

**Umweltschadstoffe und Fertilität – Untersuchungen zum Einfluss endokrin
wirksamer Chemikalien auf humane uterine Gewebe**

D i s s e r t a t i o n

zum Erlangen des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

angefertigt am

Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie

vorgelegt der

Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Biowissenschaften
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von

Frau Diplom-Biologin
Cornelia Willing
geboren am 08.03.1975 in Jena

Gutachter/in

1. Prof. Dr. H.-J. Ferenz
2. Prof. Dr. J. Dittmer
3. Prof. Dr. T. Klonisch

Öffentliche Promotionsverteidigung: 14.04.2011

Die vorliegende Dissertation wurde im Forschungslabor der Klinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin bzw. des daraus nachfolgendem Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg im Zeitraum vom 01.04.2004 bis zum 19.09.2008 unter der Betreuung von Herrn OAss. Dr. Ewald Seliger, Prof. Dr. Jürgen Dittmer und Prof. em. Gerd-Joachim Krauß angefertigt.

Weitere Ergebnisse wurden in der Zeit vom 20.09.2008-15.01.2010 während eines BMBF- und ZRA-geförderten Forschungsaufenthaltes im Rahmen einer Kooperation des Zentrums für Reproduktionsbiologie und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg im Labor von Prof. Dr. Thomas Klonisch und Frau Dr. Sabine Hombach-Klonisch des Departments for Human Anatomy and Cell Science der Universität Manitoba in Winnipeg, Kanada erarbeitet und sind ebenfalls Bestandteil dieser Arbeit.

Für meine Familie

in Liebe und tiefer Dankbarkeit!

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	1
1.1	Endokrin wirksame Umweltchemikalien (Xenoestrogene)	1
1.1.1	Polychlorierte Biphenyle (PCB)	4
1.1.2	Insektizide, deren Isomere und Metaboliten (β -HCH und p,p'DDE)	6
1.1.3	Xenoestrogene in der Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin	8
1.2	Struktur und Funktion von Estrogenrezeptor alpha und beta (ER α / β)	8
1.3	17 β -Estradiol (E2)-vermittelte Wirkungsweise von Estrogenrezeptoren (ER)	10
1.3.1	Klassischer (genomischer) Wirkmechanismus von ER	10
1.3.2	Nicht-klassische (genomische) Wirkmechanismen von ER	11
1.3.3	Unspezifischer Wirkmechanismus von ER („non-genomic signaling“)	12
1.3.4	Liganden-unabhängige Aktivierung von ER	13
1.3.5	Nebensignaleffekte („crosstalk“) zwischen ER und anderen Signalwegen	13
1.4	Wirkungsweise von Xenoestrogenen	14
1.5	Das humane Endometrium und die Entstehung von Endometriose	16
1.6	Hintergrund und Ziel der Arbeit	19
2	Material und Methoden	20
2.1	Reagenzien	20
2.2	Technische Geräte	20
2.3	Zellkultur	21
2.3.1	Verwendetes Zellmaterial	21
2.3.2	Medienherstellung und Kultur der Zellen	22
2.3.3	Aufarbeitung von Endometriose-Explantaten und deren Primärzellkultur	23
2.3.4	Exposition der Zellen mit den Testsubstanzen	24
2.3.5	Einfrieren und Auftauen von Zellen	24
2.4	Sulforhodamin B Assay (SRBA)	24
2.5	Proliferationsassays	26
2.5.1	Immuncytochemie des Proliferationsmarkers Ki67 (Ki67-Score)	26
2.5.2	Der 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU)-Assay	28
2.6	Reportergenanalysen	29
2.6.1	Transfektion der Zellen mit Plasmiden	31

2.6.2	Luciferase-Reporter-Assay	32
2.7	Proteinchemische Methoden	32
2.7.1	Analyse des klassischen genomischen Estrogen-Signalweges	32
2.7.1.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33
2.7.1.2	Western Blot	33
2.7.2	Analyse des unspezifischen MAPK-vermittelten Signalweges von ER	34
2.8	Quantitative RT-PCR-Analysen	35
2.8.1	Verwendete Primer	35
2.8.2	Isolierung der Gesamt-RNA	36
2.8.3	Agarose-Gelelektrophorese	37
2.8.4	cDNA-Synthese	37
2.8.5	Quantitative Real-Time Polymerasekettenreaktion (qRT-PCR)	38
2.9	Zweikammerfilter-Motilitätsassay	38
2.10	Statistische Auswertung	39
3	Ergebnisse	39
3.1	Xenoestrogenwirkung auf Zellwachstum und Proliferation	39
3.1.1	Sulforhodamin B Assay (SRBA) mit dem ER-Inhibitor ICI 182780	40
3.1.2	Proliferationsverhalten unter Xenoestrogeneinfluss	43
3.1.2.1	Expression des Proliferationsmarkers Ki67	44
3.1.2.1.1	Ki67-Expression in Brustkrebszellen bei An- und Abwesenheit von PCB153 oder E2	44
3.1.2.1.2	Ki67-Expression in hTERT-EEC Zellen bei An- und Abwesenheit von PCB153 oder E2	45
3.1.2.2	BrdU-Assay	46
3.2	Einfluss von PCB153 und E2 auf die ERE-abhängige Promotoraktivität	49
3.3	Xenoestrogenwirkung auf den unspezifischen MAPK-vermittelten Signalweg	51
3.3.1	Sulforhodamin B Assay (SRBA) mit den MEK1/2-Inhibitor U0126	51
3.3.2	Xenoestrogeneinfluss auf die Proteinexpression von Phospho-ERK1/2 und ERK1/2	54
3.4	Einfluss von PCB153 und E2 auf die Protein-Expression von ER α	58
3.5	Einfluss von PCB153 und E2 auf die Genexpression im Uterus	59
5.5.1	Situation im gesunden Uterus (hTERT-EEC-Zellsystem)	59
5.5.2	Situation bei Endometriose (Primärzellen aus Endometriose-Explantaten)	65
5.6	Einfluss von Xenoestrogenen auf die Zellmotilität von hTERT-EEC Zellen	73

4	Diskussion	74
4.1	Xenoestrogen-und E2-vermittelte Proliferation von hTERT-EEC-Zellen	75
4.2	Einfluss von Xenoestrogenen und E2 auf den klassischen ER-vermittelten Signalweg	78
4.3	Einfluss von Xenoestrogen und E2 auf den MAPK-vermittelten ER-Signalweg	81
4.4	Xenoestrogen-und E2-induzierte Veränderungen der Genexpression bei humanen endometrialen Zellen	83
4.4.1	Einfluss von PCB153 und E2 auf hTERT-EEC-Zellen (Situation des gesunden Uterus)	84
4.4.2	Vergleich PCB153- und E2-vermittelter Effekte bei hTERT-EEC Zellen vs. Primärzellen aus Endometriose-Explantaten	94
4.5	Risikopotential von Xenoestrogen innerhalb Hormon-abhängiger Prozesse	97
5	Zusammenfassung	103
6	Literaturverzeichnis	105

Abkürzungsverzeichnis

A.dest.	destilliertes Wasser
AF-1/2	Transaktivierungsfunktion 1 und 2
AhR	Arylhydrokarbonrezeptor
AP1	“activating Protein 1” (Transkriptionsfaktor)
APS	Ammoniumpersulfat
ARNT	“AhR nuclear translocator”
AS	Aminosäure
β-HCH	beta-Hexachlorcyclohexan
bHLH/PAS	„basic helix loop helix PER ARNT SIM”
BSA	Bovines Serumalbumin
BrdU	5-Bromo-2'-Deoxyuridin
Coum	Coumestrol (Phytoestrogen)
COX2	Cyclooxygenase 2
CYP1A1	Cytochrom P450-1A1
DBD	DNA-Bindungsdomäne
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DMEM	Dulbecco´s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DRE	„dioxin response element“ (auch XRE genannt)
DTT	Dithiothreitol
E2	17β-Estradiol
EDC	„endocrine disrupting chemicals“
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF(R)	“epidermal growth factor (receptor)”
ERαβ	Estrogenrezeptor alpha und beta
ERE	„estrogen response element“
ERK1/2	„extracellular regulated kinase 1 and 2“
FBS	„fetal bovine serum“ (fötales Kälberserum)
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
GF(R)	„growht factor (receptor)“, Wachstumsfaktor(rezeptor)
GPR30	G-Protein gekoppelter Rezeptor 30 (auch GPER genannt)

HCH	Hexachlorcyclohexan
HEPES	2-(4-(2Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HPRT	Hypoxanthinphosphoribosyltransferase
HSCORE	„immunohistochemical score“
HSP	„heat shock protein“, Hitzeschockprotein
hTERT-EEC	humane Telomerase-immortalisierte endometriale epitheliale Zellen
ICI 182780	Fulvestrant, Faslodex, ER-Inhibitor
IVF	In Vitro Fertilisation
Ki67	Proliferationsmarker
LBD	Ligandenbindungsdomäne
MAPK	Mitogen- aktivierte Protein Kinase
MMP3	Matrixmetalloprotease 3, Stromelysin-1
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl der Versuche
NF- κ B	„nuclear factor kappa B“
NDL	„not dioxin-like“, Nicht-Dioxin-artig
NO(A)EL	No Observed (Adverse) Effect Level
NR	nukleäre Rezeptor Familie
PAI-1	„plasminogen aktivator inhibitor 1“
PBS	Phosphobuffered Saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCB 153	2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl, Polychloriertes Biphenyl 153
PCDD	Polychlorierte Dibenzo-p-Dioxine
PGE2	Prostaglandin E2
PIPES	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
p,p'DDE	Dichlordiphenyldichlorethen, 1,1-Dichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)ethen
PROG-1	Progesteronrezeptor (A)
RLU	„relative light units“
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
SERM	selektive Estrogenrezeptor-Modulatoren
SDS	Natriumdodecylsulfat
SOCS3	“suppressor of cytokine signaling 3”

SP1	“promotor-specific cellular transcripton factor 1”
SRBA	Sulforhodamin B Assay
qRT-PCR	quantitative Real Time Polymerase Kettenreaktion
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin
TGF- β	“tumor growth factor beta”
TEMED	N,N,N,‘N’-Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
U0126	MEK1/2-Inhibitor
uPA	“urokinase plasminogen activator”
VEGF	“vascular endothelial growth factor”
Vol	Volumen
XRE	“xenobiotic response element” (auch DRE genannt)

International übliche biochemische und physikalische Abkürzungen sind nicht gesondert aufgeführt.

1 Einleitung

1.1 Endokrin wirksame Umweltchemikalien (Xenoestrogene)

Bei Menschen und Tieren sind endokrine Signalwege wesentlich an der Entwicklung, Reproduktion, Wachstum und Reife, Produktion, Verbrauch und Erhalt von Energie, Elektrolyt-Homeostase und Verhalten beteiligt. Störungen bzw. Disruption dieser balancierten Abläufe verursachen Veränderungen im physiologischen Status eines Organismus, vor allem während sensibler Entwicklungsphasen.

Endokrin wirksame Chemikalien, auch „endocrine disrupting chemicals (EDCs)“ genannt (Colborn, 1993) und im weiteren Text als Xenoestrogene bezeichnet, können mit der Produktion, Freisetzung, dem Transport und Abbau, Bindung an Rezeptoren und Wirkung von natürlichen Hormonen lebender Organismen interferieren (Degen and Bolt, 2000; Schlumpf et al., 2004). Dabei können sie sowohl wie körpereigene Hormone (agonistisch), als auch die Hormonwirkung herabsetzend (antagonistisch) wirken. Eine Vielzahl von Xenoestrogenen existiert in unserer Umwelt, von denen innerhalb der EU mehr als 100.000 registriert sind. Organismen sind somit einer ganzen Reihe von Chemikalien ausgesetzt, welche eventuell auf vielen verschiedenen Wegen miteinander agieren (Arnold, 1997; Soto et al., 1994).

Bei Xenoestrogenen handelt es sich um Verbindungen einer sehr heterogenen Stoffklasse von sowohl anthropogener als auch natürlicher Herkunft (Abb. 1.1.1). Bekannt wurden vor allem Chemikalien, die ähnlich dem 17β -Estradiol wirken und deshalb auch als Xenoestrogene bezeichnet wurden. Zu den Xenoestrogenen gehören Stoffklassen wie: Industriechemikalien (z.B. „Dioxine“, Non-Dioxin-ähnliche PCBs und Phtalate), Pestizide (z.B. Lindan, β -Hexachlorcyclohexan [β -HCH] und 1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)-ethan [DDT]), deren Metabolite (wie 1,1-Bis-(4-chlorophenyl)-2,2-dichlorethylen [p,p'DDE]), Arzneimittel (z.B. synth. Estrogene in Kontrazeptiva), verschiedene Zusätze in Kosmetika (z.B. UV-Schutzfilter), Metalloestrogene sowie Mykoestrogene (Zearalenon) und Phytoestrogene (wie Coumestane (Coumestrol) und Isoflavone (Genistein)). „Dioxine“ stellen hierbei einen Sammelbegriff für polychlorierte Dibenzo-p-dioxine (PCDD), Dibenzofurane (F) und Dioxin-ähnliche polychlorierte Biphenyle (PCBs) dar. Diese Stoffe sind ubiquitär verbreitet und in der Lage weit reichende Effekte hervorzurufen (Colborn, 1993; McLachlan, 2001b; Nau, 2006; Propper, 2005), auf welche später genauer eingegangen wird.

Bei den meisten Xenoestrogenen herrscht Unklarheit über entsprechende Dosis-Wirksamkeiten. So können hohe Dosen manche Effekte, welche bei geringen Xenoestrogen-Konzentrationen auftreten, ausschalten und umgekehrt (Jacobs, 2001). Kritisch ist auch das Auftreten bzw. Fehlen von „low dose effects“ trotz Anwendung gleicher Chemikalien und

Modellsysteme zu beurteilen (NIH, 2001). Dementsprechend reicht das abzuschätzende Gesundheitsrisiko, welches von einer Xenoestrogen-Exposition ausgeht, von „katastrophal“ über „nicht erwiesen“ bis hin zu „unbedeutend“.

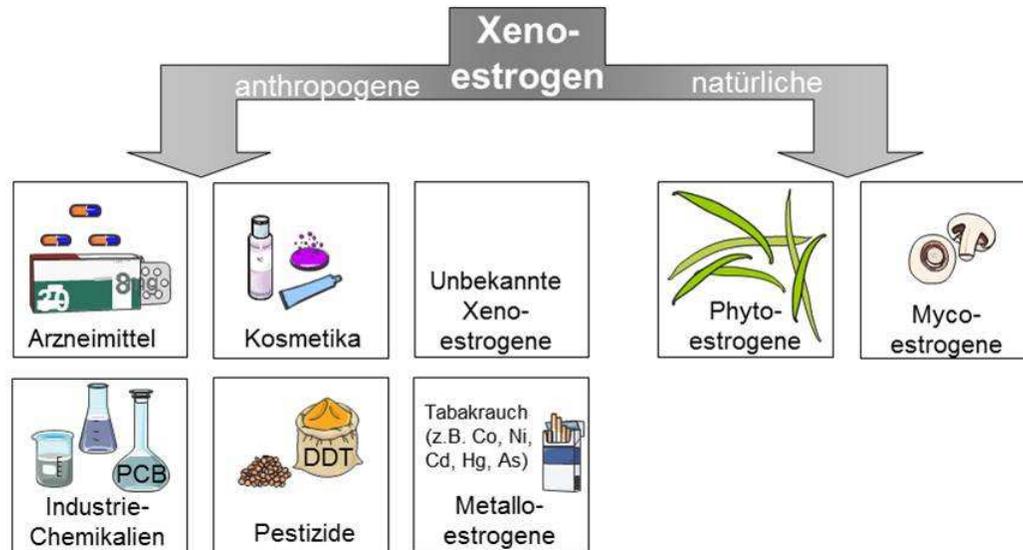


Abb. 1.1.1: Art und Vorkommen von Xenoestrogenen. Vielfältiges Vorkommen von Xenoestrogenen in unserer Umwelt, wobei der anthropogene Anteil den natürlichen überwiegt. Viele dieser Stoffe sind auch in Arzneimitteln, Kosmetika und Tabakrauch oder auch als Phytoestrogene zusammengefasst in Pflanzen und einigen Pilzarten enthalten. As: Arsen, Co: Kobalt, Cd: Kadmium, DDT: Dichlorodiphenyltrichloroethan, Hg: Quecksilber, Ni: Nickel, PCB: Polychlorierte Biphenyle.

Durch die Lipophilie vieler Xenoestrogene werden diese innerhalb der Nahrungskette angereichert und meist lebenslang in adipösen Geweben im Körper vieler Organismen gespeichert (Needham et al., 2005). Durch diesen lipophilen Charakter und der damit verbundenen biologischen Beständigkeit vieler Xenoestrogene, besitzen sie zusammen mit einer aktiven Ausbreitungsdynamik durch z.B. Wind und Meeresströmungen eine hohe Persistenz im Stoffkreislauf von Umwelt und Organismen (Abb. 1.1.2) (Böhlmann, 1991). Dabei finden sich z.B. PCBs in niederchlorierter Form vorwiegend in der Dampfphase. Mit zunehmender Chlorierung kommt es vermehrt zur Partikelbindung, wodurch sie über die Luft verbreitet werden können. Durch nasse oder auch trockene Deposition gelangen sie schließlich in Gewässer, Pflanzen und Böden. Da Oberflächengewässer den größten Anteil der Erde bilden, sind aquatische (marine und limnische) Ökosysteme und die darin lebenden Organismen durch Xenoestrogene besonders betroffen (Bucheli and Fent, 1995; Goksøyr, 1995; Payne and Penrose, 1975). Vor allem aber bei in der Nahrungskette weit oben stehenden Räubern wie Zahnwalen, Robben und Eisbären, zeigen Untersuchungen hohe Bioakkumulationen von Xenoestrogenen in den meist dick ausgebildeten Fettschichten. In einem bereits 1997 veröffentlichten Report wird von einem polwärtsgerichteten Transport dieser persistenten Stoffe durch atmosphäri-

sche Prozesse sowie von deren Effekten berichtet (AMAP, 1997; Macdonal et al., 2000). Dadurch kommt es zusätzlich zur bereits bestehenden Belastungssituation der Organismen, verstärkt zur Akkumulation dieser Stoffe in den sensiblen Polarregionen.

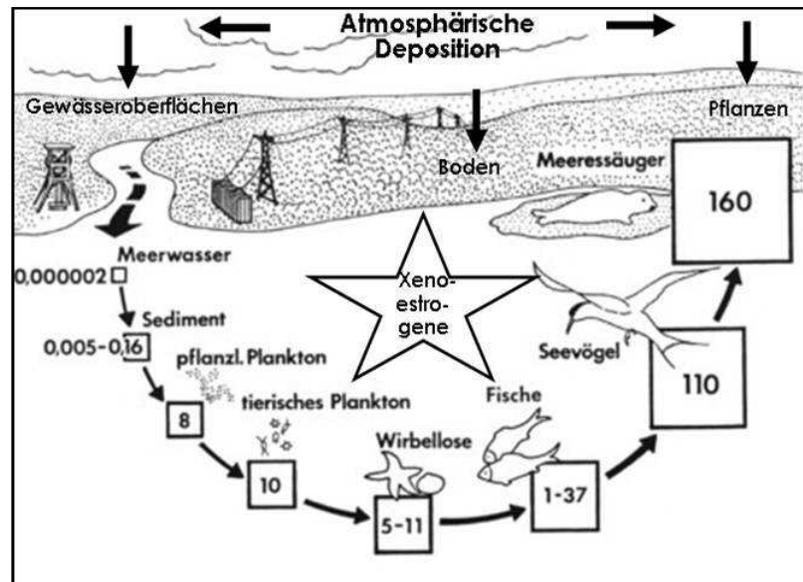


Abb. 1.1.2: Kreislauf von Xenoestrogenen und deren Bioakkumulation. Weltweite Verbreitung der ubiquitär vorkommenden Xenoestrogene, hierbei verteilen sich Xenoestrogene hauptsächlich über atmosphärische Deposition, gelangen in den Boden, Pflanzen, das Meerwasser und dessen Bewohner. Der Mensch nimmt Xenoestrogene vor allem über belastete Lebensmittel (z.B. Fisch) auf, wodurch sie im Körper v. a. im Fettgewebe, Leber, Blut und der Gebärmutter-schleimhaut angereichert werden können; Angegebene Zahlen sind Beispiele für die Belastung von Organismen mit gesamtPCBs (Gehalt in mg/l bzw. mg/kg Fett); modifizierte Darstellung nach Böhlmann et al., 1991.

Der Mensch kommt hauptsächlich über die Nahrungskette mit diesen Verbindungen in Kontakt. Vor allem Kinder sind nicht nur intrauterin während sensibelster Entwicklungsphasen durch die mütterliche Körperbelastung sondern auch nach der Geburt über die Muttermilch Xenoestrogenen gegenüber exponiert. Nach oraler Aufnahme werden Xenoestrogene in Abhängigkeit von der Chloratomanzahl vom Organismus nur langsam metabolisiert. Xenoestrogene und deren Metaboliten gelangen vor allem in die Leber, wo sie in Hepatocytin durch Detoxifikationsschritte des Fremdstoffmetabolismus zuerst oxidiert (Phase I), dann konjugiert (Phase II) und schließlich ausgeschieden werden können (Abb. 1.1.3). Während dieser Detoxifikationsschritte (z.B. Glukuronidierung) wird die Lipophilie dieser Substanzen meist so weit herabgesetzt, dass sie wasserlöslich werden, wobei größere Moleküle über die Gallendarm-Passage bzw. kleinere via Niere ausgeschieden und nicht rückresorbiert werden.



Abb. 1.1.3: Prinzip der Biotransformation bei Benzol.

In zahlreichen humanen Geweben und Körperflüssigkeiten wie Leber, Blut und - wie Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen konnten - auch in der Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium), zeigen sich Anreicherungen von verschiedenen Xenoestrogenen (Seliger et al., 1995). Gegenwärtige Belastungsrisiken für den Menschen stellen vor allem die Aufnahme solcher Stoffe über die Nahrung, Atmung und Haut dar. Da die Zufuhr von Xenoestrogenen größer ist als deren Abbau und Ausscheidung durch den Körper realisiert werden kann, steigt die Belastung des Körpers mit zunehmendem Lebensalter.

1.1.1 Polychlorierte Biphenyle (PCB)

PCB gehören zu den halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen mit der allgemeinen Summenformel $C_{12}H_{10-n}Cl_n$. Sie repräsentieren eine Stoffklasse mit insgesamt 209 Einzelverbindungen (Kongeneren), welche alle eine gemeinsame Grundstruktur, den mehr oder weniger chlorierten Biphenylring (Abb. 1.1.1 A) besitzen. Die einzelnen Kongenere unterscheiden sich in der Anzahl bzw. Position der Chloratome und der räumlichen Stellung der beiden Phenylringe zueinander. Gemeinsam führen diese Unterschiede zu den jeweiligen physikalischen, chemischen bzw. toxikologischen Eigenschaften (biologische Aktivität) der Kongenere. Durch Einführung einer fortlaufenden

Nummerierung der Einzelnen Kongenere nach Anzahl und Position der Chloratome, konnte die bestehende Nomenklatur der PCBs stark vereinfacht werden (IUPAC-Nomenklatur; (Ballschmiter and Zell, 1980). Insgesamt können am Biphenylgerüst bis zu 10 Chloratome angelagert sein, wodurch der Chlorgehalt von 18-75% variieren kann.

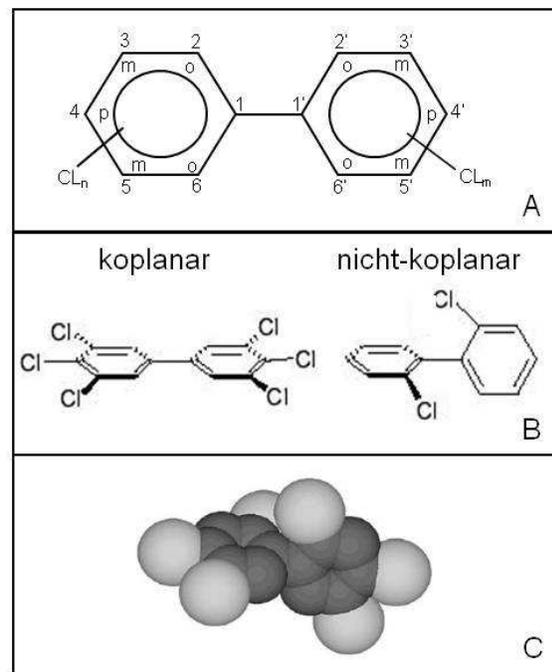


Abb. 1.1.1.1: Struktur von PCBs

A: PCB-Modell nach Koopmann-Esseboom (1990)
 B: räumliche Stellung der Phenylringe, welche zusammen mit Anzahl und Position der Chloratome die jeweilige biologische Aktivität bedingen.
 C: 2,2',4,4',5,5'-Hexachlor-Biphenyl (PCB 153).

Tierexperimentelle Untersuchungen mit einzelnen Kongeneren haben gezeigt, dass eine Unterteilung der Kongenere nach der Häufigkeit des Auftretens einer ortho-Substitution toxikologisch sinnvoll ist. So bezeichnet man nicht-ortho-substituierte PCBs durch ihre Fähigkeit an den Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) zu binden auch als „Dioxin-artige“ PCBs. Diese koplanaren PCB (77, 126 und 169) verhalten sich durch ähnliche Konformität wie das bekannte 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Zur Risikobewertung dieser Kongenere mit dioxinartiger (DL-) Wirkung und deren Gemische, d.h. Kongenere mit einer Affinität zum Arylhydrokarbonrezeptor (AhR), hat sich das TEQ-Konzept bewährt (Kannan, 1988). Ein vergleichbares System zur Einstufung von nicht-Dioxin-artigen (NDL-) PCBs ist nicht vorhanden. Dies beruht vor allem auf der zum Teil nur unzureichend geklärten Datenlage der molekularen Spezies- und Zell-spezifischen Wirkmechanismen dieser Verbindungen.

Beide Klassen beinhalten tumorpromovierende PCB-Kongenere. Aufgrund der hohen Kongenerezahl werden PCBs zur toxikologischen Risikobewertung auch in funktionelle Gruppen (I-III) eingeteilt: Gruppe I [estrogene PCBs: 44, 49, 52, 101, 174, 177, 187, 201]; Gruppe II [antiestrogene, immunotoxisch, CYP1A-induzierend, dioxinartige (DL-) PCBs: 126]; Gruppe III [sehr persistent, CYP1A1 und CYP2B induzierend vom Phenobarbital-Typ, nicht-dioxinartig (NDL-) PCBs: 99, 153, 180, 183, 196, 203] (Wolff, 1997).

PCB kommen in unserer Umwelt natürlicher Weise nicht vor, sondern wurden durch den Menschen in die Umwelt eingebracht. Seit ihrer Erstsynthese 1881 und dem Beginn der industriellen Herstellung von PCBs ab 1929, wurde weltweit eine Gesamtmenge von ca. 1,5 Mio. Tonnen dieser Verbindungen produziert (Ivanov and Sandell, 1992; Rantanen, 1992).

Aufgrund ihrer besonderen thermischen Stabilität, chemischen Beständigkeit gegenüber Säuren und Alkalien, guten dielektrischen Eigenschaften und einer vergleichsweise einfachen und preiswerten Herstellung, fanden sie ein breites Anwendungsspektrum. So wurden sie z.B. als Isolierflüssigkeiten in Transformatoren und Kondensatoren; Imprägniermittel; Weichmacher in Kunststoffen; Flammschutzmittel in Wandfarben, Lacken und Klebstoffen oder als Industriefette und -öle verwendet. Nachdem die Umweltrelevanz von PCBs erkannt wurde, kam es 1977 (USA) und 1983 (Deutschland) zum völligen Produktionsstopp. Seit 1989 sind die Herstellung, der Im- und Export sowie die generelle Verwendung von PCBs in offenen sowie geschlossenen Systemen verboten. Schließlich sollen bis zum 31.12.2010 alle PCB-haltigen Geräte entsorgt werden sein.

Viele Untersuchungen zur toxischen Wirkung von PCBs auf den Menschen beruhen auf Unglücksbefunden. Bei Massenvergiftungen durch den Verzehr von PCB-belastetem Reisöl in Japan (1968) und Taiwan (1979) zeigten viele Menschen Vergiftungssymptome wie Chlorak-

ne, Hyperpigmentierung und Ödeme im Gesicht sowie Müdigkeit, Sehstörungen und Taubheitsgefühle in den Extremitäten (Kuratsune, 1987; Safe, 1992). Außerdem zeigten Nachkommen PCB-exponierter Mütter ebenfalls Hyperpigmentierung (Cola-Babies), ein verringertes Geburtsgewicht, dentale und ossale Störungen, Entwicklungsstörungen mit u.a. signifikant gestörtem Lernverhalten und viele andere Defekte (Jacobson, 1997; Rylander and Hagmar, 1995; Rylander, 1995b). Bei männlichen Betroffenen fand sich eine erhöhte Mortalität durch Leber-, Magen- und Lungenkarzinome. Ursache für die Unglücke waren Defekte von PCB-gefüllten Wärmetauschern bei der Herstellung von Reisöl. Die betroffenen Personen nahmen dabei über Monate hinweg PCB-Dosen in Höhe von ca. 700-1800 mg/Tag auf. Auch andere Studien PCB-exponierter Arbeiter konnten ähnliche Vergiftungssymptome und eine Zunahme der Sterblichkeit an Leberkarzinomen beobachten (Brown, 1987). Aber auch im Zusammenhang mit neurodegenerativen Erkrankungen wie Parkinson müssen PCBs genannt werden (Corrigan et al., 1998; Schulte et al., 1982).

1.1.2 Insektizide, deren Isomere und Metaboliten (β -HCH und p,p'DDE)

Lindan, das gamma-Isomer des Hexachlorcyclohexans (γ -HCH), wurde in der Land- und Forstwirtschaft als Fraß-, Kontakt- oder Atemgift hauptsächlich gegen Käferbefall verwendet. Seit 1977 ist die Anwendung technisch hergestellten HCH in Deutschland verboten und für Lindan besteht seit 1980 ein beschränktes Anwendungsverbot. In der DDR dauerte der Eintrag von HCH in die Umwelt noch bis Mitte der 1980er Jahre an. Nach der EU-Verordnung 850/2004 durfte Lindan nur noch bis Ende 2007 in Europa als Insektizid eingesetzt werden. Lindan ist heute noch in der Medizin gegen Hautparasiten, vornehmlich in Cremes, Lotionen oder Shampoos bei der Behandlung von Krätzmilben sowie von Flöhen oder Läusen im Einsatz. In der Natur ist Lindan moderat bis nicht-toxisch für Vögel, jedoch hoch bis akut toxisch für viele Insekten sowie für Fische und andere aquatische Spezies. Der genaue Wirkmechanismus von Lindan ist noch immer

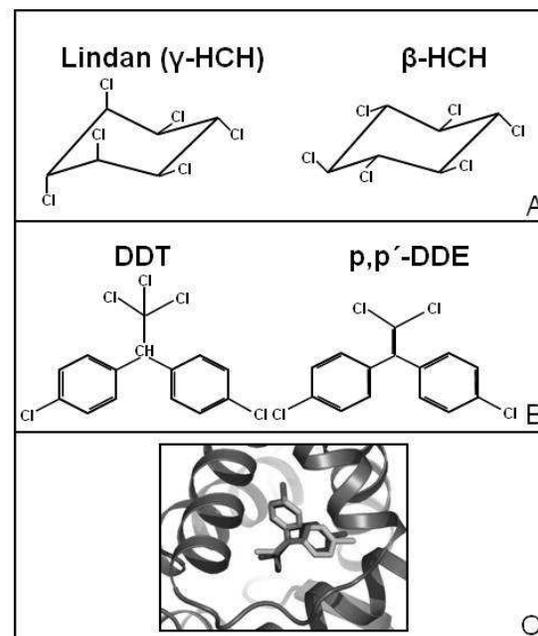


Abb.1.1.2.1: Struktur von Insektiziden, deren Isomeren und Metaboliten. A: Struktur von Lindan (γ -HCH) und seinem Isomer β -HCH; B: Strukturdarstellung von Dichlordiphenyltrichloroethan (DDT) und seinem am häufigsten in der Umwelt verbreiteten Metaboliten p,p'-Dichlorodiphenyldichloroethylen (p,p'-DDE); C: mögliche räumliche Anordnungen von p,p'-DDE in der Ligandenbindungstasche von ER α (aus D'Ursi et al., 2005).

nicht genau bekannt. Technisch hergestelltes HCH repräsentiert ein Isomeren-gemisch und besteht aus α -HCH (65-70%), β -HCH (20%), γ -HCH (ca 15%) und δ -HCH (1-2%). Von den fünf Isomeren ist nur γ -HCH für die insektizide Wirkung verantwortlich (Abb.1.1.2 A). Die einzelnen Isomere sind unterschiedlich akut und chronisch toxisch. β -HCH besitzt durch die symmetrische Struktur einen unpolaren und somit sehr lipophilen Charakter, wodurch sich β -HCH in der Nahrungskette anreichert und vor allem im Fettgewebe von Mensch und Tier nachgewiesen werden kann.

Ein weiteres sehr häufig angewendetes Insektizid ist Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT), welches seit den 1940er Jahren ebenfalls als Kontakt- und Fraßgift eingesetzt wurde. Wegen seiner guten Wirksamkeit gegen Insekten, seinen geringen Toxizität für Säugetiere und der einfachen Herstellung wurde es zur Schädlings- und Malariabekämpfung jahrzehntelang weltweit am häufigsten verwendet. Es finden sich viele Beispiele, in welchen sich die hormonähnlichen Wirkungen von DDT und seinen Metabolite widerspiegeln. DDT ist in der Lage die Eischalendicke bei Vögeln zu reduzieren. Dies führte bis Ende der 1970er Jahre u.a. zum Aussterben des Wanderfalken in weiten Teilen Europas und der USA. Weltweit ist die Herstellung und Verwendung von DDT seit Inkrafttreten der Stockholmer Konvention im Jahr 2004 nur noch zur Bekämpfung von krankheitsübertragenden Insekten zulässig.

Wegen seiner chemischen Stabilität und guten Fettlöslichkeit reichern sich DDT und seine Metaboliten in der Nahrungskette an und akkumuliert in Geweben von Tieren und Menschen. Bei Säuglingen unterscheiden sich die Gesamt-DDT-Gehalte nicht von denen der Erwachsenen. Kinder können DDT-Isomere bereits via Plazenta und Muttermilch aufnehmen. Man schätzt, dass der Abbau und die Elimination von dem in der Umwelt befindlichen DDT mehrere Jahrzehnte benötigt (Calabrese, 1982). Das p,p'-DDE ist der in der Umwelt persistenteste DDT-Metabolit (Abb.1.1.2.1 B und C). In Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnten für p,p'-DDE, im Vergleich zu anderen nachgewiesenen Xenoestrogenen wie PCB153 oder β -HCH, die höchsten Werte gemessen werden [Fettgewebe > Endometrium > Muskulatur > Blutserum] (Seliger et al., 1995).

1.1.3 Xenoestrogene in der Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin

Die anthropogene Umwelt liefert eine Vielzahl von Stoffen die entweder selbst Hormoneigenschaften besitzen oder mit körpereigenen Hormonen sowie deren Rezeptoren wechselwirken. Bereits seit den 1960er Jahren gibt es viele Hinweise auf Zusammenhänge zwischen endokrin wirksamen Umweltchemikalien und dem gehäuftem Auftreten von Reproduktionsstörungen (Bhatt, 2000; McLachlan, 2001b). So sind PCBs z.B. in der Lage, die Oocyten-Maturation bei

Säugetieren zu stören (Gandolfi et al., 2002) und DDT und seine Metabolite können die Genexpression von humanen uterinen Zelllinien verändern (Frigo, 2002). Einen Zusammenhang zwischen dem Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) und der Entstehung von Endometriose konnte Rier et al. bereits 1993 im *in vivo*-Tiermodell bei chronisch dioxinbelasteten Rhesusaffen dosisabhängig zeigen.

Der Zusammenhang zwischen Xenoestrogen und dem Auftreten verschiedener Karzinome ist in der Literatur sehr widersprüchlich bewertet. Dies liegt vor allem an den verschiedenen Mechanismen der Karzinogenese, unterschiedlichen Bedingungen innerhalb betroffener Gewebe aber auch an der pleiotrophen Natur von Xenoestrogenen. Es gibt aber Hinweise, dass z.B. PCBs die Aktivität des Tumorsuppressorgens BRCA1 bei MCF7 und MDA-MB-231 downregulieren (Rattenborg et al., 2002) und Lebertumor-Promotoren bei Mäusen darstellen können (Strathmann et al., 2006).

1.2 Struktur und Funktion von Estrogenrezeptor α und β (ER $\alpha\beta$)

Im Allgemeinen werden estrogene Effekte über zwei spezifische Steroidhormonrezeptoren vermittelt: den Liganden-induzierten Transkriptionsfaktoren (TF) Estrogenrezeptor alpha und beta (ER $\alpha\beta$). Beide Rezeptoren sind in zwei separaten Genen, ESR1 und ESR2, codiert und auf den Chromosomen 6 und 14 lokalisiert (Enmark et al., 1997; Menasce et al., 1993).

Der schematische Aufbau der zur NR-Superfamilie gehörigen ER und das Maß an Sequenzhomologie zwischen den beiden Rezeptoren wird in Abb. 1.2.1 dargestellt. Beide Rezeptoren sind aus sechs funktionellen Gruppen aufgebaut (A-F). Die N-terminale Domäne A/B zeigt zwischen beiden Rezeptoren große Unterschiede und beinhaltet die Transaktivierungsfunktion 1 (AF-1). Die Aktivität der AF-1 kann sowohl Liganden-abhängig als auch -unabhängig sein. Sie ist konstitutiv aktiv (Berry, 1990) und äußerst Zelltyp-spezifisch (Katzenellenbogen and A 2000).

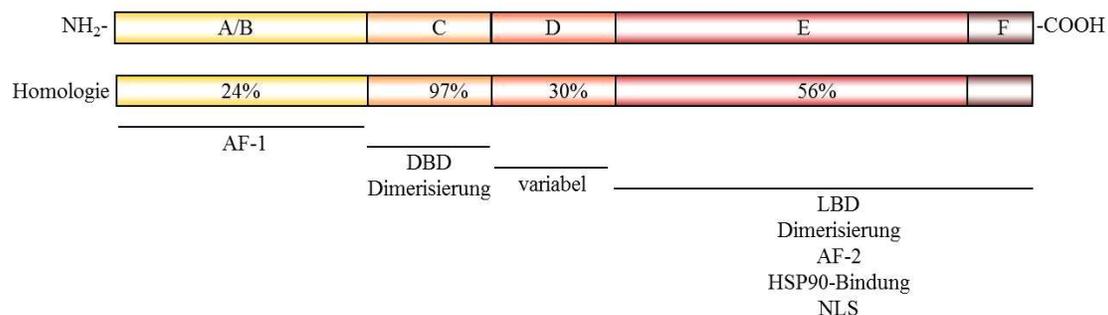


Abb. 1.2.1: Schematische Darstellung funktioneller Domänen von Nuclearen Rezeptoren (NR) am Beispiel des Estrogenrezeptors (ER) sowie Sequenzhomolgien von ER α und β . Die in 6 Domänen (A-F) eingeteilten NR, mit A/B: Transaktivierungsfunktion 1 (AF-1); C: DNA-Bindungsdomäne (DBD); D: variable hinge-Region; E: Domäne beinhaltet: Ligandenbindungsdomäne

(LBD), Transaktivierungsfunktion 2 (AF-2), HSP90: heat shock protein 90-Bindungsstelle und NLS: nukleäres Lokalisationssignal; F: C-terminale Domäne ohne bekannte Funktion; Prozentangaben der Sequenzübereinstimmungen zwischen ER α und β .

Der von selektiven Estrogenrezeptor-Modulatoren (SERMs) ausgehende und in Brust und Uterus auftretende, partiell antagonistisch/agonistische Effekt von Tamoxifen und Raloxifen, wurde der Bindung an die AF-1 zugeordnet. Die AF-1 steht unter Kontrolle von Signalkaskaden (z.B. MAPK), welche die AF-1 zur Aktivierung phosphorylieren (z.B. Ser 118 durch ERK1/2), wodurch auf Rezeptorebene ein Signalaustausch z.B. zwischen Wachstumshormon- und Steroidhormon-Signalweg möglich ist, auch „cross-talk“ genannt (Kato et al., 1995). Die in der C-Region liegende DNA-Bindungsdomäne (DBD) ist bei beiden ER hoch konserviert. Sie beinhaltet acht Cysteine, welche zwei Zinkfinger ausbilden können. Drei spezifische Aminosäuren (AS) in der proximalen Box (P-Box) des ersten Zinkfingers sind für die DNA-Bindung zuständig. Die Bindung des Zinkfingers erfolgt über das Erkennen einer spezifischen DNA-Sequenz, des „estrogen response elements“ (ERE). EREs befinden sich in Promotorbereichen E2-regulierter Gene und stellen beim Menschen meist nicht-palindromische Sequenzen (ERE half-sites) dar (Anolik, 1995). Der zweite Zinkfinger ist für die Erkennung einer weiteren ERE half-site und teilweise für die Rezeptor-Dimerisierung verantwortlich. Welche Nukleotide der EREs dabei mit höchsten Affinitäten kontaktiert werden, ist jedoch noch unklar. Man nimmt an, dass beide Rezeptoren die gleichen Nukleotide innerhalb eines EREs ansteuern und deshalb ER α und β in gleicher Weise mit dem ERE interagieren (Gruber et al., 2004; Yi, 2002). Beide ER haben jedoch unterschiedliche Affinitäten für verschiedene EREs, wodurch unterschiedliche transkriptionelle Effekte hervorgerufen werden (Kulakosky et al., 2002). Je nach gebundenem Ligand und Unterschieden in der ERE-Sequenz kann die Konformation des ER verschieden sein. Dies führt zu Seitenketten-Variationen in der DBD, wodurch die Rekrutierung unterschiedlicher co-regulatorischer Proteine möglich ist (Gruber et al., 2004; Schwabe and Teichmann, 2004). Die zwischen ER α und β nur wenig konservierte Domäne D fungiert als Verbindungsstück (linker) zwischen der DBD und der Ligandenbindungsdomäne. In der funktionell sehr komplexen E-Region befindet sich die Hormon- bzw. Ligandenbindungsdomäne (LBD). Neben der Ligandenbindung beinhaltet sie die Funktion einer weiteren Liganden-abhängigen Transaktivierung (AF-2), der Hetero- bzw. Homodimerisierung und ist Bindungsstelle für Co-Aktivatoren, –Repressoren und Hitzeschockproteine (HSP). Je nach Klasse des Liganden nimmt die LBD eine unterschiedliche Konformation ein. Diese sterischen Unterschiede im Ligand-DNA-assoziierten Rezeptorprotein bedingen agonistische und antagonistische Mechanismen. Hierbei spielt die AF-2 eine wichtige Rolle,

welche sich innerhalb der E-Region mit der LBD überlappt. Die AF-2 aktiviert dabei die Transkription durch Assoziation mit großen Proteinkomplexen (Co-Aktivatoren und -Repressoren). Diese Komplexe sind sowohl Teil der basalen Transkriptionsmaschinerie als auch Überträger AF-2-vermittelter, transaktivierender Signale und fungieren somit als Bindeglieder zwischen Rezeptor und Initiationskomplex der Transkription.

Die F-Domäne wird auch als Verlängerung der LBD bezeichnet, ist wenig konserviert und spielt wahrscheinlich bei der Unterscheidung zwischen Agonist und Antagonist von ER α eine wichtige Rolle (Montano et al., 1999).

1.3 17 β -Estradiol (E2)-vermittelte Wirkungsweise von Estrogenrezeptoren (ER)

1.3.1 Klassischer (genomischer) Wirkmechanismus von ER

Das klassische Modell der Hormon- bzw. Xenoestrogenwirkung beinhaltet die Ligandenbindung an den ER α bzw. β . Durch die Bindung des Rezeptorproteins an den endogenen Liganden E2 kommt es zu einem Konformationswechsel innerhalb des Proteins. Dieser „molecular switch“ führt zur Trennung des Rezeptors von Hitzeschockprotein-Komplexen und erlaubt zwei Rezeptoren sich aneinanderzulagern (Dimerisierung). Hierbei sind bei beiden Rezeptoren die Bildung von sowohl Homo- als auch Heterodimeren möglich. Es kommt zur Translokation der Liganden-Rezeptor-Dimere aus dem Cytoplasma in den Zellkern, wo sie an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte estrogen response elements (ERE: CAGGTCAnnnTGACCTG), in Promotorbereichen von E2-regulierten Genen binden. Die DNA-Anheftung erfolgt durch Ausbildung und Bindung von je zwei Zinkfingern der DNA-Bindungsdomäne (DBD) des ER an das ERE. Hierbei werden bestimmte Nukleotide innerhalb der ERE-Sequenz in der großen Furche der DNA angesteuert. Dadurch werden weitere Faktoren wie Co-Regulatoren (Aktivatoren bzw. Repressoren) und Komponenten der basalen Transkriptionsmaschinerie rekrutiert, wodurch die Genexpression von Hormon-regulierten Genen verschiedenartig beeinflusst werden kann. So kann z.B. die Aktivierung bzw. die Unterdrückung der Genexpression von Zielgenen wie PR und pS2 erfolgen (Abb. 1.3.2). Da die Aktivierung der Transkription von Zielgenen hierbei im Vordergrund steht, bezeichnet man diesen Wirkmechanismus von Hormonen auch als genomischen Weg.

1.3.2 Nicht-Klassische (genomische) Wirkmechanismen von ER

Eine Reihe von Genen enthalten in ihren Promotorbereichen keine klassischen EREs. Dennoch ist es ER möglich deren Genexpression durch Interaktion über andere Transkriptionsfaktoren (TF) zu beeinflussen. Bei diesen Signalwegen sind die Liganden-gebundenen ER nicht direkt mit der DNA verbunden, sondern über ihre AF-1 bzw. -2 an die nukleären Transkriptionsfaktor- (TF-) „proteine activating protein 1“ (AP-), „promotor-specific cellular transcription factor 1“ (SP1) oder „nuclear factor- κ B“ (NF- κ B) indirekt mit der DNA verbunden (Abb. 1.3.2). Die Bindung von ER α und β an diese nukleären TF sowie der transkriptionelle Effekt sind jedoch stark Zelltyp-, Liganden- und Promotor-abhängig. Im Fall von AP1 ist der ER ein Teil des Co-Aktivator Komplexes für Jun/Fos ohne direkt am AP1-response-element oder ähnlichen Elementen der DNA zu binden (Kushner et al., 2000). Im Gegensatz zu AP1 bindet der ER-SP1-Komplex an GC-reiche Consensussequenzen in Promotorbereichen von so regulierten Genen (Safe, 2001). Die Liganden-gebundenen ER können aber auch die transkriptionelle Aktivität unterdrücken, wie im Falle von NF- κ B. Dieser ER-vermittelte Signalweg wurde in der vorliegenden Arbeit jedoch nicht untersucht.

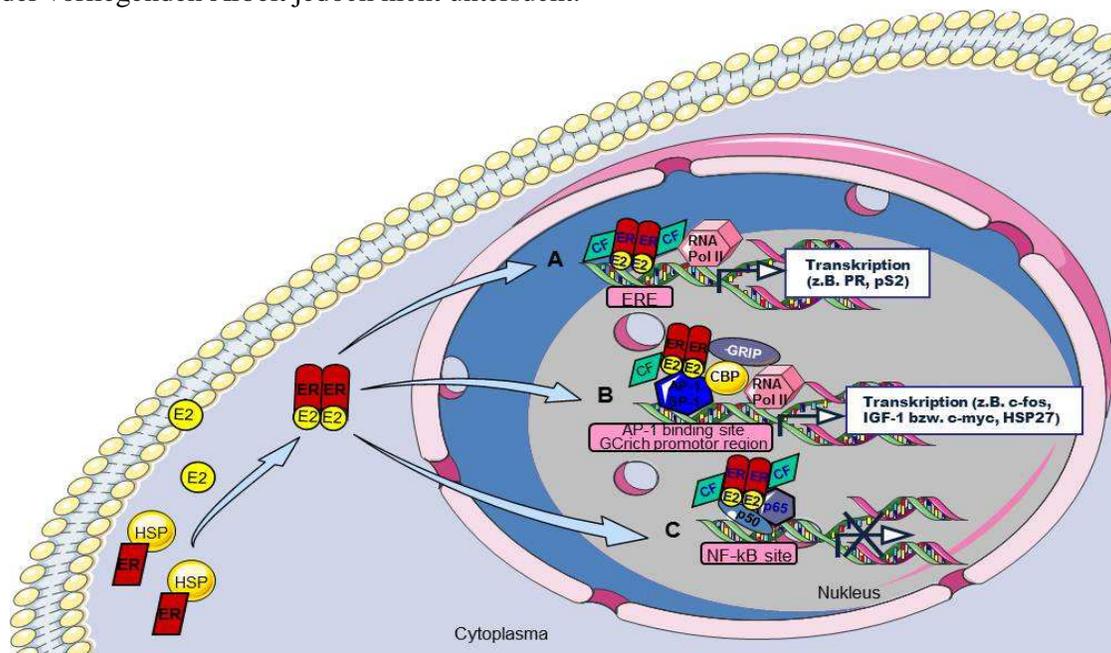


Abb. 1.3.2: Klassischer und nicht-klassischer (genomischer) Wirkmechanismus von ER α / β . Wirkungsweise Liganden-gebundener ER: A) Klassischer Mechanismus eines Homodimers nach Ligandenbindung und Translokation in den Nukleus. Dieser Komplex lagert sich direkt via DNA-Bindungsdomäne (DBD) an spezielle DNA-Sequenzen (ERE) in Promotorbereichen von Hormon-regulierten Genen an und aktiviert zusammen mit Co-Faktoren (CF) die Transkription von Genen wie Progesteronrezeptor (PR) und pS2 (=trefoil factor 1 TFF1); B) Bei nicht-klassischen (genomischen) Signalwegen lagern sich Liganden-Rezeptor-Komplexe indirekt über die nukleären Transkriptionsfaktoren (TF) AP-1 oder SP-1 an bestimmte DNA-Bereiche (AP-1 binding site bzw. GC-reiche Promotorregionen) an. Dadurch erfolgen die Rekrutierung von weiteren Co-Faktoren [CREB binding protein (CBP) und glucocorticoid receptor interacting protein (GRIP)] sowie die Stabilisierung dieses Multiproteinkomplexes. In Promotorbereichen so kontrollierter Gene sind keine klassischen ERE-

Elemente vorhanden. Genprodukte des AP-1-Weges sind z.B. c-Fos und insulin like growth factor 1 (IGF-1), des SP-1-Weges z.B. c-Myc und Hitzeschockprotein 27 (HSP27); C) In einem weiteren Nicht-klassischen Signalweg können die Liganden-Rezeptor-Komplexe die transkriptionelle Aktivität auch unterdrücken, dies erfolgt nach indirekter ER-Bindung an den TF des NF- κ B-Heterodimers p50/p65 in der nuclear factor- κ B Region (NF- κ B site) und der damit verbundenen Unterdrückung NF- κ B kontrollierter Gene.

1.3.3 Unspezifischer Wirkmechanismus von ER („nongenomic signaling“)

Die Signalkaskade der MAPK kinase (MEK)/„extracellular signal-related kinase“ (ERK) ist ein ubiquitär exprimierter intrazellulärer Signalweg, welcher durch eine Serie aufeinanderfolgender Phosphorylierungsschritte viele zelluläre Funktionen wie z.B. Proliferation, Differenzierung und Apoptose kontrolliert.

Seit einiger Zeit gibt es Hinweise auf sehr schnell ablaufende, E2-abhängige Mechanismen, welche durch z.B.: 1) zellmembranäre ER α (Razandi et al., 2004), 2) verkürzte ER α -Formen (Li et al., 2003) neuartige Membranproteine namens ESR-X (Toran-Allerand et al., 2002), 4) Steroid-bindende Proteine (SBP) in Kooperation mit dem Membranprotein Megalin (Catalano et al., 1997; Hammes and Levin, 2007), 5) G-Protein gekoppelte Rezeptoren (GPR30) (Thomas et al., 2005), 6) noch unbekannte Proteine (Nethrapalli et al., 2005) und 7) mitochondriale ER (mER) vermittelt werden könnten. All diese stehen der „klassischen“ (genomischen) Hormonwirkung gegenüber (Song and Santen, 2006; Yager and Davidson, 2006).

Es wird vermutet, dass diese sehr schnell ablaufenden Mechanismen bei vielen regulatorischen Signalkaskaden von „second messengern“ wie die Aktivierung von Signaltransduktionswegen [MAPKinase-, Tyrosinkinase-Kaskaden, Phosphatidylinositol3-OH-Kinase (PI3K)- und Protein-Kinase B (Akt)-Signalweg] und bei der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration mitwirken (Hanstein et al., 2004; Levin, 2003b; Simoncini et al., 2003). Wahrscheinlich steht diese Fülle möglicher „nicht-genomischer“ E2-Signalwege jedoch in einem starken Zelltyp-spezifischen und Promor-abhängigen Kontext.

Zur bereits vorhandenen Komplexität des ER-Signalings kommt erschwerend hinzu, dass die meisten dieser hier angesprochenen, rasch ablaufenden Signalwege, weiterführend auch eine transkriptionelle Regulation als Ziel haben. Somit stellen die in diesem Abschnitt angesprochenen Mechanismen, eine neue Stufe der E2-Wirkung dar. Da sie auch eine Rolle beim „downstream signaling“ Hormon-vermittelter Proliferation spielen können, stellen diese Mechanismen auch potentielle neue Angriffspunkte in der Anti-Tumorthherapie dar.

1.3.4 Liganden-unabhängige Aktivierung von ER

ER können post-translational modifiziert werden. Eine solche Modifikation stellt die Phosphorylierung des Rezeptors dar, wodurch ein alternativer Mechanismus der Transaktivierung möglich wird. Dieser Hormon-unabhängige Mechanismus stellt einen völlig neuen Wirkmechanismus neben den bisher erläuterten Signalwegen dar. Wachstumsfaktor (GF)-Signalwege führen zur Aktivierung von Signalkaskaden, welche durch Phosphorylierung von ER aktiviert werden können. Untersuchungen haben gezeigt, dass GF-stimulierte Phosphorylierung durch die Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK) ERK1/2 an Serin 118 der AF-1 der ER-Rezeptorproteine stattfinden kann, wodurch die transkriptionelle Funktion von AF-1 aktiviert wird (Bunone et al., 1996; Kato et al., 1995). Dieser Aktivierungsweg steht im Verdacht, für die hormonelle Unabhängigkeit mancher Tumoren verantwortlich zu sein (Lee and Bai, 2002; Levin, 2003a).

1.3.5 Nebensignaleffekte („cross talk“) zwischen ER und anderen Signalwegen

Zur bereits äußerst komplexen Thematik der Xenoestrogenwirkung kommt erschwerend hinzu, dass viele der in vorherigen Abschnitten bereits angesprochenen Signalwege miteinander „kommunizieren“ und in Verbindung stehen können.

Eine zentrale Rolle hierbei spielen inhibitorische Wechselwirkungen zwischen ER und AhR. Es gibt eine Reihe von AhR-vermittelten, inhibitorischen Wirkungen auf den ER-Signalweg. So kann der aktivierte AhR/ARNT-Komplex an inhibitorische Sequenzen (iXRE) in den Promotorbereichen von ER-regulierten Zielgenen wie Cathepsin D, pS2 und c-Fos (Safe and Wormke, 2003) binden. Dadurch wird die Bildung eines transkriptionell aktiven ER/SP-1-Komplexes sowie die Genexpression der genannten Gene verhindert (Wang et al., 1998). Durch die Interaktion des AhR/ARNT-Komplexes mit AP-1 am XRE/AP-1-DNA-Bindemotiv, wird die Bindung eines aktivierten ER α am benachbarten ERE sowie seine Signalwirkung verhindert (Gillesby et al., 1997). Matthews & Gustafsson postulieren einen inhibitorischen Effekt auf die ER-Aktivität, welcher von der AhR-vermittelten Synthese eines bisher noch unbekanntes Proteins ausgehen könnte (Matthews and Gustafsson, 2006). Ohtake et al. beschreiben darüber hinaus einen Mechanismus, bei welchem aktivierte AhR/ARNT-Komplexe selbst eine Co-regulatorähnliche Funktion auf die ER-vermittelte Transkription ausüben (Ohtake et al., 2003a). Hierbei führt die direkte Bindung des AhR/ARNT-Komplexes an ER α bzw. β via AF-1-Domäne zur Rekrutierung Liganden-freier ER und p300-Coaktivatoren an Promotorbereiche E2-kontrollierter Gene, wodurch auch der normale Liganden-gebundene ER-Signalweg geschwächt wird.

Interaktionen zwischen dem ER- und AhR-Signalweg wurden bereits vielseitig beschrieben und so ist bekannt, dass ER und AhR direkt miteinander interagieren (Abdelrahim et al., 2006; Beischlag and Perdew, 2005; Brunnberg et al., 2003; Fujii-Kuriyama and Kawajiri, 2010; Klinge et al., 1999; Matthews and Gustafsson, 2006; Ohtake et al., 2008; Ohtake et al., 2003b; Wormke et al., 2000a; Wormke et al., 2003). In einigen Studien wird von einer ER α -vermittelten Modulation AhR-abhängiger Reaktionen gesprochen, in welchem ER α einen steigernden (Matthews and Gustafsson, 2006; Thomsen et al., 1994), herabsetzenden (Beischlag and Perdew, 2005; Kharat and Saaticioglu, 1996) oder gar keinen Einfluß (Hoivik et al., 1997) auf den AhR-Signalweg zeigt.

Ein weiterer inhibitorischer Mechanismus ist die AhR-vermittelte Aktivierung des Proteasoms, welcher zum Abbau von sowohl AhR- als auch ER-Proteinen führt (Wormke et al., 2003). Aber auch Veränderungen im E2-Metabolismus wie z.B. bei erhöhter Expression von CYP19, CYP1A1 oder CYP1A2, welche zu einem erhöhten oxidativen E2-Metabolismus und sinkenden E2-Blutspiegeln führen, können bei solchen inhibitorischen Mechanismen eine Rolle spielen.

Auch das Konkurrieren um Co-Faktoren kann ebenfalls zu inhibitorischen Mechanismen führen, wobei Gewebe-spezifische Unterschiede in Co-Aktivatorkonzentrationen die Rezeptoraktivität regulieren. So kann dieser Wettbewerb auch umgekehrt zu einer ER-vermittelten inhibitorischen Wirkung auf den AhR führen, in dessen Folge es zu einer Reduktion der AhR-induzierten Transkription von CYP1A1 kommt (Ricci et al., 1999).

1.4 Wirkungsweise von Xenoestrogenen

Die anthropogene Umwelt liefert eine Vielzahl von Stoffen die entweder selbst Hormoneigenschaften besitzen oder mit körpereigenen Hormonen sowie deren Rezeptoren wechselwirken. Viele Xenoestrogene stehen im Verdacht wie E2 durch Bindung und Aktivierung des Estrogenrezeptors ebenfalls estrogene Effekte auszulösen (Bonefeld-Jorgensen et al., 2001; Korach, 1997; Korach, 1988; McLachlan, 2001a). Die pleiotrophe Natur von Xenoestrogen lässt diese aber auch mit anderen Faktoren wechselwirken und eine wachsende Zahl von Beispielen- estrogene Effekte betreffend - können nicht nur mit dem herkömmlichen, klassischen Modell der Hormonwirkung erklärt werden. Die in der Literatur beschriebenen Modelle sind jedoch sehr vielfältig und teilweise widersprüchlich. Es gibt bisher nur wenige Untersuchungen, die zeigen, dass Xenoestrogene auch über unspezifische Wirkmechanismen agieren können. Erste Hinweise dafür lieferten Maggiolini et al., sie konnten die Stimulation der c-fos Expression durch Phytoestrogene (Genistein und Quercetin) nachweisen (Maggiolini et al.,

2004). Neuere Befunde von Thomas & Dong, belegen die Bindung verschiedener Xenoestrogene an einen zellmembranären, GPR30 genannten Rezeptor mit hohen Bindungsaffinitäten (Thomas and Dong, 2006). Aber auch andere nukleäre Rezeptoren, zu denen auch viele „orphan receptors“ gehören, spielen bei Xenoestrogen-vermittelten Signalwegen eine Rolle, sie waren jedoch nicht Bestandteil dieser Arbeit.

Neben dem ER ist auch der Arylhydrokarbonrezeptor (AhR) durch bestimmte Interaktionen mit Xenoestrogenen, vor allem 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD, Dioxin) und DL-PCBs in der Lage, die Genexpression verschiedener Gene zu beeinflussen. Dabei bindet TCDD im Cytosol an den AhR, welcher ebenfalls wie die Steroidhormonrezeptoren einen Lignaden-aktivierten TF darstellt, aber zur basic Helix-Loop-Helix/Per, ARNT/AhR, SIM Homologie – (bHLH/PAS-) Proteinfamilie gehört (Denison et al., 2002). Der TCDD-Bindung am AhR folgen die Schritte der nukleären Translokation und Heterodimerisierung mit dem AhR nuclear translocator (ARNT) sowie die Bindung dieses Liganden-aktivierten AhR/ARNT-Komplexes an spezielle Nukleotide von DNA-Erkennungssequenzen (Swanson, 2002). Diese Sequenzen, die sogenannten xenobiotic- oder dioxin response elements (XRE oder DRE) sowie generell der zuvor beschriebene AhR-Aktivierungsmechanismus, sind der Wirkungsweise von Steroidhormonrezeptoren sehr ähnlich.

Die verschiedenen potentiell ER-vermittelten Wirkmechanismen von Xenoestrogenen wurden in Abbildung 1.4.1 versucht im Überblick zusammenzufassen.

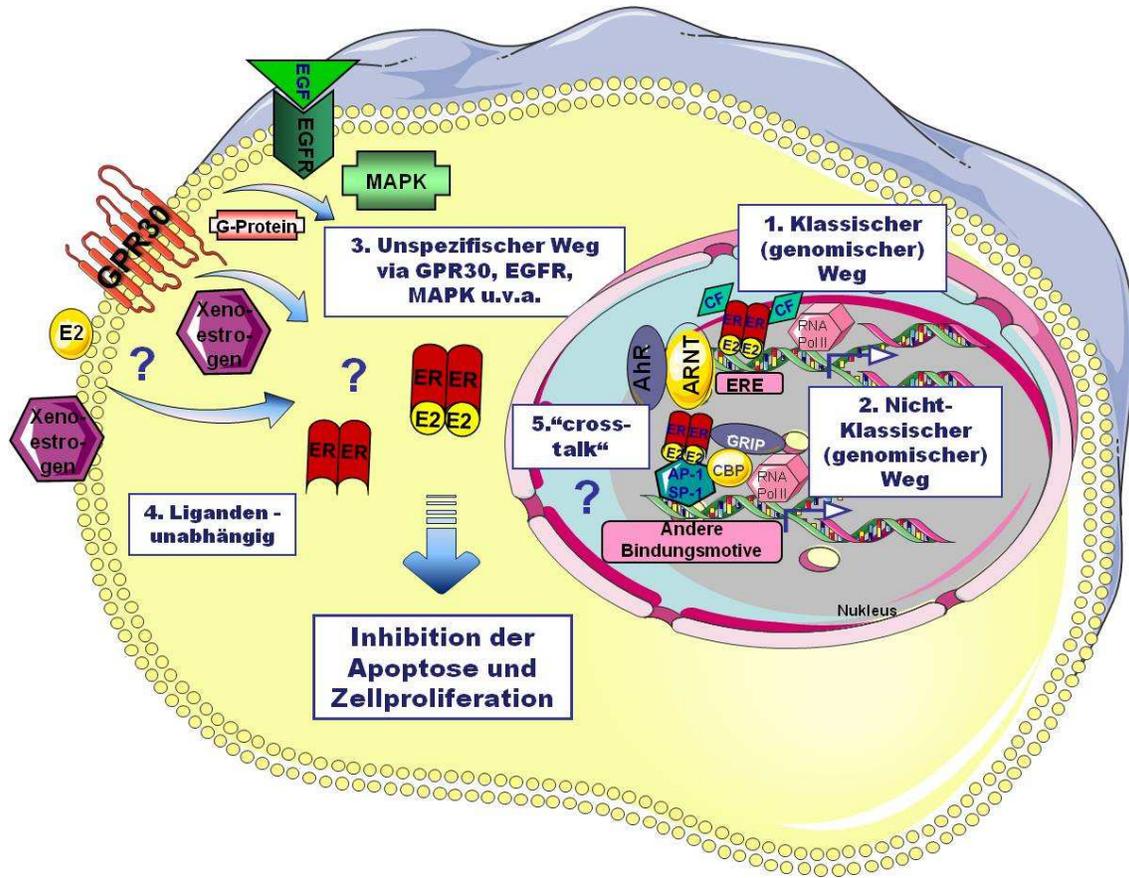


Abb. 1.4.1: Potentiell ER-vermittelte Wirkmechanismen von Xenoestrogenen und E2. Verschiedene Signalwege von E2 und Xenoestrogen in Verbindung mit Estrogenrezeptoren (ER) bzw. ER-ähnlichen Strukturen. Dabei sind E2 bzw. Xenoestrogene in der Lage an den ER zu binden, was zur Dimerisierung und Translokation der beladenen Rezeptorproteine in den Zellkern führt. Schließlich kommt es zur Anheftung der beladenen ER an spezifische DNA-Bereiche [EREs bzw. AP-1 binding sites oder GC-reiche Sequenzen] in Promotorregionen von Zielgenen. Dabei können ER sowohl über EREs selbst (1. klassischer Weg) als auch über die nukleären Transkriptionsfaktoren AP-1, SP-1 (2. nicht-klassischer Weg) an die DNA binden. Es gibt jedoch noch weitere E2- bzw. Xenoestrogenvermittelte Signalwege. Der Liganden-unabhängige Mechanismus (3.) stellt hierbei einen völlig neuen Mechanismus dar. Er ist unabhängig von einer direkten Ligandenbindung und findet aufgrund eines Wachstumsfaktorsignals statt, welches letztlich zur post-translationalen Phosphorylierung des ER und zur Aktivierung der Liganden-unabhängigen Transaktivierungsfunktion 1 des Rezeptors führt. Außerdem gibt es eine Reihe alternativer Wege (4.), bei welchen es durch zellmembranären ER α (Razandi et al., 2003) oder G-Protein gekoppelten Rezeptoren (GPR30) zu zeitlich schnell ablaufenden Reaktionen innerhalb der Zelle kommen kann (für Review siehe (Yager and Davidson, 2006)). Aber ein „cross-talk“ (5.) zwischen ER und anderen Signlwegen wie z.B. mit dem AhR/ARNT ist möglich (Matthews and Gustafsson, 2006; Ohtake et al., 2008). (Es wird vermutet, dass diese raschen Mechanismen bei vielen regulatorischen Signalkaskaden von „second messengern“ wie die Aktivierung von Signaltransduktionswegen [MAPKinase-, Tyrosinkinase-Kaskaden, Phosphatidylinositol3-OH-Kinase (PI3K)- und Protein-Kinase B (Akt)-Signalweg] und bei der Erhöhung der intrazellulären Kalziumkonzentration mitwirken. AP-1: activating protein 1; CBP: CREB binding protein; CF: Co-Faktoren; E2: Estrogen; ER: Estrogenrezeptor; ERE: estrogen response element; GF: growth factor; GFR: growth factor receptor; GPR30: G-Protein gekoppelter Rezeptor 30; GRIP: glucocorticoid receptor interacting protein; MAPK Mitogen aktivierte Proteinkinase; SP-1: promoter-specific cellular transcription factor 1

1.5 Das humane Endometrium und die Entstehung von Endometriose

Neben der Brust ist vor allem der Uterus eines der wichtigsten Zielgewebe für estrogene Effekte. Die den Uterus auskleidende Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium) stellt ein dynamisches System dar, welches in Vorbereitung auf eine Embryoimplantation fortwährend zyklischen Veränderungen unterliegt. Sie besteht aus epitheliale und stromalen Anteilen, welche unter der starken Kontrolle von Steroidhormonen stehen. Während eines Zyklus ist 17 β -Estradiol (E2) das prädominante Hormon der proliferativen Phase, wohingegen Progesteron die sekretorische Phase beherrscht.

Bereits seit den 1960er Jahren gibt es viele Hinweise auf Zusammenhänge zwischen endokrin wirksamen Umweltchemikalien und dem gehäuften Auftreten von Reproduktionsstörungen (Bhatt, 2000; McLachlan, 2001b; Sharara, 1999). So führt z.B. β -HCH bei weiblichen Ratten zu fokalen Hyperplasien bzw. metaplastischen Veränderungen des Endometriums (Van Velsen et al., 1986).

Auch p,p'-DDE und PCBs ist bekannt für seine hohen Akkumulation in verschiedenen Körpergeweben und -flüssigkeiten bei Frauen, wie z.B. in der Muttermilch (Dewailly et al., 1996) oder in Follikularflüssigkeit, was im Verdacht steht, den reproduktiven Erfolg von IVF-Behandlungen zu verringern (Baukloh et al., 1985; Younglai et al., 2005).

Eine Erkrankung, die an vielen Fällen idiopathischer Sterilität beteiligt ist und erst in jüngerer Zeit in Zusammenhang mit Umweltschadstoffen gebracht wurde, ist die Endometriose (Birnbaum and Cummings, 2001; Rier and Foster, 2002; Rier et al., 1993). Endometriose ist zusammen mit Myomen die häufigste benigne proliferative Erkrankung der Frau im reproduktiven Alter. Verbreitete Symptome betroffener Frauen mit Endometriose sind Zwischenblutungen bzw. starke Menstruationsblutungen mit schmerzhaften Krämpfen (Dysmenorrhoe) sowie häufig schmerzhafter sexueller Interkurs (Dyspareunie). Die Therapie erfolgt mit GnRH-Analoga oder Gestagenen und endet oft mit einer Hyster- und/oder Oophorektomie. Endometriose betrifft ca. 5-10% aller Frauen und ist allein in den USA für mehr als 100.000 Hysterektomien pro Jahr verantwortlich (Eskenazi, 1997; Giudice and Kao, 2004).

Das Entstehen und Wachstum von Endometrioseimplantaten wird anfänglich wesentlich durch Steroide beeinflusst. Nach Manifestierung dieser Erkrankung ist der weitere Verlauf jedoch meist Hormon-unabhängig. Die Pathogenese der Endometriose wird aber auch durch genetische, umweltbedingte und immunologische Faktoren beeinflusst. Zur Entstehung extrauteriner Endometrioseimplantate gibt es verschiedene Theorien. Der genaue Mechanismus ist jedoch noch immer nicht genau geklärt. Einer Theorie folgend handelt es sich um ontogenetische Irrläuferzellen, welche sich im Laufe des fortpflanzungsfähigen Alters zu manifesten

Endometrioseherden entwickeln. Es gibt jedoch starke Hinweise, dass der bereits 1927 von Sampson postulierte und ebenso bei gesunden Patientinnen vorkommende Mechanismus der retrograden Menstruation und die Implantations- und Invasionsfähigkeit von ektopen, dislozierten Endometriumzellen verbunden mit erhöhten intrauterinem Druck, entscheidend für die Entstehung von Endometriose ist (Leyendecker, 2004).

Die Implantation endometrialer Bestandteile im Peritonealraum des kleinen Beckens und die Etablierung der Endometriose ist das Ergebnis mehrschichtiger Störungen des Endometriosegewebes selbst sowie des umgebenden peritonealen Milieus. Wesentliche Charakteristika der Endometriose sind ihr Selbsterhalt und ihre Ausbreitung mit ausgeprägter Symptomatik. Dieser sich selbst verstärkende Krankheitsverlauf wird vor allem durch eine erhöhte Produktion und Sekretion von Prostaglandinen (PGE₂), Wachstumsfaktoren wie z.B. „vascular endothelial growth factor“ (VEGF), Interleukinen (IL-1, -2, -6, -8 und -10), hydrolytischen Enzymen und Matrixmetalloproteasen (MMPs) verursacht. Zu den resultierenden multiplen Dysfunktionen innerhalb betroffener Gewebe zählen: 1) der gestörte Abbau von E₂ und dessen Gewebeakkumulation, 2) die gesteigerte Bildung von Aromatase, welche die Bildung und Akkumulation von E₂ weiter verstärkt sowie 3) die Bildung von Cyclooxygenase 2 (COX-2) und deren damit verbundenen Rekrutierung von Prostaglandin E₂ (PGE₂) zum Ort des Endometriosegeschehens (für Review siehe (Bulun, 2009)). Diese Dysfunktionen, zusammen mit der verursachten chronischen Entzündungssituation, führen im weiteren Krankheitsverlauf zur Beeinträchtigung der Tubenfunktion, zur eingeschränkten Endometriumrezeptivität, Nidation und Implantation von Oocyten bzw. Embryonen *in utero* und somit letztlich zu einer gestörten Fertilität (Wülfing and Kiesel, 2005). Durch die erhöhte Inflammation innerhalb dieser Gewebe wird außerdem eine Reizung innervierender Nerven herforgerufen, welche den akuten und oft auch chronischen Beckenschmerz verursacht.

Der Zusammenhang zwischen der Entstehung dieser Erkrankung und dem Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) konnte Rier et al. bereits 1993 im *in vivo*-Tiermodell bei chronisch dioxinbelasteten Rhesusaffen dosisabhängig zeigen. Es gibt jedoch auch Hinweise auf Assoziationen zwischen PCBs und dem Auftreten von Endometriose (Gerhard, 1992; Louis et al., 2005; Pauwels et al., 2001; Porpora et al., 2006; Porpora et al., 2009). Im Focus vieler Studien lag bisher aber vor allem der Einfluß Dioxin-ähnlicher PCBs auf die Entstehung dieser Erkrankung. Auch für p,p'-DDE gibt es Hinweise für einen Zusammenhang zwischen dem Auftreten dieser Erkrankung und erhöhten Konzentrationen der genannten Substanz im Serum von Endometriosepatientinnen (Porpora et al., 2009; Trabert et al., 2010). Eine Reihe von Genen wie z.B. CYP1A1, COX-2, CYP19 (Aromatase), ER α , ER β , Progester-

ronrezeptor A und B (PROG-1/2) stehen im Verdacht eine Hauptrolle bei der Entstehung von Endometriose zu spielen und könnte als Biomarker eingesetzt werden (Bulun et al., 2010; Bulun, 2009; Porpora et al., 2009; Trabert et al., 2010).

1.6 Hintergrund und Ziele der Arbeit

In vorausgegangenen Untersuchungen konnte eine deutliche Belastung humaner Gebärmutter-schleimhaut (Endometrium) mit verschiedenen Xenoestrogenen gezeigt werden. Dabei wurden Anreicherungen von p,p'-DDE, β -HCH und PCB 138, 153 und 180 in physiologisch relevanten Konzentrationen nachgewiesen, wobei höchste Konzentrationen im Fettgewebe (>Endometrium>Serum>Myometrium) analysiert wurden. In Rezeptor-Kompetitionsversuchen, bei welchen die Xenoestrogene PCB153, β -HCH und p,p'-DDE am Estrogenrezeptor (ER) und Gestagenrezeptor (GR) auf ihre Fähigkeit hin untersucht wurden, die Bindung des jeweiligen Radioliganden zu inhibieren, zeigte PCB153 eine deutliche Beeinträchtigung der Bindung des Radioliganden am ER des humanen Endometriums (Kuntzsch, 2000). Bei *in vitro* Wachstumsanalysen konnten bereits proliferative Effekte dieser Stoffe auf Primärzellen des humanen Endometriums (Hippe, 2005; Köller, 2002) sowie verschiedene Brustkrebszelllinien (Delios, in Preparation) nachgewiesen werden. Bisher ist der Wirkmechanismus vieler Xenoestrogene noch immer nicht genau geklärt.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun geprüft werden, in wie weit die in bisherigen Untersuchungen aufgezeigten Effekte der im Uterus normofertiler und steriler Frauen in physiologisch-relevanten Konzentrationen nachgewiesenen Xenoestrogene PCB153, β -HCH und p,p'-DDE mit dem ER-Signalweg interferieren. Hierbei sollte möglichst eine Abgrenzung zwischen „klassischen“ (genomisch) und „alternativen“ (nicht-genomisch) ER-Mechanismen der möglicherweise durch Xenoestrogene ausgelösten Effekte sichtbar gemacht werden.

Durch die Verwendung verschiedener E2-abhängiger Zelllinien aus Brust und Uterus sollte auch auf mögliche Gewebe-spezifische Wirkungen der untersuchten Xenoestrogene eingegangen werden.

Ein wesentliches Anliegen der vorliegenden Arbeit war es, die in Abhängigkeit von Xenoestrogenen eventuell schon in frühen Stadien auftretenden Veränderungen des zellulären Kontextes gesunder endometrialer Zellen zu untersuchen, was mit Hilfe immortalisierter endometrialer Epithelzellen der Zelllinie hTERT-EEC realisiert wurde. Parallel dazu wurden Xenoestrogen-induzierte Veränderungen in Primärzellen von Endometriose-Patientinnen untersucht. Hierbei sollte das möglicherweise durch Xenoestrogene hervorgerufene Wirkungsspektrum in den einzelnen Zellsystemen sowie der Vergleich der in beiden Zellsystemen aus-

gelösten Effekte helfen, abzuschätzen, in wie weit Xenoestrogene den Krankheitsverlauf bei Endometriose beeinflussen können.

Des Weiteren sollte die Frage beantwortet werden, wie breitgefächert das im Vergleich zu E2 untersuchte Wirkspektrum von PCB153 auf einzelne zelluläre Prozesse wie Angiogenese, Gewebeumbau („tissue remodeling“), Migration und Invasivität bzw. Proliferation ist.

Abschließend wurde ein möglicher Zusammenhang des Xenoestrogens PCB153 und der Karzinogenese sowie die mögliche Assoziation zwischen Xenoestrogenen und gynäkologisch-reproduktionsmedizinischen Erkrankungen, wie Endometriose diskutiert.

2 Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Alle eingesetzten Chemikalien wurden im höchsten erhältlichen Reinheitsgrad verwendet und stammen von den Firmen: Sigma (Taufkirchen), ROTH (Karlsruhe), Fluka (Bruchs, CH), Merck (Darmstadt), AppliChem (Darmstadt), VWR (Darmstadt), Roche (Mannheim) sowie Biochrom (Berlin). Das verwendete Wasser wurde aus eine Hausanlage des Klinikums mit nachgeschaltetem Ionenaustauscher bezogen und für besondere Reinheit anschließend mit einer Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) aufgereinigt. Lösungen wurden, soweit notwendig, entweder 20min bei 121°C autoklaviert oder steril filtriert.

2.2 Technische Geräte

Gerät:	Bezeichnung:	Hersteller:
Agarosegelkammer	AGT-1	VWR international
Brutschränke	IG 150	Jouan
Feinwaage	AJ 150	Mettler
Klimaschrank	innova 4230	New Brunswick Scientific
Luminometer	Sirius	Berthold Detektion System
Magnetrührer	MR3000	Heidolph
Mikroskope	Eclipse TS 100	Nikon
	Axioskop 40	Zeiss
PCR-Maschine	T-Gradient	Biometra
pH Meter	Calimatic 761	Knick
Pipetten	verschieden	Eppendorf
Pipetierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte
Photometer	Ultrospec 1000	Pharmacia Biotech
Plattenreader	Anthos 2020	Biochrom
Reinstwasseranlage	Milli-Q-Plus	Millipore
Rotator	RS 24	Kisker
Schüttler	Hyper Shaker	Neolab

Sterilbank	HeraSafe HS12	Kendro (Heraeus)
Spannungsquellen	EPS 301	Amersham Pharmacia Biotech
Thermomixer	Comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biofuge pico	Heraeus
UV-Spektrometer	Ultraspec 1000	Pharmacia Biotech
Vortex	MS1 Minishaker	IKA
Waage	SPB62	Scaltec
Wasserbad	1003	GFL
Western Blot	Miniprotean 3	BioRad
Zentrifuge	CR4.22	Jouan

Tab. 2.1: Liste der in dieser Arbeit verwendeten Geräte.

2.3. Zellkultur

2.3.1 Verwendetes Zellmaterial

Im Rahmen dieser Arbeit kamen insgesamt sechs verschiedene Zelltypen aus der Brust und dem Uterus zum Einsatz und wurden konventionell in 2D-Adhäsionskulturen gezüchtet. Diese Zellen zeichnen sich durch eine verschieden starke Expression von ER α und β aus und sind somit verschieden hormonsensitiv.

Die verwendeten Brustkrebszelllinien waren MCF-7 (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellen, Braunschweig) und MDA-MB-231 (freundlicherweise von Prof. Dittmer aus der Gynäkologie zur Verfügung gestellt). Die gut charakterisierte Zelllinie MCF7 (Michigan Cancer Foundation) wurde 1970 aus Pleuraerguss einer Patientin isoliert, deren metastasiertes, duktales Mamma-Adenokarzinom zuvor drei Jahre lang mit Hormon- und Radiotherapie behandelt worden war. Sie wurde bereits in verschiedenen Studien (Katzenellenbogen et al., 1987; Pink and Jordan, 1996) verwendet, um Estrogen-abhängige Prozesse sowie die Auswirkungen von Anti-Estrogenen im Brustkrebs zu untersuchen. Sie wurde für diese Arbeit ausgewählt, da sie einen nichtinvasiven malignen Tumorstatus der Brust repräsentiert, die Zellen aber dennoch beide Rezeptoren ER α und β exprimieren und somit die Untersuchung der möglicherweise mit einer Hormon-interferierenden Wirkung von Xenoestrogenen zulassen. Die ER α -negative Zelllinie MDA-MB-231 wurde ausgewählt, da sie ein oft in der Literatur verwendetes Zellmodell für das aggressivere, Hormon-unabhängige Mammakarzinom darstellt. Die Zellen dieser Zelllinie, sowie wie die der ebenfalls nur in geringen Mengen ER α und β exprimierenden uterinen Zelllinie RL95-2, wurden eingesetzt um auch eine mögliche Xenoestrogen-vermittelte Wirkungen bei ER-negativen Zellen zu untersuchen, welche, falls vorhanden, auf ER-unabhängige Mechanismen dieser Stoffe hinweisen würden.

Das Zellmaterial uteriner Herkunft waren Zellen der Zelllinien hTERT-EEC und RLU95-2 sowie Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Die Zelllinie hTERT-EEC Klon B37 re-

präsentieren endometriale epitheliale Primärzellen, welche durch Telomerase-Überexpression immortalisiert wurden, also Primärgewebe des Endometriums darstellen. Sie wurde von einer eng mit unserem Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg kooperierenden Arbeitsgruppe (Department of Human Anatomy and Cell Science of the University of Manitoba, Winnipeg) aus Kanada generiert (Hombach-Klonisch et al., 2005) und freundlicherweise für die Versuche der Arbeit zur Verfügung gestellt. Sie soll als Bindeglied zwischen gesundem Endometrium und Endometriose fungieren. Die hTERT-EEC Zellen exprimieren ebenfalls beide Estrogenrezeptortypen und reagieren daher Hormon-sensitiv.

Darüberhinaus wurde Endometriosegewebe, welches mit freundlicher Hilfe und Unterstützung des OP-Teams unter der Leitung von Frau OÄ Petra Kaltwasser des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle/Wittenberg bei laparoskopischen Untersuchungen von Frauen mit idiopathischer Sterilität gewonnen wurde, für Versuche in dieser Arbeit verwendet (siehe Kapitel zu SRB-Assay und Genexpressionsanalysen).

Im Gegensatz dazu wurde Endometrium-Primärgewebe für diese Arbeit zwar anfänglich von zuvor persönlich aufgeklärten Patientinnen aus hysterektomierten Uteri gewonnen und kultiviert, war jedoch für die Versuche nicht in ausreichenden Mengen vorhanden, weswegen diese Versuche nicht weitergeführt werden konnten.

Die Endometriumkarzinom-Zelllinie RLU95-2 (American Type Culture Collection, Manassas, USA) wurde ausgewählt, da sie den Fall des progressiven Tumors mit geringer Expression von ER α und β und dem daraus resultierenden Verlust der Hormonantwort repräsentiert.

2.3.2 Medienherstellung und Kultur der Zellen

Alle Mammakarzinom- sowie die uterinen hTERT-EEC- und Endometriose-Zellen wurden in steril filtriertem 1:1 (v/v) DMEM (Dulbecco's-Modified-Eagle-Medium ohne Phenolrot, aber mit Na-Pyruvat und 1000g/l Glukose, Gibco BRL, Invitrogen) und HamsF12, ergänzt mit 10% FKS (fötales Kälberserum), 200mM L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin, 1% Amphotericin B (alle Biochrom) und 4 μ g/ml Rinderinsulin (Fluka) wachsen gelassen.

Die Zellkultur der uterinen Zelllinie RL95-2 erfolgte im selben Grundmedium (DMEM/HamsF12) und FBS- und Insulin-Gehalt wie oben beschrieben, jedoch unter Zusatz von 15mM HEPES und 1,2g/L Natriumbikarbonat (beides von Roth, Karlsruhe) und Ausschluss von L-Glutamin, Penicillin/Streptomycin und Amphotericin B.

Die Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Je nach Konfluenz wurden die Zellen nach 2 bis 3 Tagen passagiert. Dafür wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen mit 1xPBS gewaschen und durch Zugabe von 0,2% Trypsin/EDTA (BioWhittaker) 5min bei 37°C im Brutschrank abgelöst. Die gelösten Zellen wurden in entsprechendes Kulturmedium aufgenommen und auf mehrere Zellkulturflaschen verteilt und kultiviert.

Für die Expositionsversuche aller Testsubstanzen wurde spezielles, steroidfreies Medium (hormonfreies Medium) hergestellt, bei welchem das FBS über Dextran-überzogene Aktivkohle (Sigma) „gestrippt“ wurde. Während des Stripping-Prozesses wurden alle die im FBS enthaltenen Steroide abgefangen und somit aus dem Medium herausgefiltert. Dazu wurde ein Gemisch aus 5% Aktivkohle mit 0,5% Dextran ((T7000) in Aqua dest. für 1h bei RT geschüttelt und anschließend auf 50ml Röhrrchen aliquotiert, welche sodann für 10min bei 100g abzentrifugiert wurden. Der daraus resultierende Überstand wurde verworfen und das Pellet im 50ml Röhrrchen in FBS resuspendiert und die Suspension für 1h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden alle Röhrrchen für 20min bei 2000g abzentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde anschließend sterilfiltriert (Porengröße 0,2µm) und aliquotiert. Sporadisch wurde der E2-Gehalt des hormonfreien FBS gemessen, welcher in der Regel um die 30pmol/l betraf. Das fertige „gestrippte“ und hormonfreie FBS wurde bis zum Gebrauch bei -20°C gelagert.

2.3.3 Aufarbeitung des Endometriose Primärgewebes.

Die Aufarbeitung des Endometriosegewebes erfolgte unter sterilen Bedingungen im Labor. Dabei wurde das Gewebe zunächst mit einer Einwegrasierklinge zerkleinert und anschließend auf dem Schüttler in 3ml Vollmedium und 1ml Kollagenase-Lösung (50mg Kollagenase CLS II, 2mg Hyaluronidase ad 20ml Vollmedium, sterilfiltriert) im 50ml Röhrrchen für 30-60min RT in Einzelzellen dissoziiert. Nach dem Auslösen der Zellen aus dem Gewebeverband wurden diese im Röhrrchen bei 600rpm für 5min bei 20°C abzentrifugiert, der Überstand verworfen und das Zellpellet mit Vollmedium resuspendiert und auf Zellkulturschalen verteilt. Die Zellen wurden unter normalen Zellkulturbedingungen Übernacht kultiviert. Am nächsten Tag erfolgte ein Medienwechsel. Nach ausreichender Passagierung der Zellen wurden diese ausgezählt und für entsprechende Versuche eingesetzt (siehe Kapitel zu SRB-Assay und Genexpressionsanalysen).

2.3.4 Exposition der Zellen mit Hormon bzw. Xenoestrogenen

Für die Exposition der Zellen mit PCB153, p,p'-DDE, β -HCH sowie Coumestrol und Estrogen wurden die Zellen für die jeweiligen Versuche in einer definierten Zellzahl im Vollmedium auf 24-Wellplatten gegeben und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag wurden das Medium entfernt und durch hormonfreies Medium ersetzt und die Zellen für mindestens weitere 24h präinkubiert, bevor die jeweilige zu untersuchende Testsubstanz zugegeben wurde. Um Effekte des Lösungsmittels der Xenoestrogene auszuschließen, wurde zu jeder Testsubstanz-Exposition eine entsprechende Lösungsmittel-Kontrolle (E2 und Coumestrol: 0,1% DMSO; PCB153: 0,2% DMSO; p,p'-DDE: 0,1% EtOH und β -HCH: 0,1% Aceton) mitgeführt. Die Konzentration des Lösungsmittels in den Kontrollen entsprach denen in den Wells der Testsubstanz-Expositionen. Die Dauer der Exposition war je nach Versuch 20-96h. Die Exposition der Zellen mit den Xenoestrogenen PCB153, p,p'-DDE und β -HCH (Promochem, Wesel) erfolgte gelöst in hormonfreiem Medium und über einen Konzentrationsbereich von 10pg-1 μ g/ml sowie der des Coumestrols und Estrogens (beide Sigma) von 1pg-1 μ g/ml.

2.3.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die bei -80°C gelagerten Zellen wurden bei 37 °C aufgetaut, in ein 15ml Reaktionsröhrchen mit dem entsprechenden Kulturmedium überführt und bei 650rpm und 20°C, 5min zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in vorgewärmtem Kulturmedium resuspendiert und in Zellkulturflaschen überführt und die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Morgen wurde ein Medienwechsel durchgeführt. Zum Einfrieren der Zellen wurden diese, wie oben bereits beschrieben, mit Trypsin abgelöst, in dem entsprechenden Kulturmedium aufgenommen und 5min bei 650rpm und 20°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 1ml Medium (8% DMSO und 20% FBS) resuspendiert und in Kryo-Röhrchen überführt. Die Kryo-Röhrchen wurden in einem Styropor-Einfrierbehälter (Kühlungsrate von -1°C/Minute) bei -80°C gelagert.

2.4. Sulforhodamin B Assay (SRBA)

Um die optimale Zelldichte (Zellanzahl je Well) zu ermitteln, bei der die Zellen in einer Multiwellplatte ihr größtmöglichstes Wachstum zeigen, wurde ein modifizierter SRBA (Papazisis et al., 1997) durchgeführt. Der SRBA stellt eine sehr empfindliche und einfach durchzuführende kolorimetrische Methode dar, bei der der Gesamtproteingehalt einer Zelle bzw. Lösung ermitteln wird. Bei der spektralphotometrischen Messung der Konzentration des an den Zell-

proteinen anhaftenden Sulforhodamins wird indirekt die Zellanzahl/Well ermittelt. Zwischen der Absorption um 500nm und der Zellanzahl besteht über einen großen Bereich eine lineare Beziehung (Skehan, 1990). Sulforhodamin B (Sigma) ist ein Proteinfarbstoff, mit dem die Gesamtbiomasse als Maß für das Zellwachstum bestimmt wird. Dieses Assay wurde bereits erfolgreich für die Zellzahlbestimmung epithelialer und stromaler uteriner Primärzellen (Hippe, 2005) sowie von verschiedenen Zelllinien der Brust (Dellios, in Preparation) angewandt. Für die Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich uterine Zellen eingesetzt. Insgesamt kamen drei Zelltypen zum Einsatz: die aus Endometrium-Primärgewebe generierte, epitheliale Zelllinie hTERT-EEC; Zellen aus OP-Material gewonnenen primären Endometriose-Explantaten sowie die Endometriumkarzinom-Zelllinie RLU-95-2. Die eingesetzten Zellen unterschieden sich hinsichtlich ihrer Hormonsensibilität sowie ihres Malignizitätsgrades deutlich voneinander.

Um eine mögliche genomische, ER-vermittelte Wirkung von Xenoestrogenen im Uterus untersuchen zu können, wurden für alle Testsubstanzen, neben den normalen Wachstumsraten (ohne Inhibitoren), auch die Wachstumsraten mit dem ER-Inhibitor ICI 182780 (Sigma, Taufkirchen) analysiert. Der ER-Inhibitor ICI 182780, auch Fulvestrant oder Faslodex genannt, ist ein selektiver ER „down“-Regulator und das erste Antiestrogen mit keiner nennenswerten agonistischen Aktivität.

Im Vergleich dazu wurden, um auch die mögliche Xenoestrogen-vermittelte nicht-genomische Wirkung von ER über den MAPK-Signalweg untersuchen zu können, SRBAs mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 durchgeführt. Der MEK1/2-Inhibitor U0126 (Cell Signaling, Danvers, USA) ist ein hoch-selektiver Inhibitor der MAPK/Erk-Kinasen Mek1 und Mek2. Er verhindert damit die Phosphorylierung von ERK1/2 und somit deren Aktivierung bzw. die Transkription deren proliferationsfördernder Zielgene.

Die Wachstumsraten wurden über einen Zeitraum von 96h unter dem Einfluss der Xenoestrogene (PCB153, p,p'DDE, β -HCH), des Phytohormons Coumestrol sowie des 17 β -Estradiols (E2) in den physiologisch relevanten Konzentrationsbereichen von 10pg/ml-1 μ g/ml bzw. 1pg/ml-1 μ g/ml bestimmt. Der Inhibitor ICI 182780 wurde in einer Endkonzentration von 1 μ M, der Inhibitor U0126 als 3 μ M, beide in DMSO gelöst, eingesetzt. Alle Testansätze wurden in 24-Wellplatten (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen) als Doppelbestimmungen durchgeführt und jeweils die entsprechende Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) als Negativkontrolle sowie eine Inhibitor- und unbehandelte Mediumkontrolle mitgeführt. Für alle Versuche wurden die Zellen jeweils mit einer Zellzahl von ca. $1,5 \times 10^4$ pro 24Well in 0,5ml Vollmedium angesetzt, wobei darauf geachtet wurde, dass die Wellbelegung der Platten gleich war. Die

Zellen wurden über Nacht im Brutschrank bei 37°C kultiviert. Das Medium wurde am nächsten Tag gegen 1ml hormonfreies Medium ausgetauscht und die Zellen r 24h vorinkubiert, bevor die Testsubstanz oder das Lösungsmittel appliziert wurde. Nach Ablauf einer dreitägigen Inkubationszeit wurde das Medium abgenommen und die Zellen vorsichtig mit 1xPBS gewaschen. Danach erfolgte eine Zellfixierung mit 200µl TCA (10% Trichloressigsäure in A.dest.) pro Well für 30min bei 4°C. Anschließend wurden die Platten mehrere Male mit Aqua dest. gespült und über Nacht an der Luft getrocknet. Die SRB-Färbung der fixierten Zellen erfolgte mit 100µl 0,4% SRB-Lösung (in 1% Essigsäure) für 20min bei RT. Um ungebundenes SRB abzuwaschen, wurde solange mit 1% Essigsäure gespült, bis die Waschlösung wieder transparent war. Anschließend wurden der am Boden der Wells anhaftende Farbstoff und die Zellen mit je 200µl TRIS-Puffer (10mM TRIS-HCL, pH 10,5) gelöst. Nach 30min auf dem Schüttler erfolgte die photometrische Bestimmung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 570nm gegen eine Referenzwellenlänge von 620nm mit Hilfe eines Plattenlese-Photometers Anthos 2020 (Biochrom, Cambridge, UK). Die Wachstumsraten der SRBA ohne bzw. mit Inhibitor wurden anhand der mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführten Versuche als Mittelwerte berechnet und für jede einzelne Testsubstanz jeweils zusammen in einem Diagramm graphisch dargestellt. Die Standardabweichungen wurden jeweils in den Diagrammen durch Fehlerbalken angegeben.

2.5 Proliferationsassays

2.5.1 Immuncytochemie des Proliferationsmarkers Ki67 (Ki67-Score)

Mit Hilfe des monoklonalen Antikörpers Mib-1 (Dianova) wurde eine immuncytochemische Darstellung des rein im Kern exprimierten Proliferationsmarkers Ki67 durchgeführt. Die Darstellung der Expression dieses Markers erfolgte in Zellen von Zelllinien unterschiedlicher Herkunft (Brust und Uterus) sowie unter Einfluss von zwei verschiedenen Testsubstanzen. Für diese Versuche kamen insgesamt drei verschiedene Zelllinien MCF7, hTERT-EEC und RLU95-2 zum Einsatz. Die für diesen Versuch ausgewählten und verwendeten Testsubstanzen waren zum einen das Xenoestrogen PCB153, zum anderen das Hormon E2 als Kontrolle, mit welchen die Zellen separat für 72h inkubiert wurden.

Für die immuncytochemischen Färbungen wurden ca. 3×10^3 Zellen per Well auf speziellen 12-Well-Objektträgern (Menzel; Braunschweig) aus Glas kultiviert. Das Anwachsen der Zellen auf den Wells erfolgte über Nacht im Vollmedium. Am nächsten Tag wurde dieses Medium vorsichtig abgesaugt und durch hormonfreies Medium ersetzt, worin die Zellen mindestens 12h lang vorinkubiert wurden. Danach erfolgte die Applikation der Testsubstanzen, wel-

che in demselben gestippten Medium gelöst, tropfenförmig aufgetragen und die Objektträger in einer feuchten Kammer über einen Zeitraum von drei Tagen im Brutschrank bei 37°C inkubiert wurden. Nach Ablauf der 72-stündigen Inkubationszeit wurden die Objektträger aus dem Brutschrank entnommen, der Medienüberstand abpipettiert und zur Fixierung und Blockierung endogener Peroxidasen sofort die Fixierlösung (0,3% Wasserstoffperoxid in Methanol) aufgetropft. Nach einer Einwirkzeit von 40min bei 4°C wurde 3x5min mit 1xPBS gespült. Danach wurde die Blockierungslösung (1% BSA in 1xPBS), welche der Antikörperverdünnungslösung entsprach, aufgetragen und für 20min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungen zu blockieren. Nach Entfernen der Blockierungslösung wurde der Primärantikörper Mib-1 (1:10, Dianova) oder ein Kontrollansatz ohne Antikörper aufgetragen. Die Inkubation mit und ohne Antikörper erfolgte über Nacht bei 4°C in einer feuchten Kammer. Am nächsten Tag wurde nach 3x5min Spülen mit 1xPBS der Sekundärantikörper (1:100, biotinyliertes Ziege anti-Maus IgG, Jackson Immuno Research), aufgetragen und für 1h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde erneut 3x5min mit 1xPBS gespült und die Peroxidasekonjugierte Streptavidin-Lösung (1:500 in A.dest., Jackson Immuno Research) zugegeben, welche 30min bei RT inkubiert wurde. Nach erneutem Waschen mit 1xPBS wurde das Chromogen (NovaDetect AEC Substrate System, Dianova) nach Angaben des Herstellers aufgetragen und die Farbentwicklung beobachtet. Nach ca. 5-20min wurde der Farbstoff entfernt und die Zellen mit Aqua dest. gespült. Nach dieser Färbung erfolgte mit Hilfe von Hämatoxylin eine Gegenfärbung der Zellkerne, wonach die 12-Well Objektträger schließlich mit einem Deckgläschen und Einbettungsmedium [2,4g Mowiol 4-98, 6g Glycerin, 12ml 0,2M Tris (pH 8,5) und 6ml A.dest.] überschichtet und getrocknet werden konnten. Nachdem Aushärten der Objektträger über Nacht, wurden die angefärbten Zellkerne mikroskopisch (Axioscop 40, Zeiss) mit einem Zellzähler ausgezählt und automatisch je nach Färbungsintensität erfasst.

Die semiquantitative Auswertung der unterschiedlichen Färbungsintensitäten der nukleären Ki67-Expression der Zellen erfolgte durch Berechnung eines immunocytochemischen Scores (Ki67-Score). Der in dieser Arbeit verwendete Ki67-Score stellt eine modifizierte Kombination aus der von McCarty et al. für die ER-Expression bei Mammakarzinomen angewandten Berechnung (McCarty et al., 1986) des „histochemical score“ (HSCOREs), und der von Jiang et al. verwendeten Methode (Jiang et al., 2002), bei welchem vier Intensitätsstufen der Färbung berücksichtigt werden, dar. Insgesamt wurden jeweils mindestens 4x100 Zellen pro Ansatz ausgezählt, wobei drei Färbungsintensitäten der Zellkerne bewertet und die Versuche je zweimal unabhängig voneinander wiederholt wurden. Die somit erhaltenen prozentualen Werte der einzelnen Färbungsintensitäten wurden jeweils mit einem Faktor von 1 für schwach

gefärbte Zellen bis 3 für stark gefärbte Zellkerne multipliziert und ergaben addiert die Ki67-Scores, welche somit alle in einem Score-Bereich von 0-300 lagen. Die Formel zur Berechnung der Ki67-Scores lautete wie folgt:

$$\text{Ki67-Score} = \sum P_i (i+1)$$

P_i = Anteil der Zellen pro Färbungsintensitätsstufe (1=100 Zellen)

i = Färbungsintensität von 1 bis 3

1 = schwach gefärbt

2 = normal gefärbt

3 = stark gefärbt

2.5.2 Der 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) Assay zur Bestimmung der Proliferation

Zur Bestimmung der zellulären Proliferation wird häufig eine Analyse des Einbaus von radioaktiv-markierten Substanzen (^3H -Thymidin) in die DNA oder der Abbau von Radioisotopen (^{51}Cr) nach Zelllyse verwendet. Alternativ zum ^3H -Thymidin-Einbau ist auch die Inkorporation von 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) ein häufig angewandte Methode zur Messung der DNA-Synthese und Zellproliferation in immunohisto- und zytochemischen Analysen. Zellen, welche BrdU in ihre DNA einbauen, können leicht mit Hilfe eines monoklonalen anti-BrdU-Antikörpers detektiert und über einen Enzym-konjugierten Sekundärantikörper identifiziert werden.

Für diese Versuche wurde der nicht-radioaktive quantitative Proliferationstest 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit III (Roche) nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Zellen der für diese Versuche exemplarisch ausgewählten Zelllinien MCF7 und MDA-MB-231, wurden in drei verschiedenen Zellzahlen (MCF7: $4,0 \times 10^3$; $8,0 \times 10^3$ und $1,5 \times 10^4$ bzw. MDA-MB-231: $1,5 \times 10^3$; 4×10^3 und $8,0 \times 10^3$) auf 24-Well-Platten in hormonfreiem Medium verteilt und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurden auf die Wells das Xenöestrogen PCB153 sowie als Positivkontrolle das Hormon E2 in jeweils drei Testkonzentrationen 10pg/ml, 1ng/ml und 100ng/ml appliziert sowie Lösungsmittel-, ER-Inhibitor ICI 182780 und hormonfreies Medium als Kontrollen mitgeführt. Alle Ansätze wurden als Doppelbestimmungen und in der gleichen Anordnung auf den 24-Well-Platten angefertigt. Die Inkubation der Testsubstanzen erfolgte über einen Zeitraum von drei Tagen (MCF7: 48h, 72h und 96h bzw. MDA-MB-231: 24h, 48h und 72h).

Nach Ablauf der Inkubation wurde das Medium abgesaugt, mit 1xPBS gewaschen, die BrdU-Labeling-Lösung (10 μM) in die Wells gegeben und für 2,5h im Brutschrank inkubiert. Danach wurde mit Medium gewaschen und die Zellen mit vorgekühlter Fixierlösung (0,5M HCL in 70% EtOH) für 30min bei -20°C fixiert. Anschließend wurden die Zellen für 30min mit einer Nuclease-Working-Solution (1:100) bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach einem

dreimaligen Waschschrift mit Medium wurde anschließend mit dem Primärantikörper (anti-BrdU-POD-Fab fragments-working solution) erneut für 30min im Wasserbad inkubiert. Nach wiederholten Waschschriften mit einer Waschlösung (1:10), wurde das ABTS-Peroxidase-Substrat mit Substrat-Enhancer appliziert und für 30min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit bzw. der Farbentwicklung wurden die Wells einzeln photometrisch mit Hilfe eines Photometers bei einer Wellenlänge von 405nm gemessen. Als Referenz diente das reine ABTS-Peroxidase-Substrat. Die gemessenen Werte wurden mittels des Excel-Programmes graphisch erfasst und die Standardabweichung der jeweiligen Testsubstanz als Fehlerbalken dargestellt.

2.6 Reporteranalysen

Als Reportergene versteht man DNA-Sequenzen, die aus einem induzierbaren bzw. konstitutiven Promotorelement bestehen, welches die Expression eines messbaren Enzyms kontrolliert. Die Aktivitätsmessung des Reporterproteins erlaubt somit eine indirekte Bestimmung der Transkriptionsaktivität der Promotorsequenz unter bestimmten Bedingungen.

In dieser Arbeit wurde ein Luziferase-Reportersystem (Dual-Luciferase Reporter Assay System) von Promega verwendet. Dieses System ermöglicht Aktivitätsmessungen von zwei Luziferasen, einer Reporterluziferase [Firefly-Luziferase, einem Enzym des nordamerikanischen Leuchtkäfers (*Photinus pyralis*)] und einer Referenzluziferase [Renilla-Luziferase, einem Enzym der Seeanemone (*Renilla reniformis*)]. Die Genexpression der Reporterluziferase wird durch den zu analysierenden Promotorbereich kontrolliert, während die Genexpression der Referenzluziferase durch einen Promoter (SV40-Promotor) reguliert wird, dessen Aktivität relativ konstant ist. Die Referenzluziferase dient zum Ausgleich von unterschiedlichen Transfektionseffizienzen. Das Referenzluziferasegen befindet sich auf dem Plasmid pRL-SV40 (Abb. 5.2.1 B), das der Reporterluziferase auf dem pGL3 Plasmid (Abb.5.2.1 A). Um herauszufinden, ob Xenoestrogene via genomischen, ER-abhängigem Mechanismus am „estrogen response element“ (ERE) binden und somit wie das Hormon E2 wirken können, wurde dem Reporterplasmid pGL3 ein ERE dem Luziferasegen vorgeschaltet. Das auf diese Weise entstandene Plasmid mit Namen pERE wurde mir freundlicher Weise von Frau Dr. Silke Kietz (Karolinska Institut, Huddinge, Schweden) zur Verfügung gestellt.

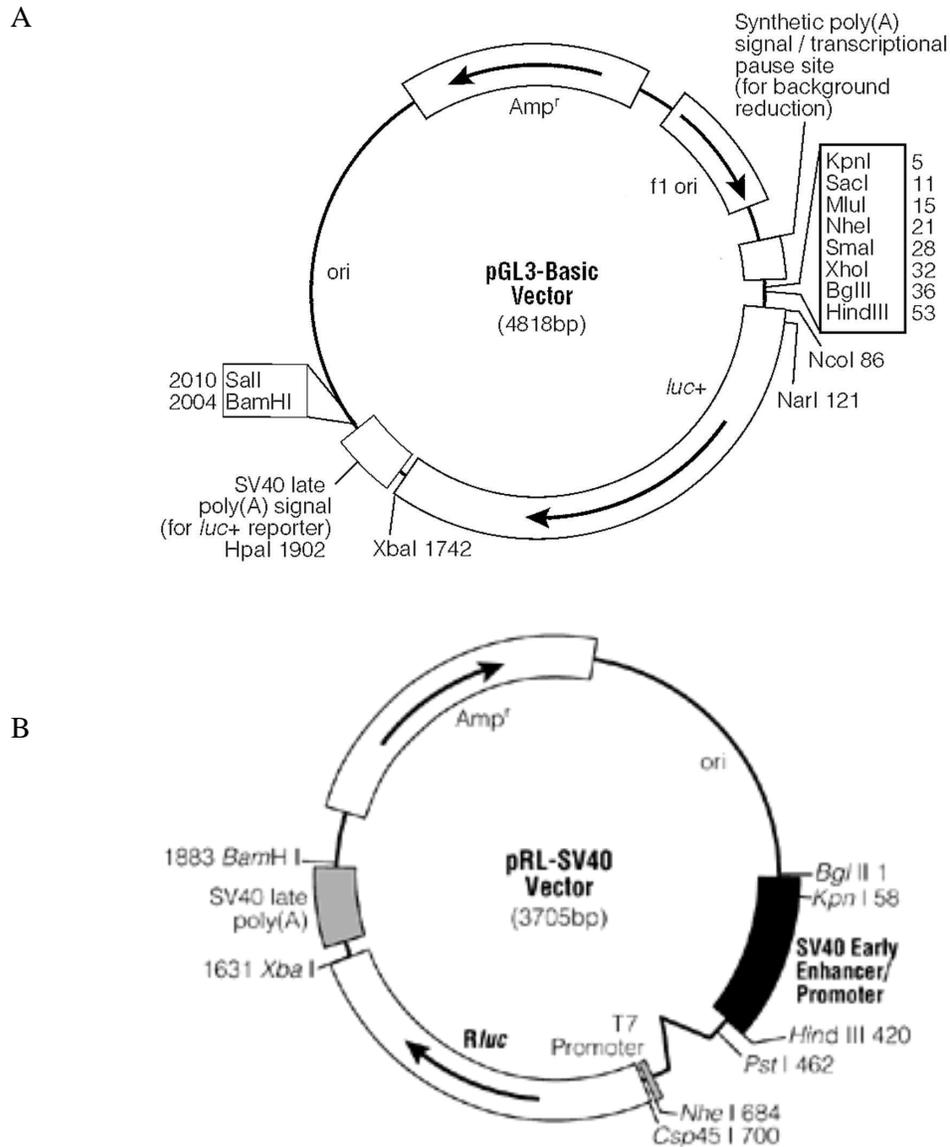


Abb. 2.6.1 A und B: Schematische Darstellung der verwendeten Plasmide. Die in dieser Arbeit für Transfektions-eruche verwendeten Plasmide des Reportergenvektors pERE (A) sowie des Kontrollvektors pRL-SV40 (B) sind schematisch dargestellt.

Bei der Umsetzung bestimmter Substrate durch Luziferase wird Licht erzeugt, das durch ein Luminometer gemessen werden kann Abb. 5.2.2. Die Quantität des erzeugten Lichtes kann als Maß für die Promotoraktivität benutzt werden. Gleichzeitig wurde untersucht ob die Xenoestrogen-vermittelte Bindung des ER am ERE durch den spezifischen ER-Inhibitor ICI 182780 gehemmt werden konnte.

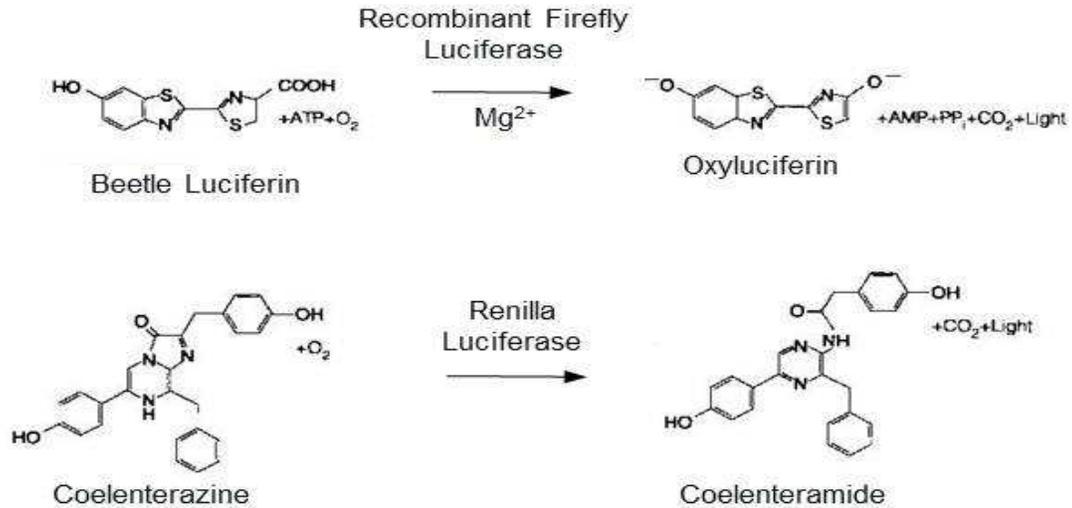


Abb. 2.6.2: Reaktionen der Firefly- und Renilla-Luziferase.

2.6.1 Transiente Transfektion der Zellen mit Plasmiden

Die beiden Plasmide pERE und pRL-SV40 wurden mit Hilfe von kationischen Lipiden in die Zellen kotransfiziert. Kationische Liposomen akkumulieren spontan mit Nukleinsäuren und bilden unilamellare Vesikel. Diese Vesikel fusionieren sodann mit der Zellmembran und gelangen via Endozytose in das Zytoplasma der Zellen (Felgner, 1987; Felgner and Ringold, 1989). Die Bildung der Nukleinsäuren/Lipid-Komplexe wird durch ionische Wechselwirkung zwischen der positiv-geladenen Kopfgruppe der Lipide und der negativ-geladenen Phosphatgruppe der Nukleinsäuren vermittelt. Für eine gute Transfektion ist das Verhältnis zwischen Lipid und DNA einschneidend, wobei die Lipide immer im Überschuss zur DNA eingesetzt werden sollten.

Für die Versuche wurden pro 24-Well je $8,0 \times 10^4$ MCF7-, hTERT-EEC-Zellen oder $6,0 \times 10^4$ MDA-MB-231-Zellen über Nacht in 0,5ml hormonfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurden 0,4ml hormonfreies Medium auf die Wells gegeben und der Transfektionsansatz angefertigt. Für den Transfektionsansatz wurden zuvor zwei Lösungen hergestellt. Für Lösung 1 wurden 50µl hormon- und serumfreies Medium pro Well mit 500ng pERE und 30ng pRL-SV40 gemischt. Lösung 2 bestand aus 50µl hormon- und serumfreiem Medium und 1,5µl Transfectin (Biorad). Lösungen 1 und 2 in einem Polystyrenröhrchen vorsichtig zusammen gemischt und für 20min bei RT unter sterilen Bedingungen inkubiert. Anschließend wurden vorsichtig 100µl Transfektionsansatz pro Well appliziert und für 6h auf den Zellen im Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Testsubstanzen PCB153 und E2 (100ng/ml) allein und zusammen mit dem Inhibitor ICI 182780 sowie als Kontrolle

der reine ER-Inhibitor ICI 182780 (1 μ M) direkt in die Wells pipettiert, wobei auch entsprechende Lösungsmittelkontrollen (Vehicle) mitgeführt wurden. Die Testsubstanz-Inkubation erfolgte über einen Zeitraum von 24h unter normalen Zellkulturbedingungen.

2.6.2 Luziferase Reporter Assay

Nach Inkubation der transfizierten Zellen wurden Luziferase-Aktivitäten gemessen. Dazu wurden die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen, mit 100 μ l passivem 1xLysepuffer versetzt und 15min bei RT auf dem Schüttler lysiert. Danach wurden 50 μ l LAR II (Luziferase-Assay-Reagenz II), welches das Substrat der Firefly-Luziferase enthielt, in ein 6ml Reaktionsgefäß pipettiert, mit 10 μ l Zelllysat versetzt und im Luminometer (Sirius, Berthold Detektion System) gemessen. Anschließend wurden 50 μ l Stop&Glo-Reagenz zu diesem Ansatz dazu pipettiert und die Aktivität der Renilla-Luziferase gemessen. Die Angabe der Lichtausbeute erfolgte in „relative light units“ (RLU). Zur Auswertung wurde die Firefly Luziferase-Aktivität gegen die Renilla-Luziferase-Aktivität normalisiert. Als Kontrolle dienten die hormonfreien Lösungsmittelkontrollen (Vehicle).

2.7 Proteinchemische Methoden

2.7.1 Analyse des klassischen genomischen Estrogen-Signalweges

Um untersuchen zu können, in wie weit sich verschiedene Konzentrationen von PCB153 (10pg-1 μ g/ml) auf die Expression des ER α -Proteins auswirken, wurden Zellen der uterinen Zelllinie hTERT-EEC sowie der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 verwendet. Außerdem wurde der Einfluss von E2 (10pM), des reinen ER-Inhibitors ICI 182780 (1 μ M) allein sowie in Kombination mit PCB153 bzw. E2 in zwei verschiedenen Konzentrationen (100pg/ml und 100ng/ml) auf die beiden gannaten Zelllinien und auf die ER-negative Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 untersucht. Auch wurden wurden Lösungsmittelkontrollen, sowie unbehandelte Kontrollen mit gestripptem Medium mitgeführt.

Die Zellen wurden vor den Versuchen mindestens 48h in den Zellkulturflaschen mit hormonfreiem Medium vorinkubiert. Sobald ein ca. 90%-konfluentes Stadium erreicht war, wurden diese ausgezählt und in einer Zellzahl von 1x10⁴ in 2ml hormonfreiem Medium auf Wells einer 6-Wellplatte verteilt. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit den Testsubstanzen behandelt. Nach 48h Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und je Well mit 150 μ l 2xLämmli-Ladepuffer [5xLämmli-Ladepuffer: 3ml Tris-HCl (1M pH 6.8), 4.5ml 20% SDS, 2.5ml Glycerin, 0.1g Bromphenolblau; mit Aqua

dest./Mercaptoethanol (10%) verdünnen) vollständig auf den 6Wells lysiert. Die Lagerung der Proteinlysate bis zur SDS-PAGE und Westernblotanalyse erfolgte bei -80°C .

2.7.1.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Acrylamid ist ein Monomer und bildet in Gegenwart freier Radikale Polymere aus. In der Gegenwart von N,N'-Methylen-bisacrylamid kommt es zu einer Kettenreaktion, wobei Acrylamid zu einer Gelmatrix, dem Polyacrylamid quervernetzt wird. SDS wird benutzt, um die Proteine zu denaturieren, was zur Entfaltung der Proteine führt. Da die Eigenladung der Proteine im Vergleich zur negativen Gesamtladung der SDS-Proteinkomplexe vernachlässigbar ist, können Proteine im SDS-Polyacrylamidgel nach Größe aufgetrennt werden. Zum Nachweis des 67kDa großen ER α -Proteins wurde ein 10%-ige SDS-Polyacrylamid-Trenngel [für 2 Trenngele: 5ml Acryl-Bisakrylamid-Mix, 5ml 1.5M Tris (pH 8.8), 0,2ml 10% SDS, 0,2ml 10% Ammoniumpersulfat, 9,6ml Aquadest. und 0,008ml TEMED] hergestellt. Zur Konzentrierung der Proteine diente ein Sammelgel [für 2 Gele: 1ml Acryl-Bisacrylamid-Mix, 1ml 1.5M Tris (pH 6.8), 0,08ml 10% SDS, 0,08ml 10% Ammoniumpersulfat, 5,8ml A.dest. und 0,008ml TEMED]. Vor dem Auftragen der Proben auf die Gele wurden die Proteine 5min bei 90°C im Wasserbad zur vollständigen Denaturierung erhitzt. Anschließend wurden je 20 μl der Proteinproben auf die fertigen Gele aufgetragen und für 1,5h bei 90V in 1xLämmli-Laufpuffer [10xLämmli-Laufpuffer: 30.25g Tris, 144.25g Glycine, 10g SDS ad 1L Aqua.dest] vertikal aufgetrennt. Zusätzlich zu den Proben wurden 5 μl eines „prestained“ EZ-Run Protein Markers (Fischer Scientific) auf das Gel aufgetragen.

2.7.1.2 Western Blot

Die mittels Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden anschließend für 1h bei 100V auf eine Nylonmembran (Thermo Scientific) im Blot-Verfahren mittels eines Miniprotean 3-Tank-Transferapparatur (BioRad) gebロットet. Die transferierten Proteine wurden anschließend mit einer Ponceau-Lösung (1% Ponceau S, 7% Eisessig in Aqua.dest.) auf den Membranen angefärbt und zur Dokumentation fotografiert. Anschließend wurden die Membranen mit 5% Milch-1xTBST pH 7.4 [10xTBST: 80g NaCl, 30g Tris, 2g KCl ad 1l A.dest und 0,05% Tween20] für 1h RT geblockt. Nach dem Blocken wurden die Membranen über Nacht mit dem monoklonalen Antikörper ER α 1:1000 (NCL-ER-66F11; Novo Castra) sowie dem β -Actin 1:10000 (A5441; Sigma) in 3% BSA-TBS (ohne Tween) im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Membranen 3x5min mit 1xTBST pH 7.4 (mit 0,05% Tween) gewaschen und danach mit einem Meerrettich-Peroxidase-konjugierten Ziege AntiMaus-

Sekundärantikörper 1:5000 (A5278; Sigma) in 3% BSA-PBST (0,05% Tween) für 1h RT inkubiert. Danach wurden die Membranen 3x je 15min mit PBST (0,05% Tween20) gewaschen und die Proteinbanden mittels ECL Western Blotting Substrate (32209; Pierce; Thermo Scientific) auf Röntgenfilmen (CL-X Posure, Thermo Scientific) im Dunkelraum sichtbar gemacht.

2.7.2. Analyse des unspezifischen, MAPK-vermittelten Signalwegs

Die nicht-genomische E2-vermittelte Wirkungsweise von ER erfolgt über eine Phosphorylierung des Serinrestes an der Aminosäure 118 und induziert die Aktivierung von ERK1/2, welche Proliferation und Differenzierung reguliert.

Die Aktivierung von ERK1/2 erfolgt über eine spezifische Phosphorylierung zweier Aminosäurereste (Thr-183 und Tyr-185) durch MEK1/2, einer spezifischen MAPKK. Durch den Einsatz des spezifischen MEK1/2 Inhibitors U0126 (Cell Signaling, Danvers, USA) kann die Aktivierung von ERK1/2 verhindert werden.

Um herauszufinden, ob Xenoestrogene in der Lage sind, mit dem MAPK-Signalweg zu interferieren, wurden Zellen mit PCB153, p,p'DDE, β HCH, oder mit dem Phytoestrogen Coumestrol oder mit E2 als Kontrolle in verschiedenen Konzentrationen (100pg/ml und 100ng/ml) mit und ohne den Inhibitor U0126 (3 μ M) inkubiert. Für diese Versuche wurden die Zellen auf Zellkulturschalen (Sarstedt) in einer Zellzahl von 1×10^6 in 10ml Vollmedium angesetzt. Am nächsten Tag wurde das Medium gegen 10ml hormonfreies Medium ausgetauscht. Nach 6h Präinkubation erfolgte die Exposition der Zellen mit den Testsubstanzen. Als Kontrollen dienten mit gestripptem Medium inkubierte bzw. eine mit entsprechendem Lösungsmittel des Xenoestrogens behandelte Zellen. Nach 48h Inkubation wurde das Medium abgenommen, die Zellen einmal mit 1xPBS gewaschen und je Schale 1ml hormonfreies Medium mit 10% FKS zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber vom Untergrund vollständig abgelöst und in ein 2ml Eppendorfgefäß auf Eis überführt. Die Zellen wurden durch Zentrifugation für ca. 10s pelletiert, der Überstand mit einer Pasteurpipette entfernt, das Zellpellet einmal mit 1xPBS gewaschen und erneut kurz abzentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig entfernt und die Zellen mit 150 μ l CAT-Lysepuffer (250mM TrisHCl, pH 7,5) durch vortexen lysiert. Zur vollständigen Lyse der Zellen wurden diese abwechselnd 5min auf Trockeneis und 2min in ein 37°C vorgeheizten Thermoblock gesetzt. Dieser Prozess wurde drei Mal wiederholt, wodurch es zum Aufplatzen der Zellen kam und ein Gesamtzellproteinextrakt entstand. Abschließend wurden das Lysat 5min bei höchster Stufe und 4°C zentrifugiert und der daraus resultierende Überstand in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäß überführt. Abschließend

wurde der Proteingehalt der Lysate mittels Bradfordanalyse (BioRad) und photometrischer Messung bei 595nm im Spektralphotometer ermittelt. Alle Proben wurden dann mit CAT-Lysepuffer auf die gleiche Proteinkonzentration (1µg/1µl) eingestellt. 10µl Proteinproben wurden anschließend mit 5µl 4xAuftragspuffer [1M TrisHCl (pH 7,0), 10% SDS, 0,1% Bromphenolblau, 20% Glycerin, 5% Mercaptoethanol in Aqua.dest] gemischt und die auftragsfertigen Proben bei -20°C im Tiefkühlschrank gelagert. Die SDS-PAGE und die Westernblotanalyse erfolgte wie unter 2.7.1.1 und 2.7.1.2 beschrieben, außer dass die Proteine auf Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membranen (Millipore) transfiziert wurden. Vor dem Proteintransfer wurde die PVDF-Membran durch 5min-Inkubation in Methanol aktiviert. Nach dem Transfer der Proteine wurde die Membran w mit 2% Milch-1xWaschpuffer [5,8g NaCl, 10ml 1M TrisHCl (pH 7,5), 2ml 0,5M EDTA (pH 8,0) ad 1l A.dest und 0,05%Tween20] für 10min bei RT geblockt. Zum Nachweis der ERK1/2-Aktivierung wurden die Primärantikörper Anti-ERK1/2- und Anti-Phospho-ERK1/2- (Cell Signaling) in einer 1:2000 Verdünnung verwendet. Als Sekundärantikörper diente ein Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase-konjugierter Antikörper (HRP-linked IgG, Cell Signaling), ebenfalls in einer 1:2000 Verdünnung. Die Detektion der 42 und 44 kDa großen PhosphoERK1/2- bzw. der ERK1/2-Proteine als Kontrolle erfolgte in weiteren Schritten wie unter 2.7.1.2 beschrieben.

2.8 Quantitative RT-PCR-Analysen

Zur Untersuchung des Einflusses von Xenoestrogenen auf die Expression bestimmter Gene, wurde die quantitative RT-PCR durchgeführt. Dafür wurden Zellen beider untersuchter Zelltypen für 24h mit PCB153 und E2 gleicher Konzentration (100ng/ml) sowie mit ICI 187280 (1µM) unter normalen Kulturbedingungen inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde, wie im Kapitel 2.8.2 beschrieben, die Gesamt-RNA der Zellen isoliert sowie eine cDNA hergestellt (siehe 2.8.3).. Die für die qRT-PCR verwendeten Primer sind in der Tab. 2.6.1 aufgelistet.

2.8.1 Verwendete Primer

Alle in diesem Kapitel verwendeten Primer wurden von MWG Biotech (Ebersfeld) oder Roth (Karlsruhe) bezogen. Bei der Auswahl der Primersequenzen wurde darauf geachtet, dass diese die Exongrenzen überspannen, um nur die Detektion der gesplitten mRNA zu ermöglichen. Im Falle der Bildung von Primer-Dimeren wurde der betroffene Primer ersetzt. Die Primersequenzen sind in Tabelle 2.8.1 aufgeführt. Eine Erklärung der Gensymbole erfolgt im entsprechenden Ergebnisteil.

Gensymbol:	Forwardprimer:	Reversprimer:
	(Sequenzen der Primer in 5'→3' Richtung)	
GAPDH	GAAGGTGAAGGTCGGAGT	GAAGATGGTGATGGGATTTC
HPRT	GGACAGGACTGAACGTCTTGC	TGAGCACACAGAGGGCTACAA
ER α	ATCTGCAGGGAGAGGAGT	TTCTCTCCAGAGACTTC
ER β	CAAGAACC GGCGTAAAAGCT	TCCTACTTCGTAACACTTGCGAAG
AhR	TATCAGTGCCAGCCAGAACCT	TTGTACTGCATCTGACCCACGT
ARNT	CATGGCGGCGACTACTGCCA	TGAAATTCCAGGTCCAGA
GPR30	TTCCTCTCGTGCCTCTACACC	GCCCACAAAGCCGATGG
Ki67	AACTATTATTGATCGTTC	TTGAGACACGACGTGCTG
EGFR	AGTCGGGCTCTGGAGGAA	TCTGATGATCTGCAGGTT
MMP9	CCCGGACCAAGGATACAGTTT	GGAATGATCTAAGCCCAGCG
VEGF	AAGGAGGAGGGCAGAATCAT	CACACAGGATGGCTTGAAGA
CYP1A1	AGGACTAGGGCTGGAGTGAG	CAAGCATGCAAGCTCAATG
SOCS	CTCTCCTGGTTGGCTTCTTG	GTGGCCACTCTTCAGCATCT
COX-2	GCACCTTGCTGGCAGGGTT	TCTGTACTGCGGGTGGAAACAT
PAI-1	GGCCATGGAACAAGGATGAGA	GACCAGCTTCAGATCCCGCT
uPA	ATTCCTGCCAGGGAGACTCAG	CCAGTCAAAGTCATGCGGC

Tab. 2.8.1 Liste der für die qRT-PCR verwendeten Primer. Die vollständigen Genbezeichnungen der hier aufgelisteten Gensymbole wurden im entsprechenden Ergebnisteil (siehe 3.4) aufgelistet.

2.8.2 Gesamt-RNA-Isolierung

Die RNA-Isolierung erfolgte mit dem Total RNA Isolation Spin-Kit (AppliChem, Darmstadt) nach Angaben des Herstellers. Zellen wurden in Standardzellkulturschalen (100x20mm, Sarstedt) gezüchtet. Nach Entfernung des Medium wurden Zellen zweimal mit 1xPBS gewaschen. Danach wurden die Zellen mittels Zellschaber direkt in der Zellkulturschale mit 800 μ l Lysepuffer lysiert und in 1,5ml Eppendorfgefäße überführt. Zur vollständigen Lysierung wurde für 5min bei 50°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von je 200 μ l Chloroform mit sofortigem Vortexen der Proben für 20sec und anschließender Zentrifugation für 10min bei 14000rpm und 4°C. Während des Zentrifugationsschrittes wurden jeweils die mit 250 μ l Isopropanol gefüllten Eppendorfgefäße vorbereitet, in welche die wässrigen Phasen der Proben nach erfolgter Zentrifugation überführt wurden. Zur Ausfällung der Nukleinsäuren wurden die Proben mehrmals geschüttelt und auf Nukleinsäure-bindende Säulen gegeben. Es folgte eine erneute Zentrifugation für 1min bei 14000rpm bei RT. Danach wurden die Proben zweimal mit 700 μ l Waschlösung auf den Säulen gewaschen und erneut wie oben beschrieben abzentrifugiert. Zur Eluierung der RNA wurden die Säulen in ein neues 1,5ml Eppendorfgefäße überführt und mit je 25 μ l DEPC-behandeltem Aquadest. für 3min auf den Säulen bei RT inkubiert. Nach Inkubation erfolgte eine letzte Zentrifugation der Säulen für 1min bei 14000rpm RT. Die Konzentration der RNA wurde mit dem Photometer Ultrospec 1000 (Phar-

macia Biotech) bestimmt. Die RNA-Proben wurden dafür zuvor mit Aquadest. 1:100 verdünnt. Die Messung erfolgte bei 260nm in einer Quarzküvette, wobei ein OD₂₆₀=1 einer RNA Konzentration von 40ng/μl entspricht. Zusätzlich wurde eine Messung bei 280nm durchgeführt. Der Quotient aus der gemessenen OD bei der Wellenlänge von 260nm und 280nm zeigt eine eventuelle Proteinverunreinigung der RNA an, wobei der Quotient der verwendeten RNA meist zwischen 1,7 und 2,0 lag.

2.8.3 Agarose-Gelelektrophorese

Um die RNA-Qualität zu überprüfen, wurde die RNA mit Hilfe einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Scharfe 28S- und 18S- rRNA Banden zeigten an, dass die RNA nicht degradiert war. Die Auftrennung der Gesamt-RNA nach Molekulargewicht erfolgte in einem 1 %-igen Agarosegel in. Die 1xTAE-Puffer gelöst und. Die Gelelektrophorese erfolgte in einer horizontalen Elektrophoresekammer im 1xTAE-Laufpuffer bei 90 V für ca. 30 min.

PCR-Produkte wurde in 1.8%igen Agarosegelen aufgetrennt. Als Größenmarker diente eine 1kb DNA-Leiter (O'GeneRuler 50bp DNA Ladder, MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Anschließend wurde das Gel für 15min in Ethidiumbromidlösung (2μg/ml) inkubiert, gewaschen und fotografiert.

2.8.4 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurden die RNA-Proben auf eine Konzentration von 1μg/10μl eingestellt. Danach wurde jede Probe mit 1μl 10mM dNTP Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Roth) 1μl 25μM Random Nonamers (Sigma, Taufkirchen) 0,5μl RNAsin (Promega) und 0,5μl DEPC-behandeltem A.dest. auf versetzt, für 5min bei 65°C inkubiert und anschließend sofort im Eiswasser abgekühlt. Danach wurden 4μl 5x FirstStrand Buffer und 2μl 0.1M DTT hinzugefügt. Anschließend erfolgte die Anlagerung der Primer (Annealing) während der Inkubation bei 25°C für 2min. Nach Zugabe von 1μl Superscript II RNase H⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) erfolgte die Synthese der cDNA durch sequentielle Inkubation bei 25°C für 10min, und 45°C für 50min. Anschließend wurde durch Inkubation bei 70°C für 15min die Synthese gestoppt. Die somit erhaltene cDNA wurde bis zur Verwendung bei -20°C gelagert.

2.8.5 Quantitative Real-Time-Polymerase Kettenreaktion (qRT-PCR)

Die qRT-PCRs wurden mit Hilfe des Absolute QPCR SYBR Green Fluorescein Mix (Abgene, Surrey,UK) durchgeführt. Dafür wurde für jeden 20μl Reaktionsansatz je 10μl SYBR

Green Fluorescein Mix, 2µl einer 1:20 verdünnten cDNA, 3µl Nuklease-freiem Wasser (Fermentas) sowie je 2,5µl der jeweiligen Primerlösung (5pmol) gemischt, in entsprechende 8er Thermotubestreifen (PeqLab, Erlangen) gefüllt und in einem iCycler (Biorad, Hercules, California, USA) inkubiert bzw. analysiert. Folgende Zyklen wurden durchgeführt:

1. Initiale Denaturierung:	95°C 15min	} 40 Zyklen
2. Denaturierung:	95°C 15s	
3. Annealing:	60°C 1min	
4. Elongation:	72°C 1min	
5. Kühlung:	4°C ∞	

(Schmelzkurve: in 0,5 °C Schritten 5 sec je Schritt bis 99 °C)

Jede Messung erfolgte als Doppelansatz. Die Ergebnisse wurden mit der iCycler iQ Optical System Software (Version 3.1) von Biorad analysiert. Der relative RNA-Gehalt der Proben wurde mit der $C_t(2^{-\Delta\Delta C_t})$ -Methode anhand der C_t -Werte der automatisch von der Software analysierten Threshold Cycles bestimmt. Die PCR-Produkte wurden gelegentlich nach einer qRT-PCR auf ein Agarose-Gel aufgetragen und zur Dokumentation fotografiert. Die zu jedem Primerpaar gehörige erhaltene Schmelzkurve aller PCR Produkte wurde nach erfolgter qRT-PCR analysiert um eine eventuelle Bildung von Primer-Dimeren auszuschließen, da diese sonst das Ergebnis verfälschen würden.

Zur Normalisierung wurden die beiden Housekeeping-Gene GAPDH (Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase) und HPRT (Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase) zur Normalisierung eingesetzt. Es wurde der Mittelwert der jeweiligen Doppelansätze aus Gen (X) bzw. Normalisierungsgen (N) verwendet. Der Algorithmus lautete wie folgt:

1. $(X_1+X_2) * \frac{1}{2} = X$
2. $(N_1+N_2) * \frac{1}{2} = N$
3. Expression = $2^{-(X-N)}$

2.9 Zweikammerfilter-Motilitätsassay

Um herauszufinden, ob Xenoestrogene auch in der Lage sind die Motilität von Zellen erhöhen, wurde bei hTERT-EEC Zellen ein Zweikammerfilter-Motilitätsassay mit PCB153-, PCB126- und TCDD-Inkubationen durchgeführt.

Hierfür wurden 12-Well Zellkulturplatten (Costar, Bodenheim) und Filtereinsätzen mit einer Polykarbonat-Filtermembran und einer Porengröße von 12µm eingesetzt. Die hTERT-EEC Zellen wurden 24h mit PCB153 (100ng/ml) in einer Zellkulturflasche präinkubiert. Anschließend wurden die Zellen in einer Zelldichte von 5×10^4 Zellen/Well auf die Filterinserts gegeben, wobei je drei Filtereinsätze wurden pro Testsubstanz verwendet wurden. Die Zellen

verblieben dann für weitere 18h in den Wells mit PCB153, PCB126 (beide 100ng/ml) und TCDD (10nM) in hormonfreiem Medium unter normalen Zellkulturbedingungen. Eine Kontrolle mit der entsprechenden Menge an Lösungsmittel wurde ebenfalls mitgeführt. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die die Filtereinsätze aus den Wells entnommen und die Zellen auf der oberen Seite des Filters mit einem Wattestäbchen vorsichtig entfernt. Nach dem Waschen der Filterunterseite mit gekühltem 1xPBS und überschüssigem PBS entfernt. Umgehend wurden die Filter sodann für 5min in PBS/Methanol und danach für weitere 15min in reinem Methanol fixiert. Anschließend wurden die an der Unterseite der Filtermembran fixierten Zellen mit Toluidinblau (0,1% in 2,5% Natriumkarbonat) für 45min bei RT angefärbt. Anschließend wurden die Zellen auf den Membranen bei 40facher Vergrößerung im Mikroskop (Zeiss) gezählt, wobei jeweils fünf ausgezählte Flächen/Filter für jede Testsubstanz ausgezählt und die Anzahl der migrierten Zellen gegen die Filterfläche normalisiert wurden. Die Anzahl der migrierten Zellen/Filter wurde mittels Excel-Programm für die jeweiligen Testsubstanzen zusammen dargestellt.

2.10 Statistische Auswertungen

Zur Bestimmung der signifikanten Abweichung zwischen den einzelnen Datenmengen wurde der Student's *t*-Test für unverbundene Stichproben bzw. ANOVA genutzt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Die Versuchswiederholungen der aufgeführten Experimente (n) sind jeweils in den Abbildungen mit angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Xenöstrogenwirkung auf Zellwachstum und Proliferation

Estrogene besitzen wachstumstimulierende Wirkung auf ER α -exprimierende Zelllinien, wie MCF-7 Brustkrebszellen. Um zu testen, inwieweit die Xenöstrogene PCB153, p,p'DDE, β -HCH und das Phytoestrogen Coumestrol ebenfalls das Wachstum und die Proliferation solcher Zellen anregen, wurden Sulforhodamin B-Assays durchgeführt, der Status des Proliferationsmarkers Ki67 und der BrdU-Einbau in die DNA untersucht. Um die Beteiligung des ERs an einem möglichen wachstums- und proliferationsfördernden Effektes dieser Substanzen zu beurteilen, wurde in einem Parallelansatz die Aktivität von ER durch das Antiestrogen ICI 182780 blockiert.

3.1.1 Sulforhodamin B Assay (SRBA) mit dem ER-Inhibitor ICI 182780

Der Einfluss von PCB153, p,p'DDE, β -HCH, Coumestrol und E2 in Gegenwart und Abwesenheit von ICI 182780 auf das Wachstum von Endometriumzellen (hTERT-EEC-Zellen, RLU95-2-Zellen und Primärzellen aus Endometriose-Explantaten) wurde untersucht. Das relative Zellwachstum wurde nach 96h mit Hilfe des Sulforhodamin B-Assays bestimmt.

Die Zelllinie hTERT-EEC sprach generell auf alle getesteten Substanzen in Abwesenheit des Inhibitors ICI 182780 mit einer deutliche Zunahme des relativen Wachstums im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle an (Abb. 3.1.1.1 A-E). Die höchsten Wachstumssteigerungen ergaben sich durch Inkubation mit E2 (Abb. 3.1.1.1 E). Hierbei war das Wachstum über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von 1pg/ml-1 μ g/ml E2 signifikant auf einen ähnlichen Wert erhöht. Durch Koinkubation von E2 mit ICI 182780 konnte diese Wachstumszunahme gehemmt werden. Das Ausmaß dieser Hemmung nahm mit steigender E2-Konzentration ab, was, auf eine kompetitive Hemmung des ERs durch ICI 182780 hinweist. Eine ähnlich hohe signifikante Wachstumssteigerung erzielte eine 96h Inkubation mit dem Xenöstrogen PCB153 (Abb. 3.1.1.1 A). Auch hier konnte das Wachstum durch Zugabe des ER-Inhibitors ICI 182780 gehemmt werden. Interessanterweise war diese Hemmung über den gesamten gemessenen Konzentrationsbereich gleich stark. Das Xenöstrogen p,p'DDE erzeugte ebenfalls über den gemessenen Konzentrationsbereich eine Wachstumssteigerungen. Diese waren jedoch aufgrund zu hoher Standardabweichungen statistisch nicht signifikant (Abb. 3.1.1.1 B). Auch diese Wachstumssteigerungen konnten durch ICI 182780 blockiert werden. Diese Hemmung war bei 100pg/ml p,p'DDE statistisch signifikant. Bei β -HCH zeigten sich signifikante wachstumssteigernde Effekte bei den Konzentrationen von 100ng/ml bis 1 μ g/ml. Diese Erhöhungen im Wachstum konnten durch den ER-Inhibitor signifikant gehemmt werden.

Auch das Phytoestrogen Coumestrol zeigte wachstumsfördernde Wirkung. Das Ausmaß dieser Wirkung änderte sich mit der Konzentration der Substanz. Die Dosis-Wirkungskurve scheint, anders als bei den anderen Substanzen, einen sigmoiden Verlauf zu nehmen (Abb. 3.1.1.1 D). Auch die wachstumsfördernde Wirkung von Coumestrol konnte durch ICI 182780 signifikant gehemmt werden. Diese Daten zeigen, dass die getesteten Xenoestrogene und das getestete Phytoestrogen ähnlich wie Estradiol das Wachstum der hTERT-EEC-Zelllinie in einer ER-abhängigen Weise stimuliert.

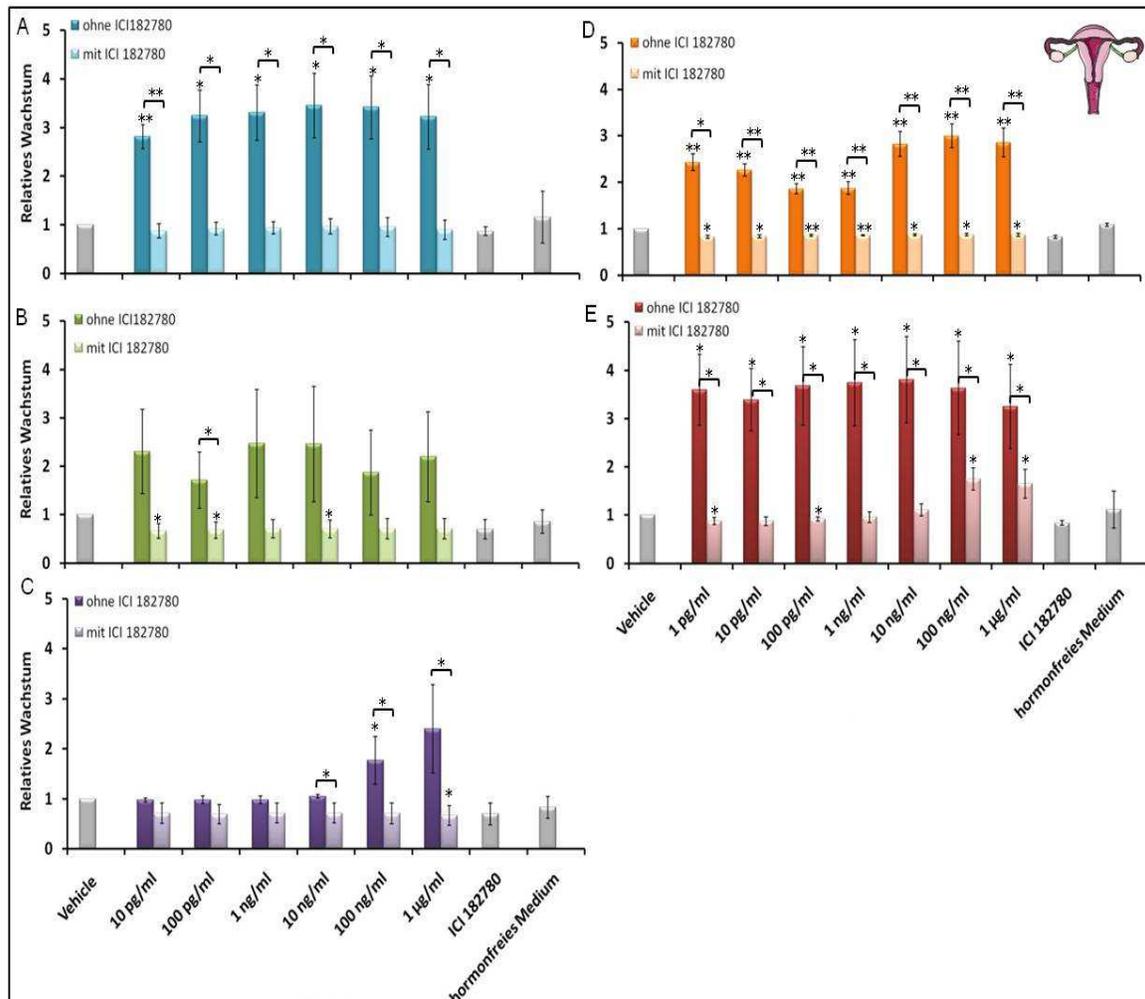


Abb. 3.1.1.1 A-E: Relatives Wachstum nach Testsubstanzinkubation mit und ohne ICI 182780 bei hTERT-EEC im SRBA. Dargestellt wurde das relative Wachstum von Zellen der aus primärem Endometrium generierten Zelllinie hTERT-EEC nach 96h Inkubation mit den Xenoestrogenen PCB153 (A), p,p'-DDE (B), (C) β-HCH, dem Phytoestrogen Coumestrol (D) sowie mit E2 als Kontrolle (E) im Sulforhodamin B Assay (SRBA). Helle Balken entsprechen der Koinkubation der jeweiligen Testsubstanz mit dem ER-Inhibitor und ICI182780 im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ zum Kontrollwert (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 (1µM) sowie unbehandeltes, hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* p < 0,05; ** p < 0,001). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Testsub-

stanzkonzentrationen mit Inhibitor gegenüber ohne diesem, wurden mit speziellen Klammern, welcher die jeweilige Testsubstanzkonzentration mit bzw. ohne Inhibitor zusammenfassen, dargestellt, (n=3).

Bei den Primärzellen aus Endometriose-Explantaten zeigten sich generell keine messbaren Wachstumsveränderungen durch die getesteten Substanzen (Abb. 3.1.1.2). Schwache, signifikante Veränderungen zeigte sich bei diesen Zellen nur für das Phytoestrogen Coumestrol beim Vergleich Coumestrol gegenüber Coumestrol plus ICI 182780 (Abb. 3.1.1.2 D). Auch zwischen E2 und E2 plus ICI 182780 konnten vereinzelt Unterschiede festgestellt werden (Abb. 3.1.1.2 E).

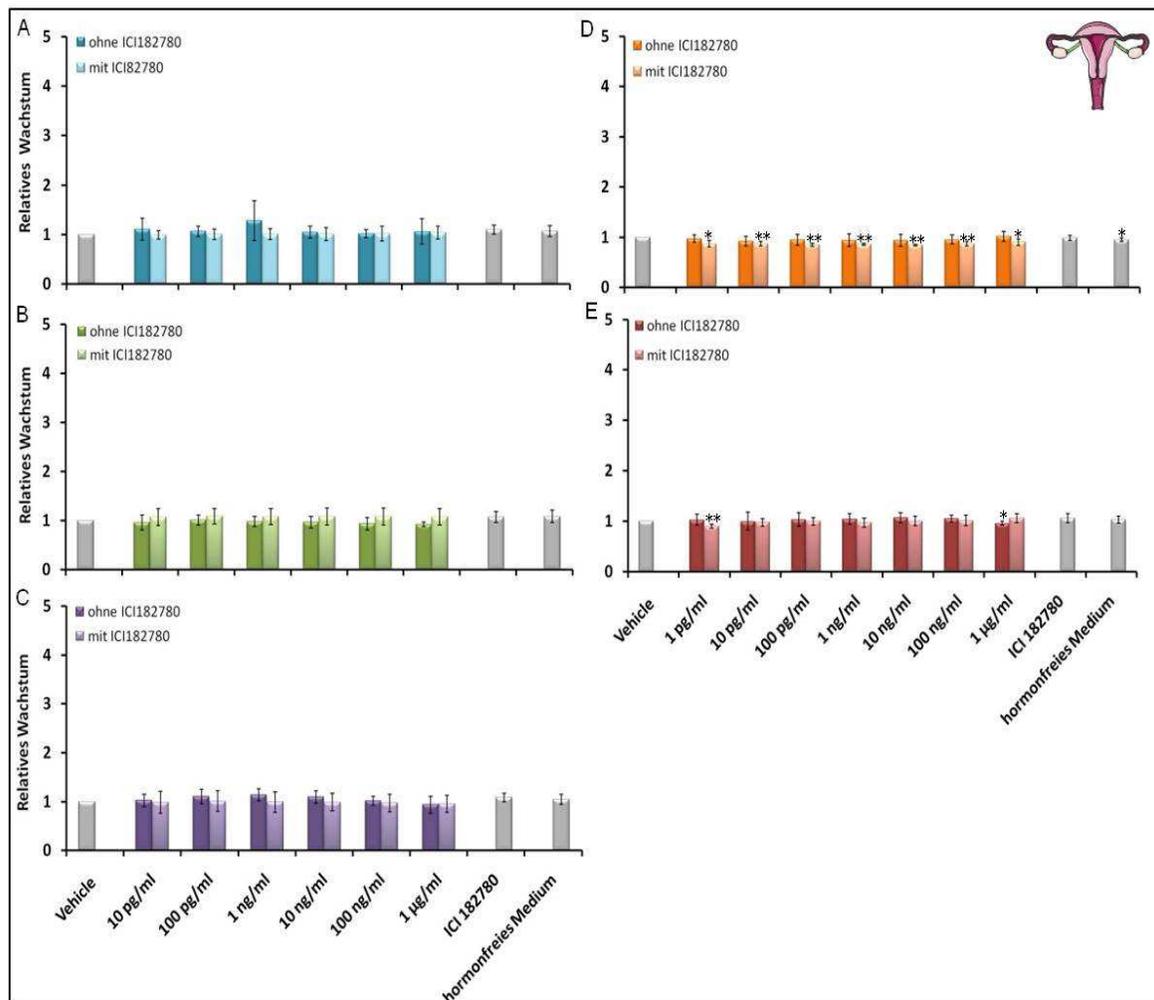


Abb. 3.1.1.2 A-E: Relatives Wachstum nach Testsubstanzinkubation mit und ohne ICI 182780 bei Zellen aus primären Endometriose-Explantaten im SRBA. Dargestellt wurde das relative Wachstum von Endometriose-Primärzellen nach 96h Inkubation mit den Xenöstrogenen PCB153 (A), p,p'DDE (B), β-HCH (C), dem Phytoestrogen Coumestrol (D) sowie mit E2 als Kontrolle (E) im Sulforhodamin B Assay (SRBA). Helle Balken entsprechen der Koinkubation der jeweiligen Testsubstanz mit dem ER-Inhibitor ICI182780 im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ zum Kontrollwert (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 (1µM) sowie unbehandeltes, hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen

gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen * wurden direkt über den Balken dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$), ($n=5$).

Bei Zellen der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL95-2 zeigte sich nach 96h Testsubstanz-einwirkung ein ähnliches Bild wie bei den Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Signifikante Veränderungen des relativen Wachstums zeigten sich bei diesem Zelltyp bei bestimmten Konzentrationen von p,p'DDE und E2 (Abb. 3.1.1.3 B und E).

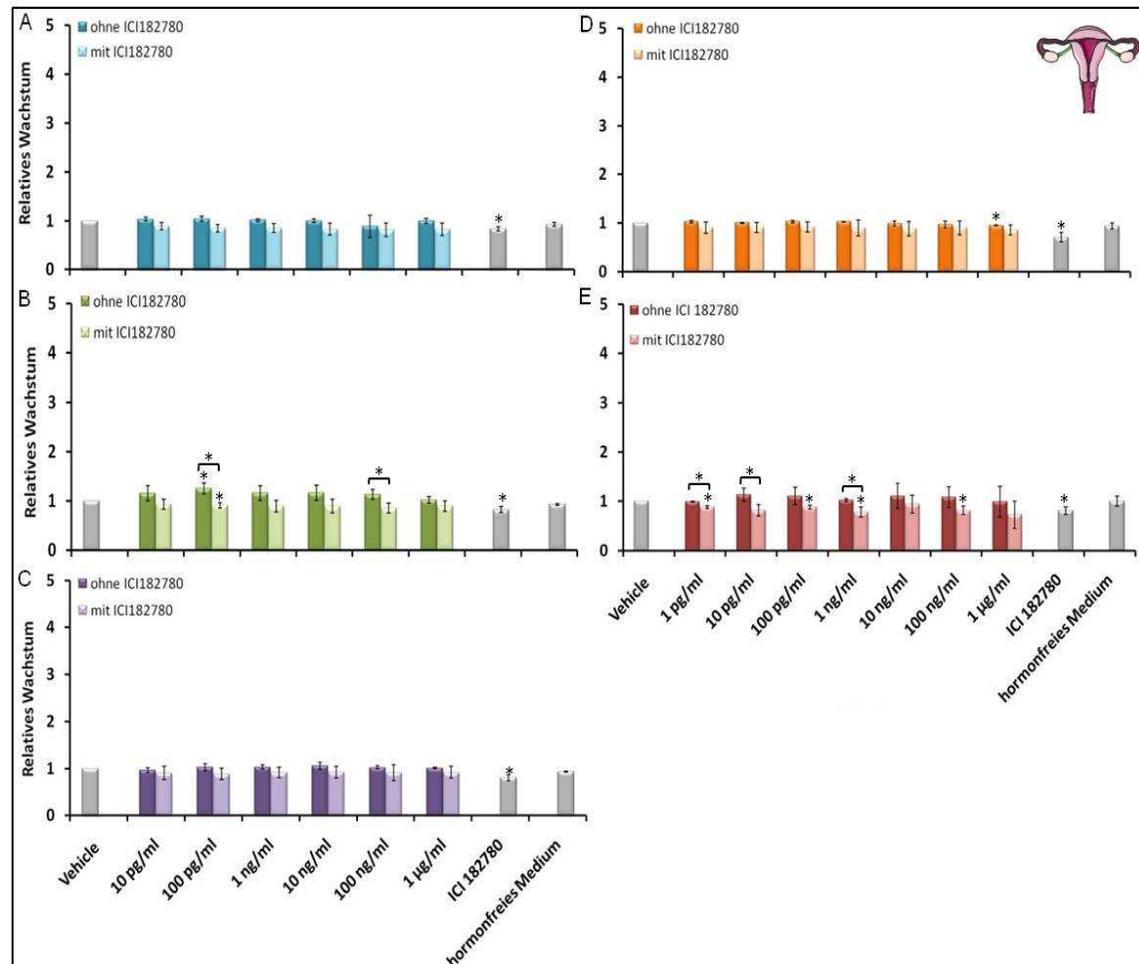


Abb. 3.1.1.3 A-E: Relatives Wachstum nach Testsubstanzinkubation mit und ohne ICI 182780 bei RLU95-2 im SRBA. Dargestellt wurde das relative Wachstum von RLU-95-2 Zellen nach 96h Inkubation mit den Xenoestrogenen PCB153 (A), β -HCH (B), p,p'DDE (C), dem Phytoestrogen Coumestrol (D) sowie mit E2 als Kontrolle (E) im Sulforhodamin B Assay (SRBA). Helle Balken entsprechen der Koinkubation der jeweiligen Testsubstanz mit dem ER-Inhibitor ICI182780 im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ zu den Kontrollwerten (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 (1 μ M) sowie unbehandeltes, hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Testsubstanzkonzentrationen mit Inhibitor gegenüber ohne diesen, wurden mit speziellen Klammern, welcher die jeweilige Testsubstanzkonzentration mit bzw. ohne Inhibitor zusammenfassen, dargestellt, ($n=3$).

Dabei erwies sich auch bei diesem Zelltyp ICI 182780 hemmend auf die Effekte von p,p'DDE- und E2. Außerdem wirkte p,p'DDE bei einer Konzentration von 100pg/ml schwach wachstumsfördernd.

3.1.2 Proliferationsverhalten unter Xenoestrogeneinfluss

Der Einfluss der Xenoestrogene auf die Proliferation von Zellen wurde am Beispiel von PCB153 getestet. Zuerst wurde immuncytochemisch die Expression des Proliferationsmarkers Ki67 bei der Brustkrebszelllinie MCF7 sowie der uterinen Zelllinie hTERT-EEC analysiert. Durch Inkubation mit dem Xenoestrogen PCB153 bzw. des Hormons E2 als positive Kontrolle wurden Veränderungen in den Färbungsintensitäten dieses Markers gemessen. Anhand der Auszählung der unterschiedlich gefärbten Zellen war es möglich, den proliferativen Effekt der getesteten Substanzen mit Hilfe eines Ki67-Scores zu ermitteln (Kapitel 3.1.2.1). Anschließend wurde mittels des nichtradioaktiven 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) die DNA-Synthese unter Testsubstanzeinfluss bei zwei Mammakarzinom-Zelllinien, der ER α -positiven MCF7 sowie der ER α -negativen MDA-MB-231 gemessen (Kapitel 3.1.2.2).

3.1.2.1 Expression des Proliferationsmarkers Ki67

3.1.2.1.1 Ki67-Expression in Brustkrebszellen bei An- und Abwesenheit von PCB153 oder E2

Zur Evaluierung des Einflusses von PCB153 und E2 auf die Ki67-Expression, wurden die ER α und β positive Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 verwendet.

Ki67 konnte im Kern von MCF-7 Zellen nachgewiesen werden. Nur wenige Zellen wurden deutlich Ki67-positiv. (Abb. 3.1.2.1.1.1). Ki67-positive Zellen gelten als proliferativ aktive Zellen.

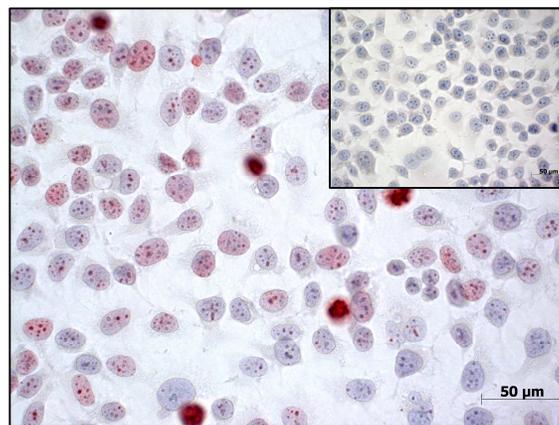


Abb. 3.1.2.1.1.1: Immunocytochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 in MCF7-Zellen. Darstellung Ki67-positiver Zellkerne bei MCF7-Zellen nach Inkubation mit hormonfreiem Medium und Immuncytochemie mit dem monoklonalen Anti-Ki67 Primärantikörper Mib-1 (1:10;

Dianova). In der Negativkontrolle (kleines Bild) wurden Zellen unter gleichen Bedingungen behandelt, jedoch ohne Primärantikörper. Bei allen Zellen wurde mit Hämatoxylin eine Gegenfärbung der Kerne durchgeführt. (40xVergrößerung)

Die im Kern von MCF7-Zellen immunocytochemisch nachgewiesene Proteinexpression von Ki-67 zeigte sich über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich von PCB153 (10pg/ml-1µg/ml) gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht. Dies spiegelte sich in signifikant erhöhten Ki-67 Scores für die PCB153-Konzentrationen 100pg/ml, 100ng/ml und 1µg/ml wieder (Abb. 3.1.2.1.1.2 A). Auch bei der Positivkontrolle E2 war ein erhöhter Ki67-Score erkennbar (Abb. 3.1.2.1.1.2 B). Für PCB153 konnten insgesamt höhere Ki67-Scores als für E2 gemessen werden. PCB153 hatte schon bei 100pg/ml einen großen Effekt auf die Zellen, was sich in einem hohen Ki67-Score zeigte. Selbst eine Erhöhung der PCB153-Konzentration auf 1µg/ml brachte kaum eine weitere Erhöhung des Ki67-Scores. Bei der Positivkontrolle mit dem Hormon E2 wurde ein schwach-biphasischer Verlauf der Score-Zunahme mit Peaks bei 100pg/ml (204,75) und 10ng/ml (205) verzeichnet (Abb. 3.1.2.1.1.2 B).

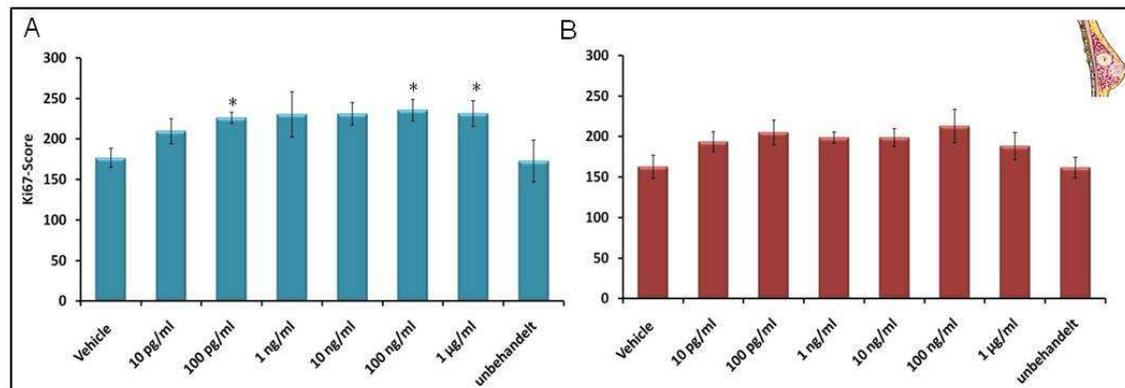


Abb. 3.1.2.1.1.2 A und B: Ki67-Scores bei MCF7. Dargestellt sind die Ki67-Scores als Indikatoren für Proliferation bei der Brustkrebszelllinie MCF7 gemessen nach einer 72h Inkubation mit dem Xenoestrogen PCB153 (A, blau) sowie E2 (B, rot) als Positivkontrolle. Für beide Testsubstanzen PCB153 und E2 wurden innerhalb des in Zehnerpotenzschritten gemessenen Konzentrationsbereichs von 10pg/ml bis 1µg/ml sowohl eine Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) als auch eine unbehandelte Kontrolle mit hormonfreiem Medium (unbehandelt) mitgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$), (n=2).

3.1.2.1.2 Ki67-Expression nach Inkubation mit PCB153 und E2 in hTERT-EEC Zellen

Zur Evaluierung einer möglicherweise durch Xenoestrogen- bzw. Hormonwirkung veränderter Proliferation bei uterinen Zellen, wurde die Ki67-Expression nach 72h Inkubation mit dem Xenoestrogen PCB153 und E2 an der endometrialen Zelllinie hTERT-EEC untersucht. Die hTERT-EEC Zellen exprimieren beide Estrogenrezeptortypen und reagieren daher hormonsensitiv.

Ähnlich wie bei MCF-7 Zellen, ließen sich auch bei hTERT-EEC Zellen Ki67-positive Kerne nachweisen (nicht dargestellt). Auch hier waren die unterschiedlich stark proliferierenden Zellen, sehr gut durch ihre verschieden, intensiv rot gefärbten Zellkerne voneinander unterscheidbar, wodurch die Berechnung des der Ki67-Score auch in diesem Zelltyp gut möglich war. Die bei hTERT-EEC-Zellen gemessenen Ki67-Scores zeigten sich über den gesamten Konzentrationsbereich von 10pg/ml-1µg/ml sowohl bei PCB153 und über fast den gesamten Konzentrationsbereich bei der Positivkontrolle E2 erhöht (Abb. 3.1.2.1.2 A und B). Innerhalb der in Zehnerpotenzschritten gemessenen Konzentrationen für PCB153 verlief die Erhöhung des Ki67-Scores stufenweise. Hierbei wurde der signifikant höchste erreichte Score mit 195 bei 100ng/ml PCB153 im Vergleich zum Score von 143,63 der Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) gemessen (Abb. 3.1.2.1.2 A). Der Verlauf der Score-Zunahme bei der Positivkontrolle E2 war deutlich biphasisch mit Peaks bei 10pg/ml (159,25) und 100ng/ml (196,25) verglichen zum Score des Vehicles von 137 (Abb. 3.1.2.1.2 B).

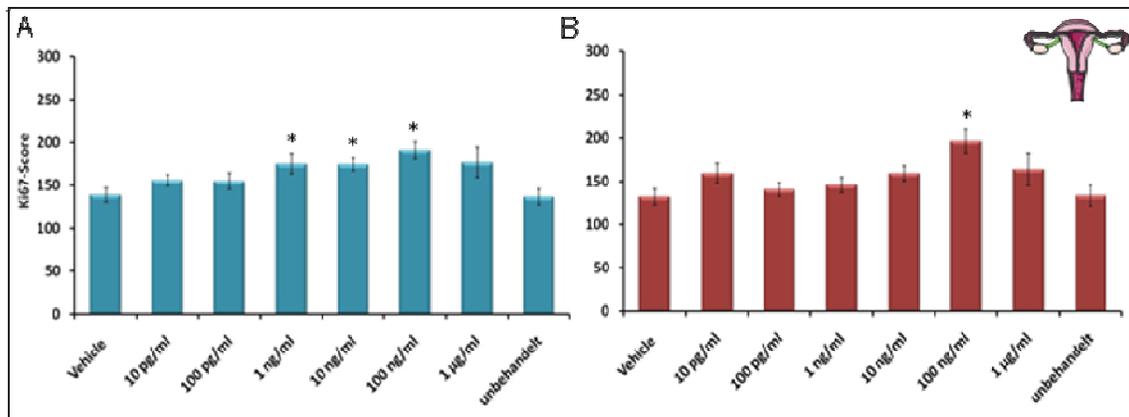


Abb. 3.1.2.1.2 A und B: Ki67-Scores bei hTERT-EEC. Dargestellt sind die Ki67-Scores als Indikatoren für Proliferation bei der uterinen Zelllinie hTERT-EEC gemessen nach einer 72h Inkubation mit dem Xenöestrogen PCB153 (A) und E2 (B) als Positivkontrolle. Für beide Testsubstanzen PCB153 und E2 wurden innerhalb des in Zehnerpotenzschritten gemessenen Konzentrationsbereichs von 10pg/ml bis 1µg/ml sowohl eine Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) als auch eine unbehandelte Kontrolle mit hormonfreiem Medium (unbehandelt) mitgeführt. Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$), (n=2).

3.1.2.2 BrdU-Assay

Der Einbau des nichtradioaktiven 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA ist eine häufig angewandte Methode zum Nachweis der DNA-Synthese und Zellproliferation. Mit Hilfe des BrdU-Assays wurde der Einfluss von drei ausgewählten Konzentrationen PCB153 im Vergleich zu E2 als Kontrolle bei MCF7 und MDA-MB-231 Brustkrebszelllinien analysiert.

Beim Betrachten des relativen BrdU-Einbaus in die DNA von MCF7-Zellen nach PCB153-Inkubation im Vergleich zu E2, zeigten sich im Allgemeinen häufiger signifikante Veränderungen unter dem Einfluss von E2 (Abb. 3.1.2.2.1 A-F). Die im Vergleich zur Lösungsmittel- bzw. unbehandelten Kontrolle höchsten proliferativen Effekte, konnten durch eine 72-stündige Inkubation von E2 bei allen drei untersuchten Zellzahlen gemessen werden (Abb. 3.1.2.2.1 E: [1,16 für $4,0 \times 10^3$ bzw. 1,18 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 10pg/ml E2, [1,35 für $4,0 \times 10^3$; 1,23 für $8,0 \times 10^3$ bzw. 1,2 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 1ng/ml E2 und [1,24 für $4,0 \times 10^3$ bzw. 1,28 für $8,0 \times 10^3$ Zellen pro Well] bei 100ng/ml E2). Es konnten jedoch schon nach 48h Inkubation mit E2 schwache signifikante Proliferationssteigerungen gemessen werden (Abb. 3.1.2.2.1 D: [1,14 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 10pg/ml E2 und [1,16 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 1ng/ml E2). Aber auch nach 96-stündiger E2-Inkubation war ein geringer wachstumsfördernder Effekt noch messbar (Abb. 3.1.2.2.1 F: [1,11 $1,5 \times 10^4$ für Zellen pro Well] bei 10pg/ml E2 und [1,16 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 100ng/ml E2).

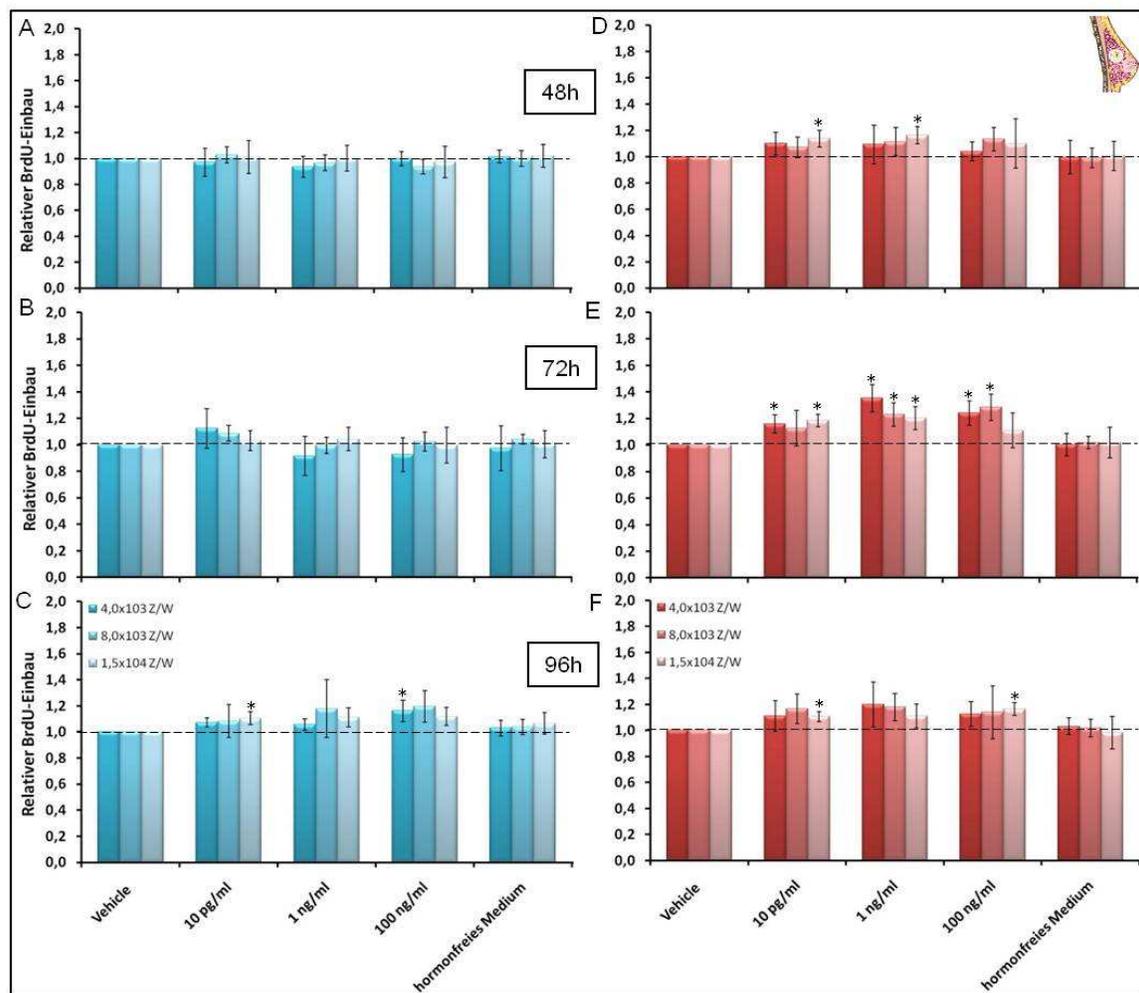


Abb. 3.1.2.2.1 A-F: Relativer BrdU-Einbau in die DNA von MCF7 Zellen unter PCB153- und E2-Einfluss. Der Einbau des nichtradioaktiven 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA von MCF7-Zellen, wurde mit Hilfe eines monoklonalen anti-BrdU-Antikörpers detektiert und über einen

Enzym-konjugierten Sekundärantikörper gemessen (Roche). Die Zellen wurden in drei verschiedenen Zellzahlen ($4,0 \times 10^3$; $8,0 \times 10^3$; $1,4 \times 10^4$ Zellen pro Well) eingesetzt und mit dem Xenooestrogen PCB153 (blau, A-C) sowie mit dem Hormon E2 (rot, D-F) als Kontrolle über einen Zeitraum von 48-96h inkubiert und analysiert. Alle Werte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle aufgetragen (Vehicle=1). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$), ($n=3$).

Im Vergleich zu E2 wies die Inkubation der MCF7-Zellen mit dem Xenooestrogen PCB153 eine messbare signifikante Erhöhung in ihrer DNA-Synthese erst nach 96h auf (Abb. 3.1.2.2.1 C: [1,11 für $1,5 \times 10^4$ Zellen pro Well] bei 10pg/ml E2 und [1,16 für $4,0 \times 10^3$ Zellen pro Well] bei 100ng/ml E2).

Die Inkubation der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 mit den Testsubstanzen PCB153 und E2 zeigte im Vergleich zur Lösungsmittel- bzw. unbehandelten Kontrolle geringe signifikante Veränderungen im BrdU-Einbau in die DNA dieser Zellen (Abb. 3.1.2.2.2 A-F). Hierbei erwies sich PCB153 als schwacher Induktor der Proliferation und führte nach 48 stündiger Inkubation zu einer signifikanten Erhöhung des relativen BrdU-Einbaus (Abb. 3.1.2.2.2 B: [1,16 für $1,5 \times 10^3$ Zellen pro Well] bei 1ng/ml PCB153).

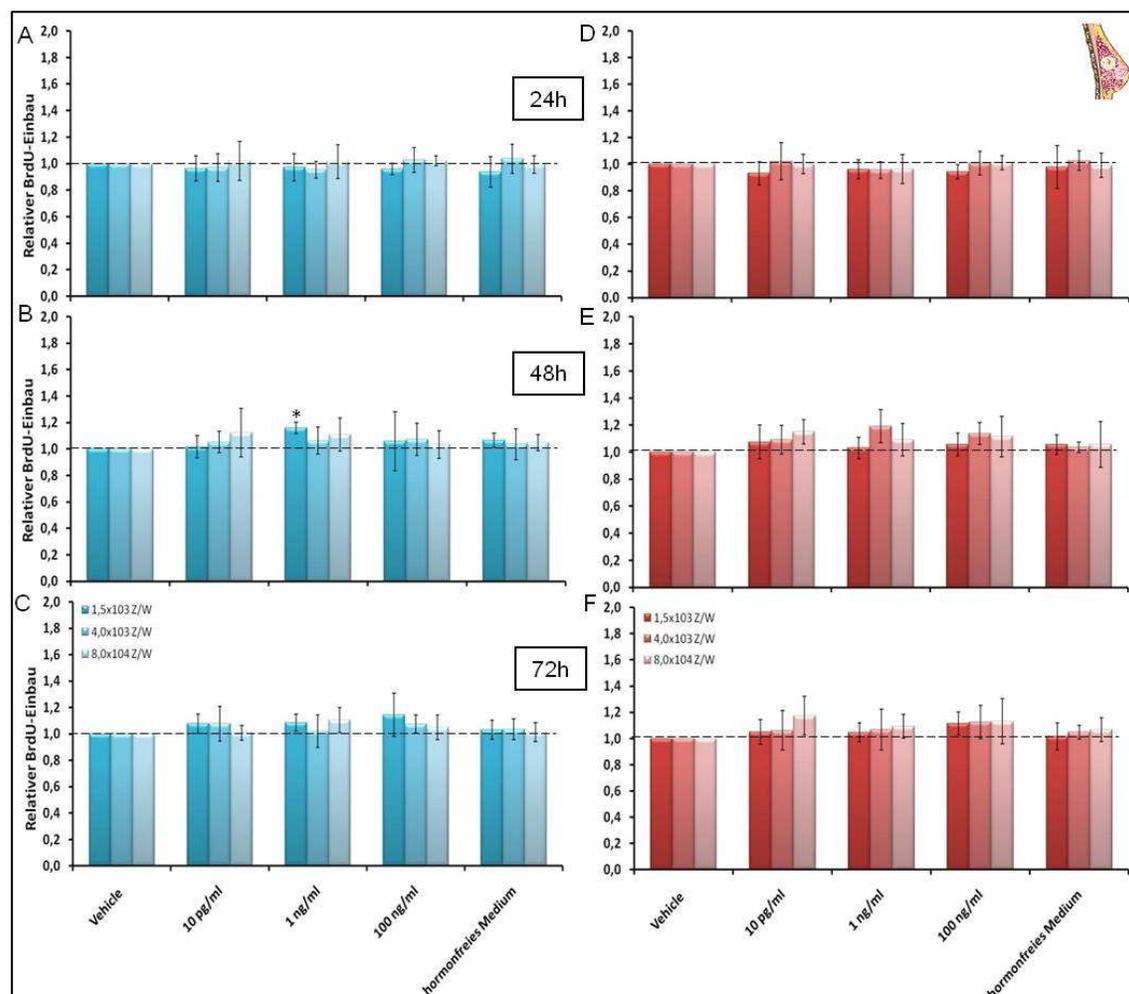


Abb. 3.1.2.2.2 A-F: Relativer BrdU-Einbau in die DNA von MDA-MB-231 Zellen unter PCB153- und E2-Einfluss. Der Einbau des nichtradioaktiven 5-Bromo-2'-Deoxyuridin (BrdU) in die DNA von MDA-MB-231-Zellen, wurde mit Hilfe eines monoklonalen anti-BrdU-Antikörpers detektiert und über einen Enzym-konjugierten Sekundäntikörper gemessen (Roche). Die Zellen wurden in drei verschiedenen Zellzahlen ($1,5 \times 10^3$; $4,0 \times 10^3$ und $8,0 \times 10^3$ Zellen pro Well) eingesetzt und mit dem Xenoestrogen PCB153 (blau, A-C) sowie mit dem Hormon E2 (rot, D-F) als Kontrolle über einen Zeitraum von 24-72h inkubiert und analysiert, Alle Werte wurden relativ zur Lösungsmittelkontrolle aufgetragen (Vehicle=1). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$), (n=3).

Der durch ICI 182780 ausgelöste inhibierende Effekt auf das Xenoestrogen-vermittelte Wachstum im SRBA, die erhöhte PCB153-vermittelte Expression des Proliferationsmarkers Ki67, sowie der im BrdU-Assay nachweisbare proliferative Effekt der getesteten Substanzen, sowie der Fakt, dass PCB153 und E2 in den ausgelösten Effekten einander sehr ähnlich waren, lässt auf eine Beteiligung von ER (genomischer bzw. klassischer Weg) bei der Wirkung von Xenoestrogenen und speziell von PCB153 schließen.

3. 2 Einfluss von PCB153 und E2 auf die ERE-abhängige Promotoraktivität

Als nächstes wurde getestet, in wieweit Xenoestrogen den Estrogenrezeptor direkt aktivieren können und somit eine ERE-abhängige Transkription stimulieren. Dazu wurden Promotorassays mit ERE-abhängigen „cis-acting elements“ im Promotorbereich durchgeführt.

MCF7, MDA-MB-231 und hTERT-EEC Zellen wurden mit einem Firefly-Luziferase-Expressionskonstrukt, welches ein spezifisches „estrogen response element“ (ERE) enthielt sowie einem Renilla-Luziferase-Kontrollplasmid transfiziert und für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Aktivitäten der Firefly-Luziferase, deren Expression durch das ERE reguliert wird, gemessen, sowie die Aktivität der Renilla-Luziferase des Kontrollplasmids, deren Expression von einem konstitutiven SV40-Promotor abhing. Die Renilla-Luziferaseaktivität wurde zur Normalisierung der Firefly-Luciferaseaktivität benutzt.

In den Zellen der beiden ER α und β positiven Zelllinien MCF7 und hTERT-EEC zeigte sich durch PCB153 eine 12- bis 14-fache bzw. 7- bis 11-fache Induktion der ERE-vermittelten Promotoraktivität nach 24-stündiger Inkubation mit 100pg/ml bzw. 100ng/ml PCB153 (Abb. 3.2 A und C). Durch die Koinkubation von zwei verschiedenen PCB153-Konzentrationen mit dem ER-Inhibitor ICI 182780 konnte die Promotoraktivität vollständig gehemmt und sogar unter das Kontrollniveau herabgesetzt werden. Bei Inkubation der Zellen mit der Positivkontrolle E2 wurde im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) eine ca. 20- bzw. 13- bis 15-fache Induktion der ERE-abhängigen Promotoraktivität gemessen (Abb. 3.2 A und C). Auch hier wurde durch Koinkubation mit dem Inhibitor ICI 182780 die relative Promotorak-

tivität signifikant gehemmt. Die Unterschiede der für die einzelnen PCB153- und E2-Konzentrationen gemessenen Promotoraktivitäten mit und ohne Beisein des Inhibitors ICI 182780 waren signifikant. Diese Signifikanzen wurden in der Abb. 3.2 speziell mit Klammern dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor ICI 182780 allein zeigte ebenfalls eine deutliche Reduktion der ERE-Promotoraktivität verglichen zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) bei beiden Zelltypen. Im Vergleich zu den beiden ER-positiven Zelllinien waren bei den Zellen der ER α -negativen Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 PCB153, E2 und ICI 182780 nicht in der Lage, eine Veränderung der basalen Promotoraktivität im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle hervorzurufen (Abb. 3.2 B).

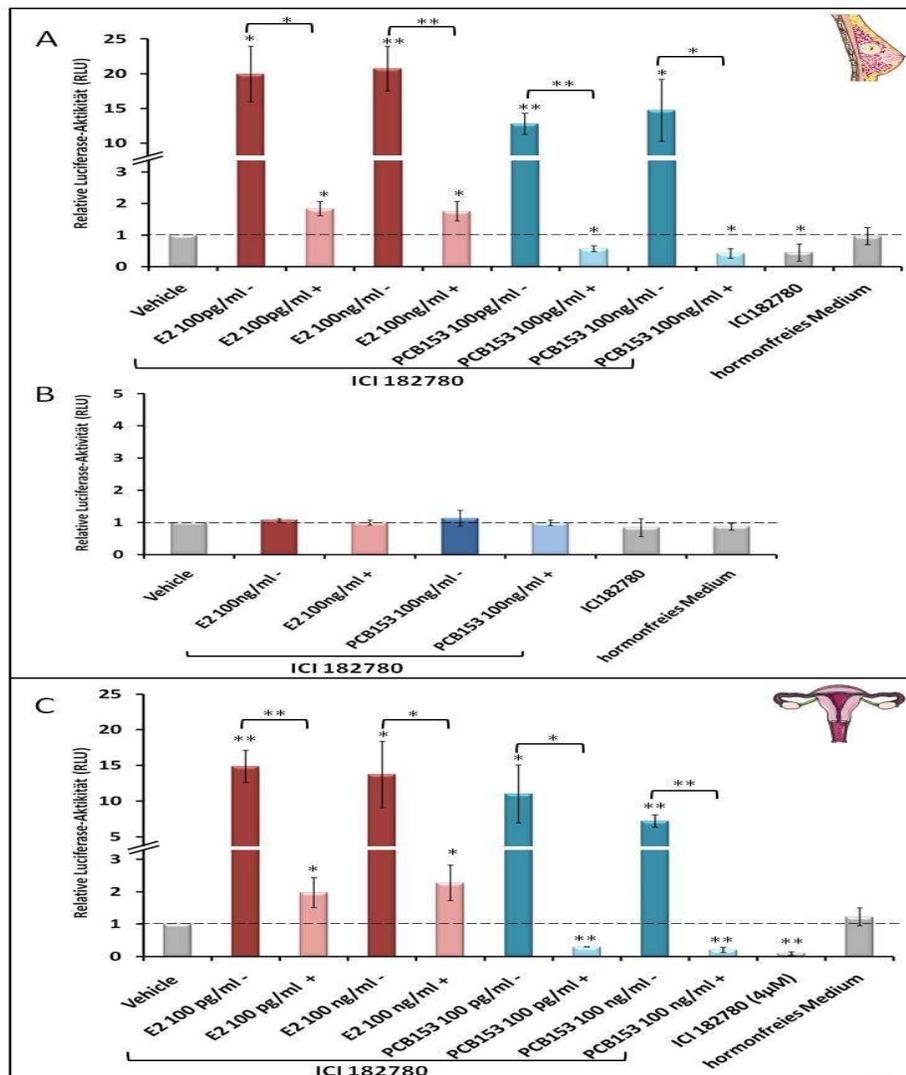


Abb. 3.2 A, B und C: Basale ERE-Promotoraktivitäten (relative Luciferase-Aktivität, RLU) nach 24h Inkubation mit PCB153 und E2 im Reporterassay. Dargestellt wurde die relative Promotoraktivität des „estrogen response elements“ (ERE), repräsentiert durch die in den Zellen gemessene relative Luciferase-Aktivität (RLU), nach 20h Inkubation mit PCB153 (blau) und E2 (rot) bei den Brustkrebszelllinien MCF7 (A) und MDA-MB-231 (B) sowie der uterinen, aus Primärzellen des

Endometriums generierten Zelllinie hTERT-EEC (C). E2 wurde als Positivkontrolle, der ER-Inhibitor ICI182780 (4 μ M) als Negativkontrolle eingesetzt. Helle Balken entsprechen der Co-Inkubation mit dem ER-Inhibitor ICI182780 (2nM) im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ und gegen das Lösungsmittel (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 sowie unbehandeltes, hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Signifikanzen der einzelnen Konzentrationen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wurden direkt über den entsprechenden Balken dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Die Vergleichssignifikanzen der einzelnen Konzentrationen für PCB153 und E2 mit bzw. ohne dem Inhibitor ICI 182780 wurden speziell mit Klammern dargestellt (n=3).

Der Nachweis einer PCB153-vermittelten Induktion der Promotoraktivität an einem ERE und somit der Bindung eines wahrscheinlich PCB153-beladenen ER am „response elemt“ in ähnlichem Masse wie E2, sowie der Fakt, dass es zu keiner Testsubstanz-vermittelten Beeinflussung der basalen Promotoraktivität bei der ER α -negativen Zelllinie MDA-MB-231 kommt, bestätigt die Vermutung, dass Xenoestrogene über den genomischen (klassischen) ER-vermittelten Signalweg agieren können.

3. 3 Xenoestrogenwirkung auf den unspezifischen, MAPK-vermittelten Signalweg

Nachdem der mögliche Einfluss von Xenoestrogenen auf den genomischen (klassischen), ER-vermittelten Signalweg untersucht wurde, sollten diese nun auf ihre Fähigkeit hin untersucht werden über dem MAPK-Signalweg zu agieren. Die nicht-genomische, E2-vermittelte Wirkungsweise von ER erfolgt über eine Phosphorylierung deren Serinreste 118 und induziert die Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion an deren Ende, über diverse Phosphorylierungsschritte, die MAPK ERK1/2 phosphoryliert und aktiviert wird, welche schließlich die Gentranskription in Richtung Proliferation und Differenzierung initiiert.

Die Aktivierung der MAPK ERK1/2 erfolgt über eine spezifische Phosphorylierung an Thr-183 und Tyr-185 durch MEK1/2, einer spezifischen MAPKK. Durch den Einsatz des spezifischen MEK1/2 Inhibitors U0126 kann die Aktivierung von ERK1/2 verhindert werden. U0126 wurde daher benutzt, um den Einfluss von ERK1/2 auf die wachstumsfördernde Wirkung von Xenoestrogenen zu untersuchen. Die Untersuchungen wurden an hTERT-EEC und MCF-7 Zellen durchgeführt.

3.3.1 Sulforhodamin B Assay (SRBA) mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126

Wie in Kapitel 3.1.1 bereits beschrieben, reagieren hTERT-EEC-Zellen nach 96h Inkubation mit PCB153, p,p'DDE, Coumestrol und E2 mit einer signifikanten Erhöhung ihrer Wachstumsrate (Abb. 3.3.1.1 A-E). Das Wachstum der Zellen in Koinkubation mit dem Inhibitor führte zu einem allgemein geringeren Wachstum im Vergleich zum Wachstum ohne Inhibitor. Gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) war das Wachstum der Zellen in Anwesenheit der Testsubstanzen PCB153, p,p'DDE, Coumestrol und E2 plus Inhibitor für fast alle Konzentrationen statistisch signifikant. Das Xenoestrogen β -HCH wies für geringe Konzentrationen (10pg-10ng/ml) keinen signifikanten jedoch für die höheren Konzentrationen von 100ng-1 μ g/ml eine signifikante Zunahme des Wachstums auf. Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Testsubstanzenkonzentrationen mit und ohne Inhibitor konnte allerdings nur vereinzelt festgestellt werden und ist in Abb. 3.3.1.1 A-E mit speziellen Klammern, welche die jeweilige Testsubstanzenkonzentration mit bzw. ohne Inhibitor zusammenfassen, dargestellt. Die Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor U0126 allein zeigte eine schwache Hemmung des Wachstums im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle).

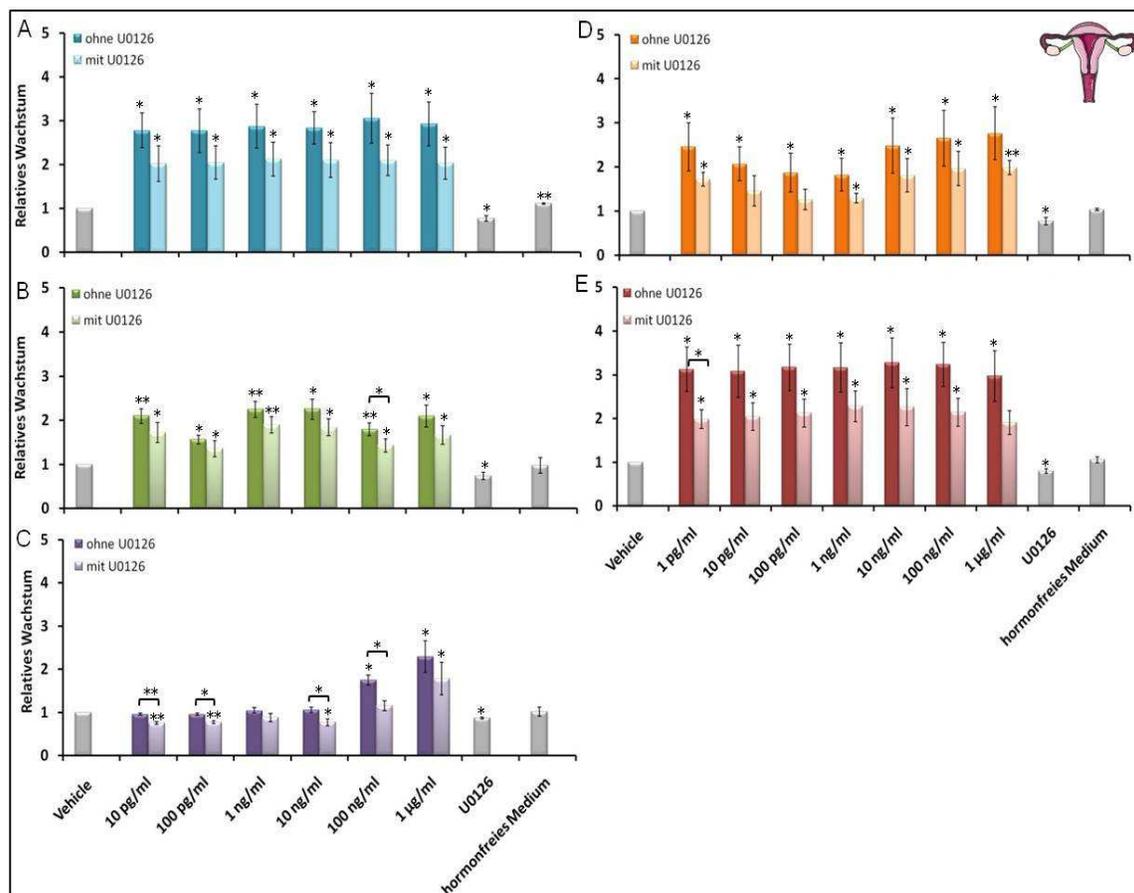


Abb. 3.3.1.1 A-E: Relatives Wachstum nach Testsubstanzeninkubation mit und ohne U0126 bei hTERT-EEC im SRBA. Dargestellt wurde das relative Wachstum von Zellen der aus primärem En-

dometrium generierten Zelllinie hTERT-EEC nach 96h Inkubation mit den Xenoestrogenen PCB153 (A), p,p'DDE (B), β -HCH (C), dem Phytoestrogen Coumestrol (D) sowie mit E2 als Positivkontrolle (E) im Sulforhodamin B Assay (SRBA). Helle Balken entsprechen der Co-Inkubation der jeweiligen Testsubstanz mit dem MAPK-Inhibitor U0126 (3 μ M) im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ und gegen lösungsmittelbehandeltes, hormonfreies Medium (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 sowie unbehandeltes hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Testsubstanzkonzentrationen mit Inhibitor gegenüber ohne diesem, wurden mit speziellen Klammern, welcher die jeweilige Testsubstanzkonzentration mit bzw. ohne Inhibitor zusammenfassen, dargestellt, (n=3).

MCF7-Zellen zeigten in den zwei exemplarisch mit PCB153 und E2 durchgeführten SRBA eine ähnliche Wachstumssteigerung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle wie hTERT-EEC-Zellen (Abb. 3.3.1.2). Auch hier konnte dieser wachstumsfördernde Einfluss durch Koinkubation der einzelnen Testsubstanzkonzentrationen mit U0126 partiell gehemmt werden. Ein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Testsubstanzkonzentrationen mit und ohne U0126 konnte über fast den gesamten Konzentrationsbereich bei E2 verzeichnet werden.

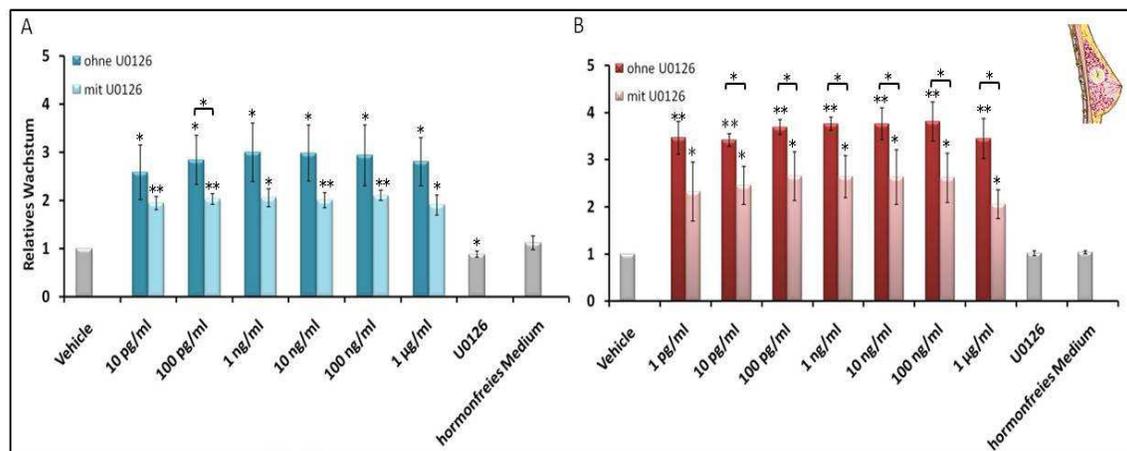


Abb. 3.3.1.2 A und B: Relatives Wachstum nach PCB153- und E2-Inkubation mit und ohne U0126 bei MCF7 SRBA. Dargestellt wurde das relative Wachstum von MCF7-Zellen nach 96h Inkubation mit dem Xenoestrogenen PCB153 (A) und E2 als Kontrolle (B) im Sulforhodamin B Assay (SRBA). Helle Balken entsprechen der Co-Inkubation der jeweiligen Testsubstanz mit dem MAPK-Inhibitor U0126 (3 μ M) im Vergleich zur Testsubstanzinkubation ohne Inhibitor (dunkle Balken). Alle Werte wurden relativ und gegen lösungsmittelbehandeltes hormonfreies Medium (Vehicle=1) aufgetragen, zusätzlich wurden Kontrollen für den Inhibitor ICI182780 sowie unbehandeltes hormonfreies Medium mitgeführt (graue Balken). Statistisch signifikante Unterschiede der gemessenen Testsubstanzkonzentrationen gegenüber den jeweiligen Lösungsmittelkontrollen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). Statistisch signifikante Unterschiede der einzelnen Testsubstanzkonzentrationen mit Inhibitor gegenüber ohne diesem, wurden mit speziellen Klammern, welcher die jeweilige Testsubstanzkonzentration mit bzw. ohne Inhibitor zusammenfassen, dargestellt, (n=3).

3.3.2. Xenoestrogeneinfluss auf die Proteinexpression von Phospho-ERK1/2 und ERK1/2

Als nächstes wurde der Einfluss der Substanzen auf die Phosphorylierung (Aktivierung) von ERK1/2 anhand von MCF7, MDA-MB-231 und hTERT-EEC bestimmt.

Der basale ERK1/2-Phosphorylierungsstatus in MCF7 und MDA-MB-231 Zellen ließ sich in der Westernblotanalyse gut darstellen (Abb. 3.3.2.1 A und B). Bei beiden Zelltypen zeigte die Inkubation mit PCB153 und E2 kaum eine Veränderung des ERK1/2-Phosphorylierungsstatus. Erwähnenswert ist jedoch eine schwache Zunahme der ERK1/2-Aktivität bei MDA-MB-231 durch PCB153 (100ng/ml) sowie eine schwache Reduktion dieser bei MCF7 durch E2 (100pg/ml) im Vergleich zu den beiden Kontrollen.

Durch Zugabe des Inhibitors U0126 konnte die Phosphorylierung von-ERK1/2 bei allen drei untersuchten Zelllinien gehemmt werden.

Eine Koinkubation von PCB153 (100ng/ml) mit U0126 (3 μ M) zeigte bei MDA-MB231 eine schwach erniedrigte und für PCB153 (100pg/ml) plus U0126, eine fast völlig gehemmte Aktivierung von ERK1/2-. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich bei diesen Zellen durch die Koinkubation von E2 und U0126. Hierbei wies E2 (100pg/ml) plus U0126 (3 μ M) eine schwach erniedrigte, E2 (100ng/ml) plus U0126 eine fast völlig herunter regulierte ERK1/2-Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen (Vehicle und unbehandelt) auf. Die Koinkubation beider getesteten PCB153- und E2-Konzentrationen mit U0126 führt bei MCF7-Zellen, ähnlich wie bei Inkubation der Zellen mit dem Inhibitor allein, zu einer Hemmung der Phospho-ERK1/2-Expression

Die ERK1/2-Aktivität der hTERT-EEC-Zellen zeigte sich im Vergleich zu den beiden Brustkrebszelllinien sensitiver. Die hTERT-EEC-Zellen wiesen in der Lösungsmittel- bzw. unbehandelten Kontrollen generell eine weniger hohe basale Phospho-ERK1/2-Aktivität als die Brustkrebszelllinien auf (Abb. 3.3.2.1 C). Eine 48-stündige Inkubation beider PCB-Konzentrationen bzw. mit E2 100ng/ml resultierte in eine gesteigerte Phosphorylierung von ERK1/2 verglichen mit beiden Kontrollen (Vehicle und unbehandelt). Durch eine Koinkubation dieser Zellen mit den getesteten PCB153- und E2-Konzentrationen zusammen mit dem Inhibitor U0126, konnte die gesteigerte ERK1/2-Aktivität gehemmt werden.

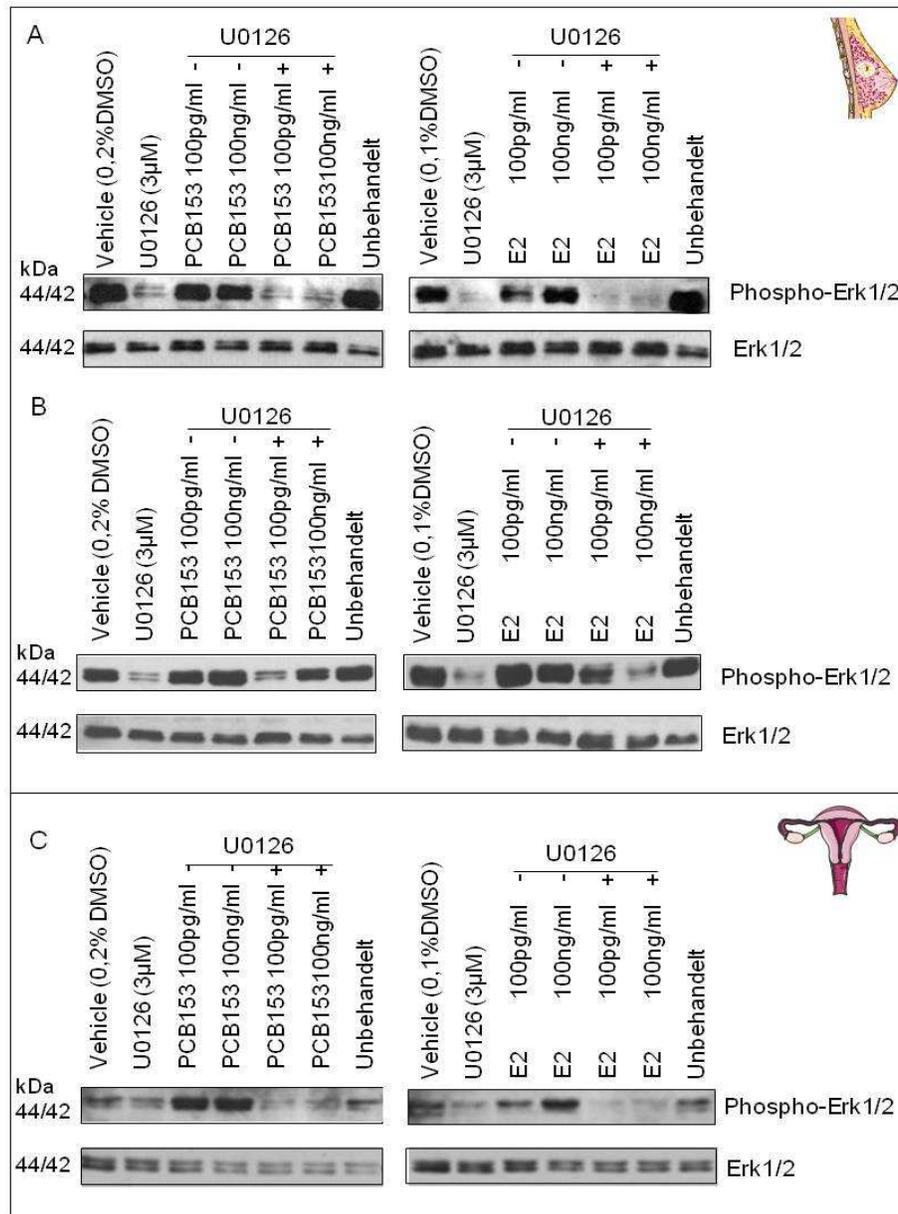


Abb. 3.3.2.1 A-C: Phospho-ERK1/2 bzw. ERK1/2 -Proteinexpression nach PCB153- und E2-Inkubation mit und ohne U0126. Dargestellt ist die Proteinexpression von Phospho-ERK1/2- bzw. ERK1/2 als Kontrolle nach 48h Inkubation mit zwei verschiedenen Konzentrationen von PCB153 und E2 (100pg/ml und 100ng/ml) mit bzw. ohne Zugabe des Inhibitors U0126 (3µM) bei den Brustkrebszelllinien MCF7 (A), MDA-MB-231 (B) sowie der uterinen Zelllinie hTERT-EEC (C). Bei der Inkubation der Zellen wurden außerdem eine Lösungsmittel (Vehicle)- bzw. eine hormonfreie Mediumkontrolle (unbehandelt) mitgeführt. Für die Western Blot Untersuchungen wurden die monoklonalen Primärtikörper ERK1/2 (p44/42 MAP Kinase; Cell Signaling) bzw der Phospho-ERK1/2 (Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204); Cell Signaling) eingesetzt, wobei die unphosphorylierte Form als Kontrolle zur Phosphorylierten diente.

Bei MCF7-Zellen zeigte die Inkubation mit β -HCH generell eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 3.3.2.2 A). Dabei zeigte sich, im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle, mit erhöhter Konzentration von β -HCH eine schwächere ERK1/2-Phosphorylierung.

Durch Zugabe des Inhibitors zu beiden Konzentrationen konnte dieser Effekt verstärkt werden. Der ERK1/2-Phosphorylierungsstatus nach p,p'DDE-Inkubation zeigte nur in Koinkubation mit U0126 Veränderungen. Hierbei reduzierte sich die ERK1/2-Aktivität bei erhöhter Konzentration von 10ng/ml p,p'DDE. Die Inkubation mit dem Phytoestrogen zeigte im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle kaum eine Veränderung. Eine E2-Koinkubation mit U0126 wies, wie erwartet, eine Reduktion der ERK1/2-Phosphorylierung auf.

MDA-MB-231 Zellen, zeigten ähnliche Veränderungen in der-ERK1/2-Phosphorylierung durch die getesteten Substanzen. Die Inkubation dieser Zellen mit β -HCH zeigte für die Koinkubation beider getesteter Konzentrationen, zusammen mit dem Inhibitor U0126 eine Hemmung der ERK1/2-Aktivität. Die p,p'DDE-Inkubation in niedriger Konzentration (100pg/ml) wies eine auffallend hemmende Wirkung im Vergleich zur höheren Konzentration (10ng/ml) bzw. zur Lösungsmittelkontrolle auf. Eine Koinkubation beider p,p'DDE-Konzentrationen mit U0126 resultierte auch hier in einer Abschwächung der ERK1/2-Phosphorylierung. Die Koinkubation von Coumestrol bzw. E2, zusammen mit dem Inhibitor führte zur Absenkung der ERK1/2-Aktivität.

hTERT-EEC-Zellen wiesen in diesen Westernblot-Untersuchungen die meisten Phospho-ERK1/2-Veränderungen durch die getesteten Substanzen auf (Abb. 3.3.2.2 C). Dabei senkte eine höhere Konzentration von β -HCH (1 μ g/ml) die ERK1/2-Phosphorylierung ab und durch Zugabe des Inhibitors konnte dieser Effekt sogar verstärkt werden. Ein umgekehrtes Bild zeigte sich für p,p'DDE, wobei die hohe Konzentration von 100ng/ml die ERK1/2-Aktivität verstärkte und die Zugabe des Inhibitors zu dieser p,p'DDE-Konzentration die völlige Hemmung dieser Aktivität zur Folge hatte. Die Inkubation der Zellen mit dem Phytoestrogen Coumestrol (100ng/ml) bewirkte eine Absenkung der ERK1/2-Phosphorylierung, welche durch Zugabe des Inhibitors zusammen in dieser Konzentration noch weiter herabgesetzt werden konnte. Die Inkubation mit dem Kontrollhormon E2 zeigte, wie erwartet, eine erhöhte ERK1/2-Aktivität ohne Inhibitor und eine gehemmte Aktivität bei Koinkubation von E2 mit U0126.

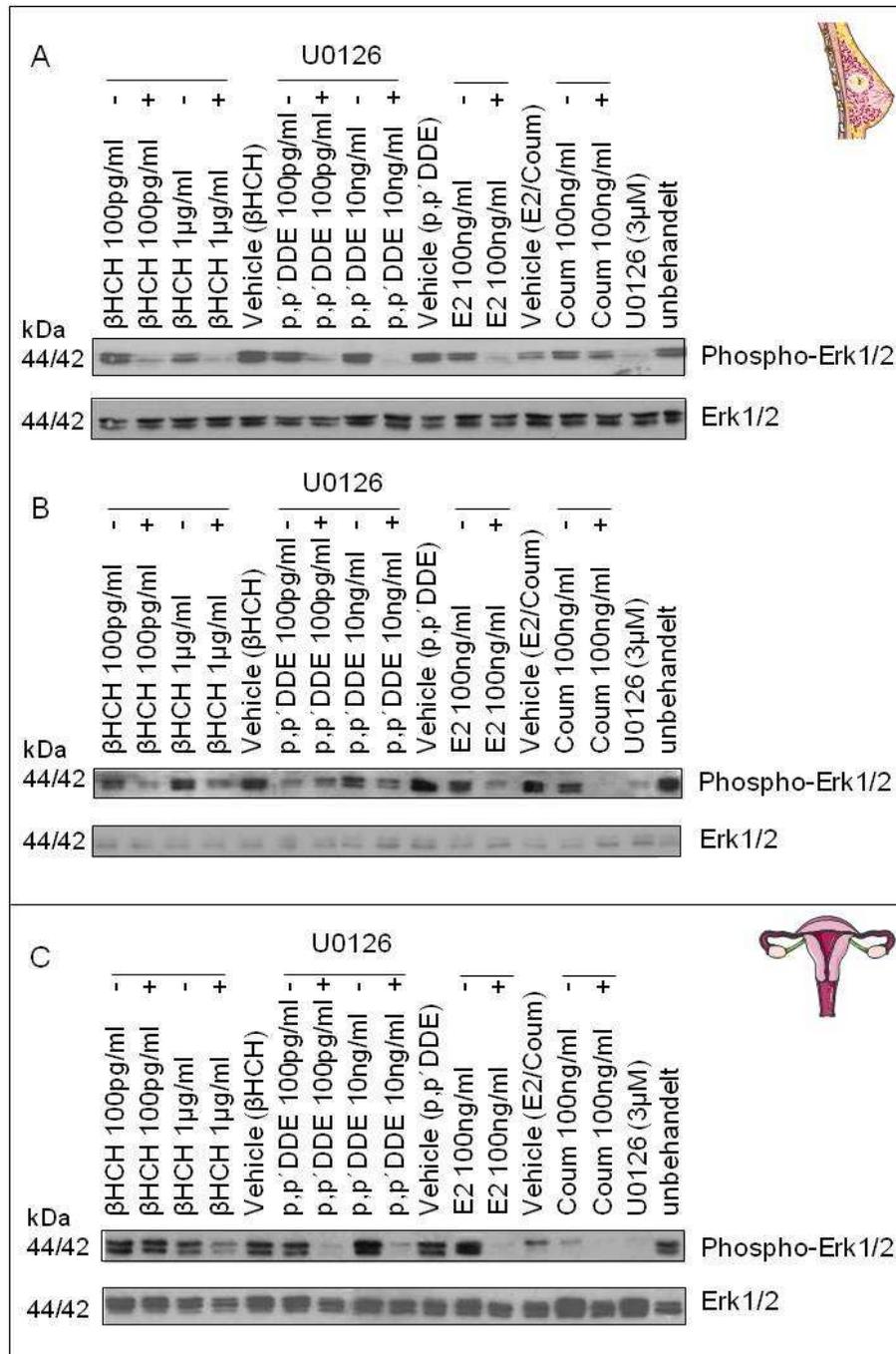


Abb. 3.3.2.2 A-C: Phospho-ERK1/2- und ERK1/2-Proteinexpression nach Testsubstanzinkubation mit und ohne U0126. Dargestellt ist die Proteinexpression von Phospho-ERK1/2- bzw. ERK1/2 als Kontrolle nach 48h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von β-HCH, p,p'DDE, Coumestrol (Coum) sowie E2 als Kontrolle mit bzw. ohne Zugabe des Inhibitors U0126 (3μM) bei den Brustkrebszelllinien MCF7 (A), MDA-MB-231 (B) sowie der uterinen Zelllinie hTERT-EEC (C). Bei der Inkubation der Zellen wurden außerdem eine Lösungsmittel (Vehicle)- bzw. eine hormonfreie Mediumkontrolle (unbehandelt) mitgeführt. Für die Western Blot Untersuchungen wurden die monoklonalen Primärantikörper ERK1/2 (p44/42 MAP Kinase; Cell Signaling) bzw. der Phospho-ERK1/2 (Phospho-p44/42 MAP Kinase (Thr202/Tyr204); Cell Signaling) eingesetzt, wobei die unphosphorylierte Form als Kontrolle zur Phosphorylierten diente. 48h Inkubation mit PCB153 und E2 bei MCF7, MDA-MB-231 und hTERT-EEC.

3.4 Einfluss von PCB153 und E2 auf die Proteinexpression von ER α

Eine mögliche Veränderung der ER α -Proteinexpression durch PCB153 wurde in zwei verschiedenen Zelllinien mittels Westernblotanalysen untersucht. Nach 48-stündiger Inkubation von hTERT-EEC und MCF7-Zellen mit PCB153 (100pg-1 μ g/ml) zeigten sich kaum Veränderungen der ER α -Proteinmenge im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Abb. 3.4 A und B). Bei Inkubation mit der Kontrolle E2 (10pM) zeigte sich bei beiden Zelltypen, eine schwache Abnahme der ER α -Proteinexpression.

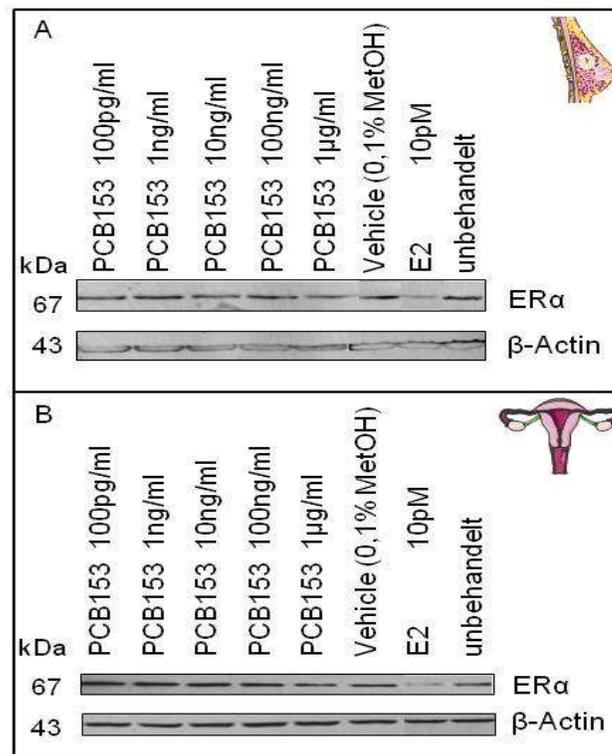


Abb. 3.4 A und B: ER α -Proteinexpression bei MCF7 und hTERT-EEC im Western Blot. Dargestellt ist die Proteinexpression von ER α - bzw. β -Aktin als Kontrolle nach 48h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von PCB153 (100p-1 μ g/ml), der Positivkontrolle E2 (10pM) bei der der Brustkrebszelllinie MCF7 (A) und der uterinen Zelllinie hTERT-EEC (B). Bei der Inkubation der Zellen wurden außerdem eine Lösungsmittel (Vehicle)- bzw. eine hormonfreie Mediumkontrolle (unbehandelt) mitgeführt. Für die Western Blot Untersuchungen wurden die monoklonalen Primärtikörper Estrogen Receptor α (mouse ER α ; # 6F11; Vector Laboratories) bzw. β -Actin (mouse; # A5441; Sigma) eingesetzt.

Der durch U0126 ausgelöste dämpfende Effekt auf das Xenoestrogen-vermittelte Wachstum im SRBA bei hTERT-EEC und MCF7, die erhöhte PCB153-vermittelte Expression des Proliferationsmarkers Ki67, sowie der im BrdU-Assay nachweisbare proliferative Effekt der getesteten Substanzen, sowie der Fakt, dass PCB153 und E2 in den ausgelösten Effekten ei-

ander sehr ähnlich waren, lässt auf eine Beteiligung von ER (genomischer bzw. klassischer Weg) bei der Wirkung von Xenoestrogenen und speziell von PCB153 schließen.

3.5 Einfluss von PCB153 und E2 auf die Genexpression im Uterus

Um einen möglichen Einfluss von Xenoestrogenen bzw. deren eventuell hervorgerufenen Veränderungen in frühen Krankheitsstadien bei uterinem Gewebe hinsichtlich gynäkologischer Erkrankungen, wie z.B. Endometriose, zu untersuchen, wurde die Genexpression verschiedener Faktoren in zwei unterschiedlichen Zelllinien analysiert. Hierbei sollte ein möglicher Einfluss des Xenoestrogens PCB153 auf das gesunde Endometrium, repräsentiert durch die aus endometrialen Primärgewebe generierte Zelllinie hTERT-EEC, versus erkranktes Endometrium bei Endometriose, bei welchem Primärzellen aus Endometriose-Explantaten zum Einsatz kamen, näher untersucht werden. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf Hormon- und Xenobiotika-vermittelte Signalwege sowie auf relevante Faktoren für Proliferation und Gewebeumbau (tissue remodeling) gerichtet, wobei drei Primersets zum Einsatz kamen (Set 1: verschieden E2-regulierte Faktoren; Set 2: AhR-reguliert Faktoren; Set 3: weitere relevante Faktoren für Proliferation und Gewebeumbau).

3.5.1 Situation im gesunden Uterus (hTERT-EEC-Zellsystem)

Der Einfluss von Xenoestrogenen auf die Expression verschiedener Gene im gesunden Uterus konnte mit Hilfe der durch Telomerase-Immortalisierung uteriner Primärzellen des Endometriums etablierten Zelllinie hTERT-EEC (Hombach-Klonisch et al., 2005) untersucht werden. In den qRT-PCR-Experimenten wurden zunächst die basalen Expressionslevel der insgesamt 15 untersuchten Faktoren in den hTERT-EEC Zellen unter normalen, unbehandelten und hormonfreien Kulturbedingungen analysiert. Die Expressionslevel sowie die für die Berechnung der Expressionslevel zugrundeliegenden ct-Werte sind als Mediane in Tabelle 3.5 aufgelistet. Sie spiegeln umgekehrt proportional die angegebenen Expressionswerte wider.

Faktoren:	Median der ct-Werte:	RNA-Expressionslevel/ GAPDH	RNA-Expressionslevel/ HPRT	Genbezeichnung
ERα	26,9	0,0057	2,26	Estrogenrezeptor α
ERβ	29,8	0,00073	0,28	Estrogenrezeptor β
PROG-1	31,5	0,00061	0,23	Progesteron Rezeptor A
GPR30	28,9	0,0013	0,52	G-Protein gekoppelter Rezeptor 30
VEGF	31,1	0,00069	0,34	Vascular Endothelial Growth Factor
SOCS3	30,9	0,00072	0,28	Suppressor of Cytokine Signaling 3
AhR	28,5	0,0017	0,68	Arylhydrokarbonrezeptor
ARNT	31,4	0,00030	0,11	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator
uPA	31,7	0,00048	0,23	Urokinase-Typ Plasminogen Activator
PAI-1	32,3	0,00035	0,18	Plasminogenaktivator Inhibitor 1
CYP1A1	35,1	0,000048	0,024	Cytochrom P450-1A1
Ki67	29,5	0,00047	0,20	Proliferationsmarker Ki67
EGFR	33,5	0,00013	0,064	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
COX-2	35,6	0,000023	0,0091	Cyclooxygenase-2
MMP3	35,4	0,000033	0,013	Matrixmetalloprotease 3

Tab. 3.5.1: Liste der Mediane und basalen Expressionslevel aller untersuchten Faktoren unter normalen, unbehandelten und hormonfreien Bedingungen bei hTERT-EEC Zellen nach qRT-PCR. Aufgelistet wurden die Mediane sowie Mittelwerte der RNA-Expressionslevel aller untersuchten Faktoren, welche jeweils mit den Housekeeping Genen GAPDH (A) und HPRT (B) normalisiert wurden. Die gemessenen Faktoren wurden hinsichtlich der drei eingesetzten Primersets (Set 1: verschiedenen E2-regulierte Faktoren; Set 2: AhR-reguliert Faktoren; Set 3: weitere relevante Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung) in drei Untergruppen zusammengefasst (blau, rot, gelb), (n=2).

Die untersuchten Gene zeigten, nach Verwendung der Housekeeping Gene GAPDH und HPRT zur Normalisierung, ein vergleichbares mRNA-Expressionsmuster (Abb. 3.5.1 A und B). In den hTERT-EEC-Zellen zeigte ER α den nennenswert höchsten gemessenen RNA-Expressionslevel. Alle weiteren analysierten Gene zeigten eine deutlich niedrigere Expression. Fast keine messbare Expression zeigten die analysierten Gene EGFR, CYP1A1, MMP3 und COX-2 in den hTERT-EEC Zellen.

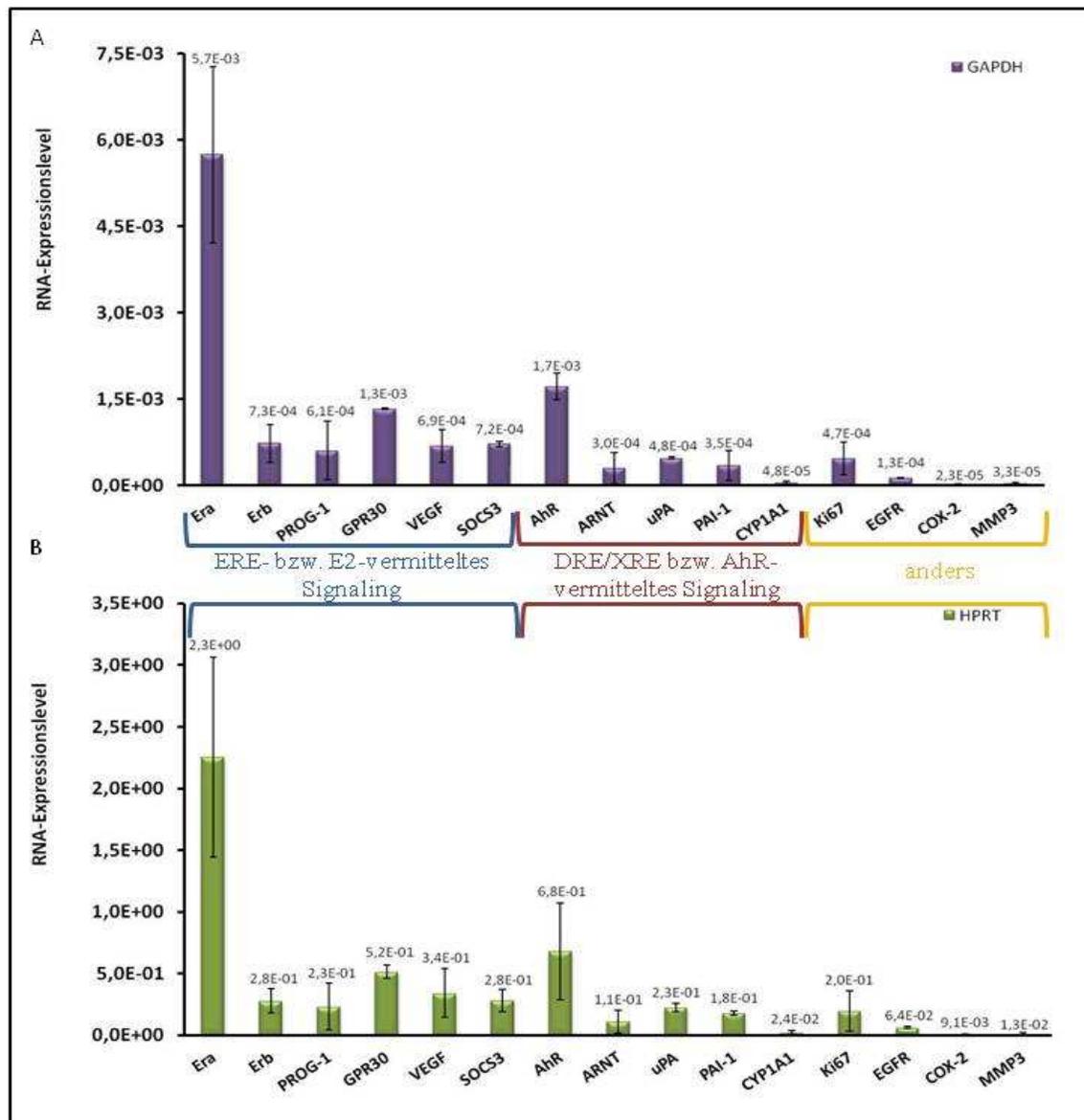


Abb. 3.5.1.1 A und B: Darstellung der basalen Expressionslevel der untersuchten Faktoren unter normalen, unbehandelten und hormonfreien Kulturbedingungen. Dargestellt wurden die Mittelwerte der RNA-Expressionslevel aller untersuchten Faktoren, welche jeweils mit den Housekeeping Genen GAPDH (A) und HPRT (B) normalisiert wurden. Die gemessenen Faktoren wurden hinsichtlich ihrer Aktivierung bzw. ihres Signalweges in drei Untergruppen zusammengefasst (blau, rot, gelb). (n=2)

Nach Analyse der basalen RNA-Expressionen unter unbehandelten, hormonfreien Kulturbedingungen, wurde der Einfluss einer ausgewählten Konzentration des Xenooestrogens PCB153 (100ng/ml) sowie E2 (100ng/ml) und ICI 182780 (10nM) als Kontrollen unter selbigen Kulturbedingungen in den hTERT-EEC-Zellen untersucht. Die in jeweils drei Primersets untersuchten Gene [1.) verschieden E2-regulierte bzw. ERE-aktivierende Faktoren; 2.) AhR-regulierte bzw. DRE/XRE-aktivierende Faktoren; 3.) weitere relevante Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung] innerhalb dieses Zelltyps, zeigten überwiegend eine Redukti-

on der relativen mRNA-Expressionen der analysierten Gene nach PCB153- bzw. E2-Behandlung im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) (Abb. 3.5.1.2-3.5.1.4).

Die nach Normalisierung erhaltenen relativen Expressionswerte für GAPDH und HPRT der E2- und Xenoestrogenbehandlung innerhalb der untersuchten Gene waren dabei nicht immer auf gleichem relativen Expressionsniveau. Jedoch konnte überwiegend ein ähnlich mehr oder weniger signifikanter Trend beobachtet werden.

Im ersten Primersset zur Untersuchung der verschiedenen E2-regulierten Faktoren konnte das Xenoestrogen PCB153 analog zu E2 die relative ER α -Expression signifikant im Vergleich zur Lösungsmittel (Vehicle) erniedrigen (Abb. 3.5.1.2 A). Das Antiestrogen ICI 182780 zeigte für die Normalisierung mit dem Housekeeping Gen GAPDH zwar eine geringe Erniedrigung der ER α -Expression, diese konnte jedoch für HPRT nicht bestätigt werden, wodurch der Einfluss von ICI 182780 auf die Expression von ER α nur schwach reprimierend bis unverändernd zu sein scheint. Ein ähnliches Bild, jedoch weniger signifikant, zeigte sich für GPR30 (Abb. 3.5.1.2 D) sowie SOCS3 (Abb. 3.5.1.2 F). Weniger eindeutig war der Einfluss der getesteten Substanzen auf die Genexpression von ER β (Abb. 3.5.1.2 B). Hierbei zeigte sich nur für E2 eine signifikante Reduktion der gegen das Housekeeping Gen GAPDH normalisierten ER β -Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle). Ebenso mehr oder wenig signifikant zeigte sich der reprimierende Trend von E2 und PCB153 auf die VEGF-Expression, welche darüber hinaus hohe Diskrepanzen zwischen den Werten für GAPDH und HPRT aufwies (Abb. 3.5.1.2 E). Ein verstärkender Einfluss von E2 und PCB153 auf die Expression des Progesteronrezeptors A (PROG-1) konnte durch die zu hohe Streuung innerhalb der beiden Versuchswiederholungen statistisch nicht untermauert werden (Abb. 3.5.1.2 C). Innerhalb der hierbei getesteten Substanzen zeigte sich nur das Antiestrogen ICI 182780 für GAPDH als statistisch relevanter Repressor der Progesteronrezeptor A-Genexpression.

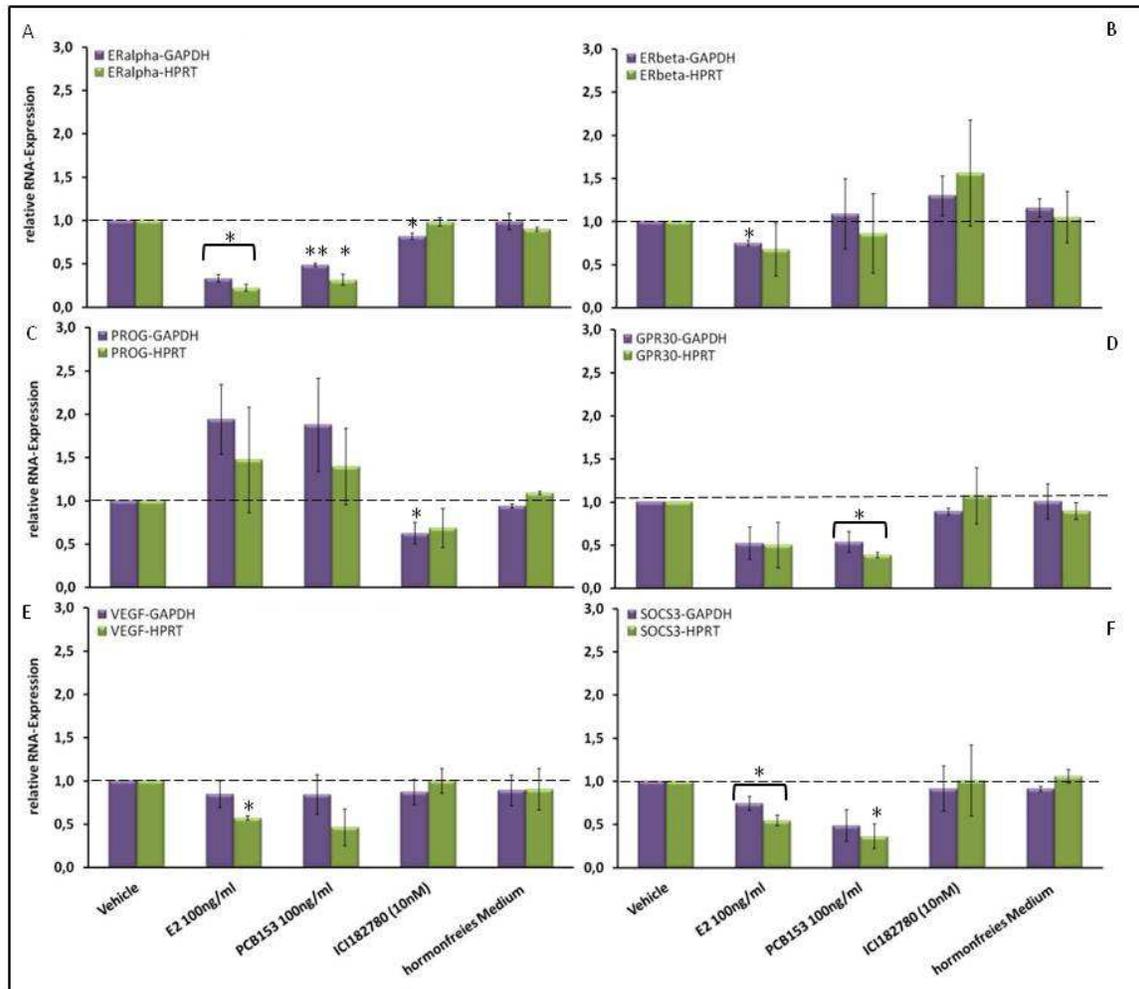


Abb.: 3.5.1.2 A-F: Relative Expressionslevel verschiedener E2-regulierter Faktoren bei hTERT-EEC Zellen. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel verschiedener E2-regulierter Faktoren bei hTERT-EEC Zellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzkonzentrationen wurden direkt über dem Balken bzw., falls für GAPDH und HPRT im gleichen signifikanten Rahmen, zusammenfassend in Klammern dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). [1. Primerset: Estrogenrezeptor α (ERalpha), Estrogenrezeptor β (ERbeta), Progesteronrezeptor A (PROG-1), G-Protein gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30), Vaskularer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Suppressor des Zytokin Signaling (SOCS3)]. (n=2)

Im zweiten Primerset zur Untersuchung AhR-regulierter Faktoren zeigte vor allem E2 eine signifikant reprimierende Wirkung auf die mRNA-Expression von ARNT, uPA, PAI-1 und CYP1A1 (Abb. 3.5.1.3 B, C, D und E) bzw. weniger signifikant aber mit dem gleichen reprimierenden Trend bei AhR (Abb. 3.5.1.3 A). Das Xenoestrogen PCB153 zeigte vor allem in Kombination mit HPRT eine signifikante Repression bei allen hier untersuchten Genexpressionen. Das Antiestrogen ICI 182780 bewirkte wie E2 eine erheblich signifikante Erniedrigung der mRNA-Expression von ARNT.

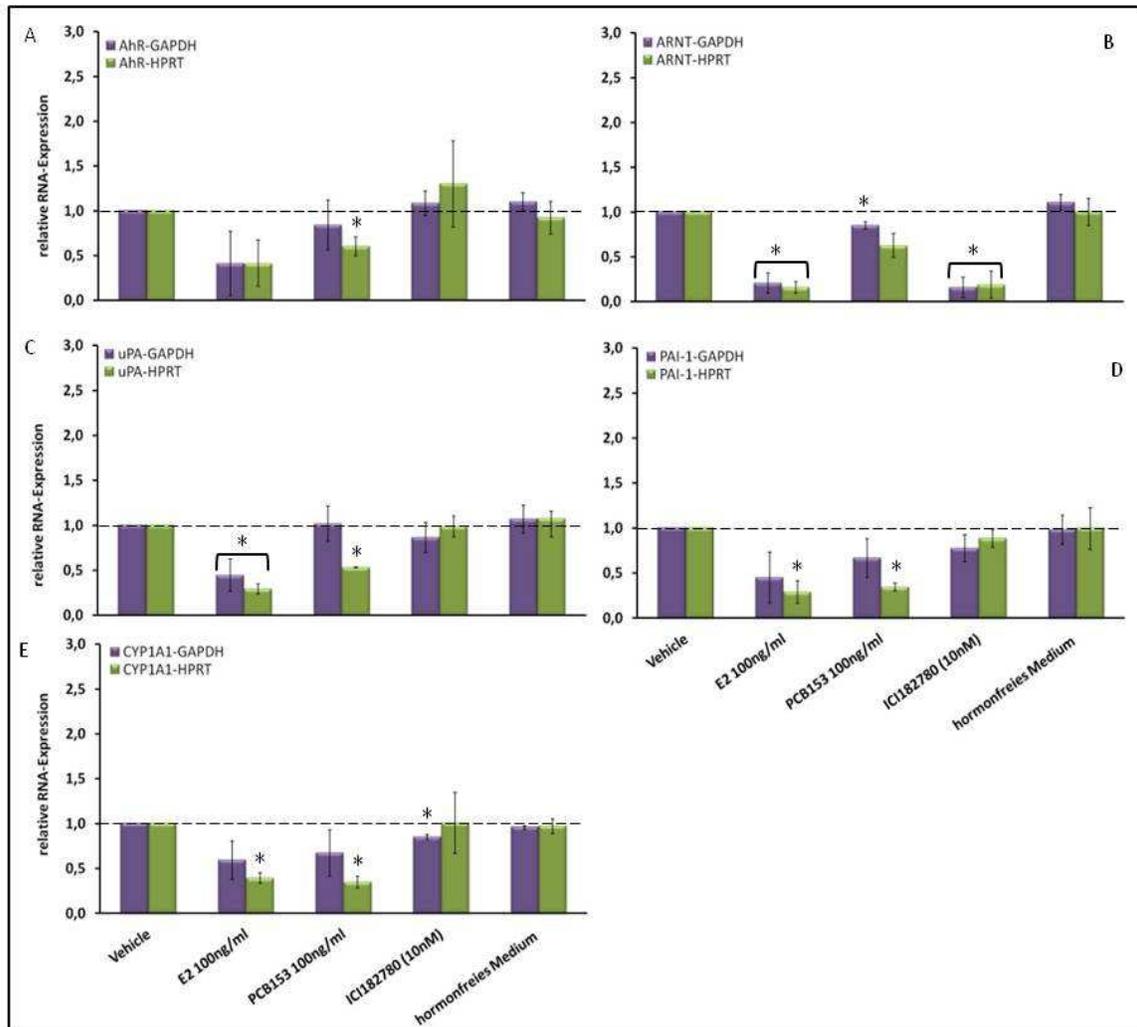


Abb.: 3.5.1.3 A-E: Relative Expressionslevel verschiedener AhR-regulierter Faktoren nach 24h Inkubation bei hTERT-EEC Zellen. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel verschiedener AhR-regulierter Faktoren bei hTERT-EEC Zellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzkonzentrationen wurden direkt über dem Balken bzw., falls für GAPDH und HPRT im gleichen signifikanten Rahmen, zusammenfassend in Klammern dargestellt (* $p < 0,05$), [2. Primerset: Arylhydrokarbonrezeptor (AhR), AhR Nuclear Translocator (ARNT), Urokinase-Plasminogen Activator (uPA), Urokinase Plasminogen Activator-Inhibitor 1(PAI-1), Cytochrom P450-1A1 (CYP1A1)]. (n=2).

Im dritten Primerset zur Untersuchung weiterer relevanter Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung zeigten sowohl E2 als auch das Xenoestrogen PCB153 eine signifikante Steigerung der Ki67-Expression für GAPDH (Abb. 3.5.1.4 A). Diese Signifikanz konnte jedoch für HPRT nicht bestätigt werden, welches an einer zu hohen Streuung innerhalb der beiden Versuchswiederholungen lag. Die EGFR-Expression wurde durch E2 und PCB153 erheblich erniedrigt und auch das Antiestrogen ICI 182780 bewirkte eine geringe Senkung dieser (Abb. 3.5.1.4 B). Einen größeren Einfluss bewirkte das Antiestrogen bei COX-2, wobei die

relativen mRNA-Expressionswerte für GAPDH und HPRT signifikant erniedrigt vorlagen (Abb. 3.5.1.4 C). Das Xenoestrogen PCB153 war das einzige der getesteten Substanzen, welches einen signifikanten Einfluss auf die MMP3-Expression bewirkte (Abb. 3.5.1.4 D).

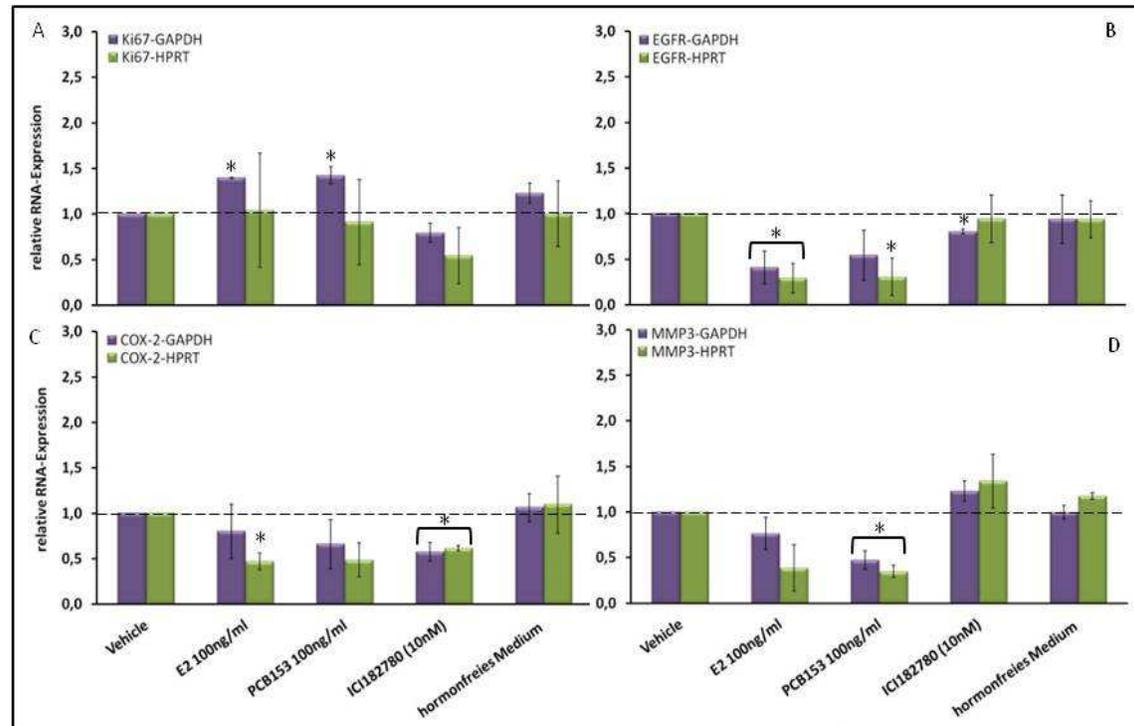


Abb.: 3.5.1.4 A-D: Relative Expressionslevel weiterer relevanter Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung bei hTERT-EEC Zellen. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel weiterer relevanter Faktoren bei hTERT-EEC Zellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzkonzentrationen wurden direkt über dem Balken bzw., falls für GAPDH und HPRT im gleichen signifikanten Rahmen, zusammenfassend in Klammern dargestellt (* $p < 0,05$). [3. Primerset: Proliferationsmarker Ki67 (Ki67), Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Cyclooxygenase 2(COX-2), Matrixmetalloprotease 3 (MMP3)] (n=2).

3.5.2 Situation bei Endometriose (Primärzellen aus Endometriose-Explantaten)

Der Einfluss von Xenoestrogenen auf die Expression verschiedener Gene im Krankheitsfall bei Endometriose, wurde mit Hilfe von Primärzellen, welche bei operativen Eingriffen entfernt und nach Aufarbeitung im Labor kultiviert und für diese Versuche eingesetzt wurden, untersucht. Außerdem sollten die erhaltenen Expressionswerte der hier untersuchten Faktoren zum Vergleich mit der Situation im gesunden Uterus, welches mittels hTERT-EEC-Zellsystem untersucht wurde, dienen (siehe vorheriges Kapitel 3.5.1). In den qRT-PCR-Experimenten wurden auch hier zunächst die basalen Expressionslevel der insgesamt 15 untersuchten Faktoren in den Primärzellen unter normalen, unbehandelten und hormonfreien

Kulturbedingungen analysiert. Die basalen Expressionslevel sowie die für die Berechnung der Expressionslevel zugrundeliegenden ct-Werte sind als Mediane in Tabelle 3.5.2 aufgelistet. Sie spiegeln umgekehrt proportional die angegebenen Expressionswerte aus den qRT-PCRs wider.

Faktoren:	Median der ct-Werte:	RNA-Expressionslevel/ GAPDH	RNA-Expressionslevel/ HPRT	Genbezeichnung
ERα	36,1	0,000009	0,0092	Estrogenrezeptor α
ERβ	28,8	0,0013	1,16	Estrogenrezeptor β
PROG-1	31,8	0,00034	0,06	Progesteron Rezeptor A
GPR30	30,0	0,00065	0,67	G-Protein gekoppelter Rezeptor 30
VEGF	29,7	0,0015	0,95	Vascular Endothelial Growth Factor
SOCS3	29,4	0,0036	0,68	Suppressor of Cytokine Signaling 3
AhR	27,2	0,0041	4,35	Arylhydrokarbonrezeptor
ARNT	31,4	0,0003	0,21	Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator
uPA	29,0	0,002	1,39	Urokinase-Typ Plasminogen Activator
PAI-1	22,6	0,17	100,34	Plasminogenaktivator Inhibitor 1
CYP1A1	35,2	0,000031	0,022	Cytochrom P450-1A1
Ki67	32,4	0,00012	0,15	Proliferationsmarker Ki67
EGFR	28,4	0,0031	1,96	Epidermal-Growth-Factor-Receptor
COX-2	26,8	0,012	1,96	Cyclooxygenase-2
MMP3	29,6	0,0015	0,30	Matrixmetalloprotease 3

Tab. 3.5.2.1: Liste der Mediane und basalen Expressionslevel aller untersuchten Faktoren unter normalen, unbehandelten und hormonfreien Bedingungen bei Primärzellen aus Endometriose-Exüplantaten nach qRT-PCR. Aufgelistet wurden die Mediane sowie Mittelwerte der RNA-Expressionslevel aller untersuchten Faktoren, welche jeweils mit den Housekeeping Genen GAPDH (A) und HPRT (B) normalisiert wurden. Die gemessenen Faktoren wurden hinsichtlich der drei eingesetzten Primersets in drei Untergruppen zusammengefasst (blau, rot, gelb), (n=3).

Die untersuchten Gene zeigten nach Verwendung der Housekeeping Gene GAPDH und HPRT zur Normalisierung ein ähnliches mRNA-Expressionsmuster (Abb. 3.5.2.1 A und B). Im Vergleich waren hier die basalen Expressionen für COX-2, AhR, SOCS3 und ER β nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT jedoch divergent im Vergleich dieser. In den endometrialen Primärzellen zeigte PAI-1 die nennenswert höchsten gemessenen RNA-Expressionslevel. Alle weiteren analysierten Gene zeigten eine deutlich niedrigere Expression. Eine sehr geringe Expression zeigte sich in diesen Zellen für die gemessenen Faktoren ER α , CYP1A1, Ki67, PROG und ARNT.

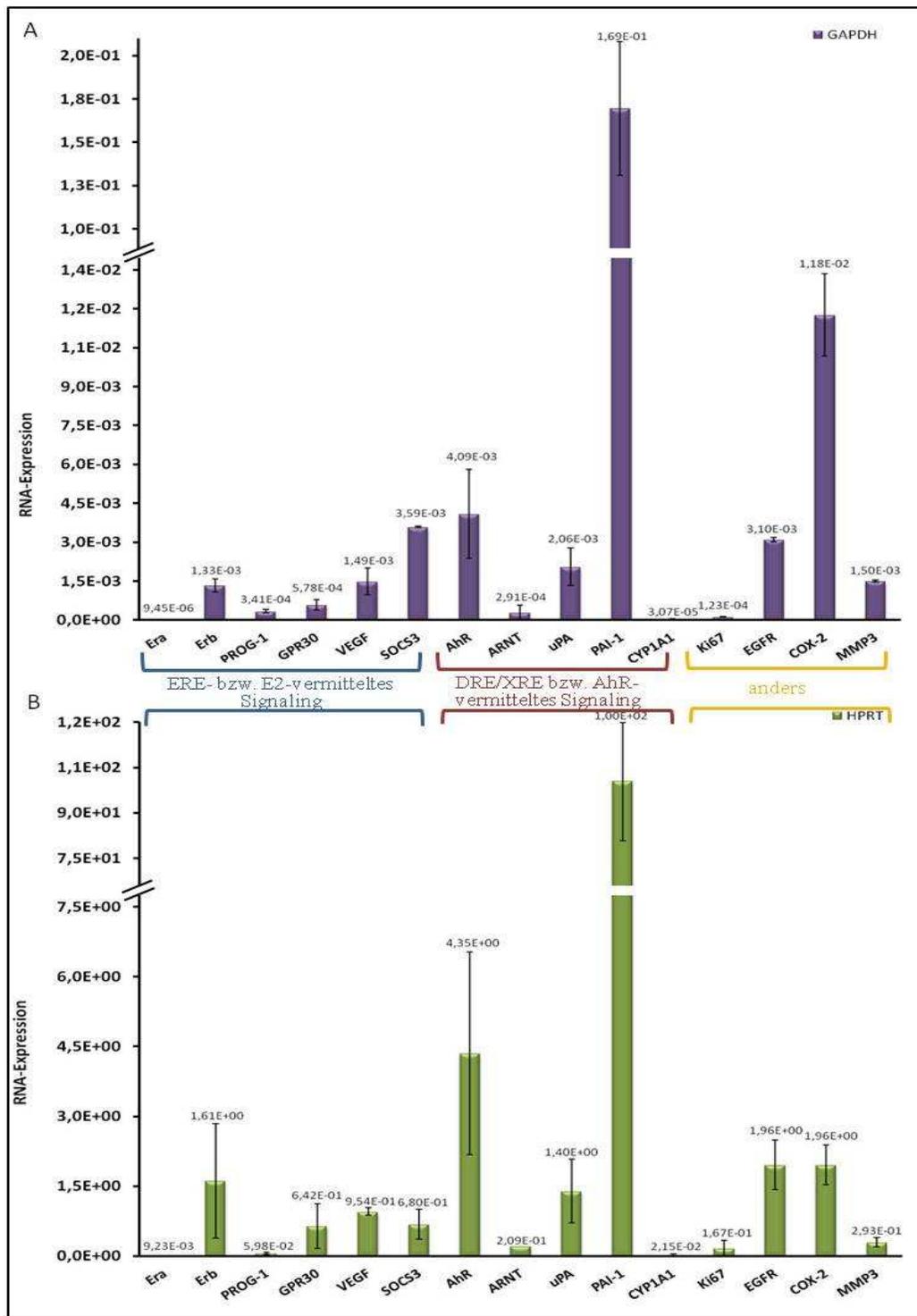


Abb. 3.5.2.1 A und B: Darstellung der basalen Expressionslevel der untersuchten Faktoren unter normalen, unbehandelten und hormonfreien Kulturbedingungen bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Dargestellt wurden die Mittelwerte der RNA-Expressionslevel aller untersuchten Faktoren, welche jeweils mit den Housekeeping Genen GAPDH (A, blau) und HPRT (B, grün) normalisiert wurden. Die gemessenen Faktoren wurden hinsichtlich ihrer Aktivierung bzw. ihres Signalweges in drei Untergruppen zusammengefasst (blau, rot, gelb), (n=3).

Nach Analyse der basalen RNA-Expressionen unter unbehandelten, hormonfreien Kulturbedingungen, wurde auch hier der Einfluss einer ausgewählten Konzentration des Xenoestrogens PCB153 (100ng/ml) sowie E2 (100ng/ml) und ICI 182780 (10nM) als Kontrollen unter selben Kulturbedingungen in endometrialen Primärzellen untersucht.

Die ebenfalls in jeweils drei Primersets untersuchten Gene [1. verschieden E2-regulierte bzw. ERE-aktivierende Faktoren; 2. AhR-regulierte bzw. DRE/XRE-aktivierende Faktoren; 3. weitere relevante Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung] innerhalb dieses Zelltyps, zeigten auch hier im allgemeinen mehr Reduktionen in den analysierten relativen mRNA-Expressionen der untersuchten Gene nach 24 stündiger Testsubstanzinkubation im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) (Abb. 3.5.2.2-3.5.2.4). Die nach Normalisierung erhaltenen Expressionswerte für GAPDH und HPRT der E2- und Xenoestrogenbehandlungen innerhalb der untersuchten Gene zeigten auch in diesem Zelltyp nicht immer vergleichbare relative Expressionsniveaus.

Im ersten Primerset zur Untersuchung verschiedener E2-regulierter Faktoren, zeigten sich die größten signifikanten Veränderungen für SOCS3 (Abb. 3.5.2.2 F). Hierbei wurde die mRNA-Expression von SOCS3 durch E2 signifikant gedrosselt. Für PCB153 zeigte sich ein ähnliches, jedoch weniger signifikantes Bild. Das Antiestrogen ICI 182780 bewirkte hingegen eine geringe Erhöhung der SOCS3-Expression, welche jedoch nur für GAPDH signifikant war. Die Expression von PROG und GPR30 wurde signifikant von sowohl E2 als auch durch das Xenoestrogen PCB153, jedoch mit nur einem der beiden Normalisierungsgene, erniedrigt (Abb. 3.5.2.2 C und D). Die PROG-Expression schien durch das Lösungsmittel DMSO (0,2%) gering beeinflusst worden zu sein, da die relative mRNA-Expression von PROG in der unbehandelte Mediumkontrolle im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) geringfügig erhöht vorlag. Die Expression von ER β zeigte sich durch E2 und PCB153 im entgegengesetzten Masse beeinflusst (Abb. 3.5.2.2 B). Dabei wurde, signifikant für je eines der beiden Normalisierungsgene, mit E2 eine Erniedrigung und PCB153 eine Erhöhung der ER β -Expressionslevel gemessen. Wenig oder kaum einen Einfluss der Testsubstanzen zeigte sich für die Expression von ER α (Abb. 3.5.2.2 A), welches jedoch an der geringen Expression dieses Faktors in endometrialen Primärzellen gelegen haben könnte. Keine signifikanten Veränderungen zeigten die getesteten Substanzen auf die VEGF-Expression (Abb. 3.5.2.2 E).

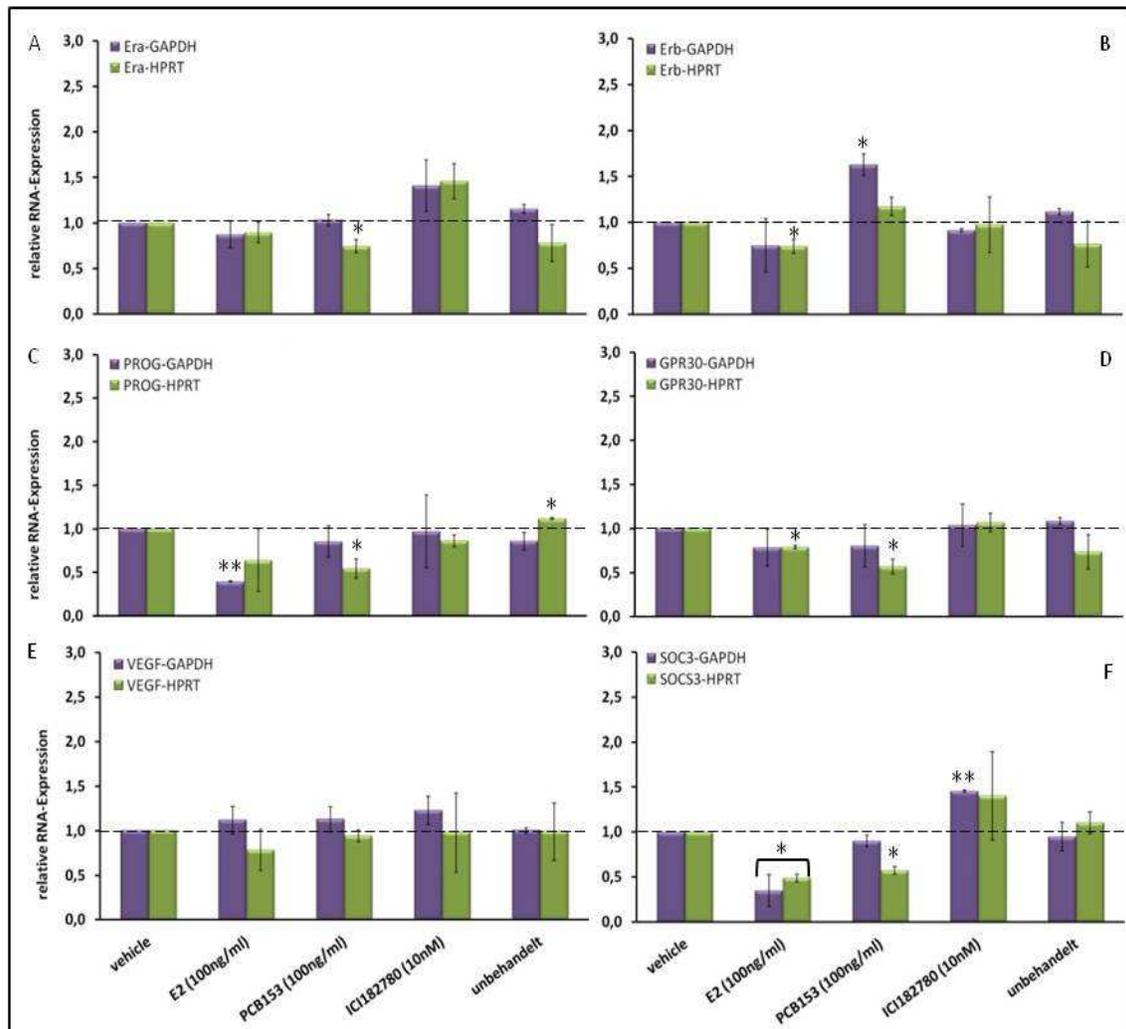


Abb. 3.5.2.2 A-F: Relative Expressionslevel verschiedener E2-regulierter Faktoren bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel verschiedener E2-regulierter Faktoren bei primären Endometriosezellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzkonzentrationen wurden direkt über dem Balken bzw., falls für GAPDH und HPRT im gleichen signifikanten Rahmen, zusammenfassend in Klammern dargestellt (* $p < 0,05$; ** $p < 0,001$). [1. Primerset: Estrogenrezeptor α (ERalpha), Estrogenrezeptor β (ERbeta), Progesteronrezeptor A (PROG-1), G-Protein gekoppelter Rezeptor 30 (GPR30), Vaskulärer Endothelialer Wachstumsfaktor (VEGF), Suppressor des Zytokin Signaling (SOCS3)]. (n=2)

Im zweiten Primerset zur Untersuchung AhR-regulierter Faktoren zeigte vor allem uPA die meisten signifikanten Veränderungen in der mRNA-Expression durch die getesteten Substanzen (Abb. 3.5.2.3). In diesem Zusammenhang rief das Antiestrogen ICI 182780 eine nennenswerte Steigerung der uPA-Expression hervor (Abb. 3.5.2.3 C).

Auch E2 schien hierbei einen geringen steigernden Effekt auf die uPA-Expression gehabt zu haben. Im Gegensatz dazu zeigte das Xenoestrogen PCB153 einen schwach repressorischen Einfluss auf die uPA-Expression im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle). Weitere signifikant reprimierte relative mRNA-Expression wurden bei AhR für E2, PCB153 und ICI

182780 mit jedoch nur geringer Signifikanz gemessen (Abb. 3.5.2.3 A). Die ARNT-Expression wurde durch PCB153 nur in geringem Maße, jedoch durch ICI 182780 stark erniedrigt (Abb. 3.5.2.3 B). Im Gegensatz dazu führte das Antiestrogen bei PAI-1 zu einer Steigerung der relativen mRNA-Expression (Abb. 3.4.2 L). Die CYP1A1-Expression wies einen wenig signifikanten, reprimierenden Trend durch die Testsubstanzen PCB153 und E2 auf (Abb. 3.5.2.3 E). Alle genannten Expressionsveränderungen waren jedoch nur für einen der beiden, GAPDH- oder HPRT-Werte signifikant.

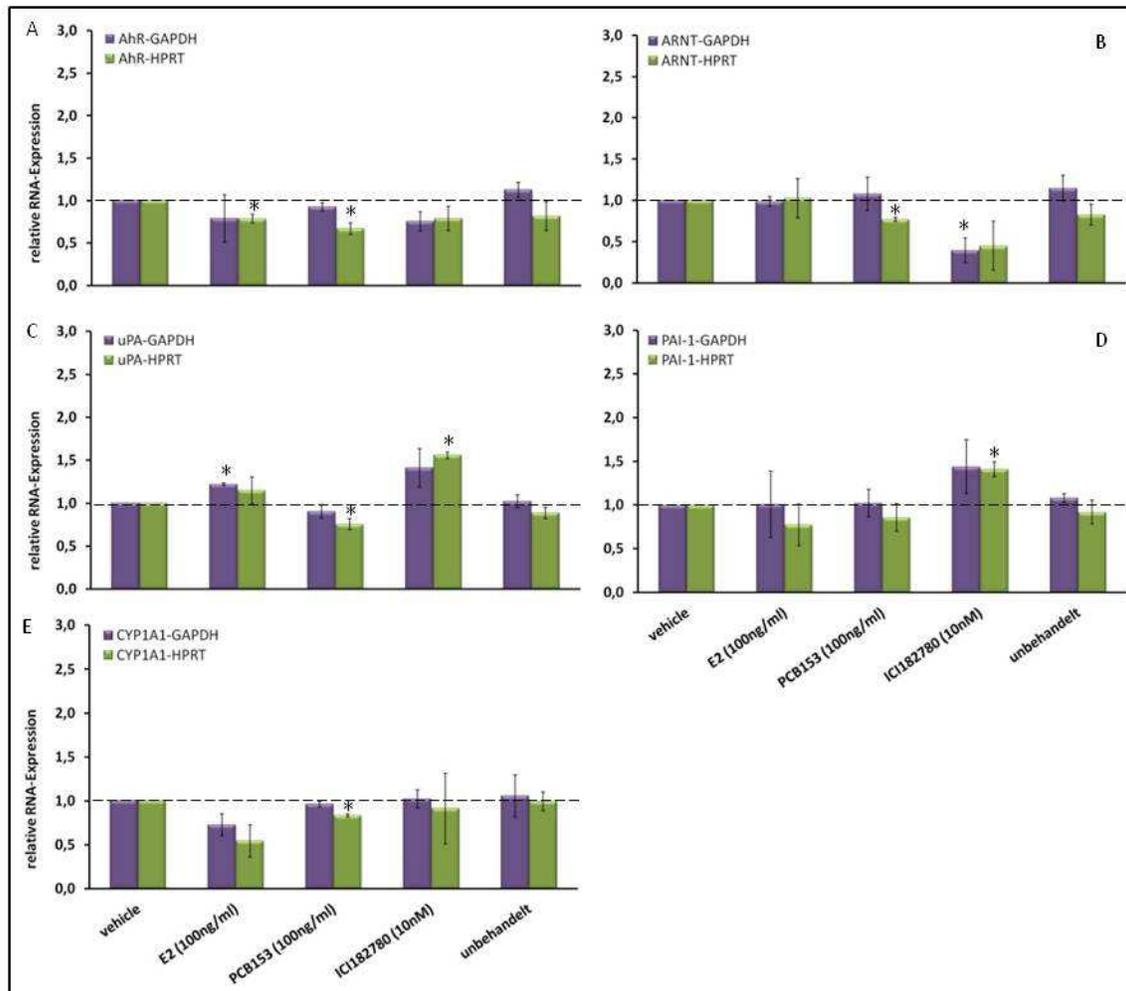


Abb.: 3.5.2.3 A-E: Relative Expressionslevel verschiedener AhR-regulierter Faktoren bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel verschiedener AhR-regulierter Faktoren bei primären Endometriosezellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzenkonzentrationen wurden direkt über dem Balken dargestellt (* p < 0,05). [2. Primerset: Arylhydrokarbonrezeptor (AhR), AhR Nuclear Translocator (ARNT), Urokinase-Plasminogen Activator (uPA), Urokinase Plasminogen Activator-Inhibitor 1(PAI-1), Cytochrom P450 Monooxygenase 1A1 (CYP1A1)]. (n=3).

Das dritte Primerset zur Untersuchung weiterer relevanter Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung zeigte tendenziell einen verstärkenden Einfluss von E2 und PCB153 auf die Expression von Ki67 und COX-2 (Abb. 3.5.2.4 A und C). Das Antiestrogen ICI 182780 verursachte in diesem Zusammenhang eine Repression der Expression dieser beiden Faktoren. Wenig Klarheit ergaben die für die Testsubstanzen gemessenen Unterschiede bei EGFR und MMP3 (Abb. 3.5.2.4 B und D). Hierbei zeigten sich große Unterschiede zwischen den einzelnen GAPDH- und HPRT-Werten einer Testsubstanzen bzw. ein möglicherweise geringer Einfluss des Lösungsmittels DMSO (0,2%) für den zuletzt genannten Faktor (Abb. 3.4.2 D).

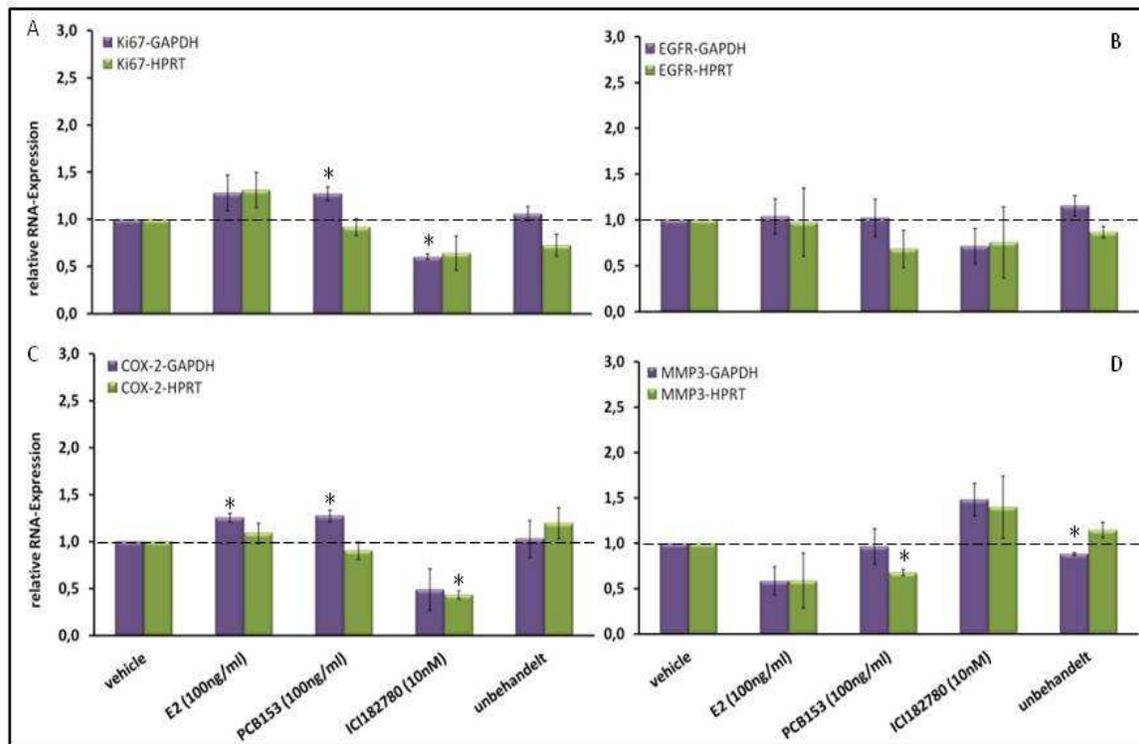


Abb.: 3.5.2.4 A-D: Relative Expressionslevel weiterer relevanter Faktoren für Proliferation und Geweberegenerierung bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. Dargestellt wurden die relativen Expressionslevel weiterer relevanter Faktoren bei primären Endometriosezellen nach 24h Inkubation mit E2, PCB153, ICI 182780 und unbehandeltem Medium im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle=1) nach Normalisierung mit GAPDH und HPRT. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Lösungsmittelkontrollen und gemessenen Testsubstanzenkonzentrationen wurden direkt über dem Balken dargestellt, (* $p < 0,05$). [3. Primerset: Proliferationsmarker Ki67 (Ki67), Epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor (EGFR), Cyclooxygenase 2(COX-2), Matrixmetalloprotease 3 (MMP3)] (n=3).

Bei Gegenüberstellung der aus den qRT-PCR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse, fiel auf, dass die durch E2 und PCB153 hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen in beiden untersuchten Zellsystemen sehr ähnlich waren. Beide Substanzen führten meist gemeinsam zu

einer Induktion, Repression oder keiner Veränderung des jeweiligen Faktors (siehe Übersichtstabelle 4.3), was auf eine potente estrogenische Wirkung von PCB153 schließen lässt.

Es scheint, dass PCB153 durch Repression multipler Gene und Verschiebung des endokrinen Gleichgewichtes im gesunden Endometriumgewebe wichtige physiologische Prozesse wie Angiogenese, Gewebeumbau („tissue remodeling“), Migration und Invasivität bzw. Proliferation sukzessive stört und dass diese verändernden Prozesse auch bei erkranktem Endometriosegewebe durch PCB153-Einwirkung weiter fortgeführt werden. Endometriosegewebe reagiert jedoch aufgrund seiner ohnehin schon endokrin-disruptierten Eigenschaften weniger sensitiv auf PCB153 bzw. E2 im Vergleich zum hTERT-EEC-Zelltyp. Die Ergebnisse aus diesem Kapitel 3.5 lassen ein reges Zusammenspiel verschiedener Signalwege bei der PCB-vermittelten Wirkung erkennen, welche zu multiplen Störungen führen könnte wie z.B die Disruption des endokrinen Gleichgewichts. Die Befunde der qRT-PCR-Experimente wurden zum Vergleich und zur besseren Übersicht in Tabelle 3.5.2.2 zusammengefasst.

untersuchte Faktoren:	Basale Expression (unbeh.)	E2	PCB 153	ICI 182780	Basale Expression (unbeh.)	E2	PCB 153	ICI 182780
ERα	+++	↓↓*	↓↓**	(↓)*	-	(↓)	(↓)*	(↑)
ERβ	+	↓*	n/a	n/a	+	↓*	(↑)	n/a
PROG-1	+	↑	↑	↓*	-	↓↓*	↓*	n/a
GPR30	+	↓	↓*	n/a	(+)	↓*	↓*	n/a
VEGF	+	(↓)*	(↓)	n/a	(+)	n/a	n/a	n/a
SOCS3	+	↓*	↓↓*	n/a	(+)	↓↓*	↓*	(↑)*
AhR	++	↓↓	↓*	n/a	++	(↓)*	(↓)*	(↓)
ARNT	(+)	↓↓*	↓*	↓↓*	-	n/a	(↓)	↓↓*
uPA	(+)	↓↓*	(↓)	n/a	+	(↑)*	(↓)*	(↑)*
PAI-1	(+)	↓↓*	↓*	n/a	+++	n/a	n/a	↑
CYP1A1	-	↓*	↓*	(↓)	-	(↓)	(↓)*	n/a
Ki67	(+)	(↑)	(↑)	(↓)	-	(↑)	(↑)	↓*
EGFR	-	↓↓*	↓↓*	(↓)	+	n/a	n/a	(↓)
COX-2	-	↓*	↓	↓*	++	(↑)	(↑)	↓*
MMP3	-	↓	↓*	n/a	(+)	(↓)	(↓)*	(↑)

Tab. 3.5.2.2: Übersicht der basalen Expression bzw. deren Veränderungen untersuchter Faktoren nach Testsubstanzeinfluss bei hTERT-EEC Zellen (hellgrün) und bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten. (dunkelgrün). Dargestellte Übersicht zeigt die mittels qRT-PCR erhaltenen basalen Expressionsstärken (+/-) ohne Testsubstanzbehandlung sowie die Änderungen der Genexpression (Pfeile bzw. n/a) nach 24h Testsubstanzinkubation beider untersuchter Zellsysteme (hell- u. dunkelgrün) aus dem Kapitel 3.4. Eingesetzte Primersets sind in drei unterschiedlichen Farben dargestellt (blau: E2-regulierte Gene; rot: AhR-regulierte Gene und gelb: relevante Faktoren für Proliferation und Gewebeumbau). [E2: 17 β -Estradiol; PCB153: Polychloriertes Biphenyl 153; ICI 182780: ER-

Inhibitor; ER α β : Estrogenrezeptoren; PROG-1: Progesteronrezeptor A; GPR30: G-Protein gekoppelter Rezeptor 30; VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor; SOCS3: Suppressor of Cytokine Signaling 3; AhR: Arylhydrokarbonrezeptor; ARNT: Aryl Hydrocarbon Rezeptor Nuclear Translocator; uPA: Urokinase-Typ Plasminogen Activator; PAI-1: Plasminogenaktivator Inhibitor 1; CYP1A1: Cytochrom P450-1A1; Ki67: Proliferationsmarker Ki67; EGFR: Epidermal-Growth-Factor-Rezeptor; COX-2: Cyclooxygenase-2; MMP3: Matrixmetalloprotease 3; - nicht oder kaum exprimiert; (+) schwach exprimiert; + exprimiert; ++ stark exprimiert; +++ sehr stark exprimiert; n/a keine Veränderung; (\downarrow) schwache Repression; \downarrow Repression; $\downarrow\downarrow$ starke Repression; (\uparrow) schwache Induktion; \uparrow Induktion; $\uparrow\uparrow$ starke Induktion; * statistisch signifikante Veränderung von mindestens $p < 0,05$]

3.6 Einfluss von PCB153 auf die Zellmotilität von hTERT-EEC Zellen

Neben der Proliferation und Veränderungen der Genexpression sollte auch das Potential von Xenöstrogenen getestet werden, die Zellmotilität zu beeinflussen.

Um darüberhinaus auch eine mögliche Abhängigkeit einer erhöhten Motilität mit spezifischen AhR-Liganden und somit dem AhR-Signalweg zu untersuchen, wurden für dieses Motilitätsassay zwei AhR-Liganden, das Dioxin-ähnliche PCB126 und TCDD (Dioxin) sowie das nicht-Dioxin-ähnliche PCB153 eingesetzt. Nach 18stündiger Migrationszeit der hTERT-EEC Zellen und einer Gesamtinkubationszeit der Zellen von 42h mit den getesteten Substanzen zeigte sich eine signifikante Zunahme der Motilität unter PCB153, PCB126 und TCDD Einfluss.

Dieses Ergebnis lässt eine AhR-spezifische Steigerung der Zellmotilität nicht erkennen. Die Ergebnisse aus diesem Teil der Arbeit wurden bereits veröffentlicht (Willing et al., 2010).

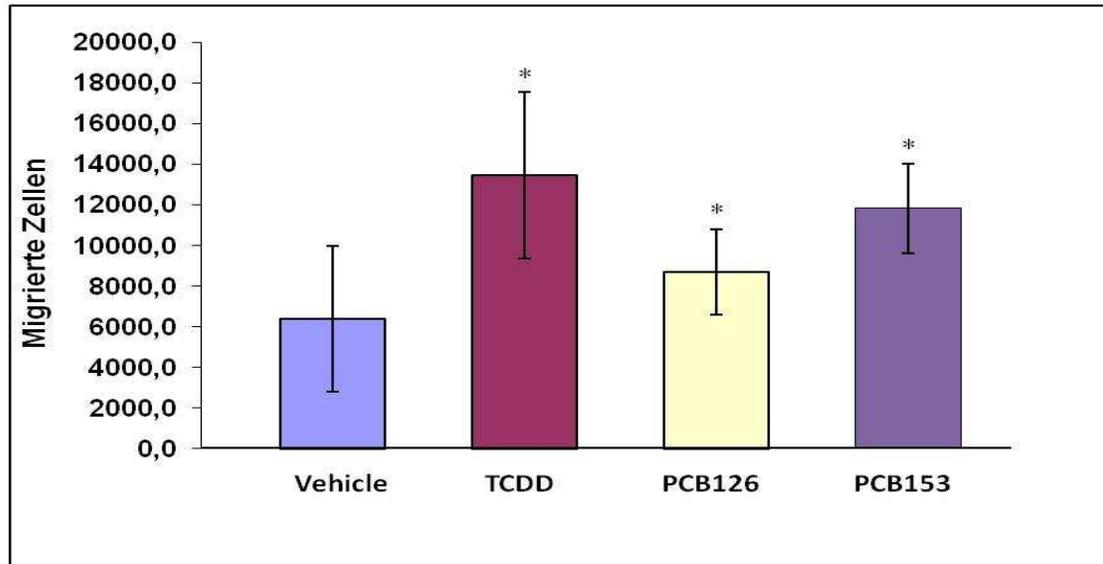


Abb.: 3.6: Motilität von hTERT-EEC Zellen nach Testsubstanzinkubation. Effekt von TCDD (10nM), PCB126 (100ng/ml) und PCB153 (100ng/ml) auf die Motilität von hTERT-EEC Zellen im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle (Vehicle) nach 42h Inkubation. Der Effekt wurde dargestellt als Anzahl migrierter Zellen/Filterinsert (12 μ m Porengröße) bei hTERT-EEC Zellen nach Normalisierung. Statistisch signifikante Unterschiede zwischen Lösungsmittelkontrolle und gemessenen Testsubstanzkonzentrationen wurden direkt über dem Balken dargestellt, (* $p < 0,05$; n=3).

4 Diskussion

Natürliche und synthetische Estrogene, wie z.B. 17 β -Estradiol (E2), agieren stimulierend in hormonabhängigen Zielgeweben. Mit der Entdeckung und Charakterisierung der Estrogenrezeptoren ER α und β wurde es möglich, E2-vermittelte Reaktionen receptorspezifisch in E2-Zielgeweben zu untersuchen. Primäre Zielgewebe von Estrogen, wie Uterus und Brust, weisen allgemein mehr ER α als ER β auf (Dahlman-Wright et al., 2006). Bei der Tumorgenese des Mammakarzinoms zeigte sich, dass das Expressionsverhältnis von ER α zu β im malignen Gewebe noch stärker zugunsten von ER α verschoben ist (Leygue et al., 1998; Speirs et al., 1999). Proliferation bzw. mitogene Effekte werden meist durch ER α vermittelt (Paruthiyil et al., 2004). Von ER β ist bekannt, dass er als Repressor der transkriptionellen Aktivität von ER α (Hall and McDonnell, 1999; Weihua et al., 2000) sowie protectiv gegen ER α -induzierte Hyperproliferation (Bardin et al., 2004) wirkt. Dabei kann ER β mit ER α Heterodimere bilden und so eine klassische ER α -vermittelte Aktivierung am ERE inhibieren (Barkhem et al., 2004). ER β könnte somit als Gegenspieler von ER α fungieren und z.B. durch Modifizierung von wachstumsfördernden Genen, wie c-Myc, Cyclin D1 und A, antiproliferative Eigenschaften besitzen (Paruthiyil et al., 2004). Es ist jedoch weitgehend akzeptiert, dass ER α und β je nach Gewebe und zellulärem Kontext verschiedene Funktionen ausüben können und dass in Geweben, in welchen beide Rezeptortypen co-exprimiert vorliegen, sie unterschiedliche bzw. gegensätzliche Wirkungsweise haben können (Matthews and Gustafsson, 2003).

Bei der endokrinen Regulation durch Estrogene ist auch der ER-Ligand selbst von großer Bedeutung. Der klassische (genomische) ER-vermittelte Signalweg von E2 erfolgt durch Bindung des endogenen Liganden an den Rezeptor, wonach es zur Dimerisierung zweier ER-Moleküle und deren Translokation in den Kern kommt. Im Kern binden die translozierten Dimere an spezifische „estrogen response elements“ (EREs) in der DNA Hormon-regulierter Promotorregionen, was schließlich zur Aktivierung der Genexpression führt. Je nach Präsenz bestimmter Co-Faktoren (Aktivatoren oder Repressoren) wirkt der Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktor agonistisch oder antagonistisch. Dabei wirkt endogenes E2 in ER-exprimierenden Zellen meist als Mitogen *in vivo* und *in vitro* (Musgrove et al., 1994). Hiernach stimuliert E2 Zellen in der G₀-Phase zum Eintritt in den Zellzyklus und beschleunigt den Übergang von der G₁- in die S-Phase (Leung and Potter, 1987; Sutherland et al., 1998), wodurch der Zellzyklus induziert wird. Neben dem endogenen Liganden E2 können ER α β auch ein weites Spektrum strukturell verschiedener Liganden binden (Kuiper et al., 1998). Einige dieser alternativen Liganden weisen eine erstaunlich konvergente Funktionalität hinsichtlich ihrer Aktivierung der Transkriptionsmachinerie mit E2 auf (Buterin et al., 2006).

Viele dieser alternativen Liganden sind anthropogenem Ursprungs (Xenoestrogene). Es wird vermutet, dass sie wie E2 durch Bindung und Aktivierung am ER estrogene Effekte auszulösen (Korach, 1997; McLachlan, 2001b; Soto et al., 1995).

4.1 Xenoestrogen- und E2-vermittelte Proliferation von hTERT-EEC Zellen

In dieser Arbeit wurde das gesteigerte relative Wachstumsverhalten von Zellen der immortalisierten humanen endometrialen epithelialen Zelllinie hTERT-EEC nach 96h Inkubation mit den Xenoestrogenen PCB153, p,p'DDE, β -HCH, dem Phytoestrogen Coumestrol (Coum) sowie E2 als Kontrolle im Sulforhodamin B Assays (SRBA) gemessen (Abb. 3.1.1.1). Dabei konnte vor allem durch die 96-stündige Inkubation mit PCB153 bei hTERT-EEC Zellen ein Wachstumsprofil beobachtet werden, dass dem E2 induzierten sehr ähnlich war (Abb. 3.1.1.1 A und E). In weiterführenden Experimenten konnte der besonders von PCB153 ausgehende proliferative Effekt auf hTERT-EEC Zellen mittels AlamarBlue-Assay bereits bestätigt, was jedoch nicht Bestandteil der vorliegenden Arbeit war (Willing et al., 2010).

Von unserer Arbeitsgruppe wurde bereits eine erhöhte relative proliferative Aktivität bei endometrialen epithelialen und stromalen Primärzellen (Dissertation Hippe, 2005) sowie bei MCF7-Mammakarzinomzellen (Dissertation Delios, in Preparation) nach Inkubation mit verschiedenen Xenoestrogenen im SRBA gezeigt (Köller *et al.*, 2004).

Die beobachteten proliferativen Effekte von PCB153 stehen im Einklang mit Ergebnissen von Radice et al., die eine Proliferationsstimulation von MCF7-Zellen durch PCB153 nach 2-6 Tagen nachweisen konnten (Radice et al., 2008). Auch Rasmussen et al. wiesen estrogene Wirkungen von Serumextrakten dänischer Frauen, welche PCBs enthielten, im E-Screen Assay nach, wobei jedoch eine Korrelation zwischen aufgezeigten Effekten und spezifischen Konzentrationen individueller Xenoestrogene im Serum leider nicht untersucht wurde (Rasmussen et al., 2003). Der in dieser Arbeit angewandte SRB-Assay entspricht im modifizierten Umfang dem eben angesprochenen E-Screen Assay (Papazisis et al., 1997; Payne et al., 2001; Skehan, 1990; Soto et al., 1995). Dieser Assay stellt eine sensitive Methode zur Messung von Zytotoxizität und Zellwachstum beim Screening von Umwelt- und Arzneimittelstoffen dar und ist mit vielen Zytotoxizitätstests wie z.B. dem MTT-Assay vergleichbar (Vichai and Kirtikara, 2006; Voigt, 2005). Etliche Arbeitsgruppen haben bereits Xenoestrogene aus der Umwelt mit Hilfe dieses Assays auf ihre potenzielle estrogene Aktivität hin untersucht (Bonefeld-Jorgensen et al., 2001; DeCastro et al., 2006; Rasmussen et al., 2003; Soto et al., 1995). Mit Hilfe dieses Assays stellten Bonefeld-Jorgensen et al. (2001) allerdings einen antiestrogenen

Einfluss von PCB 138, PCB 153 und PCB 180 auf MCF7-BUS Zellen fest, was im Widerspruch zu dem proliferativen Effekt steht, der in der vorliegenden Arbeit beobachtet wurde. Unabhängig vom benutzten Assay wurden Xenoestrogene entweder estrogene oder antiestrogenische Effekte zugewiesen. So steht z.B. der in dieser Arbeit beobachtete proliferative Effekt von PCB153 im Einklang mit den bereits erwähnten von Radice et al. (2008). Diese Arbeitsgruppe wies einen estrogenen Effekt von PCB153 bei MCF7-Zellen in FACS-Analysen nach. Durch Vondracek et al. wird jedoch bei epithelialen Rattenleberzellen (WB-F344) gegenteiliges berichtet, obwohl bei beiden Arbeitsgruppen dieselbe Methode angewendet wurde (Vondracek et al., 2005).

Ein großes Problem beim Test von Umwelt- und Arzneimittelstoffen ist, dass die durch Xenoestrogene ausgelösten Effekte auf Mensch und Tier unterschiedlich sind und aufgrund einer überwiegenden Mischexposition nicht eindeutig nur einem bestimmten Xenoestrogen zugeordnet werden können. Außerdem können Effekte je nach Typ des Xenoestrogens und je nach Beschaffenheit des jeweils untersuchten Gewebes mit seinen zellulären Kofaktoren und je nach den angewandten experimentellen Zellkulturbedingungen stark variieren. Dementsprechend wird das Gesundheitsrisiko, welches von einem Xenoestrogen ausgeht von „katastrophal“ über „nicht erwiesen“ bis hin zu „unbedeutend“ eingeschätzt.

Neben PCB153 wurde in dieser Arbeit auch für p,p'-DDE (100ng/ml und 1µg/ml) eine wachstumsfördernde Aktivität auf hTERT-EEC Zellen nachgewiesen (Abb. 3.1.1.1 B). Auffällig war hierbei ein triphasischer Kurvenverlauf über den gemessenen Konzentrationsbereich von 10pg/ml-1µg/ml, welches zusammen mit den PCB153-Daten auf eine gesteigerte Sensitivität dieses Zelltyps gegenüber Xenoestrogen schließen lässt. Bei p,p'-DDE handelt es sich um den in der Umwelt persistentesten Metaboliten des Insektizids DDT und dessen estrogenes Potenzial wurde bereits von mehreren Arbeitsgruppen für MCF7-Zellen (Andersen et al., 1999; Payne et al., 2001; Rasmussen et al., 2003), MCF7-AR1-Zellen (Aube et al., 2008) sowie Prostatakarzinomzellen (Shah et al., 2008) beschrieben. Es scheint, dass p,p'-DDE durch eine sowohl estrogene als auch antiandrogene Aktivität die Proliferation durch Interferenz zweier, ER- und AR-vermittelter Signalwege steigern kann (Kelce et al., 1995; Sohoni and Sumpter, 1998).

Auch β-HCH (100ng/ml und 1µg/ml) rief einen positiven Wachstumseffekt bei hTERT-EEC Zellen hervor (Abb. 3.1.1.1 C). Dieses Isomer des Insektizids Lindan besitzt estrogenische Aktivität, so erhöht es z.B. die PR-Expression bei MCF7-Zellen (Coosen and van Velsen, 1989) sowie das uterine Gewicht bei Ratten (Loeber, 1984). Bei Wong & Matsumura wird von einer

Proliferationssteigerung nach Langzeit-Exposition (33 Passagen) von MCF10AT1 Brustepithelzellen durch $1\mu\text{M}$ $\beta\text{-HCH}$ berichtet (Wong and Matsumura, 2007).

Auch Steinmetz et al. konnte durch $\beta\text{-HCH}$ eine Dosis-abhängige Stimulation der Proliferation bei ER-positiven MCF7- und T47D-Zellen, jedoch nicht bei den ER-negativen Zelllinien MDA-MB231, MDA-MB468 und HSS78T beobachten (Steinmetz et al., 1996). Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit, da nur für die ER-positive uterine Zelllinie hTERT-EEC (Abb. 3.1.1.1 C) und nicht für die ER-negativen uterinen Zelltypen Primärzellen von Endometriose-Explantaten (Abb. 3.1.1.1 C) bzw. RL95-2 (Abb. 3.1.1.1 C) Proliferationszunahmen durch erhöhte $\beta\text{-HCH}$ -Konzentrationen (100ng/ml und $1\mu\text{g/ml}$) zu beobachten waren. Steinmetz und seine Kollegen gehen davon aus, dass obwohl $\beta\text{-HCH}$ wie E2 agiert, es im Kontext interzellulärer Signalwege jedoch wahrscheinlich nicht über den klassischen via ER-vermittelten Signalweg wirkt, zumal Rezeptorbindungsstudien keine Konkurrenz um eine Bindung an den ER im Vergleich zu E2 ergaben.

Auch die hervorgerufene Wachstumsförderung durch Coumestrol steht im Einklang mit in der Literatur beschriebenen Auswirkung dieses Phytoöstrogens bei anderen Zellsystemen. So wird z.B. von einem erhöhten Uterusgewicht bei ovariectomierten Ratten (Ashby, 1999; Markaverich, 1995; Perel and Lindner, 1970) und einer gesteigerten Proliferation durch dieses Phytoöstrogen bei MCF7 Zellen berichtet (Bentrem et al., 2003; Diel et al., 2002; Makela, 1994). Darüberhinaus zeigten u. a. Mäkelä et al. *in vitro* die erhöhte Expression des E2-vermittelten pS2-Genes und ERE-vermittelte Reportergenaktivität durch verschiedene Phytoöstrogene. Diese Ergebnisse zusammengenommen lassen stark auf eine ER-vermittelte Wirkungsweise des genannten Phytoöstrogens schließen. Auch die agonistische Wirkungsweise verschiedener über die Nahrungskette aufgenommener Phytoöstrogene wurde bereits in der Literatur beschrieben (van Meeuwen et al., 2007).

Weitere Hinweise auf die existierende proliferationssteigernde Wirkung vor allem von PCB153 ergaben immunocytochemische Untersuchungen des Proliferationsmarkers Ki67. Hier konnte sowohl bei der Brustkrebszelllinie MCF7 als auch bei der uterinen Zelllinie hTERT-EEC durch verschiedene Konzentrationen PCB153 signifikant höhere Ki67-Scores im Vergleich zur Kontrolle gemessen werden (Abb 3.1.2.1.1.2 A und 3.1.2.1.1.3 A).

Auch mit einer dritten Nachweismethode, dem BrdU-Proliferationsassay, zeigten sich bei ER-positiven MCF7-Zellen schwache proliferative Effekte nach 96h Inkubation mit PCB153 (Abb. 3.1.2.2.1 C). Dies steht im Einklang mit Ptak et al., welche ebenfalls basale Proliferationseffekte bei MCF7-Zellen im BrdU-Assay nachweisen konnten (Ptak et al., 2010). Jedoch zeigte PCB153 im Gegensatz zur Positivkontrolle E2 einen allgemein nur geringen Einfluss

auf MCF7-Zellen. Diese hier beobachtete Diskrepanz in der estrogenen Aktivität zwischen PCB153 und E2 ist schwer zu erklären. Möglicherweise waren experimentelle Parameter, wie z.B. die gewählte Inkubationszeit oder die eingesetzte Zellzahl, unter welchem der BrdU-Assay bei MCF7 und MDA-MB-321 Zellen durchgeführt wurde, ungünstig gewählt. So konnten z.B. Tharappel et al., die auch keinen Einfluss von PCB153 auf die Proliferation von Zellen, in diesem Fall bei Hepatozyten, im BrdU-Assay nachweisen konnten, aber mit Hilfe des TUNEL-Assays zeigen konnten, dass in Gegenwart dieser Substanz signifikant weniger Zellen apoptotisch waren (Tharappel et al., 2002).

Im Gegensatz zur ER-positiven Zelllinie hTERT-EEC konnte bei keinem der untersuchten ER-negativen Zelltypen [Primärzellen von Endometriose-Explantaten siehe Abb. 3.1.1.1 bzw. Zellen des Endometriumkarzinoms RL95-2 siehe Abb. 3.1.1.1] ein echter Wachstumseffekt durch die getesteten Substanzen im SRBA nachgewiesen werden. Auch der BrdU-Proliferationsassay an der ER-negativen Brustkrebszelllinie zeigte mit einer Ausnahme (Abb 3.1.2.2.2 H).

Die Tatsache, dass PCB153 proliferationsfördernd auf ERpositive-Zellen wirkt sowie, dass die durch PCB153 und E2 hervorgerufenen Effekte einander sehr ähnlich sind, lässt auf einen ER-abhängigen Proliferationseffekt der untersuchten Substanzen schließen.

Ähnlichkeiten in der Wirkung von PCB153 im Vergleich zu E2 wurden auch von Desaulniers et al. berichtet (Desaulniers et al., 1999). Diese Arbeitsgruppe stellte ähnliche Effekte von PCB153 und E2 auf Serumkonzentrationen von Thyroxin (T4) und Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) bei männlichen Ratten nach zwei Injektionen mit PCB153 (25mg/kg/d) und E2 (20µg/kg/d) fest, was sie auf eine estrogenen Wirkung von PCB153 zurückführten. Li et al. wies einen estrogenen Charakter von PCB153 in hohen Konzentrationen mittels Uteruswachstumsassay bei Ratten nach (Li et al., 1994). Somit ist es wahrscheinlich, dass PCB153 wesentlich an estrogenen Reaktionen in Zellen hormoneller Zielgewebe beteiligt ist.

4.2 Einfluss von Xenoestrogenen und E2 auf den klassischen ER-vermittelten Signalweg

Es ist möglich, die proliferative Wirkung von E2 durch Antagonisten wie z.B. dem ER-Inhibitor ICI 182780 spezifisch zu hemmen (Dauvois et al., 1993). Dabei wird der E2-vermittelte Signalweg von ER durch den Antagonisten inhibiert.

Durch Gegenwart des ER-Inhibitors ICI 182780 mit der jeweiligen Testsubstanz konnte der von den getesteten Xenoestrogenen bzw. der durch E2 verursachte Wachstumseffekt bei hTERT-EEC Zellen vollständig aufgehoben werden (Abb. 3.1.1.1 A-E). Eine Wachstumshemmung durch ICI 182780 konnte vor allem in Gegenwart von PCB153, E2 und Coum und

bei höheren Konzentrationen von β -HCH beobachtet werden (Abb. 3.1.1.1 D, E, A und C). Die spezifische Hemmung des PCB153-vermittelten Wachstumseffektes mit ICI 182780 konnte auch von Radice et al. (2008) beobachtet werden.

Der Einsatz des ER-Inhibitors ICI 182780 im SRB-Wachstumsassay führte zur Bindung von ICI 182780 an den ER. Dabei bindet der Inhibitor mit ähnlich hohen Bindungsaffinitäten am ER (89%) wie E2, dem endogenen Liganden von ER (Wakeling and Bowler, 1987). Die Bindung des Inhibitors an einen ER führt zur Blockade des Dimersierungs- und Translokationsprozesses, wodurch der ER für transkriptionelle Zwecke nicht mehr zur Verfügung stehen kann (Dauvois et al., 1993; Fawell et al., 1990). Darüber hinaus sind ER-ICI 182780-Komplexe äußerst instabil, was zu einer vermehrten Degradation solcher komplexierten ER-Proteine führt (Nicholson, 1995).

Aufgrund der Tatsache, dass ICI 182780 nicht nur am ER bindet und ihn somit für weitere Signalwegvermittlung blockiert sondern auch aufgrund seiner durch ICI 182780 beschleunigten Degradierung, kann von einer transkriptionellen Blockade des reinen „klassischen“ Mechanismus von ER nicht ausgegangen werden. Der Einsatz dieses Inhibitors führt somit nicht nur zur Blockierung der Transkription E2-vermittelter Zielgene (genomische Wirkung) sondern gleichzeitig auch zur Inhibition aller in Verbindung mit dem ER-stehender Signalwege innerhalb einer Zelle. Eine Diskussion einer rein genomischen Xenoestrogenwirkung über den ER auf die transkriptionelle Aktivierung von E2-vermittelten Zielgenen (klassischer Signalweg) ist somit nicht möglich. Jedoch kann man aufgrund der Tatsache, dass ICI 182780 in Lage war die Xenoestrogen-vermittelten Wachstumseffekte vollständig zu unterdrücken, von einer Beteiligung des genomischen Weges an der hier beobachteten Wirkungsweise der Xenoestrogene ausgehen.

In diesem Zusammenhang ist es interessant zu erwähnen, dass die Applikation des Antiestrogens ICI 182780 ohne Xenoestrogenstimulation keinen Effekt auf hTERT-EEC-Zellen oder Zellen aus primären Endometriose-Explanten hatte (Abb. 3.1.1.1 A-E und F-J). Dies stimmt mit den Ergebnissen von Wu & Guo überein, die ebenfalls keinen signifikanten proliferativen/antiproliferativen Effekt von ICI 182780 allein auf immortalisierte endometriale Stromazelllinie beobachten konnten (Wu and Guo, 2006).

Im Gegensatz zu den hTERT-EEC Zellen wiesen weder uterine Primärzellen aus Endometriose-Explantaten noch Zellen der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL95-2 bei keiner der getesteten Substanzen einen auffälligen Wachstumsförderungseffekt auf (Abb. 3.1.1.2 bzw. 3.1.1.3), welches mit den niedrigen Expressionslevel von ER α in diesen Zelltypen erklärt werden könnte.

Im Falle der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL95-2 wurde jedoch ein signifikanter anti-proliferativer Effekt von ICI 182780 allein beobachtet (Abb.3.1.1.3). Dies steht im Einklang mit Ergebnissen von Leblanc et al., die ebenfalls eine antagonistische Aktivität von ICI 182780 auf RL95-2 Zellen sowie auf andere uterine Zelllinien, welche unter hormonfreien Bedingungen kultiviert wurden, beobachten konnten (Leblanc, 2007).

In weiterführenden Promotoranalysen konnte eine ER-vermittelte Wirkungsweise von PCB153 bei der Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 und der uterinen immortalisierten Zelllinie hTERT-EEC weiter bestätigt werden. Hierbei zeigten PCB153 und E2 eine deutliche Induktion der ERE-regulierten basalen Luciferaseaktivität (Abb. 3.2 A und C), die durch Zugabe des ER-Inhibitors ICI 182780 spezifisch inhibiert werden konnte.

Ein weiterer Hinweis auf eine ER-vermittelte Wirkungsweise von PCB153, ist der Befund, dass in der vorliegenden Arbeit bei der ER-negativen Mammakarzinom-Zelllinie MDA-MB-231 eine Induktion der ERE-regulierten Luciferaseaktivität durch PCB153 und E2 nicht gemessen werden konnte, welches mit der in diesem Zelltyp zu geringen basalen ER-Expression erklärbar ist.

Ein Vergleich der Ergebnisse mit PCB153 und E2 scheinen auf eine ähnliche Wirkungsweise beider Substanzen hinzuweisen. Dies steht jedoch wie bereits angesprochen, im Gegensatz zu einigen in der Literatur beschriebenen Ergebnissen. Viele Ergebnisse aus der Literatur sind jedoch aufgrund meist unterschiedlichen Fragestellungen und experimentellen Bedingungen mit denen aus dieser Arbeit nicht direkt vergleichbar.

So konnten z.B. Pliskova et al. bei Promotoranalysen keine Induktion der ER-abhängigen Luciferase-Aktivität nach Xenoestrogeninkubation messen, jedoch eine signifikante Erniedrigung der E2-induzierten Luciferase-Aktivität bei Ko-Inkubationsversuchen mit Xenoestrogenen verzeichnet werden (Pliskova et al., 2005).

Das Hauptziel dieser Arbeit lag in der Diskriminierung ER-abhängiger Signalwege der durch Xenoestrogene ausgelösten Effekte. Dass heißt, können einzelne Xenoestrogene wie PCB153, ähnlich wie E2, über verschiedene ER-vermittelte Mechanismen agieren (genomisch, unspezifisch bzw. über „cross-talk“)? Eine Untersuchung an Zellen mit Substanzgemischen (E2+PCB153 oder E2+Mix der untersuchten Xenoestrogene) fand nicht statt.

Ausserdem handelt es sich bei den in der Literatur beschriebenen Xenestrogenwirkungen meist um Ergebnisse aus klinisch-relevanten Studien, wobei Xenoestrogen-kontaminierte Patientenspezimen wie z.B. Blut, Plasma oder Serum von Männern, schwangeren und/oder nicht-schwangeren Frauen und Kindern bzw. einzelne Xenoestrogene aus aufgezählten Patientenspezimen isoliert, eingesetzt wurden. In jedem Fall repräsentieren Parameter wie das Ge-

schlecht, Alter, der hormonelle Status sowie die Metabolisierung verschiedener Xenoestrogene im Körper von Patienten (CYP1A1-Polymorphismen) unbekannte Störgrößen in den durchgeführten Studien. Aufgrund dessen lassen sich z.B. die im vorigen Abschnitt von Pliskova et al. (2005) angesprochenen Ergebnisse nicht vollständig mit denen aus dieser Arbeit vergleichen. Hierzu soll noch einmal auf die bereits erwähnte Problematik hingewiesen werden, dass die durch Xenoestrogene ausgelösten Effekte auf Mensch und Tier unterschiedlich sind bzw. aufgrund einer überwiegenden Mischexposition nicht eindeutig nur einem bestimmten Xenoestrogen zugeordnet werden können. Darüberhinaus können Effekte im Kontext der jeweils untersuchten Gewebe oder bei unterschiedlichen Zellkulturbedingungen stark variieren.

4.3 Einfluss von Xenoestrogenen und E2 auf den MAPK-vermittelten Signalweg

Der klassische (genomische) E2-vermittelte Signalweg von ER erklärt nicht alle im Zusammenhang mit der Zellzyklusprogression gefundenen Daten. So ist z.B. die Aktivität des zytosmatischen MAPK- Signalweges für eine E2-vermittelte Zellzyklusprogression notwendig, wie anhand der MCF7 Mammakarzinom-Zelllinie gezeigt wurde ((Lobenhofer et al., 2002). Xenoestrogene sind u.a. in der Lage, hormonähnlich zu wirken bzw. mit der Wirkungsweise endogener Estrogene wie E2 und anderen Steroidhormonen zu interferieren. Somit könnte die von Xenoestrogenen ausgehende estrogene Aktivität, ähnlich dem endogenen E2, z.B. den MAPK-Signalweg induzieren. Um dies zu überprüfen wurden alle Testsubstanzen erneut im SRBA mit dem MEK1/2-Inhibitor U0126 getestet. Der Inhibitor U0126 verhindert die Phosphorylierung der extrazellulär regulierten MAPK ERK1/2 und somit deren Phosphorylierung von ER am Serin 118.

Die Inkubation der getesteten Xenoestrogene in Gegenwart des MAPK-Inhibitors U0126 zeigte sowohl bei der Brustkrebszelllinie MCF7 als auch bei der uterinen Zelllinie hTERT-EEC einen Rückgang der Xenoestrogen-vermittelten Wachstumseffekte (Abb. 3.3.1.1.1 bzw. 3.3.1.2). Der proliferative Einfluss der Testsubstanzen wurde jedoch nicht so stark durch diesen Inhibitor gehemmt wie durch den ER-Inhibitor ICI 182780. Der MAPK-Inhibitor U0126 war, im Vergleich zum ER-Inhibitor ICI 182780, nicht in der Lage die Wachstumseffekte der untersuchten Substanzen komplett zu unterdrücken. Aufgrund der in Gegenwart von U0126 beobachteten Abschwächung des Testsubstanz-vermittelten Wachstumseffektes scheint es wahrscheinlich, dass ein proliferativer Stimulus auch über diese, MAPK-ERK1/2-vermittelte Signalkaskade erfolgt.

Weiterführende Westernblot-Untersuchungen zum Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 unter Xenoestrogeneinfluss wurden durchgeführt. Hierbei wurde der Einfluss der Xenoestrogene auf den MAPK-ERK1/2-Signalweg weiter bestätigt. So führte die PCB153- und E2-Inkubation (100ng/ml) bei der uterinen ER-positiven Zelllinie hTERT-EEC zur beachtlichen Steigerung der ERK1/2-Phosphorylierung (Abb. 3.3.2.1 C). Im Gegensatz dazu zeigten ER α -negative Zellen der Brustkrebszelllinie MDA-MB-231 keine Änderungen des Phosphorylierungsstatus von ERK1/2 nach PCB153- und E2-Inkubation. Dies könnte damit erklärt werden, dass dieser Zelltyp kaum ER α -Protein exprimiert. Auffällig war eine sowohl bei MCF7- als auch bei MDA-MB-231 Zellen vorliegende hohe basale Expression von Phospho-ERK1/2, welche sich in den starken Expressionen von Phospho-ERK1/2 der Lösungsmittel- bzw. unbehandelten Kontrollen widerspiegelte (Abb.3.3.2.1 A und B). Für MDA-MB-231 ist dies mit einem in diesen Zellen vorliegenden, konstitutiv-aktivierten MAPK-Signalweg und dem damit zusammenhängenden Verlust der Hormonsensitivität dieser Zellen zu erklären, wodurch die untersuchten Substanzen keinen Einfluss mehr auf diesen Signalweg zeigen konnten. So ist z.B. die Überexpression von Rezeptortyrosinkinasen wie EGFR und Her2/neu oder dem Proto-Onkogen Ras, welche zur konstitutiven Aktivierung des MAPK-Signalweges bzw. von ERK führen, ein häufiges Merkmal von Mammakarzinomzellen bzw. der Induktion E2-unabhängiger Proliferation (Oh et al., 2001; Ohuchi et al., 1986; Sainsbury et al., 1985). Hierbei besteht eine inverse Korrelation zwischen der EGFR- und ER α -Expression (Sainsbury et al., 1985), welche im Falle von MDA-MB-231 Zellen zutrifft.

Dass es bei der ER-positiven Brustkrebszelllinie MCF7 zu keinen Veränderungen der Phospho-ERK1/2-Expression durch PCB153 bzw. E2 kam, ist jedoch unerklärlich, da diese Zelllinie ER α -positiv ist und sich auch in den SRB-Assays Xenoestrogen- und Hormon-sensitiv zeigte. So wurde z.B. von (Radice et al., 2008) eine PCB153-aktivierte Phosphorylierung von ERK1/2 für die Mammakarzinom-Zelllinie MCF7 berichtet, was in Kontrast zu eben angesprochenen Ergebnissen bei MCF7-Zellen steht. Hierzu muss erläutert werden, dass die von Radice et al. durchgeführten Westernblot-Untersuchungen zum Einfluss von Xenoestrogenen in Form von Zeitkinetiken, nach 0,5, 1, 4, 8, 12 und 24h analysiert worden. Im Gegensatz zu Radice et al. wurden in dieser Arbeit alle untersuchten Zelltypen mit der jeweiligen Testsubstanz nur zu einem Zeitpunkt (nach 48h Testsubstanzinkubation) auf ihren entsprechenden ERK1/2-Phosphorylierungsgrad hin untersucht. Das Augenmerk dieser Arbeit lag somit eher auf längerfristigen Effekten von PCB153 auf den MAPK-Signalweg, wohingegen von Radice und anderen Arbeitsgruppen eher „Kurzeffekte“ (min-h) untersucht wurden.

Der direkte Einfluss von Xenoestrogenen auf den MAPK-Signalweg ist zurzeit aktueller Bestandteil intensiver Untersuchungen. So wurde z.B. bei der epithelialen Rattenhepatocyt-Zelllinie WB-F344 eine Aktivierung von ERK1/2 und p38 durch PCB153 nachgewiesen (Simecková et al., 2009; Umannová et al., 2008), welches im Einklang mit den in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnissen zum PCB153-Einfluss bei der uterinen Zelllinie hTERT-EEC steht. Ähnliche Aktivierungen des ERK1/2-MAPK-Signalweges sind auch für Ischikawa-Zellen durch p,p'-DDT (Frigo et al., 2004) sowie für die Rattenprolaktinoma-Zelllinie GH3/B6/F10 durch o,p'-DDE und Coum (Bulayeva and Watson, 2004) beschrieben worden. Anhand der in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse aus dieser Arbeit kann vermutet werden, dass die getesteten Xenoestrogene nicht ausschließlich über den klassischen ER-vermittelten, sondern auch teilweise über den unspezifischen MAPK-vermittelten Signalweg von ER wirken können.

4.4 Xenoestrogen- und E2-induzierte Veränderungen der Genexpression bei humanen endometrialen Zellen

Humanes Endometrium stellt ein dynamisches System dar, welches in Vorbereitung auf eine Embryoimplantation fortwährend zyklischen Veränderungen unterliegt.

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war es, die in Abhängigkeit von Xenoestrogenen eventuell schon in frühen Stadien auftretenden Veränderungen gesunder endometrialer Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden an immortalisierten endometrialen Epithelzellen (hTERT-EEC) und endometriotischen Primärzellen von endoskopierte Endometriose-Patientinnen mit der Diagnose idiopathische Sterilität durchgeführt. Dabei wurde bei quantitativen RT-PCR-Analysen besonderes Augenmerk auf Hormon- und Xenobiotika-vermittelte Signalwege sowie auf relevante Faktoren für Proliferation und Gewebeumbau („tissue remodeling“) gerichtet.

Endometriose wurde erst in jüngerer Zeit mit Umweltschadstoffen in Zusammenhang gebracht (Birnbaum and Cummings, 2001; Rier and Foster, 2002; Rier et al., 1993). Hierbei kommt es aufgrund von disloziertem Endometriums zu multiplen Dysfunktionen und im weiteren Verlauf der Erkrankung zu einer Akkumulation von E2, COX-2 und Prostaglandin E2 (PGE2) innerhalb des Endometriosegewebes. Dies führt, verbunden mit einer chronischen Entzündungssituation des umliegenden Gewebes und weiteren Faktoren, zu einer verminderten Nidations- und Implantationsrate *in uteri* bis hin zur Sterilität (Wieser *et al.*, 2004; Wülfing&Kiesel, 2005). Die Gründe für die im fortgeschrittenem Krankheitsverlauf bei Endometriose auftretenden multiplen zellulären Störungen, wie dem Verlust der Hormonsensitivität

(E2 und Prog) sowie der akuten Inflammation verbunden mit dem starken Selbsterhalt dieser Erkrankung, sollten bereits in frühen Stadien des Krankheitsgeschehens anhand zellulärer Veränderungen zu finden sein. Die Befunde aus den qRT-PCR-Experimenten wurden zum Vergleich in Tabelle 4.3 zusammengefasst.

4.4.1 Einfluss von PCB153 und E2 auf hTERT-EEC Zellen (Situation des „gesunden Uterus“)

Es war auffällig, dass die durch PCB153 und E2 erzeugten Veränderungen der Genexpression bei hTERT-EEC Zellen sehr ähnlich waren. Dass heißt, beide Substanzen führten in den meisten Fällen der untersuchten Gene, entweder zur Induktion, Repression bzw. zu keiner Veränderung (siehe Übersichtstabelle 4.3, hellgrün markiert). Die Ähnlichkeit des durch PCB153 hervorgerufenen Expressionsprofils mit dem von E2 lässt auf eine estrogene Wirkung des Xenoestrogens schließen.

In diesem Zusammenhang bestätigten die analysierten mRNA-Expressionsveränderungen der Gene ER α sowie der E2-vermittelten Zielgene GPR30 und SOCS3 zunächst einen möglichen Einfluss der untersuchten Stoffe auf den ER-Signalweg von hTERT-EEC Zellen. Die Repression von ER α durch E2 deckt sich mit Beobachtungen von Hofmeister & Bonefeld-Jorgensen, welche ebenfalls die Reduktion der mRNA-Expression von ER α nach 48h Inkubation mit E2 bei der Brustkrebszelllinie MCF7-BUS belegten. PCB153 war in ähnlichem Maße in der Lage die mRNA-Expression von ER α zu reprimieren (Abb. 3.5. 1.2 A). Eine ähnliche Reaktion bei diesen Zellen konnte nach Inkubation mit den Pestiziden Prochloraz und Methiocarb gezeigt werden (Hofmeister and Bonefeld-Jorgensen, 2004). Eine ähnliche Reduktion basaler ER α mRNA-Level durch E2 wurde auch von Jensen et al. beschrieben (Jensen et al., 1999). Diese Arbeitsgruppe zeigte auch, dass ICI 182780 einen nur geringen Einfluss auf die mRNA-Expression von ER α hat, was sich mit den Ergebnissen dieser Arbeit deckt (Abb 3.5.1.2 A). Ebenso wurde eine antagonistische Wirkung von ICI 182780 auf die mRNA-Expression des Progesteronrezeptors A (PROG-1), eines der drei untersuchten ER-aktivierten Zielgene, welches positiv durch ER α reguliert wird, bereits in der Literatur erwähnt (Nawaz et al., 1999) und was sich ebenfalls mit den Ergebnissen aus dieser Arbeit deckt (Abb. 3.5.1.2 C). Das Estrogen E2 induziert die Expression von Zielgenen wie PROG-1 über den klassischen ER-aktivierten Signalweg, durch Bindung des Rezeptors an das „estrogen response element“ (Graham et al., 1990). In der vorliegenden Arbeit war ein durch E2 induzierter positiver Trend der PROG-1 Expression erkennbar, welcher statistisch jedoch nicht signifikant war. Auch PCB153 zeigte ein vergleichbare induziertes PROG-1-Profil, was auf eine ähnliche Wirkungsweise von PCB153 und E2 schließen lässt.

Homodimerisiertes ER kann aber auch durch Bindung an andere Transkriptionsfaktoren wie c-Fos und c-Jun an weitere „response elemente“ wie AP1 oder SP1 in der DNA binden. Ein solches, durch SP1 via Liganden-gebundenen ER, aktiviertes Zielgen ist VEGF (Stoner et al., 2003). EGF wird von verschiedenen Tumorarten exprimiert, wobei bei vielen Untersuchungen gezeigt werden konnte, dass es negative Korrelationen zwischen der VEGF-Expression und Faktoren wie dem Tumorgrad oder der Überlebensrate gibt (Boocock et al., 1995; Linderholm et al., 2001; Viglietto, 1995). In vorliegender Arbeit wies die VEGF-Expression PCB153- und E2-Einfluss eine schwache Reprimierung auf (Abb. 3.5.1.2.E). Dieses Ergebnis war überraschend, da bei einem Zielgen von ER α /SP1 zumindest eine Induktion desselben durch E2 zu erwarten wäre. Ähnliches wurde für ein weiteres E2-reguliertes Gen, den „suppressor of cytokine signalling“ (SOCS3), welches ein inkomplettes ERE in seiner Promotorregion trägt und über den klassischen ER-Mechanismus reguliert wird, beobachtet (Abb. 3.5.1.2 F). Das sowohl SOCS als auch VEGF nicht auf E2 ansprachen bzw. sogar einen antagonistischen Effekt auf diese Gene ausübten war überraschend und ist soweit unerklärlich.

Neben den beiden klassischen Formen des ER (ER α β) scheint auch ein neu identifizierter membranärer ER, „G-protein coupled receptor 30“ in Estrogen-vermitteltes Signaling involviert zu sein (Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005). Dieser ER-Rezeptortyp soll für schnell stattfindende, nicht-genomische Estrogen-vermittelte Reaktionen verantwortliche sein (Moriarty et al., 2006) und wurde bereits für reproduktive Gewebe wie Brust (Castoria et al., 2001; Migliaccio, 1996; Song et al., 2002), Uterus (Aronica et al., 1994) und Ovar (Morley et al., 1992; Tesarik and Mendoza, 1997) beschrieben. Wie auch die klassischen ERs so zeigt auch der GPR30 Bindungsaffinitäten zu verschiedenen Xenoestrogenen (Thomas and Dong, 2006; Thomas et al., 2005).

Die Repression der mRNA-Expression von GPR30 durch E2 war der von ER α sehr ähnlich (Abb. 3.5.1.2 A und B). Da die Funktionen des klassischen ERs denen des membranständigen GPR30 sehr ähnlich sind, wurde eine ähnliche Reaktion von E2 auf diesen Rezeptor wie bei ER α beobachtet, erwartet. Die Fähigkeit von E2 die mRNA-Expression von GPR30 in ähnlicher Weise zu reprimieren wie ER α , bestätigt die Existenz eines funktionalen membranständigen ER in diesem Zelltyp. Nachdem die 24h-stündige Inkubation von PCB153 die „down-regulation“ der mRNA-Expression von ER α zur Folge hatte, wurde eine solche Reaktion auch für GPR30 erwartet und bestätigt.

Wie der Estrogenrezeptor (ER) gehört auch der Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) zur Familie der nukleären Kernrezeptoren. Beide Rezeptoren ähneln sich in ihrem strukturellen Aufbau und ihrer Funktionsweise und stellen Liganden-aktivierte Transkriptionsfaktoren dar. Die

Bindung des exogenen Liganden TCDD führt zur Komplexbildung von AhR mit seinem „AhR nuclear translocator“-Protein (ARNT) und zur Bindung an das „xenobiotische response element“ (XRE oder auch DER) in der Promotorregion von Zielgenen wie z.B. CYP1A1 oder CYP1A2. Durch AhR/ARNT kommt es zur transkriptionellen Aktivierung einer Vielzahl von Enzymen für den E2-Metabolismus, wodurch es z.B. durch CYP1A1 oder CYP1B1 zur Hydrolyse von Estradiol kommt (Spink et al., 1992).

Die Rolle von AhR-vermittelten Reaktionen innerhalb humaner endometrialer Zellen wurde bisher kaum untersucht. So ist in der Literatur von einem basalen Expressionsverhältnis zwischen AhR/ARNT von ca. 4:1 die Rede (Abbott et al., 1999), welches in etwa dem in dieser Arbeit bei hTERT-EEC Zellen gefundenem entspricht (Abb. 3.5.1.1 A). Bei den Zellen aus Endometriose-Explantaten zeigte sich dieses Verhältnis mehr zugunsten von AhR verschoben, wobei jedoch eine hohe Standardabweichung zwischen den zwei unabhängig voneinander durchgeführten qRT-PCR-Experimenten mit AhR zu verzeichnen war (Abb. 3.5.2.1).

Die 24h-stündige -Inkubation von hTERT-EEC Zellen mit PCB153- und E2 zeigte bei für AhR, ARNT und CYP1A1 eine deutliche Repression (Abb. 3.5.1.3 A, B und E) Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit Ergebnissen, bei welchen ein Antagonismus von di-ortho-substituierten PCBs (Suh et al., 2003) bzw. E2 (Jeong and Lee, 1998; Ricci et al., 1999) auf den klassischen AhR-Agonist-aktivieren Signalweg festgestellt wurde. Hierbei wurde jedoch nur die antagonistische Aktivität dieser beiden Substanzen, d.h. das Vermögen von PCB153 bzw. E2, die durch AhR-Liganden wie TCDD oder PCB126 induzierte CYP1A1-Expression zu hemmen gemessen, auf einen möglichen „cross-talk“ zwischen dem AhR- und ER-Signaling wurde nicht eingegangen.

Die antagonistische Wirkung von E2 auf AhR/ARNT-vermittelte Zielgene wie CYP1A1 konnten auch bereits in weiterführenden Experimenten bei hTERT-EEC Zellen bestätigt werden (Willing et al., 2010).

Interaktionen zwischen dem ER- und AhR-Signalweg wurden bereits vielseitig beschrieben (Abdelrahim et al., 2006; Beischlag and Perdew, 2005; Brunberg et al., 2003; Klinge et al., 2000; Matthews and Gustafsson, 2006; Wormke et al., 2000a; Wormke et al., 2000b). So ist bekannt, dass ER und AhR direkt miteinander interagieren (Beischlag and Perdew, 2008; Fujii-Kuriyama and Kawajiri, 2010; Matthews and Gustafsson, 2006). Die hierzu gesammelten Daten sind vielfältig und zeigen eher kontroversen Charakter, so werden von einer ER α -vermittelten Modulationen AhR-abhängiger Reaktionen gesprochen, in welchem ER α einen steigernden (Matthews et al., 2005; Sarkar, 2000; Thomsen et al., 1994), herabsetzenden (Beischlag and Perdew, 2005; Jeong and Lee, 1998; Kharat and Saatcioglu, 1996) oder gar keinen

Einfluss (Hoivik et al., 1997) auf den AhR-Signalweg zeigt. Meist wird bei Untersuchungen zum Einfluss von PCBs auf AhR-vermittelte Zielgene wie CYP1A1 auf einen Zusammenhang zwischen der Struktur und der Stärke des durch PCBs ausgelösten Effekts dieses Signalweges verwiesen. Hiernach sollen coplanare und somit Dioxin-ähnliche PCB im Vergleich zu nicht-coplanaren PCBs starke Bindungsaffinitäten zum AhR aufweisen und zu einer hohen Transkription von CYP1A1 führen (Parkinson et al., 1983; Safe, 1992; Spink et al., 2002). Das in dieser Arbeit untersuchte Xenoestrogen PCB153 stellt einen klassischen Vertreter diortho substituierter, nicht-coplanarer PCBs dar. Die aufgezeigten reprimierenden und somit umgekehrt proportionalen Effekte dieser Substanz auf AhR- bzw. XRE-regulierte Gene fügen sich somit gut in das aufgezeigte Bild des Struktur-Effekt-Zusammenhangs von PCBs hinein. Andererseits ist bekannt, dass PCB153 als PCB vom Phenobarbital-Typ auch die Expression anderer Cytochrom P450-Enzyme (CYP2B1 und CYP2B2) induziert (Vezina et al., 2004).

Die Endometriose ist zumindest anfangs eine E2-anhängige Erkrankung und wie aus der Literatur bekannt z.B. durch Xenobiotika wie TCDD im Tiermodell induzierbar (Birnbach and Cummings, 2001; Rier and Foster, 2002; Rier et al., 1993; Rier, 1995).

In dieser Arbeit wurde CYP1A1 als Vertreter eines AhR/ARNT-aktiviertes Zielgens auf eine mögliche PCB153-vermittelten Wirkung hin sowie AhR und ARNT untersucht.

Die Exposition von hTERT-EEC Zellen hatte eine PCB153- und E2-verursachte Repression von AhR, ARNT und CYP1A1 in ähnlicher Weise zur Folge (Abb. 3.5.1.3 A, B und C). Hierbei erwies sich E2 als ein stärkerer Repressor auf die mRNA-Level von AhR, ARNT und CYP1A1 als die Xenoestrogen. Andere Untersuchungen weisen ebenfalls darauf hin, dass die mRNA-Level der drei genannten Gene bei humanen endometrialen Zellen (Pitt et al., 2001) und auch bei humanen Blutproben (Hayashi et al., 1994) miteinander korreliert zu sein scheinen.

Da PCB153 und E2 nicht in Liganden-ähnlicher Weise am AhR binden (Vezina et al., 2004), weisen die Ergebnisse einer PCB153 und E2-vermittelten Repression von CYP1A1 eher auf eine ER-vermittelte Transrepression AhR-abhängiger Genregulation, also einem „cross-talk“ von ER mit dem AhR-Signalweg. Dies steht im Einklang mit den von Beischlag and Perdew (2005) gemachten Beobachtungen. Diese Arbeitsgruppe konnte die Repression der TCDD-induzierten Expression von CYP1A1 durch E2 nachweisen, wobei sie eine Bindung von ER α am CYP1A1-Enhancer Elementen in CHIP-Analysen bei MCF7-Zellen nachweisen konnten. Darüberhinaus war eine Interaktion von ER α -Proteinen mit sowohl AhR als auch ARNT mittels Glutathion-S-Transferase/Pull-down sichtbar (Beischlag and Perdew, 2005), wonach sie auf eine ER α -vermittelte Transrepression der AhR-aktivierten Genregulation schlossen.

In der Literatur wurden bereits einige Umweltschadstoffe mit estrogenen Wirkung beschrieben (Abdelrahim et al., 2006; Mortensen and Arukwe, 2008; Nesaretnam and Darbre, 1997; Soto et al., 1994). So führte z.B. 2,3,7,8 Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), obwohl exogener Ligand des AhR-Signalwegs, bei ovariectomierten C57BL/6-Mäusen ebenfalls zu ähnlichen Änderungen des Genexpressionsprofils wie E2. Darüberhinaus wurde in dieser Studie auch eine spezifische Hemmung der TCDD- bzw. E2-induzierten Reaktionen durch den spezifischen ER-Inhibitor ICI 182780 nachgewiesen (Boverhof et al., 2006). Das Vermögen von ICI 182780 die in den qRT-PCR-Experimenten durch PCB153- und E2-hervorgerufenen Effekte zu hemmen, wurde jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. Der Inhibitor wurde als reine Negativkontrolle, zusätzlich zur Positivkontrolle E2, in den qRT-PCR-Experimenten mitgeführt. Der Nachweis, dass ICI 182780 in der Lage war, die mRNA-Expression von ARNT zu reduzieren – könnte ein weiterer Hinweis auf die bereits vermutete Interaktion zwischen dem ER- und AhR-Signalweg sein (3.5.1.3 B).

Der AhR-vermittelte Signalweg spielt aber nicht nur beim Fremdstoff- und endogenen Steroid-Metabolismus eine wichtige Rolle. So haben Untersuchungen gezeigt, dass er auch bei der Regulation des Zellzyklus und als Tumor-Suppressor wichtig ist (Mulero-Navarro et al., 2006; Puga et al., 2000; Weiß et al., 1996). In Zusammenhang mit der Tumorgenese sollte daher erwähnt werden, dass AhR auch im fibrinolytischen System (Son and Rozman, 2002) bzw. bei der Modulation der Zellplastizität (Diry et al., 2006) eine Rolle zu spielen scheint. Aus Untersuchungen mit TCDD, dem „exogenen“ Liganden von AhR und Ovulationsblocker (Son et al., 1999), weiß man, dass der Liganden-gebundene AhR auch die Genexpression von „plasminogen activator inhibitor 1“ (PAI-1) (Son and Rozman, 2002), PAI-2 (Gaido and Maness, 1994; Sutter et al., 1991); (Dohr et al., 1995) und „urokinase-typ plasminogen activator“ (uPA) (Charles and Shiverick, 1997; Gaido and Maness, 1995) verändern kann. Aber auch andere, oft an pathophysiologischen Prozessen beteiligten Faktoren wie „transforming growth factor- α “ (TGF α) (Choi et al., 1991; Davis et al., 2001; Gaido and Maness, 1994; Gaido et al., 1992; Vogel and Abel, 1995; Wang et al., 1997), TGF β (Gaido and Maness, 1994; Gaido et al., 1992; Lai et al., 1997; Vogel and Abel, 1995; Yang et al., 1999) und Interleukin-1 β (Charles and Shiverick, 1997; Gaido and Maness, 1994; Lai et al., 1997; Sutter et al., 1991; Vogel and Abel, 1995) werden von diesem Signalweg beeinflusst. So weiß man von PAI-2, dass dieses Gen in seinem Promotorbereich ein XRE trägt (Sutter et al., 1991). Bisher konnte ein solches Element im PAI-1-Promotor noch nicht nachgewiesen werden, man geht aber davon aus, dass der AhR-Signalweg, ähnlich wie der ER-Signalweg auch ohne ERE, die Genexpression ebenso in XRE-unabhängiger Weise beeinflussen kann (Son and Rozman, 2002;

Vogel et al., 2000). Die uPA-Bindung an seinen Rezeptor uPAR in der Zellmembran führt extrazellulär zur Proteolyse von Plasminogen zu Plasmin. Dieser Prozess führt zur Degradation extrazellulärer Matrix und erhöht somit die Zellmotilität bzw. Metastasierung. Dieser Prozess wird inhibiert durch PAI-1/2. PAI-1 spielt eine wichtige Rolle bei Angiogenese, Wundheilung, Inflammation, Ovulation, Trophoblastenimplantation und Gametogenese sowie der Tumormetastasierung und ist eines der wichtigsten Faktoren im fibrinolytischen System (Andreasen et al., 1997; Dittmer et al., 2006; Harbeck, 2004; Irigoyen et al., 1999; Leonardsson et al., 1995; Sappino et al., 1989).

Um einen möglichen Einfluss von PCB153 auf das fibrinolytische System untersuchen zu können, wurden im Zusammenhang mit dem AhR-Signalweg deshalb auch die Gene PAI-1 und uPA untersucht. So konnte bei qRT-PCR-Analysen eine Repression von uPA und PAI-1 durch die 24-stündige Inkubation mit sowohl PCB153 als auch E2 gezeigt werden (Abb. 3.5.1.3 C und D), was den eben angesprochen Zusammenhang der Testsubstanzen zum AhR-Signalweg bestätigt.

In vitro Studien haben gezeigt, dass die PAI-1 Expression von verschiedenen Hormonen, Cytokinen, Wachstumsfaktoren, wie Glukokortikoiden, TNF- α , Interleukin 1, TGF β und „epidermal growth factor“ (EGF) reguliert wird (Andreasen et al., 1990; Krishnamurti and Alving, 1992). Obwohl PAI-1 die Aktivität von uPA hemmt und daraus eine degradationshemmende und somit protektive Funktion zu resultieren scheint, gibt es bislang keine Berichte über hohe PAI-1-Spiegel, die mit einer guten Prognose bei Patienten einhergehen (Dublin et al., 2000; Duffy et al., 1999; Harbeck, 2004; Schmitt, 1997). Auch bei der Pathogenese von endometriellen Zellen in Richtung Endometriose oder der Entstehung von Endometriumkarzinom wird von einer erhöhten Expression von PAI-1 berichtet (Bruse et al., 2004; Köhler et al., 1997). Somit bekräftigt die „down“-Regulation von vor allem PAI-1 durch PCB153 nicht die Hypothese, dass PCB153 die Entstehung der genannten patho-physiologischen Prozesse fördert, sondern es scheint ihr eventuell zu widersprechen.

Plasmin ist in der Lage, extrazelluläre Komponenten selbst zu degradieren (Vassalli et al., 1991), aber auch andere Enzyme wie Matrixmetalloproteasen (MMPs) zu aktivieren (Eckhout and Vaes, 1977). Die Invasion von Tumorzellen in die umgebende extrazelluläre Matrix (ECM) wird von einer Vielzahl von an Zelloberflächen-assoziierten proteolytischen Enzymen, wie z.B. MMPs reguliert. MMPs sind aber nicht nur an pathologischen Prozessen beteiligt, sondern überall dort aktiv, wo die Degradation extrazellulärer Matrix notwendig wird (Gilbert-Estelles et al., 2003), wie z.B. während der embryonalen Entwicklung, beim Gewebeumbau und der Reproduktion. Im Endometrium sind MMPs hauptsächlich an Remodellie-

rungsprozessen der Matrix während der perimenstruellen Phasen beteiligt (Kokorine et al., 1996; Salamonsen et al., 2002). Durch MMPs kommt es zur Neutralisierung ECM-degradierender Enzyme (Woessner, 1991). Dabei kommt MMP-3 eine zentrale Rolle zu, weil es eine Reihe von anderen MMPs aktiviert (Salamonsen and Woolley, 1996).

Die Inkubation der hTERT-EEC Zellen mit PCB153 hatte auch auf die Expression von MMP-3 eine reprimierende Wirkung, was auch für E2 wurde beobachtet wurde (Abb. 3.5.1.4 D).

Inhibitionsuntersuchungen mit verschiedenen Klassen von Proteasen konnten MMPs eine bedeutende Rolle bei der Auflösung endometrialer Explantate zuschreiben (Marbaix et al., 1996). Dabei konnte eine signifikant höhere MMP-Aktivität vor und während der Menstruation beobachtet werden (Zhang and Salamonsen, 2002). Somit ist der in dieser Arbeit bei MMP-3 erbrachte Befund, dass sowohl PCB153 als auch E2 dessen Expression erniedrigen, eventuell ein Hinweis darauf, dass es in Anwesenheit von PCB53 zum verminderten Abbau menstrueller Explantate kommen könnte und somit der Verbleib solcher Zellen eine retrograde Menstruation (wie im Fall der Entstehung von Endometriose postuliert), begünstigen könnte. In diesem Zusammenhang soll auch hier noch einmal auf die Einschränkungen des für diese Untersuchungen eingesetzten Zellmodells hingewiesen werden. So sind Expression-Analysen anhand einer rein epithelialen Zelllinie (hTERT-EEC) durchgeführt worden. Bei funktionalem Endometrium ist jedoch, neben der epithelialen Komponente, auch die Stromale von großer Bedeutung, welche durch viele parakrine Vorgänge die Funktion epithelialer Zellen beeinflussen kann.

Die Cyclooxygenase 2 (COX-2) ist bei vielen Prozessen weiblicher Reproduktion wie Ovulation, Fertilisierung und Decidualisierung beteiligt (Lim et al., 1997). Man weiß, dass COX-2 ein AP1-Motiv in seiner Promotorregion trägt und dass es somit von ER α alternativ transkriptionell kontrolliert werden könnte (Kim et al., 2009). Von COX-2 ist aber auch bekannt, dass es in seiner Promotorregion ein „xenobiotisches response element“ (auch DRE genannt) beherbergt und dass Xenobiotika wie z.B. TCDD die Expression von COX-2 oder die Prostaglandinsynthese induzieren können (Kraemer et al., 1996; Puga et al., 1997; Wölfle et al., 2000). AhR/ARNT-Heterodimere können über XRE an die DNA binden und AhR-vermittelte Gene wie COX-2 oder CYP1A1 kontrollieren.

Die Repression der Genexpression des AhR Nuclear Translocator- (ARNT) und der Cyclooxygenase 2 (COX-2) durch Einsatz des spezifischen ER-Inhibitor ICI 182780, war somit unerwartet und lässt einen existierenden „cross-talk“ zwischen ER- und AHR-Signalweg vermuten. So ist bekannt, dass ER- und AHR-Signalweg miteinander interagieren (Beischlag and Perdew, 2005; Matthews and Gustafsson, 2006; Ohtake et al., ; Ohtake et al., 2003a;

Sainsbury et al., 1985) und deren Zielgene verschiedene Bindungsmotive in ihren Promotorregionen beinhalten können, was zu multiplen Interaktionen bzw. der transkriptionellen Aktivierung vieler Signalwege führen kann. Ein Beispiel hierfür ist die 5'-UTR (untranslatierte Region) des COX-2 Gens mit einer Vielzahl an Bindungsstellen für verschiedene regulatorische Transkriptionsfaktoren, wie z.B. TATA-Box, C/EBP-Motif, NF- κ B (nuclear factor κ B), AP-2 (activator protein 1), SP-1, CREs (cAMP-response elements) und Ets-1 (Appleby et al., 1994). Ein weiteres Beispiel hierzu ist auch VEGF, ein Schlüsselfaktor der Angiogenese. VEGF ist ein E2-reguliertes Gen, weist aber auch ein „hypoxia response element“ (HRE) in seiner Promotorregion auf. Bei TCDD-Wirkung, aber auch bei Sauerstoffmangel kommt es zur Heterodimerisierung von stabilisiertem HIF-1a und ARNT/HIF-1b an HREs und damit zur Aktivierung der VEGF-Expression. ARNT ist somit an mindestens drei verschiedenen Signalwegen beteiligt: 1) an dem klassischen AhR-Signalweg via AhR/ARNT bzw. XRE-vermittelten; 2) HIF-1a/ARNT-HIF-1b bzw. HRE-, und 3) AhR/ARNT-ER α -vermittelter Funktionsweise (Othake et al., 2003). Einen möglichen Hinweis auf die zuletzt genannte Funktionsweise wurde mit der aufgezeigten Suppression der mRNA-Expression von ARNT durch E2, PCB153 und ICI 182780 (Abb. 3.4.1 J) erbracht.

Es besteht eine Korrelation zwischen einer erhöhten Expression von “epidermal growth factor receptor” (EGFR) und einer Reihe verschiedener Tumorarten wie z.B. für Hals- und Kopf, Gehirn, Brust, Blase, Magen, Lunge, Ovar und Prostata bestätigt (Bartlett, 1996; Salomon et al., 1995). In normalen Zellen ist EGFR in relativ geringen Mengen exprimiert. Durch Ligan- denbindung kommt es zur Aktivierung des Rezeptors, was in einer Dimerisierung bzw. Oligomerisierung führt. Aktive EGFR führen zur Aktivierung von Signalkaskaden, der Aktivierung zweier zellulärer Hauptsignalwege, den bereits im vorigen Kapitel angesprochenen RAS/MAPK- sowie den Phosphatidyl- Inositol 3-OH-Kinase (PI3K/AKT2)-Signalweg (Jorissen et al., 2003), welche beide wesentlich an zellulären Prozessen wie Zellproliferation, Differenzierung und Migration beteiligt sind. In EGFR-assozierten Tumoren liegt meist eine höhere Expression des Rezeptors vor und obwohl viele Mitglieder der EGFR-Familie und Liganden bisher identifiziert wurden, ist der genaue „downstream“-Mechanismus aktivierter Rezeptoren noch immer nicht im Detail geklärt. So konnte man im Rahmen endokriner Therapien bei Brustkrebspatienten feststellen, dass ein Block der ER mit einer Zunahme an EGFR und Her2/neu einherging und der umgekehrte Fall, nämlich die Inhibition von EGFR-Rezeptoren, zur gesteigerten Expression von ER und PR führte (Massarweh and Schiff, 2006; Osborne et al., 2005; Sainsbury et al., 1985). Der in diesem Zusammen in der Literatur viel

beschriebene „cross-talk“ zwischen dem EGFR- und ER-Signalweg ist ebenfalls sehr komplex und bisher nicht vollständig aufgeklärt.

In diesem Zusammenhang wurde das Vermögen von PCB153 getestet, die mRNA-Expression von EGFR zu beeinflussen. Das Xenoestrogen PCB153 war in ähnlicher Weise wie das Estrogen E2 in der Lage, die Expression dieses Rezeptors zu reprimieren. Die EGFR-Repression durch E2 weist auf einen bei hTERT-EEC-Zellen existierenden und funktionalen „cross-talk“ zwischen ER und EGFR, wobei wie bereits im Abschnitt zuvor angedeutet, ein umgekehrt proportionales Verhältnis zwischen ER und EGFR zu bestehen scheint, was die gemessenen basalen Expressionslevel dieses Zelltyps für ER und EGFR bestätigt. Durch E2 kommt es somit erwartungsgemäß zur weiteren Reprimierung, da diese Zellen Hormon-sensitiv sind und ein mutagenes Ereignis, welches zum konstitutiv-aktiven EGFR/MAPK-Signalweg und somit zum Verlust eines E2-vermittelten ER-Signalweges führen würden, in diesen Zellen noch nicht eingetreten ist. Die durch E2 und PCB153-ausgelöste Repression der EGFR-Expression weist auch hier wieder auf ein ähnliches Wirkungsprofil beider Substanzen hin.

Unklar bleibt jedoch warum PCB153 und E2 in hTERT-EEC Zellen zu so vielen inhibierenden Veränderungen führen. So weist die Repression von CY1A1, AhR und ARNT deutlich auf eine posttranslationale abnehmende Aktivität verschiedenster Enzyme der Cytochrom P450-Superfamilie hin, wodurch es nachfolgend zu einem verminderten Metabolismus und Synthese von Cholesterol, Steroiden und Xenoestrogenen und letztlich zur gestörten Detoxifizierung kommen dürfte. Dies gilt auch für ER- bzw. ERE-vermittelte Gene, hier führten PCB153 und E2 ebenfalls zu absinkenden mRNA-Level von vor allem ER α , GPR30 und SOCS3 welche im weiteren Verlauf zu Störungen des hormonellen Gleichgewichts und paradoxer Weise aber auch zu einer eingeschränkten Proliferation führen dürften.

Desweiteren ist unklar, warum es auch in AhR- bzw. XRE-vermittelten Zielgenen ausschließlich zu antagonistischen Effekten von PCB153 und E2 kam. Einige der auch in dieser Arbeit mittels qRT-PCR analysierten Faktoren wurden bereits im Zusammenhang mit PCBs von Kietz und Fischer bei präimplantierten Kaninchenembryonen untersucht (Kietz and Fischer, 2003). In dieser Studie wurden verschiedene AhR-Zielgene [cytochrome P450 (CYP) 1A1, 1A2, UDP-glucuronosyl transferase 1, glutathione S-transferase pi1 and aldehyde dehydrogenase] sowie Dioxin-vermittelte Gene [IL 1 β , PAI 2, Cox 2, TGFalpha, EGF, erbB 1-4, c-fos, c-jun, HSP 90, cyclophilin 40] im Hinblick auf eines möglichen Einflusses von coplanaren bzw. nicht-coplanaren PCBs auf deren Genexpression hin untersucht. Dabei konnte diese Arbeitsgruppe durch sowohl komplanare als auch nicht-koplanare PCBs bei CYP1B1 und COX-2 einen Anstieg der mRNA-Expression verzeichnen. Die Expression von IL-1 β und

PAI-2 hingegen war bei präimplantierten Kaninchenembryonen herunterreguliert (Kietz und Fischer, 2003).

Letzteres könnte die in dieser Arbeit aufgezeigten Ergebnisse zu PAI-1 bestätigen, da beide Serinprotease-Inhibitoren prinzipiell die gleiche Funktionsweise aufweisen, mit dem Unterschied, dass PAI-2 ein meist von der Plazenta segregiertes Serpin darstellt und während der Schwangerschaft in signifikanten Mengen vorliegt. Auch weitere Ergebnisse aus der eben genannten Arbeitsgruppe weisen auf PCB-vermittelte Expressionsveränderungen von Genen (CYP1A1, CYP1B1, VEGFR2, und COX-2) in Kaninchenblastozysten hin, wobei es sich hier um eine Erhöhung der mRNA-Level handelte, was im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen zu CYP1A1 und COX-2 steht (Clausen et al.).

Eine mögliche Erklärung für die beiden aufgeführten Diskrepanzen der durch PCB153 und E2 ausgelösten Veränderungen in den mRNA-Expressionen der untersuchten Gene ist die unterschiedliche Expositionszeit der eingesetzten Substanzen, welche bei von Kietz und Fischer bzw. Clausen et al. mit 5-6 Tage erheblich länger war. Das in dieser Arbeit mittels qRT-PCR untersuchte Zeitfenster der Testsubstanzexposition betrug jedoch nur 24h. Ein direkter Vergleich der Ergebnisse aus dieser Arbeit mit denen aus der beschriebenen Arbeitsgruppe ist aufgrund dieses eventuell zeitabhängigen Effekts von PCB153 somit nicht möglich. Neben den hier aufgezeigten „kurzfristigen“ Auswirkungen von PCB153 (100ng/ml) nach 24h Inkubation von hTERT-EEC könnten vergleichende qRT-PCR-Analysen behandelter hTERT-EEC Zellen nach 4-6 Tagen Aussagen über eventuell auftretende Langzeiteffekte dieser Substanz zulassen und sollten Bestandteil weiterer intensiver Untersuchungen sein.

Nach intensiver Literaturrecherche sind dies die ersten Hinweise auf eine PCB153-vermittelte Repression der Genexpression von ER α , GPR30, SOCS3, AhR, ARNT, PAI-1, CYP1A1, EGFR und MMP3 in einer uterinen Zelllinie. Es scheint, dass PCB153 durch multiple Genexpressionsveränderungen nicht nur zur Verschiebung des endokrinen Gleichgewichtes im gesunden Endometriumgewebe führt, sondern auch für Veränderungen wichtiger physiologischer Prozesse wie Detoxifizierung, Angiogenese, Gewebeumbau („tissue remodeling“), Migration/Invasivität bzw. Proliferation verantwortlich ist. Es könnte sein, dass PCB153 als eine Art akute bzw. kurzfristige Reaktion zunächst zu einem Arrest bzw. zur Sensibilisierung der Zelle führt und dann im späteren Verlauf nach längerfristiger Exposition der Zellen mit PCB153 erst zum spezifischen Ausschalten und Aktivieren wichtiger physiologischer Prozesse wie hormonelle Kontrolle und Proliferation führt.

Überraschend war jedoch, dass auch E2, welche als Kontrolle eingesetzt wurde, ein stark-reprimierendes Expressionsprofil bei diesem Zelltyp bewirkte. Das lässt im Hinblick auf die

Entstehung gynäkologischer Erkrankungen wie Endometriose oder Endometriumkarzinom die Tragweite des E2-Einflusses nur erahnen. Man sollte jedoch nicht vergessen, dass das hier als *in vitro*-Modell untersuchte hTERT-EEC-Zellsystem kein mehrschichtiges und zyklisch Hormon-abhängiges funktionales Endometrium darstellt und demnach die Auswirkungen natürlich vorkommender hormoneller Regulationen und Interaktionen mit anderen Signalwegen im Zusammenhang mit PCB153 hier nicht unter *in vivo* Bedingungen untersucht werden konnten.

Zusammenfassend weisen die aufgezeigten Ergebnisse PCB153-vermittelter Reaktionen bei hTERT-EEC Zellen darauf hin, dass dieses Xenoestrogen der Wirkungsweise von E2 sehr ähnliche ist und das die von beiden Substanzen hervorgerufenen Effekte nicht nur über den ER-Signalweg, sondern auch über dessen „cross-talks“ mit dem AhR- GPR30- und EGFR-Signalweg vermittelt zu werden scheinen.

4.4.2 Vergleich PCB153- und E2-vermittelter Effekte bei hTERT-EEC-Zellen vs. Primärzellen aus Endometriose-Explantaten

Endometriosegewebe unterscheidet sich von gesundem Endometrium im Hinblick auf dessen Molekularbiologie erheblich. Das Entstehen und Wachstum von Endometrioseimplantaten wird anfänglich wesentlich durch Hormone beeinflusst. Nach Manifestierung dieser Erkrankung ist der weitere Verlauf jedoch meist Hormon-unabhängig.

Bei Gegenüberstellung der aus den qRT-PCR-Experimenten erhaltenen Ergebnisse, fiel auf, dass die durch E2 und PCB153 hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen in beiden untersuchten Zellsystemen sehr ähnlich waren. Beide Substanzen führten meist gemeinsam entweder zu einer Induktion, Repression oder keiner Veränderung des jeweiligen Faktors (siehe Übersichtstabelle 3.5.2.2). Dies lässt auf eine potente estrogene Wirkung von PCB153 schließen. Weiterhin scheint es, dass PCB153 durch Repression multipler Gene und Verschiebung des endokrinen Gleichgewichtes im gesunden Gewebe wichtige physiologische Prozesse wie Angiogenese, Gewebeumbau („tissue remodeling“), Migration und Invasivität bzw. Proliferation sukzessive außer Kraft setzt und dass diese Prozesse auch bei erkranktem Endometriosegewebe durch PCB153-Einwirkung weiter fortgeführt werden. Jedoch reagiert Endometriosegewebe aufgrund seiner ohnehin schon endokrin-disruptierten Eigenschaften weniger sensitiv auf PCB153 bzw. E2 im Vergleich zum hTERT-EEC-Zelltyp. Die Ergebnisse aus Kapitel (3.4) lassen ein reges Zusammenspiel verschiedener Signalwege bei der PCB-vermittelten Disruption des hormonellen Gleichgewichtes vermuten.

Einen Zusammenhang zwischen der Entstehung dieser Erkrankung und dem Dioxin 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin (TCDD) konnte bereits Rier et al. 1993 im *in vivo*-Tiermodell bei chronisch Dioxin-belasteten Rhesusaffen Dosis-abhängig zeigen. In neueren Untersuchungen gibt es starke Hinweise, dass vor allem Dioxine und Dioxin-ähnliche Verbindungen (PCBs) potente endokrine und immunologische Modulatoren für die Pathogenese der Endometriose darstellen (Mueller et al., 2005; Rier and Foster, 2002). Die in der Literatur beschriebenen Studien zur Entstehung von Endometriose im Zusammenhang mit Xenoestrogenen, speziell im Hinblick auf PCBs, sind begrenzt und wie bereits erwähnt sehr widersprüchlich. Dabei standen vor allem Dioxin-ähnliche PCBs (=koplanare PCBs) im Focus vieler Studien, wobei generell keine Assoziation zwischen Dioxin-ähnlichen PCBs und dieser Erkrankung gefunden werden konnten (De Felip et al., 2004; Niskar et al., 2009; Pauwels et al., 2001; Tsukino et al., 2005). In Studien in denen Nicht-Dioxin-ähnliche PCBs (=Nicht-coplanare PCBs) untersucht wurden, konnten einige Hinweise auf solch einen Zusammenhang gefunden werden (Gerhard, 1992; Heilier et al., 2008; Louis et al., 2005; Porpora et al., 2009; Reddy et al., 2006). Aber auch hier gibt es widersprechende Untersuchungen, bei denen ein solcher Zusammenhang nicht bestätigt wurde (Trabert et al., 2010).

In der Literatur wurden bereits einige Endometriose-relevante Gene im Hinblick auf einen möglichen Einfluss von Xenoestrogenen auf das Krankheitsgeschehen beschrieben. Hierbei zeigten z.B. das Herbizid 2-Chloro-S-Triazin sowie p,p'DDE einen induzierenden Einfluss auf die Aromatase-Aktivität (Sanderson et al., 2000; You et al., 2001). Ein gegenteiliger Effekt ist in der Literatur z.B. für Tributyl- und Triphenylzinn beschrieben. Beide Substanzen hatten bei diesen *in vitro*-Untersuchungen die Inhibition der Aromatase-Aktivität in Zellen der humanen ovariellen Granulosa-ähnlichen Tumorzelllinie KGN zur Folge (Saitoh et al., 2001). Da Xenoestrogen-vermittelte Veränderungen auf die Aromataseexpression bereits Bestandteil vieler Untersuchungen waren, wurde dieses Gen deswegen in der hier vorliegenden Arbeit nicht in die Analysen mit einbezogen.

Die in dieser Arbeit durch PCB153 und E2 bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten gemessenen Genexpressionsänderungen, waren wie schon im hTERT-EEC-Zelltyp, mit Ausnahme von ER β und uPA, einander sehr ähnlich, führten also auch hier meist entweder zur Induktion, Repression oder zu keiner Veränderung des jeweiligen untersuchten Faktors (siehe Übersichtstabelle 4.3, dunkelgrün markiert). Die Ähnlichkeit des durch PCB153 hervorgerufenen Expressionsprofils mit dem von E2, lässt wieder auf eine estrogene Wirkung dieses Xenoestrogens schließen. In diesem Zusammenhang bestätigten die analysierten mRNA-Expressionsveränderungen der Gene PROG-1, GPR30 und SOCS3, zunächst einen möglichen

Einfluss auf den ER-vermittelten Signalweg der untersuchten Stoffe bei Primärzellen aus Endometriose-Explantaten.

Im Gegensatz zum hTERT-EEC-Zellsystem zeigte sich die mRNA-Expression von PROG-1 durch PCB153 und E2 jedoch erniedrigt. Dies steht im Einklang mit der in der Literatur während des Krankheitsgeschehs beschriebenen Entstehung der Progesteronrezeptor-Resistenz bei Endometriose, bei der dessen A-Form im Zuge der Akkumulation von E2 u.a. zellulären Veränderungen des endometriotischen Milieus komplett herunterreguliert wird (für Review siehe Bulun et al., 2009). Dies spiegelt sich auch in den gemessenen niedrigen basalen Expressionslevel von PROG-1 wider. Durch den Einfluss von E2 und PCB153 wird der reprimierende Effekt noch weiter verstärkt.

Einen wesentlichen Unterschied zwischen der Wirkung von E2 und PCB153 gibt es bei der Expression von ER β (Abb 3.4.2 D). Hier scheint E2 einen antagonistischen Effekt und PCB153 einen eher schwach agonistischen Effekt auf die Transkription von ER β zu haben. Beim Vergleich aller in diesem Zelltyp durch PCB153 und E2 ausgelösten Effekte mit dem des hTERT-EEC Zellsystems fällt der allgemein eher schwache transkriptionelle Einfluss beider Substanzen auf die untersuchten Gene auf, wobei aber auch hier beide Stoffe einen eher suppressiven Charakter aufweisen (Abb. 3.4.2 C-Q). Einige der untersuchten Gene wurden durch PCB153 und E2 (VEGF, PAI-1 und EGFR) nicht beeinflusst bzw. lagen kaum signifikant verändert vor (ER α , ARNT, uPA, CYP1A1), was möglicherweise auch am Einsatz einer zu geringen Anzahl an Endometriose-Explantaten betroffener Patientinnen (n=3) für die qRT-PCR Analysen gelegen haben könnte.

Der Einfluss der untersuchten Testsubstanzen auf eine AhR- bzw. XRE-vermittelte Transkription ist bei diesem Zelltyp im Vergleich zum hTERT-EEC System eher schwach ausgeprägt. Deckungsgleich war die in beiden untersuchten Zellsystemen antagonistische Wirkung des spezifischen ER-Inhibitors ICI 182780 auf die mRNA-Expression von ARNT und COX-2. Die Wirkung des ICI 182780 auf ARNT und COX-2 wurde bereits im hTERT-EEC Zellsystem diskutiert.

Interessant war ein vergleichsweise kaum messbarer reprimierender Einfluss von PCB153 und E2 auf die mRNA-Expression von uPA und PAI-1, welcher im hTERT-EEC Zellsystem hoch signifikant war. Trotz hoher gemessener basaler PAI-1-Expressionslevel in unbehandelten Primärzellen aus Endometriose-Explantaten, führte weder die Inkubation mit PCB153 noch E2 zu signifikanten mRNA-Veränderungen von PAI-1.

Nach gründlicher Literaturrecherche sind dies wiederum die ersten Hinweise auf eine PCB153-vermittelte Repression der Genexpression von PROG-1, GPR30 und SOCS3 bei

Endometriosegewebe. Aufgrund dessen, dass zum einen die durch PCB153 in ihrer Genexpression veränderten Faktoren (PROG-1, GPR30 und SOCS3) in die Gruppe der ER- bzw. ERE-vermittelten Zielgene einzuordnen sind und zum anderen PCB153 nur zu schwachen Veränderungen AhR- bzw. XRE-vermittelter Gene führte, könnte man diesem Xenoestrogen eine größere Rolle im ER-vermittelten Signalweg bei Endometriose zuweisen. Vielleicht spielen aber auch Cytochrom P450-Enzyme wie CYP1A1 und die Genprodukte des AhR- bzw. XRE-vermittelten Signalweges, die bekannt für ihre Rolle beim Steroid- und Fremdstoffmetabolismus sind, nur eine untergeordnete Rolle bei dieser Erkrankung. Dies könnte damit erklärt werden, dass Endometriosegewebe im Verlauf der Krankheitsentstehung zunehmend Hormon-unabhängiger wird und dass somit die genannten Enzyme damit ihre Bedeutung verlieren.

Es scheint, dass PCB153 auch im untersuchten Primärzellsystem von Endometriose-Explantaten noch die Fähigkeit besitzt, die Expression verschiedener Gene zu beeinflussen. Jedoch scheint dieser Zelltyp im Vergleich zu hTERT-EEC Zellen, aufgrund seiner ohnehin schon Hormon-disruptierten Eigenschaften, weniger sensitiv auf PCB153 bzw. E2 zu reagieren. Auch in Primärzellen von Endometriose-Explantaten liegt, obwohl in abgeschwächter Weise, eine Wirkung von PCB153 über den ER-Signalweg bzw. der „cross-talk“ zwischen ER und dem AhR-Signalweg nahe. Darum sind mehr Untersuchungen notwendig um die genauen Regulationsmechanismen des ER-Signalweges und dessen „cross-talks“ besser verstehen zu können.

4.5 Risikopotential von Xenoestrogenen innerhalb Hormon-abhängiger Prozesse

Estrogene spielen eine wichtige Rolle bei vielen physiologischen Prozessen wie Wachstum und Differenzierung. Dabei wirkt es an verschiedenen Zielgeweben wie z.B. Brustdrüsen, Knochen, Gehirn, kardiovaskulären System sowie im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt.

Der klassische Mechanismus einer E2-abhängigen Induktion der Genexpression wird durch Liganden-gebundene ER-Homodimere vermittelt, welche an spezifischen mehr oder weniger palindromischen Sequenzen (ERE) in Promotorregionen Hormon-abhängiger Gene binden (Kumar et al., 1987). Es ist bekannt, dass einige dieser Promotorregionen auch mehrere verschiedene EREs beinhalten können oder in Kooperation mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. Sp1 oder AP-1 funktionale Hormon-regulierte Motive darstellen können (Khan, 2003; Paech et al., 1997). Außerdem ist E2 in der Lage, die Genexpression auch durch Interaktion von ER mit anderen, DNA-gebundenen Transkriptionsfaktoren zu aktivieren. Darüber hinaus existiert eine Reihe von Kofaktoren, welche mit nukleären Rezeptoren (NRs) intera-

gieren und die jeweilige transkriptionelle Aktivität erhöhen (Enhancer) oder erniedrigen (Repressor) können (McKenna et al., 1999). Sie stellen molekulare Brücken zwischen den NRs und der Transkriptionsmaschinerie dar. Solche Faktoren sind jedoch limitiert und NRs konkurrieren um diesen Pool fördernder bzw. inhibierender Regulatoren, welche essentiell für ein optimales Transkriptionsmilieu sind. Hierdurch ist es möglich die Stimulation eines Rezeptor-vermittelten Signalweges durch Wegfangen gemeinsam verwendeter Regulatoren zu inhibieren (Meyer et al., 1989).

Xenoestrogene können die Funktion von NRs innerhalb Hormon-gesteuerter Systeme erheblich stören. Sie repräsentieren eine Gruppe von Substanzen natürlicher und anthropogener Herkunft. Die vielfältigen durch sie verursachten Störungen liegen zum einen daran, dass diese Gruppe eine chemisch-strukturell sehr variable Stoffklasse darstellt. Zum anderen ist dies aber auch ihrer pleiotropen Wirkung zu zuschreiben, welche wie E2 über multiple Mechanismen agieren können. Die meisten von einer Xenoestrogen-vermittelten Reaktion betroffenen NRs laufen jedoch über den ER, AhR, PROG, Thyroidrezeptor, Glucocorticoid, PregnaneX-Rezeptor (Bodwell et al., 2004; Hurst and Waxman, 2004; Villa et al., 2004) ab. Darüberhinaus können viele Rezeptoren auch ein „cross-talk“ mit Wachstumshormonrezeptoren eingehen wie am Beispiel zwischen ER und EGFR.

Die strikte Trennung und somit separate Betrachtung der in dieser Arbeit untersuchten Hormon- bzw. Xenoestrogen-vermittelten Signalwege (ER, MAPK und AhR) ist bei näherer Betrachtung der meisten untersuchten Gene nicht möglich, da viele der hier untersuchten Zielgene multiple Bindungsmotive für deren transkriptionelle Aktivierung in ihren Promotoren aufweisen oder wie eben bereits erwähnt, die ER-, AhR- und MAPK-aktivierten Signalwege um die Bindung eines gemeinsamen Kofaktoren-pools konkurrieren und so z.B. die trans-Inhibition ausgeboteter Signalwege verursachen können. Durch transkriptionelle Vernetzung von Schlüsselgenen wie z.B. ER, COX-2, CYP1A1, VEGF, EGFR u.a. wichtiger zellulärer Signalwege wird eine Steuerung physiologischer Prozesse im Hinblick auf Wachstum und Differenzierung möglich. Dies bedingt aber auch deren Störanfälligkeit gegenüber Hormon-ähnlichen Stoffen wie die des in dieser Arbeit untersuchten Xenoestrogens PCB153 erkennen. Schwierig und hoch kontrovers ist auch die Beurteilung eventuell auftretender Dosis-Wirkungs-Beziehungen. So könnten schwache Dosen eines Substanzgemisches eventuell zu größeren toxischen Effekten führen als hohe Dosen einer Substanz (Koppe, 2006; Rasmussen et al., 2003). Ein gemeinsamer Dosis-Wirkungs-Mechanismus wird wohl aufgrund ihrer bisher entdeckten vielfältigen Wirkungsweisen nicht existieren.

Das Vorhandensein genetischer Polymorphismen bei Rezeptoren, Hormon-metabolisierenden Enzymen und Rezeptor-vermittelten Zielgenen kann bei betreffenden Zellen, Geweben oder bestimmten Populationen zu unterschiedlichen Wirkungsweisen von Hormonen und Xenoestrogenen führen (Li et al., 2006). Aber auch Faktoren wie Ernährung oder Lebensstil können modulierende Auswirkungen in diesem Zusammenhang zeigen (You et al., 2002). Unterschiede in der Wirkung von Xenoestrogenen werden auch durch Exposition bestimmter Individuen zu kritischen Zeitpunkten hervorgerufen. So sind z.B. Expositionen *in utero* für physiologische Prozesse wie Differenzierung und Organogenese kritisch, aber auch postnatale Expositionen wie z.B. vor dem Beginn der Menarche oder während der Pubertät stellen sensible Zeitfenster hormoneller und xenoestrogenen Verwundbarkeit dar (LaRonda, 2004).

Es gibt starke Hinweise, dass chronische Inflammation mit der Entstehung bestimmter Krebsarten verbunden ist (Ohshima et al., 2003; Steele et al., 2003).

Alarmierende Hinweise zum Einfluss verschiedener Xenoestrogene erhielt man schon in den 1970er und 80er Jahren, als eine Vielzahl von Entwicklungs- und Reproduktionsstörungen bei vielen Tiergruppen festgestellt wurden. So gelangten z.B. 1980 bei einem Unfall in Florida große Mengen Dicofol, ein chemischer Verwandter des Schadstoffes DDT, und andere Chemikalien in den See Apopka. Während darauf folgender Jahre ging die Population dort lebender Alligatoren um 90 Prozent zurück und hat sich immer noch nicht erholt. Bei männlichen Alligatoren wurden geringere Mengen männlicher Geschlechtshormone gefunden, in weiblichen Tieren erhöhte Mengen weiblicher Hormone. Zusätzlich wiesen die Eierstöcke der Weibchen sowie die Hoden und Penisse der Männchen diverse Missbildungen auf. Heutzutage stellt die Umgebung des besonders industriell genutzten St. Lawrence Stroms in Kanada eine stark mit Xenoestrogenen belastete Region dar, in welchem eine Population von Belugawalen (*Delphiapterus leucas*) lebt. Post mortem Examinierungen dieser Tiere ergaben hohe Akkumulationen mit landwirtschaftlichen und industriellen Kontaminanten (PCB, DDT) im Fett der Tiere, welche für die reduzierte Geburtenrate verantwortlich gemacht werden. Dieser Zusammenhang konnte auch in einer experimentellen Studie, in der Robben mit belastetem Fisch gefüttert wurden und ebenfalls eine reduzierte Jungtierrate zeigten, beobachtet werden (Reijnders, 1986). Diese Beluga-Population zeigt außerdem eine höhere Tumorrare als irgendeine andere terrestrische oder aquatische Tierart (Martineau, 2002). Aber auch Störungen und Erkrankungen des Reproduktions-, Immun- und endokrinen Systems bis hin zu echten adultem Hermaphroditismus konnten beobachtet werden. Außerdem fand sich eine hohe systemische Expression der Cytochrom P450-abhängigen Monooxygenase CYP1A1 (DeGuise et al., 1994; Wilson et al., 2005).

Auch die in Zellmotilitätsversuchen mit verschiedenen Xenoestrogenen nachgewiesene gesteigerte Motilität von hTERT-EEC Zellen (Abb. 3.6) zusammen mit den Befunden einer reprimierten MMP-3-Expression durch PCB153- bzw. E2-Inkubation bei diesem Zelltyp, lassen auf pathologische Veränderungen des endometrialen Gewebes schließen. Durch Einsatz von Xenoestrogenen mit unterschiedlicher Affinität zum AhR-Rezeptor, konnte dabei eine Steigerung der Motilität in AhR-abhängiger Weise bei diesem Zelltyp nicht festgestellt werden. Vor allem TCDD und PCB153 erwiesen sich als potente Induktoren der Motilität und ließen die hTERT-EEC Zellen vermehrt durch den Porenfilter wandern (Willing et al., 2010).

Ein wesentliches Merkmal von Inflammation wie z.B. bei der Endometriose, ist die gesteigerte Produktion von Prostaglandinen und Cyclooxygenase. So werden z.B. COX-2, E2 und PGE2 in den meisten Geweben unter normalen Bedingungen nicht exprimiert, liegen jedoch bei Endometriosegewebe verstärkt akkumuliert vor (für Review siehe Bulun, 2010). Dies deckt sich mit den Ergebnissen aus der qRT-PCR dieser Arbeit, bei der hTERT-EEC Zellen kaum basale COX-2-Expressionslevel im Vergleich zu Zellen aus Endometriose-Explantaten zeigen (Abb. 3.5.1.1 und 3.5.2.1). In wie weit PCB153 oder E2 an diesem Prozess der COX-2-Zunahme im Detail beteiligt sind, sollte Bestandteil weiterführender Untersuchungen sein. In dieser Arbeit konnte jedenfalls keine Zunahme der COX-2-Expression durch Inkubation mit PCB153 oder E2 nachgewiesen werden. Beide Substanzen wirkten reprimierend auf die COX-2-Expression „gesunden“ Gewebes, repräsentiert durch hTERT-EEC Zellen. Solch ein reprimierender Effekt konnte durch keine der beiden Substanzen bei Zellen aus Endometriose-Explantaten beobachtet werden (Abb. 3.5.1.4 C und 3.5.2.4 C).

Viele Untersuchungen haben bereits auf die große Komplexität Estrogen-vermittelter Signalwege hingewiesen. So gibt es multiple ER-abhängige Signalwege, verschiedene ER-Bindungsmotive an der DNA sowie Interaktionen der verschiedenen ER-Signalwege mit anderen Transkriptionsfaktor-vermittelten Signalwegen (Hall et al., 2001). Zur Gruppe der ER-abhängigen Signalwege gehören aber auch „cross-talks“ des ER mit Rezeptortyrosinkinase-Signalwegen und intrazellulären Signalkaskaden wie der MAPK ERK1/2, aber auch Signalwege, bei dem der ER über andere Transkriptionsfaktoren an deren „response elements“ an die DNA bindet wie AP1, SP1 und NFκB (Bjornstrom and Sjoberg, 2005; Hammes and Levin, 2007; Pietras and Marquez-Garban, 2007).

Aufgrund dieser Beobachtungen ist das Interesse an der Aufklärung gerade der nicht-klassischen ER-abhängigen Signalwege, bei welcher die ER-Bindung am klassischen ERE keine Rolle spielt, groß. In diese nicht-klassische Gruppe der ER-abhängigen Signalwege gehören z.B. membranständige ER-Proteine, als GPR30 bezeichnet, welche E2 binden und über

G-Proteine und EGFR, cAMP- und MAPK-Signalkaskaden stimulieren können (Filardo et al., 2002; Prossnitz et al., 2008; Revankar et al., 2005; Thomas et al., 2005).

Neben E2 können aber auch Xenoestrogene am GPR30 binden. So wurde bereits von der p,p-DDT- und Kepon-Bindung an diesen Rezeptor berichtet (Thomas and Dong, 2006; Thomas et al., 2005). Aber auch für Substanzen wie Bisphenol A oder Pestizide wie Methoxychlor und Antrazine ist eine solche Bindung nachgewiesen worden (Thomas et al., 2005).

So ist eine Überexpression von GPR30 bei Brustkrebs positiv mit der Tumorgröße, dem Metastasierungsgrad sowie einer Her-2/neu-Überexpression korreliert, was GPR30 eventuell zu einem interessanten prediktiven Marker für das aggressive Mammakarzinom macht (Filardo et al., 2006). Auch der Zusammenhang zwischen GPR30 und dem Endometriumkarzinom ist in der Literatur beschrieben. Hierbei ist eine GPR30-Überexpression positiv mit der Proteinexpression von EGFR korreliert, welche häufiger bei einer tief myometrial-invasierte Form des Endometriumkarzinoms vorlag, was wiederum mit erhöhter Aggressivität, einem fortgeschrittenem Tumorstadium und einer geringeren Überlebensrate verbunden war (Smith et al., 2007). Ähnliches wurde auch für das Ovarialkarzinom beobachtet (Smith et al., 2009).

Der Zusammenhang eines möglichen Einflusses von PCB153 auf eine gesteigerte mRNA-Expression von GPR30 konnte in dieser Arbeit weder für Zellen der Zelllinie hTERT-EEC noch für die aus Endometriose-Explantaten aufgezeigt werden (Abb. 3.5.1.2 D und 3.5.2.2). In beiden untersuchten Zellsystemen war sowohl PCB153 als auch E2 in der Lage, die Expression diese Gens zu reprimieren, wobei der reprimierende Effekt bei hTERT-EEC Zellen deutlicher zu erkennen war. Die Ergebnisse lassen daher einen eher geringen Einfluss dieses membranständigen Estrogenrezeptors auf den Krankheitsverlauf der Endometriose vermuten. Jedoch lässt die erfolgte Repression dieses Gens durch beide Substanzen auf eine Interferenz der untersuchten Substanzen mit diesem Rezeptortyp bzw. seinem Signaling schließen.

Es existiert eine Anzahl an Hinweisen, dass die nicht-klassischen Wirkungsweisen von ER vor allem im Reproduktionssystem (*in vivo*) die eine Hauptrolle spielen (Klinge et al., 1999; Matthews and Gustafsson, 2006; McDevitt and Weiss, 2008), was viele der *in vitro* gewonnenen Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen. In welchem Maße die in dieser Arbeit angesprochenen ER-Rezeptortypen (ER α , ER β und GPR30) an einzelnen ER-vermittelten Signalwegen bzw. deren „cross-talks“ mit anderen Signalwegen beteiligt sind, bedarf weiterer genauerer Untersuchungen.

Die Evolution von Rezeptoren für die verschiedenen Klassen von Steroiden sowie die Evolution von Enzymen wie Steroiddehydrogenasen und Cytochrom P450s stellten wichtige Ereignisse in der Evolutionsgeschichte von immer komplexer werdenden multizellulären Organis-

men dar. So entwickelten sich aus einem „ER-Urahn“ im Laufe vieler Millionen Jahre durch drei aufeinander folgende Duplikationen, alle sechs heute vorkommenden Steroidhormonrezeptoren (Thornton et al., 2003). Darüber hinaus nimmt man an, dass zwischen nukleären Rezeptoren und oben genannten Enzymen eine Co-Evolution stattfand, für deren Fortentwicklung Xenoestrogene aus der Umwelt sowie die „Verwundbarkeit“ des Fremdstoffmetabolismus antreibend waren (Baker, 2005).

Mit dem ER als Urrezeptorprotein war E2 als Ligand bereits vorhanden. Vermutlich waren auch andere Hormone wie Progesteron und Testosteron, als Intermediärprodukte des E2-Metabolismus ebenfalls schon vorhanden. Diese Zwischenstufen und somit potentielle Liganden zeigten jedoch noch keine Affinität zu einem bis dato evolvierten Rezeptor („orphan ligands“). Durch Duplikationsereignisse in den Rezeptorgenen kam es zu diversen Sequenzabweichungen und schließlich zur Entstehung neuer Rezeptoren mit neuen Bindungseigenschaften, wodurch einige Intermediärprodukte des E2-Metabolismus eine Signalfunktionen erhielten („ligand exploitation“).

Solche evolutionären Prozesse können Unterschiede im Hormon- und Xenoestrogenmetabolismus hervorrufen und so z.B. Spezies-spezifische Unterschiede im Xenoestrogenstoffwechsel erklären. Außerdem liegen bei vielen Menschen Gene in unterschiedlichen Versionen (Polymorphismen) vor, wodurch deren Genprodukte in abgewandelten Versionen und Aktivitäten vorliegen, was dann auch zu Abweichungen im Xenoestrogen-Metabolismus führen kann.

Somit scheinen ER-vermittelte Reaktionen eine Schlüsselrolle bei physiologischen Prozessen wie Proliferation und Differenzierung, welche vor allem für Entwicklung und Reproduktion von größter Bedeutung sind, einzunehmen. Anthropogen hergestellte und in hohem Maße in die Umwelt eingebrachte Stoffe wie PCB153 zeigen, wie Ergebnisse dieser Arbeit ausführen, einen estrogenen Charakter sowie einen regen „cross-talk“ mit anderen Signalwegen. Deren Risikopotential, normale endogene ER-vermittelte Signalwege zu stören, ist daher hoch und sollte Bestandteil auch weiterführender intensiver Untersuchungen sein.

5 Zusammenfassung

Die humane Uterusschleimhaut (Endometrium) stellt ein dynamisches System dar, welches in Vorbereitung auf eine Embryoimplantation fortwährend zyklischen Veränderungen unterliegt. Während eines Zyklus ist 17 β -Estradiol (E2) das prädominante Hormon der proliferativen Phase, wohingegen Progesteron die sekretorische Phase dominiert. Die ungestörte hormonelle Steuerung dieses Reproduktionsorgans, welche vorrangig über Rezeptor-vermittelte Prozesse erfolgt, ist eine wesentliche Grundvoraussetzung der weiblichen Fertilität. Viele Untersuchungen haben bereits auf die große Komplexität Estrogen-vermittelter Signalwege, welche

über zwei spezifische Estrogenrezeptoren (ER α und - β) ablaufen, hingewiesen. Außerdem zeigen diese Rezeptoren in ihrer Bindung verschiedener Ligandenstrukturen ein hohes Maß an Promiskuität. In vorausgegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde auf eine deutliche Belastung des humanen Endometriums mit u.a. den Xenoestrogenen PCB153, β -HCH und p,p'-DDE in physiologisch relevanten Konzentrationen hingewiesen. Diese Xenoestrogene repräsentieren eine Gruppe von Substanzen anthropogener Herkunft, welche strukturell endogenem E2 sehr ähnlich sind. Sie stehen im Verdacht die Funktion endogener Hormone empfindlich zu stören.

In dieser Arbeit sollte daher das Ausmaß der Interferenz von Xenoestrogenen mit den verschiedenen Estrogenrezeptor (ER)-Signalwegen untersucht werden.

Dafür wurden zunächst *in vitro*-Wachstumsanalysen mit unterschiedlich Hormon-sensitiven Zelllinien durchgeführt. Dabei wurden bei der uterinen Zelllinie hTERT-EEC *in vitro* ein gesteigertes Wachstum nach 96h Inkubation mit den Xenoestrogenen PCB153, p,p'-DDE, β -HCH und Coumestrol sowie mit 17 β -Estradiol (E2) als Kontrolle nachgewiesen. Bei untersuchten Hormon-unabhängigen Primärzellen aus Endometriose-Explantaten und Zellen der Endometriumkarzinom-Zelllinie RL95-2 konnten nach gleicher Xenoestrogeninkubation keine proliferativen Effekte gemessen werden. Parallel dazu wurden die *in vitro*-Wachstumsanalysen mit zwei spezifischen Inhibitoren, welche ER-vermittelte Signalwege betreffen, durchgeführt. Hierbei kam es in Anwesenheit des reinen ER-Inhibitors ICI 182780 und dem jeweiligen Xenoestrogen PCB153, β -HCH, p,p'-DDE, dem Phytoestrogen Coumestrol sowie der Kontrolle E2 zur vollständigen Unterdrückung der gezeigten Wachstumssteigerung der hTERT-EEC Zellen. Die Inkubation mit dem MAPK-Inhibitor U0126, welcher den „unspezifischen“ Wirkmechanismus des ER-vermittelten Signalwegs durch Inhibition der Phosphorylierung von ERK1/2 verhindert, zeigte eine Dämpfung der gezeigten Wachstumssteigerung dieser Zellen. Auch bei der Brustkrebszelllinie MCF7 wurde eine ähnliche Xenoestrogen-induzierte wachstumsdämpfende Wirkung in Anwesenheit des MAPK-Inhibitors beobachtet. Die spezifische Suppression der Xenoestrogen-induzierten Proliferation durch den ER- und MAPK-Inhibitor weist auf eine Interferenz der untersuchten Xenoestrogenwirkung mit sowohl dem „klassischen“ als auch dem „alternativen“ Signalweg von ER hin.

Weiterführend wurde das Proliferationsverhalten von Zelltypen verschiedener Herkunft unter Xenoestrogeneinfluss alternativ geprüft. Dabei zeigte sich bei immunocytochemischen Untersuchungen des Proliferationsmarkers Ki67 bei den Hormon-sensitiven Zellen der Brustkrebszelllinie MCF7 und der uterinen Zelllinie hTERT-EEC durch PCB153 und E2 eine erhöhte Proteinexpression des Proliferationsmarkers Ki67.

In Reporteranalysen, bei welchen mit Hilfe des Reportergenvektors pERE die Bindung von E2

und ähnlich affinen Substanzen am „estrogen response element“ (ERE) messbar gemacht wurde, induzierte PCB153 eine ähnlich hohe Promotoraktivität wie E2. Die Gegenwart des ER-Inhibitors ICI 182780 verhinderte die Induktion der Promotoraktivität bei beiden Testsubstanzen.

Auch Western Blot-Untersuchungen der ERK1/2-Proteinexpression erhärten die Vermutung, dass die Wirkung der untersuchten Xenoestrogene von beiden ER-Signalwegen ausgehen könnte. Es scheint, dass vor allem PCB153 im Hinblick auf seine Wirkungsweise starke estrogenere Eigenschaften besitzt.

Da sowohl das Wachstum von Zellen aus der Brust als auch aus dem Uterus durch die untersuchten Xenoestrogene gesteigert wurden und dabei die eingesetzten Inhibitoren auch in ähnlicher Weise in der Lage waren die Wirkung dieser Xenoestrogene negativ zu beeinflussen, kann von einer Gewebe-spezifischen Wirkung von speziell PCB153 nicht ausgegangen werden.

Eine der Fragestellungen dieser Arbeit war es, die in Abhängigkeit von Xenoestrogenen eventuell schon in frühen Stadien auftretenden Veränderungen gesunder endometrialer Zellen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden an immortalisierten endometrialen Epithelzellen (hTERT-EEC) und endometriotischen Primärzellen von endoskopierten Endometriose-Patientinnen mit der Diagnose idiopathische Sterilität durchgeführt.

Die durch E2 und PCB153 hervorgerufenen Genexpressionsveränderungen in beiden untersuchten Zellsystemen stellten überwiegend Repressionen dar. Ausserdem war auffällig, dass beim Vergleich der durch E2 und PCB153 induzierten Effekte, beide Substanzen meist ähnlich reagierten, was die vermutete estrogenere Wirkung von PCB153 weiter erhärtet. Es scheint, dass PCB153 im gesunden Gewebe durch Repression multipler Gene an der Verschiebung des hormonellen Gleichgewichtes beteiligt sein könnte und darüber hinaus wichtige physiologische Prozesse wie Angiogenese, Gewebeumbau („tissue remodeling“), Migration und Invasivität zu stören vermag und dass diese störenden Einflüsse auch bei bereits erkranktem Endometriosegewebe durch PCB153-Einwirkung weiter fortgeführt werden können. Darüber hinaus zeigten PCB153 und E2 Auswirkungen auf die Expression von GPR30, AhR, ARNT und EGFR, was auf eine Interferenz der Stoffe mit anderen wichtigen Signalwegen hinweist und lässt somit auf einen regen „cross-talk“ von sowohl PCB153 als auch E2 über ER-vermittelte Prozesse mit anderen Signalwegen schließen.

Abschließend wurde ein möglicher Zusammenhang von PCB153 bei der Karzinogenese sowie eine mögliche Assoziation zu gynäkologischen Erkrankungen wie Endometriose diskutiert.

6 Literaturverzeichnis

- Abbott, B. D., Held, G. A., Wood, C. R., Buckalew, A. R., Brown, J. G., and Schmid, J. (1999). AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate in vivo and in culture. *Toxicological Sciences* 47, 62-75.
- Abdelrahim, M., Ariazi, E., Kim, K., Khan, S., Barhoumi, R., Burghardt, R., Liu, S., Hill, D., Finnell, R., Wlodarczyk, B., *et al.* (2006). 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha. *Cancer Res* 66, 2459 - 2467.
- AMAP (1997). Assessment Report: Arctic Pollution Issues.
- Andersen, H., Andersson, A., Arnold, S., Autrup, H., Barfoed, M., Beresford, N., Bjerregaard, P., Christiansen, L., Gissel, B., and Hummel, R. (1999). Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 107, 89 - 108.
- Andreasen, P. A., Georg, B., Lund, L. R., Riccio, A., and Stacey, S. N. (1990). Plasminogen activator inhibitors: hormonally regulated serpins. *Molecular and Cellular Endocrinology* 68, 1-19.
- Andreasen, P. A., Kjoller, L., Christensen, L., and Duffy, M. J. (1997). The urokinase-type plasminogen activator system in cancer metastasis: A review. *International Journal of Cancer* 72, 1-22.
- Anolik, J., Klinge, CM, Hilf, R, Bambara, RA. (1995). Cooperative binding of estrogen receptor to DNA depends on spacing of binding sites, flanking sequence, and ligand. 34(8), 2511-2520.
- Appleby, S. B., Ristimäki, A., Neilson, K., Narko, K., and Hla, T. (1994). Structure of the human cyclo-oxygenase-2 gene. *Biochem J* 302, 723-727.
- Arnold, S., Vonier, PM, Collins, BM, Klotz, DM, Guillette, LJ Jr, McLachlan, JA. (1997). In vitro synergistic interaction of alligator and human estrogen receptors with combinations of environmental chemicals. *Environ Health Perspect* 105 Suppl 3, 615-618.
- Aronica, S. M., Kraus, W. L., and Katzenellenbogen, B. S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8517-8521.
- Ashby, J., Tinwell, H, Soames, A, and Foster, J (1999). Induction of hyperplasia and increased DNA content in the uterus of immature rats exposed to coumestrol. *Environ Health Perspect*.
- Aube, M., Larochelle, C., and Ayotte, P. (2008). 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) disrupts the estrogen-androgen balance regulating the growth of hormone-dependent breast cancer cells. *Breast Cancer Research* 10, R16.
- Baker, M. E. (2005). Xenobiotics and the Evolution of Multicellular Animals: Emergence and Diversification of Ligand-Activated Transcription Factors. *Integr Comp Biol* 45, 172-178.
- Ballschmiter, K., and Zell, M. (1980). Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. In *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 20-31.
- Bardin, A., Boulle, N., Lazennec, G., Vignon, F., and Pujol, P. (2004). Loss of ER{beta} expression as a common step in estrogen-dependent tumor progression. *Endocr Relat Cancer* 11, 537-551.

- Barkhem, T., Nilsson, S., and Gustafsson, J. (2004). Molecular Mechanisms, Physiological Consequences and Pharmacological Implications of Estrogen Receptor Action. *American Journal of Pharmacogenomics* 4, 19-28.
- Bartlett, J. M., Langdon, S. P., Simpson, B. J., Stewart, M., Katsaros, D., Sismondi, P., Love, S., Scott, W. N., Williams, A. R., Lessells, A. M., Macleod, K. G., Smyth, J. F., and Miller, W. R. (1996). The prognostic value of epidermal growth factor receptor mRNA expression in primary ovarian cancer. *73*(3), 301–306.
- Baukloh, V., Bohnet, H. G., Trapp, M., Heeschen, W., Feichtinger, W., and Kemeter, P. (1985). Biocides in Human Follicular Fluid. *Annals of the New York Academy of Sciences* 442, 240-250.
- Beischlag, T. V., Morales, L. J., Hollingshead, B. D., and Perdew, G. H. (2008). The Aryl Hydrocarbon Receptor Complex and the Control of Gene Expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 18(3), 207–250.
- Beischlag, T. V., and Perdew, G. H. (2005). ERalpha-AHR-ARNT Protein-Protein Interactions Mediate Estradiol-dependent Transrepression of Dioxin-inducible Gene Transcription. *Journal of Biological Chemistry* 280, 21607-21611.
- Bentrem, D., Fox, J. E., Pearce, S. T., Liu, H., Pappas, S., Kupfer, D., Zapf, J. W., and Jordan, V. C. (2003). Distinct Molecular Conformations of the Estrogen Receptor alpha Complex Exploited by Environmental Estrogens. *Cancer Research* 63, 7490-7496.
- Berry, M., Metzger, D. and Chambon, P. (1990). Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen. *9*(9), 2811–2818.
- Bhatt, R. V. (2000). Environmental influence on reproductive health. *International Journal of Gynecology & Obstetrics* 70, 69-75.
- Birnbaum, L. S., and Cummings, A. M. (2001). Dioxins and Endometriosis: A Plausible Hypothesis. *Environ Health Perspect* 110.
- Bjornstrom, L., and Sjoberg, M. (2005). Mechanisms of Estrogen Receptor Signaling: Convergence of Genomic and Nongenomic Actions on Target Genes. *Mol Endocrinol* 19, 833-842.
- Bodwell, J. E., Kingsley, L. A., and Hamilton, J. W. (2004). Arsenic at very low concentrations alters glucocorticoid receptor (GR)-mediated gene activation but not GR-mediated gene repression: complex dose-response effects are closely correlated with levels of activated GR and require a functional GR DNA binding domain. *Chemical Research in Toxicology* 17, 1064-1076.
- Böhlmann, D., ed. (1991). *Ökologie von Umweltbelastungen in Boden und Nahrung. und Ökologie von Umweltbelastungen unserer Atmosphäre.* (Stuttgart, New York).
- Bonfeld-Jorgensen, E., Andersen, H., Rasmussen, T., and Vinggaard, A. (2001). Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology* 158, 141 - 153.
- Boocock, C. A., Charnock-Jones, D. S., Sharkey, A. M., McLaren, J., Barker, P. J., Wright, K. A., Twentyman, P. R., and Smith, S. K. (1995). Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Its Receptors in Ovarian Carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute* 87, 506-516.
- Boverhof, D. R., Kwekel, J. C., Humes, D. G., Burgoon, L. D., and Zacharewski, T. R. (2006). Dioxin Induces an Estrogen-Like, Estrogen Receptor-Dependent Gene Expression Response in the Murine Uterus. *Molecular Pharmacology* 69, 1599-1606.
- Brown, D. P. (1987). Mortality of workers exposed to polychlorinated biphenyls: an update. *Arch Environ Health* 42, 333-339.

- Brunnberg, S., Pettersson, K., Rydin, E., Matthews, J., Hanberg, A., and Pongratz, I. (2003). The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 6517 - 6522.
- Bruse, C., Guan, Y., Carlström, K., Carlberg, M., and Bergqvist, A. (2004). Increased proteolysis in endometriotic tissue and endometrium in women who develop endometriosis may facilitate invasion. *International Congress Series Research Papers in Fertility and Reproductive Medicine Proceedings of the 18th World Congress on Fertility and Sterility (IFFS 2004)* 1271, 236-239.
- Bucheli, T. D., and Fent, K. (1995). Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems, Vol 25, Taylor & Francis).
- Bulayeva, N. N., and Watson, C. S. (2004). Xenoestrogen-Induced ERK-1 and ERK-2 Activation via Multiple Membrane-Initiated Signaling Pathways. *Environ Health Perspect* 112.
- Bulun, S. E., Cheng, Y.-H., Pavone, M., Ellen, Xue, Q., Attar, E., Trukhacheva, E., Tokunaga, H., Utsunomiya, H., Yin, P., Luo, X., *et al.* (2010). Estrogen Receptor-beta, Estrogen Receptor-alpha, and Progesterone Resistance in Endometriosis. *Semin Reprod Med* 28, 036-043.
- Bulun, S. E. (2009). Endometriosis, Review. *New England Journal of Medicine* 360, 268-279.
- Bunone, G., Briand, P., Miksicek, R., and Picard, D. (1996). Activation of the unliganded estrogen receptor by EGF involves the MAP kinase pathway and direct phosphorylation. *EMBO J* 15, 2174 - 2183.
- Buterin, T., Koch, C., and Naegeli, H. (2006). Convergent transcriptional profiles induced by endogenous estrogen and distinct xenoestrogens in breast cancer cells. *Carcinogenesis* 27, 1567-1578.
- Calabrese, E. J. (1982). Human Breast Milk Contamination in the United States and Canada by Chlorinated Hydrocarbon Insecticides and Industrial Pollutants: Current Status. *International Journal of Toxicology* 1, 91-98.
- Castoria, G., Migliaccio, A., Bilancio, A., Di Domenico, M., de Falco, A., Lombardi, M., Fiorentino, R., Varricchio, L., Barone, M. V., and Auricchio, F. (2001). PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells. *20*, 6050-6059.
- Catalano, M. G., Comba, A., Fazzari, A., Benedusi-Pagliano, E., Sberveglieri, M., Revelli, A., Massobrio, M., Frairia, R., and Fortunati, N. (1997). Sex steroid binding protein receptor (SBP-R) is related to a reduced proliferation rate in human breast cancer. In *Breast Cancer Research and Treatment* (Springer Netherlands), pp. 227-234.
- Charles, G. D., and Shiverick, K. T. (1997). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin Increases mRNA Levels for Interleukin-1[beta], Urokinase Plasminogen Activator, and Tumor Necrosis Factor-[alpha] in Human Uterine Endometrial Adenocarcinoma RL95-2 Cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 238, 338-342.
- Choi, E. J., Toscano, D. G., Ryan, J. A., Riedel, N., and Toscano, W. A. (1991). Dioxin induces transforming growth factor-alpha in human keratinocytes. *Journal of Biological Chemistry* 266, 9591-9597.
- Clausen, I., Kietz, S., and Fischer, B. Lineage-specific effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on gene expression in the rabbit blastocyst. *Reproductive Toxicology* 20, 47-56.

- Colborn, T., vom Saal, F. S., Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101, 378-384.
- Coosen, R., and van Velsen, F. L. (1989). Effects of the [beta]-isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 101, 310-318.
- Corrigan, F., Murray, L., Wyatt, C., and and Shore, R. (1998). Diorthosubstituted polychlorinated biphenyls in caudate nucleus in Parkinson's disease. *Exp Neurol* 150, 339-342.
- Dahlman-Wright, K., Cavailles, V., Fuqua, S. A., Jordan, V. C., Katzenellenbogen, J. A., Korach, K. S., Maggi, A., Muramatsu, M., Parker, M. G., and Gustafsson, J.-Å. k. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen Receptors. *Pharmacological Reviews* 58, 773-781.
- Dauvois, S., White, R., and Parker, M. (1993). The antiestrogen ICI 182780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling. *J Cell Sci* 106, 1377-1388.
- Davis, J. W., Lauer, F. T., Burdick, A. D., Hudson, L. G., and Burchiel, S. W. (2001). Prevention of apoptosis by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in the MCF-10A cell line : Correlation with increased transforming growth factor a production, Vol 61 (Philadelphia, PA, ETATS-UNIS, American Association for Cancer Research).
- De Felip, E., Porpora, M. G., di Domenico, A., Ingelido, A. M., Cardelli, M., Cosmi, E. V., and Donnez, J. (2004). Dioxin-like compounds and endometriosis: a study on Italian and Belgian women of reproductive age. *Toxicology Letters* 150, 203-209.
- DeCastro, B., Korricks, S., Spengler, J., and Soto, A. (2006). Estrogenic activity of polychlorinated biphenyls present in human tissue and the environment. *Environ Sci Technol* 40, 2819 - 2825.
- Degen, G. H., and Bolt, H. M. (2000). Endocrine disruptors: update on xenoestrogens. *International Archives of Occupational and Environmental Health* 73, 433-441.
- DeGuise, S., Lagace, A., and Beland, P. (1994). Tumors in St. Lawrence Beluga Whales (*Delphinapterus leucas*). *Veterinary Pathology Online* 31, 444-449.
- Delios, N. (in Preparation), Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Denison, M. S., Pandini, A., Nagy, S. R., Baldwin, E. P., and Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chemico-Biological Interactions* 141, 3-24.
- Desaulniers, D., Leingartner, K., Wade, M., Fintelman, E., Yagminas, A., and Foster, W. (1999). Effects of acute exposure to PCBs 126 and 153 on anterior pituitary and thyroid hormones and FSH isoforms in adult Sprague Dawley male rats. *Toxicol Sci* 47, 158-169.
- Dewailly, E., Ayotte, P., Laliberte, C., Weber, J. P., Gingras, S., and Nantel, A. J. (1996). Polychlorinated biphenyl (PCB) and dichlorodiphenyl dichloroethylene (DDE) concentrations in the breast milk of women in Quebec. *Am J Public Health* 86, 1241-1246.
- Diel, P., Olf, S., Schmidt, S., and Michna, H. (2002). Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction, cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *J Steroid Biochem Mol Biol* 80, 61 - 70.
- Diry, M., Tomkiewicz, C., Koehle, C., Coumoul, X., Bock, K. W., Barouki, R., and Transy, C. (2006). Activation of the dioxin//aryl hydrocarbon receptor (AhR)

- modulates cell plasticity through a JNK-dependent mechanism. *Oncogene* 25, 5570-5574.
- Dittmer, A., Vetter, M., Schunke, D., Span, P. N., Sweep, F., Thomssen, C., and Dittmer, J. (2006). Parathyroid Hormone-related Protein Regulates Tumor-relevant Genes in Breast Cancer Cells. *Journal of Biological Chemistry* 281, 14563-14572.
- Dohr, O., Vogel, C., and Abel, J. (1995). Different Response of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)-Sensitive Genes in Human Breast Cancer MCF-7 and MDA-MB 231 Cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 321, 405-412.
- Dublin, E., Hanby, A., Patel, N. K., Liebman, R., and Barnes, D. (2000). Immunohistochemical Expression of uPA, uPAR, and PAI-1 in Breast Carcinoma : Fibroblastic Expression Has Strong Associations with Tumor Pathology. *Am J Pathol* 157, 1219-1227.
- Duffy, M. J., Maguire, T. M., McDermott, E. W., and O'Higgins, N. (1999). Urokinase plasminogen activator: A prognostic marker in multiple types of cancer. *Journal of Surgical Oncology* 71, 130-135.
- D'Ursi, P., Salvi, E., Fossa, P., Milanese, L., and Rovida, E. (2005). Modelling the interaction of steroid receptors with endocrine disrupting chemicals. *BMC Bioinformatics* 6, S10.
- Eeckhout, Y., and Vaes, G. (1977). Further studies on the activation of procollagenase, the latent precursor of bone collagenase. Effects of lysosomal cathepsin B, plasmin and kallikrein, and spontaneous activation. *Biochem J* 166, 21-31.
- 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 10.1210/jc.82.12.4258. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265.
- Eskenazi, B., Warner, M. L. (1997). Epidemiology of endometriosis. *Obstet Gynecol Clin North Am* 24(2), 235-258.
- Fawell, S. E., White, R., Hoare, S., Sydenham, M., Page, M., and Parker, M. G. (1990). Inhibition of estrogen receptor-DNA binding by the "pure" antiestrogen ICI 164,384 appears to be mediated by impaired receptor dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 6883-6887.
- Felgner, P. L. (1987). *Proc natn Acad Sci USA* 84, 7413-7414.
- Felgner, P. L., and Ringold, G. M. (1989). Cationic liposome-mediated transfection. *Nature* 337, 387-388.
- Filardo, E. J., Graeber, C. T., Quinn, J. A., Resnick, M. B., Giri, D., DeLellis, R. A., Steinhoff, M. M., and Sabo, E. (2006). Distribution of GPR30, a Seven Membrane-Spanning Estrogen Receptor, in Primary Breast Cancer and its Association with Clinicopathologic Determinants of Tumor Progression. *Clin Cancer Res* 12, 6359-6366.
- Filardo, E. J., Quinn, J. A., Frackelton, A. R., Jr., and Bland, K. I. (2002). Estrogen Action Via the G Protein-Coupled Receptor, GPR30: Stimulation of Adenylyl Cyclase and cAMP-Mediated Attenuation of the Epidermal Growth Factor Receptor-to-MAPK Signaling Axis. *Mol Endocrinol* 16, 70-84.
- Frigo, D. E., Burow, M. E., Mitchell, K. A., Chiang, T.-C., McLachlan, J. A. (2002). DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms. *Environ Health Perspect* 110, 1239-1245.

- Frigo, D. E., Tang, Y., Beckman, B. S., Scandurro, A. B., Alam, J., Burow, M. E., and McLachlan, J. A. (2004). Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis* 25, 249-261.
- Fujii-Kuriyama, Y., and Kawajiri, K. (2010). Molecular mechanisms of the physiological functions of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor, a multifunctional regulator that senses and responds to environmental stimuli. *Proceedings of the Japan Academy, Series B* 86, 40-53.
- Gaido, K. W., and Maness, S. C. (1994). Regulation of Gene Expression and Acceleration of Differentiation in Human Keratinocytes by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicology and Applied Pharmacology* 127, 199-208.
- Gaido, K. W., and Maness, S. C. (1995). Post-transcriptional Stabilization of Urokinase Plasminogen Activator mRNA by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a Human Keratinocyte Cell Line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 133, 34-42.
- Gaido, K. W., Maness, S. C., Leonard, L. S., and Greenlee, W. F. (1992). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors-alpha and -beta 2 expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *Journal of Biological Chemistry* 267, 24591-24595.
- Gandolfi, F., Pocar, P., Brevini, T. A. L., and Fischer, B. (2002). Impact of endocrine disrupters on ovarian function and embryonic development. *Domestic Animal Endocrinology* 23, 189-201.
- Gerhard, I., Runnebaum, B. (1992). The limits of hormone substitution in pollutant exposure and fertility disorders. *Zentralbl Gynakol* 114(12), 593-602.
- Gilabert-Estelles, J., Estelles, A., Gilabert, J., Castello, R., Espana, F., Falco, C., Romeu, A., Chirivella, M., Zorio, E., and Aznar, J. (2003). Expression of several components of the plasminogen activator and matrix metalloproteinase systems in endometriosis. *Human Reproduction* 18, 1516-1522.
- Gillesby, B. E., Stanostefano, M., Porter, W., Safe, S., Wu, Z. F., and Zacharewski, T. R. (1997). Identification of a Motif within the 5' Regulatory Region of pS2 Which Is Responsible for AP-1 Binding and TCDD-Mediated Suppression. *Biochemistry* 36, 6080-6089.
- Giudice, L. C., and Kao, L. C. (2004). Endometriosis. *The Lancet* 364, 1789-1799.
- Goksøyr, A. (1995). Use of cytochrome P450 1A (CYP1A) in fish as a biomarker of aquatic pollution. *Arch Toxicol Suppl* 17.
- Graham, R. A., Seif, M. W., Aplin, J. D., Li, T. C., Cooke, I. D., Rogers, A. W., and Dockery, P. (1990). An endometrial factor in unexplained infertility. *British Medical Journal* 300, 1428-1431.
- Gruber, C. J., Gruber, D. M., Gruber, I. M. L., Wieser, F., and Huber, J. C. (2004). Anatomy of the estrogen response element. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 15, 73-78.
- Hall, J., and McDonnell, D. (1999). The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ER alpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140, 5566 - 5578.
- Hall, J. M., Couse, J. F., and Korach, K. S. (2001). The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *Journal of Biological Chemistry* 276, 36869-36872.
- Hammes, S. R., and Levin, E. R. (2007). Extranuclear Steroid Receptors: Nature and Actions. *Endocr Rev* 28, 726-741.

- Hanstein, B., Djahansouzi, S., Dall, P., Beckmann, M., and Bender, H. (2004). Insights into the molecular biology of the estrogen receptor define novel therapeutic targets for breast cancer. *Eur J Endocrinol* 150, 243-255.
- Harbeck, N., Kates, E. R., Gauger, K., Willems, A., Kiechle, M., Magdolen, V., Schmitt, M. (2004). Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. *Thrombosis and Haemostasis* 91/3, 450-456.
- Hayashi, S.-i., Watanabe, J., Nakachi, K., Eguchi, H., Gotoh, O., and Kawajiri, k. (1994). Interindividual difference in expression of human Ah receptor and related P450 genes. *Carcinogenesis* 15, 801-806.
- Heilier, J.-F., Donnez, J., and Lison, D. (2008). Organochlorines and endometriosis: A mini-review. *Chemosphere* 71, 203-210.
- Hippe, S. (2005) Untersuchungen zur estrogenen Potenz endokrin wirksamer Umweltchemikalien an Primärkulturen humaner Endometriumzellen., Medizinische Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Hofmeister, M., and Bonfeld-Jorgensen, E. (2004). Effects of the pesticides prochloraz and methiocarb on human estrogen receptor alpha and beta mRNA levels analyzed by on-line RT-PCR. *Toxicol In Vitro* 18, 427 - 433.
- Hoivik, D., Willett, K., Wilson, C., and Safe, S. (1997). Estrogen Does Not Inhibit 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated Effects in MCF-7 and Hepa 1c1c7 Cells. *J Biol Chem* 272, 30270-30274.
- Hombach-Klonisch, S., Kehlen, A., Fowler, P. A., Huppertz, B., Jugert, J. F., Bischoff, G., Schluter, E., Buchmann, J., and Klonisch, T. (2005). Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells. *J Mol Endocrinol* 34, 517-534.
- Hurst, C. H., and Waxman, D. J. (2004). Environmental phthalate monoesters activate pregnane X receptor-mediated transcription. *Toxicology and Applied Pharmacology* 199, 266-274.
- Irigoyen, J. P., Munoz-Canoves, P., Montero, L., Koziczak, M., and Nagamine, Y. (1999). The plasminogen activator system: biology and regulation. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Birkhäuser Basel), pp. 104-132.
- Ivanov, V., and Sandell, E. (1992). Characterization of polychlorinated biphenyl isomers in Sovol and trichlorodiphenyl formulations by high-resolution gas chromatography with electron capture detection and high-resolution gas chromatography-mass spectrometry techniques. *Environmental Science & Technology* 26, 2012-2017.
- Jacobs, M. N. (2001). Unsafe sex: how endocrine disruptors work. *Environ Health Perspectives* 118.
- Jacobson, J. L. u. J., S.W. (1997). Evidence for PCBs as neurodevelopmental toxicants in humans. *Neurotoxicology* 18, 415-424.
- Jensen, B. L., Skouv, J., Lundholt, B. K., and Lykkesfeldt, A. E. (1999). Differential regulation of specific genes in MCF-7 and the ICI 182780-resistant cell line MCF-7/182R-6. *Br J Cancer* 79, 386-392.
- Jeong, H. G., and Lee, S. S. (1998). Suppressive effects of estradiol on 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated transcriptional activation of murine Cyp1a-1 in mouse hepatoma Hepa 1c1c7 cells. *Cancer letters* 133, 177-184.
- Jiang, J., Wu, R.-f., Wang, Z.-h., Sun, H.-c., Xu, Z., and Xiu, H.-m. (2002). Effect of mifepristone on estrogen and progesterone receptors in human endometrial and endometriotic cells in vitro. *Fertility and sterility* 77, 995-1000.

- Jorissen, R. N., Walker, F., Pouliot, N., Garrett, T. P. J., Ward, C. W., and Burgess, A. W. (2003). Epidermal growth factor receptor: mechanisms of activation and signalling. *Experimental Cell Research* 284, 31-53.
- Kannan, N., S. Tanabe, and R. Tatsukawa. (1988). Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: 2,3,7,8-T4CDD toxicity equivalence factors approach. *Bull Environ Contam Toxicol* 41, 267.
- Kato, S., Endoh, Y., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masucshige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., *et al.* (1995). Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science* 270, 1491 - 1494.
- Katzenellenbogen, B., S , Katzenellenbogen,, and A , J. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta - regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2, 335 - 344.
- Katzenellenbogen, B. S., Kendra, K. L., Norman, M. J., and Berthois, Y. (1987). Proliferation, Hormonal Responsiveness, and Estrogen Receptor Content of MCF-7 Human Breast Cancer Cells Grown in the Short-Term and Long-Term Absence of Estrogens. *Cancer Research* 47, 4355-4360.
- Kelce, W., Stone, C., Laws, S., Gray, L., Kempainen, J., and Wilson, E. (1995). Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375, 581 - 585.
- Khan, S., Abdelrahim, M, Samudio, I, Safe, S (2003). Estrogen receptor/Sp1 complexes are required for induction of cad gene expression by 17beta-estradiol in breast cancer cells., Vol 144 (Chevy Chase, MD, ETATS-UNIS, Endocrine Society).
- Kharat, I., and Saatcioglu, F. (1996). Antiestrogenic effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin are mediated by direct transcriptional interference with the liganded estrogen receptor. Cross-talk between aryl hydrocarbon- and estrogen-mediated signaling. *J Biol Chem* 271, 10533 - 10537.
- Kietz, S., and Fischer, B. (2003). Polychlorinated biphenyls affect gene expression in the rabbit preimplantation embryo. *Molecular Reproduction and Development* 64, 251-260.
- Kim, S.-Y., Weiss, J., Tong, M., Laronda, M. M., Lee, E.-J., and Jameson, J. L. (2009). Foxl2, a Forkhead Transcription Factor, Modulates Nonclassical Activity of the Estrogen Receptor- α . *Endocrinology* 150, 5085-5093.
- Klinge, C., Bowers, J., Kulakosky, P., Kamboj, K., and Swanson, H. (1999). The aryl hydrocarbon receptor (AHR)/AHR nuclear translocator (ARNT) heterodimer interacts with naturally occurring estrogen response elements. *Mol Cell Endocrinol* 157, 105 - 119.
- Klinge, C. M., Kaur, K., and Swanson, H. I. (2000). The Aryl Hydrocarbon Receptor Interacts with Estrogen Receptor Alpha and Orphan Receptors COUP-TFI and ERR α 1. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 373, 163-174.
- Köhler, U., Hiller, K., Martin, R., Langanke, D., Naumann, G., Bilek, K., Jänicke, F., and Schmitt, M. (1997). Tumor-Associated Proteolytic Factors uPA and PAI-1 in Endometrial Carcinoma. *Gynecologic Oncology* 66, 268-274.
- Kokorine, I., Marbaix, E., Henriot, P., Okada, Y., Donnez, J., Eeckhout, Y., and Courtoy, P. (1996). Focal cellular origin and regulation of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase-1) are related to menstrual breakdown in the human endometrium. *J Cell Sci* 109, 2151-2160.

- Köller, S. (2002) Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums., Medizinische Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Koppe, J., Bartonova, A, Bolte, G, Bistrup, ML, Busby, C, Butter, M, Dorfman, P, Fucic, A, Gee, D, van den Hazel, P, (2006). Exposure to multiple environmental agents and their effect. *Acta Pädiatrica* 95, 106-113.
- Korach, K., Davis, VL, Curtis, SW, Bocchinfuso, WP. (1997). Xenoestrogens and estrogen receptor action. *Endocrine Toxicology 2nd ed.*, 181-211.
- Korach, K., Sarver, P, Chae, K, McLachlan, JA, McKinney, JD (1988). Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes. (*Mol Pharmacol*), pp. 120–126.
- Kraemer, S. A., Arthur, K. A., Denison, M. S., Smith, W. L., and DeWitt, D. L. (1996). Regulation of Prostaglandin Endoperoxide H Synthase-2 Expression by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 330, 319-328.
- Krishnamurti, C., and Alving, B. M. (1992). Plasminogen Activator Inhibitor Type 1: Biochemistry and Evidence for Modulation of Fibrinolysis In Vivo. *Semin Thromb Hemost* 18, 67,80.
- Kuiper, G. G. J. M., 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} 10.1210/en.139.10.4252. *Endocrinology* 139, 4252-4263.
- Kulakosky, P., McCarty, M., Jernigan, S., Risinger, K., and Klinge, C. (2002). Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity. *J Mol Endocrinol* 29, 137-152.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.-R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- Kuntzsch, A. (2000) Untersuchungen zum Einfluß von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau., Naturwissenschaftliche Dissertation., Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Halle (Saale).
- Kuratsune, M., Nakamura, Y. und Ikeda, M. (1987). Analysis of deaths seen among patients with Yusho – a preliminary report. *Chemosphere* 16, 2085-2088.
- Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M., and Webb, P. (2000). Estrogen receptor pathways to AP-1. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 74, 311-317.
- Lai, Z.-W., Hundeiker, C., Gleichmann, E., and Esser, C. (1997). Cytokine Gene Expression during Ontogeny in Murine Thymus on Activation of the Aryl Hydrocarbon Receptor by 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Molecular Pharmacology* 52, 30-37.
- LaRonda, L., Henck, JW, Breslin, WJ, DeSesso, JM (2004). Hazard Identification and Predictability of Children's Health Risk from Animal Data. *Environmental Health Perspectives* 112, 266-271.
- Leblanc, K., Sexton, E, Parent, S, Bélanger, G, Déry, MC, Boucher, V, Asselin, E. (2007). Effects of 4-hydroxytamoxifen, raloxifene and ICI 182 780 on survival of uterine cancer cell lines in the presence and absence of exogenous estrogens. *Int J Oncol* 30(2), 477-487.
- Lee, H., and Bai, W. (2002). Regulation of Estrogen Receptor Nuclear Export by Ligand-Induced and p38-Mediated Receptor Phosphorylation. *Mol Cell Biol* 22, 5835-5845.
- Leonardsson, G., Peng, X. R., Liu, K., Nordström, L., Carmeliet, P., Mulligan, R., Colten, D., and Ny, T. (1995). Ovulation efficiency is reduced in mice that lack plas-

- minogen activator gene function: functional redundancy among physiological plasminogen activators. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *92*, 12446-12450.
- Leung, B. S., and Potter, A. H. (1987). Mode of estrogen action on cell proliferation in CAMA-1 cells: II. Sensitivity of G1 phase population. *Journal of Cellular Biochemistry* *34*, 213-225.
- Levin, E. R. (2003a). Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol Endocrinol* *17*, 309-317.
- Levin, E. R. (2003b). Bidirectional Signaling between the Estrogen Receptor and the Epidermal Growth Factor Receptor. *Mol Endocrinol* *17*, 309-317.
- Leyendecker, G., Kunz, G., Herbertz, M., Beil, D., Huppert, P., Mall, G., Kissler, S., Noe, M., Wildt, L. (2004). Uterine Peristaltic Activity and the Development of Endometriosis. *Annals of the New York Academy of Sciences* *1034*, 338-355.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Watson, P., and Murphy, L. (1998). Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis. *Cancer Res* *58*, 3197 - 3201.
- Li, L., Haynes, M. P., and Bender, J. R. (2003). Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *100*, 4807-4812.
- Li, M., Zhao, Y., and Hansen, L. (1994). Multiple dose toxicokinetic influence on the estrogenicity of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl. *Bull Environ Contam Toxicol* *53*, 583 - 590.
- Li, X., Zhang, S., and Safe, S. (2006). Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17[beta]-estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *98*, 122-132.
- Lim, H., Paria, B. C., Das, S. K., Dinchuk, J. E., Langenbach, R., Trzaskos, J. M., and Dey, S. K. (1997). Multiple Female Reproductive Failures in Cyclooxygenase 2 Deficient Mice. *Cell* *91*, 197-208.
- Linderholm, B. K., Lindahl, T., Holmberg, L., Klaar, S., Lennerstrand, J., Henriksson, R., and Bergh, J. (2001). The Expression of Vascular Endothelial Growth Factor Correlates with Mutant p53 and Poor Prognosis in Human Breast Cancer. *Cancer Res* *61(5)*, 2256-2260.
- Lobenhofer, E. K., Bennett, L., Cable, P. L., Li, L., Bushel, P. R., and Afshari, C. A. (2002). Regulation of DNA Replication Fork Genes by 17{beta}-Estradiol. *Mol Endocrinol* *16*, 1215-1229.
- Loeber, J., van Velsen, FL. (1984). Uterotropic effect of beta-HCH, a food chain contaminant. *Food Addit Contam* *1*, 63-66.
- Louis, B., G.M., Weiner, J. M., Whitcomb, B. W., Sperrazza, R., Schisterman, E. F., Lobdell, D. T., Crickard, K., Greizerstein, H., and Kostyniak, P. J. (2005). Environmental PCB exposure and risk of endometriosis. *Human Reproduction* *20*, 279-285.
- Macdonal, R., Barrie, L., Bidleman, T., Diamond, M., Gregor, D., Semkin, R., Strachan, W., Li, Wania, F., Alae, M., *et al.* (2000). Contaminants in the Canadian Arctic: 5 years of progress in understanding sources, occurrence and pathways. *Sci Total Environ* *254(2-3)*, 93-234.
- Maggiolini, M., Vivacqua, A., Fasanella, G., Recchia, A. G., Sisci, D., Pezzi, V., Montanaro, D., Musti, A. M., Picard, D., and Ando, S. (2004). The G Protein-coupled Receptor GPR30 Mediates c-fos Up-regulation by 17{beta}-Estradiol and Phytoestrogens in Breast Cancer Cells. *J Biol Chem* *279*, 27008-27016.

- Makela, S., Davis, VL, Tally, WC, Korkman, J, Salo, L, Vihko, R, Santti, R, Korach, KS. (1994). Dietary Estrogens Act through Estrogen Receptor-Mediated Processes and Show No Antiestrogenicity in Cultured Breast Cancer Cells. *Environ Health Perspect* 102(6-7), 572-578.
- Marbaix, E., Kokorine, I., Moulin, P., Donnez, J., Eeckhout, Y., and Courtoy, P. J. (1996). Menstrual breakdown of human endometrium can be mimicked in vitro and is selectively and reversibly blocked by inhibitors of matrix metalloproteinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9120-9125.
- Markaverich, B. M., Webb, B, Densmore, C L, and Gregory, R R (1995). Effects of coumestrol on estrogen receptor function and uterine growth in ovariectomized rats. *Environ Health Perspect* 103(6), 574–581.
- Martineau, D., Lemberger, Karin, Dallaire, André, Labelle, Philippe, Lipscomb, Thomas P, Michel, Pascal, and Mikaelian Igor (2002). Cancer in wildlife, a case study: beluga from the St. Lawrence estuary, Québec, Canada. *Environ Health Perspect* 110(3), 285–292.
- Massarweh, S., and Schiff, R. (2006). Resistance to endocrine therapy in breast cancer: exploiting estrogen receptor/growth factor signaling crosstalk. *Endocr Relat Cancer* 13, S15-24.
- Matthews, J., and Gustafsson, J.-A. (2003). Estrogen signaling: a subtle balance between ER alpha and ER beta. *Mol Interv* 3, 281 - 292.
- Matthews, J., and Gustafsson, J.-Å. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* 4, e016.
- Matthews, J., Wihlen, B., Thomsen, J., and Gustafsson, J. (2005). Aryl hydrocarbon receptor-mediated transcription: ligand-dependent recruitment of estrogen receptor alpha to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-responsive promoters. *Mol Cell Biol* 25, 5317 - 5328.
- McCarty, K. S., Szabo, E., Flowers, J. L., Cox, E. B., Leight, G. S., Miller, L., Konrath, J., Soper, J. T., Budwit, D. A., Creasman, W. T., and Seigler, H. F. (1986). Use of a Monoclonal Anti-Estrogen Receptor Antibody in the Immunohistochemical Evaluation of Human Tumors. *Cancer Research* 46, 4244s-4248s.
- McDevitt, M., Glidewell-Kenney, C, Jimenez, MA, Ahearn, PC,, and Weiss, J., Jame-son, JL, Levine, JE (2008). New insights into the classical and non-classical actions of estrogen: evidence from estrogen receptor knock-out and knock-in mice. *Mol Cell Endocrinol* 290, 24-30.
- McKenna, N., Lanz, R., and O'Malley, B. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocr Rev* 20, 321 - 344.
- McLachlan, J. A. (2001a). Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 22, 319-341.
- McLachlan, J. A. (2001b). Environmental Signaling: What Embryos and Evolution Teach Us About Endocrine Disrupting Chemicals. *Endocr Rev* 22, 319-341.
- Menasce, L. P., White, G. R. M., Harrison, C. J., and Boyle, J. M. (1993). Localization of the Estrogen Receptor Locus (ESR) to Chromosome 6q25.1 by FISH and a Simple Post-FISH Banding Technique. *Genomics* 17, 263-265.
- Meyer, M.-E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.-T., Tasset, D., and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57, 433-442.
- Migliaccio, A., Domenico, M Di, Castoria, G, de Falco, A, Bontempo, P, Nola, E, and Auricchio F (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 15(6), 1292–1300.

- Montano, M., Ekena, K., Delage-Mourroux, R., Chang, W., Martini, P., and Katzenellenbogen, B. (1999). An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens. *Proc Natl Acad Sci USA* *96*, 6947 - 6952.
- Moriarty, K., Kim, K. H., and Bender, J. R. (2006). Estrogen Receptor-Mediated Rapid Signaling. *Endocrinology* *147*, 5557-5563.
- Morley, P., Whitfield, J., Vanderhyden, B., Tsang, B., and Schwartz, J. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* *131*, 1305-1312.
- Mortensen, A. S., and Arukwe, A. (2008). Estrogenic effect of dioxin-like aryl hydrocarbon receptor (AhR) agonist (PCB congener 126) in salmon hepatocytes. *Marine Environmental Research*
- Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14, Fourteenth International Symposium on Pollutant Responses in Marine Organisms (PRIMO 14) *66*, 119-120.
- Mueller, M. D., Vigne, J.-L., Streich, M., Tee, M. K., Raio, L., Dreher, E., Bersinger, N. A., and Taylor, R. N. (2005). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-Dioxin Increases Glycodelin Gene and Protein Expression in Human Endometrium. *J Clin Endocrinol Metab* *90*, 4809-4815.
- Mulero-Navarro, S., Carvajal-Gonzalez, J. M., Herranz, M., Ballestar, E., Fraga, M. F., Ropero, S., Esteller, M., and Fernandez-Salguero, P. M. (2006). The dioxin receptor is silenced by promoter hypermethylation in human acute lymphoblastic leukemia through inhibition of Sp1 binding. *Carcinogenesis* *27*, 1099-1104.
- Musgrove, E. A., Lee, C. S., Buckley, M. F., and Sutherland, R. L. (1994). Cyclin D1 induction in breast cancer cells shortens G1 and is sufficient for cells arrested in G1 to complete the cell cycle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 8022-8026.
- Nau, h. (2006). Wirkungen und Wirkungsmechanismen von „Dioxinen“ im menschlichen und tierischen Organismus. *Dtsch Tierärztl Wschr* *113*, Heft 8, 289-320.
- Nawaz, Z., Stancel, G. M., and Hyder, S. M. (1999). The Pure Antiestrogen ICI 182,780 Inhibits Progesterin-induced Transcription. *Cancer Research* *59*, 372-376.
- Needham, L. L., Patterson, D. G., Barr, D. B., Grainger, J., and Calafat, A. M. (2005). Uses of speciation techniques in biomonitoring for assessing human exposure to organic environmental chemicals. In *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 397-404.
- Nesaretnam, K., and Darbre, P. (1997). 3,5,3',5'-tetrachlorobiphenyl is a weak oestrogen agonist in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol* *62*, 409 - 418.
- Nethrapalli, I. S., Tinnikov, A. A., Krishnan, V., Lei, C. D., and Toran-Allerand, C. D. (2005). Estrogen Activates Mitogen-Activated Protein Kinase in Native, Nontransfected CHO-K1, COS-7, and RAT2 Fibroblast Cell Lines. *Endocrinology* *146*, 56-63.
- Nicholson, R., Gee, JM, Manning, DL, Wakeling, AE, Montano, MM, Katzenellenbogen, BS. (1995). Responses to Pure Antiestrogens (ICI 164384, ICI182780) in Estrogen-Sensitive and-Resistant Experimental and Clinical Breast Cancer. *Annals of the New York Academy of Sciences* *761*, 148-163.
- NIH (2001). National Toxicology Program; Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose, Peer Review, N. National Institute of Environmental Health Sciences, ed.
- Niskar, A. S., Needham, L. L., Rubin, C., Turner, W. E., Martin, C. A., Patterson Jr., D. G., Hasty, L., Wong, L.-Y., and Marcus, M. (2009). Serum dioxins, polychlorinated biphenyls, and endometriosis: A case-control study in Atlanta. *Chemosphere* *74*, 944-949.

- Oh, A. S., Lorant, L. A., Holloway, J. N., Miller, D. L., Kern, F. G., and El-Ashry, D. (2001). Hyperactivation of MAPK Induces Loss of ER{alpha} Expression in Breast Cancer Cells. *Mol Endocrinol* 15, 1344-1359.
- Ohshima, H., Tatemichi, M., and Sawa, T. (2003). Chemical basis of inflammation-induced carcinogenesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 417, 3-11.
- Ohtake, F., Baba, A., Fujii-Kuriyama, Y., and Kato, S. (2008). Intrinsic AhR function underlies cross-talk of dioxins with sex hormone signalings. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 370(4), 541-546.
- Ohtake, F., Takeyama, K., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., *et al.* (2003a). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423, 545 - 550.
- Ohtake, F., Takeyama, K.-i., Matsumoto, T., Kitagawa, H., Yamamoto, Y., Nohara, K., Tohyama, C., Krust, A., Mimura, J., Chambon, P., *et al.* (2003b). Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. 423, 545-550.
- Ohuchi, N., Thor, A., Page, D. L., Hand, P. H., Halter, S. A., and Schlom, J. (1986). Expression of the 21,000 Molecular Weight ras Protein in a Spectrum of Benign and Malignant Human Mammary Tissues. *Cancer Research* 46, 2511-2519.
- Osborne, C. K., Shou, J., Massarweh, S., and Schiff, R. (2005). Crosstalk between Estrogen Receptor and Growth Factor Receptor Pathways as a Cause for Endocrine Therapy Resistance in Breast Cancer. *Clinical Cancer Research* 11, 865s-870s.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A., Kushner, P., and Scanlan, T. (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277, 1508 - 1510.
- Papazisis, K. T., Geromichalos, G. D., Dimitriadis, K. A., and Kortsaris, A. H. (1997). Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. *Journal of Immunological Methods* 208, 151-158.
- Parkinson, A., Thomas, P. E., Ryan, D. E., Reik, L. M., Safe, S. H., Robertson, L. W., and Levin, W. (1983). Differential time course of induction of rat liver microsomal cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase by Aroclor 1254. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 225, 203-215.
- Paruthiyil, S., Parmar, H., Kerekatte, V., Cunha, G. R., Firestone, G. L., and Leitman, D. C. (2004). Estrogen Receptor {beta} Inhibits Human Breast Cancer Cell Proliferation and Tumor Formation by Causing a G2 Cell Cycle Arrest. *Cancer Res* 64, 423-428.
- Pauwels, A., Schepens, P. J. C., D'Hooghe, T., Delbeke, L., Dhont, M., Brouwer, A., and Weyler, J. (2001). The risk of endometriosis and exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls: a case-control study of infertile women. *Human Reproduction* 16, 2050-2055.
- Payne, J., Scholze, M., and Kortenkamp, A. (2001). Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect* 109, 391 - 397.
- Payne, J. F., and Penrose, W. R. (1975). Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. In *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* (Springer New York), pp. 112-116.
- Perel, E., and Lindner, H. R. (1970). Dissociation of uterotrophic action from implantation-inducing activity in two non-steroidal oestrogens (coumestrol and genistein). *J Reprod Fertil* 21, 171-175.

- Pietras, R. J., and Marquez-Garban, D. C. (2007). Membrane-Associated Estrogen Receptor Signaling Pathways in Human Cancers. *Clinical Cancer Research* 13, 4672-4676.
- Pink, J. J., and Jordan, V. C. (1996). Models of Estrogen Receptor Regulation by Estrogens and Antiestrogens in Breast Cancer Cell Lines. *Cancer Research* 56, 2321-2330.
- Pitt, J. A., Feng, L., Abbott, B. D., Schmid, J., Batt, R. E., Costich, T. G., Koury, S. T., and Bofinger, D. P. (2001). Expression of AhR and ARNT mRNA in Cultured Human Endometrial Explants Exposed to TCDD. *Toxicological Sciences* 62, 289-298.
- Pliskova, M., Vondracek, J., Canton, R., Nera, J., Kocan, A., Petrik, J., Trnovec, T., Sanderson, T., van den, B., and Machala, M. (2005). Impact of polychlorinated biphenyls contamination on estrogenic activity in human male serum. *Environ-Health Perspect* 113, 1277 - 1284.
- Porpora, M. G., Ingelido, A. M., Domenico, A. d., Ferro, A., Crobu, M., Pallante, D., Cardelli, M., Cosmi, E. V., and De Felip, E. (2006). Increased levels of polychlorobiphenyls in Italian women with endometriosis. *Chemosphere* 63, 1361-1367.
- Porpora, M. G., Medda, E., Abballe, A., Bolli, S., De Angelis, I., di Domenico, A., Ferro, A., Ingelido, A. M., Maggi, A., Panici, P. B., and De Felip, E. (2009). Endometriosis and Organochlorinated Environmental Pollutants: A Case-Control Study on Italian Women of Reproductive Age. *Environ Health Perspect* 117.
- Propper, C. R. (2005). The Study of Endocrine-Disrupting Compounds: Past Approaches and New Directions. *Integrative and Comparative Biology* 45, 194-200.
- Prossnitz, E. R., Arterburn, J. B., Smith, H. O., Oprea, T. I., Sklar, L. A., and Hathaway, H. J. (2008). Estrogen Signaling through the Transmembrane G Protein-Coupled Receptor GPR30. *Annual Review of Physiology* 70, 165-190.
- Ptak, A., Mazur, K., and Gregoraszczyk, E. L. (2010). Comparison of combinatory effects of PCBs (118, 138, 153 and 180) with 17beta-estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicology and Industrial Health*.
- Puga, A., Barnes, S. J., Dalton, T. P., Chang, C.-y., Knudsen, E. S., and Maier, M. A. (2000). Aromatic Hydrocarbon Receptor Interaction with the Retinoblastoma Protein Potentiates Repression of E2F-dependent Transcription and Cell Cycle Arrest. *Journal of Biological Chemistry* 275, 2943-2950.
- Puga, A., Hoffer, A., Zhou, S., Bohm, J. M., Leikauf, G. D., and Shertzer, H. G. (1997). Sustained Increase in Intracellular Free Calcium and Activation of Cyclooxygenase-2 Expression in Mouse Hepatoma Cells Treated with Dioxin. *Biochemical Pharmacology* 54, 1287-1296.
- Radice, S., Chiesara, E., Fucile, S., and Marabini, L. (2008). Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2561-2567.
- Rantanen, J. (1992). Industrial and Environmental Emergencies; Lessons Learned. *Organohalogen Compounds* 10, 291-294.
- Rasmussen, T., Nielsen, F., Andersen, H., Nielsen, J., Weihe, P., and Grandjean, P. (2003). Assessment of xenoestrogenic exposure by a biomarker approach: application of the E-Screen bioassay to determine estrogenic response of serum extracts. *Environ Health* 2, 12.
- Rattenborg, T., Gjermansen, I., and Bonefeld-Jorgensen, E. (2002). Inhibition of E2-induced expression of BRCA1 by persistent organochlorines. *Breast Cancer Res* 4, R12.
- Razandi, M., Pedram, A., Merchenthaler, I., Greene, G. L., and Levin, E. R. (2004). Plasma Membrane Estrogen Receptors Exist and Functions as Dimers. *Mol Endocrinol* 18, 2854-2865.

- Reddy, B. S., Rozati, R., Reddy, S., Kodampur, S., Reddy, P., and Reddy, R. (2006). High plasma concentrations of polychlorinated biphenyls and phthalate esters in women with endometriosis: a prospective case control study. *Fertility and sterility* 85, 775-779.
- Reijnders, P. J. H. (1986). Reproductive failure in common seals feeding on fish from polluted coastal waters. *324*, 456-457.
- Revankar, C. M., Cimino, D. F., Sklar, L. A., Arterburn, J. B., and Prossnitz, E. R. (2005). A Transmembrane Intracellular Estrogen Receptor Mediates Rapid Cell Signaling. *Science* 307, 1625-1630.
- Ricci, M. S., Toscano, D. G., Mattingly, C. J., and Toscano, W. A. (1999). Estrogen Receptor Reduces CYP1A1 Induction in Cultured Human Endometrial Cells. *Journal of Biological Chemistry* 274, 3430-3438.
- Rier, S., and Foster, W. G. (2002). Environmental Dioxins and Endometriosis. *Toxicological Sciences* 70, 161-170.
- Rier, S. E., Martin, D. C., Bowman, R. E., Dmowski, W. P., and Becker, J. L. (1993). Endometriosis in Rhesus Monkeys (*Macaca mulatta*) Following Chronic Exposure to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicological Sciences* 21, 433-441.
- Rier, S. M., D. C.; Bowman, R.E. and Becker J. L. (1995). Immuno-responsiveness in endometriosis: implications of estrogenic toxicants. *Environ Health Perspect* 103(7), 151-156.
- Rylander, L., and Hagmar, L. (1995). Mortality and cancer incidence among women with a high consumption of fatty fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Scand J Work Environ Health* 21, 419 - 426.
- Rylander, L., Stromberg, U. und Hagmar, L. (1995b). Decreased birthweight among infants born to women with a high dietary intake of fish contaminated with persistent organochlorine compounds. *Scand J Work Environ Health* 21, 368-375.
- Safe, S. (1992). Toxicology, structure-function relationships, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls (PCBs): Progress and problems. *Environ Health Perspect* 100, 259-268.
- Safe, S. (2001). Transcriptional activation of genes by 17[beta]-estradiol through estrogen receptor-Sp1 interactions. In *Vitamins & Hormones* (Academic Press), pp. 231-252.
- Safe, S., and Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* 16, 807 - 816.
- Sainsbury, J. R. C., Sherbet, G. V., Farndon, J. R., and Harris, A. L. (1985). Epidermal-growth-factor receptors and oestrogen receptors in human breast cancer. *The Lancet* 325, 364-366.
- Saitoh, M., Yanase, T., Morinaga, H., Tanabe, M., Mu, Y.-M., Nishi, Y., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Takayanagi, R., and Nawata, H. (2001). Tributyltin or Triphenyltin Inhibits Aromatase Activity in the Human Granulosa-like Tumor Cell Line KGN. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 289, 198-204.
- Salamonsen, L. A., and Woolley, D. E. (1996). Matrix metalloproteinases in normal menstruation. *Human Reproduction* 11, 124-133.
- Salamonsen, L. A., Zhang, J., and Brasted, M. (2002). Leukocyte networks and human endometrial remodeling. *Journal of reproductive immunology* 57, 95-108.
- Salomon, D. S., Brandt, R., Ciardiello, F., and Normanno, N. (1995). Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 19, 183-232.

- Sanderson, J. T., Seinen, W., Giesy, J. P., and van den Berg, M. (2000). 2-Chloro-s-Triazine Herbicides Induce Aromatase (CYP19) Activity in H295R Human Adrenocortical Carcinoma Cells: A Novel Mechanism for Estrogenicity? *Toxicological Sciences* 54, 121-127.
- Sappino, A. P., Huarte, J., Belin, D., and Vassalli, J. D. (1989). Plasminogen activators in tissue remodeling and invasion: mRNA localization in mouse ovaries and implanting embryos. *The Journal of Cell Biology* 109, 2471-2479.
- Sarkar, S., Jana, NR, Yonemoto, J, Tohyama, C, Sone, H. (2000). Estrogen enhances induction of cytochrome P-450A1 by 2,3,7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in liver of female Long-Evans rats. *Int J Oncol* 16(1), 141-147.
- Schlumpf, M., Schmid, P., Durrer, S., Conscience, M., Maerkel, K., Henseler, M., Gruetter, M., Herzog, I., Reolon, S., Ceccatelli, R., *et al.* (2004). Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters--an update. *Toxicology, Multi-Organic Risk Assessment of Endocrine Disrupters - Workshop 205*, 113-122.
- Schmitt, M., Harbeck, N., Thomssen, C., Wilhelm, O., Magdolen, V., Reuning, U., Ulm, K., Höfler, H., Jänicke, F., Graeff, H. (1997). Clinical impact of the plasminogen activation system in tumor invasion and metastasis: prognostic relevance and target for therapy. *78(1)*, 285-296.
- Schulte, P., Burnett, C., and Boeniger, M. (1982). Neurodegenerative diseases: occupational occurrence and potential risk factors, 1982 through 1991. *Am J Public Health* 86, 1281-1288.
- Schwabe, J., and Teichmann, S. (2004). Nuclear receptors: the evolution of diversity. *Sci STKE* 2004, pe4.
- Seliger, E., Kaltwasser P., Buchmann J., Blüthgen A., and F., R. (1995). Akkumulation polychlorierter Kohlenwasserstoffe im humanen Endometrium. *J Fertil Reprod* 3, 16.
- Shah, S., Hess-Wilson, J. K., Webb, S., Daly, H., Godoy-Tundidor, S., Kim, J., Boldison, J., Daaka, Y., and Knudsen, K. E. (2008). 2,2-Bis(4-Chlorophenyl)-1,1-Dichloroethylene Stimulates Androgen Independence in Prostate Cancer Cells through Combinatorial Activation of Mutant Androgen Receptor and Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *Molecular Cancer Research* 6, 1507-1520.
- Sharara, F., I (1999). The role of hydrosalpinx in IVF: simply mechanical? *Human Reproduction* 14, 577-578.
- Simecková, P., Vondráček, J., Procházková, J., Kozubík, A., Krčmár, P., and Machala, M. (2009). 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl (PCB 153) induces degradation of adherens junction proteins and inhibits [beta]-catenin-dependent transcription in liver epithelial cells. *Toxicology* 260, 104-111.
- Simoncini, T., Rabkin, E., and Liao, J. K. (2003). Molecular Basis of Cell Membrane Estrogen Receptor Interaction With Phosphatidylinositol 3-Kinase in Endothelial Cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 198-203.
- Skehan, P. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *82*, 1107-1112.
- Smith, H. O., Arias-Pulido, H., Kuo, D. Y., Howard, T., Qualls, C. R., Lee, S.-J., Verschraegen, C. F., Hathaway, H. J., Joste, N. E., and Prossnitz, E. R. (2009). GPR30 predicts poor survival for ovarian cancer. *Gynecologic Oncology* 114, 465-471.
- Smith, H. O., Leslie, K. K., Singh, M., Qualls, C. R., Revankar, C. M., Joste, N. E., and Prossnitz, E. R. (2007). GPR30: a novel indicator of poor survival for endometrial carcinoma. *American journal of obstetrics and gynecology* 196, 386.e381-386.e311.

- Sohoni, P., and Sumpter, J. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol* 158, 327 - 339.
- Son, D.-S., and Rozman, K. (2002). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) induces plasminogen activator inhibitor-1 through an aryl hydrocarbon receptor-mediated pathway in mouse hepatoma cell lines. In *Archives of Toxicology* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 404-413.
- Son, D.-S., Ushinohama, K., Gao, X., Taylor, C. C., Roby, K. F., Rozman, K. K., and Terranova, P. F. (1999). 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reproductive Toxicology* 13, 521-530.
- Song, R. X.-D., McPherson, R. A., Adam, L., Bao, Y., Shupnik, M., Kumar, R., and Santen, R. J. (2002). Linkage of Rapid Estrogen Action to MAPK Activation by ER{alpha}-Shc Association and Shc Pathway Activation. *Mol Endocrinol* 16, 116-127.
- Song, R. X.-D., and Santen, R. J. (2006). Membrane Initiated Estrogen Signaling in Breast Cancer. *Biology of Reproduction* 75, 9-16.
- Soto, A., Chung, K., and Sonnenschein, C. (1994). The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect* 102, 380 - 383.
- Soto, A., Sonnenschein, C., Chung, K., Fernandez, M., Olea, N., and Serrano, F. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103, 113 - 122.
- Speirs, V., Parkes, A. T., Kerin, M. J., Walton, D. S., Carleton, P. J., Fox, J. N., and Atkin, S. L. (1999). Coexpression of Estrogen Receptor {alpha} and {beta}: Poor Prognostic Factors in Human Breast Cancer? *Cancer Res* 59, 525-528.
- Spink, D. C., Eugster, H.-P., Lincoln, D. W., Schuetz, J. D., Schuetz, E. G., Johnson, J. A., Kaminsky, L. S., and Gierthy, J. F. (1992). 17[beta]-Estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: A comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 293, 342-348.
- Spink, D. C., Katz, B. H., Hussain, M. M., Spink, B. C., Wu, S. J., Liu, N., Pause, R., and Kaminsky, L. S. (2002). Induction of CYP1A1 and CYP1B1 in T-47D Human Breast Cancer Cells by Benzo[a]pyrene Is Diminished by Arsenite. *Drug Metabolism and Disposition* 30, 262-269.
- Steele, V. E., Hawk, E. T., Viner, J. L., and Lubet, R. A. (2003). Mechanisms and applications of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the chemoprevention of cancer. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 523-524, 137-144.
- Steinmetz, R., Young, P., Caperell-Grant, A., Gize, E., Madhukar, B., Ben Jonathan, N., and Bigsby, R. (1996). Novel estrogenic action of the pesticide residue beta-hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res* 56, 5403 - 5409.
- Stoner, M., Wormke, M., Saville, B., Samudio, I., Qin, C., Abdelrahim, M., and Safe, S. (2003). Estrogen regulation of vascular endothelial growth factor gene expression in ZR-75 breast cancer cells through interaction of estrogen receptor [alpha] and SP proteins. 23, 1052-1063.
- Strathmann, J., Schwarz, M., Tharappel, J. C., Glauert, H. P., Spear, B. T., Robertson, L. W., Appel, K. E., and Buchmann, A. (2006). PCB 153, a Non-dioxin-

- like Tumor Promoter, Selects for beta-Catenin (Catnb)-Mutated Mouse Liver Tumors. *Toxicological Sciences* 93, 34-40.
- Suh, J., Kang, J. S., Yang, K.-H., and Kaminski, N. E. (2003). Antagonism of aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of CYP1A1 and inhibition of IgM expression by di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Toxicology and Applied Pharmacology* 187, 11-21.
- Sutherland, R. L., Prall, O. W. J., Watts, C. K. W., and Musgrove, E. A. (1998). Estrogen and Progestin Regulation of Cell Cycle Progression. In *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* (Springer Netherlands), pp. 63-72.
- Sutter, T. R., Guzman, K., Dold, K. M., and Greenlee, W. F. (1991). Targets for dioxin: Genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1. *Science* 254(5030), 415-418.
- Swanson, H. I. (2002). DNA binding and protein interactions of the AHR/ARNT heterodimer that facilitate gene activation. *Chemico-Biological Interactions* 141, 63-76.
- Tesarik, J., and Mendoza, C. (1997). Direct non-genomic effects of follicular steroids on maturing human oocytes: oestrogen versus androgen antagonism. *Human Reproduction Update* 3, 95-100.
- Tharappel, J. C., Lee, E. Y., Robertson, L. W., Spear, B. T., and Glauert, H. P. (2002). Regulation of Cell Proliferation, Apoptosis, and Transcription Factor Activities during the Promotion of Liver Carcinogenesis by Polychlorinated Biphenyls. *Toxicology and Applied Pharmacology* 179, 172-184.
- Thomas, P., and Dong, J. (2006). Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: A potential novel mechanism of endocrine disruption. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 102, 175-179.
- Thomas, P., Pang, Y., Filardo, E. J., and Dong, J. (2005). Identity of an Estrogen Membrane Receptor Coupled to a G Protein in Human Breast Cancer Cells. *Endocrinology* 146, 624-632.
- Thomsen, J. S., Wang, X., Hines, R. N., and Safe, S. (1994). Restoration of aryl hydrocarbon (Ah) responsiveness in MDA-MB-231 human breast cancer cells by transient expression of the estrogen receptor. *Carcinogenesis* 15, 933-937.
- Thornton, J. W., Need, E., and Crews, D. (2003). Resurrecting the Ancestral Steroid Receptor: Ancient Origin of Estrogen Signaling. *Science* 301, 1714-1717.
- Toran-Allerand, C. D., Guan, X., MacLusky, N. J., Horvath, T. L., Diano, S., Singh, M., Connolly, E. S., Jr, Nethrapalli, I. S., and Tinnikov, A. A. (2002). ER-X: A Novel, Plasma Membrane-Associated, Putative Estrogen Receptor That Is Regulated during Development and after Ischemic Brain Injury. *J Neurosci* 22, 8391-8401.
- Trabert, B., De Roos, A. J., Schwartz, S. M., Peters, U., Scholes, D., Barr, D. B., and Holt, V. L. (2010). Non-Dioxin-Like Polychlorinated Biphenyls and Risk of Endometriosis. *Environ Health Perspect*.
- Tsukino, H., Hanaoka, T., Sasaki, H., Motoyama, H., Hiroshima, M., Tanaka, T., Kabuto, M., Niskar, A. S., Rubin, C., Patterson, J., Donald G., *et al.* (2005). Associations between serum levels of selected organochlorine compounds and endometriosis in infertile Japanese women. *Environmental Research* 99, 118-125.
- Umannová, L., Neca, J., Andrysík, Z., Vondráček, J., Upham, B. L., Trosko, J. E., Hofmanová, J., Kozubík, A., and Machala, M. (2008). Non-dioxin-like polychlorinated biphenyls induce a release of arachidonic acid in liver epithelial cells: A partial role of cytosolic phospholipase A2 and extracellular signal-regulated kinases 1/2 signalling. *Toxicology* 247, 55-60.

- van Meeuwen, J. A., van den Berg, M., Sanderson, J. T., Verhoef, A., and Piersma, A. H. (2007). Estrogenic effects of mixtures of phyto- and synthetic chemicals on uterine growth of prepubertal rats. *Toxicology Letters* 170, 165-176.
- Van Velsen, F. L., Danse, L. H. J. C., Van Leeuwen, F. X. R., Dormans, J. A. M. A., and Van Logten, M. J. (1986). The subchronic oral toxicity of the [beta]-isomer of hexachlorocyclohexane in rats. *Fundamental and Applied Toxicology* 6, 697-712.
- Vassalli, J. D., Sappino, A. P., and Belin, D. (1991). The plasminogen activator/plasmin system. *The Journal of Clinical Investigation* 88, 1067-1072.
- Vezina, C., M., Walker, N., J., and Olson, J. R. (2004). Subchronic Exposure to TCDD, PeCDF, PCB126, and PCB153: Effect on Hepatic Gene Expression. *Environ Health Perspect* 112(16), 1636-1644.
- Vichai, V., and Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. 1, 1112-1116.
- Viglietto, G., Maglione, D., Rambaldi, M., Cerutti, J., Romano, A., Trapasso, F., Fedele, M., Ippolito, P., Chiappetta, G., Botti, G. (1995). Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene* 11(8), 1569-1579.
- Villa, R., Bonetti, E., Penza, M. L., Iacobello, C., Bugari, G., Bailo, M., Parolini, O., Apostoli, P., Caimi, L., Ciana, P., *et al.* (2004). Target-specific action of organochlorine compounds in reproductive and nonreproductive tissues of estrogen-reporter male mice. *Toxicology and Applied Pharmacology* 201, 137-148.
- Vogel, C., and Abel, J. (1995). Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line MCF-7. *Arch Toxicol* 69(4), 259-265.
- Vogel, C., Boerboom, A.-M. J. F., Baechle, C., El-Bahay, C., Kahl, R., Degen, G. H., and Abel, J. (2000). Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. *Carcinogenesis* 21, 2267-2274.
- Voigt, W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol Med* 110, 39-48.
- Vondracek, J., Machala, M., Bryja, V., Chramostova, K., Krcmar, P., Dietrich, C., Hampl, A., and Kozubik, A. (2005). Aryl Hydrocarbon Receptor-Activating Polychlorinated Biphenyls and Their Hydroxylated Metabolites Induce Cell Proliferation in Contact-Inhibited Rat Liver Epithelial Cells. *Toxicological Sciences* 83, 53-63.
- Wakeling, A. E., and Bowler, J. (1987). Steroidal pure antiestrogens. *J Endocrinol* 112, R7-10.
- Wang, F., Hoivik, D., Pollenz, R., and Safe, S. (1998). Functional and physical interactions between the estrogen receptor Sp1 and nuclear aryl hydrocarbon receptor complexes. *Nucleic Acids Research* 26, 3044-3052.
- Wang, W. L., Porter, W., Burghardt, R., and Safe, S. H. (1997). Mechanism of inhibition of MDA-MB-468 breast cancer cell growth by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis* 18, 925-933.
- Weihua, Z., Saji, S., Makinen, S., Cheng, G., Jensen, E. V., Warner, M., and Gustafsson, J.-A. (2000). Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97, 5936-5941.
- Wei, C., Kolluri, S. K., Kiefer, F., and Gttlicher, M. (1996). Complementation of Ah Receptor Deficiency in Hepatoma Cells: Negative Feedback Regulation and Cell Cycle Control by the Ah Receptor. *Experimental Cell Research* 226, 154-163.
- Willing, C., Peich, M., Danescu, A., Kehlen, A., Fowler, P., and Hombach-Klonisch, S. (2010). Estrogen-independent actions of environmentally relevant AhR-

- agonists in human endometrial epithelial cells. *Molecular Human Reproduction Epub*.
- Wilson, J. Y., Cooke, S. R., Moore, M. J., Martineau, D., Mikaelian, I., Metner, D. A., Lockhart, W. L., and Stegeman, J. J. (2005). Systemic Effects of Arctic Pollutants in Beluga Whales Indicated by CYP1A1 Expression. *Environ Health Perspect* 113.
- Woessner, J. (1991). Matrix metalloproteinases and their inhibitors in connective tissue remodeling. *The FASEB Journal* 5, 2145-2154.
- Wolff, M., Camann, D., Gammon, M., Stellman, S. (1997). Proposed PCB congener groupings for epidemiological studies. *Environ Health Perspect* 105(1), 13-14.
- Wölfle, D., Marotzki, S., Dartsch, D., Schäfer, W., and Marquardt, H. (2000). Induction of cyclooxygenase expression and enhancement of malignant cell transformation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p-dioxin. *Carcinogenesis* 21, 15-21.
- Wong, P., and Matsumura, F. (2007). Promotion of breast cancer by beta-Hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice. *BMC Cancer* 7, 130.
- Wormke, M., Castro-Rivera, E., Chen, I., and Safe, S. (2000a). Estrogen and aryl hydrocarbon receptor expression and crosstalk in human Ishikawa endometrial cancer cells. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 72, 197-207.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., and Safe, S. (2000b). Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes. *FEBS Lett* 478, 109 - 112.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., and Safe, S. (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23, 1843 - 1855.
- Wu, Y., and Guo, S.-W. (2006). Inhibition of Proliferation of Endometrial Stromal Cells by Trichostatin A, RU486, CDB-2914, N-Acetylcysteine, and ICI 182780. *Gynecologic and Obstetric Investigation* 62, 193-205.
- Wülfing, P., and Kiesel, L. (2005). Aromataseinhibitoren zur Therapie der Endometriose? In *Der Gynäkologe* (Springer Berlin / Heidelberg), pp. 326-332.
- Yager, J. D., and Davidson, N. E. (2006). Estrogen Carcinogenesis in Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 354, 270-282.
- Yang, J.-H., Vogel, C., and Abel, J. (1999). A malignant transformation of human cells by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exhibits altered expressions of growth regulatory factors. *Carcinogenesis* 20, 13-18.
- Yi, P., Driscoll, MD, Huang, J, Bhagat ,S, Hilf, R, Bambara, RA (2002). The effects of estrogen responsive element and ligand-induced structural changes on the recruitment of cofactors and transcriptional responses by ERa and ERb. *Mol Endocrinol* 16, 674-693.
- You, L., Casanova, M., Bartolucci, E. J., Fryczynski, M. W., Dorman, D. C., Everitt, J. I., Gaido, K. W., Ross, S. M., and Heck, H. d. A. (2002). Combined Effects of Dietary Phytoestrogen and Synthetic Endocrine-Active Compound on Reproductive Development in Sprague-Dawley Rats: Genistein and Methoxychlor. *Toxicological Sciences* 66, 91-104.
- You, L., Sar, M., Bartolucci, E., Ploch, S., and Whitt, M. (2001). Induction of hepatic aromatase by p,p'-DDE in adult male rats. *Molecular and Cellular Endocrinology* 178, 207-214.
- Younglai, E. V., Holloway, A. C., and Foster, W. G. (2005). Environmental and occupational factors affecting fertility and IVF success. *Human Reproduction Update* 11, 43-57.

Zhang, J., and Salamonsen, L. A. (2002). In Vivo Evidence for Active Matrix Metalloproteinases in Human Endometrium Supports their Role in Tissue Breakdown at Menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 87, 2346-2351.

Danksagung

Abschließend möchte ich mich bei all denen herzlich bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. em. Dr. med. habil. Friedrich Röpke (ehm. Direktor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin) für die Überlassung des interessanten Themas und seinem Interesse am Fortgang der Arbeit.

Herrn Univ.-Prof. Dr. med. Hermann M. Behre (Direktor des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie) danke ich für seine umfassende Hilfe bei der Umsetzung meines Forschungsaufenthaltes im Rahmen der Kooperation unseres Zentrums mit der University of Manitoba, in Winnipeg, Kanada.

Herrn Prof. em. Dr. Gerd-Joachim Krauß für die freundliche Unterstützung und Betreuung im DFG-Graduiertenkolleg 416 und sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit sowie für die vielen hilfreichen Ratschläge bei der schriftlichen und mündlichen Abhandlung meiner Dissertation.

Herrn Prof. Dr. Jürgen Dittmer (Leiter des Forschungslabors der Klinik und Poliklinik für Gynäkologie) und Frau Angela Dittmer gilt mein ganz spezieller Dank. Ohne ihre unendliche Hilfe, Geduld, die vielen Aufmunterungen und die liebenswerte Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe wäre die vorliegende Arbeit nicht zustande gekommen. Auch für die freundliche Bereitstellung des MAPK-Inhibitors U0126 und andere Materialien möchte ich mich herzlich bedanken. Desweiteren bedanke ich mich bei Frau Dr. Martina Vetter, Frau Sandy Kaufhold, Frau Kristina Hohlfeld für die viele Hilfe und freundliche Unterstützung im Forschungslabor.

Herrn Prof. Dr. Thomas Klonisch und Frau Dr. Sabine Hombach-Klonisch (Department of Anatomy and Cell Science der Universität von Manitoba, Kanada) möchte ich mich für ihre umfassende Hilfe bei der Vorbereitung, Organisation und Durchführung meines Forschungsaufenthaltes in ihrem Labor ganz herzlich danken. Für die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Zelllinie hTERT-EEC und des Vektors pERE-Luc, die fortwährende Diskussionsbereitschaft wissenschaftlicher Fragestellungen sowie für die unendliche Hilfe bei der Anfertigung des Manuskriptes „Estrogen-independent actions of environmentally relevant AhR-agonists in human endometrial epithelial cells“ möchte ich mich ebenso bedanken. Den Mitarbeitern des gesamten Labors, besonders Frau Dr. Aleksandra Glogowska, Herrn Adrian Danescu, Frau Dana Handerson, Frau Suchitra Natarajan, Herrn Paul Perumal und Frau Nadine Persaud danke ich herzlich.

Herrn OAss. Dr. Ewald Seliger (Leiter des Hormon- und Reproduktionsbiologischen Labors) möchte ich für seine freundliche Unterstützung und Förderung bei den Untersuchungen dieser Arbeit danken. Seine Ratschläge, Kritiken und Anregungen bei der Anfertigung der Dissertation habe ich gern aufgegriffen. Außerdem danke ich den gesamten medizinisch-technischen Kollegen des Hormon- und Reproduktionsbiologischen Labors, besonders Frau Susann Rostek.

Mein Dank gilt allen Mitarbeiterinnen des Zentrums für Reproduktionsmedizin und Andrologie, hier im Besonderen Frau OÄ Dr. med. P. Kaltwaßer, für die freundliche Unterstützung

bei der Gewinnung und Bereitstellung der Endometriose-Gewebeproben und ihre fachliche Einführung in die Thematik der idiopathischen Sterilität.

Frau Dr. Eva Kantelhardt, Frau Dr. Sabine Hippe, Herrn Niko Dellios, Frau Dr. Ursula Bauerfeind, Frau Felicitas Kramer, Frau Anja Seifert und Herrn Dr. Dario Schunke danke ich für die nette und hilfreiche Zusammenarbeit im Labor sowie für viele lustige Augenblicke während unserer gemeinsamen Zeit.

Frau Ina Nelles und Herrn Matthias Kraus möchte ich für ihre freundliche Hilfe bei der Vorbereitung, Organisation und Durchführung meines Forschungsaufenthaltes in Kanada danken.

Frau Gerda Bertram und Frau Manuela Theiler danke ich für ihre Hilfe bei der Gewinnung der Gewebeproben ebenso herzlich.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), Graduiertenkolleg 416 „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ gilt besonderer Dank für die finanzielle Unterstützung.

Nicht zuletzt möchte ich mich von ganzem Herzen bei meiner gesamten Familie und hier besonders bei meinen Eltern Dr. Matthias Reitmayer und Frau Christine Reitmayer bedanken, die mich immer unterstützt und mir mit Rat und Tat sowie vielen aufmunternden Worten zur Seite gestanden haben.

Curriculum Vitae

Persönliche Daten

Name, Vorname: Willing, Cornelia
Geburtsdatum/-ort: 08.03.1975 in Jena
Staatsangehörigkeit: deutsch

Studium

2009-2010 Gastforschungsaufenthalt im Department of Human Anatomy and Cell Sciences, University of Manitoba in Winnipeg, Manitoba, Kanada

2008 3-Monatiges Trainee-Programm (CIHR-ITMHRT) im Department of Human Anatomy and Cell Science in Winnipeg, Manitoba, Kanada

2004-2008 Bearbeitung des Promotionsthemas „Umweltschadstoffe und Fertilität - Untersuchungen zum Einfluss endokrin wirksamer Chemikalien auf humane uterine Gewebe“ im Rahmen des DFG-Doktorandenstipendiums im Graduiertenkolleg 416 „Adaptive physiologisch biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ im Zentrum für Reproduktionsmedizin und Andrologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

2000-2003 Diplomprüfungen und Diplomarbeit am Institut für Mikrobielle Phytopathologie der Friedrich-Schiller-Universität in Jena zum Thema: „Variabilität innerhalb der Pathovarietät *Pseudomonas syringae* pv. *sesami*“

1999-2000 Auslandsaufenthalt in den USA

1996-1999 Hauptstudium an der FSU Jena

1993-1996 Grundstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Schulbildung

1991-1993 Abitur am Ernst-Abbe-Gymnasium in Jena/Thüringen

1985-1991 Polytechnische Oberschule in Kahla, Thüringen

1981-1985 Grundschule „Werner-Seelenbinder“ in Orlamünde, Thüringen

Publikationen

1. **Willing, C.**; Delios, N.; Hippe, S. Seifert, A.; Kaltwaßer, P.; Seliger, E.; Hombach-Klonisch, S; Behre, H.M. Multiple estrogen like effects of PCB153 on human endometrial and endometriotic cells. (in Preparation)
2. **Willing, C.**, Peich, M., Danescu, A., Kehlen, A., Fowler, P., and Hombach-Klonisch, S. (2010). Estrogen-independent actions of environmentally relevant AhR-agonists in human endometrial epithelial cells. *Molecular Human Reproduction*.
3. Radestock, Y., **Willing, C.**, Kehlen, A., Hoang-Vu, C. und Hombach-Klonisch, S. (2010) Relaxin enhances S100A4 and promotes growth of human thyroid carcinoma cell xenografts. *Mol Cancer Res.* 8:494-506
4. Hombach-Klonisch, S., Bialek, J., Radestock, Y., Truong, A., Agoulnik A.I., Fiebig, B., **Willing, C.**, Weber, E., Hoang-Vu, C. und Klonisch T. (2010) INSL3 has tumor-promoting activity in thyroid cancer. *Int J Cancer.* 1;127(3):521-3

Versicherung

„Ich versichere, dass ich die vorstehende Arbeit selbständig angefertigt und mich fremder Hilfe nicht bedient habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß veröffentlichtem oder nicht veröffentlichtem Schrifttum entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht.“
Diese Dissertation wurde an keiner anderen Einrichtung vorgelegt.

Halle, den _____