

Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit  
Institut für Experimentelle Genetik  
Neuherberg



## **Einfluss von Phytoestrogenen auf die Aktivität der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen**

Antje Krazeisen

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität  
München zur Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. Dr. A. Bacher

Prüfer der Dissertation:

1. Priv.-Doz. Dr. J. Adamski
2. Univ.-Prof. Dr. J. Buchner

Die Dissertation wurde am 23.05.2001 bei der Technischen Universität München eingereicht  
und durch die Fakultät für Chemie am 17.10.2001 angenommen.

## **DANKSAGUNG**

Besonderer Dank gilt Prof. Rudi Balling und Dr. Martin Hrabè de Angelis für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Mein herzlichster Dank gilt PD Dr. Jerzy Adamski für die Überlassung des Themas, alle wissenschaftlichen Ratschläge, die Schaffung eines angenehmen Arbeitsklimas, sein stetes Interesse am Fortgang der Dissertation und die zahlreichen Möglichkeiten, meine Arbeit präsentieren zu dürfen.

Ganz besonderer Dank gebührt Dr. Gabriele Möller für die hervorragende Einführung in zahlreiche mikrobiologische Techniken, ihre uneingeschränkte Hilfs- und Diskussionsbereitschaft sowie ihr Engagement beim Probelesen der Doktorarbeit.

### **Mein Dank gilt weiterhin:**

Dr. Josef-Karl Gerber für die Bereitstellung eines Computerarbeitsplatzes in seinem Büro. Auch die zahlreichen Anregungen und das Lesen der Arbeit waren sehr hilfreich.

Johannes Gloeckner für die hervorragende Betreuung in allen Computerfragen und die nette Zusammenarbeit.

Rainer Breitling für die Durchführung verschiedenster Computerrecherchen und die hilfreichen Diskussionen.

Allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe, insbesondere Daniela Laubner, Zrinka Marijanović, Daniela Perović, Florian Graedler sowie allen, die ich nicht namentlich erwähnt habe. Ihnen danke ich für das angenehme Arbeitsklima, die zahlreichen fachlichen Diskussionen, die Unterstützung und die unkomplizierte Zusammenarbeit.

Gabriele Zieglmeier, die durch ihre verlässliche Organisation für ein reibungsloses Arbeiten im GAC sorgte.

Dr. Kenji Imai für die Unterstützung bei der Auswertung des Radiation Hybrid Panels.

Dr. F. Feuerhake und Dr. S. Fritz (Ludwig-Maximilians-Universität, Anatomische Anstalt) für das Bereitstellen einzelner humaner cDNA-Proben für die RT-PCR.

Prof. Dr. T. Penning (Universität von Pennsylvania, Philadelphia, USA) für das Bereitstellen des pET 3 $\alpha$ -HSD 2-Konstruktes.

Herrn Utz Linzner der AG BioDV für die schnelle Synthese der Oligonukleotide.

Ein liebes Dankeschön an Kurt Wunsch für die Begleitung und Unterstützung in Studium und Promotion.

Dank gilt auch Thomas Dahlen für die hilfreiche, konstruktive Kritik an der Arbeit sowie für die Motivation beim Fertigstellen.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinen Eltern und meiner Schwester Katja bedanken. Ihre liebevolle Unterstützung und Anteilnahme waren mir immer eine große Hilfe.

## ABKÜRZUNGEN

A	Ampère
Abb.	Abbildung
ad	( <i>lat.</i> ) zu, nach
AKR	Aldo-Keto-Reduktase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BioDV	biologische Datenverarbeitung
bp	Basenpaar
BSA	bovines Serumalbumin
5 $\alpha$ -DHT	5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Da	Dalton
DHEA	Dehydroepiandrosteron
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EST	expressed sequence tag
et al.	( <i>et alteri, lat.</i> ) und andere
ER	Estradiolrezeptor
GT	Glutathion
GST	Glutathion-S-Transferase
<sup>3</sup> H	Tritium
HPLC	Hochdruckflüssigchromatographie
HRE	hormonresponsives Element
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thio-galaktosid
kbp	Kilobasenpaare
LB	Luria-Bertani
MOPS	3-(Morpholino)-Propansulfonsäure
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
OD	optische Dichte
<sup>32</sup> P	Phosphorisotop, Masse 32
p. a.	per analysis (Analysereinheitsgrad)
PBS	salzhaltiger Phosphatpuffer (phosphat buffered saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
RHP	radiation hybrid panel
PRL	Prolaktin
PRAP	Prolaktinrezeptor-assoziiertes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (rotations per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SCAD	Short-Chain-Alkoholdehydrogenase
SDS	Natriumdodecylsulfat
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	Tetramethylethylendiamin
Tris	Tri-(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit (Unit)
UTR	untranslatierter Bereich

## **Nukleinsäuren**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

## **Ein- bzw. Dreibuchstabenkode der Aminosäuren**

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

---

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Kontrolle biologischer Prozesse .....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Bedeutung von Hormonen .....	1
1.1.2	Signalübermittlung durch Hormone.....	1
1.1.3	Klassischer molekularer Mechanismus der Hormonwirkung .....	2
<b>1.2</b>	<b>Steroidhormone .....</b>	<b>2</b>
1.2.1	Synthese der Steroidhormone .....	2
1.2.2	Steroidhormonklassen und deren Funktionen .....	4
1.2.3	Wirkungsweise von Steroidhormonen .....	5
1.2.4	Intrakrinologie .....	6
<b>1.3</b>	<b>17<math>\beta</math>-Hydroxysteroiddehydrogenasen .....</b>	<b>7</b>
1.3.1	Proteinfamilien der Hydroxysteroiddehydrogenasen.....	8
1.3.1.1	Short-Chain-Alkoholdehydrogenase-Familie .....	8
1.3.1.2	Aldo-Keto-Reduktase-Familie .....	8
1.3.2	Bekannte Mitglieder der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen .....	9
1.3.2.1	17 $\beta$ -HSD 1 .....	9
1.3.2.2	17 $\beta$ -HSD 2.....	10
1.3.2.3	17 $\beta$ -HSD 3.....	10
1.3.2.4	17 $\beta$ -HSD 4 (MFP-2).....	10
1.3.2.5	17 $\beta$ -HSD 5 (AKR1C3) .....	13
1.3.2.6	17 $\beta$ -HSD 6.....	18
1.3.2.7	17 $\beta$ -HSD 7.....	18
1.3.2.8	17 $\beta$ -HSD 8 (Ke6).....	19
1.3.2.9	17 $\beta$ -HSD 9.....	20
1.3.2.10	17 $\beta$ -HSD 10 (ERAB).....	20
1.3.2.11	17 $\beta$ -HSD 11 (Pan1b) .....	20
<b>1.4</b>	<b>Phytoestrogene .....</b>	<b>21</b>
1.4.1	Begriffsdefinition.....	21
1.4.2	Einfluss auf die menschliche Gesundheit .....	23
1.4.3	Biologische Verfügbarkeit.....	25
1.4.4	Mögliche Wechselwirkungen mit dem Hormonsystem .....	25
<b>2</b>	<b>AUFGABENSTELLUNG .....</b>	<b>27</b>

---

<b>3</b>	<b>MATERIAL .....</b>	<b>28</b>
<b>3.1</b>	<b>Verwendete Bakterienstämme.....</b>	<b>28</b>
<b>3.2</b>	<b>Verwendete Plasmide .....</b>	<b>28</b>
<b>3.3</b>	<b>Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Kits.....</b>	<b>28</b>
<b>3.4</b>	<b>Enzyme, Puffer, Antikörper .....</b>	<b>32</b>
<b>4</b>	<b>METHODEN .....</b>	<b>33</b>
<b>4.1</b>	<b>Bakterielle Techniken.....</b>	<b>33</b>
4.1.1	Nährmedien, Antibiotika.....	33
4.1.2	Kultivierung .....	33
4.1.3	Gefrierkulturen (Glycerinkulturen).....	33
4.1.4	Bestimmung des Bakterienwachstums.....	34
4.1.5	Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl-Methode).....	34
4.1.6	Transformation von Bakterien .....	34
<b>4.2</b>	<b>Weitere molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>35</b>
4.2.1	Präparation von Nukleinsäuren.....	35
4.2.1.1	Präparation von Plasmid-DNA .....	35
4.2.1.2	Präparation von RNA.....	35
4.2.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	36
4.2.3	Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren.....	36
4.2.3.1	Restriktion.....	36
4.2.3.2	Ligation.....	37
4.2.4	Agarosegelelektrophorese von DNA .....	37
4.2.5	Sequenzierung von Nukleinsäuren.....	38
4.2.6	Erststrangsynthese von cDNA .....	38
4.2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	38
4.2.7.1	Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente .....	39
4.2.7.2	Kolonie-PCR zur Identifizierung rekombinanter Plasmide .....	41
4.2.8	Reinigung von PCR-Produkten.....	41
4.2.9	Klonierung mit dem TA Cloning <sup>®</sup> Kit.....	41
4.2.10	Expressionsplasmide.....	42
<b>4.3</b>	<b>Klonierung der humanen 17<math>\beta</math>-HSD 7 .....</b>	<b>43</b>
4.3.1	Aufklärung der kodierenden Sequenz.....	43
4.3.2	Klonierung der kodierenden Sequenz in Expressionsvektoren .....	43

---

4.3.3	Aufklärung der genomischen Struktur .....	43
4.3.3.1	Screening einer humanen genomischen PAC-Bibliothek .....	43
4.3.3.2	Präparation und Sequenzierung genomischer DNA.....	45
4.3.3.3	Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen.....	45
4.3.3.4	Bestimmung der Introngrößen .....	45
4.3.4	Bestimmung der chromosomalen Lokalisation mittels eines Radiation Hybrid Panels.....	46
4.3.5	Bestimmung der Gewebeverteilung (RT-PCR) .....	47
<b>4.4</b>	<b>Expression, Reinigung und Analyse von GST-Fusionsproteinen .....</b>	<b>48</b>
4.4.1	Expression von GST-Fusionsproteinen.....	48
4.4.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen.....	48
4.4.2.1	Aufschluss des Bakterienpellets.....	48
4.4.2.2	Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen an GT-Sepharose .....	49
<b>4.5</b>	<b>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....</b>	<b>51</b>
4.5.1	Herstellen des SDS-Polyacrylamidgels.....	52
4.5.2	Probenvorbereitung.....	53
4.5.3	Laufbedingungen des SDS-Polyacrylamidgels.....	53
4.5.4	Färben und Trocknen des SDS-Polyacrylamidgels.....	53
<b>4.6</b>	<b>Bestimmung der Proteinkonzentration .....</b>	<b>53</b>
4.6.1	Vorbereitung von Proben- und Eichansätzen.....	54
4.6.2	Durchführung und Messung .....	54
<b>4.7</b>	<b>Westernblot-Analyse .....</b>	<b>54</b>
4.7.1	Blotten des SDS-Gels .....	55
4.7.2	Nachweis von Proteinen durch Antikörper.....	56
<b>4.8</b>	<b>Aktivitätsbestimmung der 17<math>\beta</math>-Hydroxysteroiddehydrogenasen .....</b>	<b>57</b>
4.8.1	Allgemeine Durchführung .....	57
4.8.1.1	Lösungen der Testsubstanzen .....	57
4.8.1.2	Vorversuche .....	58
4.8.1.3	Probenvorbereitung.....	58
4.8.1.4	Trennung der Steroide und Auswertung .....	59
4.8.1.5	Messbedingungen für 17 $\beta$ -HSD 4 und 5 .....	59
4.8.2	Inhibitionsmechanismus für die 17 $\beta$ -HSD 5.....	60
4.8.2.1	Einfluss der Cofaktorkonzentration .....	60
4.8.2.2	Kombination von Phytohormonen.....	60
4.8.3	Estradioldehydrogenaseaktivität von GST-17 $\beta$ -HSD7 .....	61
4.8.3.1	Herstellung des Bakterienlysats .....	61
4.8.3.2	Messbedingungen .....	61

---

4.8.4	Auswertung der Inhibitionsstudien .....	62
4.8.4.1	Berechnung der prozentualen Inhibition .....	62
4.8.4.2	Bestimmung der IC <sub>50</sub> -Werte .....	62
<b>5</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>63</b>
<b>5.1</b>	<b>Inhibitionsstudien .....</b>	<b>63</b>
5.1.1	Vorversuche und Systemoptimierung .....	63
5.1.2	Humane 17 $\beta$ -HSD 4 .....	63
5.1.2.1	Expressionskonstrukt .....	63
5.1.2.2	Expression und Aufreinigung .....	64
5.1.2.3	Inhibition der Estradioldehydrogenase-Aktivität .....	64
5.1.2.4	Flavonoide: Struktur-Wirkungsbeziehungen .....	68
5.1.3	Humane 17 $\beta$ -HSD 5 (AKR1C3).....	69
5.1.3.1	Klonierung des Expressionskonstruktes .....	69
5.1.3.2	Expression und Aufreinigung .....	69
5.1.3.3	Inhibition durch Phytoestrogene .....	70
5.1.3.4	IC <sub>50</sub> -Werte der oxidativen und reduktiven Aktivitäten .....	75
5.1.3.5	Flavonoide: Struktur-Wirkungsbeziehungen .....	76
5.1.3.6	Spezielle Rolle der Glycyrrhetinsäure .....	78
5.1.3.7	Untersuchungen zum Inhibitionsmechanismus.....	78
<b>5.2</b>	<b>Humane 17<math>\beta</math>-HSD 7.....</b>	<b>81</b>
5.2.1	Ausgangssituation .....	81
5.2.2	Aufklärung der kodierenden Sequenz.....	81
5.2.3	Charakterisierung der genomischen Struktur.....	85
5.2.3.1	Isolierung genomischer Klone .....	85
5.2.3.2	Exonpositionen .....	86
5.2.3.3	Introngrößen.....	87
5.2.3.4	Exon-Intronorganisation .....	87
5.2.4	Chromosomale Lokalisation .....	89
5.2.5	Gewebeverteilung .....	90
5.2.6	Aktivitätsmessungen und Aufreinigungsversuche .....	91
5.2.6.1	Aktivität im Bakterienlysat .....	91
5.2.6.2	Aufreinigungsexperimente und Aktivitätsbestimmungen.....	93
<b>6</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>96</b>
<b>6.1</b>	<b>Inhibitionsstudien an humanen 17<math>\beta</math>-HSDs.....</b>	<b>96</b>
6.1.1	Wahl des <i>in vitro</i> -Systems .....	96
6.1.2	Konzentration der Phytoestrogene .....	97



---

6.1.3	Stärkste Inhibitoren .....	98
6.1.4	Struktur-Wirkungsbeziehung .....	98
6.1.4.1	Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 4.....	98
6.1.4.2	Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 5.....	101
6.1.5	Medizinische Bedeutung.....	104
6.1.5.1	Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 4.....	104
6.1.5.2	Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 5.....	106
6.1.6	Bedeutung der Phytoestrogene für das humane Hormonsystem.....	108
<b>6.2</b>	<b>Humane 17<math>\beta</math>-HSD 7.....</b>	<b>110</b>
6.2.1	Primärstruktur des Enzyms .....	110
6.2.2	Phylogenetische Studien .....	111
6.2.3	Sekundär- und Tertiärstruktur.....	111
6.2.4	Gewebeverteilung des Enzyms .....	112
6.2.5	Funktionen des Enzyms .....	114
6.2.6	Chromosomale Lokalisation – Implikationen für die Pathologie .....	116
<b>6.3</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b>EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN .....</b>	<b>133</b>
<b>9</b>	<b>ANHANG .....</b>	<b>134</b>
<b>9.1</b>	<b>Sequenzierung des genomischen Klons von h17<math>\beta</math>-HSD 7.....</b>	<b>134</b>
<b>9.2</b>	<b>Bestimmung der Introngrößen von h17<math>\beta</math>-HSD 7.....</b>	<b>135</b>

---

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Kontrolle biologischer Prozesse

### 1.1.1 Bedeutung von Hormonen

In höher entwickelten Lebewesen übernehmen Zellvereinigungen in Form von Organen definierte Aufgaben und Funktionen. Das Zusammenspiel von Zellen und ganzen Geweben wird über Hormone koordiniert. Anhand ihrer chemischen Natur lassen sich diese Botenstoffe in verschiedene Gruppen unterteilen: Peptid- oder Proteinhormone, Steroidhormone, mit Aminosäuren verwandte Signalstoffe und von Fettsäuren abgeleitete Substanzen. Durch Hormone werden unterschiedlichste Körperfunktionen gesteuert. Dazu gehören Wachstum und Differenzierung, schnelle Umstellungen des Stoffwechsels, Steuerung des Gastrointestinaltraktes, Regulation des Wasser- und Elektrolythaushaltes sowie die Reproduktion.

### 1.1.2 Signalübermittlung durch Hormone

Hormone vermitteln innerhalb eines physiologischen Systems Signale von einem Ort zum anderen. Dabei können verschiedene Wege der Übertragung ablaufen.

- **endokrine Signalübermittlung:** Der von einer endokrinen Drüse (Ansammlung sezernierender Zellen) abgegebene Botenstoff gelangt über die Blutbahn zum weiter entfernten Zielorgan.
- **parakrine Signalübermittlung:** Der von der sezernierenden Zelle freigesetzte Signalstoff wirkt auf die benachbarte Zielzelle.
- **autokrine Signalübermittlung:** Die von der produzierenden Zelle gebildeten Hormone wirken auf die Zelle selbst zurück.
- **intrakrine Signalübermittlung** (F. Labrie, 1991): Ein Vorläufer des aktiven Steroidhormons wird von der Nebenniere ausgeschüttet, gelangt über die Blutbahn zum Zielorgan. Dort wird die Substanz mittels entsprechendem Enzymapparat zum aktiven Signalstoff umgewandelt. Dieser wirkt dann wiederum auf das Zielorgan zurück (Näheres im Kapitel 1.2.4).

### 1.1.3 Klassischer molekularer Mechanismus der Hormonwirkung

Der klassische Mechanismus der Hormonwirkung setzt die Bindung an einen speziellen Hormonrezeptor voraus. Dabei können zwei Rezeptortypen unterschieden werden:

- **intrazelluläre Hormonrezeptoren:** Zur Signalübermittlung muss der lipophile Ligand (z. B. ein Steroidhormon) die Zellmembran passieren. Bei den intrazellulären Rezeptoren handelt es sich um ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Der Hormon-Rezeptor-Komplex steuert die Expression hormonresponsiver Gene. Darauf wird detailliert im Kapitel 1.2.3 hingewiesen.
- **Plasmamembranrezeptoren:** Durch die extrazelluläre Bindung des Hormons (z. B. Peptid- oder Proteinmolekül) an den membranständigen Rezeptor werden intrazelluläre Signale (sogenannte sekundäre Botenstoffe) erzeugt. Zu den Membranrezeptoren gehören G-Protein-gekoppelte Rezeptoren, Tyrosin- und Cytokinrezeptoren. Die Signalweiterleitung erfolgt ganz allgemein durch Phosphorylierungskaskaden, welche die Aktivierung oder Inaktivierung von Enzymen, Rezeptoren und Transkriptionsfaktoren bedingen. Dadurch wird die Expression verschiedener Hormone reguliert.

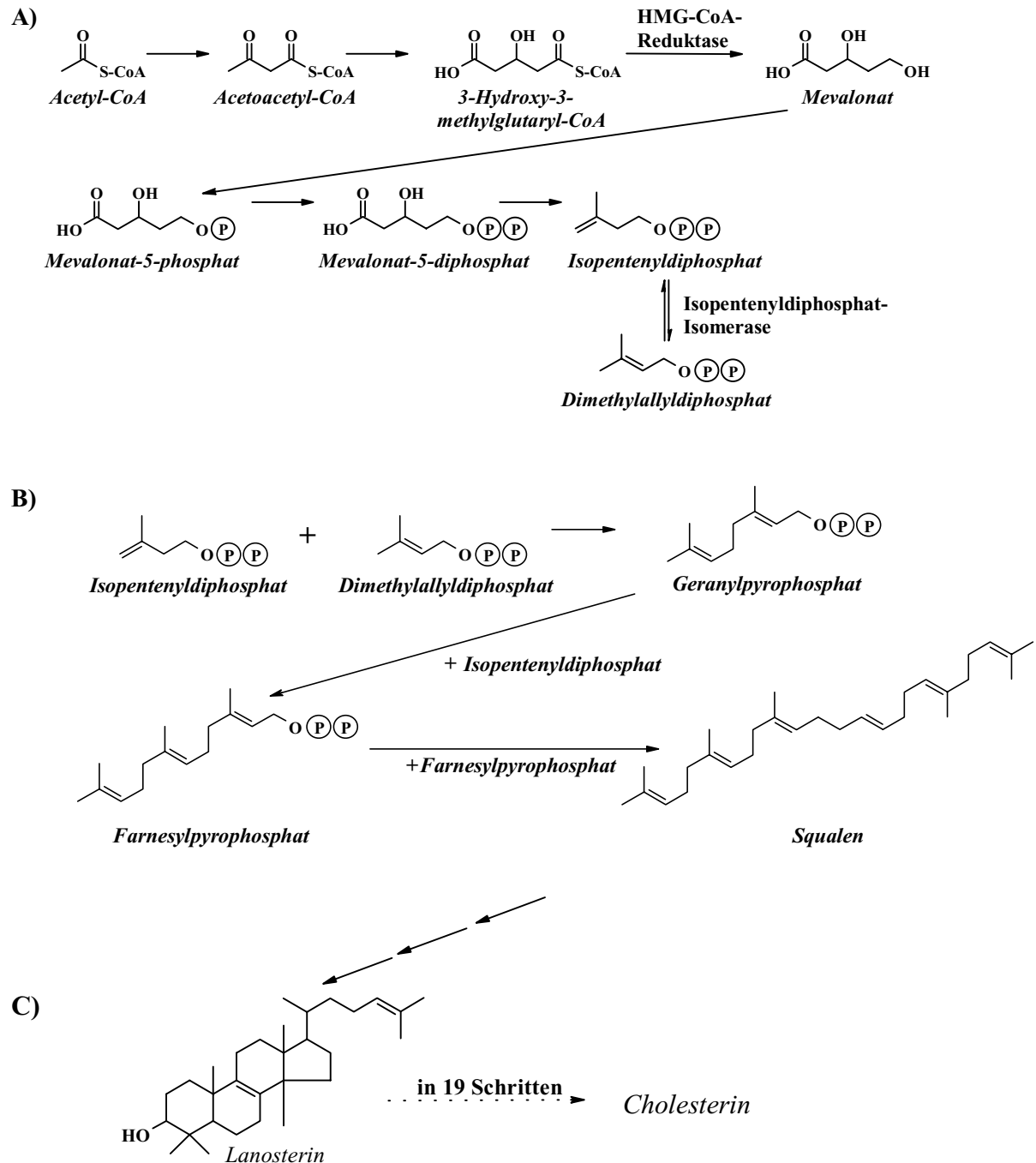
Im Hinblick auf die Steuerung eines Organismus über Signalkaskaden, welche die Genexpression regulieren, darf der Einfluss von Nahrungskomponenten nicht vernachlässigt werden. Organismen reagieren auf die Veränderung von Aufnahme und Zusammensetzung der Nahrung mit Anpassung des Metabolismus an die Gegebenheiten, indem sie die Expression genetischer Information ändern. Aus diesem Grund ist auch davon auszugehen, dass Nahrungsbestandteile in das die Genexpression kontrollierende Hormonsystem eingreifen.

## 1.2 Steroidhormone

### 1.2.1 Synthese der Steroidhormone

Steroidhormone besitzen eine tetrazyklische Struktur und werden von ihrem gemeinsamen Vorläufer Cholesterin abgeleitet. Alle diese Stoffe gehören zu den Terpenen, beziehungsweise den Terpenoiden.

Ausgangssubstanz des Cholesterins ist das Acetat, welches zunächst in Isopren umgewandelt wird. Die C<sub>5</sub>-Untereinheiten werden zum linearen Vorläufer des Cholesterins, dem Squalen, kondensiert. Durch eine Zyklisierungsreaktion wird letzteres zum Lanosterin umgewandelt.



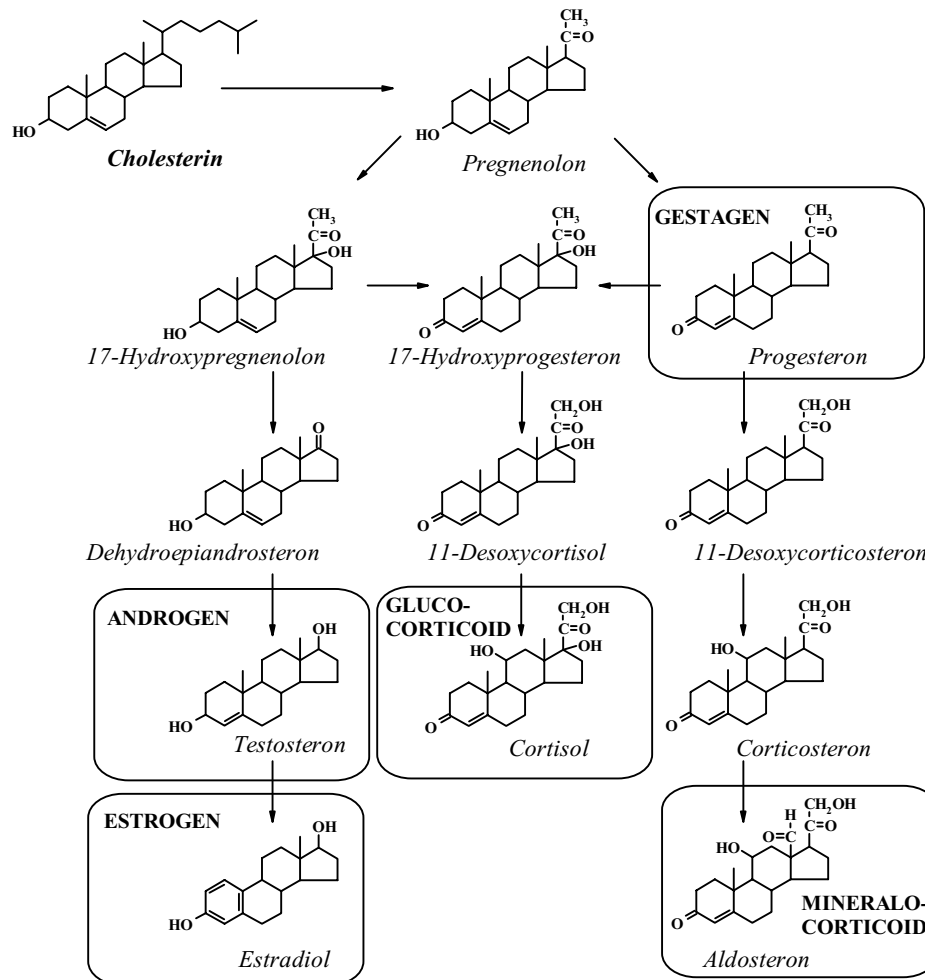
**Abb. 1.1: Cholesterinsynthese**

Die Abbildung zeigt eine Übersicht über die bei Eukaryoten ablaufende Synthese von Cholesterin. Von den beteiligten Enzymen sind nur einzelne Vertreter angegeben.

- Aufbau der C<sub>5</sub>-Untereinheiten nach dem Mevalonat-Syntheseweg
- Kondensation von 6 Isopreneinheiten zum linearen Squalen
- Nach Zyklisierung gebildetes Lanosterin wird in 19 Einzelschritten zu Cholesterin umgewandelt.

## 1.2.2 Steroidhormonklassen und deren Funktionen

Vom Cholesterin leiten sich 5 verschiedene Klassen von Steroidhormonen ab, welche im Körper unterschiedliche physiologische Funktionen kontrollieren.



**Abb. 1.2: Übersicht der letzten Stufen der Steroidsynthese**

Die Synthese aller 5 Klassen der funktionell verschiedenen Steroidhormone geht vom Cholesterin aus, welches über die Nahrung aufgenommen oder im Körper selbst synthetisiert wird.

Zu den **fünf Hauptklassen** der Steroidhormone gehören:

- **Glucocorticoide:** Sie werden in der Nebennierenrinde synthetisiert, beeinflussen Protein-, Lipid-, Kohlenhydratstoffwechsel und kontrollieren Entzündungsprozesse.
- **Mineralocorticoide:** Diese Nebennierenhormone kontrollieren den Wasser- und Elektrolythaushalt sowie den Blutdruck.
- **Sexualhormone:**
  - **Androgene:** Sie werden beim Mann hauptsächlich im Testis synthetisiert, steuern die Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsorgane und kontrollieren die Spermatogenese.

- **Estrogene:** Bei der Frau entstehen diese Sexualhormone hauptsächlich in den Ovarien. Sie steuern in diesem Geschlecht die Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale und kontrollieren zusammen mit dem Gestagen Progesteron den weiblichen Menstruationszyklus.
- **Gestagene:** Bedeutendster Vertreter ist das Progesteron, das im Ovar und auch in der Plazenta gebildet wird. Neben der Regulation des Menstruationszyklus ist dieses Gestagen auch für die Aufrechterhaltung der Schwangerschaft zuständig.

### 1.2.3 Wirkungsweise von Steroidhormonen

Nach dem klassischen Mechanismus (Übersichtsartikel: M. Beato & J. Klug, 2000) gelangt das an ein Transportprotein (z. B. steroidhormonbindendes Globulin SHBG oder Albumin) gebundene Steroidhormon über die Blutbahn zu seinem Zielgewebe. Nach erfolgter Diffusion durch die Zellwand bindet das Hormon an die Ligandenbindungsdomäne seines zytosolischen Rezeptors. Durch die Bindung des Steroids dissoziiert das Begleitprotein des Rezeptors (beispielsweise das Hitzeschockprotein Hsp70) ab und ermöglicht so eine Rezeptordimerisierung. Der Hormon-Rezeptor-Komplex wird in den Zellkern transloziert, wo er an die Promotorregion seiner Zielgene bindet und deren Expression verändert.

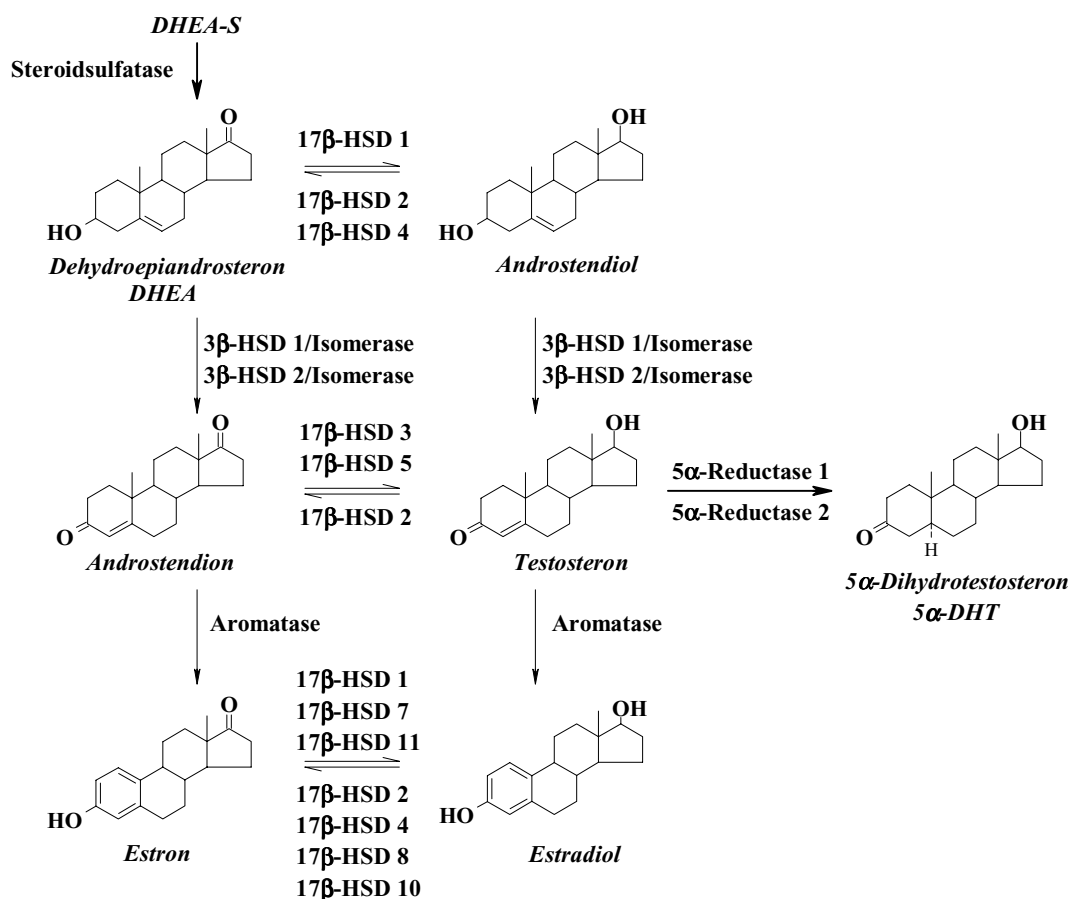
In letzter Zeit immer häufiger beobachtete, schnelle Steroideffekte lassen sich nicht mit diesem molekularen Mechanismus erklären. Für einige Steroide lassen sich schon innerhalb weniger Sekunden oder Minuten nach ihrer Verabreichung Hormonantworten erzielen, die nur mit nicht-genomischen Mechanismen zu erklären sind. Es werden drei Wirkungsweisen diskutiert (P. Tuohimaa *et al.*, 1996, Übersichtsartikel: M. Wehling, 1997):

1. Unspezifische Einflüsse auf die Fluidität von Membranen, bedingt durch den lipophilen Charakter der Steroidhormone (D. W. Brann *et al.*, 1995).
2. Signaltransduktion über einen membranständigen Rezeptor. Für Estradiol (T. C. Pappas *et al.*, 1995), Progesteron (J. P. Blondeau & E. E. Baulieu, 1984) und Corticosteron (A. C. Towle & P. Y. Sze, 1983) wurden bereits entsprechende Plasmamembranrezeptoren beschrieben.
3. Bindung und Signalübermittlung durch einen membranständigen Neurotransmitterrezeptor wie beispielsweise GABA<sub>A</sub>.

## 1.2.4 Intrakrinologie

Die Steroidhormonsynthese bei Menschen und Primaten ist innerhalb der Säugetiere einzigartig. In niedrigeren Säugetierarten (z. B. Maus, Ratte, Meerschweinchen, d. h. in typischen Tiermodellen) dienen ausschließlich die Gonaden als Syntheseorte von Androgenen und Estrogenen. Die Hormone werden von diesen Drüsen sezerniert und gelangen über die Blutbahn zum peripheren Zielgewebe.

Bei höheren Säugern werden jedoch von der Nebennierenrinde große Mengen inaktiver Vorläufersteroiden, wie Dehydroepiandrosteron DHEA, dessen Sulfat DHEA-S und Androstendion ins Blut abgegeben und erst im peripheren Zielgewebe in aktive Androgene und Estrogene umgewandelt (Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 1997; F. Labrie *et al.*, 2000). Dieser als „Intrakrinologie“ (F. Labrie, 1991) beschriebene Wirkungsmechanismus ermöglicht den Zielgeweben autonome Kontrolle und Einstellung des Hormongehaltes entsprechend den lokalen Begebenheiten.



**Abb. 1.3:** Vielfalt der steroidmetabolisierenden Enzyme

Biosynthese von aktivem Androgen 5α-DHT und Estrogen Estradiol aus den inaktiven Vorläufern DHEA-S, DHEA und Androstendion unter Angabe der beteiligten Enzyme (A. Krazeisen *et al.*, 1999; Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 2000; J. Fomitcheva *et al.*, 1998; X. Y. He *et al.*, 1999; K. X. Li *et al.*, 1998). Gleiche Reaktionen können durch verschiedene Enzyme katalysiert werden.

An der Synthese des biologisch aktiven Androgens Dihydrotestosteron DHT und des Estrogens Estradiol aus den inaktiven Vorläufern sind verschiedene Enzymaktivitäten beteiligt. Wie in Abbildung 1.3 zu erkennen, werden  $3\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-/ $\Delta^5$ - $\Delta^4$ -Isomerase-,  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenase-,  $5\alpha$ -Reduktase- und Aromataseaktivität benötigt.

Die Bedeutung der Intrakrinologie wurde anhand zahlreicher klinischer Beobachtungen deutlich. Bei Prostatakrebs wird häufig eine Entfernung des Testis oder eine chemische Kastration durchgeführt. Durch diese Behandlung konnte die Testosteronkonzentration im Serum der Patienten um bis zu 95 % reduziert werden. Trotz fehlender Androgensynthese in den Gonaden wurde in der Prostata lediglich ein Rückgang der  $5\alpha$ -DHT-Konzentration auf 50 % beobachtet (F. Labrie *et al.*, 1985b), was sich nur durch eine intrakrine Wirkungsweise der Androgene erklären lässt (F. Labrie *et al.*, 1985b).

Es wird vermutet, dass beim Mann in peripheren Geweben zwischen 30 – 50 % der Androgene aus Vorläufersubstanzen synthetisiert werden. Bei Frauen wird diese „vor-Ort-Synthese“, speziell nach der Menopause, als weitaus bedeutender angesehen (F. Labrie *et al.*, 1985a; F. Labrie, 1991).

In diesem Zusammenhang muss erwähnt werden, dass 40 % aller Krebsarten, dabei vor allem Prostata-, Brust-, Ovar- und Uteruskrebs als steroidhormonkontrolliert und damit –sensitiv gelten. Aus diesem Grund spielen die an der intraktrinen Synthese von Hormonen beteiligten Enzyme eine wesentliche Rolle bei der Entstehung, Entwicklung und Beeinflussung dieser Krebsarten (F. Labrie *et al.*, 2000).

### 1.3 $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen

Bei den Enzymen, welche für die Aktivierung und Inaktivierung von Androgenen und Estrogenen verantwortlich sind, handelt es sich um  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen ( $17\beta$ -HSDs). Sie katalysieren Oxidations- oder Reduktionsvorgänge an der Position 17 von Sexualhormonen und sorgen somit für die Umsetzung von 17-Ketosteroiden in ihre 17-Hydroxysterioide und umgekehrt. Da Estrogene und Androgene in ihrer 17-Hydroxyform die höchste Bindungsaffinität zu ihren intrazellulären Rezeptoren zeigen, kontrollieren damit die  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen die biologische Aktivität dieser Sexualhormone (Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 1997; H. Peltoketo *et al.*, 1999a).



Inzwischen sind in verschiedenen Spezies zahlreiche 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasentypen bekannt. Sie unterscheiden sich in ihrer zellspezifischen Expression, Substratspezifität und Regulation. Ihre Nomenklatur richtet sich nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung (Übersichtsartikel: J. Adamski & F. Jakob, 2001).

### **1.3.1 Proteinfamilien der Hydroxysteroiddehydrogenasen**

Die Hydroxysteroiddehydrogenasen gehören jeweils zu einer von zwei großen Proteinfamilien, den Short-Chain-Alkoholdehydrogenasen (SCAD) oder den Aldo-Keto-Reduktasen (AKR).

#### **1.3.1.1 Short-Chain-Alkoholdehydrogenase-Familie**

Zur Familie der Short-Chain-Alkoholdehydrogenasen gehören Enzyme unterschiedlichster Substratspezifität, welche untereinander lediglich eine Aminosäureidentität von circa 25 % besitzen.

Trotz der relativ geringen Übereinstimmung in ihrer Primärstruktur finden sich bei allen Familienvertretern drei stark konservierte Strukturmerkmale (B. Persson *et al.*, 1991; H. Jornvall *et al.*, 1995; Übersichtsartikel: T. M. Penning *et al.*, 1997): Eine im N-terminalen Bereich befindliche Nukleotidbindungsstelle, die ein konserviertes Glycin-reiches Motiv (**GXXXGXXG**) aufweist, das NAG-Motiv (**DXXXXNAG**) mit noch ungeklärter Bedeutung und das die konservierten Reste Tyrosin bzw. Lysin beinhaltende aktive Zentrum (**YXXXXK**).

Alle monomeren SCAD-Mitglieder bestehen aus rund 250 Aminosäuren und sind aus siebenfachen, parallelen  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut, welche auf beiden Seiten von je drei  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Charakteristisch ist die Rossmann-Falte (M. G. Rossmann *et al.*, 1974), die für die Bindung des Cofaktors benötigt wird (Übersichtsartikel: T. M. Penning *et al.*, 1997).

#### **1.3.1.2 Aldo-Keto-Reduktase-Familie**

Die große Familie der Aldo-Keto-Reduktasen (K. M. Bohren *et al.*, 1989) beinhaltet zahlreiche Oxidoreduktasen, welche ein breites Substratspektrum zeigen, aber im Gegensatz zu den SCAD-Mitgliedern relativ hohe Aminosäureidentität untereinander besitzen. 1997 wurde ein spezielles Nomenklatorsystem für diese Enzymfamilie entwickelt (J. M. Jez *et al.*, 1997b), deren Einteilung sich nach der prozentualen Übereinstimmung der Aminosäuresequenz richtet. Zum heutigen Zeitpunkt konnten dieser Großfamilie 105 Proteine

in 12 Familien zugeordnet werden. Weitere 125 Proteine gelten als potentielle AKR-Mitglieder (J. M. Jez & T. M. Penning, 2001).

Die Sekundär- und Tertiärstruktur der AKR-Proteine ist in groben Zügen konserviert. Dabei bauen acht  $\alpha/\beta$ -Einheiten eine fassförmige Struktur auf. Die  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblätter sind dabei alternierend angeordnet (T. M. Penning *et al.*, 1997; T. M. Penning, 1999). Auf der Rückseite dieser Struktur sind drei große Proteinschleifen, die A-, B- und C-Loops, angeordnet. Diese sind flexibel und können ihre Position nach erfolgter Substratbindung verändern (T. M. Penning, 1999). Die Cofaktoranlagerung erfolgt über einen geladenen Bereich in Form eines „Sicherheitsgurtes“ (T. M. Penning *et al.*, 1997), der die Bindung des Pyridinphosphatrestes bedingt, so dass der Cofaktor senkrecht zur Fassstruktur positioniert wird.

Alle Mitglieder der AKR-Proteinfamilie zeigen eine konservierte katalytische Tetrade aus den Aminosäuren Asp50, Tyr55, Lys84 und His117. Die Nummerierung richtet sich nach der zuerst beschriebenen humanen  $3\alpha$ -HSD 1 (M. Khanna *et al.*, 1995; Übersichtsartikel: T. M. Penning *et al.*, 1997; J. M. Jez *et al.*, 1997a). Alle vier Aminosäuren nehmen an der Umsetzung teil, wobei Tyr55 als wichtigster Säure/Base-Katalysator auftritt (B. P. Schlegel *et al.*, 1998; T. M. Penning, 1999).

### **1.3.2 Bekannte Mitglieder der $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen**

Die innerhalb dieser Arbeit näher untersuchten  $17\beta$ -HSD-Typen ( $17\beta$ -HSD 4, 5 und 7) sind entsprechend detaillierter beschrieben.

Sofern Krankheitsbilder bekannt sind, welche durch Mutationen in den menschlichen  $17\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen bedingt sind, ist dies im jeweiligen Kapitel angegeben.

#### **1.3.2.1 $17\beta$ -HSD 1**

Die der SCAD-Familie zugehörige  $17\beta$ -HSD 1 wurde aus Plazenta isoliert (H. Peltoketo *et al.*, 1988). Das zytosolische Protein katalysiert im Ovar in den Granulosazellen sich entwickelnder Follikel (Y. Tremblay *et al.*, 1989; S. Ghersevich *et al.*, 1994; C. Sawetawan *et al.*, 1994) die Synthese von Estradiol aus Estron (M. Dumont *et al.*, 1992; S. X. Lin *et al.*, 1992; H. Peltoketo *et al.*, 1999b; Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 2000). Das humane Enzym findet sich zudem auch in der Plazenta (P. Nokelainen *et al.*, 1996; L. A. Akinola *et al.*, 1997) und sorgt dort für die Estradiolsynthese während der letzten beiden Drittel der Schwangerschaft (N. Fournet-Dulguerov *et al.*, 1987; H. Peltoketo *et al.*, 1999b). Geringere

Mengen dieses Enzyms sind auch in den epithelialen Zellen der Brust zu finden (M. M. Miettinen *et al.*, 1996).

### 1.3.2.2 17 $\beta$ -HSD 2

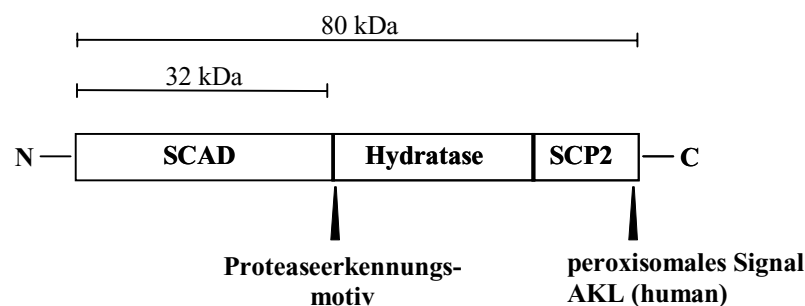
Die der SCAD-Proteinfamilie zugehörige 17 $\beta$ -HSD 2 ist ein an der Membran des endoplasmatischen Reticulums assoziiertes Enzym (L. Wu *et al.*, 1993). Das in Leber, Dünndarm, Endometrium, Plazenta, Uterus und Urinaltrakt exprimierte Protein (M. L. Casey *et al.*, 1994; N. Moghrabi *et al.*, 1997) spielt eine wichtige Rolle bei der Hormoninaktivierung (S. Andersson *et al.*, 1995). Es inaktiviert Testosteron, 5 $\alpha$ -DHT und Estradiol durch Oxidation in ihre weniger stark hormonell wirksamen 17-Ketosteroide Androstendion, Androstandion und Estron (L. Wu *et al.*, 1993; Übersichtsartikel: H. Peltoketo *et al.*, 1999a; T. M. Penning, 1997) und scheint auf diese Weise die Gewebe vor exzessiver Hormonaktivität zu bewahren (Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 2000).

### 1.3.2.3 17 $\beta$ -HSD 3

Die 17 $\beta$ -HSD 3 gehört ebenfalls zur SCAD-Proteinfamilie. Sie ist in Mikrosomen lokalisiert und am Androgenstoffwechsel beteiligt (W. M. Geissler *et al.*, 1994). Das Enzym wird ausschließlich im Testis exprimiert und katalysiert dort die Testosteronsynthese durch die Reduktion von Androstendion (S. Andersson *et al.*, 1995). Eine defekte oder fehlende h17 $\beta$ -HSD 3 verursacht beim Mann Pseudohermaphroditismus (W. M. Geissler *et al.*, 1994), Frauen dagegen sind asymptotisch (B. B. Mendonca *et al.*, 1999).

### 1.3.2.4 17 $\beta$ -HSD 4 (MFP-2)

Die 17 $\beta$ -HSD 4 ist innerhalb der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen einzigartig, da sie aus drei funktionell unterschiedlichen Domänen aufgebaut ist.



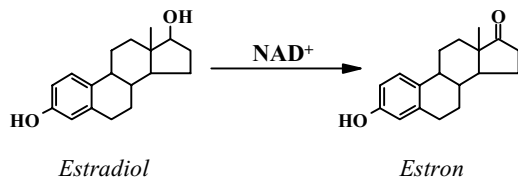
**Abb. 1.4: Funktionelle Domänen der 17 $\beta$ -HSD 4**

Die 17 $\beta$ -HSD 4 besteht aus 3 Domänen unterschiedlicher Funktionen. Das Protein ist schematisch dargestellt. Die Abbildung ist maßstabsgetreu.

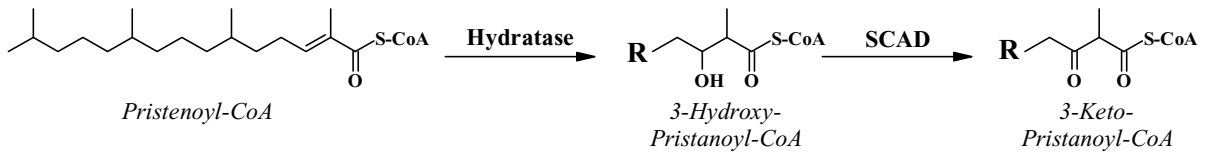
Das ursprünglich aus porcinem Endometrium isolierte Enzym (J. Adamski *et al.*, 1992) besteht aus einer Dehydrogenase-, einer Hydratase- und einer Sterol carrier protein 2 (SCP2)-Domäne (F. Leenders *et al.*, 1994a; F. Leenders *et al.*, 1994b; Übersichtsartikel: G. Möller *et al.*, 2001).

Der C-Terminus beinhaltet ein peroxisomales Zielsignal (peroxisomal targeting signal PTS1), sodass das Enzym über den PTS1-Rezeptor Pex5p (M. Fransen *et al.*, 1998; G. Möller *et al.*, 1999) in Peroxisomen transportiert wird. In diesen Organellen wird das Protein teilweise zwischen der SCAD- und der Hydratasedomäne gespalten (J. Adamski *et al.*, 1992; M. Markus *et al.*, 1995; L. L. Jiang *et al.*, 1997a; L. L. Jiang *et al.*, 1997b).

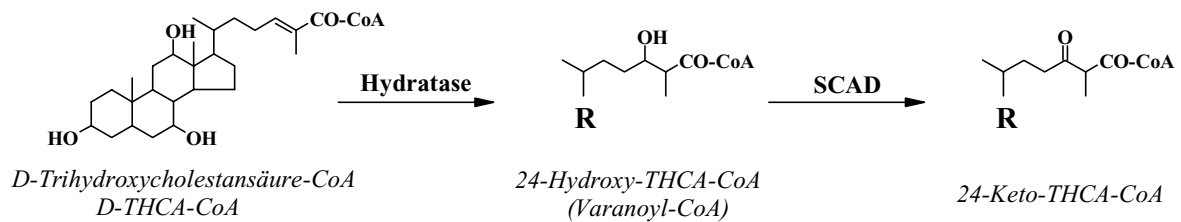
**Estradioldehydrogenase-Aktivität (SCAD)**



**β-Oxidation von Fettsäuren (Hydratase; SCAD)**



**Gallensäuresynthese (Hydratase; SCAD)**



**Abb. 1.5: Katalytische Aktivitäten der 17β-HSD 4**

Alle drei Domänen des Enzyms übernehmen unterschiedliche Aufgaben. Die Beteiligung der Dehydrogenase- und Hydratasedomäne an der Estradiolinaktivierung, sowie an den einzelnen Schritten der β-Oxidation von Fettsäuren und an der Gallensäuresynthese ist jeweils angegeben.

Das Gesamtprotein und der abgespaltene, 32 kDa große N-Terminus zeigen Estradioldehydrogenase-Aktivität (F. Leenders *et al.*, 1996). Es konnte eine Oxidation von Estradiol und damit eine Inaktivierung des Estrogens beobachtet werden (F. Leenders *et al.*, 1996).

Die N-terminale Domäne besitzt des Weiteren D-spezifische 3-Hydroxyacyl-CoA-Dehydrogenase-Aktivität (F. Leenders *et al.*, 1996), welche zusammen mit der 2-Enoyl-CoA-Hydrataseaktivität der zentralen Domäne an der peroxisomalen  $\beta$ -Oxidation beteiligt ist (M. Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1996; M. Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1997a; M. Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1997b). Dabei werden sehr langkettige Fettsäuren, wie Lignocerinsäure (C 24:0) oder Cerutinsäure (C 26:0) und verzweigte Fettsäuren, wie beispielsweise Pristansäure, umgesetzt. Auch eine Beteiligung an der Gallensäuresynthese (M. Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1997a; M. Dieuaide-Noubhani *et al.*, 1996; P. P. Van Veldhoven, 1998; P. P. Van Veldhoven & G. P. Mannaerts, 1999) wurde beschrieben.

Der C-Terminus zeigt hohe Übereinstimmung mit dem Sterol Carrier Protein 2 (SCP2), das am intrazellulären Transport von Sterolen und Fettsäuren beteiligt ist (F. Leenders *et al.*, 1996; J. T. Billheimer *et al.*, 1990; U. Seedorf & G. Assmann, 1991; U. Seedorf *et al.*, 1994; S. M. Pfeifer *et al.*, 1993). Ein Transport von 7-Dehydrocholesterol und Phosphatidylcholin konnte *in vitro* beobachtet werden (U. Seedorf *et al.*, 1995).

Die humane 17 $\beta$ -HSD 4 scheint nahezu ubiquitär zu sein. Sie konnte in großen Mengen in Leber, Herz, Prostata und Testis, in geringeren Konzentrationen in Lunge, Niere, Skelettmuskel, Pankreas, Thymus, Ovar, Darm, Gehirn, Milz und einigen Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden (J. Adamski *et al.*, 1995). In einigen Geweben wurde jedoch eine zellspezifische Verteilung festgestellt. So wurde das Enzym im Gehirn nur in Purkinje-Zellen, in der Lunge nur in Bronchialepithelzellen und im Uterus nur im luminalen und glandulären Epithelium nachgewiesen (M. Kaufmann *et al.*, 1995; G. Möller *et al.*, 1999; Übersichtsartikel: Y. de Launoit & J. Adamski, 1999).

Aufgrund der Multifunktionalität dieser Hydroxysteroiddehydrogenase wurde der Typ 4 von zahlreichen Forschergruppen unter verschiedenen Gesichtspunkten studiert und erhielt damit auch vielerlei Bezeichnungen, z. B. MFP-2 oder D-BP (Übersichtsartikel: Y. de Launoit & J. Adamski, 1999).

Durch Mutationen der h17 $\beta$ -HSD 4 bedingte Krankheitsbilder gehören in die große Gruppe der peroxisomalen Störungen (Übersichtsartikel: G. Möller *et al.*, 2001) und wirken sich mit neurologischen Störungen und Veränderungen im Lipidmetabolismus aus (Übersichtsartikel: G. Möller *et al.*, 2001). Die Patienten zeigen hohe Konzentrationen an langkettigen Fettsäuren im Plasma und in kultivierten Fibroblasten (L. L. Jiang *et al.*, 1997a; Y. Suzuki *et al.*, 1997;

E. G. van Grunsven *et al.*, 1998; E. G. van Grunsven *et al.*, 1999a; E. G. van Grunsven *et al.*, 1999b), sowie eine Akkumulation von verzweigten Fettsäuren und Gallensäuren (Y. Suzuki *et al.*, 1997; E. G. van Grunsven *et al.*, 1998). Die Betroffenen sterben meist noch im ersten Lebensjahr.

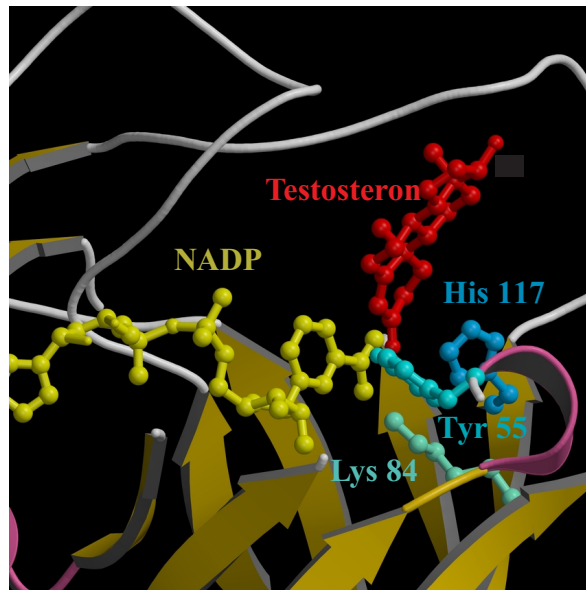
### 1.3.2.5 17 $\beta$ -HSD 5 (AKR1C3)

1997 wurde aus einer humanen cDNA-Bibliothek der Prostata die cDNA einer 3 $\alpha$ -HSD isoliert, kloniert und exprimiert. Das rekombinante Enzym reduzierte 5 $\alpha$ -DHT zu 3 $\alpha$ -Androstandiol (H. K. Lin *et al.*, 1997). Es zeigte des Weiteren eine 17 $\beta$ -HSD-Aktivität und oxidierte 3 $\alpha$ -Androstandiol zu Androsteron und setzte dieses weiter mittels 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität zu 5 $\alpha$ -Androstan-3,17-dion um (H. K. Lin *et al.*, 1997). Aufgrund der deutlichen Expression in der Prostata wurde dem Enzym eine wichtige Rolle beim dortigen Androgenabbau und damit bei der Protektion vor zu hohem Hormongehalt beigemessen (H. K. Lin *et al.*, 1997).

Kinetische Studien mit dem rekombinanten Enzym zeigten eine Favorisierung der 17 $\beta$ - gegenüber der 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität (H. K. Lin *et al.*, 1997). Das Enzym wurde entsprechend der Chronologie als h17 $\beta$ -HSD 5 bezeichnet.

Diese Aldo-Keto-Reduktase zeigte 99,4 % Aminosäureidentität (Sequenzunterschiede bei den Aminosäuren 75, 175) mit der bekannten Aldo-Keto-Reduktase h3 $\alpha$ -HSD 2 (M. Khanna *et al.*, 1995) und wurde anhand der für alle AKR entwickelten Nomenklaturregeln als mit diesem Enzym identisch erklärt (J. M. Jez *et al.*, 1997b; F. Labrie *et al.*, 1997; I. Dufort *et al.*, 1999). Bestätigung der Identität zeigte eine gezielte Mutagenese der in der h17 $\beta$ -HSD 5-Sequenz abweichenden Aminosäuren. Die damit exprimierte h3 $\alpha$ -HSD 2 zeigte identische Enzymeigenschaften (I. Dufort *et al.*, 1999). Das Enzym erhielt innerhalb der AKR-Nomenklatur die Bezeichnung AKR1C3.

Die 17 $\beta$ -HSD 5 ist damit die einzige aller bisher bekannten 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen, welche zu den AKR gehört und zeigt auch das charakteristische katalytische Zentrum (Abb. 1.6).



**Abb. 1.6: Aktives Zentrum der h17β-HSD 5**

Als Mitglied der AKR-Familie besitzt die h17β-HSD die konservierte katalytische Tetrade von Aminosäuren (Asp50, Tyr55, Lys84 und His117). Die Struktur der h17β-HSD 5 wurde durch Homologie-Modelling mittels des SWISS-MODEL- Servers (N. Guex & M. C. Peitsch, 1997) unter Verwendung der Röntgenstruktur der 3α-HSD (M. J. Bennett *et al.*, 1997) ermittelt. Übernommen aus: A. Krazeisen *et al.*, 2001.

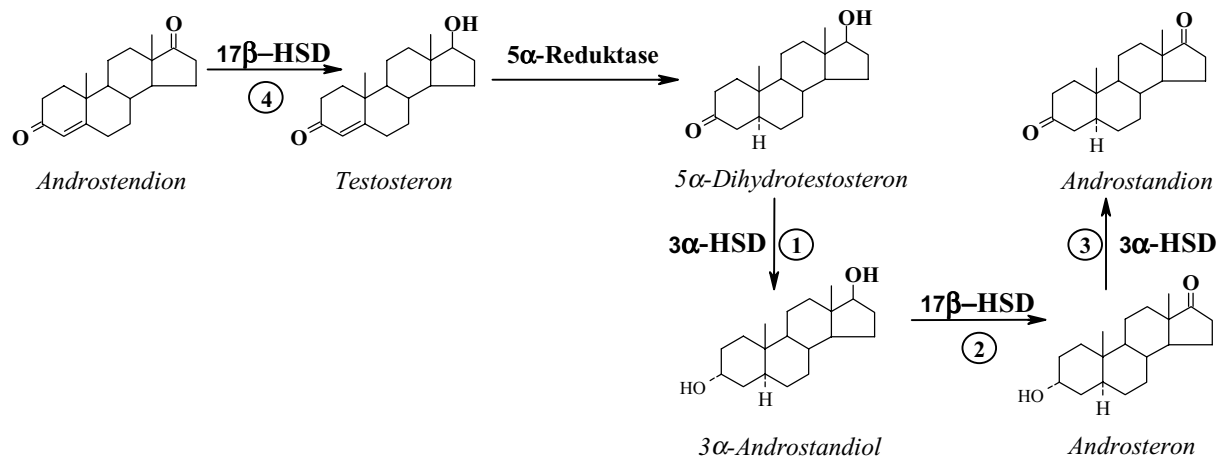
Charakterisierungsstudien ergaben auch eine 20α-HSD-Aktivität des Enzyms in Form einer Reduktion von Progesteron zu 20α-Hydroxyprogesteron (I. Dufort *et al.*, 1999). Die Ursache für die Multifunktionalität aller 3α-HSD-Isoformen (AKR1C1-AKR1C4), d. h. Aktivitäten in 3α-, 17β- und 20α-Position am Steroidgerüst des Substrates, wird in der strukturellen Flexibilität der in AKR-Proteinen beschriebenen drei Proteinschleifen gesehen (T. M. Penning *et al.*, 2000) (Kapitel 1.3.1.2).

Die in intakten Zellen exprimierte h17β-HSD 5 zeigte als stärkste Aktivität die Umsetzung von Androstendion zu Testosteron, aber auch eine deutliche Umsetzung von Progesteron zu 20α-Hydroxyprogesteron (I. Dufort *et al.*, 1999). Kinetische Charakterisierungen des aufgereinigten, rekombinant exprimierten Enzyms zeigten, neben den bereits für den beim Androgenabbau betrachteten Umsetzungen, weitere 3α- und 17β-HSD-Aktivitäten, so beispielsweise die Reduktion von Estron zu Estradiol (I. Dufort *et al.*, 1999; T. M. Penning *et al.*, 2000).

Die h17β-HSD 5 wird in Prostata, Brustdrüse, Leber und in geringeren Mengen auch in Nebennierenrinde, Niere, Dünndarm, Uterus sowie Lunge gebildet (H. K. Lin *et al.*, 1997; I. Dufort *et al.*, 1999; M. El-Alfy *et al.*, 1999; T. M. Penning *et al.*, 2000).

Die Bedeutung dieses Enzyms im Organismus ist noch nicht eindeutig geklärt. Im Folgenden werden die wichtigsten Ergebnisse und Hypothesen über die Rolle der h17 $\beta$ -HSD 5 in verschiedenen Organen erläutert:

### Beteiligung der h17 $\beta$ -HSD 5 am Androgenstoffwechsel der Prostata



**Abb. 1.7: Mögliche Aktivitäten der h17 $\beta$ -HSD 5 im Androgenstoffwechsel der Prostata**

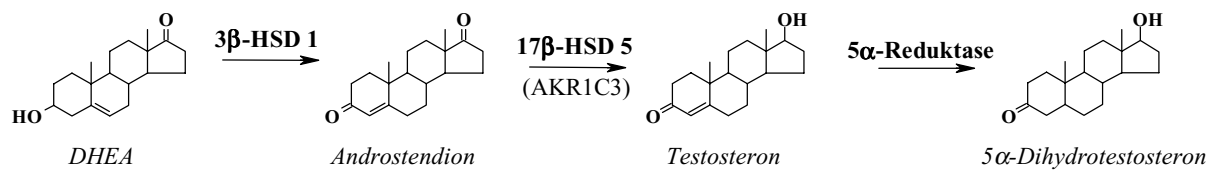
Die h17 $\beta$ -HSD 5 wurde als möglicher Katalysator bei der Synthese des Testosterons, sowie einzelner Abbauschritte des aktiven Androgens 5 $\alpha$ -DHT beschrieben (H. K. Lin *et al.*, 1997; I. Dufort *et al.*, 1999; Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 1997; F. Labrie *et al.*, 2000; T. M. Penning *et al.*, 2000). Die jeweilige Hydroxysteroiddehydrogenase-Aktivität bei den Einzelreaktionen ist angezeigt.

Wie Studien am rekombinanten, aufgereinigten Enzym gezeigt haben, reduziert die h17 $\beta$ -HSD 5 mittels 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität 5 $\alpha$ -DHT zu 3 $\alpha$ -Androstandiol (Abb.1.7: Nr.1). Auch eine weitere Umsetzung des gebildeten Androgens zu Androsteron und weiter zu 5 $\alpha$ -Androstan-3,17-dion konnte beobachtet werden (H. K. Lin *et al.*, 1997) (Abb. 1.7: Nr. 2 - 3).

Unklar bleibt, ob die Reaktionsabfolge auch in dieser Form *in vivo* in der Prostata stattfindet, beziehungsweise inwieweit dieses Enzym dort allein am Abbau von 5 $\alpha$ -DHT beteiligt ist (H. K. Lin *et al.*, 1997).

Untersuchungen am in humanen Zelllinien exprimierten, als auch am rekombinanten, aufgereinigten Protein, zeigten eine effektive Reduktion von 5 $\alpha$ -Androsten-3,17-dion zu Testosteron (I. Dufort *et al.*, 1999) (Abb. 1.7: Nr. 4). Aus diesem Grund wird der AKR1C3 eine Beteiligung an der in der Prostata ablaufenden „vor-Ort-Synthese“ von Testosteron und damit an einer intrakrinen Androgenwirkung zugeschrieben, wie in Abb. 1.8 dargestellt (F. Labrie *et al.*, 1997; F. Labrie *et al.*, 2000).





**Abb. 1.8: Beteiligung der h17β-HSD 5 an der 5α-DHT-Synthese in der Prostata**

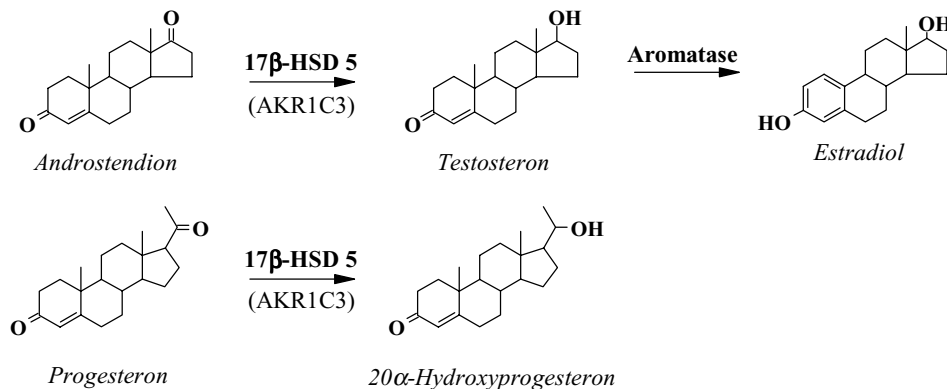
Das von der Nebenniere ausgeschüttete, inaktive Androgen DHEA wird in der Prostata unter Beteiligung der dort exprimierten Enzyme 3β-HSD 1, h17β-HSD 5 und der 5α-Reduktase zum aktiven Androgen 5α-DHT umgesetzt.

Ob die Möglichkeit der lokalen Testosteronsynthese in der Prostata beim gesunden Mann eine große Rolle spielt, bleibt unklar. Der Großteil der Androgensynthese findet in den Leydigzellen des Testis statt. Die dort gebildeten Androgene gelangen über die Blutbahn zur Prostata. Möglicherweise gewinnt die Androgensynthese in der Vorsteherdrüse erst nach Kastration, wie sie im Falle einer Prostatahyperplasie oder eines Prostatakrebses durchgeführt wird, entscheidende Bedeutung (T. M. Penning *et al.*, 2000).

### Bedeutung der h17β-HSD 5 in der Brustdrüse

Neuere Untersuchungen zeigen auch eine deutliche Expression von h17β-HSD5 in der Brustdrüse (T. M. Penning *et al.*, 2000).

Es wird vermutet, dass das Enzym dort an der Synthese von Testosteron aus 5α-Androsten-3,17-dion beteiligt ist. Dieses Androgen könnte mittels Aromatase zu Estradiol umgesetzt werden. Des Weiteren könnte es die Reduktion von Estron zu Estradiol oder von Progesteron zu 20α-Hydroxyprogesteron katalysieren (Siehe Abb.1.9). Damit würde es eine zentrale Rolle bei der Kontrolle des Estrogenstatus der Brustdrüse spielen (T. M. Penning *et al.*, 2000).



**Abb. 1.9: Mögliche Aktivitäten der h17β-HSD 5 in der Brustdrüse**

## Bedeutung der h17 $\beta$ -HSD 5 im Uterus

Die AKR1C3 ist von den vier bekannten 3 $\alpha$ -HSD-Isoformen im Uterus am stärksten exprimiert und könnte an der Synthese von 3 $\alpha$ -Androstandiol, ein die Geburt auslösendes Hormon, beteiligt sein (T. M. Penning *et al.*, 2000).

Alle Mitglieder der AKR-Großfamilie wurden zunächst nach ihrer Substratspezifität benannt. Aufgrund der ständig wachsenden Mitgliederzahl wurde ein einheitliches Nomenklatorsystem, sowie eine Aufschlüsselung der Verwandtschaftsgrade anhand der Aminosäuresequenzidentität eingeführt (J. M. Jez *et al.*, 1997b). Ähnlich, wie bereits für die 17 $\beta$ -HSD 4 angedeutet, wurde auch Typ 5 von zahlreichen Forschergruppen parallel nach unterschiedlichen Methoden isoliert und unter verschiedenen Gesichtspunkten charakterisiert. Aus diesem Grund werden unter dem der AKR-Nomenklatur entsprechenden Namen AKR1C3 vier verschieden benannte Enzyme aufgeführt: 17 $\beta$ -HSD 5, 3 $\alpha$ -HSD 2, Dihydrodioldehydrogenase X (DDx) und Prostaglandin F-Synthase (PGFS) (J. M. Jez & T. M. Penning, 2001). Damit hat sich der Aufgabenbereich und die Funktion dieser AKR deutlich erweitert.

Die unter anderem in Gehirn, Niere, Leber, Lunge, Plazenta und Testis identifizierte 3 $\alpha$ -HSD 2 wurde aus einer cDNA-Bibliothek der Leber isoliert (K. N. Qin *et al.*, 1993). Als mögliche Aktivität wurde hier die Degradation des aktiven Androgens 5 $\alpha$ -DHT beschrieben. 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität in der Leber wurde im Zusammenhang mit der dort stattfindenden Inaktivierung von Steroidhormonen gesehen. In Leber und Darm ist diese Aktivität bei der Synthese und dem Transport von Gallensäuren bedeutsam (H. Takikawa *et al.*, 1990; A. Stolz *et al.*, 1987).

Die Multifunktionalität, die durch drei flexible Proteinschleifen des Enzyms begründet wurde (T. M. Penning *et al.*, 2000), geht scheinbar über eine HSD-Aktivität hinaus. In ihrer Funktion als Dihydrodioldehydrogenase sorgt das Enzym für eine Detoxifizierung mutagen wirksamer polyzyklischer, aromatischer Kohlenwasserstoffe (M. Khanna *et al.*, 1995).

Eine Prostaglandin F-Synthase reduziert mittels PGD<sub>2</sub>-11-Ketoreduktaseaktivität PGD<sub>2</sub> zu PGF<sub>2</sub> und durch die PGH<sub>2</sub>-9,11-Endoperoxidreduktaseaktivität PGH<sub>2</sub> zu PGF<sub>2 $\alpha$</sub>  (T. Suzuki-Yamamoto *et al.*, 1999). Im Rind gibt es zwei Isoenzyme der PGFS, eines in der Leber (L. Y. Chen *et al.*, 1992) und eines, mit der bovinen Dehydrodioldehydrogenase 3 (DD3) identisches in der Lunge (K. Watanabe *et al.*, 1985). In der Leber reguliert PGF<sub>2 $\alpha$</sub> , neben PGE<sub>2</sub> und PGD<sub>2</sub>, Gallensäurefluss und -sekretion, sodass angenommen wird, dass auch PGFS in diese Prozesse involviert ist. Im Menschen wurde mittels der Sequenz des in der bovinen

Lunge exprimierten Proteins das entsprechende humane Enzym identifiziert. Die Expression im Atmungsorgan lässt eine Verwicklung der PGFS in die Pathogenese von allergischen Reaktionen vermuten.

#### 1.3.2.6 17 $\beta$ -HSD 6

Die der SCAD-Familie zugehörige 17 $\beta$ -HSD Typ 6 wird in Leber und Prostata exprimiert. Sie besitzt ein breites Substratspektrum. Das Enzym katalysiert die Oxidation von Androstandiol zu Androsteron und ist damit am 5 $\alpha$ -DHT-Katabolismus beteiligt (M. G. Biswas & D. W. Russell, 1997).

Die 17 $\beta$ -HSD 6 der Ratte zeigt 65 % Homologie mit der Retinoldehydrogenase Typ 1 (RoDH) der Ratte und gehört damit in die Familie der Retinoldehydrogenasen (M. G. Biswas & D. W. Russell, 1997).

Ein homologes Enzym im Menschen konnte bisher nicht identifiziert werden.

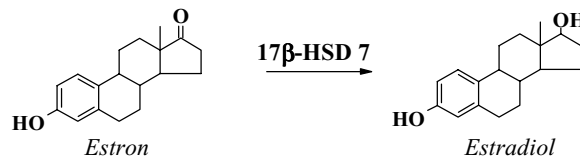
#### 1.3.2.7 17 $\beta$ -HSD 7

In den Ovarien schwangerer Ratten wurde 1992 ein 32 kDa großes Phosphoprotein entdeckt (T. G. Parmer *et al.*, 1992). Das als ovarspezifisches Protein beschriebene Eiweiß zeigte eine durch Estradiol und Prolaktin induzierbare Expressionszunahme in den großen Lutealzellen der *Corpora lutea* (T. G. Parmer *et al.*, 1992). Das Protein der Ratte wurde als mit dem zytosolischen Teil des kurzen Prolaktinrezeptors assoziiert beschrieben und dementsprechend als Prolaktinrezeptor-assoziiertes Protein PRAP benannt (W. R. Duan *et al.*, 1996).

Die lange Form des Prolaktinrezeptors, ein Cytokinrezeptor, vermittelt das durch Prolaktinbindung erhaltene Signal über die tyrosinspezifische Proteinkinase JAK2 und den Signalvermittler Stat5 (F. Gouilleux *et al.*, 1994). Für die kurze Form des Rezeptors konnte keine derartige Signaltransduktion beobachtet werden (W. R. Duan *et al.*, 1996). Eine Bedeutung der Assoziation des kurzen PRL-Rezeptors mit PRAP konnte bis heute nicht geklärt werden. Es wurde jedoch angenommen, dass das assoziierte Protein den Prolaktin-signalweg über die kurze Rezeptorform steuert (W. R. Duan *et al.*, 1997).

1998 wurde in der murinen Brustdrüsenzelllinie HC11 Estradiolsyntheseaktivität festgestellt, welche jedoch nicht der m17 $\beta$ -HSD 1 zugeordnet werden konnte. Es wurde eine neue SCAD identifiziert und in der Chronologie als m17 $\beta$ -HSD 7 benannt (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Die mittels Northernblot untersuchte Expression zeigte starke Signale in den *Corpora lutea* schwangerer Tiere, geringere mRNA-Mengen in den Ovarien erwachsener, nicht schwangerer Mäuse, in Leber, Brustdrüse, Niere und Testis (P. Nokelainen *et al.*, 1998).

Aufgrund der mit der für rPRAP übereinstimmenden Proteinsequenz, der starken Expression in den Ovarien schwangerer Tiere und der enzymatischen Charakteristika wurde angenommen, dass es sich bei rPRAP und der murinen 17 $\beta$ -HSD 7 um Orthologe handelt (P. Nokelainen *et al.*, 1998).



**Abb. 1.10: Katalytische Aktivität der m17 $\beta$ -HSD 7**

Beim Menschen ist die Plazenta in den letzten zwei Dritteln der Schwangerschaft Hauptsyntheseort von Estradiol. Dort werden große Mengen an 17 $\beta$ -HSD 1 exprimiert, die für die Estradiolsynthese im plazentalen Syncytioblasten essentiell ist (N. Fournet-Dulguerov *et al.*, 1987). In schwangeren Nagern findet eine Estrogensynthese hauptsächlich in den *Corpora lutea* statt (K. Taya & G. S. Greenwald, 1981). Da im Ovar nur einige reifende Follikel, nicht aber die *Corpora lutea*, 17 $\beta$ -HSD 1 (das Schlüsselenzym der Estradiolsynthese) enthalten, muss also bei diesen Tieren noch ein anderes Enzym vorhanden sein, das die Estradiolsynthese übernimmt. Dafür wurde der neu klonierte Typ 7 in Betracht gezogen (H. Peltoketo *et al.*, 1999b) (Abb.1.10).

Aufgrund der zeitlichen und lokalen Produktion des Enzyms im Uterus wird außerdem eine mögliche Rolle der 17 $\beta$ -HSD 7 an der Embryoimplantation postuliert (P. Nokelainen *et al.*, 2000).

Erstaunlicherweise wurde diese Hydroxysteroiddehydrogenase auch in der Leber gefunden, einem Organ, welches mit dem Estrogenabbau in Zusammenhang gebracht wird.

### 1.3.2.8 17 $\beta$ -HSD 8 (Ke6)

Das als 17 $\beta$ -HSD 8 identifizierte Enzym gehört in die Familie der SCAD. Es katalysiert *in vitro* die Umsetzung von Estradiol zu Estron und mit geringerer Aktivität auch die Oxidation von Testosteron zu Androstendion (J. Fomitcheva *et al.*, 1998). Expressionsorte des humanen Enzyms sind Leber, Pankreas und Niere (Y. Y. Kikuti *et al.*, 1997). Das murine Enzym konnte darüber hinaus noch in Ovar, Testis und Milz nachgewiesen werden (J. Fomitcheva *et al.*, 1998).

Das humane KE6-Gen wurde bereits identifiziert (Y. Y. Kikuti *et al.*, 1997), das zugehörige Genprodukt jedoch noch nicht charakterisiert.

### 1.3.2.9 17 $\beta$ -HSD 9

Die der SCAD-Familie zugehörige 17 $\beta$ -HSD 9 wurde in der Maus entdeckt und besitzt neben ihrer 17 $\beta$ -HSD- auch eine 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität. Sie katalysiert in der Leber die Umsetzung von Androgenen und Estrogenen, akzeptiert aber auch freies Retinol als Substrat (J. Su *et al.*, 1999). Das humane Enzym ist noch nicht bekannt.

### 1.3.2.10 17 $\beta$ -HSD 10 (ERAB)

Diese SCAD katalysiert reversibel die Umsetzung von L-3-Hydroxyacyl-CoA zu 3-Ketoacyl-CoAs (X. Y. He *et al.*, 1999). Die Aminosäuresequenz dieses Enzyms ist identisch mit der eines Proteins namens ERAB (**E**ndoplasmatisches **R**etikulum **A**myloid- $\beta$ -**P**eptid **b**indendes Protein) (S. D. Yan *et al.*, 1997), das die Neurotoxizität von Alzheimer beeinflusst. Es wird angenommen, dass das Enzym einen möglichen Risikofaktor bei der Entstehung der Alzheimer-Krankheit darstellt (X. Y. He *et al.*, 1999).

Diese 17 $\beta$ -HSD katalysiert des Weiteren die Oxidation von Estradiol und 5 $\alpha$ -DHT (X. Y. He *et al.*, 1999). Somit spielt das in Prostata, Testis, Ovar und Niere exprimierte Protein (X. Y. He *et al.*, 2000) eine Rolle bei der Inaktiverung des Estrogens sowie bei der Synthese aktiven Androgens (X. Y. He *et al.*, 2000).

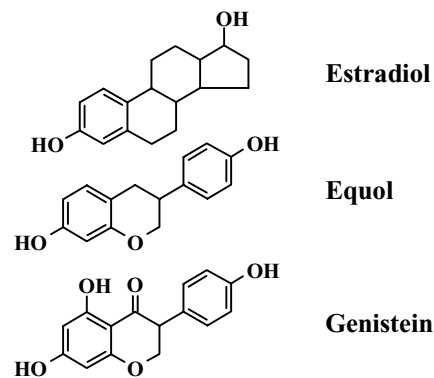
### 1.3.2.11 17 $\beta$ -HSD 11 (Pan1b)

Eine als Pan1b benannte SCAD wurde in Leber, Nierenkarzinom, Lunge, Dünndarm und in geringeren Konzentrationen in Niere, Herz und Plazenta detektiert (K. X. Li *et al.*, 1998). Im Gegensatz zur erwarteten Umsetzung von Glucocorticoiden wurden 17 $\beta$ -Hydroxysteroiden umgesetzt, sodass angenommen wurde, dass es sich um eine neue 17 $\beta$ -HSD handelt (K. X. Li *et al.*, 1998, P. Brereton *et al.*, 2001).

## 1.4 Phytoestrogene

### 1.4.1 Begriffsdefinition

Unter Phytoestrogenen versteht man pflanzliche, nicht-steroidale Komponenten mit estrogenen, aber auch antiestrogenen Wirkung. Alle Vertreter sind diphenolische Substanzen mit hoher struktureller Ähnlichkeit zu den Steroidhormonen.



**Abb. 1.11: Strukturvergleich Estrogen mit Phytoestrogenen**

Um die strukturelle Ähnlichkeit des natürlichen Estrogens mit den Phytoestrogenen darzustellen, sind hier die Strukturformeln des Estradiols mit denen des Isoflavons Genistein und seinem Abbauprodukt Equol abgebildet.

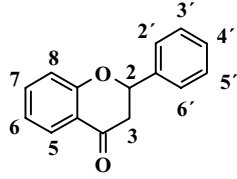
Man unterscheidet drei große Klassen von Phytoestrogenen: Flavonoide, Coumestane und Lignane (Übersichtsartikel: M. S. Kurzer & X. Xu, 1997).

Die große Familie der Flavonoide beinhaltet die Flavanone, Flavone und die Isoflavone und ist in nahezu allen Pflanzenfamilien vertreten. Die biologische Rolle der in Blättern, Blüten, Stämmen, Wurzeln und Samen zu findenden Substanzen (J. Harborne, 1971; Übersichtsartikel: K. Verdeal & D. Ryan, 1979) ist bis in die heutige Zeit noch nicht vollständig geklärt. Einigen dieser Stoffe werden Funktionen als natürliche Fungizide, UV-Protektoren, Signal- oder Blütenfarbstoffe zugeschrieben (J. Harborne, 1971).

Die Hauptquelle der Isoflavone in der Nahrung stellen Sojabohnen und damit alle daraus hergestellten Produkte dar. Flavone und Flavanone sind dagegen in allen Pflanzenfamilien weit verbreitet und finden sich in Früchten, Gemüse, Beeren, Kräutern, Bohnen und grünem Tee.

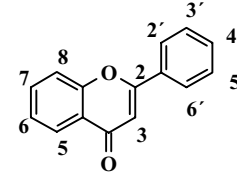
Die Abbildung 1.12 zeigt die Strukturformeln und die Tabelle 1.1 das Vorkommen der für die vorliegende Arbeit interessierenden Substanzen.

**Flavanone**



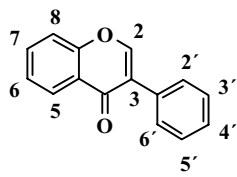
Flavanon  
Naringenin: 4',5,7-Trihydroxyflavanon

**Flavone**



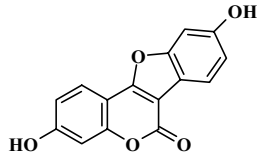
Flavon  
3-Hydroxyflavon  
5-Hydroxyflavon  
7-Hydroxyflavon  
3,7-Dihydroxyflavon  
Chrysin: 5,7-Dihydroxyflavon  
Apigenin: 4',5,7-Trihydroxyflavon  
Kaempferol: 3,4',5,7-Tetrahydroxyflavon  
Quercetin: 3,3',4',5,7-Pentahydroxyflavon

**Isoflavone**



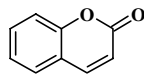
Daidzein: 4',7-Dihydroxyisoflavon  
Genistein: 4',5,7-Trihydroxyisoflavon  
Biochanin A: 5,7-Dihydroxy-4-methoxyisoflavon

**Cumestan**



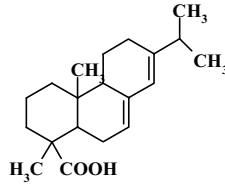
Cumestrol

**Cumarin**

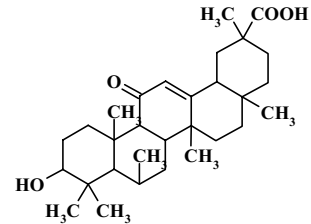


Cumarin

**Organische Säuren**

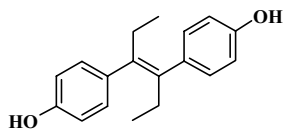


Abietinsäure

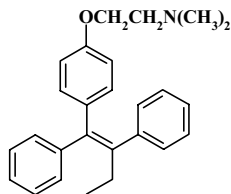


18β-Glycyrrhetinsäure

**Synthetische Komponenten**

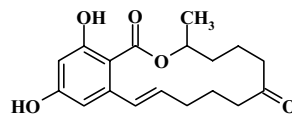


Diethylstilbestrol DES



Tamoxifen

**Mycotoxin**



Zearalenon

Abb. 1.12: Strukturformeln der Umwelthormone und synthetischen Hormonanaloga

Gruppe	Vertreter	Vorkommen/Anwendung
<b>Flavone</b> (gelbes/rotes Obst, Gemüse)	Chrysin Apigenin Kaempferol Quercetin	<i>Passiflora coerulea</i> Löwenmäulchen, Kamille Bohnen Kamille, rote Zwiebel, Apfel, Tee, Endiviensalat
<b>Flavanone</b> (gelbes/rotes Obst, Gemüse)	Naringenin	Grapefruit
<b>Isoflavone</b> (Bohnen, Erbsen, Linsen)	Daidzein Genistein Biochanin A	Sojabohnen, Bier Sojabohnen, Bier Rotklee, Bier, Bourbon
<b>Cumestane</b>	Cumestrol	Alfalfasproussen, Bohnen
<b>Cumarine</b>	Cumarin	Waldmeister, Vanille, Lavendelöl, Tonkabohne; geringere Anteile auch in Kirschen, Erdbeeren, Aprikosen
<b>Organische Säuren</b>	Abietinsäure 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure	Kiefernholz, (Abwasser von Papierfabriken) Lakritze
<b>Mykotoxine</b>	Zearalenon	Verschimmelte Nahrungsmittel (Schimmelpilzgift)
<b>Synthetische Komponenten</b>	DES Tamoxifen	Synth. Estrogen; Estrogensatztherapie Synth. Antiestrogen; Krebstherapie

**Tab. 1.1: Getestete Substanzen und deren Vorkommen**

Hauptnahrungsquellen entnommen aus: (B. E. Knuckles *et al.*, 1976; E. R. Rosenblum *et al.*, 1992; J. S. Gavalier *et al.*, 1995; M. S. Kurzer & X. Xu, 1997; O. Lapcik *et al.*, 1998; W. Mazur, 1998; L. Strauss *et al.*, 1998);

Neben den Flavonoiden wurden in der folgenden Arbeit noch Cumestane, Cumarine, einige pflanzliche Säuren, ein Mykotoxin und synthetisches Estrogen und Antiestrogen untersucht. Dementsprechend kamen Umwelthormone und synthetische Komponenten zum Einsatz, die bereits als estrogen oder antiestrogen identifiziert wurden, wie beispielsweise Cumestrol, Zearalenon oder Genistein (S. Mäkelä *et al.*, 1995a). Einige Substanzen waren bereits als Inhibitoren der 17 $\beta$ -HSD 1 (Cumestrol) (S. Mäkelä *et al.*, 1995a) oder der 17 $\beta$ -HSD 2 (Kaempferol) (S. Mäkelä *et al.*, 1998) identifiziert worden.

## 1.4.2 Einfluss auf die menschliche Gesundheit

Bereits vor mehr als 70 Jahren konnte in Sojabohnen ein außergewöhnlich hoher Gehalt an Isoflavonen ermittelt werden (E. Walz, 1931). Das Glykosid des Genisteins, Genistin, wurde 1941 aus einem methanolischen Sojaextrakt kristallisiert (E. D. Walter, 1941).



Mitte der 40er wurde erstmals die Hormonwirkung der Isoflavone anhand der Beobachtung eines Infertilitätssyndroms bei Schafen festgestellt. Die Tiere wurden nach Verzehr von Klee, der einen hohen Anteil an den Flavonoiden Biochanin A und Formonetin besitzt, steril (H. W. Bennetts *et al.*, 1946). Die beiden erwähnten Substanzen werden im Darm zu Equol metabolisiert, welches anschließend im Plasma und Urin nachgewiesen werden kann.

Der Nachweis dieses Metaboliten im menschlichen Urin und die Feststellung einer Konzentrationssteigerung dieses Stoffes als Folge erhöhten Sojakonsums beim Menschen (M. Axelson *et al.*, 1984; K. D. Setchell *et al.*, 1984) machten erstmals die Bedeutung der Ernährung für den humanen Hormonhaushalt deutlich. Ein möglicher Einfluss auf die Entwicklung hormonbedingter Krankheiten wurde in Betracht gezogen.

Inzwischen wurden zahlreiche epidemiologische Studien unternommen, die bemerkenswerte geographische Unterschiede in der Häufigkeit und Ausbildung bestimmter hormonregulierter Krebsarten wie Brust- und Prostatakrebs zeigten (J. A. Thomas, 1999). Im Vergleich zu Nordeuropa und Amerika ist die Häufigkeit derartiger Krankheiten in Asien deutlich niedriger (T. Hirayama, 1979; W. D. Flanders, 1984; H. Shimizu *et al.*, 1991). Anhand dieser Studien kann davon ausgegangen werden, dass Umweltfaktoren, d. h. bestimmte Nahrungsbestandteile, auf die entsprechende Krebsentstehung und –entwicklung Einfluss nehmen.

Als hauptverantwortliche Substanzen werden hier die Phytoestrogene gesehen, welche in Form von Isoflavonen in großen Mengen in Sojabohnen, einem wichtigen asiatischen Nahrungsmittel, vorkommen.

Für zahlreiche Phytoestrogene wurde bereits eine estrogene oder antiestrogene Wirkung gezeigt (M. Shemesh *et al.*, 1972; K. Verdeal *et al.*, 1980; S. Mäkelä *et al.*, 1994; S. Mäkelä *et al.*, 1995b). Einige Sojaprodukte haben bei chemisch induziertem Krebs präventive Wirkung gezeigt (S. Barnes *et al.*, 1990).

Neben einer Einflussnahme auf die Entwicklung hormonabhängiger Krebsarten werden noch zahlreiche weitere Effekte von Pflanzenestrogenen diskutiert. Die Substanzen gewinnen hauptsächlich für Frauen während und nach der Menopause Bedeutung. Positive Effekte werden hinsichtlich der Linderung der für die in der Menopause typischen Beschwerden (z. B. Hitzewallungen) berichtet. Des Weiteren können solche Effekte für die nach der Menopause auftretenden chronischen Erkrankungen, wie Osteoporose und kardiovaskuläre Krankheiten, beschrieben werden (Übersichtsartikel: M. S. Kurzer & X. Xu, 1997). Die zugrundeliegenden Mechanismen bedürfen jedoch noch weiterer Untersuchungen. In den USA laufen bereits entsprechende Langzeitstudien.

### 1.4.3 Biologische Verfügbarkeit

Die vor allem in Sojaprodukten enthaltenen Isoflavone liegen fast ausschließlich als  $\beta$ -Glykoside vor (P. A. Murphy, 1982; L. Coward *et al.*, 1993). Die über die Nahrung aufgenommenen Konjugate werden im Dünndarm durch Darmbakterien in die biologisch aktiven Aglykone und die entsprechenden Zuckerreste gespalten (G. E. Joannou *et al.*, 1995). Da nur die Aglykone, nicht aber die Glykoside als solche estrogenen Wirkung besitzen, ist dieser intestinale Metabolismus von entscheidender Wichtigkeit.

Dies ist vor allem zu berücksichtigen, wenn Neugeborene oder Kleinkinder mit Sojaprodukten ernährt werden. Obwohl bei ihnen die Mikroorganismen tragende Darmflora noch nicht vollständig ausgebildet ist, konnte eine  $\beta$ -Glukosidaseaktivität nachgewiesen werden, die genügt um aufgenommene Phytoestrogene für den Stoffwechsel verfügbar zu machen (K. D. Setchell *et al.*, 1997).

Die durch Resorption vorliegenden Plasmakonzentrationen von Isoflavonen variieren stark in Abhängigkeit von der zugeführten Nahrung. Bei japanischen Männern wurde eine sieben- bis einhundertzehnfach höhere Plasmakonzentration von Isoflavonen gemessen als in einer entsprechend ausgewählten Gruppe finnischer Männer. Sie erreichte in Einzelfällen Konzentrationen von 2,4  $\mu$ M (600 ng/ml) (H. Adlercreutz *et al.*, 1993). Höchste Plasmakonzentrationen von Phytoestrogenen konnten 4 - 8 h nach Nahrungsaufnahme beobachtet werden. Im Falle von Daidzein und Genistein wurde der Großteil der aufgenommenen Stoffe innerhalb der ersten 24 h wieder ausgeschieden (K. D. Setchell, 2000), sodass sich eine Halbwertszeit von 7,5 h ergibt. Eine gleichbleibend hohe Konzentration dieser Substanzen kann dementsprechend nur durch regelmäßigen Verzehr einer phytoestrogenhaltigen Diät erzielt werden.

Neben der großen Gruppe der Flavonoide waren in der vorliegenden Arbeit noch andere Nahrungskomponenten von Interesse. Über deren biologische Verfügbarkeit ist jedoch weitaus weniger bekannt.

### 1.4.4 Mögliche Wechselwirkungen mit dem Hormonsystem

Es werden drei Mechanismen diskutiert, über die Phytoestrogene mit dem komplexen Hormonsystem interferieren können.

1. Die pflanzlichen Stoffe ahmen aufgrund ihrer strukturellen Eigenschaften die Funktion der natürlichen Steroidhormone nach,

- a) durch Wechselwirkung mit deren intrazellulären Hormonrezeptoren und Auslösung von agonistischen oder antagonistischen Effekten.
- b) durch Interaktion mit den hormonmetabolisierenden Schlüsselenzymen (Aromatase, Hydroxysteroiddehydrogenasen, 5 $\alpha$ -Reduktasen) und damit der Beeinflussung der lokalen Konzentration an aktiven Steroiden.

2. Phytoestrogene wirken über andere Mechanismen, welche nicht den klassischen Hormonwirkungen entsprechen (Übersichtsartikel: M. S. Kurzer & X. Xu, 1997).

Eine Wechselwirkung der pflanzlichen Stoffe mit Hormonrezeptoren wurde bereits für die Estradiolrezeptoren (Er $\alpha$  und  $\beta$ ) gezeigt. *In vitro*-Experimente hinsichtlich der Bindungsaffinität haben gezeigt, dass Isoflavone an den Estradiolrezeptor  $\alpha$  binden, aber im Vergleich zu dem natürlichen Liganden Estradiol mit 100 bis 1000fach geringerer Affinität (D. A. Shutt & R. I. Cox, 1972). Zu dem erst kürzlich identifizierten Estradiolrezeptor Typ  $\beta$  (G. G. Kuiper *et al.*, 1996) konnten etwas höhere Bindungsaktivitäten als zum Typ  $\alpha$  beobachtet werden. So zeigte beispielsweise Genistein für Rezeptor  $\beta$  eine 20fach höhere Affinität als für den Typ  $\alpha$  (G. G. Kuiper *et al.*, 1998). Aufgrund der für zahlreiche Phytoestrogene beobachteten größeren Bindungsaffinität zum Typ  $\beta$  wird davon ausgegangen, dass diese Stoffe ihre estrogenen oder antiestrogenen Wirkung über diesen Estrogenrezeptortyp vermitteln (Übersichtsartikel: A. Cassidy, 1999). Demnach richtet sich die Einflussnahme dieser Stoffe nach der Expression dieses Rezeptortyps in den unterschiedlichen Geweben (G. G. Kuiper *et al.*, 1997; E. Enmark *et al.*, 1997).

Als weitere Angriffspunkte des hormonellen Systems wurden bereits die steroidmetabolisierenden Enzyme erwähnt. Beschrieben wurde die Beeinflussung der Aromatase (J. C. Le Bail *et al.*, 1998a), der 17 $\beta$ -HSD 1 (S. Mäkelä *et al.*, 1995a) und der 17 $\beta$ -HSD 2 (S. Mäkelä *et al.*, 1998) durch Phytoestrogene.

Neben einer Einflussnahme auf die Konzentration und die Bindung des natürlichen Steroidhormons an den Hormonrezeptor und damit eine Transkription des durch das Hormon regulierten Gens wird auch eine nicht-hormonelle Aktivität der Phytoestrogene beschrieben. Für das in Soja am stärksten vertretene Isoflavon Genistein wurden in diesem Gebiet zahlreiche Untersuchungen durchgeführt. Genistein ist nachweislich ein Inhibitor von Tyrosinkinasen (T. Akiyama *et al.*, 1987), der Topoisomerase II und der Enzyme des Phosphatidylinositolmetabolismus (Übersichtsartikel: K. Polkowski & A. P. Mazurek, 2000).

## 2 AUFGABENSTELLUNG

Für die Wirkmechanismen der Pflanzenestrogene im Organismus beziehungsweise in der Zelle werden genomische und nicht-genomische Aktivitäten angenommen. Beide Möglichkeiten sind bislang noch nicht vollständig aufgeklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluss von Phytoestrogenen und künstlichen Estrogenen auf die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen - Enzyme, welche die lokale, intrazelluläre Steroidhormonkonzentration kontrollieren - untersucht werden. In Anlehnung an die bereits für 17 $\beta$ -HSD 1 (S. Mäkelä *et al.*, 1995a) und 17 $\beta$ -HSD 2 (S. Mäkelä *et al.*, 1998) beschriebenen Inhibitionsstudien sollten Stoffe, welche vom Menschen über die Nahrung oder Medikamente aufgenommen werden, zum Einsatz kommen. Dabei handelt es sich um verschiedene Flavonoide, ein Cumestan, ein Cumarin, organische Säuren, ein Mykotoxin und synthetische Steroidanaloga.

Das Interesse lag dabei speziell bei der Beeinflussung der humanen 17 $\beta$ -HSD 4 und 17 $\beta$ -HSD 5. Diese Enzyme gehören zwei unterschiedlichen Enzymfamilien an und werden einmal dem Estrogen- und auf der anderen Seite dem Androgenmetabolismus zugeordnet. Beide Proteine sollten rekombinant in *E. coli* exprimiert, aufgereinigt und im *in vitro*-System auf die Beeinflussbarkeit ihrer katalytischen Aktivitäten durch verschiedene Phytoestrogene untersucht werden. Die ermittelten Inhibitionsprofile sollten eine Aussage hinsichtlich Struktur und Wirkung der Steroidanaloga erlauben.

Ein weiteres Ziel der Arbeit war die Klonierung, Sequenzierung und Charakterisierung der humanen 17 $\beta$ -HSD Typ 7, dem Orthologen der Maus (P. Nokelainen *et al.*, 1998) und der Ratte (W. R. Duan *et al.*, 1997). Dies sollte dazu dienen, das Bild aller am humanen endokrinen und intrakrinen System beteiligten Enzyme zu vervollständigen, insbesondere im Hinblick auf die einander entsprechenden Enzymaktivitäten von 17 $\beta$ -HSD 7 und Typ 1. Ebenso sollten die Enzymaktivitäten der rekombinant exprimierten humanen 17 $\beta$ -HSD 7 untersucht werden. Im Speziellen die für das murine Protein beschriebene Estradiol-syntheseaktivität untersucht.

### 3 MATERIAL

#### 3.1 Verwendete Bakterienstämme

Zur Amplifikation von Plasmiden und zur Expression von Proteinen wurden als Wirtsorganismen folgende *E. coli*- Stämme verwendet:

- **JM 107** (Stratagene): *mcrA*-,  $\Delta(lac-proAB)$ , *thi-1*, *gyrA96*, *endA1*, *hsdR17*, *relA1*, *supE44*, F'[*traD36 proAB*, *lacI<sup>q</sup>ZΔM15*]
- **Top 10F' One Shot™** (Invitrogen): F'(lacI<sup>q</sup>, Tn10(tet<sup>r</sup>), *mcrA*, D(*mrr-hsdRMS-mcrCB*),  $\phi 80lacZ\Delta M15$ ,  $\Delta lacX74$ , *deoR*, *recA1*, *araD139*, D(*ara-leu*)7697, *galU*, *galK*, *rpsL*(Str<sup>r</sup>), *endA1*, *nupG*)
- **Epicurian Coli® BL 21 DE3 – Codon Plus (RP)™** (Stratagene): *E. coli* B, F<sup>-</sup>, *ompT*, *hsdS*(r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>), *dcm*<sup>+</sup>, Tet<sup>r</sup>, galλ(DE3), *endA*, Hte, [*argU proL Cam<sup>r</sup>*]

#### 3.2 Verwendete Plasmide

Für die vorliegende Arbeit wurden folgende Abkömmlinge des synthetisch hergestellten Plasmids pBR322 verwendet:

pCR®2.1	Invitrogen
pREP10	Invitrogen
pGEX 2TΔBamHI*	Pharmacia

\* besitzt gegenüber dem pGEX 2T mehrere zusätzliche Restriktionsschnittstellen, eingefügt im MPI Hannover;  
**im Folgenden nur noch als pGEX-Vektor bezeichnet!**

#### 3.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial, Kits

##### Chemikalien

Acrylamidlösung (30 % (m/v) Acrylamid,

0,8 % (m/v) Bisacrylamid)

Carl Roth GmbH

Agarose

Biozym

Ampicillin

Biomol Feinchemikalien

Ammoniumperoxodisulfat (APS)

Merck

---

Antipain	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Aprotinin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Bacto-Trypton	Difco Laboratories
Bacto-Hefeextrakt	Difco Laboratories
BSA (Bovine serum albumin)	Biomol Feinchemikalien
Borsäure	Biomol Feinchemikalien
Calciumchlorid ( $\text{CaCl}_2$ )	Merck
Coomassie Brilliant Blue G250	Biomol Feinchemikalien
Diaminbenzidiniumtetrahydrochlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Dinatriumhydrogenphosphat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )	Merck
Difco-Agar	Difco Laboratories
Endonuklease (Benzonase)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
EDTA	Biomol Feinchemikalien
Essigsäure	Merck
Ethidiumbromidlösung (500 $\mu\text{g/ml}$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Folin-Ciocalteu's-Reagenz	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Glutathion-Sepharose 4B	Amersham Pharmacia Biotech
Glycerin	Biomol Feinchemikalien
Glycin	Biomol Feinchemikalien
Imidazol	Biomol Feinchemikalien
Isopropylthiogalactopyranosid (IPTG)	DCL
Kaliumacetat (KAc)	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	Merck
Kaliumhydroxid (KOH)	Merck
Kanamycin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kobaltchlorid ( $\text{CoCl}_2$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Kupfersulfat ( $\text{CuSO}_4$ )	Merck
Leupeptin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Lysozym	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Manganchlorid ( $\text{MnCl}_2$ )	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
3-(M-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Biomol Feinchemikalien
Natriumacetat (NaAc)	Merck

---

Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck
Natriumchlorid (NaCl)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck
Natriumhydroxid (NaOH)	Merck
Natriumtartrat	Merck
α-[ <sup>32</sup> P]-dCTP	Amersham Pharmacia Biotech
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Serva Electrophoresis GmbH
Serva-Blue	Serva Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH
Thrombin	Sigma-Aldrich GmbH
TRIS	USB
Tricin	Biomol Feinchemikalien
Triton X 100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Trypton	Difco Laboratories
Tween 20	Merck
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Wasserstoffperoxid 30 % (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	Merck

### Phytoestrogene

Alle Substanzen, mit Ausnahme von Abietinsäure, Kaempferol, Quercetin (ICN Biomedical Research Products) und Cumestrol (Steraloids Inc.) wurden von Sigma-Aldrich Chemie GmbH bezogen.

### Cofaktoren

NAD <sup>+</sup>	Serva Electrophoresis GmbH
NADPH <sup>+</sup>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH

### <sup>3</sup>H-markierte Substrate

[9,11- <sup>3</sup> H]-5α-Androstan-3α,17β-diol	NEN-Life Science Products
[1,2,6,7- <sup>3</sup> H]-Androst-4-en-3,17-dion	NEN-Life Science Products
[6,7- <sup>3</sup> H]-Estron	NEN-Life Science Products
[6,7- <sup>3</sup> H]-Estradiol	NEN-Life Science Products

**Lösungsmittel**

Acetonitril (HPLC-gradient grade)	Riedel-de-Haen
Ethanol abs. p. a.	Merck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Biomol Feinchemikalien
2-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH
Methanol abs. p. a.	Merck
Szintillationsflüssigkeit Ready Flow III	Beckman

**Verbrauchsmaterial**

Gelblotpapier (Gel-Blotting-Papier GB 004)	Schleicher & Schuell
Membranfilter (RC 55; regenerierte Cellulose; Porengröße 0,45 µm)	Schleicher & Schuell
PVDF-Membran (Fluorotrans W)	Pall
Röntgenfilme X-Omat	Kodak
RP18-Extraktionssäulchen (Supelclean LC)	Supelco
Spritzenaufsatzfilter (Porengröße 0,45 µm)	Millipore
Qiashredder	Qiagen

**Kits**

GST Gene Fusion System	Amersham Pharmacia Biotech
NucleoSpin™-Kit	Macherey-Nagel
Nucleobond™ AX100	Macherey-Nagel
Prime-it® RmT Random Primer Labeling Kit	Stratagene
Qiagen Plasmid MAXI-Kit	Qiagen
QIAquick™ Nucleotide Removal Kit	Qiagen
QIAquick™ PCR Purification Kit	Qiagen
QIAquick™ Gel Extraction Kit	Qiagen
Rapid DNA Ligation Kit	Boehringer Mannheim (Roche)
RNeasy® Mini Kit	Qiagen,
TA Cloning® Kit	Invitrogen
T-primed First-Strand Kit	Amersham Pharmacia Biotech



## Größenstandards und Probenauftragspuffer

### Größenstandards DNA

III: Lambda DNA/EcoRI + Hind III MBI Fermentas

VIII: pUC Mix Marker 8 MBI Fermentas

Probenauftragspuffer (DNA/6×) sind bei den Standards enthalten.

### Größenstandards Protein

M<sub>F</sub>: gefärbt, von 27-180 kDa Fluka

M<sub>B</sub>: ungefärbt, 6,5-200 kDa Biorad

### Oligonukleotide (Primer)

Alle eingesetzten Oligonukleotide wurden von Herrn Utz Linzner aus der AG BioDV am Institut für Säugetiergenetik der GSF hergestellt.

## 3.4 Enzyme, Puffer, Antikörper

### Enzyme

BamH I (10 U/μl) MBI Fermentas

Hind III (10 U/μl) MBI Fermentas

Kpn I (10 U/μl) New England Biolabs

ELONGASE<sup>®</sup>- Amplification Kit Gibco Life technologies

Taq DNA-Polymerase rekombinant (1 U/μl) MBI Fermentas

Endonuclease (Benzonase) (340 U/μl) Sigma Aldrich GmbH

### Restriktionspuffer

Restriktionspuffer B Boehringer Mannheim (Roche)

NEB 4 New England Biolabs

### Antikörper

monoklonaler Maus-Anti-GST Zymed Laboratories Inc.

Peroxidase-konjugierter

Ziege-Anti-Maus IgG + IgM (H + L) Jackson Immunoresearch  
Laboratories; Vertrieb: Dianova

## 4 METHODEN

### 4.1 Bakterielle Techniken

#### 4.1.1 Nährmedien, Antibiotika

Die Züchtung der Bakterien erfolgte mit folgenden Nährmedien:

- *LB-Medium (Luria-Bertani-Medium)*:  
1 % Bacto-Trypton, 0,5 % Bacto-Hefeextrakt, 1 % NaCl; mit NaOH auf pH 7,0 titriert; autoklaviert;
- *LB-Agar*:  
LB-Medium, 15 g/l Difco-Agar; autoklaviert;

Für eine Antibiotika-Selektion wurden LB-Medien mit 100 µg/ml Ampicillin beziehungsweise 50 µg/ml Kanamycin hergestellt. Aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der Antibiotika wurden diese dem LB-Agar erst nach Abkühlung unter 50 °C zugegeben.

#### 4.1.2 Kultivierung

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte aerob in LB-Medium, das gegebenenfalls mit dem nötigen Antibiotikum versetzt war. Die Flüssigkulturen wurden je nach erforderlichem Volumen in Glasröhrchen oder Erlenmeyerkolben bei 37 °C mit etwa 130 rpm geschüttelt.

Zur kurzfristigen Aufbewahrung und um Einzelkolonien zu erhalten, wurde ein kleines Volumen der entsprechenden Bakteriensuspension auf Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

#### 4.1.3 Gefrierkulturen (Glycerinkulturen)

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Klonen wurden Gefrierkulturen hergestellt.

- 20 ml Medium (+/- Antibiotikum) wurden mit einer Einzelkolonie oder 20 µl einer bereits bestehenden Kultur beimpft und über Nacht bei 37 °C geschüttelt.
- Am nächsten Tag wurde ein Aliquot (500 µl) dieser Kultur in ein steriles Röhrchen überführt, mit dem gleichen Volumen an sterilem Glycerin (87 %) versetzt und gut gemischt.

Derart angelegte Kulturen wurden bei –80 °C eingefroren und sind so über mehrere Jahre haltbar.

#### 4.1.4 Bestimmung des Bakterienwachstums

Die Zelldichte einer Bakteriensuspension wurde durch photometrische Trübungsmessung bei 600 nm bestimmt. Das reine Inkubationsmedium diente dabei als Referenzwert.

#### 4.1.5 Herstellung kompetenter Bakterien (RbCl-Methode)

(aus: The NEB Transcript, May 1994, S. 7)

##### Benötigte Lösungen und Medien:

- LB-Medium
  - *TFBI*:  
30 mM KAc, 100 nM RbCl, 10 mM CaCl<sub>2</sub>, 50 mM MnCl<sub>2</sub>, 15 % Glycerin; mit Essigsäure auf pH 5,8 eingestellt und sterilfiltriert
  - *TFBII*:  
10 mM MOPS , 75 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM RbCl, 15 % Glycerin; mit KOH auf pH 6,5 eingestellt und sterilfiltriert
- 
- Der gewünschte Bakterienstamm wurde auf einer LB-Agarplatte ohne Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Davon wurde eine einzelne Kolonie in 4 ml LB-Medium über Nacht bei 37 °C vermehrt.
  - Von dieser Bakterienkultur wurden 2,5 ml in 250 ml LB-Medium überimpft, bis zu einer OD<sub>600 nm</sub> von 0,4 - 0,6 inkubiert und anschließend mit 5000 rpm bei 4 °C für 5 min abzentrifugiert.
  - Das Pellet wurde vorsichtig in 100 ml eisgekühltem *TFBI* resuspendiert. Alle folgenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt.
  - Nach 5minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension erneut bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml eisgekühltem *TFBII* resuspendiert, nach 60minütiger Inkubation aliquotiert (je 100 µl) und bei -80 °C tiefgefroren.

#### 4.1.6 Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden nach der in Kapitel 4.1.5 dargelegten Vorgehensweise selbst hergestellt oder käuflich erworben.

- Die kompetenten Bakterien wurden aus dem -80 °C Gefrierfach direkt auf Eis gegeben und so mit 5 ng Plasmid-DNA oder 2 µl Ligationsansatz für 30 min

aufgetaut. Anschließend wurden die Bakterien für maximal 1 min einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt und umgehend für 5 min auf Eis abgekühlt.

- In 1 ml LB-Medium ohne Antibiotikum aufgenommen, wurden die Bakterien für 1 h bei 37 °C geschüttelt.
- Nach dieser Inkubationsphase wurden die Bakterien für 5 min bei 5000 rpm zentrifugiert. Das überstehende Medium wurde abdekantiert, das Pellet mit dem verbliebenen Restmedium (maximal 150 µl) resuspendiert und die Ansätze nach dem Ausplattieren auf Selektivmedium (LB-Medium mit Antibiotikum) über Nacht bei 37 °C inkubiert.

## **4.2 Weitere molekularbiologische Methoden**

### **4.2.1 Präparation von Nukleinsäuren**

#### **4.2.1.1 Präparation von Plasmid-DNA**

- Die das Plasmid tragenden Bakterien wurden über Nacht in geeignetem Selektivmedium vermehrt.
- Um kleine Mengen DNA zu gewinnen, wurde sie aus 2 ml einer „über Nacht-Kultur“ mit dem NucleoSpin™-Kit isoliert.
- Für größere Mengen an DNA musste ein Ansatz von 50 ml gewählt werden. Die Isolierung erfolgte dann mit Nucleobond™ AX100.
- Für sehr große Mengen an DNA wurde mit dem Qiagen Plasmid MAXI-Kit aus 150 ml Kultur präpariert.

#### **4.2.1.2 Präparation von RNA**

Die mRNA aus der humanen Zelllinie HepG2 wurde für die unter 4.3.5. beschriebene RT-PCR benötigt.

Die Homogenisierung der Zellen erfolgte mit Hilfe des QIAshredders, eine anschließende Isolierung der Total-RNA wurde mit dem RNeasy® Mini Kit durchgeführt und die cDNA, wie unter 4.2.6 beschrieben, gewonnen.

## 4.2.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht eine  $OD_{260\text{ nm}}$  von 1,0 einer Konzentration von 50  $\mu\text{g/ml}$  bei doppelsträngiger DNA beziehungsweise 40  $\mu\text{g/ml}$  bei einzelsträngiger RNA.

## 4.2.3 Enzymatische Modifikation von Nukleinsäuren

### 4.2.3.1 Restriktion

Zur Konstruktion von neuen Expressionsplasmiden wurden Grundplasmide (Vektoren) und PCR-Produkte („Inserts“) durch Restriktionsverdau für verschiedene Ligationen vorbereitet.

- *Verwendete Restriktionsenzyme:*

BamH I, Kpn I, Hind III

- *Verwendete Puffer:*

Boehringer B (10 $\times$ ):

100 mM Tris-HCl, 50 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 M NaCl, 10 mM 2-Mercaptoethanol; pH 8,0

NEB 4 (10 $\times$ ):

200 mM Tris-acetat, 100 mM Magnesiumacetat, 500 mM Kaliumacetat, 10 mM DTT;  
pH 7,9

- *Reaktionsansätze:*

Gleichzeitiger Verdau mit BamH I und Kpn I

X  $\mu\text{l}$  DNA (= 5  $\mu\text{g}$  Vektor, oder circa 35  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR-Produkt)

5  $\mu\text{l}$  NEB 4

0,5  $\mu\text{l}$  BSA-Lösung

1  $\mu\text{l}$  BamH I

1  $\mu\text{l}$  Kpn I

ad. 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Gleichzeitiger Verdau mit BamH I und Hind III

X  $\mu\text{l}$  DNA (= 5  $\mu\text{g}$  Vektor, oder circa 35  $\mu\text{l}$  aufgereinigtes PCR-Produkt)

5  $\mu\text{l}$  Puffer Boehringer B

1  $\mu\text{l}$  BamH I

1  $\mu\text{l}$  Hind III

ad. 50  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$

Die Restriktionsansätze wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert. Um nach der Spaltung freigesetzte Oligonukleotide zu entfernen, wurden die Reaktionslösungen mit dem QIAquick™ Nucleotide Removal Kit behandelt. Die geschnittenen Vektoren und Inserts konnten nach der Reinigung für die Ligation eingesetzt werden.

#### 4.2.3.2 Ligation

Die Ligation von geschnittenem Vektor und Insert erfolgte mit dem DNA Ligation Kit entsprechend dem vorgegebenen Protokoll. Um eine möglichst gute Ligationseffizienz zu erhalten, wurde das Insert in vierfachem molarem Überschuss zum Vektor vorgelegt.

- *Reaktionsansatz:*
  - X µl geschnittener Vektor (etwa 40 ng)
  - Y µl geschnittenes Insert
  - 2 µl DNA Dilutionspuffer (5×)
    - ad 10 µl H<sub>2</sub>O bidest., gut gemischt
  - + 8 µl H<sub>2</sub>O bidest.
  - 2 µl T<sub>4</sub>-Ligasepuffer (10×)
  - 0,5 µl T<sub>4</sub>-Ligase
- Die Ligation erfolgte über Nacht bei 16 °C. Die Reaktion wurde durch 10minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt. Vom Ansatz wurden entsprechende Aliquots für die Transformation (Kapitel 4.1.6) verwendet.

#### 4.2.4 Agarosegelelektrophorese von DNA

##### Benötigte Lösungen und Chemikalien:

- Agarose
- Ethidiumbromidlösung (500 µg/ml)
- Größenstandards III oder VIII
- Probenauftragspuffer (6×)
- *TBE (Tris-Borat-Puffer):*
  - 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA
- *TAE (Tris-Acetat-Puffer):*
  - 40 mM Tris, 10 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; mit Eisessig auf pH 7,8 eingestellt

Nukleotidfragmente wurden je nach Bedarf auf 0,8 bis 2 %igen Agarosegelen aufgetrennt.

- Je nach gewünschtem Endgehalt und Größe des Gels wurde die nötige Menge an Agarose in einen Erlenmeyerkolben eingewogen, mit dem entsprechenden Volumen an TAE oder TBE versetzt und diese Suspension anschließend in der Mikrowelle aufgeköcht.
- Nach Zugabe von Ethidiumbromidlösung (500 µg/ml; 1-2 µl je ml Agaroselösung) wurde die Lösung in den vorbereiteten Gelträger gegossen.
- Auf dem nach 30 min ausgehärtetem Gel konnten nun die Proben, 1:4 bis 1:6 mit Auftragspuffer versetzt, aufgetragen werden.
- Die Elektrophorese erfolgte in Biorad Gelelektrophoresekammern bei einer auf die Gelgröße abgestimmten Spannung von 80-120 V.

#### 4.2.5 Sequenzierung von Nukleinsäuren

Die Sequenzierung erfolgte nach der Sanger-Methode (Didesoxy-Verfahren) durch die Firma Sequiserve (Dr. W. Metzger) in Vaterstetten, München.

#### 4.2.6 Erststrangsynthese von cDNA

Mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase wird RNA in DNA umgeschrieben. In einem Ansatz des T-primed First-Strand Kits liegt dieses Enzym zusammen mit einem Oligo-d(T)-Primer und allen nötigen Reagenzien lyophilisiert vor. Dem erwähnten Reaktionsansatz musste nur noch bis zu 5 µg Gesamt-RNA (isoliert, wie unter 4.2.1.2 beschrieben) zugesetzt werden.

#### 4.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Diese *in vitro*-Methode wurde verwendet um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren. Der jeweiligen Zielsetzung entsprechend mussten die Reaktionsbedingungen dem unten angegebenen Standardprotokoll angepasst werden.

##### Verwendete Lösungen und Chemikalien:

- *Taq DNA-Polymerase (rekombinant) Amplifikationssystem (MBI Fermentas):*  
mit Taq DNA-Polymerase, PCR-Puffer (10×) und MgCl<sub>2</sub>-Lösung (25 mM)
- *dNTP-Lösung (2 mM):*  
Stammlösung (100 mM; MBI Fermentas) 1:50 mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub> verdünnt

- Für einen 20 µl-Reaktionsansatz wurden pipettiert:
  - 2 µl dNTP
  - 2 µl Taq-Polymerase-Puffer
  - 0,2 µl MgCl<sub>2</sub>-Lösung
  - 1 µl forward-Primer (10 µM)
  - 1 µl reverse-Primer (10 µM)
  - 0,2 µl DNA Taq-Polymerase (1 U/µl)
  - 0,1-1 µl Template (2 ng Plasmid-DNA/Mini-Präparation, 20 ng cDNA, oder 1 µl Bakteriensuspension)
  - ad. 20 µl mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>
  
- Die Amplifizierung des gewünschten DNA-Fragmentes erfolgte in einem PCR-Gerät (Robocycler, Stratagene) nach folgendem allgemeinen Temperaturprogramm:

Zyklus	Zeit	Temperatur	Wiederholungen	Zweck
1	5-10 min	95 °C	1	Denaturierung der Matrize
2	0,5-1 min 0,5-1 min 0,5-1,5 min	95 °C 45-65 °C* 72 °C	25-35	Denaturierung der Matrize Primer-Hybridisierung Strangverlängerung
3	10 min	72 °C	1	Strangverlängerung

\* Die optimale Primerhybridisierungstemperatur richtet sich nach der individuellen Schmelztemperatur des verwendeten Primerpaars und wurde jeweils experimentell ermittelt.

#### 4.2.7.1 Amplifizierung spezifischer DNA-Fragmente

##### Amplifizierung der kodierenden Sequenz von h17β-HSD 5

Unter Bezugnahme auf das Standardprotokoll wurden folgende spezifische Komponenten gewählt:

- *Matrize:*

Plasmid von pET h3α-HSD 2 (AKR1C3), freundlicherweise von Prof. Dr. T. Penning (University of Pennsylvania, Philadelphia) zur Verfügung gestellt.

Proteinsequenz: entspricht für 3α-HSD 2 veröffentlichten Sequenz mit Austausch Aminosäure 75: Lys gegen Met und Aminosäure 175: Met gegen Ile (GenBank-Zugangsnr. AAB 41916), identisch mit AKR1C3 (H. K. Lin *et al.*, 1997; I. Dufort *et al.*, 1999; J. M. Jez & T. M. Penning, 2001).



- *Primer:*

forward: 5'-TTT **GGA TCC** ATG TCC CAG CAG TGT GTA AAG-3'

reverse: 5'-TTT **GGT ACC** TTA ATA TTC ATC TGA ATA TGG ATA ATT AGG GTG-3'

Die Primer besitzen die Schnittstellen (fett gedruckt) für BamH I (forward) und Kpn I (reverse), um die erhaltenen DNA-Fragmente nach erfolgter Restriktionsspaltung in einen entsprechend komplementär geschnittenen Expressionsvektor einklonieren zu können.

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	1
45 sec	95 °C	30
40 sec	59 °C	
1 min	72 °C	
5 min	72 °C	1

### Amplifizierung der kodierenden Sequenz von h17 $\beta$ -HSD 7

Im Bezug auf das Standardprotokoll wurden hier folgende Komponenten gewählt:

- *Matrize:*

cDNA aus humanem Ovar

- *Primer:*

forward: 5'-TTT **TGG ATC** CAT GCG AAA GGT GGT TTT GAT CAC CG-3'

reverse: 5'-AAA AAA **GCT TAT** AGG CAT GAG CCA CTG AGC CTG-3'

Die Oligonukleotide besitzen die Schnittstellen (fett gedruckt) für BamH I (forward) und Hind III (reverse) um eine spätere Klonierung in einen entsprechend komplementär geschnittenen Vektor zu ermöglichen.

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	1
45 sec	95 °C	30
30 sec	60 °C	
1 min	72 °C	
5 min	72 °C	1

#### 4.2.7.2 Kolonie-PCR zur Identifizierung rekombinanter Plasmide

Mit Hilfe dieser Methode konnten nach erfolgter Ligation und Transformation die Bakterienkolonien auf das Tragen des gewünschten Plasmids untersucht werden.

Dazu wurden die Klone in 200  $\mu$ l Selektivmedium überimpft und anschließend 2 h bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Von den Bakterienkulturen wurden jeweils 1  $\mu$ l pro PCR-Ansatz verwendet. Folgende Klone wurden überprüft (PCR-Protokolle unter 4.2.7.1):

- pGEX h17 $\beta$ -HSD 5 BamH I/Kpn I (*E. coli* JM 107)
- pCR2.1 h17 $\beta$ -HSD 7 BamH I/Hind III (*E. coli* JM 107)
- pGEX h17 $\beta$ -HSD 7 BamH I/Hind III (*E. coli* B BL21 Codon<sup>+</sup>)

#### 4.2.8 Reinigung von PCR-Produkten

Die Reinigung von PCR-Produkten erfolgte entweder unmittelbar aus dem erhaltenen PCR-Ansatz mittels des QIAquick™ PCR Purification Kits oder präparativ aus einem TAE-Agarosegel. Dabei wurde die interessierende Bande aus dem Gel ausgeschnitten und die DNA mit Hilfe des QIAquick™ Gel Extraction Kits aufgereinigt.

#### 4.2.9 Klonierung mit dem TA Cloning® Kit

Mit Hilfe des TA Cloning® Kits konnten die durch PCR amplifizierten DNA-Sequenzen direkt, ohne weitere Vorbehandlung, in den beinhalteten pCR®2.1-Vektor einkloniert werden. Die Taq-Polymerase hat die Eigenschaft, vorwiegend Nukleotide als Überhänge an das Ende des PCR-Produkts zu hängen, sodass dieses leicht in den im Kit vorliegenden pCR®2.1-Vektor, der jeweils 3'-T-Überhänge trägt, einligiert werden kann. Da es sich bei diesem Vektor nicht um einen Expressionsvektor handelt, kann er nach erfolgter Transformation in ebenfalls im Kit enthaltene TOP 10F'-Bakterien lediglich zur Amplifikation des erhaltenen Konstruktes verwendet werden.

- *Allgemeiner Ligationsansatz:*
  - X  $\mu$ l PCR-Produkt
  - 1  $\mu$ l Ligationspuffer (10 $\times$ )
  - 2  $\mu$ l pCR®2.1-Vektor (25 ng/ $\mu$ l)
  - 1  $\mu$ l T<sub>4</sub>-DNA-Ligase (5 U/ $\mu$ l)
  - ad. 10  $\mu$ l mit H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 16 °C.

#### **4.2.10 Expressionsplasmide**

##### **pGEX h17 $\beta$ -HSD 4 (N-term./h32) Sac I/Sal I**

Der dieses Konstrukt tragenden Klon wurde von Dr. Gabriele Möller zur Verfügung gestellt. In diesem Expressionsplasmid ist die N-terminale EDH-Domäne der h17 $\beta$ -HSD 4 über die Restriktionsschnittstellen Sac I und Sal I in den pGEX-Vektor inkloniert worden.

##### **pGEX h17 $\beta$ -HSD 5 BamH I/Kpn I**

Als Matrize für die Amplifizierung der kodierenden Sequenz der h17 $\beta$ -HSD 5 diente die Plasmidpräparation des Vektors pET h3 $\alpha$ -HSD 2, zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. T. Penning (University of Pennsylvania, Philadelphia). Das nach PCR-Amplifikation (Primer mit Schnittstellen für BamH I bzw. Kpn I) und Restriktion erhaltene Insert wurde in die multiple Klonierungsstelle des pGEX-Vektors einligiert.

##### **pCR<sup>®</sup>2.1 h17 $\beta$ -HSD 7 BamH I/Hind III**

Das mittels PCR (siehe 4.2.7.1) aus humaner, ovarieller cDNA amplifizierte DNA-Fragment wurde mit dem TA Cloning<sup>®</sup> Kit direkt in den pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor inkloniert, siehe Kapitel 4.2.9. Dieses Konstrukt diente lediglich der Vervielfältigung der DNA.

##### **pGEX h17 $\beta$ -HSD 7 BamH I/Hind III**

Das Insert für den Expressionsvektor pGEX wurde durch PCR unter Verwendung des Plasmids pCR<sup>®</sup>2.1 h17 $\beta$ -HSD 7 als Template vervielfältigt, mit den entsprechenden Restriktionsenzymen (siehe 4.2.3.1) geschnitten, mit dem QIAquick<sup>™</sup> Nucleotide Removal Kit gereinigt und in den mit den gleichen Restriktionsenzymen verdauten und über Gelextraktion gereinigten pGEX-Vektor inkloniert.

## **4.3 Klonierung der humanen 17 $\beta$ -HSD 7**

### **4.3.1 Aufklärung der kodierenden Sequenz**

Mit der kodierenden Sequenz der murinen 17 $\beta$ -HSD 7 (GenBank-Zugangsnr.: Y15733) wurde die humane EST-Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach passenden Konstrukten durchsucht. Die gewünschten Klone wurden bestellt, sequenziert und mit dem AssemblyLign-Computerprogramm (Oxford Molecular) verglichen.

### **4.3.2 Klonierung der kodierenden Sequenz in Expressionsvektoren**

Die bei den Sequenzvergleichen erhaltene, für die humane 17 $\beta$ -HSD 7 kodierende Sequenz diente als Grundlage für das Design von Oligonukleotiden. Diese dienten der Amplifikation der kodierenden DNA-Sequenz mit Hilfe der cDNA aus humanem Ovar. Die Amplifizierung erfolgte wie in Kapitel 4.2.7.1. angegeben. Die Herstellung der Konstrukte findet sich im Abschnitt 4.2.10.

### **4.3.3 Aufklärung der genomischen Struktur**

#### **4.3.3.1 Screening einer humanen genomischen PAC-Bibliothek**

Zur Aufklärung der genomischen Struktur der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 wurde die humane genomische PAC-Bibliothek RPCI6 709 (vierfache genomische Repräsentation, durchschnittliche Insertlänge 130 kb) des Ressourcenzentrums, Primärdatenbank des Deutschen humanen Genomprojektes (RZPD), am Max-Planck-Institut für molekulare Genetik in Berlin, verwendet.

#### **[<sup>32</sup>P]-dCTP-Markierung der Sonde**

Die eingesetzte Sonde wurde mittels PCR gewonnen, siehe Kapitel 4.2.7.1. Die Markierung dieser hergestellten DNA-Stränge mit  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP erfolgte mit dem Prime-it<sup>®</sup> RmT Random Primer Labeling Kit entsprechend dem vorgegebenem Protokoll.

Um den Ansatz von nicht inkorporiertem  $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-dCTP zu reinigen, wurde der Markierungsansatz anschließend mit dem PCR-Purification Kit von Qiagen behandelt. Abschließend wurde die Sonde für 5 min auf 95 °C denaturiert, auf Eis abgekühlt und sofort verwendet.

## Hybridisierung der Filter

### Benötigte Materialien:

- Membran mit humaner genomischer PAC-Bibliothek
  - *Church-Puffer*:  
0,5 M NaP<sub>i</sub> pH 7,2, 0,25 M SDS, 1 mM EDTA, 1 % BSA (m/v)
  - *Waschpuffer*:  
40 mM NaP<sub>i</sub> pH 7,2, 0,1 % SDS
- Für die Prähybridisierung wurden die Membranen in mit je 200 ml Church-Puffer gefüllte Schalen (24×24 cm), mit der Oberseite nach unten zeigend, bei 65 °C für 4 h inkubiert.
  - Die Sonde wurde direkt unter die Membranen in den Church-Puffer pipettiert. Über Nacht wurde bei 65 °C hybridisiert.
  - Am folgenden Tag wurden die Filter mit auf 65 °C temperierter Waschlösung zweimal für je 20 min gewaschen und anschließend in einen Kunststoffbeutel eingeschweißt.
  - Die Exposition von Kodak X-Omat-Filmen erfolgte für 12 h bei –80 °C.

## Gewinnung der Klone

- Die Koordinaten der positiven Spots auf den Filtern dienten zur Berechnung eines Nummerncodes unter dem die Klone bestellt wurden. Von allen 7 identifizierten Klonen wurde eine Plasmidpräparation angefertigt.

## Verifizierung und Auswahl des verwendeten genomischen Klons

Die Verifizierung der erhaltenen Klone erfolgte mit Hilfe einer PCR. Dabei lag der forward-Primer am Ende der kodierenden Region, der reverse-Primer komplementär zur 3'-untranslatierten Region, in 5'-Richtung zum Poly(A)-Signal. Als Matrizen wurden die entsprechenden Plasmidpräparationen der genomischen Klone verwendet.

- *Primer*:  
forward: 5'-CCA GGC TCA GTG GCT CAT GC-3' (for.1045)  
reverse: 5'-CCA TGT ACC CCA GAA TGT ACA GAA GG-3' (1372 rev (UTR))

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	1
45 sec	95 °C	30
30 sec	60 °C	
30 sec	72 °C	
5 min	72 °C	1

#### 4.3.3.2 Präparation und Sequenzierung genomischer DNA

Die Präparation der genomischen DNA wurde mit dem Qiagen MAXI-Kit nach der entsprechenden Vorschrift durchgeführt. Für die Sequenzierung (Firma Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) eingesetzten Primer finden sich im Anhang (Kapitel 9.1).

#### 4.3.3.3 Bestimmung der Exon-Intron-Grenzen

Die Exon-Introngrenzen wurden durch den Vergleich der cDNA-Sequenz der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 mit den aus den Sequenzierungen der genomischen DNA erhaltenen Nukleinsäuresequenzen bestimmt. Auf die Einhaltung der Splice-Akzeptor-Stellen wurde dabei ebenfalls geachtet.

#### 4.3.3.4 Bestimmung der Introngrößen

Um besonders lange DNA-Sequenzen, damit auch Introns, mittels PCR amplifizieren zu können, wurde der ELONGASE<sup>®</sup>-Amplification Kit verwendet, der neben der Taq-Polymerase noch thermostabile DNA-Polymerasen der *Pyrococcus species* enthält und so eine Vervielfältigung von Nukleotidsequenzen einer Länge bis 20 kb ermöglicht.

Unter Verwendung der im Kit enthaltenen Pufferlösungen und des Enzymmixes wurde für einen 20  $\mu$ l-PCR-Ansatz Folgendes pipettiert:

- *20  $\mu$ l-Ansatz:*
  - 2  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix
  - 4  $\mu$ l Puffer A
  - 6  $\mu$ l Puffer B
  - 0,2  $\mu$ l Elongase
  - 1  $\mu$ l forward-Primer
  - 1  $\mu$ l reverse-Primer
  - 0,1  $\mu$ l DNA-Matrize (Plasmidpräparation des genomischen PAC-Klons)
  - 5,7  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

- *Primer:*

Um die Introngrößen ermitteln zu können, wurden anhand der cDNA für die PCR Intron-flankierende Primer konstruiert (Kapitel 9.2).

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	1
1 min	95 °C	35
45 sec	53 °C	
12 min	68 °C	
5 min	68 °C	1

#### 4.3.4 Bestimmung der chromosomalen Lokalisation mittels eines Radiation Hybrid Panels

Für die Bestimmung der chromosomalen Lokalisation der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 wurden die Sammlungen genomischer DNA der zwei Mensch-Hamster Hybridzelllinien Stanford (G3) und GeneBridge (GB4) von Research Genetics (Huntsville, AL, USA) eingesetzt.

Alle beiden Panel wurden durch die Fusion von bestrahlten menschlichen diploiden Zellen mit Akzeptorzellen des chinesischen Hamsters erzielt. Durch unterschiedliche Bestrahlungsstärken konnten zwei Hybridzelllinien-Sammlungen unterschiedlicher Auflösung erhalten werden. Der GB4-Panel wurde durch die Bestrahlung mit 3000 rad Röntgenstrahlung erhalten und beinhaltet 93 Hybride (G. Gyapay *et al.*, 1996). Der G3-RHP wurde durch Bestrahlung mit 10000 rad erhalten und zeigt in seiner gesamten Länge durchschnittliche physikalische Distanzen von etwa 500 kb (E. A. Stewart *et al.*, 1997).

Die DNA-Präparationen aller Hybridzelllinien wurden als Matrizen für eine PCR-Reaktion verwendet.

- *Primer:*

forward: 5'-GCT CTT TTA CTA AGC CAG ATT GAT ATT AGG-3'

(Intron 8/20915)

reverse: 5'-ATG CCA CCA CAC CCA GCT ATT A-3' (Exon 9: 1152 rev/20496)

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur	Wiederholung
5 min	95 °C	1
30 sec	95 °C	30
45 sec	55 °C	
45 sec	72 °C	
5 min	72 °C	1

- Die Ergebnisse der PCR wurden auf einem 2 %igen, mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel sichtbar gemacht und nach Vorschrift ausgewertet (Bande = 1, keine Bande = 0, schwaches Signal = 2) und für eine „Multipunktanalyse“ an den Whitehead/MIT-Server (<http://www-genome.wi.mit.edu/GB4>) und für eine Zweipunktanalyse an den Stanford Human Genome Center Server (<http://www-shgcc.stanford.edu/G3>) geschickt.
- Die G3-Daten wurden mit der Multipunktanalyse der RHMAP 3.0-Software weiterbearbeitet.

#### 4.3.5 Bestimmung der Gewebeverteilung (RT-PCR)

Zur Bestimmung der Expression der h17 $\beta$ -HSD 7 in verschiedenen Geweben wurde eine RT-PCR durchgeführt und auf einem 1 %igen Agarosegel mittels Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

- *Matrizen:*
  - käuflich erworbene menschliche cDNA von Darm, Ovar, Leukozyten, Prostata, Dünndarm, Niere, Testis und Thymus (Human Multiple Tissue cDNA (MTC<sup>TM</sup>) Panel; Clontech)
  - cDNA aus HepG2-Zellen;
  - Positivkontrolle: Plasmidpräparation: pCR<sup>®</sup> 2.1 h17 $\beta$ -HSD 7
- *Primer:*
  - h17 $\beta$ -HSD 7:  
forward: 5'-TTT TGG ATC CAT GCG AAA GGT GGT TTT GAT CAC CG-3'  
reverse: 5'-AAA AAA GCT TAT AGG CAT GAG CCA CTG AGC CTG-3'



- humane ribosomale S26-Untereinheit:

forward: 5'-AAT GGT CGT GCC AAA AAG GGC-3'

reverse: 5'-TTA CAT GGG CTT TGG TGG GGG-3'

- *Temperaturprogramm:*

Zeit	Temperatur		Wiederholung
	h17 $\beta$ -HSD 7	S26	
5 min	95 °C	95 °C	1
45 sec	95 °C	95 °C	30
45 sec	64 °C	60 °C	
1 min	72 °C	72 °C	
5 min	72 °C	72 °C	1

## 4.4 Expression, Reinigung und Analyse von GST-Fusionsproteinen

### 4.4.1 Expression von GST-Fusionsproteinen

- Der das entsprechende pGEX-Konstrukt tragende Klon wurde in ampicillinhaltigem LB-Medium (zwischen 200 und 600 ml) angeimpft, üblicherweise mit 1/100 einer Übernachtskultur.
- War eine optische Dichte OD<sub>600 nm</sub> von 0,6 bis 1,0 erreicht, so wurde die Expression des Fusionsproteins durch Zusatz von IPTG (Endkonzentration 0,25-0,5 mM) induziert und die Kultur weitere 2 bis 4 h bei 37 °C geschüttelt.
- Durch Zentrifugation (4500 rpm/10 min/4 °C) wurde ein Bakterienpellet gewonnen und bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert.

### 4.4.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen

#### 4.4.2.1 Aufschluss des Bakterienpellets

##### Benötigte Lösungen/Chemikalien:

- 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- flüssiger Stickstoff
- Endonuklease (Benzonase)

- *LysozymbLösung*: 50 mg Lysozym/ml PBS)
- *PBS (phosphate buffered saline)*:  
8 g NaCl, 1,44 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,24 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; ad 1 l mit H<sub>2</sub>O<sub>bide</sub>; mit HCl auf pH 7,3 eingestellt
- *Lysispuffer für h17β-HSD 4 und 5*:  
50 mM Tris/HCl pH 7,8, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA
- *Lysispuffer für h17β-HSD 7*:  
10 mM KP<sub>i</sub> pH 8,0, 20 % Glycerin (v/v), 0,05 % BSA, 0,02 % NaN<sub>3</sub>, 0,08 % Triton X 100
- *Proteaseinhibitorlösung (1000×)*:  
Antipain (20 mg/ml), Aprotinin (0,2 mg/ml), Leupeptin (0,2 mg/ml)

Die im Folgenden angeführten Mengenangaben beziehen sich auf die Aufarbeitung eines Bakterienpellets, das aus 100 ml Kultur gewonnen wurde.

- Die gefrorenen Pellets wurden auf Eis aufgetaut, in je 5 ml eisgekühltem PBS resuspendiert und zentrifugiert (4500 rpm/10 min/4 °C).
- Die resultierenden Pellets wurden in je 5 ml Lysispuffer aufgenommen, mit 10 µl Lysozym- und 5 µl Proteaseinhibitorlösung versetzt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Die Suspension wurde anschließend abwechselnd in flüssigem Stickstoff gefroren und in einem Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Vorgang wurde sooft wiederholt bis die Präparation in einen zähflüssigen Zustand übergegangen war.
- Die den viskosen Zustand verursachende DNA wurde durch Zusatz von 1 U Endonuklease und 300 µl 100 mM MgCl<sub>2</sub> abgebaut, bis die Lösung wieder leichtflüssig wurde (circa 45 min/RT) und zentrifugiert werden konnte (4500 rpm/4 °C/30 min).
- Der die löslichen Proteinkomponenten beinhaltende Überstand des Zentrifugats konnte abgenommen und für die folgende Aufreinigung verwendet werden.

#### **4.4.2.2 Aufreinigung von GST-Fusionsproteinen an GT-Sepharose**

Die Aufarbeitung erfolgte nach der Vorschrift des GST Gene Fusion Systems der Firma Pharmacia Biotech.

Die im Folgenden angegebenen Mengen an Lösungen beziehen sich auf die Aufarbeitung eines Bakterienpellets, das aus 100 ml Kultur gewonnen wurde.

**Benötigte Lösungen und Chemikalien:**

- Glutathion Sepharose 4B (100  $\mu$ l je 100 ml Bakterienkultur)
- PBS
- *Thrombinstammlösung:*  
500 U in 500  $\mu$ l vorgekühltem PBS gelöst, gemischt, in Aliquots zu je 50  $\mu$ l bei -20 °C eingefroren
- *Thrombinspaltlösung:*  
die Stammlösung wurde unmittelbar vor der Anwendung 1:20 in eiskaltem PBS verdünnt
- *Glutathion-Elutionspuffer:* 10 mM Glutathion in 5 mM Tris pH 8,0

**Vorbereitung der GT-Sepharose 4B**

Die GT-Sepharose-Suspension wurde dreimal mit dem 10fachen Volumen an eiskaltem PBS gewaschen.

**Anbindung des Fusionsproteins**

- Proteinhaltiger Überstand wurde auf vorbereitete GT-Sepharose 4B gegeben.
- Die Anbindung von GST-Fusionsprotein an die Matrix erfolgte unter Schütteln für 2 h bei 4 °C.
- Danach wurde der Protein-Sepharose-Komplex dreimal mit dem doppeltem Volumen an eisgekühltem PBS gewaschen (Zentrifugation: max. 500 rpm/5 min/4 °C).

**Elution des rekombinanten Proteins****A) Thrombinspaltung**

- Um die Hydroxysteroiddehydrogenasen vom an der Matrix gebundenen GST-Anteil zu trennen, wurde eine Thrombinspaltung angeschlossen. Nach Zugabe der Trombinlösung (100  $\mu$ l je 100 ml Bakterienkultur) wurde unter Schütteln bei 4 °C über Nacht inkubiert.
- Am folgenden Tag konnte die das Zielprotein beinhaltende Lösung von der Matrix durch Zentrifugation abgetrennt werden (maximal 500 rpm/5 min/4 °C).
- Die Matrix wurde dreimal mit je 100  $\mu$ l PBS gewaschen (Zentrifugation: maximal 500 rpm/5 min/4 °C);
- Alle erhaltenden Eluate wurden vereinigt und zur Abtrennung mitgerissener Matrixteilchen erneut zentrifugiert (Tischzentrifuge: 10000 rpm/30 sec/RT).

- 
- Der danach erhaltene Überstand wurde über einen Spritzenaufsatzfilter (PVDF, Porengröße 0,45 µm) filtriert. Diese Proteinlösung wurde zu je 50 µl aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

### **B) Elution mit Gluthation**

- Um das an GT-Sepharose gebundene Fusionsprotein als Ganzes zu gewinnen, wurden je 100 µl Matrix mit den gleiche Volumina Gluthation-Elutionspuffer versetzt und über Nacht bei 4° C unter Schütteln eluiert.
- Das weitere Verfahren entspricht den bei der Thrombinspaltung zur Elution angegebenen Arbeitsschritten.

Um die Effektivität aller einzelnen Bindungs-, Wasch- und Elutionsschritte verfolgen zu können, wurden von jedem Reinigungsschritt Aliquots für eine anschließende SDS-Gelelektrophorese zurückbehalten.

## **4.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**

Zur Kontrolle der Aufreinigung und der Reinheit der isolierten Proteine wurde jeweils eine denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese durchgeführt (nach: H. Schagger & G. von Jagow, 1987).

### **Benötigte Lösungen und Chemikalien:**

- Größenstandards: M<sub>F</sub> (Fluka) und M<sub>B</sub> (Biorad)
- Acrylamidlösung (30 % (w/v) Acrylamid, 0,8 % (w/v) Bisacrylamid)
- *Gelpuffer*:  
3 M Tris, 0,3 % SDS; mit HCl auf pH 8,45 eingestellt
- *Laufpuffer*:
  - Anodenpuffer:  
0,2 M Tris; mit HCl auf pH 8,9 eingestellt
  - Kathodenpuffer:  
0,1 M Tris, 0,1 M Tricin, 0,1 % SDS
- *Probenpuffer*:  
50 % Glycerin, 4 % SDS, 0,2 M Tris, 0,1 % Serva-Blue, β-Mercaptoethanol; mit HCl auf pH 6,8 eingestellt

- *Färbelösung:*  
500 mg Coomassie Brilliant Blue-G250, 200 ml Methanol, 5 ml Essigsäure, 295 ml H<sub>2</sub>O; erwärmen und filtrieren
- *Entfärbelösung:* 7 % Essigsäure
- 50 % Glycerin
- 10 % APS
- TEMED
- H<sub>2</sub>O<sub>bidest.</sub>

#### 4.5.1 Herstellen des SDS-Polyacrylamidgels

Die im Folgenden angegebenen Lösungsmengen reichen für zwei Gele in der verwendeten Mini-Protean-Gelkammer (BioRad).

- *10 %iges Trenngel:*  
3,3 ml Acrylamidlösung,  
3 ml Gelpuffer,  
2,5 ml 50 % Glycerin,  
1 ml H<sub>2</sub>O, 20 µl TEMED  
50 µl 10 % APS
- Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit circa 1,5 ml Wasser überschichtet, um die Bildung einer geraden Oberfläche zu ermöglichen. Nach 30 min war der Polymerisationsvorgang abgeschlossen, das Wasser konnte abgegossen und das Sammelgel darübergegeben werden.
- *4 %iges Sammelgel:*  
0,67 ml Acrylamidlösung,  
0,67 ml Gelpuffer,  
3,67 ml H<sub>2</sub>O,  
100 µl Laemmli-Puffer,  
20 µl TEMED,  
50 µl 10 % APS
- Unmittelbar nach Einfüllen der Sammelgelmischung wurden die Probenkämme eingesteckt. Nach weiteren 30 min konnten die Gele für den Lauf aufgebaut werden.

### 4.5.2 Probenvorbereitung

- Die für die Gelelektrophorese bestimmten Proteinlösungen wurden im Verhältnis 1:1 mit Probenpuffer versetzt und 5 min auf 100 °C erhitzt.
- Die Größenmarker  $M_B$  und  $M_F$  mussten für den Lauf gleichermaßen vorbereitet werden.

### 4.5.3 Laufbedingungen des SDS-Polyacrylamidgels

- Die Elektrophorese erfolgte in den Mini PROTEAN II-Apparaturen (Biorad) zunächst bei einer Spannung von 80 V. Diese konnte aber nach Eindringen der Probenfront (anhand der Serva-Blue-Front zu verfolgen) in das Sammelgel auf 120 V erhöht werden.
- Der Lauf wurde beendet nachdem die Serva-Blue-Front das Ende des Gels erreicht hatte.

### 4.5.4 Färben und Trocknen des SDS-Polyacrylamidgels

- Zum Färben der Proteinbanden wurden die Gele etwa 20 min auf 90 °C in Färbelösung erhitzt.
- Nach Beendigung des Färbevorgangs wurden die SDS-Gele kurz mit  $H_2O$  gespült und in die Entfärbelösung gegeben.
- Die Entfärbung erfolgte durch mehrfaches Erhitzen auf 90 °C in jeweils neuer Entfärbelösung bis deutliche Banden erkennbar waren.
- Abschließend wurden die Gele luftblasenfrei zwischen feuchte Zellophanfolie gelegt und in einem Geltrockner bei 80 °C im Vakuum getrocknet.

## 4.6 Bestimmung der Proteinkonzentration

Für die Proteinbestimmung wurde ein von Markwell et al (1981) modifiziertes Protokoll nach Lowry et al (1951) angewendet.

### Benötigte Lösungen und Chemikalien:

- *Tartrat-Lösung:*  
2 %  $Na_2CO_3$ , 0,7 % NaOH, 0,16 % Natriumtartrat, 1 % SDS

- *Lösung A:*  
Tartrat-Lösung mit 4 %  $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ , wird 1:100 verdünnt und frisch eingesetzt
- *Lösung B:*  
Folin-Ciocalteu's-Reagenz/ $\text{H}_2\text{O}$  1:1 (v/v)
- *BSA-Stammlösung (0,1 mg/ml):*  
0,1 mg/ml BSA in Wasser  
Exakte Konzentrationsbestimmung: Stammlösung wurde bei 279 nm gegen Wasser vermessen. 10 mg BSA/ml zeigt bei 1 cm Lichtweg eine Extinktion von 6,6.

#### 4.6.1 Vorbereitung von Proben- und Eichansätzen

- Herstellung der Standardreihe: 0, 40, 80, 120, 160, 200 und 250  $\mu\text{l}$  (mit 0, 16, 32, 64, 80, 88 und 100  $\mu\text{g}$  BSA/ml Ansatz) des BSA-Standards wurden vorgelegt und mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest.}}$  auf 250  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen aufgefüllt.
- Die Proteinproben werden so verdünnt, dass ihre Konzentrationen im Bereich der Standardkurve lagen, das heißt bis maximal 100  $\mu\text{g}$ /Ansatz.

#### 4.6.2 Durchführung und Messung

- Je 250  $\mu\text{l}$  der Proben und des Standards wurden mit 750  $\mu\text{l}$  der Lösung A versetzt, gemischt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert.
- Anschließend wurden jeder Probe 75  $\mu\text{l}$  der Lösung B zusetzt, gründlich gemischt und im Dunkeln mindestens 45 min inkubiert.
- Die Extinktion der Proben sollten innerhalb der nächsten 45 min bei 660 nm gemessen werden.
- Die Konzentration der unbekanntes Proteinprobe wurde mit Hilfe einer Standardkurve (kubische Regression) ermittelt.

### 4.7 Westernblot-Analyse

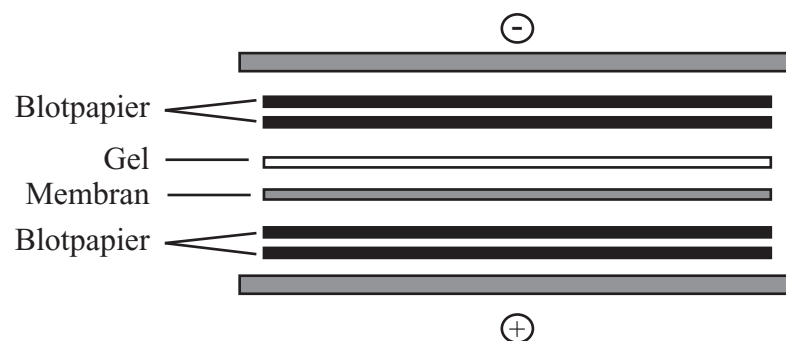
Die im Folgenden angegebenen Lösungen ergeben sich aus dem der verwendeten Trans-Blot SD Semi-Dry Electrophoretic Transfer Zelle (BioRad) beigefügten Arbeitsvorschrift.

**Benötigte Lösungen und Chemikalien:**

- Methanol p. a.
- *Blotpuffer* („Bjerrum und Schafer-Nielsen“-Transferpuffer, Anleitung Biorad):  
48 mM Tris, 39 mM Glycin, 1,3 mM SDS (0,037 %), 20 % Methanol \*  
\* Der pH-Wert des Puffers liegt je nach Qualität des Tricins, Glycins, Methanols oder Wassers zwischen pH 9,0 und 9,4 und sollte nicht durch Zugabe von Säuren oder Basen auf den erwünschten Wert von 9,2 eingestellt werden!
- PVDF-Membran
- Gelblotpapier

**4.7.1 Blotten des SDS-Gels**

- Zunächst wurde die auf Gelgröße zugeschnittene Membran mit Methanol befeuchtet.
- Die je Gel benötigten 4 Blotpapierstücke, die Membran und das zu blottende Gel wurden für 30 min im Blotpuffer inkubiert.
- Alle benötigten Komponenten wurden nach folgendem Schema auf der Blotapparatur luftblasenfrei aufgebracht:



- *Blotbedingungen:*
  - Zeit: 30 min
  - Stromstärke: je nach Gelgröße berechnet:  $2,5 \text{ mA/cm}^2$
  - Spannung: richtete sich nach Stromstärke; 25 V durften nicht überschritten werden
- Das Gel wurde zur Kontrolle der Bloteffizienz anschließend wie unter 4.5.4 gefärbt. Der Proteinnachweis erfolgte durch Antikörper.



## 4.7.2 Nachweis von Proteinen durch Antikörper

### Benötigte Lösungen und Chemikalien:

- PBS
- 5 % Milchpulver in PBS
- *1. Antikörper:*  
2 µl monoklonaler Maus-Anti-GST-Antikörper in 5 ml PBS mit 5 ml Milchpulverlösung
- *2. Antikörper:*  
25 µl Peroxidase-konjugierter Ziege-Anti-Maus IgG + IgM (H + L)-Antikörper (1:1 in Glycerin) in 5 ml PBS und 5 ml Milchpulverlösung
- *Komponenten für den Peroxidase-Nachweis:*
  - Stammlösung (5×):  
6,5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 35,7 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0,75 M NaCl, 0,5 M Imidazol, 0,25 % Tween 20 (v/v), pH 7,5
  - CoCl<sub>2</sub>-Lösung: 10 mg/ml
  - 30 % H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - Diaminobenzidintetrahydrochlorid
- Die Membran wurde unmittelbar nach dem Blotten in Milchpulverlösung gegeben und für 1 h bei RT geschüttelt, um unspezifische Bindungen abzusättigen.
- Nach einigen Spülschritten mit PBS wurde der 1. Antikörper auf die Membran gegeben und für 2 h bei RT unter Schütteln auf der Membran belassen.
- Dieser Inkubation folgten weitere gründliche Waschschrte mit PBS und ein Wechsel zur 2. Antikörperlösung.
- Nach zweistündiger Inkubation wurde die Membran erneut gründlich gewaschen.
- Frisch zubereitete Peroxidase-Färbelösung (5 ml Stammlösung, 20 ml H<sub>2</sub>O, 100 µl CoCl<sub>2</sub>-Lösung, 10 µl H<sub>2</sub>O, 3 mg Diaminobenzidintetrahydrochlorid) wurde für einige Minuten auf die Membran geben, bis sich die Banden färben, dann abgegossen. Die Membran wurde nach einem Waschschrte mit Wasser an der Luft getrocknet.

## 4.8 Aktivitätsbestimmung der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen

### 4.8.1 Allgemeine Durchführung

Die jeweiligen Einzelbedingungen für die unterschiedlichen Aktivitätsmessungen der Enzyme finden sich in den folgenden Unterpunkten.

#### Allgemein benötigte Lösungen und Chemikalien:

- $^3\text{H}$ -markiertes Substrat
- Inkubationspuffer
- Cofaktorlösung (5 mg/ml  $\text{H}_2\text{O}$ )
- *Stoplösung:*  
0,21 M Ascorbinsäure in 1 %iger methanolischer Essigsäurelösung
- *Fließmittel HPLC:*  
Acetonitril/ $\text{H}_2\text{O}$  1:1; über Membranfilter (RC 55; regenerierte Cellulose; Porengröße 0,45  $\mu\text{m}$ ) filtriert;
- Szintillationsflüssigkeit: Ready Flow III
- RP-18-Extraktionskartuschen
- Verdünnungen der Phytoestrogene in DMSO bzw. Ethanol (siehe 4.8.1.1)

#### 4.8.1.1 Lösungen der Testsubstanzen

- *Verwendete Lösungsmittel*

Ethanol	Dimethylsulfoxid (DMSO)
Abietinsäure	Apigenin
Biochanin A	Cumestrol
Cumarin	Chrysin
DES	Daidzein
Genistein	3,7-Dihydroxyflavon
Glycyrrhetinsäure	Flavanon
Tamoxifen	Flavon
Quercetin	3-Hydroxyflavon
Zearalenon	5-Hydroxyflavon
	7-Hydroxyflavon
	Kaempferol
	5-Methoxyflavon
	Naringenin

Alle eingesetzten Phytoestrogene wurden im jeweils am besten geeigneten Lösungsmittel aufgenommen und die Stammlösungen (5 mM, 2 mM, 1 mM, 0,5 mM, 10  $\mu$ M und 10 nM) bei -80 °C aufbewahrt.

#### 4.8.1.2 Vorversuche

Um sicherzustellen, dass die hydrophoben Testsubstanzen im wässrigen Reaktionsansatz auch in den angegebenen Endkonzentrationen löslich sind, wurden Vorversuche zur Bestimmung der maximalen Löslichkeit vorgenommen. Dazu wurden die Reaktionsansätze (wie unter 4.8.1.5 beschrieben) pipettiert, wobei anstelle der Enzymlösung PBS und statt der Cofaktorlösung reines H<sub>2</sub>O verwendet wurde. Es wurden Ansätze mit Endkonzentrationen von 50  $\mu$ M, 20  $\mu$ M und 10  $\mu$ M an Testsubstanz vorbereitet und mittels Wellenlängenmessung (190 nm bis 500 nm) auf Absorption und Streuung (Verschiebung der Absorptionskurven oberhalb der X-Achse) bei Wellenlängen > 300 nm untersucht. Wenn Streuung bei einer Testsubstanzkonzentration beobachtet wurde, wurde diese Konzentration ausgeschlossen, um sicher zu sein, dass Inhibitionsunterschiede nicht auf Löslichkeitsunterschieden beruhen.

#### 4.8.1.3 Probenvorbereitung

- Reaktionsansätze (Puffer, aufgereinigtes Enzym, Substrat, Inhibitor, Cofaktor) wurden individuell für ein Gesamtvolumen von 500  $\mu$ l kalkuliert und auf Eis pipettiert;
- Die Ansätze wurden bei 37 °C inkubiert. Die Dauer der Umsetzung richtete sich nach der Aktivität des aufgereinigten Enzyms und sollte gewährleisten, dass der Umsatz noch im linearen Bereich lag.
- Die Proben wurden nach Ablauf der Inkubationszeit aus dem Inkubator genommen und durch Zusatz von je 100  $\mu$ l Stopplösung beendet.
- Eine Vorreinigung der Steroide erfolgte über 1 ml RP-18-Kartuschen, welche jedoch vorher konditioniert werden mussten: Diese wurden je zweimal mit 1 ml Methanol gewaschen, um eine Ausrichtung der hydrophoben C<sub>18</sub>-Ketten zu ermöglichen. Anschließend wurde durch Auftragen von je zweimal 1 ml H<sub>2</sub>O ein wässriges Milieu auf den Säulen geschaffen.
- Die Proben wurden über die Kartuschen gegeben, gefolgt vom Nachspülen mit je 500  $\mu$ l H<sub>2</sub>O. Anschließend wurde mit insgesamt 300  $\mu$ l Methanol in Probengläschen eluiert.

#### 4.8.1.4 Trennung der Steroide und Auswertung

Die Trennung der Steroide erfolgte auf einer RP-18-HPLC-Säule unter folgenden Bedingungen:

- Säule: Hibar<sup>®</sup> Fertigsäule RT, 250-4, Lichrosolv, # 50333, RP-18, 5 µm (Merck)
- Laufmittel: Acetonitril : H<sub>2</sub>O = 1:1 (v/v)
- Einspritzvolumen: 20 µl
- Flussrate: 1 ml/min
- Das Säuleneluat wurde automatisch mit Szintillationsflüssigkeit 1:1 versetzt und die Radioaktivität im Durchflußszintillationsmeßgerät bestimmt.
- Die Aufzeichnung und Auswertung der Chromatogramme erfolgte durch das Programm „Ramona“ (Raytest). Aus den Flächen von Produkt und Edukt wurde der prozentuale Umsatz von Edukt zu Produkt errechnet.

#### 4.8.1.5 Messbedingungen für 17β-HSD 4 und 5

##### Inhibition der humanen 17β-HSD 4

- *Oxidation von Estradiol zu Estron*

*Inkubationsansatz:*

100 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,7 (ad 500 µl)

X µl Enzymlösung (3,2 µg aufgereinigte 17β-HSD4; entspricht Endkonz.: 200 nM)

5µl Lösungsmittel /Stammlösung Phytoestrogen (Endkonz.: 100 nM – 20 µM)

0,5 µl [6,7-<sup>3</sup>H]-Estradiol (Endkonz.: 40 nM)

50 µl NAD<sup>+</sup>-Lösung (5 mg/ml; Endkonz.: 5 mM)

*Inkubationszeit:* ca. 20 min; (Inkubationszeit an die jeweilige Umsatzgeschwindigkeit angepasst; Umsatz sollte maximal bei 30 % liegen)

##### Inhibition der humanen 17β-HSD 5

- *Androstendion zu Testosteron*

*Inkubationsansatz:*

50 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer pH 7,4 (ad 500 µl)

X µl Enzymlösung (8 µg aufgereinigte 17β-HSD 5; entspricht Endkonz.: 0,4 µM)

5 µl Lösungsmittel oder Phytoestrogen (Endkonz.: 100 nM – 20 µM)

0,5 µl [1,2,6,7-<sup>3</sup>H]-Androst-4-en-3,17-dion (Endkonz.: 30 nM)

50 µl NADPH<sup>+</sup>-Lösung (5 mg/ml; Endkonz.: 7 mM)

*Inkubationszeit:* ca. 20 min;

- ***Androstandiol zu Androsteron***

*Inkubationsansatz:*

100 mM NaP<sub>i</sub>-Puffer pH 9,0 (ad 500 µl)

X µl Enzymlösung (6 µg aufgereinigte 17β-HSD 5; entspricht Endkonz.: 0,3 µM)

5 µl Lösungsmittel/ Phytoestrogen (Endkonz.: 100 nM – 20 µM)

0,5 µl [9,11-<sup>3</sup>H]-5α-Androstan-3α,17β-diol (Endkonz.: 50 nM)

50 µl NAD<sup>+</sup>-Lösung (5 mg/ml; Endkonz.: 5 mM)

*Inkubationszeit:* ca. 20 min;

## **4.8.2 Inhibitionsmechanismus für die 17β-HSD 5**

### **4.8.2.1 Einfluss der Cofaktorkonzentration**

Um festzustellen, ob die inhibierende Wirkung von Quercetin auf die Reduktion von Androstendion zu Testosteron durch eine Veränderung der Cofaktorkonzentration zu beeinflussen ist, wurde ein entsprechendes Zusatzexperiment durchgeführt. Bei dem Reaktionsansatz (Kapitel 4.8.1.5) wurde Quercetin (Stammlösung 2 mM; Endkonzentration 20 µM) als Inhibitor eingesetzt und die Reaktion mit einer 12 µM, 120 µM, 1,2 mM, 2,4 mM, 6 mM und 12 mM Cofaktorstammlösung gestartet. Analyse und Auswertung erfolgte wie bereits beschrieben.

### **4.8.2.2 Kombination von Phytohormonen**

Um den Einfluss von Phytoestrogenkombinationen auf die reduzierende Aktivität der 17β-HSD 5 zu analysieren, wurde der unter 4.8.1.5 beschriebene Reaktionsansatz und Messbedingungen gewählt, jedoch die entsprechend höher aufkonzentrierten Kombinationen der Stammlösungen von Quercetin, Biochanin A, Genistein und Daidzein gewählt.

## 4.8.3 Estradioldehydrogenaseaktivität von GST-17 $\beta$ -HSD7

### 4.8.3.1 Herstellung des Bakterienlysats

Das Pellet der induzierten Bakterien wurde im entsprechenden Lysispuffer (Kapitel 4.4.2.1) aufgenommen und nach verschiedenen Verfahren behandelt:

1. keine weitere Behandlung
2. abwechselndes Frieren in flüssigem Stickstoff und Tauen im Wasserbad
3. zunächst Lysozymbehandlung, anschließend Frieren und Tauen
4. Ultraschallbehandlung

Die derart erhaltenen Suspensionen wurden für die Aktivitätsmessung verwendet.

Um die Aktivitäten im Pellet oder im Überstand lokalisieren zu können, wurden die Suspensionen zentrifugiert. Von den erhaltenen Fraktionen (Überstand und Pellet) wurde ein SDS-Gel und ein Westernblot angefertigt.

### 4.8.3.2 Messbedingungen

- ***Bakterienlysats***

*Inkubationsansatz:*

440  $\mu$ l 10 mM  $KP_i$ -Puffer pH 8,0

10  $\mu$ l Bakteriensuspension

0,5  $\mu$ l [6,7- $^3H$ ]-Estron (Endkonz.: 40 nM)

50  $\mu$ l NADPH -Lösung (5 mg/ml; Endkonz.: 5 mM)

*Inkubationszeit:* 60 min

- ***aufgereinigtes Enzym***

*Inkubationsansatz:*

10 mM  $KP_i$ -Puffer pH 8,0 (ad 500  $\mu$ l)

X  $\mu$ l Enzymlösung (5/10  $\mu$ g aufgereinigte GST-HSD 7)

0,5  $\mu$ l [6,7- $^3H$ ]-Estron (Endkonz.: 40 nM)

50  $\mu$ l NADPH -Lösung (5 mg/ml; Endkonz.: 5 mM)

*Inkubationszeit:* 30/60 min

## 4.8.4 Auswertung der Inhibitionsstudien

### 4.8.4.1 Berechnung der prozentualen Inhibition

Die Inhibition in % wurde aus errechneten Umsätzen von Edukt zu Produkt nach folgender Formel bestimmt:

Durch Phytoestrogen *reduzierter Umsatz*  $U_R$  [%]:

$$U_R = \frac{U_I [\%]}{U_K [\%]}$$

$$U_R [\%] = U_R \times 100$$

mit:  $U_I$  [%]: Umsatz in Gegenwart des Phytoestrogens in %

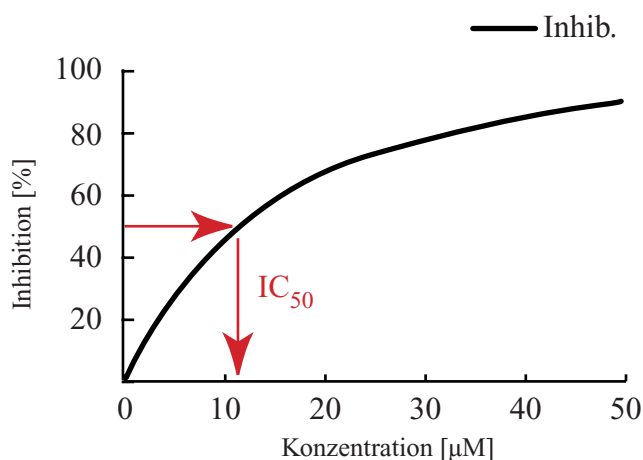
$U_K$  [%]: Umsatz ohne Phytoestrogen in %

Daraus resultierende *Inhibition in %*:

$$\text{Inhib.} [\%] = 100 - U_R [\%]$$

### 4.8.4.2 Bestimmung der $IC_{50}$ -Werte

Die  $IC_{50}$ -Werte, d. h. die Konzentrationen des Inhibitors, die nötig ist um das Enzym um 50 % in seiner Aktivität zu hemmen, wurden durch Interpolation (unter Verwendung der nach 4.8.4.1 erhaltenen Werte) ermittelt.



## 5 ERGEBNISSE

### 5.1 Inhibitionsstudien

#### 5.1.1 Vorversuche und Systemoptimierung

Um sicherzustellen, dass die hydrophoben, pflanzlichen oder synthetischen Steroidhormonanaloga im wässrigen Milieu der Versuchsanordnung in den eingestellten Endkonzentrationen in löslicher Form vorliegen, wurden entsprechende Vorversuche durchgeführt (Kapitel 4.8.1.2). Da einige Substanzen in einer Konzentration von 50  $\mu\text{M}$  nicht mehr, bei 20  $\mu\text{M}$  jedoch die Mehrzahl vollständig in Lösung ging, wurden folgende Endkonzentrationen für die Versuche zur Beeinflussung von Hydroxysteroiddehydrogenasen gewählt: 100 nM, 1  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$ , 10  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$ .

Die Reaktionsbedingungen (Enzymmenge, Inkubationszeit) wurden so gewählt, dass einerseits die Produktbildung im linearen Umsatzbereich lag und andererseits die Menge des gebildeten Produktes groß genug war, um durch Phytoestrogene bedingte Umsatzunterschiede eindeutig quantifizieren zu können.

Als Referenzwert für die ungehemmte Reaktion wurden 25 % und 20 % für 17 $\beta$ -HSD 4 und HSD 5 in Gegenwart von Ethanol oder DMSO (Phytoestrogenlösungsmittel) gewählt. Aus den Umsätzen des Enzyms in Gegenwart der einzelnen Phytoestrogene wurde die Inhibition in Prozent berechnet (Kapitel 4.8.4.1).

#### 5.1.2 Humane 17 $\beta$ -HSD 4

##### 5.1.2.1 Expressionskonstrukt

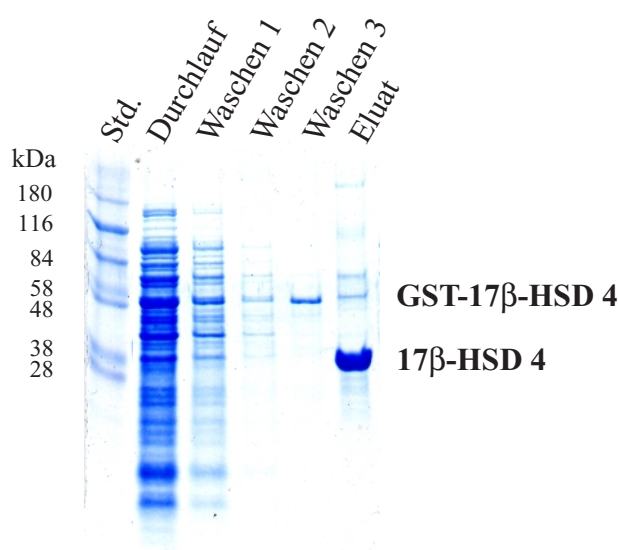
Die humane 17 $\beta$ -HSD 4 wurde 1994 kloniert und charakterisiert (F. Leenders *et al.*, 1994a). Lediglich deren N-terminale Domäne gehört in die SCAD-Proteinfamilie und besitzt Estradioldehydrogenase-Aktivität. Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit nur diese erste 32 kDa-Einheit der h17 $\beta$ -HSD 4 untersucht. Ein, das entsprechende pGEX h17 $\beta$ -HSD 4-Konstrukt tragender, bakterieller Klon wurde von Frau Dr. Möller freundlicherweise zur Verfügung gestellt.



### 5.1.2.2 Expression und Aufreinigung

Das rekombinante Protein wurde in Form eines GST-Fusionsproduktes in *E. coli* überexprimiert (Kapitel 4.4.1). Die Aufreinigung mittels Affinitätsmatrix Glutathion-Sepharose und anschließender Thrombinspaltung lieferte ein mit dem gewünschten Enzym angereichertes Eluat (Kapitel 4.4.2).

Aus 600 ml Kultur konnten bis zu 0,9 mg Protein aufgereinigt werden (Konzentrationsbestimmung des Eluats nach Kapitel 4.6).



**Abb. 5.1: Aufreinigung der h17 $\beta$ -HSD 4**

Die N-terminale Domäne der h17 $\beta$ -HSD 4 wurde mittels GST-Gene Fusion System (Amersham Pharmacia Biotech) exprimiert und aufgereinigt.

*Durchlauf*: nach Anbindung des GST-Fusionproteins an GT-Sepharose erhaltene Fraktion, in der sich alle nicht an die Matrix gebundenen Proteine befinden; *Waschen 1-3*: nach Anbindungsschritt angeschlossene Waschschrte; *Eluat*: nach Thrombinspaltung gesammelte Eluate; *Std.*:Molekularmassenstandard  $M_F$ .

Das erhaltene Enzym wurde für alle im Folgenden beschriebenen *in vitro*-Inhibitionsstudien eingesetzt.

### 5.1.2.3 Inhibition der Estradioldehydrogenase-Aktivität

Die Inhibition der EDH-Domäne der 17 $\beta$ -HSD 4 wurde, wie unter 4.8.1.5 beschrieben, durchgeführt und daraus mit den entsprechenden Formeln die prozentuale Inhibition berechnet (Kapitel 4.8.4.1).

Substanz	Hemmung [%] bei Konzentration von				
	100 nM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM
Flavanon	0	9	4	0	1
Naringenin	0	0	7	0	4
Flavon	0	7	0	10	1
3-Hydroxyflavon	0	13	15	18	7
5-Hydroxyflavon	0	8	0	4	10
7-Hydroxyflavon	0	0	0	15	10
3,7-Dihydroxyflavon	0	10	5	16	6
Chrysin	0	10	6	22	8
Apigenin	0	0	10	4	6
Kaempferol	0	1	14	29	21
Quercetin	0	29	54	79	80
5-Methoxyflavon	0	0	8	12	5
Daidzein	0	15	22	17	11
Genistein	4	16	16	36	42
Biochanin A	0	12	3	24	33
Cumarin	4	0	3	15	15
Cumestrol	0	5	11	32	30
Abietinsäure	12	6	30	30	40
Glycyrrhetinsäure	6	33	44	49	47
DES	0	13	18	14	33
Tamoxifen	11	9	5	0	-*
Zearaleon	12	33	10	37	40

**Tab. 5.1: Inhibition der h17β-HSD 4 durch Phytohormone**

Die in der Tabelle angegebenen Zahlenwerte der Hemmwirkung stellen den Mittelwert aus mehrfacher Messung jedes Ansatzes dar. Diese Werte werden in der darunter gezeigten Grafik veranschaulicht.

\* in dieser Konzentration nicht mehr im Ansatz löslich

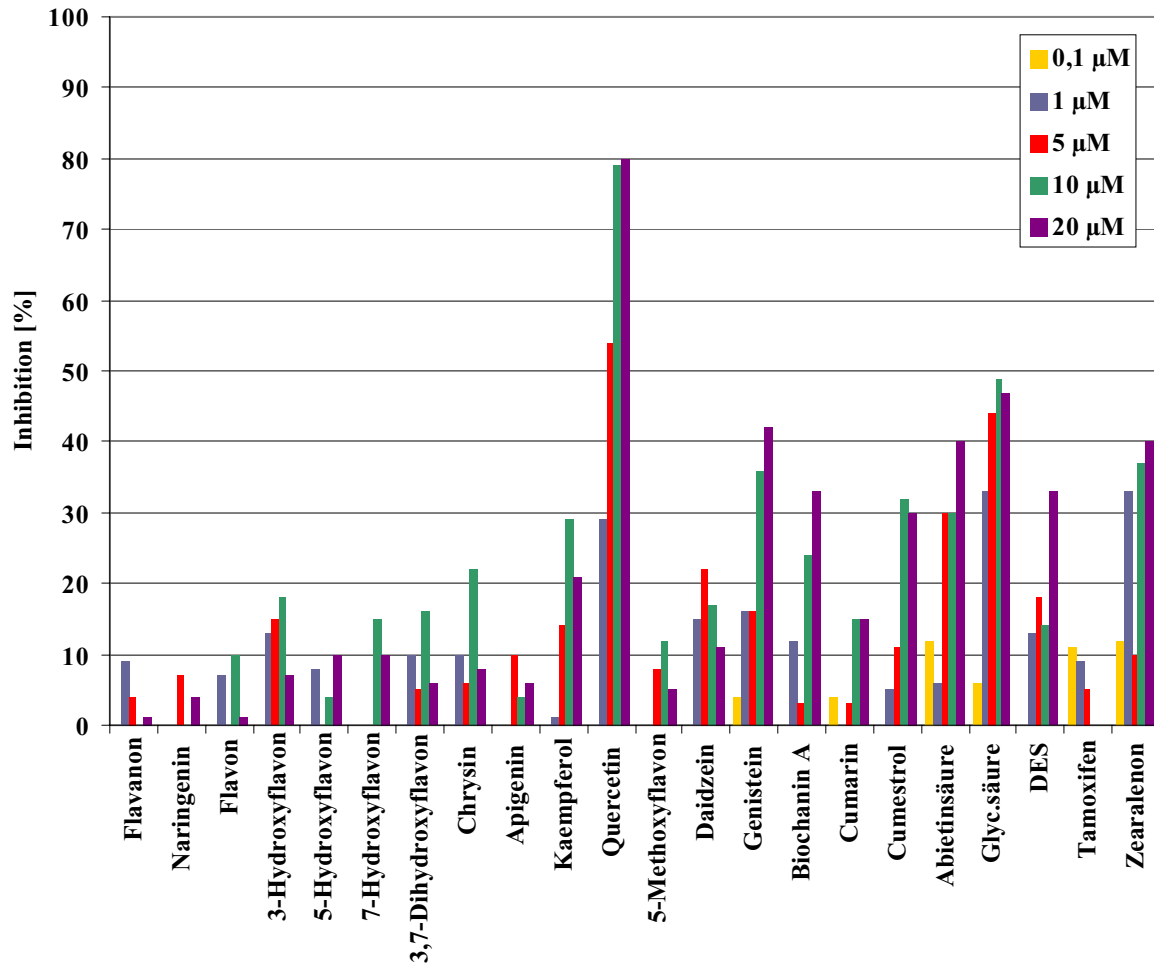


Abb. 5.2: Inhibitionsprofil der h17β-HSD 4

Die Grafik zeigt das Inhibitionsprofil der h17β-HSD 4. Sie wurde mittels der in Tab. 5.1 gezeigten Werte erstellt.

Um die Inhibitorstärke der Umwelthormone beschreiben zu können, wurden deren IC<sub>50</sub>-Werte durch Interpolation ermittelt (Kapitel 4.8.4.2). Bei dieser Bestimmung musste die begrenzte Löslichkeit der hydrophoben Phytoestrogene im wässrigen Puffersystem berücksichtigt werden. Vor allem bei sehr schwachen Inhibitoren konnte häufig die für eine 50%ige Inhibition nötige Konzentration im wässrigen System nicht erreicht werden. In diesen Fällen konnte lediglich die Größenordnung der IC<sub>50</sub>-Werte abgeschätzt werden. Die Bewertung der Inhibitionsstärke anhand der Tabellenposition muss demnach unter Berücksichtigung dieser Einschränkung stattfinden.

Anhand der Tabellenwerte (Tab. 5.1) entsteht zunächst der Eindruck, dass die einzelnen Messwerte nicht inhibierender Substanzen (wie beispielsweise Flavanon) innerhalb der Messreihe stärkeren Schwankungen unterliegen. Ursächlich sind die bei geringeren

Umsatzdifferenzen schwacher Inhibitoren stärker zum Tragen kommende Messungenauigkeit. Gleiches gilt für die beobachteten Schwankungen in den Tabellen 5.3 und 5.4.

Substanz	IC <sub>50</sub> [µM]
Quercetin	4
Glycyrrhetinsäure	5
Tamoxifen	>>10 **
Genistein	20
Chrysin	>20
Daidzein	>20
Biochanin A	>20
Cumarin	>20
Cumestrol	>20 *
DES	>20 *
Flavanon	>>20
Naringenin	>>20
Flavon	>>20
7-Hydroxyflavon	>>20
Apigenin	>>20
5-Methoxyflavon	>>20
3-Hydroxyflavon	>>20 *
5-Hydroxyflavon	>>20 *
3,7-Dihydroxyflavon	>>20 *
Abietinsäure	38
Kaempferol	40
Zearalenon	>50

**Tab. 5.2: IC<sub>50</sub>-Werte der getesteten Substanzen**

Alle IC<sub>50</sub>-Werte wurden durch Interpolation (Kapitel 4.8.4.2) unter Einsatz der in der Tab. 5.1 bzw. Abb. 5.2 gezeigten Messergebnisse ermittelt.

\* nicht löslich in höheren Konzentration als 20 µM;

\*\*nicht löslich in höheren Konzentrationen als 10 µM;

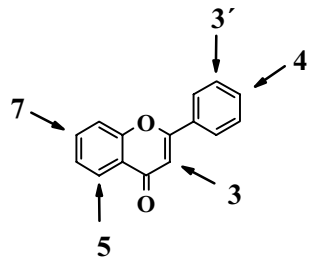
Die beiden stärksten Inhibitoren waren in dieser Studie eindeutig Quercetin und Glycyrrhetinsäure.

### 5.1.2.4 Flavonoide: Struktur-Wirkungsbeziehungen

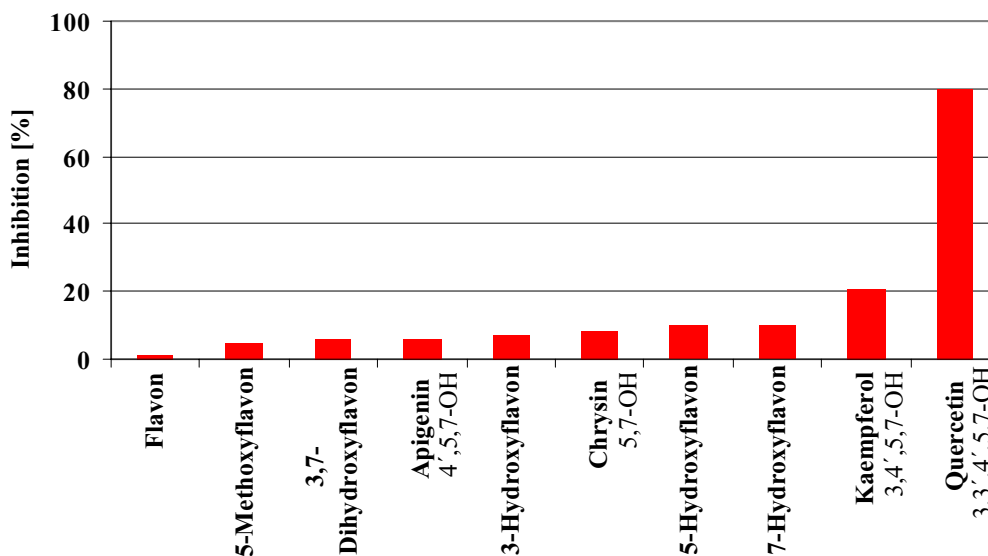
Unter den getesteten pflanzlichen, synthetischen und von Pilzen gebildeten Strukturanaloga der humanen Steroide stellt die Klasse der Flavonoide die größte Gruppe dar. Innerhalb dieser zählen wiederum die Flavone zu den häufigsten Vertretern.

Um die Bedeutung einzelner funktioneller Gruppen innerhalb der Flavone für deren Inhibitionskraft beurteilen zu können, wurden für die Inhibitionsstudie Vertreter dieser Klasse gewählt, die sich in Anzahl und Position ihrer Hydroxylierung unterscheiden. Vergleicht man die Inhibitorkapazität dieser Substanzen untereinander, so ergibt sich folgendes Bild:

A)



B)



**Abb. 5.3: Inhibitionsstärke von Flavonen in Abhängigkeit vom Hydroxyierungsgrad und -position**

A) Strukturformel des Flavongrundgerüsts mit den Positionen möglicher OH-Substitutionen.

B) Im Diagramm ist die Inhibition in % bei einer Hemmstoffkonzentration von 20 µM angezeigt.

In dieser Darstellung lässt sich ablesen, dass bei dem unsubstituierten Flavon kaum eine Hemmung zu beobachten war, während schon für die einfach bis dreifach hydroxilierten bzw. einfach methoxilierten Flavone eine schwache Inhibition der Enzymaktivität zu messen war. Diese Inhibitionskraft steigerte sich deutlich mit der vierten Hydroxylierung (Kaempferol). Mit Abstand als stärkster Inhibitor hat sich das Flavon Quercetin mit 5 hydrophilen Gruppen

dargestellt, wobei unklar blieb, ob die Position der fünften Hydroxygruppe (hier Position 3') eine entscheidende Rolle spielte.

Die im Kapitel 5.1.2.3 ermittelten Ergebnisse für die prozentuale Hemmung sowie die IC<sub>50</sub>-Werte wurden des Weiteren herangezogen, um die Bedeutung der zwischen den Mitgliedern der Flavonoide variierenden Struktureigenschaften auf deren Hemmwirkung zu beurteilen (Näheres im Kapitel 6.1.4.1).

### **5.1.3 Humane 17 $\beta$ -HSD 5 (AKR1C3)**

#### **5.1.3.1 Klonierung des Expressionskonstruktes**

Ein Plasmid mit der kodierende Sequenz der h17 $\beta$ -HSD 5 wurde von Prof. Dr. T. Penning (University of Pennsylvania, Philadelphia) erhalten und für die im Folgenden beschriebenen Klonierungsexperimente verwendet. Die entsprechenden Klone mit dem Expressionskonstrukt pGEX h17 $\beta$ -HSD 5 wurden gewonnen wie unter 4.2.10 beschrieben.

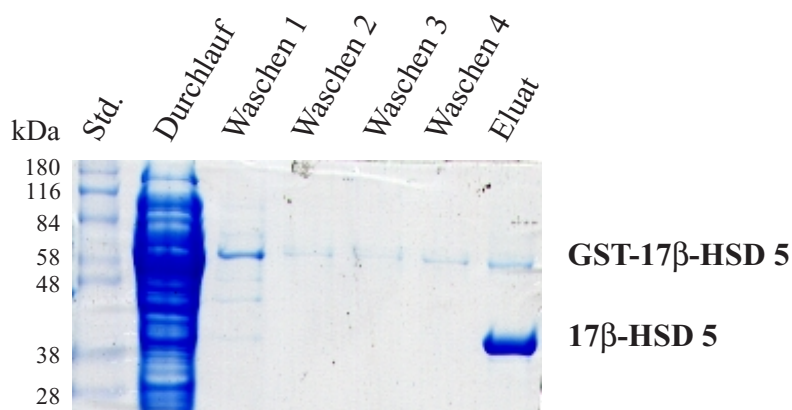
Die Sequenzierung des für das Enzym kodierenden DNA-Abschnittes zeigte im Vergleich mit der von Lin und Mitarbeitern angegebenen Sequenz (M. Khanna *et al.*, 1995) drei Nukleinsäureaustausche, die jedoch auf Aminosäureebene keine Veränderung mit sich brachten und stille Austausche repräsentierten. Dementsprechend ist die Aminosäuresequenz der in den folgenden Experimenten verwendeten h17 $\beta$ -HSD 5 mit der veröffentlichten Sequenz identisch (H. K. Lin *et al.*, 1997), zeigt im Vergleich zur h3 $\alpha$ -HSD 2-Sequenz (GenBank-Zugangsnr.: AAB 41916) nur die, wie bereits erwähnt, zwei abweichenden Aminosäuren (Kapitel 4.2.7.1), was die Enzymaktivität nachweislich nicht beeinflusst (I. Dufort *et al.*, 1999).

#### **5.1.3.2 Expression und Aufreinigung**

Das Enzym wurde in Form des GST-Fusionsproduktes in *E. coli* JM107 überexprimiert (Kapitel 4.4.1). Nach Anreicherung über Bindung an GT-Sepharose und anschließender Thrombinspaltung wurde die Hydroxysteroiddehydrogenase eluiert (Kapitel 4.4.2) und quantifiziert (Kapitel 4.6).

Je nach eingesetzter Bakterienmenge konnten bis zu 0,6 mg Protein aufgereinigt werden.

Das derart gewonnene Protein wurde für die folgenden Messungen verwendet.



**Abb. 5.4: Aufreinigung der h17 $\beta$ -HSD 5**

Die h17 $\beta$ -HSD 5 wurde mittels GST-Gene Fusion System (Amersham Pharmacia Biotech) exprimiert und aufgereinigt. *Durchlauf*: nach Anbindung des GST-Fusionproteins an GT-Sepharose erhaltene Fraktion, in der sich alle nicht an die Matrix gebundenen Proteine befinden; *Waschen 1-3*: angeschlossene Waschschritte; *Elution*: nach Thrombinspaltung gesammelte Eluate; *Std.*: Molekularmassenstandard  $M_F$  (Fluka);

### 5.1.3.3 Inhibition durch Phytoestrogene

Im Falle der h17 $\beta$ -HSD 5 waren bereits durch andere Arbeitsgruppen im Zuge kinetischer Charakterisierungen zahlreiche Aktivitätsmessungen (H. K. Lin *et al.*, 1997; W. R. Duan *et al.*, 1997) mit dem rekombinant synthetisierten und aufgereinigten Enzym durchgeführt worden. Da diese Studien eine Favorisierung der 17 $\beta$ - gegenüber der 3 $\alpha$ -HSD-Aktivität gezeigt hatten (H. K. Lin *et al.*, 1997), wurden für die hier durchgeführten Inhibitionsstudien zwei durch diese Dehydrogenaseaktivität katalysierte Umsetzungen untersucht. Es wurde der Einfluss der Phytoestrogene auf die Reduktion von Androstendion zu Testosteron und auf die Oxidation von Androstandiol zu Androsteron betrachtet.

Bei der Optimierung der Messung enzymatischer Aktivität wurde auf entsprechende Veröffentlichungen zurückgegriffen.

#### Reduktion von Androstendion zu Testosteron

Die Reduktionsfähigkeit der Aldo-Keto-Reduktase 17 $\beta$ -HSD 5 wurde in 50 mM Natriumphosphatpuffer pH 7,4 unter Verwendung von NADPH<sup>+</sup> als Cofaktor (I. Dufort *et al.*, 1999) untersucht.

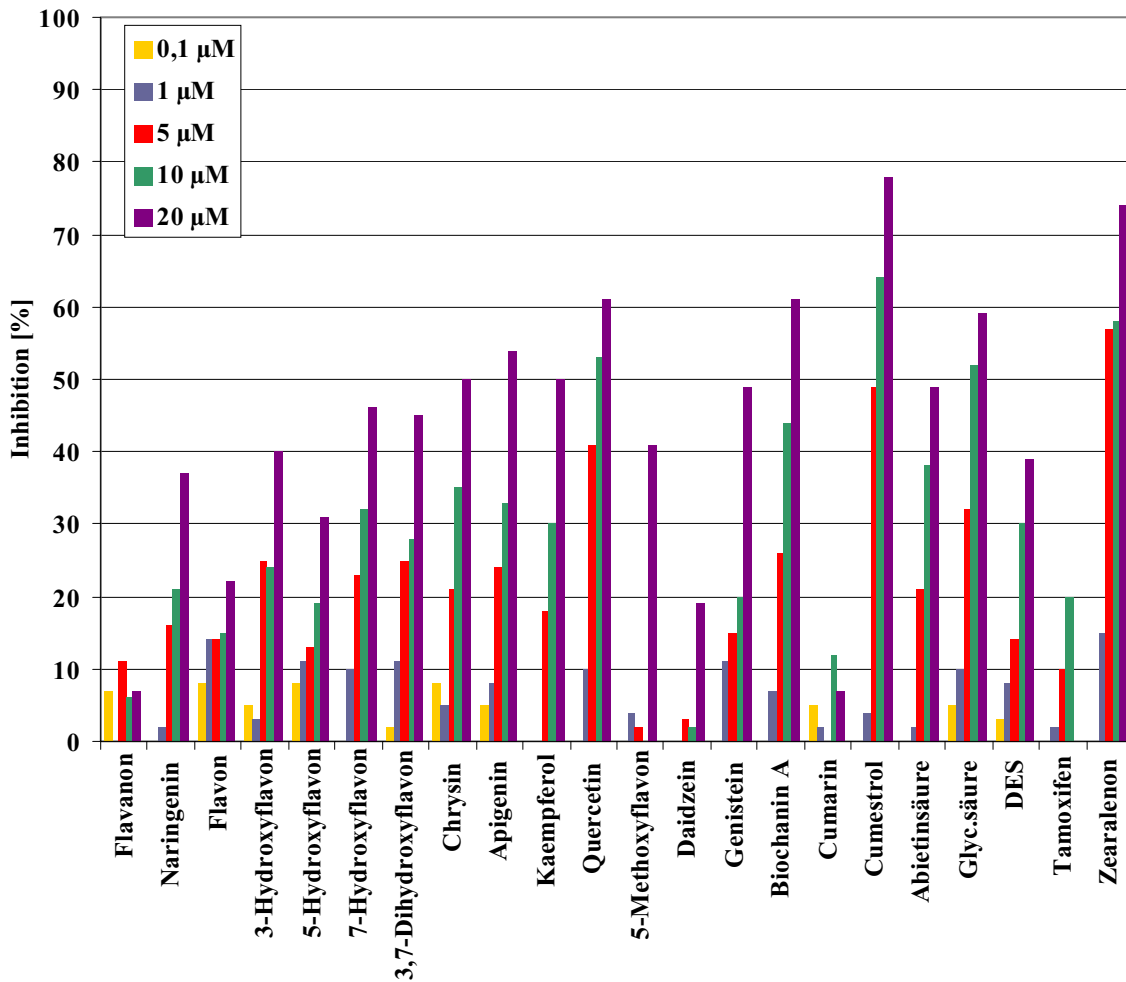
Substanz	Hemmung [%] bei einer Konzentration von				
	100 nM	1 µM	5 µM	10 µM	20 µM
Flavanon	7	0	11	6	7
Naringenin	0	2	16	21	37
Flavon	8	14	14	15	22
3-Hydroxyflavon	5	3	25	24	40
5-Hydroxyflavon	8	11	13	19	31
7-Hydroxyflavon	0	10	23	32	46
3,7-Dihydroxyflavon	2	11	25	28	45
Chrysin	8	5	21	35	50
Apigenin	5	8	24	33	54
Kaempferol	0	0	18	30	50
Quercetin	0	10	41	53	61
5-Methoxyflavon	0	4	2	0	41
Daidzein	0	0	3	2	19
Genistein	0	11	15	20	49
Biochanin A	0	7	26	44	61
Cumarin	5	2	0	12	7
Cumestrol	0	4	49	64	78
Abietinsäure	0	2	21	38	49
Glycyrrhetinsäure	5	10	32	52	59
DES	3	8	14	30	39
Tamoxifen	0	2	10	20	-*
Zearaleon	0	15	57	58	74

**Tab. 5.3: Inhibition der reduktiven 17β-Dehydrogenaseaktivität der h17β-HSD 5 durch Phytohormone**

Die in der Tabelle angegebenen Zahlenwerte der Hemmwirkung stellen den Mittelwert aus mehrfacher Messung jedes Ansatzes dar. Diese Werte werden in der darunter gezeigten Grafik veranschaulicht.

\* in dieser Konzentration nicht mehr im Ansatz löslich.





**Abb. 5.5: Inhibitionsprofil der reduktiven Aktivität der h17β-HSD 5**

Die Grafik zeigt das Inhibitionsprofil der h17β-HSD 5. Sie wurde mittels der in Tab. 5.3 gezeigten Werte erstellt.

Wie im Säulendiagramm zu erkennen ist, wurde die reduktive 17β-Dehydrogenaseaktivität des Enzyms am stärksten von Cumestrol, Zearalenon, Quercetin und dem Isoflavon Biochanin A inhibiert.

Die Messergebnisse bildeten auch die Grundlage zur Ermittlung der IC<sub>50</sub>-Werte und der Bedeutung struktureller Charakteristika einzelner Substrate für die beobachtete Hemmwirkung (Kapitel 6.1.4.2).

### Oxidation von Androstadiol zu Androsteron

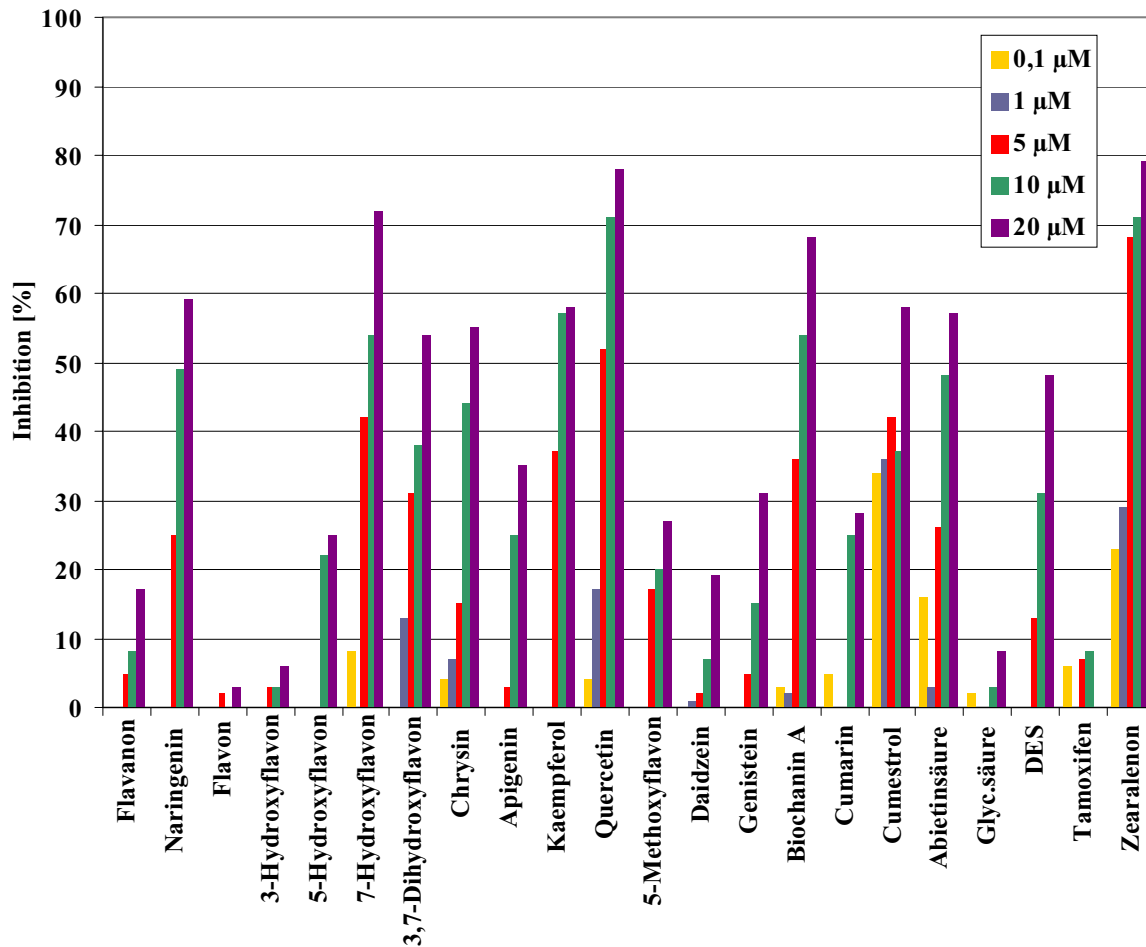
Die oxidative Aktivität der h17 $\beta$ -HSD 5 wurde in basischem Milieu, in 100 mM Natriumphosphat pH 9,0 mit NAD<sup>+</sup> als Cofaktor (H. K. Lin *et al.*, 1997) untersucht.

Substanz	Hemmung [%] bei einer Konzentration von				
	100 nM	1 $\mu$ M	5 $\mu$ M	10 $\mu$ M	20 $\mu$ M
Flavanon	0	0	5	8	17
Naringenin	0	0	25	49	59
Flavon	0	0	2	0	3
3-Hydroxyflavon	0	0	3	3	6
5-Hydroxyflavon	0	0	0	22	25
7-Hydroxyflavon	8	0	42	54	72
3,7-Dihydroxyflavon	0	13	31	38	54
Chrysin	4	7	15	44	55
Apigenin	0	0	3	25	35
Kaempferol	0	0	37	57	58
Quercetin	4	17	52	71	78
5-Methoxyflavon	0	0	17	20	27
Daidzein	0	1	2	7	19
Genistein	0	0	5	15	31
Biochanin A	3	2	36	54	68
Cumarin	5	0	0	25	28
Cumestrol	34	36	42	37	58
Abietinsäure	16	3	26	48	57
Glycyrrhetinsäure	2	0	0	3	8
DES	0	0	13	31	48
Tamoxifen	6	0	7	8	-*
Zearaleon	23	29	68	71	79

**Tab. 5.4: Inhibition der oxidativen 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivität der h17 $\beta$ -HSD 5 durch Phytohormone**

Die in der Tabelle angegebenen Zahlenwerte der Hemmwirkung stellen den Mittelwert aus mehrfacher Messung jedes Ansatzes dar. Diese Werte werden in der darunter gezeigten Grafik veranschaulicht.

\* in dieser Konzentration nicht mehr im Ansatz löslich.



**Abb. 5.6: Inhibitionsprofil der oxidativen Aktivität der h17β-HSD 5**

Die Grafik zeigt das Inhibitionsprofil der h17β-HSD 5. Sie wurde mittels der in Tab. 5.4 gezeigten Werte erstellt.

Unter den stärksten Inhibitoren der oxidativen 17β-HSD-Aktivität fanden sich neben dem 7-Hydroxyflavon die bereits für die reduktive Aktivität als wichtigsten Hemmstoffe identifizierten Komponenten Zearalenon, Cumestrol, Quercetin und Biochanin A. Allgemein ließ sich anhand dieser Grafik feststellen, dass sich die Inhibitionsprofile beider Reaktionsrichtungen, der Reduktion und der Oxidation, in groben Zügen ähnelten. Als auffälliger Unterschied wurde jedoch der Einfluss der Glycyrrhetinsäure festgestellt. Sie trat unter den für die Untersuchung der Reduktion von Androstendion gewählten Reaktionsbedingungen als bedeutender Hemmstoff auf, zeigte aber unter den für die Oxidation von Androstandiol gewählten Bedingungen nahezu keinen Einfluss auf die Aktivität der h17β-HSD 5. Im Kapitel 5.1.3.6 wird darauf näher eingegangen.

### 5.1.3.4 IC<sub>50</sub>-Werte der oxidativen und reduktiven Aktivitäten

Alle in den Inhibitionsmessungen für die h17β-HSD 5 erhaltenen Daten wurden eingesetzt, um die IC<sub>50</sub>-Werte entsprechend Kapitel 4.8.4.2 zu berechnen.

Reduktion von Androstendion		Oxidation von Androstandiol	
Inhibitor	IC <sub>50</sub> -Wert [μM]	Inhibitor	IC <sub>50</sub> -Wert [μM]
Zearalenon	4	Zearalenon	2
Cumestrol	5	Quercetin	5
Quercetin	9	7-Hydroxyflavon	7
Tamoxifen	> 10**	Biochanin A	8
Biochanin A	14	Kaempferol	8
Apigenin	20	Abietinsäure	10
Abietinsäure	20	Naringenin	10
Chrysin	20	Tamoxifen	> 10**
Kaempferol	20	Cumestrol	11
3,7-Dihydroxyflavon	20	Chrysin	13
Daidzein	> 20	3,7-Dihydroxyflavon	18
3-Hydroxyflavon	> 20*	DES	20
Genistein	> 20	Flavanon	> 20
DES	> 20	Glycyrrhetinsäure	> 20
5-Hydroxyflavon	> 20*	3-Hydroxyflavon	> 20
Cumarin	- <sup>+</sup>	Flavon	> 20*
7-Hydroxyflavon	24 <sup>##</sup>	5-Hydroxyflavon	> 20*
Glycyrrhetinsäure	30 <sup>#</sup>	Genistein	> 20
Naringenin	33 <sup>##</sup>	5-Methoxyflavon	> 20
Flavon	41 <sup>##</sup>	Cumarin	> 20
5-Methoxyflavon	50 <sup>##</sup>	Daidzein	> 20
Flavanon	50 <sup>##</sup>	Apigenin	45 <sup>##</sup>

**Tab. 5.5: IC<sub>50</sub>-Werte für alle getesteten Umwelthormone**

Alle IC<sub>50</sub>-Werte, sowohl für die reduktive, als auch für die oxidative Aktivität der h17β-HSD 5 wurden durch Interpolation ermittelt (Kapitel 4.8.2.4).

\* nicht löslich in höheren Konzentration als 20μM;

\*\* nicht löslich in höheren Konzentration als 10μM;

# nicht graphisch bestimmbar, da keine verwendbare Kurve erhalten wurde;

## IC<sub>50</sub> > 20 aus Messungen mit Endkonzentration von 50μM (wenn löslich). Ergebnisse in Tab. 5.3 bzw.

Tab. 5.4 nicht gezeigt;

Bei dem direkten Vergleich der für beide untersuchten  $17\beta$ -Dehydrogenaseaktivitäten jeweils am Beginn der Liste stehenden Inhibitoren zeigt sich, dass beide Reaktionen durch nahezu die gleichen Stoffe stark gehemmt werden.

### **5.1.3.5 Flavonoide: Struktur-Wirkungsbeziehungen**

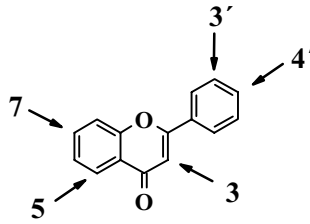
Auch für die  $17\beta$ -HSD 5 wurden die Einflüsse einzelner funktioneller Gruppen der Flavone auf deren Hemmwirkung untersucht. Dazu wurden die Messergebnisse aller Vertreter dieser Klasse hinsichtlich ihres Substitutionsmusters verglichen (Abb. 5.7).

Ausgehend von den Inhibitionskapazitäten der Flavonderivate konnte man zunächst für beide Umsetzungen die generelle Schlußfolgerung ziehen, dass ein steigender Hydroxylierungsgrad eine zunehmende Hemmwirkung der Substanzen bewirkt. Entsprechend zeigte das unsubstituierte Flavon in beiden Fällen die geringste Beeinflussung der  $17\beta$ -HSD-Aktivität. Der Zusammenhang zwischen steigender Anzahl an OH-Gruppen (d. h. Hydrophilität) und der Hemmwirkung deutet darauf hin, dass die Hemmstoffe womöglich über diese Gruppen an entsprechend polare Regionen des Enzyms binden und dort für die inhibierende Veränderung sorgen.

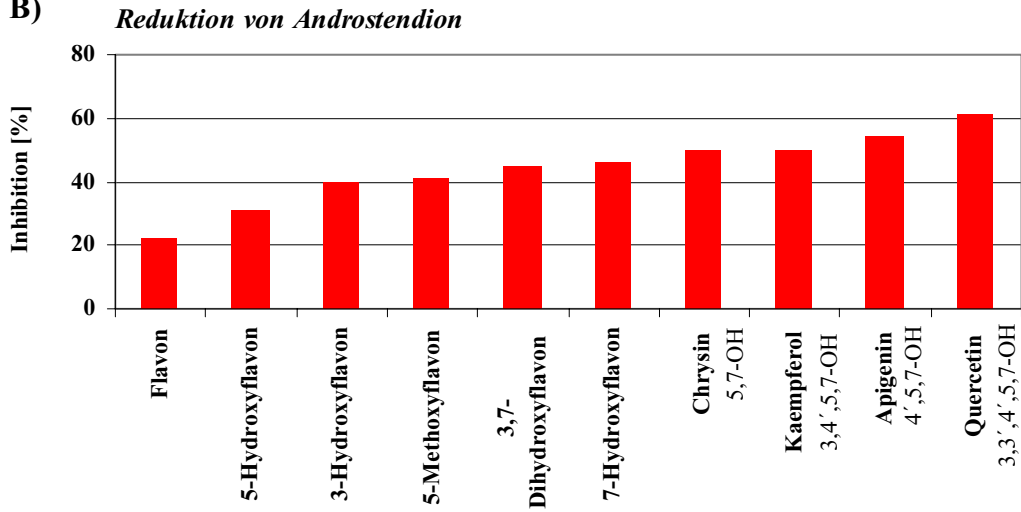
Weitere detaillierte Vergleiche hinsichtlich des Einflusses des Substitutionsmusters machten deutlich, dass eine Hydroxylierung eines Flavons in Position 7 für die Hemmwirkung von entscheidender Bedeutung ist. Alle starken Hemmstoffe dieser Flavonoidklasse zeigten eine OH-Gruppe in dieser Position.

Um die Bedeutung der innerhalb der Flavonoide verschiedener Gruppen der Flavonoide (Flavanone, Flavone und Isoflavone) variierenden strukturellen Eigenschaften und deren Einfluss auf die Hemmwirksamkeit beurteilen zu können, wurden die Inhibitionsstärken jeweils gleich substituierter Vertreter der einzelnen Klassen verglichen (Kapitel 6.1.4.2).

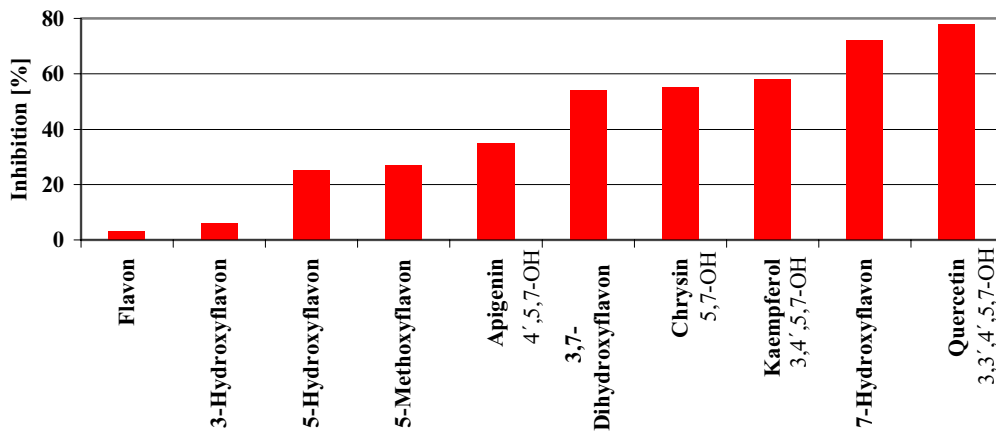
A)



B)



*Oxidation von Androstandiol*



**Abb. 5.7: Einfluss funktioneller Gruppen von Flavonen auf deren Hemmwirkung**

In dieser Grafik werden Flavone mit unterschiedlichem Hydroxylierungsgrad und –position im Hinblick auf ihre Inhibitorfähigkeit verglichen.

A) Strukturformel des Flavongrundgerüsts mit den Positionen möglicher Hydroxylierungen.

B) Die Diagramme zeigen die prozentualen Inhibitionen bei einer Inhibitorkonzentration von 20 µM.

### 5.1.3.6 Spezielle Rolle der Glycyrrhetinsäure

Wie bereits angedeutet (Kapitel 5.1.3.3) schien die Glycyrrhetinsäure der Lakritze eine besondere Rolle in der Hemmung der h17 $\beta$ -HSD 5 zu spielen. Sie hatte sich unter reduktiven Reaktionsbedingungen (pH 7,4) als starker Inhibitor und unter oxidativen Bedingungen (pH 9,0) als nicht hemmend dargestellt (Abb. 5.8).

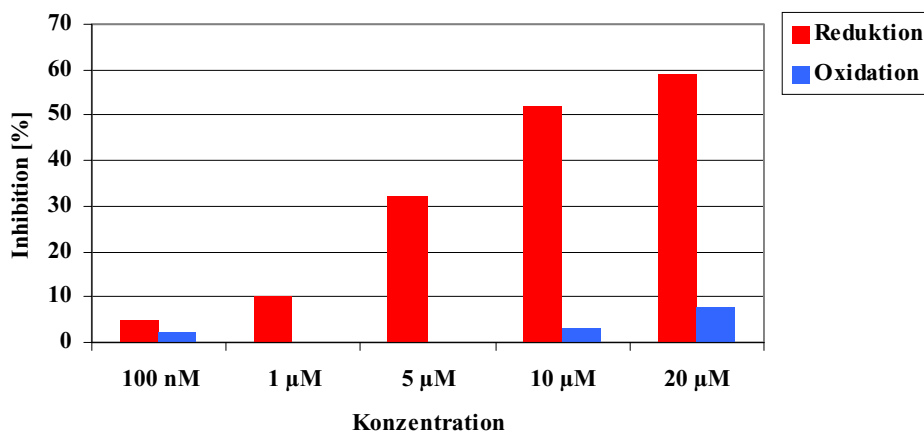
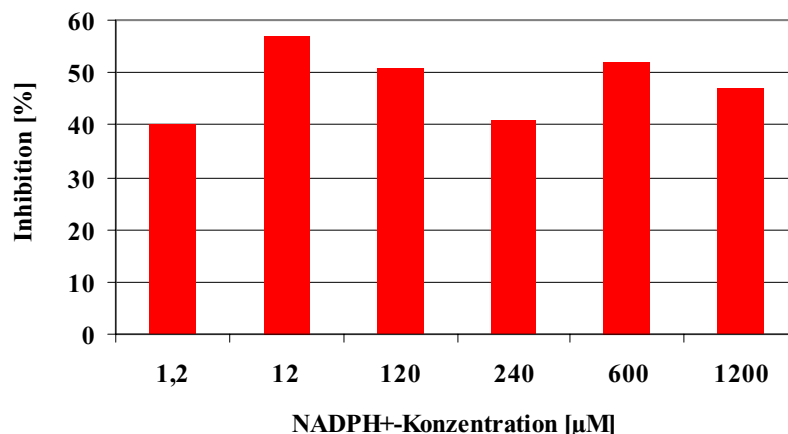


Abb. 5.8: Hemmung der h17 $\beta$ -HSD 5 durch Glycyrrhetinsäure

(Werte entnommen aus Kapitel 5.1.3.3)

### 5.1.3.7 Untersuchungen zum Inhibitionsmechanismus

Um festzustellen, ob die inhibierende Wirkung der Flavonoide durch eine Beeinflussung der Cofaktorbindung bedingt war (Kapitel 5.1.3.5), wurde eine Testreihe mit 6 verschiedenen Konzentrationen von NADPH<sup>+</sup> (1,2; 12; 120; 240; 600; 1200  $\mu$ M) durchgeführt. Um möglichst deutliche Umsatzunterschiede sehen zu können, wurde der starke Inhibitor Quercetin in einer Konzentration von 20  $\mu$ M als Hemmstoff eingesetzt. Eine Konkurrenz des NADPH<sup>+</sup> und des Inhibitors um die gleiche Bindungsstelle am Enzym sollte bei der deutlichen Konzentrationssteigerung des Cofaktors mit einer Verminderung der Inhibitorkapazität des Quercetins verbunden sein. Die Messungen wurden, wie unter 4.8.2.1 beschrieben, durchgeführt.



**Abb. 5.9: Inhibition der reduzierenden Aktivität der h17β-HSD 5 durch 20 μM Quercetin in Gegenwart unterschiedlicher Cofaktormengen**

Die dargestellten Ergebnisse stellen einen Mittelwert aus mehrfacher Messung der einzelnen Reaktionsansätze dar.

Bei diesem Experiment ließ sich keine signifikante Änderung der Inhibitionsstärke des Quercetins mit der Zunahme der NADPH<sup>+</sup>-Konzentration erkennen.

### **Kombination von Phytoestrogenen**

Phytoestrogene kommen in Nahrungsmitteln selten einzeln, sondern viel häufiger in Kombinationen vor. Es wird vermutet, dass gerade diese Tatsache messbare Auswirkungen bei der Beeinflussung des Hormonsystems verursacht, da sich die einzelnen Effekte additiv oder synergistisch verstärken könnten. Aus diesem Grund wurde die Beeinflussung der reduktiven 17β-Dehydrogenaseaktivität der h17β-HSD 5 durch Phytoestrogenkombinationen untersucht. Dabei wurden Flavonoide kombiniert, die in den vorhergehenden Inhibitionsstudien eine sehr starke (Quercetin, Biochanin A), eine mittlere (Genistein) und eine sehr schwache Inhibitorwirkung (Daidzein) bewiesen hatten. Des Weiteren wurde die in Sojabohnen natürlich vertretene Kombination von Genistein mit Daidzein getestet. In diesen Experimenten wurde lediglich der Einfluss auf die reduktive Enzymaktivität untersucht. Dazu wurden relativ niedrige Endkonzentrationen der Phytoestrogene (5, 1, 0,1 μM) gewählt. Zum einen sollten die erzielten prozentualen Umsätze, auch bei schwachen Inhibitoren, groß genug sein um noch Veränderungen im Umsatz exakt messen zu können, andererseits sollten die Inhibitorkonzentrationen relativ niedrig sein, um zu sehen, ob sich gerade in diesen Grenzbereichen eine Potenzierung der Effekte ergab.



**A) 5  $\mu$ M**

Substanz	Inhib.	$\Sigma$ ber.	$\longleftrightarrow$	$\Sigma$ gem.
Quercetin	36 %	68 %	$\longleftrightarrow$	44 %
Biochanin A	32 %			
Genistein	10 %	42 %	$\longleftrightarrow$	37 %
Daidzein	2 %			
		12 %	$\longleftrightarrow$	7 %

**B) 1  $\mu$ M**

Substanz	Inhib.	$\Sigma$ ber.	$\longleftrightarrow$	$\Sigma$ gem.
Quercetin	7 %	14 %	$\longleftrightarrow$	23 %
Biochanin A	7 %			
Genistein	0 %	7 %	$\longleftrightarrow$	5 %
Daidzein	1 %			
		1 %	$\longleftrightarrow$	7 %

**C) 100 nM**

Substanz	Inhib.	$\Sigma$ ber.	$\longleftrightarrow$	$\Sigma$ gem.
Quercetin	0 %	5 %	$\longleftrightarrow$	9 %
Biochanin A	5 %			
Genistein	3 %	8 %	$\longleftrightarrow$	6 %
Daidzein	0 %			
		3 %	$\longleftrightarrow$	0 %

**Abb. 5.10: Einfluss von Phytoestrogenkombinationen auf die reduktive 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivität der h17 $\beta$ -HSD 5 (Umsatz von Androstendion zu Testosteron)**

Die Grafik zeigt die Hemmung der Aktivität bei einer Phytohormonkonzentration von A) 5  $\mu$ M; B) 1  $\mu$ M und 100 nM.

}: Ergebnis der Kombination von Substanzen..

$\Sigma$  ber.: berechnete Summe der Einzelinhibitionen;

$\Sigma$  gem.: Messergebnis des Kombinationsansatzes;

Bei den angegebenen Ergebnissen handelt es sich um Mittelwerte aus mehreren Messungen.

Die für die Kombinationen beobachteten Inhibitionswerte wurden mit den Messungen der jeweiligen Einzelkomponenten und den berechneten Werten für eine additive Wirkung dieser Kombinationen verglichen (Siehe Abb. 5.10).

Die Unterschiede zwischen den berechneten und gemessenen Inhibitionen liegen bis auf zwei Ausnahmen um die 5 %. Weder ein additiver, noch ein starker synergistischer Effekt der

Kombinationen konnte beobachtet werden. Damit liegen die jeweiligen prozentualen Unterschiede im Bereich der Messungenauigkeit.

## 5.2 Humane 17 $\beta$ -HSD 7

### 5.2.1 Ausgangssituation

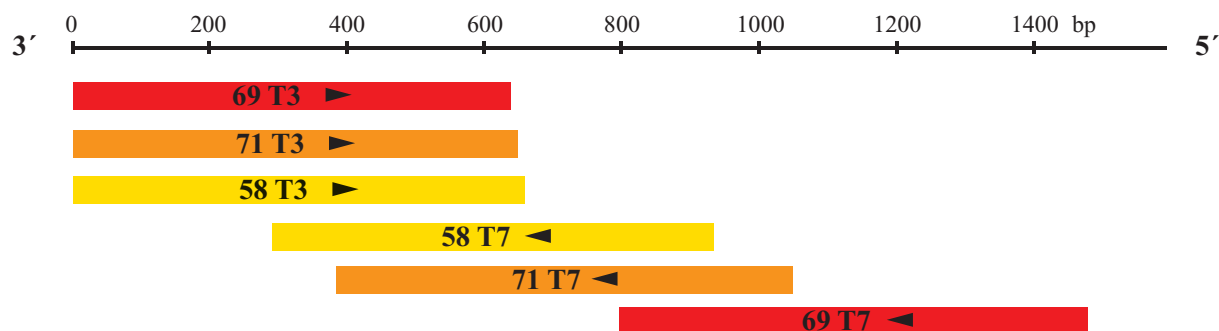
Das zur h17 $\beta$ -HSD 7 orthologe Enzym der Maus wurde 1998 aus der HC11-Zelllinie (Brustdrüse) isoliert (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Das der SCAD-Proteinfamilie zugehörige Protein wurde hauptsächlich in Ovarien schwangerer Mäuse exprimiert und als für die Estradiolsynthese verantwortliches Enzym beschrieben (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Vor Entdeckung dieses Enzyms war angenommen worden, dass hier ausschließlich Typ 1 für die Estradiolsynthese verantwortlich ist.

### 5.2.2 Aufklärung der kodierenden Sequenz

Unter Verwendung der kodierenden Sequenz der murinen 17 $\beta$ -HSD 7 (GenBank-Zugangsnr.: NM\_010476) wurde die humane dbEST-Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) nach menschlichen exprimierten Sequenzen (EST = expressed sequence tags) durchsucht. Dabei wurden drei Kandidatenklone (GenBank-Zugangsnr.: R83178, R92053 und H95413) identifiziert und vom RessourcenZentrum/PrimärDatenbank, Berlin (RZPD) angefordert. Die Plasmid-DNA (im pT7T3-Vektor) folgender Klone wurde unter Verwendung üblicher T3- bzw. T7-Primer sequenziert:

- IMAGp998J12558 (IMAG 58)
- IMAGp998K21369 (IMAG 69)
- IMAGp998N01371 (IMAG 71)

Ein Sequenzvergleich mit Hilfe des AssemblyLign-Programms ergab folgendes Alignment:



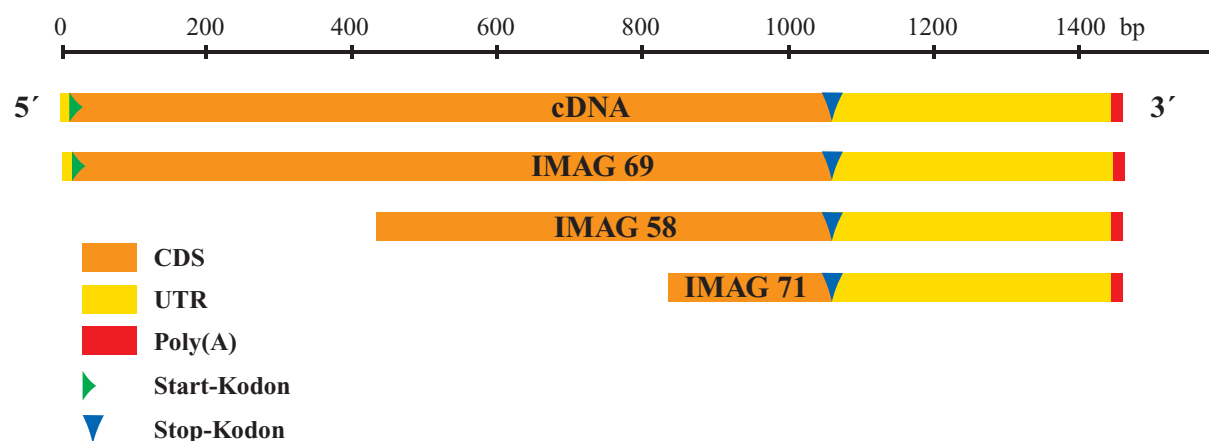
**Abb. 5.11: Alignment der EST-Sequenzen**

Die im pT7T3D-Vektor vorliegenden Contigs wurden jeweils mit gängigen T3- bzw. T7-Primern sequenziert. Die Länge des Alignment ist in Basenpaaren bp angegeben. Die Balken symbolisieren die sequenzierten Bereiche, die Pfeile die Sequenzierrichtung.

Aus dem in Abb. 5.11 gezeigten Alignment konnte man ersehen, dass die beiden IMAG-Klone mit den Nummern 58 und 71 einen cDNA-Bereich von etwa 1000 bp beinhalteten. Der IMAG-Klon Nr. 69 war zwar aufgrund seiner Größe hier nicht vollständig durchsequenziert, trug aber das längste Fragment von über 1400 bp.

Durch das Verfahren der Herstellung von ESTs tragen alle im Vektor vorliegenden DNA-Sequenzen beginnend eine Poly(A)-Sequenz. Dementsprechend stimmen alle 3 ESTs mit dem 3'-Ende der cDNA der h17 $\beta$ -HSD 7 überein. In Richtung des Startkodons sind jedoch nicht alle vollständig.

Die kompletten EST-Sequenzierungen im Vergleich mit der vollständigen humanen cDNA der 17 $\beta$ -HSD 7 sind in der folgenden Abbildung gezeigt.



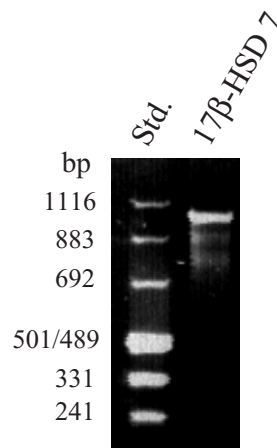
**Abb. 5.12: Alignment der EST-Sequenzen mit der resultierenden cDNA der humanen 17 $\beta$ -HSD 7**

Die Sequenzen der für die cDNA der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 kodierenden Bereiche sind in Reihenfolge ihrer Länge unter der ermittelten cDNA als Balken angebracht. Der für das Enzym kodierende Bereich ist in orange, die untranslatierten Bereiche in gelb und der Poly(A)-Abschnitt in rot dargestellt.

Anhand des Vergleichs der humanen EST-Sequenz mit der 17 $\beta$ -HSD 7-cDNA von Maus und Ratte konnte davon ausgegangen werden, dass im IMAG 69-Klon ein vollständiger Leserahmen für die humane 17 $\beta$ -HSD 7 vorlag. Unterstützt wurde diese Beobachtung durch das Vorliegen eines im Leserahmen liegenden, 5'-stromaufwärts vom ATG-Startkodon befindlichen Stopkodons.

Bei einer vollständigen Sequenzierung des IMAG 69-Klones stellte sich jedoch heraus, dass dieser Klon eine Punktmutation trug, die an der Position 251 der cDNA vorlag und somit einen Kettenabbruch bei Aminosäure 82 in der Proteinbiosynthese bedingt hätte. Damit war dieser Klon als Matritze für weitere Experimente unbrauchbar.

Mit Hilfe der aus dem EST-Klon erhaltenen Sequenz wurden jedoch Primer entwickelt, die für eine PCR-Amplifikation des gesamten, für die h17 $\beta$ -HSD 7 kodierenden, Bereiches benötigt wurden. Als Matritze kam demnach nicht der IMAG 69-Klon, sondern die humane, ovarielle cDNA (Clontech) zum Einsatz (Kapitel 4.2.7.1). Die verwendeten Primer trugen eine BamH I- beziehungsweise eine Hind III-Schnittstelle. Nach Zwischenklonierung in den Vektor pCR<sup>®</sup>2.1 sollte die Umklonierung in den pGEX-Expressionsvektor erfolgen.



**Abb. 5.13: Agarosegel: Amplifizierung der kodierenden Region von 17 $\beta$ -HSD 7**

Das gewonnene PCR-Produkt wurde auf einem 1 %iges Agarosegel analysiert. *Std.*: Größenstandard VIII (MBI Fermentas);

Ein 1027 kb großes PCR-Fragment wurde in den pCR<sup>®</sup>2.1-Vektor einligiert und sequenziert. Durch Sequenzabgleich mit der vom IMAG 69-Klon erhaltenen Nukleinsäureabfolge konnte nun die gesamte cDNA des humanen Enzyms, d. h. die kodierende Region, sowie der untranslatierte Bereich inklusive der Poly(A)-Einheit aufgeklärt werden. Damit war die korrekte cDNA und Aminosäuresequenz der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 bekannt (Abb. 5.14).

TC TGA TTG GTG ACG GGT GAG GCG GCC CGA AAT CGT AGG ATC TCC GAA AGC AGC GGT GGC	-27
	*
GTT TGC TTC ACT GCT TGG AAG TGT GAG TGC GCG AAG <b>ATG</b> CGA AAG GTG GTT TTG ATC ACC	24
<b>Cofaktorbindung</b>	
<b>G A S S G I G</b> L A L C K R L L A E D D E	
GGG GCT AGC AGT GGC ATT GGC CTG GCC CTC TGC AAG CGG CTG CTG GCG GAA GAT GAT GAG	84
L H L C L A C R N M S K A E A V C A A L	
CTT CAT CTG TGT TTG GCG TGC AGG AAC ATG AGC AAG GCA GAA GCT GTC TGT GCT GCT CTG	144
L A S H P T A E V T I V Q V D V S N L Q	
CTG GCC TCT CAC CCC ACT GCT GAG GTC ACC ATT GTC CAG GTG GAT GTC AGC AAC CTG CAG	204
S V F R A S K E L K Q R F Q R L <b>D C I Y</b>	
TCG GTC TTC CGG GCC TCC AAG GAA CTT AAG CAA AGG TTT CAG AGA TTA GAC TGT ATA TAT	264
<b>NAG-Motiv</b>	
<b>L N A G</b> I M P N P Q <b>L N I K A L F F G L</b>	
CTA AAT GCT GGG ATC ATG CCT AAT CCA CAA CTA AAT ATC AAA GCA CTT TTC TTT GGC CTC	324
<b>mögliche PRL-Rezeptorbindung</b>	
<b>F S R K V I H M F S T A E G L L T Q</b> G D	
TTT TCA AGA AAA GTG ATT CAT ATG TTC TCC ACA GCT GAA GGC CTG CTG ACC CAG GGT GAT	384
K I T A D G L Q E V F E T N V F G H F I	
AAG ATC ACT GCT GAT GGA CTT CAG GAG GTG TTT GAG ACC AAT GTC TTT GGC CAT TTT ATC	444
L I R E L E P L L C H S D N P S Q L I W	
CTG ATT CGG GAA CTG GAG CCT CTC CTC TGT CAC AGT GAC AAT CCA TCT CAG CTC ATC TGG	504
T S S R S A R K S N F S L E D F Q H S K	
ACA TCA TCT CGC AGT GCA AGG AAA TCT AAT TTC AGC CTC GAG GAC TTC CAG CAC AGC AAA	564
<b>aktives Zentrum</b>	
G K E P <b>Y S S S K</b> Y A T D L L S V A L N	
GGC AAG GAA CCC TAC AGC TCT TCC AAA TAT GCC ACT GAC CTT TTG AGT GTG GCT TTG AAC	624
R N F N Q Q G L Y S N V A C P G T A L T	
AGG AAC TTC AAC CAG CAG GGT CTC TAT TCC AAT GTG GCC TGT CCA GGT ACA GCA TTG ACC	684
<b>stark hydrophober Bereich</b>	
<b>I L P P F I W T L L M P A I L</b>	
AAT TTG ACA TAT GGA ATT CTG CCT CCG TTT ATA TGG ACG CTG TTG ATG CCG GCA ATA TTG	744
<b>L L R F F A</b> N A F T L T P Y N G T E A L	
CTA CTT CGC TTT TTT GCA AAT GCA TTC ACT TTG ACA CCA TAT AAT GGA ACA GAA GCT CTG	804
V W L F H Q K P E S L N P L I K Y L S A	
GTA TGG CTT TTC CAC CAA AAG CCT GAA TCT CTC AAT CCT CTG ATC AAA TAT CTG AGT GCC	864
T T G F G R N Y I M T Q K M D L D E D T	
ACC ACT GGC TTT GGA AGA AAT TAT ATT ATG ACC CAG AAG ATG GAC CTA GAT GAA GAC ACT	924
A E K F Y Q K L L E L E K H I R V T I Q	
GCT GAA AAA TTT TAT CAA AAG TTA CTG GAA CTG GAA AAG CAC ATT AGG GTC ACT ATT CAA	984
K T D N Q A R L S G S C L .	
AAA ACA GAT AAT CAG GCC AGG CTC AGT GGC TCA TGC CTA <b>TAA</b> TTCCAGCACTTTGGGAGGCCAAG	1049
GCAGAAGGATCACTTGAGACCAGGAGTTCAAGACCAGCCTGAGAAAACATAGTGAGCCCTGTCTCTACAAAAAGAAATA	1128
AAAATAATAGCTGGGTGTGGTGGCATGCGCATGTAGTCCAGCTACTCAGAAGGATGAGGTGGGAGGATCTCTTGAGGC	1207
TGGGAGGCAGAGGTTGCACTGAGCTGAGATTGTGCCACTGCCTCCAGCCTGGGTGACAGCGAGACCCCTGTCTCAAAAT	1286
ATGTATATATTTAATATATATAAAAACCAGAGCTGACAATGACACTCTGGAACATTGCATACCTTCTGTACATTCTGG	1365
GGTACATGGATTCTACTGAGTTGGATAATATGCATTGTG <b>AATAAA</b> CTATGAACATGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA	1442

**Abb. 5.14: Protein- und cDNA-Sequenz der humanen 17β-HSD 7**

Die Proteinsequenz ist jeweils oberhalb der kodierenden Region angegeben. Exon-Introngrenzen sind durch schwarze Schrägbalken angezeigt. Die Cofaktorbindungsstelle (Rossmanspalte) ist grün, das aktive Zentrum rot und das NAG-Motiv gelb hinterlegt. Eine vermutlich membranassoziierte Domäne ist blau gekennzeichnet. Eine mögliche Prolaktinrezeptorbindungsstelle ist in orange angegeben. Das Startkodon, sowie die beiden Stopkodons sind fett gedruckt. Das Poly(A)-Signal ist fett und kursiv gedruckt. Der oberhalb der Nukleinsäuresequenz eingefügte Stern zeigt die Nukleinsäure an, mit der die in der in GenBank eingetragenen mRNA-Sequenz beginnt. (GenBank-Zugangsnr.: AF098786);

Die ermittelte Aminosäuresequenz machte eine zweifelsfreie Zuordnung des Enzyms zur Familie der Short-Chain-Alkoholdehydrogenasen SCAD möglich, da alle konservierten, charakteristischen Strukturmerkmale (B. Persson *et al.*, 1991) zu finden sind: die Nukleotidbindungsstelle mit dem Glycin-reichen Motiv (**GXXXGXXG**), gefolgt von dem NAG-Motiv (**DXXXXNAG**) und das die Aminosäuren Tyrosin und Lysin beinhaltende aktive Zentrum (**YXXXXK**) im Aminosäurebereich 150-160.

Zu den orthologen Enzymen aus Ratte und Maus zeigt die 37 kDa große humane 17 $\beta$ -HSD 7 78 %, beziehungsweise 74 % Aminosäureidentität. Eine Analyse mit der PROSITE-Datenbank weist auf mehrere mögliche posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten hin: 4 potentielle N-Glykosilierungsstellen (Positionen 37, 178, 229 und 263), 5 Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen (Positionen 110, 170, 173, 195 und 299) und 5 Caseinkinase II-Phosphorylierungspositionen. Fünf Tyrosinreste (Positionen 88, 193, 198, 217 und 232) werden als mögliche Phosphorylierungsstellen vorgeschlagen, jedoch konnte keinem ein für Tyrosinkinasen spezifisches, passendes Erkennungsmotiv zugeordnet werden.

## 5.2.3 Charakterisierung der genomischen Struktur

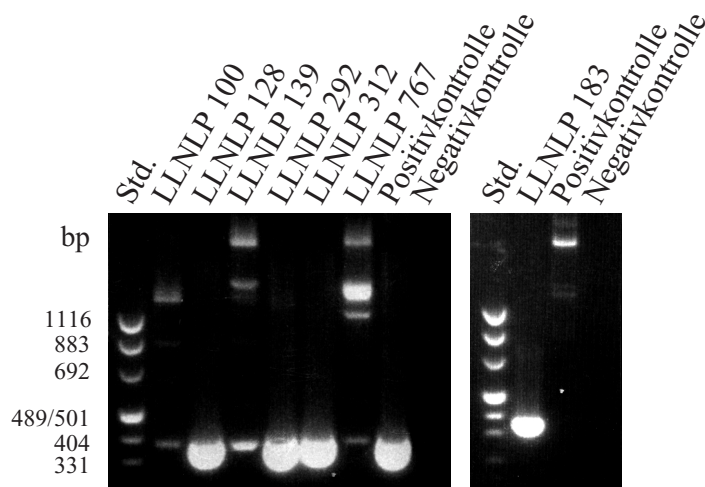
### 5.2.3.1 Isolierung genomischer Klone

Um die genomische Struktur des menschlichen 17 $\beta$ -HSD 7-Proteins aufzuklären, wurde eine humane genomische PAC-Bibliothek (weiblich, RPCI6 709) mit durchschnittlicher Insertlänge von 130 kb vom RZPD in Berlin bestellt. Die Bibliothek wurde mit einer [<sup>32</sup>P]-dCTP-markierten Sonde, die der kodierenden Sequenz der 17 $\beta$ -HSD 7 entsprach, durchsucht. Folgende 7 Kandidatenklone (abgekürzte Namen sind in Klammern angegeben) wurden identifiziert und beim RZPD bestellt:

- LLNLP709I09**100**Q2 (LLNLP 100)
- LLNLP709M1**292**Q2 (LLNLP 292)
- LLNLP709I05**128**Q2 (LLNLP 128)
- LLNLP709C01**139**Q2 (LLNLP 139)
- LLNLP709E08**183**Q2 (LLNLP 183)
- LLNLP709P2**312**Q2 (LLNLP 312)
- LLNLP709H0**767**Q2 (LNLP 767)

Die Verifizierung der Klone erfolgte mit Hilfe einer Polymerasekettenreaktion (Kapitel 4.2.7.1) unter Verwendung der Plasmidpräparationen der Klone als Matrizen. Die Primer wurden dabei so gewählt, dass ein Primer am Ende der kodierenden Region, der zweite im

3'-untranslatierten Bereich oberhalb des Poly(A)-Signals positioniert lag und ein 374 bp-großes Fragment amplifiziert werden sollte (Kapitel 4.3.3.1).



**Abb. 5.15: Verifizierung der genomischen PAC-Klone durch PCR**

*Positivkontrolle:* Plasmidpräparation des EST-Klones IMAG 69; *Negativkontrolle:* H<sub>2</sub>O; *Std:* Molekularmassenstandard VIII (MBI Fermentas)

Von den untersuchten 7 Klonen konnten bei 3 mittels PCR das Vorliegen der 17 $\beta$ -HSD 7-cDNA bestätigt werden: LLNLP 128, LLNLP 292 und LLNLP 312 (Abb. 5.15). Der das stärkste Signal liefernde Klon LLNLP 128 wurde für die weiteren Analysen verwendet.

### 5.2.3.2 Exonpositionen

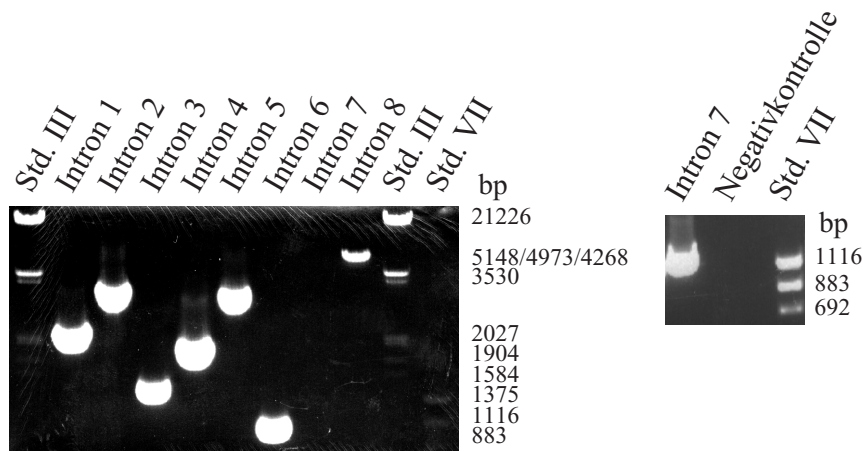
Um die Positionen und Größen der Exons, d. h. auch die Exon- und Intronengrenzen, in der humanen h17 $\beta$ -HSD 7 bestimmen zu können, wurde das Plasmid des Klons LLNLP 128 mit Hilfe des Qiagen MAXI-Kits präpariert. Um die Exon-Intronengrenzen ermitteln zu können, wurden von der cDNA-Sequenz abgeleitete Primer (Kapitel 9.1) für die Sequenzierung (Fa. Sequiserve, Vaterstetten, Deutschland) verwendet. Eine Bestimmung der Exon-Intron-Übergänge konnte durch den Sequenzvergleich der cDNA mit den erhaltenen Sequenzierungsergebnissen der genomischen DNA durchgeführt werden. Alle Exons wurden vollständig sequenziert und die Introns nur ansequenziert.

Alle derart ermittelten 8 Exon-Intronengrenzen sind in Abb. 5.14 als Balken eingezeichnet. Basierend auf der Kenntnis der Exongrenzen konnten Intron-flankierende Primer abgeleitet (Kapitel 9.2) und für die Amplifikation der Intron-überspannenden Bereiche (Kapitel 4.3.3.4) verwendet werden.

Um Bereiche der Promotorregion untersuchen zu können, wurde 1,2 kb in 5'-Richtung vom ATG-Startkodon des ersten Exons sequenziert. (GenBank-Zugangsnr.: AF162759)

### 5.2.3.3 Introngrößen

Für die Amplifikation der 8 Intron-überspannenden Bereiche der genomischen DNA wurden Langstrecken-PCRs mit dem Elongase-System (Gibco) durchgeführt (Kapitel 4.3.3.4). Aus dem in Abb. 5.16 gezeigten Agarosegel ließ sich die Introngrößen ablesen.



**Abb. 5.16: Bestimmung der Introngrößen mittels Elongase-PCR:**

Unter Verwendung der für jedes Intron spezifischen Primerpaare wurden die nicht kodierenden Bereiche DNA-Fragmente mittels Elongase-PCR (Gibco) amplifiziert. Oberhalb des 0,8 %igen Gels sind alle zu bestimmenden Introns aufgeführt. Für die Bestimmung des Introns 7 musste die PCR optimiert werden. *Negativkontrolle*: H<sub>2</sub>O; *Std. III*: Größenstandard III (MBI Fermentas); *Std. VIII*: Größenstandard VIII (MBI Fermentas)

### 5.2.3.4 Exon-Intronorganisation

Durch die Kombination aller unter 5.3.3.2 und 5.3.3.3 erhaltenen Ergebnisse konnte die Exon-Intronorganisation ermittelt werden (Tab.5.5 und Abb. 5.17).

Das 21,8 kb große *HSD17B7* Gen besteht aus neun Exons und acht Introns, letztere mit einer maximalen Größe von 8 kb. Alle Introns zeigen die Consensus-Sequenzen GT der 5'-Splice-stellen (Donor-Sequenz) und AG der 3'-Splicestellen (Akzeptor-Sequenz).



Exon Nr. / Größe	5'-Splice-Donor	Intron Nr. / Größe	3'-Splice-Akzeptor
1 (34 bp)	A S S GCT AGC AG	gtgaggcc...	I (2 kb) ...cctaacag
2 (203 bp)	K Q R AAG CAA AG	gtatatct...	II (3 kb) ...aagcaaag
3 (92 bp)	F S R TTT TCA AG	gtaatttt ...	III (1 kb) ...tgttcag
4 (116 bp)	F I L TTT ATC CTG	gtaaagaa ...	IV (1,6 kb) ...tcaccag
5 (194 bp)	N Q Q AAC CAG CAG	gtaaggcc ...	V (3 kb) ...gttcctag
6 (104 bp)	I L L ATA TTG CTA	gtaagtga ...	VI (0,8 kb) ...ttccgag
7 (56 bp)	E A L GAA GCT CTG	gtatgta ...	VII (1 kb) ...ctttccag
8 (98 bp)	T Q K ACC CAG AAG	gtaaatgt ...	VIII (8 kb) ...ggacctag
9 (520 bp)	bis Poly(A)		

Tab. 5.5.: Exon/Intron-Organisation des *HSD17B7* Gens

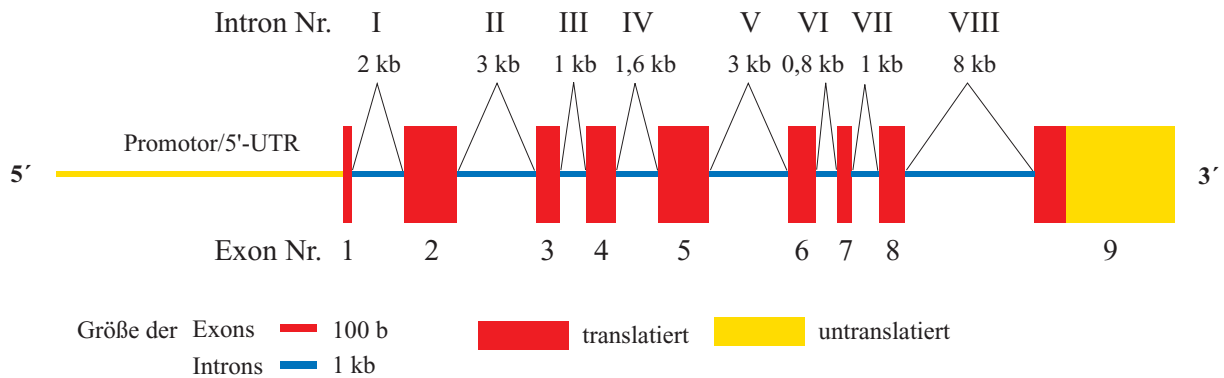


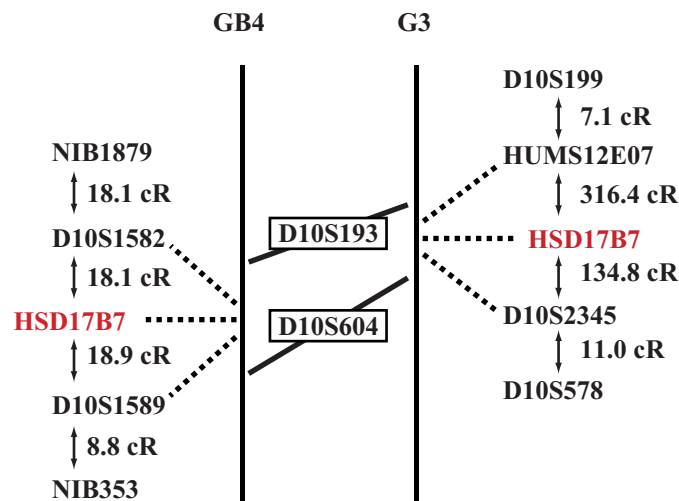
Abb. 5.17: Struktur des *HSD17B7* Gens

Alle Exons (rote Boxen) und Introns (blaue Linien) sind im jeweils unten angegebenen Maßstab gezeichnet. Das Exon 9 besteht aus einem translatierten (rot) und einem untranslatierten Bereich (gelb) und endet mit der Poly(A)-Sequenz der cDNA. Der untranslatierte Promotorbereich ist ebenfalls gekennzeichnet. Alle Nukleotidsequenzen sind in der EMBL-Nukleotidsequenzdatenbank unter folgenden GenBank-Zugangsnummern eingetragen: AF162759-162767.

### 5.2.4 Chromosomale Lokalisation

Zur Bestimmung der chromosomalen Lokalisation des *HSD17B7* Gens wurden zwei Radiation Hybrid Panels (Research Genetics) verwendet. Um die jeweils erzielten Ergebnisse absichern zu können, kamen der GeneBridge 4 (GB4)-Panel mit geringer Auflösung und der Stanford G3-Panel mit mittlerer Auflösung zum Einsatz.

Mit den DNA beider Panels wurde eine PCR-Typisierung durchgeführt, wobei der eine Primer aus dem Bereich des Introns 8, der zweite aus der Region des Exons 9 gewählt wurde. Das somit amplifizierte DNA-Fragment hatte eine Größe von 565 bp. Die Ergebnisse der PCR-Reaktionen (hier nicht gezeigt) wurden dem Whitehead/MIT-Server zu <http://www-genome.wi.mit.edu> (GB4) zur Multipoint-Analyse und zu <http://www-chgc.stanford.edu> (G3) für eine Zweipunkt-Analyse übermittelt.



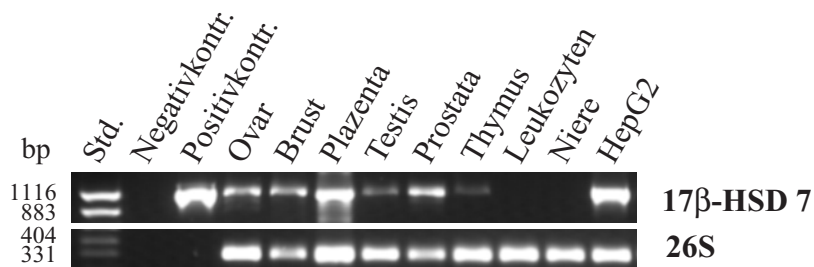
**Abb. 5.18: Chromosomale Lokalisierung des *HSD17B7* Gens**

Vergleich der Kartierungsergebnisse beider Radiation Hybrid Panel. Die zwei Marker des Kartierungsgerüsts, D10S193 und D10S604, die das entsprechende Intervall im GB4 und G3-Panel begrenzen, sind mittig gekennzeichnet. Die Abstände im GB4 und G3-Panel sind in cR<sub>3000</sub> bzw. cR<sub>10000</sub> angegeben. Die ermittelten RHP-Daten wurden bei der EMBL RH Datenbank unter den Zugangsnummern RH115827 und RH11528 eingereicht.

Die Radiation-Hybrid-Kartierung zeigte, dass das *HSD17B7* Gen durch beide Analysen auf Chromosom 10p11.2 zwischen den beiden Kartierungsmarken D10S1582 und D10S1589 lokalisiert ist (Abb 5.18). Dabei handelt es sich um eine Region mit hoher genetischer Plastizität (E. E. Eichler *et al.*, 1997; M. S. Jackson *et al.*, 1999). Mit dieser chromosomalen Lokalisation werden eine Reihe menschlicher Krankheiten in Verbindung gebracht.

### 5.2.5 Gewebeverteilung

Die Gewebeverteilung des menschlichen Enzyms wurde mittels RT-PCR untersucht. Die Vorauswahl der getesteten Gewebe erfolgte anhand der Expressionsmuster in Maus (P. Nokelainen *et al.*, 1998) und Ratte (W. R. Duan *et al.*, 1997). Die menschliche cDNA aus Ovar, Testis, Prostata, Thymus, Niere und peripheren Blutleukozyten wurden von der Firma Clontech, die cDNA aus Brustgewebe und Plazenta freundlicherweise von Dr. F. Feuerhake (Ludwig-Maximilians-Universität, Anatomische Anstalt) zur Verfügung gestellt und die cDNA aus HepG2-Zellen selbst präpariert (Kapitel 4.2.1.2). Um die Konzentrationen der vorliegenden Templates verifizieren und abschätzen zu können, wurde die PCR-Amplifizierung eines 324 bp-Fragmentes des ribosomalen S26-Proteins parallel durchgeführt.



**Abb. 5.19: RT-PCR- Analyse**

Unter Verwendung der cDNA verschiedener menschlicher Gewebe wurde mit spezifischen Primern für die 17β-HSD 7 ein 1029 bp und ein 324 bp-Fragment für das ribosomale S26-Protein amplifiziert. *Negativkontrolle*: H<sub>2</sub>O; *Positivkontrolle*: pCR<sup>®</sup> 2.1 17β-HSD 7; *Std.*: Größenstandard VIII (MBI Fermentas);

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte RT-PCR zeigte hohe Expression für die Brust, dem Ursprungsgewebe der Zelllinie, aus der das murine Enzym kloniert wurde (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Das humane Protein zeigte ein Signal in den Ovarien nicht schwangerer Frauen und war stark in der Plazenta vertreten. Wie bei der Maus ebenfalls beobachtet findet sich dieser Typ der 17β-HSD 7 auch in Testis (P. Nokelainen *et al.*, 1998).

Auch im Falle der humanen 17β-HSD 7 konnten wie für das Protein aus Nagetieren als mögliche Expressionsgewebe zahlreiche nicht endokrine Gewebe identifiziert werden. So zeigte die RT-PCR ein starkes Signal bei aus der Leber gewonnenen HepG2-Zelllinie. Auch ein potentieller Einfluss des Enzyms auf die Hämatopoese konnte in Erwägung gezogen werden, bedingt durch ein Vorkommen in Thymus, nicht jedoch in peripheren Leukozyten.

Die Kombination der Ergebnisse der RT-PCR mit einem von Rainer Breitling durchgeführten *in silico*-Northernblot (A. Krazeisen *et al.*, 1999) ermöglichten einen detaillierteren Einblick in das Expressionsmuster des Enzyms. (Näheres im Kapitel 6.2.4)

## 5.2.6 Aktivitätsmessungen und Aufreinigungsversuche

Um die Aktivität der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 untersuchen zu können, wurde die cDNA der kodierenden Sequenz in einen Expressionsvektor umkloniert. Wie bereits für die humanen 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 4 und 5 beschrieben, wurde zur Expression und Aufreinigung das GST Gene Fusion System (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt. Das erhaltene Konstrukt wurde in den *E. coli*-Stamm BL 21 DE3 Codon Plus (RP), später mit BL21 C<sup>+</sup> abgekürzt, eingebracht.

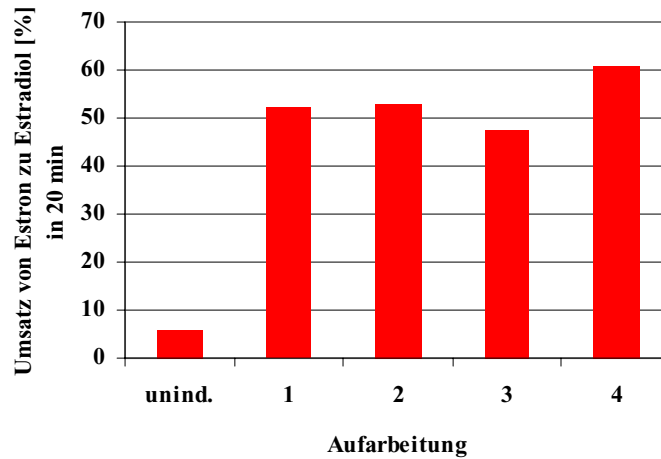
### 5.2.6.1 Aktivität im Bakterienlysate

Zunächst sollte generell gezeigt werden, ob die humane 17 $\beta$ -HSD 7, in Bakterien als GST-Fusionsprotein exprimiert (d. h. ohne postrtranslationale Modifikationen), überhaupt in aktiver Form erhalten werden kann.

Für eine Aufreinigung des Eiweißes über den Proteinanteil GST muss das Fusionsprotein in löslicher Form vorliegen. Da für das Enzym eine membranassoziierte Domäne postuliert wird, wurden Schwierigkeiten bei der Aufreinigung erwartet. Zum anderen sollte geprüft werden, ob das Protein aktiv bleibt, wenn es in Lösung gebracht wird. Mehrere Aufschlussverfahren sollten das klären.

Dazu wurde das Bakterienpellet in einem für die Aktivitätsmessung des murinen Enzyms beschriebenen Lysispuffer (P. Nokelainen *et al.*, 1998) aufgenommen und nach vier verschiedenen Methoden behandelt (Kapitel 4.8.4.1). Als Aktivitätsreferenzwerte dienten zum einen die induzierten, lediglich in Puffer resuspendierten Bakterien und zum anderen uninduzierte Bakterienkultur. Die 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivität des in den einzelnen Bakteriensuspensionen oder -lysaten vorliegenden GST-17 $\beta$ -HSD 7-Fusionsproteins wurden in den üblichen Reaktionsansätzen der *in vitro*-Messmethode bestimmt. Wie in Abb. 5.20 zu erkennen, kann selbst bei der uninduzierten Aufarbeitung ein geringer Umsatz von Estron zu Estradiol beobachtet werden. Ursache hierfür ist eine Hintergrund-expression des Enzyms, bedingt durch einen nicht ganz repressiven Promotor. Das bedeutet, dass selbst ohne Induktion durch IPTG kleine Mengen des humanen Enzyms gebildet wurden. Im Vergleich zu den induzierten Proben ist der beobachtete Umsatz jedoch gering.

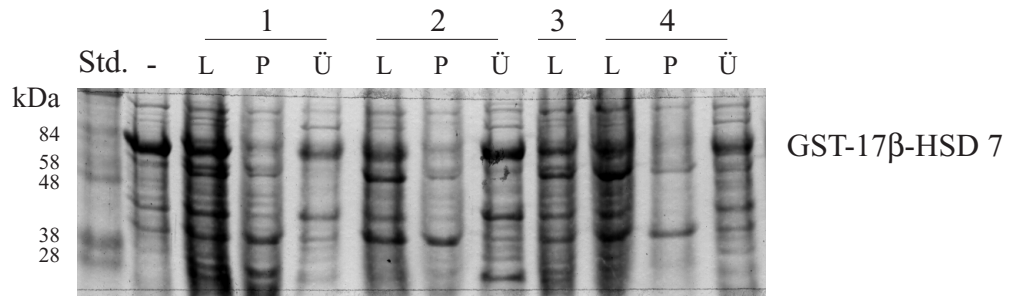
Alle angewandten Lysisverfahren schienen keinen Einfluss auf die Aktivität des Enzyms zu haben. Unterschiede liegen im Rahmen der Messgenauigkeit.



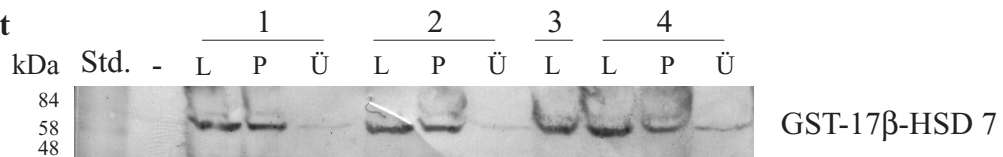
**Abb. 5.20: Bestimmung des Umsatzes von Estron zu Estradiol im Bakterienlysat**

Das pGEX-h17β-HSD 7-Konstrukt wurde BL21 C<sup>+</sup> exprimiert, die Bakterien nach vier Verfahren resuspendiert bzw. lysiert und anschließend die Aktivität aller Fraktionen getestet. Die *Nummern 1-4* beschreiben die Behandlungsmethode: *1*: in Lysispuffer resuspendiert; *2*: in Lysispuffer resuspendiert, Lyse durch Frieren und Tauen; *3*: in Lysispuffer resuspendiert; Lyse durch Lysozym, anschließendes Frieren und Tauen; *4*: in Lysispuffer resuspendiert, Lyse durch Ultraschallbehandlung; *unind.*: nicht induzierte Bakteriensuspension;

**SDS-Gel**



**Westernblot**



**Abb. 5.21: SDS-Gel und Westernblot der einzelnen Lysisfraktionen**

Die vier verschiedenen Methoden behandelten Bakteriensuspensionen bzw. -lysate (L) wurden zentrifugiert, der Überstand (Ü) abgenommen und das Pellet (P) in einer kleinen Menge PBS resuspendiert. Alle erhaltenen Fraktionen wurden auf ein 10 %iges SDS-Gel aufgetragen *L*: Lysat; *Ü*: Überstand; *P*: Pellet; *Std.*: Molekularmassenstandard  $M_F$  (Fluka). Die *Nummern 1-4* beschreiben die Behandlungsmethode: *1*: in Lysispuffer resuspendiert; *2*: in Lysispuffer resuspendiert, Lyse durch Frieren und Tauen; *3*: in Lysispuffer resuspendiert; Lyse durch Lysozym, anschließendes Frieren und Tauen; *4*: in Lysispuffer resuspendiert, Lyse durch Ultraschallbehandlung; Die Aufarbeitung nach Nr.3 ermöglichte aufgrund der Konsistenz keine klare Auftrennung in Überstand und Pellet nach Zentrifugation;

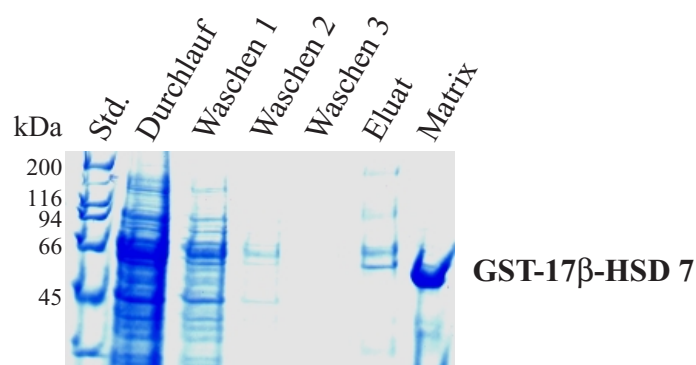
Die Suspensionen bzw. Lysate (L) wurden zentrifugiert und in einen unlöslichen Pelletanteil (P) und einen löslichen, zytosolischen Überstand (Ü) getrennt. Die erhaltenen Fraktionen wurden auf SDS-Gele aufgetragen, welche einerseits mit Coomassie Blue G-250 gefärbt und andererseits für einen Westernblot verwendet wurden. Die Detektion des Fusionsproteins beim Westernblot erfolgte mit einem Anti-GST-Antikörper aus Maus, einem sekundären Peroxidase-markierten Maus-Antikörper aus Ziege und einer Färbelösung mit Diaminobenzidintetrahydrochlorid (Abb. 5.21).

Schon im Coomassie-gefärbten Gel war die Überexpression des Fusionsproteins in den einzelnen Bakteriensuspensionen beziehungsweise -lysaten anzunehmen. Eine genaue Lokalisation des Proteins war im Westernblot jedoch wesentlich besser zu ermitteln, da nur das GST-Fusionsprotein vom GST-Antikörper erkannt wird. Der Hauptanteil des Fusionsproteins blieb bei Verwendung verschiedener Lysismethoden immer im unlöslichen Bakterienanteil (P) gebunden und war nur zu sehr geringen Anteilen im Überstand (Ü) löslich. Wie aus dem Blot zu erkennen ist, wurde das Enzym durch Ultraschallbehandlung am besten in den Überstand überführt. Der Überstand mit dem gelösten Protein wurde zur Reinigung mittels Affinitätschromatographie eingesetzt.

#### **5.2.6.2 Aufreinigungsexperimente und Aktivitätsbestimmungen**

Zunächst sollte der nach Ultraschallbehandlung der Bakteriensuspension und Zentrifugation erhaltene Überstand zur Aufreinigung an GT-Sepharose nach dem üblichen Protokoll (Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt werden. Da jedoch nach durchgeführter Thrombinspaltung zahlreiche, unspezifische Proteine erhalten wurden (hier nicht gezeigt), wurde der bei den 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen Typ 4 und 5 beschriebene Weg zur Aufreinigung eingeschlagen. Zunächst sollte das reine Enzym unter Abspaltung des GST-Anteils mittels Thrombinspaltung aufgereinigt werden.

Das Pellet der induzierten BL21 C<sup>+</sup>-Kultur wurde im Lysispuffer resuspendiert. Die Bakterien wurden durch Lysozym und anschließendes Frieren und Tauen aufgebrochen. Nach DNA-Verdau wurde das Lysat zentrifugiert. Der Überstand mit den löslichen Proteinen wurde für die Aufreinigung mittels Affinitätschromatographie (Kapitel 4.4.2.2) verwendet.



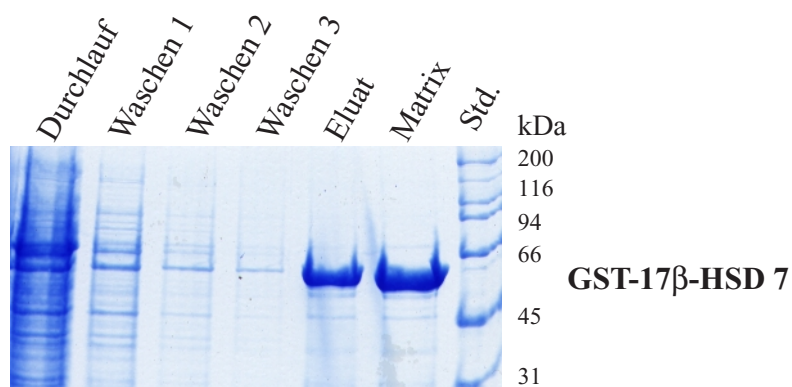
**Abb. 5.22: Aufreinigung des GST-17 $\beta$ -HSD 7-Fusionsproteins unter Thrombinspaltung**

*Durchlauf*: nach Anbindung des GST-Fusionsproteins an die GT-Sepharose erhaltener Überstand, in dem sich alle nicht an die Sepharose gebundene Proteine befinden; *Waschen 1-3*: Drei dem Anbindungsschritt angeschlossenen Waschschriffe; *Eluat*: nach Thrombinspaltung gesammelte Eluate; *Matrix*: GT-Sepharose nach Elution; *Std.*: Molekularmassenstandard  $M_B$  (Biorad);

Um den tatsächlichen Ablauf des Aufreinigungsverfahrens verfolgen zu können, wurden alle erhaltenen Fraktionen auf ein SDS-Gel aufgetragen und anschließend mit Coomassie gefärbt (Abb. 5.22).

Wie anhand des SDS-Gels deutlich zu erkennen ist, konnte durch Inkubation mit Thrombin kein 17 $\beta$ -HSD 7-Protein abgespalten und eluiert werden. Das zeigte sich daran, dass nahezu das gesamte Fusionsprotein an der GT-Sepharose zurückblieb. Eine mehrfache Wiederholung dieser Aufreinigungsmethode lieferte kein anderes Ergebnis. Die parallel zur h17 $\beta$ -HSD 7, unter gleichen Bedingungen erfolgreich aufgereinigte h17 $\beta$ -HSD 5 zeigte, dass die nicht erfolgte Thrombinspaltung von Typ 7 nicht auf eine fehlerhafte Aufreinigungsprozedur zurückzuführen war. Vermutlich lässt die Tertiärstruktur des GST-Fusionsproteins im Falle der h17 $\beta$ -HSD 7 keine Spaltung durch Thrombin zu, zum Beispiel wegen sterischer Hinderung. Im Folgenden wurde gezeigt, dass es möglich war, das Fusionsprotein nach Anbindung an die Matrix mittels Gluthationelution anzureichern.

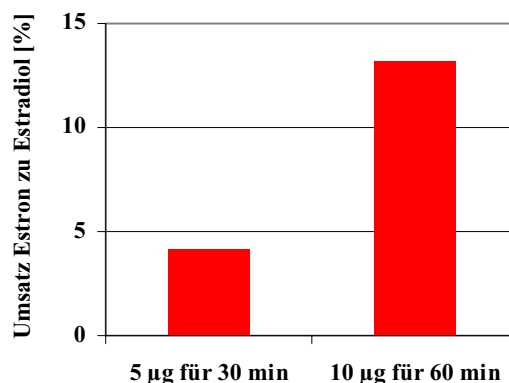
Die Aufreinigung der h17 $\beta$ -HSD 7 nach dieser Methode wurde ebenfalls mittels SDS-Gel dokumentiert.



**Abb. 5.23: Aufreinigung des GST-Fusionsproteins mittels Gluthationelution**

*Durchlauf*: nach Anbindung des Proteins an die Matrix, in einem Zentrifugationsschritt erhaltener Überstand, in dem sich alle nicht an die Sepharose gebundenen Proteine befinden; *Waschen 1-3*: Drei dem Anbindungsschritt angeschlossene Waschschrte; *Eluat*: gesammelte Eluate; *Matrix*: GT-Sepharose nach Elution; *Std.*: Molekularmassenstandard  $M_B$  (Biorad);

Durch Inkubation mit Glutathion konnte ein großer Anteil des gebundenen Fusionsproteins eluiert werden. Die mit GST-h17 $\beta$ -HSD 7 angereicherte Fraktion wurde im *in vitro*-System auf HSD-Aktivität geprüft.



**Abb. 5.24: Umsatz von Estron zu Estradiol durch aufgereinigte GST-h17 $\beta$ -HSD 7**

Zusammenfassend lässt sich demnach feststellen, dass die h17 $\beta$ -HSD 7 die erwartete Reduktion von Estron zu Estradiol, auch in Form des Fusionsproteins, zeigte. Die biologische Funktion des Enzyms und eventuell weitere Aktivitäten sind bisher nicht geklärt und bedürfen weiterer Untersuchungen.



## 6 DISKUSSION

### 6.1 Inhibitionsstudien an humanen 17 $\beta$ -HSDs

#### 6.1.1 Wahl des *in vitro*-Systems

Das *in vitro*-System für die Untersuchung von Einflüssen der pflanzlichen und synthetischen Steroidanaloga auf rekombinant exprimierte und aufgereinigte 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen wurde aus verschiedenen Gründen gewählt. Es handelt sich dabei um ein definiertes System, bei dem das Auftreten von unerwünschten Seitenreaktionen minimiert werden kann. Das zugegebene Phytohormon kann nicht, wie beispielsweise in Zellkultur denkbar, durch den komplexen, zellulären Enzymapparat metabolisiert und damit der eigentlichen Wechselwirkung mit der Hydroxysteroiddehydrogenase entzogen werden.

Der Hormonstatus einer Zelle oder eines Gewebes wird oft durch das Zusammenspiel steroidmetabolisierender Enzyme bestimmt, d. h. mehrere Typen der 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen können in einer Zelle nebeneinander auftreten. Bei der Umsetzung der angebotenen Substanzen ist auch ein Mitwirken noch nicht identifizierter 17 $\beta$ -HSD-Typen denkbar. Das angewandte *in vitro*-System ermöglicht demnach die Detailbetrachtung eines einzelnen vom interessierenden Enzym katalysierten Umsetzungsschrittes im komplexen Metabolismus von Estrogenen und Androgenen.

Zur Optimierung des Systems wurden für alle untersuchten Aktivitäten die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Puffersysteme mit entsprechendem pH-Optimum eingesetzt. Die Wahl der pH-Werte richtete sich nach maximaler Aktivität des jeweiligen Enzyms. Dabei blieben die tatsächlichen Bedingungen, wie sie *in vivo* in den Organen, Zellen oder Kompartimenten vermutlich herrschen, in denen das Protein exprimiert wird, weitgehend unberücksichtigt. Der pH-Wert des Reaktionsmilieus bestimmt den Ladungszustand des Proteins und beeinflusst damit dessen Tertiärstruktur und die Aktivität. Aus diesen Gründen liefert das in dieser Arbeit eingesetzte *in vitro*-System zwar Einblicke in einzelne, in einer Zelle ablaufende Umsetzungen, ist jedoch nicht ohne weiteres auf die *in vivo*-Situation zu übertragen. Arbeiten in Zellkultur könnten hier Reaktionsbedingungen schaffen, welche etwas näher an der tatsächlichen *in vivo*-Situation liegen, bergen aber, wie bereits erwähnt, andere Nachteile.

### 6.1.2 Konzentration der Phytoestrogene

Phytoestrogene können im Serum nachgewiesen werden und variieren je nach Ernährungsgewohnheiten. Als maximal können die in japanischen Männern für Isoflavone gemessenen Werte (H. Adlercreutz *et al.*, 1993) gesehen werden. Sie lagen im mikromolaren Bereich, bis maximal 2,4  $\mu\text{M}$ . Es wird vermutet, dass die Konzentration natürlicher Steroidhormone in verschiedenen Geweben deutlich unterschiedlich sind.

In der vorliegenden Arbeit wurden Phytohormonkonzentrationen von 100 nM bis 20  $\mu\text{M}$  in einem beschriebenen *in vitro*-System eingesetzt. Im Testsystem entsprachen zwar weder Phytohormon-, noch Enzym- (ca. 0,3  $\mu\text{M}$ ) oder Steroidhormonkonzentrationen (ca. 40 nM) den physiologischen Begebenheiten, jedoch die Verhältnisse der Komponenten zueinander. Somit können die hier ermittelten  $\text{IC}_{50}$ -Werte als Maß für die Inhibitionsstärke dienen, jedoch nicht als Absolutwerte betrachtet werden.

Die durch andere Arbeitsgruppen mittels verschiedener Methoden bestimmten Mindestkonzentrationen für eine estrogenische Wirkung bzw. für den hemmenden Einfluss von Phytoestrogenen auf steroidmetabolisierende Enzyme variieren stark. Für die  $17\beta$ -HSD 1 (S. Mäkelä *et al.*, 1995a; S. Mäkelä *et al.*, 1998) oder  $17\beta$ -HSD 2 (S. Mäkelä *et al.*, 1998) wurden Inhibitionen der Enzymaktivitäten ab einer Pflanzenhormonkonzentration von 1,2  $\mu\text{M}$  festgestellt. Estrogenische Wirkung, d. h. Erhöhung der Transkriptionsaktivität von Zielgeweben, wurde ab einer Konzentration von 10 nM beobachtet (G. G. Kuiper *et al.*, 1998). Im Vergleich zum natürlichen Liganden Estradiol wird für die Phytoestrogene eine zwischen 100-1000fach geringere Bindungsaffinität zum  $\text{ER}\alpha$  (D. A. Shutt & R. I. Cox, 1972) und eine 5-50fach geringere für  $\text{ER}\beta$  (G. G. Kuiper *et al.*, 1998) beobachtet. In anderen Studien konnte, in Zellen mit endogenen Rezeptoren und den responsiven Genen, für starke Phytoestrogene ab 10-100 nM eine estrogenische Wirkung beobachtet werden, für schwächere Komponenten erst ab 10  $\mu\text{M}$  (R. S. Zand *et al.*, 2000). Diese Konzentrationen sind ca. 10fach höher als von anderen Arbeitsgruppen (J. C. Le Bail *et al.*, 1998b; R. J. Miksicek, 1995) beschrieben. Dort kamen Systeme zum Einsatz, bei denen Zellen mit ER-responsiven Reporterplasmiden transfiziert wurden. Letztere Versuche scheinen im Vergleich zu den oben genannten eher „nicht physiologisch“ und wurde als zu empfindlich kritisiert (L. Xu *et al.*, 1999; R. S. Zand *et al.*, 2000).

### 6.1.3 Stärkste Inhibitoren

Als stärkste Inhibitoren der EDH-Aktivität der h17 $\beta$ -HSD 4 wurden Quercetin und 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure, gefolgt von Zearalenon und Genistein, bestimmt (Kapitel 5.1.2.3; Abb. 5.2).

Im Falle der h17 $\beta$ -HSD 5 zeigten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente, dass zahlreiche Substanzen beide von dem Enzym katalysierten Umsetzungen (d. h. die oxidative und reduktive Aktivität) des Androgenstoffwechsels hemmen. Als stärkste Inhibitoren konnten Cumestrol, Zearalenon, Quercetin und der Genistein-Vorläufer Biochanin A identifiziert werden. Substanzen wie das synthetische Antiestrogen Tamoxifen, das Isoflavon Daidzein und Cumarin zeigten auf beide 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten der AKR keinen Einfluss. Ein uneinheitlicher Effekt konnte für die in Lakritze zu findende 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure beobachtet werden. Diese Substanz inhibierte lediglich die von 17 $\beta$ -HSD 5 katalysierte Reduktion von Androstendion zu Testosteron, ließ jedoch die Oxidation von Androstandiol zu Androsteron unbeeinflusst.

Im Vergleich dazu gelten die Substanzen Cumestrol und Kaempferol als stärkste Inhibitoren der 17 $\beta$ -HSD 1 (S. Mäkelä *et al.*, 1995a; S. Mäkelä *et al.*, 1998) und 17 $\beta$ -HSD 2 (S. Mäkelä *et al.*, 1998). Inwiefern eine der vier erwähnten 17 $\beta$ -HSDs sensitiver auf die Gegenwart von Pflanzenestrogenen reagiert, kann an dieser Stelle schwer beurteilt werden. Den jeweiligen der Literatur entnommenen Ergebnissen lagen unterschiedliche Aufreinigungsmethoden und Messbedingungen zugrunde. Die Beeinflussbarkeit von Typ 1 wurde mit aus Gewebe aufgereinigtem Enzym und in Zellkultur unter Verwendung verschiedener Brustkrebszelllinien untersucht. Die Untersuchungen an Typ 2 erfolgten ausschließlich in Zellkultur mittels der Prostatakrebszelllinie PC-3.

Auch die Aufreinigungstechnik sowie die vorherrschenden Bedingungen beeinflussen die gemessene Aktivität des Proteins.

### 6.1.4 Struktur-Wirkungsbeziehung

#### 6.1.4.1 Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 4

##### Substitutionsmuster von Flavonoiden

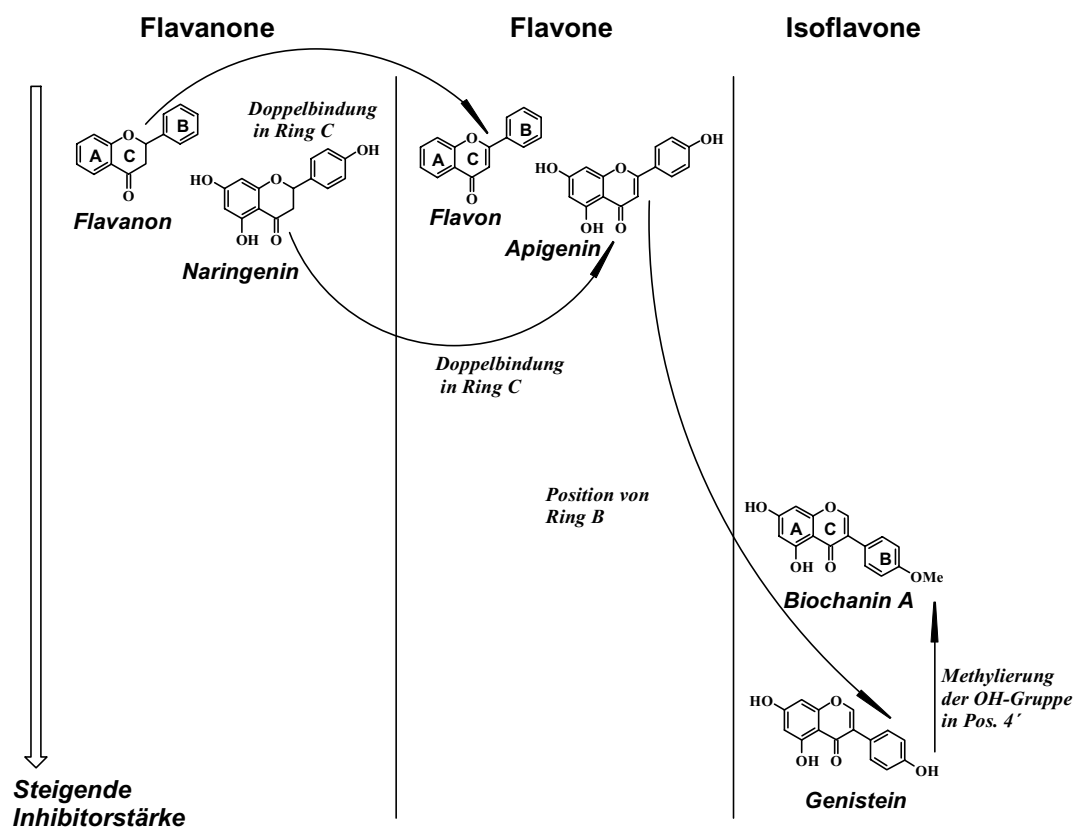
Innerhalb der Klasse der Flavone konnte dem fünffach hydroxylierten Quercetin die stärkste Hemmwirkung auf die EDH-Aktivität der h17 $\beta$ -HSD 4 zugeschrieben werden, gefolgt von Kaempferol und 7-Hydroxyflavon (Kapitel 5.1.2.4; Abb. 5.3). Anhand der in der

vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse konnte innerhalb der Gruppe der Flavonoide der Hydroxygruppe an Position 7 eine besondere Bedeutung beigemessen werden. Deutlich wurde ebenfalls der Einfluss des hydrophilen Charakters der Substanzen. Eine höhere Anzahl von Hydroxygruppen war mit einer stärkeren Hemmwirkung des Flavons verbunden. Eine sprunghafte Zunahme an Inhibitionswirkung wurde beim Übergang vom vierfach hydroxylierten Kaempferol zum fünffach substituierten Quercetin beobachtet. Offen bleibt an dieser Stelle, ob diese Aktivitätssteigerung auf einer Zunahme des hydrophilen Charakters oder auf der Positionierung der zusätzlichen OH-Gruppe (Position 3') beruht.

Die Flavonoide lassen sich weiter in die Flavanone, Flavone und Isoflavone unterteilen. Im Vergleich zu den Flavonen besitzen die Flavanone keine Doppelbindung im Ring C des Flavonoidgrundgerüsts. Der aromatische B-Ring ist bei den Isoflavonen über die Position 3 des C-Ringes kovalent verknüpft, bei den Flavonen und Flavanonen über die Position 2. Die Bedeutung dieser, innerhalb der Flavonoide variierenden strukturellen Eigenschaften und deren Einfluss auf die Hemmwirksamkeit sollte untersucht werden. Dazu wurden die Inhibitionsstärken von Vertretern der einzelnen Klassen mit identischer OH-Substitution miteinander verglichen.

Unsubstituierte Flavonoide zeigten generell (Abb. 6.1), unabhängig von der Zahl der im Ring C zu findenden Doppelbindungen, eine kaum messbare Hemmwirkung. Nur wenig stärkere Inhibition konnte für die dreifach hydroxylierten Flavonoide beobachtet werden.

Eine deutliche Steigerung der Inhibitionswirkung ist beim Übergang von den Flavonen zu den Isoflavonen zu bemerken (wie beispielsweise von Apigenin zu Genistein). Die bei Isoflavonen zu Flavonen veränderte Position des B-Rings steigerte die Inhibitionskraft um ein Vielfaches. Eine Methylierung der OH-Gruppe in Position 4' reduzierte diese Hemmwirkung geringfügig. Demnach schien bei den Isoflavonen die Position des B-Rings sowie dessen hydrophile Gruppen entscheidend für die Hemmwirkung.



**Abb. 6.1: Inhibitionsstärke der Flavonoide**

Als Grundlage für die Bemessung der Inhibitionsstärke der einzelnen Komponenten dienten zum einen die in den Inhibitionsstudien ermittelte prozentuale Hemmung für die Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  (Tabelle in Abb. 5.2) und zum anderen die  $\text{IC}_{50}$ -Werte (Tab. 5.2). Die Darstellung der steigenden Inhibitorstärke ist nicht linear.

### Flavonoide: Hemmwirkung auf die humane $17\beta$ -HSD 4 und Estrogenizität

Neben einer Interaktion mit den estrogenmetabolisierenden Enzymen können Phytoestrogene auch mit Hormonrezeptoren, wie den Estradiolrezeptoren, wechselwirken. Eine estrogenische Wirkung beinhaltet die ligandenaktivierte Transkription der Hormonzielgene. Studien an mit estrogenresponsiven Reporterplasmidsystemen transfizierten Zellen (R. J. Miksicek, 1995; J. C. Le Bail *et al.*, 1998b), sowie Studien an Zellen mit endogenen Rezeptoren und entsprechenden Zielgenen (R. S. Zand *et al.*, 2000) zeigten klare Struktur-Estrogenizitätsbeziehungen. Die für eine estrogenische Wirkung der Flavonoide über die Rezeptoren beobachteten strukturellen Eigenschaften (R. S. Zand *et al.*, 2000) zeigen zahlreiche Übereinstimmungen mit den in der vorliegenden Arbeit für die Inhibition der EDH-Aktivität der  $h17\beta$ -HSD 4 bestimmten Gesetzmäßigkeiten. So gilt die Hydroxylierung des Flavon- und Flavanon-Grundgerüsts als für die Estrogenizität unverzichtbare Grundvoraussetzung. Unsubstituierte Vertreter zeigten keine Wirkung (A. Cassidy, 1999; R. S. Zand *et al.*, 2000). Eine Hydroxylierung der Position 7 im Flavonoidgerüst konnte bei allen Komponenten mit

stärkerer estrogener Wirkung festgestellt werden. Die am stärksten estrogen wirkenden Komponenten trugen zwischen 2 und 4 OH-Gruppen (R. S. Zand *et al.*, 2000). Im Vergleich zu den Flavonen und Flavanonen wurde die Transkription der hormonresponsiven Gene weitaus stärker durch Isoflavone induziert (R. S. Zand *et al.*, 2000). Damit zeigen sich deutliche Übereinstimmungen in den allgemeinen Strukturmerkmalen, welche ein Flavonoid als estrogen wirksam, beziehungsweise als potentiellen Hemmstoff der EDH-Aktivität des untersuchten Enzyms auszeichnen. Substanzen, die besonders gut die Transkription über den Estradiolrezeptor steuern, scheinen auch den Estradiolabbau durch 17 $\beta$ -HSD 4 beeinflussen zu können. Diese Beobachtung deutet darauf hin, dass Phytoestrogene über eine Bindung an der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors oder am aktiven Zentrum des Enzyms Estrogene ersetzen oder „nachahmen“ können.

#### **6.1.4.2 Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 5**

##### **Substitutionsmuster von Flavonoiden**

Beide untersuchten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten von Typ 5 besitzen in ihren stärksten Hemmstoffen stets eine Hydroxygruppe in der Position 7 des Flavonoidgrundgerüsts. Diese funktionelle Gruppe scheint, wie bereits für die 17 $\beta$ -HSD 4 gezeigt, für diese Wirkung unverzichtbar. Für die Hemmung von Typ 1 und 2 ist ebenfalls, neben einer Hydroxylierung an Position 5 am Flavonoidgrundgerüst, eine OH-Gruppe an Position 7 unbedingt notwendig (S. Mäkelä *et al.*, 1998). 17 $\beta$ -HSD 1, 2, und 4 gehören in die Familie der SCAD, 17 $\beta$ -HSD 5 zu den Aldo-Keto-Reduktasen. Untersuchungen an Kristallstrukturen von Vertretern der AKR- und der SCAD-Familie haben gezeigt, dass die katalytischen Aminosäurereste des aktiven Zentrums bei beiden Proteinfamilien in ihrer Position zueinander konserviert sind (T. M. Penning *et al.*, 1997). So steht das Lys/Tyr-Paar im aktiven Zentrum der SCAD, sowie innerhalb der katalytischen Tetrade der AKR-Familie in einem festen Abstand von 0,5 Å zueinander (T. M. Penning *et al.*, 1997). Anhand dieser für die vier 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasentypen gefundenen Übereinstimmungen wird angenommen, dass die einander entsprechenden strukturellen Eigenschaften der Hemmstoffe sowie die konservierten Positionen der an der katalytischen Umsetzung beteiligten Aminosäurereste, in allen Fällen eine Bindung des Hemmstoffes über die Hydroxygruppe in Position 7 an das aktive Zentrum ermöglicht. Unterstützt wird diese Hypothese durch weitere Beobachtungen. Im Komplex der 3 $\alpha$ -HSD mit NADP und Testosteron ist die 3 $\alpha$ -OH-Gruppe des Substrates über eine Wasserstoffbindung zwischen den Tyrosin- und Histidinresten der konservierten katalytischen Tetrade positioniert (M. J. Bennett *et al.*, 1997). Die gleiche Stellung nimmt ein fest

gebundenes Wassermolekül im binären Komplex mit der 3 $\alpha$ -HSD ein (M. J. Bennett *et al.*, 1997). Ähnlich positioniert ist das Sauerstoffatom der entsprechenden funktionellen Gruppe verschiedener Inhibitoren in anderen AKR-Mitgliedern. Aus diesen Betrachtungen kann abgeleitet werden, dass die in Position 7 des Flavongerüsts positionierte Hydroxygruppe über den Tyrosinrest am aktiven Zentrum der 17 $\beta$ -HSD 5 bindet.

Inhibitionsstudien mit unterschiedlich substituierten Flavonen haben gezeigt, dass die Inhibitionskapazität dieser Stoffklasse mit steigendem Hydroxyierungsgrad zunimmt. Daher wurde zunächst angenommen, dass der Hemmstoff über die 7-Hydroxygruppe am katalytischen Zentrum fixiert ist und der „Restkörper“ aufgrund der eben genannten Eigenschaft mehr in die hydrophile Cofaktorbindungsdomäne dirigiert wird. In der vorliegenden Arbeit wurde daraufhin getestet, ob eine Steigerung der Cofaktorkonzentration die Wirkung des stark inhibierenden Phytoestrogens Quercetin reduziert. Dabei wurde davon ausgegangen, dass Inhibitor und Cofaktor um die gleiche Bindungsdomäne konkurrieren und ein Cofaktorüberschuss das Quercetin verdrängen und damit eine Inhibition verhindern würde. Eine eben solche Beobachtung konnte nicht gemacht werden. Entweder wird also, falls das Quercetin in Richtung NADPH<sup>+</sup>-Bindungsdomäne dirigiert wird, die Cofaktorbindung scheinbar nicht beeinflusst oder Quercetin hat eine höhere Affinität des Inhibitors zur entsprechenden Domäne des Enzyms als der natürliche Cofaktor NADPH<sup>+</sup>.

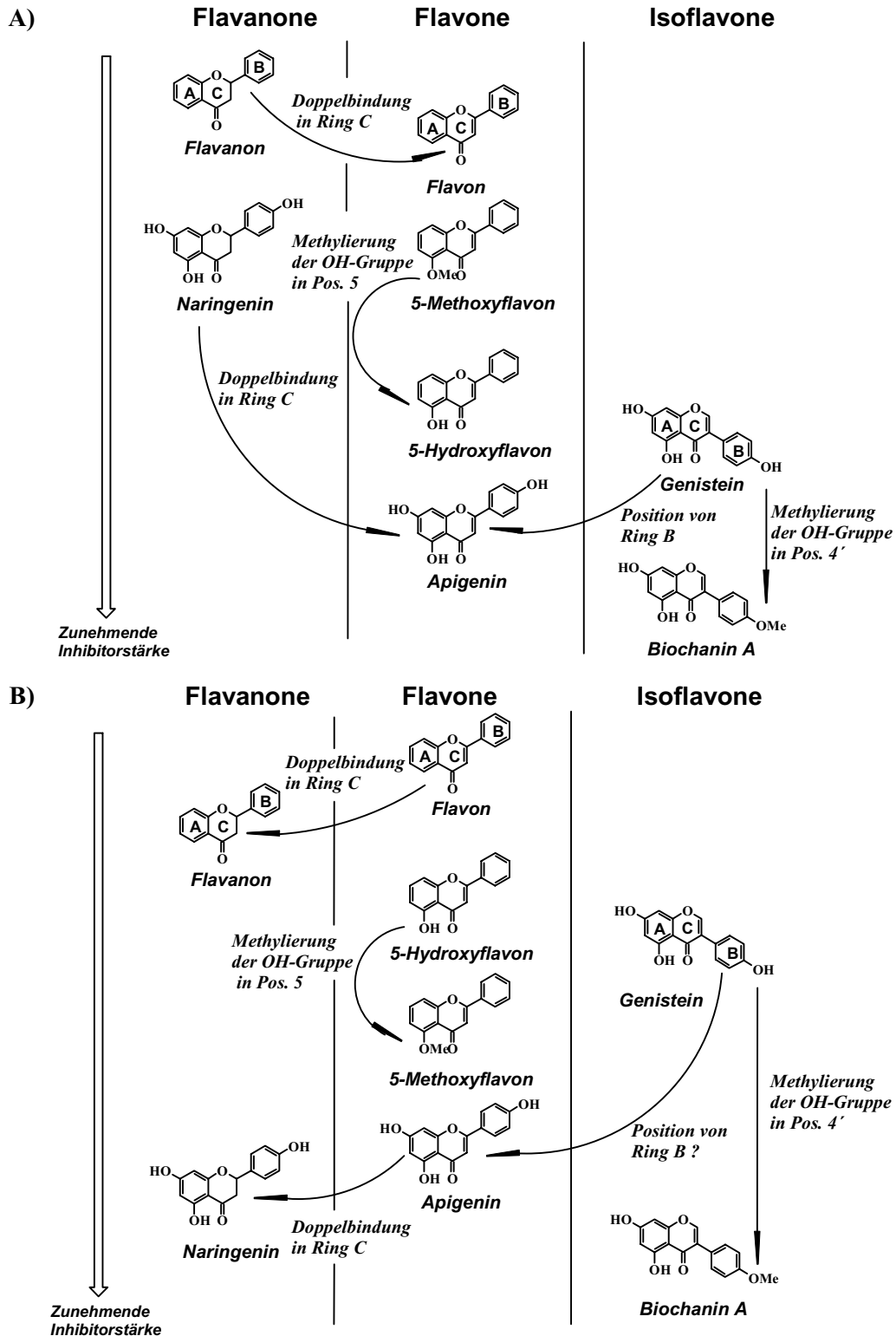
Eine exakte Aussage über den Hemmungsmechanismus kann an dieser Stelle nicht getroffen werden. Um genaue Erkenntnisse darüber zu erhalten, müssten Kristallisationsstudien folgen.

Um die Bedeutung der innerhalb der Flavonoide verschiedener Gruppen der Flavonoide (Flavanone, Flavone und Isoflavone) variierenden strukturellen Eigenschaften und deren Einfluss auf die Hemmwirksamkeit beurteilen zu können, wurden die Inhibitionsstärken jeweils gleich substituierter Vertreter der einzelnen Klassen verglichen (Abb. 6.2).

Die Bedeutung der Doppelbindung im C-Ring des Flavonoidgerüsts wird beim Vergleich von Flavanon mit Flavon sowie Naringenin mit Apigenin ersichtlich. Unter reduktiven Bedingungen schien die für Flavone charakteristische Doppelbindung die Inhibitorstärke zu vergrößern. Andererseits wurde für die Hemmung der oxidativen Enzymaktivität eine Abnahme der Hemmwirkung bei Vorhandensein der Doppelbindung beobachtet.

Für beide untersuchten 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivitäten wurde ein Verlust an Inhibitionsstärke beobachtet, wenn sich der B-Ring, wie bei den Isoflavonen, an der Position 3 im C-Ring befand.

Innerhalb der Isoflavone ist eine Methylierung der in 4'-Position befindlichen OH-Gruppe mit einer Zunahme an Inhibitionskraft verbunden (Genistein verglichen mit Biochanin A).



**Abb. 6.2: Inhibitionsstärke der Flavonoide auf die**

**A) Reduktion von Androstendion zu Testosteron und**

**B) Oxidation von Androstandiol zu Androsteron**

Zur Einschätzung der Hemmstärke wurden die Hemmwerte der Substanzen bei 20  $\mu\text{M}$  Konzentration, sowie deren  $\text{IC}_{50}$ -Werte herangezogen (Kapitel 5.1.3.3). Die Darstellung der zunehmenden Inhibitorstärke ist nicht linear.



## Spezielle Rolle der 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure

Im Falle der 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure scheint deren Carboxygruppe den Carbonylsauerstoff des natürlichen Substrates vorzutauschen. Entsprechendes konnte für die Carboxygruppen von Tolrestat, welches an Aldehydreduktase und Zopolrestat, das an Aldosereduktase bindet (O. El-Kabbani *et al.*, 1998), gezeigt werden. Beide Enzyme sind Vertreter der AKR-Familie. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Versuche dieser Arbeit. Die 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure zeigte drastisch unterschiedliche Effekte auf beide untersuchten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten der 17 $\beta$ -HSD 5. So wurde die Reduktion von Androstendion zu Testosteron (bei pH 7,4) stark gebremst, die Oxidation von Androstandiol zu Androsteron (bei pH 9,0) blieb dagegen unbeeinflusst. Vermutlich wird durch die basischen Reaktionsbedingungen bei der Oxidation das Histidin des aktiven Zentrums deprotoniert und eine Bindung der Carboxygruppe der 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure unterbunden.

## 6.1.5 Medizinische Bedeutung

### 6.1.5.1 Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 4

Die Entstehung von Brustkrebs wird unter anderem mit einer erhöhten Estradiolkonzentration im Serum, sowie einer verlängerten Exposition zu dem Hormon in Zusammenhang gebracht (P. G. Toniolo *et al.*, 1995; A. Zeleniuch-Jacquotte *et al.*, 1995). Demnach wird das Brustkrebsrisiko mit der Ovaritätigkeit assoziiert mit nimmt entsprechend mit dem Alter zu (L. Bernstein & R. K. Ross, 1993), d. h. als Risikofaktoren gelten frühe Geschlechtsreife, späte Menopause (Übersichtsartikel: S. A. Bingham *et al.*, 1998; S. H. Safe, 1998) sowie eine Hormonersatztherapie in der Postmenopause (H. S. Jacobs, 2000). Demnach spielen alle in die Aktivierung und Inaktivierung dieses aktiven Estrogens eingreifenden Komponenten eine Rolle bei der Entstehung von Brustkrebs.

Als mögliche Therapie bei Brustkrebs kommt, sofern der Tumor hormonabhängig ist, meist das synthetische Antiestrogen Tamoxifen zum Einsatz (reviewed: S. A. Bingham *et al.*, 1998). Da die Behandlung mit diesem Medikament wiederum das Risiko des Gebärmutterkrebses erhöht, wird nach einer risikolosen Alternativsubstanz gesucht. Dabei sollte es sich ebenfalls um ein Substanz handeln, welche antiestrogen wirkt und gleichzeitig die Synthese des aktiven Estrogens unterdrückt. Einige Phytoestrogene gelten hier als aussichtsreiche Kandidaten.

Als wichtigstes Enzym der Estradiolsynthese (Estradiol aus Estron) gilt die 17 $\beta$ -HSD 1, welche neben ihrem Vorkommen im Ovar und Plazenta noch im Brustgewebe exprimiert ist (Übersichtsartikel: F. Labrie *et al.*, 2000). Daneben bietet das Enzym Aromatase, welches die Umsetzung von Androgenen zu Estrogenen katalysiert, die Möglichkeit lokaler Estrogensynthese. Eine Inhibition dieser Enzyme (R. J. Santen & H. A. Harvey, 1999) gilt, neben dem Einsatz von Antiestrogenen, als wichtiger Therapieansatz bei einer hormonsensitiven Brustkrebserkrankung.

Im Falle der 17 $\beta$ -HSD 4 handelt es sich um ein ebenfalls am Estrogenmetabolismus beteiligtes Enzym. Im Gegensatz zum Typ 1 katalysiert sie die Inaktivierung von Estradiol durch Oxidation zu Estron (F. Leenders *et al.*, 1996). Das Enzym ist in zahlreichen Geweben, darunter hauptsächlich in der Leber, dem Ort des Hormonabbaus, und in geringeren Mengen auch in endokrinen Geweben exprimiert. In Anbetracht der beschriebenen Korrelation zwischen einer hohen lokalen Estradiolkonzentration im Brustgewebe und der Entwicklung von Brustkrebs scheint hier weniger die Inhibition, sondern vielmehr eine hohe Aktivität der 17 $\beta$ -HSD 4 wünschenswert.

Um eine Auswirkung der Veränderung der 17 $\beta$ -HSD 4-Aktivität auf die das Hormonsystem bewerten zu können, muss an dieser Stelle der allgemeine Abbau der Estrogene beschrieben werden. Diese werden ganz allgemein durch verschiedenste Hydroxylierungen metabolisiert und abgebaut. Ausgangspunkt kann zum einen das aktive Estrogen Estradiol oder zum anderen das Oxidationsprodukt Estron sein. Beteiligt sind jeweils verschiedene Enzymsysteme (C. P. Martucci & J. Fishman, 1993).

Durch Hydroxylierung von Estradiol entstehen die stark estrogenen Substanzen Estriol und 16-Hydroxyestradiol, welche mit der Entstehung und Entwicklung verschiedener hormonkontrollierter Krebsarten in Zusammenhang gebracht werden (Übersichtsartikel: M. Oettel & E. Schillinger, 1999).

Das nach Oxidation aus Estradiol entstandene Estron wird zum Großteil in den Positionen 6 $\alpha$  oder 7 $\alpha$  hydroxyliert (I. Maschler *et al.*, 1983). Die Produkte besitzen keine Rezeptoraffinität (E. Hohls, 1991), werden umgehend aus der Zelle geschleust und nehmen demnach keinen weiteren Einfluss auf das Hormonsystem. Über einen anderen Abbauweg entstehen aus dem inaktiven Estrogen die Catecholestrogene 2-Hydroxyestron und 4-Hydroxyestron. Das antiestrogen wirksame 2-Hydroxyestron scheint eine gewisse Schutzwirkung hinsichtlich der Entstehung von Brustkrebs zu besitzen (H. L. Bradlow *et al.*, 1996).

In der vorliegenden Arbeit wurden anhand von *in vitro*-Experimenten einige Inhibitoren der EDH-Aktivität der h17 $\beta$ -HSD 4 identifiziert. Die Inhibition dieser Enzymaktivität könnte mit einer Erhaltung des Estradiolniveaus, gefolgt von einem weiteren Abbau dieser Komponente zu Estriol und 16-Hydroxyestradiol, verbunden sein. Diese Abbauprodukte werden jedoch mit der Entstehung hormonregulierter Krebsarten assoziiert. Somit scheint eine Hemmung des Estradiolabbaupfades weniger wünschenswert. Ob eine Inhibition der 17 $\beta$ -HSD 4 tatsächlich mit einer starken Veränderung des Hormongleichgewichtes verbunden ist, bleibt an dieser Stelle jedoch noch unklar.

#### 6.1.5.2 Hemmung der humanen 17 $\beta$ -HSD 5

Der h17 $\beta$ -HSD 5 wird eine wichtige Rolle bei der „vor-Ort-Synthese“ von Androgen in der Prostata zugeschrieben. Diese Testosteronsynthese gewinnt vor allem deshalb an Bedeutung, weil es sich bei der Prostata um ein extrem hormonsensitives Gewebe handelt, dessen Wachstum, Proliferation und damit auch Krebsentwicklung stark mit hoher Androgenkonzentration korreliert (F. Labrie *et al.*, 1997).

Die homeostatische Balance des Prostatagewebes ist das Resultat des Zusammenwirkens stimulatorischer Faktoren, wie 5 $\alpha$ -DHT, zusammen mit verschiedenen Wachstumsfaktoren, und dem wachstumshemmenden Einfluss entsprechender Faktoren (K. Griffiths *et al.*, 1997; L. J. Denis & K. Griffiths, 2000).

Zu den häufigsten Erkrankungen der Prostata zählen die bösartige Prostataproliferation (benigne Prostataproliferation; BPH) und der Prostatakrebs. Als charakteristische Eigenschaft dieser Krankheiten gilt deren starke Empfindlichkeit gegenüber Androgenentzug (F. Labrie *et al.*, 1997). Bereits in den 40er Jahren wurde als Therapie bei den erwähnten Krankheitsbildern der Entzug testikulärer Androgene durch medikamentöse oder chirurgische Kastration angewandt (C. Huggins & C. V. Hodges, 1941). Um zusätzlich die intrakrine Androgenwirkung auszuschalten, werden heutzutage Kombinationstherapien angewandt, bei denen die Kastration bzw. für jüngere Patienten besser geeignet, ein 5 $\alpha$ -Reduktaseinhibitor mit Antiandrogeneinsatz (z. B. Flutamid, Cyproteronacetat) kombiniert wird. Ziel dieser Kombinationstherapien ist eine maximale Androgenblockade (R. Montironi *et al.*, 1999; L. J. Denis & K. Griffiths, 2000).

Zusammenfassend muss festgestellt werden, dass ein Stoff, der die lokale Androgenkonzentration in der Prostata reduziert und gleichzeitig antiandrogen wirksam ist, einer starken Proliferation der Prostata vorbeugt und damit eine Krebsentwicklung oder Entstehung von BPH entgegenwirken könnte.

Ein Zusammenhang zwischen Diät und Prostatakrebhäufigkeit konnte anhand zahlreicher epidemiologischer Studien gezeigt werden. In Abhängigkeit von der Ernährung konnten unterschiedliche Mengen an Phytoestrogenen im Prostatasekret festgestellt werden. Dabei war deren Konzentration negativ mit dem Prostatakrebsrisiko der entsprechenden Population korreliert (M. S. Morton *et al.*, 1997). In Studien an histologischen Kulturen induzierte die Sojakomponente Genistein einen Wachstumsrückgang von BHP- und Prostatakrebsgeweben (J. Geller *et al.*, 1998). Erhöhte Apoptoseraten wurden auch bei in Ratten und Mäusen implantierten Prostatakrebsgeweben als Folge des Konsumierens von phytoestrogenreichem Sojafuttermittel gefunden (H. Adlercreutz, 1998). Des Weiteren zeigten epidemiologische Studien ebenfalls eine Schutzwirkung der auf Soja basierenden, Phytoestrogene beinhaltenden Diäten. Die Wahrscheinlichkeit an latenten, kleinen oder nicht infiltrierenden Prostatakarzinomen zu erkranken, ist in Japan und der westlichen Welt etwa gleich groß. Aber die daraus resultierende Sterblichkeitsrate ist in Japan, wo eine mehr auf Soja basierende Diät konsumiert wird, bedeutend geringer (N. Breslow *et al.*, 1977; R. Yatani *et al.*, 1982). Ein Einfluss auf die lokale Androgenkonzentration über die Inaktivierung der in der Prostata exprimierten 17 $\beta$ -HSD 5 könnte hierfür eine mögliche Ursache sein.

In der vorliegenden Arbeit konnten die Diätkomponenten Cumestrol, Zearalenon, Quercetin und Biochanin A als stärkste Inhibitoren der 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivität von Typ 5 identifiziert werden. Innerhalb der Gruppe der Flavonoide zeigten identisch substituierte Flavone eine stärkere Hemmwirkung auf die Testosteronsynthese als entsprechende Isoflavone (Apigenin versus Genistein). Auf der anderen Seite werden Flavone und Flavanone als stärker androgen als die Isoflavone beschrieben (R. S. Zand *et al.*, 2000). Eine Methylierung von am Flavonoidgrundgerüst befindlichen Hydroxygruppen ist einerseits mit einer reduzierten androgenen Wirksamkeit (R. S. Zand *et al.*, 2000), andererseits mit einer zunehmenden Hemmung der durch die 17 $\beta$ -HSD 5 katalysierten Testosteronsynthese verbunden (Genisteins versus Biochanin A).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die in der Lakritze zu findende 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure eine stark inhibierende Wirkung auf die Testosteronsyntheseaktivität der humanen 17 $\beta$ -HSD 5 aufweist, wogegen deren Oxidationsfähigkeit durch diese Substanz unberührt bleibt. Diese spezifische Wirkung hätte demnach eine Reduktion der lokalen Testosteronkonzentration zur Folge. Interessanterweise konnte erst kürzlich bei Männern, welche täglich etwa 7 g einer kommerziellen Lakritzpräparation (0,5 g 18 $\beta$ -Glycyrrhetin-

säure) zu sich nahmen, eine stark reduzierte Testosteronkonzentration im Serum gemessen werden (D. Armanini *et al.*, 1999). Es wurde beobachtet, dass durch Lakritzkonsum die Aktivität der 11 $\beta$ -HSD- (B. R. Walker *et al.*, 1995), 17, 20-Lyase- und der 17 $\beta$ -HSD-Aktivität inhibiert wird (D. Armanini *et al.*, 1999). Eine reduzierte 17 $\beta$ -HSD-Aktivität bedeutet hier vermutlich zum einen die Hemmung von Typ 3 im Testis (Beeinflussung der endokrinen Testosteronsynthese), resultierend in der reduzierten Testosteronkonzentration im Serum und zum anderen der Reduktion der intrakrinen Androgensynthese in der Prostata, bedingt durch die Hemmung von Typ 5. Eine verringerte Konzentration dieses Androgens im männlichen Körper ist mit einer reduzierten Libido oder anderen sexuellen Dysfunktionen assoziiert (D. Armanini *et al.*, 1999), hat aber hinsichtlich der Proliferation des Prostatagewebes einen protektiven Effekt.

Die 17 $\beta$ -HSD 5 ist auch in einigen weiblichen Hormonzielgeweben, darunter dem Brustgewebe exprimiert (G. Pelletier *et al.*, 1999; T. M. Penning *et al.*, 2000). Durch die Reduktion von Androstendion zu Testosteron synthetisiert dieses Enzym das Substrat der Aromatase, welche lokal das wirksame Estradiol bilden kann (T. M. Penning *et al.*, 2000). Zu einem geringen Anteil ist die 17 $\beta$ -HSD Typ 5 auch selbst in der Lage dieses Estrogen aus dem inaktiven Estron zu synthetisieren (I. Dufort *et al.*, 1999). Da eine erhöhte lokale Estradiolkonzentration mit verstärktem Brustkrebsrisiko assoziiert wird, könnte auch hier die Inhibition der h17 $\beta$ -HSD 5 ein möglicher Ansatz bei der Verhinderung der Entstehung oder Entwicklung dieser Krebsart darstellen.

### **6.1.6 Bedeutung der Phytoestrogene für das humane Hormonsystem**

Obwohl die 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen 1 - 4 einzelne, mehr oder minder spezifische Inhibitoren besitzen, scheinen bestimmte strukturelle Eigenschaften eines Phytohormons sowohl für die Beeinflussung der katalytischen Aktivitäten dieser 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen, als auch für die Bindung an Hormonrezeptoren von Bedeutung zu sein. Die Ursache für die Existenz von generell für die Wechselwirkung benötigten Struktureigenschaften könnte die Tatsache sein, dass die Substanzen in allen Fällen die Position des Steroidhormons einnehmen. Andererseits bleibt zu berücksichtigen, dass es Umweltkomponenten gibt, die sowohl Synthese als auch Abbau von Hormonen gleichermaßen beeinflussen. Wie sich der lokale Hormonstatus in Gegenwart eines Phytoestrogens verändert, hängt damit von der Enzymausstattung des jeweiligen Gewebes,

den Affinitäten des Stoffes zu den entsprechenden Enzymen ab und ist in der Regel schwer vorhersagbar, da über diese Wechselwirkungen noch wenig bekannt ist.

Bei diesen Betrachtungen bleibt des Weiteren zu berücksichtigen, dass die lokale Hormonkonzentration bei der Entstehung hormonregulierter Krebsarten nur einen neben zahlreichen anderen Faktoren (Mutationen in Proto-Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Ungleichgewicht verschiedener Wachstumsfaktoren usw.) darstellt.

Für zahlreiche Phytoestrogene konnten bereits weitere, in die Krebsentstehung und -entwicklung eingreifende, nicht über den Hormonrezeptor vermittelte Eigenschaften bestimmt werden. Diese Effekte beinhalten antioxidative Eigenschaften (A. Arora *et al.*, 1998), antiproliferative Aktivität, Inhibition der Angiogenese (T. Fotsis *et al.*, 1993), Inhibition der Tyrosinkinase, Proteinkinase C sowie der Topoisomerase (Übersichtsartikel: L. Strauss *et al.*, 1998).

Das in Zwiebeln und roten Äpfeln vertretene Flavon Quercetin wurde in der vorliegenden Arbeit als einer der stärksten Testosteronsyntheseinhibitoren identifiziert. Für dieses Flavonoid konnten verschiedene protektive Effekte (Übersichtsartikel: D. W. Lamson & M. S. Brignall, 2000) hinsichtlich der Krebsentwicklung beschrieben werden. So regulierte es in Brustkrebszelllinien ein mutiertes p53-Protein bis zu einer nicht mehr detektierbaren Konzentration herab (M. A. Avila *et al.*, 1994). Mutationen im p53-Gen gelten als häufige Ursache für die Entstehung menschlicher Tumoren (J. M. Nigro *et al.*, 1989). Auch eine Inhibition der Thyrosinkinaseaktivität mittels Quercetin wurde bereits beschrieben (D. W. Lamson & M. S. Brignall, 2000).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass zahlreiche Vertreter der Phytoestrogene einen protektiven Einfluss auf die Entstehung und Entwicklung von verschiedenen Krebsarten besitzen. Die Substanzen greifen in vielen Ebenen der Kontrollmechanismen von Differenzierung und Wachstum der Gewebe ein. Vermutlich ist das Zusammenspiel aller Eigenschaften der Phytoestrogene, darunter u. a. die untersuchte Beeinflussung des Steroidhormonsystems, für deren positive Effekte auf die Reduktion des Krebsrisikos ursächlich.

## 6.2 Humane 17 $\beta$ -HSD 7

### 6.2.1 Primärstruktur des Enzyms

Die zu 78 % bzw. 74 % mit den Aminosäuresequenzen der Ratte und Maus identische Primärstruktur des humanen Enzyms zeigte alle für die SCAD charakteristischen konservierten Motive (B. Persson *et al.*, 1991). Es konnten Cofaktorbindungsstelle, aktives Zentrum und NAG-Motiv lokalisiert werden.

Eine Analyse mit der PROSITE-Datenbank weist auf mehrere mögliche posttranslationale Modifikationsmöglichkeiten hin: 4 potentielle N-Glykosilylierungsstellen (Aminosäurepositionen 37, 178, 229 und 263), 5 Proteinkinase C-Phosphorylierungsstellen (Aminosäurepositionen 110, 170, 173, 195 und 299) und 5 Caseinkinase II-Phosphorylierungspositionen. Fünf Tyrosinreste (Positionen 88, 193, 198, 217 und 232) werden als potentielle Phosphorylierungsstellen vorgeschlagen, jedoch konnte keinem ein für Tyrosinkinase spezifisches, passendes Erkennungsmotiv zugeordnet werden.

Eine Hydrophobizitätsanalyse der Proteinsequenz machte deutlich, dass dieses Enzym entweder eine Transmembrandomäne oder zumindest einen membranassoziierten Bereich besitzt (Abb. 5.16: hellblau gekennzeichnet). Eine entsprechende Region wurde ebenfalls für das Prolaktinrezeptor assoziierte Protein der Ratte rPRAP (W. R. Duan *et al.*, 1996) und das murine Enzym (P. Nokelainen *et al.*, 1998) beschrieben.

Die Signaltransduktion des langen Prolaktinrezeptors verläuft über das JAK2/Stat5-System. Die durch die kurze Rezeptorform vermittelte Signalkaskade ist jedoch noch unklar (F. Gouilleux *et al.*, 1994). Duan und Mitarbeiter (W. R. Duan *et al.*, 1996) konnten in rPRAP, wie auch in der vorliegenden Arbeit mit der humanen 17 $\beta$ -HSD 7, mittels PROSITE-Datenbank kein Tyrosin, welches als mögliche Phosphorylierungsstelle angegeben wurde, einem Tyrosinkinaseerkennungsmotiv zuordnen. Dennoch postulierten sie eine mögliche Bindung für JAK2 und damit eine Einflussnahme des rPRAP auf die Aktivität anderer JAK2-Ziele. Durch die Bindung dieser Tyrosinkinase an das rPRAP sollte die Konzentration an freiem Enzym reduziert werden (W. R. Duan *et al.*, 1996).

Bei Aminosäuresequenzvergleich mit allen bisher bekannten h17 $\beta$ -HSDs zeigte Typ 7 einen insertierten Proteinbereich von 28 Aminosäuren (Abb. 5.14: orange gekennzeichnet). Anhand der für SCAD-Domänen bekannten 3D-Struktur wurde ermittelt, dass diese zusätzliche Aminosäureregion als dem als membranassoziiert beschriebenen Proteinbereich benachbart liegt. Dieses Strukturmerkmal wurde zunächst mit der für das orthologe Enzym der Ratte

beschriebenen Prolaktinrezeptorbindung (T. G. Parmer *et al.*, 1992; W. R. Duan *et al.*, 1996; W. R. Duan *et al.*, 1997) in Zusammenhang gebracht.

### 6.2.2 Phylogenetische Studien

Unter Verwendung der Primärsequenz des humanen Enzyms wurden phylogenetische Analysen durchgeführt (A. Krazeisen *et al.*, 1999; R. Breitling *et al.*, 2001). Dabei konnten drei Transmembranproteine von Hefen als nächste Verwandte der h17 $\beta$ -HSD 7 identifiziert werden (A. Krazeisen *et al.*, 1999; R. Breitling *et al.*, 2001). Sequenzvergleiche des humanen Enzyms mit den erwähnten Hefeproteinen zeigten deutlich übereinstimmende Charakteristika: ein vor dem NAG-Motiv eingeschobenes, 28 Aminosäuren großes Peptid sowie eine im C-Terminus gelegene hydrophobe Domäne. Anhand des Vergleichs von 3D-Strukturen anderer SCAD-Proteine wurde angenommen, dass dieser zusätzliche Proteinteil eine dem als Transmembrandomäne beschriebenen Bereich benachbarte Proteinschleife formen würde (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Die evolutionäre Konservierung und die räumliche Anordnung dieses Elements lässt auf eine Wechselwirkung mit anderen Membranproteinen schließen (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Im Falle der 17 $\beta$ -HSD 7 wurde dafür zunächst die kurze Form des Prolaktinrezeptors postuliert (A. Krazeisen *et al.*, 1999), da bereits für das Orthologe der Ratte eine Wechselwirkung mit diesem Rezeptor beschrieben worden war (W. R. Duan *et al.*, 1996).

Als eines der h17 $\beta$ -HSD 7 nahestehenden Hefeproteine wurde das als 3-Ketosteroidreduktase charakterisierte Protein ERG27 beschrieben (R. Breitling *et al.*, 2001). Dieses Enzym katalysiert einen der finalen Syntheseschritte des Ergosterols (D. Gachotte *et al.*, 1999), einer dem menschlichen Cholesterin entsprechenden Komponente.

Für *Drosophila* und *C. elegans* konnten im gesamten Genom keine Homologen der 17 $\beta$ -HSD 7 gefunden werden (R. Breitling *et al.*, 2001). Beide Spezies sind hinsichtlich Cholesterin auxotroph, d. h. nicht in der Lage diesen Stoff selbst zu synthetisieren. Diese Beobachtungen deuten damit auf eine Beteiligung der h17 $\beta$ -HSD 7 in der Cholesterinsynthese hin (R. Breitling *et al.*, 2001).

### 6.2.3 Sekundär- und Tertiärstruktur

Unter Verwendung der für die 17 $\beta$ -HSD 1 bekannten Daten hinsichtlich der Sekundär- und Tertiärstruktur, gesammelt in Kristallisationsstudien, wurde kürzlich ein Modell der humanen



17 $\beta$ -HSD 7 entwickelt (R. Breitling *et al.*, 2001). In dieser räumlichen Struktur konnten auch die für die SCAD-Familie charakteristischen Sekundärstrukturen (H. Jornvall *et al.*, 1995; Übersichtsartikel: T. M. Penning *et al.*, 1997) zugeordnet werden.

Das Enzym besitzt das für SCAD-Proteine charakteristische, aus sieben  $\beta$ -Faltblättern aufgebaute Motiv, welches jeweils beidseitig von 3 $\alpha$ -Helices umgeben ist (R. Breitling *et al.*, 2001). Anhand des 3D-Modells wurde jedoch deutlich, dass die hydrophobe Domäne des Enzyms, welche ursprünglich als potentielle Transmembranregion beschrieben worden war, ein Teil dieser konservierten SCAD-Sekundärstruktur ist (R. Breitling *et al.*, 2001). Seine Position im Bezug auf das Restmolekül machen das Vorliegen einer Transmembranhelix unwahrscheinlich. Eine periphere Assoziation der h17 $\beta$ -HSD 7 über diesen hydrophoben Bereich bleibt jedoch weiterhin sehr wahrscheinlich. Das räumliche Modell des Enzyms gab auch weitere Einsichten im Bezug auf die Bedeutung des im Vergleich mit anderen HSD-Mitgliedern nur bei Typ 7 eingeschobenen Proteinbereichs von 28 Aminosäuren. Im 3D-Modell befindet sich diese Proteinschleife an der Enzymoberfläche in unmittelbarer Nähe zur Substratbindungsregion und dem möglicherweise membranassoziierten Bereich (R. Breitling *et al.*, 2001). Dieses Proteinelement scheint eine Bindungstasche aufzubauen, welche sich in Richtung der membranassoziierten Region und damit zur Membran hin öffnet und vermutlich Membrankomponenten als Substrat aufnehmen kann (R. Breitling *et al.*, 2001).

#### 6.2.4 Gewebeverteilung des Enzyms

Die Expression des zunächst als PRAP in der Ratte beschriebenen Enzyms im Westernblot zeigte lediglich für die großen Lutealzellen des *Corpus luteum* ein deutliches Signal. Das 32 kDa-Protein konnte in Leber, Skelettmuskel, Herz, Niere, Pankreas, Lunge und Thymus nicht detektiert werden (T. G. Parmer *et al.*, 1992). Auch ein später durchgeführter Northernblot lieferte für das Enzym der Ratte keine andere Expression (W. R. Duan *et al.*, 1997).

Die Expression des murinen Enzyms wurde durch Nokelainen und Mitarbeiter mittels RT-PCR durchgeführt (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Diese Methode war sensitiv genug, um auch geringere Konzentrationen an mRNA und damit eine Expression des Proteins in einer größeren Anzahl von Geweben nachzuweisen (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Es wurden beispielsweise schwache Signale in Ovarien nicht schwangerer Tiere, Brustdrüse, Leber, Niere und Testis detektiert. Aufgrund der dominanten Expression der murinen 17 $\beta$ -HSD 7 im

*Corpus luteum* schwangerer Mäuse in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft wurde ihr eine bedeutende Rolle bei der lokalen Estradiolsynthese, ursächlich für das Aufrechterhalten dieser Follikel und eine entsprechende Bedeutung für den Fortbestand der Schwangerschaft zugeschrieben (P. Nokelainen *et al.*, 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Gewebeverteilung der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 mittels RT-PCR untersucht. Ein ebenfalls in der Arbeitsgruppe durchgeführter *in silico*-Northernblot (A. Krazeisen *et al.*, 1999) lieferte ergänzende Daten. Durch die Kombination der Ergebnisse wurde ein detailliertes Expressionsmuster ermittelt.

Für den *in silico*-Northernblot wurden humane EST-Datenbanken mit der cDNA des menschlichen Enzyms durchsucht (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Die Ergebnisse dieser Analyse entsprechen weitgehend den durch die RT-PCR ermittelten Mustern. Die Expression des Proteins konnte für Brustgewebe, Uterus und Plazenta bestätigt werden (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Für Ovar bzw. *Corpus luteum*, dem Gewebe, das bei Nagern als der bedeutendste Expressionsort angegeben wurde, konnte jedoch kein EST gefunden werden (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Dabei ist jedoch zu berücksichtigen, dass das Vorhandensein von ESTs bestimmter Gewebe durch die Verfügbarkeit der Organe für das Erstellen entsprechender Datenbanken begrenzt ist. An dieser Stelle wurde jedoch die Expression der h17 $\beta$ -HSD 7 im humanen Ovar nicht schwangerer Frauen durch RT-PCR bestätigt. Es zeigte sich auch eine Expression in Prostata und Testis. Der *in silico*-Northernblot ergab weiterhin ein Vorkommen des humanen Enzyms in germinalen B-Zellen und Thymus, nicht dagegen in peripheren Leukozyten, sodass eine mögliche Beteiligung des Enzyms an der Hematopoese postuliert wurde (A. Krazeisen *et al.*, 1999).

Eine hohe Anzahl von ESTs, sowie ein starkes Signal in der PCR konnte in wichtigen Orten der Cholesterinsynthese, d. h. in Leber und Gehirn, festgestellt werden (A. Krazeisen *et al.*, 1999; R. Breitling *et al.*, 2001). Diese Expressionsorte finden sich auch für das murine Enzym (P. Nokelainen *et al.*, 1998). Darüber hinaus konnten mittels Northernblot in zahlreichen neuralen Geweben wie Retina, neuronalen Präkursoren, sowie in Gehirn und Glioblastoma eine Expression ermittelt werden (A. Krazeisen *et al.*, 1999). In sich entwickelndem Gehirn (V. V. Reddy, 1979; V. V. Reddy *et al.*, 1980), sowie in der Retina (L. Starka & J. Obenberger, 1975) war bereits 17 $\beta$ -HSD-Aktivität, ohne Klärung der Identität des 17 $\beta$ -HSD-Typs, beschrieben worden. Bei Gehirntumoren von Frauen wurde gezeigt, dass die Symptome in Abhängigkeit von der Phase des Menstruationszyklus oder im Falle einer Schwangerschaft variieren (N. C. Roelvink *et al.*, 1987). Veränderte Estradiolkonzentrationen wurden in Gehirntumoren mit einem Fortschreiten der Glioblastomawachstums assoziiert

(E. von Schoultz *et al.*, 1990; R. J. Plunkett *et al.*, 1999). Welcher Mechanismus oder welche Rolle die humane 17 $\beta$ -HSD 7 bei der Entwicklung entsprechender Tumore spielt, bleibt jedoch noch ungeklärt.

### 6.2.5 Funktionen des Enzyms

Die murine 17 $\beta$ -HSD 7 wurde für die während der Schwangerschaft in den *Corpora lutea* ablaufende Estradiolsynthese verantwortlich gemacht (H. Peltoketo *et al.*, 1988; H. Peltoketo *et al.*, 1999b).

In der vorliegenden Arbeit konnte für die humane 17 $\beta$ -HSD 7 *in vitro* eine entsprechende Estradiolsyntheseaktivität nachgewiesen werden. Somit scheint auch im Menschen eine Beteiligung an der Synthese des aktiven Estrogens in Ovar, Plazenta, sowie den entsprechenden Hormonzielgeweben wie Brust, Prostata und Gehirn denkbar. Die 17 $\beta$ -Dehydrogenaseaktivität des aufgereinigten GST-Fusionsproteins erwies sich jedoch im Vergleich zu denen anderer aufgereinigter 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen (siehe Typ 4 und 5) als relativ gering. Ob das Enzym im Zuge der Aufarbeitung einen Verlust an Aktivität erleidet, der N-terminale GST-Proteinanteil störend wirkt, eine hohe Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  (damit eine geringere Affinität des Enzyms zum Substrat) oder der Verlust der Membranassoziation für diese Beobachtung ursächlich war, wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Auf eine weitere Aufgabe der h17 $\beta$ -HSD 7 *in vivo* deutet die Expression in Nicht-hormonzielgeweben hin. Besonders das Auftreten in Leber, der Ort der Estradiol-inaktivierung (M. V. Mustonen *et al.*, 1998) unterstützt die Hypothese, dass das Enzym noch ein weiteres, bisher unbeschriebenes Substrat umsetzt. Dabei handelt es sich vermutlich einen Cholesterinvorläufer (R. Breitling *et al.*, 2001).

In dieser Arbeit wurde ein etwa 1,2 kb großer, 5'-untranslatierter Sequenzbereich in 5'-Richtung vom ATG der für h17 $\beta$ -HSD 7 kodierenden Region auf Bindungsstellen bekannter Transkriptionsfaktoren untersucht (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Dabei konnten einige lymphoid- und gehirnspezifische Transkriptionsfaktorbindungsstellen, jedoch keine steroidhormonresponsiven Elemente (HRE) festgestellt werden. Auch hieraus ist auf eine über die Estradiolsynthese hinausgehende Aktivität zu schließen. Gerade das Fehlen von HREs bedarf einer weiteren Interpretation, da das homologe Enzym der Ratte durch Estradiol hochreguliert werden konnte (T. G. Parmer *et al.*, 1992). Unter Umständen wird die

Expression der 17 $\beta$ -HSD 7 indirekt reguliert, oder hormonresponsive Elemente finden sich noch weiter stromaufwärts im 5'-untranslatierten Bereich als bisher untersucht.

Für die Beteiligung der humanen 17 $\beta$ -HSD 7 am Cholesterinstoffwechsel wird folgender Mechanismus vorgeschlagen (R. Breitling *et al.*, 2001): Das an die Membran assoziierte Protein bildet über die an der Enzymoberfläche befindliche Proteinschleife und die Substratbindungsstelle eine der Membran zugewandte Substrattasche. Über diese Tasche wird ein Substrat, welches möglicherweise Membranbestandteil ist, angenommen. Um welches Edukt es sich dabei handelt, bleibt noch unklar. Als ursprüngliches Substrat der 17 $\beta$ -HSD 7 wurde Zymosteron (oder das C 24-gesättigte Analogon) vermutet (R. Breitling *et al.*, 2001), welches wiederum als mögliches Substrat des homologen Enzyms ERG27 diskutiert wird (D. Gachotte *et al.*, 1999). Die Cholesterinsynthese gilt als alter, konservierter Syntheseweg, welcher mit der Ergosterolsynthese der Hefen in zahlreichen Punkten übereinstimmt.

Das inzwischen als 17 $\beta$ -HSD 7 benannte Enzym wurde ursprünglich als Prolaktinrezeptor assoziiertes Protein (PRAP) entdeckt (T. G. Parmer *et al.*, 1992), welches mit dem zytosolischen Teil der kurzen Form des Prolaktinrezeptors interagiert (W. R. Duan *et al.*, 1996).

Prolaktin ist ein 23 kDa-großes Peptidhormon (N. E. Cooke *et al.*, 1981), welches durch Bindung an einen membranständigen Cytokinrezeptor Signale ins Zellinnere vermittelt. Über die durch dieses Hormon ausgelöste Signalkaskade werden zahlreiche Körperfunktionen reguliert (Übersichtsartikel: C. Bole-Feysot *et al.*, 1998). Dazu gehören Einflüsse im Wasser- und Elektrolythaushalt, Wachstums- und Entwicklungsvorgänge, Endokrinologie, Gehirnfunktionen und Verhalten, Reproduktion und Immunregulationen. Als Beispiel für die Einflussnahme von Prolaktin auf die Reproduktion sollen kurz einige Aktivitäten im Ovar angesprochen werden. Das Hormon besitzt eine luteotrope Aktivität (M. Cecim *et al.*, 1995), darunter die Stimulation der Progesteronsynthese in den Lutealzellen (S. Matsuyama *et al.*, 1990). In den Granulosazellen wird die Estrogensynthese durch dieses Hormon inhibiert (C. Wang *et al.*, 1980; C. Wang & V. Chan, 1982; J. E. Fortune *et al.*, 1986).

Zunächst wurde angenommen, dass der innerhalb aller humanen 17 $\beta$ -HSDs nur in Typ 7 eingefügte 28 Aminosäuren umfassende Proteinbereich mit dem kurzen Prolaktinrezeptor interagiert. Diese Vorstellung musste jedoch aufgrund der Ergebnisse der phylogenetischen Studien sowie eines entwickelten 3D-Modells für das Protein (R. Breitling *et al.*, 2001), wie in Kapitel 6.2.3 beschrieben, revidiert werden. Somit bleibt an dieser Stelle unklar, ob und über welche Bereiche die 17 $\beta$ -HSD 7 mit dem Prolaktinrezeptor interagiert. Hinsichtlich der kontaktierenden Aufgabenfelder wäre eine Kommunikation von PRL und Estradiol in den

Geweben gemeinsamer Expression von 17 $\beta$ -HSD 7 und der kurzen Form des Prolaktinrezeptors denkbar. Aufgabe und Mechanismus dieses möglichen Zusammenwirkens bedürfen noch weiterer Untersuchungen.

### 6.2.6 Chromosomale Lokalisation – Implikationen für die Pathologie

In der vorliegenden Arbeit konnte das humane *HSD17B7* Gen dem Chromosombereich 10p11.2 zugeordnet werden, einem Bereich hoher genetischer Plastizität (M. S. Jackson *et al.*, 1999; E. E. Eichler *et al.*, 1997). In diesem chromosomalen Bereich wurden Hyperlipidämie (P. Pajukanta *et al.*, 1999), Fettsucht (J. Hager *et al.*, 1998) und Diabetes mellitus Typ 1 (P. Reed *et al.*, 1997) lokalisiert. In der multiformen Glioblastomzelllinie IN 1434 ist Chromosom 10 im Bereich 10p11-12.2 durch eine Translokation mit Chromosom 15 und dem X-Chromosom gespalten (X. Mao *et al.*, 1999). Ob und inwieweit h17 $\beta$ -HSD 7 in der Entstehung dieser Krankheitsbilder involviert ist, bleibt noch unklar.

Im Zuge der Erstellung des *in silico*-Northernblots, das heißt der EST-Datenbankrecherche für die humane h17 $\beta$ -HSD 7, wurde ein EST aus einem Glioblastom gefunden, welcher sich vom *HSD17B7* Gen abgeleitete, aber eine 24 bp große Deletion zeigte (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Die Deletion entspricht einer Verkürzung der cDNA resultierend in einem Verlust von 8 Aminosäuren im zentralen Bereich der oberflächlich angeordneten, spezifisch in 17 $\beta$ -HSD 7 zu findenden Proteinschleife (A. Krazeisen *et al.*, 1999). Da als mögliche Aufgabe dieses Proteinelements die Aufnahme des Substrates in eine spezielle „katalytische Tasche“ postuliert worden war (R. Breitling *et al.*, 2001), könnte eine Verkürzung dieses Proteinabschnittes direkt die Aktivität des Enzyms beeinflussen.

### 6.3 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit zum Thema „Einfluss von Phytoestrogenen auf die Aktivität von 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasen“ wurden einzelne Substratspezifitäten und -umsetzungen der beiden humanen Enzyme 17 $\beta$ -HSD 4 und 5 in einem *in vitro*-System auf Effekte, bedingt durch die Gegenwart von Pflanzenhormonen, untersucht. Für beide Enzymtypen konnten zum ersten Mal hemmende Einflüsse einzelner Steroidanaloga festgestellt werden. Stärkste Inhibitoren der EDH-Aktivität von h17 $\beta$ -HSD 4 waren Quercetin und 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure. Beide untersuchten 17 $\beta$ -HSD-Aktivitäten von Typ 5 wurden durch Zearalenon, Cumestrol und Biochanin A inhibiert. Andere Arbeitsgruppen hatten als stärkste Hemmstoffe der 17 $\beta$ -HSD 1 und 2 Cumestrol bzw. Kaempferol beschrieben. Somit wird anhand all dieser Studien deutlich, dass sich diese vier 17 $\beta$ -Hydroxysteroiddehydrogenasetypen in ihrer Beeinflussbarkeit durch Phytoestrogene unterscheiden.

Durch den Vergleich der Inhibitionsstärke verschieden substituierter Flavone konnte in der vorliegenden Arbeit der Hydroxylierung in Position 7 des Flavongrundgerüsts eine entscheidende Rolle bei der Hemmung aller von Typ 4 und 5 katalysierten und im Rahmen der Arbeit untersuchten Umsetzungen zugeschrieben werden. Des Weiteren konnte bei allen Messungen eine Zunahme der Hemmwirkung mit Erhöhung des Hydroxylierungsgrades und damit des hydrophilen Charakters des Flavons beobachtet werden. Im Falle von Typ 5 wurde postuliert, dass ein inhibierendes Flavon über die Hydroxygruppe in Position 7 am aktiven Zentrum fixiert wird.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals der 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure, Inhaltsstoff der Lakritze, eine spezielle Rolle bei der Hemmung der h17 $\beta$ -HSD 5 zugewiesen werden. Die Säure hatte sich unter reduzierenden Reaktionsbedingungen als starker Inhibitor und unter oxidierenden Bedingungen als nicht hemmend dargestellt. Die Substanz inhibierte damit spezifisch die durch das Enzym katalysierte Testosteronsynthese, wie sie für die Prostata postuliert wurde. Andere Arbeitsgruppen hatten bereits als Folge von Lakritzkonsum eine durch Hemmung der 17 $\beta$ -HSD 3-Aktivität reduzierte Testosteronsynthese im Testis beschrieben. Die Kombination mit früheren Untersuchungen und den in dieser Arbeit erzielten Resultaten legt nahe, dass die 18 $\beta$ -Glycyrrhetinsäure nicht nur die endokrine, sondern auch die intrakrine Androgenwirkung reduziert. Damit kann diese Lakritzkomponente als ein möglicher Kandidat für die Therapie von androgenregulierten Krebsarten, im Speziellen von Prostatakrebs, betrachtet werden.

---

Daneben konnte eine weitere  $17\beta$ -HSD im Menschen, die h $17\beta$ -HSD 7, isoliert, kloniert und charakterisiert werden. Dieses Enzym ist ein Orthologes der in Nagern bekannten m $17\beta$ -HSD 7 und rPRAP und zeigt alle für die SCAD-Familie charakteristischen Motive. Interessanterweise ist das aus 9 Exons bestehende *HSD17B7* Gen auf Chromosom 10p11.2 lokalisiert, einem Bereich, in dem auch Kandidatengene für Hyperlipidämie, Fettsucht und Diabetes mellitus Typ 1 zu finden sind.

Mit Hilfe der Aminosäuresequenz in Kombination mit in der Arbeitsgruppe durchgeführten, phylogenetischen Studien sowie einem 3D-Modell konnten Einblicke in mögliche Funktionen einzelner Proteinbereiche sowie des gesamten Enzyms gewonnen werden. Eine erwartete Estradiolsyntheseaktivität der h $17\beta$ -HSD 7, analog dem murinen Orthologen, konnte in dieser Arbeit bestätigt werden. Für eine der postulierten membranassoziierten Region benachbarte Proteinschleife wurde eine Aufgabe bei der Substratbindung postuliert. Überraschend ist die nahe Verwandtschaft mit dem ergosterolsynthetisierenden Enzym ERG27. Dies deutete erstmals eine weitere Funktion des Enzyms an, möglicherweise in der Cholesterinsynthese. Unterstützt wird diese Vermutung auch durch die in der vorliegenden Arbeit durchgeführte RT-PCR sowie den Ergebnissen eines ebenfalls in der Arbeitsgruppe durchgeführten *in silico*-Northernblots. Durch diese Methoden konnte eine Expression des Enzyms in Ovar, Brustdrüse, Testis, aber auch in Leber, dem Ort des Estradiolabbaus und der Cholesterinsynthese, nachgewiesen werden.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

- Adamski, J., Husen, B., Marks, F. and Jungblut, P.W. (1992). Purification and properties of oestradiol 17 beta-dehydrogenase extracted from cytoplasmic vesicles of porcine endometrial cells. *Biochem J* 288, 375-81.
- Adamski, J., Normand, T., Leenders, F., Monte, D., Begue, A., Stehelin, D., Jungblut, P.W. and de Launoit, Y. (1995). Molecular cloning of a novel widely expressed human 80 kDa 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *Biochem J* 311, 437-43.
- Adamski, J. and Jakob, F. (2001). A guide to 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenases. *Mol Cell Endocrinol* 171/1-2, 1-4.
- Adlercreutz, H., Markkanen, H. and Watanabe, S. (1993). Plasma concentrations of phyto-oestrogens in Japanese men. *Lancet* 342, 1209-10.
- Adlercreutz, H. (1998). Epidemiology of phytoestrogens. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 605-23.
- Akinola, L.A., Poutanen, M., Vihko, R. and Vihko, P. (1997). Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats. *Endocrinology* 138, 2886-92.
- Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, H., Watanabe, S., Itoh, N., Shibuya, M. and Fukami, Y. (1987). Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *J Biol Chem* 262, 5592-5.
- Andersson, S., Geissler, W.M., Patel, S. and Wu, L. (1995). The molecular biology of androgenic 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases. *J Steroid Biochem Mol Biol* 53, 37-9.
- Armanini, D., Bonanni, G. and Palermo, M. (1999). Reduction of serum testosterone in men by licorice. *N Engl J Med* 341, 1158.
- Arora, A., Nair, M.G. and Strasburg, G.M. (1998). Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system. *Arch Biochem Biophys* 356, 133-41.
- Avila, M.A., Velasco, J.A., Cansado, J. and Notario, V. (1994). Quercetin mediates the down-regulation of mutant p53 in the human breast cancer cell line MDA-MB468. *Cancer Res* 54, 2424-8.
- Axelsson, M., Sjoval, J., Gustafsson, B.E. and Setchell, K.D. (1984). Soya-a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 102, 49-56.
- Barnes, S., Grubbs, C., Setchell, K.D. and Carlson, J. (1990). Soybeans inhibit mammary tumors in models of breast cancer. *Prog Clin Biol Res* 347, 239-53.
- Beato, M. and Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update* 6, 225-36.
- Bennett, M.J., Albert, R.H., Jez, J.M., Ma, H., Penning, T.M. and Lewis, M. (1997). Steroid recognition and regulation of hormone action: crystal structure of testosterone and NADP<sup>+</sup> bound to 3 alpha-hydroxysteroid/dihydrodiol dehydrogenase. *Structure* 5, 799-812.



- Bennetts, H.W., Underwood, E.J. and Shier, F.L. (1946). A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. J. Agric. Res.* 22, 131-138.
- Bernstein, L. and Ross, R.K. (1993). Endogenous hormones and breast cancer risk. *Epidemiol Rev* 15, 48-65.
- Billheimer, J.T., Strehl, L.L., Davis, G.L., Strauss, J.F.d. and Davis, L.G. (1990). Characterization of a cDNA encoding rat sterol carrier protein2. *DNA Cell Biol* 9, 159-65.
- Bingham, S.A., Atkinson, C., Liggins, J., Bluck, L. and Coward, A. (1998). Phyto-oestrogens: where are we now? *Br J Nutr* 79, 393-406.
- Biswas, M.G. and Russell, D.W. (1997). Expression cloning and characterization of oxidative 17 $\beta$ - and 3 $\alpha$ -hydroxysteroid dehydrogenases from rat and human prostate. *J Biol Chem* 272, 15959-66.
- Blondeau, J.P. and Baulieu, E.E. (1984). Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem J* 219, 785-92.
- Bohren, K.M., Bullock, B., Wermuth, B. and Gabbay, K.H. (1989). The aldo-keto reductase superfamily. cDNAs and deduced amino acid sequences of human aldehyde and aldose reductases. *J Biol Chem* 264, 9547-51.
- Bole-Feysot, C., Goffin, V., Edery, M., Binart, N. and Kelly, P.A. (1998). Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19, 225-68.
- Bradlow, H.L., Telang, N.T., Sepkovic, D.W. and Osborne, M.P. (1996). 2-hydroxyestrone: the 'good' estrogen. *J Endocrinol* 150, S259-65.
- Brann, D.W., Hendry, L.B. and Mahesh, V.B. (1995). Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52, 113-33.
- Breitling, R., Krazeisen, A., Möller, G. and Adamski, J. (2001). 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 7 - an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis. *Mol Cell Endocrinol* 171/1-2, 199-204.
- Brereton, P. et al. (2001). Pan1b (17 $\beta$ HSD11)-enzymatic activity and distribution in the lung. *Mol Cell Endocrinol* 171, 111-117.
- Breslow, N., Chan, C. and Dhom, G. (1977). Latent carcinoma of prostate at autopsy in seven areas. *Int J Cancer* 20, 680-688.
- Casey, M.L., MacDonald, P.C. and Andersson, S. (1994). 17  $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase type 2: chromosomal assignment and progestin regulation of gene expression in human endometrium. *J Clin Invest* 94, 2135-41.
- Cassidy, A. (1999). Potential tissue selectivity of dietary phytoestrogens and estrogens. *Curr Opin Lipidol* 10, 47-52.

- Cecim, M., Kerr, J. and Bartke, A. (1995). Infertility in transgenic mice overexpressing the bovine growth hormone gene: luteal failure secondary to prolactin deficiency. *Biol Reprod* 52, 1162-6.
- Chen, L.Y., Watanabe, K. and Hayaishi, O. (1992). Purification and characterization of prostaglandin F synthase from bovine liver. *Arch Biochem Biophys* 296, 17-26.
- Cooke, N.E., Coit, D., Shine, J., Baxter, J.D. and Martial, J.A. (1981). Human prolactin. cDNA structural analysis and evolutionary comparisons. *J Biol Chem* 256, 4007-16.
- Coward, L., Barnes, N.C., Setchell, K.D.R. and Barnes, S. (1993). Genistein and daidzein, and their  $\beta$ -glycoside conjugates: anti-tumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *J. Agric. Food Chem.* 41, 1961-1967.
- de Launoit, Y. and Adamski, J. (1999). Unique multifunctional HSD17B4 gene product: 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase 4 and D-3-hydroxyacyl-coenzyme A dehydrogenase/hydratase involved in Zellweger syndrome. *J Mol Endocrinol* 22, 227-40.
- Denis, L.J. and Griffiths, K. (2000). Endocrine treatment in prostate cancer. *Semin Surg Oncol* 18, 52-74.
- Dieuaide-Noubhani, M. et al. (1996). Further characterization of the peroxisomal 3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenases from rat liver. Relationship between the different dehydrogenases and evidence that fatty acids and the C27 bile acids di- and tri-hydroxycoprostanic acids are metabolized by separate multifunctional proteins [published erratum appears in Eur J Biochem 1997 Jan 15;243(1-2):537]. *Eur J Biochem* 240, 660-6.
- Dieuaide-Noubhani, M., Asselberghs, S., Mannaerts, G.P. and Van Veldhoven, P.P. (1997a). Evidence that multifunctional protein 2, and not multifunctional protein 1, is involved in the peroxisomal beta-oxidation of pristanic acid. *Biochem J* 325, 367-73.
- Dieuaide-Noubhani, M., Novikov, D., Vandekerckhove, J., Veldhoven, P.P. and Mannaerts, G.P. (1997b). Identification and characterization of the 2-enoyl-CoA hydratases involved in peroxisomal beta-oxidation in rat liver. *Biochem J* 321, 253-9.
- Duan, W.R., Linzer, D.I.H. and Gibori, G. (1996). Cloning and characterization of an ovarian-specific protein that associates with the short form of the prolactin receptor. *J Biol Chem* 271, 15602-7.
- Duan, W.R., Parmer, T.G., Albarracin, C.T., Zhong, L. and Gibori, G. (1997). PRAP, a prolactin receptor associated protein: its gene expression and regulation in the *Corpus luteum*. *Endocrinology* 138, 3216-21.
- Dufort, I., Rheault, P., Huang, X.F., Soucy, P. and Luu-The, V. (1999). Characteristics of a highly labile human type 5 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocrinology* 140, 568-74.
- Dumont, M., Luu-The, V., de Launoit, Y. and Labrie, F. (1992). Expression of human 17  $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in mammalian cells. *J Steroid Biochem Mol Biol* 41, 605-8.

- Eichler, E.E., Budarf, M.L., Rocchi, M., Deaven, L.L., Doggett, N.A., Baldini, A., Nelson, D.L. and Mohrenweiser, H.W. (1997). Interchromosomal duplications of the adrenoleukodystrophy locus: a phenomenon of pericentromeric plasticity. *Hum Mol Genet* 6, 991-1002.
- El-Alfy, M., Luu-The, V., Huang, X.F., Berger, L., Labrie, F. and Pelletier, G. (1999). Localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and androgen receptor in the human prostate by in situ hybridization and immunocytochemistry. *Endocrinology* 140, 1481-91.
- El-Kabbani, O., Wilson, D.K., Petrash, M. and Quiocho, F.A. (1998). Structural features of the aldose reductase and aldehyde reductase inhibitor-binding sites. *Mol Vis* 4, 19.
- Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Grandien, K., Lagercrantz, S., Lagercrantz, J., Fried, G., Nordenskjöld, M. and Gustafsson, J.A. (1997). Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-65.
- Flanders, W.D. (1984). Review: prostate cancer epidemiology. *Prostate* 5, 621-9.
- Fomitcheva, J., Baker, M.E., Anderson, E., Lee, G.Y. and Aziz, N. (1998). Characterization of Ke 6, a new 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and its expression in gonadal tissues. *J Biol Chem* 273, 22664-71.
- Fortune, J.E., Wissler, R.N. and Vincent, S.E. (1986). Prolactin modulates steroidogenesis by rat granulosa cells: II. Effects on estradiol. *Biol Reprod* 35, 92-9.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., Fleischmann, G., Hase, T., Montesano, R. and Schweigerer, L. (1993). Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 2690-4.
- Fournet-Dulguerov, N., MacLusky, N.J., Leranthe, C.Z., Todd, R., Mendelson, C.R., Simpson, E.R. and Naftolin, F. (1987). Immunohistochemical localization of aromatase cytochrome P-450 and estradiol dehydrogenase in the syncytiotrophoblast of the human placenta. *J Clin Endocrinol Metab* 65, 757-64.
- Fransen, M., Terlecky, S.R. and Subramani, S. (1998). Identification of a human PTS1 receptor docking protein directly required for peroxisomal protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 8087-92.
- Gachotte, D., Sen, S.E., Eckstein, J., Barbuch, R., Krieger, M., Ray, B.D. and Bard, M. (1999). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* ERG27 gene encoding the 3-keto reductase involved in C-4 sterol demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 12655-60.
- Gavaler, J.S., Rosenblum, E.R., Deal, S.R. and Bowie, B.T. (1995). The phytoestrogen congeners of alcoholic beverages: current status. *Proc Soc Exp Biol Med* 208, 98-102.
- Geissler, W.M. et al. (1994). Male pseudohermaphroditism caused by mutations of testicular 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3. *Nat Genet* 7, 34-9.

- Geller, J., Sionit, L., Partido, C., Li, L., Tan, X., Youngkin, T., Nachtsheim, D. and Hoffman, R.M. (1998). Genistein inhibits the growth of human-patient BPH and prostate cancer in histoculture. *Prostate* 34, 75-9.
- Ghersevich, S., Nokelainen, P., Poutanen, M., Orava, M., Autio-Harmainen, H., Rajaniemi, H. and Vihko, R. (1994). Rat 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1: primary structure and regulation of enzyme expression in rat ovary by diethylstilbestrol and gonadotropins in vivo. *Endocrinology* 135, 1477-87.
- Gouilleux, F., Wakao, H., Mundt, M. and Groner, B. (1994). Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription. *Embo J* 13, 4361-9.
- Griffiths, K., Morton, M.S. and Nicholson, R.I. (1997). Androgens, androgen receptors, antiandrogens and the treatment of prostate cancer. *Eur Urol* 32 Suppl 3, 24-40.
- Gueux, N. and Peitsch, M.C. (1997). SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-23.
- Gyapay, G. et al. (1996). A radiation hybrid map of the human genome. *Hum Mol Genet* 5, 339-46.
- Hager, J. et al. (1998). A genome-wide scan for human obesity genes reveals a major susceptibility locus on chromosome 10. *Nat Genet* 20, 304-8.
- Harborne, J. (1971). Distribution of flavonoids in leguminosae. In: *Harborne JB, Boulter D, Turner BL, Eds. Chemotaxonomy of the Leguminosae. London: Academic Press*, 31-71.
- He, X.Y., Merz, G., Mehta, P., Schulz, H. and Yang, S.Y. (1999). Human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase is a single-domain multifunctional enzyme. Characterization of a novel 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Biol Chem* 274, 15014-9.
- He, X.Y., Merz, G., Yang, Y.Z., Pullakart, R., Mehta, P., Schulz, H. and Yang, S.Y. (2000). Function of human brain short chain L-3-hydroxyacyl coenzyme A dehydrogenase in androgen metabolism. *Biochim Biophys Acta* 1484, 267-77.
- Hirayama, T. (1979). Epidemiology of prostate cancer with special reference to the role of diet. *Natl Cancer Inst Monogr*, 149-55.
- Hohls, E. (1991). Über die Beteiligung von intrazellulär gebildeten Metaboliten des Estradiols an einer nicht-genomischen Wirkung. *Ph.D.Thesis* Schriftenreihe 10, Max-Planck-Institut für experimentelle Endokrinologie, Hannover.
- Huggins, C. and Hodges, C.V. (1941). Studies of prostatic cancer. I. Effect of castration, estrogen and androgen injections on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res* 1, 293-297.
- Jackson, M.S. et al. (1999). Sequences flanking the centromere of human chromosome 10 are a complex patchwork of arm-specific sequences, stable duplications and unstable sequences with homologies to telomeric and other centromeric locations. *Hum Mol Genet* 8, 205-15.
- Jacobs, H.S. (2000). Hormone replacement therapy and breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 7, 53-61.

- Jez, J.M., Bennett, M.J., Schlegel, B.P., Lewis, M. and Penning, T.M. (1997a). Comparative anatomy of the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem J* 326, 625-36.
- Jez, J.M., Flynn, T.G. and Penning, T.M. (1997b). A new nomenclature for the aldo-keto reductase superfamily. *Biochem Pharmacol* 54, 639-47.
- Jez, J.M. and Penning, T.M. (2001). The aldo-keto reductase (AKR) superfamily: an update. *Chem Biol Interact* in press.
- Jiang, L.L., Kurosawa, T., Sato, M., Suzuki, Y. and Hashimoto, T. (1997a). Physiological role of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *J Biochem (Tokyo)* 121, 506-13.
- Jiang, L.L., Miyazawa, S., Souri, M. and Hashimoto, T. (1997b). Structure of D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein. *J Biochem (Tokyo)* 121, 364-9.
- Joannou, G.E., Kelly, G.E., Reeder, A.Y., Waring, M. and Nelson, C. (1995). A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol* 54, 167-84.
- Jornvall, H., Persson, B., Krook, M., Atrian, S., Gonzalez-Duarte, R., Jeffery, J. and Ghosh, D. (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry* 34, 6003-13.
- Kaufmann, M., Carstensen, J., Husen, B. and Adamski, J. (1995). The tissue distribution of porcine 17 beta-estradiol dehydrogenase and its induction by progesterone. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 535-9.
- Khanna, M., Qin, K.N., Wang, R.W. and Cheng, K.C. (1995). Substrate specificity, gene structure, and tissue-specific distribution of multiple human 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenases. *J Biol Chem* 270, 20162-8.
- Kikuti, Y.Y. et al. (1997). Physical mapping 220 kb centromeric of the human MHC and DNA sequence analysis of the 43-kb segment including the RING1, HKE6, and HKE4 genes. *Genomics* 42, 422-35.
- Knuckles, B.E., deFremery, D. and Kohler, G.O. (1976). Cumestrol content of fractions obtained during wet processing of alfalfa. *J Agric Food Chem* 24, 1177-80.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Imai, K., Fritz, S., Moller, G. and Adamski, J. (1999). Determination of cDNA, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7(1). *FEBS Lett* 460, 373-9.
- Krazeisen, A., Breitling, R., Möller, G. and Adamski, J. (2001). Phytoestrogens inhibit human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 5. *Mol Cell Endocrinol* 171/1-2, 151-162.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 5925-30.

- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1997). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138, 863-70.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B. and Gustafsson, J.A. (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* 139, 4252-63.
- Kurzer, M.S. and Xu, X. (1997). Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr* 17, 353-81.
- Labrie, F., Dupont, A. and Belanger, A. (1985a). Complete androgen blockade for the treatment of prostate cancer. *Important Adv Oncol*, 193-217.
- Labrie, F., Dupont, A., Belanger, A., Giguere, M., Lacoursiere, Y., Emond, J., Monfette, G. and Bergeron, V. (1985b). Combination therapy with flutamide and castration (LHRH agonist or orchiectomy) in advanced prostate cancer: a marked improvement in response and survival. *J Steroid Biochem* 23, 833-41.
- Labrie, F. (1991). Intracrinology. *Mol Cell Endocrinol* 78, C113-8.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Labrie, C., Simard, J., Breton, R. and Belanger, A. (1997). The key role of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in sex steroid biology. *Steroids* 62, 148-58.
- Labrie, F., Luu-The, V., Lin, S.X., Simard, J., Labrie, C., El-Alfy, M., Pelletier, G. and Belanger, A. (2000). Intracrinology: role of the family of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenases in human physiology and disease. *J Mol Endocrinol* 25, 1-16.
- Lamson, D.W. and Brignall, M.S. (2000). Antioxidants and cancer, part 3: quercetin. *Altern Med Rev* 5, 196-208.
- Lapcik, O., Hill, M., Hampl, R., Wahala, K. and Adlercreutz, H. (1998). Identification of isoflavonoids in beer. *Steroids* 63, 14-20.
- Le Bail, J.C., Laroche, T., Marre-Fournier, F. and Habrioux, G. (1998a). Aromatase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase inhibition by flavonoids. *Cancer Lett* 133, 101-6.
- Le Bail, J.C., Varnat, F., Nicolas, J.C. and Habrioux, G. (1998b). Estrogenic and antiproliferative activities on MCF-7 human breast cancer cells by flavonoids. *Cancer Lett* 130, 209-16.
- Leenders, F., Adamski, J., Husen, B., Thole, H.H. and Jungblut, P.W. (1994a). Molecular cloning and amino acid sequence of the porcine 17 beta-estradiol dehydrogenase. *Eur J Biochem* 222, 221-7.
- Leenders, F., Husen, B., Thole, H.H. and Adamski, J. (1994b). The sequence of porcine 80 kDa 17 beta-estradiol dehydrogenase reveals similarities to the short chain alcohol dehydrogenase family, to actin binding motifs and to sterol carrier protein 2. *Mol Cell Endocrinol* 104, 127-31.
- Leenders, F., Tesdorpf, J.G., Markus, M., Engel, T., Seedorf, U. and Adamski, J. (1996). Porcine 80 kDa protein reveals intrinsic 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase, fatty acyl-CoA-hydratase/dehydrogenase, and sterol transfer activities. *J Biol Chem* 271, 5438-42.

- Li, K.X., Smith, R.E. and Krozowski, Z.S. (1998). Cloning and expression of a novel tissue specific 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase. *Endocr Res* 24, 663-7.
- Lin, H.K., Jez, J.M., Schlegel, B.P., Peehl, D.M., Pachter, J.A. and Penning, T.M. (1997). Expression and characterization of recombinant type 2 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD) from human prostate: demonstration of bifunctional 3 alpha/17 beta-HSD activity and cellular distribution. *Mol Endocrinol* 11, 1971-84.
- Lin, S.X., Yang, F., Jin, J.Z., Breton, R., Zhu, D.W., Luu-The, V. and Labrie, F. (1992). Subunit identity of the dimeric 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase from human placenta. *J Biol Chem* 267, 16182-7.
- Mäkelä, S., Davis, V.L., Tally, W.C., Korkman, J., Salo, L., Vihko, R., Santti, R. and Korach, K.S. (1994). Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect* 102, 572-8.
- Mäkelä, S., Poutanen, M., Lehtimäki, J., Kostian, M.L., Santti, R. and Vihko, R. (1995a). Estrogen-specific 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase type 1 (E.C. 1.1.1.62) as a possible target for the action of phytoestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 208, 51-9.
- Mäkelä, S., Santti, R., Salo, L. and McLachlan, J.A. (1995b). Phytoestrogens are partial estrogen agonists in the adult male mouse. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 123-7.
- Mäkelä, S., Poutanen, M., Kostian, M.L., Lehtimäki, N., Strauss, L., Santti, R. and Vihko, R. (1998). Inhibition of 17beta-hydroxysteroid oxidoreductase by flavonoids in breast and prostate cancer cells. *Proc Soc Exp Biol Med* 217, 310-6.
- Mao, X. et al. (1999). Genetic aberrations in glioblastoma multiforme: translocation of chromosome 10 in an O-2A-like cell line. *Br J Cancer* 79, 724-31.
- Markus, M., Husen, B., Leenders, F., Jungblut, P.W., Hall, P.F. and Adamski, J. (1995). The organelles containing porcine 17 beta-estradiol dehydrogenase are peroxisomes. *Eur J Cell Biol* 68, 263-7.
- Martucci, C.P. and Fishman, J. (1993). P450 enzymes of estrogen metabolism. *Pharmacol Ther* 57, 237-57.
- Maschler, I., Ball, P., Bayerkohler, G., Gaus, J. and Knuppen, R. (1983). Identification of 6 alpha- and 7 alpha-hydroxyestrone as major metabolites of estrone and estradiol in porcine uterus. *Steroids* 41, 597-607.
- Matsuyama, S., Shiota, K. and Takahashi, M. (1990). Possible role of transforming growth factor-beta as a mediator of luteotropic action of prolactin in rat luteal cell cultures. *Endocrinology* 127, 1561-7.
- Mazur, W. (1998). Phytoestrogen content in foods. *Baillieres Clin Endocrinol Metab* 12, 729-42.
- Mendonca, B.B., Arnhold, I.J., Bloise, W., Andersson, S., Russell, D.W. and Wilson, J.D. (1999). 17Beta-hydroxysteroid dehydrogenase 3 deficiency in women. *J Clin Endocrinol Metab* 84, 802-4.

- Miettinen, M.M., Mustonen, M.V., Poutanen, M.H., Isomaa, V.V. and Vihko, R.K. (1996). Human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2 isoenzymes have opposite activities in cultured cells and characteristic cell- and tissue-specific expression. *Biochem J* 314, 839-45.
- Miksicek, R.J. (1995). Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. *Proc Soc Exp Biol Med* 208, 44-50.
- Moghrabi, N., Head, J.R. and Andersson, S. (1997). Cell type-specific expression of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 in human placenta and fetal liver. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 3872-8.
- Möller, G. et al. (1999). Characterization of the HSD17B4 gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 441-6.
- Möller, G., van Grunsven, E.G., Wanders, R.J. and Adamski, J. (2001). Molecular basis of D-bifunctional protein deficiency. *Mol Cell Endocrinol* 171/1-2, 61-70.
- Montironi, R., Mazzucchelli, R., Marshall, J.R. and Bartels, P.H. (1999). Prostate cancer prevention: review of target populations, pathological biomarkers, and chemopreventive agents. *J Clin Pathol* 52, 793-803.
- Morton, M.S. et al. (1997). Lignans and isoflavonoids in plasma and prostatic fluid in men: samples from Portugal, Hong Kong, and the United Kingdom. *Prostate* 32, 122-8.
- Murphy, P.A. (1982). Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technol.* 34, 60-64.
- Mustonen, M.V., Isomaa, V.V., Vaskivuo, T., Tapanainen, J., Poutanen, M.H., Stenback, F., Vihko, R.K. and Vihko, P.T. (1998). Human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2 messenger ribonucleic acid expression and localization in term placenta and in endometrium during the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 83, 1319-24.
- Nigro, J.M. et al. (1989). Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. *Nature* 342, 705-8.
- Nokelainen, P., Puranen, T., Peltoketo, H., Orava, M., Vihko, P. and Vihko, R. (1996). Molecular cloning of mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and characterization of enzyme activity. *Eur J Biochem* 236, 482-90.
- Nokelainen, P., Peltoketo, H., Vihko, R. and Vihko, P. (1998). Expression cloning of a novel estrogenic mouse 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase (m17HSD7), previously described as a prolactin receptor-associated protein (PRAP) in rat. *Mol Endocrinol* 12, 1048-59.
- Nokelainen, P., Peltoketo, H., Mustonen, M. and Vihko, P. (2000). Expression of mouse 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase/17-ketosteroid reductase type 7 in the ovary, uterus, and placenta: localization from implantation to late pregnancy. *Endocrinology* 141, 772-8.
- Oettel, M. and Schillinger, E. (1999). Physiology and mechanism of action of estrogens and antiestrogens. *Handbook of experimental Pharmacology* 135/I, 243-271.



- Pajukanta, P. et al. (1999). Genomewide scan for familial combined hyperlipidemia genes in finnish families, suggesting multiple susceptibility loci influencing triglyceride, cholesterol, and apolipoprotein B levels. *Am J Hum Genet* 64, 1453-63.
- Pappas, T.C., Gametchu, B. and Watson, C.S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* 9, 404-10.
- Parmer, T.G., McLean, M.P., Duan, W.R., Nelson, S.E., Albarracin, C.T., Khan, I. and Gibori, G. (1992). Hormonal and immunological characterization of the 32 kilodalton ovarian-specific protein. *Endocrinology* 131, 2213-21.
- Pelletier, G., Luu-The, V., Tetu, B. and Labrie, F. (1999). Immunocytochemical localization of type 5 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in human reproductive tissues. *J Histochem Cytochem* 47, 731-8.
- Peltoketo, H., Isomaa, V., Maentausta, O. and Vihko, R. (1988). Complete amino acid sequence of human placental 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase deduced from cDNA. *FEBS Lett* 239, 73-7.
- Peltoketo, H., Luu-The, V., Simard, J. and Adamski, J. (1999a). 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase (HSD)/17-ketosteroid reductase (KSR) family; nomenclature and main characteristics of the 17HSD/KSR enzymes. *J Mol Endocrinol* 23, 1-11.
- Peltoketo, H., Nokelainen, P., Piao, Y.S., Vihko, R. and Vihko, P. (1999b). Two 17beta-hydroxysteroid dehydrogenases (17HSDs) of estradiol biosynthesis: 17HSD type 1 and type 7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 431-9.
- Penning, T.M. (1997). Molecular endocrinology of hydroxysteroid dehydrogenases. *Endocr Rev* 18, 281-305.
- Penning, T.M., Bennett, M.J., Smith-Hoog, S., Schlegel, B.P., Jez, J.M. and Lewis, M. (1997). Structure and function of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Steroids* 62, 101-11.
- Penning, T.M. (1999). Molecular determinants of steroid recognition and catalysis in aldo-keto reductases. Lessons from 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 69, 211-25.
- Penning, T.M. et al. (2000). Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J* 351, 67-77.
- Persson, B., Krook, M. and Jornvall, H. (1991). Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur J Biochem* 200, 537-43.
- Pfeifer, S.M., Furth, E.E., Ohba, T., Chang, Y.J., Rennert, H., Sakuragi, N., Billheimer, J.T. and Strauss, J.F.d. (1993). Sterol carrier protein 2: a role in steroid hormone synthesis? *J Steroid Biochem Mol Biol* 47, 167-72.

- Plunkett, R.J., Lis, A., Barone, T.A., Fronckowiak, M.D. and Greenberg, S.J. (1999). Hormonal effects on glioblastoma multiforme in the nude rat model. *J Neurosurg* 90, 1072-7.
- Polkowski, K. and Mazurek, A.P. (2000). Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm* 57, 135-55.
- Qin, K.N., New, M.I. and Cheng, K.C. (1993). Molecular cloning of multiple cDNAs encoding human enzymes structurally related to 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *J Steroid Biochem Mol Biol* 46, 673-9.
- Reddy, V.V. (1979). Estrogen metabolism in neural tissues of rabbits: 17 beta - hydroxysteroid oxidoreductase activity. *Steroids* 34, 207-15.
- Reddy, V.V., Rajan, R. and Daly, M.J. (1980). Estrogen metabolism in neural tissues of six-day-old rats. *Brain Res* 197, 443-52.
- Reed, P. et al. (1997). Evidence for a type 1 diabetes susceptibility locus (IDDM10) on human chromosome 10p11-q11. *Hum Mol Genet* 6, 1011-6.
- Roelvink, N.C., Kamphorst, W., van Alphen, H.A. and Rao, B.R. (1987). Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol* 44, 209-15.
- Rosenblum, E.R., Campbell, I.M., Van Thiel, D. H. and Gavaler, J.S. (1992). Isolation and identification of phytoestrogens from beer. *Alcohol Clin Exp Res* 16, 843-5.
- Rossmann, M.G., Moras, D. and Olsen, K.W. (1974). Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. *Nature* 250, 194-9.
- Safe, S.H. (1998). Interactions between hormones and chemicals in breast cancer. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 38, 121-58.
- Santen, R.J. and Harvey, H.A. (1999). Use of aromatase inhibitors in breast carcinoma. *Endocr Relat Cancer* 6, 75-92.
- Sawetawan, C., Milewich, L., Word, R.A., Carr, B.R. and Rainey, W.E. (1994). Compartmentalization of type I 17 beta-hydroxysteroid oxidoreductase in the human ovary. *Mol Cell Endocrinol* 99, 161-8.
- Schagger, H. and von Jagow, G. (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368-79.
- Schlegel, B.P., Jez, J.M. and Penning, T.M. (1998). Mutagenesis of 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase reveals a "push-pull" mechanism for proton transfer in aldo-keto reductases. *Biochemistry* 37, 3538-48.
- Seedorf, U. and Assmann, G. (1991). Cloning, expression, and nucleotide sequence of rat liver sterol carrier protein 2 cDNAs. *J Biol Chem* 266, 630-6.
- Seedorf, U., Scheek, S., Engel, T., Steif, C., Hinz, H.J. and Assmann, G. (1994). Structure-activity studies of human sterol carrier protein 2. *J Biol Chem* 269, 2613-8.

- Seedorf, U., Engel, T., Assmann, G., Leenders, F. and Adamski, J. (1995). Intrinsic sterol- and phosphatidylcholine transfer activities of 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type IV. *J Steroid Biochem Mol Biol* 55, 549-53.
- Setchell, K.D., Borriello, S.P., Hulme, P., Kirk, D.N. and Axelson, M. (1984). Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *Am J Clin Nutr* 40, 569-78.
- Setchell, K.D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. and Heubi, J.E. (1997). Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula. *Lancet* 350, 23-7.
- Setchell, K.D. (2000). Absorption and metabolism of soy isoflavones-from food to dietary supplements and adults to infants. *J Nutr* 130, 654S-5S.
- Shemesh, M., Lindner, H.R. and Ayalon, N. (1972). Affinity of rabbit uterine oestradiol receptor for phyto-oestrogens and its use in a competitive protein-binding radioassay for plasma Cumestrol. *J Reprod Fertil* 29, 1-9.
- Shimizu, H., Ross, R.K., Bernstein, L., Yatani, R., Henderson, B.E. and Mack, T.M. (1991). Cancers of the prostate and breast among Japanese and white immigrants in Los Angeles County. *Br J Cancer* 63, 963-6.
- Shutt, D.A. and Cox, R.I. (1972). Steroid and phyto-oestrogen binding to sheep uterine receptors in vitro. *J Endocrinol* 52, 299-310.
- Starka, L. and Obenberger, J. (1975). In vitro estrone-estradiol-17beta interconversion in the cornea, lens, iris and retina of the rabbit eye. *Albrecht Von Graefes Arch Klin Exp Ophthalmol* 196, 199-204.
- Stewart, E.A. et al. (1997). An STS-based radiation hybrid map of the human genome. *Genome Res* 7, 422-33.
- Stolz, A., Takikawa, H., Sugiyama, Y., Kuhlenkamp, J. and Kaplowitz, N. (1987). 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity of the Y' bile acid binders in rat liver cytosol. Identification, kinetics, and physiologic significance. *J Clin Invest* 79, 427-34.
- Strauss, L., Santti, R., Saarinen, N., Streng, T., Joshi, S. and Makela, S. (1998). Dietary phytoestrogens and their role in hormonally dependent disease. *Toxicol Lett* 102-103, 349-54.
- Su, J., Lin, M. and Napoli, J.L. (1999). Complementary deoxyribonucleic acid cloning and enzymatic characterization of a novel 17beta/3alpha-hydroxysteroid/retinoid short chain dehydrogenase/reductase. *Endocrinology* 140, 5275-84.
- Suzuki, Y. et al. (1997). D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase/D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein deficiency: a newly identified peroxisomal disorder. *Am J Hum Genet* 61, 1153-62.
- Suzuki-Yamamoto, T., Nishizawa, M., Fukui, M., Okuda-Ashitaka, E., Nakajima, T., Ito, S. and Watanabe, K. (1999). cDNA cloning, expression and characterization of human prostaglandin F synthase. *FEBS Lett* 462, 335-40.

- Takikawa, H., Stolz, A., Kuroki, S. and Kaplowitz, N. (1990). Oxidation and reduction of bile acid precursors by rat hepatic 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase and inhibition by bile acids and indomethacin. *Biochim Biophys Acta* 1043, 153-6.
- Taya, K. and Greenwald, G.S. (1981). In vivo and in vitro ovarian steroidogenesis in the pregnant rat. *Biol Reprod* 25, 683-91.
- Thomas, J.A. (1999). Diet, micronutrients, and the prostate gland. *Nutr Rev* 57, 95-103.
- Toniolo, P.G., Levitz, M., Zeleniuch-Jacquotte, A., Banerjee, S., Koenig, K.L., Shore, R.E., Strax, P. and Pasternack, B.S. (1995). A prospective study of endogenous estrogens and breast cancer in postmenopausal women [see comments]. *J Natl Cancer Inst* 87, 190-7.
- Towle, A.C. and Sze, P.Y. (1983). Steroid binding to synaptic plasma membrane: differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem* 18, 135-43.
- Tremblay, Y., Ringler, G.E., Morel, Y., Mohandas, T.K., Labrie, F., Strauss, J.F.d. and Miller, W.L. (1989). Regulation of the gene for estrogenic 17-ketosteroid reductase lying on chromosome 17cen-q25. *J Biol Chem* 264, 20458-62.
- Tuohimaa, P. et al. (1996). Mechanisms of action of sex steroid hormones: basic concepts and clinical correlations. *Maturitas* 23, S3-12.
- van Grunsven, E.G. et al. (1998). Peroxisomal D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency: resolution of the enzyme defect and its molecular basis in bifunctional protein deficiency. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 2128-33.
- van Grunsven, E.G., van Berkel, E., Denis, S., Mooijer, P.A. and Wanders, R.J. (1999a). D-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase deficiency. Identification of a new peroxisomal disorder with implications for other disorders of beta-oxidation. *Adv Exp Med Biol* 466, 365-9.
- van Grunsven, E.G. et al. (1999b). Peroxisomal bifunctional protein deficiency revisited: resolution of its true enzymatic and molecular basis. *Am J Hum Genet* 64, 99-107.
- Van Veldhoven, P.P. (1998). New insights in peroxisomal beta-oxidation. Implications for human peroxisomal disorders. *Verh K Acad Geneesk Belg* 60, 195-214.
- Van Veldhoven, P.P. and Mannaerts, G.P. (1999). Role and organization of peroxisomal beta-oxidation. *Adv Exp Med Biol* 466, 261-72.
- Verdeal, K. and Ryan, D. (1979). Naturally occurring estrogens in plant foodstuffs - A review. *J Food Protection* 42, 557-583.
- Verdeal, K., Brown, R.R., Richardson, T. and Ryan, D.S. (1980). Affinity of phytoestrogens for estradiol-binding proteins and effect of Cumestrol on growth of 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* 64, 285-90.
- von Schoultz, E., Bixo, M., Backstrom, T., Silfvenius, H., Wilking, N. and Henriksson, R. (1990). Sex steroids in human brain tumors and breast cancer. *Cancer* 65, 949-52.

- Walker, B.R., Aggarwal, I., Stewart, P.M., Padfield, P.L. and Edwards, C.R. (1995). Endogenous inhibitors of 11 beta-hydroxysteroid dehydrogenase in hypertension. *J Clin Endocrinol Metab* 80, 529-33.
- Walter, E.D. (1941). Genistin (an isoflavone glucoside) and its aglucone, genistein, from soybeans. *J Am. Oil Chem. Soc.* 63, 3273-3276.
- Walz, E. (1931). Isoflavon- und saponin-glucoside in Soja-Hispida. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 489, 118-155.
- Wang, C., Hsueh, A.J. and Erickson, G.F. (1980). Prolactin inhibition of estrogen production by cultured rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 20, 135-44.
- Wang, C. and Chan, V. (1982). Divergent effects of prolactin on estrogen and progesterone production by granulosa cells of rat Graafian follicles. *Endocrinology* 110, 1085-93.
- Watanabe, K., Yoshida, R., Shimizu, T. and Hayaishi, O. (1985). Enzymatic formation of prostaglandin F<sub>2</sub> alpha from prostaglandin H<sub>2</sub> and D<sub>2</sub>. Purification and properties of prostaglandin F synthetase from bovine lung. *J Biol Chem* 260, 7035-41.
- Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* 59, 365-93.
- Wu, L., Einstein, M., Geissler, W.M., Chan, H.K., Elliston, K.O. and Andersson, S. (1993). Expression cloning and characterization of human 17 beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 2, a microsomal enzyme possessing 20 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase activity. *J Biol Chem* 268, 12964-9.
- Xu, L., Glass, C.K. and Rosenfeld, M.G. (1999). Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev* 9, 140-7.
- Yan, S.D. et al. (1997). An intracellular protein that binds amyloid-beta peptide and mediates neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Nature* 389, 689-95.
- Yatani, R., Chigusa, I., Akazaki, K., Stemmermann, G.N., Welsh, R.A. and Correa, P. (1982). Geographic pathology of latent prostatic carcinoma. *Int J Cancer* 29, 611-6.
- Zand, R.S., Jenkins, D.J. and Diamandis, E.P. (2000). Steroid hormone activity of flavonoids and related compounds. *Breast Cancer Res Treat* 62, 35-49.
- Zeleniuch-Jacquotte, A., Toniolo, P., Levitz, M., Shore, R.E., Koenig, K.L., Banerjee, S., Strax, P. and Pasternack, B.S. (1995). Endogenous estrogens and risk of breast cancer by estrogen receptor status: a prospective study in postmenopausal women. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 4, 857-60.

## 8 EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN

### Veröffentlichungen

- Möller G., Leenders F., van Grunsven E. G., Dolez V., Qualmann B., Kessels M. M., Markus M., Krazeisen A., Husen B., Wanders R. J., de Lanoit Y., Adamski J. (1999) Characterization of the *HSD17B4* gene: D-specific multifunctional protein 2/17beta-hydroxysteroid dehydrogenase IV, *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 69(1-6), 441-6
- Krazeisen A., Breitling R., Imai K., Fritz S., Möller G., Adamski J. (1999) Determination, gene structure and chromosomal localization of the novel human 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 7, *FEBS Letters* 460(2), 373-9
- Krazeisen A., Breitling R., Möller G., Adamski J. (2001) Phytoestrogens inhibit human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5, *Molecular and Cellular Endocrinology* 171(1-2), 151-162
- Breitling R., Krazeisen A., Möller G., Adamski J. (2001) 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 7 – an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis, *Molecular and Cellular Endocrinology* 171(1-2), 199-204

### Vorträge

- Krazeisen A., Möller G., Adamski J., 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type IV is inhibited by phytoestrogens, Secotox 99, Fifth European Conference on Ecotoxicology and Environmental Safety, GSF - National Research Center Neuherberg/München, Deutschland, 15-17. März 1999
- Krazeisen A., Breitling R., Möller G., Adamski J., Phytoestrogens inhibit human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase type 5, international workshop: recent progress in research on 17β-hydroxysteroid dehydrogenases: impact on medicine, Schloss Elmau, Deutschland, 4-8. April 2000

### Posterpräsentationen

- Krazeisen A., Möller G., Adamski J., Human 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 4 is inhibited by phytoestrogens, Meeting of the Endocrine Society, San Diego, USA, 12-15. Juni 1999
- Breitling R., Krazeisen A., Möller G., Adamski J., 17β-hydroxysteroid dehydrogenase 7 – an ancient 3-ketosteroid reductase of cholesterologenesis, International workshop: recent progress in research on 17β-hydroxysteroid dehydrogenases: impact on medicine, Schloss Elmau, Deutschland, 4-8. April 2000

### GenBank-Einträge

- h17β-HSD 7: mRNA, komplette cDNA: AF098786
- h17β-HSD 7 genomisch: Exon 1-9: AF162759-162767

## 9 ANHANG

### 9.1 Sequenzierung des genomischen Klon von h17 $\beta$ -HSD 7

Nr. **	Position in cDNA *	Sequenz
19782	- 5 (ATG) for	5'-CGA AGA TGC GAA AGG TGG-3'
19783	12 (ATG) rev	5'-CCA CCT TTC GCA TCT TCG-3'
19784	1000 for	5'-CCA GGC TCA GTG GCT CAT GC-3'
19785	1018 rev	5'-GCA TGA GCC ACT GAG CCT GG-3'
19786	1372 rev (UTR)	5'-CCA TGT ACC CCA GAA TGT ACA GAA GG-3'
20102	31 rev	5'-GCT AGC CCC GGT GAT CAA AAC-3
20104	875 for	5'-GGA AGA AAT TAC ATT ATG ACC CAG-3'
20106	53 rev	5'-CAG AGG GCC AGG CCA ATG C-3'
20107	36 for	5'-GCA TTG GCC TGG CCC TCT G-3'
20183	341 for	5'-CAT ATG TTC TCC ACA GCT GAA GGC-3'
20243	Intron 7 rev	5'-CAG TGT GAT GCT GGT GAA CAG TG-3'
20401	279 rev	5'-GGC ATG ATC CCA GCA TTT AGA TAT ATA C-3'
20402	387 rev	5'-ATC TTA TCA CCC TGG ATC AGC AG-3'
20403	404 for	5'-CAG GAG GTG TTT GAG ACC AAT GTC-3'
20404	476 rev	5'-TGT GAC AGA GGA GAG GCT CCA GT-3'
20494	1015 rev	5'-TGA GCC TGG CCT GAT TAT CTG-3'
20589	261 for	5'-TCT AAA TGC TGG GAT CAT GCC T-3'
20590	283 rev	5'-AGG CAT GAT CCC AGC ATT TAG A-3'
20591	364 rev	5'-GCC TTC AGC TGT GGA GAA CAT ATG-3'
20592	477 rev	5'-ACA GAG GAG AGG CTC CAG TTC C-3'
20593	450 for	5'-GGA ACT GGA GCC TCT CCT CTG T-3'
20710	Intron 2 for	5'-GCA ACT CAC AAT CTT GTT TGG TGG-3'
20711	281 for	5'-GCC TAA TCC ACA ACT AAA TAT CAA AGC-3'
20712	Intron 8 for	5'-CAC ACA GCA AAC ATC AGT GCA TC-3'
20713	Intron 4 for	5'-CCT AAT CTC TTC CCA TAC AGT ACA GTG G-3'
20907	-550/Promotor rev	5'-GCC CAA CTT TTG ATC CCA GAC C-3'
20909	660 for	5'-CCT GTC CAG GTA CAG CAT TGA CC-3'
20910	682 rev	5'-GGT CAA TGC TGT ACC TGG ACA GG-3'
20911	758 for	5'-GCA AAT GCA TTC ACT TTG ACA CC-3'
20912	782 rev	5'-GGT GTC AAG TGA ATG CAT TGC-3'
20925	83 rev	5'-GCT CAT CAT CTT CCG CCA GC-3'
20926	519 rev	5'-CGA GAT GAT GTC CAG ATG AGC TGA-3'
21058	789 rev	5'-CCA TTA TAT GGT GTC AAA GTG AAT GC-3'
21059	-1050/Promotor rev	5'-GCT GGA AGT AAG GAA TCT GAG ACC-3'
21060	Intron 6 for	5'-GTG TTC TAT AAT CAG AAA GGC AGG G-3'
21132	-93/Promotor rev	5'-GAT TGG TGA CGG GTG AGG C-3'
21133	119 rev	5'-CCT TGC TCA TGT TCC TGC ACG-3'
21134	416 rev	5'-CAA ACA CCT CCT GAA GTC CAT CAG C-3'
21135	724 rev	5'-CAG CGT CCA TAT AAA CGG AGG C-3'

\* Nummerierung beginnt mit 0 bei ATG (Startkodon); angegebene Position entspricht immer 5'-Ende des jeweiligen Primers;

\*\* laborinterne Nummerierung der Primer

## 9.2 Bestimmung der Introngrößen von h17 $\beta$ -HSD 7

Intron	forward-Primer	reverse-Primer
<b>I</b>	5'-CGA AGA TGC GAA AGG TGG-3' (19782)	5'-CAG AGG GCC AGG CCA ATG C-3' (20106)
<b>II</b>	5'-GGG CCT CCA AAC TTA AGC A-3' (20405)	5'-GGC ATG ATC CCA GCA TTT AGA TAT ATA C-3' (20401)
<b>III</b>	5'-TCT AAA TGC TGG GAT CAT GCC T-3' (20589)	5'-GCC TTC AGC TGT GGA GAA CAT ATG-3' (20591)
<b>IV</b>	5'-CAG GAG GTG TTT GAG ACC AAT GTC-3' (20403)	5'-TGT GAC AGA GGA GAG GCT CCA GT-3' (20404)
<b>V</b>	5'-AGC TCT TCC AAA TAT GCC ACT GAC C-3' (20908)	5'-GGT CAA TGC TGT ACC TGG ACA GG-3' (20910)
<b>VI</b>	5'-GCC CAA CTT TTG ATC CCA GAC C-3' (20907)	5'-GGT GTC AAG TGA ATG CAT TGC-3' (20912)
<b>VII</b>	5'-GCA AAT GCA TTC ACT TTG ACA CC-3' (20911)	5'-CTG GGT CAT AAT GAT ATT TCT TCC-3' (20103)
<b>VIII</b>	5'-GGA AGA AAT TAC ATT ATG ACC CAG-3' (20104)	5'-TGA GCC TGG CCT GAT TAT CTG-3' (20494)

In Klammern sind die laborinternen Primernummern angegeben.