

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med., Dr. agr. Bernd Fischer)

**Einflüsse ubiquitär vorkommender Xenobiotika auf
humane immortalisierte endometriale Epithelzellen
(hTERT-EEC B37)**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Marco Polo Peich

geboren am 01.11.1978

in Berlin

Betreuerin: Dr. med. habil S. Hombach-Klonisch

Gutachter:

1. PD Dr. med. J. Buchmann
2. Prof. Dr. rer. nat. I. Classen-Linke
3. Prof. Dr. med. Dr. agr. B. Fischer

Tag der Verteidigung 18.07.2011

Referat

Die in dieser Arbeit verwendeten Umweltkontaminanten, Dioxine und polychlorierte Biphenyle sind ubiquitär anzutreffen, sie entstehen vor allem in den industrialisierten Ländern. Aufgrund ihrer guten Lipidlöslichkeit, sowie ihrer hohen Halbwertszeit kummulieren sie in der Nahrungskette.

Im Rahmen dieser chronischen Exposition gelten sie als karzinogen und lösen in Säugetieren multiple Entwicklungs- und Differenzierungsstörungen aus, auch eine Rolle bei der Genese der Endometriose wird diskutiert.

Zu unterscheiden ist die akute Intoxikation mit den Folgen einer Chlorakne und dem möglichen „wasting-syndrom“, welche nicht Bestandteil dieser Arbeit war.

Ein großer Teil der zellulären Wirkungen der Dioxine werden über den sogenannten „Dioxin-Rezeptor“, den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) gesteuert.

Bisherige Untersuchungen dieser zellulären Abläufe erfolgten ausschließlich an malignen, transformierten Tumorzellen. Ziel dieser Arbeit war, die humane endometriale Epithelzelllinie hTERT-EEC B37 und deren Reaktionen auf eine Exposition mit Dioxin und polychlorierten Biphenylen (PCB) zu untersuchen. Die hTERT-EEC B37 sollten durch Expositionsversuche und nachfolgenden Untersuchungen auf Transkriptions- und auf Translationsebene als in vitro Zellmodell charakterisiert werden. Die Funktionalität des rezeptorgebundenen Signaltransduktionsweges sollte mit Hilfe von transienten Transfektionen untersucht werden.

Es zeigte sich eine Induzierbarkeit der klassischen AhR-Zielgene, vor allem von CYP 1A1, allerdings in unterschiedlicher Stärke durch die verschiedenen PCB.

Auch ließ sich eine Wechselwirkung mit Östrogenen beobachten. Im Rahmen der durchgeführten Proliferations- und Apoptoseversuche zeigten sich die Umweltkontaminanten geringfügig proliferationshemmend, nicht jedoch apoptosefördernd.

Die hTERT-EEC B37 stellten sich im Rahmen dieser Arbeit als ein durchaus geeignetes Zellmodell zur weiteren Untersuchung AhR-vermittelter Effekte heraus.

Ziel zukünftiger Arbeiten sollte es sein, die in vivo stattfindenden Wechselwirkungen zwischen endogenen Botenstoffen und den exogenen Xenobiotika zu eruieren.

Peich, Marco Polo: Einflüsse ubiquitär vorkommender Xenobiotika auf humane, immortalisierte, endometriale Epithelzellen (hTERT-EEC B37). Halle (Saale), Med. Fak. Diss., 70 Seiten, 2010

Inhaltsverzeichnis

0	<u>Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen</u>	III
1	<u>Einführung in die Thematik</u>	1
1.1	Allgemeine Einführung	1
1.2	Ziele der Arbeit	3
1.3	2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenzodioxin	4
1.4	Polychlorierte Biphenyle	4
1.4.1	Allgemeine Strukturformel für PCB	5
1.4.2	Koplanare PCB	6
1.4.3	Nichtkoplanare PCB	7
1.5	Pathomechanismus der Xenobiotika	7
1.6	Die hTERT-EEC B37 Zellen	10
2	<u>Material und Methoden</u>	11
2.1	Chemikalien und Substanzen	11
2.1.1	Chemikalien und Substanzen Zellkultur	11
2.1.2	Chemikalien und Substanzen Labor	12
2.2	Geräte und Materialien	14
2.2.1	Geräte und Materialien Zellkultur	14
2.2.2	Geräte und Materialien Labor	15
2.3	Lösungen	15
2.4	EEC B37 Zellen	17
2.4.1	Zellkultur	18
2.4.2	Passage und Zellzahlbestimmung	18
2.5	Expositionsversuche	19
2.5.1	Expositionsversuche mit TCDD und PCB	19
2.5.2	Expositionsversuche mit und ohne Östrogenzusatz	20
2.6	RNA-Isolierung	20
2.7	cDNA-Synthese	21
2.8	PCR und PCR-Auswertung	21
2.8.1	RT- PCR	21
2.8.2	Gelelektrophorese	23
2.8.3	GAPDH-PCR	23
2.8.4	Echtzeit-PCR	24
2.9	Westernblot	24
2.10	Zytotoxizitätsversuche	26
2.10.1	Proliferationsversuche	26
2.10.2	Apoptoseversuche	27
2.11	Transiente Transfektion	28

3	<u>Ergebnisse</u>	29
3.1	TCDD Exposition	30
3.1.1	Cyp1A1 mRNA Induktion	30
3.1.2	Cyp1B1 mRNA Induktion	32
3.2	PCB Exposition	33
3.3	Quantifizierung der Transkriptionssteigerung der Zielgene	36
3.4	Einfluss von Östrogen auf die Cyp Induktion durch Xenobiotika	38
3.5	Transiente Transfektion	41
3.6	Westernblot	41
3.7	Zytotoxizitätsversuche	43
3.7.1	Proliferationsversuche	43
3.7.2	Apoptoseversuche	44
4	<u>Diskussion</u>	45
4.1	Ziele der Arbeit	46
4.2	Modellsystem Zellkultur	46
4.3	Expositionsversuche	47
4.4	Transiente Transfektion	48
4.5	Zielgen-Induktion	48
4.6	Zytotoxizitätsversuche	51
4.7	TCDD-Östrogen-Interaktion	53
5	<u>Schlußfolgerungen und Ausblick</u>	56
6	<u>Zusammenfassung</u>	57
7	<u>Literaturverzeichnis</u>	58
8	<u>Thesen</u>	66
9	<u>Anhang</u>	67

0 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

Abb.	<u>Ab</u> bildung
AhR	<u>A</u> ryl <u>h</u> ydrocarbon <u>R</u> ezeptor
ARNT	<u>a</u> rylhydrocarbon <u>r</u> eceptor <u>n</u> uclear <u>t</u> ranslocator protein
AT	<u>A</u> nnealing <u>t</u> emperatur
ATP	<u>A</u> denosin <u>t</u> riphosphat
bHLH	<u>b</u> asic <u>H</u> elix- <u>L</u> oop- <u>H</u> elix
bzw.	<u>b</u> eziehungs <u>w</u> eise
CDS	<u>C</u> ell <u>D</u> issociation <u>S</u> olution
Cyp	<u>C</u> ytochrom <u>P</u> 450
DMSO	<u>D</u> imethyl <u>s</u> ulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (<u>D</u> esoxyribon <u>u</u> clein <u>a</u> cid)
EDTA	<u>E</u> thylendi <u>a</u> minotetra <u>e</u> ssigsäure (<u>a</u> cid)
E2	17-beta <u>E</u> stradiol
ER	<u>Ö</u> strogen <u>r</u> ezeptor
FKS	<u>f</u> ötale <u>K</u> älbers <u>e</u> rum
GAPDH	<u>G</u> lycerin <u>a</u> ldehydphosphat- <u>D</u> e <u>h</u> ydrogenase
gRNA	<u>g</u> esamt-RNA
HIF-1 α	<u>h</u> ypoxia- <u>i</u> nducible <u>f</u> actor <u>1</u> <u>a</u> lpha
hsp	<u>h</u> eats <u>h</u> ock <u>p</u> rotein
ITE	2-(1' <u>H</u> - <u>i</u> ndol-3'-carbonyl)- <u>t</u> hiazol-4-carbonsäuremethylester
IUPAC	<u>I</u> nternational <u>U</u> nion of <u>P</u> ure and <u>A</u> ppplied <u>C</u> hemistry
Kap.	<u>K</u> apitel
kopIPCB	koplanare PCB
min	Minuten
mRNA	<u>m</u> essenger <u>R</u> ibon <u>u</u> kleinsäure (<u>a</u> cid)
neg.	negativ
NES	<u>n</u> uclear <u>e</u> xport <u>s</u> ignal
NF- κ B	<u>n</u> uclear <u>f</u> actor <u>k</u> appa <u>B</u>
PAS	C-terminale <u>P</u> er/ <u>A</u> rn <u>t</u> / <u>S</u> im – Domäne
PCB 77	3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl
PCB 126	3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl
PCB 169	3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl
PBS	<u>p</u> hosphate <u>b</u> uffered <u>S</u> aline = phosphatgepufferte Salzlösung
PCB	<u>p</u> oly <u>ch</u> lorierte <u>B</u> iphenyle

PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
Per	<u>p</u> eriodic (Protein der PAS-Familie)
PR	<u>P</u> rogesteron <u>r</u> ezeptor
pRb	<u>R</u> etinob <u>l</u> astom <u>a</u> protein
RLU	<u>r</u> elative <u>l</u> ight <u>u</u> nits = relative Lichteinheiten
RT	<u>R</u> everse <u>T</u> ranskriptase
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulfate = Laurylsulfat
SIM	<u>s</u> ingle <u>m</u> inded (Protein der PAS-Familie)
Tab.	<u>T</u> abelle
TAE	<u>T</u> ris- <u>A</u> cetate- <u>E</u> DTA
TCDD	2,3,7,8- <u>T</u> etrachlor- <u>d</u> ibenzodioxin
TEF	<u>T</u> oxizitäts <u>E</u> quivalenz <u>F</u> aktoren
TEMED	(N, N, N', N' - <u>t</u> etramethylethylen- <u>d</u> iamine)
TEQ	<u>T</u> oxizitäts- <u>e</u> quivalenzen
Tris	<u>T</u> ris(hydroxymethyl)aminomethan
Tween	Polyoxyethylenesorbitan monolaurate
U/min	<u>U</u> mdrehungen pro <u>M</u> inute
WHO	<u>W</u> orld <u>H</u> ealth <u>O</u> rganization = Weltgesundheitsorganisation
XRE	<u>x</u> enobiotic <u>r</u> esponse <u>e</u> lement
z.B.	<u>z</u> um <u>B</u> eispiel

1 Einführung in die Thematik

1.1 Allgemeine Einführung

Chlororganische Verbindungen werden seit mehreren Jahrzehnten weltweit als Insektizide, Herbizide und in der Chemischen Industrie genutzt. Verschiedene Dioxine entstehen auch bei unvollständigen Verbrennungsprozessen, z.B. in Müllverbrennungsanlagen. 1929 wurden polychlorierte Biphenyle (PCB) erstmals industriell produziert. In den industrialisierten Ländern wurde die Produktion in den siebziger und achtziger Jahren nach und nach eingestellt. Dioxine sind polyhalogenierte, aromatische Kohlenwasserstoffe, sie finden Verwendung in vielen verschiedenen ubiquitär vorkommenden Stoffen und Materialien. Durch die langjährige Stabilität und die hohe Lipidlöslichkeit, akkumulieren diese Stoffe im globalen Ökosystem [1]. Sie lassen sich nicht nur im Boden, in der Luft, in Pflanzen und im Wasser, sondern auch in Tieren, so zum Beispiel in Fischen nachweisen. Aufgrund der hohen Lipidlöslichkeit spielen vor allem Tiere am Ende der Nahrungskette eine besondere Rolle [2-3]. Hier kommt es zu einer verstärkten Kumulation im eigenen Fettgewebe durch nahrungbedingte Aufnahme der bereits im Fettgewebe der aufgenommenen Lebewesen gespeicherten Toxine.

In der Nahrung liegt auch die Hauptaufnahmequelle des Menschen für diese Substanzen [4]. Die täglich so aufgenommene Menge an Dioxinen beträgt in den Vereinigten Staaten von Amerika schätzungsweise 47 pg [5], wobei aufgrund der unterschiedlichen Ernährungsgewohnheiten regionale Unterschiede existieren, z.B. in Abhängigkeit von der verzehrten Fischmenge [5]. In verschiedenen menschlichen Geweben ließen sich chlorierte Kohlenwasserstoffe nachweisen, unter anderem im Serum, im Fettgewebe, in der Muttermilch, im Zervixschleim und in der Follikelflüssigkeit [6-10].

Die Halbwertszeit von Dioxinen im Menschen beträgt 5,8 – 11,3 Jahre [5].

Die verschiedenen Dioxine, allen voran das Tetrachlor-Dibenzodioxin (TCDD) als ihr toxischster Vertreter, verursachen eine Reihe unterschiedlicher Veränderungen im Menschen [11-15]. Sie schwächen das Immunsystem einerseits durch eine Thymusinvolution und andererseits durch Störung der Lymphozytendifferenzierung. Sie beeinflussen den Hormonhaushalt, sie stören die Entwicklung der Leber, sie sind an der Genese verschiedener Tumore beteiligt (z.B. bei Mäusen und Ratten für Leber-,

Lungen-, Nieren- und Schilddrüsenkarzinome beschrieben) und sie wirken teratogen[11-17]. Langzeitstudien in den USA zeigten ein erhöhtes Vorkommen von Neuralrohrdefekten unter Kindern von Vietnamveteranen [18]; diese Veränderungen treten allerdings meist erst bei chronischer Exposition auf.

Bei einer akuter Intoxikation, kann es zum Auftreten von akneiformen Eruptionen, einer sogenannten Chlorakne kommen oder zu einem, als „wasting-syndrome“ beschriebenen letalem Krankheitsbild.

Eine hohe Exposition der Bevölkerung mit zahlreichen akuten Intoxikationen ereignete sich z.B. 1976 in der italienischen Stadt Seveso. Bei einem Chemiewerksunglück wurde Dioxin in großen Mengen freigesetzt.

Dieses Unglück war Anlass für zahlreiche Studien und Untersuchungen.

Das sogenannte „wasting-syndrome“ tritt spezieübergreifend auf und beinhaltet folgende Symptome: ausgeprägte Gewichtsabnahme; Thymus-Involution; Leberverfettung und -hypertrophie; Einschmelzen des Fettgewebes; depressive Effekte auf das Knochenmark (Anämie, Leukopenie, Thrombozytopenie) und Hämorrhagien (besonders im Gastrointestinaltrakt). Die Hautläsionen, welche häufig als Chlorakne beschrieben werden, finden sich besonders bei Primaten.

Weitere, verschiedene Effekte der Dioxine im menschlichen Organismus sind Bestandteil der aktuellen Forschung.

Ein Zusammenhang zwischen einer kontinuierlichen Belastung mit Dioxinen und der Entstehung einer Endometriose ist in verschiedenen Säugetieren gesichert, so zeigten z.B. *Rier et al* [19] einen Zusammenhang von TCDD-Exposition und Endometrioseentstehung im Rhesusaffen, einem Primaten mit einer der menschlichen ähnlichen, cyclischen endometrialen Dynamik. Auch beim Menschen scheint eine kontinuierliche Exposition mit dioxinähnlichen Substanzen eine Rolle zu spielen, wenn gleich die Pathomechanismen noch nicht ausreichend geklärt sind [20].

Dioxine sind Liganden eines sogenannten Dioxin-Rezeptors, dem Arylhydrocarbonrezeptor (AhR), durch diesen werden zahlreiche Ihrer Wirkungen gesteuert.

Aufgrund der Rezeptorexpression in Epithelzellen, stellen Liganden des AhR potentielle Störfaktoren der epithelialen Differenzierung dar. Sie könnten daher sowohl eine Rolle in der Genese von endometrialen Karzinomen spielen, als auch eine der möglichen Ursachen von Nidations- und Implantationsstörungen sein.

Wie schon von *Küchenhoff et al.* [21] gezeigt ist der AhR auch im humanen endometrialen Epithel exprimiert, jedoch sind hier die zellulären Wirkungen der AhR-Liganden noch unklar, da unter anderem kein physiologisches zelluläres in-vitro Modell etabliert ist.

1.2 Ziele der Arbeit

Ziele der vorliegenden Arbeit waren, zum Einen die weitere Charakterisierung einer neuen, im Labor von Dr. S. Hombach-Klonisch/Dr. T. Klonisch etablierten immortalisierten humanen endometrialen Epithelzelllinie (hTERT-EEC B37) als AhR-responsives endometriales Zellmodell und zum Anderen die Identifizierung der Xenobiotika TCDD und verschiedener koplanarer PCB als Induktoren von AhR-Zielmolekülen in diesen hTERT-EEC B37. Es sollte die Evaluierung der Funktionalität des Signaltransduktionsweges des AhR in diesem Zellmodell erfolgen.

Vor allem galt es die Induktion der beiden AhR-Zielgene der Cytochrom-Familie, Cyp1A1 und Cyp1B1 [22] auf Transkriptionsebene mit Hilfe der RT-PCR zu untersuchen.

Eine Quantifizierung der veränderten Transkription sollte mit Hilfe der Echtzeit-PCR erfolgen.

Die Funktionalität des endogenen AhR in hTERT-EEC B37 sollte zusätzlich durch transiente Transfektionen mit einem XRE-Reporterplasmid überprüft werden.

Desweiteren sollte der Einfluss von 17β -Estradiol auf die AhR-vermittelte Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 untersucht werden.

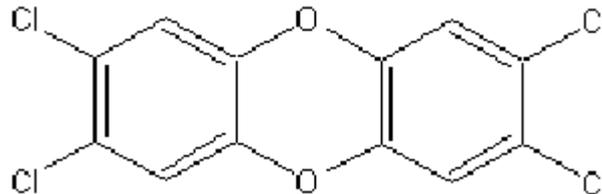
Neben dem Einfluss der Xenobiotika auf die Transkription sollten deren Einfluss auf die Proliferation und die Apoptose der Zellen geprüft werden.

Es galt also herauszufinden, ob die immortalisierten hTERT-EEC Zellen sich als Zellmodell eignen, um die Einflüsse von Xenobiotika auf das humane Endometrium und deren Wechselwirkungen mit Östrogenen zu untersuchen.

Die Arbeit dient demnach der Prüfung von funktionalen Signaltransduktionswegen in den EEC B37 und somit als Grundlage für weiterführende Versuche.

1.3 2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenzodioxin

Das bekannteste und giftigste Dioxin ist das 2,3,7,8-Tetrachlor-Dibenzo-p-dioxin (TCDD).
Strukturformel 2,3,7,8- TCDD:



TCDD liegt bei Standardbedingungen als farblose bis weiße, nadelförmige Kristalle vor, die sich in organischen Lösungsmitteln lösen lassen.

Es entsteht in industriellen Syntheseprozessen bei der Herstellung von Herbiziden und bei der unvollständigen Verbrennung industrieller Abfälle. Als verunreinigender Bestandteil von Agent Orange, wurde es in großen Mengen im Vietnamkrieg freigesetzt und fand so den Weg ins globale Ökosystem. Auch hat es nach Seveso „traurige“ Bekanntheit erlangt.

Im Februar 1997 hat die Weltgesundheitsorganisation (WHO) TCDD als humankanzerogen eingestuft.

TCDD ist ein klassischer und der potenteste Ligand des Arylhydrocarbon Rezeptors. Sämtliche anderen polyhalogenierten Kohlenwasserstoffe werden in ihrer Toxizität an der des TCDD's gemessen.

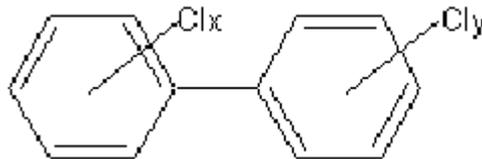
TCDD ist in Tiermodellen an der Pathogenese der Endometriose [23-25] über einen noch nicht näher bekannten Mechanismus beteiligt.

1.4 Polychlorierte Biphenyle

Bei den Polychlorierten Biphenylen handelt es sich unter Normalbedingungen um farblose Kristalle, die in chemischen Gemischen ölige Flüssigkeiten mäßiger bis hoher Viskosität sind. Sie sind in den meisten organischen Lösungsmitteln gut löslich. PCB werden in der Umwelt nur sehr langsam abgebaut. Sie finden Anwendung in der Industrie und Landwirtschaft in Form von Kühl- und Isolierflüssigkeiten in Transformatoren, als Weichmacher für Lacke, Klebstoffe und Kunststoffe, als Schmierstoffe, als Hydraulikflüssigkeiten, als Flammschutz- und Imprägnierungsmittel in der Textilindustrie, als Papierbeschichtungsmittel und in Pestiziden. Weltweit wurden seit 1929 750000 t

PCB produziert und unter Warenzeichen wie Aroclor, Clophen, Kanechlor, Phenochlor u.a. eingesetzt.

1.4.1 Allgemeine Strukturformel für PCB



wobei Cl(x) = 1-5 Chloratome am einen und Cl(y) = 1-5 Chloratome am zweiten Phenylring bedeuten kann.

Durch die verschiedenen Substituenten an den Kohlenstoffatomen des Phenylringes sind insgesamt 209 Einzelverbindungen, sogenannte Kongenere, darstellbar.

Nach der IUPAC-Nomenklatur werden alle PCB-Kongenere nach Anzahl und Stellung ihrer Substituenten von 1-209 durchnummeriert.

Technische PCB-Produkte sind immer Gemische aus ca. 60 - 80 Kongeneren. In der Umwelt sind PCB deshalb immer als Gemische anzutreffen. Per Konvention wurden 6 PCB aufgrund ihres dominierenden Vorkommens als "Indikator-PCB" festgelegt.

Tab.1: Indikator PCB im Überblick

Nummer	Gruppe	Bezeichnung
28	Trichlor-Biphenyl	2, 4, 4'
52	Tetrachlor-Biphenyl	2, 2',5,5'
101	Pentachlor-Biphenyl	2,2',4,5,5'
138	Hexachlor-Biphenyl	2,2',3,4,4',5
153	Hexachlor-Biphenyl	2,2',4,4',5,5'
180	Heptachlor-Biphenyl	2,2',3,4,4',5,5'

1.4.2 Koplanare PCB

Als koplanare PCB (kopIPCB) bezeichnet man jene PCB-Kongenere, die in den 2- und 6-Stellungen kein oder nur ein Chloratom aufweisen. Ihre beiden Phenylringe sind daher in Ihrer Rotation frei beweglich, eine Konfiguration in einer Ebene ist somit möglich ("koplanar" = „non-ortho-substituiert“). Das verleiht Ihnen eine strukturelle Ähnlichkeit mit den polychlorierten Dibenzodioxinen sowie den polychlorierten Dibenzofuranen, welche als so genannte "Dioxine" zusammengefasst werden.

Polyhalogenierte aromatische Kohlenwasserstoffe dieser Struktur, haben alle eine hohe Bindungsaffinität zu dem AhR [26] und lösen daher dem TCDD ähnliche Effekte aus.

Die WHO hat 1998 festgelegt, dass 12 kopIPCB als "dioxinähnliche Verbindungen" zu betrachten und zu bewerten sind, unter anderem sind dies: PCB 77, PCB 126 und PCB 169.

In der vorliegenden Arbeit wurden diese drei Kongenere in den Expositionsversuchen verwandt, da sie ubiquitär in der Umwelt vorkommen, im humanen Serum und Gewebe nachgewiesen wurden [10, 27-28] und eine wesentliche Rolle in der Entstehung der Endometriose zu spielen scheinen [29], des weiteren wirken sie ebenfalls über den AhR. Die kopIPCB werden seit einigen Jahren in eine Toxizitätsabschätzung von AhR-vermittelten Schadstoffen mit einbezogen. Dabei wird die Toxizität eines kopIPCB in Beziehung zu der Toxizität des TCDD gesetzt und in sogenannten 2,3,7,8-TCDD-Toxizitäts-**E**quivalent-**F**aktoren (TEF) ausgedrückt.

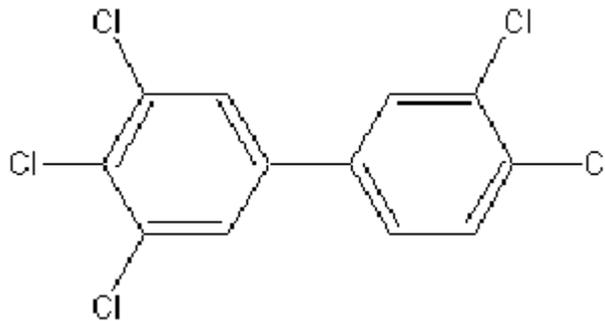
Tab.2: TEF´s der verwandten kopIPCB nach WHO

PCB	2,3,7,8-TCDD-TEF
77	0,001
126	0,1
169	0,01

Dem TCDD in seiner Giftigkeit am nächsten kommt daher das Non-Ortho-PCB 126.

Die Konzentration eines jeweiligen kopIPCB läßt sich dann mit Hilfe dieser TEF´s in „2,3,7,8-TCDD-Toxizitäts-**E**quivalente“ (TEQ) umrechnen [30].

Strukturformel koplPCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl):



1.4.3 Nichtkoplanare PCB

Die nichtkoplanaren PCB sind durch die Anordnung ihrer Chloratome in Orthostellung sterisch so gehindert, dass ihre beiden Phenylringe nicht in einer Ebene liegen.

Sie haben daher eine sehr geringe, bis keine Bindungsaffinität zum AhR, sie zeigen daher keine Induktion von AhR-Zielgenen.

Ihre biologischen Einflüsse werden über verschiedene, zum großen Teil noch unbekannte Mechanismen vermittelt.

1.5 Pathomechanismus der Xenobiotika

Die Dioxine sind in der Lage, über verschiedene, teilweise bekannte und teils unbekannte Wege, auf den menschlichen Organismus Einfluss zu nehmen.

Ein großer Anteil der Effekte, die diese Stoffe auslösen, wird über den so genannten Dioxin-Rezeptor, den AhR vermittelt [11, 31-32].

Ihre über diesen Weg wirkende Toxizität steht daher in unmittelbarem Zusammenhang mit ihrer Bindungsaffinität zu diesem Rezeptor.

Der AhR fungiert als einer der zellulären Sensoren für extrazelluläre Signale und umweltbedingten Stress.

Nach neueren Erkenntnissen spielt er des Weiteren eine Rolle in der physiologischen Entwicklung und Differenzierung [17], sowie in der Genese verschiedener Tumoren [16, 33].

Noch nicht alle Prozesse im Organismus, an denen der AhR beteiligt ist, sind aufgeklärt. In Studien mit permanent aktiviertem Rezeptor [33] oder durch Sequenzveränderung ausgeschaltetem Rezeptor [34], zeigen sich eine Vielzahl von Veränderungen, die auf

eine Beteiligung des AhR an vielen verschiedenen Prozessen hinweisen. So zeigten Mäuse mit nichtfunktionellem Rezeptor zwar eine Resistenz gegenüber den toxischen Dioxinwirkungen, sie wiesen aber starke Entwicklungsstörungen, vor allem der Leber auf. In diesen sogenannten Knock-out Mäusen blieb die Leber im Wachstum deutlich zurück, verursacht wurde dies durch eine Beeinflussung der Angiogenese und durch einen persistierenden Ductus venosus und somit einer partiellen Umgehung der Leber im Blutfluss [34].

Der AhR ist ein ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor mit einer basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) Struktur.

Bei den HLH-Proteinen handelt es sich um Proteine mit zwei Regionen aus hochkonservierten Aminosäuresequenzen die zwei Helices bilden, welche durch eine Schleife (loop) voneinander getrennt werden. Diese typische Sekundärstruktur verleiht ihnen auch ihren Namen.

Die PAS-Domäne ist ein ebenfalls hochkonservierter Aminosäureabschnitt, der sich in verschiedenen Spezies in verschiedenen die Zelldifferenzierung beeinflussenden Proteinen findet, namensgebend sind hier die drei Proteine, in denen diese Domäne zuerst entdeckt und beschrieben wurde: PER und SIM aus *Drosophila* sowie das humane ARNT [35].

Der AhR ist im nichtaktivierten Zustand im Zytosol lokalisiert, seine Struktur wird durch die Chaperone-Proteine, hsp90 [36], hsp23 [37] sowie das immunophilin-like-Protein [38-40] stabilisiert.

Erfolgt die Bindung eines Liganden an die Bindungsdomäne des AhR, dissoziieren die Chaperone-Proteine und der Komplex aus Rezeptor und Ligand verlagert seine Lokalisation in den Nukleus. Dort bindet er an ein ARNT genanntes PAS-Protein [41] und bildet ein Heterodimer.

Die (bHLH/PAS) Struktur des AhR ist sowohl für die Heterodimerisierung als auch für die Zielgenbindung wichtig [42-43].

ARNT stabilisiert den ligandenaktivierten AhR und vermittelt den Verbleib des Heterodimers im Nukleus und ermöglicht im Verlauf vermutlich die Bindung des AhR/ARNT-Komplexes an sogenannte Dioxin-Response-Elemente (=XRE's) der DNA.

ARNT ist wahrscheinlich auch direkt an der Bindung an die DNA beteiligt, da eine Mutation in der Basisregion des ARNT die Funktion des Heterodimers als Transkriptionsfaktor verhindert, nicht aber die Heterodimerisierung und die nukleäre Translokation des AhR-ARNT-Komplexes [44-46].

Das intakte Heterodimer ist in der Lage an ein XRE der DNA zu binden und als Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Transkription verschiedener Zielgene zu modulieren [47-50].

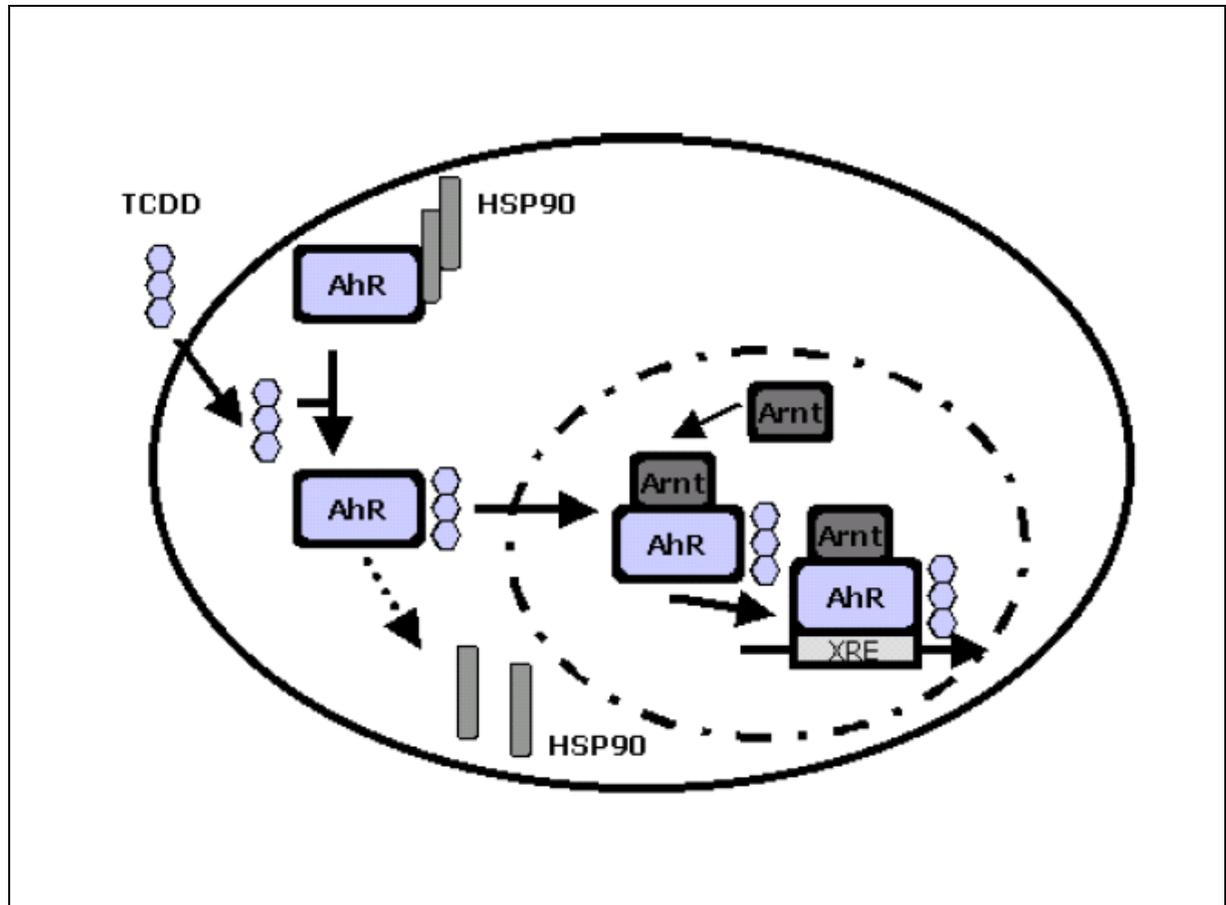


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion durch den AhR (modifiziert nach Ross et al.)

Das in der Literatur am häufigsten beschriebene AhR-Zielgen ist das Cytochrom P450A1 Gen, welches für das Enzym Cyp1A1 kodiert.

Die Cytochrom P450 (CYP) Proteine sind eine Familie von Hämproteinen, die enzymatische Aktivität besitzen, sogenannte Oxidoreduktasen. Sie sind u.a. an der Biosynthese von Steroiden, Prostaglandinen und Retinoiden beteiligt. Des Weiteren spielen sie eine wesentliche Rolle im Metabolismus von exogenen Stoffen, wie Pharmaka und Xenobiotika. Die Bezeichnung Cytochrom P450 beruht auf dem Absorptionsverhalten dieser Proteinfamilie bei einer Wellenlänge von 450 nm.

Cyp1A1 zählt zu der Untergruppe der Monooxygenasen. Diese katalysieren die Hydroxylierung verschiedener Fremdstoffe, sie metabolisieren apolare zu polaren Stoffen, indem sie funktionelle Gruppen hinzufügen oder demaskieren. Sie führen so den

ersten Schritt zur angestrebten renalen Elimination durch. Es handelt sich daher um sogenannte Phase 1 Enzyme,

Aufgenommene Pharmaka oder Umweltkontaminanten, die sogenannten Xenobiotika [51], aber auch körpereigene Stoffe zählen zu Ihren Substraten. Ein weiteres beschriebenes AhR-Zielgen ist das Cytochrom P4501B1 Gen. Es kodiert ebenfalls für eine Oxidoreduktase.

CYP1A1 und CYP1B1 nehmen auch am Östrogen-Stoffwechsel teil, beide Enzyme katalysieren die Hydroxylierung von 17 β -Estradiol (E2). CYP 1A1 hydroxyliert dabei an der C-2 Position, während CYP1B1 einen 4-hydroxylierten Metaboliten des E2 produziert [52].

Der Mechanismus der Inaktivierung des ligandengebundenen Rezeptors ist noch nicht restlos verstanden, *Davarinos et al.* [53] charakterisiert eine so genannte NES-Sequenz im AhR, die dafür zuständig ist den Rezeptor zurück ins Zytosol zu befördern. Dort findet dann die proteasomale Degradation statt.

Der Abbau von Signalproteinen im Proteasom ist ein üblicher Weg der Zelle ein Signal zu beenden, so werden unter anderem auch NF- κ B, ER α oder HIF-1 α im Proteasom abgebaut [54-57].

Die Toxizität der verschiedenen polyhalogenierten Kohlenwasserstoffe ist unter anderem von ihrer Bindungsaffinität zu dem AhR abhängig [26].

1.6 Die hTERT-EEC B37 Zellen

Bei den hTERT-EEC B37 Zellen handelt es sich um eine humane endometriale Epithelzelllinie, die von *Hombach-Klonisch et al.* wie folgt hergestellt und charakterisiert wurden.

Die Zellen wurden aus einem Operationspräparat selektiert und als Primärzellkultur isoliert. Das Uteruspräparat stammt von einer 37-jährigen Nullipara, es befand sich in der Proliferationsphase.

Die endometrialen Epithelzellen wurden anschließend mit dem eukaryoten Expressionsplasmid, welches für den katalytischen Teil (hTERT) des humanen Telomerase-Komplexes kodiert, stabil transfektiert und somit immortalisiert.

Die so immortalisierten Zellen sind seit über 4 Jahren in Kultur.

Die hTERT-EEC exprimieren Zytokeratin und E-Cadherin, welche sich als Epithelzellmarker und Differenzierungsmarker immunhistochemisch nachweisen lassen.

Sie sind negativ für die Stromazellmarker Vimentin, CD10 und CD13.

In den Untersuchungen der hTERT-EEC von *Hombach-Klonisch et al.* zeigten die Zellen apikal Mikrovilli und produzierten in Kultur auf einer dreidimensionalen Kollagen-

Fibroblasten-Matrix eine Basalmembran [58], sie zeigen also noch ein für Epithelzellen physiologisches, polarisiertes Wachstum.

Die hTERT-EEC Zellen exprimieren induzierbare und funktionale endogene Steroidhormon-Rezeptoren. Der Östrogenrezeptor-alpha ($ER\alpha$) wird unter Östrogen-freien Kulturbedingungen transkriptionell induziert und ist durch steroidfreie Kulturbedingungen auch als Protein induzierbar [58]. Der Progesteronrezeptor (PR) als klassisches Östrogen-Zielmolekül ist durch Östrogen-Inkubation sowohl auf mRNA, als auch auf Protein-Ebene induzierbar, die hTERT-EEC sind daher hormonsensitiv.

Die hTERT-EEC B37 Zellen exprimieren den AhR und ARNT, die sich sowohl als Transkripte als auch auf Proteinebene darstellen lassen.

hTERT-EEC stellen somit ein geeignetes Zellmodell dar, um zelluläre Effekte von AhR-Liganden auf endometriale Epithelzellen zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Substanzen

2.1.1 Chemikalien und Substanzen Zellkultur

Chemikalien / Substanzen	Hersteller
Ham´s F-12 Medium mit Phenolrot - mit 1,176 g/l $NaHCO_3$ - ohne L-Glutamin	BIOCHROM
Ham´s F-12 Medium ohne Phenolrot - mit 1,176 g/l $NaHCO_3$ - ohne L-Glutamin	BIOCHROM
FKS	GIBCO BRL und Life Technologies
steroidhormonfreies FKS	Biozol
L-Glutamin	Biochrom
Insulin	Biochrom
PBS-Dulbecco ohne Ca^{2+} , Mg^{2+}	Biochrom

CDS	Promega
BSA	SIGMA-ALDRICH
DMSO	SIGMA-ALDRICH
17 β -Estradiol	SIGMA-ALDRICH
TRIzol Reagenz	Invitrogen, Life Technologies
TCDD	amchro GmbH, Bad Soden
PCB 77	Ökumetrie GmbH, Bayreuth Institut für Umweltforschung
PCB 126	Ökumetrie GmbH, Bayreuth Institut für Umweltforschung
PCB 169	Ökumetrie GmbH, Bayreuth Institut für Umweltforschung
Gemisch nichtkoplanarer PCB	Ökumetrie GmbH, Bayreuth Institut für Umweltforschung
Metafectene	Biontex
Passive Lysis Buffer	Promega
Dual-Luciferase Reporter Assay (inkl. Firefly Luziferase Reagenz)	Promega
Plasmide	
XRE-Reporter pTX DiR 2	freundlicherweise von Prof. Dr. Katschinski (Institut für Kreislaufphysiologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt
Co-Reporter pT81	

2.1.2 Chemikalien und Substanzen Labor

Chemikalien / Substanzen	Hersteller
Chloroform	Merck
Isopropanol	Merck
Ethanol	Roth
zur cDNA-Herstellung: 5x Puffer DTT dNTP RT- Superscript	Invitrogen

für die RT-PCR: 10x Puffer MgCl ₂ dNTP Taq- Polymerase	Invitrogen
Mineralöl	SIGMA-ALDRICH
Agarose Seakem LE	BMA
Ethidiumbromid	Invitrogen
TAE 50 x	Invitrogen
DNA-Marker 1kb Gene ruler	Fermentas
Protein-Marker Cruz marker MW Cat # sc-2035	SantaCruz
Bromphenolblau	LKB, Pharmacia
EDTA	Merck
Tris	Merck
Glycin	Serva
Methanol	Merck
Ponceau S (3-hydroxy-4-[2-sulfo-4-(4-sulfo-phenylazo)phenylazo]-2,7-naphtalen-disulfonsäure	Sigma
SDS (Dodecylsulfate Natrium-Salz)	Serva
TEMED	Sigma
Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan monolaurate)	Sigma
Apoptosetest; Caspase-glo 3/7 assay	Promega
Proliferationstest; EZ4U assay	Biomedica
Protein assay kit	Biorad
ECL-Lösungen 1 und 2	Amersham
Primer	Hersteller
3'AP	Biosource Europe
GAPDH	Biosource Europe
huAhR.1	Metabion
ARNT.1	Metabion
Cyp 1A1	Invitrogen

Cyp 1B1	Invitrogen
ER α	Invitrogen
ER β	Invitrogen
Antikörper	Hersteller
Goat polyclonal anti CYP1A1 (G-18), Cat # sc-9828	SantaCruz
HRP rabbit anti-goat IgG, Cat # 305-0350045	Dianova
Estrogen Receptor (Clone SP1) Rabbit Monoclonal Antibody, Cat. #RM-9101-S0	Thermo Fisher Scientific
HRP rabbit anti-goat IgG, Cat # 305-0350045	Dianova
Anti-AhR rabbit polyclonal antibody Cat. # SA-210	Biomol
AhR – Antikörper PA3–513	Dianova

2.2 Geräte und Materialien

2.2.1 Geräte und Materialien Zellkultur

Geräte / Materialien	Hersteller
Zellkulturflaschen, 25 cm ³	Greiner
Zellkulturflaschen, 75 cm ³	Greiner
Multiwellplatten, 6-well / 96-well	Greiner
sterile Einmalpipetten, diverse Größen	Greiner
Sterilbank, Herasafe	Heraeus
Inkubatoren, Heraeus 6000	Heraeus
Zentrifuge, 2-5	Sigma
Neubauer-Zählkammer	Greiner
Pipetus, Akku	Hirschmann

2.2.2 Geräte und Materialien Labor

Geräte / Materialien	Hersteller
Luminometer, Sirius 2	Berthold
Photometer, Ultrospec 3300 pro	Amersham
Mikrotiterplatten-Reader, SET Spectra	SLT
Zentrifuge, Biofuge fresco	Heraeus
Thermocycler, Trio Thermoblock	Biometra
Gelelektrophoresewanne, Agagel Maxi Powerpack P25	Biometra
Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer	Biorad
Horizontale Blotkammer	Biorad
Nitrozellulose Membranen	Amersham
ECL Hyperfilm	Amersham
Vakuumentrifuge Speed-Vac	Biometra
Vortex MS1 Minishaker	IKA
Pipetten	Eppendorf
Reaktionsgefäße, Safe-lock-tubes	Eppendorf
Pipettenspitzen	Eppendorf
Geldokumentationsgerät Bio Capture-Software MW	LTF
Rotor-Gene 2000	LTF

2.3 Lösungen

- 1) zur Kultivierung der Zellkultur: Medium Ham's F-12 Medium (mit Phenolrot)
- | | | |
|------------|-----|-------|
| FKS | 10 | % |
| L-Glutamin | 2 | mmol |
| Insulin | 160 | ng/ml |
- 2) für E2 Expositionsversuche: Medium Ham's F-12 Medium (ohne Phenolrot)
- | | | |
|-----------------------|-----|-------|
| charcoal-stripped FKS | 10 | % |
| L-Glutamin | 2 | mmol |
| Insulin | 160 | ng/ml |

3) <u>zur cDNA-Synthese:</u> pro Probe	5x Puffer	4 µl
	0,1 M DTT	2 µl
	10 nM dNTP	1 µl
	RT-Superscript	1 µl
4) <u>für die PCR:</u> pro 10 Proben	DEPC-Wasser	188 µl
	10x Puffer	25 µl
	MgCL ₂	10 µl
	10 nM dNTP	5 µl
	F Primer	5 µl
	R Primer	5 µl
	Taq-Polymerase	2 µl
5) <u>für die Echtzeit-PCR:</u>	1x Advantage2 Puffer	
	Taq-Polymerase	1,5 U
	0,2x SYBR Green	
	dNTP	(je Nukleotid) 200 µl
	F Primer	0,5 µM
	R Primer	0,5 µM
6) <u>für das Agarose-Gel:</u>	Agarose	1 g
	1x TAE Laufpuffer	100 ml
	Ethidiumbromid	1 µl
7) <u>für die Agarose-Gel-Elektrophorese:</u>		
6xDNA Probenpuffer:	Sucrose	40 %
	Bromphenolblau	0,25 %
	EDTA pH 8,0	5 mM
1 x TAE Laufpuffer:	Tris-Acetat pH 8,3	40 mM
	EDTA pH 8,0	1 mM

8) für die Westernblots:

Cell lysis buffer:	SDS	2 %
	Saccharose	10 %
	Tris-Acetat pH 8,3	63 mM
4 ml 5 % Sammelgel:	Aqua bidest.	2,7 ml
	Acrylamid Mix 30 %	0,67 ml
	Tris-Acetat pH 6,8 1.0 M	0,5 ml
	SDS 10 %	0,04 ml
	Ammoniumpersulfat 10 %	0,04 ml
	TEMED	0,004 ml
10 ml 12 % Trenngel:	Aqua bidest.	3,3 ml
	Acrylamid Mix 30 %	4,0 ml
	Tris-Acetat pH 8,8 1.5 M	2,5 ml
	SDS 10 %	0,1 ml
	Ammoniumpersulfat 10 %	0,1 ml
	TEMED	0,004 ml
Laufpuffer nach Laemmli:	Tris	25 mM
	Glycin	200 mM
	SDS	0,1 %
Blotpuffer:	Tris	20 mM
	Glycin	300 mM
	Methanol	20 %
Blockpuffer:	Magermilchpulver	5 %
	PBS	100 ml
	Tween	0,1 %
Waschlösung; PBS-Tween:	Aqua bidest.	1 l
	PBS	9,55 g
	Tween	1 ml

2.4 EEC B37 Zellen

Bei den EEC B37 Zellen handelt es sich um eine humane endometriale Epithelzelllinie (1.6).

Es handelt sich phenotypisch um Epithelzellen, die polarisiertes nicht-invasives und

kontaktinhibiertes Wachstum zeigen.

Die Zellen wurden mit dem katalytischen Teil (hTERT) des humanen Telomerase-Komplexes stabil transfektiert und somit immortalisiert, sie sind also längerfristig kultivierbar.

2.4.1 Zellkultur

Die EEC B37 Zellen wurden, abhängig von der benötigten Zellzahl, in 25 cm³ oder 75 cm³ Kulturflaschen kultiviert.

Für die Expositionsversuche wurden unbeschichtete 6-well-Kulturplatten, für die Zytotoxizitätsversuche ebenfalls unbeschichtete 96-well-Kulturplatten verwendet.

Zur Kultivierung wurde Ham's F-12 Medium (2.3 1) verwendet.

Die Häufigkeit des Mediumwechsels richtete sich nach der ausgesäten Zellmenge und deren Stoffwechsellistung. Diese wurde anhand des pH-Wertes, angezeigt durch die Farbe des Phenolrotzusatzes, abgelesen. Die verwendete Mediummenge betrug für kleine Flaschen 8 ml und für große 16 ml.

Die Zellen wurden im Inkubator bei einer Temperatur von 37 °C und einem CO₂ Gehalt von 5% kultiviert.

2.4.2 Passage und Zellzahlbestimmung

Die Passage der Zellen erfolgte, sobald die Zellen optisch mehr als 80% Konfluenz aufwiesen. Zur Passage wurden die Zellen abgelöst, resuspendiert und auf neue Kulturflaschen verteilt oder für Versuche eingesetzt.

Die Zellpassage beginnt mit dem Abnehmen des Mediums, anschließend wird die Kultur mit 10 ml Ca²⁺ - und Mg²⁺ -freiem PBS gespült um etwaigen Zelldetritus sowie freies Calcium zu entfernen. Das Ablösen der Zellen erfolgte nicht-enzymatisch mit 1 bis 1,5 ml CDS.

Um den Ablösevorgang zu beschleunigen wurden die Zellen für 2-3 Minuten zurück in den Inkubator gestellt. Durch leichtes, horizontales Klopfen löst sich der Zellrasen gut von der Flasche. Die Zellen wurden anschließend in frischem Medium resuspendiert, die Menge des Mediums entsprach hierbei der doppelten Menge der jeweils verwendeten CDS-Menge. Diese Zellsuspension wurde dann je nach Bedarf aufgeteilt.

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Auflichtmikroskop.

Die Zellkonzentration pro ml ergibt sich aus dem Mittelwert der ausgezählten Großquadrate multipliziert mit dem Verdünnungsfaktor und 10^4 .

Multipliziert man nun die ermittelte Zellkonzentration pro ml mit der vorhandenen Menge an Zellsuspension, so erhält man die Gesamtzellzahl.

Von dieser Gesamtzellmenge kann dann der benötigte Teil entnommen werden.

2.5 Expositionsversuche

2.5.1 Expositionsversuche mit TCDD und PCB

Alle in dieser Arbeit angegebenen Stoffmengen der Xenobiotika beziehen sich immer auf 1 ml Kulturmedium, stellen also Konzentrationen im Expositionsansatz dar.

Die jeweils durchgeführten Kontrollansätze mit dem Lösungsmittel DMSO wurden immer mit der Menge DMSO inkubiert, die der DMSO-Menge in dem entsprechenden Xenobiotika-Ansatz entsprach. Im folgendem sind in den Tabellen die DMSO Kontrollansätze immer mit der jeweiligen Zahl, die der Konzentration an Xenobiotika im Versuchsansatz entsprach gekennzeichnet (z.B. Xenobiotikakonzentration entsprach 100nM TCDD, der Kontrollansatz heißt 100 DMSO).

Die Expositionen erfolgten sowohl in Konzentrationsreihen als auch in Zeitreihen.

Die Expositionsversuche erfolgten in 6-well-Kulturplatten, mit 1×10^6 Zellen pro Napf in 2 ml Zellkulturmedium (2.3 1). Die Expositionsversuche wurden 24 Stunden nach Zellaussaat begonnen.

Als Negativkontrolle wurde bei jedem Versuchsansatz eine Inkubation in normalem Kulturmedium mitgeführt.

TCDD und PCB sind nicht wasserlöslich und wurden daher in DMSO gelöst. Um den Einfluss dieses Lösungsmittels beurteilen zu können, ist daher bei jedem Expositionsversuch außerdem eine DMSO Kontrolle in der jeweils höchsten verwandten Konzentration durchgeführt worden. Vor jeder Verwendung wurden diese Lösungen jeweils 1-2 Minuten mit dem Vortex und dem Ultraschallbad gemischt. Die weitere Verdünnung dieser Lösungen auf die benötigten Konzentrationen erfolgte in normalem Zellkulturmedium.

Unmittelbar vor Zugabe der Xenobiotika erfolgte ein Mediumwechsel.

Bei einer Expositionsdauer von mehr als 48 Stunden, erfolgte nach 48 Stunden ein Mediumwechsel sowie eine erneute Xenobiotikazugabe. Die Inkubation der Zellen für die Dauer des Versuchs erfolgte in einem gesonderten Inkubator bei 37°C in humiden

Verhältnissen und bei 5 % CO₂-Gehalt. Eine Kontamination der negativ Kontrollen durch mögliche Aerosole konnte so ausgeschlossen werden.

Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurde das xenobiotika-haltige Medium abgesaugt und fachgerecht entsorgt. Die Zellen wurden pro Napf in 1 ml Trizol Reagenz aufgenommen, in 2-ml-Reaktionsgefäße gefüllt und bei Bedarf, wenn die RNA-Isolierung nicht im Anschluss erfolgte, bei -80 °C eingefroren.

2.5.2 Expositionsversuche mit und ohne Östrogenzusatz

Die Expositionsversuche erfolgten in 6-well-Kulturplatten, mit $0,35 \times 10^6$ Zellen pro Napf in 2 ml steroidhormonfreiem Medium (2.3 2). Die Zellen wurden für 72 Stunden in steroidfreiem Medium kultiviert, um die Expression des Östrogenrezeptors (ER-alpha) zu induzieren [58].

Ein Wechsel des Mediums erfolgte alle 24 Stunden. Nach 72 Stunden erfolgte der Zusatz der Xenobiotika und je nach Ansatz des Weiteren der Zusatz von 1 nM E2. Die Inkubation sowie die Beendigung der Inkubation erfolgte wie in 2.5.1 beschrieben.

2.6 RNA-Isolierung

Zu den in 1 ml Trizol aufgenommenen Zellen aus den verschiedenen Inkubationsansätzen wurde jeweils 200 µl Chloroform pipettiert. Diese Ansätze wurden in den 2-ml-Reaktionsgefäßen gevortext und 4-5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Danach wurde für 15 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden 500 µl des klaren Überstands in ein vorgekühltes 1,5-ml-Reaktionsgefäß pipettiert und die gleich Menge an Isopropanol (-20 °C) dazugegeben. Dann erfolgte die Inkubation bei -20 °C für 40 min. Hiernach wurde erneut gemischt und für 10 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugiert.

Vorsichtig wurde der Überstand über dem oft nicht sichtbaren Pellet abgenommen und 1 ml 75 % Ethanol (-20 °C) dazugegeben. Nun wurde für 10 min bei 10.000 U/min und 4 °C zentrifugiert. Dieser Wasch-Schritt wurde einmal wiederholt.

Nach dem Waschen wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in der Vakuumzentrifuge getrocknet.

Das Pellet wurde nun in 20 µl DEPC-Wasser im 70 °C Wasserbad gelöst.

Zur Qualitätsprüfung der isolierten gRNA wurden 2 µl jeder Probe auf ein Agarose-Gel aufgetragen. Nur Proben die die 18 S- und die 28 S-rRNA Bande zeigten wurden weiterverwandt [59].

Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch bei 260 nm Wellenlänge (dem Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren). Durch Messen der Absorption bei 280 nm wurde der Anteil an Proteinen bestimmt.

Die Reinheit der Proben wurden durch den Quotienten der Wellenlängen 260 nm und 280 nm (260 : 280) bestimmt, es wurden nur Proben mit einem Quotienten größer als 1,6 weiterverwandt.

2.7 cDNA-Synthese

Zur cDNA-Synthese wurden 2 µg RNA in 2-ml-Reaktionsgefäßen eingesetzt. Es wurden 1 µl 3'AP-Primer zugesetzt, das Gesamtvolumen wurde mit DEPC-Wasser auf 12 µl aufgefüllt. Anschließend wurde gut durchmischt. Es folgte eine Inkubation von 10 min bei 70 °C sowie ein rasches Abkühlen im Eiswasserbad. Nun wurden 8 µl des für die reverse Transkriptase nötigen Reaktionsansatzes dazugegeben (2.3 3). Es wurde gut gemischt und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Inkubation wurden jeder Probe 20 µl DEPC-Wasser zugesetzt. Die so erzeugte cDNA wurde bei -20 °C gelagert.

2.8 PCR und PCR-Auswertung

2.8.1 RT- PCR

Das Reaktionsgemisch für die PCR (2.3 4) wurde in der benötigten Menge hergestellt und gut durchmischt.

Zu 24 µl Reaktionsgemisch im 1,5-ml-Reaktionsgefäß wurde je 1 µl der cDNA-Probe zugegeben.

Erneut wurde gut durchgemischt und im Anschluss mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet, um den Reaktionsansatz auch während des Erhitzens am Boden des Reaktionsgefäßes zu halten.

Die 25 µl des Reaktionsansatzes wurden dann in den Thermocycler gestellt, der nach folgendem Programm arbeitete:

3 min 95 °C – 30x (1 min 95 °C, 1 min AT, 2 min 72 °C) – 10 min 72 °C

Die 95 °C dienen der Denaturierung des Doppelstranges, während der Annealingtemperatur (AT) erfolgt die Anlagerung des Primers und bei 72 °C erfolgt die

Elongation des neuen Stranges durch die Polymerase.

Die Annealingtemperatur ist für jeden Primer spezifisch und wurde dementsprechend verändert.

Tab. 3: verwandte Primer mit Angabe Ihrer Basenpaarfolge und Annealingtemperatur

Primer	Sequenz	AT in °C
Cyp 1A1		
F	5' TCT-TTC-TCT-TCC-TGG-CTA-TC 3'	56
R	5' CTG-TCT-CTT-CCC-TTC-ACT-CT 3'	56
Cyp 1B1		
F	5'AGC-CTC-AGC-CCG-AAC-GAC-CC 3'	56
R	5'GCA-CCA-GCA-GCG-CCA-CCA-GC 3'	56
AhR.1		
F	5'CTA-GGG-TTT-CAG-CAG-TCT-GAT-GTC 3'	62
R	5'TTC-AGT-ATA-TCC-TAA-AAC-AAT-TCT-TCC 3'	62
ARNT.1		
F	5' TCA-TGT-GAG-ACA-GGC-AGG-GTG-G 3'	65
R	5' GCC-ACT-AGG-CAA-AAC-TTG-CTT-CC 3'	65
ER α		
F	5' CAG-GGG-TGA-AGT-GGG-GTC-TGC-TG 3'	60
R	5' ATG-CGG-AAC-CGA-GAT-GAT-GTA-GC 3'	60
Er β		
F	5' CGA-TGC-TTT-GGT-TTG-GGT-GAT 3'	60
R	5' CTT-TAG-GCC-ACC-GAG-TTG-ATT 3'	60

Tab. 4: PCR Produktgrößen der verwandten Primer

Primer	Größe Transkriptionsprodukt in bp
AhR	500
ARNT	478
CYP1A1	795
CYP1B1	537
ER α	482
ER β	213

2.8.2 Gelelektrophorese

Es kam ein 1 %iges Agarose-Gel mit Ethidiumbromid-Zusatz zum Einsatz. Der Ethidiumbromid-Zusatz ermöglicht ein sichtbar machen der PCR-Banden im UV-Licht. Pro Geltasche wurden 8 µl DNA-Probe und 1 µl Ladepuffer eingefüllt.

Pro Gel wurde einmal DNA-Marker aufgetragen. Die Gele liefen bei 80-100 Volt 45 bis 90 Minuten. Durch die Wanderung des Bromphenolblau-Farbstoffs des Ladepuffers konnte das Fortschreiten der Elektrophorese optisch kontrolliert werden.

Die Dokumentation der Gele erfolgte in einem Dokumentationsgerät auf einem UV-Lichttisch mit Hilfe einer Kamera. Diese war an einen Personalcomputer angeschlossen, der die Bilder sofort digitalisierte.

Die in dieser Arbeit gezeigten Abbildungen der PCR-Gele stellen immer das mehrfach ($n \geq 2$) bestätigte Ergebnis der PCR's dar.

2.8.3 GAPDH-PCR

Aus jeder cDNA-Probe wurde parallel zur Zielgen-PCR auch eine GAPDH-PCR angefertigt. Die GAPDH-PCR wurde als interner Standard verwendet, da GAPDH als sogenanntes housekeeping-Gen konstitutiv exprimiert wird.

Housekeeping-Gene kodieren in der Regel für Enzyme, die der Aufrechterhaltung des Stoffwechsels dienen oder z.B. für Proteine des Zytoskeletts, also für essentiell wichtige Zellbestandteile.

In vorausgegangenen nicht veröffentlichten Experimenten der Arbeitsgruppe um Dr. med habil S. Hombach-Klonisch zeigte sich, daß die in dieser Arbeit verwendeten Xenobiotika keine Veränderungen der GAPDH mRNA auslösten, sie kann daher zur Überprüfung der Unversehrtheit der RNA sowie der reversen Transkription genutzt werden.

Da der Anteil der Zielgen-RNA von der Xenobiotikaexposition abhängt und je nach Induktion variabel ist, kann die konstante Menge an GAPDH-RNA so zur semiquantitativen Bestimmung der Zielgen-RNA-Menge genutzt werden.

Die Reaktionslösungen der GAPDH-PCR entsprechen denen der RT-PCR unter 2.8.1, Programm des Thermocyclers:

3 min 95 °C – 20x (1 min 95 °C, 1 min 60 °C, 2 min 72 °C) – 10 min 72 °C

Die Auswertung der GAPDH-PCR erfolgte wie unter 2.8.1 beschrieben.

2.8.4 Echtzeit-PCR

Für die Quantifizierung wurde 1 µl des RT-PCR Reaktionsgemisches (2.3 4) mit 25 µl Reaktionsansatz für die Echtzeit-PCR (2.3 5) vermischt.

Als negative Kontrolle diente eine Probe ohne cDNA. Es wurden immer Triplikate gemessen.

Programm des Thermocyclers:

300 sec 95 °C –40x ((15 sec 95 °C, 30 sec 60 °C, 20 sec 72 °C) Messung bei 82 C) –

SYBR Green ist ein interkalierender Fluoreszenzfarbstoff, welcher doppelstrang-spezifisch ist. Er zeigt daher die Menge der gebildeten PCR-Produkte an.

Die Fluoreszenzsignale des SYBR Green wurden nach jedem Elongationsschritt bei 82 °C gemessen.

Die Messung der Fluoreszenzsignale mit SYBR Green ist sequenzunspezifisch. Deshalb wurde im Anschluss an die PCR eine Spezifitätskontrolle der PCR-Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse durchgeführt.

Jedes Amplikon besitzt abhängig von seiner Länge, dem Anteil der verschiedenen Basen und eventuellen Fehlpaarungen einen spezifischen Schmelzpunkt, der mit Hilfe des SYBR Green bestimmt werden kann. Das Fluoreszenzsignal nimmt beim Aufschmelzen des Doppelstranges ab.

Die relative Quantifizierung der Genexpression erfolgte mit der Rotor-Gen Software Version 4.6 aus den Schmelzkurven.

Die relative Konzentration der Proben wurde im Vergleich zur Negativkontrolle berechnet.

Die Echtzeit-PCR wurde mit freundlicher Unterstützung von Dr. A. Kehlen durchgeführt (damals: Institut für Immunologie, MLU Halle-Wittenberg).

2.9 Westernblot

Der Westernblot ist ein hochempfindliches Immunoblot-Verfahren zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine nach ihrer elektrophoretischen Übertragung aus SDS-Polyacrylamid-Gelen auf eine Nitrocellulose Membran durch eine immunologische Färbung.

Für die Proteinnachweise wurden die EEC B37 in 25 cm³ Kulturflaschen in normalem

Kulturmedium, bzw. fünf Tage E2-frei kultiviert. Die Lyse erfolgte nach Erreichen von mindestens 80% optischer Konfluenz mit dem Zellysierungspuffer für 30 Minuten bei 4° C. Das Lysat wurde für 5 Minuten mit 90° C gekocht und anschließend zentrifugiert, um den Zelldetritus zu pellettieren. Der Proteingehalt des Überstands wurde mit einem Protein assay und einem Photometer bei 595 nm bestimmt. Die Lagerung der so isolierten Proteine erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -80° C.

Die Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde nach der Methode von Laemmli durchgeführt. Die Auftrennung des Proteingemisches erfolgte über 12 %-ige Trenngelle in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer gefüllt mit Laemmli-Laufpuffer. Vor dem Auftragen wurden alle Proben mit dem Laemmli-Ladepuffer auf ein Volumen von 20 µl gebracht und für fünf Minuten auf 90° C erhitzt, anschließend in Eiswasser verbracht und gevortext. Es wurden jeweils 30 µg Protein eingebracht.

Es wurden pro Geltasche im 5 %-igen Sammelgel jeweils 20 µl der Probe vorsichtig eingefüllt.

Zur Bestimmung der relativen Molmassen der Proteine wurde pro Gel eine Tasche mit einem Protein-Marker befüllt.

Die SDS-PAGE wurde in einer Mini-Trans-Blot-Elektrophoresekammer durchgeführt. Die Trennung wurde gestoppt, sobald die Lauflinie des Farbstoffs aus dem Trenngel herauslief (Laufzeit ungefähr zwei Stunden bei 100-120 mV Spannung).

Im Anschluss wurden die Gele zur Äquilibration in Blotpuffer geschwenkt.

Nachdem auch alle Filterpapierbogen und die Nitrozellulosemembran mit Blotpuffer befeuchtet worden waren, wurde die horizontale Blotkammer folgendermaßen gepackt:

Anode
Schwamm
Filterpapier
SDS-Gel
Nitrozellulosemembran
Filterpapier
Schwamm
Kathode

Für einen vollständigen Blot-Vorgang war es wichtig keine Lufteinschlüsse zwischen den Schichten zu haben.

Der Proteintransfer geschah über ein angelegtes elektrisches Feld von konstant 300 mA Stromstärke für 25 Minuten pro Gel. Die auf die Nitrozellulosemembran transferierten Proteine wurden mit Ponceau-Färbelösung sichtbar gemacht, dieser Schritt diente der

Transferkontrolle und ermöglichte zur späteren Orientierung ein Einzeichnen der Markerproteine mit einem Bleistift. Die Ponceau-Färbung wurde dann mit Leitungswasser vorsichtig weggespült.

Vor der Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper, wurden zunächst alle freien Proteinbindungsstellen auf der Membran mit dem Blockpuffer zwei Stunden bei Raumtemperatur abgesättigt. Nach dem Blocken wurde die Membran dreimal kurz mit einigen Millilitern PBS-Tween gewaschen und anschließend mit dem primären Antikörper in der jeweiligen Blockpuffer-Verdünnung über Nacht bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit stets frischem PBS-Tween-Puffer für je zehn Minuten am Folgetag wurde die Nitrozellulosemembran mit dem korrespondierenden zweiten Antikörper in 12 ml PBS-Tween-Puffer eine Stunde bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln inkubiert.

Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS-Tween-Puffer wurde die Nitrozellulosemembran mit einem Gemisch aus jeweils 1,5 ml der ECL-Lösungen 1 und 2 für eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert. Der sekundäre Antikörper ist Peroxidase (HRP) konjugiert, diese katalysiert in Anwesenheit von Wasserstoffperoxid die Oxidation von Luminol, beides war in der ECL-Lösung enthalten. Die entstehenden Lichtemissionen wurden durch Belichten von Röntgenfilmen und anschließendem Entwickeln und Fixieren der Filme in der Dunkelkammer sichtbar gemacht.

Die verwendeten Antikörper wurden wie folgt verdünnt:

Goat polyclonal anti CYP1A1 1: 200,

HRP-rabbit anti-goat IgG 1: 5000,

ER α antibody rabbit monoclonal 1: 100,

HRP-goat anti-rabbit IgG 1: 10000.

2.10 Zytotoxizitätsversuche

2.10.1 Proliferationsversuche

Der verwandte Test ist ein nichtradioaktiver Zellproliferationstest, der ein nichttoxisches Chromophor nutzt.

Er beruht darauf, dass vitale Zellen in ihren Mitochondrien ein nahezu farbloses, leicht gelbliches Tetrazoliumsalz NADH₂-abhängig in ein intensiv rot gefärbtes Formazanderivat umwandeln.

Der Proliferationstest erfolgte in einer 96-well-Kulturplatte in 200 μ l Kulturmedium.

Jeder Expositionsansatz wurde mit drei Zellzahlen, 3×10^3 , 5×10^3 sowie 1×10^4 Zellen, jeweils in Triplikaten ausgesät.

Die weitere Handhabung der Zellen und die Inkubation erfolgte so, wie in Punkt 2.5 beschrieben. Nach 24stündiger Exposition wurde dem Expositionsmedium das Substrat des Proliferationstests beigelegt.

Es wurden 2,5 ml der auf 37°C erwärmten Aktivatorlösung mit dem Substrat vermischt, pro Napf wurden 20 μl des gelösten Substrats zugesetzt.

Durch leichtes Antippen der Kulturplatte erfolgte die Vermischung von Substrat und Medium. Die Mikrotiterplatte wurde dann weiter bei 37°C inkubiert.

Die Intensität der Umsetzung wurde in einem Mikrotiterplatten-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm nach 2, 4 und 6 Stunden als Extinktion gemessen.

Als Leerwert dienen Messungen von Kulturmedium und Substrat ohne Zellzusatz.

2.10.2 Apoptoseversuche

Der verwandte Test ist ein Apoptosetest, der die Aktivität der Caspasen 3 und 7 mit Hilfe eines Luminometers misst.

Die Caspasen 3 und 7 spielen im Ablauf der Regulation der zellulären Apoptose eine wichtige Rolle.

Der Test beruht darauf, dass die Caspasen 3 und 7 ein Substrat in dem Testreagenz spalten und aus ihm Aminoluziferin freisetzen, welches durch eine Luziferasereaktion leuchtet.

Die Lumineszenz ist proportional zur Aktivität der zellulären Caspasen.

Der Apoptosetest erfolgte in einer 96-well-Kulturplatte in 200 μl Kulturmedium.

Jeder Expositionsansatz wurde mit drei Zellzahlen, 3×10^3 , 5×10^3 sowie 1×10^4 Zellen jeweils in Triplikaten ausgesät.

Die weitere Handhabung der Zellen und die Inkubation erfolgte so, wie in Punkt 2.5 beschrieben.

Nach 24stündiger Exposition wurden 100 μl des Expositionsmediums abpipettiert und die Kulturplatten auf Raumtemperatur äquilibriert.

Das Caspase-Glo 3/7 Substrat und der Puffer wurden bei Raumtemperatur miteinander vermischt. Pro Napf wurden 100 μl Caspase-Glo-Reagenz zugesetzt (Medium: Caspase-Glo-Reagenz = 1:1)

Die 96-well Kulturplatte wurde für 30 Sekunden zum Mischen auf den Rüttler gestellt.

Die Inkubation erfolgte für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur.

Anschließend wurden die Proben in die Luminometer-Röhrchen pipettiert und im Luminometer einzeln gemessen.

Die Lichtemission wird in relativen Lichteinheiten (RLU) gemessen, die Darstellung erfolgte in RLU pro 1000 Zellen.

Als Leerwert diente die Messung eines zellfreien Ansatzes ohne Xenobiotikazusatz.

2.11 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion stellt eine Möglichkeit dar, für eine begrenzte Zeitdauer einen beliebigen DNA-Abschnitt mit Hilfe eines bakteriellen Plasmids in eine Zelle zu bringen.

Das hier verwandte Plasmid, welches freundlicherweise von Professor Dr. Dörthe Katschinski (Institut für Kreislaufphysiologie, Universität Göttingen) zur Verfügung gestellt wurde, ist ein XRE-Reporter Plasmid.

Das bakterielle Plasmid dient hier als eine Art „Genfähre“, welche einen DNA-Abschnitt, der die XRE-Sequenz, sowie ein Luziferase-Gen enthält, vorübergehend in die Zellen transportiert. Über die XRE-Sequenz wird in den transfektierten Zellen nun die Aktivität der Luziferase reguliert und somit die Menge des leuchtenden Firefly-Substrats.

Die Ansätze erfolgten in 6-well-Kulturplatten, es wurden $0,9 \times 10^6$ Zellen in 2 ml Kulturmedium pro Napf eingesetzt, das entspricht 90 % optischer Konfluenz 24 Stunden nach Aussaat der Zellen.

Die Transfektion wurde 24 Stunden nach Zellaussaat nach einem Mediumwechsel begonnen.

Zur Transfektion wurde Metafectene, ein polykationisches Transfektionsreagenz verwendet. Es ermöglicht eine einfache Transfektion in normalem, serumhaltigem Kulturmedium.

Die Plasmidlösung sowie das Metafectene wurden auf Raumtemperatur gebracht und sanft gevortext.

Es wurden 1 µg des XRE-Reporter-Plasmids in 100 µl serumfreien Medium mit 3 µl Metafectene ebenfalls in 100 µl serumfreien Medium durch vorsichtiges auf- und abpipettieren vermischt.

Diese Transfektionslösung wurde für 20 Minuten bei Raumtemperatur zur Bildung eines DNA-Lipid-Komplexes inkubiert.

Wichtig war diese Transfektions-Mischung unbedingt in serumfreiem Medium herzustellen, da es sonst zu Beeinträchtigungen der Bildung des DNA-Lipid-Komplexes kommt.

Dieser DNA-Lipid-Komplex stellt gewissermaßen die Grundlage der Transfektion dar, da es sich bei dem verwandten Transfektionsverfahren um eine sogenannte Lipofektion handelt.

Hierbei wird die DNA zunächst in Liposomen eingekapselt. Liposomen sind vesikelartige Gebilde, die ähnlich wie die Zellmembran aus einer Lipiddoppelschicht bestehen. Die Aufnahme der Nukleinsäuren erfolgt durch den Kontakt mit den zu transfizierenden Zellen, hierbei fusioniert die Membran der Liposomen mit der Zellmembran.

Die Nukleinsäuren gelangen auf diese Weise direkt in das Cytoplasma. Eine andere Möglichkeit besteht in der Aufnahme der Vesikel durch Endozytose [60].

Der liposomale Inhalt liegt hierbei zunächst endosomal vor und muss dieses Kompartiment zunächst verlassen [61]. Die freigesetzte DNA muss dann, aus dem Cytoplasma durch die Kernporen in den Zellkern transportiert werden. Wie diese Aufnahme im Einzelnen erfolgt, ist noch weitgehend unbekannt.

Pro Napf wurden 200 µl der Transfektionslösung eingesetzt und anschließend für 6 Stunden bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert.

Nach diesen 6 Stunden erfolgte ein Mediumwechsel und es wurde mit der Xenobiotika Exposition begonnen.

Nach 24 Stunden wurde die Inkubation durch Absaugen des Mediums und einmaligem Spülen mit PBS beendet. Das Lösen der Zellen erfolgte in 500 µl Passive Lysis Buffer für 10 Minuten bei Raumtemperatur.

Nach Pelletierung der Zellreste in der Zentrifuge, wurde die Luziferase Aktivität im Überstand nach Zugabe des Firefly-Luziferase Reagenz (Luciferase substrate) 10 Sekunden im Luminometer gemessen.

3 Ergebnisse

Die hTERT-EEC B37 Zellen wuchsen in den Kulturflaschen als Monolayer und zeigten bei Erreichen vollständiger Konfluenz eine Kontaktinhibition.

Erfolgte dann eine Passage und Ausdünnung setzten die Zellen ihre regelrechte Proliferation fort.

Die Expositionsversuche sollten zeigen, ob hTERT-EEC Zellen sich als responsives humanes endometriales Zellmodell zu in-vitro Untersuchungen über den Einfluss verschiedener in der Umwelt verbreiteter Xenobiotika eignen.

Die Zellen zeigten unter Einwirkung des Dioxins und der PCB optisch keine Veränderungen der Morphologie, der Proliferation oder ihres Adhäsionsverhaltens bei Betrachtung unter dem Auflichtmikroskop.

Die Zellen exprimierten Transkripte für AhR unabhängig von der Anwesenheit der Xenobiotika oder des Lösungsmittels DMSO (siehe Abb.:2 A). Des Weiteren lässt sich die mRNA von ARNT und ERα nachweisen (siehe Abb.:2 B). ERβ wird nicht exprimiert in

hTERT-EEC.

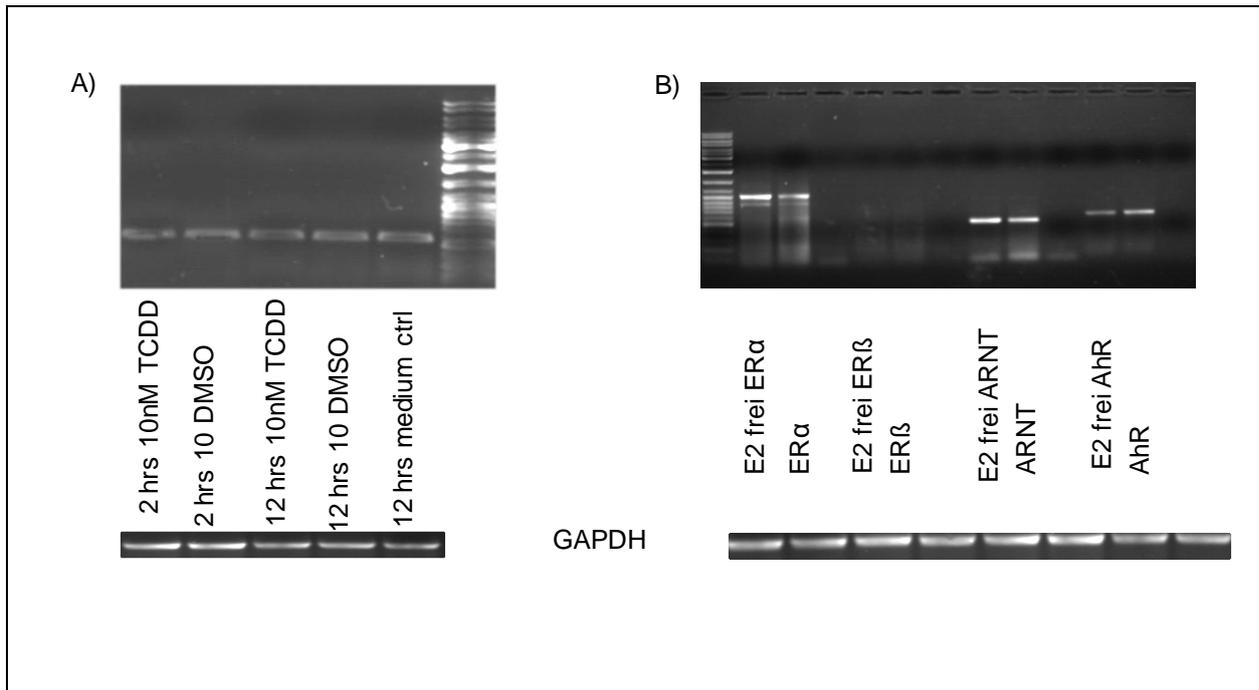


Abb. 2 : Nachweis verschiedener Rezeptor mRNA unter unterschiedlichen Kulturbedingungen

- A) AhR mRNA nach unterschiedlicher TCDD Expositionsdauer mit jeweiliger Lösungsmittelkontrolle
- B) Rezeptor mRNA nach 24 Stunden Inkubation in Medium mit und ohne E2

Expositionsversuche mit TCDD und kopIPCB zeigten eine zeit- und dosisabhängige Expression des „klassischen Dioxin-Zielgens“ Cyp1A1 in hTERT-EEC.

3.1 TCDD Exposition

3.1.1 Cyp1A1 mRNA Induktion

In verschiedenen Konzentrationsreihen zeigte sich eine deutliche Induktion der Cyp1A1 Transkription ab einer TCDD Konzentration von 1 nM bei einer Expositionszeit von 24 Stunden.

Die Cyp1A1 mRNA war bei Exposition mit den höheren Konzentrationen 10 nM und 100 nM TCDD für 24 Stunden gegenüber den Lösungsmittelkontrollen ebenfalls deutlich erhöht.

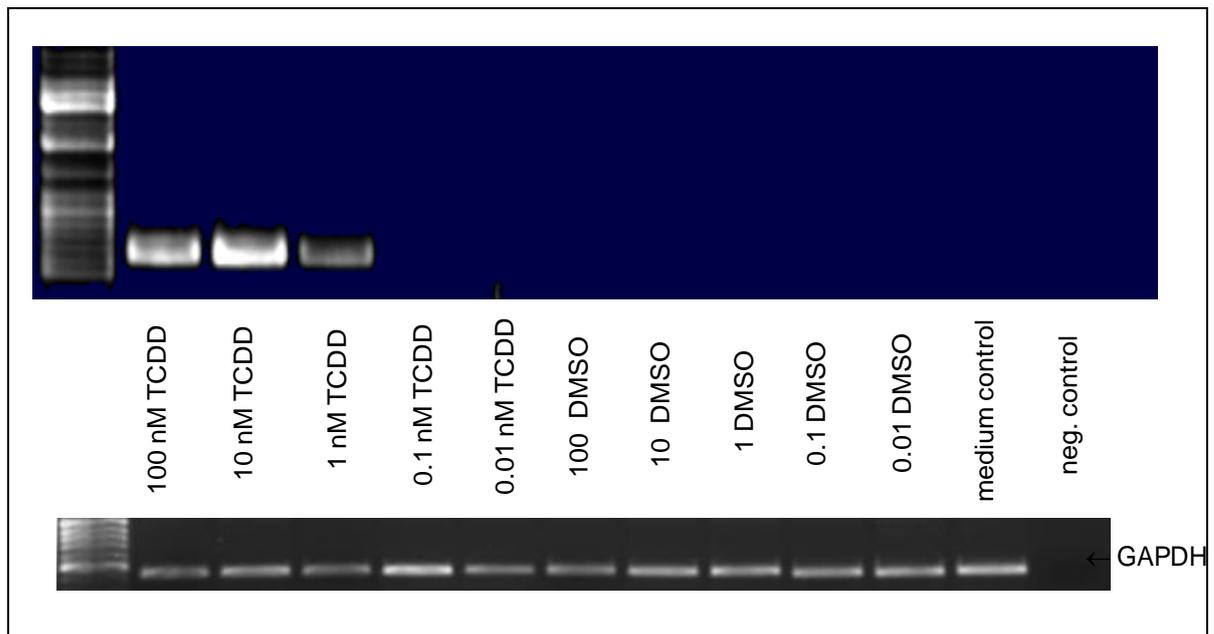


Abb. 3: Cyp 1A1 Induktion nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen TCDD Konzentrationen

Bei keiner der als Lösungsmittel in den TCDD Versuchen verwendeten DMSO Konzentrationen ließ sich, bei einer Expositionszeit von 24 Stunden eine gesteigerte Cyp1A1 Transkription feststellen.

Niedrigere TCDD Konzentrationen als 1 nM erzeugten bei 24stündiger Exposition keine sicheren Effekte, d.h. die Induktion war nicht regelmäßig auszulösen.

In Zeitreihen, die mit TCDD Konzentrationen von 0,1 nM und 10 nM durchgeführt wurden zeigte sich für 10 nM bereits nach 20 Minuten Expositionszeit eine Cyp1A1 Induktion.

Regelmäßig verursachte auch DMSO in einer Konzentration äquivalent zu der in 10 nM TCDD, bei einer Expositionszeit bis zu 6 Stunden eine erhöhte Transkription von Cyp1A1. Bei Expositionszeiten länger als 6 Stunden war keine DMSO bedingte Induktion mehr vorhanden.

Die Induktion der Cyp1A1 Expression unter TCDD steigerte sich bis zu Expositionszeiten von 72 Stunden.

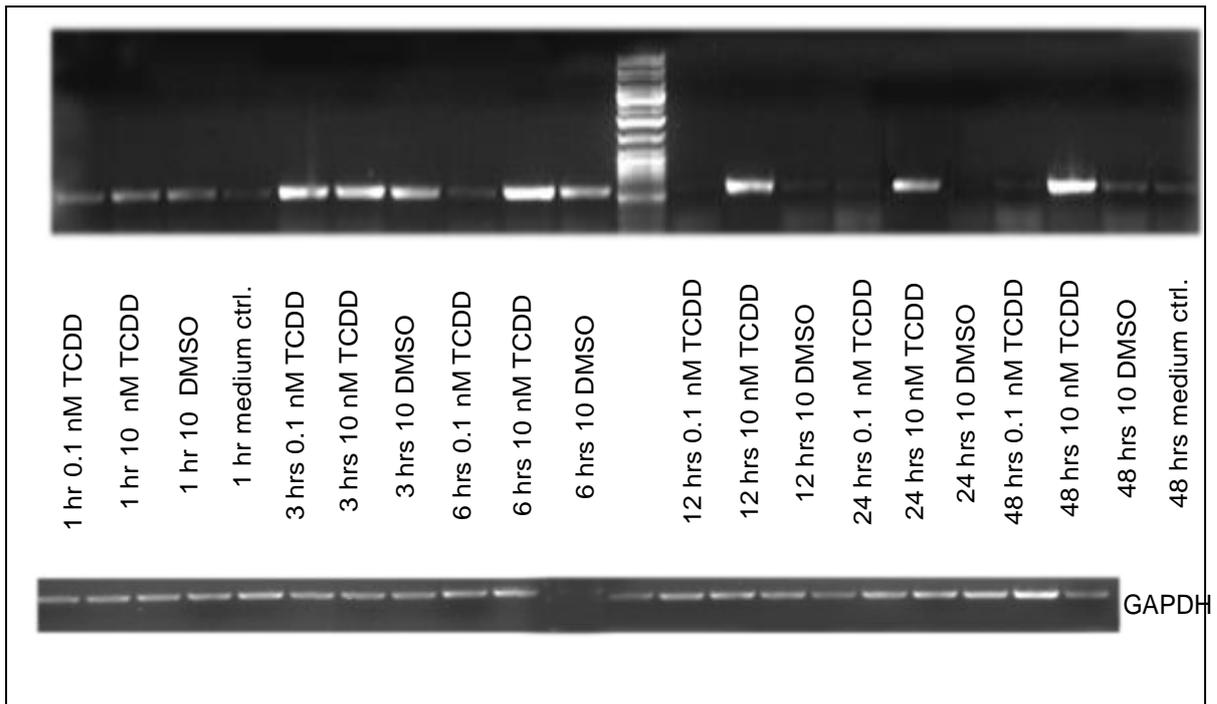


Abb. 4: Cyp 1A1 Induktion nach verschiedenen TCDD Expositionszeiten

3.1.2 Cyp1B1 mRNA Induktion

Auch Cyp1B1 wurde bei einer Expositionsdauer von 24 Stunden ab einer TCDD Konzentration von 1 nM induziert.

In Zeitreihen mit 10 nM TCDD zeigte sich eine im Vergleich zu Cyp1A1 eher schwache und bei Expositionszeiten von 20 Minuten bis zu 12 Stunden, recht gleichbleibende Transkriptionssteigerung von Cyp1B1.

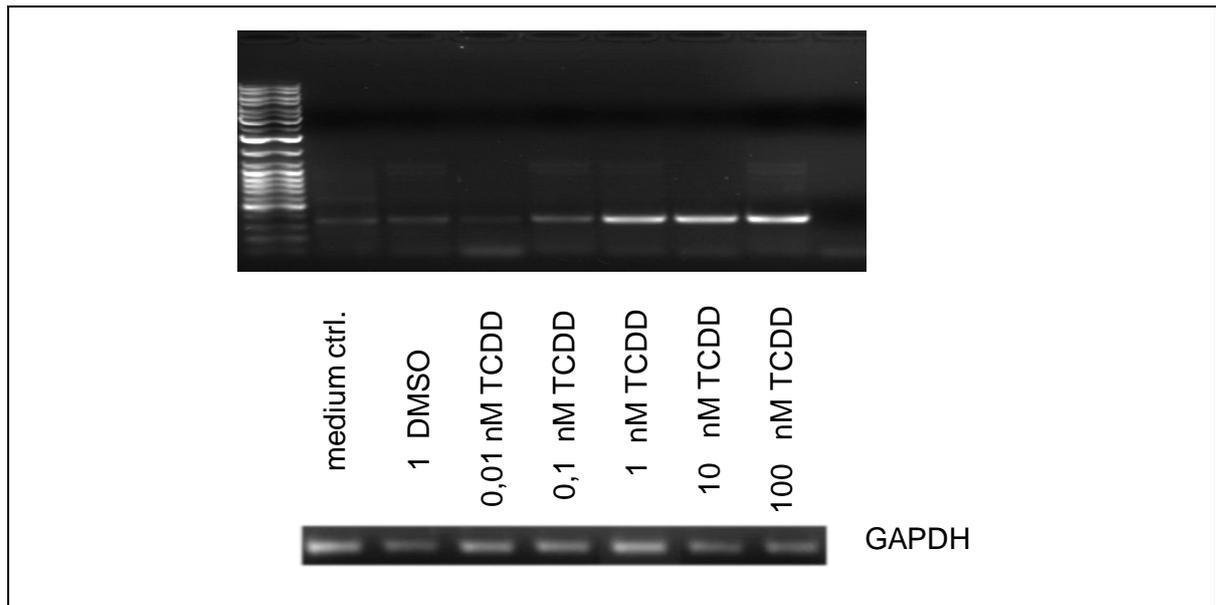


Abb. 5: Cyp 1B1 Induktion nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen TCDD Konzentrationen

3.2 PCB Exposition

Initial haben wir in verschiedenen, hier nicht gezeigten Versuchen einige nichtkoplanare PCB eingesetzt, eine Cyp-Induktion fand durch diese nichtkoplanaren PCB nicht statt.

Die weiteren Versuche beschränkten sich bezüglich der PCB's ausschließlich auf die koplanaren Kongenere 77, 126 und 169.

Die weiteren Expositionsversuche mit koplanaren PCB wurden erst mit einem Gemisch der drei Kongenere 77, 126 und 169, indem alle drei Kongenere zu gleichen Teilen enthalten waren und anschließend mit den einzelnen Kongeneren durchgeführt.

In verschiedenen Konzentrationsreihen zeigte sich eine deutliche Induktion der Cyp1A1 mRNA ab einer kopIPCB-Gemischkonzentration von 100 ng und einer Expositionszeit von 24 Stunden.

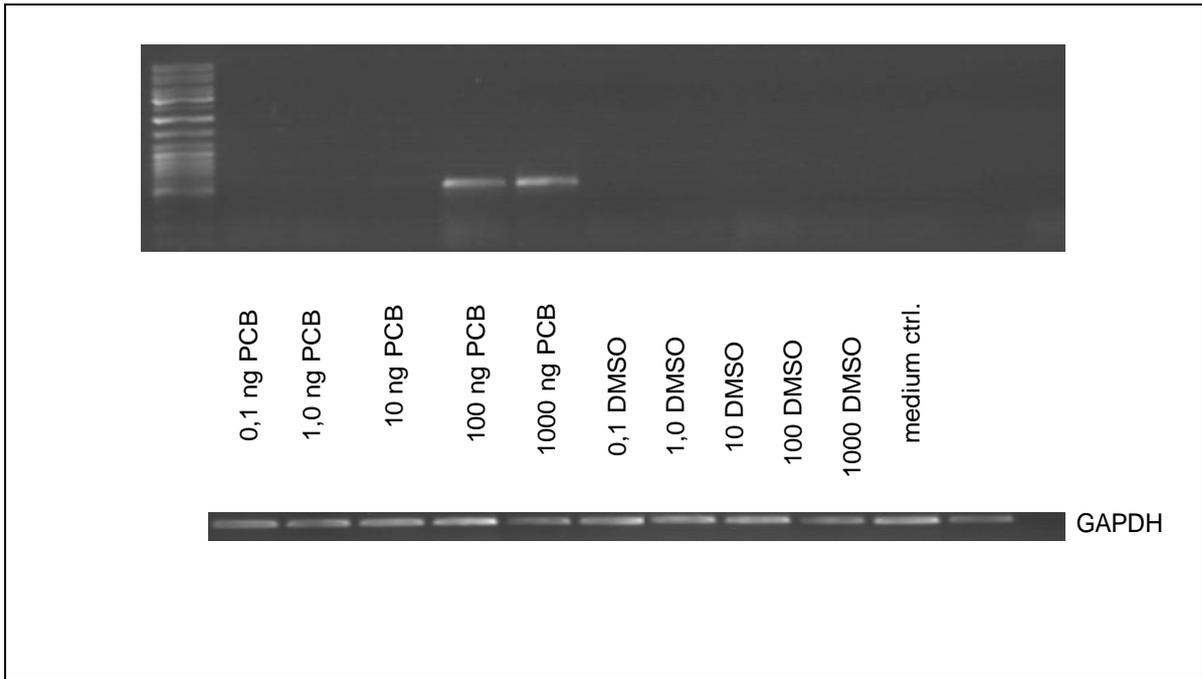


Abb. 6: Cyp 1A1 Induktion nach 24 Stunden Exposition mit verschiedenen Konzentrationen koplaraner PCB

In den, mit 100 ng koplPCB-Gemisch, durchgeführten Expositionszeitreihen, zeigte sich eine Induktion der Cyp1A1 mRNA bereits nach drei Stunden. Diese ließ auch bei bis zu 48 Stunden andauernder Exposition nicht nach.

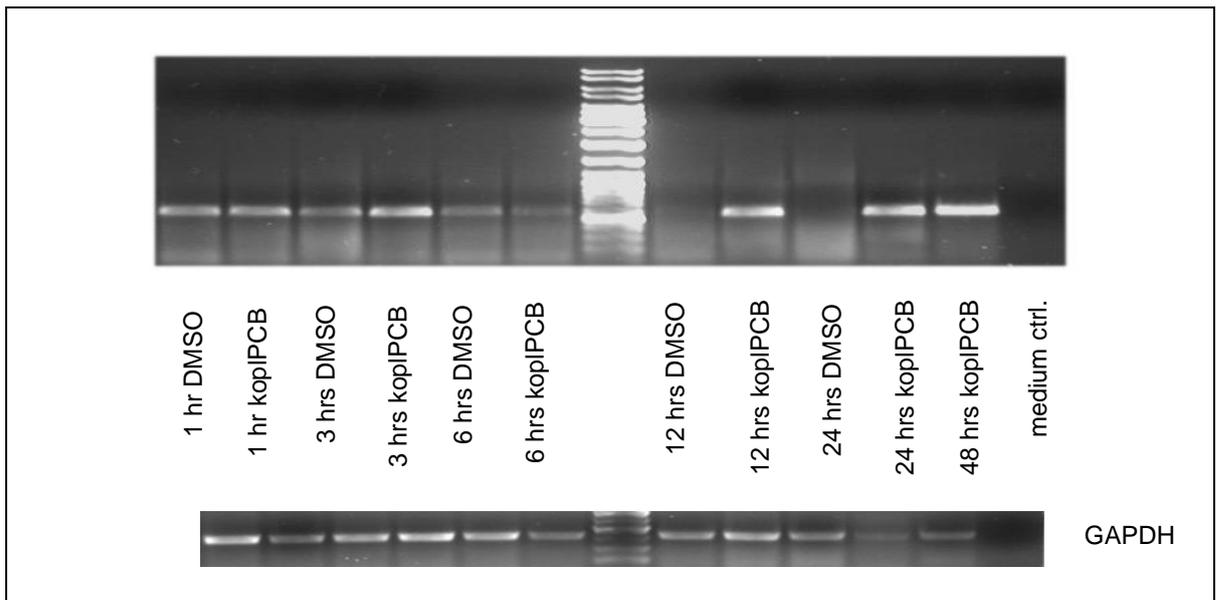


Abb. 7: Cyp 1A1 Induktion nach verschiedenen Expositionszeiten mit 100 ng koplaren PCB

Expositionsversuche mit den einzelnen Kongeneren, in einer Konzentration die der, der Kongenere im koplanaren Gemisch entsprach (33 ng) zeigten, dass die erhöhte Cyp1A1 Transkription in erster Linie durch 3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl (PCB 126) ausgelöst wurde.

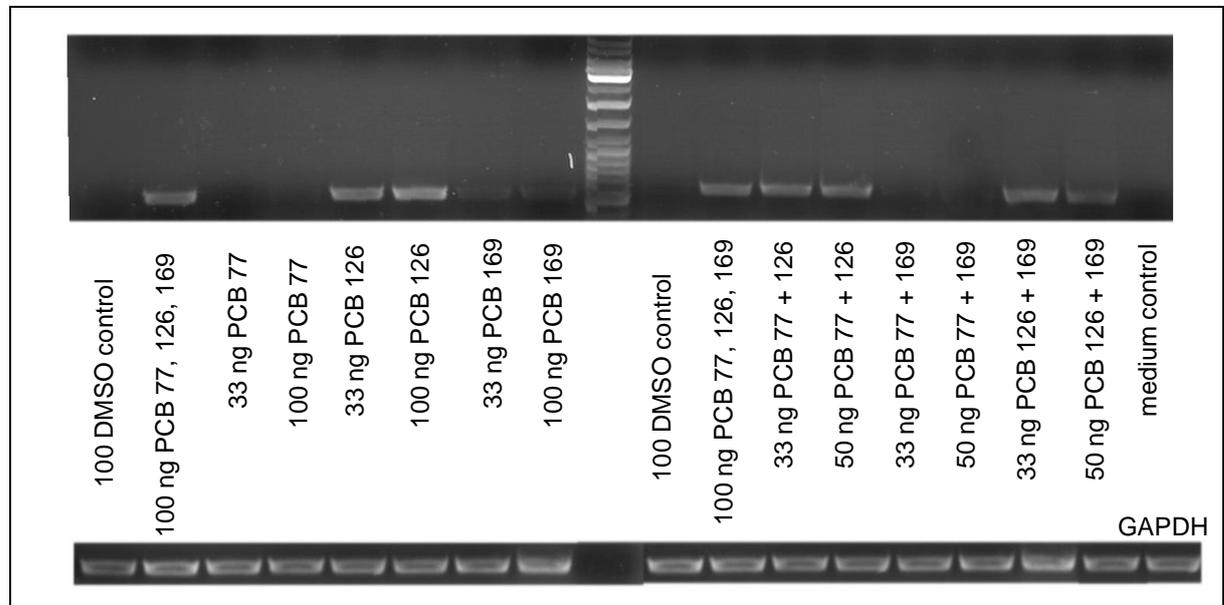


Abb. 8: Cyp 1A1 Induktion nach 24 Stunden Exposition einmal mit dem koplanaren PCB Gemisch und mit den enthaltenen Kongeneren jeweils einzeln

Erst in sehr hohen Konzentrationen von 500 ng war auch das PCB 169 in der Lage eine, wenn auch im Vergleich zum PCB 126 deutlich geringere, Induktion von Cyp1A1 auszulösen.

Das PCB 77 löste in keinem der Versuche eine Cyp1A1 Induktion aus.

In hohen Konzentrationen induzierte auch das Lösungsmittel DMSO Cyp1A1, jedoch nur bis zu einer Expositionsdauer von 6 Stunden.

Bei längerer Expositionszeit erfolgte die Induktion nur durch die PCB.

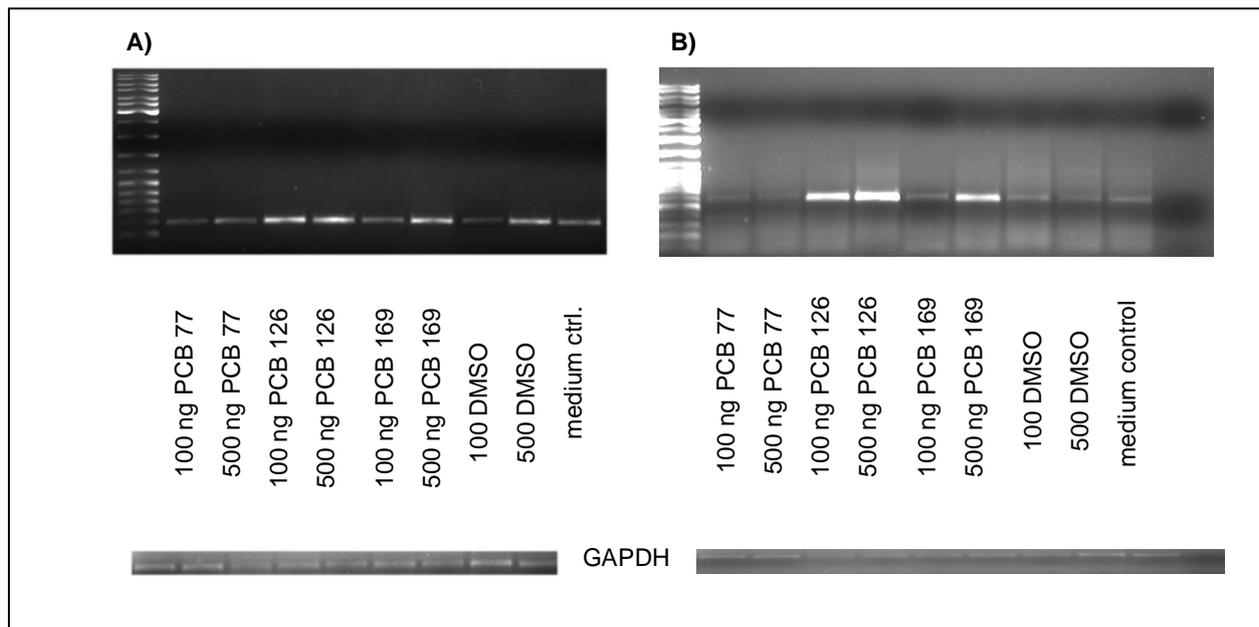


Abb. 9: Cyp 1A1 Induktion durch verschiedene PCB Konzentrationen nach 6 (A) und 24 (B) Stunden Expositionsdauer

Das PCB 126 allein induzierte in abnehmenden Konzentrationsreihen über 24 Stunden Cyp1A1 bis zu einer Konzentration von 25 ng gegenüber äquimolaren DMSO Kontrollen deutlich.

3.3 Quantifizierung der Transkriptionssteigerung der Zielgene

Da es sich bei der RT-PCR lediglich um eine semiquantitative Nachweismethode handelt, wurde die mRNA einiger Expositionsversuche in der Echtzeit-PCR quantifiziert. Diese bestätigte und verdeutlichte eindrucksvoll die Ergebnisse der RT-PCR.

In einer Zeitreihe mit 10 nM TCDD zeigte sich eine nahezu exponentielle Transkriptionsteigerung. So zeigte sich in der Echtzeit-PCR z.B. nach einer Expositionszeit von 12 Stunden eine Transkriptionsteigerung der Cyp1A1 mRNA von 1000 mRNA Kopien.

Als Kontrolle diente eine 12-stündige Inkubation in Kulturmedium mit einer, dem 10 nM TCDD Ansatz äquivalenten DMSO Konzentration.

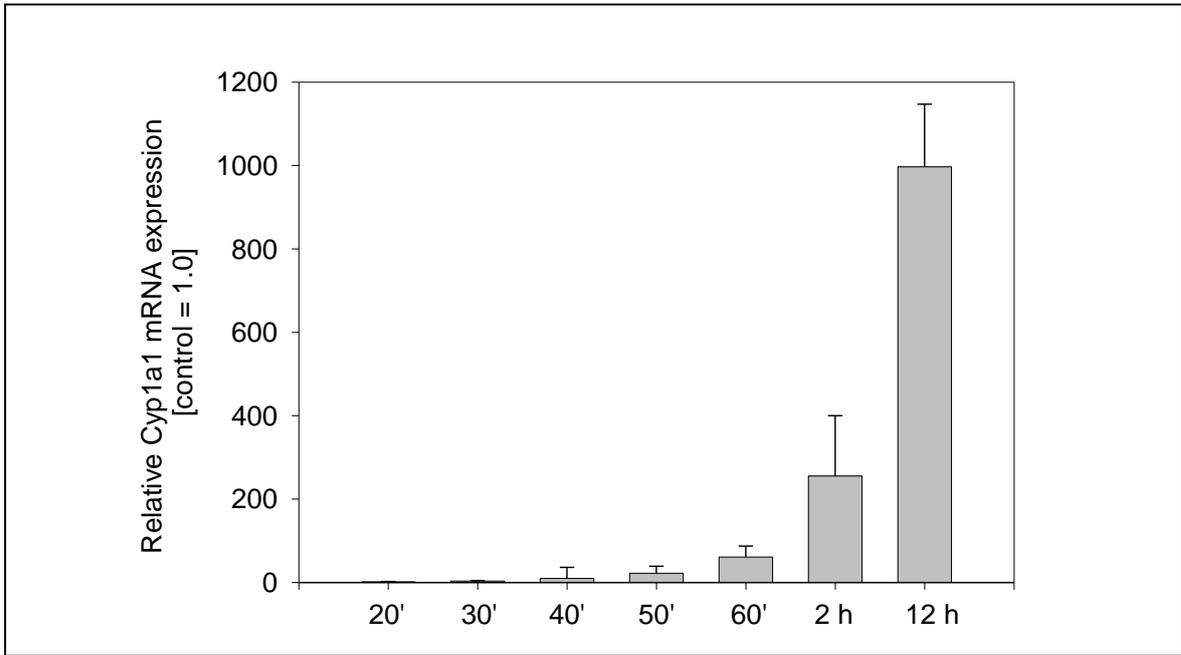


Abb. 10: Cyp 1A1 Induktion nach verschiedenen Expositionszeiten mit 10 nM TCDD (Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Kehlen)

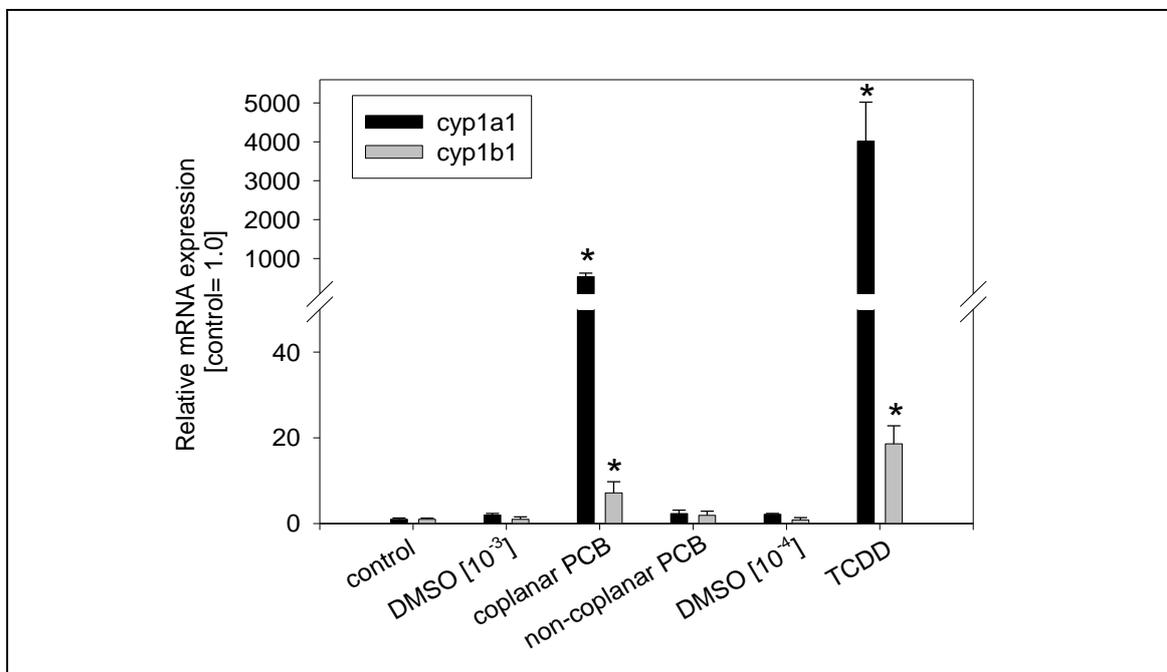


Abb. 11: Cyp1A1 und Cyp1B1 Induktion nach 24 Stunden Exposition mit TCDD oder PCB und der jeweiligen Lösungsmittelkontrolle (Abb. freundlicherweise zur Verfügung gestellt von A. Kehlen)

Für die 24 Stunden Inkubationen, zeigten sich die Ergebnisse der RT-PCR ebenfalls noch eindrucksvoller in der Echtzeit-PCR,

TCDD steigerte die Cyp1A1 Transkription um den Faktor 4000 im Vergleich zur Kontrollinkubation mit Kulturmedium.

Das Gemisch der drei koplanaren PCB steigerte die Cyp1A1 Transkription um den Faktor 1000, die DMSO Kontrollen verdreifachen die Transkriptionsrate lediglich.

Die Transkription des Cyp1B1-Gens wird durch die Xenobiotika Exposition, wie sich schon in der RT-PCR abzeichnete, weniger stark induziert, TCDD löste eine Steigerung um den Faktor 20 aus, während die koplPCB die Cyp1B1 mRNA Menge verachtfachten.

Das Gemisch aus nichtkoplanaren PCB zeigte keine Induktion der beiden Zielgene.

3.4 Einfluss von Östrogen auf die Cyp Induktion durch Xenobiotika

Nachdem die Zellen 72 Stunden unter hormonfreien Bedingungen wuchsen, zeigten sie bereits in der Negativkontrolle eine leicht erhöhte Cyp1A1 Transkription, die nach dem Zusatz von Östrogen jedoch reduziert wurde.

Die eingesetzten Xenobiotika führten zur Transkriptionssteigerung des Cyp1A1, die durch den Östrogenzusatz vermindert wurde, d.h. AhR Liganden führen auch unter der Anwesenheit von Östrogen noch zu einer Induktion von Cyp1A1, wenn auch die Cyp1A1 Expressionssteigerung insgesamt geringer ausfällt als unter E2-freien Bedingungen.

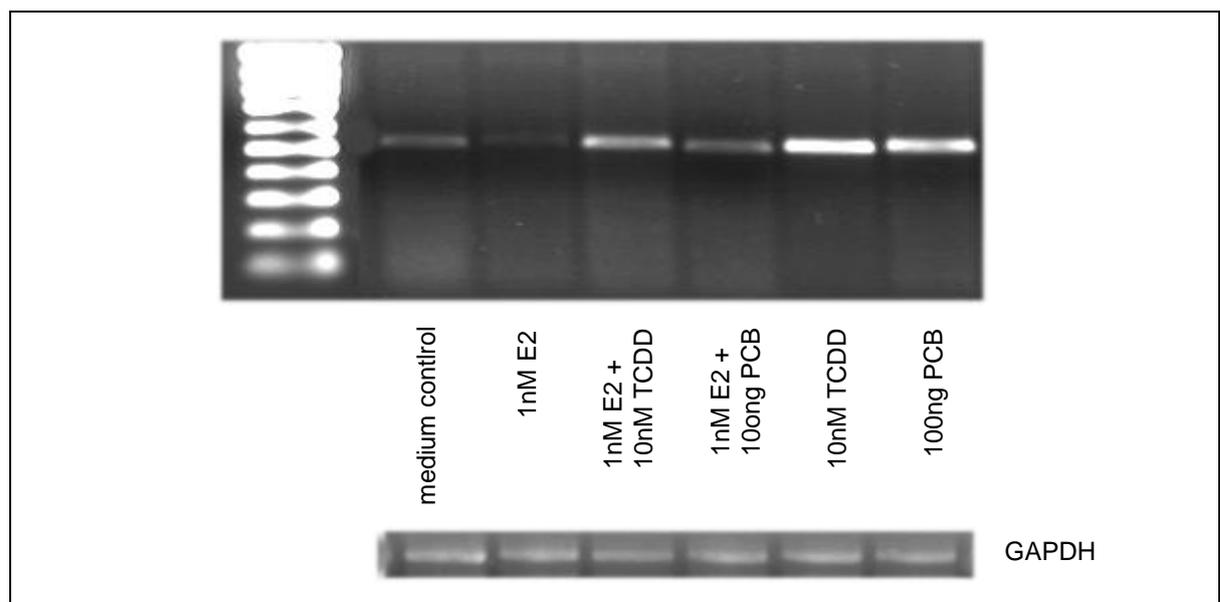


Abb.12: Cyp 1A1 Induktion nach 24 Stunden TCDD und PCB Exposition mit und ohne Zusatz von Östrogen

Der Einfluß von E2 auf die Transkription des Cyp1B1-Gens, ist weniger ausgeprägt, da hier sowohl Östrogen als auch die AhR-Agonisten induzierend wirken. Hier zeigte sich jedoch eine weniger deutliche Veränderung der Cyp1B1 mRNA, im Vergleich zu Cyp1A1.

Die konstitutive Expression war höher als die von Cyp1A1, Cyp1B1 wurde durch E2 alleine schon deutlich induziert, während Cyp1A1 durch E2 ja herabreguliert wird.

Die Steigerung der Cyp1B1 Transkription durch beide Xenobiotika wurde durch E2 nicht reduziert.

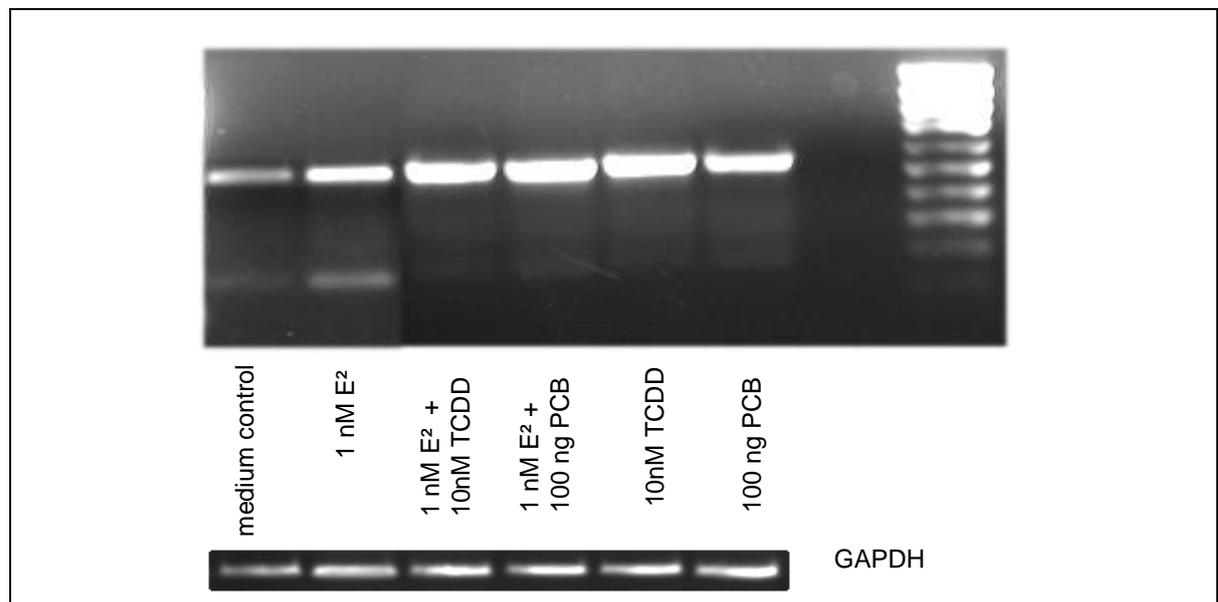


Abb.13: Cyp1B1 Induktion nach 24 Stunden TCDD und PCB Exposition mit und ohne Zusatz von Östrogen

Die Inhibition der Xenobiotika induzierten Cyp1A1 Transkriptionsteigerung, unter dem zusätzlichem Östrogeneinfluss, ließ mit der Dauer der Exposition nach.

Nach 48 Stunden Expositionsdauer zeigte die Transkription von Cyp1A1 in der RT-PCR keine sichtbaren Unterschiede gegenüber der alleinigen Exposition mit TCDD oder PCB.

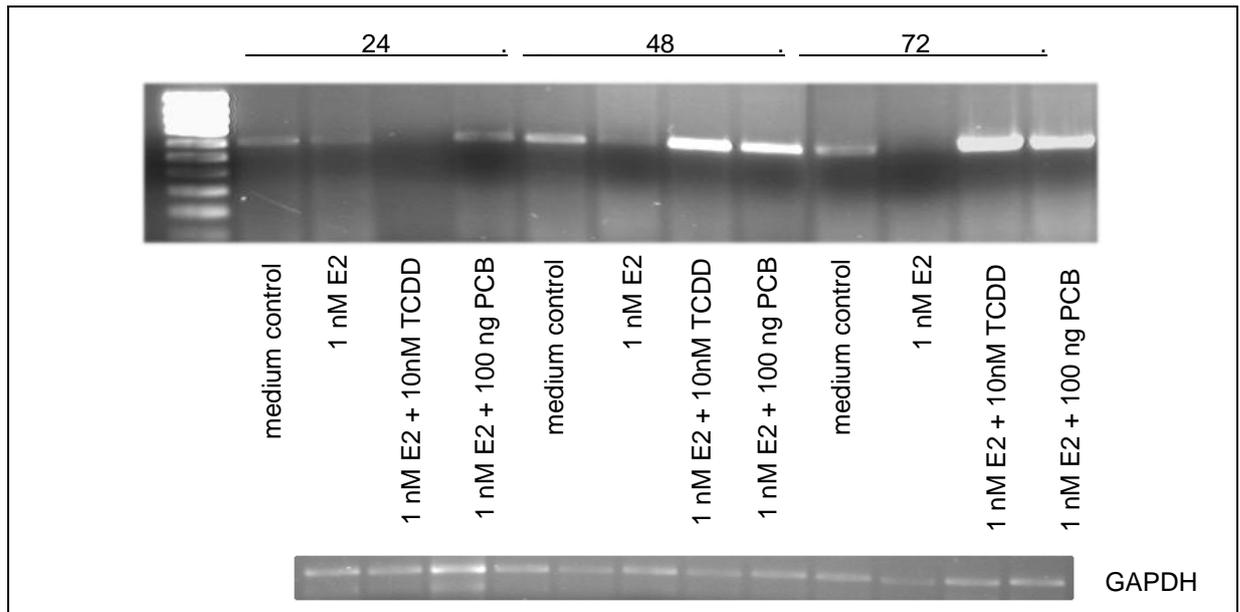


Abb. 14: Cyp 1A1 Induktion nach 24,48 und 72 Stunden Exposition mit Östrogen (E2) mit und ohne TCDD, bzw. PCB

Östrogen zeigt also in TERT-EEC Zellen sehr wohl Wechselwirkungen mit TCDD, wenn man diese beiden Oxidoreduktasen betrachtet, wobei diese Wechselwirkungen zeitlich begrenzt sind.

3.5 Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen zeigten, dass es möglich war das funktionelle XRE-Reporter Plasmid zu transfektieren. Es ließ sich reproduzierbar eine signifikante Steigerung der Luziferaseaktivität durch TCDD nachweisen.

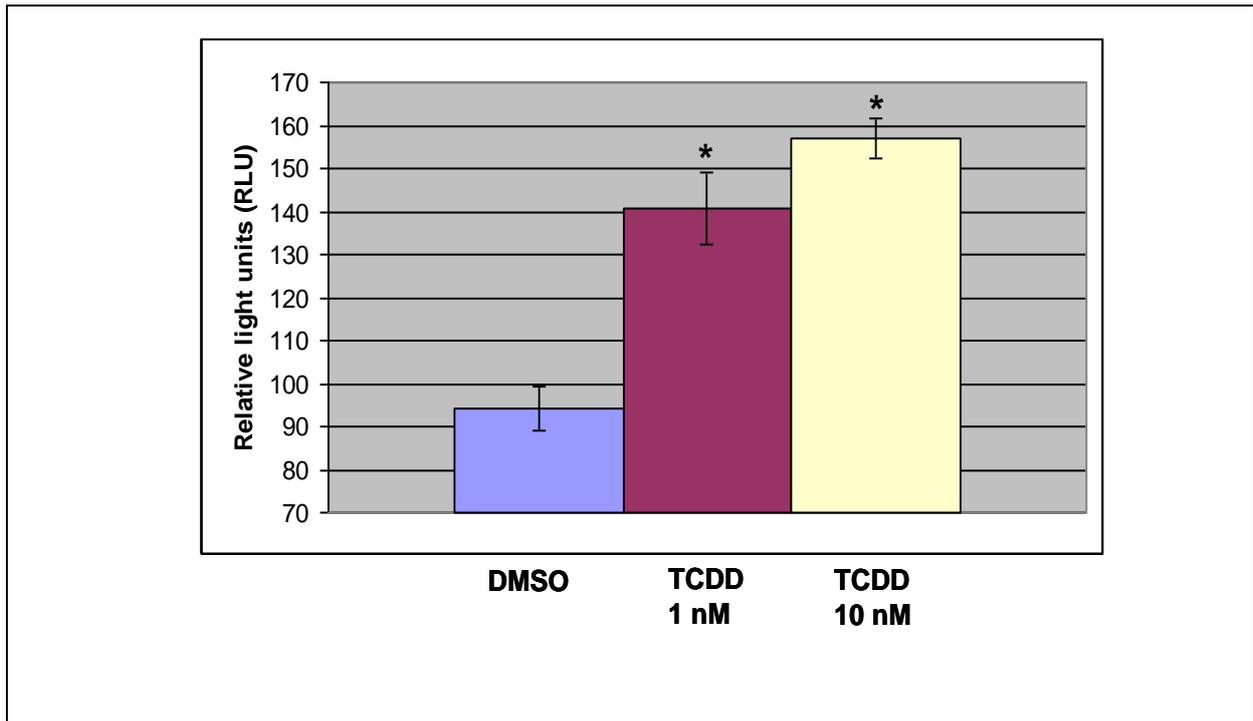


Abb. 15: Luziferaseaktivität in einem XRE-Reporter-Plasmid-Assay nach 24 Stunden Inkubation mit TCDD und DMSO

3.6 Westernblot

Auch auf Proteinebene lies sich der AhR in den hTERT-EEC B37 nachweisen, wie sich unter anderem in den Transfektionsversuchen dieser Arbeit zeigte, handelt es sich bei dem isolierten Protein auch um einen funktionalen Rezeptor.

Auch die Oxydoreduktase Cytochrom P450 1A1 zeigte sich durch TCDD induzierbar. Für eine eindeutige Zunahme des Proteins war eine größere Expositionsdauer als für die Transkriptionssteigerung des Cyp 1A1 Gens notwendig. Eine deutliche Zunahme der Proteinmenge zeigte sich erst nach 72 Stunden TCDD Exposition.

Die Zunahme der Proteinmenge unter TCDD Exposition war in Kultur sowohl unter Normal-, als auch unter E2-freien Bedingungen zu beobachten.

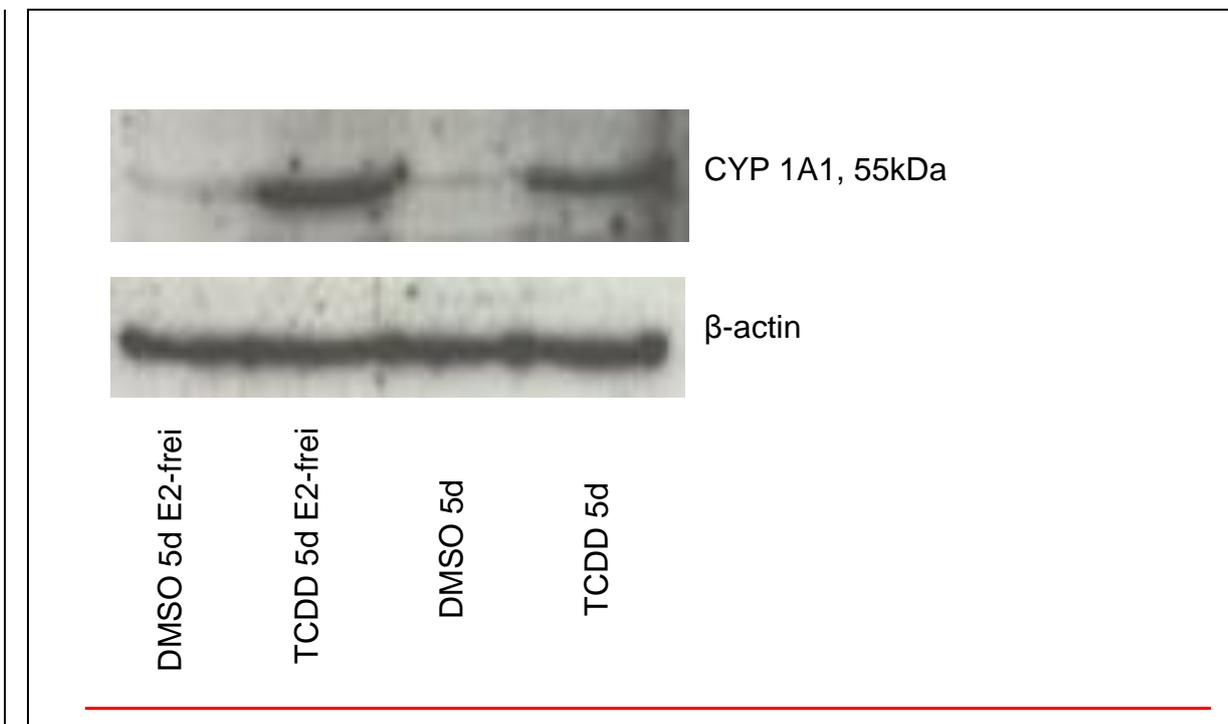


Abb.16: Induzierbarkeit von CYP 1A1 Protein durch TCDD, β -actin dient als housekeeping-Gen zur Kontrolle

Auf Proteinebene zeigte sich, dass TCCD auf den Östrogenrezeptor alpha keinen herabregulierenden Effekt hat, der Zusatz des eigentlichen Rezeptor Agonisten E2 führt zu einer reduzierten Translation des Rezeptors selbst. Unter E2-freien Bedingungen hatte TCDD hier keinen estrogenen Effekt im Sinne dieser „down“-Regulation.

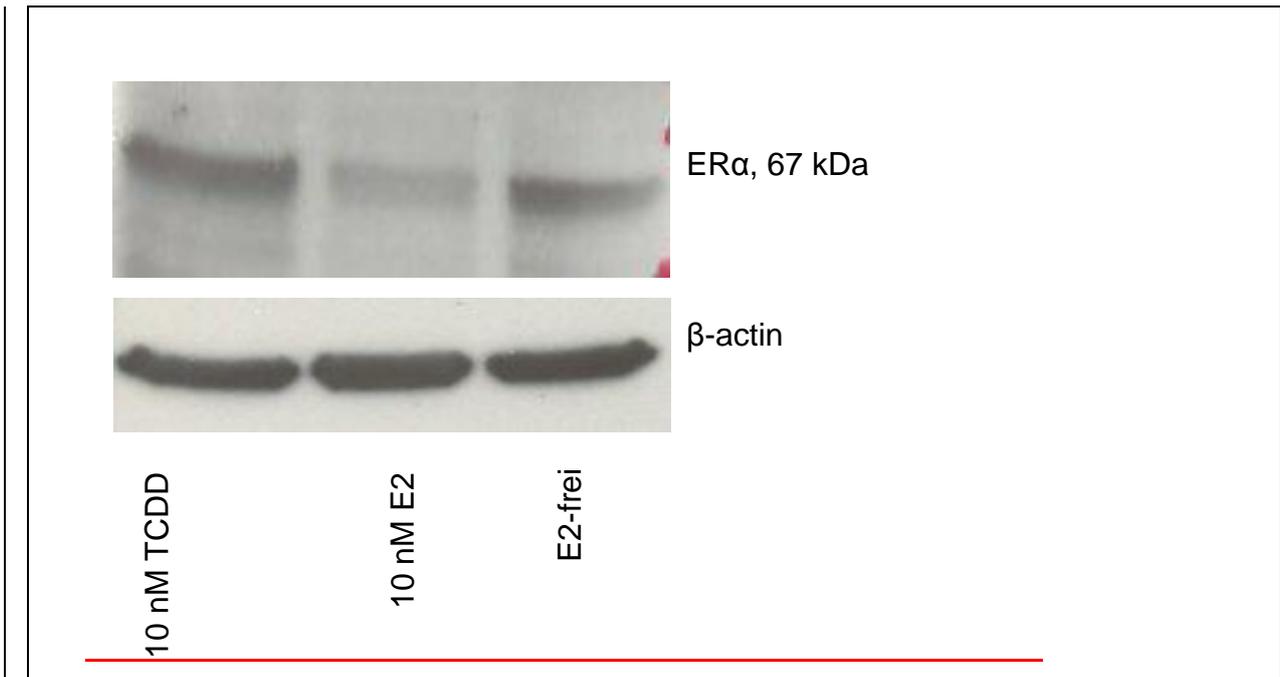


Abb. 17: Einfluss von TCDD und E2 auf den Östrogenrezeptor α

3.7 Zytotoxizitätsversuche

3.7.1 Proliferationsversuche

In den Proliferationsversuchen zeigte sich, dass die EEC B37 Zellen durch den Zusatz von TCDD und PCB in Ihrem Wachstum gefördert werden, eine Wachstumshemmung findet nicht statt.

Dieser Effekt war auch weitgehend unabhängig von der Zahl und so der Dichte der ausgesäten Zellen.

Das Lösungsmittel DMSO alleine zeigte keine signifikanten Effekte auf die Proliferation der Zellen.

Der Zusatz von 10 nM TCDD förderte die Proliferation geringfügig, aber signifikant, im Vergleich zum DMSO Ansatz und dem reinen Kulturmedium.

Bei der Exposition mit PCB zeigte sich auch für die Förderung der Proliferation, dass nahezu der gesamte Effekt durch das PCB 126 hervorgerufen wird.

Der Zusatz von Östrogen hingegen wirkt eher proliferationshemmend. Dieser Effekt wird aber bei zusätzlicher Exposition mit Xenobiotika wieder aufgehoben.

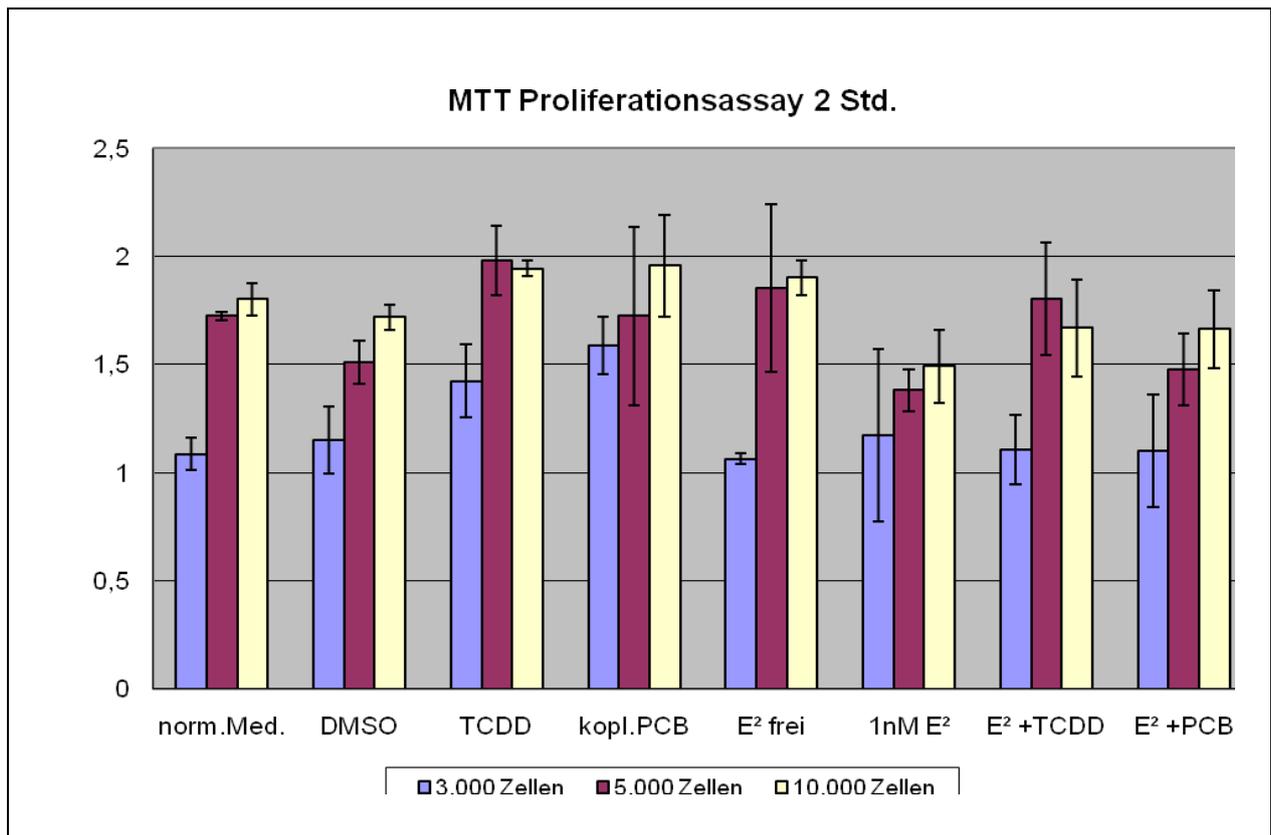


Abb. 18: Proliferation nach 2 Stunden Xenobiotikaexposition

3.7.2 Apoptoseversuche

In den Apoptoseversuchen zeigte sich für keine der Xenobiotikainkubationen eine Steigerung des programmierten Zelltods, jedoch stellte sich eine scheinbare Reduktion der Apoptose dar. Bereits DMSO als Lösungsmittel wirkte geringgradig apoptosehemmend. Die Apoptose, gemessen als Lichtemission des durch die Caspasen 3 und 7 freigesetzten Aminoluziferins pro 1000 Zellen, wurde aber nicht signifikant reduziert.

TCDD verursacht keine weitere Abnahme der Lichtemission, die Apoptoserate ist im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle nicht signifikant verändert.

Eine Beseitigung der eventuell vorhandenen Steroidhormonbelastung und des Phenolrotzusatzes im Medium reduziert die Lumineszenz scheinbar geringfügig, jedoch ebenfalls nicht signifikant.

Auch der Zusatz von 1 nM Östrogen reduzierte die Lumineszenz, d.h. die Apoptoserate im Vergleich zum normalen Kulturmedium nur scheinbar und nicht signifikant.

Bei gleichzeitiger Exposition mit Xenobiotika und Östrogen war keine signifikante Reduktion der Lichtemission gegenüber einer alleinigen Xenobiotika Exposition zu

sehen, die Apoptoserate bleibt also unverändert.

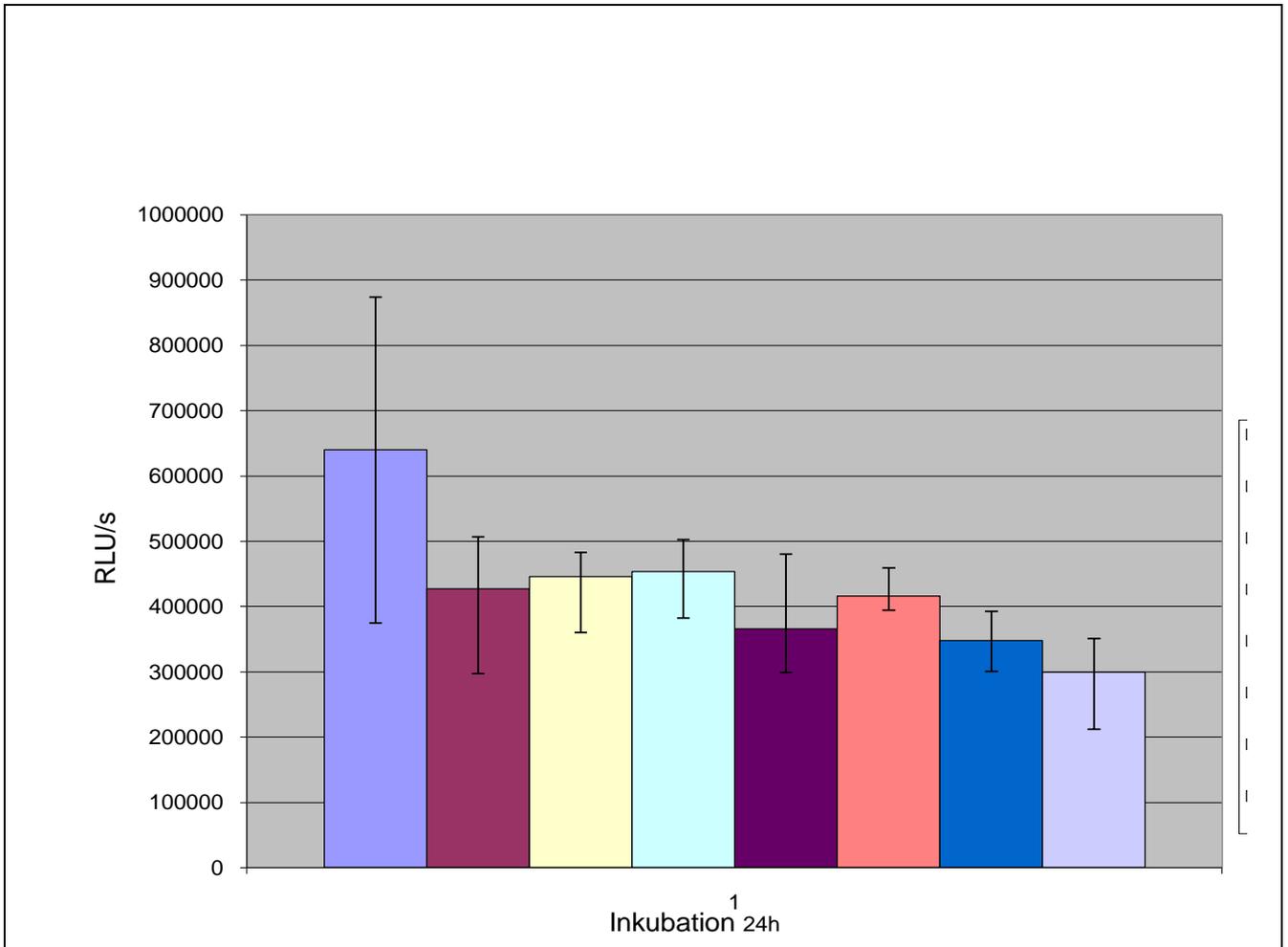


Abb. 19: Apoptose nach 24 Stunden Xenobiotika Exposition (Caspase glow assay 3000 Zellen/ well)

4 Diskussion

4.1 Ziel der Arbeit

In dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob hTERT-EEC B37 Zellen als geeignetes zelluläres Modell für Untersuchungen zur Wirkung von Umweltkontaminanten vom Dioxin-typ auf endometriale Epithelzellen geeignet sind.

Schwerpunkt der Arbeit war die Untersuchung zeit- und dosisabhängiger Transkriptionsveränderungen verschiedener Zielgene des Arylhydrocarbon Rezeptors mit der Methode der RT-PCR.

Es sollten die Auswirkungen von dem klassischen AhR-Liganden TCDD sowie von verschiedenen koplanaren, polychlorierten Biphenylen und deren Wechselwirkungen mit 17 β -Estradiol, auf die Zielgentranskription und das Wachstumsverhalten der Zellen untersucht werden.

Des Weiteren sollte untersucht werden, ob sich die Effekte der Xenobiotikaeinwirkung auf die Transkription auch in Änderungen der Translation der Zellen zeigen.

4.2 Modellsystem Zellkultur

Kulturen humaner Primärzellen ermöglichen Experimente an einem Zellmodell, welches sehr nahe an den in vivo Bedingungen ist. Die Nachteile bei der Arbeit mit Primärzellen sind eine unter Umständen heterogene Zellpopulation und eine „Kontamination“ durch endometriale Stromazellen. Das größte Hindernis für Untersuchungen an endometrialen epithelialen Primärzellen ist vor allem die sehr begrenzte Lebensdauer isolierter Zellen und die geringe Anzahl der isolierten Zellen aus Abrasio- und Biopsiematerialien. Häufig kommt es im Rahmen der Kultivierung von Primärzellen auch zu einem zunehmenden Verlust der ursprünglichen Zelldifferenzierung.

Experimente mit Tumorzellen weisen diesen Nachteil nicht auf, da sie beliebig lange kultiviert werden können. Sie sind als Zellmodell jedoch weit von einer physiologischen Zelle entfernt, da sie maligne transformiert sind. Sie zeigen die typischen Merkmale von Tumorzellen, sind weitestgehend undifferenziert, zeigen keine oder eine veränderte Expression der Steroidhormonrezeptoren ER und PR und zeigen keine Kontaktinhibition in Ihrem Wachstumsmuster.

Sie weichen also sowohl im Genotyp, als auch im Phänotyp von den Zellen des Ursprungsgewebes ab.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte daher versucht werden, ein Zellmodell weiter zu charakterisieren, welches durch Immortalisierung von phänotypisch normalen Primärzellen entstanden ist und funktionale endogene Steroidhormonrezeptoren aufweist. Die Primärzellisolierung erfolgte aus einem von einem erfahrenen Gynäkopathologen als normal identifizierten Endometrium in der Proliferationsphase.

4.3 Expositionsversuche

In etwa 10 – 15 % aller Frauen in fortpflanzungsfähigem Alter leiden an Endometriose und der dadurch eingeschränkten Lebensqualität sowie der häufig verminderten Fortpflanzungsfähigkeit [62].

TCDD und PCB als Umweltkontaminanten sind vermutlich an der Pathogenese der Endometriose beteiligt, ihre Serumspiegel korrelieren mit dem Grad der Ausbildung der Erkrankung [29, 63].

Ziel der Expositionsversuche war es, zu untersuchen, ob und wenn ja, welchen Einfluß diese Xenobiotika auf die Genexpression der klassischen AhR-Zielgene der hTERT-EEC Zellen haben.

Substanzen können auf verschiedenen Wegen in die Zelle gelangen, entweder durch aktiven Transport mit Hilfe ATP-verbrauchender Pumpen oder durch passiven Transport, mittels Diffusion über Proteine oder direkt durch die Phospholipid-Doppelschicht.

Bei allen Testsubstanzen handelt es sich um lipophile Stoffe, die mittels Diffusion über die Phospholipid-Doppelschicht der Zellmembran in die Zelle gelangen [22].

Bei den Versuchen, unter östrogen-freien Kulturbedingungen wurde aktivkohle-adsorbiertes Serum eingesetzt, um die Effekte von unter Umständen enthaltenen Spuren von Steroidhormonen zu minimieren. Ein Einfluss von im Serum enthaltener mitogener Faktoren kann nicht sicher ausgeschlossen werden [64], jedoch schafft dieses Vorgehen definierte experimentelle und standardisierte in-vitro Bedingungen.

Die Wechselwirkungen zwischen den verschiedenen Xenobiotika, vor allem zwischen TCDD und den verschiedenen polychlorierten Biphenylen sollten in dieser Arbeit nicht weiter untersucht werden, da zunächst die Reaktion der Zellen auf die Einzelsubstanzen analysiert werden sollte. Dennoch ist die weitere Untersuchung sinnvoll, da der menschliche Organismus in der Umwelt immer einem Gemisch der verschiedenen Stoffe

ausgesetzt ist. *Rier et al.* [29] konnten zum Beispiel zeigen, dass eine Exposition von Rhesusaffen mit TCDD, die Serumkonzentrationen von PCB verändert.

4.4 Transiente Transfektion

Die transienten Transfektionen mit dem XRE-Reporter Plasmid zeigten, dass TCDD in der Lage war, die Luziferaseaktivität zu steigern. Allerdings war eine sichere Transfektion nicht immer zu erreichen.

Bei erfolgreicher Transfektion ließ sich regelmäßig eine signifikante Steigerung der Luziferaseaktivität im Vergleich zur DMSO Kontrolle zeigen. Der TCDD-Rezeptor-Komplex konnte also an der XRE-Sequenz des Luziferase-Promoters im Plasmid anbinden.

Die XRE Sequenz des Plasmids entspricht dem Enhancer-Abschnitt des Cyp1A1-Gens. Ein sogenannter Enhancer-Abschnitt dient in allen regulierbaren eukaryoten Genen dazu, bei Vorhandensein entsprechender ligandenaktivierbarer Transkriptionsaktivatoren die Transkription des betreffenden Gens um ein vielfaches zu steigern. Enhancer-Abschnitte liegen meist im Abstand von einigen hundert Basenpaaren zu den Promoterregionen der einzelnen Gene.

Die Expositionsversuche nach transients Transfektion mit dem XRE-Luziferase Plasmid zeigten, dass hTERT-EEC B37 Zellen einen funktionalen endogenen AhR exprimieren.

4.5 Zielgen-Induktion

Bezüglich der Auswirkungen einer TCDD Exposition auf die Expression des Ah Rezeptors existieren verschiedene Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen. *Pitt et al.* [65] beschreibt eine Zunahme der AhR mRNA in humanen Endometriumzellen in Primärkultur nach TCDD Exposition, während *Abbott et al.* [13] in embryonalen Gaumenzellen und verschiedene andere Autoren [53, 66] in unterschiedlichen Geweben eine Abnahme der Rezeptor mRNA beschreiben.

Diese Regulation scheint also Gewebe abhängig zu sein.

In den EEC B37 Zellen war der AhR konstitutiv, unabhängig einer TCDD Exposition exprimiert. *Küchenhoff et al.* [21] beschreibt für das humane Endometrium eine vom Tag des Zyklus abhängige AhR Expression, mit einer maximalen Expression zum Zeitpunkt der Ovulation. Die hTERT-EEC B37 stammen jedoch aus einem Uteruspräparat, welches sich in der Proliferationsphase (Tag 7) befand, so dass davon auszugehen ist, dass die

AhR Expression zu einer möglichen Nidation hin noch zunimmt.

Vermutlich dient die Cyp1A1 Induktion, als ein zelleigener Mechanismus dazu, den Liganden des AhR zu metabolisieren, also im Sinne eines negativen Rückkopplungssystems die AhR Aktivierung zu regulieren [67].

Ein körpereigener, physiologisch im Serum vorkommender Ligand des AhR wurde schon häufig postuliert [67-70], der Nachweis ist aber erst 2002 gelungen [71].

Als körpereigener Ligand des AhR stellte sich 2-(1'-H-Indol-3'-Carbonyl)-Thiazol-4-Carbonsäuremethylester (ITE) heraus, welcher von *Song et al.* aus porcinem Lungengewebe isoliert wurde. ITE zeigt wie TCDD eine Aktivierung der AhR Zielgene, löst aber keine der toxischen Wirkungen, wie die Entwicklungstörungen des TCDD aus [72].

Diese Indol-haltigen Liganden sind Fotoprodukte, welche UV-induziert aus Tryptophan entstehen können. Ein anderes Fotoderivat von Tryptophan ist Indolessigsäure, welche auch ein schwacher Ligand des AhR ist [73]. Da alle diese Verbindungen von Lichteinwirkung abhängig sind, könnten sie eine Bedeutung als Lichtsensoren in physiologischen Prozessen haben.

Ein Ligand, der von der Zelle nicht metabolisiert werden kann, wie z.B TCDD führt zu einem dauerhaft aktivierten AhR und einem, durch ihn vermittelten Zellzyklusstop in der G₁-Phase [44, 70].

Die Induzierbarkeit der AhR-Zielgene in den EEC B37 Zellen, demonstriert, dass der AhR-Signaltransduktionsweg in diesem Zellmodell funktional ist.

Die maximale Induktion des Cyp1A1 Gens benötigt nach *Elferink et al.* [48] die direkte Interaktion mit dem pRb, welches an dem LXCXE-Motiv des Ah Rezeptors gebunden wird. Der Phosphorylierungsstatus des Rb wird auch über andere Signaltransduktionswege reguliert und beeinflusst. So löst sich beispielsweise vom ligandenaktivierten AhR-Proteinkomplex im Cytosol ein Protein c-Src ab. Es handelt sich hierbei um eine Tyrosinkinase, welche eine Proteinkinasekaskade in Gang setzen kann. Dies kann potentiell zu einer Phosphorylierung und damit Inaktivierung des Rb führen [74]

Nach *Mimura et al.* [75-76] existiert ein weiterer Rückkopplungsmechanismus der AhR-Zielgen Regulation. Die Aktivierung des AhR durch eine Ligandenbindung führte in Dünndarmzellen der Maus zur XRE-vermittelten Transkriptionssteigerung von einem AhR-Repressorgen (AhRR). AhRR ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, welcher nur in dimerisierter Form funktional ist. AhRR benötigt für die Bindung an das Dioxin-Response-Element das Protein ARNT. Das AhRR-Protein konkuriert also mit dem AhR zum Einen um ARNT und zum Anderen um das XRE. Eine Abnahme der AhR-Zielgeninduktion

könnte also auch durch eine Hochregulation von AhRR bedingt sein.

Ob dieser Mechanismus in den EEC-B37 eine Rolle spielt, sollte daher Inhalt weiterer Arbeiten sein.

Charles et al. zeigte eine Cyp1B1 Induktion durch TCDD in einer humanen Adenokarzinomzelllinie [77], auch in dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Cyp1B1 mRNA durch Exposition mit TCDD induziert wird. Auch in den hier untersuchten EEC B37 stellt Cyp 1B1 ein TCDD Zielgen dar.

Die EEC-Zellen zeigten eine geringe konstitutive Expression von Cyp1B1, nicht jedoch von Cyp1A1, diese Beobachtung machten *Bofinger et al.* [78] auch für endometriale Primärzellen. Hier zeigte sich ebenfalls eine Abhängigkeit der Expression vom Hormonstatus und der Zyklusphase.

Die Induzierbarkeit von Cyp 1B1 durch TCDD ist im Vergleich mit der von Cyp1A1 geringer, sie zeigt vor allem keine weitere Steigerung bei Erhöhung der TCDD Konzentration über 1 nM. In der quantitativen Echtzeit-PCR zeigte sich eine Steigerung der basalen Expression der Cyp1A1 mRNA um das 4000-fache, die Steigerung der Cyp1B1 mRNA betrug lediglich das 20-fache.

Die durch TCDD hervorgerufenen gesteigerte Transkription des CYP 1A1 Gens führte auch zu einer gesteigerten Translation des CYP 1A1 Proteins. Die im Vergleich zur transkriptionalen Ebene verzögerte Aktivierbarkeit der Translation lässt sich damit erklären, dass für die Westernblots in dieser Arbeit ein Proteinlysate der gesamten Zelle und nicht eine mikrosomale Proteinfraction verwandt wurde, es scheint also bei nur kurzer Expositionsdauer eine zu geringe CYP 1A1 Proteinkonzentration vorzuliegen, um diese im Westernblot sicher zu erfassen.

Bei längerer Exposition der Zelle gegenüber TCDD reagieren diese also mit einer vermehrten Bildung der Oxidoreduktase CYP 1A1, die Zelle versucht das einwirkende Agens zu metabolisieren.

Die Cyp1 Enzymfamilie trägt sowohl zur Entgiftung verschiedener Stoffe als auch zur Kanzerogenese und verschiedenen Defekten in den Organsysteme bei [79].

Die Expositionsversuche mit den drei PCB zeigten, dass in erster Linie das PCB 126 für die Transkriptionssteigerung des Cyp1A1-Gens verantwortlich ist. Das PCB 169 war erst in sehr hohen Dosierungen in der Lage Cyp1A1 zu induzieren und das PCB 77 löste keine Cyp 1A1 Induktion aus.

Dies entspricht den für die PCB eingeführten Toxizitätsfaktoren (TEF's), die ihre Toxizität mit der des TCDD vergleichen (1.4.2).

4.6 Zytotoxizitätsversuche

Vor den Zytotoxizitätsversuchen, bestand die Annahme, TCDD würde eine Hemmung der Zellproliferation verursachen. Sie basierte unter anderem auf der bereits beschriebenen direkten Interaktion zwischen dem AhR und dem Retinoblastomprotein [48, 80-81], welches in der Kontrolle des Zellzyklus eine wesentliche Rolle einnimmt [82] und zum Anderen auf der Beeinflussung des ligandenaktivierten AhR und verschiedener im Zellzyklus wichtiger Cycline, Cyclin-Kinasen und Cyclin-Kinase-Inhibitoren.

Puga et al. [81] beschreibt eine direkte Protein-Protein-Bindung vom Liganden aktivierten und in den Nukleus translozierten AhR und dem pRb.

TCDD kann zum Beispiel über diesen Weg den Cyclin-Kinase-Inhibitor p27Kip1 induzieren [70, 83], dieser inhibiert die Cyclin-Kinase CDK2, daher verbleibt das pRb dann hypophosphoryliert und somit aktiv.

Ein aktives pRB bindet den Transkriptionsfaktor E2F [84], welcher so gebunden nicht die Transkription der für den Übertritt in die S-Phase des Zellzyklus notwendigen Gene vermitteln kann.

Über beide Wege verbleiben die Zellen in der G₁-Phase des Zellzyklus, die Proliferation wäre unterbrochen.

Die oben beschriebenen Wege wurde an verschiedenen Zellen untersucht, *Puga et al.* arbeitete mit einer humanen Brustkrebszelllinie (MCF-7), während *Levine-Fridman et al.* mit Hepa 1c1c7 Zellen, einer Leberkarzinomzelllinie der Maus arbeitete. Aus Mangel an einem geeigneten Zellmodell konnte dies noch nie an humanen endometrialen Zellen untersucht werden.

Im Rahmen der in dieser Arbeit durchgeführten Zytotoxizitätsversuche, lies sich jedoch keine Hemmung der Proliferation zeigen.

In verschiedenen RT-PCR's die hier nicht gezeigt wurden, stellte sich nach TCDD-Inkubation auch keine veränderte Transkription der Cyclin-Kinasen 2 und 4 sowie des Cyclin 2 dar.

In Hepatocyten der Ratte zeigten *Huang et al.* [44], dass eine TCDD vermittelte Arretierung in der G₁-Phase durch eine Mutation des AhR lediglich eingeschränkt wird, während eine Mutation des ARNT-Proteins den Effekt vollkommen aufhebt.

Dieser Mechanismus von TCDD den Zellzyklus zu beeinflussen ist also, zumindest in Hepatocyten der Ratte in Teilen unabhängig des klassischen AhR-Transduktionsweges an ein XRE zu binden.

Für unser endometriales hTERT-EEC Zellmodell stellte sich heraus, dass die Effekte in den Proliferationsversuchen mit PCB Gemischen in erster Linie durch das Kongener 126

vermittelt werden. Die entspricht auch den neuen TEF's [85].

In den Apoptoseversuchen zeigte sich eine Apoptose reduzierende Wirkung des TCDD mit und ohne weiteren Zusatz von E2.

Eine verminderte Apoptose kann auch auf eine maligne Entartung einer Zelle hinweisen. Im Rahmen einer malignen Zellentartung wäre aber eine deutlich gesteigerte oder überschießende Proliferation, bzw. eine aufgehobene Kontaktinhibition zu erwarten. Dies lies sich jedoch im Rahmen der durchgeführten Versuche nicht beobachten.

Besonders deutlich war die Reduktion der Apoptose bei Zusatz von E2 und PCB, in der RT-PCR zeigte sich diese Kombination auch als potenter Induktor des Cyp1B1-Gens. Nach *Sasaki et al.* [86] und nach *Hayes et al.* [52] ist Cyp1B1 im Metabolismus von E2 für eine 4-Hydroxylierung zuständig, dieses 4-Hydroxy-Derivat ist an der Kanzerogenese in verschiedenen hormonsensitiven Geweben, durch Schädigung der DNA direkt beteiligt [87-89]. So ist dieser C-4-Metabolit vermutlich an der östrogen-induzierten Karzinogenese der weiblichen Brust beteiligt, während der C-2-Metabolit scheinbar protektive Wirkung besitzt [52, 90].

Dies könnte unter Berücksichtigung der in dieser Arbeit gewonnenen Daten bedeuten, dass, da ja sowohl die betrachteten AhR-Liganden, als auch E2 alleine zu einer CYP 1B1 Induktion führen, sich die karzinogene Wirkung dieser Stoffe gegenseitig verstärken könnte.

Aussagen bezüglich der tatsächlichen Toxizität der verschiedenen Xenobiotika auf das endometriale Epithel in vivo sind auch anhand dieses neuen Zellmodells nur spekulativ oder nicht zu treffen, da ja bei jedem in vitro Modell nur ein Ausschnitt der komplexen Abläufe in einem intakten Organismus betrachtet werden kann. Es wurden in dieser Arbeit ausschließlich die Enzyme der Phase-I der Biotransformation betrachtet. Wie sich die Toxizität der untersuchten Xenobiotika dann in Verbindung mit den Phase-II-Enzymen verhält, ob es zu einer Entgiftung oder einer Toxizitätszunahme kommt bleibt anhand von Untersuchungen, z.B. an Knock-out-Mäusen zu klären.

Nebert et al. zeigte in verschiedenen Studien, dass Cyp 1A1-K.o.-Mäuse nach täglicher Gabe von 125 mg/kg Benzapyrenen (=polyzyklische, aromatische Kohlenwasserstoffe) innerhalb von 30 Tagen versterben, Cyp 1A1 positive Mäuse die Behandlung aber über ein Jahr überlebten. Gleichzeitig zeigte diese Arbeitsgruppe aber auch, dass die Toxizität von Benzapyrenen in in-vitro-Versuchen an Leberzellen hauptsächlich durch Cyp 1A1 vermittelt ist [91].

Da in dieser Arbeit für die Zytotoxizitätsversuche ausschließlich relativ kurze Expositionszeiten (maximal 6 Stunden) untersucht wurden, ist nicht auszuschließen, dass eine länger andauernde Exposition der hTERT-EEC doch zu einer veränderten Proliferation oder Steigerung der Apoptoserate führt.

4.7 TCDD-Östrogen-Interaktion

In der hier vorliegenden Arbeit zeigte E2 eine Inhibition der TCDD vermittelten Cyp 1A1 Transkriptionssteigerung für einen Zeitraum bis zu 48 Stunden (Abb. 12, 14).

E2 alleine wirkt induzierend auf Cyp 1B1 und inhibiert die TCDD bedingte Transkriptionssteigerung nicht wesentlich (Abb. 13).

Für eine Interaktion zwischen AhR-Liganden wie TCDD und den körpereigenen Hormonen gibt es zahlreiche verschiedene mögliche Interaktionswege, die zu einem großen Teil noch nicht genau bekannt sind. Einige Möglichkeiten der Interaktion von AhR-Liganden und Östrogen sollen hier beispielhaft diskutiert werden, eine weitere Abklärung dieser möglichen Abläufe in den EEC muß in der Zukunft erfolgen.

Davarinos et al. und *Nawaz et al.* haben gezeigt, dass sowohl Östrogen als auch TCDD den Abbau ihrer eigenen Rezeptoren im Proteasom fördern [53, 92].

Dies konnten im Rahmen der Westernblots bestätigt werden, die Anwesenheit von E2 alleine führt auf Proteinebene zu einer reduzierten Expression des Östrogenrezeptor α (Abb. 17).

Für TCDD wurde beschrieben, dass es zusätzlich den Abbau des ER α [93-94] fördert, diese Beobachtung könnte zu einem Teile die beschriebenen antiöstrogenen Effekte von TCDD erklären, des Weiteren bildet sie unter anderem die Grundlage für Überlegungen, AhR-Liganden die weniger toxisch sind als TCDD in der Therapie von hormonsensitiven Tumoren einzusetzen und so Ihre antiöstrogene Wirkung auszunutzen.

In der vorliegenden Arbeit konnte dies für die EEC B37 nicht beobachtet werden, die Anwesenheit von TCDD führt zu keiner Herabregulation des ER α .

Nach *Wormke et al.* [94] ist der Weg des vermehrten proteasomalen Abbaus des ER α und des AhR jedoch unidirektional, d.h. in den von Ihrer Gruppe untersuchten MCF-7 Zellen (eine humane Brustkrebszelllinie) steigerte zwar TCDD unabhängig von E2 den Abbau des AhR und des ER, E2 hingegen zeigte jedoch keinen Effekt auf den Abbau des AhR.

Dieser Mechanismus ist für die hTERT EEC noch nicht weiter untersucht.

Die Inhibition der Transkriptionssteigerung wurde schon mehrfach für andere östrogensensitive Zellen beobachtet. Es handelt sich hierbei jedoch nicht um einen direkten Antagonismus am Ah Rezeptor selbst.

Ricci et al. [95] beschrieben, dass diese Reduktion der TCDD vermittelten Cyp1A1

Induktion durch Zugabe von Tamoxifen, einem Östrogenrezeptor-Antagonisten reversibel ist, was darauf hinweist, dass der ER eine entscheidende Rolle spielt.

Des Weiteren konnten sie zeigen, dass die Bindung des ligandenaktivierten AhR an das XRE der Cyp1A1-Enhancer-Region nicht gestört wird. Bei Überexpression des Transkriptionsfaktors NF-1 zeigte sich die TCDD bedingte Induktion von Cyp1A1 durch Östrogen nicht beeinflussbar, so dass es sich bei der Induktionsminderung scheinbar um eine Konkurrenz der beiden Rezeptoren um den Transkriptionsfaktor NF-1 handelt. Der Östrogenrezeptor ist ein nukleärer Hormonrezeptor, während der AhR ja primär im Zytosol lokalisiert ist, so dass der ER hier einen Vorteil gegenüber dem AhR hat, wenn es darum geht, um einen nukleären Transkriptionsfaktor zu konkurrieren.

In hormonsensitiven Zellen wie den hTERT-EEC ist die Menge des ER abhängig von der Menge des anwesenden Östrogen [58], d.h. in vitro ist sie abhängig von den Kulturbedingungen und in vivo z.B. von dem allgemeinen Entwicklungsstand der Frau oder der Zyklusphase. Folglich ist die Interaktion zw. ER und AhR Zyklus- und Altersabhängig.

Das Nachlassen der östrogenvermittelten Hemmung der Transkriptionssteigerung durch TCDD scheint unter anderem auch durch eine Herabregulation des ER α und so verringerter Wirksamkeit des Östrogens erklärbar zu sein.

Das unterschiedliche Ansprechen der beiden Zielgene Cyp 1A1 und 1B1 auf die Östrogen-Inkubationen könnte auf einem Unterschied in der Promoter-Region der beiden Gene beruhen, das Cyp1A1-Gen besitzt zwei Bindungsstellen für NF-1 in seiner Promoter-Region, während das Cyp1B1-Gen keine Bindungsstelle für NF-1 in seiner Promoter-Region enthält [96]. Dieser Unterschied der beiden Promoter-Regionen könnte die nicht vorhandene Abschwächung der Cyp1B1 Induktion durch E2 erklären. In Anwesenheit von E2 im Kulturmedium zeigte sich Cyp1B1 konstitutiv exprimiert.

Ohtake et al. [97] zeigten einen Mechanismus der die östrogenen Effekte von AhR-Liganden, wie das Auslösen einer Endometriose erklären könnte. Sie beschrieben in MCF-7 Zellen eine direkte Bindung des ligandenaktivierten AhR/ARNT-Komplexes unter Beteiligung des Co-Aktivators p300 an nichtaktivierte nukleäre Östrogenrezeptoren, die zur Bindung an den ERE's verschiedener ER-Zielgene und so zu deren Transkription führte. Durch Versuche mit ER α -, bzw AhR-Knock-out-Mäusen wiesen sie eine Beteiligung dieser beiden Rezeptoren an diesem Signaltransduktionsweg nach. Sie konnten allerdings auch nachweisen, dass die Aktivierung von ER-Zielgenen durch AhR-Liganden nur bei Abwesenheit von E2 erfolgt.

Bei simultaner Exposition mit einem AhR-Liganden und E2 zeigte der AhR-Agonist eher

anti-östrogene Wirkung. Diese Ergebnisse von *Ohtake et al.* machen deutlich, dass die Effekte von Xenobiotika, die über den Ah-Rezeptor wirken unter anderem von der Östrogenkonzentration abhängig sind. Auch in-vivo kann angenommen werden, dass die Effekte einer AhR Aktivierung im Endometrialengewebe von der systemischen und lokalen E2-Konzentration beeinflusst werden.

Unabhängig von der Beeinflussung der Östrogenhomöostase auf Transkriptionsebene zeigten *Enan* und *Matsumura* [98] einen weiteren Weg auf dem der AhR in zelluläre Prozesse eingreift. Sie entdeckten, dass in zellkernfreiem Homogenisat von Meerschweinadipozyten TCDD bereits nach 10 min veränderte Tyrosinkinaseaktivitäten auslöst. Auch eine Aktivierung des ER auf diesem transkriptionsunabhängigem Weg ist beschrieben. Bei Ligandenbindung an den cytosolischen Proteinkomplex des AhR löst sich das Protein c-Src, eine Tyrosinkinase, welche dann verschiedene weitere Proteinkinasen aktiviert, die dann den ER und andere Proteine und Rezeptoren phosphorylieren und sie so aktivieren können [74].

Die verschiedenen durch TCDD induzierten Cytochrome sind in der Lage in den Metabolismus von Östrogen einzugreifen und ihn zu beschleunigen. *Hayes et al.* [52] und *Safe et al.* [99] zeigten, dass Cyp1A1 und Cyp1B1 17 β -Estradiol zu einem 2-, bzw. 4-hydroxyliertem Derivat metabolisieren. Diese Metaboliten sind jedoch selbst aktiv und können die Östrogenwirkung modulieren, indem sie an den ER binden und diesen blockieren oder andere ER-unabhängige Effekte haben.

Eine Metabolisierung des wirksamen E2 kann die zeitliche Limitierung der Inhibition der TCDD vermittelten Transkriptionssteigerung von Cyp1A1, in den hier durchgeführten Versuchen jedoch nicht erklären, da alle 24 Stunden frisches Medium mit den jeweiligen Konzentrationen von TCDD und E2 eingesetzt wurde.

Da bei permanenter Anwesenheit von Östrogen ja eine Herabregulation des ER in den EEC stattfindet [58], könnte dies eine mögliche Erklärung für die nachlassende Inhibition sein.

Unter Umständen zielt die östrogenbedingte Minderung der Cyp-Induktion in östrogensensitiven Geweben darauf ab, eine weitere Giftung der Xenobiotika durch Bildung von reaktiven Metaboliten zu reduzieren, allerdings bedeutet dies auch eine längere Aktivierung des AhR durch diese Liganden und somit einen Eingriff in die Östrogenhomöostase der Zellen auf den verschiedenen anderen Signaltransduktionswegen, die zu einem Großteil noch der Abklärung bedürfen.

5 Schlußfolgerungen und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnten die hTERT-EEC B37 Zellen als AhR-responsives, endometriales Zellmodell charakterisiert werden und die Xenobiotika TCDD und koplanare PCB als AhR-Zielgeninduktoren in diesen Zellen beschrieben werden.

Die bereits bekannten TCDD-Zielgene Cyp 1A1 und CYP1B1 zeigten sich auch für die EEC B37 Zellen als verlässliche Indikatoren einer AhR-Aktivierung.

Die EEC B37 Zellen exprimieren einen funktionalen endogenen AhR-ARNT transkriptionsweg.

Da hTERT-EEC auch regulierbare und funktionale endogene Steroidhormon-Rezeptoren aufweisen, ist dies ein geeignetes Zellmodell, um Interaktionen zwischen AhR-liganden und Steroidhormonen zu untersuchen.

In dieser Arbeit zeigte sich, dass TCDD und PCBs in den getesteten Konzentrationen und Expositionszeiten keine proliferationshemmende Wirkung zeigten.

Weiter konnte beobachtet werden, dass nach 24 h Inkubationszeit keine statistisch signifikante Steigerung der Apoptose in hTERT-EEC durch die Umweltkontaminante TCDD zu detektieren war. Die Anwesenheit von E2 änderte dies nicht. Eine weitere Erforschung der komplexen Wechselwirkungen zwischen körpereigenen Botenstoffen und ubiquitär vorkommenden Xenobiotika scheinen mit diesem Model möglich.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen die Komplexität der verschiedenen Interaktionen der Xenobiotika und den körpereigenen Hormonen vor allem in einem Gewebe, welches in vivo einem zyklischem hormonellem Regelkreis ausgesetzt ist. Diese Wechselwirkungen gilt es noch weiter zu erforschen. Auch sollten noch weitere Untersuchungen folgen, die Veränderungen der extracellulären Matrix bei Xenobiotikaeinwirkung und so ein verändertes Migrationsverhalten der Zellen untersuchen. Die hTERT-EEC scheinen also noch viele Erkenntnisse über die Pathogenese von Nidationsstörungen und der Endometriose bereitzuhalten.

6 Zusammenfassung

hTERT-EEC B37 exprimieren AhR, ARNT und ER α , jedoch keine ER β mRNA, diese Expression ist Östrogen unabhängig.

Die Induktion des AhR-Zielgens CYP 1A1 durch TCDD ist konzentrations- und zeitabhängig. Die Induktion von CYP 1B1 ist lediglich konzentrationsabhängig.

Bei Exposition der hTERT-EEC mit koplanaren PCB's zeigt sich für CYP 1A1 wiederum eine konzentrations- und zeitabhängige Induktion, wobei die einzelnen Kongenere eine unterschiedlich starke Induktion hervorrufen (PCB126 > PCB169 > PCB77).

Die kombinierte Exposition mit allen drei PCB's wirkt nicht synergistisch.

Da nicht-koplanare PCB's zu keiner CYP 1A1 Induktion führen, ist die CYP 1A1 Induktion in den hTERT-EEC B37 demnach über eine AhR-Aktivierung vermittelt.

Östrogen hemmt die Induzierbarkeit von CYP 1A1 in hTERT-EEC und wirkt hier partiell antagonistisch zu TCDD.

Die TCDD bedingte Induzierbarkeit von CYP 1A1 zeigt sich auch im Bereich der Translation, das CYP 1A1 wird nach TCDD Exposition vermehrt exprimiert.

TCDD zeigt keinen östrogenen Effekt auf die ER α Proteinexpression.

TCDD induziert die Aktivität des XRE Luziferase Reportergens nach transienter Transfektion, dies belegt das Vorhandensein eines funktionalen endogenen AhR in hTERT-EEC B37.

Es kommt bei Exposition gegenüber allen, der in dieser Arbeit untersuchten Xenobiotika zu keiner Hemmung der Proliferation der hTERT-EEC B37.

Die Exposition gegenüber TCDD resultiert auch nicht in einer vermehrten Apoptose der Zellen.

7 Literaturverzeichnis

1. Obenland, H. and S. Pfeil, *Studie zu Vorkommen und gesundheitlicher Bedeutung von polychlorierten Biphenylen in Innerräumen*. 2004.
2. Ross, P.S., et al., *PCBs are a health risk for humans and wildlife*. *Science*, 2000. **289**(5486): p. 1878-9.
3. Ross, P.S. and L.S. Birnbaum, *Persistent organic pollutants (POPs) in human and wildlife*. WHO case studies, 2001: p. http://whqlibdoc.who.int/hq/2001/a76785_persistent.pdf.
4. Bundesministerium für Umwelt Naturschutz und Reaktorsicherheit, *Dioxine in der Umwelt*. Studie im Auftrag des BMU, 2004: p. <http://www.bmu.de/allgemein/aktuell/160.php>.
5. US Department of Health and Human Services, *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo p-Dioxin (TCDD); Dioxin*. National Toxicology program, 2001. **9th Report of Carcinogens**(CAS No.1746-01-6).
6. van der Veen, H., et al., *Chlorinated hydrocarbon content in serum and genital trakt fluids of infertility patients and pregnant women*. Abstracts of the 7th Annual Meeting of the ESHRE and the 7th World Congress on IVF and Assisted Procreation, 1991: p. 107.
7. Seliger, E., et al., *Akkumulation polychlorierter Kohlenwasserstoffe im humanen Endometrium*. *J. Fertil. Reprod.*, 1995. **3**: p. 16.
8. Lehnert, G., et al., *Referenzwerte für persistente Gefahrstoffe am Beispiel der Konzentrationen an Polychlorierten Biphenylen im Humanserum*. *Arbeitsmed. Sozialmed. Umweltmed.*, 1994. **29**: p. 454-458.
9. Nakagawa, R., et al., *Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins*. *J. AOAC. Int.*, 1999. **82**(3): p. 716-724.
10. Schecter, A., et al., *Polychlorinated biphenyl levels in the tissues of exposed and nonexposed humans*. *Environ Health Perspect*, 1994. **102 Suppl 1**: p. 149-58.
11. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity*. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1996. **140**(1): p. 173-9.
12. Whitlock, J.P., Jr., et al., *Cytochromes P450 5: induction of cytochrome P4501A1: a model for analyzing mammalian gene transcription*. *Faseb J*, 1996. **10**(8): p. 809-18.
13. Abbott, B.D., et al., *AhR, ARNT, and CYP1A1 mRNA quantitation in cultured human embryonic palates exposed to TCDD and comparison with mouse palate in vivo and in culture*. *Toxicol Sci*, 1999. **47**(1): p. 62-75.

-
14. Gerhard, I., et al., *Chlorinated hydrocarbons in infertile women*. Environ Res, 1999. **80**(4): p. 299-310.
 15. Peterson, R.E., H.M. Theobald, and G.L. Kimmel, *Developmental and reproductive toxicity of dioxins and related compounds: cross-species comparisons*. Crit Rev Toxicol, 1993. **23**(3): p. 283-335.
 16. Shimizu, Y., et al., *Benzo[a]pyrene carcinogenicity is lost in mice lacking the aryl hydrocarbon receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(2): p. 779-82.
 17. Lahvis, G.P., et al., *Portosystemic shunting and persistent fetal vascular structures in aryl hydrocarbon receptor-deficient mice*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2000. **97**(19): p. 10442-7.
 18. (HPDP), C.t.R.t.H.E.i.V.V.o.E.t.H., *Veterans and Agent Orange*. Fifth Biennial Update ed. 2005: Board on Health Promotion and Disease Prevention (HPDP).
 19. Rier, S., et al., *Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Fundam Appl Toxicol, 1993. **21**(4): p. 433-441.
 20. Rier, S. and W. Foster, *Environmental Dioxins and Endometriosis*. Toxicological Sciences 70, 161-170. Toxicol Sci, 2002. **70**: p. 161-170.
 21. Kuchenhoff, A., et al., *Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium*. Fertil Steril, 1999. **71**(2): p. 354-60.
 22. Schmidt, J.V. and C.A. Bradfield, *Ah receptor signaling pathways*. Annu Rev Cell Dev Biol, 1996. **12**: p. 55-89.
 23. Rier, S. and W.G. Foster, *Environmental dioxins and endometriosis*. Toxicol Sci, 2002. **70**(2): p. 161-70.
 24. Rier, S. and W.G. Foster, *Environmental dioxins and endometriosis*. Semin Reprod Med, 2003. **21**(2): p. 145-54.
 25. Rier, S.E., et al., *Endometriosis in rhesus monkeys (Macaca mulatta) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. Fundam Appl Toxicol, 1993. **21**(4): p. 433-41.
 26. Safe, S., *PCB's, PCDD's, PCDF's and related compounds: Environmental and mechanistic considerations which support the development of TEF's*. Crit Rev Toxicol, 1990. **21**: p. 51-58.
 27. Safe, S.H., *Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment*. Crit Rev Toxicol, 1994. **24**(2): p. 87-149.
 28. Schecter, A., et al., *Chlorinated dioxins and dibenzofurans in human tissue from general populations: a selective review*. Environ Health Perspect, 1994. **102 Suppl 1**: p. 159-71.

-
29. Rier, S.E., et al., *Serum levels of TCDD and dioxin-like chemicals in Rhesus monkeys chronically exposed to dioxin: correlation of increased serum PCB levels with endometriosis*. *Toxicol Sci*, 2001. **59**(1): p. 147-59.
 30. Safe, S.H., *Development validation and problems with the toxic equivalency factor approach for risk assessment of dioxins and related compounds*. *J Anim Sci*, 1998. **76**(1): p. 134-41.
 31. Fernandez-Salguero, P.M., et al., *Lesions of aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice*. *Vet Pathol*, 1997. **34**(6): p. 605-14.
 32. Gonzalez, F.J. and P. Fernandez-Salguero, *The aryl hydrocarbon receptor: studies using the AHR-null mice*. *Drug Metab Dispos*, 1998. **26**(12): p. 1194-8.
 33. Andersson, P., et al., *A constitutively active dioxin/aryl hydrocarbon receptor induces stomach tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. **99**(15): p. 9990-5.
 34. Bungler, M.K., et al., *Resistance to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin toxicity and abnormal liver development in mice carrying a mutation in the nuclear localization sequence of the aryl hydrocarbon receptor*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(20): p. 17767-74.
 35. Nambu, J.R., et al., *The Drosophila single-minded gene encodes a helix-loop-helix protein that acts as a master regulator of CNS midline development*. *Cell*, 1991. **67**(6): p. 1157-67.
 36. Perdew, G.H., *Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein*. *J Biol Chem*, 1988. **263**(27): p. 13802-5.
 37. Kazlauskas, A., L. Poellinger, and I. Pongratz, *Evidence that the co-chaperone p23 regulates ligand responsiveness of the dioxin (Aryl hydrocarbon) receptor*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(19): p. 13519-24.
 38. Carver, L.A. and C.A. Bradfield, *Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): p. 11452-6.
 39. Ma, Q. and J.P. Whitlock, Jr., *A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(14): p. 8878-84.
 40. Meyer, B.K., et al., *Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(2): p. 978-88.
 41. Lees, M.J. and M.L. Whitelaw, *Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt*. *Mol Cell Biol*, 1999. **19**(8): p. 5811-22.
 42. Huang, Z.J., I. Edery, and M. Rosbash, *PAS is a dimerization domain common to Drosophila period and several transcription factors*. *Nature*, 1993. **364**(6434): p. 259-62.

-
43. Zelzer, E., P. Wappner, and B.Z. Shilo, *The PAS domain confers target gene specificity of Drosophila bHLH/PAS proteins*. *Genes Dev*, 1997. **11**(16): p. 2079-89.
 44. Huang, G. and C.J. Elferink, *Multiple mechanisms are involved in Ah receptor-mediated cell cycle arrest*. *Mol Pharmacol*, 2005. **67**(1): p. 88-96.
 45. Reisz-Porszasz, S., et al., *Identification of functional domains of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein (ARNT)*. *Mol Cell Biol*, 1994. **14**(9): p. 6075-86.
 46. Bacsi, S.G. and O. Hankinson, *Functional characterization of DNA-binding domains of the subunits of the heterodimeric aryl hydrocarbon receptor complex imputing novel and canonical basic helix-loop-helix protein-DNA interactions*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(15): p. 8843-50.
 47. Kumar, M.B., R.W. Tarpey, and G.H. Perdew, *Differential recruitment of coactivator RIP140 by Ah and estrogen receptors. Absence of a role for LXXLL motifs*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(32): p. 22155-64.
 48. Elferink, C.J., N.L. Ge, and A. Levine, *Maximal aryl hydrocarbon receptor activity depends on an interaction with the retinoblastoma protein*. *Mol Pharmacol*, 2001. **59**(4): p. 664-73.
 49. Beischlag, T.V., et al., *Recruitment of the NCoA/SRC-1/p160 family of transcriptional coactivators by the aryl hydrocarbon receptor/aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator complex*. *Mol Cell Biol*, 2002. **22**(12): p. 4319-33.
 50. Wang, S. and O. Hankinson, *Functional involvement of the Brahma/SWI2-related gene 1 protein in cytochrome P4501A1 transcription mediated by the aryl hydrocarbon receptor complex*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(14): p. 11821-7.
 51. Löffler, G. and P. Petrides, *Biochemie und Pathobiochemie*. Springer Verlag, 1998. **6.Auflage**: p. 509-512.
 52. Hayes, C.L., et al., *17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. **93**(18): p. 9776-81.
 53. Davarinos, N.A. and R.S. Pollenz, *Aryl hydrocarbon receptor imported into the nucleus following ligand binding is rapidly degraded via the cytoplasmic proteasome following nuclear export*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(40): p. 28708-15.
 54. Huang, L.E., et al., *Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998. **95**(14): p. 7987-92.
 55. Palombella, V.J., et al., *The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B*. *Cell*, 1994. **78**(5): p. 773-85.
 56. Pugh, C.W., et al., *Activation of hypoxia-inducible factor-1; definition of regulatory domains within the alpha subunit*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(17): p.

11205-14.

57. Salceda, S. and J. Caro, *Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes.* J Biol Chem, 1997. **272**(36): p. 22642-7.
58. Hombach-Klonisch, S., et al., *Regulation of functional steroid receptors and ligand-induced responses in telomerase-immortalized human endometrial epithelial cells.* J Mol Endocrinol, 2005. **34**(2): p. 517-34.
59. Nicholl, D., *Gentechnische Methoden.* 2.Auflage ed. 1995: Spektrum Akademischer Verlag.
60. Matsui, H., et al., *Loss of binding and entry of liposome-DNA complexes decreases transfection efficiency in differentiated airway epithelial cells.* J Biol Chem, 1997. **272**(2): p. 1117-26.
61. Zabner, J., et al., *Cellular and molecular barriers to gene transfer by a cationic lipid.* J Biol Chem, 1995. **270**(32): p. 18997-9007.
62. Goldman, M. and D. Cramer, *The epidemiology of endometriosis.* Prog. Clin. Biol. Res., 1990. **323**: p. 15-31.
63. Gerhard, I. and B. Runnebaum, *the limits of hormon substitution in pollutant exposure and fertility disorders.* Zentralblatt für Gynäkologie, 1992. **114**: p. 593-602.
64. Guigal, N., et al., *Induction of CYP1A1 by serum independent of AhR pathway.* Biochem Biophys Res Commun, 2000. **267**(2): p. 572-6.
65. Pitt, J.A., et al., *Expression of AhR and ARNT mRNA in cultured human endometrial explants exposed to TCDD.* Toxicol Sci, 2001. **62**(2): p. 289-98.
66. Masten, S.A. and K.T. Shiverick, *Characterization of the aryl hydrocarbon receptor complex in human B lymphocytes: evidence for a distinct nuclear DNA-binding form.* Arch Biochem Biophys, 1996. **336**(2): p. 297-308.
67. Chang, C.Y. and A. Puga, *Constitutive activation of the aromatic hydrocarbon receptor.* Mol Cell Biol, 1998. **18**(1): p. 525-35.
68. Okey, A.B., D.S. Riddick, and P.A. Harper, *Molecular biology of the aromatic hydrocarbon (dioxin) receptor.* Trends Pharmacol Sci, 1994. **15**(7): p. 226-32.
69. Adachi, J., et al., *Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine.* J Biol Chem, 2001. **276**(34): p. 31475-8.
70. Levine-Fridman, A., L. Chen, and C.J. Elferink, *Cytochrome P4501A1 promotes G1 phase cell cycle progression by controlling aryl hydrocarbon receptor activity.* Mol Pharmacol, 2004. **65**(2): p. 461-9.
71. Song, J., et al., *A ligand for the aryl hydrocarbon receptor isolated from lung.*

-
- Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(23): p. 14694-9.
72. Henry, E.C., et al., *A potential endogenous ligand for the aryl hydrocarbon receptor has potent agonist activity in vitro and in vivo*. Arch Biochem Biophys, 2006.
73. Wei, Y.D., et al., *Regulation of CYP1A1 transcription via the metabolism of the tryptophan-derived 6-formylindolo[3,2-b]carbazole*. Arch Biochem Biophys, 2000. **383**(1): p. 99-107.
74. Pocar, P., et al., *Molecular interactions of the aryl hydrocarbon receptor and its biological and toxicological relevance for reproduction*. Reproduction, 2005. **129**(4): p. 379-89.
75. Mimura, J., et al., *Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function*. Genes Dev, 1999. **13**(1): p. 20-5.
76. Mimura, J. and Y. Fujii-Kuriyama, *Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD*. Biochim Biophys Acta, 2003. **1619**(3): p. 263-8.
77. Charles, G.D. and K.T. Shiverick, *2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases mRNA levels for interleukin-1beta, urokinase plasminogen activator, and tumor necrosis factor-alpha in human uterine endometrial adenocarcinoma RL95-2 cells*. Biochem Biophys Res Commun, 1997. **238**(2): p. 338-42.
78. Bofinger, D.P., et al., *Effect of TCDD exposure on CYP1A1 and CYP1B1 expression in explant cultures of human endometrium*. Toxicol Sci, 2001. **62**(2): p. 299-314.
79. Nebert, D.W., et al., *Role of Aryl Hydrocarbon Receptor-mediated Induction of the Cyp1 Enzymes in Environmental Toxicity and Cancer*. J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 23847-23850.
80. Ge, N.L. and C.J. Elferink, *A direct interaction between the aryl hydrocarbon receptor and retinoblastoma protein. Linking dioxin signaling to the cell cycle*. J Biol Chem, 1998. **273**(35): p. 22708-13.
81. Puga, A., et al., *Aromatic hydrocarbon receptor interaction with the retinoblastoma protein potentiates repression of E2F-dependent transcription and cell cycle arrest*. J Biol Chem, 2000. **275**(4): p. 2943-50.
82. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
83. Kolluri, S.K., et al., *p27(Kip1) induction and inhibition of proliferation by the intracellular Ah receptor in developing thymus and hepatoma cells*. Genes Dev, 1999. **13**(13): p. 1742-53.
84. Hines, R., et al., *Molecular Regulation of genes encoding xenobiotic-metabolizing enzymes: Mechanisms involving endogenous factors*. Drug Metabolism and Disposition, 2001. **29**(5): p. 623-633.

-
85. Huwe, J., et al., *Survey of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, polychlorinated dibenzofurans, and non-ortho-polychlorinated biphenyls in U.S. meat and poultry, 2007-2008: effect of new toxic equivalency factors on toxic equivalency levels, patterns, and temporal trends.* J Agric Food Chem, 2009. **57**(23): p. 11194-200.
 86. Sasaki, M., et al., *Cyp1B1 gene polymorphisms have higher risk for endometrial cancer.* Cancer Res, 2003. **63**: p. 3913-18.
 87. Newbold, R.R. and J.G. Liehr, *Induction of uterine adenocarcinoma in CD-1 mice by catechol estrogens.* Cancer Res, 2000. **60**: p. 235-237.
 88. Han, X. and J.G. Liehr, *DNA single-strand breaks in kidneys of Syrian hamsters treated with steroidal estrogens: hormone-induced free radical damage preceding real malignancy.* Carcinogenesis, 1994. **15**: p. 997-1000.
 89. Liehr, J.G. and M.J. Ricci, *4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(8): p. 3294-6.
 90. Bradlow, H.L., et al., *2-hydroxyestrone: the 'good' estrogen.* J Endocrinol, 1996. **150 Suppl**: p. S259-65.
 91. Nebert, D.W., et al., *Role of aryl hydrocarbon receptor-mediated induction of the CYP1 enzymes in environmental toxicity and cancer.* J Biol Chem, 2004. **279**(23): p. 23847-50.
 92. Nawaz, Z., et al., *Proteasome-dependent degradation of the human estrogen receptor.* Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 1858-62.
 93. Safe, S., M. Wormke, and I. Samudio, *Mechanisms of inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor crosstalk in human breast cancer cells.* J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2000. **5**(3): p. 295-306.
 94. Wormke, M., et al., *Crosstalk between estrogen receptor alpha and the aryl hydrocarbon receptor in breast cancer cells involves unidirectional activation of proteasomes.* FEBS Lett, 2000. **478**(1-2): p. 109-12.
 95. Ricci, M., et al., *Estrogen receptor reduces Cyp1A1 induction in cultured human endometrial cells.* J Biol Chem, 1999. **274**(6): p. 3430-3438.
 96. Wo, Y.Y., J. Stewart, and W.E. Greenlee, *Functional analysis of the promoter for the human Cyp1B1 gene.* J Biol Chem, 1997. **272**: p. 26702-07.
 97. Ohtake, F., et al., *Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor.* Nature, 2003. **423**(6939): p. 545-50.
 98. Enan, E. and F. Matsumura, *Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions.* Biochem Pharmacol, 1995. **49**(2): p. 249-61.
 99. Safe, S.H., *Modulation of gene expression and endocrine response pathways*

by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related compounds. Pharmacol Ther, 1995. 67(2): p. 247-81.

8 **Thesen**

1. In-vitro Versuche an humanen Zellen erfolgen oftmals an Tumorzelllinien, welche sich nicht physiologisch verhalten.
2. Die immortalisierten endometrialen Epithelzellen hTERT-EEC B37 zeigen sich nach phenotypischer Beurteilung als nicht transformierte, benigne Zellen.
3. Die hTERT-EEC B37 Zellen exprimieren einen funktionalen AhR.
4. CYP 1A1 und 1B1 sind auch in den EEC B37 klassische TCDD Zielgene.
5. Die TCDD Zielgene werden durch die Xenobiotika zeit- und konzentrationsabhängig beeinflusst.
6. Die Wirkungen der Xenobiotika beeinflussen die EEC B37 über die transkriptionelle Ebene hinaus.
7. Die Aktivitätsänderung der Zielgene zeigt sich auch in einer veränderten Translationsleistung der EEC B37.
8. Die Aktivierung dieser Zielgene erfolgt über sogenannte XRE-Sequenzen, welche in den EEC B37 funktional sind.
9. Umweltkontaminanten können das Wachstums- und Absterbeverhalten, sowie die Produktion von ECM der endometrialen Zellen beeinflussen.
10. Es findet eine komplexe Wechselwirkung zwischen endogenen und exogenen Stoffen statt.
11. Die EEC B37 zeigen sich als hormonsensitive Zellen, mit denen eine Untersuchung dieser komplexen Wechselwirkungen möglich erscheint.

Anlagen

Lebenslauf

Persönliche Daten

Geburtsdatum	01. November 1978
Geburtsort	Berlin
Familienstand	ledig

Schulbildung

09/1984 – 08/1990	Grundschule am Dielingsgrund, Berlin
09/1990 – 06/1994	Askanische Oberschule (Gymnasium), Berlin
08/1994 – 06/1995	Argo Community High School, Summit, Illinois, USA
06/1995	High School Diploma
07/1995 – 06/1997	Askanische Oberschule (Gymnasium), Berlin
06/1997	Abitur - allgemeine Hochschulreife -

Hochschulausbildung

10/1997 – 03/2000	Studium der Sportwissenschaften an der Humboldt-Universität Berlin
03/2000 – 10/2000	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig-Universität Gießen
10/2000 – 03/2002	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
03/2002	Ärztliche Vorprüfung (Physikum)

03/2002 – 10/2002	Forschungssemester zum Beginn der Promotionsarbeit am Institut für Anatomie und Zellbiologie der MLU Halle-Wittenberg
10/2002 – 12/2006	Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
09/2003	Erster Abschnitt zur ärztlichen Prüfung (1. Staatsexamen)
09/2005	Zweiter Abschnitt zur ärztlichen Prüfung (2. Staatsexamen)
10/2005 – 09/2006	Praktisches Jahr
12/2006	Dritter Abschnitt zur ärztlichen Prüfung (3. Staatsexamen)
Seit 02/2007	Tätigkeit als Assistenzarzt in der Klinik für Orthopädie und Physikalische Medizin der MLU Halle-Wittenberg, Ausbildung zum Facharzt für Orthopädie und Unfallchirurgie

Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre hiermit, das ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Halle, November 2010

Marco Polo Peich

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Frühere Promotionsversuche durch meine Person haben nicht stattgefunden.

Halle, November 2010

Marco Polo Peich

Veröffentlichungen

--Teile dieser Arbeit wurden im Rahmen einer Posterpräsentation der 19. Arbeitstagung der Anatomischen Gesellschaft in Würzburg im Oktober 2002 präsentiert.

Titel: *"AhR-mediated responses in immortalized human endometrial epithelial cells"*

--Ergebnisse aus den Versuchen dieser Arbeit wurden in Molecular Human Reproduction veröffentlicht.

C. Willing, M. Peich, A. Danescu, A. Kehlen, P. Fowler, S. Hombach-Klonisch
"Estrogen-independent actions of environmentally relevant AhR-agonists in human endometrial epithelial cells." Mol. Hum. Reprod. 2010

Danksagung

Mein Dank gilt in erster Linie meiner Betreuerin Frau Dr. med. habil S. Hombach-Klonisch sowie Ihrem Mann, für die Überlassung des Themas und Ihrem langen Atem in meiner Betreuung.

Des Weiteren gilt mein besonderer Dank:

-meinen Eltern, die mir mein Studium sowie diese Promotionsarbeit ermöglicht haben.

-Frau C. Fröhlich für die Einarbeitung und die Betreuung meiner ersten Schritte im Labor.

-meinem Bruder Carlo und Herrn Knut Fälker für die kritischen, aber produktiven Anmerkungen.

-Frau Dr. rer. nat. habil A. Bernstein für die entscheidenden Worte zum richtigen Zeitpunkt.

-meiner Freundin Carolin, die mich in jeder Lage zu unterstützen wusste und auf verschiedenes verzichten mußte.

Danke!