketone, Triterpene, Xanthone und Stilbene bekannt. In vitro erwies sich die Droge u. a. als antifungal und antiviral, in vivo zusätzlich als uterusrelaxierend, schleimlösend und sogar wirksam gegen Leukämie-388-Tumorzellen. Allerdings scheinen bei Extrakten aus *Rhizoma Belamcandae sinensis*, abgesehen von den Hauptbestandteilen Tectoridin und Iridin, die Zusammensetzungen der Inhaltsstoffe durchaus abhängig von der Herkunft der Pflanze zu sein (Wagner et al. 1999).

Es wurde bewiesen, dass ein Extrakt aus BC (BNO 1420) die Aktivität des GnRH-Pulsgenerators hemmt und die Genexpression von IGF-1, TGF- β , Osteocalcin und Kollagen 1 α 1 stimuliert, also auf Hypothalamus und Knochen wie E2 wirkt. Dieser Extrakt hatte jedoch keine Wirkung auf das uterine Gewicht oder die Expression der östrogenregulierten uterinen Gene des IGF-1 bzw. des Komplementproteins C3 (Seidlovà-Wuttke et al. 2000).

Extrakten aus BC werden anhand von Ergebnissen aus Tierversuchen an ovariectomierten Ratten und aus In-vitro-Untersuchungen SERM-artige Wirkungen nachgesagt. So wurde für Tectorigenin als einen der Belamcanda-chinensis-Inhaltsstoffe anhand von ER- Ligandbindungsanalysen nachgewiesen, dass es sowohl über ER α als auch β wirkt, jedoch mit einer geringeren Bindungsaffinität (670x und 400x geringer) als E2. Es konnte eine östrogenähnliche, jedoch kürzer andauernde LH-Ausschüttung aus dem Hypothalamus und damit eine mögliche Effektivität von BC in der Behandlung peri- bzw. postmenopausaler Symptome aufgezeigt werden. Weiterhin konnte eine schwach östrogene Wirkung auf den Knochen im Sinne einer Prävention bzw. Reduktion von Osteoporose nachgewiesen werden, ohne dass östrogene Effekte auf die Mamma oder den Uterus auftraten (Seidlová-Wuttke et al. 2004).

1.6 Anatomie und Histologie der Brustdrüse der weiblichen Ratte

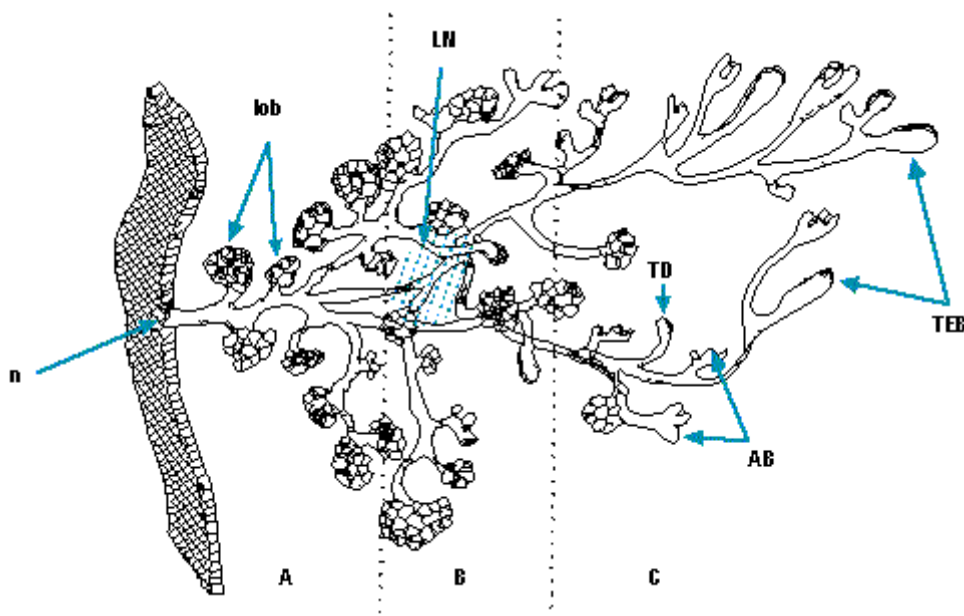
Viele Erkenntnisse über die humane Brustkrebsentwicklung beruhen auf Studien an der Ratte, da hier die einzelnen Entwicklungsstadien detailliert untersucht werden können. Daher wird im Folgenden die Mamma der Ratte beschrieben.

Die Brustdrüse, deren Aufgabe die Milchsekretion für die Ernährung der Nachkommen ist, passt sich an diese Funktion in erster Linie durch die Entwicklung einer ausreichenden Anzahl von Drüsen an, die charakteristisch für eine bestimmte Art ist. Die Brustdrüsen der Ratte sind ventrolateral der Milchleiste von zervikal bis inguinal angeordnet. Den einzig von außen sichtbaren Teil der Brustdrüse stellt die Brustwarze dar, von der aus sich der Rest der Brustdrüse nach dorsolateral als flache subkutane Schichten von fibroadipösem Gewebe ausbreitet. Weibliche Ratten besitzen sechs Brustdrüsenpaare, von denen eines zervikal, zwei thorakal, eines abdominal und zwei inguinal lokalisiert sind, die in ihren Entwicklungsstadien variieren. Der Differenzierungsgrad bei den Nullipara nimmt von zervikal nach inguinal zu (Astwood et al. 1937, Myers 1917, Russo IH und Russo J 1996). Die Brustdrüsen der männlichen Ratten stellen atrophe Organe dar.

Die Größe und Verteilung der Milchdrüsen variieren stark in Abhängigkeit von Geschlecht, Alter, hormoneller Stimulation und reproduktiven Bedingungen. Histologisch bestehen die einzelnen Brustdrüsen aus Stroma und Parenchym. Das Parenchym besteht aus einem bis zwei großen Milchgängen, die sich von der Brustwarze in das umgebende Fettgewebe erstrecken. Das Areal, in dem sich die gestreckten Milchgänge ganz in der Nähe der Brustwarze befinden, wird bei der Ratte als Zone A bezeichnet. Eine zunehmende Trennung und Aufzweigung in kleinere Duktus und seitliche Knospen erscheint im mittleren Drittel der Brustdrüse, welche als Zone B bezeichnet wird (Russo IH und Russo J 1996). Der Teil der Brustdrüse, der sich auf der Gegenseite

der Brustwarze befindet, enthält die am stärksten wachsenden terminalen dukta- len Strukturen, welche als terminal end buds (TEBs) bzw. terminale Endknospen (s. Abb. 1) bezeichnet werden (Daniel und Silberstein 1987). Die Duktus sind tubuläre Struktu- ren, deren Wände aus zwei unterschiedlichen Zelltypen bestehen, einer inneren Schicht epithelialer Zellen, die das Lumen umgeben, und einer äußeren, diskontinuier- lichen Schicht aus myoepithelialen Zellen, die der Basalmembran aufliegen (Russo IH et al. 1989). Große Duktus sind oft ausgekleidet von einer Lage flacher bis isoprismatischer epithelialer Zellen, deren luminale Seite Mikrovilli aufweist (Russo IH und Rus- so J 1996). Die TEBs hingegen sind umgeben von einem aus drei bis sechs Lagen bestehenden Epithel (Fritz et al. 1998), welches sich aus großen isoprismatischen Zel- len zusammensetzt, die eine hohe Zellproliferation aufweisen (Russo IH et al. 1989).

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Brustdrüse der weiblichen Ratte



Zone A, die sich in der Nähe der Brustwarze (n) befindet, enthält die gestreckten Milchgänge (lob). Das Areal, in dem sich die gestreckten Milchgänge ganz in der Nähe der Brustwarze befinden, wird bei der Ratte als Zone A bezeichnet. Eine zunehmende Trennung und Aufzweigung in kleinere Duktus und seitliche Knospen erscheint im mittleren Drittel der Brustdrüse, welche als Zone B bezeichnet wird. Hier findet man auch Lymphknoten (LN). Der Teil der Brustdrüse, der sich auf der Gegenseite der Brustwarze befindet (Zone C), enthält die am stärksten wachsenden terminalen dukta- len Strukturen, welche als terminal end buds (TEBs), alveolar buds (AB) und terminal ducts (TD) bezeichnet werden (Russo J und Russo IH 1980, S. 500).

1.7 Unterschiede zwischen der humanen und murinen Brustdrüse

Es gibt, abgesehen von der unterschiedlichen Anzahl von Brustdrüsenpaaren (sechs in der Ratte), noch weitere Unterschiede zwischen der murinen und humanen Mamma. So existiert bei der Ratte keine lobuläre Anordnung innerhalb der einzelnen

Drüsen. Im Gegensatz zu den TEBs in der murinen Brust wird die funktionelle Einheit in der menschlichen Brust als terminale duktulo-lobuläre Einheit (TDLE) bezeichnet. Jede dieser Einheiten besteht aus mehreren Verzweigungen und Acini und bildet einen Lobulus.

Diese gruppieren sich wie Trauben um einen terminalen Duktus. Jeder intralobuläre terminale Duktus ist von lobulärem Stroma umgeben, welches keine Adipozyten enthält und wiederum von losem Stroma umgeben ist, das in das umgebende Fettgewebe übergeht. Das Fettgewebe ist daher, im Gegensatz zu der murinen Mamma, in der ein enger Kontakt zwischen Epithelzellen, Fibroblasten und Adipozyten besteht, nicht direkt mit dem Epithel assoziiert (Abb. 1). Die Interaktion zwischen Epithel und Stroma ist nicht nur essentiell für die Entwicklung der Mamma, sondern auch für die Entstehung des Mammakarzinoms, da epitheliale und stromale Signalwege an der Tumorgenese beteiligt sind.

1.8 Brustkrebs und Statistik

In Deutschland erkranken derzeit jährlich über 58.000 Frauen an Brustkrebs. Brustkrebs ist die häufigste Krebsneuerkrankung bei Frauen. Diese Erkrankung ist für 29,3 % aller Krebserkrankungsfälle bei Frauen und damit für deutlich mehr als ein Viertel aller Krebserkrankungen bei Frauen verantwortlich. Das mittlere Erkrankungsalter liegt bei 64 Jahren und damit sieben Jahre unter dem mittleren Erkrankungsalter aller Krebserkrankungen. Die relativen 5-Jahres-Überlebensraten für Brustkrebspatientinnen betragen derzeit über alle Stadien betrachtet zwischen ca. 83 bis 87% (Husmann et al. 2010).

Nicht nur in Deutschland, sondern in ganz Europa und Nordamerika gilt der Brustkrebs als die häufigste Krebserkrankung der Frau (Husmann et al. 2010, Jemal et al. 2009). Nach wie vor ist das Mammakarzinom die häufigste Todesursache bei Frauen zwischen dem 35. und 54. Lebensjahr. Dennoch zeichnet sich eine Entwicklung ab, wonach die Mortalität durch die Wahrnehmung von Früherkennungsuntersuchungen sowie verbesserte Therapieoptionen in den letzten Jahren konstant abnimmt (Smigal et al. 2006).

1.9 Brustkrebs und Steroidhormone

In der Vergangenheit konzentrierte sich das Interesse auf den Einfluss der Östrogene, denen man aufgrund der Ergebnisse von Tierversuchen karzinogene Eigenschaften zugeschrieben hat. Darüber hinaus besteht kein Zweifel, dass das Mammakarzinom-Risiko mit der Dauer der Exposition gegenüber endogenen oder exogenen Sexualste-

roiden während der gesamten Lebenszeit korreliert (Kuhl 2003). Hierzu wird angemerkt, dass die alleinige Östrogen-Verwendung bis zu 7 Jahre lang zu keiner Zunahme der Brustkrebsfälle führt (Stefanick et al. 2006).

Dagegen scheint sich das Risiko für invasive duktale Mamma-Ca um 30 Prozent zu reduzieren (Li et al. 2008). Die Analyse des Östrogen-Monotherapie-Arms der WHI-Studie war zum gleichen Ergebnis gekommen. Offensichtlich spielt die Kombination mit Gestagenen eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Mamma-Ca. In mehreren neuen Fall-Kontroll-Studien wurde gezeigt, dass eine signifikante Zunahme des Brustkrebsrisikos in erster Linie unter der Östrogen-Gestagen-Therapie und nicht unter der Östrogensubstitution beobachtet wird, wobei es sich um lobuläre Mamma-Ca handelt. Dies ist mit der erheblichen Verstärkung der östrogenabhängigen Proliferation des Brustdrüsengewebes durch das Gestagen zu erklären.

Den Schätzungen zufolge ergeben sich laut WHI-Studie nach einer 10 jährigen Hormonersatztherapie pro 1000 Anwenderinnen, die Östrogen allein nehmen, fünf zusätzliche Brustkrebsfälle gegenüber 19 zusätzlichen Fällen pro 1000 Anwenderinnen einer kombinierten HRT. Diese Ergebnisse lassen sich jedoch nicht auf alle HRT-Kombinationen übertragen. Dabei kommt es auf die Dosierung und den Progesteron-Typ an.

Laut einer Studie, die unter der Leitung von Dadak (2008a) durchgeführt wurde, konnten folgende Ergebnisse beobachtet werden: Östrogen-Progesteron und Östrogen-Dydrogesteron (z. B. in Femoston®)-Kombinationen waren mit keinem oder nur einem leicht erhöhten, jedoch nicht signifikanten Anstieg des Brustkrebsrisikos assoziiert. Alle anderen Östrogen-synthetisches-Gestagen-Kombinationen waren mit einem erhöhten Risiko verbunden, die meisten davon signifikant. Dabei schnitten Östrogen und Progesteron sowie Östrogen und Dydrogesteron für kürzer als zwei Jahre jeweils am besten ab (Dadak 2008a).

Auch die Applikationsform spielt eine Rolle. Laut Daten aus zwei französischen Kohortenstudien (Fournier et al. 2007, De Lignieres et al. 2002) kann nicht ausgeschlossen werden, dass ein Wechsel auf transdermales Estradiol mit Progesteron als Gestagenkomponente eine Reduktion der Brustkrebsrate gegenüber den Vorjahren bewirkt haben könnte. Im Gegensatz zu bestimmten synthetischen oralen Gestagenen hat dieses Regime in den französischen Studien das Brustkrebsrisiko nicht erhöht (Fournier et al. 2007).

1.10 Steroidhormone und Steroidhormonrezeptoren

Die endogenen Östrogene sind E2, Östron und Östriol. E2 ist das am stärksten wirkende Östrogen. Die Wirksamkeit von Östron beträgt nur ca. 30% und die von Östriol

nur ca. 10% der biologischen Aktivität von E2. Vor der Menopause ist E2 das wichtigste endogene Östrogen im weiblichen Körper.

1.10.1 Östrogenrezeptoren

Das Verständnis der molekularen Mechanismen der Östrogene ist für die weitere Entwicklung von therapeutischen Möglichkeiten wichtig, um den physiologischen Mangel an Östrogenen nach der Menopause auszugleichen. Im Blut wird E2 meist an Proteine gebunden transportiert. Seine Wirkung an den Zielorganen, wie beispielsweise der Brustdrüse, entfaltet E2 über die beiden Östrogenrezeptoren ER α und ER β (Kuiper et al. 1998).

Die Signalübertragung von E2 über ER erfolgt durch drei verschiedene Wege. Im klassischen Modell kommt es zur Bindung des Liganden an den Rezeptor. Dieser Liganden-Rezeptor-Komplex bindet an den Estrogen-Response-Element (ERE) auf der DNA. Über ein ERE reguliert der Rezeptor die Transkription seiner Zielgene. Zu diesem Zweck besitzt das Rezeptormolekül eine DNA-bindende Domäne und bringt über ihre Aktivatorfunktionen AF-1- und AF-2-Domäne die Coaktivatoren und Corepressoren zur Transkription.

Östrogen moduliert ebenfalls über einen anderen Mechanismus eine Genexpression, in welchem ER mit anderen Transkriptionsfaktoren interagiert. Dieser Prozess wird als „Transkriptionsfaktor cross-talk“ bezeichnet. In diesem Fall moduliert ER die Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren wie z. B: Aktivatorprotein (AP)-1, Nuklearfaktor κ B (NF κ B) oder *stimulating protein* (SP)-1, indem er ihre DNA Bindung stabilisiert und/oder Koaktivatoren rekrutiert. Folgerichtig zu dieser Coaktivator ähnliche Funktion sah man bei ER α , welcher keine funktionelle DNA-Bindungsdomäne hatte, eine Modulation der AP-1- Transkriptionsmaschinerie. Der AP-1 Transkriptionsfaktor verwandelt mehrere mitogene Signale der Wachstumsfaktore wie z. B. IGF-1, erbB2, EGF und Steroidhormone wie E2 und Progesteron (DeNardo et al. 2005).

Ein anderer Mechanismus, bei der E2 und ER die Genexpression beeinflusst, wird als nichtgenomische Weg bezeichnet. Hier bindet E2 an ER, der außerhalb des Zellkerns lokalisiert ist. Dieser zytoplasmatisch- oder membranlokalisierte-ER aktiviert die Signaltransduktion im Zytosol. Über diesen Mechanismus wurde gezeigt, wie schnell E2 MAPK aktiviert und auch die Induktion von Signaltransduktionsweg, die zu Proteinkinase C und A-Aktivierung führt. Die östrogeninduzierte Aktivierung der zytoplasmatischen Proteinkinasen führt zu Induktionen von Genen, die diesen Kinasekaskaden nachgeschaltet sind (DeNardo et al. 2005).

Sowohl die genomische als auch die nichtgenomische E2-Aktionen spielen eine erhebliche Rolle bei der E2-induzierten Krebszellproliferation und beim Überleben der Brustkrebspatienten (Song et al. 2007, Marino et al. 2006).

Es sind zwei Östrogenrezeptoren bekannt, die so genannten ER α und ER β . Sie gehören zur Familie der Kernrezeptoren (Steroidhormonrezeptoren) und werden als Liganden-aktivierte-Transkriptionsfaktoren eingesetzt (Grandien et al. 1997).

ER wurde in den 60er Jahren entdeckt (Jensen und Jacobson 1960, Toft und Gorski 1966). Immunhistochemisch wurde die prädominante Zellkernlokalisation bestätigt. (Greene et al. 1980, King und Greene 1984).

ER α ist der schon länger bekannte ER. Er wurde 1986 geklont. (Green et al. 1986). 1996 wurde ER β , der für die Praxis immer bedeutender wird, entdeckt (Kuiper et al. 1996, Gustafsson 2006).

ER β ist kein Splicing-Produkt des ER α -Gens, sondern besitzt einen eigenen Gen-Locus, dessen Kode eigenständig transkribiert wird. Trotzdem bestehen Homologien zwischen dem ER α und dem ER β . Der Umfang gleicher Strukturelemente variiert allerdings von Abschnitt zu Abschnitt der beiden Rezeptoren zwischen 97% und 17,5%. Es ist anzunehmen, dass die Gene, die für die beiden Rezeptoren kodieren, aus einem gemeinsamen „Vorfahren“ (*common ancestor*) hervorgegangen sind, da die Grundstruktur identisch ist. Die Basensequenzen und damit auch die räumliche Konfiguration von ER α und ER β sind hingegen unterschiedlich (Marino et al. 2006). Der ER β wirkt antiinflammatorisch und kann eventuell auch eine kanzeroprotektive Wirkung vermitteln (Harris 2006, Gustafsson 2006).

Im Gegensatz dazu wirkt der bekannte ER α proliferativ. Um optimal zu wirken, müssen ER β und ER α immer im Gleichgewicht sein, was nach Gustafsson, dem Entdecker des ER β , als „Yin-Yang“ bezeichnet wird (Lindberg et al. 2003).

Die Verteilung der Rezeptoren im Organismus ist unterschiedlich. Es gibt Gewebe, die ER α -dominiert sind. Innerhalb der Brustdrüse befindet sich ER β sowohl in Stromalen als auch in epithelialen Zellen, wohingegen ER α hauptsächlich in epithelialen Zellen vorhanden zu sein scheint (Abukhdeir et al. 2006).

1.10.2 Progesteronrezeptor

Der Progesteronrezeptor (PR) vermittelt die physiologische Wirkung des Steroid-Hormons Progesteron. Es handelt sich also, genau wie bei den Östrogenrezeptoren um ein Mitglied der Steroid-Rezeptor-Superfamilie.

Progesteron hat seine hauptsächliche Bedeutung in der Etablierung und dem Erhalt einer Schwangerschaft. Das humane PR-Gen nutzt zwei unterschiedliche Promotoren

und Transkriptionsstarts, um zwei Isoformen hPRA, und hPRB zu produzieren. Diese sind bis auf 165 zusätzliche Aminosäuren am N-Terminus von hPRB, welcher für eine zusätzliche Aktivatorfunktion (AF-3) kodieren, identisch. Trotzdem unterscheiden sich beide Varianten stark in ihrer transkriptionellen Aktivität und physiologischen Funktion (Conneely et al. 2000).

Obwohl sowohl hPRA als auch hPRB eine sogenannte inhibitorische Domäne enthalten, ist diese ausschließlich in hPRA aktiv, was darauf hindeutet, dass die beiden Rezeptoren unterschiedliche Konformationen besitzen, welche zu einer unterschiedlichen Rekrutierung von Kofaktoren führt. Die Folge ist, dass vermutlich hPRA einen starken ligandenabhängigen Transrepressor für die Aktivität verschiedener Steroidhormonrezeptoren u. a. auch der ER darstellt, während hPRB in den meisten Zell- und Promotorkontexten als ebenfalls ligandenabhängiger transkriptioneller Aktivator wirkt, indem es als Homodimer an ein progesteronresponsives Element (PRE) in der Promotorregion des Zielgens bindet (Graham und Clarke 2002). Trotz der Tatsache, dass der Promoter von PR kein palindromisches estrogenresponsiv Element (ERE) besitzt, unterliegt die Transkription dieses Gens der östrogenen Kontrolle. In MCF-7-Zellen konnte eine Hochregulation sowohl der PR-mRNA-Expression als auch des Proteins festgestellt werden (Nardulli et al. 1988). Im Uterus von Ratten konnte dieser Effekt bestätigt werden. Es zeigte sich dabei auch, dass die Proteinkonzentration zwar über den gesamten Untersuchungszeitraum anstieg, die mRNA-Expression jedoch nach 24 h ein Maximum erreichte und danach zurückging (Kraus und Katzenellenbogen 1993). Es sind mehrere Sp1-Elemente bzw. ERE/SP-1-Elemente sowie zwei AP-1-Elemente in der Promotor-Region von PR bekannt, deren Beitrag zur östrogenen Regulation der PR-Transkription in transfizierten Knochen- (U2OS), Uterus (HEC-1) und Brust- (SK-BR3)-Zelllinien gezeigt werden konnte (Schultz et al. 2005).

1.10.3 Einfluss der Hormone in der Brustdrüse der Ratte

Wie bereits erwähnt wurde, sind die Entwicklung und Morphologie der Brustdrüse der weiblichen und männlichen Ratte von verschiedenen Hormonen abhängig. Diese sind u. a. Östrogene, Progesterone, Androgene, Prolaktin und Wachstumshormone.

Die Wirkung der Androgene in der männlichen Brustdrüse der Ratte ist gut geforscht. Bereits im männlichen Ratten-Fötus führen Androgene zu Atrophie der Brustdrüse (Goldman et al. 1976, Sourla et al. 1998).

Im Gegensatz dazu ist die Rolle von Östrogenen und Progesteron im Fötus noch nicht ganz klar. Progesteron scheint bei der Entwicklung der Brustdrüse der Maus keine Rolle zu spielen und die Abwesenheit des Hormons in utero spielt keine entscheidende Rolle bei der Heranreifung im Erwachsenenalter (Freeman und Topper 1978).

Östrogene hemmen die Brustentwicklung des Ratten-Fötus (Ceriani 1970). In der präpubertären Phase spielen die Wachstumshormone GH und Prolaktin beim Wachstum der Brustdrüse der Ratte eine entscheidende Rolle. Hier haben Östrogene und Progesteron einen geringeren Einfluss (Knight und Peaker 1982). In der adulten Brustdrüse der Ratte spielen Östrogene bei der Entwicklung und Funktion eine entscheidende Rolle (Russo IH et al. 1989).

Weibliche Ratten, die mit der Nahrung E2 zugeführt wurden, zeigten eine multifokale oder diffuse lobuloalveoläre Hyperplasie. Die Drüsen zeigten eine erhöhte Dichte der Alveolen (Biegel et al. 1998). Hypoöstrogenismus oder ER-Antagonismus z. B. durch Tamoxifen oder Toremifen führen bei Ratten, die keine hormonellen Veränderungen aufweisen zu Atrophie der weiblichen Brustdrüse. Die Atrophie in der weiblichen Brustdrüse betrifft sowohl die duktaalen als auch alveolaren Komponenten. Das Fettgewebe erscheint durch den Verlust des Drüsenparenchyms prominenter (Lucas et al. 2007).

Progesteron ist sowohl in der präpubertären Phase als auch in der Schwangerschaft entscheidend für die duktaalen und lobuloalveolären Veränderungen. Bei der duktaalen Entwicklung und beim Wachstum sind die Effekte von Progesteron synergistisch zu E2, IGF-1 in ovx Mäusen (Ruan et al. 2005) und E2, IGF-1, Prolaktin und GH in weiblichen Ratten (Kamiya et al. 1998). Progesteronmangel führt in der Brustdrüse der Mäuse zur Abnahme der mit der Schwangerschaft verbundenen Entwicklung und Verzweigung der duktaalen Epithelien, deren Verzweigung in sekundäre Gänge und Abfall der TEB's sowie Hemmung der lobuloalveolar Differenzierung (Atwood et al. 2000, Conneely et al. 2000, Fernandez-Valdivia et al. 2005). Allerdings ist Progesteron nicht unbedingt erforderlich für die pubertäre Entwicklung der Brustdrüse in der PR-Knockout-Maus (Fernandez-Valdivia et al. 2005). Hingegen zeigten adulte Ratten mit intakten Ovarien, denen vier Wochen lang Mifepriston, ein potenter PR-Agonisten zugeführt wurde, eine lobuloalveoläre Hyperplasie mit Bildung von großen Zysten, die mit Milch gefüllt waren (van der Schoot et al. 1987).

1.10.4 Die Wirkung von Östrogenen und Gestagenen im humanen Mammagewebe

Die Östrogen- und Gestagenwirkung auf die Brust ist komplex. Die Ergebnisse von In-vitro-Studien an epithelialen Mammazellen oder Mammakarzinomzellen lassen keine endgültigen Schlüsse hinsichtlich der In-vivo-Wirkung in Mammagewebe zu, da im Gewebe Interaktionen zwischen epithelialen Zellen und Stroma erfolgen. Die Östrogenwirkung ist nicht nur eine direkte auf die epitheliale Zelle, sondern erfolgt indirekt über Induktion und Inhibition von Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren. Außerdem ist Mammagewebe selbst ein endokrin aktives Gewebe, da sowohl aus Androge-

nen durch Aromatisierung Östrogene entstehen als auch inaktive Östrogene lokal in aktive metabolisiert werden können.

Progesteron hat einen direkten Einfluss auf epitheliale Mammagewebszellen. Man konnte anhand der In-vitro-Studien je nach Versuchsordnung die unterschiedlichsten Effekte nachweisen. In der Regel erfolgt durch Gestagene eine Inhibition der östrogenstimulierten Proliferation. In Mammagewebe wurde unter endogenem Progesteroneinfluß eine erhöhte Mitoserate, jedoch auch eine erhöhte Apoptoserate gefunden (Laidlaw et al. 1995).

Studien nach exogener Anwendung von Gestagenen haben widersprüchliche Daten geliefert. Es wurde sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Mitoserate gefunden. Hinsichtlich der Entwicklung von Mammakarzinomen muss den Östrogenen durch ihre proliferative Wirkung ein fördernder Effekt zugeschrieben werden, allerdings nur bezogen auf östrogenabhängige und damit in ihrem Wachstum weniger bösartige Tumoren. Ein Schutzeffekt durch Gestagene ließ sich nicht nachweisen (Braendle 2001).

1.11 Übersicht über die auf ihre RNA-Expression untersuchten Gene

Genexpression, ist ein Prozess, bei dem aus genetischen Informationen ein funktionelles Genprodukt z. B. RNA oder Protein entsteht.

Nachdem die DNA in mRNA transkribiert worden ist, entsteht aus dieser durch Translation ein Protein. In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression der mRNA, welche eine Schlüsselrolle bei der Proteinsynthese spielt, bestimmt.

1.11.1 Östrogenrezeptoren alpha und beta (ER $\alpha\beta$)

Die beiden Östrogenrezeptoren α und β , über die das physiologische E₂ das Wachstum, die Differenzierung und die Funktion vieler Zielgewebe u. a. der weiblichen Brustdrüse beeinflusst (Pettersson und Gustafsson 2001), spielen nicht nur eine entscheidende Rolle beim Mechanismus der östrogenen Wirkung, sie sind gleichzeitig selbst Gene, deren Expression E₂-reguliert ist (Seidlová-Wuttke et al. 2003b). Dadurch entsteht ein Regelkreis in Form einer Rückkopplungs-Regulation, der für die östrogenabhängige Regulation der Expression aller weiteren Gene, die durch AP-1 kontrolliert werden von übergeordneter Bedeutung ist.

E₂ bindet mit etwa gleicher Affinität an ER α und ER β (Kuiper et al. 1996 und 1997, Kulakosky et al. 2002, Ramsey et al. 2004, Edwards 2005). Über diese Rezeptoren entfaltet E₂ vielfältige Wirkungen im Körper, wobei die unterschiedlich starke transkriptionische Aktivität in der unterschiedlichen Verteilung der beiden Rezeptoren und ihrer Splicevarianten begründet zu sein scheint (Seidlová-Wuttke et al. 2003a).

Um Aussagen über die Bedeutung der einzelnen Rezeptortypen treffen zu können, sind spezifische Untersuchungen notwendig. Ein mögliches Verfahren hierfür stellt die Züchtung von Östrogen-Rezeptor- knock- out- Mäusen (ERKO) dar. Bei dieser genetischen Methode können selektiv Rezeptorsubtypen deaktiviert werden, so dass α ERKO- und β ERKO-Tiere entstehen. Bei α ERKO sind alle α -Östrogenrezeptoren funktionsunfähig, bei β ERKO alle β -Rezeptoren. Auch die Ausschaltung beider ER-Subtypen (α/β ERKO) ist möglich. Die Mammdrüsen der α ERKO-Mäuse zeigen eine normale pränatale und präpubertäre Entwicklung. Nach der Pubertät bleiben sie rudimentär, die epithelialen Verzweigungen und die lobuloalveoläre Entwicklung fehlen dabei. Anders als die unterentwickelten α ERKO-Brustdrüsen zeigen die β ERKO-Mäuse eine normale duktale Struktur mit normalem Fettgewebe. Nach der Schwangerschaft kommt es zur normalen Differenzierung der β ERKO-Milchdrüsen mit notwendigen lobuloalveolären Strukturen für die Laktation. Die Brustdrüse der erwachsenen α/β ERKO-Mäusen ähnelt die der Brustdrüse der α ERKO-Mäusen.

Dies erlaubt die Aussage, dass $ER\alpha$ für die Wirkung von E2 im Mammgewebe von entscheidender Bedeutung ist (Walker und Korach 2004). Förster et al. (2002, 2004) und Kietz et al. (2004) versuchten ebenfalls, anhand von α -ERKO- und β -ERKO-Mäusen, die differenzielle Vermittlung von Östrogeneffekten über $ER\alpha$ und $ER\beta$ im Herzmuskel und Brustgewebe zu entschlüsseln. Die Autoren konnten einen ersten Hinweis auf differenzierende Östrogeneffekte auf das Brustepithel, spezifisch vermittelt über den $ER\beta$, gewinnen. Da Frauen, die gestillt haben, ein reduziertes Brustkrebsrisiko zugeschrieben wird, spekulieren Förster et al. (2002) darüber, dass die $ER\beta$ -vermittelte terminale Differenzierung des Brustepithels zu dieser Risikoverminderung beitragen könnte. In einem In-vitro-Ansatz konnten Ström et al. (2004) komplementär an der Brustkrebszelllinie T47D zeigen, dass die Überexpression von $ER\beta$ die Östrogen-vermittelte Aktivierung des Zellzyklus hemmt. Damit ist der $ER\beta$ ein geeigneter Angriffspunkt für therapeutische Brustkrebsprävention und -therapie durch $ER\beta$ -selektive SERMs (Förster et al. 2002 und 2004, Kietz et al. 2004, Ström et al. 2004).

Alle Substanzen üben durch $ER\alpha$ und $ER\beta$ einen Effekt. Dies wird in der vorliegenden Arbeit als Beweis der Wirkung auf die Genexpression nachgewiesen.

1.11.2 Progesteronrezeptor (PR)

(s. Kapitel Steroide und Steroidhormone)

1.11.3 Insulin-like growth factor (IGF-1)

Der „*insulin-like growth factor*“-1 (IGF-1), auch bekannt als Somatomedin, ist ein dem Insulin strukturell und funktionell ähnliches Polypeptid, welches sowohl für das prä- als

auch für das postnatale Wachstum sowie für die Organentwicklung von Bedeutung ist (Le Roith et al. 2001).

Er wirkt als starkes Mitogen für normale und abnormale Zellen. Seine Aktivierung führt zu erhöhter Proliferationsneigung und verringerter Apoptoserate. Die Regulierung der IGF-1-Konzentration wird in hohem Maße von Bindungsproteinen beeinflusst.

Die Wirkungsvermittlung findet an einem Rezeptor statt, der zu der Familie der Tyrosin-Kinasen gehört. Der Großteil des zirkulierenden IGF-1 wird in der Leber produziert und sezerniert. Damit entspricht die Wirkungsweise einem endokrinen Hormon. Es findet sich allerdings auch eine lokale Produktion in vielen unterschiedlichen Geweben, dabei wird entweder dieselbe Zelle (autokrin) oder eine angrenzende Zelle beeinflusst (parakrin) (Zapf 1997).

Dem IGF-1 wird als Mitogen bei der Entstehung von Brustkrebs und anderen malignen Tumoren eine wichtige Rolle zugeschrieben. Durch experimentelle Studien konnte dargestellt werden, dass sich die Proliferation von Brustkrebszelllinien durch IGF-1 stimulieren lässt (Jones et al. 1995) und durch eine Blockade der Rezeptoren mittels Antikörper inhibiert wird (Rohlik et al. 1987). Immunocytochemische Untersuchungen zeigen, dass die Lokalisation der IGF-1-Rezeptoren im schnell proliferierenden Bereich des Tumors zu finden ist (Pollak und Tremblay 1989).

Die Ausschüttung von IGF-1 aus den Leberzellen wird von der Höhe des Östrogenspiegels beeinflusst, da Östrogen die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse fördert und somit indirekt für einen Anstieg des IGF-1 verantwortlich ist (Pollak et al. 1992). Übermittelt wird dieser Prozess über spezifische Östrogenrezeptoren in der Hypophyse (McEwen et al. 1979). Bei östrogenrezeptor-positiven Brustkrebszellen führt zusätzlich die Stimulation der Rezeptoren an der Tumorzelle zu einer Ausschüttung von IGF-1, welches dann eine autokrine und parakrine Wirkung auf die umliegenden Zellen zeigt (Bruns 1994).

Es wurde gezeigt, dass Östrogen und IGF-1 synergistisch den Eintritt der Brustkrebszelllinie MCF 7 in die S-Phase der Zellteilung induzieren. In der Brustdrüse spielt bei der Entwicklung des gesunden Brustgewebes und des Mammakarzinoms die Signalübertragung zwischen den beiden Stoffen eine Schlüsselrolle. Ferner haben ER, und IGF-1-Expression eine prognostische Bedeutung und es gibt eine positive Korrelation zwischen IGF-1-Rezeptorkonzentration und Mamma-Ca-Risiko bei prämenopausalen Frauen. Wenn man bedenkt, dass es zwischen den beiden Rezeptoren und deren Beteiligung bei der Brustkrebsprogression einen bedeutenden Zusammenhang gibt, wäre eine Kombination von ER-, und IGF-1-Inhibitor eine rationale therapeutische Strategie (Lisztwan et al. 2008).

Es stellt sich hier die Frage inwiefern Phytoöstrogene, die eine östrogen-ähnliche Wirkung haben, einen Einfluss auf die IGF-1-Konzentration und die Brustkrebsentstehung haben.

1.11.4 Vascular endothelial growth factor (VEGF)

Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF wird von nahezu allen soliden Tumoren gebildet und sezerniert (Fiedler et al. 2001). Er wirkt endothelspezifisch und nimmt damit eine besondere Stellung unter den proangiogenetischen Faktoren ein (Siemeister et al. 1998).

Bei der Entstehung eines soliden Tumors spielt VEGF als wichtigstes Mitogen der Angiogenese eine entscheidende Rolle (Claffey und Robinson 1996). Durch Erhöhung der Gefäßdurchlässigkeit und Bildung von neuen Gefäßen werden Größenzunahme und Metastasierung ermöglicht (Heits et al. 1998). Besonders im hochmalignen, schnell proliferierenden Tumorgewebe und dort vor allem in hypoxischen Arealen ist die Expression deutlich erhöht (Kroll und Waltenberger 2000). Folkman stellte 1995 die enorme Bedeutung von VEGF und seinen Rezeptoren für die Tumorentwicklung fest und schlug zur Krebsbekämpfung Eingriffe in den VEGF-Signalweg vor (Folkman 1995). Die VEGF-Synthese wird über verschiedene Mediatoren wie Steroidhormone, Zytokine und Tumorpromotoren mit hemmenden oder fördernden Effekten reguliert (Heits et al. 1998).

VEGF spielt vor allem bei der Angiogenese von Geweben eine große Rolle. Östrogeneinfluss wird speziell lokal in der Mamma mit erhöhter VEGF-Expression und erhöhter Mikrogefäßdichte assoziiert (Pavlakakis et al. 2008). Heits et al. (1998) zeigten, dass Östrogene und Progesteron die Freisetzung von VEGF in einigen Brustkrebszelllinien fördern (Heits et al. 1998). Ebenfalls wurde demonstriert, dass in menschlichen Mammakarzinom- und Endometriumkarzinomzellen die VEGF-Expression neben multifaktoriellen, zum Teil noch nicht bekannten Einflüssen, durch Östrogene über ER α als auch ER β induzierbar ist (Koduri et al. 2006, Hyder et al. 2000).

Insgesamt bleibt die Rolle des E2 bezüglich der VEGF-Regulation umstritten. Während einige Studien über eine E2 induzierte erhöhte VEGF-Genexpression in Endometriumkarzinomzellen (Dardes et al. 2002, Navarro et al. 2003, Dai et al. 2009, Mueller et al. 2000) und in Mammakarzinomzellen (Soares et al. 2002, Ruhola et al. 1999) berichten, gibt es ebenfalls Studien, die eine E2-induzierte VEGF-Überexpression in ER-positiven MCF-7, T47-D- oder ZR-75-Mammakarzinomzellen nicht demonstrieren konnten, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene (Hyder et al. 1998, Bermonta et al. 2001, und Degani 2002, Merkins et al. 2006).

Es stellt sich die Frage, ob Phytoöstrogene, die eine östrogen-ähnliche Wirkung haben, auch die VEGF-Konzentration beeinflussen und somit eine Krebsentstehung begünstigen.

1.11.5 Aromatase

Das Enzym Aromatase, auch Cytochrom P450_{Aro} genannt, aromatisiert Androgene zu Östrogenen. Die Cytochrom P450-Proteine sind Monooxygenasen, die Reaktionen katalysieren, die mit der Synthese von Cholesterol, Steroiden und Lipiden zusammenhängen und zudem an der Verstoffwechslung von Pharmazeutika beteiligt sind.

Die Aromatase ist am Endoplasmatischen Retikulum lokalisiert und katalysiert dort den letzten Schritt in der Steroidbiosynthese von Östradiol aus Testosteron, sowie Estron aus Androstendion. Die Aromatase konnte bisher in vielen verschiedenen Geweben nachgewiesen werden, z.B. in Haut-, Knochen- und Fettgewebe, sowie in Blutgefäßen. Der Umwandlungsprozess steroidaler Vorstufen in Östrogen findet bei prämenopausalen Frauen vorwiegend in den Eierstöcken (Ovarien) statt. Aber auch im Körper von Frauen, die ihre Wechseljahre schon hinter sich haben, oder von Frauen, deren ovarielle Östrogenproduktion unterdrückt wird, wird noch in geringerem Umfang Östrogen hergestellt.

Im Brustgewebe postmenopausaler Frauen ist die Aromatase für die lokale Östrogenproduktion verantwortlich, denn nach der Menopause, wenn die Östrogenkonzentration in der Brust absinkt, wird wahrscheinlich über eine Steigerung der Aromatase in der Brustdrüse die Östrogenkonzentration aufrechterhalten. Auf diese Weise könnte die Aromatase die lokale Östrogenproduktion über einen auto- parakrinen Regelkreis kontrollieren (Nakamura et al. 1999, Mense et al. 2008). Östrogenvorstufen werden noch von der Nebenniere produziert und anschließend mit Hilfe der Aromatase im Muskel- und Fettgewebe in Östrogen umgewandelt. Die vermehrte Expression über Aktivität dieser Enzyme wird mit Brustkrebs assoziiert. Denn während einer malignen Transformation, könnte das lokal produzierte Östrogen die Proliferation von Tumorzellen und VEGF-Produktion stimulieren. Das sind Effekte, die eine Tumorentstehung, Angiogenese und letztendlich die Metastasierung begünstigen (Nakamura et al. 1996 und 1999, Yue et al. 2001, Mense et al. 2006). Es hat sich gezeigt, dass die Aromatase in malignem Mammagewebe mehr exprimiert wird als im normalen Mammagewebe (Miller 1997, Harada 1997). Tekmal et al. (1999) demonstrierten, dass eine gesteigerte Östrogenproduktion, welche aus einer Aromataseüberexpression in der Brustdrüse resultierte, einem Mamma-Ca in einem Frühstadium ähnelte und zu einer Reihe von präneoplastischen und neoplastischen Veränderungen führte. Sie zeigten ebenfalls, dass eine alleinige Aromataseüberexpression ohne zirkulierende Östrogene in der Brustdrüse ausreicht, um Präneoplasien und Neoplasien zu verursachen (Tekmal et

al. 1999). Im Hinblick auf die Schlüsselrolle der Aromatase bei der Biosynthese von Östrogenen und die Rolle der Östrogene bei der Tumorentstehung, würde eine Reduktion des Hormons im Körper über eine Hemmung der Aromataseaktivität vor Brustkrebsentstehung schützen (Altundag und Ibrahim 2006). Zur Wirkung der verschiedenen Phytoöstrogene auf die Aromataseaktivität oder Genexpression gib es ebenfalls einige Studien.

Es wird behauptet, dass Phytoöstrogene wie Resveratrol die Aromataseaktivität kompetitiv und nicht kompetitiv in MC7-Brustkrebszellen (Wang et al. 2006) und in SK-BR-3-Brustkrebszellen (Mense et al. 2008) hemmen. Ye et al. (2009) und Myllymaki et al. (2005) demonstrierten, dass Phytoöstrogene wie Genistein die Aktivität von Aromatase in HepG2- Leberzellen (Ye et al. 2009) und in isolierten Ovarfollikeln (Myllymaki et al. 2005) steigern (Ye et al. 2009, Myllymaki et al. 2005).

Es gibt aber wenige Studien, die die Langzeitwirkung von Phytoöstrogenen bei der Expression von Steroidhormonenzymen untersuchen. In einer Studie wurde der Einfluss von verschiedenen Phytoöstrogenen entweder einzeln oder als Kombination auf die Expression und Aktivität von Aromatase in menschlichen Zellen verglichen. Es wurde behauptet, dass eine chronische diätetische Exposition sowie eine Gewebsakkumulation mit niedrig dosierten Gemischen aus Phytoöstrogenen eine bedeutende Rolle bei der Aktivität von Aromatase und somit die Synthese von Östrogenen haben (Rice et al. 2006).

1.12 Zielsetzung

Klimakterische Beschwerden können das Allgemeinbefinden von Frauen stark negativ beeinflussen. Die HRT, welche unumstritten die wirksamste Behandlung gegen klimakterische Beschwerden ist, stellt ein Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung dar. Die in letzter Zeit publizierten beiden Studien der „Women’s Health Initiative“ und die „One Million Women Study“ haben trotz mehrerer methodischer Studienmängel dazu geführt, dass die Indikation zu einer Hormonersatztherapie heute strenger als noch vor Jahren gestellt wird (Rossouw et al. 2002, Beral und Million Women Study Collaborators 2003).

In der Praxis stellt sich somit heute mehr denn je die Frage, ob nicht Phytoöstrogene in der Lage wären, Wechselbeschwerden auf „natürliche Weise“ zu reduzieren, ohne dabei einen proliferativen Effekt auf das Brustgewebe auszuüben.

Ziel dieser Arbeit ist es, im Brustgewebe der ovx Ratte, die als etabliertes Modell in der Forschung über die Postmenopause gilt, molekularbiologische Effekte (=Genexpression) der Pflanzenextrakte *Agnus castus*, *Belamcanda chinensis* und

Silybum marianum, des SERMs Raloxifen sowie 17β -Estradiol im Vergleich zur Kontrollgruppe auf die RNA-Expression nachzuweisen.

Untersucht werden folgende Gene: ER(α/β), Aro, PR, IGF-1 und VEGF. Es wurde neben der Genexpression auch untersucht, ob ein Unterschied entsteht, wenn man die Substanzen p. g. oder s. c. appliziert. Es sollte untersucht werden, ob von den getesteten Substanzen im Hinblick auf das Mammakarzinomrisiko negative Wirkungen ausgehen.

Darauf aufbauend war die Wirksamkeit und Sicherheit bei einem möglichen Einsatz der Testsubstanzen bei perimenopausalen Beschwerden als Therapeutika, ohne das Brustkrebsrisiko zu erhöhen, zu diskutieren.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere und Versuchsaufbau

Die Tierversuche standen unter der Aufsicht von Dr. Dana Seidlová-Wuttke und wurden von der Bezirksregierung Braunschweig genehmigt. (AZ: 509.42502/01-02.98).

Für die Organentnahme wurden 88 drei Monate alte weibliche Sprague-Dawley (SD)-Ratten mit einem Durchschnittsgewicht von 162 g verwendet. Die Tiere wurden in Käfigen unter standardisierten Bedingungen (23 ± 0.5 Grad Zimmertemperatur, Lichtperiode 7:00 bis 19:00 Uhr) mit Futter und Wasser ad libitum, jeweils sechs Tiere pro Käfig, gehalten. Nach der Gewöhnungsphase (7 Tage) waren die Tiere ovariectomiert (ovx) unter intraperitoneale Narkose mit Xylazin (Rompun® Fa. Bayer, Leverkusen) 2,5 mg/Tier, entspr. 10 mg/kg KGW und Ketamin (Hostaket®, Fa. Hoechst, Bad Soden) 11mg/Tier, entspr. 45 mg/kg KGW im Verhältnis 3:5.

Für schnelles Aufwachen der Tiere nach der ovx folgte die Gabe von Antisedan. 26 Tage später wurden dann 2 Tage morgens und abends und am 3. Tag nur morgens in gleicher Menge entweder per gavage (p. g.) über eine zuvor gelegte Magensonde oder mittels subcutaner Injektion (s. c.) mit einer Einmal-Injektionsnadel (BD Microlance™ 3) und 1 ml- Einmal-Spritze (BD Plastipak™) die u. g Substanzen (siehe Tabelle 1) appliziert und mit der Kontrollgruppe verglichen.

Die Testsubstanzen Estradiol, Raloxifen, Belamcanda chinensis, Silybum marianum und Agnus castus wurden von der Firma Bionorica® bereitgestellt. Nach diversen Studien gelten die gewählten Dosierungen (siehe Tabelle 1) als humanadaptiert, d. h. die Substanzen würden in gleicher Dosierung beim Menschen den gleichen Effekt auslösen.

Gruppe a (p.g.)	Gruppe b (s.c.)
1a. 17 β -Estradiol (1,75 μ g/ml)x2	1b. 17 β -Estradiol (1,75 μ g/ml)x2
2a. Belamcanda chinensis (30mg/ml)x2	2b. Belamcanda chinensis (30mg/ml)x2
3a. Silybum marianum (3mg/ml)x2	3b. Silybum marianum (3mg/ml)x2
4a. Agnus castus (30mg/ml)x2	4b. Agnus castus (30mg/ml)x2
5a. Raloxifen(1,5mg/ml)x2	5b. Raloxifen (1,5mg/ml)x2
6a. Kontrolle (Co) (0,5 %Carboxymethylcellulose)	6b. Kontrolle (0,5 %Carboxymethylcellulose)

Tabelle 1: Liste der zu applizierenden Substanzen und die jeweiligen Mengen

Die Applikation dauerte 2,5 Tage und am 3. Tag wurden die Tiere 6 Stunden nach der letzten Dosisgabe in Ethernarkose dekapitiert. Es wurde Dekapitationsblut für serologische Untersuchungen und eine große Anzahl von Organen entnommen. Für die vorliegende Arbeit wurde die Mammae beidseits sorgfältig freipräpariert und die Organe in flüssigem Stickstoff eingefroren.

2.2 Molekularbiologische Methoden

Die entnommenen Organe, sowie die später isolierte RNA, wurden bei -70°C aufbewahrt, während die bei der reversen Transkriptase gewonnene DNA bei -21°C gelagert wurde.

Bei der molekulargenetischen Aufarbeitung der Organe wurden immer ethanolgesäuberte Latexhandschuhe getragen. Alle Glasgefäße sind vorher bei 240°C für 12 Stunden sterilisiert worden. Sämtliche andere Materialien wurden 30 Minuten bei 121°C autoklaviert. Die Arbeitsgänge wurden ausschließlich mit sterilen, RNAsen-, ATP- und DNA-freien Pipettenspitzen und Combitips der Firmen Sarstedt (Nümbrecht) und Eppendorf (Hamburg) ausgeführt.

Die Arbeitsplätze waren semisteril; die PCR-Vorbereitung erfolgte an einer sterilen Werkbank (Firma Heraeus/Hanau), welche ausschließlich für prä-PCR Arbeitsschritte genutzt wurde.

Alle PCR-Reagenzien, sowie die RNA- und DNA-Proben wurden schnell nach dem Gebrauch wieder verschlossen und während der Verarbeitung auf Eis kühl gehalten.

2.3 Präparation der Gewebeproben

Die tiefgefrorenen Organe und die verwendeten Schüttelbehälter aus Teflon von der Firma Medconsult Haep wurden in Stickstoffbehältern oder auf Trockeneis gekühlt, um ein Auftauen des Gewebes während der Arbeitsschritte zu verhindern.

Zur Lysierung der Zellen wurde der RTL-Lysis-Buffer aus einem RNeasy®-Kit (Fa. Qiagen/Hilden) benutzt, dem zuvor noch β -Mercaptoethanol (Fa. Sigma/Deisenhofen) hinzugefügt werden musste. Die Organe wurden jeweils in einen Schüttelbehälter mit einer Mahlkugel aus Chromstahl gegeben und im Dismembrator (Fa. Braun/Melsungen) pulverisiert. Das Organpulver wurde anschließend in eine mit RTL-Lysispuffer gefüllte 24-Well-Gewebekulturplatte (Fa. NUNC/Roskilde/Dänemark) gefüllt und vor dem Einfrieren bei -70°C in einem Ultraschallbad (Fa. Branson/Danbury/USA) etwa 15 Sekunden durchmischt.

2.4 RNA-Isolierung

In verwendeten RNeasy®-Kit (Qiagen/Hilden) waren folgende Materialien enthalten:

- QIASchredder-Columns
- Rneasy Mini Spin Columns
- Collection Tubes (1,5 und 2 ml)
- RTL-Lysis-Buffer
- RW1-Wash-Buffer
- RPE-Wash-Buffer
- RNase-free Water.

Bei der Aufarbeitung der Organe wurde nach den Arbeitsanweisungen der Rneasy® Mini Handbook verfahren. Die Zentrifugation der Spin Columns erfolgte in einer Tischzentrifuge der Firma Hettich aus Tuttlingen. Nach mehreren Wasch- und Zentrifugationsvorgängen konnte die isolierte RNA in einem autoklavierten 0,5 ml Eppendorf-Cup eingefroren werde.

2.5 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA

Durch photometrische Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm kann die Qualität und Quantität der RNA bestimmt werden. Dabei gelten folgende Beziehungen für $d=1$ (Sambrook et al. 1989):

$$OD_{260} = 1 = 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Die Absorptionsmessung bei 280 nm dient der Feststellung des Reinheitsgrades der isolierten RNA. Der Quotient aus OD_{260}/OD_{280} liegt für eine reine RNA zwischen 1,8 und 2,0. Proben, die mit Fremdprotein kontaminiert sind, weisen einen niedrigeren Reinheitswert auf.

2.6 Reverse Transkription

Um eine PCR durchführen zu können, muss die isolierte mRNA zuvor in cDNA umgeschrieben werden. Diese Umwandlung wird durch das Enzym Reverse Transkriptase, eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, die aus dem Bakterium *Escherichia coli* gewonnen wird, katalysiert (Roth et al. 1985).

Zunächst wurde der photometrisch bestimmte RNA-Gehalt der Proben auf einen einheitlichen Wert eingestellt, um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten. Als Verdünnungsmedium wurde 0,1% Velcorinwasser (=Dimethylpyrocarbonat, Firma Bayer/Leverkusen) eingesetzt.

Für die Reverse Transkription wurden folgende Substanzen verwendet:

- M-MLV Reverse Transkriptase, RNase Hminus, Point Mutant (Promega/Madison/USA)
- M-MLV RT 5x Reaction Buffer aus : 50mM Tris-HCl (pH 8,3), 75mM KCl, 3mM MgCl₂ und 10mM DTT (Promega/Madison/USA)
- RNasin (Promega/Madison/USA)
- 10mM dNTP Mix: je 10mM dATP, dCTP, dGTP, und dTTP (GibcoBRL/Eggenheim) (Saiki et al. 1988).
- Random Primer mit einer Konzentration von 0,09 U/μl in 3mM Tris-HCl (pH 7,0) und 0,2 mM EDTA (GibcoBRL/Eggenheim)
- Velcorinwasser 0,1%

Die 60μl Reaktionsvolumen jeder Probe setzte sich aus den folgenden Komponenten zusammen:

- 30μl RNA
- + 9μl Velcorin Wasser
- + 3μl Random Primer (1:30 verdünnt).

Die Proben wurden gevortext und zentrifugiert, nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei Raumtemperatur wurde noch folgendes hinzugefügt:

- 12μl M-MLV RT 5x Reaction Buffer
- +3μl dNTP-Mix
- +3μl RT (20 Units/μl).

Pro 10 Ansätze wurden noch 3μl RNasin hinzugegeben, um eventuell vorhandene Rnase-Aktivität zu blockieren. Die gemischten Ansätze wurden in einen Termocycler (Fa. Perkin-Elmer/Langen) gesetzt, der nach folgendem Schema programmiert worden war:

- 10 Minuten bei 22°C zur Primeranlagerung an die RNA
- 50 Minuten bei 42°C, in dieser Phase erfolgte die cDNA-Synthese durch die reverse Transkriptase

- 10 Minuten bei 95°C um die Gegenstrangsynthese zu stoppen.

Anschließend wurden die Proben auf Eis heruntergekühlt und nach kurzer Zeit Zentrifugation bei -70°C eingefroren.

2.7 Quantitative Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion

PCR (Polymerase chain reaction) wurde 1984 von dem amerikanischen Chemiker Kary Banks Mullis (1990a/b) entwickelt. In der DNA-Analytik handelt es sich um eine sehr sensitive und schnelle Methode, bei der durch spezifische Primer-definierte enzymatische in vitro Replikation durch wiederholende Zyklen eine annähernd exponentielle Amplifikation der Zielsequenz erreicht wird. Mit Hilfe dieser Methodik kann man aus geringsten Mengen an genetischem Material größere Mengen an DNA gewinnen. Das genetische Material kann sowohl aus einzelsträngiger als auch aus doppelsträngiger DNA bestehen.

Will man statt DNA mRNA aus Zellen oder Geweben quantifizieren, gerät man in Schwierigkeiten. Zwar kann man eine Reverse Transkription durchführen und die gewünschte cDNA anschließend über einen externen oder internen Standard quantifizieren, doch liefert das nur eine Aussage über die Menge an cDNA im Ansatz, nicht aber über die Menge an mRNA im Ausgangsmaterial. Das Problem ist, dass die cDNA-Synthese höchst unterschiedlich verlaufen kann. Ihre Effizienz liegt üblicherweise zwischen 5% und 90%. Eine Quantifizierung liefert unter diesen Bedingungen nur einen Hinweis auf die Mindestmenge an mRNA im Ansatz, aber keinen absoluten Wert, weil man nichts über die Effizienz der cDNA-Synthese und die Integrität der cDNA weiß. Man kann die cDNA-Synthese zwar prinzipiell quantifizieren, aber meist nur mit recht großem Aufwand und nicht sonderlich genau (Mülhardt 2009).

Die PCR besteht aus 3 Schritten, die einen Zyklus bilden und sich wiederholen.

a. Denaturierung

Die zu amplifizierende Doppelstrang-DNA wird in einer Pufferlösung mit Oligonucleotid-Primern, Nucleosidphosphaten und einer hitzestabilen DNA-Taq-Polymerase etwa eine Minute bei 92-95°C denaturiert.

b. Annealing

In diesem Vorgang, der als Annealing (Anheften) bezeichnet wird, bindet die Oligonucleotidprimer (Amplimer) mit dem komplementären 5'-Ende an das 3'-Ende der denaturierten Matrizenstränge. Es wird dabei eine Temperatur von 37-65°C benötigt. Die genaue Annealingtemperatur hängt von der Hybridisierungstemperatur (T_m) der verwendeten Primerpaare ab.

c. Extension

Das aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isolierte Enzym Taq-Polymerase ist eine DNA-abhängige DNA-Polymerase und wird seit 1988 im PCR verwendet (Saiki et al. 1988).

Die Taq-Polymerase ist hitzestabil und synthetisiert mit einer sehr hohen Geschwindigkeit durch Verlängerung des Primers in 5´-3´-Richtung bei einer Temperatur von 72°C den DNA-Gegenstrang. Dabei werden komplementäre Nucleosidtriphosphate unter Abspaltung zweier Phosphatreste aneinander geknüpft. Die dabei benötigte Energie wird durch die Freisetzung der Phosphatreste frei.

Pro Zyklus wird die von den Primern eingerahmte DNA-Sequenz verdoppelt und im nächsten Zyklus als Matrizenstrang benutzt und amplifiziert. Die DNA-Stränge, die im ersten Zyklus entstehen, werden am 5´-Ende durch das Primer-Annealing begrenzt, jedoch am 3´-Ende unbegrenzt verlängert. Erst im zweiten Zyklus entstehen DNA-Moleküle, die genau den gewünschten Genabschnitt umfassen und an ihrem 3´- und 5´-Ende begrenzt sind. Werden die Zyklen mehrfach wiederholt, so ergibt sich eine exponentielle Zunahme der amplifizierenden DNA-Moleküle. In der Theorie ist die Amplifizierung mit dieser Methode außerordentlich effektiv. Theoretisch ist mit einer Amplifikationsrate von 10^6 nach 20 PCR-Zyklen zu rechnen. Da die tatsächliche Reaktionsausbeute aber durchschnittlich nur 85% beträgt, ist von einer Amplifikationsrate von 10^5 pro DNA-Matrize auszugehen.

Nach 25 bis 30 Zyklen sinkt die Effizienz der PCR rapide ab und der Konzentrationszuwachs der amplifizierenden DNA stagniert. Als Ursache lässt sich ein Verlust der Polymerase-Aktivität durch Denaturierungsprozesse, sowie eine Abnahme der Primerkonzentration im Reaktionsgefäß ausmachen. Die Matrizenstränge können zu einer Doppelstrang-DNA denaturieren und stehen so der Taq-Polymerase nicht mehr zur Amplifikation zur Verfügung.

Die PCR sollte aus folgenden Substanzen bestehen, um optimale Reaktionsbedingungen zu schaffen:

- 100µl Desoxynucleotide
- 10mM Tris-HCl mit einem pH von 8,3 bei Raumtemperatur
- 50mM KCl
- 40mM NaCl
- 1,5mM MgCl₂
- 0,01% Gelatine

Das pH-Optimum des Reaktionsansatzes liegt bei pH 8,8.

2.8 TaqMan™-PCR

Die PCR wurde bei dieser Arbeit mit dem ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System (PE. Applied Biosystems/Weiterstadt) durchgeführt. Dadurch wurde das Automatisierungsniveau der PCR erhöht. Dieses homogene Assay ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis des PCR-Produktes simultan in einem Gefäß.

Für den TaqMan™ benötigt man einen Universal PCR Master Mix (PE. Applied Biosystem/Branchburg/New Jersey/USA), der optimal eingestellte Pufferkomponenten besitzt. Folgende Substanzen sind in dem Master Mix enthalten:

- Uracil N-Glykosylase (AmpErase™ UNG)
- AmpliTaq Gold DNA Polymerase
- Deoxynukleotidtriphosphat (dNTP)
- ein passiver Referenzfarbstoff (ROX).

Die AmpErase UNG (Uracil N-Glykosylase) wird zum Schutz vor Carryover Kontamination eingesetzt. Vorher ist der PCR eine 2-minütige Inkubation bei 50°C vorzuschalten, gefolgt von einer 10-minütigen Inkubation bei 95°C, um zum einen die durch UNG verdauten Carryover-Moleküle zu zerstören und zum anderen UNG selbst zu inaktivieren.

AmpliTaq Gold ist eine modifizierte Form der rekombinanten AmpliTaq DNA Polymerase. Dieses Enzym ist zuerst inaktiv und wird erst durch eine 9-12 minütige Inkubation bei 95°C irreversibel aktiviert. In der aktiven Form entsprechen die Eigenschaften und Leistungsdaten denen der AmpliTaq DNA Polymerase. Ein anderer Vorteil der AmpliTaq Gold ist, dass ohne vorherige Aktivierung komplette Master-Mixe ohne Gefahr von Primer-Dimer-Bildung vorpipettiert werden können. Solche Master-Mixe können mehrere Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert werden. Mit dem ROX, die dem Master-Mix zugesetzt werden, werden störende Fluktuationen der Fluoreszenz ausgeglichen.

Es wurden 21µl Master-Mix mit Sonde und Primern mit 4µl Proben-DNA vermischt, so dass das Reaktionsvolumen in der Biosphere® Multiply PCR 96-Well Platte je 25µl erreichte. Die Menge und Molarität der zugefügten Primern und Sonden variierte in Abhängigkeit von der nachzuweisenden Gegensequenz.

Die speziell für die Fluoreszenzanalyse entwickelten Mikrotiterplatten wurden mit geschliffenen optischen Biosphere® PCR-Deckeln (Sarstedt/Nümbrecht) verschlossen.

Die TaqMan-PCR wurde als 2-Schritt-PCR mit 40 Zyklen mit einer DNA-Denaturierungstemperatur von 95°C für 15 Sekunden, sowie einem einminütigen kombinierten Annealing- und Extensionsschritt bei 60°C durchgeführt. Der zweite und dritte PCR-Schritt konnte zusammengefasst werden, da die AmpliTaq Gold Polymerase schon bei Temperaturen ab 55°C eine signifikante Aktivität besitzt. Die 2-Schritt-PCR liefert aufgrund der höheren Annealing-Temperaturen spezifischere Ergebnisse und hat einen positiven Einfluss auf die Bindung der Sonde an die Template-DNA.

2.9 Auswahl der Primer und TaqMan™-Sonden

Für TaqMan™ PCR wird eine spezielle fluorogene Sonde (TaqMan™-Fluorogenic-Sonden von Perkin-Elmer/Langen) eingesetzt, die aus einem Oligonucleotid besteht, dessen 5'-Ende mit einem fluoreszenten Reporter-Farbstoff (fluoreszein-Derivat) markiert ist, während das 3'-Ende einen Quencher-Farbstoff (Rhodamin-Derivat) trägt und außerdem mit einem Phosphat blockiert ist. Um eine optimale TaqMan™-Sonde auszuwählen, müssen einige Faktoren berücksichtigt werden.

Das 5'-Ende der TaqMan™-Sonde sollte idealerweise relativ nahe beim 3'-Ende des PCR-Primers liegen und kein G als Endonukleinsäure enthalten. Es sollte nie mehr als 3x dieselbe Base hintereinander vorkommen. Am besten sollte die Sonde einen CG-Gehalt von 40-60% und eine Länge von 20 bis 30 Basen besitzen.

Der Quencher soll am 3'-Ende positioniert werden. Die Sonde sollte nicht komplementär zu der PCR-Primer sein und keine auffälligen Sekundärstrukturen und Polynukleotide im Zielbereich aufweisen, damit keine Fehlhybridisierungen entstehen.

Die Hybridisierungstemperatur der Sonde sollte um ca. 5-10°C über der Primer-Hybridisierungstemperatur liegen (PE Applied Biosystems).

Bei intakter Sondenstruktur bewirkt der Quencher eine Suppression der Reporterfluoreszenz. Diese Fluoreszenzunterdrückung beruht vorwiegend auf dem Förster-Energie-Transfer (Lakowicz 1983).

Während der Gegenstrangsynthese wird die Sonde mit Hilfe der Taq-Polymerase zwischen dem Reporter- und dem Quencher-Farbstoff hydrolysiert, da die Taq-Polymerase eine Exonucleaseaktivität besitzt. Die Abspaltung der Sonde bewirkt eine Fluoreszenzzunahme des Reporters, was vom ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System registriert wird. (PE Applied Biosystems)

Die PCR-Primer sollen 18-30 Basenpaare lang sein, der C/G-Gehalt der Primer sollte zwischen 20-80% liegen. Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, sind Primer auszuwählen, die keine Poly(T)-Bereiche und keine palindromischen Sequenzabschnitte besitzen. Die Sequenz der Template-DNA an ihrem 3'-Ende und 5'-Ende sollte weitgehend bekannt sein, damit die beiden Primer (sense/antisense) die zu amplifizierende Gegensequenz einschließen. Die Primer sollten an ihren 3'-Enden weder inter- noch intramolekular komplementär sein, um unspezifische Hybridisierungen und Primer/Dimer-Artefakte zu verhindern.

Es wurden folgende PCR-Primerpaare und Taqman-Sonden für diese Arbeit verwendet:

- **Rat Estrogen Receptor alpha (ER α):**

sense-Primer: 5'-AAG CTG GCC TGA CTC TGC AG-3'

antisense-Primer: 5'-GCA GGT CAT AGA GAG GCA CGA-3'

Primerkonzentration: sense 50nM/ antisense 900nM

Sonde: 5'-FAM-CGT CTG GCC CAG CTC CTC CTC ATC-
TAMRA3'

Sondenkonzentration: 225nM

(Spreafico et al. 1992)

- **Rat Estrogen Receptor beta (ER β):**

sense-Primer: 5'-GAG GAG ATA CCA CTC TTC GCA ATC-3'

antisense-Primer: 5'-GGA GTA TCT CTG TGT GAA GGC CAT-3'

Primerkonzentration: sense und antisense je 300nM

Sonde: 5'-FAM-CAG GGC ATC TGT CAC CGC GTT CAG-
TAMRA3'

Sondenkonzentration: 225nM

(Kuiper et al. 1996)

- **Rat Progesterone Receptor (PR):**

sense-Primer: 5'-CTG GTT CCG CCA CTC ATC AA-3'

antisense-Primer: 5'-TCA GGC TCA TCC AGG AGT ACT GA-3'

Primerkonzentration: sense und antisense je 300nM

Sonde: 5'-FAM-CCG ACA CTT CCA GCT CTT TGC TGA CCA-
TAMRA3'

Sondenkonzentration: 225nM

(Park-Sarge und Mayo 1994)

- **Rat IGF-1:**

sense-Primer: 5'-TGT CGT CTT CAC ATC TCT TCT ACC TG-3'

anti-sense-Primer: 5'-CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCG T-3'

Primerkonzentration: sense und antisense je 300nM

Sonde: 5'FAM-TTA CCA GCT CGG CCA CAG CCG GAC-
TAMRA-3'

Sondenkonzentration: 225nM

(Schoenfeld et al. 1998)

- **Rat VEGF:**

sense-Primer: 5'-GGG AGC AGA AAG CCC ATG A-3'

antisense-Primer: 5'-GCT TGAAGA TAT ACT CTA TCT CAT CGG G-3'

Primerkonzentration: sense und antisense je 900nM

Sonde: 5'FAM-TCA CAG CGC AGC TAT TGC CGT CCA ATT G-
TAMRA-3'

Sondenkonzentration: 225nM

(Schoenfeld et al. 1998, Conn et al. 1990)

- **Rat Aromatase (Aro):**

sense-Primer: 5'-TGA CCA ATG AAT CGG GCT ATG TG-3'

antisense-Primer: 5'-GAT CCT CAA GAA GAG CGT GTT AGA-3'

Primerkonzentration: sense und antisense je 300nM

Sonde: 6-FAM- 5'ACC CTT CTG CGT CGT GTC ATG CTG GA-3'-
TAMRA

Sondenkonzentration: 200nM

(Ju et al. 2008)

2.10 ABI PRISM™ 7700 Sequence Detection System

Durch die Abspaltung der sequenzspezifischen Sonde zwischen dem Reporter und Quencher kommt es zu einer Fluoreszenzzunahme des Reporter-Farbstoffes. Die Taq-Polymerase, die über Exonukleaseaktivität verfügt, ermöglicht die Hydrolyse der Sonde. Mit Hilfe eines passiven Referenzfarbstoffes, der dem Reaktionspuffer zugesetzt wird, werden unspezifische Einflüsse wie Voluminaschwankungen durch Pipettierfehler ausgeglichen. Die Veränderung der Fluoreszenzen der verschiedenen Farbstoffe wird vom ABI PRISM™ 7700 SDS Zyklus für Zyklus registriert.

Um eine Echtzeit-Analyse der bis zu 96 Proben eines Laufes zu ermöglichen, befindet sich im Heizdeckel des Gerätes über jeder Thermocycler-Position eine optische Linse, die den Lichtstrahl in das jeweilige Reaktionsgefäß leitet.

Mit Hilfe eines Argonlasers (488nm), dessen Strahl über einen dichroiden Spiegel zunächst auf einen Multiplexer (MUX) gelenkt wird, wird die Fluoreszenz-Emission angeregt. Der MUX ist über 96 Lichtleiter mit dem optischen Heizdeckel des Thermocyclers verbunden, wobei diese jeweils über einer der 96 Linsen enden, dadurch wird der Laserstrahl auf sie einzelnen Positionen verteilt. Von der Linse fokussiert, dringt der Strahl in das geschlossene Reaktionsgefäß ein, regt dort die Fluoreszenzemission an, welche den Cyclus über jeweils denselben optischen Leiter wieder verlässt.

Die Emissionsstrahlen, die eine andere Wellenlänge als der Laserstrahl besitzt, wird an dichroiden Spiegel reflektiert, über eine neue Linse erneut fokussiert und auf einen Spektrographen geleitet. Mittels einer CCD-Kamera werden alle 7 Sekunden die Emissionsdaten von 500-660 nm gesammelt und in ein digitales Signal umgewandelt. (PE Applied Biosystems)

2.11 Statistische Auswertung

Alle Messwerte der Versuchsgruppen wurden prozentrelativiert. Die Gesamtheit der Ergebnisse der Kontrolltiere wurde als 100% definiert und die Abweichungen der mit 5 verschiedenen Substanzen behandelten Tiere dazu in Relation gesetzt. Für jede Versuchsgruppe wurden der arithmetische Mittelwert und die Standardabweichung oder Standarderror berechnet. Die Werte für die Statistik wurden mit dem Computerprogramm Graph Pad Prism4® berechnet.

Die Signifikanz wurde mit einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem multiplen T-Test nach Dunnett ermittelt. Hierbei wurden die einzelnen Gruppen mit der Kontrollgruppe verglichen. Zudem wur-

de zum Vergleich der Einzelgruppen miteinander ein T-Test für ungepaarte Stichproben durchgeführt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Genexpression von ER α

Nach fünfmaliger s. c. und p. g. Applikation der Testsubstanzen bewirken E2 s. c. und Ral s. c. in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe eine signifikant reduzierende Wirkung auf die Genexpression von ER α . BC s. c. wirkt ebenfalls reduzierend, jedoch insignifikant. E2 p. g., MD s. c./ p. g., AC s. c./p. g., BC p. g. und Ral p. g. lösen einen insignifikanten Anstieg der Genexpression aus (Abb. 2).

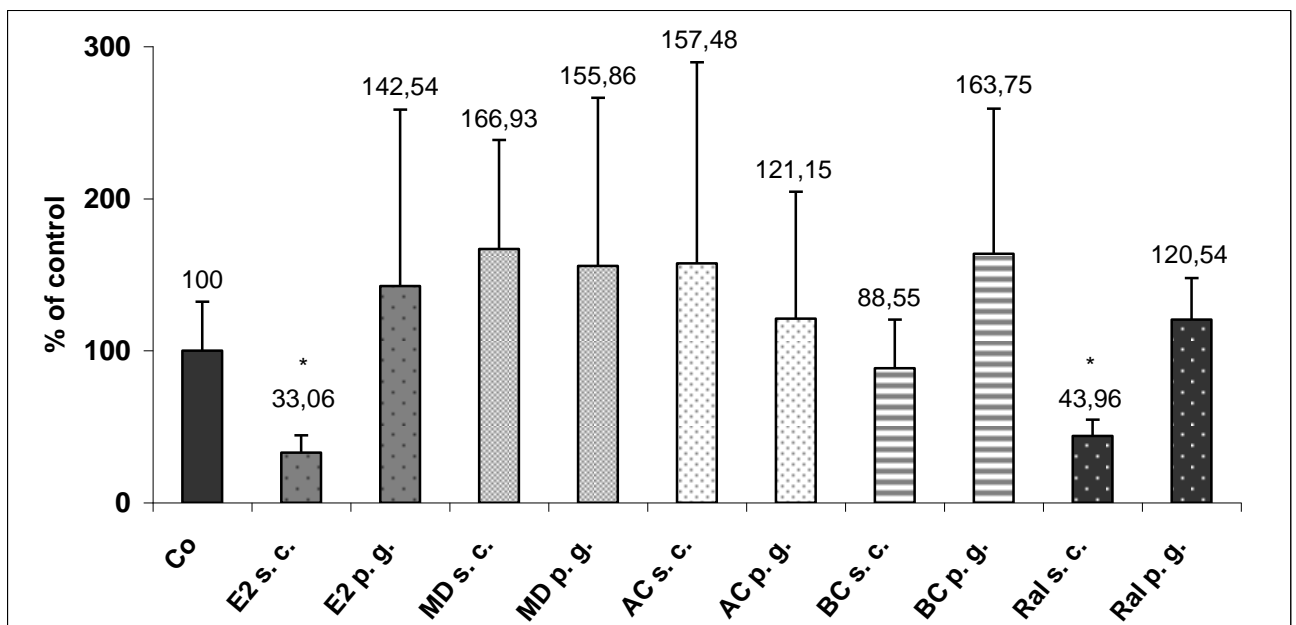


Abbildung 2: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von ER α im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.2 Genexpression von ER β

Nach fünfmaliger s. c. und p. g. Applikation der Testsubstanzen ergibt sich für keine der Testsubstanzen ein signifikanter Anstieg der Genexpression von ER β in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe.

Ein T-Test war für E2 s. c., BC s. c. und Raloxifen p. g. aufgrund nicht verwertbarer Daten nicht durchführbar (Abb. 3).

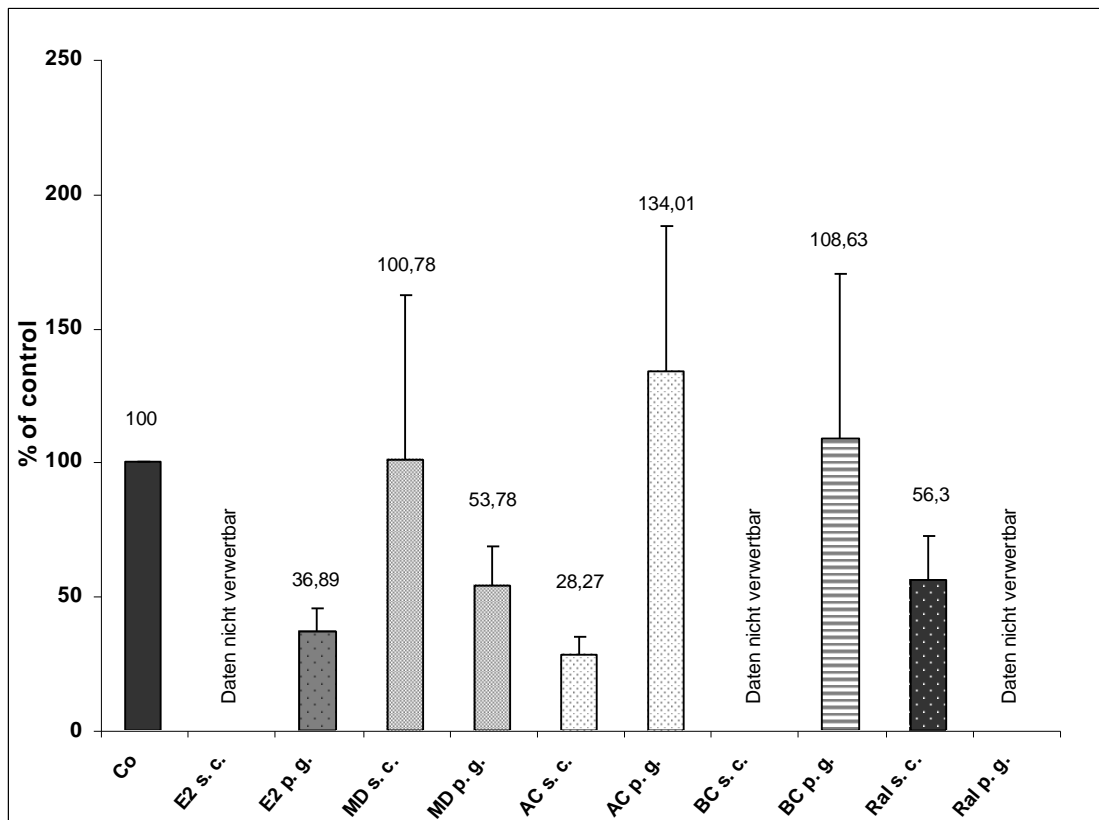


Abbildung 3: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von ER β im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.3 Genexpression von PR

Nach fünfmaliger s. c. und p. g. Applikation der Testsubstanzen außer E2 s. c. weist keine der Testsubstanzen einen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von PR in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe auf. Nur E2 s. c. erhöht die Genexpression von PR um mehr als das Zweifache im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb. 4).

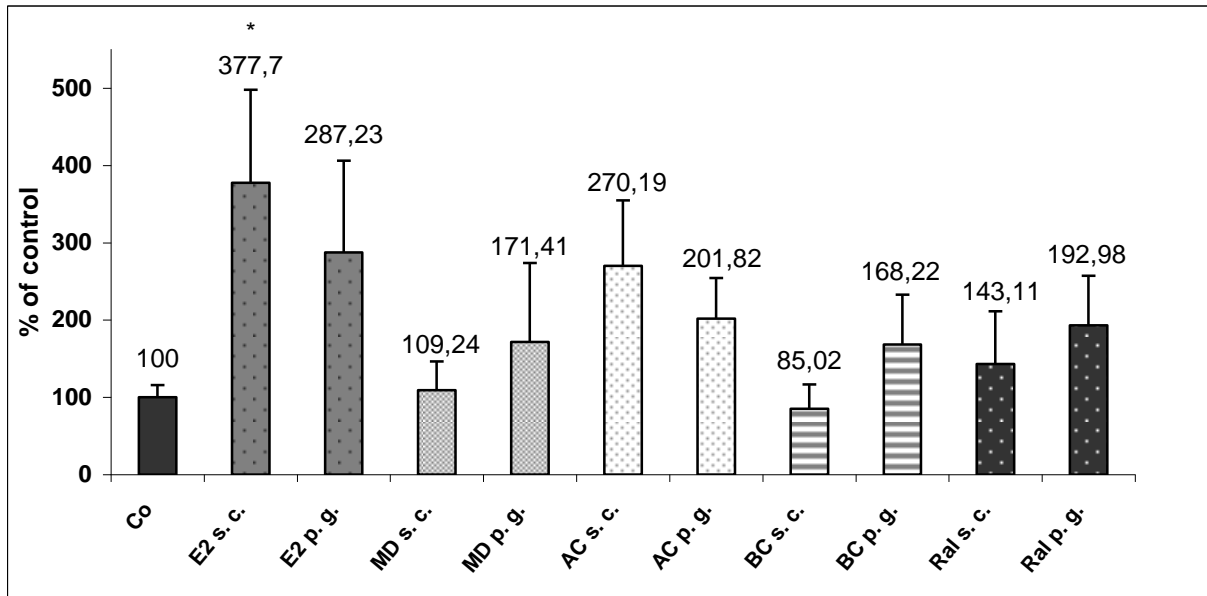


Abbildung 4: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von PR im Mammage-
webe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.4 Genexpression von IGF-1

Nach fünfmaliger s. c. und p. g. Applikation der Testsubstanzen kommt es bei keinem der Testsubstanzen zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression von IGF-1 in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe.

Bis auf MD s. c., AC p. g., und BC p. g. bewirken alle Substanzen einen Abfall der Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe (Abb. 5).

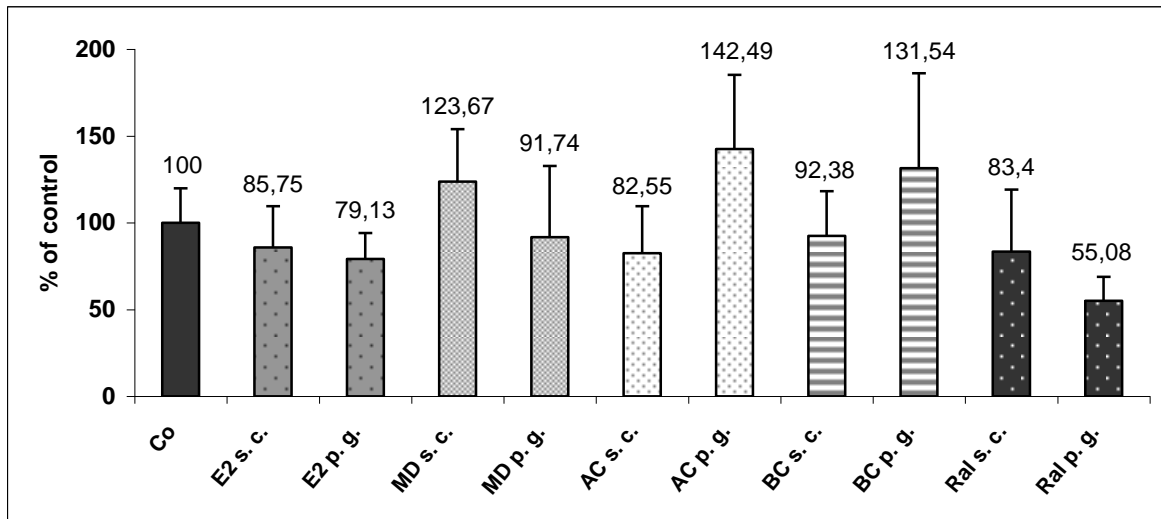


Abbildung 5: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von IGF-1 im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.5 Genexpression von VEGF

Nach fünfmaliger Applikation der Testsubstanzen kommt es bei E2 s. c./p. g., BC s. c. und Ral s.c./p. g. zu einem signifikanten Abfall der Genexpression von VEGF in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe.

Außer MD s. c. wirken auch die anderen Substanzen in unterschiedlichem Maße reduzierend auf die Genexpression von VEGF, jedoch insignifikant (Abb. 6).

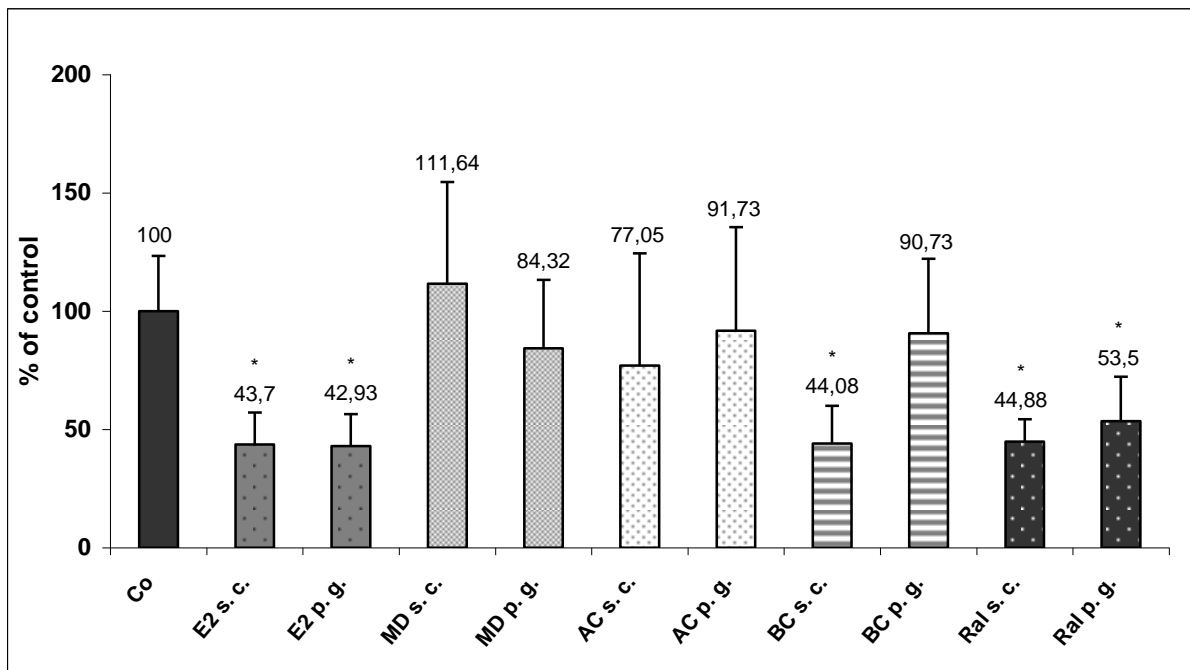


Abbildung 6: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von VEGF im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.6 Genexpression von Aromatase

Nach fünfmaliger s. c. und p. g. Applikation der Testsubstanzen zeigen E2 p. g., AC s. c. und BC p. g. einen signifikanten Anstieg der Genexpression von Aromatase in der Brustdrüse gegenüber der Kontrollgruppe.

Alle anderen Substanzen weisen keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von Aromatase auf (Abb. 7).

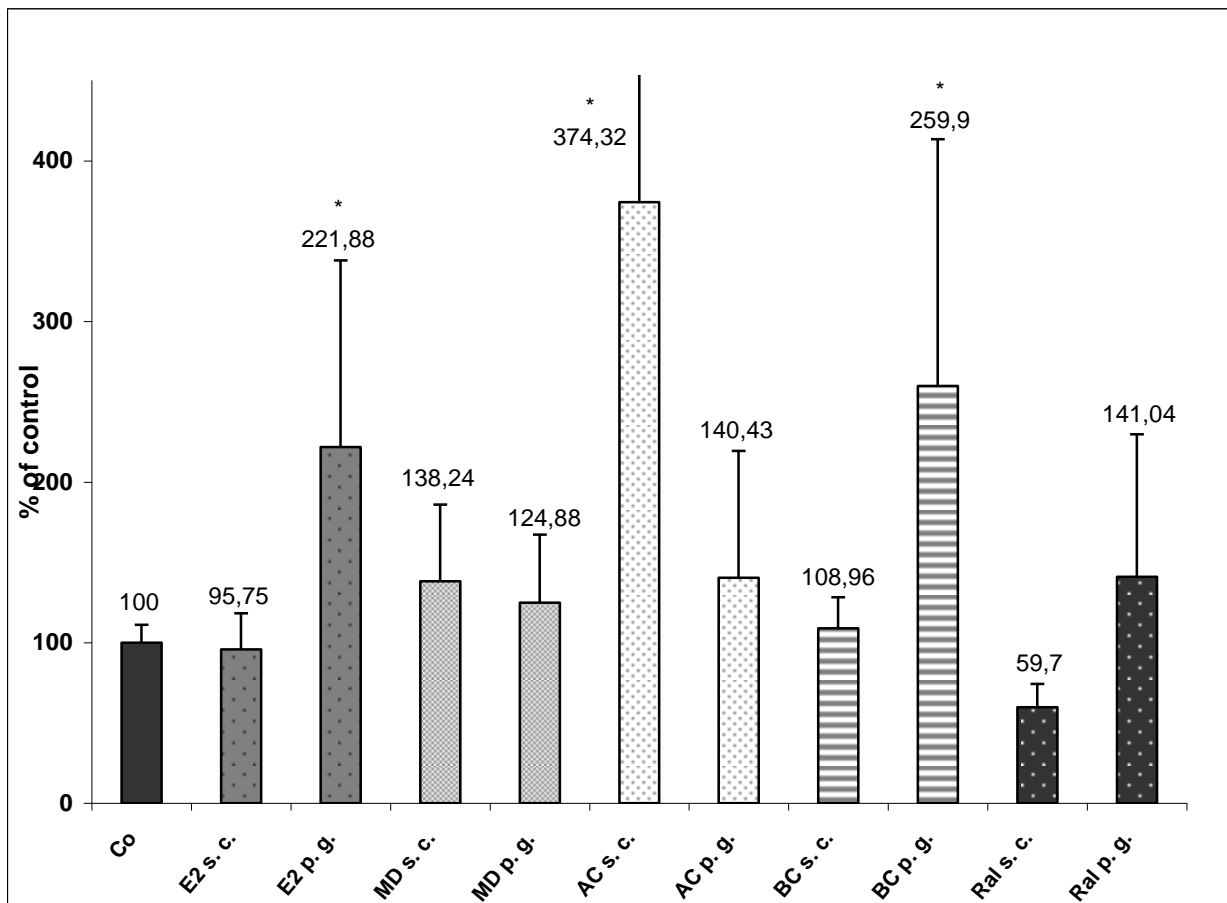


Abbildung 7: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von Aromatase im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.7 Zusammenfassung der Ergebnisse s. c. versus p. g.

3.7.1 Genexpression von ER α , ER β , PR, IGF-1, VEGF und Aromatase nach s. c. Applikation von E2, MD, AC, BC und Raloxifen

Untersuchte Substanzen (% derCo) Gen- expression	Co	E2	MD	AC	BC	Ral
ERα	100	33,06 *	166,93	157,48	88,55	43,96 *
ERβ	100	Daten nicht verwertbar	100,78	28,27	Daten nicht verwertbar	56,3
PR	100	377,7 *	109,24	270,19	85,02	143,11
IGF-1	100	85,75	123,67	82,55	92,38	83,4
VEGF	100	43,7 *	111,64	77,05	44,08 *	44,88 *
Aro	100	95,75	138,24	374,32 *	108,96	59,7

Tabelle 2: Einfluss der getesteten Substanzen auf die Genexpression im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

3.7.2 Genexpression von ER α , ER β , PR, IGF-1, VEGF und Aromatase nach p. g. Applikation von E2, MD, AC, BC und Raloxifen

Untersuchte Substanzen (% derCo) Gen- expression	Co	E2	MD	AC	BC	Ral
ERα	100	142,54	155,86	121,15	163,75	120,54
ERβ	100	36,89	53,78	134,01	108,63	Daten nicht verwertbar
PR	100	287,23	171,41	201,82	168,22	192,98
IGF-1	100	73,13	91,74	142,49	131,54	55,08
VEGF	100	42,93 *	84,32	91,73	90,73	53,5 *
Aro	100	221,88 *	124,88	140,43	259,9 *	141,04

Tabelle 3: Einfluss der getesteten Substanzen auf die Genexpression im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger p. g. Applikation über 2,5 Tage

* signifikant versus Kontrolle im multiplen T-Test nach Dunnett

4 Diskussion

Die hier vorgelegten Untersuchungen wurden an Brustgewebe von drei Monate alten ovx Ratten durchgeführt. Nachdem 2,5 Tage E2, die beschriebenen Pflanzenextrakte und Raloxifen entweder p. g. oder s. c. appliziert wurden, wurden die Tiere sechs Stunden nach der letzten Dosisgabe dekapitiert und die Organe entnommen.

Anhand der Untersuchungen mit den Verbindungen und deren Extrakten im Mammagewebe der ovx Ratte soll festgestellt werden, inwieweit die Substanzen positive oder negative Auswirkungen im Hinblick auf das Mammakarzinomrisiko zeigen. Zusätzlich wird ein Beitrag zur Aufklärung ihrer molekularen Mechanismen in Bezug auf die Beeinflussung von Zellfunktionen gewährleistet.

Die Behandlung mit E2 diente in allen Experimenten als Positivkontrolle für östrogene Effekte. Die gleichzeitige Behandlung mit Raloxifen diente dem Nachweis eines ER-abhängigen Wirkmechanismus, da dieser durch Raloxifen blockiert wird.

Bei der Auswertung der molekularbiologischen Ergebnisse muss erwähnt werden, dass die Rattenmamma aufgrund ihrer geringen Größe und der schwer zu markierenden Grenze zu Nachbargeweben ein schwieriges Untersuchungsorgan zur Bearbeitung mit der extrem sensiblen Methodik der PCR ist.

Die tiefgefrorenen Mammapräparate waren unterschiedlich groß, hatten unterschiedliche Konsistenz und beinhalteten unterschiedlich große Mengen von zusätzlichem Gewebe. Genau genommen handelt es sich bei den Präparaten um eine komplexe Gewebemischung aus Mammagewebe, Fettgewebe, Gefäßen, Hautanhangsdrüsen, Muskelgewebe und Haaren.

Zudem ist allgemein die mRNA-Bestimmung bei der quantitativen Reverse-Transkriptase-PCR schwierig (s. Material und Methoden). Hierdurch könnte man die großen Standardabweichungen der Genexpression erklären.

4.1 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER α in der Mamma

In der vorliegenden Arbeit wurde die Expression von ER α in der Mamma unter E2 und Raloxifen s. c. im Vergleich zur Kontrolle signifikant reduziert. Die BC-s. c.-Tiere zeigten ebenfalls eine Reduktion der ER α -Expression, jedoch nicht signifikant. Es lagen sehr starke Schwankungsbreiten in den Ergebnissen vor.

Die Bedeutung des ER α ist in der Literatur sehr vielseitig beschrieben. Die genauen lokalen Effekte sind jedoch noch größtenteils unerforscht geblieben. Wie schon beschrieben, zeigen die Mamdrüsen der α ERKO-Mäuse eine normale pränatale und präpubertäre Entwicklung. Nach der Pubertät bleiben sie rudimentär, während die epithelialen Verzweigungen und die lobuloalveolären Entwicklungen fehlen. Anders als die unterentwickelten α ERKO-Brustdrüsen, zeigen die β ERKO-Mäuse eine normale duktale Struktur mit normalem Fettgewebe. Nach der Schwangerschaft kommt es zur normalen Differenzierung der β ERKO-Milchdrüsen mit notwendigen lobuloalveolären Strukturen für die Laktation. Die Brustdrüse der erwachsenen α/β ERKO-Mäuse ähnelt der der α ERKO-Mäuse.

Dies erlaubt die Aussage, dass ER α für die Wirkung von E2 im Mammagewebe von entscheidender Bedeutung ist (Walker und Korach 2004).

Eine Aussage über die Bedeutung der Änderungen in der Genexpression ist schwierig zu treffen. Laut Speirs (2002) lässt sich erstens aus einer erhöhten Expression aufgrund vieler posttranskriptioneller Regulationsmechanismen nicht zwangsläufig auf eine Änderung in der Rezeptorproteinkonzentration schließen. Zweitens lässt sich aus erhöhter Proteinkonzentration nicht direkt die entsprechende Funktion oder Aktivität des Rezeptors ableiten (Review Speirs 2002).

Es gibt zunehmend Beweise, dass E2 und IGF-1 über komplexe Mechanismen die Zellproliferation des normalen Brustepithels stimulieren und somit das Risiko für die Brustkrebsentstehung erhöhen. Diese noch nicht ganz verstandenen Interaktionen legen nahe, dass E2 über ER α die IGF-1- und IGF-1-Rezeptor-Expression reguliert und so das normale Mammawachstum beeinflusst (Martin und Stoica 2002).

Martin und Stoica (2002) wollten untersuchen, inwiefern IGF-1 die ER α -Expression und -Aktivität in Mamakarzinomzellen reguliert. Sie haben festgestellt, dass IGF-1 in MCF-7 Zellen die ER α -mRNA-Expression reduzierten, in dem die Transkription des ER α -Promotors blockiert wurde. Sie konnten ebenfalls zeigen, dass die ER α -Proteinkonzentration und E2-Bindungsstellen im Rezeptor abnahmen. Es gab keinen Effekt auf die Bindungsaffinität des Rezeptors für E2. Im Gegensatz zu der reduzierten ER α -Expression durch IGF-1 führte dies zur Induktion von zwei E2-regulierten Genen, nämlich PR und pS2 (Martin & Stoica 2002).

Es wurde festgestellt, dass im normalen Mammawachstum durch Östrogene die ER α -Expression downreguliert wird. Entsprechend führt eine östrogenarme Umgebung, wie sie in der Postmenopause vorkommt, zur ER α -Up-Regulation, was die Östrogenempfindlichkeit erhöht, ohne einen direkten Einfluss auf proliferierende Zellen zu haben (Fendrick et al. 1998).

ER α -positive Zellen sind nur extrem selten Ki-67-positiv, d.h. zur Proliferation fähig. Sie sind eher als Regulatoren des Wachstums benachbarter ER-negativer Mamme-pithelien zu werten. Nach Tumorentstehung kann durch Dysregulation ER α vermehrt exprimiert werden, und so können Östrogene einen proliferationserhöhenden Effekt ausüben (Palmieri et al. 2002).

Entsprechend der einschlägigen Literatur kommt es unter E2 zu einer signifikanten Downregulation der ER α -Expression, allerdings wenn E2 s. c. appliziert wird. Für E2 p. g. könnte es folgende Erklärung geben: Die p. g. Applikation mit der anschließenden Aufnahme des E2 über die Magen- und Darmschleimhaut in die Blutbahn hat den Nachteil, dass der Wirkstoff grundsätzlich auf dem Weg in den großen Kreislauf erst die Leber passieren muss (*First-pass*-Effekt). So hat E2 aufgrund der hohen *First-pass*-Metabolisierung eine Bioverfügbarkeit von 5% (AWMF Leitlinie Nr. 015062/Okttober 2010).

Bei der subcutanen Applikation, die eine parenterale Verabreichungsform darstellt, wird der *First-pass*-Effekt umgangen. Hierdurch wird eine höhere Bioverfügbarkeit erreicht. Daher zeigen die E2-s. c.-Tiere eine signifikante ER α -Downregulation.

SM hat in diesem vorliegenden Experiment keinen Effekt auf die ER α -Expression. Wie schon in der Einleitung beschrieben, wirkt SM ausschließlich über ER β (Seidlová-Wuttke et al. 2003a), und ER β hat in östrogenarmer Umwelt eher einen ER α -inhibitorisch- modulierenden Effekt (Hall and McDonnell 1999, Weihua et al. 2000). Daher war als Ergebnis, ein nicht signifikanter Effekt, zu erwarten.

Über Vitex agnus castus, die gegen Wechseljahresbeschwerden eingesetzt wird, gibt es die Hypothese, dass sie bei einer längeren Anwendung vor dem Auftreten eines invasiven Brustkrebses in der Postmenopause schützen könnte (Obi et al. 2009). Die AC-Tiere zeigen in dieser Arbeit keinen signifikanten Effekt auf die ER α -Expression.

BC-Inhaltsstoffen wurden in der Literatur zwar ER α - und - β -Bindungsfähigkeiten nachgesagt, Seidlová-Wuttke et al. (2004) konnten in einer Studie beweisen, dass Tectorigenin, ein isoliertes Isoflavon aus BC, keine mammotrophe Wirkung aufweist (Seidlová-Wuttke et al. 2004). Dies wird in dieser vorliegenden Arbeit, zumindest was die ER α -Expression betrifft, bestätigt.

ER stellt den Angriffspunkt für Raloxifen dar. Die Substanz bindet mit hoher Affinität an beide Rezeptorsubtypen (α , β) und wirkt in erster Linie als Antagonist, das heißt, die endogenen Östrogenwirkungen werden blockiert. Im Tierversuch erzeugt die Zugabe von Raloxifen eine Hormonmangel-Symptomatik, bei postmenopausalen Frauen kann es Wechseljahresbeschwerden verstärken. Darüber hinaus wirkt Raloxifen aber auch als partieller Agonist. In Abwesenheit von Östrogenen vermag Raloxifen den ER zu

aktivieren, wenn auch nur schwach (etwa 10 % der Maximalaktivierung durch E2). Diese Wirkung äußert sich aber nur in einigen Geweben.

Raloxifen wird nach oraler Anwendung rasch resorbiert. Durch eine ausgeprägte prä-systemische Glukuronidierung beträgt die absolute Bioverfügbarkeit 2%. Die hohe Clearance der Substanz ist auf eine extrem effiziente Konjugation des Raloxifenmoleküls in der Leber zurückzuführen (Fahrleitner-Pammer 2007).

Die subcutane Gabe, die eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt, führt entgegen der einschlägigen Literatur zu einer signifikanten Reduktion der ER α -Expression. Die per gavage Gabe hat keinen signifikanten Effekt auf ER α -Expression. Dies steht im Einklang mit vorherigen Veröffentlichungen (Glaeser et al. 2006). Die signifikante Reduktion der ER α durch Raloxifen s. c. wäre im Hinblick auf die Mammakarzinomentstehung durch die proliferative Wirkung des ER α wünschenswert.

Zusammenfassend könnte man sagen, dass die fehlende signifikante Änderung der ER α -Expression durch die getesteten Pflanzenextrakte im Hinblick auf die Brustkrebsentstehung erwünscht wäre, denn wie bereits erwähnt, wird die Anwesenheit von ER α mit proliferativen Effekten von Östrogenen im Zusammenhang gebracht (Chang et al. 2009).

Die Erforschung der Auswirkung von getesteten Pflanzenextrakten auf die ER α -Expression und somit auf das Proliferationsverhalten von Brustgewebe ist insofern von entscheidender Bedeutung, da eine erhöhte Proliferationsrate der Zellen unter bestimmten Umständen im weiteren Verlauf zu einer malignen Entartung des Brustgewebes führen kann.

4.2 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von ER β in der Mamma

In der Literatur wird dem ER β eine antiproliferative, tumorsuppressive und vor allem unter niedrigen Östrogenumgebungskonzentrationen eine ER α hemmend modulierende Wirkung nachgesagt (Hall and McDonnell 1999, Weihua et al. 2000, Saji et al. 2000).

In einem In-vitro-Ansatz konnten Ström et al. (2004) komplementär an der Brustkrebszelllinie-T47D erforschen, dass die Überexpression von ER β die Östrogen-vermittelte Aktivierung des Zellzyklus hemmt. Damit ist der ER β ein geeigneter Angriffspunkt für therapeutische Brustkrebsprävention und -therapie durch ER β -selektive SERM (Ström et al. 2004).

Nach Speirs (2002) sei viel Verwirrung über die Funktion des ER β durch Interpretationen von ER β -mRNA-Überexpression in Tumoren im Zusammenhang mit maligneren Indikatoren entstanden. Eine mRNA-Überexpression sei mit einer vermehrten Translation in aktives Protein gleichgesetzt worden, was sich in entsprechenden immunhistologischen Untersuchungen nicht nachweisen lässt. Mit der Immunhistologie habe sich das ER β -Vorkommen als ein guter prognostischer Marker ergeben. Aus dieser Diskrepanz von mRNA- und Proteinexpression lässt sich auf eine große Rolle der posttranskriptionellen und -translationalen Modulationen in der ER β -Wirkung schließen (Speirs 2002). Auch Smith und Huges (2008) unterstreichen die bedeutende Rolle der posttranskriptionellen Regulationen in Bezug auf die ER β -Proteinexpression und der daraus folgenden Rezeptoraktivität (Smith und Hughes 2008). Damit wäre die Aussagekraft einer ER β -mRNA-Expression in den Mammae bezüglich der endgültigen ER β -Aktivität der verschiedenen Behandlungsgruppen schwierig. Bei der Bewertung der vorliegenden Ergebnisse war auffällig, dass bei E2-s. c.-, BC-s. c.- und Raloxifen-p. g.-Tieren in der Rattenmamma keine ER β -mRNA der mit der Sonde detektierbaren Sequenz vorhanden war.

In diesem Zusammenhang muss bedacht werden, dass Palmieri et al. (2002) erwähnen, dass sich zwar in Untersuchungen der Rattenmammae ein hohes Vorkommen von ER β gezeigt habe, ER β jedoch in wesentlichen Mengen als ER β Splice-Variante mit verminderter Affinität zu Östrogenen vorkommt (Palmieri et al. 2002). Ebenso wird in der Übersicht über die Östrogenrezeptoren der *International Union of Pharmacology* (Dahlmann-Wright et al. 2006) das häufige Vorkommen von verschiedenen ER α - sowie ER β -Splice-Varianten auf Protein- und m-RNA-Ebene in Ratten erwähnt. Dies könnte für diesen Versuch bedeuten, dass bei E2-s. c.-, BC-s. c.- und Raloxifen-p. g.-Tieren ER β als Splice-Variante zwar in dem vorliegenden Versuch vorhanden sein könnte, jedoch nicht unbedingt mit der hier verwendeten Sonde detektierbar ist. Die Arbeitsgruppe Seidlová-Wuttke et al. (2003) konnte ebenfalls wider Erwarten unter SM keine ER β - Expression im Knochen der Ratten nachweisen und erklärte die östrogene Wirkung von SM entweder mit dem Vorkommen einer ER β -Splice-Variante oder eines weiteren Östrogenrezeptors, dem ER γ (Seidlová-Wuttke et al. 2003a).

In der Literatur liegen bezüglich E2 und ER β kontroverse Ergebnisse vor. Während Gallo et al. (2006) in Mamma der ovx Ratte keinen signifikanten Einfluss von E2 auf den ER β -Status zeigte (Gallo et al. 2006), beschreibt Glaeser et al (2006) eine Up-Regulation der ER β -Expression durch E2, wahrscheinlich vermittelt über ER α -abhängige Mechanismen. Wenn davon ausgegangen wird, dass ER β die ER α Transaktivierung reguliert (Hall und McDonnell 1999), würde eine Up-Regulation von ER β

durch ER α durch eine Änderung oder Hemmung der ER α -vermittelten Transaktivierung über E2 erklärt werden. (Glaeser et al. 2006).

In dieser Arbeit kam es bei E2-p. g.-Tieren zu keiner Up- oder Downregulation der ER β -Expression. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Arbeit von Gallo et al. (2006). Raloxifen s. c. scheint keinen Effekt auf die ER β -Expression zu haben, was mit vorherigen Veröffentlichungen übereinstimmt (Glaeser et al. 2006). Auch die getesteten Pflanzenextrakte führten zu keinem signifikanten Anstieg der ER β -Expression.

Mit dem Wissen, dass ER β eventuell antiproliferative, tumorsuppressive und vor allem unter niedrigen Östrogenumgebungskonzentrationen eine ER α hemmend modulierende Wirkung haben könnte (Hall und McDonnell 1999, Weihua et al. 2000, Saji et al. 2000) und diese Wirkung auch in Mamma auftritt und laut Sröm et al. (2004) der ER β ein geeigneter Angriffspunkt für therapeutische Brustkrebsprävention und -therapie durch ER β -selektive SERM sei, wäre in diesem Fall eine Up-Regulation des Rezeptors wünschenswert. Wobei man, wie oben beschrieben, beachten muss, dass die Aussagekraft über ER β -mRNA-Expression in den Mammæ bezüglich der endgültigen ER β -Aktivität schwierig ist.

4.3 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von PR in der Mamma

Progesteron fördert zusammen mit Östrogenen die Entwicklung des duktales Systems, ferner die Ausbildung, Proliferation und Differenzierung sowie Sekretionsbereitschaft der Alveoli. Primär bewirkt Progesteron zeitabhängig immer erst eine Zunahme der Mitoserate am Mammagewebe, jedoch auch eine Apoptoserate. Studien nach exogener Anwendung von Gestagenen haben widersprüchliche Daten geliefert. Es wurde sowohl eine erhöhte als auch eine erniedrigte Mitoserate gefunden. (Braendle 2001, Göretzlehner et al. 2007).

Die meisten Effekte des Progesterons scheinen antiöströgen zu sein, vor allem im Uterus. Progesteron führt im Uterus zu einer Down-Regulation der cytoplasmatischen und nukleären ER-Konzentrationen und antagonisiert die Wirkung des ER auf molekularer Ebene (Graham et al. 1997). Ursprünglich dachte man, wenn Progesteron die E2-induzierte Proliferation im Uterus antagonisieren würde, würde es genauso die E2-induzierte Proliferation im Mammagewebe antagonisieren. Heute weiß man, dass Progesteron in Kombination mit E2 eine höhere proliferative Wirkung im adulten Mammagewebe der Menschen und Tiere (Affe, Nagetier) hat als E2 allein. Folglich könnte Progesteron zu einer Brustkrebsrisikoerhöhung beitragen (Aupperlee et al. 2005).

Wie bereits beschrieben, wird die Wirkung des Progesterons über PR vermittelt (Manoharan et al. 2010).

In der vorliegenden Arbeit sollte ebenfalls untersucht werden, inwiefern die untersuchten Substanzen einen Einfluss auf die PR-Expression haben und auf diesem Wege zu einer Brustkrebsrisikoerhöhung führen könnten.

Nur E2-s. c.-Tiere zeigten im Einklang mit der Literatur eine signifikante Erhöhung der PR-Genexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe. Kraus et al. (1993) zeigten im Uterus der ovx Ratte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PR-Expression durch E2 (Kraus et al. 1993). Gallo et al. (2006) bewiesen eine Up-Regulation der PR-Genexpression durch E2 im Brustgewebe der ovx Ratte (Gallo et al. 2006).

Wenn man bedenkt, dass PR ein ER-reguliertes Gen ist und die Präsenz und die Konzentration von PR ein Marker für die Östrogenaktivität sind (Graham und Clarke 1997, Allred et al. 2001b), war der signifikante Anstieg der Genexpression von PR durch E2 s.c. zu erwarten. Auch bei den E2-p. g.-Tieren kommt es zu einem Anstieg der PR-Genexpression, jedoch nicht signifikant. Wie bereits aufgeführt ist aufgrund der hohen *First-pass*-Metabolisierung bei oraler Applikation von E2 nur 5 % bioverfügbar (AWMF Leitlinie Nr. 015062/Okttober 2010).

Raloxifen-Tiere zeigen, unabhängig von der Applikationsform keinen signifikanten Einfluss auf die PR-Genexpression. Dieses Ergebnis ist im Einklang mit der Arbeit von Bayram et al. (2005). Sie konnte ebenfalls im Mammagewebe der Ratte einen signifikanten Effekt auf die PR-Expression nachweisen (Bayram et al. 2005).

Glaeser et al. (2006) und Bläuer et al. (2008) konnten unter Raloxifeneinfluss In-vitro-Untersuchungen von humanen Mammakarzinomzelllinien (Glaeser et al. 2006) und Endometriumzellen (Bläuer et al. 2008) ebenfalls keine Effekte bezüglich der PR-Expression nachweisen (Glaeser et al. 2006, Bläuer et al. 2008). Rosal und Da Silvia (2010) hingegen wiesen im Brustgewebe der Frauen im gebärfähigen Alter unter Raloxifen und Tamoxifen einen signifikanten Abfall der PR- und ER α -Genexpression nach (Rosal und Da Silvia 2010).

In der vorliegenden Arbeit scheinen die Pflanzenextrakte keinen signifikanten Effekt auf die PR-Genexpression im Brustgewebe der ovx Ratte zu haben. Hier spielt die Applikationsform der Substanzen keine Rolle.

Bedenkt man, dass der PR-Status im Brustgewebe während der Karzinogenese deutlich erhöht ist (Shyamala et al. 2002) und eine Hochregulation der PR-mRNA-Expression sowie des daraus resultierende Proteine in MCF-7-Zellen festgestellt wurde (Nardulli et al. 1988), ist zu vermuten, dass von den getesteten Pflanzenextrakten im Hinblick auf das Mammakarzinomrisiko keine negativen Wirkungen ausgehen, da sie wahrscheinlich eine Überexpression des PR im Mammagewebe der ovx Ratte ver-

hindern. Da die untersuchten Pflanzenextrakte nicht den gleichen Effekt wie E2 s. c. zeigen, könnte man behaupten, dass sie hier im Brustgewebe der ovx Ratte keinen östrogenen Effekt aufweisen.

Die Wirkung von *Silybum marianum* im normalen Brustgewebe ist wenig erforscht. Eine rein östrogene Wirkung von Silymarin wurde, wie schon beschrieben, in der Metaphyse des Femurs der adulten ovx Ratte beobachtet (Seidlová-Wuttke et al. 2003 a). Die fehlende Wirkung des *Belamcanda chinensis* im ovx Mammagewebe ist im Einklang mit der Arbeit von Seidlová-Wuttke et al. (2004). Sie zeigten, dass Tectorigenin, ein Extrakt aus *Belamcanda chinensis* keine östrogene proliferationserhöhende Wirkungen im Mammagewebe aufweisen (Seidlová-Wuttke et al. 2004).

Mittlerweile verdichten sich jedoch die Hinweise auf eine östrogene Wirkung des Extrakts im Tierversuch. In vitro binden Extrakte aus VAC an ER (Rensen 2010). Liu et al. (2004) beschrieben, dass Linolinsäure ein Extrakt des VAC an ER bindet und somit eine östrogene Wirkung hat (Liu et al. 2004), allerdings nicht im normalen Mammagewebe, sondern in Mammakarzinomzellen.

4.4 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von IGF-1 in der Mamma

Im Rahmen dieser Arbeit sollte ebenfalls festgestellt werden, ob die getesteten Substanzen einen signifikanten Einfluss auf die Expression des IGF-1 im Brustgewebe der ovx Ratte haben, denn wie bereits erwähnt wurde, wird dem IGF-1 als Mitogen bei der Entstehung von Brustkrebs und anderen malignen Tumoren eine wichtige Rolle zugeschrieben.

Es wurde gezeigt, dass Östrogen und IGF-1 synergistisch den Eintritt der Brustkrebszelllinie MCF-7 in die S-Phase der Zellteilung induzieren. In der Brustdrüse spielt die Signalübertragung zwischen den beiden Stoffen bei der Entwicklung des gesunden Brustgewebes und des Mammakarzinoms eine Schlüsselrolle (Lisztwan et al. 2008).

In vielen Studien wird bewiesen, dass bei prämenopausalen Frauen eine positive Korrelation zwischen der IGF-1-Rezeptorkonzentration und dem Mamma-Ca-Risiko vorhanden ist (Lisztwan et al. 2008), nicht aber bei postmenopausalen Frauen (Gronbaek et al. 2004).

Wie bereits in der Einleitung beschrieben, wird die Ausschüttung von IGF-1 aus den Leberzellen von der Höhe des Östrogenspiegels beeinflusst, da Östrogen die Ausschüttung des Wachstumshormons (GH) aus der Hypophyse fördert und somit indirekt für einen Anstieg des IGF-1 verantwortlich ist (Pollak et al. 1992). Es gibt zunehmende Beweise, dass E2 und IGF-1 über komplexe Mechanismen die Zellproliferation des

normalen Brustepithels stimulieren und somit das Risiko für die Brustkrebsentstehung erhöhen. Diese noch nicht ganz verstandenen Interaktionen legen nahe, dass E2 über ER α die IGF-1- und IGF-1-Rezeptor-Expression reguliert und so das normale Mammawachstum beeinflusst (Martin und Stoica 2002). Eine andere Studie untersuchte die organspezifische Wirkung des E2 speziell auf den Uterus, die Vagina und die Brustdrüse der ovx Ratte bezüglich der IGF-1-Expression. Während E2 im Uterus und in der Vagina zur vermehrten IGF-1-Expression führte, blieb dieser Effekt in der Brustdrüse aus (Suzuki et al. 2007).

Dies bestätigen die vorliegenden Ergebnisse bezüglich des fehlenden signifikanten Effektes des E2 auf die IGF-1-Genexpression. Hier spielte es keine Rolle, ob E2 s. c. oder p. g. appliziert würde. Wenn man bedenkt, dass E2 die ER α -Expression downreguliert (Fendrick et al. 1998) und, wie oben beschrieben, E2 über ER α die IGF-1- und IGF-1-Rezeptor-Expression reguliert (Martin und Stoica 2002), könnte der fehlende signifikante Effekt unter E2 durch verminderte ER α -Expression bedingt sein.

Raloxifen wird in der Literatur vielfach als antiöstrogen und antiproliferativ in der Brust beschrieben (Dadak 2008b). Bezüglich der Effekte von Raloxifen auf die IGF-1-Expression existieren unterschiedliche Daten. Scheinbar ist die IGF-1-Regulation vom menopausalen Status abhängig, denn während Torrisi et al. (2001) und Duschek et al. (2004) den signifikant reduzierenden Effekt des Raloxifens auf IGF-1-Konzentrationen in postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs zeigten (Torrisi et al. 2001, Duschek et al. 2004), bewiesen Eng-Wong et al. (2003), dass Raloxifen in premenopausalen Frauen keinen Effekt auf die IGF-1-Konzentrationen ausübt (Eng-Wong et al. 2003).

In dieser Arbeit zeigte Raloxifen im Brustgewebe der ovx Ratte entgegen der Literatur keinen signifikanten Effekt auf die IGF-1-Genexpression. Er wirkt zwar, je nachdem wie er appliziert wird, in unterschiedlichem Maße reduzierend auf die Genexpression von IGF-1, jedoch nicht signifikant. Wenn man bedenkt, dass hohe IGF-1-Konzentrationen mit hohem Brustkrebsrisiko assoziiert werden, wäre ein fehlender signifikanter Effekt ebenso wünschenswert wie eine signifikante Reduktion der Genexpression von IGF-1. Auch die getesteten Pflanzenextrakte haben, unabhängig von der Applikationsart keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression von IGF-1. Dieses Ergebnis könnte man als erwünscht betrachten.

Bezüglich der Schlüsselrolle des IGF-1 als Mitogen bei der Brustkrebsentstehung und aufgrund der fehlenden Wirkung der Pflanzenextrakte auf die IGF-1-Expression könnte man vermuten, dass in diesem Falle keine negativen Auswirkungen von den getesteten Pflanzenextrakten ausgehen.

4.5 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von VEGF in der Mamma

Wie schon beschrieben, ist der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor (VEGF) ebenfalls wie IGF-1 ein Mitogen, welches bei der Entstehung und Progression eines Tumors bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt. Er kann in nahezu allen soliden Tumoren gefunden werden (Leung et al. 1989, Claffey et al. 1996, Fiedler et al. 2001, Dai et al. 2009).

VEGF spielt vor allem bei der Angiogenese von östrogenreguliertem Gewebe eine bedeutende Rolle. Unter dem Einfluss von Hormonen und Epithel- und Stroma-Interaktionen ist VEGF bei der Entwicklung und Funktion des normalen Mammagewebes essentiell und wird abhängig vom Zelltyp transkribiert (Hovey et al. 2001). Durch ER α und ER β wird auch die VEGF-Expression in Mamakarzinom-, und Endometriumkarzinomzellen reguliert (Koduri et al. 2006, Hyder et al. 2000). Ebenfalls in DMBA (Dimethylbenz(a)anthrazen) induzierten-Mamma-Ca der Ratte konnte *in-vivo* eine Stimulation der VEGF-Produktion durch E2 nachgewiesen werden (Nakamura et al. 1996).

In der vorliegenden Arbeit führen E2 und Raloxifen sowie BC s.c. im Brustgewebe von ovx Ratten zu einer signifikanten Reduktion der VEGF-Genexpression. Alle anderen Substanzen üben keinen signifikanten Einfluss auf die Genexpression aus. Entgegen der Studie von Nakamura et al. (1996), die gezeigt hat, dass es unter Östrogeneinfluss in Mammatumoren von ovx Ratten zu einer erhöhten VEGF-Expression kommt (Nakamura et al. 1996), hatte E2 in dieser Arbeit eine signifikant reduzierende Wirkung auf die Genexpression von VEGF.

Wie bereits aufgeführt, ist die Rolle des E2 bezüglich der VEGF-Regulation umstritten.

Während einige Studien über eine E2-induzierte erhöhte VEGF-Genexpression in Endometriumkarzinomzellen (Dardes et al. 2002, Navarro et al. 2003, Dai et al. 2009, Mueller et al. 2000) und in Mammakarzinomzellen (Soares et al. 2002, Ruhola et al. 1999) berichten, existieren ebenfalls Studien, die keine E2-induzierte VEGF-Überexpression in ER-positiven MCF-7-, T47D- oder ZR-75-Mammakarzinomzellen demonstrieren konnten, weder auf mRNA- noch auf Proteinebene (Hyder et al. 1998, Bermonta et al. 2001, Bogin und Degani 2002, Merkins et al. 2006). Letzteres steht im Einklang mit den vorliegenden Ergebnissen, nämlich eine fehlende VEGF-Überexpression durch E2, wobei erwähnt werden muss, dass dieses Experiment im normalen Brustgewebe der ovx Ratte durchgeführt wurde.

Obwohl viele Studien *Estrogen-Response-Elemente* in den Regulationsregionen des VEGF-Gens nachgewiesen haben (Hyder et al. 2000, Mueller et al. 2000), liegen in der Literatur auch Hinweise darauf vor, dass die VEGF-Induktion durch E2 zelltypab-

hängig sei (Hovey et al. 2001) und auch andere bisher nicht bekannte Faktoren außer ER bei der östrogenen Antwort eine Rolle spielen könnten (Hyder 2002).

Die Zell- und Spezies-abhängige VEGF-Regulation durch E2 in der Brust und Gebärmutter und die Fluktuationen in Zelllinien von solchen Faktoren in verschiedenen Laboren könnten einige Diskrepanzen zwischen den Ergebnissen von verschiedenen Forschern mit ähnlichen experimentellen Bedingungen erklären (Hyder 2002).

Raloxifen hat in dieser Arbeit, im Gegensatz zu den meisten beschriebenen Studien (Merkins et al. 2006, Navarro et al. 2003, Christodoulakes et al. 2004), einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die VEGF-Genexpression. Dies ist wünschenswert, wenn man die Rolle des VEGF bei der Tumorangiogenese betrachtet. Unter Raloxifeneinfluss wurde der fehlende Effekt bezüglich der VEGF-Konzentration im Serum postmenopausaler Frauen (Christodoulakos et al. 2004), in Brustkrebszellen (Merkins et al. 2006) sowie Endometriumkarzinomzellen (Navarro et al. 2003, Dai et al. 2009) nachgewiesen. Lam et al. (2004) zeigten, dass Raloxifen im Serum postmenopausaler Frauen die VEGF-Konzentration signifikant senkt (Lam et al. 2004).

Es stellt sich die Frage, ob Phytoöstrogene, die eine östrogen-ähnliche Wirkung haben können, auch die VEGF-Konzentration beeinflussen und somit eine Krebsentstehung begünstigen, da wenige Daten über die Rolle der Phytoöstrogene und VEGF-Genexpression im Mammagewebe existieren. Der fehlende signifikante Anstieg der VEGF-Genexpression durch die Pflanzenextrakte, mit Ausnahme von BC s. c., ist im Hinblick auf das Brustkrebsrisiko ebenfalls wünschenswert.

Der signifikante Abfall der Gen-Expression durch SM und AC, wie er bei BC s. c. beobachtet wurde, wäre in diesem Falle auch erwünscht, welcher aber hier ausbleibt, da eine reduzierende Wirkung auf die VEGF-Genexpression eher für eine tumorprotektive Wirkung der untersuchten Substanzen sprechen würde. Man könnte annehmen, dass BC, wenn s. c. appliziert und dadurch eine höhere Bioverfügbarkeit besitzt, einen protektiven Effekt auf das Mammagewebe hat, da es die VEGF-Expression signifikant reduziert.

Betrachtet man nur die E2-induzierte Wirkung auf die VEGF-Genexpression, wie es in einigen Studien beschrieben wird (Dardes et al. 2002, Navarro et al. 2003, Dai et al. 2009, Mueller et al. 2000, Soares et al. 2002, Ruohola et al. 1999), könnte man annehmen, dass die untersuchten Pflanzenextrakte im Mammagewebe der ovx Ratten keine östrogene Wirkung zeigen, da sie nicht die VEGF-Genexpression induzieren, was wiederum für die SERM-Eigenschaft dieser Substanzen sprechen könnte. Wenn man jedoch bedenkt, wie oben beschrieben, dass die Rolle der Östrogene bezüglich der VEGF-Regulation umstritten ist, ist es schwierig, eine Aussage über die östrogene Wirkung der Pflanzenextrakte zu treffen.

Zusammenfassend könnte man durch den fehlenden signifikanten Anstieg der getesteten Pflanzenextrakte auf die Genexpression von VEGF im Mammagewebe der ovx Ratten behaupten, dass die untersuchten Substanzen nicht zu einer erhöhten Neovaskularisation im Mammagewebe führen. Betrachtet man die entscheidende angiogenetische Rolle des VEGF bei der Entstehung eines soliden Tumors, könnte man in diesem Falle die These aufstellen, dass die getesteten Pflanzenextrakte nicht zu einem erhöhten Brustkrebsrisiko führen.

4.6 Einfluss der verschiedenen Futtersubstanzen auf die Genexpression von Aromatase in der Mamma

Ziel der vorliegenden Arbeit war es zudem, neben E2 und Raloxifen die Wirkung der Pflanzenextrakte auf die Genexpression des Enzyms Aromatase, dem Schlüsselenzym der Biosynthese von Östrogenen zu untersuchen, da es wenige Daten über die Wirkung von Phytoöstrogenen im Brustgewebe bezüglich der Aromataseaktivität gibt. Die meisten Studien wurden in MCF-7-Zellen oder anderen Geweben durchgeführt (Mense et al. 2008)

Im Brustgewebe postmenopausaler Frauen ist Aromatase für die lokale Östrogenproduktion verantwortlich, denn nach der Menopause, wenn die Östrogenkonzentration in der Brust absinkt, wird wahrscheinlich über eine Steigerung der Aromatase in der Brustdrüse die Östrogenkonzentration aufrechterhalten. Auf diese Weise könnte die Aromatase die lokale Östrogenproduktion über einen auto-parakrinen Regelkreis kontrollieren (Nakamura et al. 1999, Mense et al. 2008).

Die vermehrte Expression über die Aktivität dieser Enzyme wird mit Brustkrebs assoziiert, denn während einer malignen Transformation könnte das lokal produzierte Östrogen die Proliferation von Tumorzellen und VEGF-Produktion stimulieren. Dies sind Effekte, die eine Tumorentstehung, Angiogenese und letztendlich die Metastasierung begünstigen (Nakamura et al. 1996 und 1999, Yue et al. 2001, Mense et al. 2008). Es hat sich gezeigt, dass die Aromatase in malignem Mammagewebe mehr exprimiert wird als im normalen Mammagewebe (Miller 1997, Harada 1997).

Im Hinblick auf die Schlüsselrolle der Aromatase bei der Biosynthese von Östrogenen und die Rolle der Östrogene bei der Tumorentstehung würde eine Reduktion des Hormons im Körper über eine Hemmung der Aromataseaktivität vor Brustkrebsentstehung schützen (Altundag und Ibrahim 2006). Hiernach wäre ein signifikanter Abfall der Genexpression von Aromatase durch die getesteten Substanzen wünschenswert.

In der vorliegenden Arbeit üben die getesteten Substanzen einen unterschiedlichen Effekt auf die Genexpression von Aromatase aus. Lediglich E2-p. g.-, AC-s. c.- und BC-p. g.-Tiere führen zu einem signifikanten Anstieg der Genexpression.

Bukulmez et al. (2008) konnten in ihrer Studie zeigen, dass Androstendion in Endometriumstromazellen und in Endometriumobeflächenepithelien (HES) über eine Erhöhung der SF-1-mRNA-Expression die Aromatase-mRNA-Expression induzieren. E2 und Testosteron konnten sowohl die Aromatase- als auch die SF-1-mRNA-Expression upregulieren. Dadurch, dass diese Effekte, nämlich die androstendion- und testostereinduzierte Aromatase- und SF-1-mRNA-Expression durch ICI 182, 780, ein ER-Antagonist und den Aromataseinhibitor Fedrozol supprimiert wurden, kamen sie zur Schlussfolgerung, dass diese induzierten Effekte von Androstendion und Testosteron über ihre Konversion in Östrogenen vermittelt werden (Bukulmez et al. 2008). Hiernach wäre eine signifikante Aromatase-Genexpression durch E2-p. g.-Tiere zu erwarten.

Im Gegensatz dazu demonstrierten Galmiche et al. (2006) in Hirnanhangsdrüsen der Ratten nach ovx einen Anstieg der Aromatase-mRNA-Expression und konnten diesen Effekt durch E2-Gabe verhindern und schlugen vor, dass E2 in Hirnanhangsdrüsen der Ratten die Aromatase-mRNA-Expression downreguliert (Galmiche et al. 2006). Dadurch ist ein signifikanter Anstieg der Aromatase-Genexpression bei E2-p. g.-Tieren nicht zu erwarten.

Wie schon beschrieben, wird bei postmenopausalen Frauen, wenn die Östrogenkonzentration in der Brust absinkt, wahrscheinlich die Östrogenkonzentration über eine Steigerung der Aromatase in der Brustdrüse aufrechterhalten (Nakamura et al. 1999, Mense et al. 2008). Somit könnte man vermuten, dass die Versuchstiere wahrscheinlich auch nach der ovx mit einer Steigerung der Aromatase-Genexpression reagiert hätten. Dies wäre der Studie von Galmiche et al. (2006) ähnlich und man könnte vermuten, dass die vermehrte Aromatase-Genexpression ohnehin schon vorhanden war und nicht als Folge der Behandlung mit E2 aufgetreten ist.

E2 p. g. konnte vermutlich aufgrund des hohen *Firts-pass*-Effektes mit deutlich geringerer Bioverfügbarkeit als E2 s. c. (AWMF Leitlinie Nr. 015062/Okttober 2010) keine Down-Regulation der Genexpression bewirken. E2 s. c. führte zwar nicht zu einer Down-Regulation der Genexpression, konnte aber aufgrund der besseren Bioverfügbarkeit vermutlich eine Up-Regulation verhindern.

Insgesamt bleibt die Rolle von E2 bei der Aromatase-Gen-Regulation unklar. Catalano et al. (2009) konnten in ihrer Studie demonstrieren, dass in östrogenabhängigen MCF-7-Brustkrebszellen E2 in der Lage ist, über eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung auf Aromataseproteinebene die enzymatische Aktivität von Aromatase zu erhöhen. Außerdem konnten sie in ER-negativen SKBR3-Brustkrebszellen und in R2C-Lydig-Tumorzellen der Ratten, welche eine hohe Aromataseaktivität anzeigen, ähnliche Ergebnisse erzielen und schlugen vor, dass die hohe Aromataseaktivität durch E2 nicht unbedingt zellspezifisch wäre. Hierbei wurde jedoch erwähnt, dass das Wachstum und

die Progression des Brustkrebses stark E2-abhängig sind. Catalano et al. (2009) demonstrierten in ihrer Studie, dass die E2-induzierte Up-Regulation der Aromatase und die Enzymaktivität in Brustkrebszellen nicht mit einem erhöhten Aromatase-mRNA oder -Protein korrelierte und schlugen eine posttranslationale Modulation der Aromatase-Protein vor (Catalano et al. 2009).

Es gibt andere Studien, die eine E2-induzierte Senkung der Aromataseaktivität in Brustkrebszellen (Yue et al. 2001, Pasqualini und Chetrite 2006) aufzeigen. Es muss jedoch betonend gesagt werden, dass E2 längerfristig und deutlich höher dosiert wurde als in anderen Versuchen (Catalano et al. 2009). Die MCF-7-Zellen wurden nach einer längerfristigen E2-Exposition entweder in östrogenfreien Medien kultiviert oder mit Aromatase-Gen (MCF-7aro) transfiziert (Yue et al. 2001, Pasqualini und Chetrite 2006).

Raloxifen hat weder p. g. noch s. c. eine Wirkung auf die Genexpression von Aromatase. Wenn man von der E2-induzierten Down-Regulation der Aromatase-mRNA-Expression (Galmich et al. 2006) und der antiöstrogenen Wirkung von Raloxifen in der Brust ausgeht (Dowsett et al. 2001, Glaeser et al. 2006), wäre eine Up-Regulation der Aromatase-Genexpression zu erwarten. Leider gibt es wenige Studien über die Effekte des Raloxifens auf die Aromatase-Genexpression im Mammagewebe, so dass weitere Aussagen diesbezüglich als schwierig erscheinen.

Bei den untersuchten Pflanzenextrakten bewirkten nur AC s. c. und BC p. g. einen signifikanten Anstieg der Aromatase-Genexpression. Der einschlägigen Literatur nach kann keine genaue Aussage darüber gemacht werden, ob die vorliegenden Ergebnisse erwartungsgemäß waren, denn es gibt unterschiedliche Daten über die Auswirkung von Pflanzenextrakten auf die Aromatase.

Es gibt einerseits Studien, die beweisen, dass Phytoöstrogene wie Resveratrol die Aromataseaktivität kompetitiv und nicht kompetitiv in MC-7-Brustkrebszellen (Wang et al. 2006) und in SK-BR-3-Brustkrebszellen (Mense et al. 2008) hemmen, andererseits wird in einigen Studien dargestellt, dass Phytoöstrogene wie Genistein die Aktivität von Aromatase in HepG2- Leberzellen (Ye et al. 2009) und isolierten Ovarfollikeln (Myllymaki et al. 2005) steigern. Hiernach ist ein Anstieg der Gen-Expression bei den AC-s. c.- und BC-p. g.-Tieren zu erwarten, wenn man davon ausgeht, dass eine erhöhte Genexpression auch eine erhöhte Enzymaktivität zur Folge hat (Bulun et al. 2005). Darüber hinaus kann behauptet werden, dass diese Substanzen aufgrund der vermehrten Östrogensynthese durch die erhöhte Aromataseaktivität durchaus zu einem vermehrten Brustkrebsrisiko führen kann. Ein fehlender signifikanter Anstieg der Aromatase-Genexpression, wie es bei MD-s.c./p. g.-, AC-p. g.- und BC-s. c.-Tieren der Fall ist, stellt eine positive Wirkung dar, wenn man bedenkt, dass die Erhöhung der Aromatase-Genkonzentration zu einer vermehrten E2-Produktion und somit zu erhöh-

ter E2-Aktivität führt. Folglich bewirken in diesem Falle SM, AC p. g. oder BC s. c. kein erhöhtes Mammakarzinomrisiko.

4.7 Abschließende Beurteilung

Zusammenfassend muss erwähnt werden, dass in der vorliegenden Arbeit die getesteten Pflanzenextrakte abhängig von der Applikationsform einen unterschiedlichen Einfluss auf die Genexpression haben.

Einerseits waren die Ergebnisse wünschenswert, wie z. B. die signifikante Reduktion der VEGF-Genexpression durch BC, wenn s. c. appliziert oder unabhängig von der Applikationsform der fehlende signifikante Effekt der Substanzen auf die Expression der Wachstumsfaktoren IGF-1 und VEGF und Steroidhormonrezeptoren $ER_{\alpha/\beta}$ und PR. Andererseits gab es im Hinblick auf die Mammakarzinomentstehung adverse Effekte wie der signifikante Anstieg der Aromatase-Genexpression durch AC und BC je nach Applikationsform.

Aufgrund der vorgelegten Ergebnisse in dieser Arbeit, der teilweise kontroversen Ergebnisse in der Literatur und unter Berücksichtigung der Tatsache, dass meines Wissens die Effekte der getesteten Substanzen auf die Rattenmamma nicht häufig untersucht worden sind, ist es aktuell schwierig, eine klare Aussage über die Risiken der getesteten Pflanzenextrakte bezüglich der Mammakarzinomentstehung zu treffen. Es sollte hierüber mehr Forschungsarbeit betrieben werden, bevor einige dieser Substanzen als sichere Alternativen für eine Hormonersatztherapie ohne Effekt auf die Mamma klassifiziert werden können.

5 Zusammenfassung

Klimakterische Beschwerden können das Allgemeinbefinden von Frauen stark negativ beeinflussen. Betroffen sind nicht nur Frauen in der natürlichen oder chirurgischen Menopause, sondern auch Frauen, die sich wegen eines Mammakarzinoms einer antihormonellen Therapie mit Tamoxifen oder Aromatase-Hemmern +/- GNRH-Analoga oder gar einer Chemotherapie unterziehen (müssen).

Die HRT, welche unumstritten als die wirksamste Behandlung gegen klimakterische Beschwerden gilt, stellt ein Risikofaktor für die Brustkrebsentstehung dar. Die in letzter Zeit publizierten Studien der „Women’s Health Initiative“ und die „One Million Women Study“ haben trotz mehrerer methodischer Studienmängel dazu geführt, dass die Indikation zu einer Hormonersatztherapie heute strenger gestellt wird als noch vor Jahren.

Es haben sich im Laufe der Zeit mehrere pflanzliche Produkte, u.a. die Phytoöstrogene mit fraglichen positiven, eventuell östrogenen Effekten auf perimenopausale Symptome als Alternativen zu HRT herauskristallisiert. Diese werden bereits zum Teil von Ärzten verschrieben oder von Frauen in der Selbsttherapie als harmlos angesehen und zur Nahrungsergänzung eingenommen. In der Literatur liegen wenige oder kontroverse Daten bezüglich der Effektivität, des Wirkungsmechanismus inklusive Wechselwirkungen und des Risikoprofiles der Phytoöstrogene vor. Die momentane Datenlage erlaubt keine abschließende Aussage.

Das Ziel dieser vorliegenden Arbeit war es, im Brustgewebe der ovx Ratte, die als etabliertes Modell in der Forschung über die Postmenopause gilt, molekularbiologische Effekte (=Genexpression) der Pflanzenextrakte *Agnus castus*, *Belamcanda chinensis* und *Silybum marianum*, des SERM Raloxifen sowie 17β Östradiol im Vergleich zur Kontrollgruppe auf die RNA-Expression nachzuweisen. Dabei diente Östrogen als positive und Raloxifen als negative Kontrolle.

Zur Analyse fraglicher östrogenen Wirkungen wurde der Effekt der Testsubstanzen auf die Östrogenrezeptoren $ER(\alpha/\beta)$ auf m-RNA-Ebene mittels Genexpressionsstudien (PCR) festgestellt. Zur Beantwortung der Frage nach möglichen proliferativen Effekten auf Mammastrukturen wurde die Genexpression von PR-, IGF-1-, und VEGF-mRNA mit der PCR-Methode quantifiziert. Die Bestimmung der Aromatase-mRNA Genexpression mittels PCR diente zur Beantwortung der Frage, ob die getesteten Pflanzenextrakte möglicherweise einen Einfluss auf die Biosynthese der Östrogene ausüben könnten. Dabei sollten als weitere Endpunkte neben der Genexpression auch der Vergleich zwischen der beiden Applikationsformen p. g. und s. c. untersucht werden. Zu-

sammenfassend kann Folgendes über die einzelnen Behandlungsgruppen gesagt werden:

Die subcutane Behandlung mit E2 führte erwartungsgemäß (Fendrick et al. 1998) im Gegensatz zu der per gavage Behandlung, zur einer signifikanten Down-Regulation des ER α . Die Zufuhr von E2 per gavage, führte zu keinem signifikanten Effekt, vermutlich weil E2, wenn subcutan appliziert durch die Umgehung des *First-pass*-Effektes eine deutlich bessere Bioverfügbarkeit besitzt als per gavage.

ER β -mRNA war mit den vorliegenden PCR-Untersuchungen unter subcutaner Östrogenbehandlung nicht nachweisbar. Gegensätzliche Aussagen in der Literatur über häufiges ER β -Vorkommen in der Mamma sind vermutlich in spezies- und gewebsspezifischem, oft beschriebenem Vorhandensein von mRNA- und Protein-Splice-Varianten begründet (Palmieri et al. 2002, Dahlman-Wright et al. 2006). Die Behandlung der Tiere mit E2 per gavage zeigte bezüglich der ER β -Expression ähnlich wie der Studie von Gallo et al. (2006), keinen Effekt. Glaeser et al (2006) konnten hingegen durch E2 eine Up-Regulation der ER β -Expression nachweisen.

E2 subcutan führte im Einklang mit der einschlägigen Literatur eine signifikante Erhöhung der PR-Genexpression gegenüber der Kontrollgruppe. Kraus und Katzenellenbogen (1993) zeigten durch E2 im Uterus der ovx Ratte ebenfalls einen signifikanten Anstieg der PR-Expression (Kraus und Katzenellenbogen 1993). Gallo et al. (2006) bewiesen im Brustgewebe der ovx Ratte durch E2 eine Up-Regulation der PR-Genexpression (Gallo et al. 2006). Die fehlende Wirkung des E2, wenn per gavage gegeben, kann erneut durch die geringere Bioverfügbarkeit aufgrund der hohen *First-pass*-Metabolisierung erklärt werden.

Ähnlich wie die Arbeit von Suzuki et al. (2007) hatte eine E2-Behandlung keinen Effekt auf die Genexpression von IGF-1 im Mammagewebe (Suzuki et al. 2007). Martin und Stoica (2002) konnten hingegen eine E2-induzierte IGF-1-Genexpression über ER α demonstrieren (Martin und Stoica 2002).

Der signifikant reduzierende Effekt des E2 auf die Genexpression von VEGF war nicht im Einklang mit den meisten Studien, denn diese demonstrierten eine E2-induzierte VEGF-Expression (Dardes et al. 2002, Navarro et al. 2003, Dai et al. 2009, Mueller et al. 2000, Soares et al. 2002, Ruohola et al. 1999). Allerdings muss man hier erwähnen, dass dieses Experiment im Gegensatz zu den o. g. Studien im normalen Brustgewebe der ovx Ratte durchgeführt wurde. Es gibt in der Literatur auch Hinweise darauf, dass die VEGF-Induktion durch E2 zelltypabhängig (Hovey et al. 2001) wäre, und dass auch andere bisher nicht bekannte Faktoren außer ER, bei der östrogenen Antwort eine Rolle spielen (Hyder 2002). Die Zell- und Spezies-abhängige VEGF-Regulation durch E2 in der Brust, Gebärmutter und die Fluktuationen in Zelllinien von

solchen Faktoren (Hyder 2002) können die Diskrepanzen zwischen dem vorliegenden Ergebnis und den anderen Ergebnissen erklären.

Die per gavage Behandlung der Tiere mit E2 führte zu einer signifikanten Up-Regulation der Genexpression von Aromatase, während die subcutane Gabe keinen Einfluss zeigte. Es lässt sich schwer sagen, ob die Ergebnisse erwartungsgemäß ausfielen, denn es gibt einerseits Studien, die eine E2-induzierte Up-Regulation der Aromatase-Genexpression in Endometriumzellen demonstrieren (Bukulmez et al. 2008), andererseits liegen auch Beweise vor, dass E2 in Hirnanhangsdrüsen von ovx Ratten die Aromatase-Genexpression in Hirnanhangsdrüsen downreguliert (Galmiche et al. 2006). Man könnte vermuten, dass E2 gewebespezifisch die Aromatase-Genexpression reguliert.

Raloxifen zeigte in dieser Arbeit erwartungsgemäß keinen Einfluss auf die Expression von ER β und PR (Glaeser et al. 2006, Bayram et al. 2005, Merkins et al. 2006, Navarro et al. 2003, Christodoulakos et al. 2004, Lam et al. 2004). Entgegen der Studie von Glaeser et al. (2006) wurde die ER α -Expression durch Raloxifen signifikant reduziert, allerdings nur als es s. c. appliziert wurde. Dies könnte durch die bessere Bioverfügbarkeit aufgrund des fehlenden „First-pass-Effektes“ im Gegensatz zur p. g.-Applikation erklärt werden.

Bezüglich der Effekte von Raloxifen auf die IGF-1-Expression gibt es unterschiedliche Daten. Es scheint, dass die IGF-1-Regulation vom menopausalen Status abhängig ist, denn während Torrisi et al. (2001) und Duschek et al. (2004) den signifikant reduzierenden Effekt des Raloxifens auf IGF-1-Konzentrationen in postmenopausalen Frauen mit Brustkrebs zeigten (Torrisi et al. 2001, Duschek et al. 2004), bewiesen Eng-Wong et al. (2003), dass Raloxifen in premenopausalen Frauen keinen Effekt auf die IGF-1-Konzentrationen hat (Eng-Wong et al. 2003). Da dieser Versuch mit postmenopausalen Ratten durchgeführt wurde, war laut Studien von Torrisi et al. (2001) und Duschek et al. (2004) der fehlende Effekt des Raloxifens auf die IGF-1-Genexpression nicht zu erwarten.

Raloxifen hat in der vorliegenden Arbeit, unabhängig von der Applikationsform im Gegensatz zu den meisten beschriebenen Studien (Merkins et al. 2006, Navarro et al. 2003, Christodoulakos et al. 2004), einen signifikant reduzierenden Einfluss auf die VEGF-Genexpression. Dies ist wünschenswert, wenn man die Rolle des VEGF bei der Tumorangio-genese betrachtet.

Die Aromatase-Genexpression wurde von Raloxifen nicht signifikant beeinflusst. Wenn man von der E2-induzierten Down-Regulation der Aromatase-mRNA-Expression (Galmich et al. 2006) und der antiöstrogenen Wirkung von Raloxifen in der Brust ausgeht (Dowsett et al. 2001, Glaeser et al. 2006), wäre eine Up-Regulation der Aromatase-Genexpression zu erwarten. Leider gibt es wenige Studien über die Effekte des

Raloxifens auf die Aromatase-Genexpression im Mammagewebe, so dass weitere Aussagen diesbezüglich als schwierig erscheinen.

Zusammenfassend wurden in dieser Arbeit drei Resultate erzielt: Die Experimente führten zu einem signifikanten Anstieg der Aromatase-Genexpression durch AC s. c. und BC p. g. Zudem kam es einem signifikanten Abfall der VEGF-Genexpression durch BC s. c. Darüber hinaus ergab sich ein fehlender signifikanter Effekt der untersuchten Pflanzenextrakte im Brustgewebe der ovx Ratten.

In zahlreichen Organen reguliert E2 auch die Gen- und Proteinexpression seiner eigenen Rezeptoren (Seidlová-Wuttke et al. 2003b). Entscheidende ähnliche Effekte wie das E2, z. B. die Beeinflussung der ER α/β -, PR-, Aromatase-, VEGF- und IGF-1-Aktivität durch erhöhte Expression der Gene wurden nicht erzielt, da hier die Substanzen keine östrogene Wirkung auf das Brustgewebe der ovx Ratte aufwiesen. In diesem Fall wäre dies der Beweis dafür, dass das Risiko für die Brustkrebsentstehung nicht erhöht ist. Es gäbe lediglich nur bei AC und BC Bedenken, da sie zu einem signifikanten Anstieg der Aromatase-Genexpression führen. Allerdings spielt hier die Applikationsform eine Rolle.

Im Allgemeinen lassen die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse den Schluss zu, dass die hier untersuchten Pflanzenextrakte durchaus eine SERM-artige Wirkung besitzen, da sie am Knochen eine erwünschte östrogenagonistische, anabole (Metka 2001), an der Mamma bis auf wenige Ausnahmen (s. Genexpression von VEGF und Aromatase) jedoch eine - ebenfalls erwünschte - neutrale Wirkung zeigen.

Da die hier untersuchten Substanzen keine signifikanten Effekte auf die ER α/β Expression aufwiesen, konnte in der vorliegenden Arbeit keine Aussage darüber treffen, über welchen der beiden Rezeptoren die Substanzen wirken. Fakt ist aber, dass die untersuchten Substanzen keinen Einfluss auf die Genexpression von ER α/β haben. Auch die Expression von IGF-1, welches als Mitogen bei der Entstehung von Brustkrebs und anderen malignen Tumoren eine wichtige Rolle spielt, wird nicht beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit haben die untersuchten Substanzen, bezogen auf die IGF-1 Expression, keine negativen Effekte in der Brustdrüse.

Die Expression des VEGF, ebenfalls wie IGF-1, ein Mitogen, welches bei der Entstehung von Tumoren bei der Angiogenese eine entscheidende Rolle spielt, wird durch keine der Substanzen negativ beeinflusst. Dies wäre ein Beweis für den fehlenden Einfluss der untersuchten Pflanzenextrakte auf eine mögliche Tumorangio-genese durch VEGF. Somit gäbe es in dem Fall keine Hinweise für eine vermehrte Tumorentstehung durch die Substanzen.

AC s. c. und BC p. g. könnten über einen signifikanten Anstieg der Aromatase-Genexpression Auswirkungen auf die Biosynthese von Östadiol haben. Hier gibt es

bezüglich des Brustkrebsrisikos Bedenken, denn diese Substanzen könnten über eine erhöhte Aromataseaktivität zu vermehrter Östrogensynthese und somit erhöhtem Brustkrebsgefahr führen.

Wenn man von krebsfördernder oder -schützender Wirkung der Phytoöstrogene spricht, sollte man beachten, dass entsprechend der aktuellen Datenlage dies nicht für alle Phytoöstrogene und alle Applikationsarten gilt. AC p. g. und BC s. c. sowie die anderen getesteten Substanzen führen nicht zu einer erhöhten Aromatase-Genexpression, die aufgrund vermehrter E2-Synthese eine erhöhte E2-Aktivität zur Folge haben könnte. Dies stellt einen positiven Effekt dar.

Unter Berücksichtigung der Tatsache, dass die Effekte von BC und AC bezüglich der Aromatase-Genexpression auf die Rattenmamma nicht häufig untersucht worden sind, sind weitere Studien notwendig, um eine klare Aussage über diese Substanzen bezüglich der Brustkrebsrisikoerhöhung oder -minimierung zu treffen.

Zusammenfassend beeinflussen die untersuchten Pflanzenextrakte nicht entscheidend die Expression der Wachstumsfaktoren IGF-1 und VEGF und führen nicht zu einer signifikanten erhöhten ER α/β und PR-Expression, unabhängig davon, ob die Substanzen s.c. oder p. g. appliziert werden. Dies wäre der Beweis, dass sie im Gegensatz zu den Östrogenen keine Effekte im Brustgewebe der ovx Ratte ausüben. Die fehlende östrogene Wirkung der Substanzen im Mammagewebe der Ratte würde für eine SERM-artige Eigenschaft der Substanzen sprechen, denn wie bereits erwähnt, gibt es Phytoöstrogene, die eine östrogene Wirkung in anderen Geweben (z. B. im Knochen) ausüben (Metka 2001, Seidlová-Wuttke et al. 2003a). Außer der signifikant ansteigenden Wirkung von AC und BC auf die Gen-Expression von Aromatase, wenn per gavage appliziert, üben die Substanzen keine proliferativen, adversen Effekte auf das Mammagewebe der ovx Ratte aus. Somit wäre das Risiko für die Brustkrebsentstehung in diesem Fall nicht erhöht. Abschließend kann davon ausgegangen werden, dass aufgrund der teilweise kontroversen Ergebnisse in der Literatur entsprechende Schlüsse nur mit Vorsicht gemacht werden dürfen. Außerdem sollte hierüber mehr Forschungsarbeit betrieben werden, bevor einige dieser Substanzen als sichere Alternativen für eine Hormonersatztherapie ohne Effekt auf die Mamma klassifiziert werden können.

6 Literaturverzeichnis

Abukhdeir AM, Blair BG, Brenner K, Karakas B, Konishi H, Lim J, Sahasranaman V, Huang Y, Keen J, Davidson N (2006): Physiologic estrogen receptor alpha signaling in non-tumorigenic human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* 99, 22-23

Adlercreutz H und Mazur W (1997): Phytoestrogens and Western diseases. *Ann Med* 29, 95-120

Allred DC, Allred KF, Ju YH, Virant SM, Helferich WG (2001a): Soy diets containing varying amounts of genistein stimulate growth of estrogen-dependent (MCF-7) tumors in a dose-dependent manner. *Cancer Res* 61, 5045–5050

Allred DC, Mohsin SK, Fuqua SAW (2001b): Histological and biological evolution of human premalignant breast disease. *Endocrinol Relat Cancer* 8, 47-61

Altundag K und Ibrahim NK (2006): Aromatase inhibitors in breast cancer: an overview. *Oncologist* 11, 553–562

Astwood EB, Geschickter CF, Rausch EO (1937): Development of the mammary Gland of the rat. *Am J Anat* 61, 373-405

Atwood CS, Hovey RC, Glover JP, Chepko G, Ginsburg E, Robison WG, Vonderhaar BK (2000): Progesterone induces side-branching of the ductal epithelium in the mammary glands of peripubertal mice. *J Endocrinol* 167, 39-52

Aupperlee MD, Smith KT, Kariagina A, Haslam SZ (2005): Progesterone Receptor Isoforms A and B: Temporal and Spatial Differences in Expression during Murine Mammary Gland Development. *Endocrinol* 146, 3577-3588

Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, McNabb MA, Wenger NK (2006): Effects of Raloxifen on Cardiovascular Events and Breast Cancer in Postmenopausal Women. *N Eng J Med* 355, 125-137

Bayram M, Bayram O, Dursun A, Isik I, Dilekoz E, Ozkan S (2005): Expression of steroid receptors in intact rat uterus, mammary gland, and liver treated with selective estrogen receptor modulators and conjugated equine estrogens. *Adv Ther* 22, 587-94

Beral V und Million Women Study Collaborators (2003): Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet* 362, 419–27

Bermonta L, Lamielle-Musarda F, Chezya E, Weisz A, Adessi GL (2001): 17-Estradiol inhibits forskolin-induced vascular endothelial growth factor promoter in MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 78, 343-349

Biegel LB, Flaws JA, Hirshfield AN, O'Connor JC, Elliott GS, Ladics GS, Silbergeld EK, Van Pelt CS, Hurtt ME, Cook JC, Frame SR (1998): 90-day feeding and one-generation reproduction study in Crl:CD BR rats with 17b-estradiol. *Toxicol Sci* 44, 116–42

Bläuer M, Heinonen PK, Rovio P, Ylikomi T (2008): Effects of tamoxifen and raloxifene on normal human endometrial cells in an organotypic in vitro model. *Eur J Pharmacol* 592, 13-8

Bogin L und Degani H (2002): Hormonal regulation of VEGF in orthotopic MCF-7 human breast cancer. *Cancer Res* 62, 1948-1951

Borde T und David M: Sind die Wechseljahre ein kulturspezifisches Syndrom? Forschungsergebnisse und Anmerkungen zur Informiertheit und den Bedürfnissen von Migrantinnen in der gynäkologischen Praxis. In: Wechseljahre multidisziplinär. Was wollen Frauen – was brauchen Frauen? (Band 28: Schriftenreihe zur Gesundheitsanalyse GEK - Gmünder ErsatzKasse; hrsg Jahn I); Asgard-Verlag Hippe; Sankt Augustin 2004, 83-96

Braendle W (2001): Estrogene, Gestagene und Brust. *J Menopause* 8, 7-11

Branham WS, Dial SL, Moland CL, Hass BS, Blair RM, Fang H, Shi L, Tong W, Perkins RG, Sheehan DM (2002): Phytoestrogens and mycoestrogens bind to the rat uterine estrogen receptor. *J Nutr* 132, 658-664

Bruns A (1994): Veränderungen im endokrinen System bei postmenopausalen Frauen mit metastasiertem Mammakarzinom unter einer Behandlung mit Tamoxifen bzw. Toremifene. Med Diss Bonn 1994

Bukulmez O, Hardy DB, Carr BR, Auchus RJ, Toloubeydokhti T, Word RA, Mendelson CR (2008): Androstenedione up-regulation of endometrial aromatase expression via local conversion to estrogen: potential relevance to the pathogenesis of endometriosis. *J Clin Endocrinol Metab* 9, 3471-3477

Bulun SE, Lin Z, Imir G, Amin S, Demura M, Yilmaz B, Martin R, Utsunomiya H, Thung S, Gurates B, Tamura M, Langoi D, Deb S (2005): Regulation of aromatase expression in estrogen-responsive breast and uterine disease: from bench to treatment. *Pharmacol Rev* 57, 359-383

Catalano S, Barone I, Giordano C, Rizza P, Qi H, Gu G, Malivindi R, Bonofiglio D, Andò S (2009): Rapid estradiol/ERalpha signaling enhances aromatase enzymatic activity in breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 23, 1634 -1645

Ceriani RL: (1970): Fetal mammary gland differentiation in vitro in response to hormones. II. Biochemical findings. *Develop Biol* 21, 530-546

Chang EC, Charn TH, Park SH, Helferich WG, Komm B, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2009): Estrogen Receptors α and β as Determinants of Gene Expression: Influence of Ligand, Dose, and Chromatin Binding. *Mol Endocrinol* 22, 1032-1043

Christodoulakos G, Lambrinoudaki I, Panoulis C, Papadias C, Sarandakou A, Liakakos T, Alexandrou A, Creatsas G (2004): Effect of hormone therapy, tibolone and raloxifene on circulating vascular endothelial growth factor in Greek postmenopausal women. *Eur J Endocrinol* 151, 187-192

Claffey KP und Robinson GS (1996): Regulation of VEGF/VPF expression in tumor cells: consequences for tumor growth and metastasis. *Cancer Metastasis* 15, 165-176

Conn G, Bayne ML, Sondermann DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA (1990): Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 2628-2632

Conneely OM, Lydon JP, De Mayo F, O'Malley BW (2000): Reproductive functions of the progesterone receptor. *J Soc Gynecol Investig* 7, 25-32

Cos P, De Bruyne S, Apers D, Berghe V, Pieters L, Vlietinck AJ (2003): Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 69, 589-599

- Dadak C** (2008a): Minimierung des Brustkrebsrisikos, *J Mineralstoffwechsel* 15, 103-104
- Dadak C** (2008b): Unterschiedliche Hormonersatztherapien weisen unterschiedliche Risiken für Brustkrebs auf – zur E3N-Kohorten-Studie. *J Gynäkol Endokrinol* 2, 79-82
- Dahlman-Wright K**, Cavailles V, Fuqua SA, Jordan VC, Katzenellenbogen JA, Korach KS, Maggi A, Muramatsu M, Parker MG, Gustafsson JA (2006): International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacol Rev* 58, 773-81
- Dai H**, Zhang P, Zhao S, Zhang J, Wang B (2009): Regulation of the vascular endothelial growth factor and growth by estrogen and antiestrogens through Efp in Ishikawa endometrial carcinoma cells. *Oncol Rep* 21, 395-401
- Daniel CW** und Silberstein GB: Postnatal Development of the Rodent Mammary Gland; In: *The mammary gland*; hrsg. v. Neville MC, Daniel CW; Plenum Press, New York 1987, 3-36
- Dardes RC**, Schafer JM, Pearce ST, Osipo C, Chen B, Jordan VC (2002): Regulation of estrogen target genes and growth by selective estrogen-receptor modulators in endometrial cancer cells. *Gynecol Oncol* 85, 498-506
- De Lignieres B**, de Vathaire F, Fournier S, Urbinelli R, Allaert F, Le MG, Kuttenn F (2002): Combined hormone replacement therapy and risk of breast cancer in a French cohort study of 3.175 women. *Climacteric* 5, 332–340
- DeNardo DG**, Kim HT, Hilsenbeck S, Cuba V, Tsimelzon A, Brown PH (2005): Global gene expression analysis of estrogen receptor transcription factor cross talk in breast cancer: identification of estrogen-induced/activator protein-1-dependent genes. *Mol Endokrinol* 19, 362-78
- Den Tonkelaar I**, Keinan-Boker L, Veer PV, Arts CJ, Adlercreutz H, Thijssen JH, Peeters PH (2001): Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 223–228
- Dowsett M**, Bundred NJ, Decensi A, Sainsbury RC, Lu Y, Hills MJ, Cohen FJ, Veronesi P, O'Brien MER, Scott T, Muchmore DB (2001): Effect of Raloxifene on Breast Cancer Cell Ki67 and Apoptosis: A Double-Blind, Placebo-controlled, Randomized Clinical Trial in Postmenopausal Patients. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 10, 961–966
- Duffy C**, Perez, K, Partridge, A (2007): Implications of Phytoestrogen Intake for Breast cancer. *CA Cancer J Clin* 57, 260-277
- Duschek EJ**, de Valk-de Roo GW, Gooren LJ, Netelenbos C (2004): Effects of conjugated equine estrogen vs. raloxifene on serum insulin-like growth factor-i and insulin-like growth factor binding protein-3: A 2-year, double-blind, placebo-controlled study. *Fertil Steril* 82, 384-390
- Edwards DP** (2005): Regulation of signal transduction pathways by estrogen and progesterone. *Annu Rev Physiol* 67, 335-376
- EI-Shitany NA**, Hegazy S, El-Desoky K (2010): Evidences for antiosteoporotic and selective estrogen receptor modulator activity of silymarin compared with ethinylestradiol in ovariectomized rats. *Phytomedicine* 17, 116-125
- Emmen JM** und Korach KS (2001): Developing animal models for analyzing SERM activity. *Ann N Y Acad Sci* 949, 36-43

- Eng-Wong J**, Hursting SD, Venzon D, Perkins SN, Zujewski JA (2003): Effect of raloxifene on insulin-like growth factor-I, insulin-like growth factor binding protein-3, and leptin in premenopausal women at high risk for developing breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 12, 1468 – 73
- Fahrleitner-Pammer A** (2007): Aktuelles: Raloxifen (Evista(R))-Ein Molekül mit vielen Aspekten. *J Mineralstoffwechsel* 14, 39-44
- Fendrick JL**, Raafat AM, Haslam SZ (1998): Mammary Gland Growth and Development from the Postnatal Period to Postmenopause: Ovarian Steroid Receptor Ontogeny and Regulation in the Mouse. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 7-22
- Fernandez-Valdivia R**, Mukherjee A, Mulac-Jericevic B, Conneely OM, DeMayo FJ, Amato P, Lydon JP (2005): Revealing progesterone's role in uterine and mammary gland biology: insights from the mouse. *Sem Reproduct Med* 23, 22-37
- Fiedler W**, Gehling U, Mende T, Hossfeld DK (2001): Neoangiogenese und Tumorstromawachstum, Pathophysiologie und neue therapeutische Ansätze. *Dtsch Arztebl* 21, 1392-1394
- Flora K**, Hahn M, Rosen H, Benner K (1998): Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 93, 139–143
- Folkman J** (1995): Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat Med* 1, 27-31
- Förster C**, Mäkela S, Wärrä A, Kietz S, Becker D, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA (2002): Involvement of Estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 15578–15583
- Förster C**, Kietz S, Hultenby K, Warner M, Gustafsson JA (2004): Characterization of the ERbeta^{-/-} mouse heart. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 14234–14239
- Fournier A**, Berrino F, Clavel-Chapelon F (2007): Unequal risks for breast cancer associated with different hormone therapies: results from the E3N cohort study. *Breast Cancer Res Treat* 107, 103-11
- Freeman CS** and Topper YJ (1978): Progesterone and glucocorticoid in relation to the growth and differentiation of mammary epithelium. *J Toxicol Environ Health* 4, 269-82
- Fritz WA**, Coward L, Wang J, Lamartiniere CA (1998): Dietary genistein: perinatal mammary cancer prevention, bioavailability and toxicity testing in the rat. *Carcinogenesis* 19, 2151-2158
- Gallo D**, Zannoni GF, Martinelli E, Ferlini C, Fabrizi M, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G (2006): Estradiol and phytoestrogens differently influence the rodent postmenopausal mammary gland. *J Menopause* 13, 72-79
- Galmiche G**, Corvaisier S, Kottler ML (2006): Aromatase gene expression and regulation in the female rat pituitary. *Ann N Y Acad Sci* 1070, 286-92
- Glaeser M**, Niederacher D, Djahansouzi S, Hanstein B, Dittrich R, Beckmann MW, Fasching PA, Ackermann S (2006): Effects of the antiestrogens tamoxifen and raloxifene on the estrogen receptor transactivation machinery. *Anticancer Res* 26, 735-44
- Goldman AS**, Shapiro B, Neumann F (1976): Role of testosterone and its metabolites in the differentiation of the mammary gland in rats. *Endocrinol* 99, 1490-1495
- Göretzlehner G**, Lauritzen Ch, Göretzlehner U: *Praktische Hormontherapie in der Gynäkologie*. Walter de Gruyter; Berlin 2007, S. 17

- Graham** JD and Clarke CL (2002): Expression and transcriptional activity of progesterone receptor A and progesterone receptor B in mammalian cells. *Breast Cancer Res* 18, 187-190
- Grandien** K, Berkenstam A, Gustafsson JA (1997): The estrogen receptor gene: promoter organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol* 29, 1343-1369
- Green** S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320, 134-9
- Greene** GL, Fitch FW, Jensen EV: (1980) Monoclonal antibodies to: probes for the study of estrogen receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 157-161
- Gronbaek** H, Flyvbjerg A, Mellekjær L, Tjønnelân A, Christensen J, Sørensen HT, Overvad K (2004): Serum insulin-like growth factors, insulin-like growth factor binding proteins, and breast cancer risk in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 13, 1759-64
- Gustafsson** JA (2006): ERbeta scientific visions translate to clinical uses. *Climacteric* 9, 156-60
- Hall** J and McDonnell DP (1999): The Estrogen Receptor b-Isoform (ERb) of the Human Estrogen Receptor Modulates ERa Transcriptional Activity and Is a Key Regulator of the Cellular Response to Estrogens and Antiestrogens. *Endocrinol* 140, 5566-5578
- Harada** N (1997): Aberrant expression of aromatase in breast cancer tissues. *J Steroid Biochem Mol Biol* 61, 175-184
- Harris** HA (2006): Preclinical characterization of selective estrogen receptor beta agonists: new insights into their therapeutic potential. *Ernst Schering Found Symp Proc* 1, 149-61
- Heits** F, Wiedemann GJ, Jelkmann W (1998): Der vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktor VEGF stimuliert die Angiogenese im Guten wie im Bösen. *Dtsch Med Wochenschr* 123, 259-265
- Horn-Ross** PL, John EM, Lee M, Stewart SL, Koo J, Sakoda LC, Shiao AC, Goldstein LP, Davis P, Perez-Stable EJ (2001): Phytoestrogen consumption and breast cancer risk in a multiethnic population: the Bay Area. *Breast Cancer Study. Am J Epidemiol* 154, 434 - 441
- Hovey** RC, Goldhar AS, Baffi J, Vonderhaar BK (2001): Transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor expression in epithelial and stromal cells during mouse mammary gland development. *Mol Endocrinol* 15, 819-31
- Husmann** G, Kaatsch P, Katalinic A, Bertz J, Haberland J, Kraywinkel K, Wolf U: Krebs in Deutschland 2005/2006. In: Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe; hrsg. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. Berlin 2010, S.12 und 56-59
- Hyder** SM, Murthy L, Stancel GM (1998): Progesterin regulation of vascular endothelial growth factor in human breast cancer. *Cancer Res* 58, 392-395
- Hyder** SM, Nawaz Z, Chiappetta C, Stancel GM (2000): Identification of functional estrogen response elements in the gene coding for the potent angiogenic factor vascular endothelial growth factor. *Cancer Res* 60, 3183-3190

- Hyder SM** (2002): The Role of Steroid Hormones on the Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor. *Am J Pathol* 161, 345-346
- Jarry H, Spengler B, Porzel A, Schmidt J, Wuttke W, Christoffel V** (2003): Evidence for estrogen receptor beta-selective activity of Vitex agnus castus and isolated flavones. *Planta Med* 69, 945-947
- Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Thun MJ** (2009): Cancer statistics, 2009. *CA Cancer J Clin* 59, 225-249
- Jensen EV, Jacobson HI**: Fate of steroidal estrogen in target tissues. In: *Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer*; hrsg. Pincus G, Vollmer EP, Academic Press New York 1960, 161–178
- Jones JI, Doerr ME, Clemmons DR** (1995): Cell Migration: Interactions among integrins, IGFs and IGF-BPs. *Prog in Growth Factor Res* 6, 319-327
- Jordan VC und O'Malley BW** (2007): Selective Estrogen-Receptor Modulators and Antihormonal Resistance in Breast Cancer. *J Clin Oncol* 36, 5815-5824
- Ju YH, Allred KF, Allred CD, Helferich WG** (2006): Genistein stimulates growth of human breast cancer cells in a novel, postmenopausal animal model, with low plasma estradiol concentrations. *Carcinogenesis* 27, 1292–1299
- Ju YH, Doerge DR, Woodling KA, Hartman JA, Kwak J, Helferich WG** (2008): Dietary genistein negates the inhibitory effect of letrozole on the growth of aromatase-expressing estrogen-dependent human breast cancer cells (MCF-7Ca) in vivo. *Carcinogenesis* 29, 2162-2168
- Kamiya K, Gould MN, Clifton KH** (1998): Quantitative studies of ductal versus alveolar differentiation from rat mammary clonogens. *Proc Soc Exper Biol Med* 219, 217-225
- Karkola S und Wähälä K** (2009): The binding of lignans, flavonoids and coumestrol to CYP450 aromatase: A molecular modelling study. *Mol Cell Endocrinol* 301, 235-44
- Kietz S, Thomsen JS, Matthews J, Pettersson K, Strom A and Gustafsson JA** (2004): The Ah receptor inhibits estrogen-induced estrogen receptor beta in breast cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 320, 76–82
- King WJ and Greene GL** (1984): Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307, 745–747
- Knight CH and Peaker M** (1982): Development of the mammary gland. *J Reproduct Fertil* 65, 521-36
- Koduri S, Goldhar A, Vonderhaar B** (2006): Activation of vascular endothelial growth factor (VEGF) by the ER- α variant, ER Δ 3. *Breast Cancer Res Treat* 95, 37-43
- Koksal E, Gulcin I, Beyza S, Sarikaya O, Bursal E** (2008): In vitro antioxidant activity of silymarin. *J Enzym Inhib Med Chem* 24, 395-405
- Kraus WL u. Katzenellenbogen BS** (1993): Regulation of progesterone receptor gene expression and growth in the rat uterus; modulation of estrogen actions by progesterone and sex steroid hormone antagonists. *Endocrinol* 132, 2371-2379
- Kroll J und Waltenberger J** (2000): Regulation der Endothelfunktion und der Angiogenese durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor-A (VEGF-A). *Z Kardiol* 89, 206-218
- Kuhl H** (2003): Epidemiologie, Mammakarzinom und Hormonersatztherapie. *J Menopause* 10, 6-10

- Kuiper** GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93, 5925-5930
- Kuiper** GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptor alpha and beta. *Endocrinol* 138, 863-870
- Kuiper** GG, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA (1998): Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinol* 139, 4252-4263
- Kulakosky** PC, McCarty MA, Jernigan SC, Risinger KE, Klinge CM (2002): Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *J Mol Endocrinol* 29, 137-152
- Laidlaw** IJ, Clarke RB, Howell A, Owen AWM, Potten CS, Anderson E (1995): The proliferation of normal human breast tissue implanted into athymic nude mice is stimulated by estrogen but not progesterone. *Endocrinol* 136, 164-71
- Lakowicz** JR: Energy Transfer. In: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, Plenum Press; New York 1983, 303-339
- Lam** PM, Yim SF, Britton-Jones C, Chung TK, Haines C (2004): Raloxifene therapy in postmenopausal women is associated with a significant reduction in the concentration of serum vascular endothelial growth factor. *Fertil Steril* 81, 393-7
- Lasek**, R and Müller-Oerlinghausen, B (2003): Hormontherapie im Klimakterium. *AVP* 30, 1-40
- Le Roith** D, Scavo L, Buttler A (2001): What is the role of circulating IGF-I? *Trends Endocrinol Metab* 12, 48 - 52
- Leung** DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989): Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246, 1306-1309
- Li** CI, Malone KE, Porter PL, Lawton TJ, Voigt LF, Cushing-Haugen KL, Lin MG, Yuan X, Daling JR (2008): Relationship between Menopausal Hormone Therapy and Risk of Ductal, Lobular, and Ductal-Lobular Breast Carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 17, 43-50
- Lindberg** MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlmann-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)-beta reduces ER-alpha regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17, 203-208
- Lisztwan** J, Pornon A, Chen B, Chen S, Evans DB (2008): The aromatase inhibitor letrozole and inhibitors of insulin-like-growth factor I receptor synergistically induce apoptosis in in vitro models of estrogen-dependent breast cancer. *Breast Cancer Res* 10, 56
- Liu** J, Burdette JE, Sun Y, Deng S, Schlecht SM, Zheng W, Nicolich D, Mahady G, van Breemen RB, Fong HHS, Pezzuto JM, Bolton JL, Farnsworth (2004): Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chasteberry). *Phytomed* 11, 18-23
- Lucas** JN, Rudmann DG, Credille KM, Irizarry AR, Peter A, Snyder, PW (2007): The Rat Mammary Gland: Morphologic Changes as an Indicator of Systemic Hormonal Perturbations Induced by Xenobiotics. *Toxicol Pathol* 35, 199 - 207

- Manoharan S**, Pugalendhi P, Baskaran N (2010): Effects of genistein and daidzein, in combination, on immunoexpression pattern of ER, PR and HER-2/neu during 7, 12-dimethylbenz (a) anthracene induced mammary carcinogenesis in rats. *Int J Res Pharm Sci* 1, 421-427
- Marino M**, Galluzzo P, Ascenzi P (2006): Estrogen signaling multiple Pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics* 7, 497-508
- Martin MB** und Stoica A (2002): Insulin-Like Growth Factor-I and Estrogen Interactions in Breast Cancer. *J Nutr* 132, 3799–3801
- McEwen BS**, Davis PG, Parsons B (1979): The brain as a target for steroid hormone action. *Ann Rev Neurosci* 2, 65-112
- Mense SM**, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK (2008): Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environ Health Perspect* 116, 426–433
- Merkins S**, Wong BC and Archer DF (2006): Effects of 17beta-estradiol, progesterone, synthetic progestins, tibolone, and raloxifene on vascular endothelial growth factor and Thrombospondin-1 messenger RNA in breast cancer cells. *Int J Gynecol Cancer* 16, 560-563
- Messina M**, McCaskill-Stevens W, Lampe J (2006): Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings. *J Natl Cancer Inst* 98, 1275-84
- Metka M** (2001): Phytoestrogene, Phytogestagene und Phytoandrogene. *J Menopause* 8, 12-18
- Miller WR** (1997): Uptake and synthesis of steroid hormones by the breast. *Endocr Relat Cancer* 4, 307–311
- Mueller MD**, Vigne JL, Minchenko A, Lebovic DI, Leitman DC, Taylor RN (2000): Regulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) gene transcription by estrogen receptors α and β . *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 10972-10977
- Mülhardt, C**: Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR). In: *Der Experimentator: Molekularbiologie/Genomics*; Spektrum Akademischer Verlag; Heidelberg 2009, S. 108
- Mullis KB** (1990a): Eine Nachtfahrt und die Polymerase-Kettenreaktion. *Spektrum Wiss* 6, 60-67
- Mullis KB** (1990b): Target amplification for DNA analysis by the polymerase chain reaction. *Ann Biol Clin* 48, 579-582
- Myers JA** (1917): Studies of the mammary gland II. The fatal development of the mammary gland in the female albino rat. *Am J Anat* 22, 195-223
- Myllymaki S**, Haavisto T, Vainio M, Toppari J, Paranko J (2005): In vitro effects of diethylstilbestrol, genistein, 4-tert-butylphenol, and 4-tert-octylphenol on steroidogenic activity of isolated immature rat ovarian follicles. *Toxicol Appl Pharmacol* 204, 69–80
- Nakamura J**, Savinov A, Lu Q, Brodie A (1996): Estrogen regulates vascular endothelial growth/permeability factor expression in 7,12 Dimethylbenz(a)anthracene-induced rat mammary tumors. *Endocrinology* 137, 5589-5596
- Nakamura J**, Lu Q, Aberdeen G, Albrecht, Brodie A (1999): The Effect of Estrogen on Aromatase and Vascular Endothelial Growth Factor Messenger Ribonucleic Acid in the Normal Nonhuman Primate Mammary Gland. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 1432-1437

- Nardulli** AM, Greene GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1988): Regulation of progesterone receptor messenger ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122, 935-944
- Navarro** FJ, Mirkin S, Archer DF (2003): Effect of raloxifene, 17beta-estradiol, and progesterone on mRNA for vascular endothelial growth factor isoforms 121 and 165 and thrombospondin-1 in Ishikawa cells. *Fertil Steril* 79,1409-15
- Obi** N, Chang-Claude J, Berger J, Braendle W, Slinger T, Schmidt M, Steindorf K, Ahrens W, Flesch-Janys D (2009): The Use of Herbal Preparations to Alleviate Climacteric Disorders and Risk of Postmenopausal Breast Cancer in a German Case-Control Study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 18, 2207–2213
- Ohyama** K, Akaike T, Hirobe C, Yamakawa T (2003): Cytotoxicity and apoptotic inducibility of Vitex agnus-castus fruit extract in cultured human normal and cancer cells and effect on growth. *Pharm Bull* 26, 10-18
- Palmieri** C, Cheng GJ, Saji S, Zelada-Hedman M, Wärrri A, Weihua Z, Van Noorden S, Wahlstrom T, Coombes RC, Warner M, Gustafsson JA (2002): Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 9,1-13
- Park-Sarge** OK and Mayo KE (1994): Regulation of the progesterone receptor gene by gonadotropins and cyclic adenosin3', 5'-monophosphate in rat granulosa cells. *Endocrinology* 134, 709-718
- Pasqualini** JR and Chetrite GS (2006): Estradiol as an anti-aromatase agent in human breast cancer cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 98,12–17
- Pavlakis** K, Messini I, Vrekoussis T, Yiannou P, Keramopoulos D, Louvrou N, Liakakos T, Stathopoulos EN (2008): The assessment of angiogenesis and fibroblastic stromagenesis in hyperplastic and pre-invasive breast lesions. *BMC Cancer* 8, 88
- Pettersson** K and Gustafsson JA (2001): Role of estrogen receptor beta in estrogen action. *Annu Rev Physiol* 63, 165-192
- Petrakis** NL, Barnes S, King EB, Lowenstein J, Wiencke J, Lee MM, Miike R, Kirk M, Coward L (1996): Stimulatory influence of soy protein isolate on breast secretion in pre- and postmonopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers* 5, 785-794
- Pollak** M und Tremblay G (1989): Immunocytochemical localization of insulin-like growth factor-1 receptors in primary human breast cancers. *Breast Cancer Res Treat* 14, 174
- Pollak** M, Huynh H, Pratt S (1992): Tamoxifen reduces serum insulinlike growth factor 1 (IGF 1). *Breast Cancer Res Treat* 22, 91-100
- Powell** SL, Gödecke T, Nikolic D, Chen S-N, Ahn S, Dietz B, Farnsworth NR, Van Breemen RB, Lankin DC, Pauli GF, Bolton JL (2008): In Vitro Serotonergic Activity of Black Cohosh and Identification of N(omega)-Methylserotonin as a Potential Active Constituent. *J Agric Food Chem* 56, 11718-11726
- Ramsey** TL, Risinger KE, Jernigan SC, Mattingly KA, Klinge CM (2004): Estrogen receptor beta isoforms exhibit differences in ligand-activated transcriptional activity in an estrogen response element sequence-dependent manner. *Endocrinology* 145,149-160
- Rensen** I (2010): Porträt einer Arzneipflanze: Mönchspfeffer (Ivy Chaste tree). *Z Phytother* 31, 322-326

Rice S, Masson HD, Whitehead SA (2006): Phytoestrogens and their low dose combinations inhibit mRNA expression and activity of aromatase in human granulosa-luteal cells; *J Steroid Biochem Mol Biol* 101, 216-225

Rohlik QT, Adams D, Kull FC Jr (1987): An antibody to the receptor for insulin-like growth factor-1 inhibits the growth of MCF-7 cells in tissue culture. *Biochem Biophys Res Commun* 149, 276-281

Rosal MA and da Silva BB (2010): Evaluation of estrogen and progesterone receptors in non-neoplastic breast tissue of women of reproductive age exposed to tamoxifen and raloxifene: a randomized, double-blind study. *Breast Cancer Res Treat* 125, 797-801

Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J, Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators (2002): Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomised controlled trial. *J Am Med Assoc* 288, 321-333

Roth MJ, Tanese N, Goff SP (1985): Purification and characterization of murine retroviral reverse transcriptase expressed in *Escherichia coli*. *J Biol Chem* 260, 9326

Ruan W Monaco ME, Kleinberg DL (2005): Progesterone stimulates mammary gland ductal morphogenesis by synergizing with and enhancing insulin-like growth factor-I action. *Endocrinology* 146, 1170-8

Ruohola, JK, Valve EM, Karkkainen MJ, Joukov V, Alitalo K, Harkonen PL (1999): Vascular endothelial growth factors are differentially regulated by steroid hormones and antiestrogens in breast cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 149, 29-40

Russo IH and Russo J (1996): Mammary gland neoplasia in long-term rodent studies. *Environ Health Perspect* 104, 938-967

Russo IH and Russo J (1998): Role of hormones in cancer initiation and progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 3, 49-61

Russo IH, Tewari M, Russo J: Morphology and development of rat mammary gland; In: *Integument and mammary gland of laboratory animals*; hrsg. v. Jones TC, Mohr U, Hunt RD; Springer-Verlag, Berlin 1989, 233-252

Russo J and Russo IH (1980): Susceptibility of the mammary gland to carcinogenesis. II. Pregnancy interruption as a risk factor in tumor incidence. *Am J Pathol* 100, 497-512

Russo J, Gusterson BA, Rogers AE, Russo IH, Wellings SR, Van Zwieten MJ (1990): Comparative study of human and rat mammary tumorigenesis. *Lab Invest* 62, 244-278

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N (1985): Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 4732, 1350-1354

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA (1988): Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 4839, 487-491

Saji S, Sakaguchi H, Anderson S, Warner M, Gustafsson JA (2000): Qualitative Analysis of Estrogen Receptor Proteins in Rat Mammary Gland. *Endocrinology* 142, 3177-3186

Sambrook J, Maniatis T, Fritsch EF: *Molecular cloning. A laboratory manual*. Vol. 1; Cold Spring Harbor Laboratory Press; New York, USA 1989

Schoenfeld JR, Vasser M, Jhrani P, Ng P, Hunter JJ, Ross J Jr, Chien KR, Lowe DG (1998): Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 30, 2269-2280

Schultz JR, Petz NL, Nardulli AM (2005): Cell- and ligand-specific regulation of promoters containing activator protein-1 and Sp1 sites by estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* 280, 347- 354

Seidlová-Wuttke D, Christoffel V, Heiden I, Jarry H, Sprengler B, Wuttke W (2000): Die Wirkung von Belamcanda chinensis abstammenden Phytoöstrogenen auf die Serum-LH-Spiegel und auf die Expression von östrogenregulierten Genen im Uterus und im Knochen der ovariectomierten Ratte. *J Menopause* 7, 28-31

Seidlová-Wuttke D, Becker T, Christoffel V, Jarry H, Wuttke W (2003a): Silymarin is a selective estrogen receptor β (ER β) agonist and has estrogenic effects in the metaphysis of the femur but no or antiestrogenic effects in the uterus of ovariectomized (ovx) rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86, 179-188

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Christoffel V, Sprengler B, Becker T, Wuttke W (2003b): Evidence for selective estrogen receptor modulator activity in a black cohosh (*Cimicifuga racemosa*) extract: comparison with estradiol-17 β . *Eur J Endocrinol* 149, 351-362

Seidlová-Wuttke D, Hesse O, Jarry H, Rimoldi G, Thelen P, Christoffel V, Wuttke W (2004): Belamcanda chinensis and thereof purified tectorigenin have selective estrogen receptor modulator activities. *Phytomed* 11, 392-403

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

Shyamala G, Chou YC, Louie SG, Guzman RC, Smith GH, Nandi S (2002): Cellular expression of estrogen and progesterone receptors in mammary glands: regulation by hormones, development and aging. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 137-48

Siemeister G, Martiny-Baron G, Marmé D (1998): The pivotal role of VEGF in tumor angiogenesis: molecular facts and therapeutic opportunities. *Cancer Metastasis Rev* 2, 241-248

Smigal C, Jemal A, Ward E, Cokkinides V, Smith R, Howe HL, Thun M (2006): Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. *CA Cancer J Clin* 56, 168-183

Smith L and Hughes TA (2008): Regulation of estrogen receptor beta by 5' untranslated regions in breast carcinogenesis. *Breast Cancer Res* 10, 24

Soares R, Reis-Filho JS, Gartner F, Schmitt FC, Iruela-Arispa L, Graubert MD (2002): Vascular endothelial growth factor, transforming growth factor- α and estrogen receptors: possible cross-talks and interactions. *Am J Pathol* 160, 381-383

Song RX, Zhang Z, Chen Y, Bao Y, Santen RJ (2007): Estrogen signaling via a linear pathway involving insulin-like growth factor-1 receptor, matrix metalloproteinases and epidermal growth factor receptor to activate mitogen-activated protein kinase in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinol* 148, 4091-4101

Sourla A, Flamand M, Belanger A, Labrie F (1998): Effect of dehydroepiandrosterone on vaginal and uterine histomorphology in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol* 66, 137-49

Speirs V (2002): Oestrogen Receptor β in Breast Cancer: Good, Bad or Still Too Early to Tell? *J Pathol* 197, 143-147

- Spreafico E**, Bettini E, Pollio G, Maggi A (1992): Nucleotide sequence of estrogen receptor cDNA from Sprague-Dawley rat. 353-356-GenBank Accession X61098. *Eur J Pharmacol* 227, 353-356
- Stefanick ML**, Anderson GL, Margolis KL, Hendrix SL, Rodabough RJ, Paskett ED, Lane DS, Hubbell FA, Assaf AR, Sarto GE, Schenken RS, Yasmeen S, Lessin L, Chlebowski RT, WHI Investigators (2006): Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy. *JAMA* 295, 1647–57
- Ström A**, Hartman J, Foster J. S, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 1566–1571
- Suzuki A**, Urushitani H, Watanabe H, Sato T, Iguchi T, Kobayashi T, Ohta Y (2007): Comparison of estrogen responsive genes in the mouse uterus, vagina and mammary gland. *J Vet Med Sci* 69, 725-31
- Tekmal PR**, Kirma N, Gill K, and K Fowler K (1999): Aromatase overexpression and breast hyperplasia, an in vivo model--continued overexpression of aromatase is sufficient to maintain hyperplasia without circulating estrogens, and aromatase inhibitors abrogate these preneoplastic changes in mammary glands. *Endocr Rel Cancer* 6, 307-314
- Toft D** and Gorski J (1966): A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterization. *Proc Natl Acad Sci USA* 55, 1574–1581
- Torrisi R**, Baglietto L, Johansson H, Veronesi G, Bonanni B, Guerrieri-Gonzaga B, Ballardini B and Decensi A (2001): Effect of raloxifene on IGF-I and IGFBP-3 in postmenopausal women with breast cancer. *Br J Cancer* 85, 1838-1841
- Trock BJ**, Hilakivi-Clarke L, Clarke R (2006): Meta-analysis of soy intake and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 98, 459–471
- Van der Schoot P**, Bakker GH, Klijn JGM (1987): Effects of the progesterone antagonist RU486 on ovarian activity in the rat. *Endocrinol* 121, 1375-82
- Wagner H**, Bauer R, Xiao PG, Chen JM, Nenninger A: *Rhizoma Belamcandae sinensis*. In: Chinese Drug Monographs and Analysis Band 2: hrsg. v. Dr. Erich Wühr, Verlag für Ganzheitliche Medizin, Kötzing 1999, 1-13
- Walker VR** and Korach KS (2004): Estrogen Receptor Knockout Mice as a Model for Endocrine Research. *ILAR J* 45, 455-461
- Wang Y**, Lee KW, Chan FL, Chen S, Leung LK (2006): The red wine polyphenol resveratrol displays bilevel inhibition on aromatase in breast cancer cells. *Toxicol Sci* 92, 71–77
- Weihua Z**, Saji S, Mäkinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptor (ER) b, a modulator of ERa in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 5936–5941
- Wuttke W**, Jarry, Seidlová-Wuttke D (2007): Isoflavones - safe food additives or dangerous drugs? *Ageing Res Rev* 6, 150-188
- Wuttke W**, Seidlová-Wuttke D, Jarry H, Artymuk N (2010): Der Stellenwert des Mönchspfeffers (*Vitex agnus-castus*) in der gynäkologischen Endokrinologie. *Z Phytother* 31, 294-298

Ye L, Chan MY, Leung LK (2009): The soy isoflavone genistein induces estrogen synthesis in an extragonadal pathway. *Mol Cell Endocrinol* 30, 73-80

Yue W, Berstein LM, Wang JP, Clark GM, Hamilton CJ, Demers LM (2001): The potential role of estrogen in aromatase regulation in the breast. *J Steroid Biochem Mol Biol* 79,157–164

Zapf J (1997): Total and free IGF serum levels. *Eur J Endocrinol* 136, 146-147

Zhang S, Qin C, Safe SH (2003): Iavonoids as Aryl Hydrocarbon Receptor Agonists/Antagonists: Effects of Structure and Cell Context. *Environ. Health Perspect* 111, 1877-1882

Zittermann A (2003): Phytoestrogenes. *Zentralbl Gynakol* 125, 195-201

7 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Schematische Darstellung der Brustdrüse der weiblichen Ratte</i>	<i>16</i>
<i>Abbildung 2: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von ERα im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage</i>	<i>42</i>
<i>Abbildung 3: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von ERβ im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage</i>	<i>43</i>
<i>Abbildung 4: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von PR im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage.....</i>	<i>44</i>
<i>Abbildung 5: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von IGF-1 im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage</i>	<i>45</i>
<i>Abbildung 6: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von VEGF im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage</i>	<i>46</i>
<i>Abbildung 7: Einfluss von E2, MD, AC, BC und Raloxifen auf die Genexpression von VEGF im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. und p. g. Applikation über 2,5 Tage</i>	<i>47</i>

8 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: Liste der zu applizierenden Substanzen und die jeweiligen Mengen</i>	<i>30</i>
<i>Tabelle 2: Einfluss der getesteten Substanzen auf die Genexpression im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger s. c. Applikation über 2,5 Tage.....</i>	<i>48</i>
<i>Tabelle 3: Einfluss der getesteten Substanzen auf die Genexpression im Mammagewebe der ovx Ratten nach 5-maliger p. g. Applikation über 2,5 Tage.....</i>	<i>49</i>

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke danke ich für die Möglichkeit, die Doktorarbeit zu schreiben, und für die wissenschaftliche und fachliche Supervision.

Ich bedanke mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen für die Hilfe bei der Einarbeitung und bei allen Mitarbeitern der Abteilung der Klinischen und Experimentellen Endokrinologie der Frauenklinik für die Kollegialität und freundliche Atmosphäre bei der Arbeit.

Meine Arbeit wurde in hervorragender Weise durch Frau Dr. med. D. Seidlová-Wuttke betreut. Bei ihr möchte ich mich für die Überlassung des Themas und die stetige fachliche Begleitung besonders bedanken.

