



# Nachweis der Effekte von Endokrin- wirksamen Stoffen

Leane Lehmann

Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie

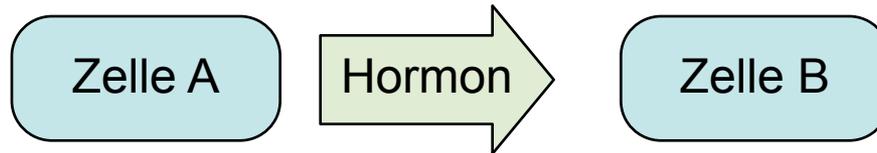
Universität Würzburg

# „Endokrine“ Effekte

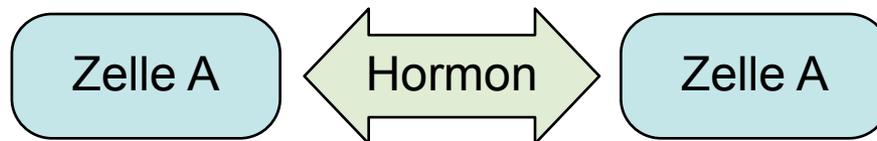
Klassisches endokrines System (systemisch)



Parakrine



Autokrine



Neurotransmitter



Hypothalamus-regulierende Hormone

Hypophysenhormone

Pankreashormone

Gastrointestinale Hormone

Peptidhormone

Calciumregulierende Hormone

Nebennierencorticoide

Schilddrüsenhormone

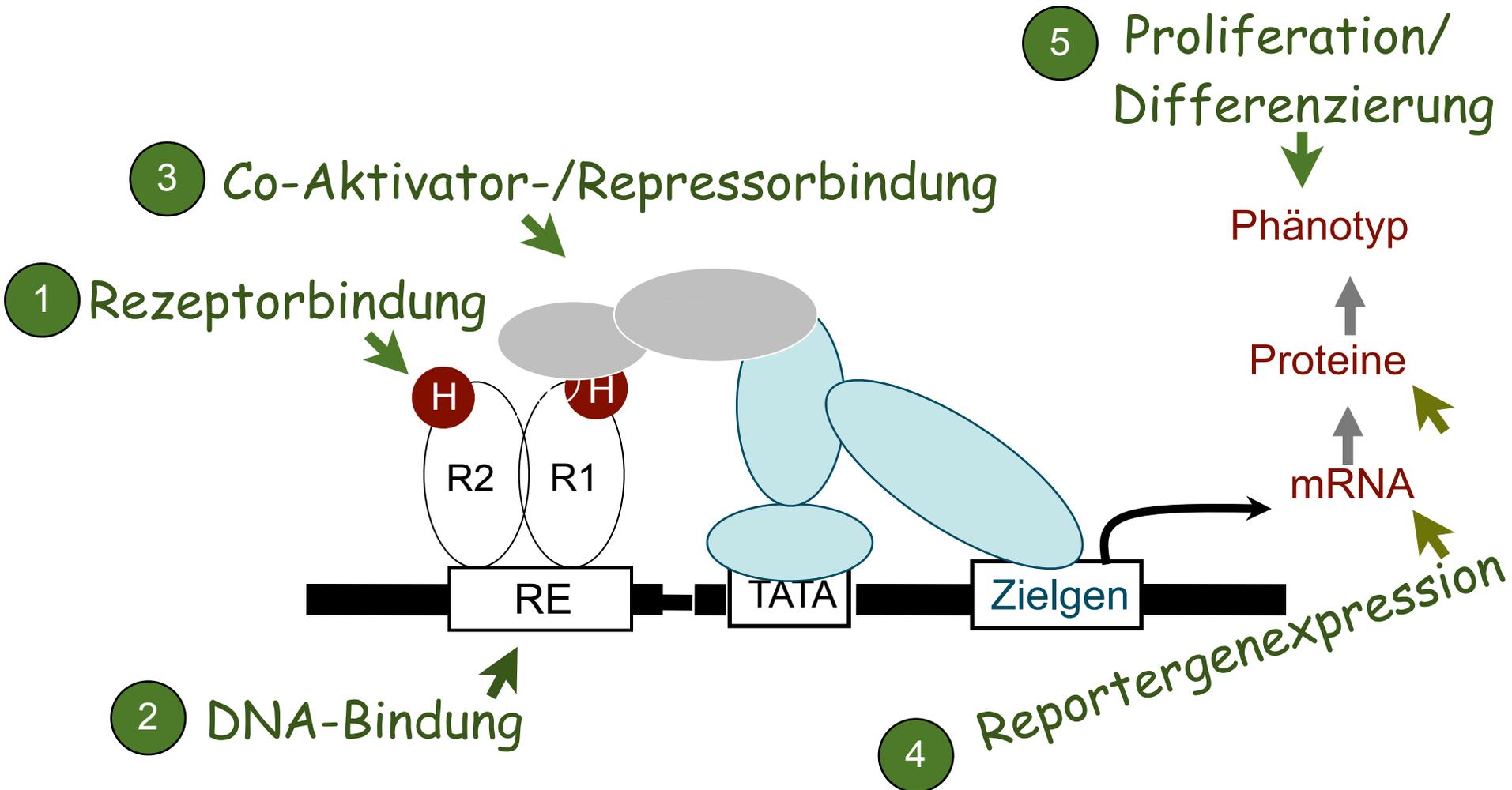
Andogene

Estogene

Progestine

Steroidhormone

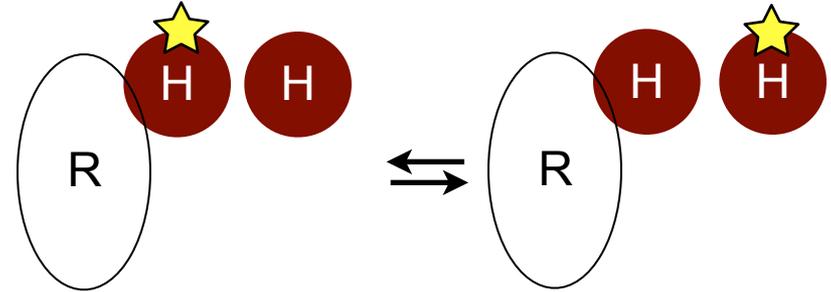
# Nachweis der Wechselwirkung



# Rezeptorbindungstests

## Prinzip/Varianten

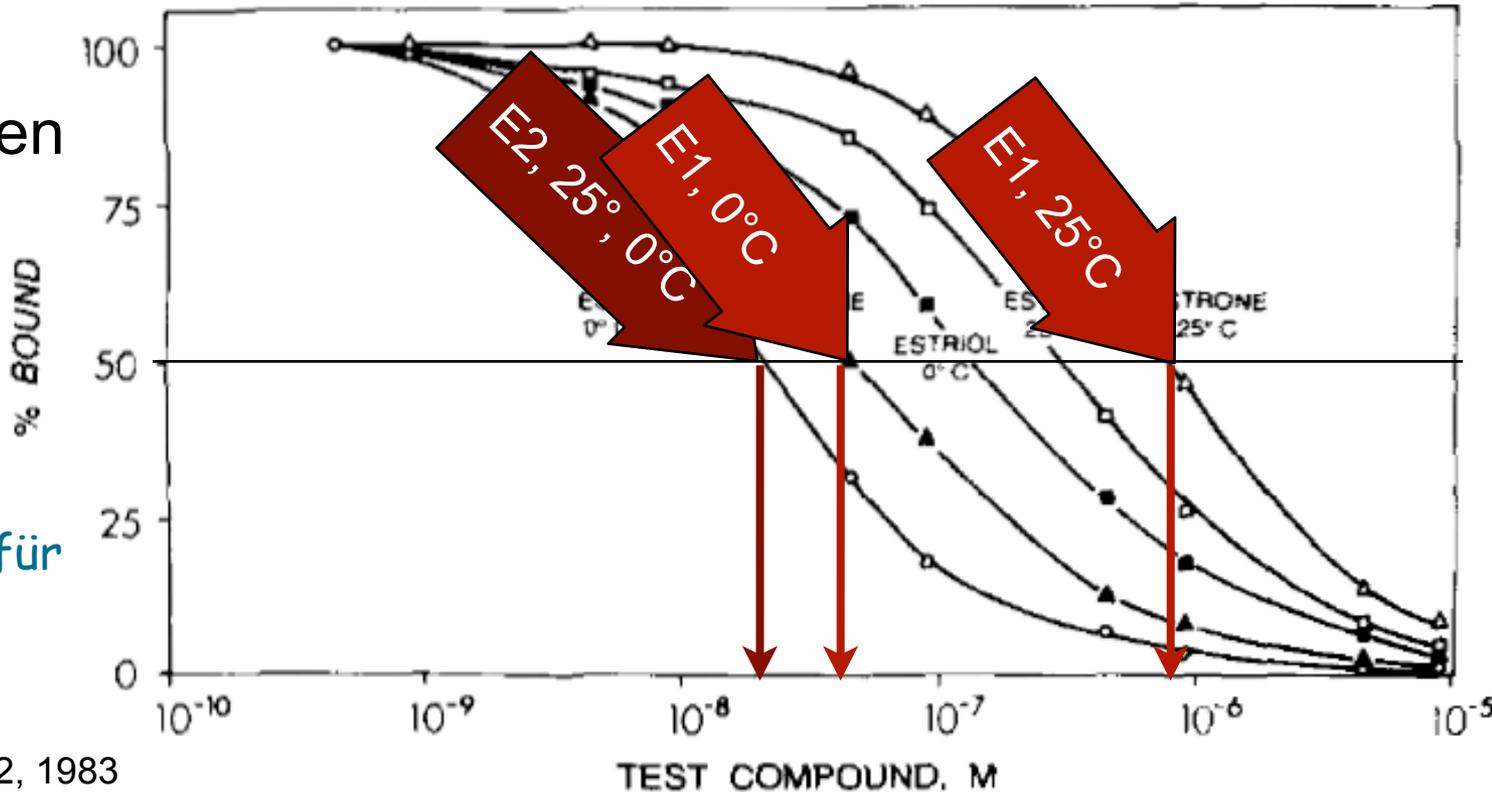
- Radioaktiv markierter Ligand
- Fluoreszenzmarkierter Ligand
- Unmarkierter Ligand



## Einflussfaktoren

- Temperatur
- Zeit
- Rezeptor

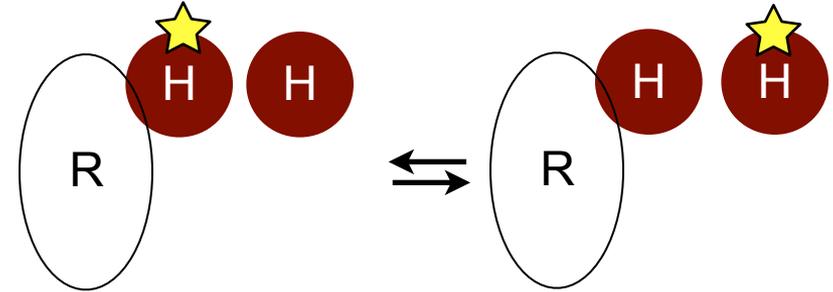
EPA-Guidelines für  
ER und AR



# Rezeptorbindungstests

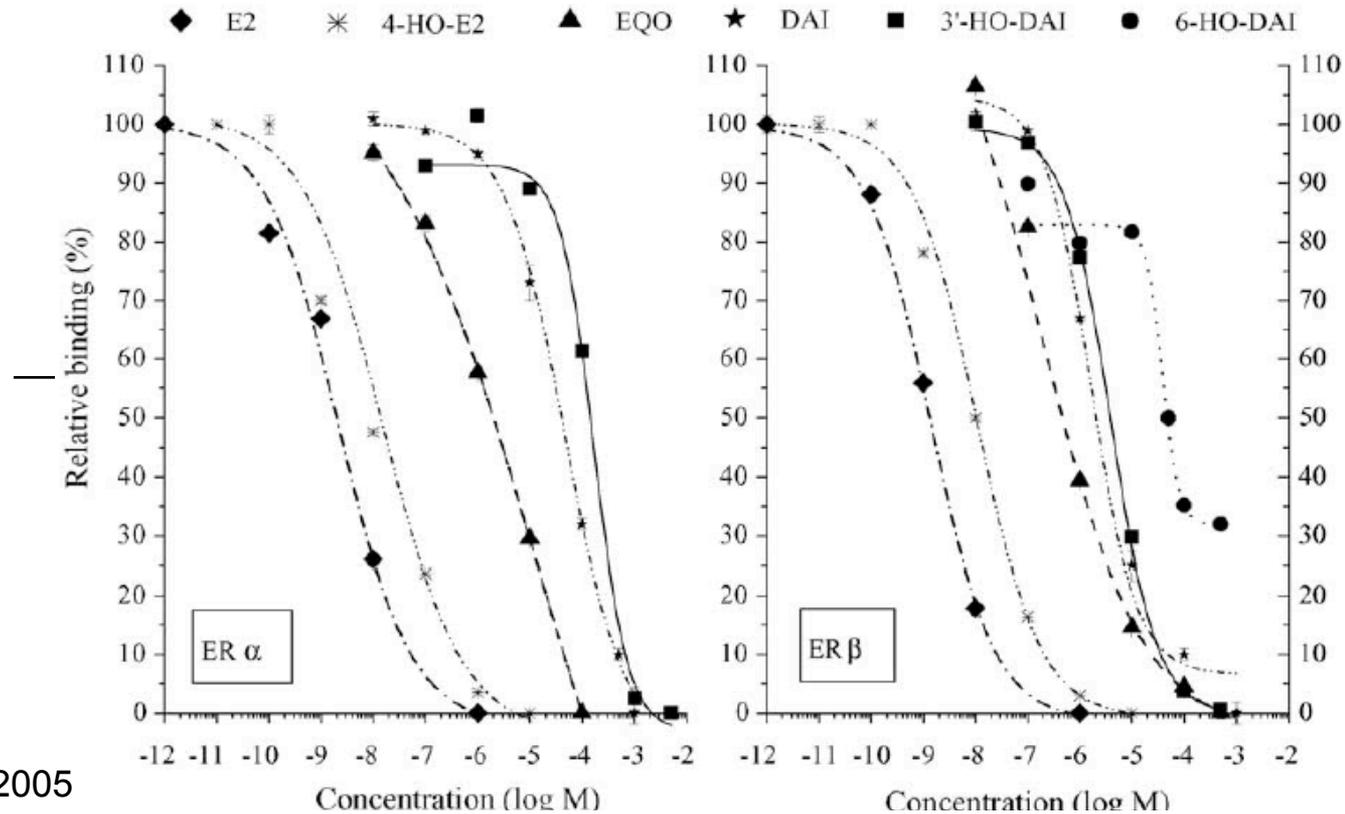
## Prinzip/Varianten

- Radioaktiv markierter Ligand
- Fluoreszenzmarkierter Ligand
- Unmarkierter Ligand



## Einflussfaktoren

- Temperatur
- Zeit
- Rezeptor



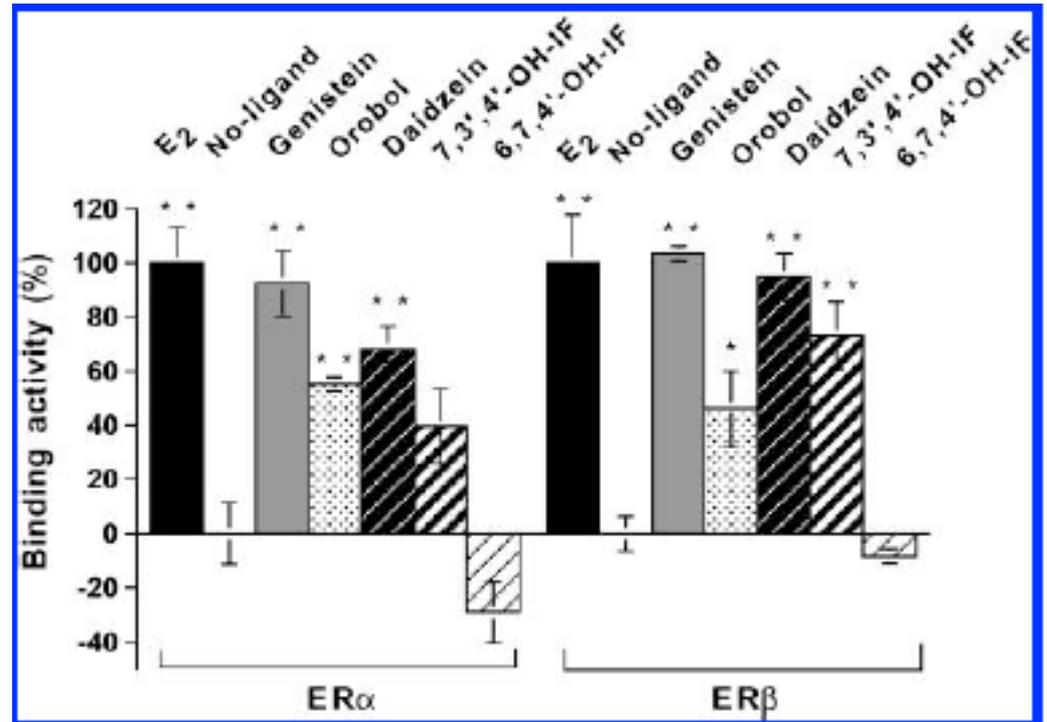
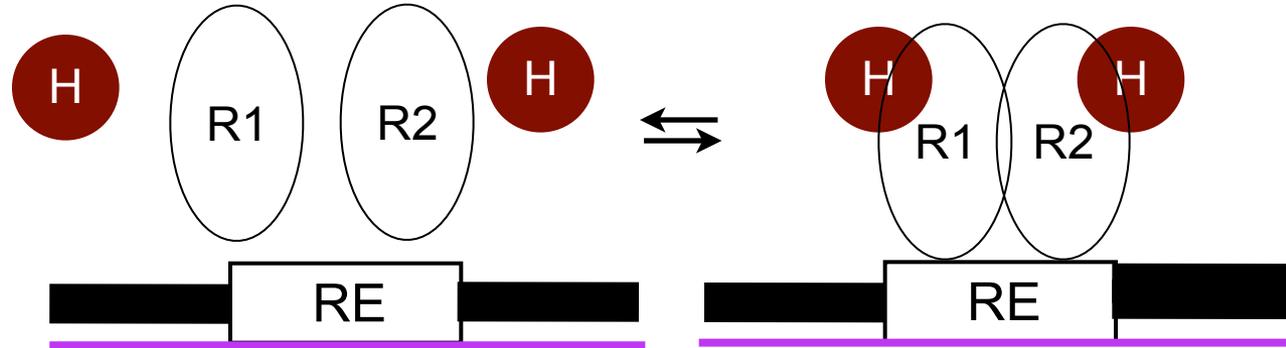
# Bindung Rezeptor-Ligand → DNA

## Prinzip/Varianten

Plasmonresonanz

ELISA o.ä.

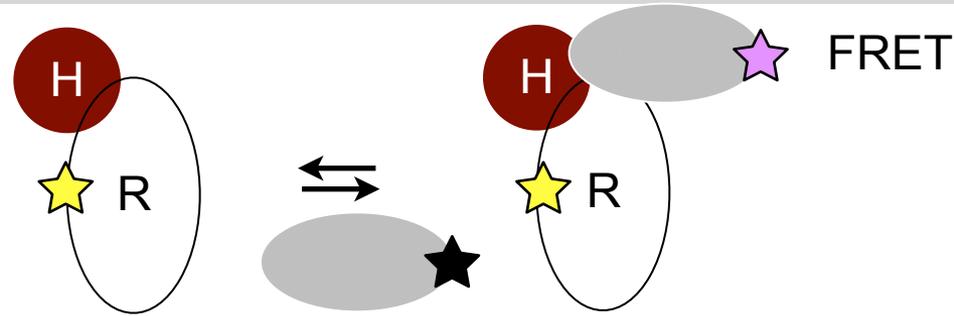
Electromobility shift



# Bindung Co-Aktivator/-repressor

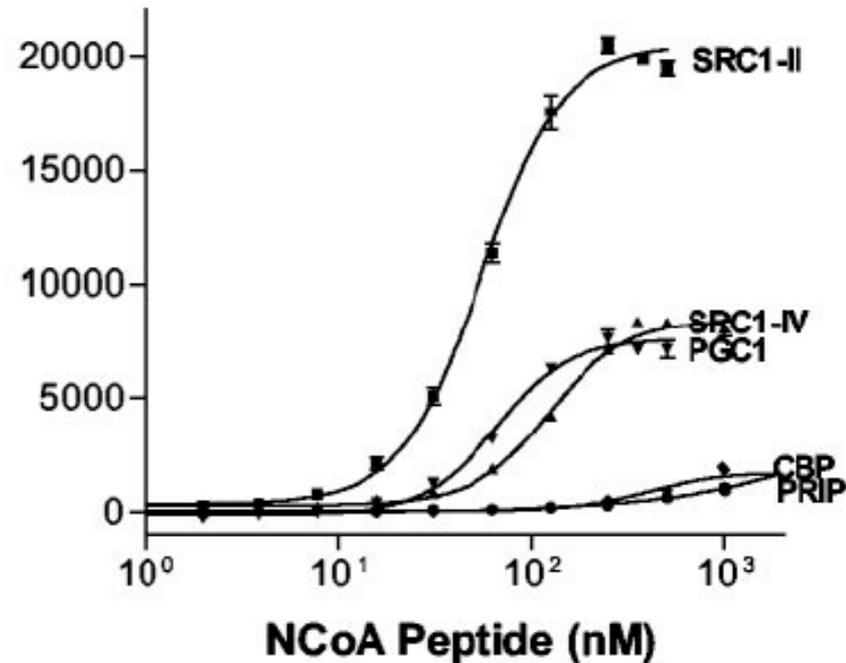
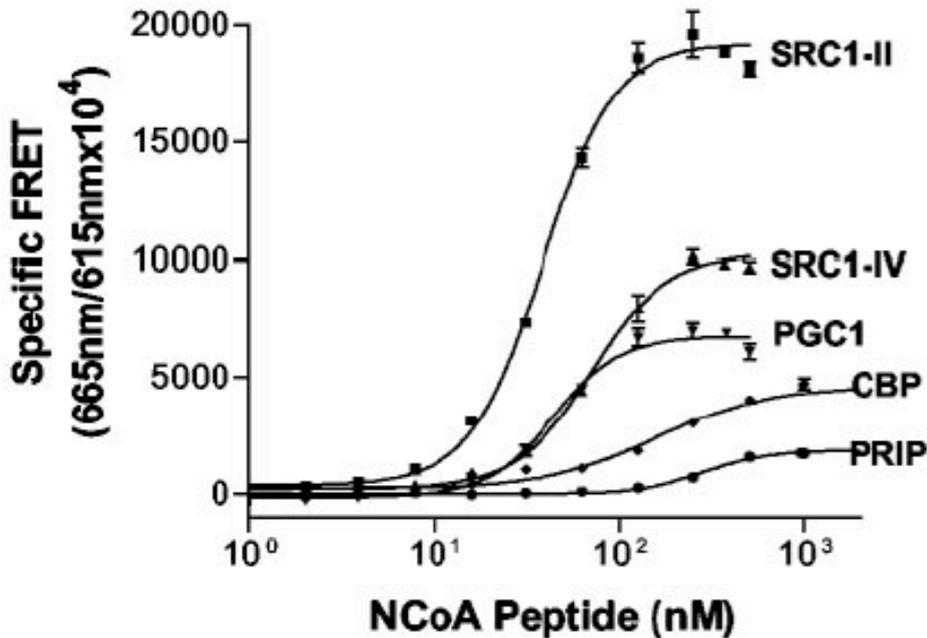
## Prinzip/Varianten

Markierter Rezeptor  
+Markiertes Peptid



**ER $\alpha$ +E2**

**ER $\alpha$ +GEN**



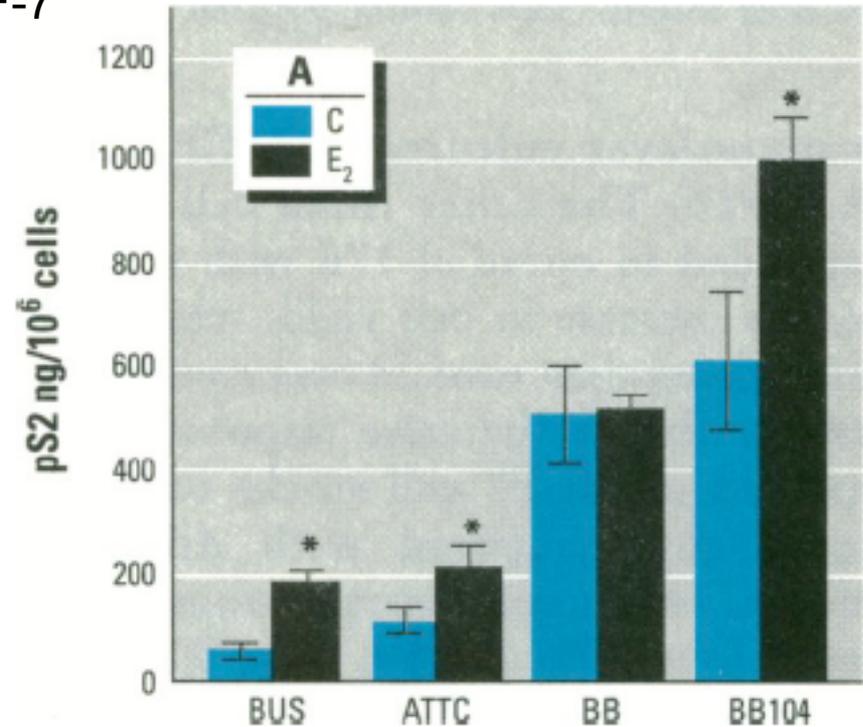
# Reportergenassays: Testsysteme

Transgen	Einzelner	Hefe h,r,mER $\alpha$ und h,r,mER $\beta$
	Säuger, transient	Ishikawa hER $\alpha$ und hER $\beta$
	Säuger, stabil	Hela9903 (hER $\alpha$ ), MDA-kb2 (AR, GR)
Natürlich	Säuger	Ishikawa ER+
		MCF-7

EPA-/OECD-  
Guidelines

## Einflussfaktoren

Transgen	Art des Konstrukts
	Effizienz
	Stabilität
Sub-Zelllinie	Rezeptoren
	Co-Aktivatoren
Kulturbedingungen	FKS,...
Mycoplasmen	



# Reportergenassays: Endpunkt mRNA

Prinzip/Varianten

qRT-PCR

Einflussfaktoren

RNA-Qualität

Quantifizierung

Housekeeping-Gen

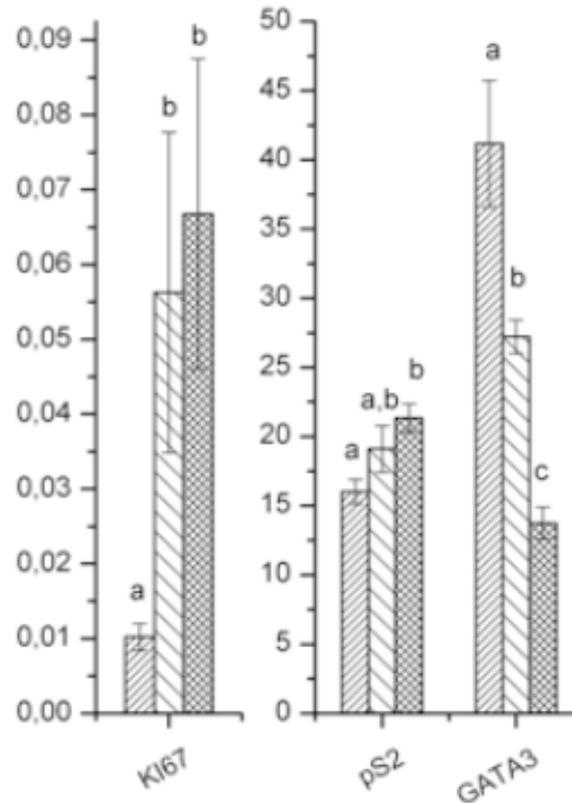
qPCR-Methode

Zieltranskript/HPRT in MCF-7 BUS Zellen

K (0,1% DMSO)

0,1  $\mu$ M GEN

1  $\mu$ M GEN



Katja Schmalbach,  
unpublizierte Daten

Methode: TaqMan TDLA 48 ausgewählte Transkripte

Auswertung: Berechnung  $N_0$  ausgehend von  $N_{CT}$

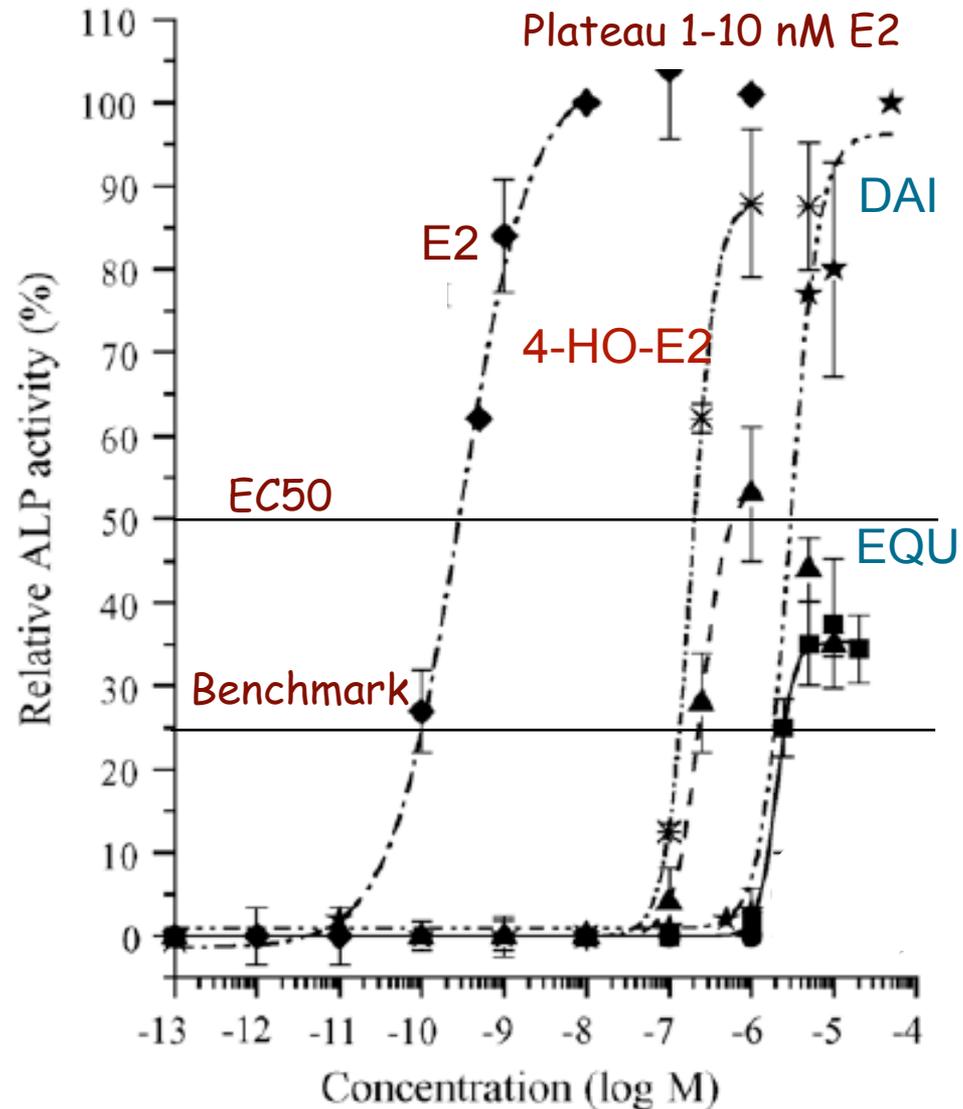
Darstellung: 3 unabhängige Zellkulturexperimente

## Prinzip/Varianten

- Proteinaktivität
- Proteinmenge

## Einflussfaktoren

- siehe Testsysteme
- Variabilität durch Sublinien
- methodisch ähnlich mRNA



## Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

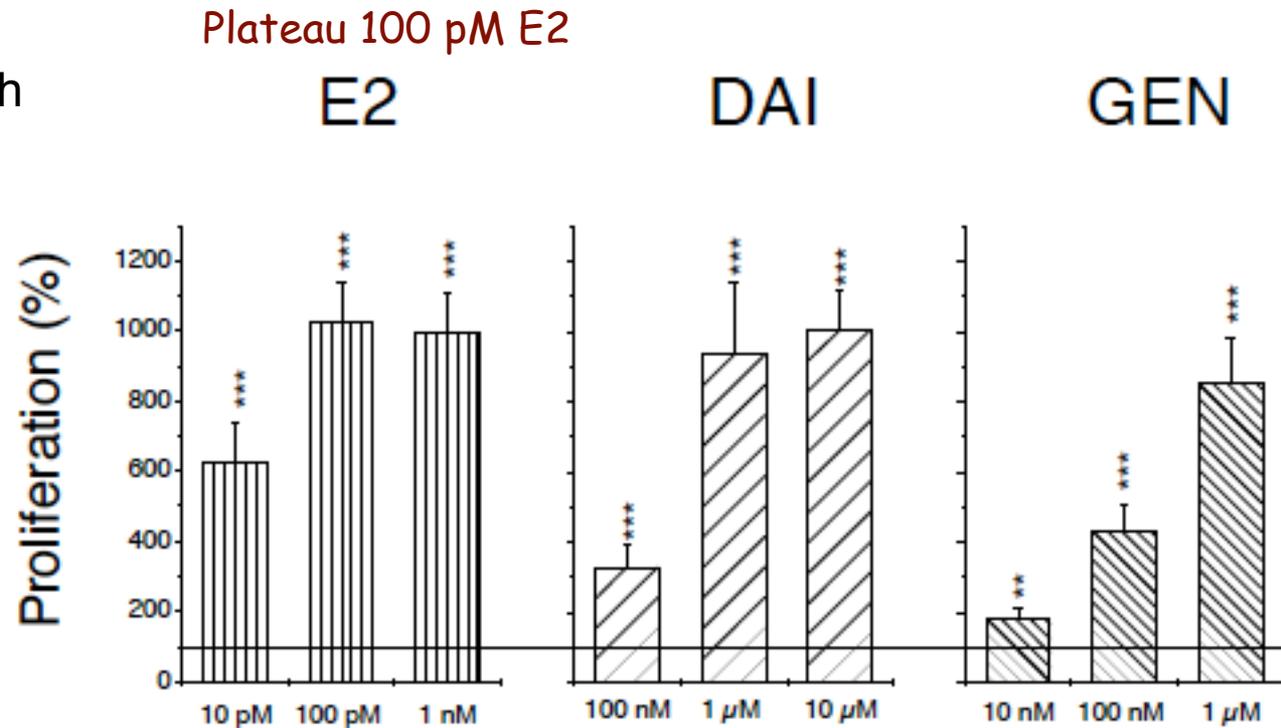
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

## Einflussfaktoren

Zellpopulation

Kulturbedingungen



## Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

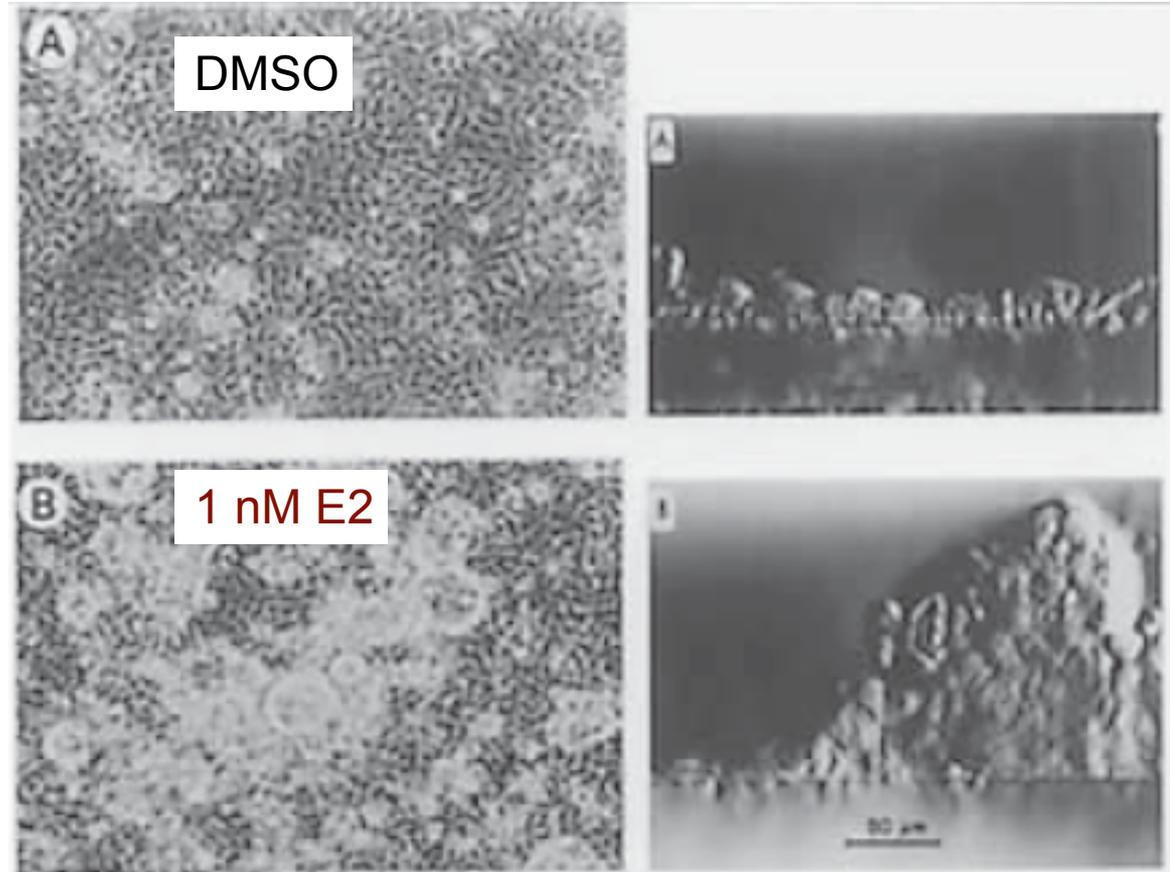
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

## Einflussfaktoren

Zellpopulation

Kulturbedingungen



# Veränderter Phänotyp

## Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

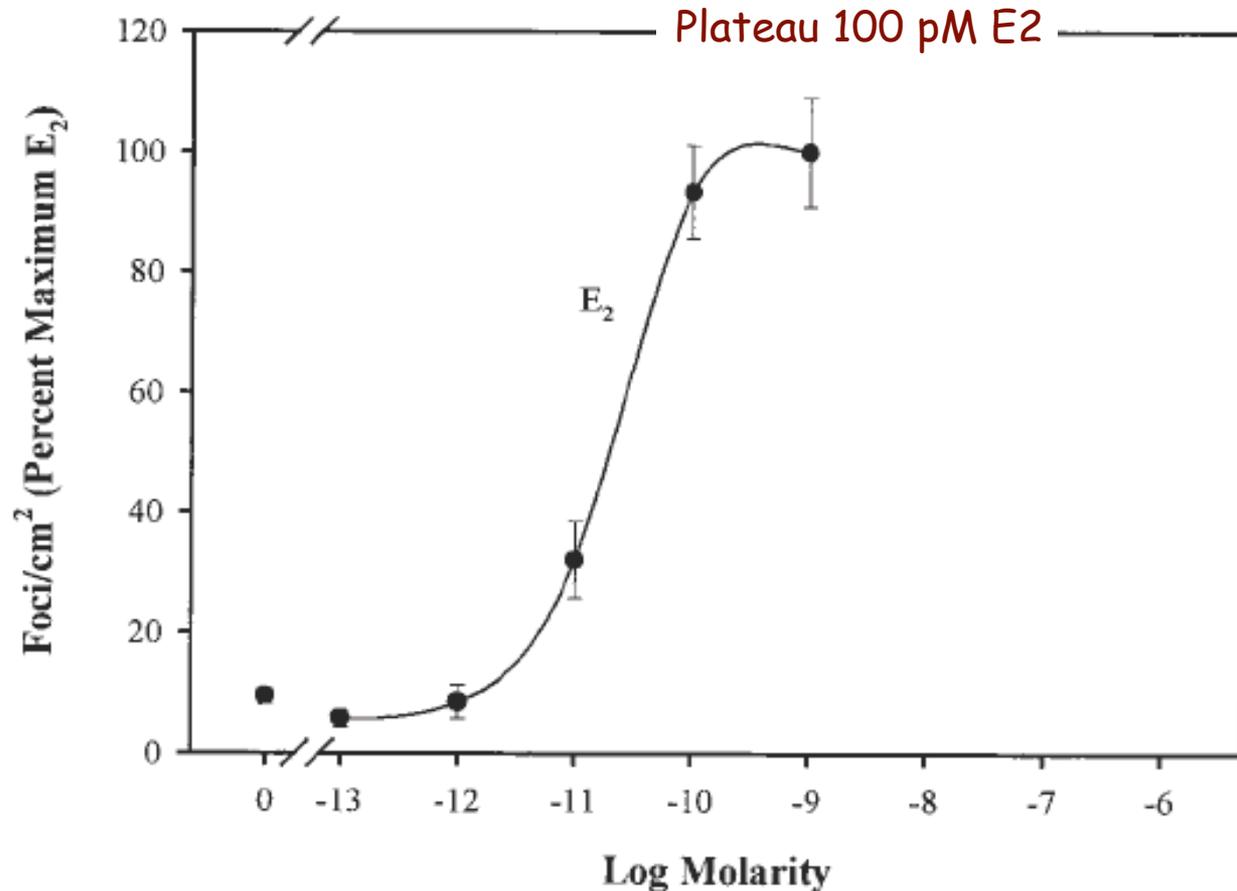
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

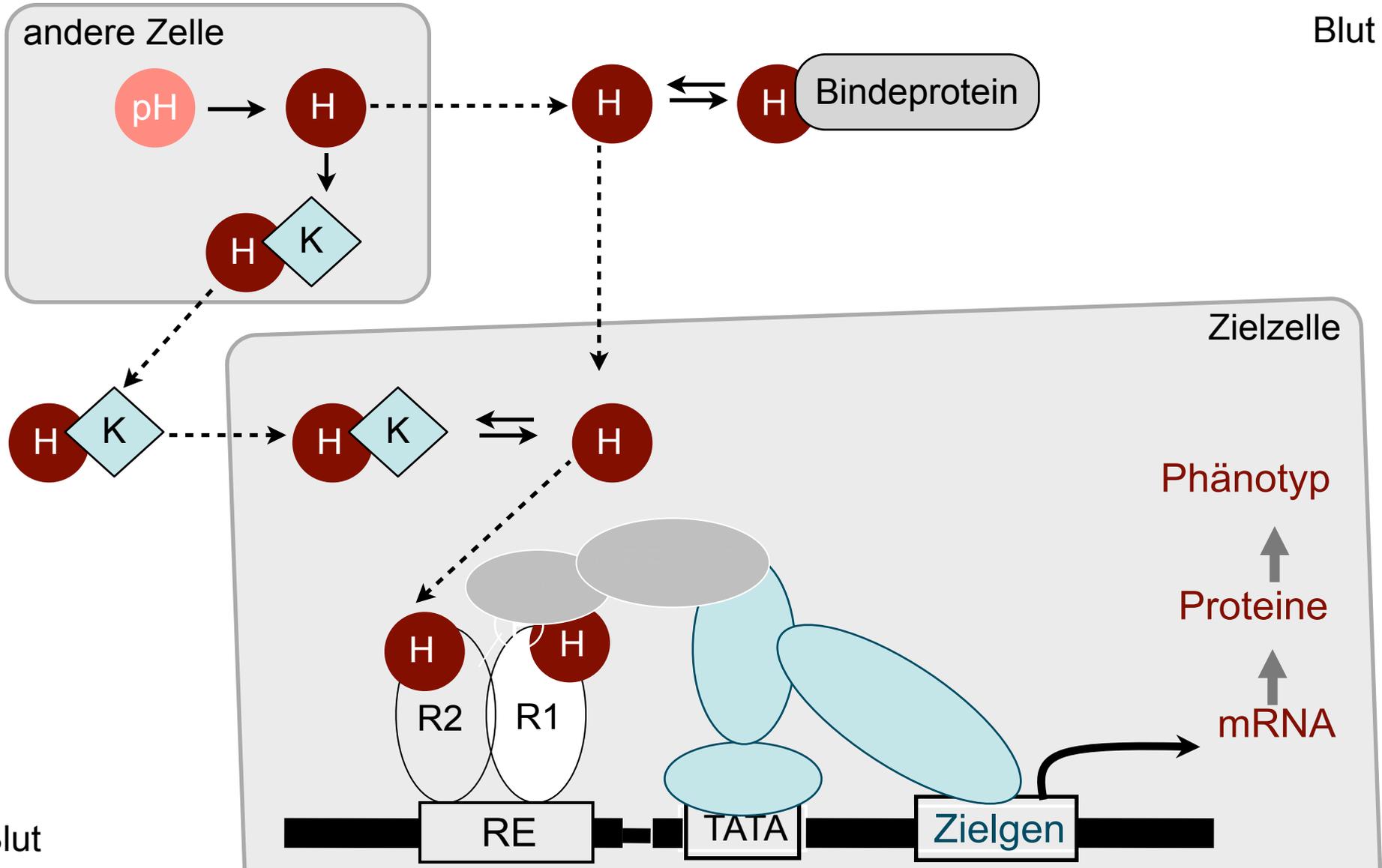
## Einflussfaktoren

Zellpopulation

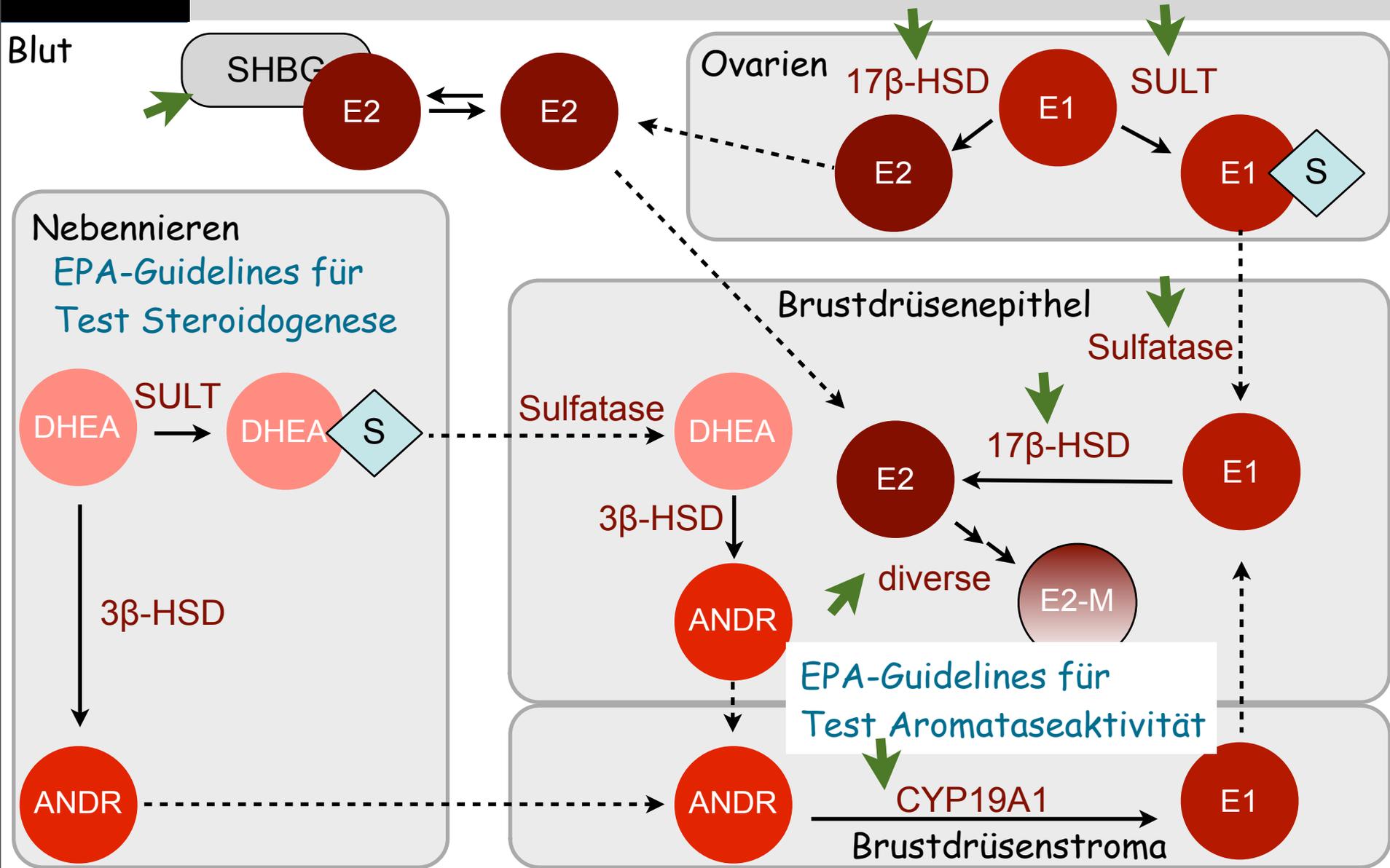
Kulturbedingungen



# Achtung Kinetik!



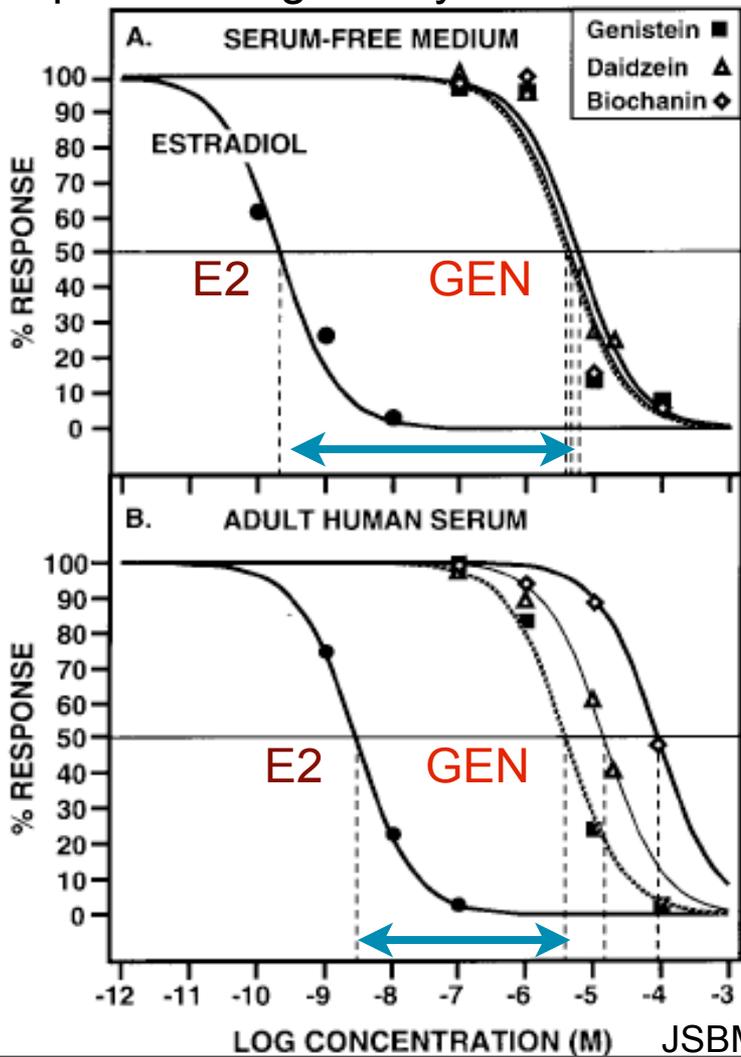
# Achtung Kinetik! Beispiel Estrogene



# Achtung Kinetik! Beispiel Estrogene

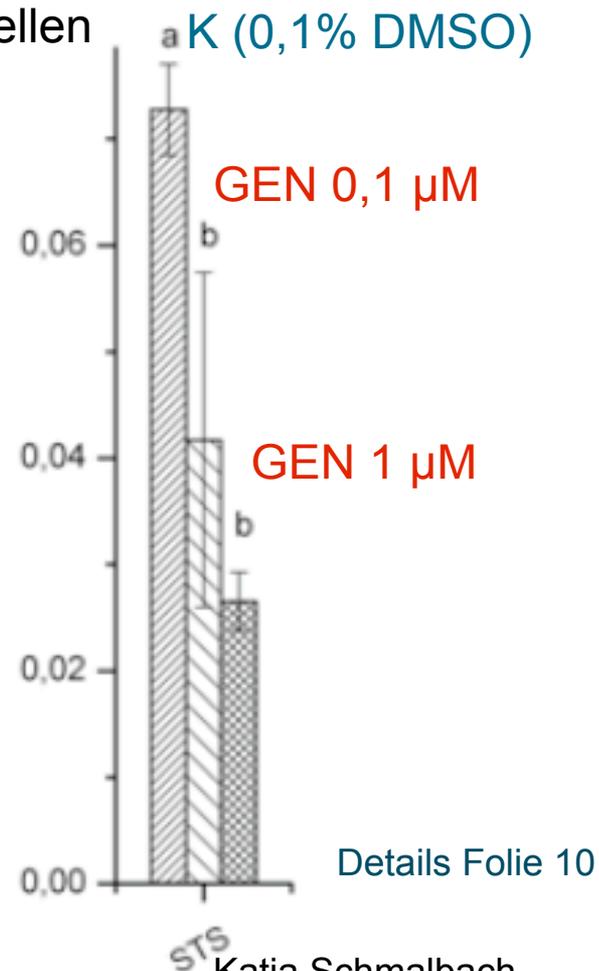
## Proteinbindung

### Rezeptorbindungsassay



## E2-Kinetik in MCF-7 Zellen

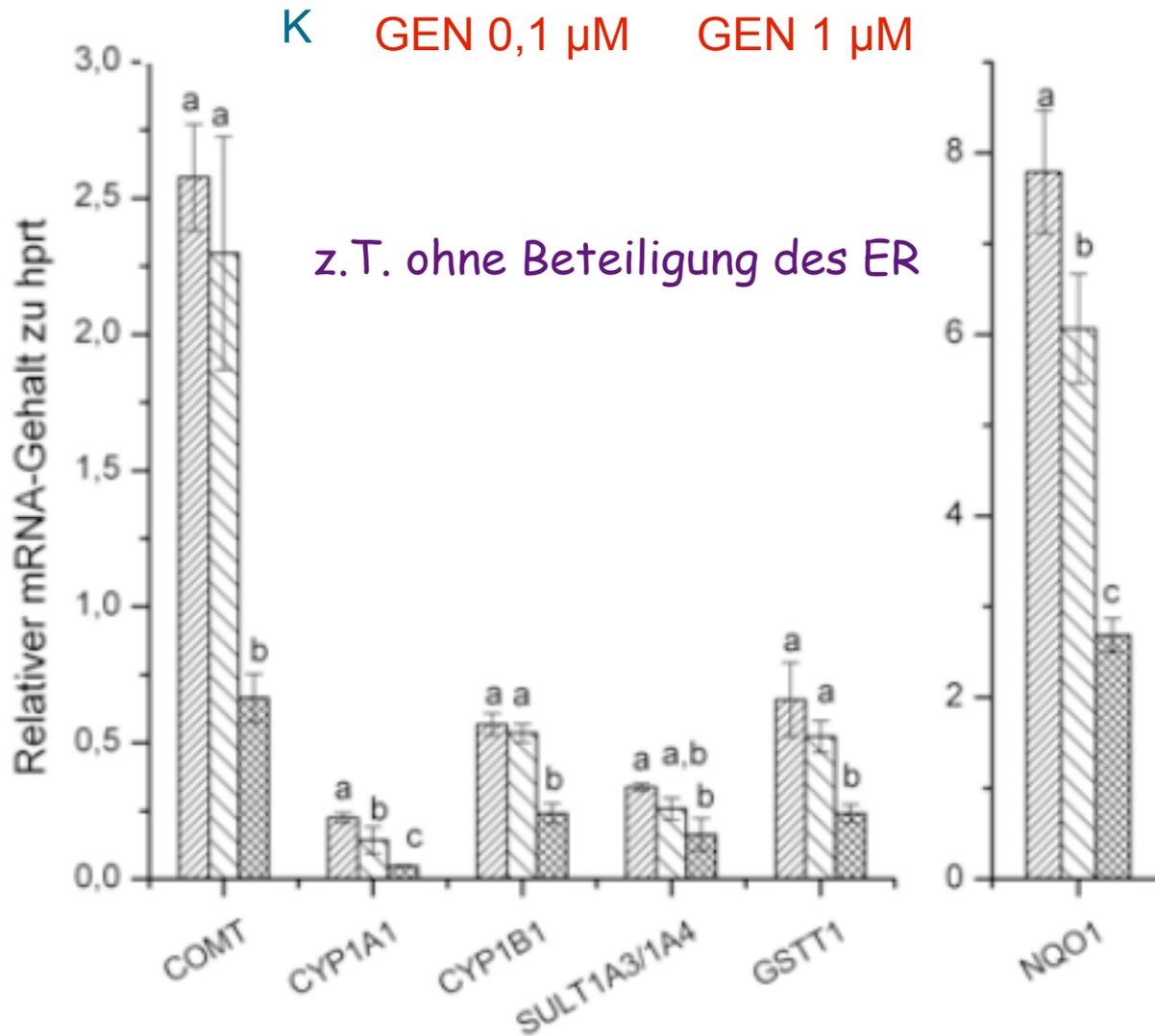
### Steroidsulfatase-Transkript/HPRT in MCF-7 BUS Zellen



Details Folie 10

Katja Schmalbach  
unveröffentlichte Ergebnisse

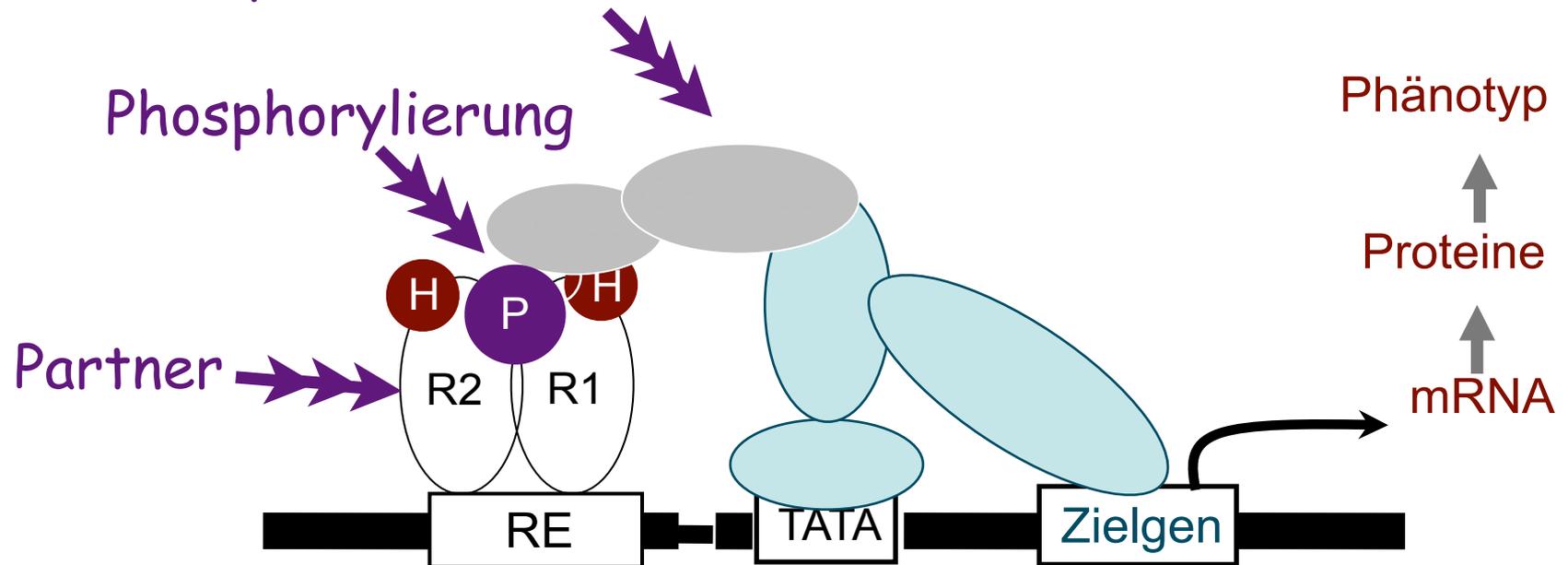
# Beispiel E2-Kinetik in MCF-7 Zellen



# Achtung Crosstalk!

Aktivierung anderer Signalwege beeinflusst...

Genexpression/Stabilität von R, CoA/R...



Herzlichen Dank!

Fragen?