



Nachweis der Effekte von Endokrin- wirksamen Stoffen

Leane Lehmann

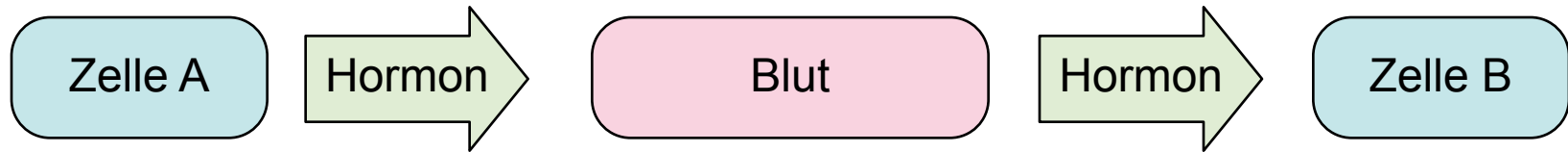
Lehrstuhl für Lebensmittelchemie

Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie

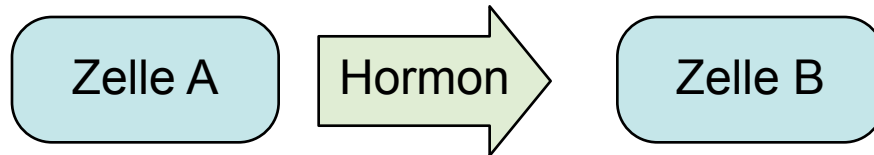
Universität Würzburg

„Endokrine“ Effekte

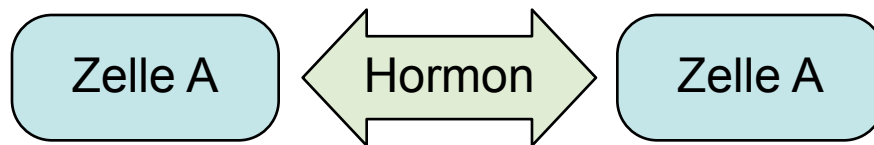
Klassisches endokrines System (systemisch)



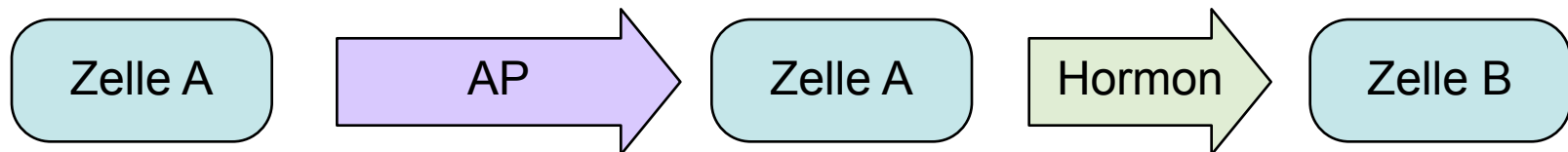
Parakrine



Autokrine



Neurotransmitter



Hypothalamus-regulierende Hormone

Hypophysenhormone

Pankreashormone

Gastrointestinale Hormone

Peptidhormone

Calciumregulierende Hormone

Nebennierencorticoide

Schilddrüsenhormone

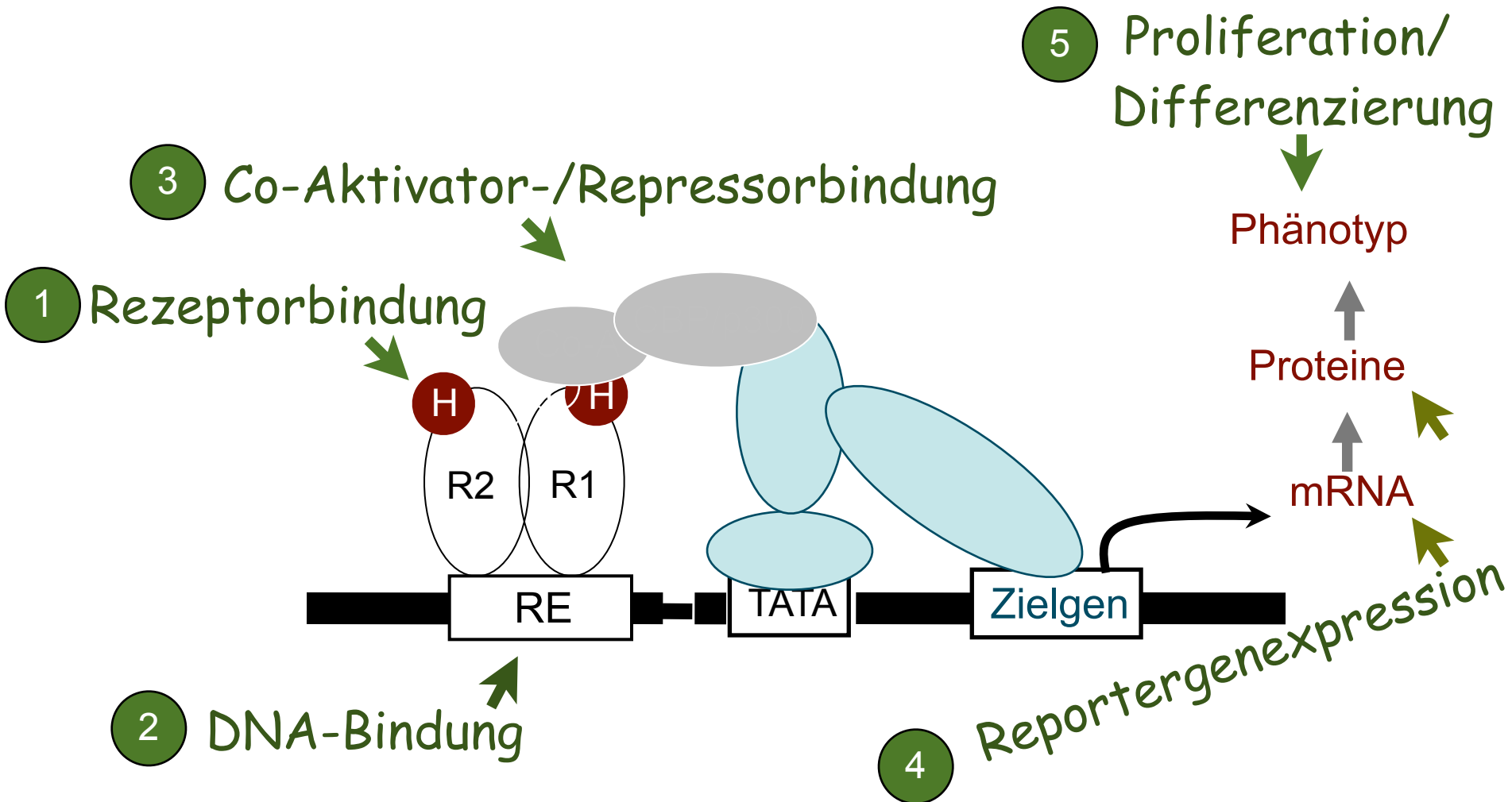
Andogene

Estogene

Progestine

Steroidhormone

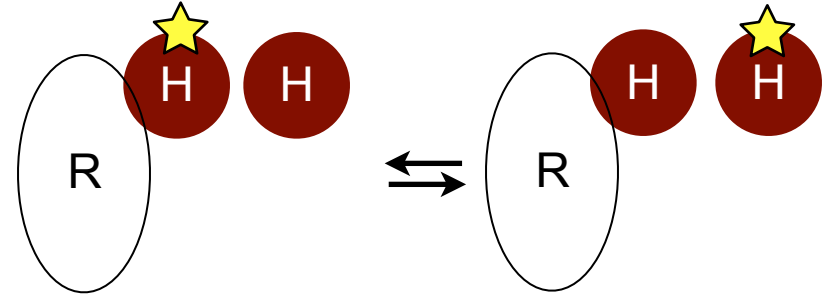
Nachweis der Wechselwirkung



Rezeptorbindungstests

Prinzip/Varianten

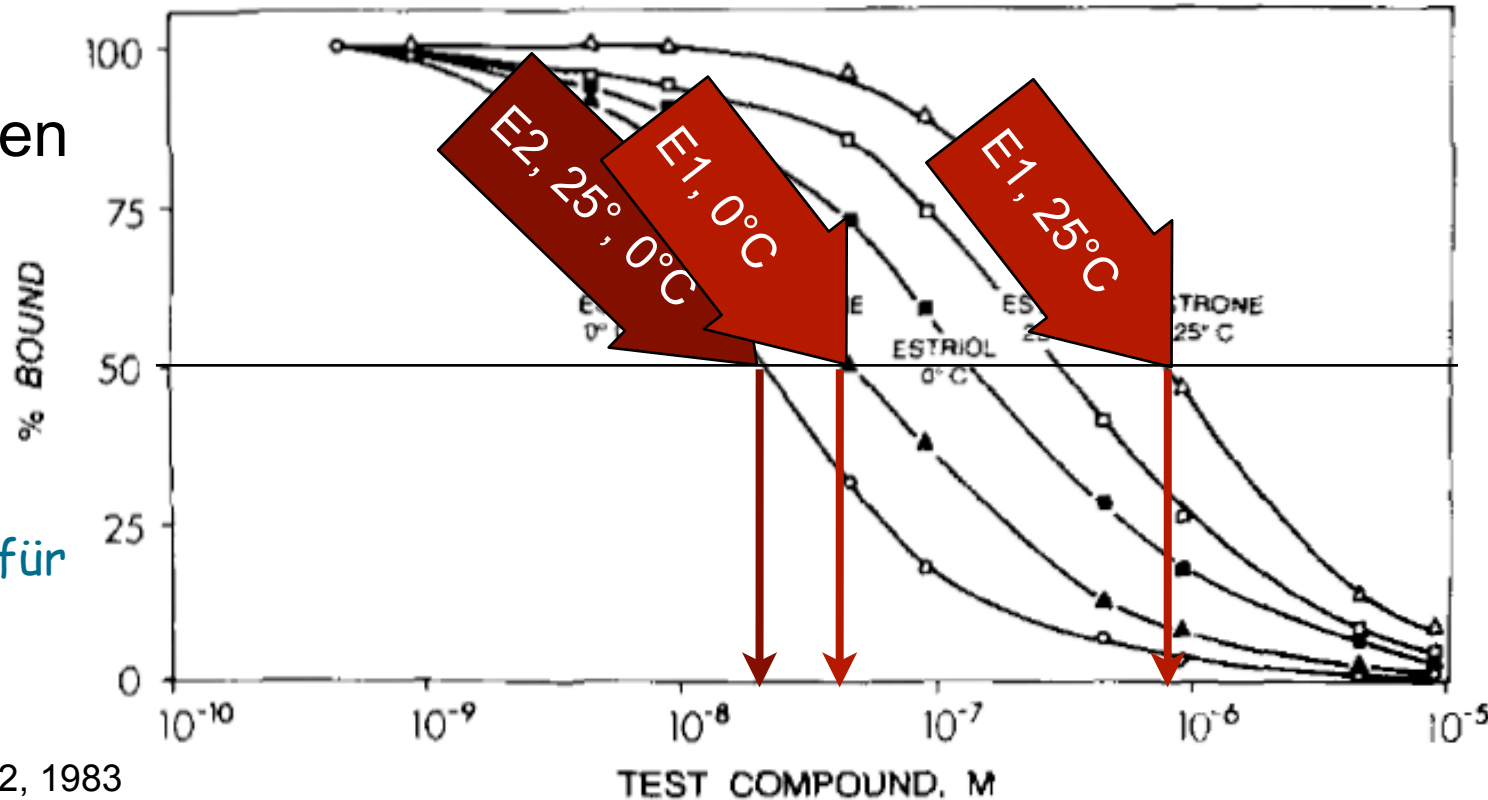
- Radioaktiv markierter Ligand
- Fluoreszenzmarkierter Ligand
- Unmarkierter Ligand



Einflussfaktoren

- Temperatur
- Zeit
- Rezeptor

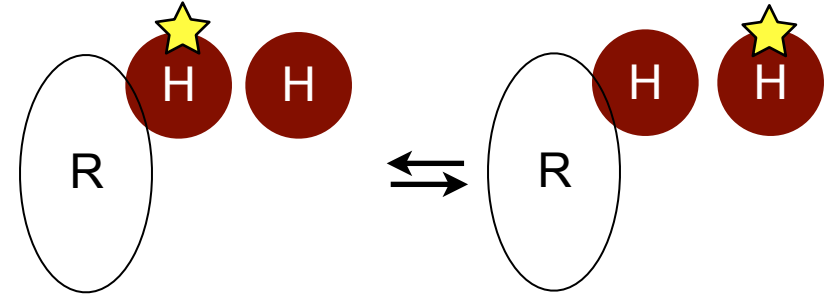
EPA-Guidelines für
ER und AR



Rezeptorbindungstests

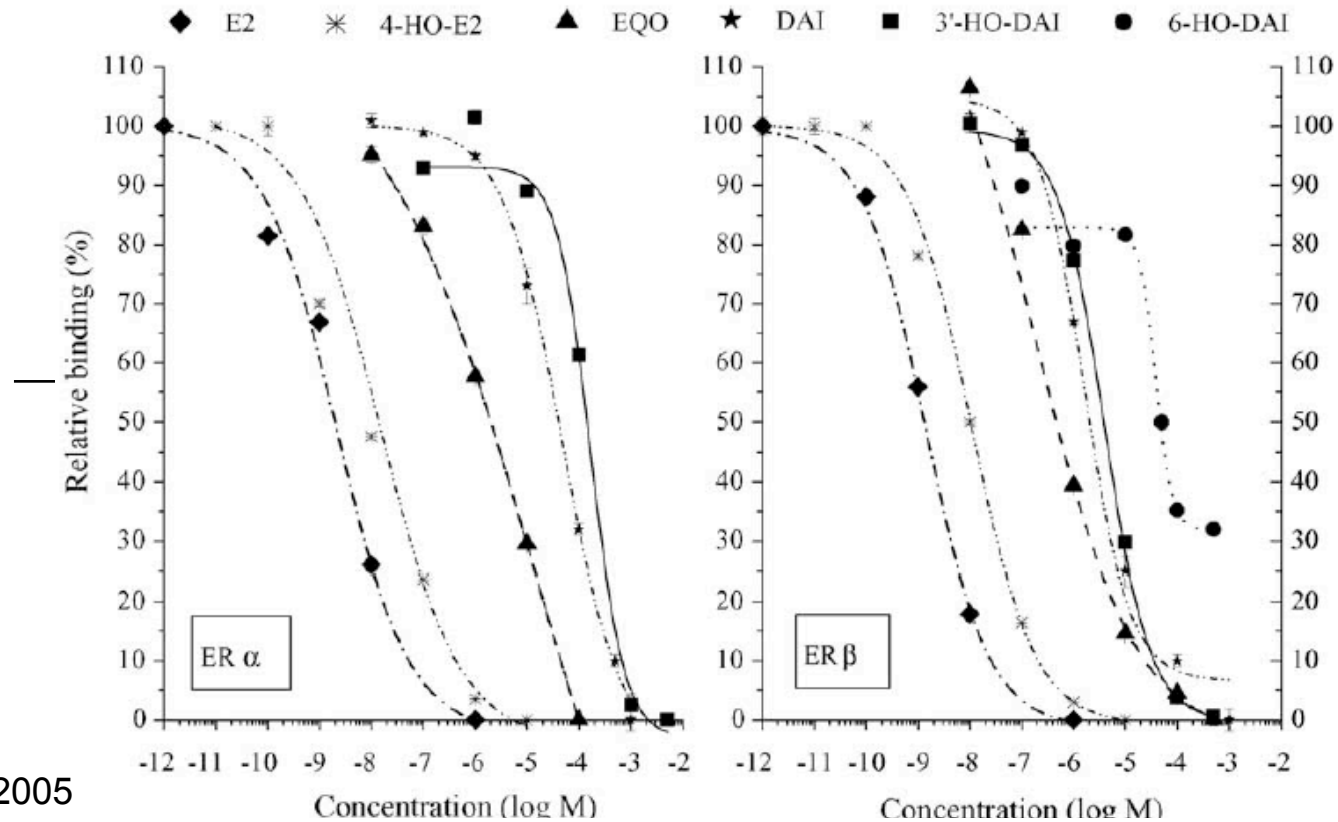
Prinzip/Varianten

- Radioaktiv markierter Ligand
- Fluoreszenzmarkierter Ligand
- Unmarkierter Ligand



Einflussfaktoren

- Temperatur
- Zeit
- Rezeptor



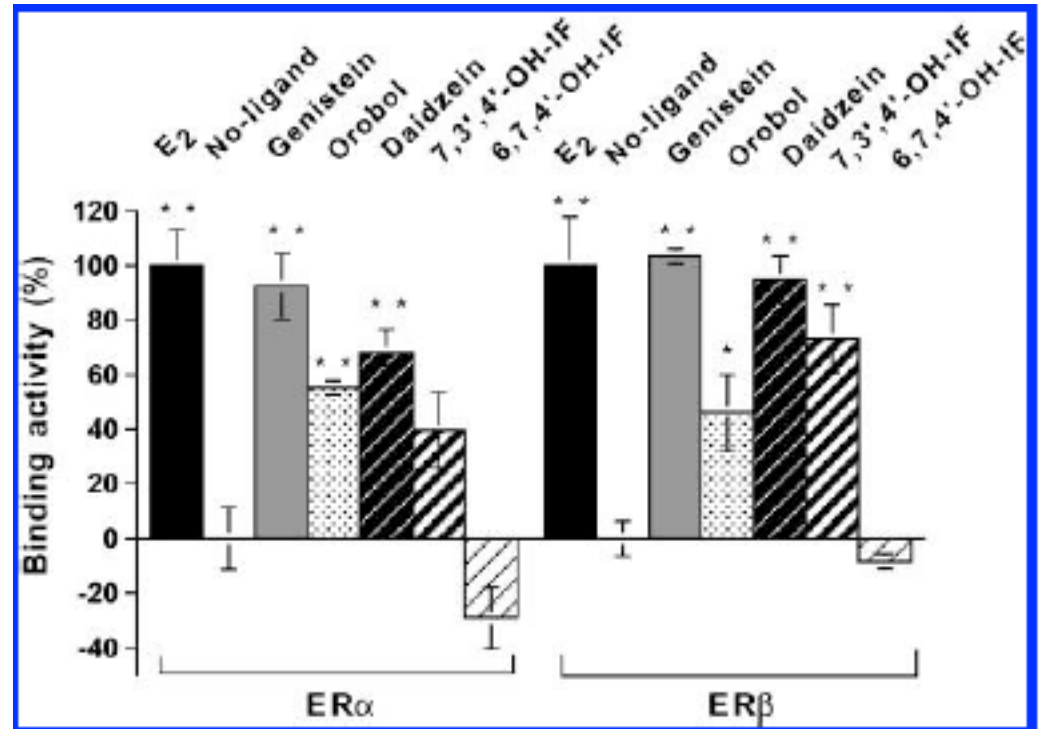
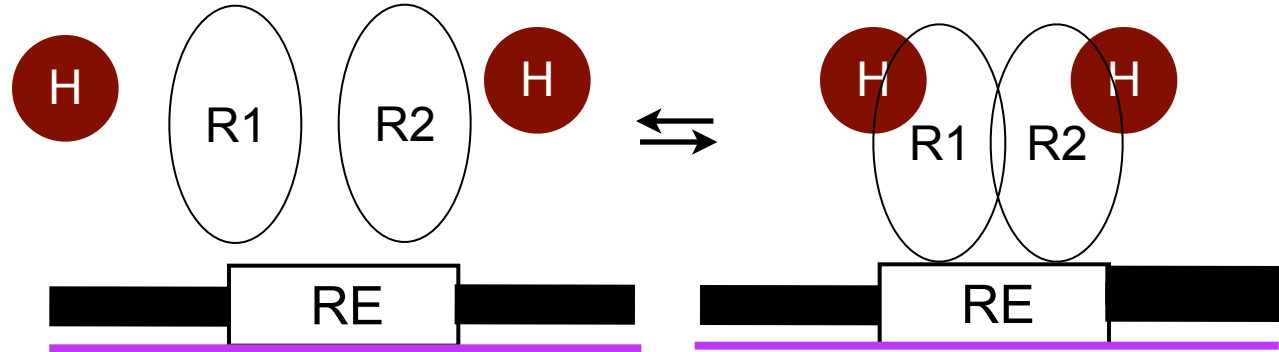
Bindung Rezeptor-Ligand → DNA

Prinzip/Varianten

Plasmonresonanz

ELISA o.ä.

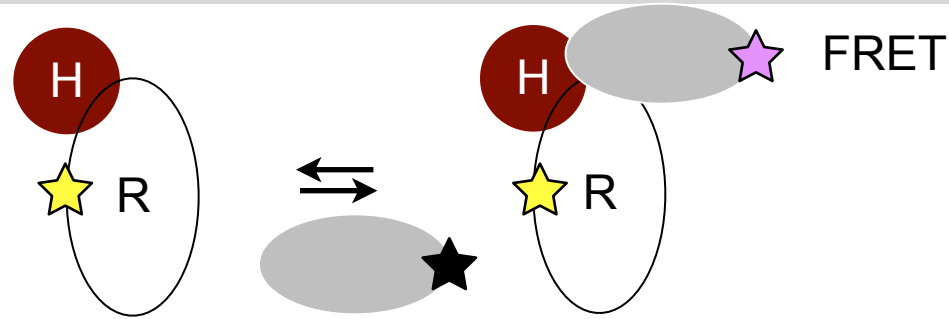
Electromobility shift



Bindung Co-Aktivator/-repressor

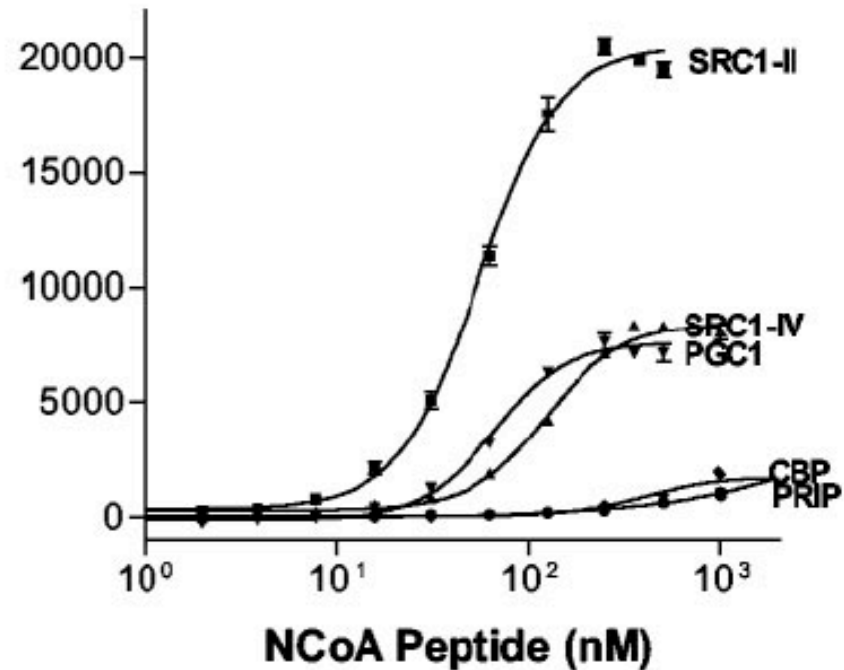
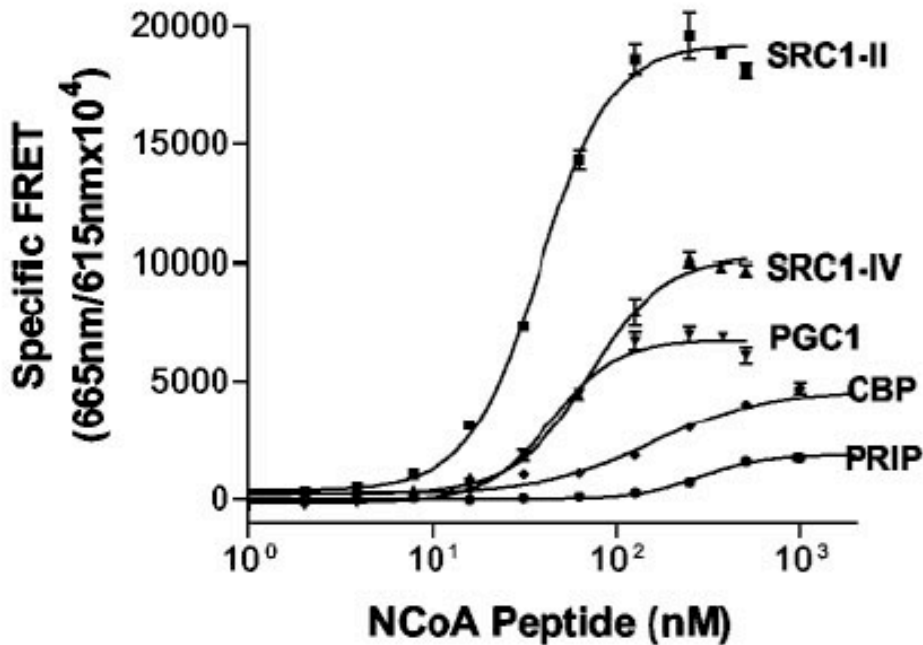
Prinzip/Varianten

Markierter Rezeptor
+Markiertes Peptid



ER α +E2

ER α +GEN



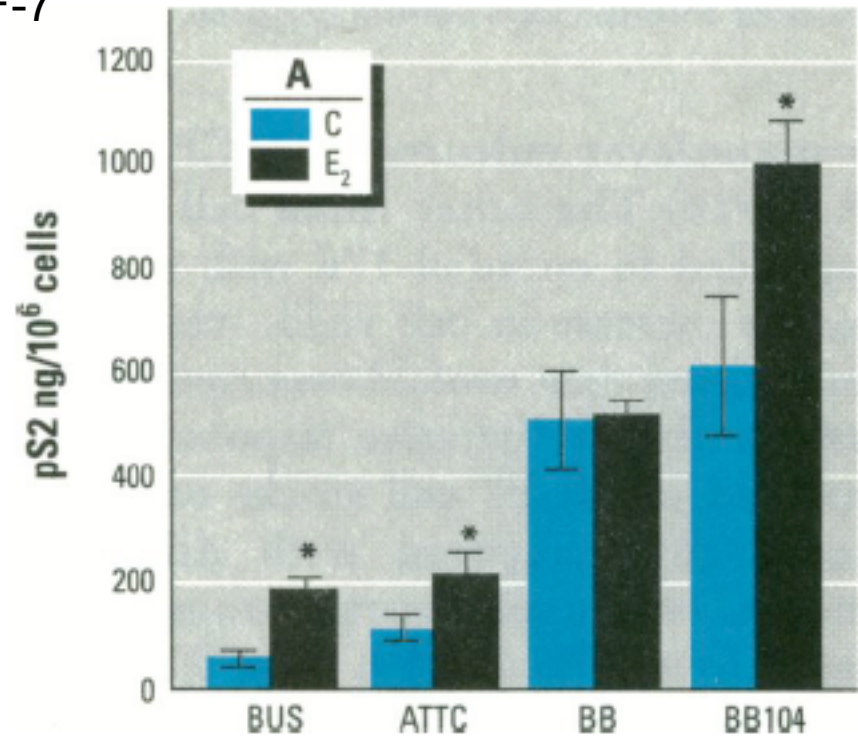
Reportergenassays: Testsysteme

Transgen	Einzeller	Hefe h,r,mER α und h,r,mER β
	Säuger, transient	Ishikawa hER α und hER β
	Säuger, stabil	Hela9903 (hER α), 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

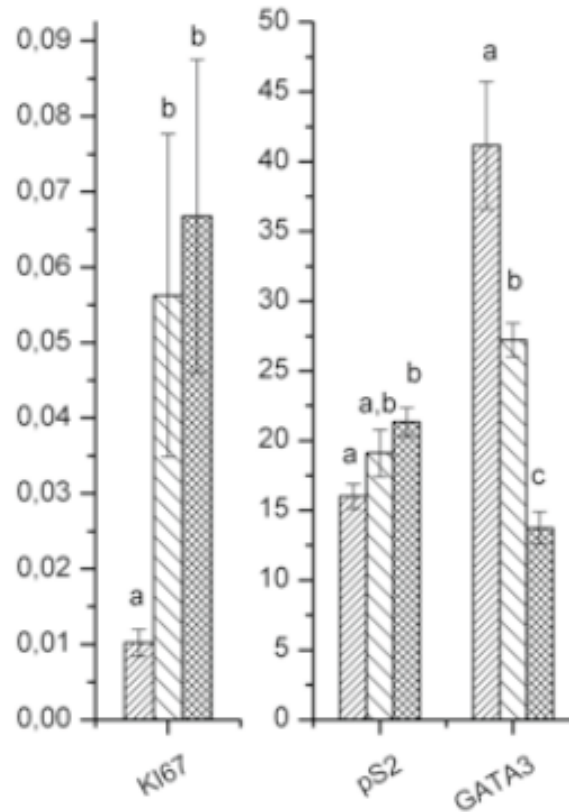
qPCR-Methode

Zieltranskript/HPRT in MCF-7 BUS Zellen

K (0,1% DMSO)

0,1 μ M GEN

1 μ M GEN



Katja Schmalbach,
unpublizierte Daten

Methode: TaqMan TDLA 48 ausgewählte Transkripte

Auswertung: Berechnung N_0 ausgehend von N_{CT}

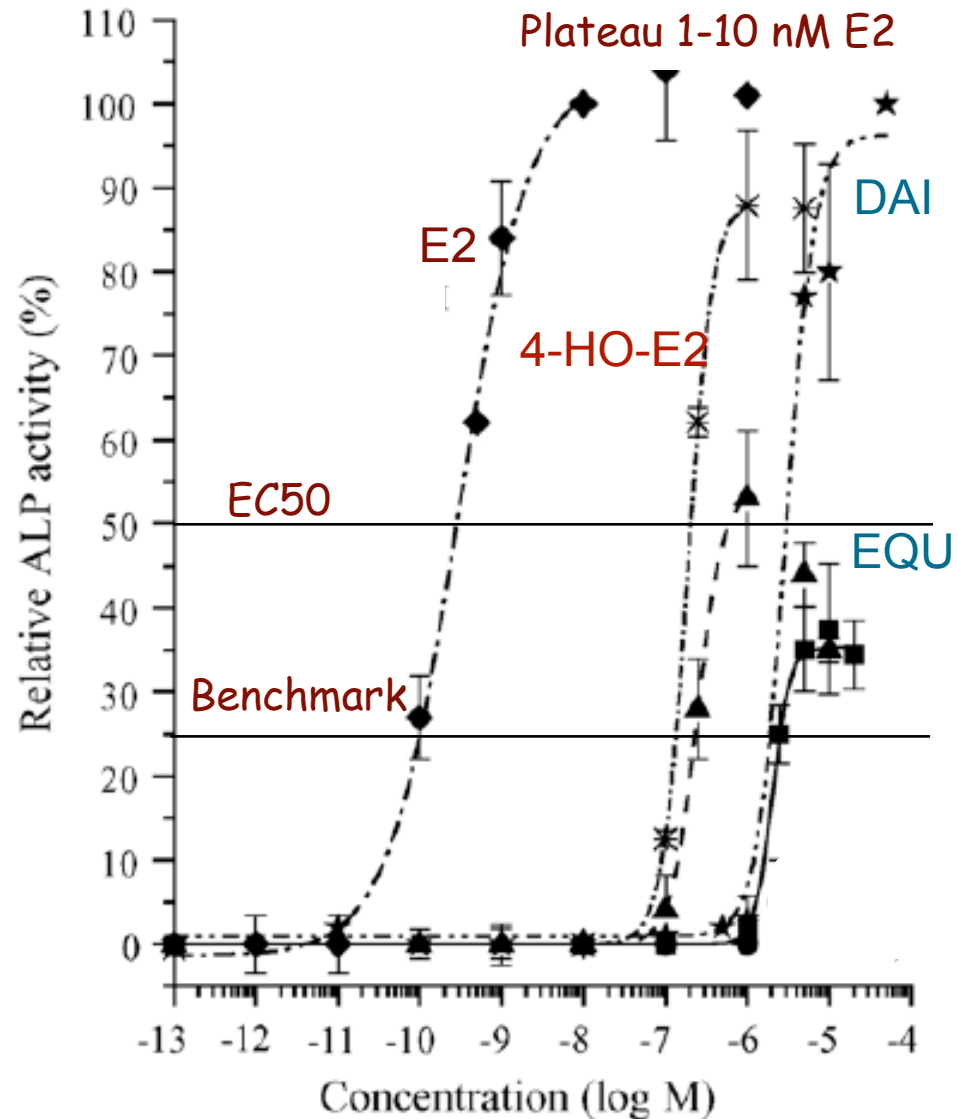
Darstellung: 3 unabhängige Zellkulturexperimente

Prinzip/Varianten

- Proteinaktivität
- Proteinmenge

Einflussfaktoren

- siehe Testsysteme
- Variabilität durch Sublinien
- methodisch ähnlich mRNA



Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

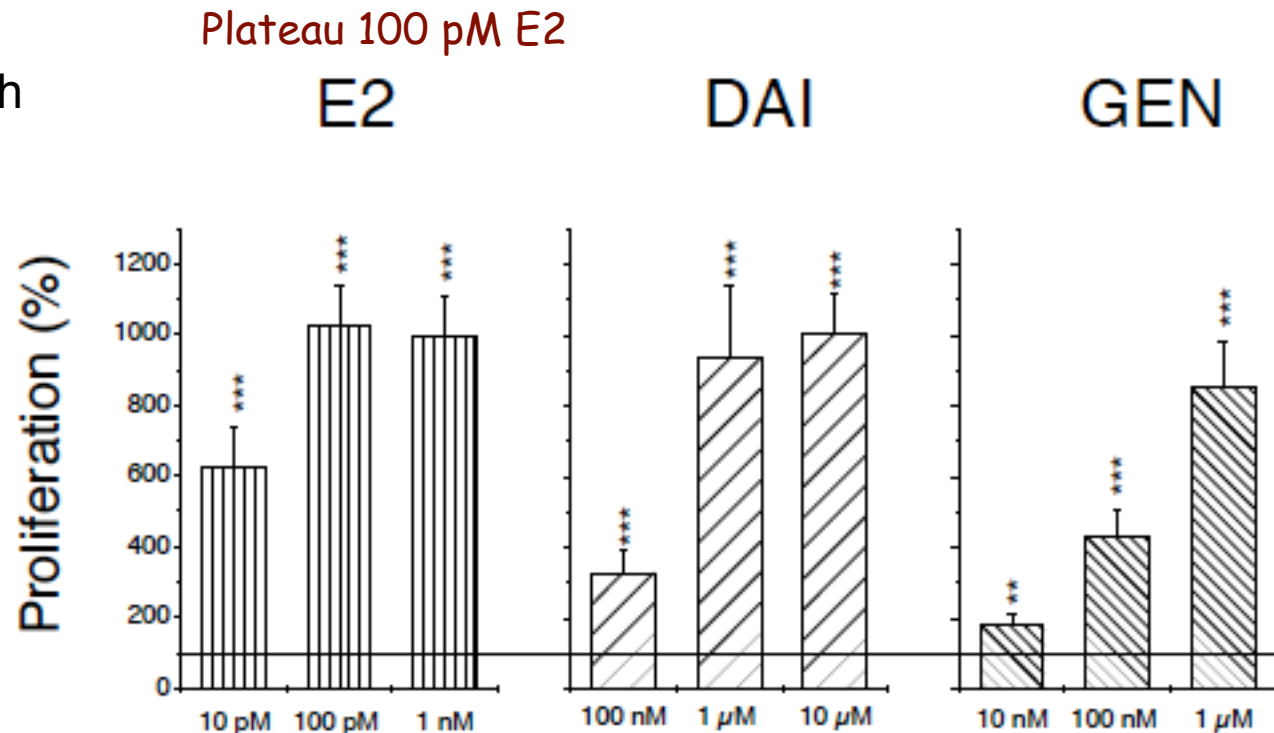
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

Einflussfaktoren

Zellpopulation

Kulturbedingungen



Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

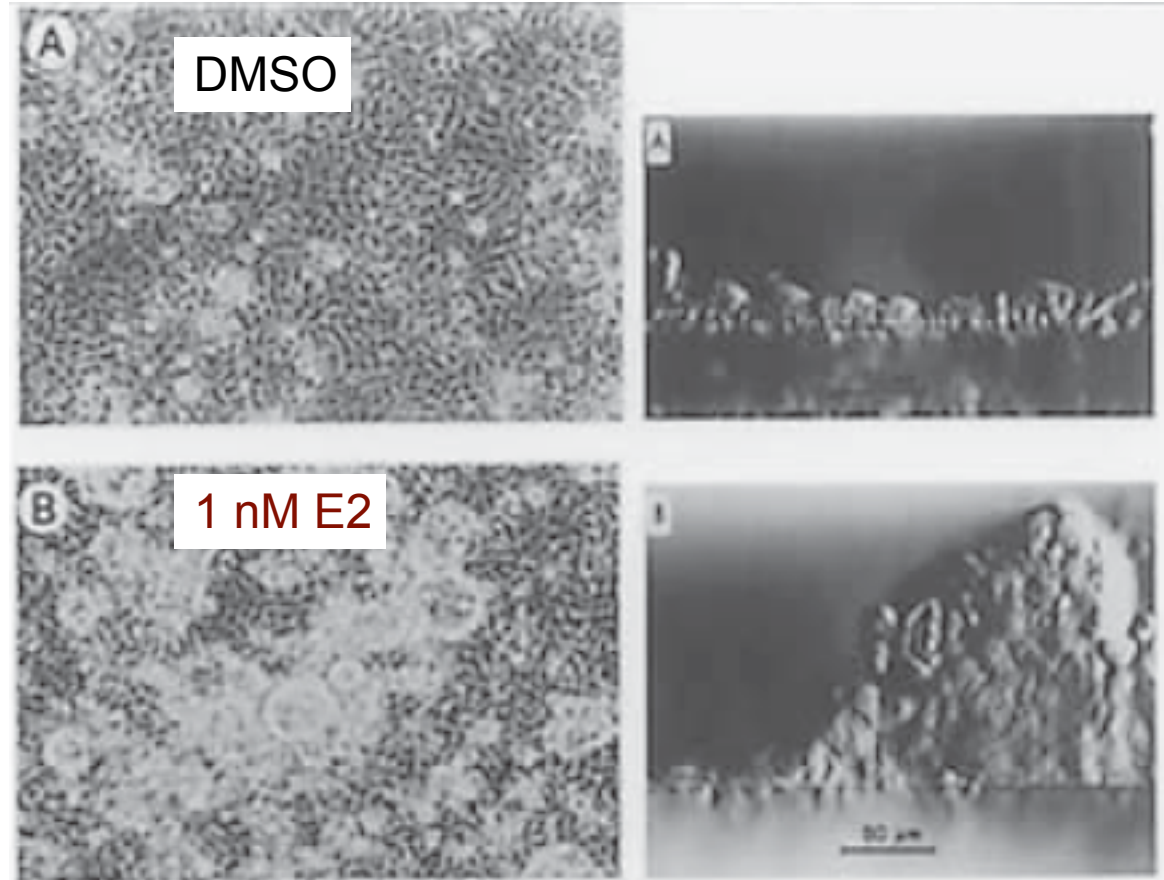
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

Einflussfaktoren

Zellpopulation

Kulturbedingungen



Veränderter Phänotyp

Prinzip/Varianten

Zellzahl

elektronisch

durchflusszytometrisch

photometrisch

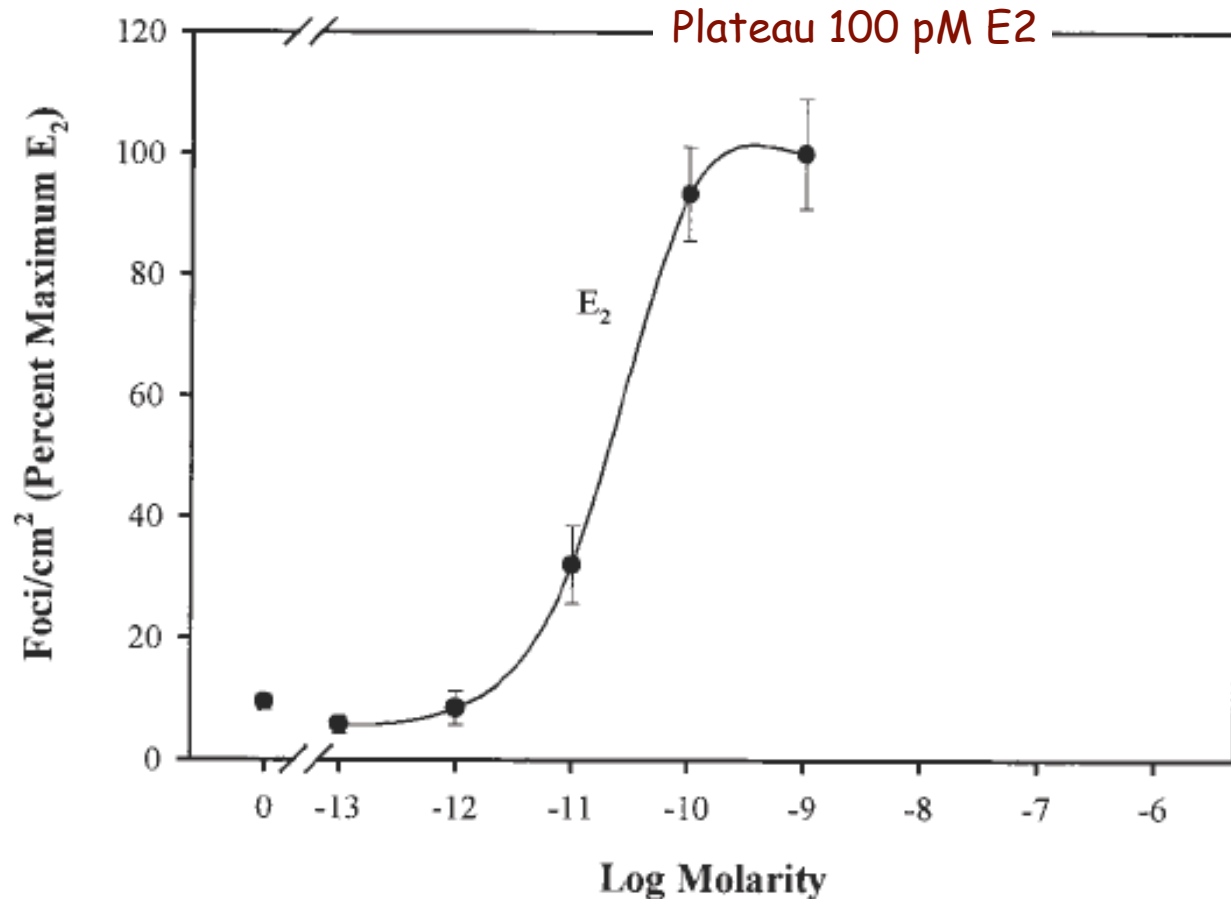
Zellzyklusverteilung

Kontaktinhibition

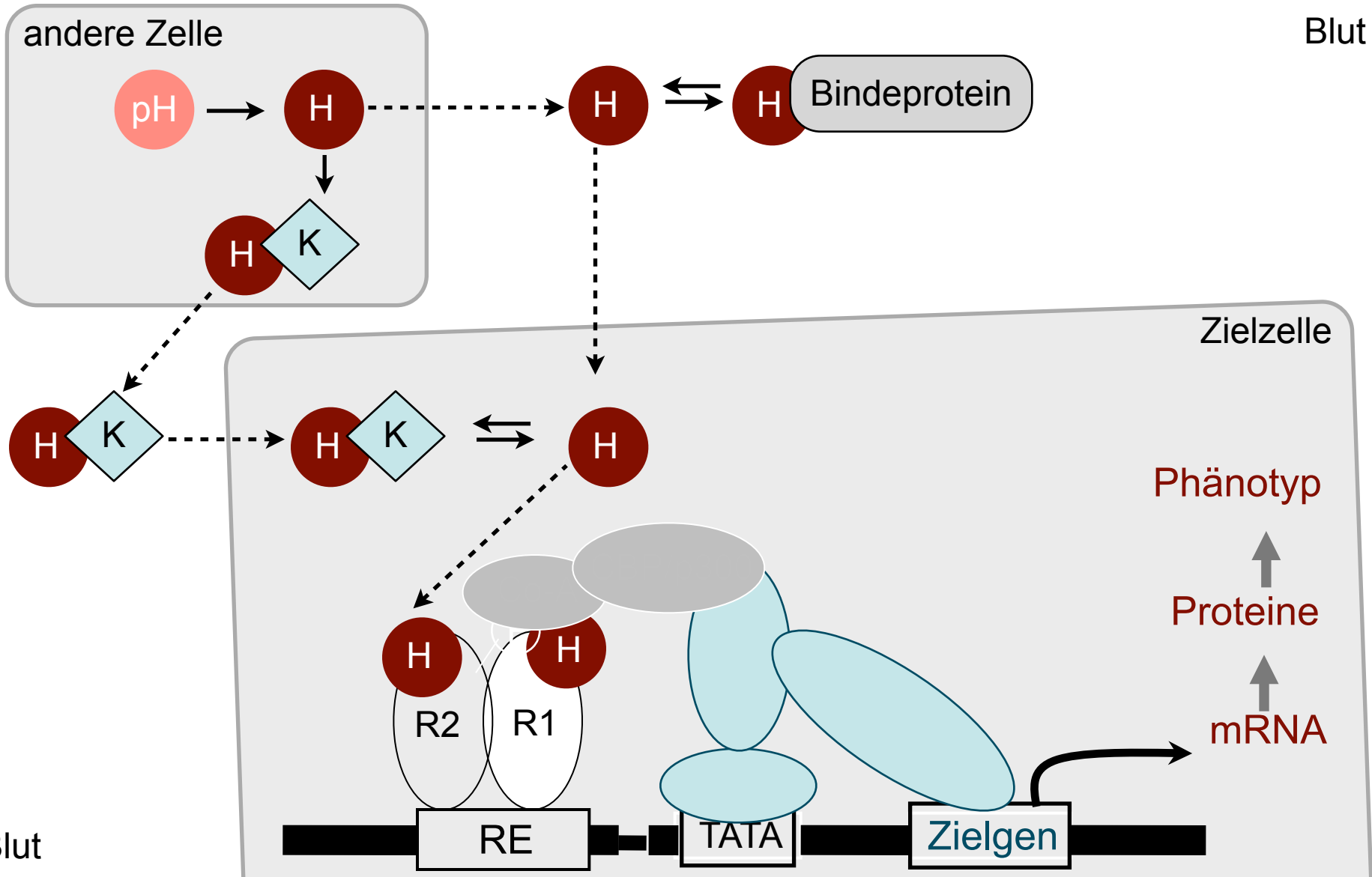
Einflussfaktoren

Zellpopulation

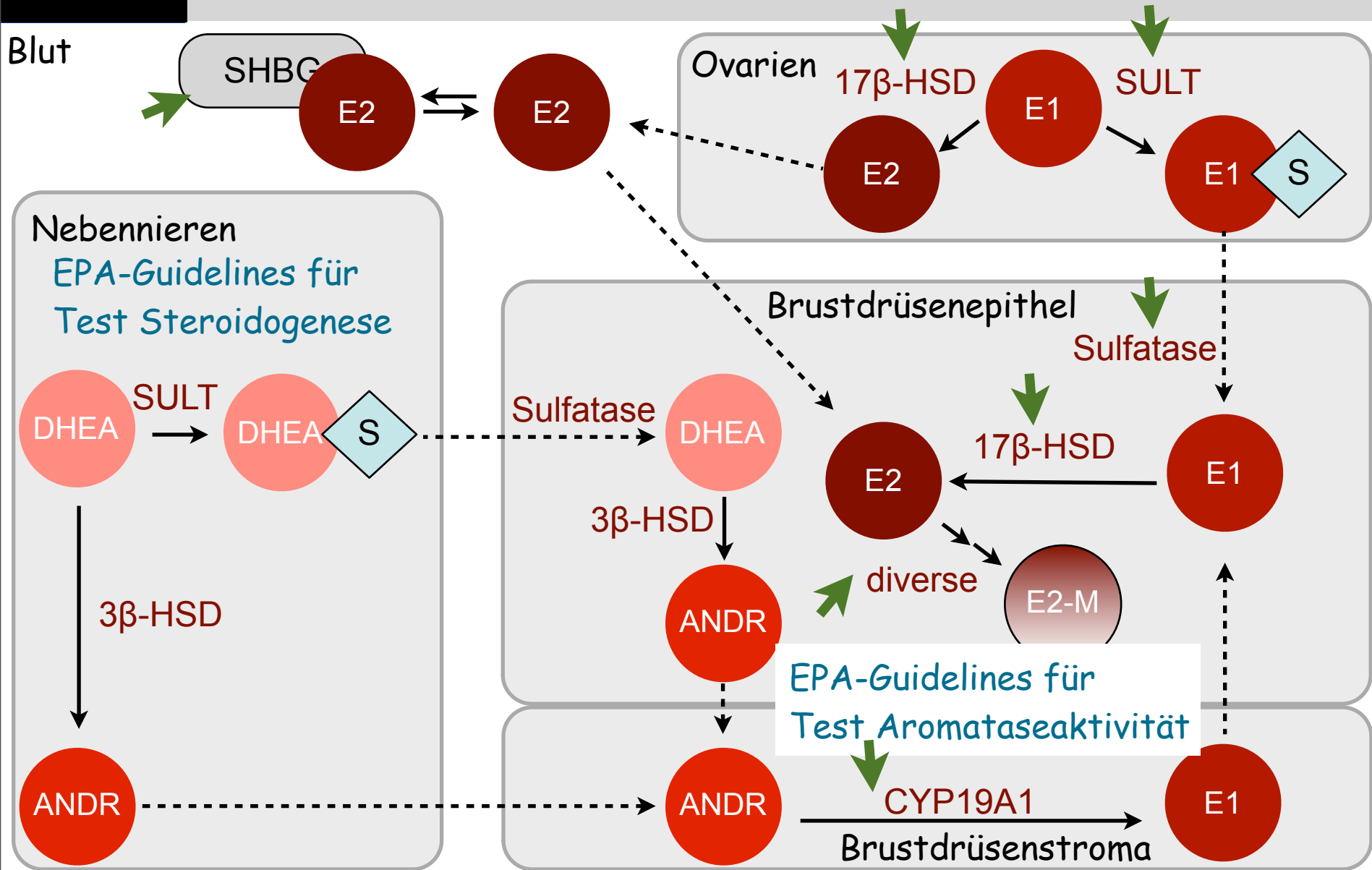
Kulturbedingungen



Achtung Kinetik!



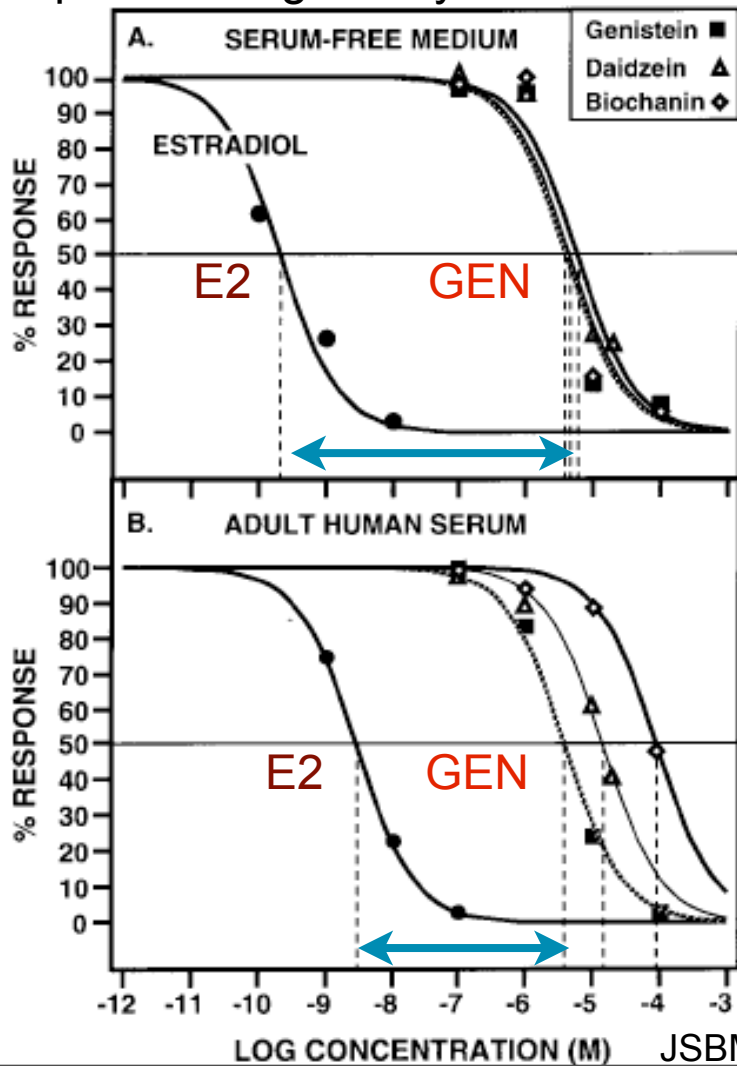
Achtung Kinetik! Beispiel Estrogene



Achtung Kinetik! Beispiel Estrogene

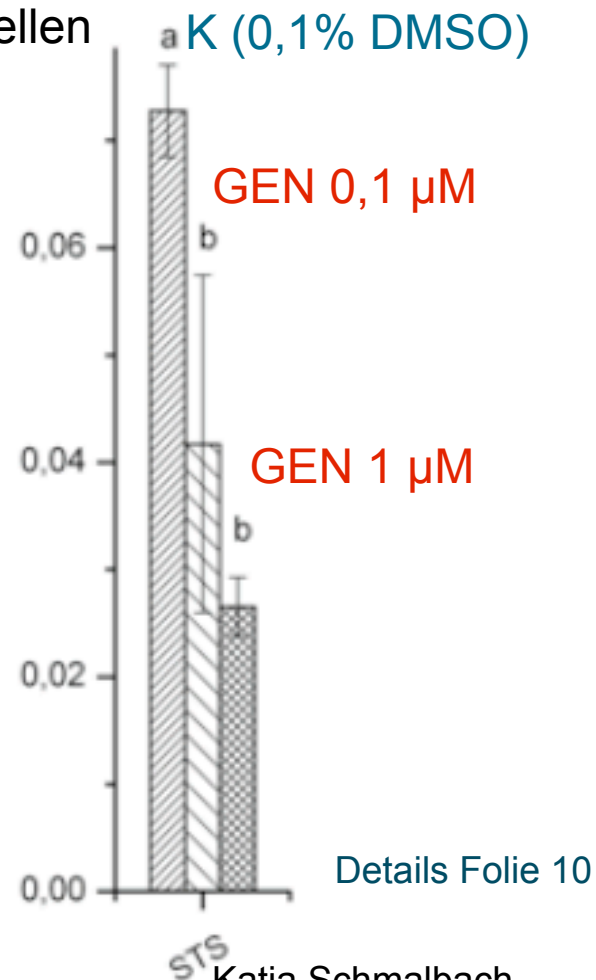
Proteinbindung

Rezeptorbindungsassay



E2-Kinetik in MCF-7 Zellen

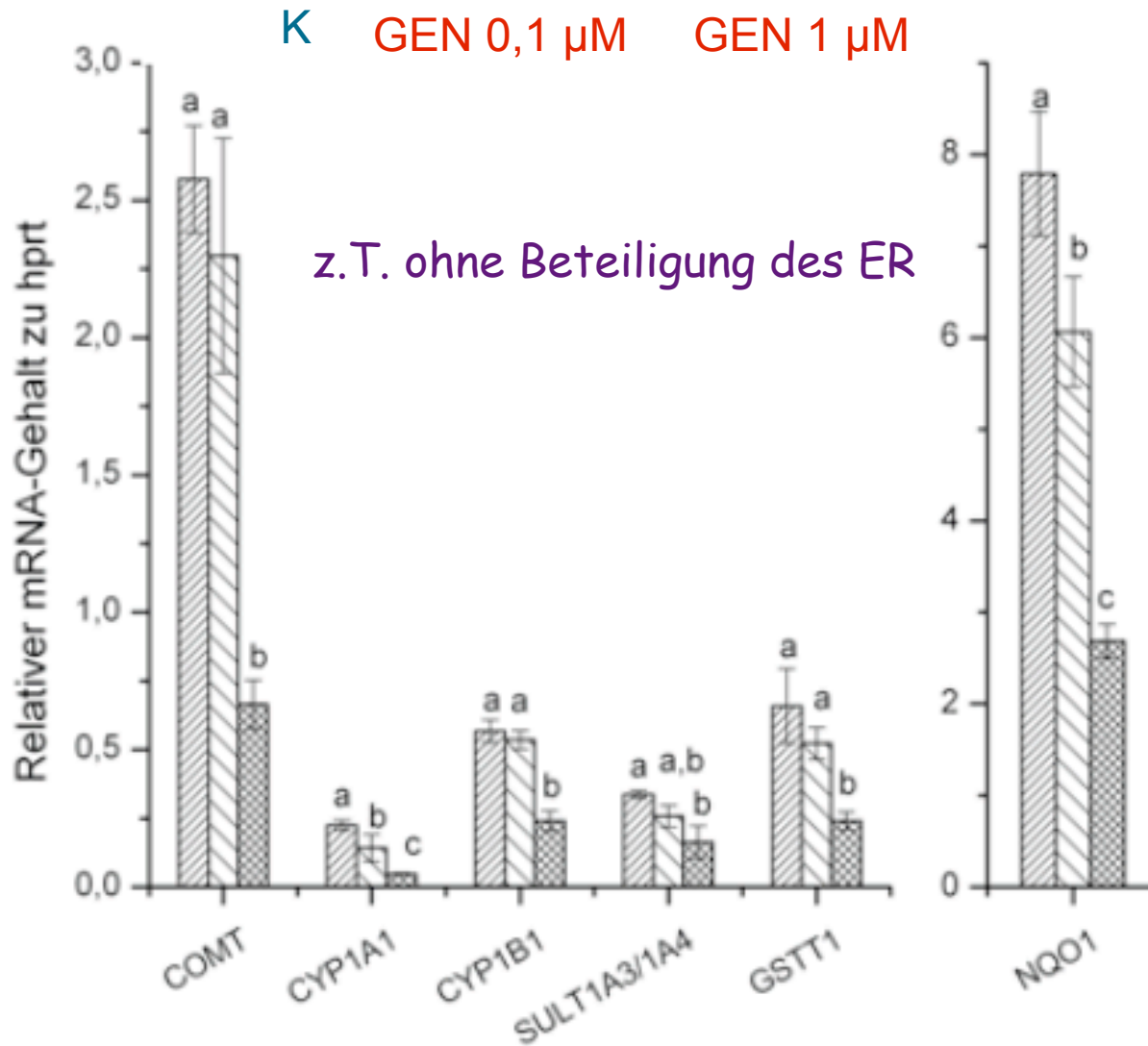
Steroidsulfatase-Transkript/HPRT in MCF-7 BUS Zellen



Details Folie 10

Katja Schmalbach
unveröffentlichte Ergebnisse

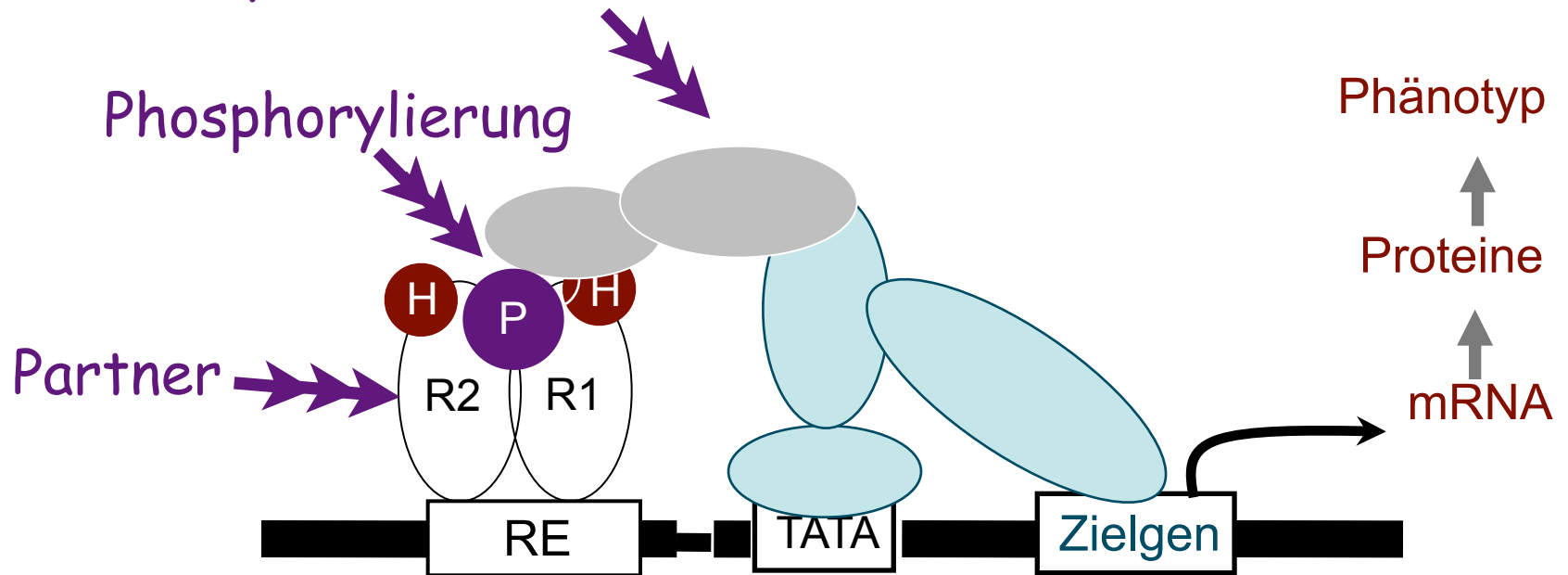
Beispiel E2-Kinetik in MCF-7 Zellen



Achtung Crosstalk!

Aktivierung anderer Signalwege beeinflusst...

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



Herzlichen Dank!

Fragen?