

***In vitro*-Untersuchungen zum Einfluss estrogenaktiver
Substanzen auf die Expression entwicklungs- und
tumorrelevanter Gene in Uterus und Brustdrüse**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN

(Dr. rer. nat.)

der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften der

Universität Karlsruhe (TH)

vorgelegte

DISSERTATION

von

Diplom-Lebensmittelchemiker

Jörg Wagner

aus Lahr

Dekan: Prof. Dr. Stefan Bräse

Referent: Prof. Dr. Dr. Manfred Metzler

Koreferent: Prof. Dr. Doris Marko

Tag der mündlichen Prüfung: 24. April 2008

Danksagung

Ich danke . . .

- Herrn Prof. Dr. Manfred Metzler für die Überlassung des interessanten Themas und seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.
- Frau Dr. Leane Lehmann für die gute Betreuung, die wertvollen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- meinen Kollegen Julia, Silke, Melanie, Jessica, Simon, Georg, Markus, Markus, Matthias für Diskussion, Rat und Tat, sowie Rosi Förster für die Arbeit in der Zellkultur
- den Zellkulturdiplomanden für die Unterstützung
- ganz besonders meinen Eltern und Großeltern, die mir den Weg bis zu dieser Arbeit ermöglicht haben
- ganz arg ganz besonders Anne, die mich immer ertragen und nie gesehen hat....

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Estrogene und ihre hormonelle Wirkung	1
1.2	Körperfremde estrogen-aktive Substanzen	5
1.2.1	Genistein (GEN)	5
1.2.2	Zearalenon (ZEN)	6
1.2.3	Polychlorierte Biphenyle (PCB)	6
1.3	Wnt-Proteine	12
1.3.1	Struktur von Wnt-Proteinen	12
1.3.2	Transport und Modifikation von Wnt-Proteinen	13
1.3.3	Wnt-Signalwege	14
1.3.4	Expression von Wnt-Genen im weiblichen Reproduktionstrakt	15
1.4	17 β -Estradiol (E2)	18
1.4.1	Metabolismus von E2	18
1.4.2	Die Rolle von E2 bei der Kanzerogenese in der Brust	22
2	Aufgabenstellung und Zielsetzung	26
3	Ergebnisse und Diskussion	27
3.1	Charakterisierung der Ishikawazellen als Testsystem für estrogen-aktive Substanzen	27
3.1.1	Kernrezeptorstatus in Ishikawazellen	28
3.1.2	Die Alkalische Phosphatase (AIP) in Ishikawazellen	29
3.1.3	Rolle des ER α bei der Induktion der AIP	33
3.2	Einfluss exogener Estrogene auf die AIP-Aktivität	41
3.2.1	GEN	41
3.2.2	ZEN	43
3.2.3	Polychlorierte Biphenyle (PCBs)	45
3.2.4	DES	81
3.3	Expression von Wnt-Genen in Ishikawazellen	83
3.4	Einfluss von DES auf die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a	85
3.5	Rolle der Proteinbiosynthese bei der DES-induzierten Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a	88
3.5.1	Einfluss von Cycloheximid auf die Lebendzellzahl von Ishikawazellen	88
3.5.2	Einfluss von Cycloheximid auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen	89
3.5.3	Einfluss von Cycloheximid auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt5a in Ishikawazellen	90
3.5.4	Einfluss von Cycloheximid auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt7a in Ishikawazellen	91
3.5.5	Diskussion	92
3.6	Rolle des ER bei der DES-vermittelten Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a	93
3.6.1	Einfluss von DES auf die Genexpression von ER α	93
3.6.2	Einfluss eines ER-Antagonisten auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen	94

3.6.3	Einfluss des Knockdown von ER α auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen	96
3.6.4	Diskussion	100
3.7	Rolle von Wnt5a bei der DES induzierten Repression von Wnt7a	101
3.7.1	Knockdown von Wnt5a in Ishikawazellen	101
3.7.2	Einfluss von DES auf die Expression von Wnt5a in Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen	102
3.7.3	Einfluss von DES auf die Expression von Wnt7a in Ishikawazellen mit normalem und reduziertem Gehalt an Wnt5a	103
3.7.4	Diskussion	105
3.8	Einfluss von weiteren estrogen-aktiven Substanzen auf die Expression von Wnt-Genen in Ishikawazellen	106
3.8.1	17 β -Estradiol	106
3.8.2	GEN	108
3.8.3	ZEN	109
3.8.4	PCB9 und 4-HO-PCB9	110
3.9	Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in menschlichen Geweben und in MCF-7 Zellen	113
3.9.1	Herstellung und Charakterisierung der Standards für die PCR	113
3.9.2	Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in MCF-7 Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen	115
3.9.3	Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in der Brustdrüse	122
3.9.4	Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in der Leber	128
3.9.5	Diskussion der Genexpression E2-metabolisierender Enzyme in Zellen und Geweben	134
4	Zusammenfassung	138
5	Material und Methoden	139
5.1	Geräte	139
5.2	Verbrauchsmaterialien	141
5.3	Testsubstanzen	142
5.4	Zellkultur	143
5.4.1	Zellen	143
5.4.2	Lösungen	144
5.4.3	Durchführung	145
5.5	Transfektion der Ishikawazellen mit siRNA	145
5.5.1	Reagenzien	146
5.5.2	Durchführung	147
5.6	RNA-Isolation	149
5.6.1	Durchführung	149
5.7	Konzentrationsbestimmung der RNA	150
5.8	Konzentrationsbestimmung des DNA-Standards	150
5.9	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	152
5.9.1	Reverse Transkription	152

5.9.2	PCR	153
5.10	Elektrophorese der Reaktionsprodukte	157
5.10.1	Lösungen	157
5.10.2	Durchführung	158
5.10.3	Quantitative Auswertung der PCR-Produkte im Agarosegel	158
5.10.4	Bestimmung der ALP-Aktivität	159
5.11	Zytotoxizitätstest durch Zellzahlbestimmung	161
5.11.1	Lösungen	161
5.11.2	Durchführung	161
5.12	Statistik	162
	Literatur	163
	A Anhang	182

Abkürzungsverzeichnis

4-NPP	para-Nitrophenylphosphat
Abb	Abbildung
AIP	Alkalische Phosphatase
MDCB	Mono- und Dichlorbiphenyle
bp	Basenpaare
CE	Catecholestrogene
COMT	Catechol-O-Methyltransferase
CYP	Cytochrom P450
DBD	DNA-bindende Domäne
DES	Diethylstilbestrol
DMEM	Dulbeccos Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E1	Estrone
E2	17 β -Estradiol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Estrogenrezeptor
ER α	Estrogenrezeptor alpha
ER β	Estrogenrezeptor beta
EtOH	Ethanol
FKS	Fötales Kälberserum
GEN	Genistein
GST	Glutathion-S-Transferase
LBD	Ligand-bindende Domäne
MCF-7	Humane Adenokarzinomzellen aus dem Brustgewebe
mRNA	Messenger-RNA
NOAEL	No-Observable-Adverse-Effect-Level
PBS	Phosphat Buffered Saline
PBS-CMF	PBS ohne Calcium und Magnesium
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCB1	2-Chlorobiphenyl
PCB12	3,4-Dichlorobiphenyl
PCB2	3-Chlorobiphenyl
PCB3	4-Chlorobiphenyl

PCB9	2,5-Dichlorobiphenyl
PCP	planarer Zellpolarität-Signalweg
PCR	Polymerasekettenreaktion
PR	Progesteronrezeptor
QR	NADPH-Chinon-Oxidoreduktase
RNA	Ribonukleinsäure
RNA-Pol	RNA-Polymerase
RT	Reverse Transkription
siRNA	small interfering RNA
siRNA _(C)	zur keiner bekannten Gensequenz komplementäre siRNA
siRNA _(Wnt5a)	zur Sequenz des Gens Wnt5a komplementäre siRNA
siRNA _{ER(α)}	zur Sequenz des Gens ERα komplementäre siRNA
SULT	Sulfotransferase
Tab	Tabelle
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TE	Tris-EDTA
TF	Transkriptionsfaktoren
TM	Transfektionsmittel
UV	Ultraviolett
ZEN	Zearalenon

1 Einleitung

1.1 Estrogene und ihre hormonelle Wirkung

Estrogene sind Steroidhormone die sowohl das Wachstum als auch die Differenzierung von Zellen regulieren. Estrogene üben diese Wirkungen in einer Vielzahl von Zielgeweben aus. Das wirksamste natürliche Estrogen im Menschen ist das 17β -Estradiol (E2). Die biologischen Effekte von Estrogenen können über den Estrogenrezeptor- α (ER α) und Estrogenrezeptor- β (ER β) vermittelt werden.

Genomische Signaltransduktion über den Estrogenrezeptor (ER) Es existieren 2 Formen des ER: ER α (Greene und Press, 1986) und ER β (Kuiper *et al.*, 1996). Der ER α ist in hohen Konzentrationen in den klassischen E2-Zielgeweben Brust, Uterus und Ovarien zu finden. Der ER β wird in Ovarien, Prostata, Blase und Lunge gefunden (Kuiper und Gustafsson, 1997). Sie gehören zur Steroid/Thyroid-Superfamilie von Kernrezeptoren (Evans, 1988). Die Kernrezeptoren liegen als Monomere in einer inaktiven Form vor. Der ER α ist ein 66kD Protein das aus 595 Aminosäuren aufgebaut ist. Der ER α ist aus 3 unabhängigen funktionalen Bereichen aufgebaut: das NH₂-terminale Ende oder A/B-Domäne, die DNA-bindende (DBD) oder C-Domäne und die Liganden-bindende (LBD) oder D/E/F-Domäne. Die DNA-bindende Domäne enthält 2 Zinkfinger, von denen einer für die Interaktion mit der DNA und der andere für die Rezeptordimerisierung benötigt wird. In der Domäne E bindet der Ligand an den Rezeptor. An dieser Stelle ist zusätzlich die Ligand-abhängige Transaktivierungsfunktion AF-2 lokalisiert. Der ER β besteht aus 485 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 54,2 kDA. Die Aminosäuresequenzen sind besonders in der LBD (55%) und der DBD (95%) recht konserviert. Wenn kein Ligand an den ER gebunden hat liegt er an Chaperone gebunden in einer inaktiven Form vor. Aus der Klasse der Chaperone sind die Hitzeschockproteine HSP90, HSP70 und HSP56 am inaktiven ER lokalisiert.

Klassische Stimulation durch Bindung an ein Estrogen-responsives Element (ERE)

Die Bindung eines Liganden bewirkt eine Konformationsänderung des Rezeptors. Dadurch kann dieser dimerisieren und an die DNA binden. Nach Anlagerung von Koaktivatoren und Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren bildet sich ein Präinitiationskomplex (Abb. 1). Schlussendlich ändert sich die Transkriptionsrate von Estrogen-regulierten Genen.

Nach Bindung von E2 spalten sich die Chaperone vom ER ab. Der ER dimerisiert und bindet an eine bestimmte Erkennungssequenz an der DNA (ERE, Abb. 1). Das ERE befindet sich in der Kontrollregion der Promotoren der Zielgene. Über AF-2 binden E2-abhängige Koaktivatoren wie SRC-1 und CBP/p300 an den ER-DNA-Komplex und ermöglichen so die Bindung der Transkriptionsmaschinerie (TATA-Box-bindendes Protein, TBP; Transkriptionsfaktoren, TF; RNA-Polymerase, RNA-Pol) an die TATA-Box in der Promotorregion (Mueller und Korach, 2001). Der ER wird daher auch als Ligand-aktivierter TF bezeichnet. Neben der Ligand-abhängigen Genexpression können Gene auch über die Transaktivierungsfunktion AF-1 Ligand-unabhängig exprimiert werden. Der estrogene Stimulus hängt damit von AF-1 und AF-2 ab (McDonnell *et al.*, 1995). Koaktivatoren die zell- und gewebsspezifisch exprimiert werden, beeinflussen in starkem Maße die Aktivierung.

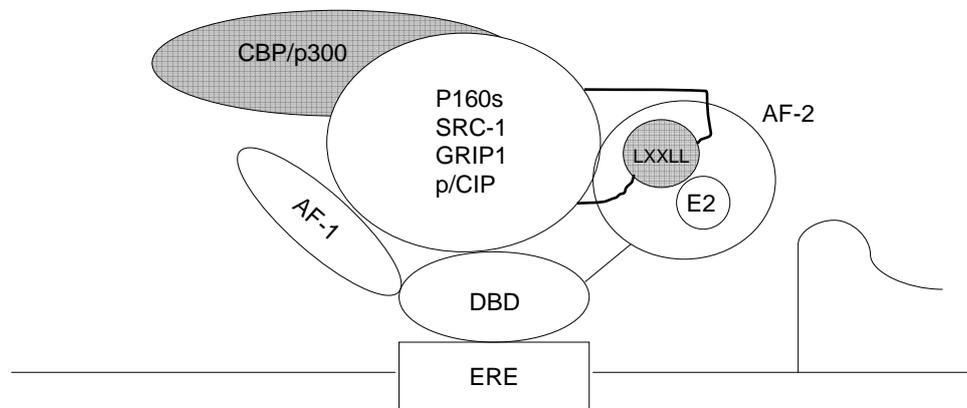


Abb. 1: Präinitiationskomplex des ER (modifiziert nach Kushner *et al.*, 2000).

Bindung an SP-1 und AP-1 Etwa ein Drittel der ER-abhängig regulierten Gene besitzen keine EREs in ihrer DNA-Sequenz. Estrogene können die Transkription von Genen auch beeinflussen, ohne dass eine Bindung des ER an die DNA notwendig ist. Der ER mit gebundenem Estrogen kann mit Transkriptionsfaktoren an der DNA interagieren, ohne selber an die DNA zu binden. Diese Proteininteraktionen können mit AP-1 oder SP-1 Proteinen geschehen (Abb. 2).

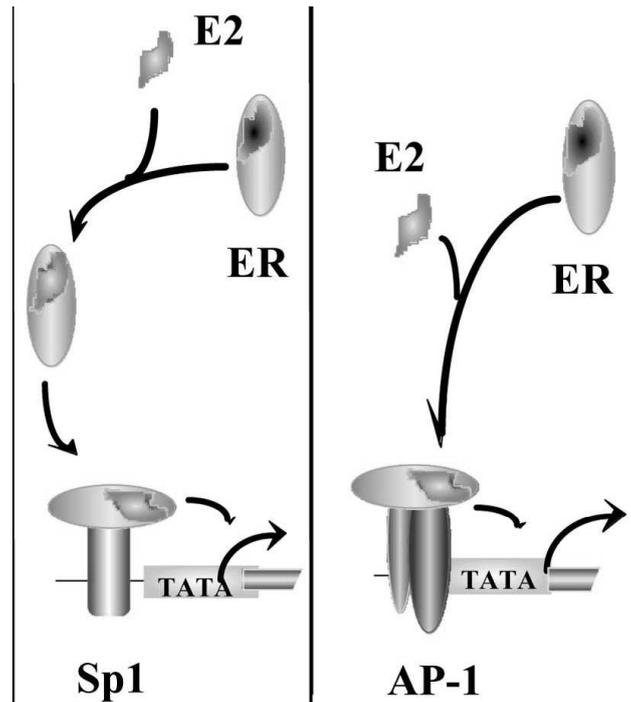


Abb. 2: Regulation der Transkription durch Bindung eines Estrogen-ER-Komplexes an SP1- und AP-1-Proteine (modifiziert nach Nilsson *et al.*, 2001).

Nicht-genomische Signaltransduktion von Estrogenen Estrogene bewirken einige ihrer Effekte über die ER-abhängige Genexpression. Eine große Anzahl weiterer Effekte von Estrogenen wird jedoch so schnell vermittelt, dass die Signalwirkung unabhängig von einer genomischen Antwort sein muss. Diese Effekte werden als nicht-genomische Signalwirkung beschrieben. E2 bewirkte beispielsweise einen Anstieg an intrazellulärem Calcium (Improta-Brears *et al.*, 1999), eine Stimulation der Adenylatcyclase-Aktivität und eine cAMP-Produktion (Aronica *et al.*, 1994; Razandi *et al.*, 1999). Der Einfluss von E2 auf den MAPK-Kinase-Signalweg wurde intensiv in verschiedenen Zelllinien untersucht (Migliaccio *et al.*, 1996; Chen *et al.*, 1999). Zudem aktivierte E2 den Phosphoinositol-3-Kinase Signalweg in Brustkrebs- und Leberzellen (Castoria *et al.*,

2001; Marino *et al.*, 2002).

1.2 Körperfremde estrogen-aktive Substanzen

1.2.1 Genistein (GEN)

In asiatischen Ländern, in denen eine sojareichere Nahrung im Vergleich zu westlichen Ländern verzehrt wird, wird eine niedrigere Rate an Brustkrebskrankungen beobachtet. Daher hat sich die Suche nach brustkrebspräventiven Nahrungsmittelinhaltsstoffen schnell auf Sojaiso flavone, insbesondere Genistein und Daidzein fokussiert (Adlercreutz *et al.*, 2004). Isoflavone binden und aktivieren beide Isoformen des ER (mit Präferenz für ER β) und haben so estrogenartige Eigenschaften. Sie besitzen zusätzlich nichthormonelle Wirkungen, die mit einer Hemmung des Krebszellwachstums assoziiert werden. Ein Einfluss von Nahrungsiso flavonen, insbesondere Genistein und Daidzein, auf das Auftreten von hormonabhängigen Tumoren der Brust- und der Gebärmutter schleimhaut wird jedoch seit Jahren kontrovers diskutiert (Messina *et al.*, 2006): Genistein zeigte in einigen Tierversuchen chemopräventive Eigenschaften gegen Brustkrebs, die stark vom Zeitpunkt der Exposition (Wirkung nur bei jungen Tieren) und dem experimentellen Protokoll abhingen, was dazu führte, dass eine isoflavonreiche Diät bereits für Schwangere, Säuglinge und Kinder empfohlen wurde. Jedoch traten bei Tieren, die bereits im Mutterleib Genistein ausgesetzt waren, Tumore der Gebärmutter auf (Newbold *et al.*, 2001), was diese Empfehlung kritisch bewerten lässt. Auch die tumorpromovierende Wirkung von Genistein in verschiedenen Tiermodellen der Brustkrebsentstehung erregte Besorgnis. Ob Genistein zur Initiation von Tumoren beiträgt ist noch unklar. Genistein ist zwar genotoxisch *in vitro* (Stopper *et al.*, 2005), jedoch ist in transgenen Tiermodellen die Datenlage für Genistein noch nicht gesichert (Manjanatha *et al.*, 2005, 2006).

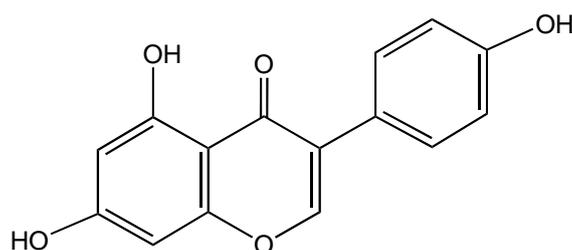


Abb. 3: Strukturformel des Isoflavones Genistein.

1.2.2 Zearalenon (ZEN)

Zearalenon ist ein Resorcylsäurelacton (Abb. 4), das als Mykotoxin von *Fusarium spp.* gebildet wird. Es wird vor allem in verschimmeltem Getreide nachgewiesen. ZEN kann in Getreide frei oder als Glucuronid gebunden vorliegen. Die Konzentrationen variieren sehr stark je nach Getreideart und Herkunftsland. In bayerischen Weizenproben wurde beispielsweise 11 - 860 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZEN und 17 - 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ des Glucuronids nachgewiesen (Schneweis *et al.*, 2002). ZEN wird durch großtechnische Prozesse nicht zerstört. Das Glucuronid kann im Körper gespalten werden, und dadurch kann zusätzlich ZEN in den Körper gelangen.

Beim Menschen wird ZEN und sein Hauptmetabolit α -Zearalenol hauptsächlich als Glucuronid über den Urin ausgeschieden. Die biliär ausgeschiedenen Glucuronide unterliegen dem enterohepatischen Kreislauf mit einer hohen Resorptionsrate im Darm (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987). Zearalenon besitzt eine estrogenere Wirkung (Hearnshaw *et al.*, 1972). Der No-Observable-Adverse-Effect-Level (NOAEL) beträgt im Schwein 0,06 mg/kg Körpergewicht und Tag. Die Bindungsaffinität von ZEN an den ER α ist ungefähr 20 mal schwächer als die von E2 (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

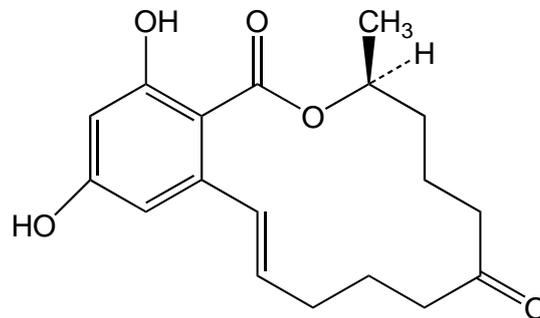


Abb. 4: Strukturformel des Mykotoxins Zearalenon.

1.2.3 Polychlorierte Biphenyle (PCB)

PCBs gehören zu den halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffen. Die Bezeichnung PCB beschreibt eine Gruppe von 209 chemischen Substanzen, auch Kongenere genannt. Diese PCBs können weiter durch den Grad der Chlorierung in homologe PCBs eingeteilt werden. Homologe

PCBs mit unterschiedlicher Position der Chlorsubstitution werden als Isomere bezeichnet. Für die Bezeichnung der Kongenere wurden IUPAC Nummern eingeführt mit denen die einzelnen Kongenere von 1 bis 209 durchnummeriert wurden (PCB1 entspricht 2-Monochlorobiphenyl, PCB209 entspricht Decachlorobiphenyl). Bei PCBs handelt es sich um synthetische Produkte ohne natürliches Vorkommen. PCBs bestehen aus zwei über eine C-C-Brücke (1-1') miteinander verbundenen Benzolringen. Die zehn Wasserstoffatome sind durch ein bis zehn Chloratome substituiert.

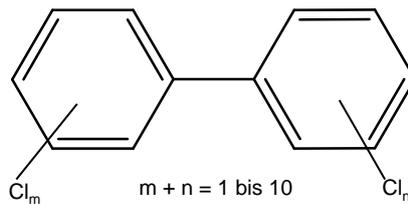


Abb. 5: Allgemeine Strukturformel von PCBs.

Die zwei Phenylstrukturen der PCBs können um die Einfachbindung rotieren. Die bevorzugte Konformation ist abhängig vom Chlorierungsgrad, da die Chloratome grösser als die Wasserstoffatome sind und damit die Rotation behindern können. PCBs werden aufgrund ihrer Struktur und Konformation häufig in koplanar, nicht-koplanar oder dioxinähnlich eingeteilt (Abb. 6, Ganey und Boyd, 2005):

Koplanare-PCBs: Koplanare PCBs besitzen kein Chloratom in ortho-Position. Es existieren 68 coplanare PCBs.

Dioxinähnliche PCBs: Koplanare PCBs, bei denen 2 oder mehr meta-Positionen chloriert sind, die Anzahl der Chloratome ≥ 4 beträgt und beide para-Positionen chloriert sind.

Nicht-koplanare PCBs PCBs mit 2, 3 oder 4 Chloratomen in ortho-Position.

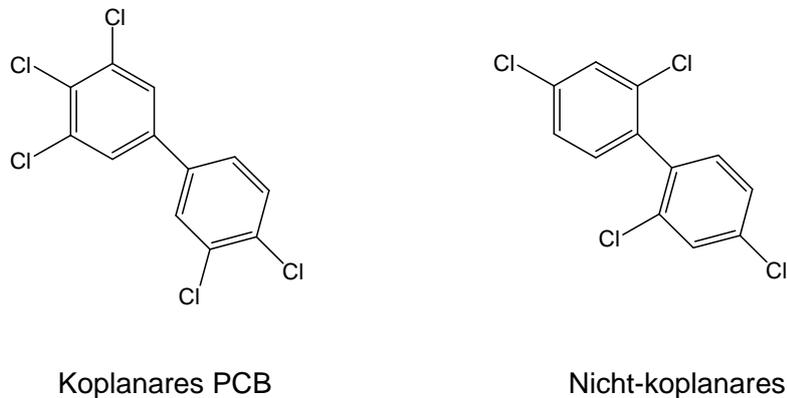


Abb. 6: Struktur eines koplanaren (3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl) und nicht-koplanaren PCBs (2,2',4,4'-Tetrachlorbiphenyl).

Vorkommen und Verwendung von PCBs PCBs wurden erstmals in den 30er Jahren des 20. Jahrhunderts kommerziell hergestellt und auf Grund ihrer physikalischen und chemischen Eigenschaften (chemische und thermische Stabilität) in vielen verschiedenen Bereichen der Industrie eingesetzt (z.B. als elektrische Transformatoren, Hydrauliköle, dielektrische Fluide, Weichmacher für Kunststoffe) ((Zhao *et al.*, 2004; Amaro *et al.*, 1996)). Die gesamte hergestellte Menge an PCBs wird auf 1.5 - 2 Millionen Tonnen geschätzt (Koss *et al.*, 2004). Jedoch erweisen sich gerade die für die Industrie idealen physikochemischen Eigenschaften der PCBs und deren globale Verteilung als problematisch, da sich diese Verbindungen auf Grund ihrer hohen Persistenz in der Umwelt und ihrer Lipophilie in der Nahrungskette anreichern und somit in den Menschen gelangen können (Zhao *et al.*, 2004). Neben der Problematik der Bioakkumulation und Persistenz sind insbesondere die toxikologischen Effekte dieser Substanzklasse von Bedeutung.

Aufnahme und Verteilung im Körper Auf Grund der Lipophilie von PCBs erfolgt die Resorption dieser Verbindungen aus dem Gastrointestinaltrakt im Sinne einer passiven Diffusion, während eine Aufnahme über aktive Transportmechanismen wahrscheinlich keine Rolle spielt (Kimbrough und Krouskas, 2003). Über die Resorptionsraten von PCBs über die Lunge existieren keine genauen Daten. Die dermale Aufnahme ist abhängig von der Einwirkzeit und der Applikationsmatrix, und ist im Allgemeinen wesentlich geringer als die gastrointestinale Aufnahme. Die Verteilung von PCBs erfolgt vom Dünndarm aus über das Blut und die Lymphe in sämtliche Gewebe. Im Blut sind PCBs vorwiegend mit Lipoproteinen und Plasmaproteinen assoziiert, wobei die Verteilung der einzelnen Kongenere insbesondere durch deren lipophile

Eigenschaften und der Lipophilie des jeweiligen Gewebes bestimmt wird. Dies gilt insbesondere für sehr hoch chlorierte PCB-Kongenere, wie Octachlorbiphenyle und Decachlorbiphenyle, die praktisch nicht metabolisiert werden. Bei diesen Verbindungen kommt es auf Grund ihrer hohen Lipophilie zu einer Biokonzentrierung im Fettgewebe (Kimbrough und Krouskas, 2003). Niedrig chlorierte Biphenyle, wie Mono- und Dichlorbiphenyle (MDCB) werden vorwiegend über die Atemluft aufgenommen. Die Hauptquelle anderer PCBs ist meist die Nahrung. Die PCBs in der Nahrung sind meist höher chlorierte PCBs, die schlecht metabolisiert werden. Nach Schätzungen der WHO erfolgt die Gesamt-PCB Exposition der Durchschnittsbevölkerung 90% oral, 10% inhalativ. Die PCBs, die in der Luft vorkommen sind im Gegensatz dazu flüchtiger, niedrig-chloriert und dem Metabolismus zugänglicher. Diese niedrig-chlorierten PCBs wurden in erhöhten Mengen sowohl in Fettgewebe und Blut als auch in Uterus, Ovarien und Hoden nachgewiesen (Menone *et al.*, 2000; Younglai *et al.*, 2002).

Die HO-PCB-Konzentrationen, die im Menschen beobachtet wurden, lagen bei etwa 10-40% der Gesamt-PCB-Belastung (Bergman *et al.*, 1994; Sandau *et al.*, 2000).

Metabolismus von PCBs PCBs sind Umweltkontaminanten, die aufgrund ihrer chemischen Struktur nur geringfügig durch Tiere und Mikroorganismen metabolisiert werden und deshalb sehr persistent sind. Für ihre Toxikologie ist es jedoch bedeutsam zu wissen, dass es große Unterschiede bei der Biotransformation von verschiedenen Kongeneren und deren Metaboliten gibt. Generell läuft die Metabolisierung aller PCBs in ähnlicher Weise aber stark unterschiedlicher Effizienz ab. Zuerst findet eine Hydroxylierung oder Epoxidbildung des PCBs statt. Je nach Chlorierungsmuster sind dafür unterschiedliche Cytochrom-P450-Isoenzyme (CYP) verantwortlich (Ishida *et al.*, 1991). Die hydroxylierten PCBs können durch Sulfotransferasen (SULTs) oder UDP-Glucuronyltransferasen (UGTs) mit Sulfat beziehungsweise Glucuronsäure konjugiert werden. Auch eine weitere Hydroxylierung ist möglich. Ein gebildetes Epoxid kann sich in eine phenolische Hydroxy-Gruppe umlagern, durch eine Epoxidhydrolase in ein Dihydrodiol umgewandelt werden oder durch GSH konjugiert werden. Durch weitere Oxidationen können Catechole und Chinone entstehen. Koplanare PCBs können an den Ah-Rezeptor binden und bewirken teilweise eine Induktion von Ah-Rezeptor regulierten Genen wie beispielsweise CYP1A1. Nicht-koplanare PCBs induzieren Gene der CYP2B- und 3A-Familie. Zusätzlich zur Induktion von Enzymen wurde auch eine Hemmung verschiedener Fremdstoff-metabolisierender Enzyme durch PCBs beobachtet. 3,3',4,4'-Tetrachlorbiphenyl war ein Inhibitor von CYP1A1 (Stegeman *et al.*, 1995), und mehrere hydroxylierte PCBs inhibierten die Sulfonierung und Glucuronidierung (Schuur *et al.*, 1998; Kester *et al.*, 2000).

Generell sind PCBs mit einem oder mehreren ortho-Chlor-Substitutionen schlechter metabolisierbar. PCBs mit einem oder keiner Chlorsubstitution in ortho-Position können eine koplanare

Konformation einnehmen. Diese flache Konformation wird von CYP1A1 bevorzugt. Bei Personen die hoch mit PCBs belastet waren, wurden hohe HO-PCB-Spiegel im Blut beobachtet. Durch die Hydroxylierung werden die PCBs hydrophiler und werden besser ausgeschieden. HO-PCBs haben teilweise dennoch eine Halbwertszeit von mehreren Tagen im Körper, auch wenn diese geringer als die der Muttersubstanzen ist (Yoshimura *et al.*, 1987).

PCBs als endokrine Disruptoren Sowohl PCBs als auch PCB-Gemische hatten in *in vivo*- und *in vitro*-Studien estrogene und anti-estrogene Wirkungen, die zumindest teilweise durch hydroxylierte PCBs vermittelt wurden (Safe, 1994; Li und Hansen, 1996; Connor *et al.*, 1997). Aufgrund ihrer Persistenz und Bioakkumulation im Körper wurden mehrere PCBs und PCB-Gemische hinsichtlich ihrer estrogenen Wirkung untersucht. Es gibt eine Reihe von Testsystemen zur Messung der estrogenen Aktivität von Einzelsubstanzen und Umweltproben *in vitro*, die zumeist in drei Gruppen eingeteilt werden: Proliferations-Assays, ER-Bindungsassays und Reportergeren-Assays. Dazu gibt es noch Testsysteme in denen biologische Veränderungen durch estrogen-aktive Substanzen beobachtet werden.

Bindungsaffinität zum ER ER-Bindungsassays wurden entwickelt, um Substanzen zu identifizieren, die an den ER binden und dort entweder agonistisch oder antagonistisch wirken können. Eine Unterscheidung zwischen diesen beiden Wirkungsweisen ist mit diesen Assays allerdings nicht möglich (Charles, 2004). Estrogene wie E2 besitzen eine große Bindungsaffinität zum Estrogenrezeptor. Durch die Bindung mit einem Estrogen wird der ER aktiviert (siehe Kapitel 1.1) und es werden biologische Wirkungen vermittelt. Die Messung der Bindung an den ER ist eine Methode estrogen-aktive Stoffe zu identifizieren. Dennoch ist die Aussagekraft dieses Testsystems eingeschränkt, da eine Bindung an den ER nicht gleichzeitig eine biologische Wirkung induzieren muss. Die Bindung an den ER kann nur als Hinweis auf eine mögliche estrogene Wirkung gesehen werden.

PCBs und HO-PCBs hatten oft eine Bindungsaffinität zum ER, die jedoch deutlich geringer als die von E2 war (Tab. 1).

Bestimmung des Uterusgewichts Die Bestimmung des Uterusgewichts *in vivo* ist ein weiterer Test zur Untersuchung estrogen-aktiver Substanzen. In der Wachstumsphase steht der Uterus unter der Kontrolle von Estrogenen. In dieser Zeit bewirken Estrogene ein schnelles Wachstum des Uterus, das innerhalb weniger Tage gemessen werden kann. Bei ovariectomierten Ratten ist das Wachstum des Uterus von exogenen Estrogenen abhängig. Mit der Bestimmung des Uterusgewichts bekommt man eine Aussage darüber, ob die untersuchte Substanz ähnliche

Tab. 1: Kompetitive Bindungsaffinität von HO-PCBs an den ER der Ratte (modifiziert nach Connor *et al.*, 1997). RBA, Relative Bindungsaffinität bezogen auf E2.

Kongener	IC50 (M)	RBA
4'-HO-2',2,3,4,5-Pentachlorbiphenyl	$4 \cdot 10^{-5}$	0.0003600
4'-HO-2',2,3,5,6-Pentachlorbiphenyl	$1 \cdot 10^{-5}$	0.0014000
4'-HO-2',2,4,6-Tetrachlorbiphenyl	$3 \cdot 10^{-3}$	0.0000053
E2	$1,4 \cdot 10^{-8}$	1

biologische Effekte auf das Wachstum hat wie E2.

Mehrere PCBs induzierten eine Zunahme des Uterusgewichts in Nagern. Die Zunahme des Uterusgewichts wurde sowohl bei niedrig- als auch hochchlorierten PCBs beobachtet. Darunter waren welche mit einem Chloratom (PCB3, Geyer *et al.*, 2000), mit zwei Chloratomen (PCB15, Geyer *et al.*, 2000) bis hin zu 6 Chloratomen (PCB155, Fielden *et al.*, 1997). Zudem zeigten auch hydroxylierte PCBs einen Einfluss auf das Uterusgewicht. Die ortho-chlorierten PCBs 4-HO-PCB30 und 4-HO-PCB61 bewirkten eine signifikante Induktion des Uterusgewichts (Ramamoorthy *et al.*, 1997).

Induktion der ER-regulierten Genexpression Reporter-gen-Assays benutzen genetisch veränderte Zellen, in die ein Enzym, z.B. β -Galactosidase oder Luziferase, als Reporter-gen zusammen mit einem ERE kloniert wurde. Falls nicht endogen vorhanden, muss auch der ER selbst in die Zellen hineinkloniert werden. Werden diese Zellen mit einer estrogen aktiven Testsubstanz inkubiert, aktiviert diese den ER und das Reporter-gen wird translatiert. Die Messung der estrogenen Aktivität erfolgt durch Zugabe des Enzymsubstrates und Messung der Umsatzungsrate. PCB138, 153 und 180 reduzierten in MCF-7 Zellen sowohl die basale als auch E2-induzierte Reporter-genaktivität (Bonfeld-Jørgensen *et al.*, 2001). 30 HO-PCBs wurden in Hefe- und CHO-Zellen auf ihre estrogen Aktivität untersucht. Dabei war die estrogen Aktivität der in para-Stellung hydroxylierten PCBs am höchsten vor meta- und ortho-hydroxylierten PCBs (Arulmozhiraja *et al.*, 2005). Unterstützt werden diese Ergebnisse von Kramer *et al.* (1997), die in MCF-7 Zellen eine Aktivierung eines Reporter-gens durch HO-PCBs festgestellt haben. Die PCBs mit einem Chloratom in ortho-Stellung hatten die höchste Aktivität. Bei der Untersuchung von mono- und dihydroxy-PCBs in HeLa-Zellen zeigten diese eine Induktion die bis zu 40% der von E2 betrug, und vergleichbar mit der Aktivierung von 2- und 4-HO-E2 war. Bei der Untersuchung von höher-chlorierten hydroxylierten PCBs, die in menschlichem Serum nachgewiesen wurden, wurde eine Reduktion der E2-induzierten Reporter-genaktivität beobachtet (Moore *et al.*, 1997).

Proliferationsassay Proliferations-Assays, wie der E-Screen, werden mit verschiedenen humanen Krebszelllinien durchgeführt. Der E-Screen mit der Brustkrebszelllinie MCF-7 hat aber den größten Bekanntheitsgrad und findet am häufigsten Verwendung. Zusätzlich gibt es noch den Focus-Assay in MCF-7 Zellen, der den Einfluss von Estrogenen auf das Wachstum konfluenter Zellen untersucht. Diese Assays zeigen allerdings nicht direkt eine Interaktion der Testsubstanz mit dem ER auf, sondern messen die Steigerung der Zellproliferation, einem komplexen Endpunkt, der auch durch estrogen-aktive Substanzen angeregt wird (Charles, 2004). Im MCF-7 Focus-Assay wurden 90 verschiedene PCBs und 30 HO-PCBs untersucht. Dabei zeigten 13 PCBs eine estrogene Aktivität, die relativ zu E2 bei maximal 0,0005% lag. Unter den untersuchten HO-PCBs waren 10 estrogen-aktiv, mit einer maximalen relativen Wirkung von 0,01%. Aus diesen Studien ging hervor, dass eine ortho-Chlorierung und eine Para-Hydroxylierung wichtig für die estrogenen Wirkung sind (Gierthy *et al.*, 1997, 1991; Arcaro und Gierthy, 2001). Zusätzlich zur Reduktion der Reportergenaktivität reduzierten PCB138, 153 und 180 das Wachstum im E-Screen in MCF-7 Zellen (Bonfeld-Jørgensen *et al.*, 2001). Zusätzlich zu der ER-antagonistischen Wirkung im Reportergen Testsystem reduzierten höher-chlorierte hydroxylierte PCBs auch das Wachstum von MCF-7 Zellen (Moore *et al.*, 1997).

1.3 Wnt-Proteine

Die Wnt-Proteine umfassen eine große Familie an Proteinen die Prozesse wie die embryonale Entwicklung, die Bildung der Zellpolarität und die Differenzierung von Zellen steuern (Logan und Nusse, 2004). Die Bezeichnung Wnt ist eine Kombination aus *int-1* und *wingless*. Das *int-1*-Gen fördert bei Mäusen die Entwicklung von Brustkrebs, wenn es durch Integration eines Virus aktiviert wird. *Int-1* war das erste Mitglied der Wnt-Familie, das entdeckt wurde. Es hat große Ähnlichkeit mit dem *wingless*-Gen in *Drosophila*, das an der Entwicklung der Flügel beteiligt ist (Bui *et al.*, 1997). Inzwischen sind beim Menschen und bei der Maus 19 Wnt-Gene bekannt. Bei dem Versuch, die Wnt-Signalwirkung zu charakterisieren und einzuteilen, wurden mehrere Signalwege entdeckt, durch die Wnt-Proteine ihre Wirkung entfalten können. Die Wnt-Signalwege werden in kanonische und nichtkanonische eingeteilt. Am besten untersucht ist der kanonische Signalweg, der die Regulation von β -Catenin einschließt.

1.3.1 Struktur von Wnt-Proteinen

Die Mehrheit der Wnt-Proteine besitzt eine Aminosäuresequenz die zu 35% identisch ist. Wnt-Proteine gleicher Untergruppen sind durch die gleiche Zahl gekennzeichnet. Die Mitglieder einer

Untergruppe sind in der Sequenz zunehmend identisch (von 58 bis 83%, Miller, 2002). Die menschlichen Wnt-Proteine sind in der Größe alle sehr ähnlich. Ihr Molekulargewicht reicht von 39 kDa (Wnt-7a) bis 46 kDa (Wnt-10a, Miller, 2002). Über die Struktur der Wnt-Proteine ist bisher wenig bekannt. Sie sind schlecht wasserlöslich und daher zur Strukturbestimmung im wässrigen Milieu schlecht zugänglich. Die Wnt-Proteine besitzen alle 23 oder 24 Cysteinreste, deren Abstand ähnlich ist. Dies legt nahe, dass die Faltung von Wnt-Proteinen von der Bildung von mehreren intramolekularen Disulfid-Brücken abhängt (Miller, 2002).

1.3.2 Transport und Modifikation von Wnt-Proteinen

Nach ihrer Synthese werden die Wnt-Proteine auf verschiedene Art modifiziert. Wnts besitzen mehrere Stellen an denen sie glykosyliert werden können. Der Effekt der Glykosylierung ist noch nicht vollständig verstanden. Einige Untersuchungen deuten auf eine Regulation der Exozytose durch die Glykosylierung hin. Dabei führt eine Glykosylierung zur Exozytose auf der apikalen Seite der Zelle (Abb. 7, Rodriguez-Boulan *et al.*, 2005). Zusätzlich gibt es Lipidmodifikation von Wnts, denen 2 wichtige Funktionen zugeschrieben werden. Eine Addition von Palmitoylsäure an Ser209 ist Voraussetzung für den intrazellulären Transport und die Sekretion. Im Gegensatz dazu ist die Modifikation an Cys77 ausschlaggebend für die Signalwirkung des ausgeschleusten Proteins (Willert *et al.*, 2003). Verantwortlich für die Lipidmodifikation ist wahrscheinlich die Acyltransferase Porcupine, ein Transmembranprotein im Endoplasmatischen Retikulum. Der Mechanismus der Ausschleusung von Wnts ist noch nicht vollständig verstanden (Hausmann *et al.*, 2007).

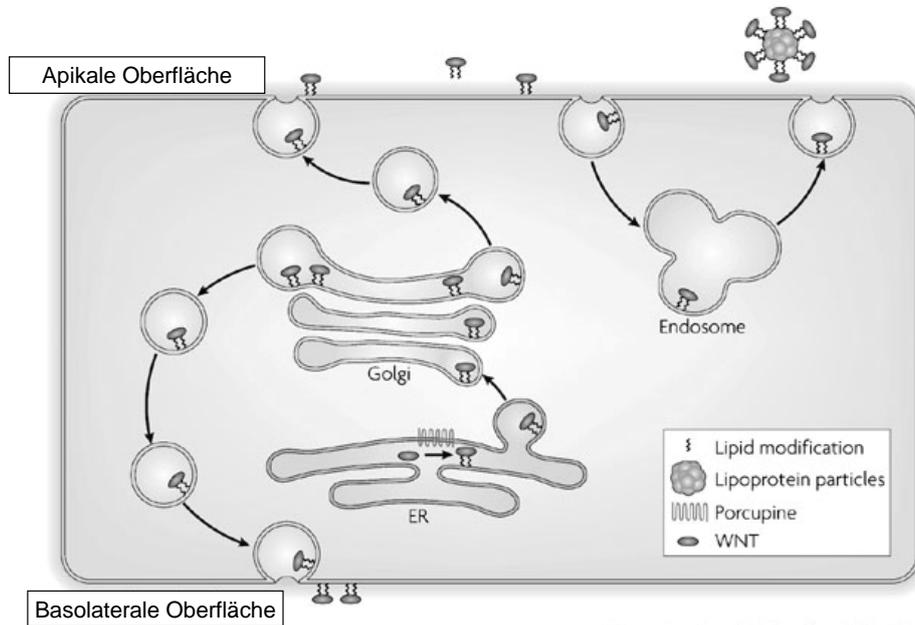


Abb. 7: Transport und Modifikation von Wnt-Proteinen (modifiziert nach Hausmann *et al.*, 2007).

1.3.3 Wnt-Signalwege

Der als erstes entdeckte Wnt-Signalweg ist der kanonische, β -Catenin-abhängige Wnt-Signalweg, der zwischen verschiedenen Spezies stark konserviert vorliegt. In Abwesenheit von Wnts phosphorylieren die Casein-Kinase-1a (CK1a) und die Glykogensynthase-Kinase-3 β (GSK-3 β) β -Catenin im Axinkomplex. Phosphoryliertes β -Catenin wird mit Ubiquitin markiert und folglich durch das Proteasom abgebaut. Dadurch ist der Gehalt an β -Catenin im Zytosol gering. Sobald ein Wnt einen Rezeptor an der Zelloberfläche bindet (Frizzled-Rezeptor(Fz) und "Low-Density-Lipoproteinrezeptor-related protein 5/6 "(LRP5/6)), wird die Degradierung von β -Catenin verhindert. β -Catenin kann nun im Zytosol akkumulieren und transloziert dann in den Zellkern. Dort bindet es an den T-Cell-Factor/Lymphoid Enhancer Factor (TCF/LEF) Transkriptionsfaktor und bewirkt eine Änderung der Genexpression bestimmter Gene.

Einige Wnts aktivieren einen β -Catenin-unabhängigen Signalweg, der während der Embryogenese beobachtet wurde und dort Zellbewegungen steuerte (Kohn und Moon, 2005). Die Aktivierung dieses Weges kommt durch mindestens 3 Mechanismen zustande, die mit anderen Signalwegen überlappen.

Bestimmte Wnt- und Fz-Proteine können eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels

durch trimere GTP-Bindeproteine bewirken und dabei die Calcium/Calmodulin-abhängige Proteinkinase II und die Proteinkinase C (PKC) aktivieren (Veeman *et al.*, 2003). Dieser Signalweg hat offensichtlich einen Einfluss auf die Zellproliferation und die Zellmigration.

Einige Fz aktivieren über heterotrimere G-Proteine die Phospholipase C und Phosphodiesterasen (Slusarski *et al.*, 1997).

Der planare Zellpolarität-Signalweg (PCP) in *Drosophila* wird durch Fz vermittelt. Fz aktiviert dabei kleine G-Proteine wie Rac und Rho, c-Jun N-terminale Kinase (JNK) und Rho-assoziierte Kinase (RHO-Kinase) (Adler, 2002). Der PCP-Signalweg steuert die Polarität von Zellen, die Zellmigration und das Zytoskelett.

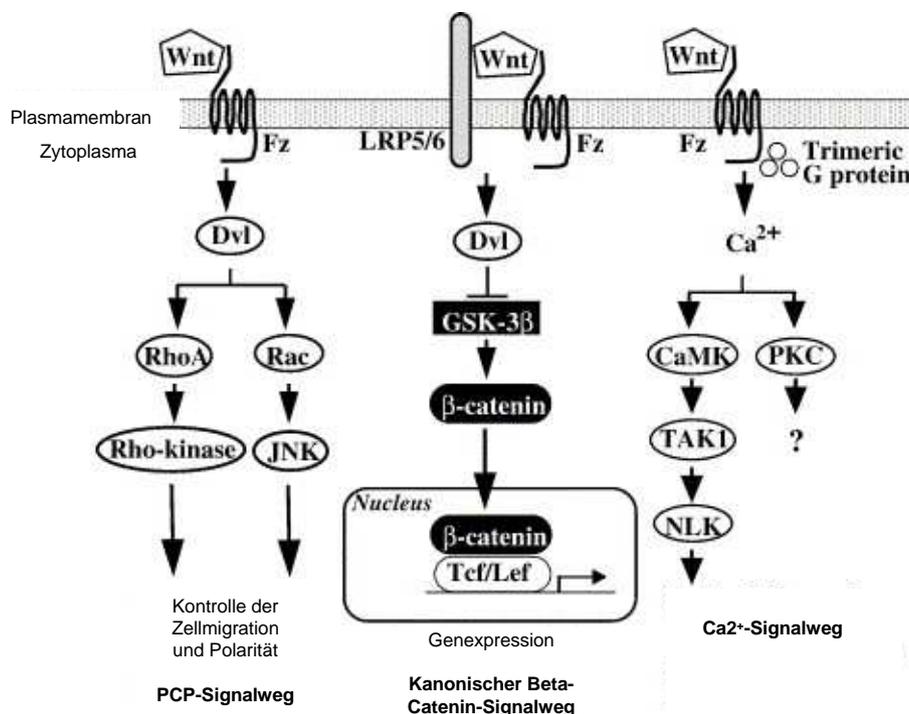


Abb. 8: Schematischer Überblick über die grobe Einteilung der Wnt-Signalwege (modifiziert nach Kikuchi *et al.*, 2007).

1.3.4 Expression von Wnt-Genen im weiblichen Reproduktionstrakt

Eine Eigenschaft der embryonalen Entwicklung ist ein schnelles Zellwachstum, vergleichbar mit dem Wachstum in malignen Tumoren, in Kombination mit exakter Differenzierung der Zellen und Formung von Geweben. In dieser Wachstumsphase sind außer Regulatoren des Zellwachstums andere Gene hochexprimiert, die eine korrekte Entwicklung des Embryos steuern.

Zu diesen Genen gehören Homeobox-Gene, die für Transkriptionsfaktoren kodieren, und Wnt-Proteine, die eine Art sekretierter Wachstumsfaktor sind (Mericskay *et al.*, 2004). Mitglieder der Wnt-Genfamilie werden im sich entwickelnden weiblichen Reproduktionstrakt exprimiert, und im Unterschied zu anderen Geweben und Organen wird ihre Expression auch im Erwachsenen beibehalten. Beispielsweise wurde in Biopsiematerial aus menschlichem Endometrium die mRNA von Wnt2, 3, 4, 5a, 7a nachgewiesen (Tulac *et al.*, 2003). In einer weiteren Studie wurde die mRNA von Wnt5a und Wnt7a in Biopsiematerial von 24 Patientinnen zwischen 20 und 45 Jahren nachgewiesen (Punyadeera *et al.*, 2005). Bui *et al.* (1997) wiesen in humanen Endometriumzellen die mRNA von Wnt2, 3, 4, 5a, 7a und 7b nach.

Die mRNA von Wnt5a und Wnt7a wurde auch im weiblichen Reproduktionstrakt erwachsener Mäuse nachgewiesen (Miller *et al.*, 1998b). In den Mäusen wurde ein bestimmtes Verteilungsmuster der Transkripte von Wnt5a und Wnt7a innerhalb der verschiedenen Zellschichten beobachtet. Während Wnt5a hauptsächlich im Mesenchym vorliegt ist die Expression von Wnt7a auf das luminale Epithel beschränkt. Das gleiche Verteilungsmuster von Wnt5a und Wnt7a wurde auch in Schafen beobachtet. Zusätzlich wurde in verschiedenen Tumorzelllinien, unter anderem auch in Ishikawazellen, als auch in humanem Tumorgewebe des Endometriums die mRNA von Wnt5a und Wnt7a nachgewiesen.

Einfluss von Diethylstilbestrol (DES) auf die Expression von Wnt-Genen In den letzten Jahren kam den Wnt-Proteinen eine immer größere Aufmerksamkeit im Bezug auf die Kanzerogenese zuteil, da in Tumoren oft Defekte in Signalwegen erkannt wurden, die zu den Wnt Signalwegen gehören oder sich zumindest teilweise mit diesen überschneiden. Umgekehrt wurde mit der Erschaffung verschiedener Wnt Knockout Mäuse und der Auswirkung auf den damit verbundenen Phänotyp noch einmal die Wichtigkeit der Wnt-Proteine deutlich. Um die Rolle der Wnt-Proteine im Uterus genauer zu untersuchen wurde eine Wnt7a-Knockout Maus gezüchtet. Ein besonders ins Auge fallender Aspekt des Phänotyps des weiblichen Wnt7a-Knockout (Wnt7a^{-/-}) Reproduktionstraktes von Mäusen ist die Ähnlichkeit mit der Situation bei Frauen (und Mäusen), die während der fetalen Entwicklung mit dem synthetischen Estrogen DES exponiert waren (Newbold *et al.*, 2002). Besonders von einer Reduktion der Anzahl an Drüsen, einem hyperplastischem Myometrium und morphologisch verändertem Uterusepithel wurde nach einer Exposition mit DES und beim Wnt^{-/-} Phänotyp der Maus berichtet. DES wurde an 2-4 Millionen schwangere Frauen verabreicht, bis bekannt wurde, dass die weiblichen Nachkommen ein erhöhtes Risiko hatten an Klarzell-Adenokarzinomen der Vagina und des Cervix zu erkranken. Zusätzlich wurden weitere Probleme wie Missbildungen der Eileiter, Hyperplasien der glatten Muskelzellen und Empfängnischwierigkeiten beobachtet (Newbold und McLachlan, 1982). Bereits früh wurde postuliert, dass eine Exposition mit DES in utero

die mesenchymalen-epithelialen Wechselwirkungen des sich entwickelnden Müllerschen Gangs stört (Iguchi und Takasugi, 1987). Der Müllersche Gang stellt die indifferente Anlage der Geschlechtsorgane dar, die sich in der Embryonalentwicklung beim weiblichen Geschlecht zu Eileitern, Uterus und oberer Vagina differenziert. In Untersuchungen von Miller *et al.* (1998b) wurde deutlich, dass DES durch eine transiente Verminderung der Expression von Wnt7a direkt in die Wnt-Regulierung im weiblichen Reproduktionstrakt von Mäusen eingreift und dadurch den Aufbau des kompletten weiblichen Reproduktionstraktes permanent stören kann. Es scheint, dass Wnt7a in eine Vielzahl von Regulationsmechanismen eingreift, die das postnatale Uteruswachstum und die Hormonantwort steuern, und dass eine Störung dieser Wege unter anderem zu einer Veränderung der Apoptoserate im Uterus führt (Kitajewski und Sassoon, 2000; Carta und Sassoon, 2004; Huang *et al.*, 2005).

Wnt7a ist allerdings nicht das einzige Gen dessen Expression durch DES moduliert wird: Huang *et al.* (2005) haben durch DES eine veränderte Expression von 183 Genen im Mäuseuterus beobachtet. Unter diesen Genen waren mit Hoxa-10 und Hoxa-11 zwei, die nach Knockout den DES-Phänotyp partiell kopieren. Da beide Gene vermutlich Downstream-Effektoren von Wnt7a sind (Kitajewski und Sassoon, 2000) ist ihre Mindereexpression nach DES-Gabe vermutlich ein sekundärer Effekt. Neben Wnt7a spielt das hauptsächlich im Stroma exprimierte Wnt5a eine wichtige Rolle bei der Bildung von Drüsen im Uterus und scheint für die zellulären und molekularen Reaktionen auf exogene Estrogene verantwortlich zu sein. Ein komplexes Zusammenspiel von Wnt5a, Wnt7a, Hoxa-10 and Hoxa-11 scheint daher den Aufbau und die Funktion des weiblichen Reproduktionstrakts zu koordinieren (Mericskay *et al.*, 2004). Wichtige Erkenntnisse zum Einfluss von DES auf die Expression von Wnt5a und Wnt7a liefern die lokalen Expressionsmuster im Epithel und Stroma neonatal mit DES behandelter Mäuse: die Expression von Wnt7a im Epithel wird durch DES stark reduziert, so dass auch der mRNA-Gehalt von Wnt7a im Uterus-Homogenat stark reduziert ist. Im Gegensatz dazu ist die Expression von Wnt5a im Stroma reduziert, dafür aber ungewöhnlicher Weise im Epithel zu beobachten, so dass im Uterus-Homogenat keine Veränderung der Wnt5a mRNA-Gehalte, zu beobachten ist (Mericskay *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005). Interessanter Weise verändern sich durch neonatale DES Applikation auch in Wnt5a-Knockout-Mäusen, die ein nicht-funktionelles Wnt5a-Protein exprimieren, die RNA-Spiegel von Wnt5a auf die gleiche Weise. Die Mindereexpression von Wnt5a im Stroma bewirkt demnach direkt oder indirekt die Mindereexpression von Wnt7a im Epithel.

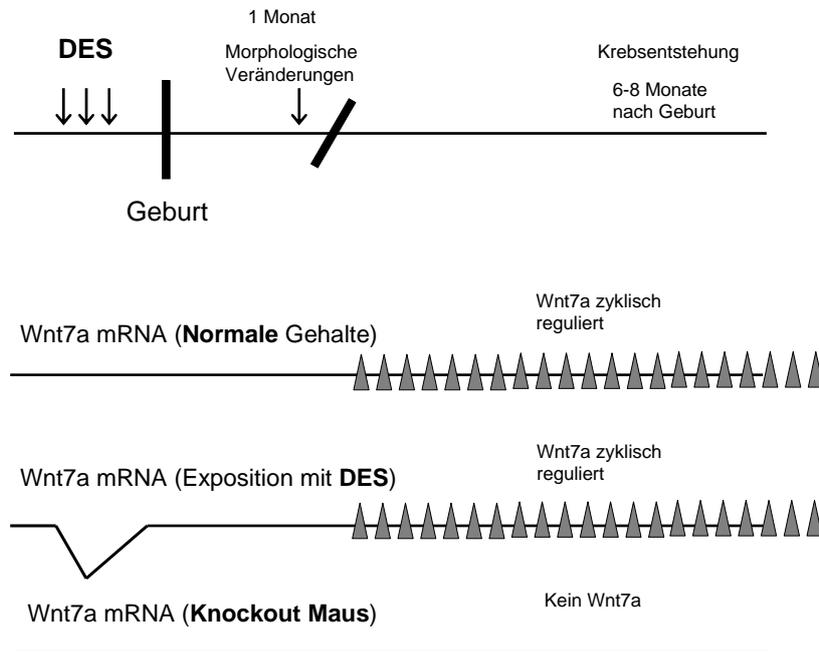


Abb. 9: Auswirkung der Exposition von Mäusen mit DES *in utero*. DES bewirkt eine kurzzeitige Minderexpression von Wnt7a, die zu später auftretenden morphologischen Veränderungen führt. Die gleichen morphologischen Veränderungen sind bei der Wnt7a Knockout Maus zu beobachten (modifiziert nach Mericskay *et al.*, 2005).

1.4 17β -Estradiol (E2)

1.4.1 Metabolismus von E2

E2 wird im Körper zu hormonell inaktiven beziehungsweise weniger aktiven, wasserlöslichen Metaboliten umgewandelt und über den Urin und Fäces ausgeschieden. Bestandteil des Metabolismus sind oxidative Umwandlungen, hauptsächlich Hydroxylierungen durch CYPs. Beteiligte Konjugationsreaktionen sind Glucuronidierung, Sulfonierung und O-Methylierung. Für die Detoxifizierung von beim Metabolismus entstehenden reaktiven Metaboliten sind die NADPH-Chinon-Oxidoreduktase (QR) und Glutathion-S-Transferasen (GST) von großer Bedeutung. Ein Großteil des E2-Metabolismus findet in der Leber statt. Dennoch werden bestimmte Estrogen-metabolisierende Enzyme spezifisch in extrahepatischen Geweben exprimiert.

Phase I Metabolismus Eine wichtige Rolle beim oxidativen Metabolismus von E2 in der Leber spielen die CYP-Isoformen 1A2 und 3A4, die zusammen knapp 45% der Proteinmenge aller CYPs in der Leber ausmachen (Zhu und Lee, 2005). Sie hydroxylieren E2 unter anderem zu den Catecholestrogenen (CE) 2-Hydroxyestradiol (2-HO-E2) (Spink *et al.*, 1992) und 4-Hydroxyestradiol (4-HO-E2) (Spink *et al.*, 1994; Hayes *et al.*, 1996), wobei 2-HO-E2 mehr als 80% der Metaboliten ausmacht (Tsuchiya *et al.*, 2005).

Im Brustgewebe wird E2 hauptsächlich durch die CYP-Isoenzyme 1A1 und 1B1 zu 2-HO-E2 und 4-HO-E2 metabolisiert. Im Brustgewebe liegen aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung an CYP-Isoenzymen die CE 4-HO-E2 und 2-HO-E2 etwa im Verhältnis 1:1 vor (Liehr und Ricci, 1996) (Tab. 2).

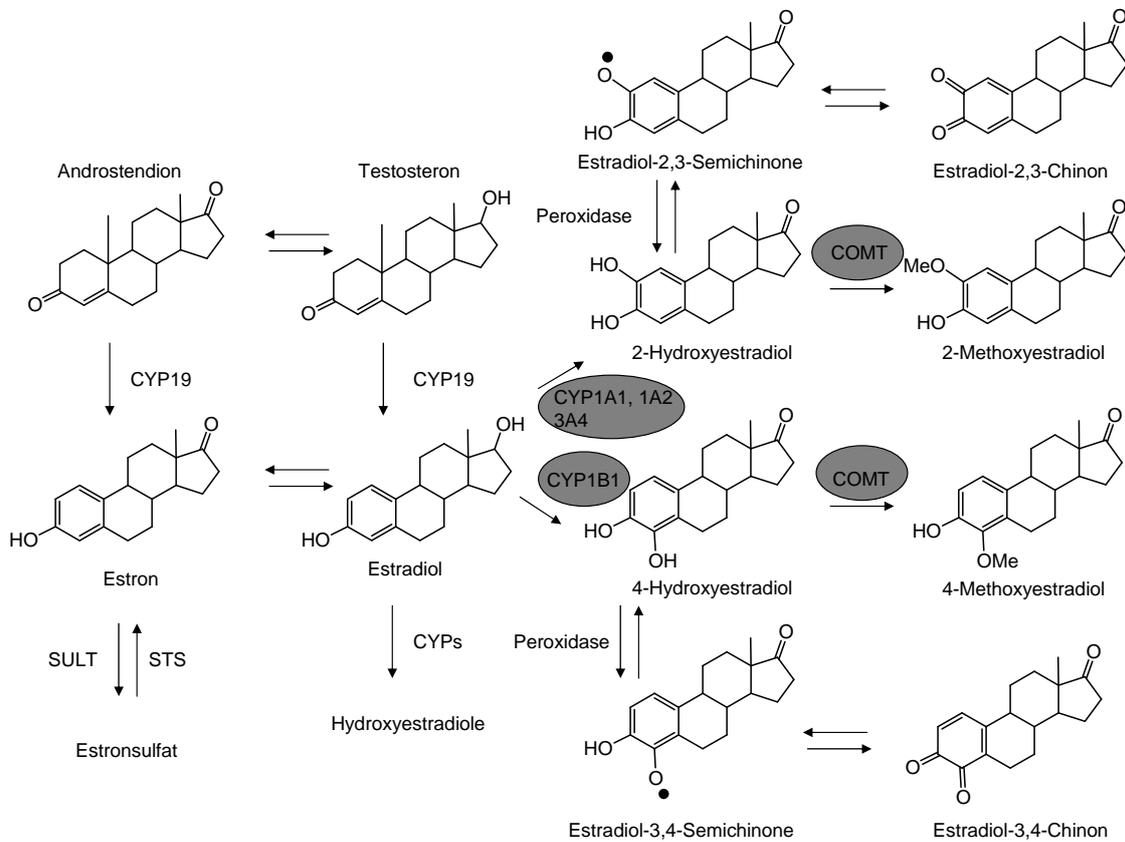


Abb. 10: Schematische Darstellung wichtiger Schritte des Metabolismus von E2 im Organismus. CYP: Cytochrom-P450-Enzyme; SULT: Sulfotransferase; STS: Steroidsulfatase; COMT: Catechol-O-methyltransferase.

Phase II Metabolismus Die Konjugation von E2, CE und anderen oxidativen E2-Metaboliten stellt einen weiteren wichtigen Weg des Estrogenmetabolismus dar.

Sulfonierung E2 und seine Metaboliten können sulfoniert werden. Die Sulfonierung bewirkt eine Inaktivierung der ER-abhängigen estrogenen Wirkung (Zhu und Conney, 1998). Obwohl durch die Sulfonierung die Metabolite von E2 inaktiv und polarer wurden, und sie deshalb besser ausgeschieden werden sollten, ist nicht ganz klar, ob den Metaboliten doch eine physiologische Wirkung zukommt. Die Halbwertszeit der sulfatierten Metaboliten ist höher als die der Estrogene selber (Zhu und Conney, 1998; Coughtrie *et al.*, 1998). Möglicherweise sind die Estrogensulfate nur eine Transportform, und werden in hormonellen Zielgeweben wieder in ihre aktive Form überführt (Coughtrie *et al.*, 1998). Dies könnte durch die Umwandlung der sulfatierten Estrogenen mit einer Steroidsulfatase (STS) geschehen.

Die Sulfonierung wird von einer Reihe an zytosolischen Enzymen, den Sulfotransferasen (SULT) katalysiert. Die SULTs sind als Homodimere aktiv und katalysieren bei Estron und E2 jeweils die Sulfonierung der phenolischen OH-Gruppe an Position 3 des Steroidalen A-Rings. SULTs wurden in vielen menschlichen Geweben wie Leber, Niere, Darm, Uterus und Brust nachgewiesen (Hernández *et al.*, 1992; Her *et al.*, 1996; Adams und Phillips, 1990). Es gibt 10 menschliche SULTs innerhalb zwei Familien. Wichtig für den Metabolismus von E2 sind dabei SULT1A1, 1E1 und 2A1. SULT1E1 kommt dabei eine besondere Bedeutung bei der Sulfonierung von E2 zu, da es eine 100-fach höhere Affinität zu E2 besitzt als andere SULTs (Hernández *et al.*, 1992) (Tab. 3).

Glucuronidierung Zusätzlich zur Sulfonierung werden E2 und seine Metaboliten auch glucuronidiert. Die Glucuronidierung dient hauptsächlich zur Inaktivierung und Exkretion der Metabolite. Von den Glucuronosyltransferasen gibt es 12 Enzyme, die wiederum in 2 Familien eingeteilt werden (Meech und Mackenzie, 1997). Bisher wurden in der mRNA aus menschlichem Brustdrüsengewebe nur die Expression von UGT1A3, 1A4, 1A8 und 2B7 nachgewiesen (Chouinard *et al.*, 2006). Zusätzlich wurde mittels Immunfärbung Protein von UGT1A8/9 im Brustepithel nachgewiesen (Thibaudeau *et al.*, 2006). Die Expression von UGT1A1 wurde in mehreren Tumorzelllinien aus Brustgewebe beobachtet (Guillemette *et al.*, 2000), wurde jedoch in der RNA aus normalem Brustdrüsengewebe nicht nachgewiesen (Chouinard *et al.*, 2006) (Tab. 4).

O-Methylierung Die gebildeten CE werden überwiegend durch die Catechol-O-Methyltransferase- (COMT) katalysierte O-Methylierung entgiftet. Dabei wird in Gegenwart von Magnesiumionen eine Methylgruppe von dem Coenzym S-Adenosyl-L-Methionin auf eine der beiden Hydroxylgruppen der CEs übertragen (Guldberg und Marsden, 1975). Es sind zwei Isoformen der COMT mit gleicher Wirkung bekannt: eine lösliche (S-COMT) und eine

membrangebundene (MB-COMT) (Salminen *et al.*, 1990; Lundström *et al.*, 1991). In den meisten menschlichen Geweben liegt die COMT zum Großteil in löslicher Form vor, während der Anteil an MB-COMT im Gehirn bis zu 70% der gesamten COMT betragen kann (Zhu, 2002). 2-HO-E2 und 4-HO-E2 sind einzeln betrachtet beide gleich gute Substrate der COMT. Liegen die CE jedoch gleichzeitig vor, so wird die O-Methylierung von 4-HO-E2 durch 2-HO-E2 stark inhibiert. Die Inhibierung der O-Methylierung von 4-HO-E2 durch 2-HO-E2 könnte ausschlaggebend für die längere Halbwertszeit von 4-HO-E2 im Körper sein (Roy *et al.*, 1990). Kommt es aufgrund zu hoher Catechol-Konzentrationen oder durch Anwesenheit xenobiotischer COMT-Inhibitoren zu einer reduzierten Kapazität der O-Methylierung, kann dies eine signifikante Verlängerung der Lebensdauer der CE zur Folge haben (Weisz *et al.*, 2000). Die CE können nun durch Peroxidasen oder CYPs zu Semichinonen und weiter zu Chinonen oxidiert werden, welche katalysiert durch eine Steroid-spezifische Glutathion-S-Transferase mit Glutathion (GSH) konjugiert werden können. Ist auch dieser inaktivierende Weg unzureichend oder ineffektiv, können die Chinone mit der DNA zu Addukten reagieren.

Tab. 2: Metabolisierung von E2 durch CYPs. Aktivitäten von CYPs bezüglich der 2-, 4-, und 16 α -Hydroxylierung von E2 (nmol/ min /nmol P450, Badawi *et al.*, 2001).

CYP-Isoenzym	2-Hydroxylierung	4-Hydroxylierung	16 α -Hydroxylierung
1A1	7,5	0,2	0,6
1A2	9,2	1,0	0,6
1B1	1,0	4,3	0,2
3A4	1,0	0,2	0,5

Tab. 3: Metabolisierung von 2-HO- und 4-HO-E2 durch SULTs. Aktivitäten von rekombinanten SULTs bezüglich der Sulfonierung von 2-HO- und 4-HO-E2 (nmol/mg/ min, Taskinen *et al.*, 2003).

SULT-Isoenzym	2-Sulfonierung	4-Sulfonierung
1A1	7,5	3
1A2	2,8	1,5
1A3	13,5	1,0
1B1	6,1	0,1
1E1	1,8	3,7

Tab. 4: Metabolisierung von 2-HO- und 4-HO-E2 durch UGTs. Aktivitäten von rekombinanten UGTs bezüglich der Glucuronidierung von 2-HO- und 4-HO-E2 (nmol/ min /mg, Taskinen *et al.*, 2003).

UGT-Isoenzym	2-Glucuronidierung	4-Glucuronidierung
1A1	<0,01	<0,01
1A6	<0,01	<0,01
1A9	0,02	0,11
2B7	<0,01	<0,01
2B15	<0,01	<0,01

1.4.2 Die Rolle von E2 bei der Kanzerogenese in der Brust

Epidemiologische Studien belegen einen Zusammenhang zwischen einer längeren Exposition mit Hormonen und einem erhöhten Risiko an Brustkrebs oder Endometriumkrebs zu erkranken (Colditz, 1998; Feigelson und Henderson, 1996; Liehr *et al.*, 1990; Yager und Davidson, 2006). Je länger eine Frau Estrogenen ausgesetzt ist, sei es durch eine frühe Menarche oder eine späte Menopause, erhöht sich das Risiko an einem hormon-abhängigen Krebs zu erkranken.

Der Mechanismus der Estrogen-induzierten Kanzerogenese ist noch nicht vollkommen verstanden. Ein oft diskutierte Ursache der Kanzerogenese von E2 ist die Stimulation der Zellproliferation über einen ER-abhängigen Signalweg, was letztendlich durch erhöhte Replikation zu einem erhöhten Risiko an Mutationen führen kann. Desweiteren werden nicht-genomische Wege diskutiert, über die Estrogene Signalwege beeinflussen können. Eine weitere Hypothese ist die Bildung von elektrophilen und redox-aktiven Metaboliten von E2. E2 wird zu Catecholen und Chinonen metabolisiert. E2 und seine Catechol-Metaboliten zeigten in der Niere, Leber, Uterus und Brust von Nagern ein kanzerogenes Potential (Yue *et al.*, 2003; Nandi *et al.*, 1995; Harvell *et al.*, 2000; Shull *et al.*, 1997; Turan *et al.*, 2004). Dabei zeigte nur 4-HO-E2, der Hauptmetabolit von E2 in der Brust, eine kanzerogene Wirkung im Kanzerogenese-Modell in der Niere des Syrischen Goldhamsters. 2-HO-E2 wirkte in der Niere des Syrischen Goldhamsters nicht als Kanzerogen (Liehr *et al.*, 1986; Li und Li, 1987). In CD-1 Mäusen bewirkte 4-HO-E2 eine höhere Inzidenz an Tumoren im Uterus als 2-HO-E2. Im Kanzerogenesemodell der ACI-Ratte gibt es Widersprüche zur Kanzerogenität von 4-HO-E2. Einerseits führte 4-HO-E2 zu keiner Tumorbildung in der ACI-Ratte (Turan *et al.*, 2004; el Bayoumy *et al.*, 1996), andererseits wurde nach Gabe von 4-HO-E2 oder E2-3,4-Q eine erhöhte DNA-Adduktbildung in der Brustdrüse beobachtet (Li *et al.*, 2004).

Mechanismus der Schädigung durch E2, CE oder E2-Chinone Ortho-Chinone sind redox-aktive Substanzen, die ein Redox-Cycling mit dem Semichinon-Radikal eingehen können. Dadurch entstehen durch P450/P450-Reduktase Superoxid-Anion-Radikale, die durch weitere Reaktion mit Wasserstoffperoxid zur Bildung von Hydroxyl-Radikalen führen. Hydroxyl-Radikale sind extrem reaktiv und schädigen willkürlich in der Zelle vorliegende Makromoleküle. In Studien mit Hamstern, die mit E2 behandelt wurden, war eine erhöhte Anzahl an DNA-Einzelstrangbrüchen, 8-Oxo-Guanin-Bildung und chromosomale Veränderungen zu beobachten, die diesen Mechanismus unterstützen (Roy und Liehr, 1999; Nutter *et al.*, 1991; Lavigne *et al.*, 2001). 4-HO-E2 führt sowohl *in vitro* als auch *in vivo* zu DNA-Einzelstrangbrüchen (Zhang *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2002).

Zusätzlich zu den oxidativen Schäden führen Estrogene auch zu DNA-Adduktbildung. E2-3,4-Q führt über eine Michael-Addition zu N7-Guanin und N3-Adenin-Addukten (Cavalieri *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2004; Liehr, 2000; Russo und Russo, 2004; Chakravarti *et al.*, 2001). Aufgrund der Instabilität des N3-Adenin-Adduktes führt dieses sehr schnell zur Bildung einer abasischen Stelle in der DNA, während das N7-Guanin-Addukt bis zu mehrere Stunden stabil ist (Cavalieri *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2007; Zahid *et al.*, 2006). Aufgrund der Instabilität des N3-Adenin-Adduktes wird von einer mutagenen Wirkung des Adduktes ausgegangen (Zahid *et al.*, 2006; Saeed *et al.*, 2005). Im Gegensatz zu 4-HO-E2 führt 2-HO-E2 zu einer 1,6-Michael-Addition mit den exozyklischen Aminogruppen von Adenin und Guanin (Stack *et al.*, 1996; Debrauwer *et al.*, 2003). Diese Addukte sind stabil und sind dadurch der DNA-Reparatur zugänglich, was möglicherweise die geringere Mutagenität von 2-HO-E2 bewirkt.

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Von zahlreichen chemischen Stoffen in der Umwelt und in Lebensmitteln wird vermutet, dass sie eine Wirkung auf das Hormonsystem und die Entwicklung von Menschen und Tieren haben. Am besten untersucht sind estrogen-aktive Stoffe, die im lebenden Organismus eine ähnliche Wirkung wie 17β -Estradiol entfalten oder mit 17β -Estradiol interferieren. Zu den estrogenen Stoffen zählen die in Lebensmitteln und Futtermitteln vorkommenden Substanzen Zearalenon und Genistein. Außerdem weisen persistente Umweltkontaminanten wie Polychlorierte Biphenyle und ihre Metaboliten teilweise eine estrogenische Wirkung auf. Das estrogenische Potential dieser Substanzen soll in Ishikawazellen, einem natürlichen Reportersystem für estrogen-aktive Substanzen, verglichen werden.

Die Exposition *in utero* mit dem synthetischen Estrogen Diethylstilbestrol führt zu einem erhöhten Auftreten von Adenokarzinomen der Vagina und Cervix sowie Missbildungen von Vagina, Cervix und Uterus des Menschen. Es wird vermutet, dass Diethylstilbestrol durch Eingriff in die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a zu Missbildungen im weiblichen Reproduktionstrakt führt. Der molekulare Mechanismus der reproduktionstoxischen und kanzerogenen Wirkung von Diethylstilbestrol ist bislang jedoch nicht vollständig aufgeklärt. Da es keine Möglichkeit gibt, die Wirkung von Substanzen im sich entwickelnden menschlichen Reproduktionstrakt zu untersuchen, sollen in dieser Arbeit Ishikawazellen hinsichtlich ihrer Eignung als *in vitro*-Testsystem für Diethylstilbestrol-induzierte Genexpressionsänderungen von Wnt-Genen mittels Reverser-Transkription/kompetitive Polymerasekettenreaktion charakterisiert werden. Zudem soll die Rolle des Estrogenrezeptors bei der Diethylstilbestrol-vermittelten Signalwirkung mit Hilfe von RNA-Interferenz eruiert werden. Desweiteren soll der Einfluss anderer estrogen-aktiver Substanzen auf die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a untersucht werden.

Neben ihrer Hormonwirkung trägt die genotoxische Wirkung von Estrogenen zur Kanzerogenität bei. So wird beispielsweise das endogene Estrogen 17β -Estradiol zu Catecholen hydroxyliert, die weiter zu Chinonen oxidiert werden können. Diese Chinone können DNA-Addukte bilden und so zu Mutationen führen. Wichtige Faktoren die die 17β -Estradiol-induzierte Kanzerogenese beeinflussen, sind daher 17β -Estradiol-metabolisierende Enzyme.

Da wenig über die metabolische Aktivität der zur Untersuchung der Genotoxizität von 17β -Estradiol verwendeten *in vitro*-Testsysteme bekannt ist, sollte die Genexpression 17β -Estradiol-metabolisierender Enzyme in einem weit verbreiteten Testsystem, den MCF-7 Zellen, unter verschiedenen Kulturbedingungen bestimmt werden, und mit der einer Gesamt-mRNA-Probe aus gesundem Brustgewebe verglichen werden.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Charakterisierung der Ishikawazellen als Testsystem für estrogen-aktive Substanzen

Ishikawazellen stammen aus einem endometrialen Adenokarzinom einer 39-jährigen Frau. Ein Teil des Tumors wurde zur Gewinnung einer Primärkultur verwendet. Die Zellen dieser Primärkultur hatten eine Verdopplungszeit zwischen 27 und 36 h, die sich mit der Anzahl an Passagen änderte. Auffallend war auch das gehäufte Auftreten undifferenzierter Zellen ab Passage 45. Die Gehalte an Estrogenrezeptor (ER) und Progesteronrezeptor (PR) variierten mit der Anzahl der Passagen und dem verwendeten Medium. Um reproduzierbare Eigenschaften zu erhalten, wurden verschiedene Klone der Primärkultur von Passage 25 selektiert, vermehrt und in Aliquots gelagert. Es wurden 18 Klone erhalten, von denen 4 differenziert, 8 teilweise differenziert und 6 kaum differenziert waren (Nishida *et al.*, 1985)). Dabei enthielten 15 Klone den ER und 16 Klone den PR. Die Verdopplungszeit der Klone lag zwischen 24 und 44 h. Seit Etablierung der Klone wurden Ende der 90er Jahre lediglich 2 Klone an andere Institutionen verteilt. Zwischen 1993 und 1996 war es der ER- und PR-positive Klon 3-H-4, der *in vitro* teilweise differenziert war. Nach 1996 wurde der Klon 3-H-12 verteilt, der ebenso ER- und PR-positiv jedoch *in vitro* kaum differenziert war (Nishida, 2002). ER-positive Ishikawazellen reagieren auf estrogen Reize in physiologischen Konzentrationen mit einer Induktion der AIP-Aktivität. Aufgrund dieser Eigenschaft wurden sie seither oft als *in vitro*-Testsystem zur Unterstützung bei der Untersuchung hormonresponsiver Tumoren verwendet (Holinka *et al.*, 1986). Die Induktion der AIP-Aktivität durch estrogenaktive Substanzen wird durch ER-Antagonisten geblockt, was auf eine ER-abhängige Regulation der AIP hindeutet (Holinka *et al.*, 1986; Simard *et al.*, 1997). Holinka *et al.* (1986) führte diese Versuche durch noch bevor die Zellklone etabliert waren. Ishikawazellen sind noch teilweise dedifferenziert, und können in Ko-Kultur mit endometrialen Stromazellen zu sekretorischen Epithelzellen differenzieren (Arnold *et al.*, 2002). Aufgrund der Tatsache, dass mehrere Klone von Ishikawazellen mit unterschiedlichen Eigenschaften im Umlauf sind, und selbst innerhalb eines Labor eine ungewollte Selektion eines Subklons möglich ist, sollten Parameter wie Kernrezeptorstatus, Expression und Induktion der AIP in bestimmten Abständen überprüft und mit historischen Kontrolldaten verglichen werden.

3.1.1 Kernrezeptorstatus in Ishikawazellen

Von Ishikawazellen existieren Klone, die keinen ER exprimieren (Nishida, 2002), was diese Klone für den Einsatz zur Untersuchung der ER-abhängigen Regulation der AIP-Aktivität unbrauchbar macht. Um den ER-Status in den verwendeten Ishikawazellen zu verifizieren, wurde die relativen mRNA-Gehalte von ER α und ER β bestimmt. In der Gesamt-cDNA der hier verwendeten Ishikawazellen wurde sowohl die cDNA von ER α (19.80 amol/ μ g Gesamt-RNA) als auch ER β (0.28 amol/ μ g Gesamt-RNA) beobachtet (Abb. 11).

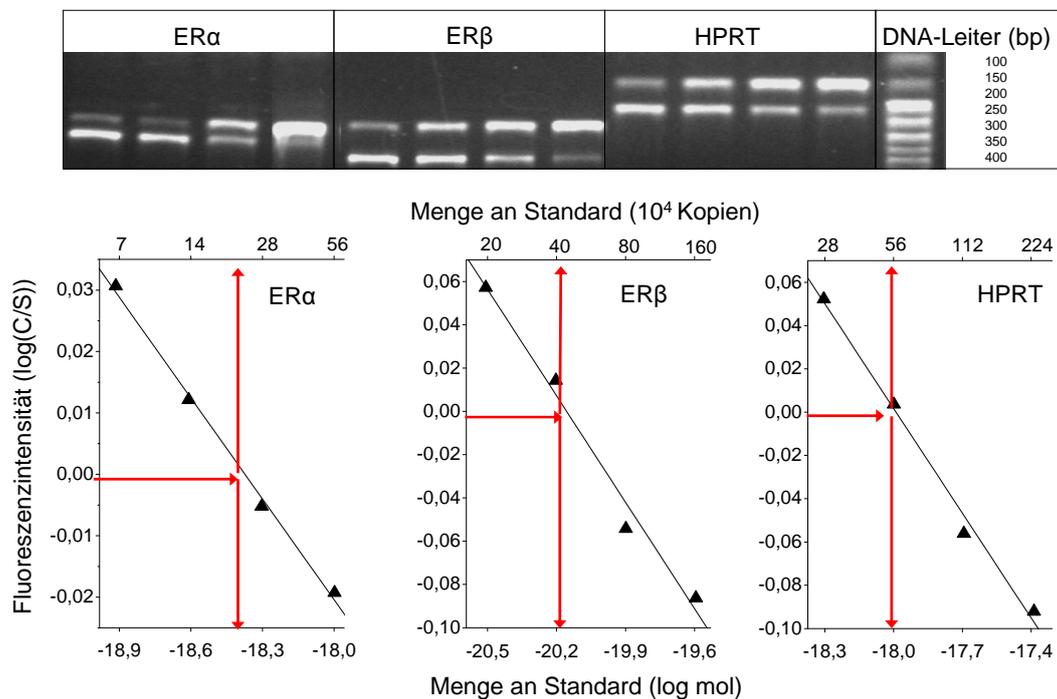


Abb. 11: Bestimmung der cDNA von ER α , ER β und HPRT in Ishikawazellen mittels kompetitiver PCR. Oben: PCR Produkte von Standard (obere Bande) und cDNA (untere Bande) von ER α (345/281), ER β (393/247) und HPRT (214/163) in kultivierten, nicht-konfluenten Ishikawazellen nach Agarosegelelektrophorese (2%) und Färbung mit SybrGreen. Unten: Exemplarische Auswertung der relativen mRNA-Gehalte von ER α , ER β und HPRT mittels linearer Regression.

Die relativen mRNA Gehalte von ER α und ER β lagen bei $2,5 \pm 0,27$ und $0,04 \pm 0,004$ (Abb. 12). Die Expression von ER β liegt damit bei ungefähr 1,5% der Expression des ER α , was mit den Daten von Smuc et al. (2006) korreliert, die ebenfalls eine viel geringere Expression von

ER β in der von Ihnen verwendeten Ishikawa-Zellpopulation gefunden hatten.

Auch im Stroma und Epithel des gesunden menschlichen Uterus wurde sowohl die mRNA (Rey *et al.*, 1998; Matsuzaki *et al.*, 1999) als auch das Protein (Lecce *et al.*, 2001) beider ERs nachgewiesen. Im Uterus von Ratten und Mäusen wird sowohl ER α als auch ER β exprimiert. Dabei ist die Expression von ER α im Endometrium von Mensch, Maus und Ratte meist stärker als die von ER β (Wang *et al.*, 2000; Wada-Hiraike *et al.*, 2006; Lecce *et al.*, 2001; Bhat und Pezzuto, 2001).

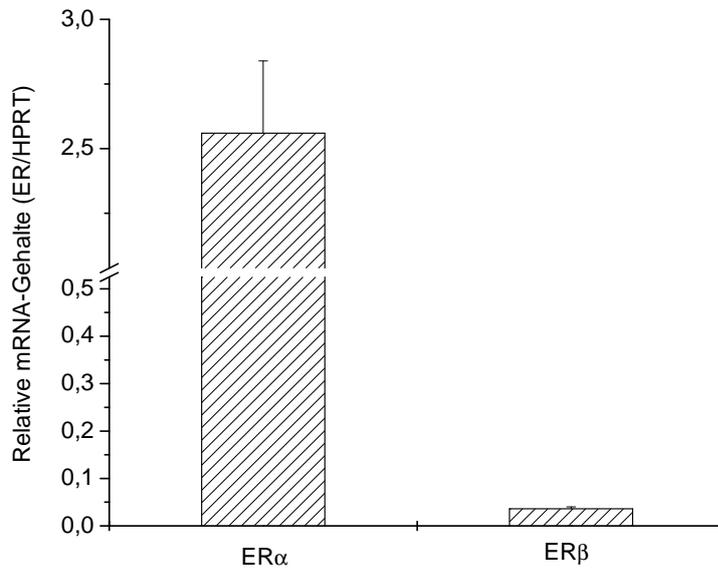


Abb. 12: Relative ER α und ER β mRNA-Gehalte in exponentiell wachsenden kultivierten Ishikawazellen ohne Behandlung. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

3.1.2 Die Alkalische Phosphatase (ALP) in Ishikawazellen

Ishikawazellen besitzen eine basale ALP-Aktivität. Diese basale Aktivität wird durch das hitzelabile Liver-Bone-Kidney(LKB)-ALP-Isoenzym vermittelt (Holinka und Gurspide, 1981) und korreliert direkt mit der Zellzahl. Zur Überprüfung der basalen ALP-Aktivität wurden 20000 Ishikawazellen pro Loch einer 96-Lochplatte ausgestreut und anwachsen gelassen. Nach dem Anwachsen wurden nach 6, 12, 24, 48 und 72 h die Zellen lysiert, und die Bildung von 4-Nitrophenol durch den ALP-katalysierten Umsatz von 4-Nitrophenylphosphat photometrisch bestimmt. Nach 6 h lag die Bildung von 4-Nitrophenol bei 24 ± 2 pmol/ min/ Loch (Abb.

13). Die Bildung von 4-Nitrophenol stieg zeitabhängig an und betrug nach 72 h das 5-fache im Vergleich zur Bildung von 4-Nitrophenol nach 6 h (100 ± 7 pmol/min/Loch). Parallel dazu wurde an den gleichen Zeitpunkten die Zellzahl bestimmt. Die Zellzahl betrug 6 h nach dem Anwachsen 21055 ± 628 Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte. 72 h nach dem Anwachsen war die Zellzahl etwa auf das 5,5-fache angestiegen (118833 ± 2117 Zellen pro Loch). Es besteht eine Korrelation zwischen der Bildung von 4-Nitrophenol und der Zellzahl. Deswegen kann die Bestimmung der basalen Umsetzung von 4-Nitrophenol auch zur Abschätzung der Zytotoxizität von Substanzen eingesetzt werden.

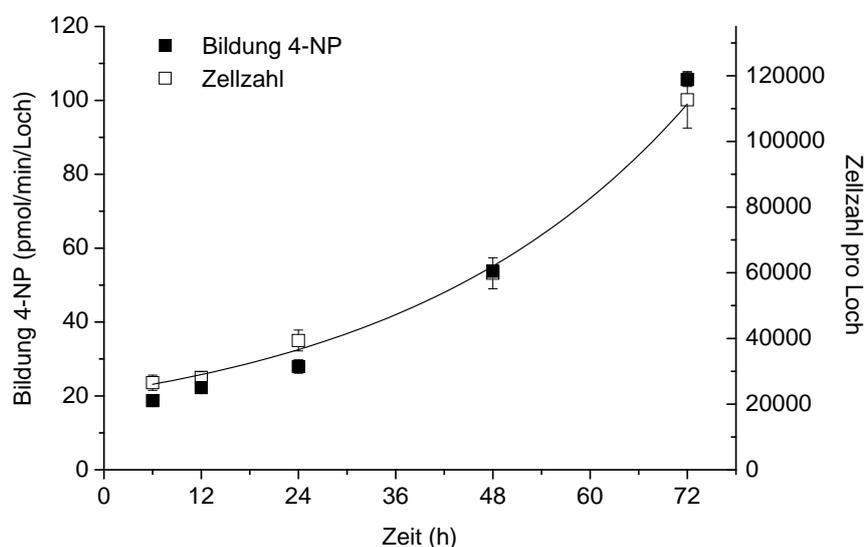


Abb. 13: Die Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP, linke Y-Achse) und Zellzahl (rechte Y-Achse) während der Kultur von Ishikawazellen. Ishikawazellen wurden ausgestreut (10000 Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte) und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurde 6, 12, 24, 48 und 72 h nach dem Anwachsen sowohl die Bildung von 4-Nitrophenol als auch die Zellzahl bestimmt. Die schwarze Linie beschreibt eine exponentielle Anpassung der Bildung 4-NP (MicrocalOrigin®). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 (4-NP) beziehungsweise 3 (Zellzahl) Bestimmungen.

Die ALP-Aktivität in Ishikawazellen wird durch estrogenaktive Substanzen induziert (Holinka *et al.*, 1986; Simard *et al.*, 1997). Die Induktion beruht auf der verstärkten Bildung des placentaren ALP-Isoenzymes (Holinka *et al.*, 1986). Da das Ausmaß dieser Induktion in verschiedenen Zellklonen unterschiedlich sein kann, wurde zuerst die Empfindlichkeit der verwendeten Ishikawazellen untersucht. Dazu wurden Ishikawazellen mit 0,1% DMSO oder 1 pM bis 100 nM

E2 für 72 h behandelt. Nach Lyse der Zellen wurde die Bildung von 4-Nitrophenol durch ALP-katalysierten Umsatz von 4-Nitrophenylphosphat (die Umsetzung des Modellsubstrates erfolgt durch beide ALP-Isoformen) photometrisch gemessen. In der Lösungsmittelkontrolle lag die Bildung von 4-Nitrophenol bei 67 ± 8 pmol/min/Loch. Nach Behandlung mit 10 nM E2 und mehr stieg die Bildung an 4-Nitrophenol maximal auf das 6-fache der Lösungsmittelkontrolle an. Der EC50-Wert lag bei 270 ± 68 pM E2 (Abb. 14).

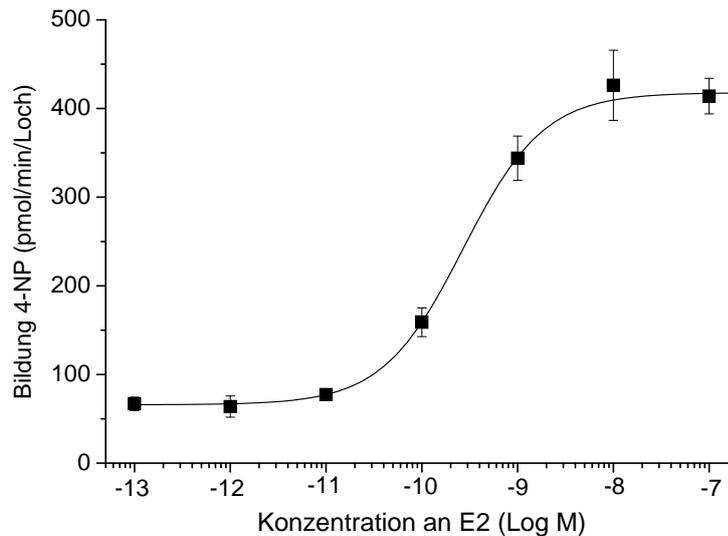


Abb. 14: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) nach Behandlung von Ishikawazellen mit E2 für 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

Die Bestimmung des Umsatzes an 4-Nitrophenol ist ausreichend zur Untersuchung von Substanzen, die einen Einfluss auf die Bildung der ALP aber gleichzeitig keinen Einfluss auf die Zellzahl haben. Da sich jedoch bei vielen Substanzen der Einfluss auf die Bildung der ALP mit einer zytotoxischen oder proliferationssteigernden Wirkung überschneidet, muss dabei die Zellzahl als weiterer Parameter bestimmt werden. Damit lässt sich dann die ALP-Aktivität bestimmen, die die Bildung an 4-Nitrophenol pro Minute und Anzahl Zellen beschreibt.

Bei Inkubationsbeginn waren 33374 ± 1256 Zellen pro Loch vorhanden. Nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO stieg die Zellzahl auf das 3,5-fache an (118833 ± 2117 nach 72 h, Abb. 15). Ebenso bewirkten 100 pM und 10 nM E2 einen 3,5-fachen Anstieg der Zellzahl nach 72 h. Eine Behandlung von Ishikawazellen mit 100 pM und 10 nM E2 für 72 h hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Ishikawazellen im Vergleich zu unbehandelten Zellen.

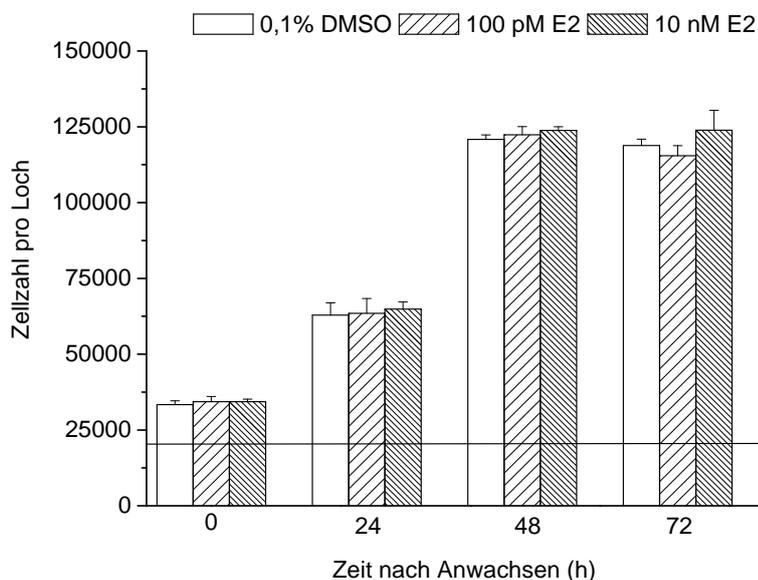


Abb. 15: Wachstumskurve von Ishikawazellen. 20000 Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% DMSO, 100 pM und 10 nM E2 für 72 h behandelt. Direkt nach Anwachsen sowohl als auch 24, 48 und 72 h nach der Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO.

Zur Bestimmung der AIP-Aktivität werden die Werte zum Umsatz von 4-Nitrophenol nach 72 h (Abb. 14) mit den Zellzahlen nach 72 h (Abb. 15) verrechnet (siehe Kapitel 5.10.4). Die AIP-Aktivität nach Behandlung mit 0,1% DMSO für 72 h betrug $0,56 \pm 0,06$ nmol/min/ 10^6 Zellen (Abb. 16). Nach Behandlung mit 10 nM E2 stieg die AIP-Aktivität maximal auf das 6-fache der Lösungsmittelkontrolle an ($3,5 \pm 0,21$ nmol/min/ 10^6 Zellen, Abb. 16). Die Stärke der Induktion der AIP-Aktivität war identisch mit der Induktion der Umsetzung von 4-Nitrophenol (Abb. 14). Ebenso lag der EC50-Wert bei 270 ± 68 pM E2 (Abb. 16).

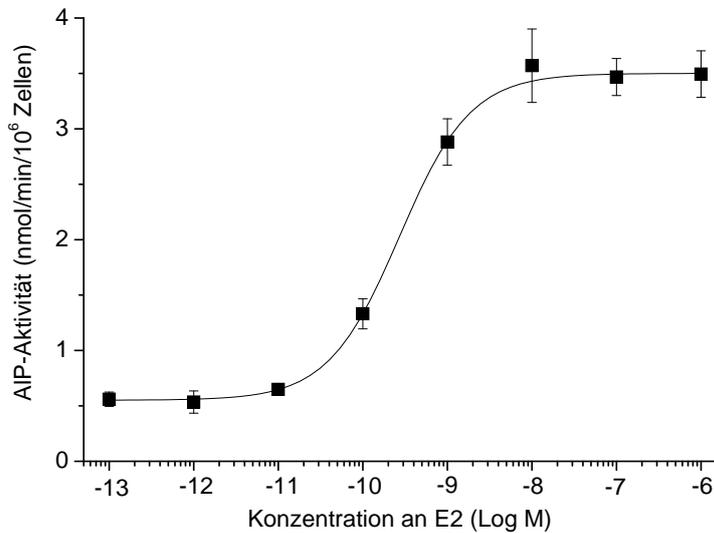


Abb. 16: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit E2 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Bestimmungen.

Der EC50-Wert und die Stärke der Induktion der AIP-Aktivität nach Behandlung mit E2 variierte innerhalb verschiedener Zellchargen. Dabei wurden EC50-Werte von 180 bis 350 pM beobachtet. Neu in Kultur genommene Zellen des gleichen Klones wurden anhand der Werte der basalen AIP-Aktivität, Höhe der Stimulation durch E2 und dem EC50-Wert charakterisiert. Wenn diese Merkmale innerhalb der aus Erfahrungswerten gewonnenen Grenzen liegen, werden die Zellen für weitere Versuche eingesetzt (Lehmann *et al.*, 2005; Wagner und Lehmann, 2006). Andere Arbeitsgruppen berichteten von einer maximalen Stimulation der AIP nach Behandlung mit 1 - 100 nM E2 und einer 11 ± 5 fachen Induktion der basalen AIP Aktivität (Holinka *et al.*, 1986), beziehungsweise einer maximalen Stimulation nach Behandlung mit 1 nM E2 und einer 13 fachen Induktion der basalen AIP Aktivität. Die in dieser Arbeit verwendeten Zellen hatten einen niedrigen EC50 Wert und bewirkten eine hohe Induktion der basalen AIP Aktivität.

3.1.3 Rolle des ER α bei der Induktion der AIP

Obwohl die AIP-Aktivität in Ishikawazellen bereits seit Jahren als Marker für die Stimulation des ER dient (Kapitel 3.1.2), gibt es kaum spezifische Untersuchungen der Rolle von ER α

und ER β bei der Expression der AIP. Zur weiteren Charakterisierung sollte die Bildung von ER α mittels RNA-Interferenz unterdrückt werden, und nachfolgend die Induktion der AIP überprüft werden. Mit Hilfe der RNA-Interferenz ist es möglich, posttranskriptionell den Abbau der ER α -mRNA zu induzieren (siehe Kapitel 5.5). Die Reduktion der ER α -mRNA führt zu einer Depletion an ER α -Protein.

Knockdown des ER- α mittels RNA-Interferenz Ishikawazellen wurden mit siRNA, die komplementär zur mRNA von ER α (siRNA_{ER α}) war, behandelt, um einen posttranskriptionellen Knockdown zu bewirken (siehe Kapitel 5.5). Zur Transfektion wurde ein auf Lipidbasis hergestelltes Transfektionsmittel verwendet (siehe Kapitel 5.5). Da Transfektionsmittel oft einen Einfluss auf die Viabilität der Zellen haben, wurde der Einfluss des Transfektionsmittels auf die Lebendzellzahl der Ishikawazellen untersucht. Die basale Bildung von 4-Nitrophenol diente dabei als Maß für die Zellzahl (Kapitel 3.1.2). Zusätzlich wurde die Zellzahl mit einem elektronischen Zellanalysengerät bestimmt. Die Ishikawazellen wurden mit 0,05-0,5% Transfektionsmittel für 24 h, und anschließend mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 für 48 h behandelt. Die Behandlung mit 0,25% und mehr Transfektionsmittel hatte weder einen Einfluss auf die basale und E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol noch auf die Zellzahl.

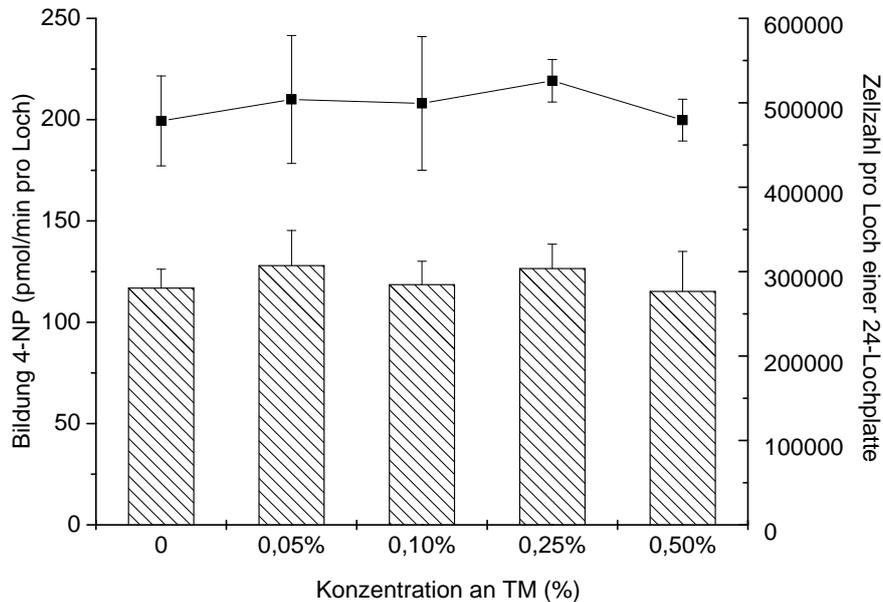


Abb. 17: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (NP, Balken, linke Achse) und Lebendzellzahl (Punkt-Liniendiagramm, rechte Achse) nach 24-stündiger Vorbehandlung von Ishikawazellen mit verschiedenen Konzentrationen an Transfektionsmittel (TM) und anschließender Inkubation mit 0,1% DMSO für 48 h in einer 24-Lochplatte. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

Um einen Knockdown des $ER\alpha$ zu erreichen, wurden Ishikawazellen für 24 h mit 10 nM $siRNA_{ER\alpha}$ und 0,25% Transfektionsmittel behandelt. Anschließend wurde die Gesamt-mRNA isoliert bzw. für weitere 24 h oder 48 h mit DMSO weiter kultiviert. Als Erfolgskontrolle des Knockdown wurden die relativen $ER\alpha$ mRNA-Gehalte unmittelbar nach der Transfektion bestimmt. Unmittelbar nach der Transfektion enthielt die cDNA der Kontrollzellen zwischen 4,6 und 5,4 amol $ER\alpha$ cDNA beziehungsweise zwischen 8,8 und 14,8 amol HPRT cDNA pro 1 μ g Gesamt-RNA. Der mittlere relative mRNA Gehalt von $ER\alpha$ lag direkt nach Transfektion bei $0,39 \pm 0,04$. Unmittelbar nach Behandlung der Ishikawazellen mit 10 nM $siRNA_{ER\alpha}$ für 24 h waren die relativen $ER\alpha$ mRNA-Gehalte auf $16 \pm 4\%$ im Vergleich zur Transfektionskontrolle reduziert (Abb. 18). Mit einer Halbwertszeit des $ER\alpha$ -Proteins von 4-5 h (Wijayarathne and McDonnell 2001) ist nach 24 h (mindestens 4 Halbwertszeiten) demnach das vor der Transfektion vorhandene $ER\alpha$ Protein zu $>95\%$ abgebaut. Um die Dauer des transienten Knockdown zu bestimmen wurden die $ER\alpha$ mRNA-Gehalte zusätzlich nach 24 und 48 h nach der Transfektion bestimmt. Nach 24 und 48 h waren die relativen mRNA-Gehalte immer noch erniedrigt ($25 \pm 2\%$, $39 \pm 10\%$), jedoch war diese Erniedrigung rückläufig. Aufgrund des stark reduzierten $ER\alpha$ mRNA-Gehalts um 95% ist in dieser Zeit mit einer stark verringerten $ER\alpha$ Proteinsynthese

zu rechnen, was auf einen deutlich reduzierten Gehalt an ER α -Protein nach der Transfektion hindeutet. Untersuchungen auf Proteinebene wurden noch nicht durchgeführt, da diese eine größere Anzahl an Zellen und damit eine unökonomische Menge an siRNA und TM benötigen würde.

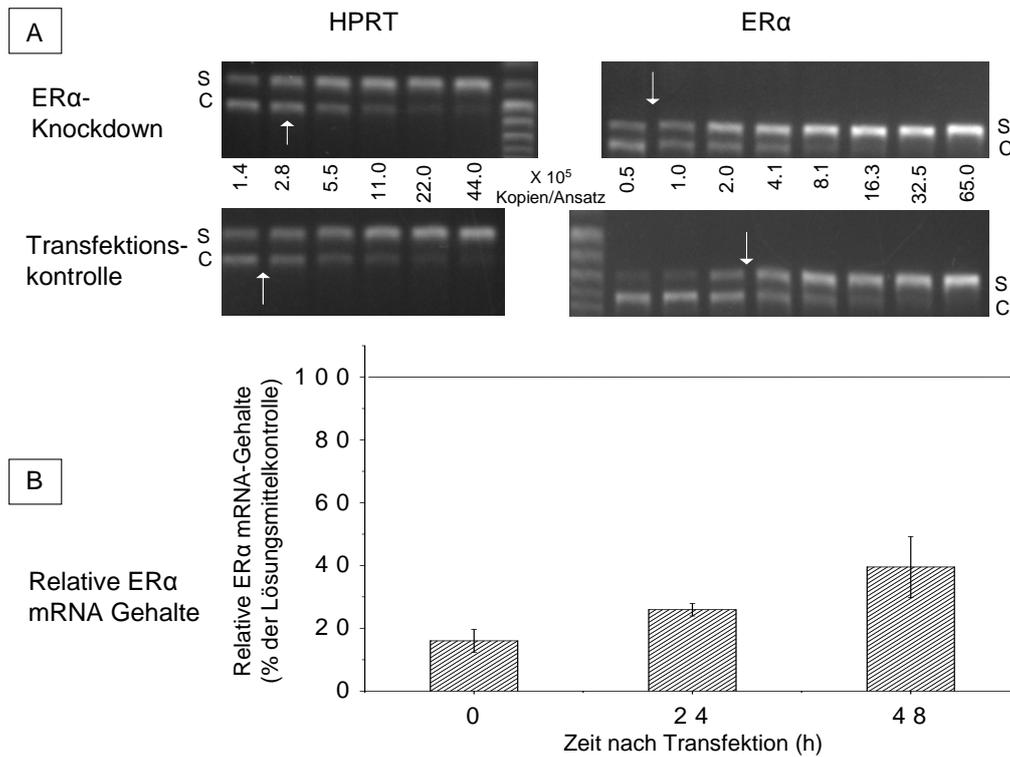


Abb. 18: Verifizierung des Knockdown von ER α auf mRNA-Ebene. A: HPRT-(214/163) und ER α -(345/281) PCR-Produkte von Standard (S) und cDNA (C) mit siRNA_{ER α} behandelter Ishikawazellen (obere Reihe) und der Transfektionskontrolle (untere Reihe) unmittelbar nach Transfektion. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese (3%) getrennt und mit SybrGreen angefärbt. B: Relative ER α mRNA Gehalte nach 24-stündiger Transfektion von Ishikawazellen mit 0,25% Transfektionsmittel (TM) mit und ohne siRNA_{ER α} (10 nM) und weiterer anschließender Inkubation mit Lösungsmittel (0,1% DMSO) für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen. Säulen mit Fehlerbalken unterhalb der schwarzen Linie unterscheiden sich statistisch signifikant von der Transfektionskontrolle ($p \leq 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss des Knockdown von ER α auf die mRNA-Gehalte und AIP-Aktivität Nachdem der Knockdown von ER α mittels RNA-Interferenz auf mRNA Ebene bestätigt wurde,

sollte als nächstes dessen Einfluss auf die E2-induzierte Bildung der AIP untersucht werden. Ishikawazellen wurden mit und ohne vorherigen Knockdown von ER α für 48 h mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 behandelt und anschließend die relativen AIP mRNA-Gehalte bestimmt. Die cDNA der Kontrollzellen enthielt zwischen 8,6 und 13,9 amol AIP mRNA, beziehungsweise zwischen 8,7 und 10,1 amol HPRT pro 1 μ g Gesamt-RNA. Der mittlere relative mRNA Gehalt der AIP lag bei $1,18 \pm 0,29$. Wie erwartet induzierten 10 nM E2 einen Anstieg der relativen AIP mRNA-Gehalte von $1,2 \pm 0,29$ auf $15,4 \pm 0,2$ (15-fach). Nach Knockdown des ER α wurde kein signifikanter Unterschied der AIP mRNA-Gehalte in den mit E2 behandelten Zellen und der DMSO Kontrolle festgestellt (Abb. 19).

Nun sollte untersucht werden, wie die AIP-Aktivität und die AIP mRNA-Gehalte korrelieren. Zur Untersuchung der AIP-Aktivität wurden Ishikawazellen wie oben beschrieben transfiziert und danach mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 für 48 h behandelt. Ebenso wie der Knockdown des ER α den Anstieg der AIP mRNA-Gehalte verhinderte (Abb. 19, oben), wurde auch die Induktion der AIP-Aktivität durch E2 größtenteils verhindert (Abb. 19, unten). Die basale AIP-Aktivität betrug in den Ishikawazellen $0,7 \pm 0,10$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 17-fach induziert ($12 \pm 0,6$ nmol/ min / 10^6 Zellen). In den ER α -Knockdownzellen wurde eine 3-fache Induktion der basalen AIP-Aktivität durch E2 beobachtet.

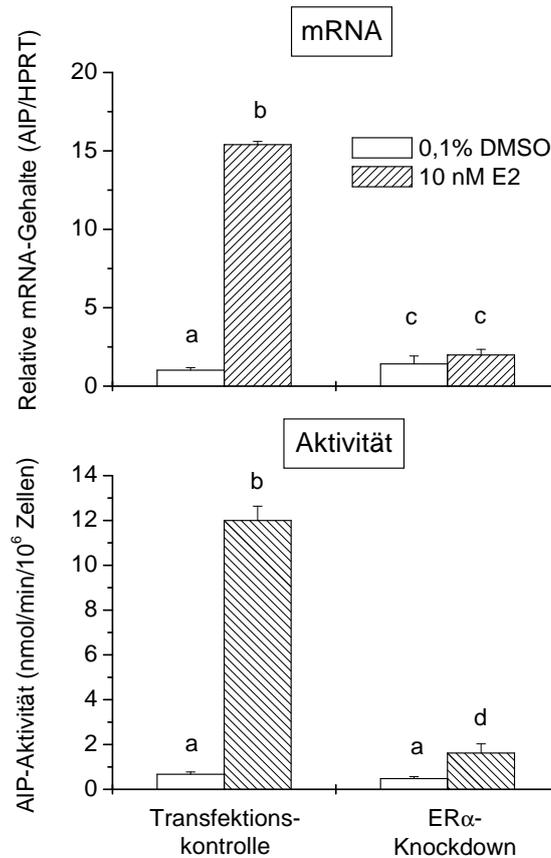


Abb. 19: Relative AIP mRNA-Gehalte (oben) und AIP-Aktivität (unten) in Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen nach 24-stündiger (mRNA) beziehungsweise 48-stündiger Behandlung mit DMSO (0,1%) bzw. 10 nM E2. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 (mRNA) beziehungsweise 6 (Aktivität) Bestimmungen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a–b) unterscheiden sich statistisch signifikant ($p \leq 0,001$, Anova).

Optimierung und Charakterisierung des Knockdown von ER- α Die E2-vermittelte Induktion der AIP-Aktivität wurde durch RNA-Interferenz stark vermindert (Kapitel 3.1.3). Um die Bedingungen für einen effektiven Knockdown bei minimalem Verbrauch an Reagenzien zu gewährleisten, wurden Ishikawazellen mit 1-25 nM siRNA und 0,1 bzw. 0,25% TM für 24 h behandelt und anschließend mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM E2 für 48 h inkubiert. Die basale AIP-Aktivität lag in der Kontrolle mit 0,1% Transfektionsmittel bei $0,3 \pm 0,05$ nmol/min/10⁶ Zellen und wurde durch Behandlung mit siRNA_{ER α} nicht beeinflusst (Abb. 20, oben). Die E2-induzierte AIP-Aktivität lag bei $5,2 \pm 0,69$ nmol/min/10⁶ Zellen, und wurde wie erwartet durch Vorbehandlung mit siRNA_{ER α} konzentrationsabhängig reduziert. Die

maximale Reduktion der E2-induzierten AIP-Aktivität um 50% war nach Vorbehandlung mit 5 nM siRNA_{ER α} erreicht (Abb. 20, oben).

Die basale AIP-Aktivität von $0,2 \pm 0,03$ nmol/min/ 10^6 Zellen der Kontrolle mit 0,25% TM wurde durch Behandlung mit 25 nM siRNA_{ER α} maximal um 50% reduziert (Abb. 20, unten). Die E2-induzierte AIP-Aktivität lag bei $4,4 \pm 0,23$ nmol/min/ 10^6 Zellen, und wurde durch Vorbehandlung mit siRNA_{ER α} auch konzentrationsabhängig reduziert. Die Behandlung mit 25 nM siRNA_{ER α} bewirkte eine maximale Reduktion um 90% (Abb. 20, unten).

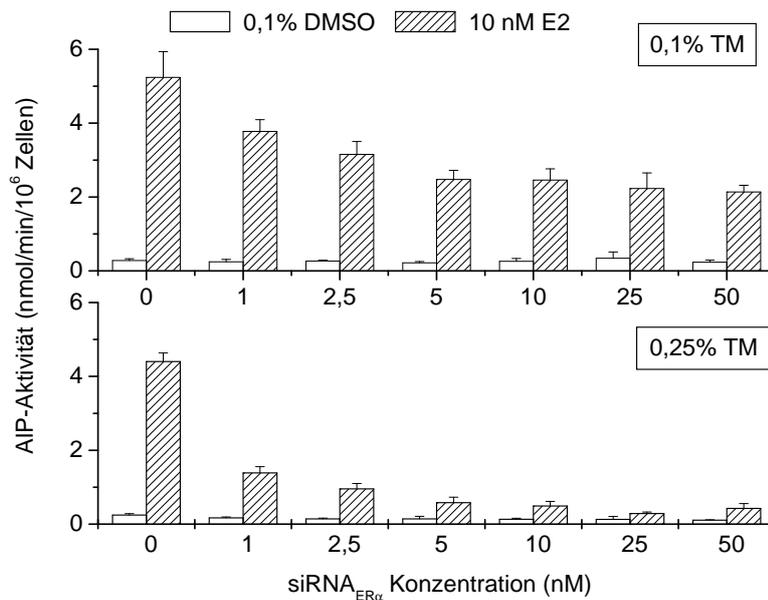


Abb. 20: AIP-Aktivität nach 24-stündiger Vorbehandlung von Ishikawazellen mit verschiedenen Konzentrationen an Transfektionsmittel (TM) und anschließender Inkubation mit Lösungsmittel (0,1% DMSO) oder 10 nM E2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

Der Bildung des ER α wurde mittels siRNA transient unterdrückt. Sobald die siRNA in der Zelle abgebaut ist kann wieder ER α -Protein entstehen. Zur Charakterisierung des zeitlichen Verlaufs der transienten Repression von ER α wurden Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen für 6-72 h mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 behandelt, und anschließend die AIP-Aktivität bestimmt. Die basale AIP-Aktivität der Transfektionskontrolle betrug 6 h nach der Transfektion $1,2 \pm 0,10$ nmol/min/ 10^6 Zellen. Die basale AIP-Aktivität der Transfektionskontrolle blieb zwischen 6 und 72 h konstant. 10 nM E2 induzierte erstmals nach 24 h die AIP-Aktivität signifikant auf das Doppelte der Lösungsmittelkontrolle. Nach 72 h wurde eine 9-fache Induktion der AIP-Aktivität durch 10 nM E2 beobachtet. Nach dem Knockdown des ER α lag

die AIP-Aktivität in den mit 0,1% DMSO behandelten Zellen bei $1,1 \pm 0,03$ nmol/ min / 10^6 Zellen. Zwischen 6 und 72 h wurde kein Unterschied der basalen AIP-Aktivität zwischen der Transfektionskontrolle und den Zellen mit ER α -Knockdown nach Behandlung mit 0,1% DMSO festgestellt. 10 nM E2 bewirkte in den Zellen mit ER α -Knockdown nach 72 h eine 2-fache Induktion der AIP-Aktivität im Vergleich zur Transfektionskontrolle. Durch den Knockdown von ER α waren die mRNA-Gehalte von ER α bis 48 h nach der Transfektion stark erniedrigt (Kapitel 3.1.3). Die Erniedrigung der ER α mRNA-Gehalte war ausreichend um die Induktion der AIP-Aktivität durch ER α bis zu 72 h vollständig zu unterdrücken. Für Untersuchungen der ER-Abhängigkeit der Genexpression von Proteinen, die ähnlich wie die AIP induziert werden, könnten daher Inkubationen von bis zu 72 h durchgeführt werden. Für Untersuchungen auf mRNA-Ebene sind Inkubationszeiten von bis zu 48 h geeignet. Längere Zeiten sind zumindest im Falle der AIP ungeeignet, da zwischen 48 und 72 h neu synthetisierte AIP-mRNA vorhanden gewesen sein musste.

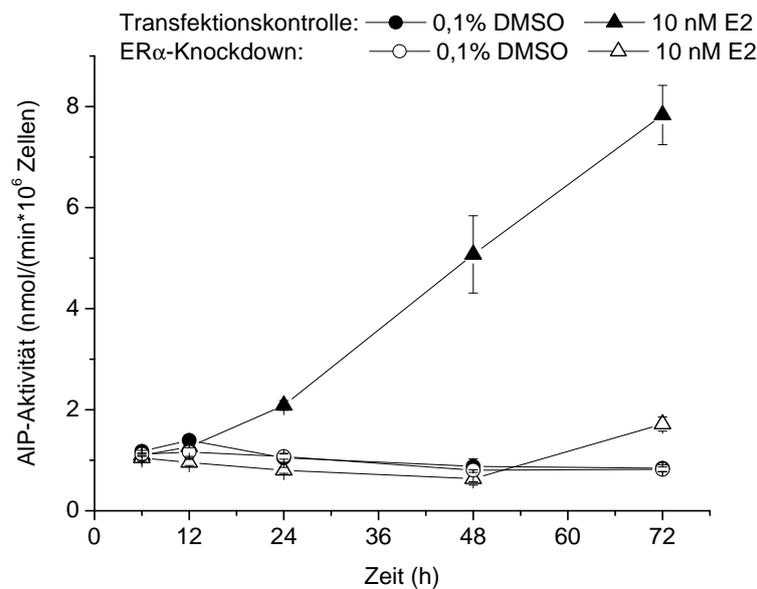


Abb. 21: AIP-Aktivität von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen nach Inkubation mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 für 6-72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

3.2 Einfluss exogener Estrogene auf die AIP-Aktivität

Die Bestimmung der AIP-Aktivität des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES), des Isoflavons Genistein, des Mykotoxins Zearalenon wurde durchgeführt, um die Potenz der estrogenen Wirkung in den Ishikawazellen zu bestimmen. Die verschiedenen Kongenere und Oxidationsprodukte von Polychlorierten Biphenylen (PCB) sollten hinsichtlich ihrer Fähigkeit die AIP in Ishikawazellen zu beeinflussen charakterisiert werden, da bisher wenig über deren estrogenes Potential bekannt ist.

3.2.1 GEN

Die Bildung von 4-Nitrophenol nach Behandlung von Ishikawazellen über einen Zeitraum von 72 h lag bei 61 ± 7 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte. 10 nM E2 induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol 10-fach (629 ± 41 pmol/ min / Loch). Ab einer Behandlung mit 100 nM GEN wurde eine Induktion der basalen Bildung von 4-Nitrophenol beobachtet. Die Behandlung mit 1 μ M GEN für 72 h führte zu einem 9-fachen Anstieg der basalen Bildung von 4-Nitrophenol. Der EC50-Wert betrug 152 ± 28 nM GEN und war damit etwa 1000-fach höher als der EC50-Wert von E2 (270 ± 68 pM, siehe Kapitel 3.1.2). In dem Konzentrationsbereich zwischen 10 pM und 1 μ M hatte GEN keinen Einfluss auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol. Nach Behandlung mit 10 μ M GEN war sowohl ein Rückgang der E2-induzierten als auch GEN-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol zu beobachten, was auf eine reduzierte Zellzahl zurückzuführen ist.

Isoflavone wie GEN können an den ER binden und die Expression Estrogen-regulierter Gene bewirken (Barnes *et al.*, 2000; Mayr *et al.*, 1992). Ihre estrogenen Wirkung ist im Vergleich mit E2 relativ gering Breinholt und Larsen (1998). Markiewicz *et al.* (1993) beobachteten bei der Bestimmung der AIP-Aktivität in Ishikawazellen einen um Faktor 1200 höheren EC50-Wert von GEN im Vergleich zu E2. Zudem wurde eine maximale Induktion der AIP-Aktivität nach Behandlung mit 1 μ M GEN beobachtet (Wober *et al.*, 2002; Kayisli *et al.*, 2002), wohingegen eine Behandlung mit 10 μ M GEN zytotoxisch war (Kayisli *et al.*, 2002). Die Bindungsaffinität an ER α und ER β liegt bei etwa 30% der Bindungsaffinität von E2 an den ER Kuiper *et al.* (1998). Dennoch ist die estrogenen Wirkung von GEN nicht zu unterschätzen, da durch eine Soja-reiche Ernährung Plasmaspiegel von GEN erreicht werden, die 10000-fach über denen von E2 liegen. Aufgrund ihrer stärkeren Bindung an ER β könnte GEN eine gewebspezifische Wirkung entfalten.

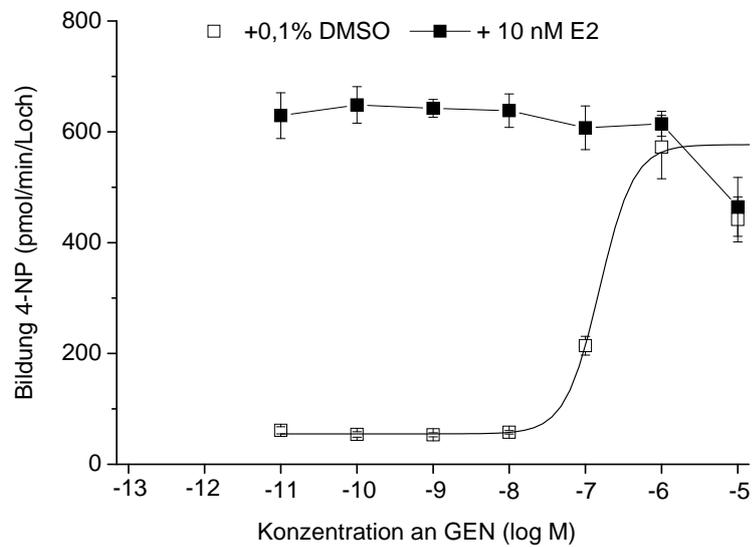


Abb. 22: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit GEN für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

3.2.2 ZEN

Ishikawazellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen ZEN für 72 h behandelt. Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 44 ± 5 pmol/min/Loch einer 96-Lochplatte. Die Behandlung mit 10 nM ZEN für 72 h führte zu einer 8-fach erhöhten Bildung von 4-Nitrophenol. Der EC50-Wert lag bei 719 ± 237 pM ZEN, der damit um Faktor 4 über dem von E2 lag (siehe Kapitel 3.1.2). ZEN zeigte eine Affinität zum ER. Die relative Bindungsaffinität zum menschlichen ER α lag im Vergleich mit E2 bei 10% (Kuiper *et al.*, 1998) beziehungsweise 4% (Takemura *et al.*, 2007). Guevel und Pakdel (2001) beobachteten eine maximale Stimulation der AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 100 pM ZEN und einen EC50-Wert von 58 pM der im Vergleich mit dem EC50-Wert von E2 um Faktor 3 kleiner war. (Wober *et al.*, 2002) beobachteten eine Stimulation der AIP in Ishikawazellen nach Behandlung mit 10 nM ZEN.

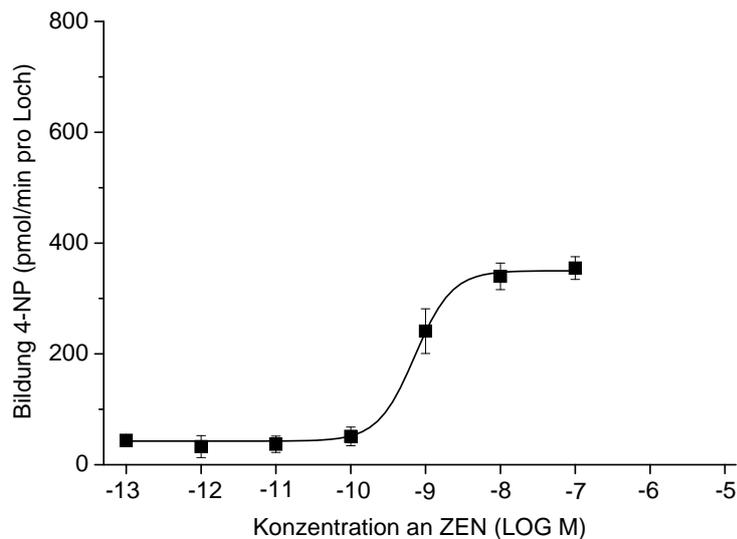


Abb. 23: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit ZEN für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Bestimmungen.

3.2.3 Polychlorierte Biphenyle (PCBs)

PCBs und ihre Abbauprodukte MDCBs sind *in vivo* teilweise estrogen aktiv. In *in vitro* Tests ohne metabolische Aktivierung sind PCBs und MDCBs meist negativ (siehe Kapitel 1.2.3). Daher wird vermutet, dass die estrogen Wirkung unter anderem durch oxidative Metaboliten bewirkt wird. Im Gegensatz zu PCBs werden MDCBs durch ihre geringere Anzahl an Chlorsubstituenten besser oxidativ metabolisiert. Um den Einfluss eines PCBs oder eines PCB-Metaboliten auf die basale und E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol zu untersuchen, wurden Ishikawazellen in 96-Lochplatten in An- und Abwesenheit von 10 nM E2 (maximale Induktion der ALP, Kapitel 3.1.2) für 72 h inkubiert und zunächst die Bildung von 4-Nitrophenol bestimmt. Falls ein Einfluss der untersuchten Substanz auf die Bildung von 4-Nitrophenol beobachtet wurde, wurde nachfolgend die ALP-Aktivität und die Zellzahl in 24-Lochplatten bestimmt, und die ALP-Aktivität als Bildung 4-Nitrophenol pro Minute pro 1 Million Zellen angegeben. In den 24-Lochplatten wurde die ALP-Aktivität nach 48 h gleichzeitig mit der Zellzahl bestimmt. Da die Zellzahl nach einer Inkubationsdauer zwischen 48 und 72 h ein Plateau erreicht (siehe Kapitel 3.1.2), würden zytotoxische Wirkungen durch den Wachstumsstopp in der Plateaupase unterschätzt werden. Wenn die Zellzahl um mehr als 80% im Vergleich zur Lösungsmittelkontrolle reduziert war, wurden keine ALP-Aktivitäten berechnet.

PCB1, PCB3 und PCB9 PCB1, 3 und 9 sind Kontaminanten mit 1 (PCB1, 3) und 2 Chloratomen (PCB9), die vor allem in der Atemluft nachgewiesen wurden (siehe Kapitel 1.2.3). Nach Behandlung der Ishikawazellen mit 10 pM bis 10 μ M PCB1, 3 und 9 für 72 h wurde kein Einfluss auf die basale Bildung von 4-Nitrophenol (30 ± 2 pmol/ min / Loch, 34 ± 1 pmol/ min / Loch, 56 ± 7 pmol/ min / Loch) beobachtet (Abb. 24). E2 (10 nM) induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol 18-, 8- beziehungsweise 13-fach (559 ± 32 pmol/ min / Loch, 253 ± 21 pmol/ min / Loch, 712 ± 35 pmol/ min / Loch, Abb. 24). Bis 10 μ M PCB1, 3 beziehungsweise 9 wurde kein Einfluss auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol beobachtet. PCB1 und 3 induzieren wie auch andere niedrig chlorierte PCBs in Ratten eine Zunahme des Uterusgewichts (Geyer *et al.*, 2000). *In vitro* wurde nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10 μ M PCB3 eine minimale Proliferationssteigerung beobachtet, die etwa 4% der Proliferationssteigerung durch E2 entsprach (Soto *et al.*, 1995).

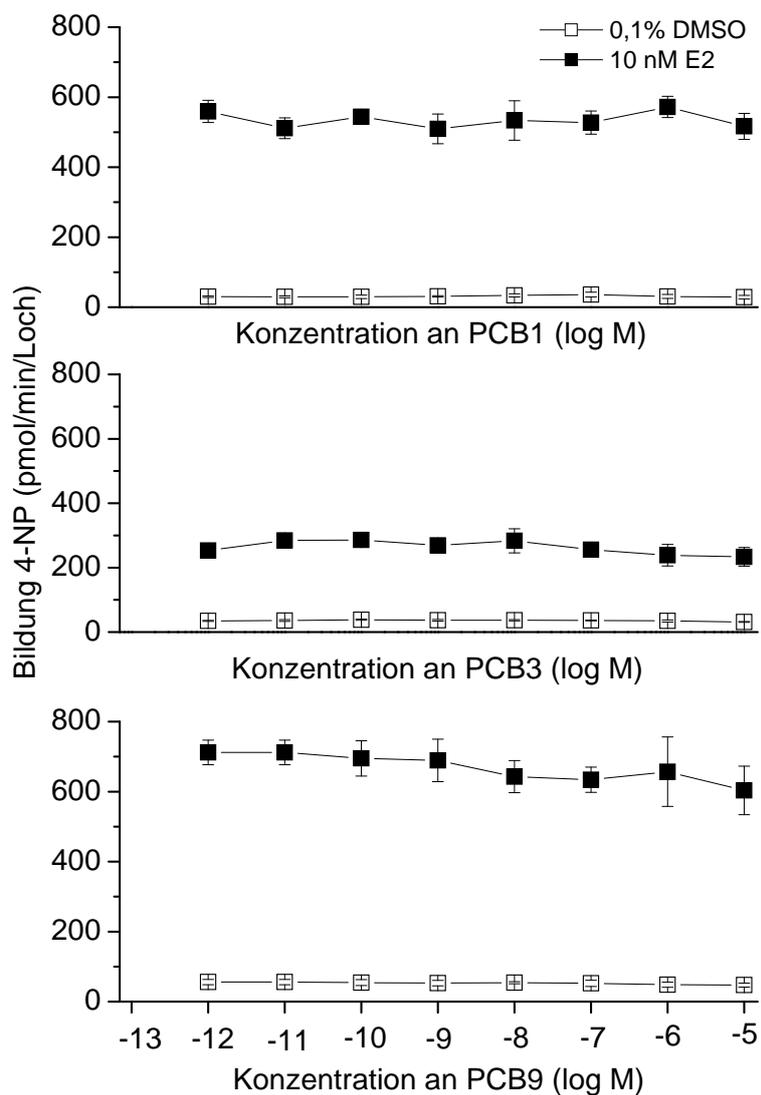


Abb. 24: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1, 3 und 9 für 72 h. Die Konzentration 10^{-12} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

HO-PCB3 PCB3 hatte im Konzentrationsbereich zwischen 10 pM und 10 μ M weder einen Einfluss auf die basale noch auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol in Ishikawazellen. Im Gegensatz dazu induzierte PCB3 sowie mehrere HO-PCBs wie 4-HO-PCB3 in Ratten eine Zunahme des Uterusgewichts (Geyer *et al.*, 2000). HO-PCBs bewirkten zudem eine Aktivierung des ER in 2 verschiedenen Reporterassays (siehe Kapitel 1.2.3).

Um die Bedeutung des Metabolismus für das estrogene Potential von PCB3 zu untersuchen, wurden der Einfluss von drei monohydroxylierten Metaboliten von PCB3 (2-, 3- und 4-HO-PCB3) auf die ER-abhängige basale und E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol in Ishikawazellen mit der von PCB3 verglichen.

2-HO-PCB3 Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 39 ± 10 pmol/ min / Loch in einer 96-Lochplatte. Nach Behandlung mit 100 pM bis 10 μ M 2-HO-PCB3 für 72 h war keine Veränderung der basalen Bildung von 4-Nitrophenol zu beobachten (Abb. 25, oben). Nach Behandlung mit 10 μ M 2-HO-PCB3 wurde eine Reduktion der E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol (337 ± 34 pmol/ min / Loch) um 35% beobachtet. Die unveränderte basale Bildung von 4-Nitrophenol durch 10 μ M 2-HO-PCB3 deutet eher auf einen ER-antagonistischen Effekt anstatt einer Reduktion der Zellzahl hin.

Die basale ALP-Aktivität betrug $0,22 \pm 0,03$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 12-fach induziert ($2,70 \pm 0,12$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 25, unten). 1 bis 25 μ M 2-HO-PCB3 hatten keinen Einfluss auf die basale ALP Aktivität. Im Gegensatz dazu reduzierten 25 μ M 2-HO-PCB3 die E2-induzierte ALP-Aktivität signifikant um 60%.

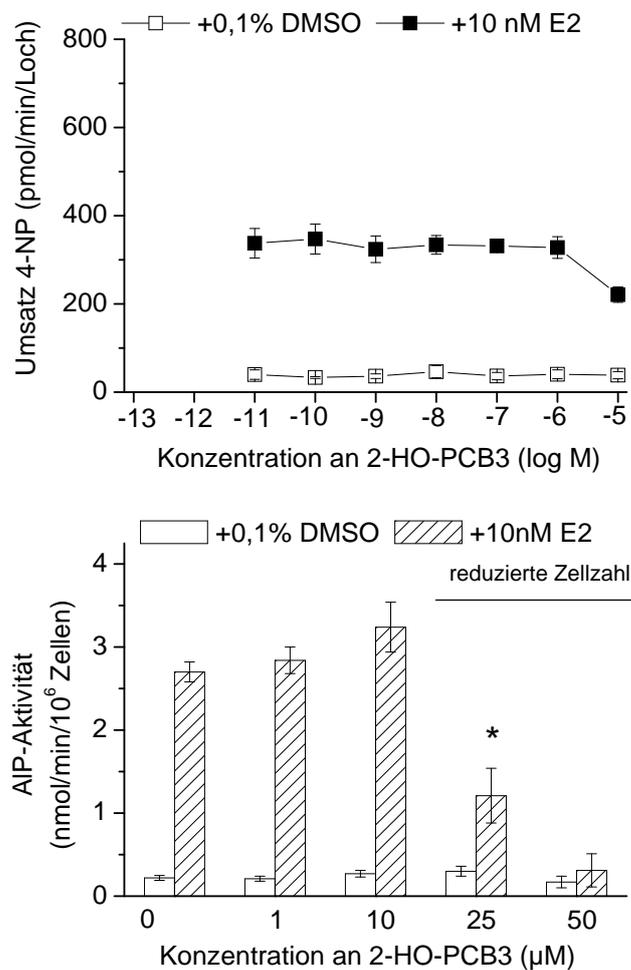


Abb. 25: Einfluss von 2-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2-HO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

3-HO-PCB3 Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 32 ± 8 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte. E2 (10 nM) bewirkte eine 10-fache Induktion der Bildung von 4-Nitrophenol (333 ± 26 pmol/ min / Loch). Nach Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 3-HO-PCB3 wurde eine Verdoppelung der basalen Bildung von 4-Nitrophenol beobachtet. 3-HO-PCB ($10 \mu\text{M}$) bewirkte eine Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol um 20% (Abb. 26, oben). Die Erhöhung der basalen Bildung von 4-Nitrophenol und gleichzeitige Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol nach Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 3-HO-PCB3 deutet auf eine Überschneidung von ER-agonistischen und zytotoxischen Effekten hin.

Die basale ALP-Aktivität betrug $0,21 \pm 0,04$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 11-fach induziert ($2,28 \pm 0,13$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 26, unten). Ab $10 \mu\text{M}$ 3-HO-PCB3 war eine Induktion der basalen ALP-Aktivität zu beobachten. $25 \mu\text{M}$ 3-HO-PCB3 bewirkte dabei die maximale Induktion der basalen ALP-Aktivität um Faktor 3. Bis zu einer Konzentration von $25 \mu\text{M}$ hatte 3-HO-PCB3 keinen Einfluss auf die E2-induzierte ALP-Aktivität.

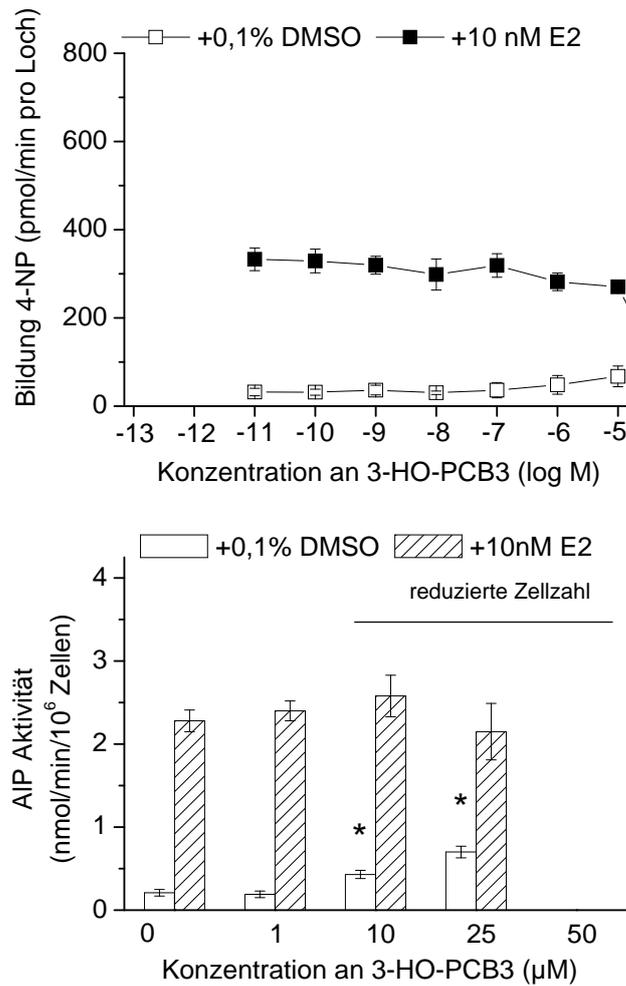


Abb. 26: Einfluss von 3-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3-HO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

4-HO-PCB3 Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 37 ± 7 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte. Die Behandlung mit 10 nM E2 bewirkte eine 9-fache Induktion der Bildung von 4-Nitrophenol (322 ± 21 pmol/ min / Loch, Abb. 27, oben). Nach Behandlung mit 10 μ M 4-HO-PCB3 wurde eine 5-fache Induktion der basalen Bildung von 4-Nitrophenol beobachtet. Die Behandlung mit 4-HO-PCB3 hatte in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 50 μ M keinen Einfluss auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol. Nach Behandlung mit 100 μ M 4-HO-PCB3 waren sowohl die basale als auch E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um mehr als 95% reduziert, was auf die gleichzeitig beobachtete Reduktion der Zellzahl zurückzuführen war. Die basale AIP-Aktivität betrug $0,2 \pm 0,03$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 13-fach induziert ($2,6 \pm 0,15$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 27, unten). Ab 10 μ M 4-HO-PCB3 war die basale AIP-Aktivität erhöht. Die Behandlung mit 25 μ M 4-HO-PCB3 bewirkte eine maximale Induktion der basalen AIP-Aktivität um Faktor 10. Die E2-induzierte AIP-Aktivität wurde durch Behandlung mit 1 bis 25 μ M 4-HO-PCB3 nicht beeinflusst. 4-HO-PCB3 zeigte starke ER-agonistische Eigenschaften.

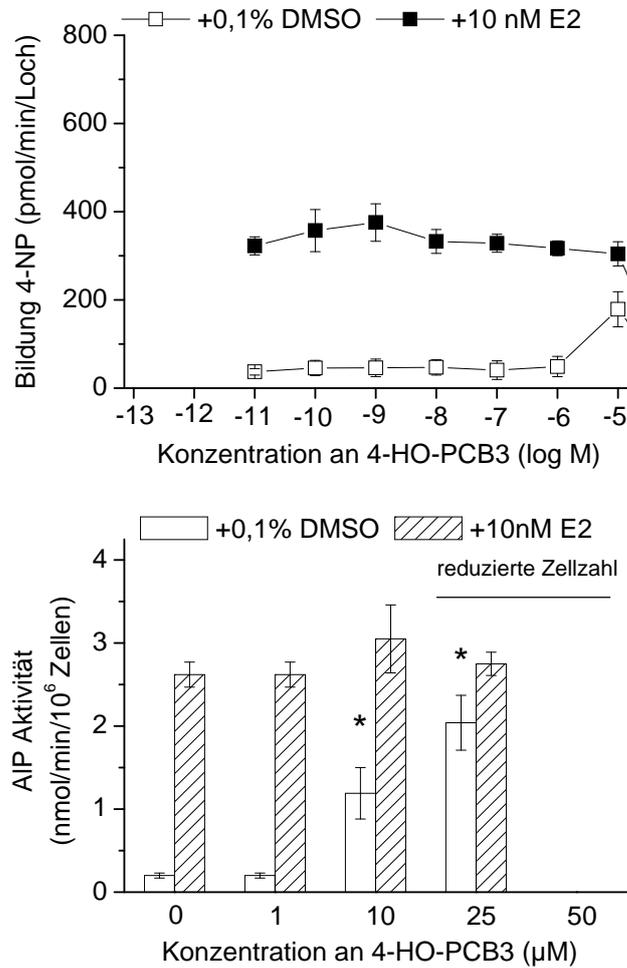


Abb. 27: Einfluss von 4-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von 4-HO-PCB9 auf die ALP-Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 43 ± 5 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte, und wurde durch Behandlung mit 10 nM E2 9-fach induziert (380 ± 41 pmol/ min / Loch, Abb. 28, oben). Ab einer Behandlung mit 1 μ M 4-HO-PCB9 war die basale Bildung von Nitrophenol induziert. 10 μ M 4-HO-PCB9 induzierte dabei die basale Bildung von 4-Nitrophenol maximal um das 7-fache. 1 bis 25 μ M 4-HO-PCB9 hatte keinen Einfluss auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol. Nach Behandlung mit 100 μ M 4-HO-PCB9 waren sowohl die basale als auch E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um mehr als 95% reduziert, was auf die gleichzeitig beobachtete Reduktion der Zellzahl zurückzuführen war.

Die basale ALP-Aktivität lag bei $0,09 \pm 0,09$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 auf $2,62 \pm 0,15$ nmol/ min / 10^6 Zellen induziert (Abb. 28, unten). Ab 1 μ M 4-HO-PCB9 war die basale ALP-Aktivität erhöht. 10 μ M 4-HO-PCB9 bewirkte eine maximale Induktion der basalen ALP-Aktivität um Faktor 17. Die E2-induzierte ALP-Aktivität wurde in einem Konzentrationsbereich von 1 bis 25 μ M 4-HO-PCB9 nicht beeinflusst.

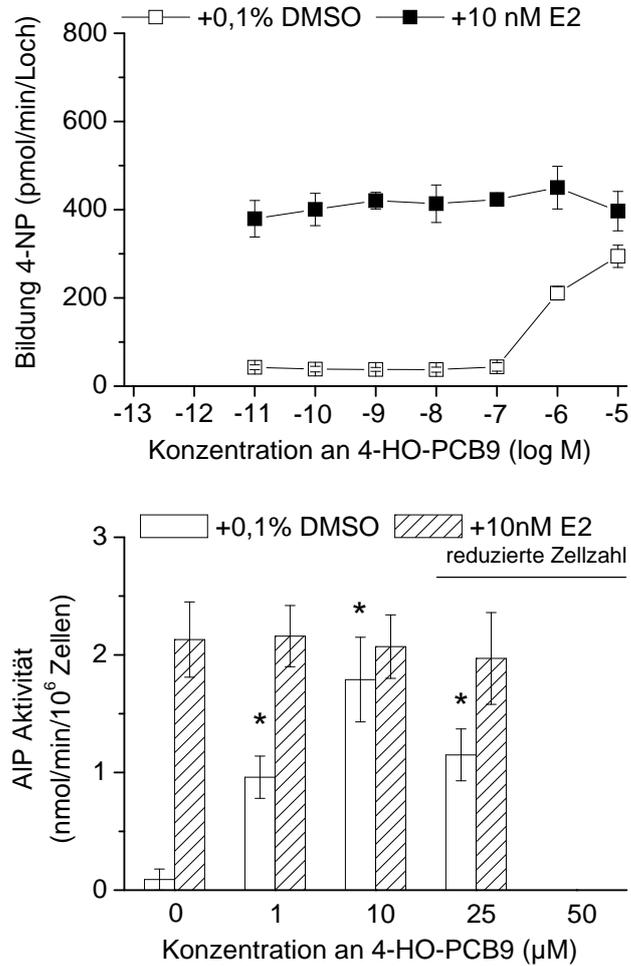


Abb. 28: Einfluss von 4-HO-PCB9 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB9 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB9 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von 4-HO-PCB12 auf die AIP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 44 ± 3 pmol/ min /Loch einer 96-Lochplatte. Die Behandlung mit 10 nM E2 bewirkte eine 8-fache Induktion der Bildung von 4-Nitrophenol (351 ± 27 pmol/ min / Loch, Abb. 29, oben). Ab einer Konzentration von $1 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 war die basale Bildung von 4-Nitrophenol erhöht. $10 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 bewirkten eine maximale Induktion der basalen Bildung von 4-Nitrophenol um Faktor 5. Im Gegensatz dazu hatten 1 bis $25 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 keinen Einfluss auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol. Die starke Reduktion der basalen als auch der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol bei $100 \mu\text{M}$ ist auf eine starke zytotoxische Wirkung zurückzuführen. Die basale AIP-Aktivität betrug $0,21 \pm 0,02$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch Behandlung mit 10 nM E2 10-fach induziert (Abb. 29, unten). Ab $10 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 wurde eine Erhöhung der basalen AIP-Aktivität beobachtet. Die Behandlung mit $25 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 bewirkte eine maximale Induktion der basalen AIP-Aktivität um Faktor 12, die auf dem Niveau der E2-induzierten AIP-Aktivität lag. Dagegen hatten 1 bis $25 \mu\text{M}$ 4-HO-PCB12 keinen Einfluss auf die E2-induzierte AIP-Aktivität. 4-HO-PCB12 zeigte in diesem Testsystem ausschließlich ER-agonistische Eigenschaften.

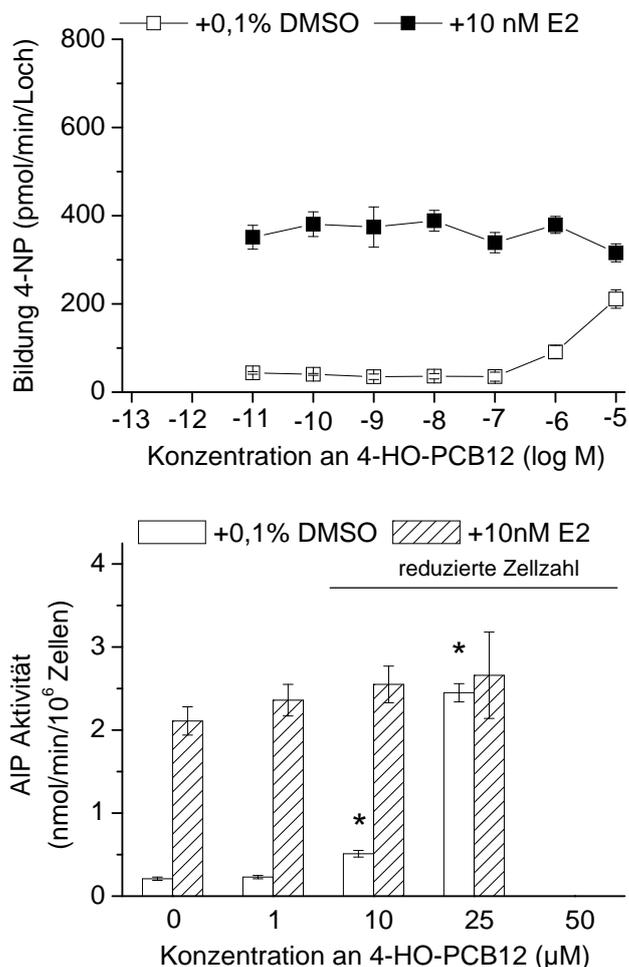


Abb. 29: Einfluss von 4-HO-PCB12 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB12 für 72 h. Die Konzentration 10⁻¹¹ entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB12 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,5$, Student's t-Test).

Einfluss von 2,5-diHO-PCB1 auf die ALP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 43 ± 3 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch E2 9-fach induziert (414 ± 45 pmol/ min / Loch, Abb. 30, oben). Im Konzentrationsbereich zwischen 10 pM und 10 μ M hatte 2,5-diHO-PCB1 weder einen Einfluss auf die basale noch auf die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol. 100 μ M 2,5-diHO-PCB1 reduzierte sowohl die basale als auch E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um etwa 95%, was auf eine hohe Zytotoxizität zurückzuführen ist.

Die basale ALP-Aktivität lag bei $0,24 \pm 0,03$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 10-fach induziert ($2,4 \pm 0,05$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 30, unten). Die Behandlung mit 25 μ M 2,5-diHO-PCB1 bewirkte eine Induktion der basalen ALP-Aktivität um Faktor 3. Die E2-induzierte ALP-Aktivität wurde dagegen durch Behandlung mit 25 μ M 2,5-diHO-PCB1 um 30% erniedrigt (Abb. 30, oben). 2,5-diHO-PCB1 zeigte sowohl ER-agonistische als auch ER-antagonistische Eigenschaften.

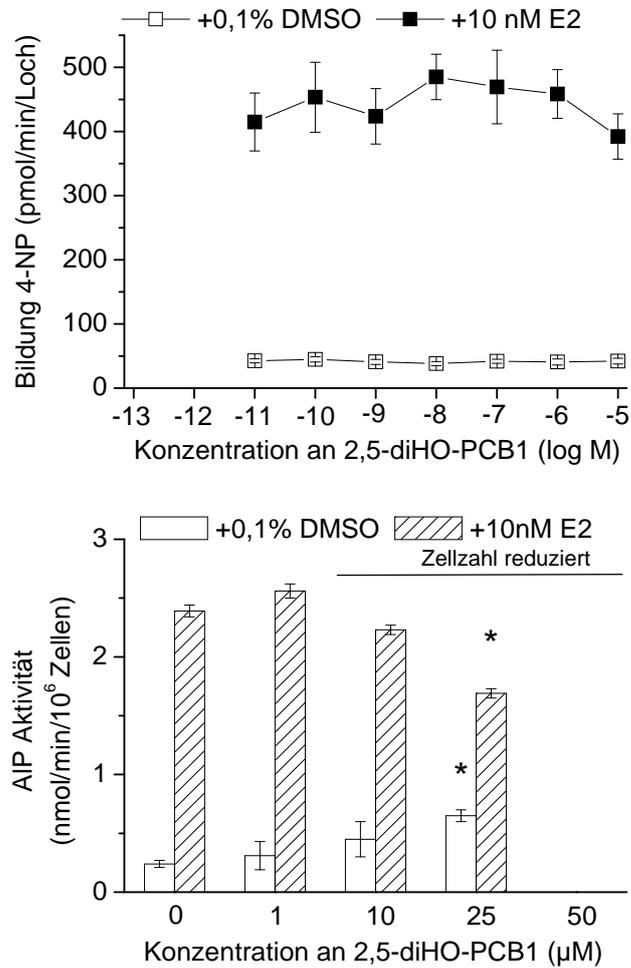


Abb. 30: Einfluss von 2,5-diHO-PCB1 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB1 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB1 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,5$, Student's t-Test).

Einfluss von 2,5-diHO-PCB2 auf die ALP-Aktivität in Ishikawazellen Die Bildung von 4-Nitrophenol lag in der Lösungsmittelkontrolle bei 36 ± 4 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch E2 11-fach induziert (385 ± 17 pmol/ min / Loch, Abb. 31, oben). Ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 2,5-diHO-PCB2 war die basale Bildung von 4-Nitrophenol erniedrigt. Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 2,5-diHO-PCB2 bewirkte zusätzlich eine Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol um 50%. Die Erniedrigung der basalen und E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol ist auf Zytotoxizität zurückzuführen.

Die basale ALP-Aktivität lag bei $0,55 \pm 0,08$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 auf $5,80 \pm 0,87$ nmol/ min / 10^6 Zellen induziert (Abb. 31, unten). Die Behandlung mit 10 und $25 \mu\text{M}$ 2,5-diHO-PCB2 bewirkte eine nicht signifikante Reduktion der basalen ALP-Aktivität um etwa 20%. Die E2-induzierte ALP-Aktivität wurde ab einer Konzentration von $10 \mu\text{M}$ 2,5-diHO-PCB2 reduziert (Abb. 31, oben). $25 \mu\text{M}$ 2,5-diHO-PCB2 bewirkten eine maximale Reduktion der E2-induzierten ALP-Aktivität um 50%. 2,5-diHO-PCB2 hatte ER-antagonistische Eigenschaften in diesem Testsystem.

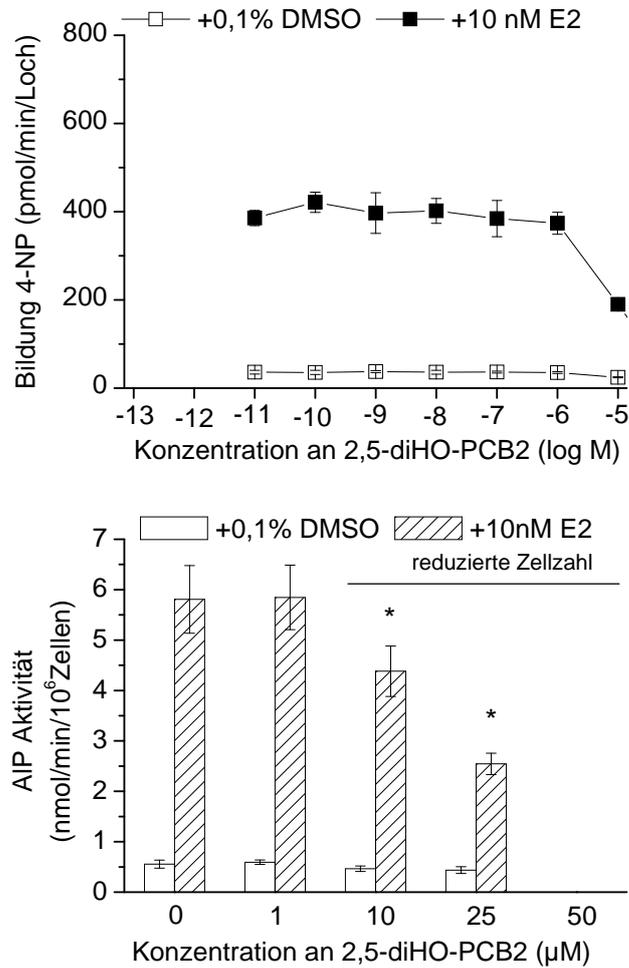


Abb. 31: Einfluss von 2,5-diHO-PCB2 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB2 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von 2,5-diHO-PCB3 auf die ALP-Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 65 ± 10 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte, und wurde durch Behandlung mit 10 nM E2 7-fach induziert (Abb. 32, oben). Die Behandlung mit 10 μ M 2,5-diHO-PCB3 reduzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um 50% und gleichzeitig die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um 77%. Die Reduktion ist auf eine reduzierte Zellzahl zurückzuführen.

Die basale ALP-Aktivität betrug $0,10 \pm 0,02$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch E2 11-fach induziert (Abb. 32, unten). Die Behandlung mit 1 μ M 2,5-diHO-PCB3 hatte weder einen Einfluss auf die basale noch auf die E2-induzierte ALP-Aktivität (Abb. 32, oben).

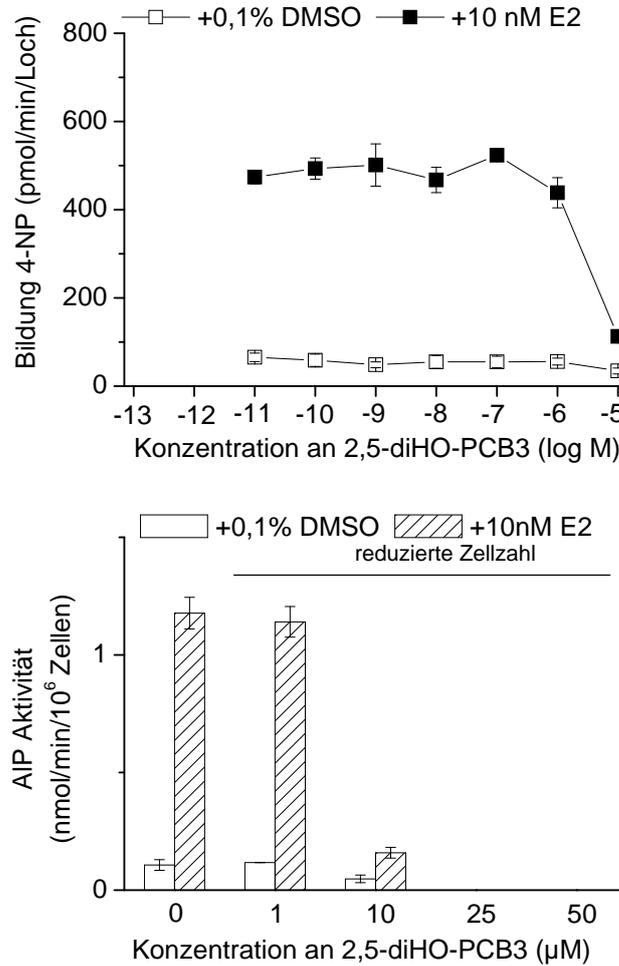


Abb. 32: Einfluss von 2,5-diHO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

Einfluss von 3,4-diHO-PCB3 auf die AIP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 37 ± 3 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 7-fach induziert (Abb. 33, oben). Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 3,4-diHO-PCB3 reduzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um 30%, während die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um 60% verringert wurde. Die Reduktion der basalen und E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol könnte auf eine Überschneidung zytotoxischer und ER-antagonistischer Effekte zurückzuführen sein, da die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol stärker reduziert war, als durch zytotoxische Effekte zu erwarten war.

Die basale AIP-Aktivität lag bei $0,44 \pm 0,14$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch Behandlung mit 10 nM E2 7-fach induziert (Abb. 33, unten). Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 3,4-diHO-PCB3 hatte keinen Einfluss auf die basale AIP-Aktivität, reduzierte im Gegensatz dazu die E2-induzierte AIP-Aktivität um 70%. 3,4-diHO-PCB3 zeigt eine stark ER-antagonistische Wirkung in diesem Testsystem.

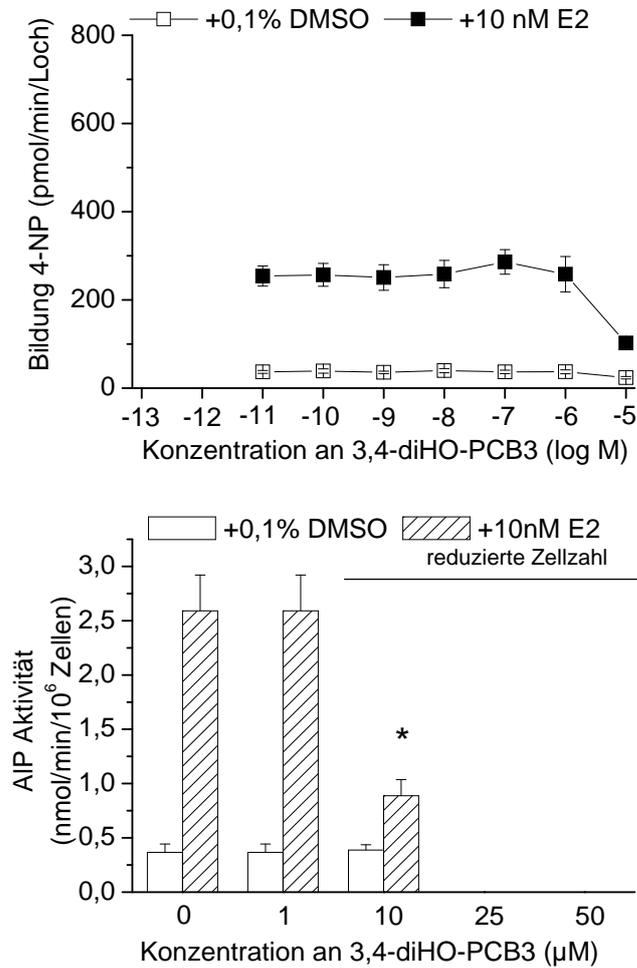


Abb. 33: Einfluss von 3,4-diHO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von 3,4-diHO-PCB12 auf die ALP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 36 ± 2 pmol/ min/ Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch E2 7-fach induziert (Abb. 34, oben). Die Behandlung mit $10 \mu\text{M}$ 3,4-diHO-PCB12 reduzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um 30%, wohingegen die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol durch $10 \mu\text{M}$ 3,4-diHO-PCB12 um 70% reduziert wurde. Aufgrund der starken Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol im Vergleich der zur geringeren Reduktion der basalen Bildung von 4-Nitrophenol ist diese sowohl auf zytotoxische als auch ER-antagonistische Effekte zurückzuführen.

Die basale ALP-Aktivität lag bei $0,23 \pm 0,02$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 7-fach induziert (Abb. 34, unten). In einem Konzentrationsbereich von $1 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$ hatte 3,4-diHO-PCB12 keinen Einfluss auf die basale ALP-Aktivität. Jedoch bewirkte $10 \mu\text{M}$ 3,4-diHO-PCB12 eine Reduktion der E2-induzierte ALP-Aktivität um mehr als 90%.

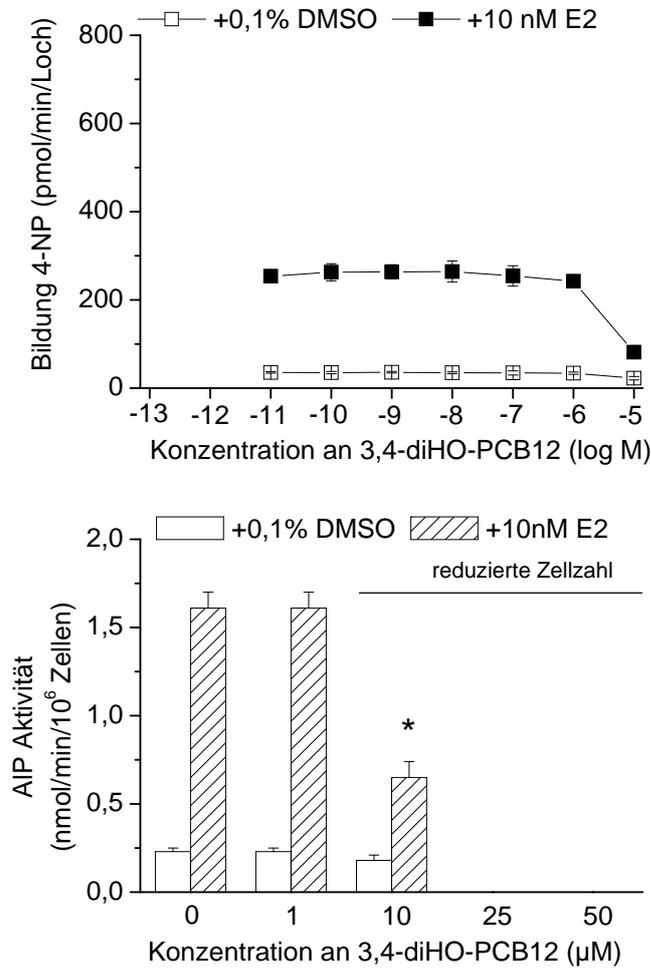


Abb. 34: Einfluss von 3,4-diHO-PCB12 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB12 für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB12 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von PCB1-2,5-Q auf die AIP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 43 ± 2 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 12-fach induziert (Abb. 35, oben). Die Behandlung mit 10 μ M PCB1-2,5-Q induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um das 4-fache, während die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol durch 10 μ M PCB1-2,5-Q gleichzeitig um 25% reduziert wurde. Die ER-agonistische Wirkung von PCB1-2,5-Q wurde dabei von einer Reduktion der Zellzahl überlagert. Nach Behandlung mit 100 μ M PCB1-2,5-Q waren die basale als auch die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol $>95\%$ reduziert, was auf die Reduktion der Zellzahl zurückzuführen war.

Die basale AIP-Aktivität lag bei $0,78 \pm 0,05$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 5-fach induziert (Abb. 35, unten). Ab einer Behandlung mit 10 μ M PCB1-2,5-Q war die basale AIP-Aktivität erhöht. Die Behandlung mit 50 μ M PCB1-2,5-Q induzierte die basale AIP-Aktivität maximal auf das 5-fache und erreichte die gleiche Induktion wie 10 nM E2. Die E2-induzierte AIP-Aktivität wurde durch 1 bis 50 μ M PCB1-2,5-Q nicht beeinflusst.

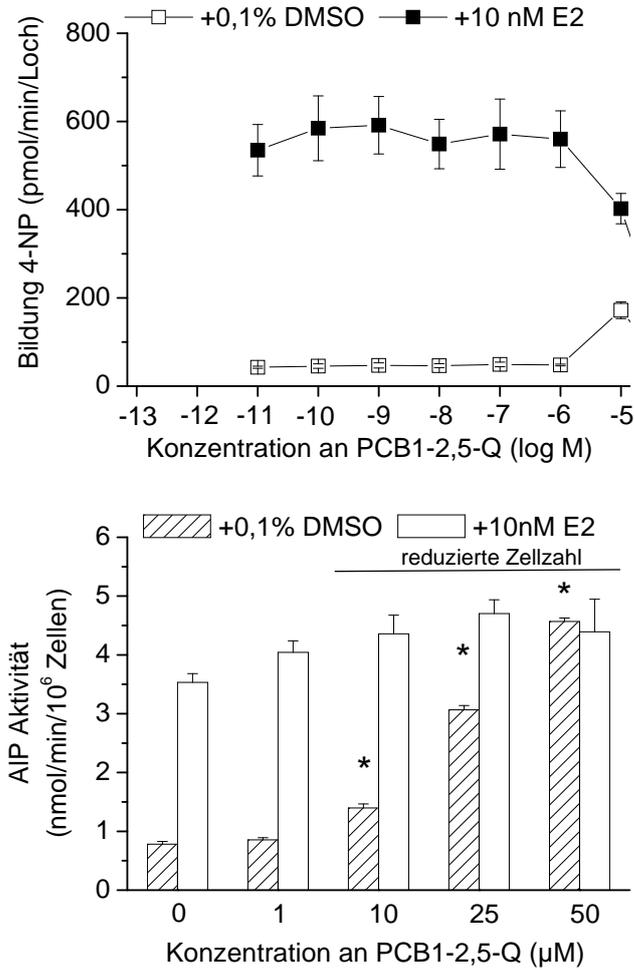


Abb. 35: Einfluss von PCB1-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von PCB2-2,5-Q auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 39 ± 4 pmol/min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 9-fach induziert (410 ± 18 pmol/min / Loch, Abb. 36, oben). Die basale Bildung von 4-Nitrophenol war ab einer Behandlung mit 1 μ M erhöht. Die Behandlung mit 10 μ M PCB2-2,5-Q induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol maximal um das 5-fache, während die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol durch 10 μ M PCB2-2,5-Q gleichzeitig um 36% reduziert wurde. Die Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol war auf eine reduzierte Zellzahl zurückzuführen. Nach Behandlung mit 100 μ M PCB2-2,5-Q war aufgrund der starken Zytotoxizität sowohl die basale als auch die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol reduziert. Die basale AIP-Aktivität lag bei $0,20 \pm 0,03$ nmol/min/ 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 12-fach induziert (Abb. 36, unten). Die basale AIP-Aktivität war ab einer Behandlung mit 10 μ M erhöht. Die Behandlung mit 25 μ M PCB2-2,5-Q induzierte die basale AIP-Aktivität maximal auf das 10-fache. In einem Konzentrationsbereich zwischen 1 μ M und 25 μ M hatte PCB2-2,5-Q keinen Einfluss auf die E2-induzierte AIP-Aktivität.

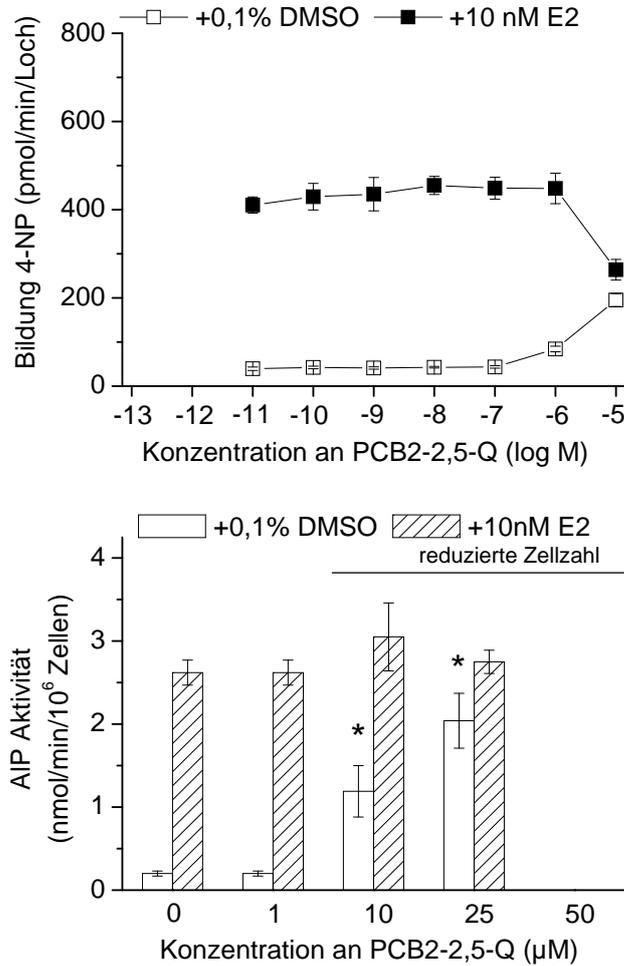


Abb. 36: Einfluss von PCB2-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB2-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB2-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von PCB3-2,5-Q auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 40 ± 1 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 8-fach induziert (325 ± 32 pmol/ min / Loch, Abb. 37, oben). Die Behandlung mit 10 μ M PCB3-2,5-Q induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um 19%, wohingegen 10 μ M PCB3-2,5-Q eine Reduktion der E2-induzierten Bildung von 4-Nitrophenol um 30% bewirkte. Die basale AIP-Aktivität lag bei $0,34 \pm 0,08$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 7-fach induziert ($2,4 \pm 0,05$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 37, unten). Die Behandlung mit 1 bis 10 μ M PCB3-2,5-Q hatte keinen Einfluss auf die basale AIP-Aktivität. Im Gegensatz dazu bewirkte die Behandlung mit 10 μ M PCB3-2,5-Q eine Reduktion der E2-induzierte AIP-Aktivität um 45%.

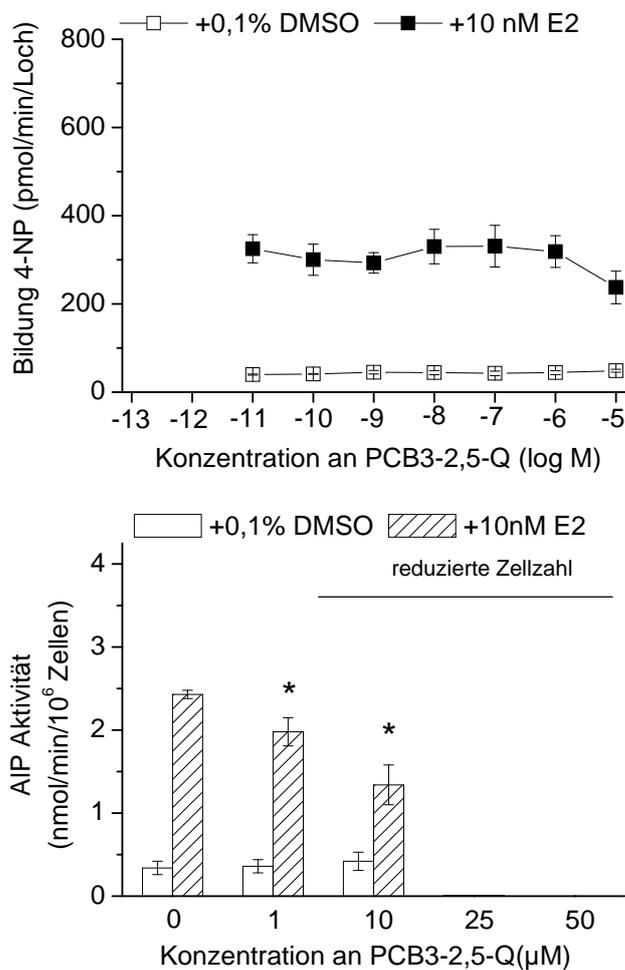


Abb. 37: Einfluss von PCB3-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von PCB3-3,4-Q auf die AIP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 46 ± 4 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 7-fach induziert (323 ± 47 pmol/ min / Loch, Abb. 38, oben). Die Behandlung mit 10 μ M PCB3-3,4-Q induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um Faktor 3. Im Gegensatz dazu reduzierte 10 μ M PCB3-3,4-Q die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um 35%, was auf eine Reduktion der Zellzahl zurückzuführen ist.

Die basale AIP-Aktivität lag bei $0,31 \pm 0,07$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 6-fach induziert ($1,97 \pm 0,07$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 38, unten). Die Behandlung mit 1 bis 25 μ M PCB3-3,4-Q hatte keinen Einfluss auf die basale AIP-Aktivität. Nach Behandlung mit 25 μ M PCB3-3,4-Q war die basale AIP-Aktivität zwar leicht erhöht, diese Erhöhung war jedoch nicht statistisch signifikant. 25 μ M PCB3-3,4-Q reduzierte die E2-induzierte AIP-Aktivität um 65%.

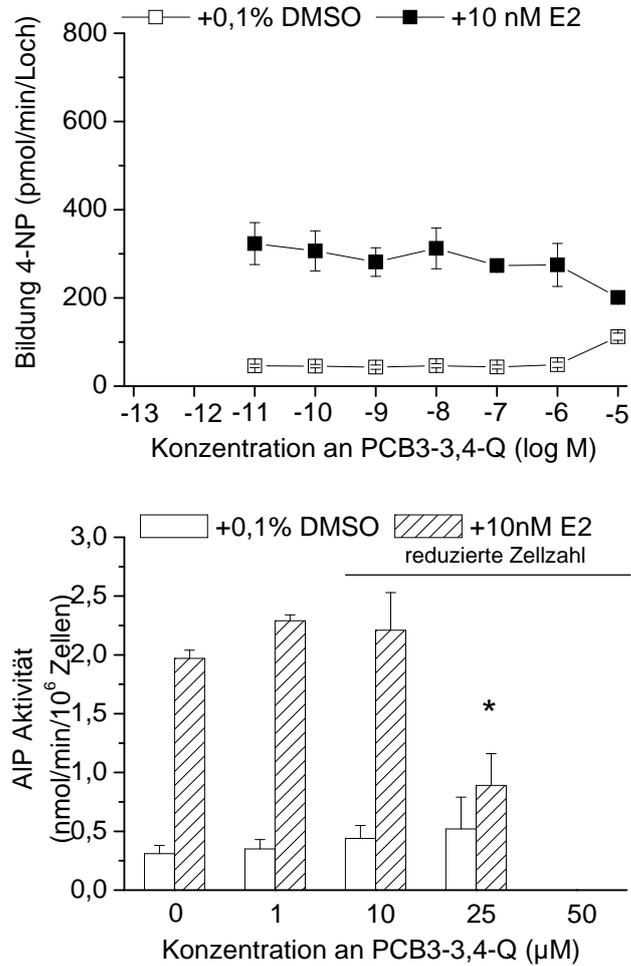


Abb. 38: Einfluss von PCB3-3,4-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-3,4-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-3,4-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Einfluss von PCB12-3,4-Q auf die ALP Aktivität in Ishikawazellen Die basale Bildung von 4-Nitrophenol betrug 35 ± 1 pmol/ min / Loch einer 96-Lochplatte und wurde durch 10 nM E2 8-fach induziert (288 ± 15 pmol/ min / Loch, Abb. 39, oben). 10 μ M PCB12-3,4-Q induzierte die basale Bildung von 4-Nitrophenol um Faktor 3. Währenddessen reduzierte 10 μ M PCB12-3,4-Q die E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol um 22%.

Die basale ALP-Aktivität lag bei $0,38 \pm 0,13$ nmol/ min / 10^6 Zellen und wurde durch 10 nM E2 13-fach induziert ($5,01 \pm 0,73$ nmol/ min / 10^6 Zellen, Abb. 39, unten). Ab einer Behandlung mit 10 μ M PCB12-3,4-Q war die basale ALP-Aktivität erhöht. Die Behandlung mit 25 μ M PCB12-3,4-Q induzierte die basale ALP-Aktivität maximal um Faktor 4. Die Behandlung mit PCB12-3,4-Q hatte keinen Einfluss auf die E2-induzierte ALP-Aktivität.

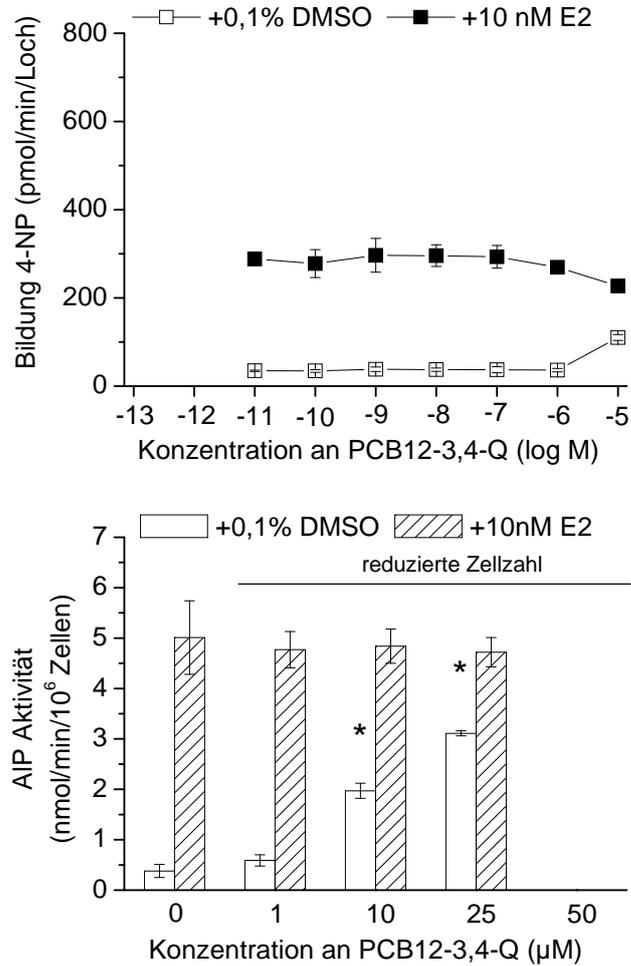


Abb. 39: Einfluss von PCB12-3,4-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB12-3,4-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB12-3,4-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen. Säulen mit Stern unterscheiden sich signifikant von der jeweiligen PCB-freien Kontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test).

Diskussion des Einflusses von PCBs und PCB-Metaboliten auf die AIP Aktivität in Ishikawazellen

Die Muttersubstanzen PCB_{1,3} und 9 hatten in Ishikawazellen weder einen Einfluss auf die basale noch auf die E₂-induzierte AIP-Aktivität (siehe Kapitel 3.2.3). In Ratten induzierten dichlorierte PCBs (PCB₁, 3, 4, 8 und 15) eine Zunahme des Uterusgewichts (Geyer *et al.*, 2000), was auf eine estrogenere Aktivität hinweist. Bei *in vivo*-Studien müssen Prozesse wie Metabolismus und Pharmakokinetik beachtet werden (Andersen *et al.*, 1999; Zacharewski, 1997). Gerade bei niedrig-chlorierten PCBs, die im Gegensatz zu den höher-chlorierten oxidativ metabolisiert werden können (siehe Kapitel 1.2.3) könnten die Metabolite zu der beobachteten estrogenen Aktivität beitragen.

Nach Behandlung von MCF-7 Zellen mit 10 μ M PCB₃ wurde eine signifikante Proliferationssteigerung beobachtet, die jedoch lediglich 4% der Proliferationssteigerung durch 100 pM E₂ (Soto *et al.*, 1995) entsprach. Eine mögliche Erklärung, warum der estrogenere Effekt von PCB₃ nicht in den Ishikawazellen beobachtet wurde könnte ein unterschiedlicher Metabolismus sein. MCF-7 Zellen exprimieren verschiedene CYPs (siehe Kapitel 3.9.2), die in der Lage sind hydroxylierte Metaboliten von PCBs zu erzeugen, von denen eventuell ein estrogenes Potential ausgeht. Des Weiteren reagieren MCF-7 Zellen empfindlicher auf estrogenere Signale. Während im E-Screen der EC₅₀-Wert etwa 10 pM E₂ beträgt, und eine maximale Stimulation der Proliferation mit 100 pM E₂ erreicht werden, wird die Stimulation der AIP-Aktivität in Ishikawazellen erst bei etwa 20-fach höheren Konzentrationen erreicht (siehe Kapitel 3.1.2).

Mehrere mono-, bi- und trichlorierte PCBs induzierten die Bildung von Foci bei konfluentem Wachstum in MCF-7 Zellen (Gierthy *et al.*, 1997). Dabei hatten alle untersuchten PCBs eine etwa 10000-fach kleinere Potenz zur Focibildung als E₂. Ähnlich wie beim E-Screen wird bei der Beobachtung der Bildung von Foci das Wachstumsverhalten von MCF-7 Zellen beobachtet. Die Proliferation muss jedoch nicht unbedingt vom ER reguliert werden. Die Ergebnisse des Foci-Test geben nur Hinweise auf eine eventuelle estrogenere Wirkung. Unter den untersuchten PCB-Metaboliten gab es welche, die keinen Einfluss auf die AIP-Aktivität hatten. Andere bewirkten entweder eine Stimulation der basalen AIP-Aktivität, eine Reduktion der E₂-induzierten AIP-Aktivität oder beides (Tab. 5). Mehrere Hydroxylierte tri- und tetra-chlorierte PCBs bewirkten eine Zunahme des Uterusgewichts von Ratten (Fielden *et al.*, 1997; Connor *et al.*, 1997; Korach *et al.*, 1988), was auf eine estrogenere Aktivität hinweist (siehe Kapitel 1.2.3). Hydroxylierte tri- und tetrachlorierte PCBs hatten eine relative Bindungsaffinität zum ER von <0,001 im Vergleich mit der Bindungsaffinität von E₂ (1) (Korach *et al.*, 1988; Connor *et al.*, 1997; Ramamoorthy *et al.*, 1997). Verschiedene monohydroxylierte tri- und tetachlorierte PCBs (4-HO-PCB₃₀, 4-HO-PCB₅₆, 2-HO-PCB₇₇) induzierten in einem Reportersystem die Genexpression ER-regulierter Gene (Kitamura *et al.*, 2005). Desweiteren hatten einige hydroxylierte PCBs 10-fach höhere Potenz Foci in MCF-7 Zellen zu induzieren als die Muttersubstanzen. Im Vergleich zu E₂ war die relative Potenz der hydroxylierten PCBs immer noch schwach (0,1%,

Kitamura *et al.* 2005).

Von den MDCBs gibt es kaum Untersuchungen zu Gehalten in menschlichen Geweben. Die HO-PCB-Konzentrationen, die im Menschen beobachtet wurden, lagen bei etwa 10-40% der Gesamt-PCB-Belastung (Bergman *et al.*, 1994; Sandau *et al.*, 2000). In diesen Studien wurden jedoch nur HO-PCBs mit mehr als 3 Chloratomen untersucht.

In reproduktionstoxikologischen und entwicklungstoxischen Studien wurden wenig Hinweise auf eine Interaktion von PCBs mit der Wirkung endogener Hormone im Menschen gefunden. Frauen mit vermehrtem Fischkonsum (New York Angler-Kohorte) wiesen geringfügige Zyklusverkürzungen auf (Mendola *et al.*, 1997). In einer anderen Angler-Kohorte (Michigan, Great Lakes) fand sich eine trendmäßige, aber nicht signifikante Korrelation zwischen vermehrtem Fischkonsum und verzögerter Empfängnis (Courval *et al.*, 1999). Durch unberücksichtigte Confounder-Faktoren erlauben diese Studien jedoch keine eindeutige Aussage.

Mehrere PCBs (PCB52, 102, 138, 153 und 180) wurden in Follikelflüssigkeiten von Schweinen, Ziegen und Schafen im Konzentrationsbereich von 0,45 bis 3,5 ng/mL nachgewiesen. Selbst unter der Annahme, dass die Konzentration der HO-PCBs 50% der Muttersubstanzen betrug, war die Konzentration der PCBs in der Follikelflüssigkeit etwa 100-fach geringer, als die Konzentration an PCBs, die in den Ishikawazellen einen Einfluss auf die AIP-Aktivität hatte.

Tab. 5: Einfluss von PCBs und oxidativen PCB-Metaboliten auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen (Konzentration ab der die AIP-Aktivität signifikant beeinflusst wurde)

Ohne Wirkung	Induktion der basalen AIP-Aktivität	Hemmung der E2-induzierten AIP-Aktivität	Induktion und Hemmung
PCB1	3-HO-PCB3 (10 μ M)	2-HO-PCB3 (25 μ M)	2,5-diHO-PCB1 (25 μ M)
PCB3	4-HO-PCB3 (10 μ M)	2,5-diHO-PCB2 (10 μ M)	PCB2-2,5-Q
PCB9	4-HO-PCB9 (1 μ M)	3,4-diHO-PCB12 (10 μ M)	
2,5-diHO-PCB3	4-HO-PCB12 (ab 10 μ M)	PCB3-2,5-Q (1 μ M)	
	PCB1-2,5-Q (10 μ M)	PCB3-3,4-Q (25 μ M)	
	PCB12-3,4-Q (10 μ M)	3,4-diHO-PCB3 (10 μ M)	

Einfluss der Hydroxylierung von PCBs auf die estrogenen Aktivität Das ortho-substituierte 2-HO-PCB3 hatte ER-antagonistische Eigenschaften (Tab. 5), wohingegen alle untersuchten meta- und para-monohydroxylierten PCBs in Ishikawazellen als ER-Agonisten wirkten (Abb. 40). Dabei waren die an Position-4 hydroxylierten PCBs die stärksten ER-Agonisten (Abb. 40). Verschiedenen hydroxylierte PCBs induzierten die Expression eines Reportergens unter der Kontrolle des humanen ER in Hefeellen (Schultz, 2002). Die Stärke der Induktion war dabei abhängig von der Stellung der Hydroxyl-Gruppe. Der stärkste Effekt wurde bei den para-HO-PCBs >meta-HO-PCBs >ortho-HO-PCBs beobachtet (Tab.5).

Nach Einführen einer zweiten Hydroxy-Gruppe wurde meist keine Induktion der basalen AIP-Aktivität mehr beobachtet (Kapitel 3.2.3). Vier der sechs di-Hydroxy-Verbindungen waren ER-Antagonisten. Verglichen mit den analogen di-Hydroxy-PCBs hatten die PCB-Chinone meist eine gegensätzliche Wirkung auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Beispielsweise induziert 2,5-diHO-PCB2 die basale AIP-Aktivität, während das PCB2-2,5-Q sowohl agonistische als auch eine antagonistische Wirkung zeigte. Im Gegensatz dazu wirkte 2,5-diHO-PCB2 als partieller Agonist während das PCB2-2,5-Q agonistische Eigenschaften hatte. Die Position der Chinon-Struktur zeigte keinen Einfluss auf die estrogenen Wirkung. PCB3-2,5-Q und PCB3-3,4-Q sind beide ER-Antagonisten.

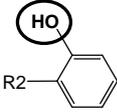
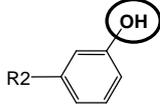
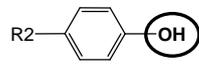
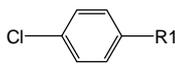
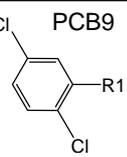
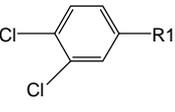
R1 \ R2			
PCB3 	ER-Antagonist	ER-Agonist	ER-Agonist
PCB9 	Kein Effekt	Nicht untersucht	ER-Agonist
PCB12 	Kein Effekt	Nicht untersucht	ER-Agonist

Abb. 40: Einfluss der Hydroxylierung von PCB3, PCB9 und PCB12 auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen.

Einfluss der Chlorsubstitution von PCBs auf die estrogenen Aktivität PCB1, PCB3 und PCB9 hatten keinen Einfluss auf die basale und E2-induzierte AIP-Aktivität. Die unterschiedliche Chlorsubstitution machte sich bezüglich der Wirkung auf die AIP-Aktivität nicht bemerkbar.

Unter den para-hydroxylierten Metaboliten hatte 4-HO-PCB9 die stärkste ER-agonistische Wirkung (signifikant ab $1 \mu\text{M}$). Jedoch wurde ebenfalls bei 4-HO-PCB3 als auch 4-HO-PCB12 eine ER-agonistische Wirkung beobachtet (signifikant ab $10 \mu\text{M}$). Der Chlorierungsgrad hatte demnach keinen deutlichen Einfluss auf die ER-agonistische Wirkung (Abb. 41). Es gibt jedoch Hinweise darauf, dass wenn die Substitution an der ortho-Stellung fehlt, auch die ER-agonistischen Eigenschaften verschwinden.

Eine freie Hydroxyl-Gruppe in para-Stellung und eine ortho-Chlorierung sind möglicherweise Voraussetzungen für eine maximale estrogenen Wirkung (McKinney und Waller, 1994). Ortho-chlorierte PCBs weisen mit hoher Wahrscheinlichkeit eine nicht-koplanare Konformation auf und ähneln damit der Steroidstruktur und besitzen teilweise eine Bindungsaffinität zum ER (Li

und Hansen, 1996; Soontornchat *et al.*, 1994; Connor *et al.*, 1997). Die freie Hydroxyl-Gruppe in para-Stellung scheint für die Aktivierung der Signalweiterleitung über den ER wichtig zu sein.

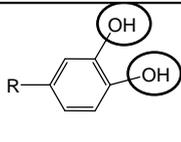
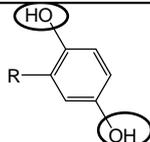
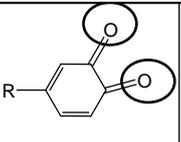
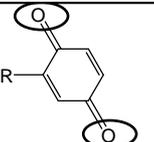
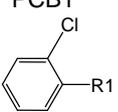
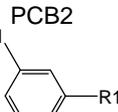
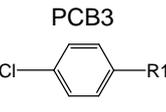
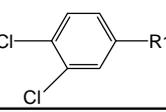
R2 \ R1				
PCB1 	Nicht untersucht	Partieller Agonist	Nicht untersucht	ER-Agonist
PCB2 	Nicht untersucht	ER-Antagonist	Nicht untersucht	Partieller Agonist
PCB3 	ER-Antagonist	Kein Effekt	ER-Antagonist	ER-Antagonist
PCB12 	ER-Antagonist	Nicht untersucht	ER-Agonist	Nicht untersucht

Abb. 41: Einfluss der Chlorsubstitution von PCBs auf die ALP-Aktivität in Ishikawazellen.

3.2.4 DES

Die Bildung von 4-Nitrophenol betrug in der Lösungsmittelkontrolle 25 ± 5 pmol/min und wurde durch E2 (10 nM) um Faktor 10 auf 245 ± 7 pmol/min induziert (Abb. 42). Die Behandlung mit 10 nM DES bewirkte analog E2 eine 10-fache Induktion der Bildung von 4-Nitrophenol. Im Gegensatz dazu hatte DES keinen Einfluss auf E2-induzierte Bildung von 4-Nitrophenol (Abb. 42). Der EC50-Wert lag in diesem Versuch bei 162 ± 30 pM DES und ist geringer als der EC50-Wert von E2 (siehe Kapitel 3.1.2).

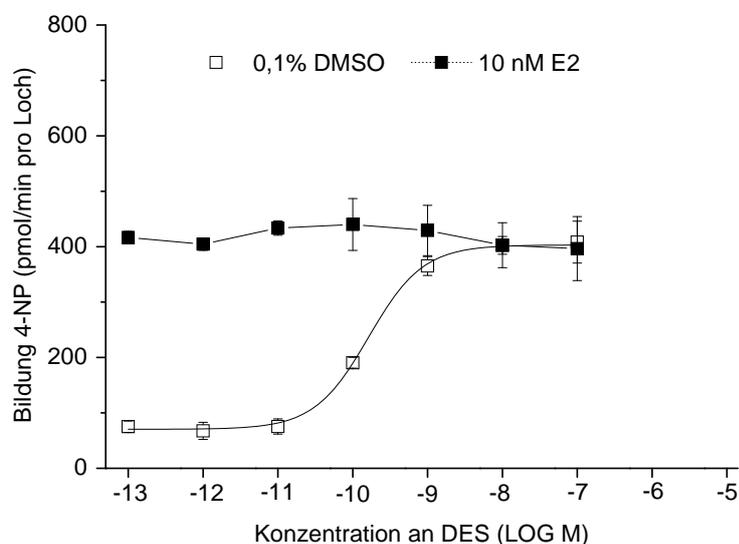


Abb. 42: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) nach Behandlung von Ishikawazellen mit verschiedenen Konzentrationen DES für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten.

Der mittlere EC50-Wert aus 6 unabhängigen Versuchen, die teilweise mit einer anderen Charge an Ishikawazellen durchgeführt wurden, betrug 138 ± 37 pM. Dabei variierte der EC50-Wert von DES von minimal 89 ± 23 pM bis maximal 179 ± 53 pM. Diese Daten stimmen mit anderen Literaturwerten überein, in denen ein analoger Verlauf der Induktion der AIP durch DES und E2 gezeigt wurde (Kotov *et al.*, 1999).

3.3 Expression von Wnt-Genen in Ishikawazellen

DES ist ein synthetisches Estrogen, das bei Exposition *in utero* zu morphologischen Missbildungen des weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt in Mensch und Tier führt (Kapitel 1.3.4). Der Mechanismus, der zu diesen Fehlbildungen führt, ist nicht vollständig aufgeklärt, einen möglichen Angriffspunkt stellt jedoch die Störung von Wnt Signalkaskaden durch DES im sich entwickelnden Genitaltrakt dar. Da es nicht möglich ist die Wirkung von DES auf den sich entwickelnden menschlichen Organismus direkt zu erfassen, sollte ein *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung der Wirkung von DES gefunden werden. Primäre, differenzierte menschliche Zellen des weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt sind keine Zielzellen von DES. Ishikawazellen sind Adenokarzinomzellen des menschlichen Endometriums (siehe Kapitel 3.1). Sie stellen dedifferenzierte Endometriumzellen dar, die jedoch die Fähigkeit haben, in Kokultur mit Stromazellen des Endometriums zu typischen Epithelzellen auszudifferenzieren. Diese Eigenschaften erscheinen denen im sich entwickelnden Endometrium sehr ähnlich. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von DES auf die Expression von Wnt Genen in dem vereinfachten menschlichen Zellsystem, den Ishikawazellen überprüft.

In Mäuseuterus hatte DES einen Einfluss auf die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a, die beide im Endometrium exprimiert werden und im Zusammenhang mit den DES-induzierten morphologischen Fehlbildungen diskutiert werden (Kapitel 1.3.4). Zur Charakterisierung der Expression entwicklungsrelevanter WNT-Gene wurde zunächst die Gesamt-mRNA unbehandelter Ishikawazellen isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mittels kompetitiver PCR und anschließender Auftrennung der Produkte im Agarosegel und Anfärbung mit SybrGreen wurden die relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a bestimmt.

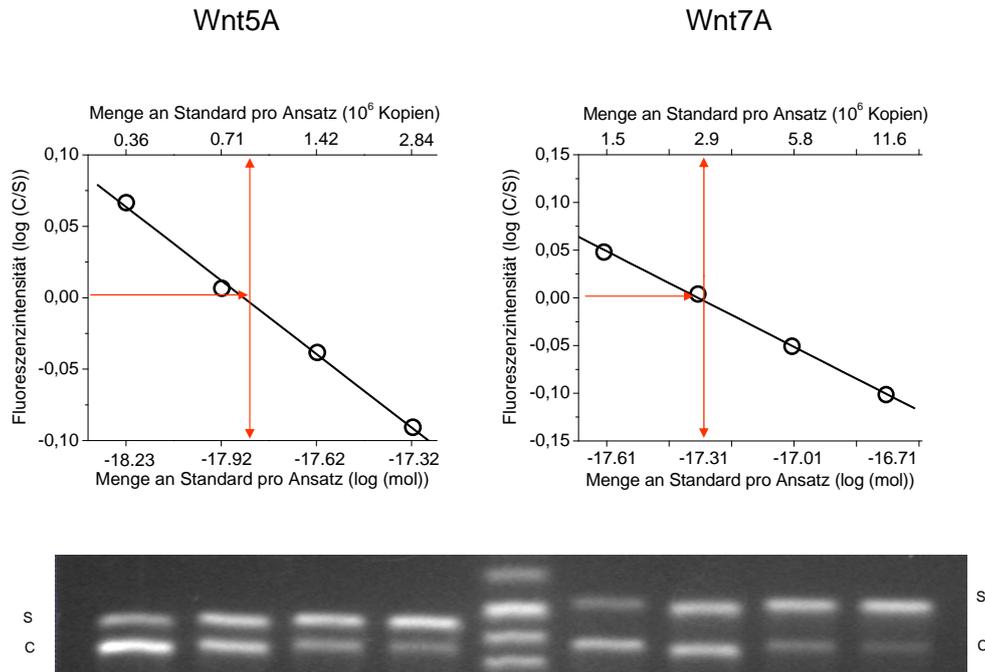


Abb. 43: Auswertung (schematisch) der relativen Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte in unbehandelten Ishikawazellen (oben), anhand einer kompetitiven PCR-Analyse und anschliessender Trennung der PCR-Produkte von Standard (S) und cDNA (C) im Agarosegel (2%) und Anfärbung mit SybrGreen (unten).

In allen Versuchen wurde in der gesamt cDNA der mit 0,1% DMSO behandelten Ishikawazellen zwischen 4 bis 10 amol ($2,4 - 6,0 \cdot 10^6$ Kopien) Wnt5a, 119 bis 375 amol ($72 - 226 \cdot 10^6$ Kopien) Wnt7a und 23 bis 63 amol ($14 - 38 \cdot 10^6$ Kopien) HPRT cDNA pro μg Gesamt-RNA nachgewiesen. Dabei lag das Verhältnis Wnt5a:HPRT im Durchschnitt bei $0,2 \pm 0,09$ und das Verhältnis Wnt7a:HPRT bei $3,96 \pm 1,79$. Ishikawazellen exprimieren also Wnt5a und Wnt7a in einer konstanten und mittels kompetitiver PCR quantifizierbaren Menge.

Mittels "Ribonuclease Protection Assay" wurde ebenfalls die Expression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen nachgewiesen Bui *et al.* (1997). Die Expression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen ist zu erwarten, da die Expression dieser beiden Gene in verschiedensten Zellschichten des Endometrium nachgewiesen wurde. Die Expression von Wnt5a wurde in verschiedenen Tumorzellen und Primärzellen (Bui *et al.*, 1997), sowie in Biopsieproben aus dem adulten humanen Endometrium nachgewiesen (Punyadeera *et al.*, 2005). Zudem wird die Expression von Wnt7a speziesübergreifend im Endometrium von Mäusen, Schafen und Ratten nachgewiesen (Miller *et al.*, 1998a; Deutscher und Yao, 2007; Heikkilä *et al.*, 2001; Hu

et al., 2005; Katayama *et al.*, 2006; Hayashi und Spencer, 2006). Analog zur Expression von Wnt5a wurde die Expression von Wnt7a in Tumorzellen und Primärzellen des Endometriums ((Bui *et al.*, 1997)), als auch in Biopsien des menschlichen Endometriums nachgewiesen ((Tulac *et al.*, 2003)). Die Expression von Wnt7a wurde zusätzlich spezieübergreifend im Epithel des Endometriums in Mäusen, Schafen und Ratten nachgewiesen ((Huang *et al.*, 2005; Couse und Korach, 2004; Carta und Sassoon, 2004; Kim *et al.*, 2003; Hayashi und Spencer, 2006; Katayama *et al.*, 2006)).

3.4 Einfluss von DES auf die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a

Wnt5a Die Genexpression von Wnt5a wurde in Mäusen, die *in utero* gegenüber DES exprimiert waren, im Stroma des Endometriums reduziert und im Epithel induziert (Kapitel 1.3.4). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von DES auf die Expression von Wnt5a in Ishikawazellen untersucht. Ishikawazellen wurden mit 1 und 10 nM DES 2 - 72 h und mit 100 nM DES 6 und 48 h lang behandelt. Nach 2-stündiger Behandlung mit 1 nM DES waren die relativen Wnt5a mRNA-Gehalte signifikant erhöht, während nach Behandlung mit 10 nM DES an diesem Zeitpunkt keine Veränderung zu beobachten war. Im Gegensatz dazu zog die 6-stündige Behandlung mit DES eine konzentrationsabhängige Reduktion der relativen Wnt5a mRNA-Gehalte nach sich (Abb. 44). Bis zum Ende des Experiments nach 72 h blieben die relativen Wnt5a mRNA-Gehalte reduziert, wobei nach 48 h und 72 h keine Konzentrationsabhängigkeit mehr zu erkennen war. Die maximale Reduktion der Wnt5a mRNA-Gehalte auf $26 \pm 4\%$ der Lösungsmittelkontrolle wurde nach Behandlung mit 100 nM DES für 6 h erreicht.

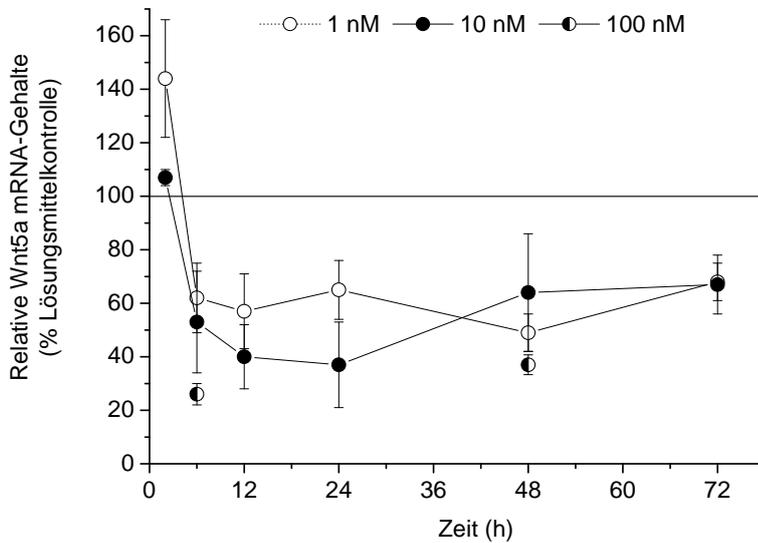


Abb. 44: Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 2 bis 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–6 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 4 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Alle Symbole mit Fehlerbalken unterhalb 100% unterschieden sich statistisch signifikant von der Lösungsmittelkontrolle (100%, schwarze Line; $p \leq 0,05$, Student's t-Test).

Die neonatale Behandlung von Mäusen (Tag 1-5) mit DES führte zu einem erhöhten Wnt5a mRNA-Gehalt im Uterushomogenat von Mäusen (Couse *et al.*, 2001). Zudem bewirkte sie die Expression von Wnt5a im Epithel und Stroma des Endometriums, während Wnt5a normalerweise nur im Stroma exprimiert wird (Huang *et al.*, 2005). Nach Gabe von Ethinylestradiol wurde nach 3 h eine Erhöhung der Wnt5a Expression im Uterushomogenat im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, während nach 6 und 12 h kein Unterschied zur Kontrolle sichtbar war. Im Gegensatz dazu waren die mRNA-Spiegel im Uterushomogenat nach 24 und 48 h auf ungefähr die Hälfte der Kontrolle gesunken Katayama *et al.* (2006).

Wnt7a Die Genexpression von Wnt7a war in Mäusen, die *in utero* gegenüber DES exprimiert waren, im Epithel des Endometriums reduziert (Kapitel 1.3.4). Aus diesem Grund wurde der Einfluss von DES auf die Expression von Wnt7a in Ishikawazellen untersucht. Ishikawazellen wurden mit 1 und 10 nM DES 2 bis 72 h und mit 100 nM DES 6 und 48 h lang behandelt. Die relativen Wnt7a mRNA Gehalte waren nach Behandlung der Zellen für 6 bis 72 h mit 1-100 nM

DES signifikant erniedrigt. Die maximale Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte auf $33 \pm 3\%$ der Lösungsmittelkontrolle wurde nach Behandlung mit 100 nM DES für 48 h erreicht (Abb. 45).

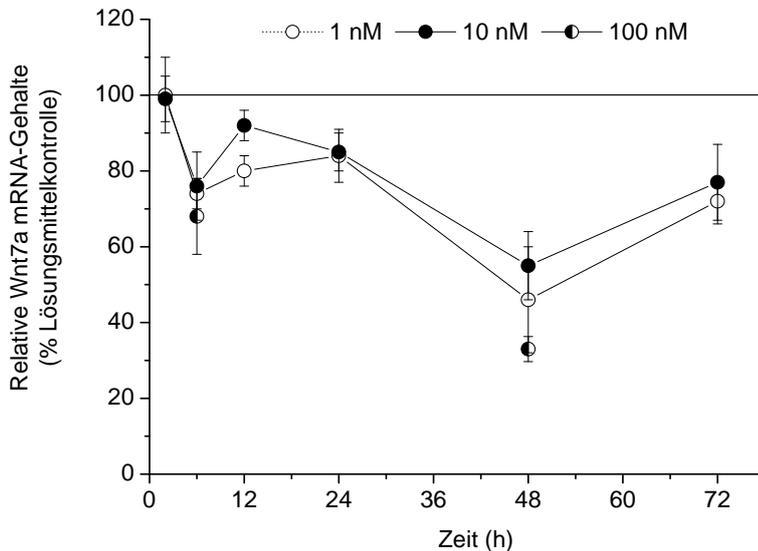


Abb. 45: Relativer mRNA Gehalt von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 2 bis 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–6 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 4 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Alle Symbole mit Fehlerbalken unterhalb 100% unterschieden sich statistisch signifikant von der Lösungsmittelkontrolle (100%, schwarze Linie; $p \leq 0,05$, ANOVA).

Die neonatale Behandlung von Mäusen und Ratten mit DES führte zu einer Reduktion der Wnt7a Expression im Epithel des Endometriums (Carta und Sassoon, 2004; Huang *et al.*, 2005; Katayama *et al.*, 2006) beziehungsweise im Uterushomogenat (Couse und Korach, 2004). Nach Gabe von DES waren die Wnt7a mRNA-Gehalte im Epithel des Endometriums von Mäusen nach 72 h stark reduziert (Carta und Sassoon, 2004). Im Epithel des Endometriums der Ratte führte die Behandlung mit DES nach 24 und 48 h zu einer maximalen Reduktion der Wnt7a mRNA Gehalte. In Grafting-Experimenten mit dem Endometrium neugeborener Mäuse wiesen Mericskay *et al.* (2004) eine Expression von Wnt7a im luminalen Epithel unbehandelter Tiere nach. DES bewirkte auch in diesen Experimenten eine Reduktion der Wnt7a Expression im luminalen Epithel. Die Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte durch Behandlung mit DES in Ishikawazellen war vergleichbar mit der Situation in Mäusen und Ratten, was auf ähnliche

Regulationsmechanismen hindeutet.

3.5 Rolle der Proteinbiosynthese bei der DES-induzierten Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a

DES reduzierte die relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen. Nun stellt sich die Frage wie DES diese Reduktion bewirkt. Erste Untersuchungen sollten zeigen, ob die Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a abhängig oder unabhängig von der Translationsmaschinerie stattfindet. Deshalb wurden Versuche in An- und Abwesenheit eines Hemmstoffs der Proteinbiosynthese (Cycloheximid) durchgeführt. Cycloheximid stört die Peptidsynthese indem es die Anlagerung und den Transport bestimmter tRNAs an die Ribosomen verhindert (Obrig *et al.*, 1971).

3.5.1 Einfluss von Cycloheximid auf die Lebendzellzahl von Ishikawazellen

Zunächst sollte der Einfluss von Cycloheximid auf die Zellzahlentwicklung untersucht werden. Dazu wurden Ishikawazellen in 24-Lochplatten mit 0,1% DMSO in An- und Abwesenheit von Cycloheximid (0,035 - 2,140 μM) für 2 Populationsverdopplungszeiten (48 h) behandelt und anschließend die Zellzahl elektronisch bestimmt. In der Lösungsmittelkontrolle wurden 825701 ± 24551 Zellen pro Loch gemessen (Abb. 46). Die Behandlung mit Cycloheximid bewirkte eine konzentrationsabhängige Verringerung der Anzahl an Ishikawazellen. Nach Behandlung mit 2,14 μM Cycloheximid erreichte die Zellzahl ein Minimum von $15 \pm 3\%$ der Lösungsmittelkontrolle, und lag damit unterhalb der Zellzahl bei Inkubationsbeginn, was auf eine zytotoxische Wirkung hinweist.

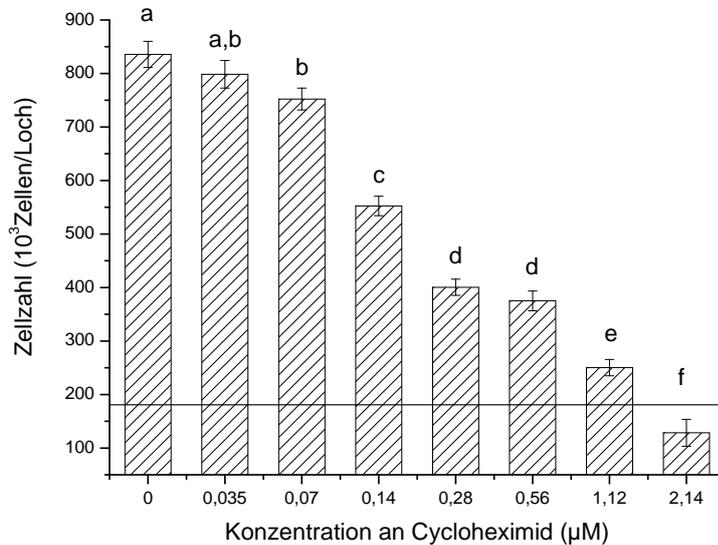


Abb. 46: Anzahl Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit Cycloheximid für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a–f) unterscheiden sich statistisch signifikant ($p \leq 0,05$, Student's t-Test). Die schwarze Linie stellt die Zellzahl bei Beginn der Inkubation dar.

3.5.2 Einfluss von Cycloheximid auf die AIP-Aktivität in Ishikawazellen

Um die minimal notwendige Cycloheximidkonzentration zur vollständigen Hemmung der Protein-synthese zu bestimmen, wurde die AIP als Markerprotein herangezogen. Die AIP eignet sich dafür, da sie durch estrogenaktive Substanzen wie beispielsweise E2 ER-abhängig transkribiert wird und daraufhin die Neusynthese des Proteins erfolgt (siehe Kapitel 3.1.2). Ishikawazellen wurden mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES in An- und Abwesenheit von Cycloheximid (0,03 - 0,96 µM) für 48 h behandelt. Die basale AIP-Aktivität der Lösungsmittelkontrolle lag bei 37 ± 4 pmol/ min /10⁶ Zellen. Nach Behandlung mit 10 nM DES wurde die 7-fache AIP-Aktivität beobachtet (Abb. 47). Cycloheximid bewirkte konzentrationsabhängig eine Reduktion der DES-induzierten AIP-Aktivität, die nach Behandlung mit 0,48 und 0,96 µM Cycloheximid bis auf das Niveau der basalen AIP-Aktivität reduziert war (Abb. 47). Cycloheximid wurde in weiteren Versuchen in einer Konzentration von 0,75 µM eingesetzt, da bei dieser Konzentration die Induktion der AIP-Aktivität durch DES komplett blockiert war.

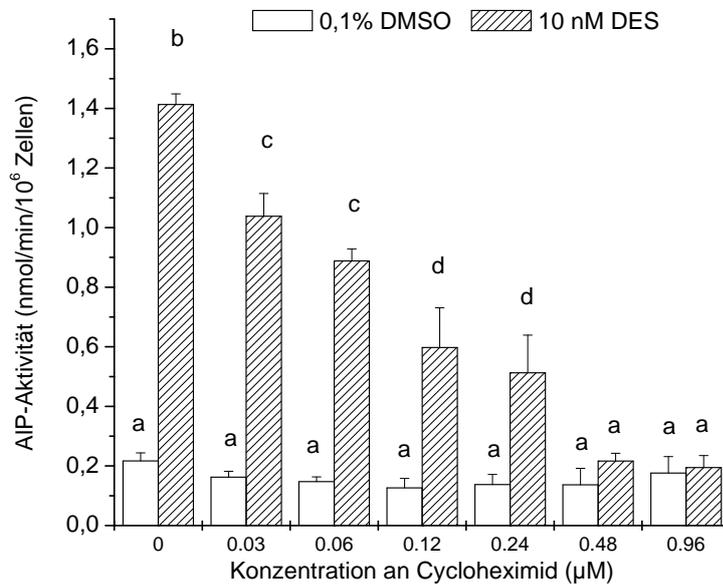


Abb. 47: ALP Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h in An- und Abwesenheit von Cycloheximid. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a–f) unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ($p \leq 0,001$, Student's t-Test).

3.5.3 Einfluss von Cycloheximid auf die DES-induzierte Minderepression von Wnt5a in Ishikawazellen

Ishikawazellen wurden mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 0,75 μM Cycloheximid für 6 h beziehungsweise 48 h behandelt. Anschliessend wurde die Gesamt-mRNA isoliert und die relative Genexpression von Wnt5a bestimmt. Ohne Cycloheximid waren nach Behandlung mit 10 nM DES für 6 und 48 h die Wnt5a mRNA Gehalte wie erwartet auf $73 \pm 6\%$ beziehungsweise $61 \pm 26\%$ der Lösungsmittelkontrolle reduziert (Abb. 48). Die Koinkubation mit Cycloheximid verhinderte die DES-vermittelte Reduktion der Wnt5a mRNA Gehalte. Nach 48-stündiger Behandlung wurde sogar eine leichte Erhöhung auf $115 \pm 1\%$ der Lösungsmittelkontrolle beobachtet (Abb. 48).

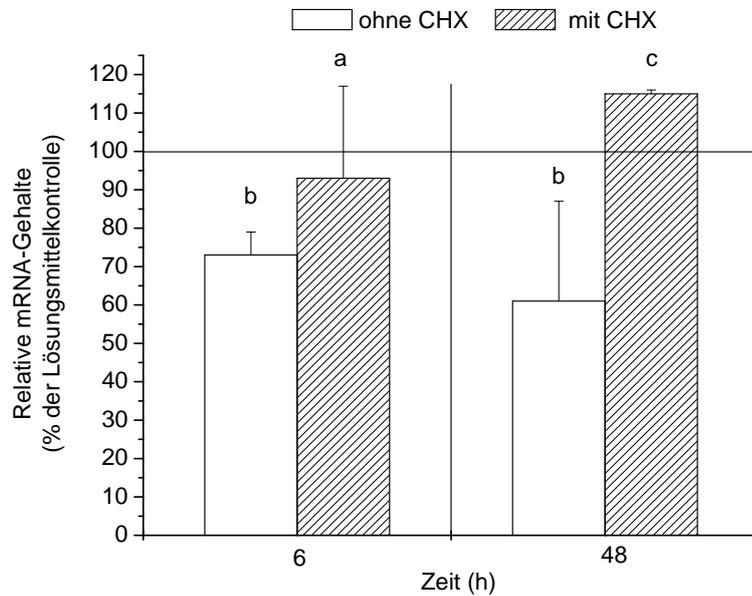


Abb. 48: Relative Wnt5a mRNA-Gehalte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 0,75 μ M Cycloheximid (CHX) für 6 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a-c) unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ($p \leq 0,05$, Student's t-Test, schwarze Linie entspricht a).

3.5.4 Einfluss von Cycloheximid auf die DES-induzierte Minderepression von Wnt7a in Ishikawazellen

Ishikawazellen wurden wie in Kapitel 3.5.3 behandelt, und anschließend wurde die relativen mRNA-Gehalte von Wnt7a bestimmt. Ohne Cycloheximid waren nach Behandlung mit 10 nM DES für 6 und 48 h die Wnt7a mRNA Gehalte wie erwartet auf $78 \pm 10\%$ beziehungsweise $62 \pm 11\%$ der Lösungsmittelkontrolle reduziert (Abb. 49). Die Koinkubation mit Cycloheximid verhinderte die DES-vermittelte Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte (Abb. 49).

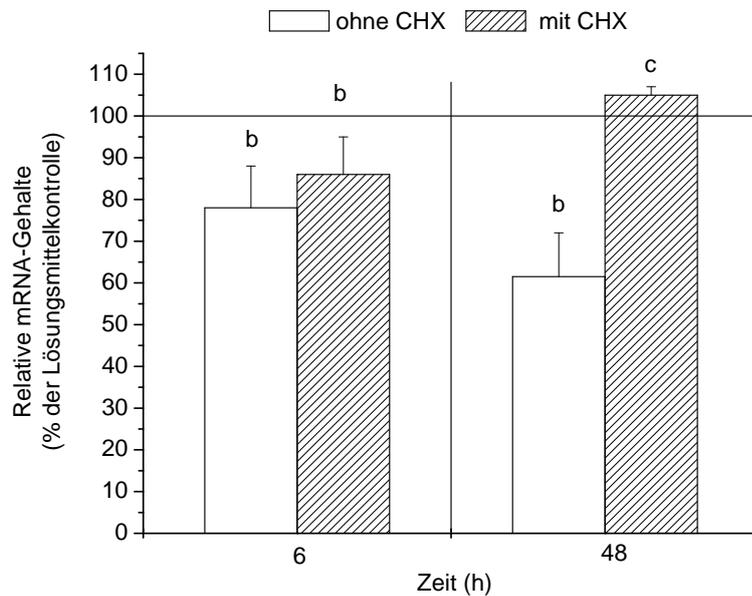


Abb. 49: Relativer Wnt7a mRNA-Gehalte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 0,75 μ M Cycloheximid (CHX) für 6 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a-c) unterscheiden sich statistisch signifikant voneinander ($p \leq 0,05$, Student's t-Test, schwarze Linie entspricht a).

3.5.5 Diskussion

Die Ishikawazellen wurden bis zu 48 h mit Cycloheximid behandelt. Obwohl diese Behandlungszeit üblich ist (Kogai *et al.*, 1997) bedeutet das im Falle der Ishikawazellen eine Hemmung der Proteinsynthese für zwei Verdopplungszeiten, wodurch sie eine teilweise andere Physiologie aufweisen könnten und ganz anders auf Signale reagieren als unter Normalbedingungen. Die nach 48 h beobachtete DES-induzierte Reduktion der Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte wurde durch die Anwesenheit eines Proteinsyntheseinhibitors verhindert (Abb. 48, 49). Die Halbwertszeit des ER α Proteins liegt in MCF-7 Zellen unabhängig von der Ligandenbindung bei 4 h (Eckert *et al.*, 1984), während die Halbwertszeit der ER α mRNA in unbehandelten Ishikawazellen bei 6-10 h liegt (Robertson *et al.*, 2002). Anhand dieser Daten ist davon auszugehen, dass durch Cycloheximid der Gehalt an ER bereits nach 24 h sehr stark reduziert ist. Eine Beteiligung des ER könnte daher die fehlende DES-induzierte Reduktion der Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte nach Behandlung für 48 h erklären. Dabei könnte der ER eine

wichtige Rolle bei der Signalweiterleitung von DES einnehmen, wie in der Maus gezeigt werden konnte (Mericskay *et al.*, 2004). Nach 6-stündiger Hemmung der Proteinsynthese wurde die DES-induzierte Reduktion der mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a nur teilweise aufgehoben. Da der ER-Gehalt nach 6 h nur zu einem Teil reduziert war, gab es möglicherweise noch eine reduzierte Signalweiterleitung über den ER.

3.6 Rolle des ER bei der DES-vermittelten Minderepression von Wnt5a und Wnt7a

Cycloheximid verhinderte die durch DES-vermittelte Reduktion der Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte (Kapitel 3.5.5), möglicherweise unter anderem durch Hemmung der Synthese des ER-Proteins. ER α Knockout-Mäuse, die *in utero* gegenüber DES exponiert waren zeigten weder eine Minderepression von Wnt7a im Endometrium, noch die DES-typischen morphologischen Veränderungen des Reproduktionstrakts (Couse *et al.*, 2001). Der ER wird im Endometrium sowohl im Stroma als auch im Epithel exprimiert, wobei die klassische Stimulation der Proliferation des Epithels nur den ER α im Stroma benötigt (Cooke *et al.*, 1997). Nun sollte sowohl die ER-Abhängigkeit der DES-induzierten Minderepression von Wnt5a und Wnt7a als auch der Einfluss von DES auf die Expression von ER α in Ishikawazellen untersucht werden. Zur Blockierung von ER α wurde zum einen der ER-Antagonisten ICI 182,780 (ICI) und zum anderen die RNA-Interferenz eingesetzt.

3.6.1 Einfluss von DES auf die Genexpression von ER α

Um den Einfluss von DES auf die Genexpression von ER α zu untersuchen wurden Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 24 und 48 h behandelt und anschliessend die relativen ER α mRNA-Gehalte bestimmt. Die ER α mRNA-Gehalte waren nach Behandlung mit DES für 24 h gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (100%) leicht, aber statistisch nicht signifikant auf $138 \pm 25\%$ erhöht (Abb. 50). Im Gegensatz dazu wurde nach 48 h eine Reduktion der ER α mRNA Gehalte auf $63 \pm 8\%$ beobachtet. Die Modulation der Genexpression von Steroidrezeptoren durch ihre Liganden ist ein normaler Vorgang. Ethinylestradiol induzierte in unreifen Ratten nach 1 und 3 h eine leichte, nicht signifikante Erhöhung der ER α mRNA-Gehalte im Uterushomogenat um 20% Katayama *et al.* (2006), während nach 24 und 48 h eine Erniedrigung des ER α mRNA-Gehalts auf etwa 60% der Kontrolle beobachtet wurde. Nach einer dreitägigen Behandlung von Mäusen mit E2 waren ebenfalls die ER α mRNA Gehalts im Uterushomogenat um 60% reduziert (Waters *et al.*, 2001).

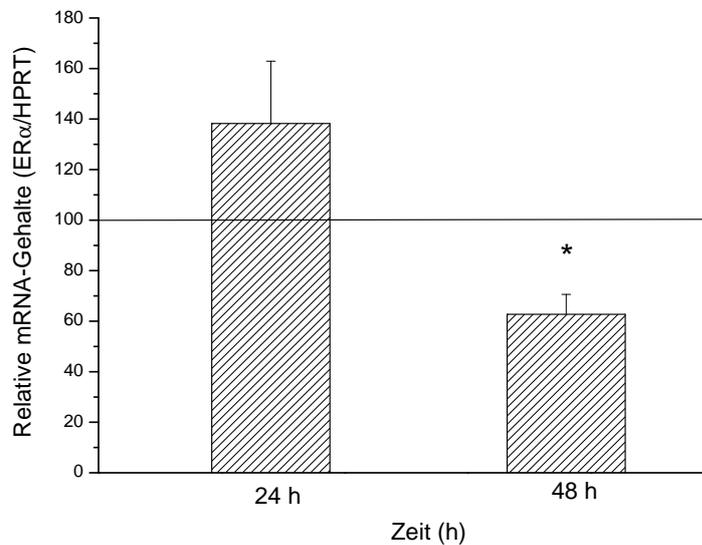


Abb. 50: Relativer mRNA Gehalt von ER α nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–6 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 4 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (schwarze Linie) ($p \leq 0,05$, Student's t-Test).

3.6.2 Einfluss eines ER-Antagonisten auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen

Die relativen ER α mRNA-Gehalte wurden durch DES leicht beeinflusst (siehe Kapitel 3.6.1). Um zu überprüfen welche Auswirkungen eine unspezifische Blockierung des ER durch einen ER-Antagonisten hat, wurden Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 1 μ M ICI für 48 h inkubiert. ICI hat etwa eine halb so große Bindungsaffinität zum ER wie E2 (Sun *et al.*, 2002). 1 μ M ICI (100-facher Überschuss) ist ausreichend um 10 nM E2 komplett vom ER zu verdrängen (Newill *et al.*, 2007). Da DES eine 8-fach höhere Bindungsaffinität zum ER α im Vergleich zu ICI besitzt, sollte der 100-fache Überschuss an ICI dennoch ausreichend sein um 10 nM DES vom ER zu verdrängen. Die induzierte AIP-Aktivität diente als Marker für die Effektivität der Blockierung des ER durch ICI (Kapitel 3.1.2). Die basale AIP-Aktivität von $0,46 \pm 0,05$ nmol/min/ 10^6 Zellen wurde durch Behandlung mit 10 nM DES für 48 h etwa 8-fach induziert (Abb. 51). In Anwesenheit von ICI wurde keine Induktion der AIP-Aktivität durch DES beobachtet (Ab. 51).

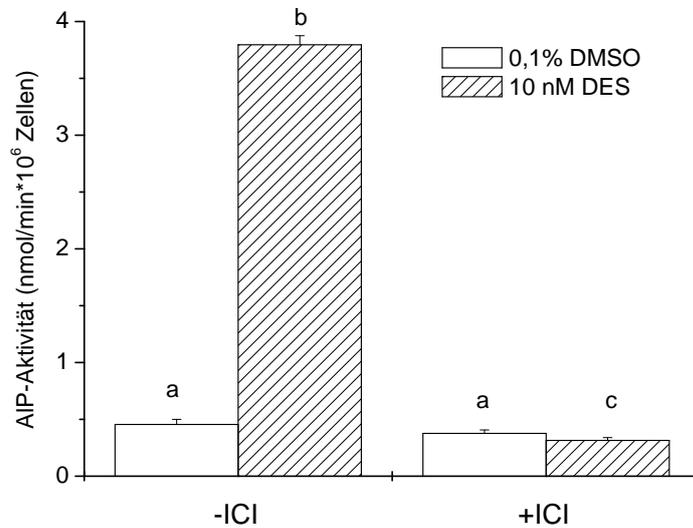


Abb. 51: ALP-Aktivität in Ishikawazellen nach Behandlung mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 1 μ M ICI. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a–c) unterscheiden sich statistisch signifikant ($p \leq 0,05$, Student's t-Test)

Die Behandlung mit 10 nM DES für 48 h bewirkte die erwartete Minderexpression von Wnt5a auf $53 \pm 16\%$ der Lösungsmittelkontrollen (Abb. 52). In Anwesenheit von 1 μ M ICI war keine Minderexpression von Wnt5a zu beobachten, vielmehr lagen die relativen mRNA Gehalte von Wnt5a im Bereich der Lösungsmittelkontrolle ($109 \pm 20\%$, Abb. 52). Auch die durch DES vermittelte Minderexpression von Wnt7a auf $50 \pm 7\%$ der Lösungsmittelkontrolle wurde durch ICI vollständig verhindert (Abb. 52).

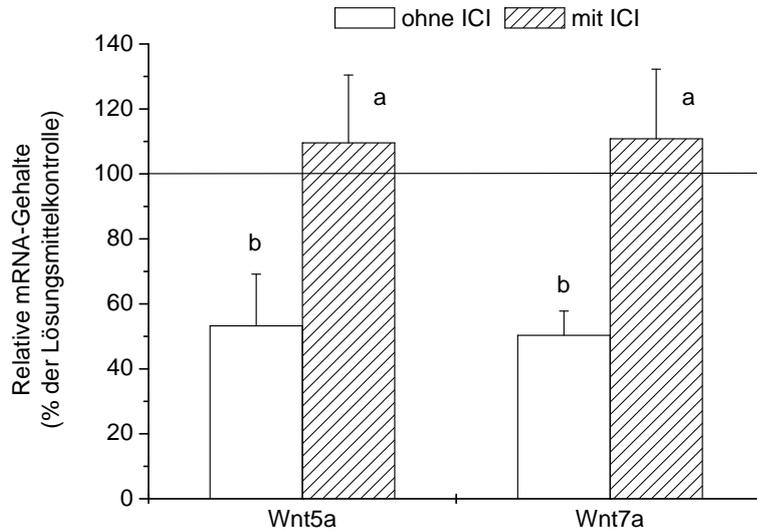


Abb. 52: Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a (links) und Wnt7a (rechts) nach Behandlung von Ishikawazellen mit 10 nM DES in Abwesenheit (weisse Säulen) und Anwesenheit (gestreifte Säulen) des ER-Antagonisten ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a–b) unterscheiden sich statistisch signifikant ($p \leq 0,05$, Student's t-Test), wobei der Spiegel der Lösungsmittelkontrolle (schwarze Linie) a darstellt.

3.6.3 Einfluss des Knockdown von $ER\alpha$ auf die DES-induzierte Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen

Bei der DES-induzierten Minderexpression von Wnt5a und Wnt7a wurde eine ER-Abhängigkeit beobachtet (Abb. 52). Nun sollte spezifisch der $ER\alpha$ mit RNA-Interferenz ausgeschaltet (siehe Kapitel 5.5), und der Einfluss von DES auf die Expression von Wnt5a und Wnt7a untersucht werden.

Verifizierung des Knockdown von $ER\alpha$ Die AIP scheint $ER\alpha$ -abhängig exprimiert zu werden (siehe Kapitel 3.1.3). Daher wurde zur Bestätigung des Knockdown von $ER\alpha$ in Ishikawazellen der mRNA-Gehalt und die Aktivität der AIP als Markergen beziehungsweise Markerprotein bestimmt (3.1.2). Zur Bestimmung der Genexpression wurden Ishikawazellen

mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10 nM siRNA_{ER α} für 24 h vorbehandelt und die Zellen anschließend mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 und 48 h behandelt. Die relativen AIP mRNA-Gehalte betragen nach Behandlung mit 10 nM DES das 5-fache (24 h) beziehungsweise 8-fache (48 h) der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 53, oben). Im Gegensatz dazu wurde nach Behandlung der ER α -Knockdownzellen mit 10 nM DES kein Anstieg der relativen AIP mRNA-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet (Abb. 53, unten).

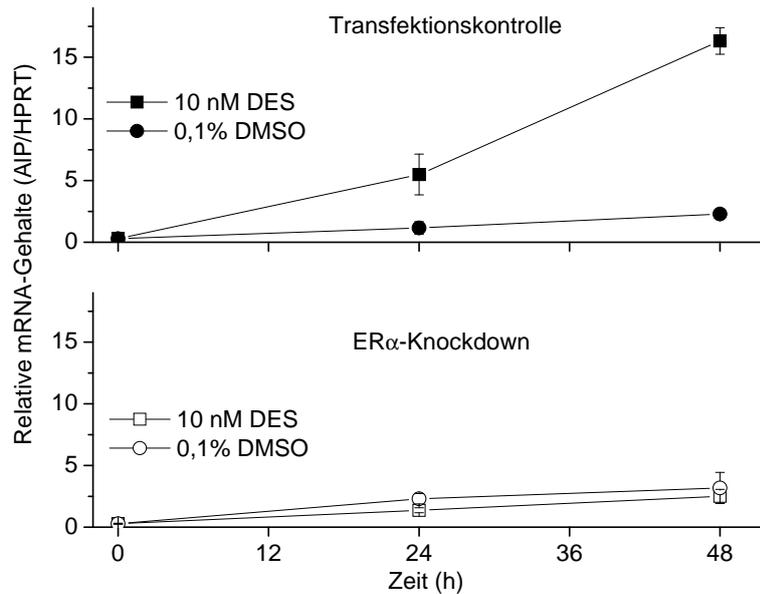


Abb. 53: Relative AIP mRNA-Gehalte von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen unmittelbar nach der Transfektionsperiode (0 h) und nach Behandlung mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Zur Bestimmung der AIP Aktivität wurden Ishikawazellen mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10 nM siRNA_{ER α} für 24 h vorbehandelt und anschliessend mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 12, 24, 48 und 72 h inkubiert. Die basale AIP-Aktivität der Transfektionskontrolle lag bei $0,60 \pm 0,17$ nmol/min/ 10^6 Zellen. Nach Behandlung der Zellen der Transfektionskontrolle mit 10 nM DES war die AIP-Aktivität nach 24 h signifikant um Faktor 3 gegenüber der Lösungsmittelkontrolle erhöht und erreichte eine 14-fache Induktion der AIP-Aktivität nach 72 h. Die basale AIP-Aktivität der ER α -Knockdownzellen lag direkt nach Transfektion bei $0,47 \pm 0,09$ nmol/min/ 10^6 Zellen. Nach Behandlung der ER α -Knockdownzellen mit 10 nM DES für 72 h wurde eine leichte Erhöhung der AIP Aktivität um Faktor 3 gegenüber der

Lösungsmittelkontrolle beobachtet.

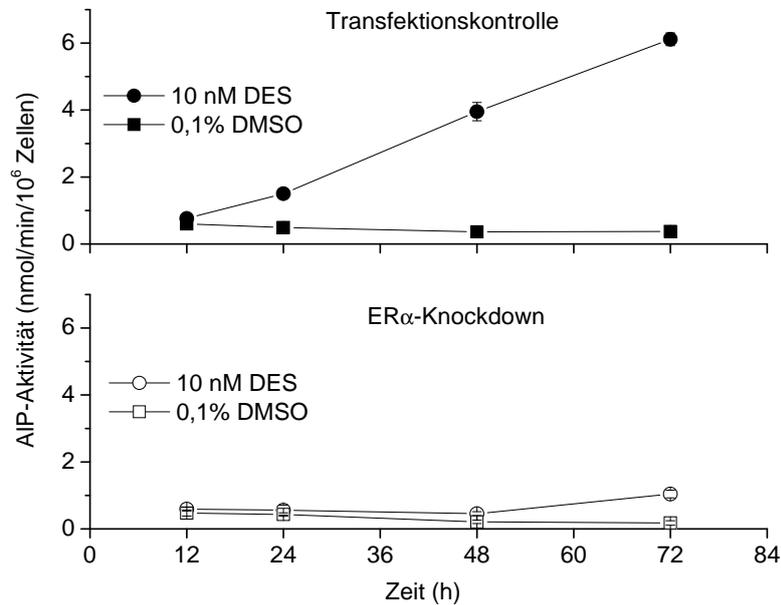


Abb. 54: AIP-Aktivität von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen (0 h) nach Behandlung mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 12, 24, 48 und 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Eine signifikante Erhöhung der AIP mRNA-Gehalte war spätestens 24 h nach Zugabe von DES zu beobachten. Im Gegensatz dazu war bis 48 h nach Zugabe von DES keine Erhöhung der AIP mRNA-Gehalte in den ER α -Knockdownzellen zu beobachten. Die relativen ER α mRNA-Gehalte waren direkt nach der Transfektion auf etwa 20% der Transfektionskontrolle reduziert. 48 h nach der Transfektion waren die relativen ER α mRNA-Gehalte immer noch reduziert (auf 40% der Transfektionskontrolle, siehe Kapitel 3.1.3. Diese Reduktion der relativen ER α mRNA-Gehalte war ausreichend, um die DES-vermittelte, ER α -abhängige Induktion der AIP mRNA für mindestens 48 h zu verhindern. Die AIP-Aktivität war in Ishikawazellen 24 h nach Behandlung mit DES signifikant erhöht, während in den ER α -Knockdownzellen erst 72 h nach Zugabe von DES eine signifikante Induktion festgestellt wurde. Diese Beobachtung passt zum Verlauf der Induktion der AIP mRNA-Gehalte. Innerhalb von 24 h ist eine Erhöhung der AIP mRNA-Gehalte bei ungestörter Translation auch auf Proteinebene nachzuweisen.

Expression von Wnt5a und Wnt7a Um die Bedeutung des ER α für die DES-abhängige Mindereexpression von Wnt5a und Wnt7a zu untersuchen, wurden Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen verwendet 3.1.3. Dazu wurden Ishikawazellen mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10 nM siRNA_{ER α} für 24 h vorbehandelt (Kapitel 5.5). Danach wurden die Zellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 h (Wnt5a) und 48 h (Wnt7a) behandelt. Ausschlaggebend für die Länge der Behandlung mit DES war die maximale Reduktion von DES auf die relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a, die bei Wnt5a nach 24 h und bei Wnt7a nach 48 h erreicht wurde. Nach Behandlung der Zellen der Transfektionskontrolle mit 10 nM DES wurde eine Repression der relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a auf $55 \pm 18\%$ der Lösungsmittelkontrolle beobachtet (Abb. 55). In den ER α -Knockdownzellen zeigte sich nach Behandlung mit DES ein gegenteiliger Effekt. Die relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a waren auf $134 \pm 12\%$ bezogen auf die Transfektionskontrolle erhöht (Abb. 55). Nach Behandlung der Zellen der Transfektionskontrolle mit 10 nM DES für 48 h wurde eine Reduktion des relativen Wnt7a mRNA-Gehalts auf $57 \pm 6\%$ der Lösungsmittelkontrolle festgestellt (Abb. 55). Diese Reduktion konnte in den ER α -Knockdownzellen nicht beobachtet werden. Der relative Wnt7a mRNA-Gehalt lag in den ER α -Knockdownzellen im Bereich der Transfektionskontrolle ($92 \pm 2\%$).

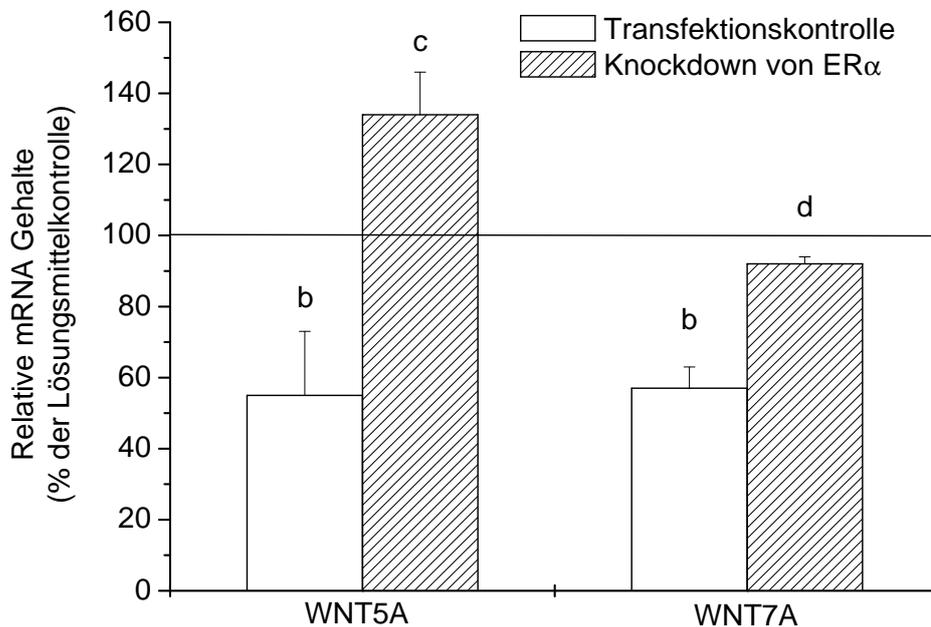


Abb. 55: Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a (links) und Wnt7a (rechts) nach Behandlung von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen mit 10 nM DES für 24 h (Wnt5a) und 48 h (Wnt7a). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Säulen mit unterschiedlichen Buchstaben (a-d) unterscheiden sich statistisch signifikant von der Lösungsmittelkontrolle ($p \leq 0,05$, Student's t-Test), deren Spiegel (schwarze Linie) a darstellt.

3.6.4 Diskussion

Die Verringerung der relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a durch DES konnte durch einen unspezifischen ER-Antagonisten sowie durch Knockdown von ER α verhindert werden. Auch im Endometrium von Mäusen war die Anwesenheit von ER α notwendig zur DES-induzierten Reduktion der Wnt5a mRNA-Gehalte im Stroma (Mericskay *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005) und der Wnt7a mRNA-Gehalte im Epithel Couse *et al.* (2001). DES bewirkte *in vivo* zusätzlich sowohl eine Erhöhung der Wnt5a mRNA-Gehalte im Epithel des Endometriums (Mericskay *et al.*, 2004; Huang *et al.*, 2005) als auch im Uterushomogenat von Mäusen (Couse *et al.*, 2001). Interessanterweise wurde die Induktion der Wnt5a mRNA-

Gehalte ER α -unabhängig vermittelt. Dies deutet auf eine unterschiedliche Regulation von Wnt5a innerhalb des Endometriums hin.

In Ishikawazellen wurde eine DES-vermittelte, ER α -abhängige Reduktion der relativen Wnt5a mRNA-Gehalte beobachtet. Die Wnt5a mRNA-Gehalte werden in Ishikawazellen somit ähnlich wie im Stroma des Endometriums von Mäusen reguliert.

3.7 Rolle von Wnt5a bei der DES induzierten Repression von Wnt7a

In Ishikawazellen ist die DES-induzierte Mindereexpression von Wnt5a und Wnt7a ER α -abhängig. Unklar ist bisher, ob sich Wnt5a und Wnt7a in Ishikawazellen gegenseitig regulieren. Hinweise darauf gibt es anhand von *in vivo*-Untersuchungen in Mäusen, wo die Expression von Wnt5a im Stroma des Endometriums Voraussetzung für die DES induzierte Herunterregulierung der Wnt7a Expression im Luminalem Epithel darstellt. Zur Überprüfung, ob die Expression von Wnt5a in den Ishikawazellen Voraussetzung für die DES-vermittelte Mindereexpression von Wnt7a ist, sollten zuerst die mRNA-Gehalte von Wnt5a mittels siRNA verringert werden, um dann den Einfluss von DES auf die relativen mRNA-Gehalte von Wnt7a in Zellen mit normalem und reduziertem (Wnt5a-Knockdownzellen) Wnt5a mRNA-Gehalt zu bestimmen.

3.7.1 Knockdown von Wnt5a in Ishikawazellen

Um die mRNA-Gehalte von Wnt5a zu reduzieren wurden Ishikawazellen mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10, 20 und 50 nM siRNA_{Wnt5a} für 24 h behandelt. Dabei konnte nach Behandlung mit 10 nM siRNA_{Wnt5a} eine maximale Reduktion der relativen Wnt5a mRNA-Gehalte auf 5% der Transfektionskontrolle beobachtet werden. Deshalb wurde in allen weiteren Versuchen 10 nM siRNA_{Wnt5a} eingesetzt um einen Knockdown von Wnt5a zu erreichen.

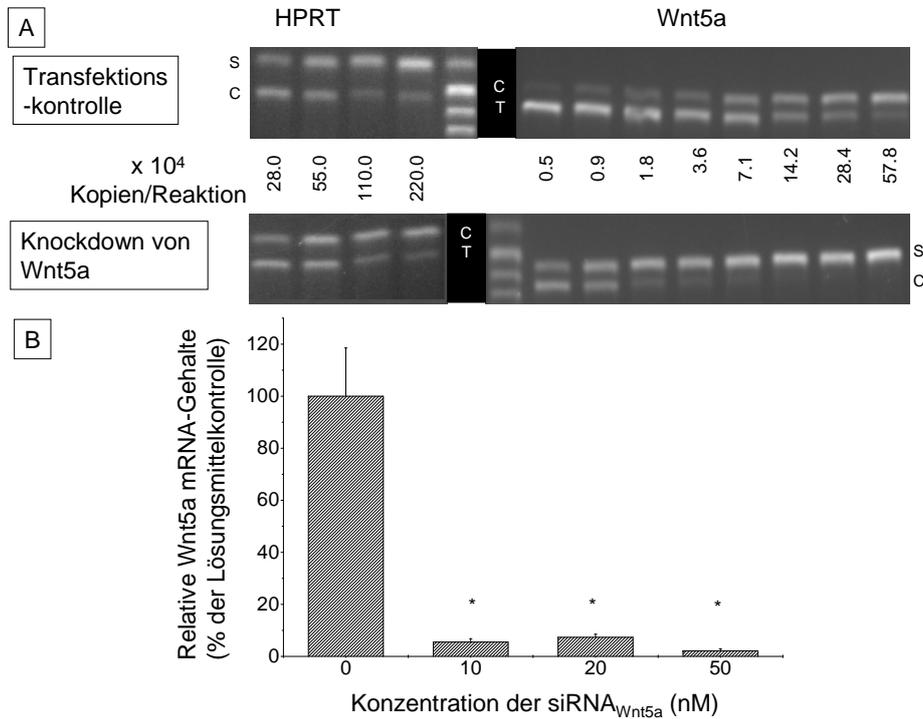


Abb. 56: Knockdown von Wnt5a in Ishikawazellen mittels RNA-Interferenz. A: PCR-Produkte von Standard (S) und cDNA (C) von HPRT (214/163) und Wnt5a der Transfektionskontrolle und nach Knockdown von Wnt5a, nach Auftrennung mittels Agarosegelelektrophorese (2%) und anschließender Färbung mit SybrGreen. B: Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Transfektion von Ishikawazellen mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10, 20 und 50 nM siRNA_{Wnt5a}. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Säulen mit Stern unterscheiden sich statistisch signifikant von der Transfektionskontrolle ($p \leq 0,001$, Student's t-Test).

3.7.2 Einfluss von DES auf die Expression von Wnt5a in Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen

Zur Bestätigung der Vorergebnisse zur Reduktion der Wnt5a mRNA-Gehalte (siehe Kapitel 3.7.1) und einem möglichen Einfluss von DES auf die mRNA-Gehalte von Wnt5a in Wnt5a-Knockdownzellen wurden Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 h behandelt. In den Zellen der Transfektionskontrolle lag der relative Wnt5a mRNA-Gehalt nach Behandlung mit 0,1% DMSO bei $0,121 \pm 0,0224$. Nach Behandlung mit DES wurde eine Reduktion der relativen Wnt5a mRNA-Gehalte um 30% beobachtet (Abb. 57).

Demgegenüber waren die Wnt5a mRNA Gehalte in den mit siRNA_{Wnt5a} behandelten Zellen nach Behandlung mit DMSO und DES stark reduziert (<5% der Transfektionskontrolle, Abb. 57). Die relativen Wnt5a mRNA-Gehalte waren nach Behandlung mit DES im Vergleich zu denen der Lösungsmittelkontrolle. Diese Ergebnisse bestätigen die Resultate des Vorversuchs zur Reduktion des Wnt5a mRNA Gehaltes mittels siRNA (Kapitel 3.7.1).

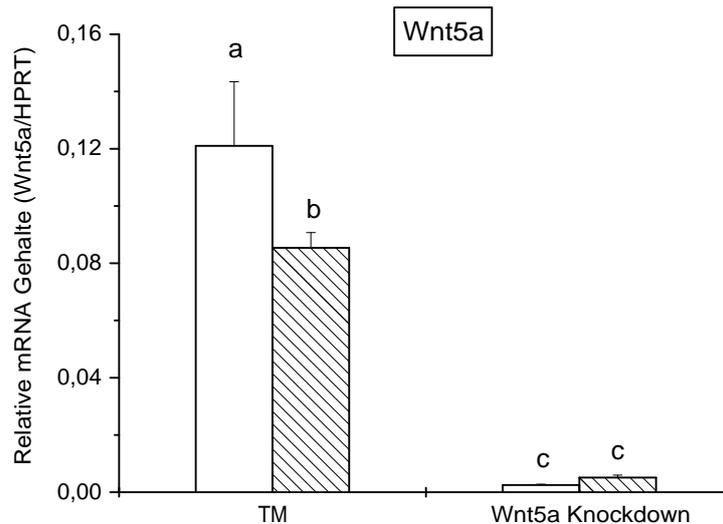


Abb. 57: Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

3.7.3 Einfluss von DES auf die Expression von Wnt7a in Ishikawazellen mit normalem und reduziertem Gehalt an Wnt5a

Um die Rolle von Wnt5a bei der DES-induzierten Minderexpression von Wnt7a in Ishikawazellen genauer zu untersuchen, wurden Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 48 h behandelt. Dabei bewirkte DES in der Transfektionskontrolle wie erwartet eine Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte um 40%. In den Wnt5a-Knockdownzellen wurde die DES-vermittelte Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte nicht beobachtet (Abb. 58).

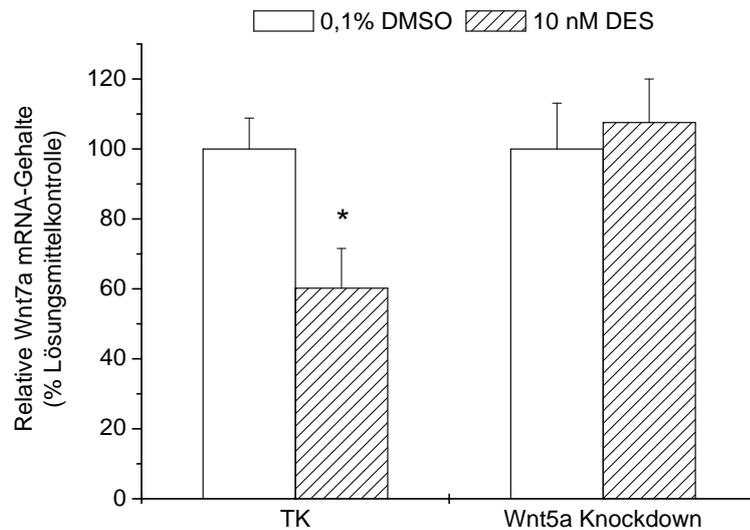


Abb. 58: Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a in Prozent der Lösungsmittelkontrolle nach Behandlung von Ishikawazellen Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Die Absolutwerte der relativen mRNA Gehalte von Wnt7a lagen in der Transfektionskontrolle nach Behandlung mit 0,1% DMSO bei $5,7 \pm 0,5$ (Abb. 59). Die Behandlung mit DES hatte eine Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte auf $3,5 \pm 0,5$ zur Folge. Die relativen mRNA-Gehalte von Wnt7a der Wnt5a-Knockdownzellen betrugen nach Behandlung mit DMSO $3,4 \pm 0,6$, während die Behandlung mit DES keinen Einfluss auf die relativen Wnt7a mRNA-Gehalte hatte (Abb. 59).

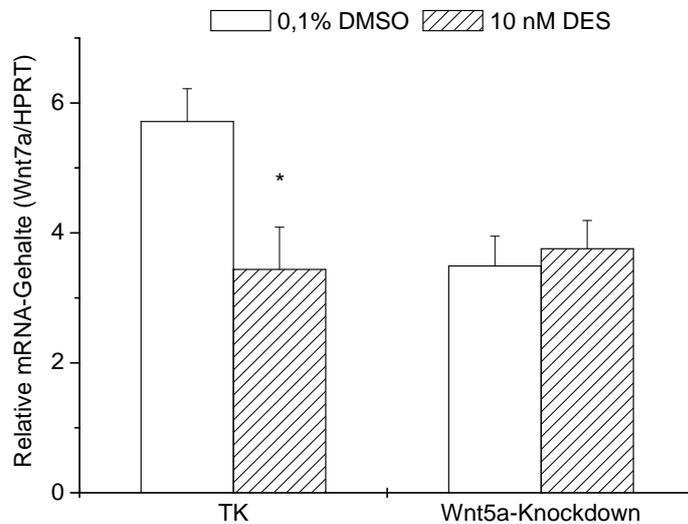


Abb. 59: Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

3.7.4 Diskussion

In Ishikawazellen ist die DES-vermittelte Minderexpression von Wnt7a von der Expression von Wnt5a abhängig. In Wnt5a-Knockdownzellen ist keine DES-vermittelte Minderexpression von Wnt7a zu beobachten. Durch den Knockdown von Wnt5a fehlt möglicherweise ein für die Signalweiterleitung von DES wichtiger Bestandteil. Dadurch wäre DES nicht in der Lage eine Minderexpression von Wnt7a zu bewirken. Eine andere Erklärung wäre, dass die reduzierten Wnt5a mRNA-Gehalte alleine schon zu einer maximalen Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte in Ishikawazellen führen, und eine Behandlung mit DES keinen zusätzlichen Effekt zeigen würde. Der Knockdown von Wnt5a würde genauso wie eine Behandlung mit DES eine Minderexpression von Wnt7a nach sich ziehen. Um diese Frage zu klären müssten die Wnt7a mRNA-Gehalte in Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen quantifiziert werden, oder Untersuchungen auf Proteinebene durchgeführt werden.

Die Abhängigkeit der DES-vermittelten Minderexpression von Wnt5a wurde auch *in vivo* beobachtet. In Mäusen bewirkte DES nur dann eine Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte im

Epithel wenn eine Expression von Wnt5a im Stroma vorhanden war (Mericskay *et al.*, 2004).

3.8 Einfluss von weiteren estrogen-aktiven Substanzen auf die Expression von Wnt-Genen in Ishikawazellen

Estrogen-aktive Substanzen können keiner einzelnen Stoffklasse zugeordnet werden. Sie unterscheiden sich sowohl hinsichtlich ihrer chemischen Struktur als auch in ihrer Herkunft und Vorkommen (siehe Kapitel 1.1). Teilweise haben sie auch unterschiedliche Wirkmechanismen durch welche sie eine estrogene Wirkung vermitteln, und die wiederum ER-abhängig oder -unabhängig sein kann. Je nach untersuchtem Endpunkt und Testsystem können unterschiedliche Wirkungen mit derselben Substanz beobachtet werden. Einige estrogen-aktive Substanzen sollten hinsichtlich ihres Einfluss auf die Expression von Wnt-Genen in Ishikawazellen untersucht werden.

3.8.1 17 β -Estradiol

Eine Exposition mit DES *in utero* führte zu einer kurzzeitigen Minderexpression von Wnt7a im Endometrium von Versuchstieren. Als Folge dieser Minderexpression von Wnt7a kam es zu einer Missbildung des Uterus (siehe Kapitel 1.3.4). Es stellt sich jedoch die Frage, ob für diese Minderexpression von Wnt7a einzig eine ER-Aktivierung oder eine stoffspezifische Wirkung von DES verantwortlich ist. E2 ist ein ähnlich starkes Estrogen wie DES, ist dauerhaft im Körper vorhanden und ist plazentagängig. Der Grund warum E2 jedoch nicht die gleichen Auswirkungen wie DES hat, liegen in einer geringeren Bioverfügbarkeit im Fötus (Bindung an Proteine) und einem schnellerem Metabolismus von E2 begründet (Henry *et al.*, 1984; Harmon *et al.*, 1989). Direkte fetale Gabe von E2 in Mäusen in höheren Dosen hatte vergleichbare Auswirkungen wie DES. Da DES in Ishikawazellen die Minderexpression von Wnt7a induzierte sollte der Einfluss von E2 auf die Wnt7a mRNA-Gehalte in Ishikawazellen mit dem von DES verglichen werden.

Dazu wurden die Zellen mit 0,1 bis 100 nM E2 für 48 h inkubiert, anschließend die RNA isoliert, die Gesamt-RNA in cDNA umgeschrieben und die Wnt7a mRNA-Gehalte mittels kompetitiver PCR bestimmt (siehe Kapitel 5.9.2). E2 bewirkte eine konzentrationsabhängige Reduktion der relativen Wnt7a-mRNA-Gehalte, die bei 1 nM und mehr E2 signifikant war (Abb. 60). Die maximale Reduktion auf $45 \pm 11\%$ der Lösungsmittelkontrolle wurde nach Behandlung mit 10 nM E2 beobachtet (Abb. 60).

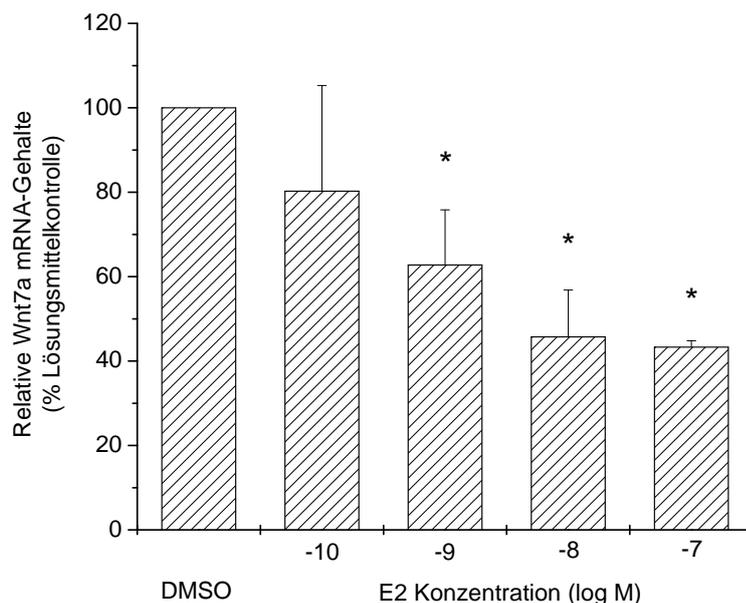


Abb. 60: Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO oder 0,1 bis 100 nM E2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–8 unabhängigen Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test)

Weitere Untersuchungen sollten die Rolle des ER bei der DES-induzierten Minderexpression von Wnt7a zeigen. Dazu wurden Ishikawazellen wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben, mit DMSO oder 10 nM E2 in An- und Abwesenheit von ICI behandelt. In Abwesenheit von ICI reduzierte E2 wie erwartet die Wnt7a mRNA-Gehalte auf $46 \pm 12\%$ der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 61). In Anwesenheit von ICI war jedoch keine Reduktion der Wnt7a mRNA-Gehalte durch 10 nM E2 zu erkennen (Abb. 61).

E2 induziert ebenso wie DES eine ER-abhängige Reduktion der Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte. Der Effekt von DES scheint demnach nicht stoffspezifisch zu sein sondern von der Stimulation des ER vermittelt zu werden.

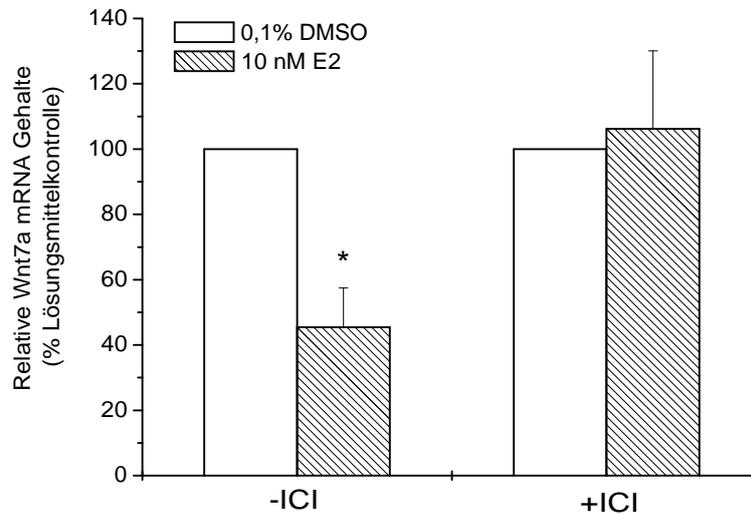


Abb. 61: Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 in An- und Abwesenheit von ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test)

3.8.2 GEN

Als Inhaltsstoff von Soja sind die Isoflavone wie Genistein in großen Mengen in Nahrungsmitteln vorhanden. Die Aufnahme von 30 g Sojamehl pro Tag hatte Auswirkungen auf die Länge des Zyklus von Frauen, was mit der estrogenen Wirkung der Isoflavone zusammenhängen könnte. In Babynahrung werden teilweise etwa 5-fach höhere Dosen an Isoflavonen erreicht (Doerge *et al.*, 2002). Dies ist bedenklich, da GEN in hohen Dosen in Tierversuchen auch positive Ergebnisse im "Uteotrophic Assay" und die Bildung von Adenokarzinomen nach neonataler Behandlung bewirkte (Newbold *et al.*, 2001; Diel *et al.*, 2000). Diese Wirkungen von Genistein werden alleine der ER-vermittelten estrogenen Wirkung zugeschrieben. Da Genistein auch die AIP-Aktivität in Ishikawazellen induzierte sollte folglich der Einfluss auf die Expression von Wnt7a untersucht werden. Dazu wurden Ishikawazellen mit 1 und 10 μ M GEN für 48 h behandelt. Anschliessend wurden die relativen Wnt7a mRNA Gehalte bestimmt. Dabei bewirkte GEN eine signifikante Erniedrigung der Wnt7a mRNA Gehalte (Abb. 62). Eine Behandlung mit 10 μ M GEN bewirkte einen Rückgang auf $42 \pm 12\%$ der Lösungsmittelkontrolle (Abb. 62).

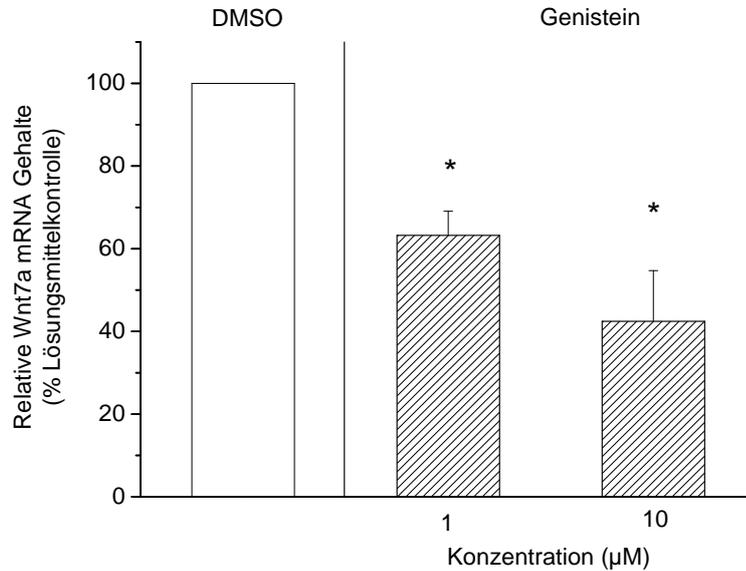


Abb. 62: Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 1 und 10 μM Genistein (GEN) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test)

Die Serum- und Plasmaspiegel an GEN liegen bei Erwachsenen je nach Ernährungsgewohnheiten bei bis zu 5 μM (Allred *et al.*, 2004; Wiseman *et al.*, 2004; Maubach *et al.*, 2003; Safford *et al.*, 2003). Die Behandlung von neugeborenen Mäusen mit Genistein führte in diesem Konzentrationsbereich zu adversen Effekten, die sich in einer veränderten Morphologie des Drüsengewebes der Brust, einem veränderten Zyklus und Unfruchtbarkeit äußerten (Padilla-Banks *et al.*, 2006).

3.8.3 ZEN

ZEN ist ein Mykotoxin, das vor allem in maishaltigen Lebensmitteln nachgewiesen wird. ZEN hat ein starkes estrogenes Potential *in vivo* und *in vitro* (siehe Kapitel 1.2.2). Ob ZEN einen Einfluss auf die Expression von Wnt7a hat sollte untersucht werden. Dazu wurden Ishikawazellen mit 1 bis 100 μM ZEN für 48 h behandelt. Anschließend wurden die relativen Wnt7a mRNA Gehalte bestimmt. Dabei reduzierte ZEN die Wnt7a mRNA Gehalte in allen drei untersuchten Konzentrationen auf etwa 45% der Kontrolle (Abb. 63).

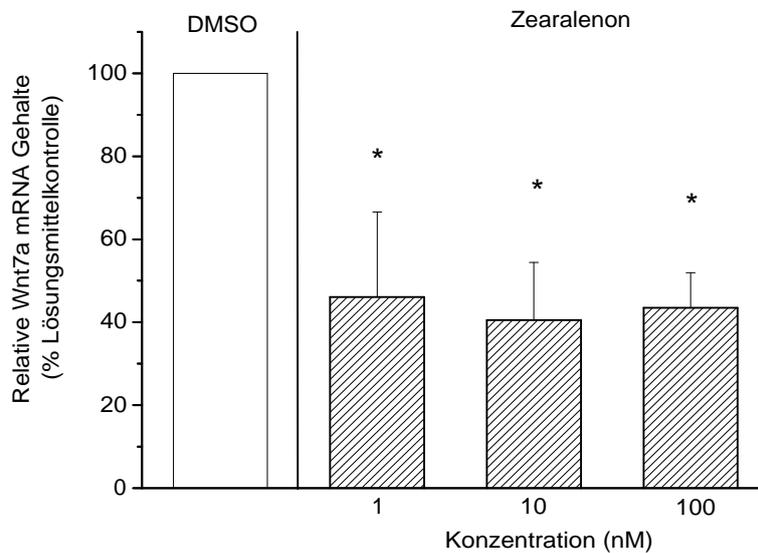


Abb. 63: Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 1 bis 100 nM ZEN für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*: $p < 0,05$, Student's t-Test)

3.8.4 PCB9 und 4-HO-PCB9

PCB9 hatte keinen Einfluss auf die basale und E2-induzierte AIP-Aktivität (siehe Kapitel 3.2.3). Im Gegensatz dazu induzierte 4-HO-PCB die basale AIP-Aktivität. Nun sollte untersucht werden, ob ein Zusammenhang zwischen der Beeinflussung der AIP-Aktivität und einer Veränderung mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a besteht. Als ER-Agonist wurde 4-HO-PCB9 ausgesucht, da es die höchste Potenz bei der Induktion der AIP-Aktivität in Ishikawazellen gezeigt hat. Als Vergleich diente die Muttersubstanz PCB9, die weder die basale noch E2-induzierte AIP-Aktivität beeinflusste. Die Ishikawazellen wurden mit 0,1% DMSO oder 25 μ M PCB9 oder 4-HO-PCB9 behandelt. Nach 24 und 48 h wurden die Gesamt-RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und die relativen mRNA-Gehalte von Wnt5a und Wnt7a bestimmt. Nach Behandlung mit PCB9 für 24 h wurde eine Erhöhung des Wnt5a mRNA-Gehaltes auf $136 \pm 14\%$ der Lösungsmittelkontrolle beobachtet, während nach 48 h kein Unterschied zur Kontrolle mehr sichtbar war (Abb. 64). Im Gegensatz dazu wurde nach Behandlung mit 4-HO-PCB9 für 24 h und 48 h ein statistisch signifikanter Rückgang der relativen Wnt5a mRNA-Gehalte auf $32 \pm 5\%$ beziehungsweise $62 \pm 24\%$ der Lösungsmittelkontrolle beobachtet (Abb. 64).

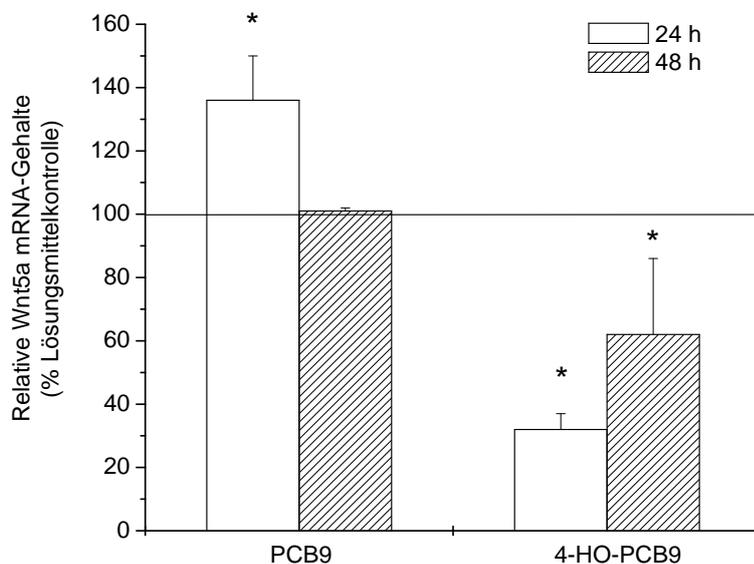


Abb. 64: Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO, 25 μ M PCB9 oder 4-HO-PCB9 für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*:p <0,05, Student´s t-Test).

Die Behandlung mit 25 μ M PCB9 für 24 und 48 h hatte keinen Einfluss auf die relativen Wnt7a mRNA-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 65). Nach Behandlung mit 4-HO-PCB9 für 24 h wurde kein Unterschied der relativen Wnt7a mRNA-Gehalte im Vergleich zur Kontrolle beobachtet, während nach 48 h eine Reduktion der relativen Wnt7a mRNA-Gehalte auf $39 \pm 14\%$ der Lösungsmittelkontrolle nachgewiesen wurde.

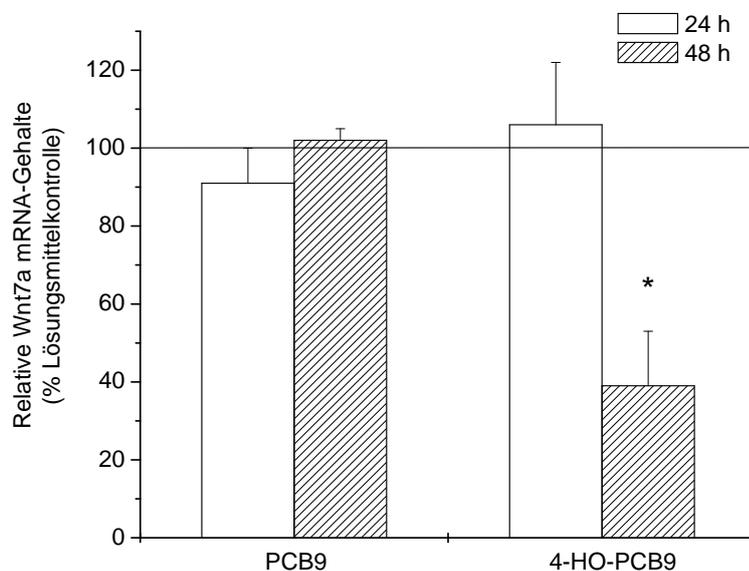


Abb. 65: Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO, 25 μ M PCB9 oder 4-HO-PCB9 für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten. Sterne markieren signifikante Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle (*:p <0,05, Student´s t-Test).

Der ER-Agonist 4-HO-PCB9 reduzierte die Genexpression von Wnt5a und Wnt7a, während PCB9 selber keinen Einfluss auf die Genexpression der Wnt-Gene hatte. Die ER-agonistische Wirkung scheint direkt im Zusammenhang mit der Reduktion der Genexpression von Wnt5a und Wnt7a zu stehen.

3.9 Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in menschlichen Geweben und in MCF-7 Zellen

Die metabolische Aktivierung von E2 zu genotoxischen Chinonen bei gleichzeitiger geringer Deaktivierung trägt zur Tumorinduktion in der weiblichen Brustdrüse bei (siehe Kapitel 1.4.2). Obwohl die Genotoxizität von E2 in einer großen Anzahl an *in vitro*-Testsystemen untersucht wird, ist die Enzymausstattung der E2-metabolisierenden Enzyme in diesen Testsystemen oft unbekannt. Aus diesem Grund wurden Genexpressionsprofile der wichtigsten E2-metabolisierenden Enzyme in MCF-7 Zellen, die ein weit verbreitetes *in vitro*-Testsystem zur Kanzerogenese im menschlichen Brustgewebe darstellen, erstellt. Desweiteren wurde der Einfluss des Serums (steroidfrei und steroidhaltiges) auf die Expression dieser Enzyme untersucht und mit der Enzymausstattung des menschlichen Brustdrüsengewebes verglichen. Da sich der hepatische Metabolismus stark von dem im Brustgewebe unterscheidet, wurde zusätzlich als Vergleich die Genexpression E2-metabolisierender Enzyme im Lebergewebe untersucht.

3.9.1 Herstellung und Charakterisierung der Standards für die PCR

Durch Literaturrecherche wurden zunächst die Isoenzyme von COMT, CYPs, SULTs, UGTs, GSTs und QR identifiziert, die E2, 2-HO-E2 und 4-HO-E2 metabolisieren können. Ein Überblick der wichtigsten Isoenzyme der Enzymfamilien sind in Kapitel 1.4.1 mit Angaben zu ihren Aktivitäten aufgelistet. Nachfolgend wurden die E2-metabolisierenden Enzyme identifiziert, deren Expression im Brustgewebe beschrieben ist (siehe Tab. 6).

Tab. 6: E2-metabolisierende Isoenzyme, deren mRNA oder Protein in Brustgewebe (Tumorzelllinien aus der Brust) beschrieben wurden (l, löslich; m, membrangebunden).

Enzym	Isoenzym	Referenz
CYP	1A1, 1A2, 1B1, 3A4	Turgeon <i>et al.</i> 2001; Chouinard <i>et al.</i> 2006; Thibaudeau <i>et al.</i> 2006
UGT	(1A1), 1A3, 1A4, 1A8, 1A9, 2B7	Aust <i>et al.</i> 2005a,b
SULT	1A1, 1A2, 2A1, 2E1	Ball und Knuppen 1980
COMT	l und m	Albin <i>et al.</i> 1993; Dawling <i>et al.</i> 2004
GST	M1, P1, T1	Montano <i>et al.</i> 2005
QR	1	Danson <i>et al.</i> 2004

Von diesen Enzymen sollten dann die relativen mRNA-Gehalte in Brustgewebe, MCF-7 Zellen

und Lebergewebe bestimmt werden. Dazu wurden zuerst von jedem Enzym Forward-, Reverse-, und Linker-Primer kreiert. Mit Hilfe der Forward- und Linker-Primer eines jeden Enzyms wurde dann ein Standard hergestellt und seine Konzentration bestimmt (siehe Kapitel 5.8). Dieser Standard wurde dann in der kompetitiven PCR eingesetzt um die relativen cDNA-Gehalte der E2-metabolisierenden Isoenzyme zu bestimmen (siehe Kapitel 5.9.2). Die Basenpaarlängen der Proben- und Standard-cDNA sind in Tab. 7 aufgelistet. Zusätzlich sind die minimalen und maximalen Absolutwerte der Isoenzyme aus allen Versuchen und die Nachweisgrenzen aufgelistet (Tab. 7).

Tab. 7: Kenngrößen der kompetitiven PCR-Methode zur Quantifizierung der cDNA E2-metabolisierender Enzyme und des Housekeepinggens HPRT (l, löslich; m, membran-gebunden). Die Minimal- Maximalgehalte und die Nachweisgrenze sind in amol pro 1 μ g Gesamt-RNA angegeben.

Enzym	Isoenzym	cDNA (bp)	Standard (bp)	Minimal- Maximalgehalte	Nachweisgrenze
HPRT		214	176	2,6-24	<0,001
COMT	l + m	357	285	85-3330	<0,01
CYP	1A1	448	351	15-75	<0,01
	1A2	395	299	0,37-434	<0,02
	1B1	383	302	45-240	<0,01
	3A4	238	156	6,4	<0,01
SULT	1A1	122	85	2,2-14,4	<0,01
	1A2	307	231	0,005-5,31	<0,005
	2A1	159	118	53,6	<0,01
	1E1	219	128	14,5	<0,05
UGT	1A1	270	173	75	<0,01
	1A3	247	196	5,5	<0,01
	1A4	221	155	0,01	<0,001
	1A8	246	174	0,02	<0,002
	2B7	232	170	0,06-5,99	<0,006
	1A9	280	207	5,53	<0,05
GST	M1	304	222	0,81-181	<0,08
	P1	231	154	2,3-26	<0,01
	T1	223	171	4,1-25,7	<0,01
QR	1	438	350	5,5-17,5	<0,01

3.9.2 Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in MCF-7 Zellen unter verschiedenen Kulturbedingungen

MCF-7 Zellen werden häufig als *in vitro*-Testsystem bei der Untersuchung der hormonellen Kanzerogenese im Brustgewebe eingesetzt. Die MCF-7 Zellen werden in Medium mit "normalem" FKS kultiviert (MCF-7). "Normales" FKS beinhaltet Spuren von Steroidhormonen (E2: etwa 40 pM (Wilkinson, 1993)). Sobald die Zellen in Versuchen eingesetzt werden, in denen ihre Reaktion auf hormonelle Stimuli untersucht wird, werden die Zellen in Medium mit steroidarmem (charcoal-dextran(cd)-behandeltem) FKS kultiviert (MCF-7cd), während die Zellen in Studien zur Untersuchung der Genotoxizität meist in steroidhaltigem Medium kultiviert werden. Um den Einfluss des Kulturmediums auf die relativen mRNA-Gehalte der E2-metabolisierenden Enzyme in MCF-7 Zellen zu untersuchen, wurde die Gesamt-RNA aus MCF-7- und MCF-7cd Zellen isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels kompetitiver PCR die relativen mRNA-Gehalte bestimmt (siehe Kapitel 5.9.2). Die in den folgenden Abschnitten und Kapiteln genannten prozentualen Angaben beziehen sich auf die Summe der relativen mRNA-Gehalte der untersuchten E2-metabolisierenden Enzyme. Da die Expression vieler Enzyme nicht berücksichtigt wurde, dienen diese Ergebnisse nur als auf die E2-metabolisierenden Enzyme beschränktes Expressionsprofil der MCF-7 Zellen.

Zusammensetzung der Enzymfamilien Während bei den MCF-7 Zellen die CYPs 63% der Gesamt-cDNA der E2-metabolisierenden Enzyme betrug, hatte bei den MCF-7cd Zellen die COMT mit 92% den grössten Anteil an der Gesamt-cDNA der E2-metabolisierenden Enzyme (Abb. 66). Ein weiterer Unterschied lag bei den UGTs, deren cDNA lediglich 0,005% der Gesamt-cDNA der E2-metabolisierenden Enzyme in MCF-7cd Zellen betrug, während sie in den steroidhaltig-kultivierten MCF-7 Zellen überhaupt nicht nachweisbar war (Abb. 66, Nachweisgrenze siehe Tab. 7).

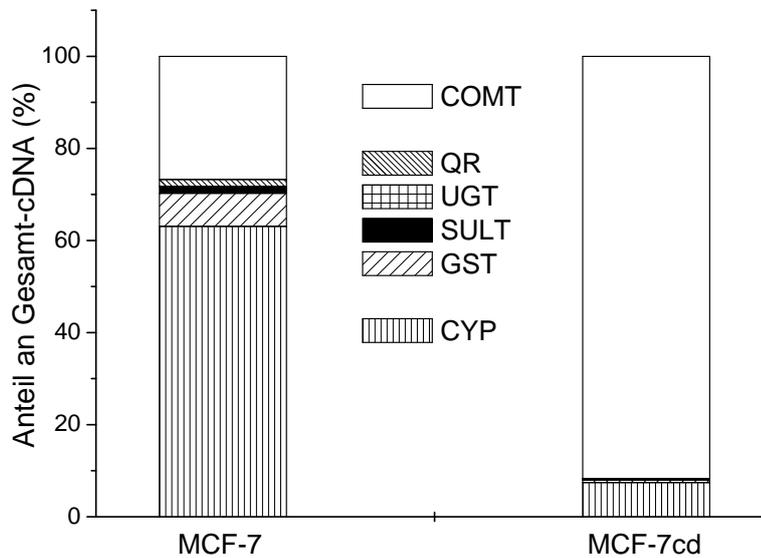


Abb. 66: Prozentualer Anteil der cDNA E2-metabolisierender Enzymfamilien in der Gesamt-cDNA von steroidhaltig (MCF-7) und steroidfrei (MCF-7cd) kultivierten MCF-7 Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

COMT Die relativen COMT mRNA-Gehalte waren in den MCF-7cd Zellen (160 ± 35) 4-fach höher als in den MCF-7 Zellen (35 ± 18 ; $p < 0,01$, Student's t-Test). Die MCF-7 Zellen haben ein COMT-Allel mit geringer Aktivität. Ihre Aktivität zur *O*-Methylierung von 4-HO-E2 betrug etwa 350 pmol/min/mg Protein (Lehmann *et al.*, 2008), was ungefähr 2 μ g COMT pro mg zytosolischem Protein entspricht (Lehmann *et al.* 2008; Basis für die Umrechnung Dawling *et al.* 2001. In ZR-75, die ein WildTyp-Allel der COMT haben, wurde eine 3-fach höhere COMT-Aktivität beobachtet (Dawling *et al.*, 2001). Da E2 und weitere estrogene Stoffe eine Reduktion der relativen COMT mRNA-Gehalte induzierten (Lehmann *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 1999), könnten die niedrigeren relativen mRNA-Gehalte in den MCF-7 Zellen durch das steroidhaltige Medium bedingt sein. Da die COMT mRNA-Gehalte direkt mit der Enzymaktivität in MCF-7 Zellen korrelieren (Lehmann *et al.*, 2008), wäre in den MCF-7cd Zellen eine erhöhte Inaktivierung von CE zu erwarten.

CYP Die relativen mRNA-Gehalte von CYP1B1 waren in den MCF-7 Zellen signifikant höher als in MCF-7cd Zellen ($30,2 \pm 5,6 > 11,0 \pm 0,7$). Im Gegensatz dazu waren die relativen

mRNA-Gehalte von CYP1A1 unter beiden Kulturbedingungen vergleichbar (MCF-7: $2,1 \pm 1,4$; MCF-7cd: $1,4 \pm 0,4$). In der Gesamt-cDNA der MCF-7 Zellen konnte keine CYP1A2-cDNA nachgewiesen werden (Nachweisgrenze siehe 7. Im Gegensatz dazu betragen die relativen mRNA-Gehalte von CYP1A2 in MCF-7cd Zellen $0,017 \pm 0,003$ (Abb. 67).

Die mRNA von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 wurde in MCF-7 Zellen nachgewiesen, die in steroidhaltigem Medium kultiviert wurden. In steroidhaltig kultivierten MCF-7 Zellen wurde eine 7-Ethoxyresorufin-*O*-Deethylase-Aktivität beobachtet, die überwiegend durch CYP1A1 bedingt ist (Mahadevan *et al.*, 2007). (Iwanari *et al.*, 2002; Yu *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2004).

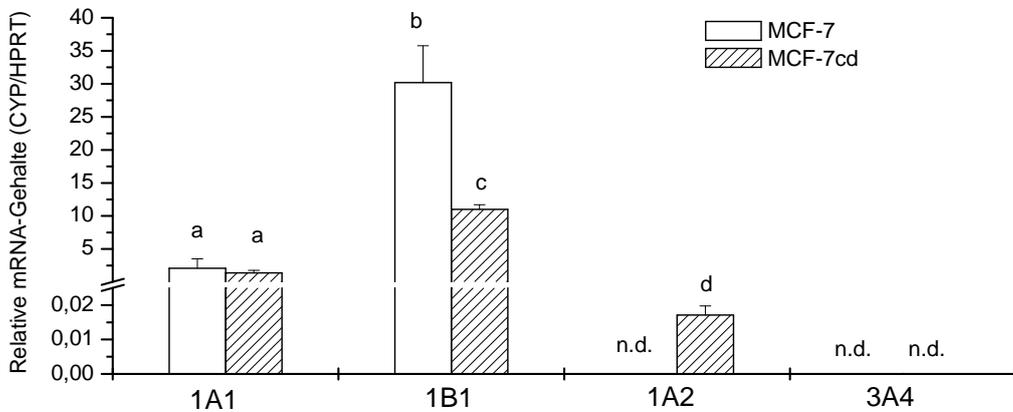


Abb. 67: Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender CYPs in der Gesamt-cDNA von MCF-7 Zellen und MCF-7cd Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (spezifischer cDNA-Gehalt lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

SULT In MCF-7- und in MCF-7cd Zellen wurde die cDNA von SULT1A1 und SULT1A3 nachgewiesen. Die relativen mRNA-Gehalte waren in den MCF-7 Zellen (SULT1A1: $0,7 \pm 0,1$; SULT1A3: $0,004 \pm 0,001$) jeweils eine Größenordnung höher als in den MCF-7cd Zellen (SULT1A1: $0,10 \pm 0,02$; SULT1A3: $0,0002 \pm 0,0001$, Abb. 68). Auch Spink *et al.* (1994, 1998) detektierten die mRNA von SULT1A1 und 1A3 in MCF-7 Zellen, die steroidfrei kultiviert wurden nachgewiesen, während keine mRNA von SULT1A3, 1E1, 2A1 nachgewiesen wurde (Spink *et al.*, 1994, 1998).

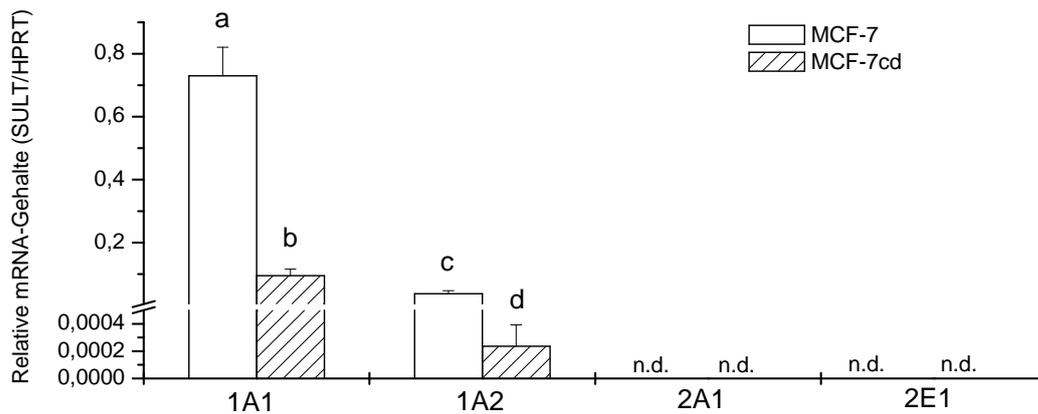


Abb. 68: Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender SULT-Isoenzyme in der Gesamt-cDNA von MCF-7 Zellen und MCF-7cd Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (spezifischer cDNA-Gehalt lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

UGT Während in den MCF-7cd Zellen die cDNA von UGT1A4 ($0,00053 \pm 0,00015$), UGT1A8 ($0,0010 \pm 0,0001$) und UGT2B7 ($0,0073 \pm 0,0006$) nachgewiesen wurde, wurde in den MCF-7 Zellen keine UGT-cDNA in der Gesamt-cDNA nachgewiesen (Abb. 69).

In steroidarm-kultivierten MCF-7 Zellen wurde von Harrington *et al.* (2006) keine UGT2B7-mRNA nachgewiesen, während Hum *et al.* (1999) die mRNA von UGT2B7 in steroidarm-kultivierten MCF-7 Zellen nachgewiesen haben. Brangi *et al.* (1999) wiesen die mRNA von UGT1A und mehrere Glucuronide in MCF-7 Zellen nach, die nicht steroidfrei kultiviert wurden.

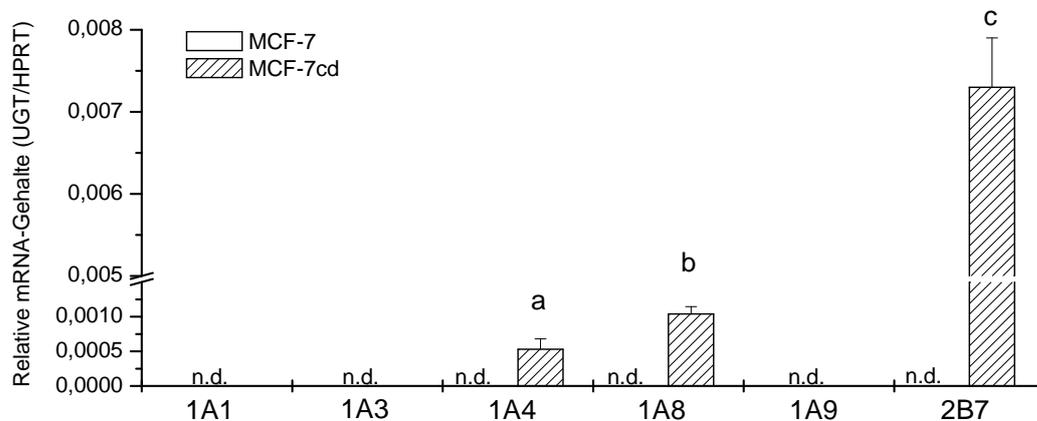


Abb. 69: Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender UGT-Isoenzyme in der Gesamt-cDNA von MCF-7 Zellen und MCF-7cd Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (spezifischer cDNA-Gehalt lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

GST und QR In den MCF-7cd Zellen wurde die cDNA von GSTT1 ($0,90 \pm 0,08$), QR ($0,45 \pm 0,07$) und GSTM1 ($0,037 \pm 0,002$) in der Gesamt-cDNA aller E2-metabolisierenden Enzyme nachgewiesen. In den MCF-7 Zellen wurde die cDNA von GSTM1, T1 und der QR in einem ähnlichen Verhältnis gefunden. Jedoch war der relative mRNA-Gehalt der einzelnen Isoenzyme GSTM1 ($0,15 \pm 0,09$), GSTT1 ($3,53 \pm 0,03$) und der QR ($0,76 \pm 0,29$) in den MCF-7 Zellen generell höher (Abb. 70).

Im Gegensatz zu diesem Ergebnis wurde von Wang *et al.* (1999); Whelan *et al.* (1989) in MCF-7 Zellen, die steroidhaltig kultiviert wurden, weder GSTM-Protein noch GSTM-Aktivität festgestellt. Die mRNA und die Aktivität der QR in MCF-7 Zellen wurde nachgewiesen (Han *et al.*, 2007).

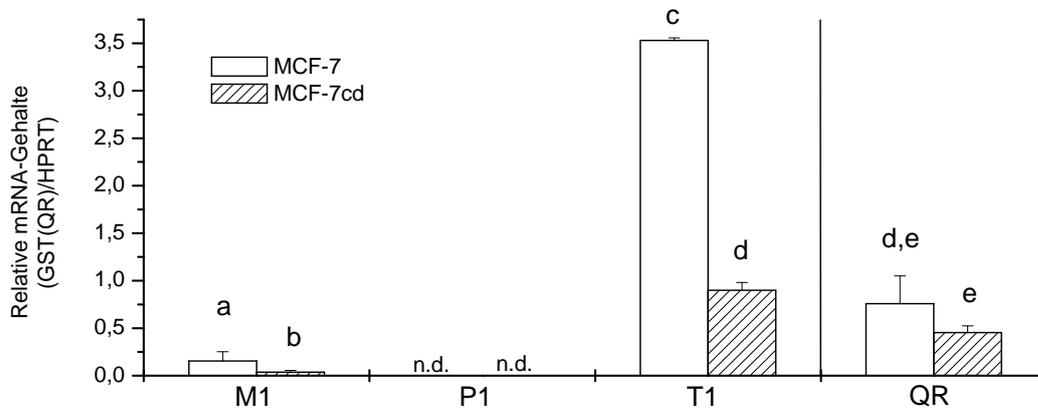


Abb. 70: Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender GST-Isoenzyme und der QR in der Gesamt-cDNA von von MCF-7 Zellen und MCF-7cd Zellen für 24 h kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (spezifischer cDNA-Gehalt lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

Zusammenfassung In MCF-7 Zellen wurde die Genexpression durch unterschiedliche Kulturbedingungen stark beeinflusst. Ausgehend von E2 als Substrat könnte die Bildung von 4-HO-E2 in MCF-7 Zellen durch die höheren mRNA-Gehalte von CYP1B1 (Abb. 67) und dem höheren Verhältnis CYP1B1:CYP1A1 leicht bevorzugt sein. Von den mRNA-Gehalten direkt auf die Aktivität zu schließen ist in diesem Falle vertretbar, da in mehreren Experimenten eine Korrelation zwischen den CYP1A1 und 1B1 mRNA-Gehalten und der Enzymaktivität gezeigt wurde (Spink *et al.*, 2003; Hellmold *et al.*, 1998; Wagner *et al.*, 2008). Dabei bewirkte ein

4-facher mRNA-Gehalt eine Verdopplung der Enzymaktivität (Spink *et al.*, 2003). In MCF-7 Zellen wurde nach einer Halbierung der mRNA-Gehalte von CYP1A1 auch etwa eine Halbierung der EROD-Aktivitäten beobachtet (Wagner *et al.*, 2008).

Die COMT mRNA-Gehalte waren in den MCF-7cd Zellen 4-fach höher als in den MCF-7 Zellen. Die COMT mRNA-Gehalte und die Aktivitäten korrelieren in MCF-7 Zellen (Lehmann *et al.*, 2008). Eine Reduktion der relativen mRNA-Gehalte auf 25% der Kontrolle nach 24 h bewirkte eine Reduktion der Aktivität auf 50% der Kontrolle nach 48 h. Das lässt das auf eine bessere O-Methylierung von Catecholestrogenen in MCF-7cd Zellen schließen.

Die UGT mRNA-Gehalte in MCF-7cd Zellen (Abb. 69) deuten auf eine mögliche Glucuronidierung von Catecholestrogenen hin, während dies in den MCF-7 Zellen nicht möglich zu sein scheint. Auch die UGT mRNA-Gehalte korrelieren mit den Aktivitäten (Chouinard *et al.*, 2007; Tian *et al.*, 2005; Katoh *et al.*, 2005). Bei Reduktion der relativen mRNA-Gehalte von UGT2B7 um 60% in LNCaP-Zellen wurde eine um 50% reduzierte Aktivität beobachtet (Chouinard *et al.*, 2007).

Die relativen RNA-Gehalte der SULTs waren in MCF-7 Zellen wesentlich höher als in MCF-7cd Zellen (Abb. 68). Bei SULTs ist eine Korrelation zwischen mRNA, Proteinmenge und Aktivität nicht immer gewährleistet (Katoh *et al.*, 2005; Maiti *et al.*, 2004). Maiti *et al.* (2004) untersuchten den Einfluss von Parathion und Stress ("erzwungenes Laufen ") auf die Induktion von SUL1A1 und SUL2A1 in der Leber von Ratten. Nach 2-facher Induktion der SUL2A1-mRNA-Gehalte war auch die doppelte Aktivität zu beobachten. Im Gegensatz dazu wurde eine Induktion der SUL1A1-Aktivität beobachtet ohne dass eine Änderung der mRNA-Gehalte erfolgte. Im Gegensatz dazu wurde bei der Untersuchung von 35 Brustkarzinomen eine gute Korrelation zwischen den mRNA-Gehalten, der Proteinmenge und der Aktivität von SUL1E1 beobachtet (Suzuki *et al.*, 2003). Proben mit doppelten SUL1E1 mRNA-Gehalten wiesen auch eine doppelte Enzymaktivität auf.

In MCF-7 Zellen wird E2 vermutlich mit aktiviertem Sulfat konjugiert. Verbleibendes E2 wird vermehrt zu 4-HO-E2 metabolisiert, das dann wiederum durch SULTs und COMT inaktiviert wird (Tab. 8). Im Gegensatz dazu wird E2 in den MCF-7cd Zellen vergleichbar zu 2-HO-E2 und 4-HO-E2 umgesetzt.

Die anschliessenden Konjugationsreaktionen sind vielfältiger als in den MCF-7 Zellen, was zu einem breiteren Spektrum an Metaboliten führen könnte. Die Detoxifizierung von E2-Chinonen könnte in MCF-7 Zellen geringfügig besser erfolgen .

Tab. 8: Relative mRNA-Gehalte E2-metabolisierender Enzyme in MCF-7- und MCF-7cd Zellen. Die relativen mRNA-Gehalte fett gedruckter Isoenzyme waren unter den genannten Kulturbedingungen statistisch signifikant gegenüber der anderen Kulturbedingung erhöht ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Enzym	Isoenzym	MCF-7	MCF-7cd
CYP	1A1	2,8 ± 1,4	1,5 ± 0,4
	1B1	30,0 ± 6,0	11,5 ± 0,7
	1A2		0,018 ± 0,003
COMT		35 ± 18	160 ± 35
SULT	1A1	0,73 ± 0,09	0,10 ± 0,02
	1A3	0,03900 ± 0,00200	0,00025 ± 0,00016
UGT	1A4		0,00055 ± 0,00015
	1A8		0,0011 ± 0,0001
	2B7		0,0073 ± 0,0006
GST	M1	0,155 ± 0,097	0,039 ± 0,018
	T1	3,53 ± 0,30	0,94 ± 0,08
QR		0,76 ± 0,09	0,47 ± 0,07

3.9.3 Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in der Brustdrüse

Um Informationen über die Expression verschiedener E2-metabolisierender Enzyme im menschlichen Brustgewebe zu bekommen, wurde ein Genexpressionsprofil der wichtigsten, bei der Metabolisierung von E2 beteiligten Enzyme in der Gesamt-RNA einer 27-jährigen kaukasischen Spenderin bestimmt (siehe Kapitel 1.4.1).

Zusammensetzung der Enzymfamilien Den größten Anteil an der Expression, bezogen auf die untersuchten Enzyme, hatten die COMT und die CYPs mit etwa 53% beziehungsweise 44%. Danach kamen in absteigender Reihenfolge die GSTs (1,9%), QR (1,2%), SULTs (0,4%) und UGTs (<0,1%) (Abb. 71).

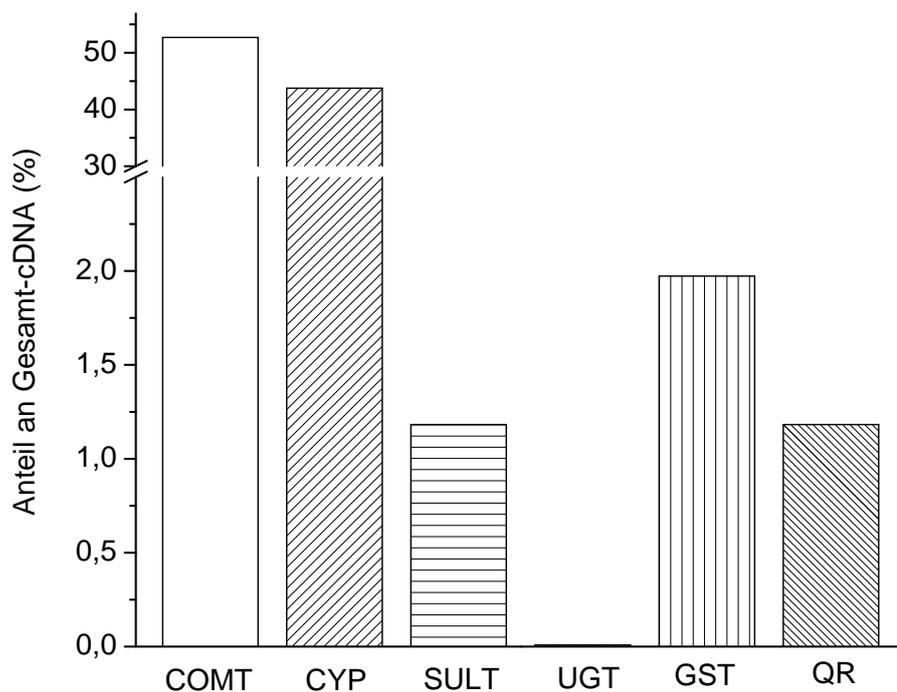


Abb. 71: Prozentualer Anteil der Expression verschiedener E2-metabolisierender Enzymfamilien in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

COMT Der relative mRNA-Gehalt der COMT im menschlichen Brustgewebe war der höchste ($15 \pm 3,6$, Abb. 71) der untersuchten mRNA-Gehalte der E2-metabolisierenden Enzyme. In gesundem Brustgewebe wurde in allen 7 untersuchten Proben eine COMT-Aktivität beobachtet (van Duursen *et al.*, 2004). Dabei spielt im Brustgewebe die O-Methylierung durch die COMT die größte Rolle (Ball und Knuppen, 1980; Zhu, 2002). Ein Großteil der CE wird als O-Methylether im Urin ausgeschieden (Raftogianis *et al.*, 2000).

CYP Die cDNA von CYP1A1 und CYP1B1 wurde in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde die cDNA von CYP1A2- und CYP3A4 in der Gesamt-cDNA der E2-metabolisierenden Enzyme nicht nachgewiesen (Abb. 72). Die relativen mRNA-Gehalte von CYP1B1 ($9,7 \pm 3,7$) waren 3-fach höher als die von CYP1A1 ($3,2 \pm 1,5$). CYP1B1 ist dabei das am höchsten exprimierte CYP-Isoenzym in der menschlichen Brustdrüse, und wird auch in anderen hormon-regulierten Geweben wie Uterus und Ovarien in hohem Maße exprimiert (Quattrochi und Tukey, 1989; Shimada *et al.*, 1996; Hakkola *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 1996). Auch wenn die Absolutwerte der relativen mRNA-Gehalte von CYP1A1 und CYP1B1 in der Brustdrüse sehr stark schwanken, ist der relative mRNA-Gehalt von CYP1B1 meist größer als der von CYP1A1 (Goth-Goldstein *et al.*, 2001). In 61 Proben aus gesundem Brustdrüsengewebe war meist zwischen 2-7 mal mehr CYP1B1 als CYP1A1 mRNA vorhanden (Goth-Goldstein *et al.*, 2001).

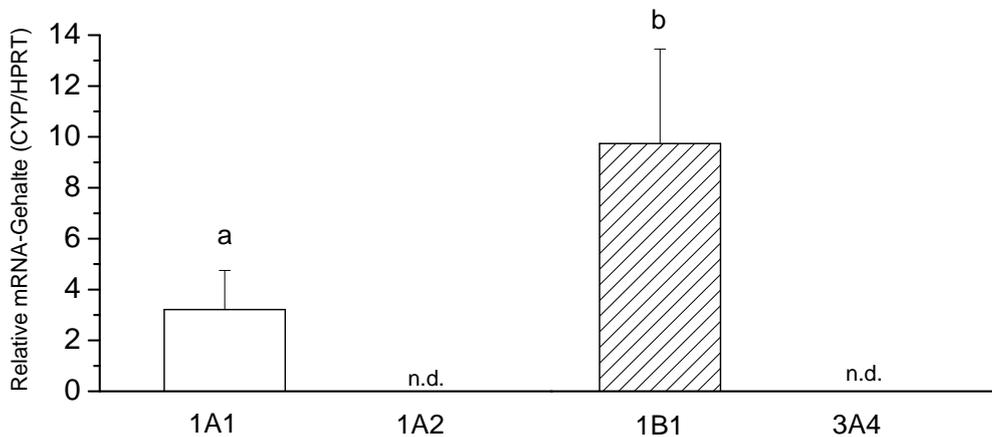


Abb. 72: Relative Expression von E2-metabolisierenden CYPs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (cDNA lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

SULT In der Gesamt-RNA aus menschlichen Brustdrüsengewebe wurde die mRNA von SULT1A1, SULT1A3 und SULT1E1 nachgewiesen (Abb. 73) (Gamage *et al.*, 2006). SULT1A1 war dabei mit einem relativen mRNA-Gehalt von $0,11 \pm 0,037$ am stärksten exprimiert. Die relativen mRNA-Gehalte von SULT1E1 und SULT1A3 betragen $0,002 \pm 0,0003$ beziehungsweise $0,0015 \pm 0,0005$ (Abb. 73). SULT1A1, 1A3, 1E1, 2A1 werden alle konstitutiv sowohl in gesundem Brustgewebe als auch in Tumorgewebe aus der Brust exprimiert (Aust *et al.*, 2005b). E2, 2-HO-E2 und 4-HO-E2 sind Substrate für SULT1A1, 1A3, 1E1 und 2A1 (Falany *et al.*, 2006; Raftogianis *et al.*, 2000; Adjei und Weinshilboum, 2002). Das Isoenzym SULT1E1 besitzt eine etwa 100-fach höhere Affinität zu E2 (Nishiyama *et al.*, 2002) als alle anderen SULTs (Harris *et al.*, 2000; Wang und James, 2005), was auf eine besondere Rolle bei der Konjugation von E2 und den Catecholestrogenen hinweist.

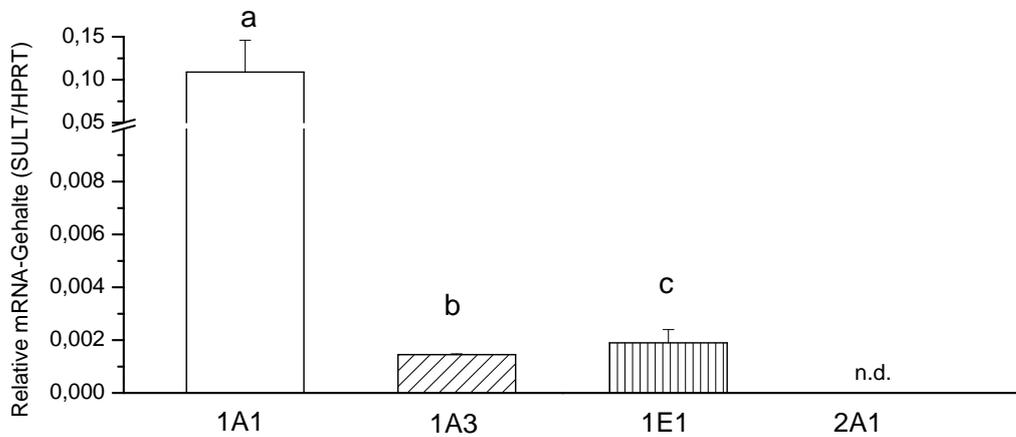


Abb. 73: Relative Expression von SULTs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (cDNA lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

UGT Von den Glucuronosyltransferasen wurde nur die cDNA von UGT2B7 in der Gesamt-cDNA der E2-metabolisierenden Enzyme nachgewiesen ($0,0024 \pm 0,0006$, Abb. 74). UGT2B7 wird bekanntermaßen im Brustgewebe exprimiert (Guillemette *et al.*, 2004; Chouinard *et al.*, 2006). Die mRNA von UGT1A1, 1A4, 1A8 und 1A9 wurde nicht nachgewiesen.

Im Gegensatz dazu konnten Chouinard *et al.* (2006) die mRNA von UGT1A3, 1A4 und 1A8 in menschlichem Brustdrüsenngewebe nachweisen. Zusätzlich wurde mittels Immunfärbung Protein von UGT1A8/9 im Brustepithel nachgewiesen (Thibaudeau *et al.*, 2006). E2 und E2-Catechole sind Substrate für alle UGT1A-Isoenzyme und UGT2B7. UGT2B7 hat die höchste Aktivität für die Glucuronidierung von 4-HO-E2 (Turgeon *et al.*, 2001).

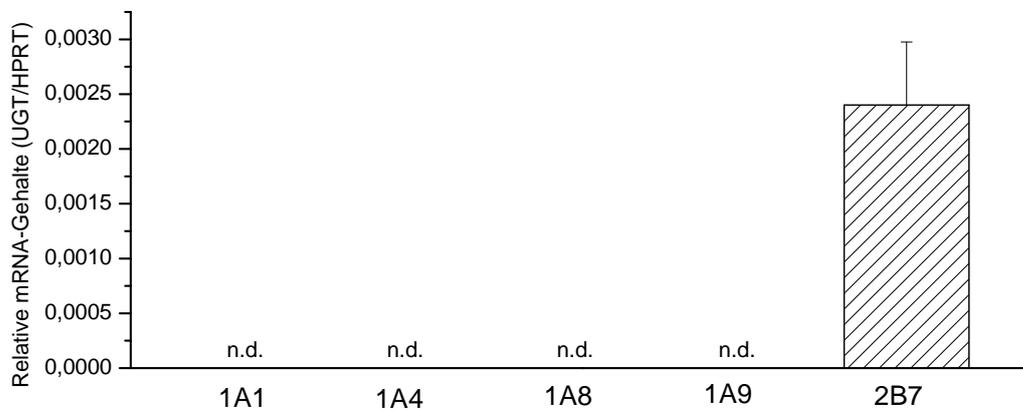


Abb. 74: Relative Expression von UGTs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsenngewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (cDNA lag unter der Nachweisgrenze).

GST und QR Die GSTs und die QR spielen eine Schlüsselrolle bei der Detoxifizierung von Estrogen-Chinonen (siehe Kapitel 1.4.2). Die mRNA von GSTP1, GSTM1, GSTT1 und der QR wurde in der Brustgewebeprobe nachgewiesen. GSTP1 zeigte mit $1,65 \pm 0,29$ die größten relativen mRNA-Gehalte der untersuchten GST-Isoenzyme (Abb. 75). Danach folgten die GSTM1 ($0,35 \pm 0,09$) > GSTT1 ($0,18 \pm 0,04$). GSTP1 kommt von allen GSTs im Brustgewebe in der höchsten Mengen vor, und wird in fast jedem Individuum exprimiert (Kelley *et al.*, 1994), während die GSTM1 dagegen nur bei etwa 40% und die GSTT1 bei 15% der kaukasischen Bevölkerung, zu der auch die Spenderin des Brustgewebes gehört, exprimiert wird. Die relative Expression der QR lag bei $0,41 \pm 0,03$ (Abb. 75).

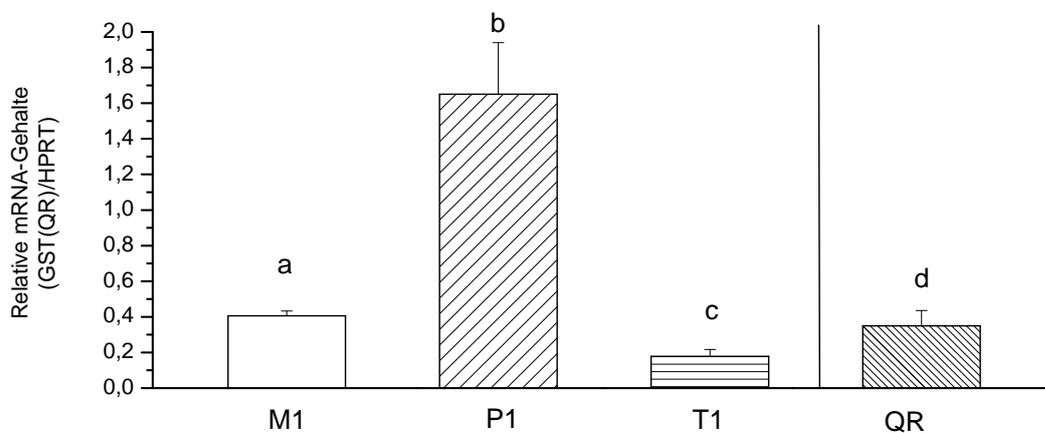


Abb. 75: Relative Expression von GSTs und QR in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Zusammenfassung In der RNA aus dem Brustdrüsengewebe wurde die mRNA von CYP1A1 und 1B1 nachgewiesen, wobei die relativen mRNA-Gehalte von CYP1B1 3-fach höher waren als die von CYP1A1 (Abb. 72). CYP1B1 bildet bevorzugt 4-HO-E2, was zu einem größeren Verhältnis von 4-HO-E2:2-HO-E2 im Brustgewebe als beispielsweise in der Leber führt (Dawling *et al.*, 2004). Im Gegensatz dazu wurde keine CYP1A2 und 3A4 cDNA in der Gesamt cDNA nachgewiesen. CYP1A2 und CYP3A4 sind vor allem für den Metabolismus von E2 zu 2-HO-E2 in der Leber verantwortlich und werden in der Brust nicht exprimiert (Iscan *et al.*, 2001; Shou *et al.*, 1997). Bei der Untersuchung von 25 Proben aus gesundem Brustgewebe wurde bei etwa 25% die mRNA von CYP1A1 nachgewiesen, während die mRNA von CYP3A4 in keiner Probe nachgewiesen wurde (Iscan *et al.*, 2001). In der untersuchten Probe aus dem Brustdrüsengewebe

wurde die mRNA der CYP-Isoenzyme detektiert, die auch in anderen Studien nachgewiesen wurden.

Von den UGTs wurde nur die mRNA von UGT2B7 im Brustdrüsengewebe detektiert (Abb. 74). Im Gegensatz dazu wurde die mRNA von UGT1A4 und 1A8 und das Protein von UGT1A8 und 1A9 im Brustgewebe nachgewiesen (Chouinard *et al.*, 2006; Thibaudeau *et al.*, 2006). Glucuronidierungsprodukte von E2, die in Flüssigkeit aus Zysten im Brustgewebe nachgewiesen wurden deuten auf eine Aktivität von mehreren UGTs im Brustgewebe hin (Bélanger *et al.*, 1990a,b). UGT2B7 konjugiert sehr effektiv 4-HO-E2 und könnte für die Entgiftung genotoxischer Chinone eine Rolle spielen (Lépine *et al.*, 2004; Gestl *et al.*, 2002). Eine Studie in der gesundes Brustgewebe (28 Proben) und Tumor- und Normalgewebe von Erkrankten (37 Proben) untersucht wurde, berichtete von einer signifikanten Reduktion von UGT2B7 mRNA-Gehalten und einer verminderten UGT-Aktivität in den Tumorproben (Gestl *et al.*, 2002). Im untersuchten Brustgewebe wurde die mRNA einiger UGTs, die in der Literatur beschrieben waren, nicht nachgewiesen. Jedoch wurde das für den E2-Metabolismus wichtige UGT2B7 nachgewiesen.

Die cDNA von SULT1A1, 1A2, 1E1 wurde in der Gesamt-cDNA aus dem Brustgewebe nachgewiesen (Abb. 73). Diese Enzyme sind typischerweise im Brustgewebe exprimiert (Aust *et al.*, 2005b). SULT1A1 und 1E1 haben die größte Aktivität bei der Sulfonierung von E2 (Wang und James, 2005), wobei SULT1E1 eine etwa 100-fach höhere Aktivität als SULT1A1 besitzt (Nishiyama *et al.*, 2002). SULT1A1, 1A2, 1E1 sulfonieren zusätzlich die CE mit der gleichen Effizienz (Taskinen *et al.*, 2003).

Im Brustdrüsengewebe wurden zudem GSTM1, P1, T1 und die QR nachgewiesen. Die mRNA von GSTM1, P1, T1 wurde auch in 18 Proben aus menschlichem Brustgewebe nachgewiesen (Kelley *et al.*, 1994). Die mRNA von QR wurde in normalem und Tumorgewebe nachgewiesen (Singh *et al.*, 2005).

In der Probe aus der Brustdrüse wurden die wichtigsten E2-metabolisierenden Enzyme, die auch in der Literatur beschrieben waren, nachgewiesen. Unterschiede waren lediglich bei der Expression von UGTs zu beobachten, wobei jedoch die mRNA des für den E2-Metabolismus wichtigsten Enzymes UGT2B7 nachgewiesen wurde. Die Probe des Brustgewebes kann daher als Referenz für die Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in normalem Brustgewebe dienen.

3.9.4 Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in der Leber

Der hepatische Metabolismus von E2 unterscheidet sich in Leber- und Brustdrüsengewebe deutlich, da sowohl das Spektrum der Isoenzyme sowie deren mRNA-Gehalte differieren. Die Bestimmung der relativen mRNA-Gehalte der E2-metabolisierenden Enzyme in der Gesamt-

RNA einer humanen Leber einer 51-jährigen kaukasischen Frau soll diese Unterschiede deutlich machen. Zusätzlich wurde die Leber-mRNA als Positivkontrolle für die cDNA genutzt, die in der Brustdrüse nicht nachgewiesen wurde (CYP1A2, CYP3A4, UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9 und SULT2A1).

Zusammensetzung der Enzymfamilien Die COMT (49%) und die CYPs (31%) hatten den größten Anteil an der Expression der E2-metabolisierenden Enzyme (Abb. 76). Danach folgten die GSTs (10%), UGTs (5%), SULTs (4%) und die QR (2%) (Abb. 76).

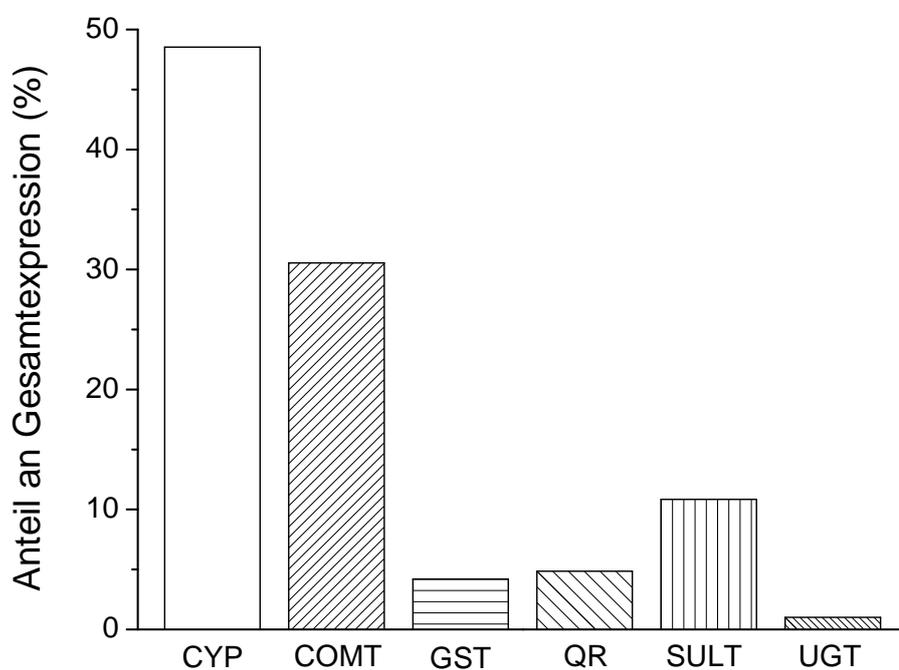


Abb. 76: Prozentualer Anteil der Expression verschiedener E2-metabolisierender Enzymfamilien in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

COMT Der relative mRNA-Gehalt der COMT betrug 328 ± 83 und war damit der größte der E2-metabolisierenden Enzyme.

CYPs Der relative mRNA-Gehalt von CYP1A2 war am höchsten von den untersuchten CYPs (168 ± 21 , Abb. 77). CYP1A2 ist in der Leber konstitutiv hoch exprimiert und beträgt etwa 13% des Proteingehaltes aller CYPs in der Leber (Zhu und Lee, 2005).

Der relative mRNA-Gehalt von CYP1A1 betrug 19 ± 2 und lag bei knapp 15% des mRNA-Gehaltes von CYP1A2. Die relativen mRNA-Gehalte von CYP1B1 waren vergleichbar mit denen von CYP1A1 und betrugen 17 ± 3 . Die kleinsten relativen mRNA-Gehalte bei den E2-metabolisierenden CYP-Isoenzymen wurde bei CYP3A4 beobachtet ($2,5 \pm 0,3$, Abb. 77). In der Leber werden die CYPs 1A2, 2A6, 2B6, 2C9/19, 2D6, 2E1 und 3A4/5 konstitutiv exprimiert (Zhu und Lee, 2005). Die Proteingehalte von CYP1A2 (13%), 2C9/19 (18%) und 3A4 (30%) machen in der menschlichen Leber 61% des Gesamtgehalts aller CYPs in der Leber aus (Zhu und Lee, 2005). Dabei spielen vor allem die CYPs 1A2, 3A4/5 eine große Rolle beim Metabolismus von E2 in der Leber. Während Bergheim *et al.* (2005) deutliche Unterschiede zwischen CYP3A4 mRNA- und Proteingehalten festgestellt haben, zeigte andere Studien sehr gute Korrelationen zwischen mRNA- und Proteingehalten und der Enzymaktivität (Watanabe *et al.*, 2004; Sumida *et al.*, 1999). Die sehr geringen mRNA-Gehalte von CYP3A4 in der Leberprobe sind sehr ungewöhnlich. Die mRNA-Gehalte von CYP3A4 liegen normalerweise im Bereich von CYP1A2 und anderen CYPs (Nishimura *et al.*, 2003). Jedoch wurde bei der Untersuchung von 18 humanen Leberproben kaukasischer Spender eine grosse Variation der CYP3A4 mRNA-Gehalte beobachtet, die maximal bei Faktor 1000 der relativen mRNA-Gehalte lag (Hirota *et al.*, 2004).

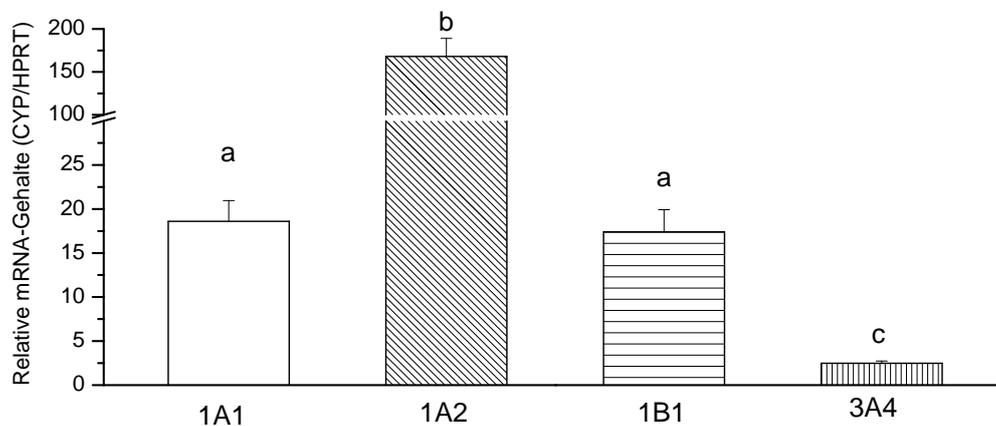


Abb. 77: Relative Expression von CYPs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (cDNA lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

GST In der RNA der humanen Leber war der relative mRNA-Gehalt von GSTM1 der höchste ($70,0 \pm 14,6$, Abb. 78). Das Isoenzym GSTT1 hatte einen relativen mRNA-Gehalt von $3,3 \pm 0,8$. Der relative mRNA-Gehalt von GSTP1 betrug etwa 20% des mRNA-Gehaltes von GSTT1 ($0,88 \pm 0,01$). Der relative mRNA-Gehalt der QR betrug $6,8 \pm 2,6$ (Abb. 78).

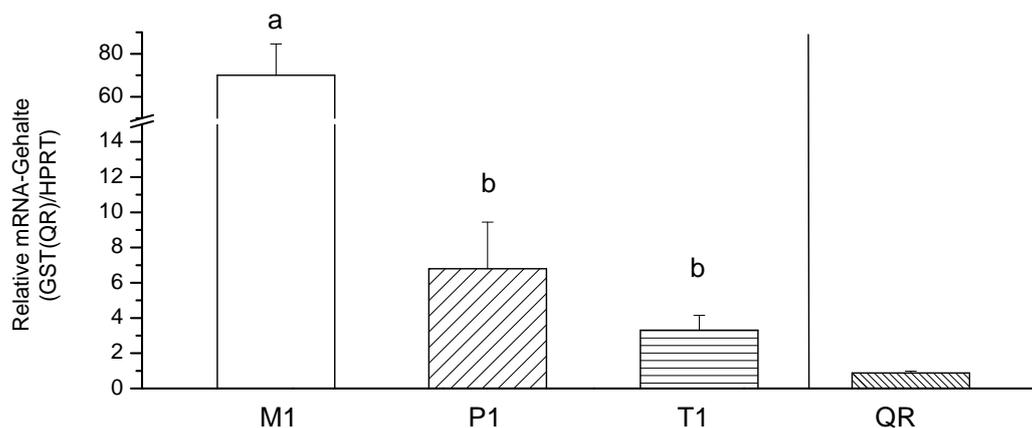


Abb. 78: Relative Expression von GSTs und QR in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test).

UGT In der Leber wurde die mRNA von UGT1A1, UGT1A4, UGT1A9 und UGT2B7 nachgewiesen (Abb. 77). Die größten relativen mRNA-Gehalte hatten UGT1A1 ($24,1 \pm 4,7$) und UGT2B7 ($23,2 \pm 4,2$). UGT1A4 hatte einen etwa 60% geringeren relativen mRNA-Gehalt als UGT1A1 und UGT2B7 ($7,5 \pm 3,3$, Abb. 77). Der kleinste relative mRNA-Gehalt der UGT-Isoenzyme wurde bei UGT1A9 nachgewiesen ($2,1 \pm 0,8$). In der Gesamt-cDNA der Leber wurde keine UGT1A8-cDNA nachgewiesen. Ebenso wurde von anderen Arbeitsgruppen keine mRNA von UGT1A8 in der Leber nachgewiesen, während die mRNA von UGT1A1, 1A4 und 2B7 nachgewiesen wurde (Tukey und Strassburg, 2000).

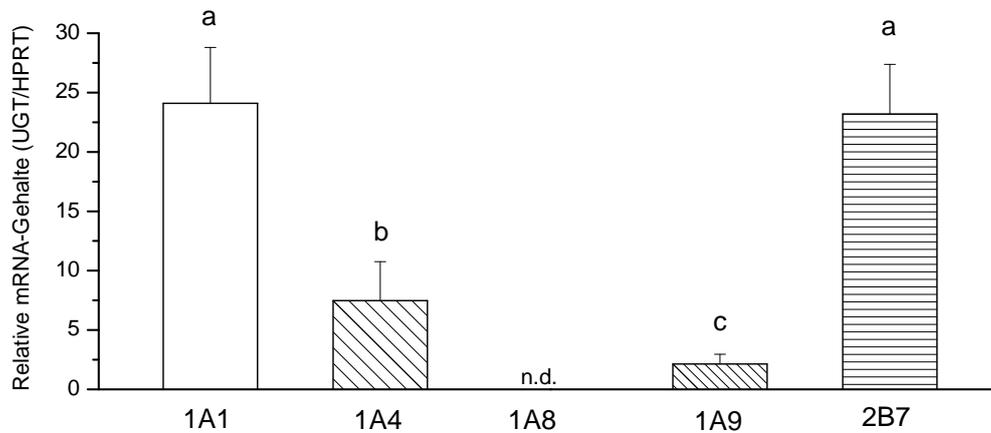


Abb. 79: Relative Expression von UGTs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test). n.d.; nicht detektierbar (cDNA lag unter der Nachweisgrenze, Tab. 7).

SULT SULT2A1 hatte den höchsten relativen mRNA-Gehalte in der Gesamt-RNA der Leber ($20,8 \pm 8,1$, Abb. 80). Der relative mRNA-Gehalt von SULT1A3 betrug 25% des mRNA-Gehalts von SULT2A1 ($5,6 \pm 2,0$) und SULT1E1 ($5,5 \pm 0,4$). Zusätzlich wurde die cDNA von SULT1A1 nachgewiesen, dessen relative mRNA-Gehalte bei $2,1 \pm 0,2$ lagen (Abb. 80). SULT1A1, 1E1 und 2A1 sind die bedeutendsten SULTs in der Leber (Nishiyama *et al.*, 2002). Während in der Leber auch die mRNA von SULT1A3 nachgewiesen wurde (Dooley *et al.*, 2000), wurde noch kein SULT1A3-Protein in der Leber detektiert (Nowell *et al.*, 2005).

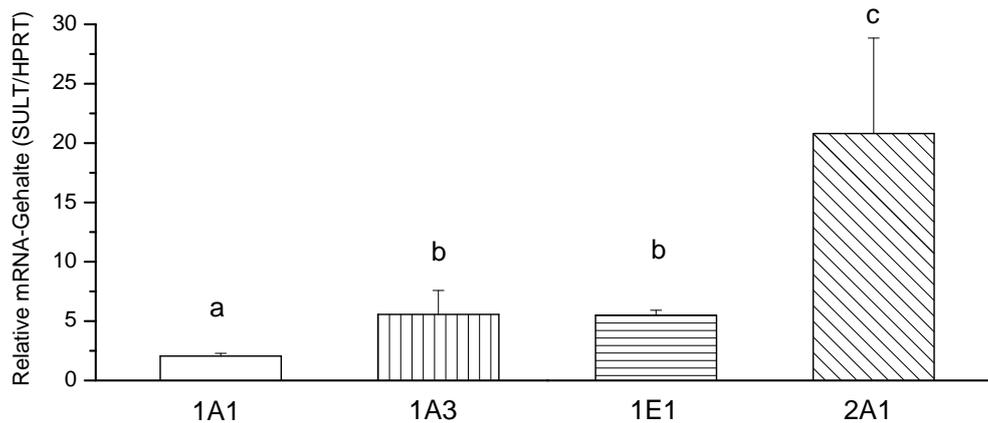


Abb. 80: Relative Expression von SULTs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Bestimmungen. Balken mit unterschiedlichen Buchstaben unterscheiden sich signifikant ($p < 0,05$, Student's t-Test).

Zusammenfassung In der Leberprobe wurde die mRNA von CYP1A1, 1A2, 1B1 und 3A4 nachgewiesen. CYP1A2 und CYP3A4 sind vor allem für Hydroxylierung von E2 zu 2-HO-E2 in der Leber verantwortlich (siehe Kapitel 1.4.1) (Iscan *et al.*, 2001; Shou *et al.*, 1997; Quattrochi und Tukey, 1989), wobei etwa 80% des E2 in der Leber zu 2-HO-E2 metabolisiert wird (Tsuchiya *et al.*, 2005; Bui und Weisz, 1988; Osawa *et al.*, 1993). Die Proteingehalte von CYP1A2 und 3A4 machen in der Leber etwa 40% des Gesamtproteingehaltes aller CYPs aus. Bezüglich der Expression der CYPs unterscheidet sich die Leberprobe bei CYP3A4 von den meisten Literaturangaben. Jedoch wurde bei einigen Individuen eine sehr geringe Expression der CYP3A4 beschrieben (siehe Kapitel 3.9.4).

Das Spektrum der E2-metabolisierenden SULTs, UGTs, GSTs und der QR in der untersuchten Leberprobe ist repräsentativ für bisherige Untersuchungen in der Leber (siehe Kapitel 3.9.4).

3.9.5 Diskussion der Genexpression E2-metabolisierender Enzyme in Zellen und Geweben

In diesem Kapitel wurde die Genexpression verschiedener E2-metabolisierender Enzyme in MCF-7 Zellen unter unterschiedlichen Kulturbedingungen und in der RNA menschlichen Brustdrüsen- und Lebergewebes bestimmt. Die Proben aus dem menschlichen Brustgewebe und der Leber stammen jeweils von nur einem gesunden Spender, was bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden sollte. Aufgrund hoher inter-individueller und intra-individueller (unbekannter Hormonstatus der Spenderin des Brustgewebes) Unterschiede der Genexpression der untersuchten Enzyme sollten die Ergebnisse nicht ohne Weiteres verallgemeinert werden. Allerdings wurden fast alle CYP, COMT, SULT, GST und QR Isoenzyme, deren Expression im Drüsengewebe der Brust beschrieben wurde, detektiert (siehe Kapitel 3.9.3). Die mRNA des Brustgewebes kann daher als Referenz für die Expression von E2-metabolisierenden Enzymen in normalem Brustgewebe dienen. Die Expression E2-metabolisierender Enzyme unterscheidet sich in den MCF-7- und MCF-7cd Zellen teilweise von der im Brustgewebe. In Tab. 9 sind zusammenfassend die relativen mRNA-Gehalte der E2-metabolisierenden Enzyme aus MCF-7- und MCF-7cd Zellen, Brustdrüsen- und Lebergewebe aufgelistet.

Tab. 9: Relative mRNA-Gehalte E2-metabolisierender Enzyme in MCF-7 und MCF-7cd Zellen, Brust- und Lebergewebe.

Enzym	Isozym	MCF-7	MCF-7cd	Brustdrüse	Leber
CYP	1A1	2,8 ± 1,4	1,5 ± 0,4	3,2 ± 1,5	18,1 ± 2,3
	1A2		0,018 ± 0,003		168,000 ± 21,100
	1B1	30,0 ± 6,0	11,5 ± 0,7	9,7 ± 3,7	17,4 ± 2,5
	3A4				2,5 ± 0,3
COMT		35 ± 18	160 ± 35	15 ± 3	328 ± 83
SULT	1A1	0,73 ± 0,09	0,10 ± 0,02	0,11 ± 0,03	5,60 ± 2,00
	1A2	0,03900 ± 0,00200	0,00025 ± 0,00016	0,00145 ± 0,00003	2,06000 ± 0,23000
	1E1			0,0019 ± 0,0004	5,5000 ± 0,4200
	2A1				21 ± 8
UGT	1A1				24,1 ± 4,7
	1A4		0,00055 ± 0,00015		7,48000 ± 3,28000
	1A8		0,0011 ± 0,0001		
	1A9				2,14 ± 0,82
	2B7		0,0073 ± 0,0006	0,0024 ± 0,0005	23,2000 ± 4,1800
GST	M1	0,155 ± 0,097	0,039 ± 0,018	0,406 ± 0,027	70,0000 ± 14,0000
	P1			1,6 ± 0,3	6,8 ± 2,6
	T1	3,53 ± 0,30	0,94 ± 0,08	0,18 ± 0,034	3,31 ± 0,83
QR	1	0,76 ± 0,09	0,47 ± 0,07	0,3500 ± 0,0856	0,88 ± 0,1

Die Hydroxylierung von E2 durch CYPs ist in den MCF-7cd Zellen dem Brustgewebe sehr

ähnlich, während die erhöhte Menge an CYP1B1 in den MCF-7-Zellen zu einer erhöhten Menge an 4-HO-E2 im Vergleich zum Brustgewebe führen könnte. Diese Annahme wird durch die Tatsache unterstützt, dass die mRNA-Gehalte von CYP1A1 und CYP1B1 gut mit den Enzymaktivitäten korrelieren 3.9.3. Die Konjugation der CE ist in MCF-7cd Zellen am effektivsten und wird durch ein breites Spektrum an COMT, SULTs und UGTs bewirkt. Besonders der hohe COMT mRNA-Gehalt, der auch als Maß für die Enzymaktivität betrachtet werden kann (siehe Kapitel 3.9.2), würde eine hohe Konjugation von CE bewirken. Die MCF-7 Zellen und das Brustdrüsengewebe könnten die CE in gleichem Maße konjugieren, sind aber unter Umständen durch den niedrigeren COMT mRNA-Gehalt und das kleinere Spektrum an SULTs und UGTs jedoch nicht so effizient wie die MCF-7cd Zellen. E2-Chinone würden von MCF-7 Zellen besser detoxifiziert werden als in dem Brustdrüsengewebe, während die Detoxifizierung von Chinonen von MCF-7cd Zellen nicht so gut wie im Brustdrüsengewebe ist.

Die MCF-7 Zellen erscheinen als *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung der Genotoxizität von E2-Metaboliten gut geeignet. Sie haben im Vergleich zum Brustgewebe ein ähnliches Expressionsprofil an E2-metabolisierenden Enzymen. Selbst die relativen mRNA-Gehalte unterscheiden sich nur geringfügig, insbesondere wenn interindividuelle Schwankungen berücksichtigt werden. Bei den MCF-7cd Zellen ist das Verhältnis von CYP1B1:COMT im Vergleich zum Brustdrüsengewebe und den MCF-7 Zellen stark erniedrigt. Daher könnte bei der Untersuchung der Genotoxizität von 4-HO-E2 in den MCF-7cd Zellen die Bildung von genotoxischen Metaboliten eventuell unterschätzt werden.

4 Zusammenfassung

Ishikawazellen wurden als *in vitro*-Testsystem zur Charakterisierung der estrogenen Aktivität von Diethylstilbestrol, Zearalenon und Genistein genutzt. Diethylstilbestrol hatte die höchste stimulatorische Aktivität (200% von E2) gefolgt von Zearalenon und Genistein (relative stimulatorische Aktivität 25% beziehungsweise 0,05%). Für die Polychlorierten Biphenyle und Metaboliten wurden Struktur-Wirkungsbeziehungen bezüglich ihrer estrogenen Aktivität aufgestellt. Dabei wurden sowohl Estrogenrezeptor-Agonisten, -Antagonisten, partielle Agonisten als auch welche ohne estrogenen Aktivität identifiziert.

Ishikawazellen erwiesen sich als geeignetes *in vitro*-Modell zur Untersuchung der Diethylstilbestrol-vermittelten Minderepression von entwicklungsrelevanten Wnt-Genen im weiblichen Reproduktionstrakt. Diethylstilbestrol bewirkte in Ishikawazellen eine Reduktion der relativen mRNA-Gehalte sowohl von Wnt5a als auch von Wnt7a um maximal 60%, wobei die Minderepression von Wnt5a der von Wnt7a vorausging. Die Reduktion der Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte durch Diethylstilbestrol wurde sowohl durch einen Estrogenrezeptor-Antagonisten als auch durch transienten Knockdown des Estrogenrezeptors- α mittels RNA-Interferenz verhindert, was auf eine Estrogenrezeptor-vermittelte Wirkung von Diethylstilbestrol hinweist. Knockdown-Experimente belegten ebenfalls die Notwendigkeit von Wnt5a für die DES-induzierte Minderepression von Wnt7a, was auf eine bedeutende Rolle von Wnt5a hinweist. Genistein, Zearalenon und 4'-Hydroxy-2,5-Dichlorbiphenyl reduzierten analog Diethylstilbestrol die mRNA-Gehalte von Wnt7a.

Die Genexpression 17 β -Estradiol-metabolisierender Enzyme wurde in MCF-7 Zellen untersucht, die entweder in Medium mit steroidhaltigem oder steroidarmem fötalem Kälberserum kultiviert wurden. Dabei wurden deutliche Unterschiede der Genexpression der 17 β -Estradiol-metabolisierenden Enzyme in den MCF-7 Zellen durch die Kulturbedingungen beobachtet. Die MCF-7 Zellen, die steroidarm kultiviert wurden, zeigten ein breiteres Spektrum an E2-metabolisierenden Isoenzymen als die in steroidhaltigem Medium kultivierten MCF-7 Zellen. Um die Situation in der menschlichen Brustdrüse mit der in MCF-7 Zellen zu vergleichen, wurde die Genexpression der E2-metabolisierenden Enzyme in einer humanen Gewebeprobe aus der Brustdrüse untersucht, die sich als gute Referenzprobe herausstellte. Die wichtigsten 17 β -Estradiol-metabolisierenden Enzyme, die im Brustgewebe beschrieben waren, wurden in dieser Probe nachgewiesen. Die MCF-7 Zellen stellen ein gutes *in vitro*-Testsystem zur Untersuchung der Genotoxizität von 17 β -Estradiol dar.

5 Material und Methoden

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammen von Carl Roth (Karlsruhe), Fluka / Sigma / Aldrich (Deisenhofen) oder Merck (Darmstadt) in der Reinheit mind. „zur Analyse“.

Wenn nicht anders angegeben, wird entionisiertes Wasser aus der Hausversorgung verwendet.

5.1 Geräte

Sterilbank Uni Equip Uniflow UVUB 1200 Biohazard

Zellzählgerät, elektronisch CASY1 Schärfe Systeme

Fluorimeter Perkin-Elmer LS-50B Lumineszenz Spektrometer

Shimadzu RF-5301

Phasenkontrastmikroskop Leitz Labovert FS; Objektive: 10x, 20x, 32x

Elektrophorese Biorad PowerPac 300; Pharmacia Biotech GNA 100

Handzählgeräte

Pipetten Biozym Precision 0,5-10 µl / 5-50 µl / 50-200 µl

Eppendorf 50 µl / 100 µl / Research 2-20 µl

Abimed Pipetman P1000 / P200 / P100

Roth 0,5-10 µl / 10-100 µl / 100-1000 µl

Multipette®plus (Eppendorf)

Thermocycler MJ Research Mini Cycler PTC-150 mit Hot Bonnet

Zentrifugen Eppendorf 5414S und 5417R

National Labmed C-1200

Hereaus Megafuge 1.0R

Trockenschrank Heraeus

Wasserbad mgw Lauda, Thermostar

Waagen Mettler

Sartorius H110

Sartorius PT1200

Heizplatte Omnilab Jürgens (Bremen) PST100

Magnetrührer

pH-Meter Metrom 610 Ion-Meter; pH-Elektrode Blueline 12 (Schott)

Ultraschallbad

Mikrowellenherd

Brutschrank Sanyo CO₂ -Inkubator MCO-17AI

Geldokumentationssystem LAS 3000 CD Camera, Raytest (Straubenhardt)

Auswertesoftware AIDA Raytest

Mikrotiterplattenlesegerät (Tecan GENios mit Auswertesoftware XFluor)

Photometer Tegimenta Kontron UV/VIS-Spektralphotometer Uvikon 930 mit Thermostatic
Ciculator Jasco V-550 UV/VIS Spektrometer

Laborspülmaschine Miele Mielabor G 7783 Multitronic

Spektrophotometer Nanodrop ND-1000 (Peqlab, Erlangen)

5.2 Verbrauchsmaterialien

CASYTON (Schärfesysteme)

CASY ® (Schärfesysteme)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)

Pipettenspitzen, Plastik 1 ml, 200 µl (Sarstedt)

PCR-Tubes, 0,2 ml (Biozym)

Zentifugenröhrchen 50 ml (Greiner); 15 ml (Sarstedt); 2 ml (Greiner, „cryo.s“)

Reaktionsgefäße, 1,5 ml (Sarstedt)

Zellkulturflaschen Cellstar 550 ml, 175 cm² Wachstumsfläche / 250 ml, 75 cm² / 50 ml, 22 cm²
(Greiner)

Lochplatten Nunclon 6-, 24- und 96-Loch 9,6-, 1,9- und 0,33 cm² Fläche pro Loch (NUNC)

Pipettenspitzen Multipette Plus 2,5 - 5 - 10 - 50 ml (Eppendorf)

PCR-Tubes Multiply®-muStrip, 0,2 ml (Sarstedt)

PCR-Tubes Multiply®-muStrip Pro, 8er Kette (Sarstedt)

PCR-Platte: 96 Multiply®-PCR-Platte natur (Sarstedt)

Deckel für PCR-Platte: 8er optisch klar, flacher Deckel (Biozym)

Pipettenspitzen Biosphere®Filter Tips, steril, non-pyrogenic DNA-free, RNase-free, ATP-free (Sarstedt), 10 µl

Biosphere®Filter Tips, steril, non-pyrogenic DNA-free, RNase-free, ATP-free (Sarstedt),
20 µl

Biosphere®Filter Tips, steril, non-pyrogenic DNA-free, RNase-free, ATP-free (Sarstedt),
100 µl

Multiguard®Barrier Tips, steril, oberflächenoptimiert (Roth) 200 µl

Multiguard®Barrier Tips, steril, oberflächenoptimiert (Roth) 1000 µl

Küvetten für die Photometrie aus Quarzglas (Hellma) und aus Polystyrol (Sarstedt)

Küvetten für die Fluorimetrie aus Quarzglas oder optischem Spezialglas (Hellma)

Sterilfilter Porengröße 0,45 µm und 0,22 µm (Rothoder Sarstedt)

5.3 Testsubstanzen

Polychlorierte Biphenyle ohne Angabe der Herkunft wurden freundlicherweise von Prof. Larry Robertson, Universität Iowa, Iowa City, USA überlassen.

Polychlorierte Biphenyle

PCB1 2-Chlorobiphenyl

PCB2 3-Chlorobiphenyl, Sigma

PCB3 4-Chlorobiphenyl

PCB9 2,5-Dichlorobiphenyl, Sigma

PCB12 3,4-Dichlorobiphenyl, Sigma

2-HO-PCB3 4-Chlorobiphenyl-2'-ol

3-HO-PCB3 4-Chlorobiphenyl-3'-ol

4-HO-PCB3 4-Chlorobiphenyl-4'-ol

4-HO-PCB9 2,5-Chlorobiphenyl-2'-ol

4-HO-PCB12 3,4-Chlorobiphenyl-2'-ol

PCB1-2,5-Q 2-Chlorobiphenyl-2',5'-Chinon

PCB12-3,4-Q 3,4-Chlorobiphenyl-3',4'-Chinon

2,5-diHOPCB2 3-Chlorobiphenyl-2',5'-ol

3,4-diHO-PCB12 3,4-Chlorobiphenyl-3',4'-ol

PCB3-2,5-Q 4-Chlorobiphenyl-2',5'-Chinon

PCB3-3,4-Q 4-Chlorobiphenyl-3',4'-Chinon

3,4diHO-PCB3 4-Chlorobiphenyl-3',4'-ol

2,5-diHO-PCB1 2-Chlorobiphenyl-2',5'-ol

PCB2-2,5-Q 3-Chlorobiphenyl-2',5'-Chinon

Genistein Sigma

Zearalenon Sigma

17 β -Estradiol Sigma

Diethylstilbestrol Sigma

5.4 Zellkultur

5.4.1 Zellen

Tumorzelllinien

Ishikawa(+) Zelllinie aus menschlichem endometrialem Adenokarzinom, die einen ER α exprimieren. Die Zelllinie wurde freundlicherweise von Ken Korach vom National Institute for Environmental Health Sciences (Research Triangle Park, North Carolina, USA) zur Verfügung gestellt. Die Verdopplungszeit liegt etwa bei 24 Stunden.

MCF-7 BUS 127 Zelllinie aus humanem Brustkarzinom, die freundlicherweise von Frau Ana Soto (Tufts University School of Medicine, Boston, USA) zur Verfügung gestellt wurde.

5.4.2 Lösungen

Medien und alle Mediumzusätze von Sigma, wenn nicht anders angegeben. Allen Medien werden Penizillin (Pen; Endkonzentration: 100 U/ml) und Streptomycin (Strep; Endkonzentration 100 µg/ml) zugesetzt, wenn nicht anders angegeben.

Medium

Ishikawazellen Steroidhaltiges Medium zur Kultivierung: Ham's F12/Dulbecco's Modified Eagle Medium (F12/DMEM, Sigma D6434) 1+1 (v:v) mit 10 % FKS, 2,5 mM L-Glutamin und Pen/Strep.

Steroidfreies Versuchsmedium: Ham's F12/Dulbecco's Modified Eagle Medium (F12/DMEM, Sigma D6434) 1+1 (v:v) mit 5 % CD-FKS, 2,5 mM L-Glutamin und PEN/STREP.

MCF-7 Steroidhaltiges Medium zur Kultivierung: DMEM (mit Phenolrot, Sigma D5648) mit 5 % FKS (hitzeinaktiviert) und Pen/Strep. Zusatz: 2,25 g/L NaHCO₃, 1 mM Pyruvat.

Steroidfreies Medium: DMEM (ohne Phenolrot, Sigma D2902) mit 5 % CD-FKS und Pen/Strep. Zusatz: 2,25 g/L NaHCO₃, 15 mM Hepes (Sigma, H0887), 3,5 g/L Glukose.

10x PBS-CMF 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 11,1 g Na₂HPO₄ (wasserfrei) (78 mM), 2 g KH₂PO₄ (15 mM)

PBS-CMF 10x PBS-CMF wird 1:10 (v/v) verdünnt, pH 7,4.

Trypsin (Sigma) 0,25 %

Trypsin-EDTA In 900 ml PBS-CMF 200 mg EDTA (freie Säure, Sigma) lösen, den pH-Wert auf 7,4 einstellen und autoklavieren. Danach 100 ml Trypsin steril zugeben.

Fetales Kälberserum (Invitrogen, Karlsruhe)

CD-FKS, steroidfrei (Hyclone, South Logan, USA)

Penicillin 5000 U/ml (Sigma)

Streptomycin 5 mg/ml (Sigma)

L-Glutamin 200 mM (Sigma)

5.4.3 Durchführung

Auftauen Der Eisfropf wird mit warmem Medium geschmolzen und die Suspension in 10 ml Medium überführt. Die Zellen werden bei 270 g für 5 min abzentrifugiert, in 20 ml frischem Medium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 24 h wird das Medium gewechselt. Sobald die Zellen normal wachsen, können sie für Versuche eingesetzt werden.

Subkultivieren Die Zellen werden bei 37 °C, 5 % CO₂ in einer mit Wasser gesättigten Atmosphäre kultiviert.

Vor der Benutzung werden alle Lösungen auf 37 °C erwärmt.

Zum Passagieren wird das Medium abgegossen, der Zellrasen mit 10 ml PBS-CMF gewaschen und für 5 s mit 10 ml Trypsin bedeckt. Die Lösung wird abgegossen und die Zellkulturflasche für solange in den Brutschrank gestellt bis sich die Zellen abgekugelt haben. Die Zellen werden durch Klopfen vom Flaschenboden getrennt, und in 10 ml Medium aufgenommen. Etwa 2 Mio. Zellen werden in 20 ml Medium ausgestreut.

Alle zwei Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das bisherige Medium aus der Kulturflasche gegossen, der Zellrasen mit PBS-CMF gewaschen und 20 ml frisches Medium in die Flasche gefüllt.

Einfrieren Die Zellen werden in kaltem Einfrier-Medium (Medium mit 20% FKS, 10% DMSO) suspendiert (1 Mio. Zellen / ml) und in Portionen zu 1,5 ml für 24 h bei -20 °C eingefroren und dann während weiteren 24 h auf -80 °C abgekühlt. Dann werden die Gefäße in flüssigen Stickstoff überführt und dort gelagert.

5.5 Transfektion der Ishikawazellen mit siRNA

5.5.1 Reagenzien

Medium

Reagenzien Wasser RNase-frei

5x siRNA Puffer (Dharmacon, Chicago, USA)

1x siRNA Puffer: 5X siRNA Puffer wird mit Wasser RNase-frei 1:5 verdünnt. 1x siRNA Puffer enthält 20 mM KCl, 6 mM HEPES-pH 7 und 0,2 mM MgCl₂.

siRNA gegen den ER α und Wnt5a (Dharmacon)

siRNA_{ER α} -Lösung 1 (20 μ M): siRNA_{ER α} wird in 1x siRNA Puffer gelöst. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

siRNA_{ER α} -Lösung 2 (2 μ M): siRNA_{ER α} -Lösung 1 wird mit 1x siRNA-Puffer 1:10 verdünnt

Kontroll-siRNA (siRNA_C) (Dharmacon): RNA , die zu keiner bekannten Sequenz komplementär ist.

siRNA_C-Lösung 1 (20 μ M): siRNA_C wird in 1x siRNA Puffer gelöst. Die Lösung wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

siRNA_C-Lösung 2 (2 μ M): siRNA_C-Lösung 1 wird mit 1x siRNA-Puffer 1:10 verdünnt

Transfektionsmittel (TM; Dharmafect®1;Dharmacon)

steroidfreies, antibiotikafreies Medium: F12/DMEM-Medium mit 5% CD-FKS und 2,5 mM L-Glutamin

steroidfreies, antibiotikafreies Medium: F12/DMEM-Medium mit 6% CD-FKS und 2,5 mM L-Glutamin

serumfreies, antibiotikafreies Medium: F12/DMEM-Medium mit 2,5 mM L-Glutamin

Platte	Reaktionsgefäß 1					Reaktionsgefäß 2		Transfektionsvolumen µl/Loch
	Löcher/Platte (cm ² /Loch)	Oberfläche (cm ²)	siRNA-Lsg. 2 µl	1x siRNA-Puffer µl	serumfreies Medium µl	TM	serumfreies Medium µl	
96	0,3	0,5	4,95	5	0,25	9,75	100	
24	1,75	2,875	28,5	28,75	1,43	56	575	
6	10	15	135	150	7,5	292,5	3000	

Abb. 81: Pipettierschema zur Transfektion von Ishikawazellen mit siRNA.

5.5.2 Durchführung

1. Pro Loch werden 10.000 Zellen (96-Lochplatte), 55.000 (24-Lochplatte) oder 300.000 Zellen (6-Lochplatte) in 100 µl, 500 µl beziehungsweise 3 ml steroid- und antibiotikafreiem Medium (5% CD-FKS) ausgestreut und für 24 h anwachsen gelassen.
2. Die siRNA und das TM werden wie in Abb. 81 und 82 skizziert in separaten Reaktionsgefäßen verdünnt. Im dargestellten Beispiel handelt es sich um eine Transfektion mit 10 nM siRNA und 0,25% TM. Der Inhalt beider Reaktionsgefäße wird vorsichtig (durch auf und ab pipettieren) gemischt und 5 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen.
3. Die Inhalte beider Reaktionsgefäße werden vereinigt, vorsichtig gemischt und für 20 min bei Raumtemperatur stehen gelassen.
4. Dem Transfektionsgemisch werden 4 Teile steroidfreies Medium (6% FKS) zugegeben. Das Transfektionsvolumen beträgt 100 (96-Loch-Platte), 500 (24-Lochplatte) oder 3000 µl (6-Loch-Platte) pro Loch.
5. Die Platten werden aus dem Brutschrank genommen und das Kulturmedium wird abgesaugt. Anschließend werden pro Loch 100, 500 oder 3000 µl des hergestellten Transfektionsmediums pipettiert.
6. Nach 24 h wird das Transfektionsmedium abgesaugt und durch steroid- und antibiotikafreies Kulturmedium (5% CD-FKS), dem die zu testenden Substanzen zugefügt werden, ersetzt.

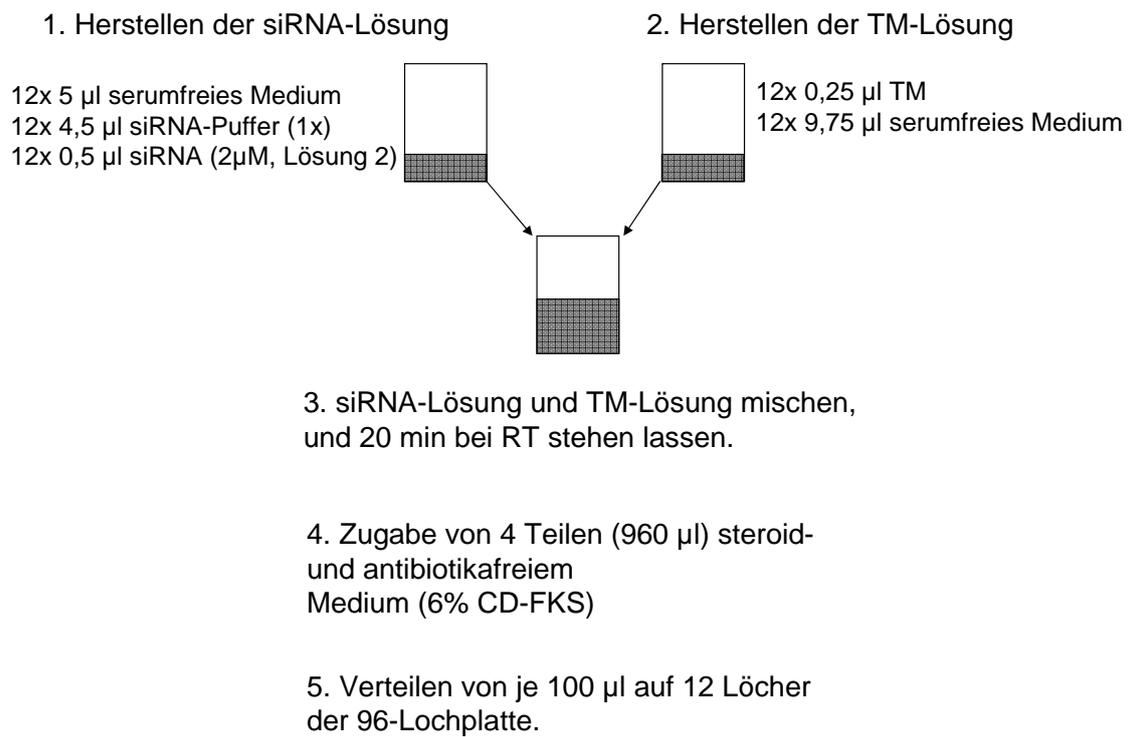


Abb. 82: Schematische Anleitung zur Vorbereitung einer Transfektion in 12 Löchern einer 96-Loch-Platte mit 10 nM siRNA und 0,25% TM (Endkonzentration).

5.6 RNA-Isolation

Reagenzien

Ethanol 99,8%, DAB, reinst (Roth)

GenElute™ Mammalian Total Kit (Sigma)

Ethanol 70% ig, Ethanol (reinst) und Wasser (autoklaviert) wird im Verhältnis 7:3 gemischt

β -Mercaptoethanol 14,3 M

Lyse-Lösung enthält Guanidin-Thiocyanat

Waschlösung 1 Flascheninhalt mit Ethanol (reinst) verdünnen (60 ml für 70x RNA-Isolierungskit)

Elutionslösung Wasser RNase-frei

Deoxyribonuclease Amplification Grade Amplification Grade DNase I, 1 unit/ μ l in 50% Glycerin, 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 10 mM CaCl₂, 10 mM MgCl₂, 10x Reaktionspuffer, 200 mM Tris-HCl, pH 8,3, 20 mM MgCl₂ - Stopp-Lösung, 50 mM EDTA

5.6.1 Durchführung

Die gesamte RNA-Isolierung geschieht auf möglichst keimfreiem Arbeitsplatz. Dazu wird in einem Abzug UV-Licht über einen Zeitraum von mindestens einer halben Stunde eingestellt. Alle im Folgenden genannten Zentrifugationsschritte werden bei einer Umdrehung von 15000*g (g=Fallbeschleunigung auf der Erdoberfläche=9,81 m/s²) durchgeführt.

RNA-Isolation Das Inkubationsmedium wird zunächst abgesaugt. Anschließend wird auf jedes Well einer 6-Lochplatte 350 μ l des Lyselösung/2-Mercaptoethanol-Gemisches (10 μ l 2-Mercaptoethanol in 1000 μ l Lyselösung) gegeben. Die Platte wird vorsichtig hin und her bewegt bis die Lyselösung die gesamte Oberfläche bedeckt. Nach 2 Minuten wird das Lysat auf die Filtrationssäule überführt und für 2 Minuten zentrifugiert. Die Filtrationssäule wird verworfen. Zum Filtrat werden 350 μ l 70% iges Ethanol gegeben und gemischt. Das Lysat/Ethanol-Gemisch wird auf die Binde-Säule überführt und für 15 sec zentrifugiert. Die RNA befindet sich

nun auf der Binde-Säule und das Filtrat kann verworfen werden. Die Säule wird mit 500 μl Waschlösung I gewaschen und für 15 sec zentrifugiert. Anschließend wird die Säule auf ein neues Kollektionsröhrchen überführt, 500 μl Waschlösung II zugegeben und für 15 sec zentrifugiert. Das Filtrat wird verworfen. Es wird nochmals mit 500 μl der Waschlösung II gewaschen und für 2 Min. zentrifugiert, um das Ethanol von der Säule zu entfernen. Die Säule wird nun auf ein neues Kollektionsröhrchen überführt und mit 50 μl RNase-freiem Wasser (Elutions-Lösung) die RNA von der Säule eluiert, indem für eine Minute zentrifugiert wird. Die Säule wird nun verworfen.

DNase-Verdau Die isolierte RNA-Lösung wird mit 5 μl Reaktionspuffer und 5 μl DNase versetzt. Die Lösung wird bei Raumtemperatur 15 Min. stehen gelassen. Anschließend werden 5 μl Stopplösung zugegeben, gemischt und die DNase bei 70°C für 10 Min. im Wasserbad inkubiert. Ein Reagenzienblindwert wird mitgeführt. Die RNA-Lösung wird auf Eis gestellt und der RNA-Gehalt bestimmt. Bis zur weiteren Verwendung wird die RNA bei -80 °C im Biofreezer aufbewahrt.

5.7 Konzentrationsbestimmung der RNA

Die Konzentration der RNA wird mittels Nanodrop ND-1000 bestimmt. Dazu wird mit 1,5 μl des Reagenzienblindwerts aus dem DNA-Abbau ein Nullabgleich durchgeführt. Daraufhin wird je ein Tropfen der zu messenden RNA-Lösung auf das Gerät gegeben und die Absorption bei 260 nm gemessen. Die RNA-Konzentration berechnet sich mit Hilfe der folgenden Gleichung (modifizierte Lambert-Beer- Gleichung für die Quantifizierung von Nukleinsäuren): C_{RNA} ($\mu\text{g}/\text{ml}$) = $\text{Extinktion}_{260\text{nm}}$ * VF * ϵ ϵ : Wellenlängen-abhängiger Extinktionskoeffizient (für RNA: $\epsilon = 40 \text{ ng}/\mu\text{l}$), VF = Verdünnungsfaktor

5.8 Konzentrationsbestimmung des DNA-Standards

Reagenzien

DNA von Kälberthymus (Serva, Heidelberg)

SYBR Green Stammlösung 10000X in DMSO (Molecular Probes, Leiden, Niederlande)

SYBR Green Lösung I Stammlösung 1:100 in TAE-Puffer verdünnen

SYBR Green Lösung II SYBR Green Lösung I mit Wasser 1:10 verdünnen

50x TAE-Puffer Es werden 242,2 g TRIS-Base, 57 ml Eisessig und 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0, Na₂EDTA*2 H₂O; MW: 372,24 g/mol) gemischt. Die Mischung wird mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt. Die Lösung ist bei Raumtemperatur haltbar.

1x TAE-Puffer Ein Volumenteil 50x TAE-Puffer wird mit 49 Volumenteil Wasser gemischt.

DNA-Stammlösung 44,03 µg/ml in TAE-Puffer, DNA von Kälberthymus wird in Puffer gelöst und anschließend verdünnt, die Konzentration wird photometrisch bei 260 nm bestimmt.

Verdünnung I DNA-Stammlösung zu 1 µg/ml mit Wasser verdünnen

Verdünnung II Verdünnung I 1:100 mit Wasser verdünnen (c = 1 ng/ml)

Kalibrierlösungen 0 - 12 ng/ml aus Verdünnung II herstellen

Durchführung Aus den DNA-Stammlösungen werden je 1 ml Kalibrierlösungen hergestellt. 1-2 µl Probelösung wird mit 1 ml Wasser verdünnt. Nach Zugabe von je 1 µl SYBR-Green-Lösung-II zu den Kalibrierlösungen und den Proben wird gut durchgemischt und die Lösungen für 20 min. im Dunkeln stehen gelassen. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt in einer Halbmikroküvette mit einer Anregungswellenlänge von 497 nm und einer Emissionswellenlänge von 520 nm. Die Spaltbreite für Anregung und Emission beträgt jeweils 10 nm. Die Kalibrierlösungen werden ohne Zwischenspülung mit steigender Konzentration gemessen. Anschließend wird die Küvette ausgespült und die Proben gemessen.

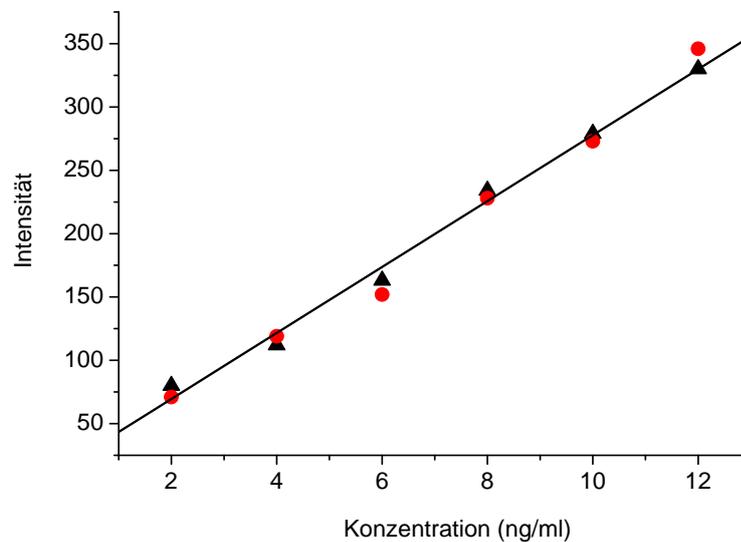


Abb. 83: Kalibriergerade zur fluorimetrischen Bestimmung der Konzentration der DNA-Standards

5.9 Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

5.9.1 Reverse Transkription

Die RNA wird mittels M-MuLV-RTase in cDNA umgeschrieben, die dann für die kompetitive PCR verwendet wird.

Reagenzien

M-MuLV Reaktionspuffer (5X) 250 mM Tris-HCl, pH 8,3, 250 mM KCl, 20 mM MgCl₂, 50 mM DTT (MBI Fermentas)

dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 10 mM (Qbiogene, Heidelberg)

M-MuLV Reverse Transkriptase 200 U (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

RNAse-Inhibitor 40 U pro μ l (MBI Fermentas, St. Leon-Rot)

Durchführung Für einen 20 μ l-Ansatz wird 1 μ g RNA aus der RNA-Lösung mit sterilfiltriertem Wasser auf 11 μ l aufgefüllt. Dazu wird 1 μ l Oligo-(dT)18-Primer gegeben. Nach Mischen und Herunterzentrifugieren werden die Lösungen im Thermocycler bei 70°C für 5 Min. erhitzt und anschließend sofort auf Eis gekühlt. Es werden 7 μ l eines Master-Mix zugegeben, der aus 4 μ l 5x Reaktionspuffer, 2 μ l dNTPs, 0,5 μ l RNase- Inhibitor und 0,5 μ l sterilfiltriertem Wasser besteht. Die Lösung wird nach dem Mischen und Zentrifugieren für 5 Min. bei 37°C vorinkubiert. Anschließend wird 1 μ l Reverse Transkriptase zugegeben, gut gemischt und zentrifugiert. Die Lösung wird für 60 Min. bei 42°C inkubiert und dann abgestoppt, indem 10 Min. lang die Temperatur bei 70°C gehalten wird. Danach wird auf 4°C abgekühlt. Bis zur weiteren Verwendung werden die Proben bei -18°C aufbewahrt.

5.9.2 PCR

In der in Kapitel 5.9.1 hergestellten Gesamt-cDNA kann durch kompetitive PCR die Kopienzahl spezifischer cDNAs ermittelt werden. Dazu sind für jedes Gen geeignete forward- und reverse-Primer nötig, mit denen jeweils ein Teil der cDNA amplifiziert wird.

Reagenzien

sterilfiltriertes Wasser deionisiertes Wasser wird über einen Spritzenfilter mit 0,2 μ m Porendurchmesser sterilfiltriert

10x Reaktionspuffer 100 mM Tris-HCl, pH 9,0, 25°C, 500 mM KCl, 1% Triton, 2 mg/ml BSA (Qbiogene, Heidelberg)

MgCl₂ 25 mM (Qbiogene)

dNTPs Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) je 10 mM (Qbiogene, Heidelberg)

Taq-DNA-Polymerase 5 U/ μ l

Primer Für den Primer-Mix wird eine Lösung mit sterilfiltriertem Wasser mit einer Primerkonzentration von 5 μ M hergestellt (Hermann GbR, Freiburg; biomers.net, Ulm).

Kit zum Aufreinigen von PCR-Produkten E.Z.N.A.®Cycle-Pure Kit (Peqlab)

Herstellung der DNA-Standards Die kompetitive PCR wird mithilfe interner DNA-Standards durchgeführt (Förster, 1994; Celi *et al.*, 1993). Die Standard-DNA wird mit den selben Primern amplifiziert wie die gesuchte Probe. Die Herstellung der Standards erfolgt folgendermassen: 1. Ein Teil des gesuchten Gens wird mithilfe eines Primerpaares a (Forward) und c (Reverse) amplifiziert. Die Primer haben eine Länge von ca. 20 bp. 2. Das PCR-Produkt wird aufgereinigt. 3. Durchführung einer weiteren PCR mit dem aufgereinigten PCR-Produkt. Bei dieser PCR werden der Forward-Primer (a) und ein Linker-Primer (bc) eingesetzt. Der Linker-Primer besitzt an seinem 3'-Ende eine etwa 20 bp lange Sequenz, die komplementär zu einer Sequenz des aufgereinigten PCR-Produktes zwischen den Primerbindestellen a und c ist. Zudem besitzt der Linker-Primer an seinem 5'-Ende eine Sequenz, die der des Reverse-Primer (c) entspricht. Folglich entsteht ein Produkt, daß kürzer als das erste PCR-Produkt ist, jedoch die gleichen Primerbindungsstellen a und c besitzt. Dieses Produkt wird aufgereinigt und mittels Fluorimetrie quantifiziert, und kann dann als interner Standard verwendet werden.

5 Material und Methoden

Tab. 10: Basenpaarlängen von Probe und Standards und Sequenzen der verwendeten Forward-, Reverse- und Linkerprimer zur Bestimmung der E2-metabolisierenden Enzyme.

Isozyme	Länge		Primer		
	T	S	Forward	Reverse	Linker
COMT (s)	357	285	5'-CTGCTCATGGGT GACACCAAG-3'	5'-TCCAACCACAAGG GTGACCTT-3'	5'-CAAGGGTGACCTT ATGGTGATGAGCC-3'
CYP 1A1	448	351	5'-ACATCACAGACAG CCTGAT-3'	5'-GGTAGGAACTCA GATGGGT-3'	5'-GAACTCAGATG GGTCTTGTGTGCTGT GG-3'
CYP 1A2	395	299	5'-GGCAACCTCATC CCACAG-3'	5'-TCAGGCCGGAAC CAGAG-3'	5'-TCAGGCCGGAAC CAGAGCTTGTGTGCT G-3'
CYP 1B1	383	302	5'-GTCACTATTCTT CATGCCAC-3'	5'-TCTCTGAGAGTGAC ATTGAC-3'	5'-TCTCTGAGAGTGA CATTGACATCGCACTG GTGAG-3'
CYP 3A4	238	156	5'-CTCTCATCCAG ACTTGGCCA-3'	5'-ACAGGCTGTTGAC CATCATAAAAG-3'	5'-ACAGGCTGTTGA CCATCATAAAAGAAAG GCAGAGG-3'
GST M1	304	222	5'-ATGCCCATGATA CTGGGGTA-3'	5'-TCTCCAAAATGTC CACACGA-3'	5'-TCTCCAAAATGT CCACACGAGAGCCCC ATC-3'
GST P1	231	154	5'-GGAGACCTCAC CTGTACCA-3'	5'-GGACAGCAGGGTC TCAAAAG-3'	5'-GGACAGCAGGGT CTCAAAAGGATGTATT TGC-3'
GST T1	223	171	5'-GCAGACCCACC ATAAAGCAGAAG-3'	5'-GTGGAAGACAGGG TGGGGATGGT-3'	5'-GTGGAAGACAGG GTGGGGATGGTTCCTG CTTTCTGG-3'
HPRT	214	176	5'-TGTAATGACCA GTCAACAGGG-3'	5'-TGGCTTATATCCAA CACTTCG-3'	5'-TGGCTTATATCCA ACACTTCGCCTGCCTG ACCAAGGAAAG-3'
QR	438	350	5'-TCTTGCAGCAGA CCACACTG-3'	5'-GTCAATAGTACCTC TGCTGC-3'	5'-GTCAATAGTACC TCTGCTGCCCTTTCTC ACCAAC-3'
SULT 1A1	122	85	5'-GCAACGCAAAG GATGTGGCA-3'	5'-TCCGTAGGACACTT CTCCGA-3'	5'-TCCGTAGGACAC TTCTCCGACTCAGGGT GC-3'
SULT 1A2	307	231	5'-GAGGAGACTGTG GACCTCATGGTTG-3'	5'-TTATTCTGGAGCCT CTTGGTCAGGC-3'	5'-TTATTCTGGAGC CTTGGTCAGGCGCC ATCTTCTTCG-3'
SULT 1E1	219	128	5'-CAAATCCTGGAT CCTTTC-3'	5'-TCCTGTCCACAAGC TCCTCT-3'	5'-TCCTGTCCACAA GCTCTCTGACTCTTT CC-3'
SULT 2A1	159	118	5'-TGGTTTGAAGGC ATAGCTTTC-3'	5'-GGAGTGCATCA GGCAGAGAATC-3'	5'-GGAGTGCATCAG GCAGAGAATCATCCCT TATC-3'
UGT 1A1	270	173	5'-GAAAGCCACAA ATCCAAGA-3'	5'-AATGGCACATGTC ATCCTGA-3'	5'-AATGGCACATGT CATCCTGAGGCTGATT AAT-3'
UGT 1A3	247	196	5'-ATGGCAATGTTG AACAAATAG-3'	5'-GGTCTGAATTGGTT GTTAGTAATC-3'	5'-GGTCTGAATTGGT TGTTAGTAATCACACA GTAGGA-3'
UGT 1A4	221	155	5'-ACGCTGGGCTAC ACTAAGG-3'	5'-GACAGGTACTTAG CCAGCACC-3'	5'-GACAGGTACTTAG CCAGCACCAGGGCCTC ATT-3'
UGT 1A8	246	174	5'-CTGCTGACCTGT GGCTTTGCT-3'	5'-CCATTGAGCATCG GCGAAAT-3'	5'-CCATTGAGCATCG GCGAAATTTCCAGTT GC-3'
UGT 1A9	280	207	5'-GAGGAACATTTA TTATGCCACCG-3'	5'-CCATTGATCCCAA AGAGAAAACC-3'	5'-CCATTGATCCCAA AGAGAAAACCTGATA CCACC-3'
UGT 2B7	232	170	5'-TCAGCCAGCAG CTCACTACAGGG-3'	5'-TCAGCCAGCAGCT CACTACAGGG-3'	5'-TCAGCCAGCAGC TCACTACAGGGTATT GAAACTA-3'

Tab. 11: Basenpaarlängen von Probe und Standards und Sequenzen der verwendeten Forward-, Reverse- und Linkerprimer zur Bestimmung von ALP, ER α , ER β , Wnt5a und Wnt7a.

Isozyme	Länge		Primer		
	T	S	Forward	Reverse	Linker
ALP	505	463	5'-CCT AAA AGG GCA GAA GAA GAA C-3'	5'-GCT GTA GTC ATC TGG GTA CTC A-3'	5'- ATG TAC TTT CGG CCT CCA CCT AGC TGT AGT CAT CTG GGT ACTCA -3'
ER α	345	281	5'-AAT TCA GAT AAT CGA CGC CAG-3'	5'-GTG TTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3'	5'- CAT TCT CCC TCC TCC CTG GCA GCT CTT CTT -3'
ER β	393	280	5'- TAGTGGTCCATCGCC AGTTAT-3'	5'- GGGAGCCACACTTCAC CAT-3'	5'- GGGAGCCACACTTCAC CATGCCTTACATCCTT C -3'
Wnt5a	272	224	5'-ATT CTT GGT GGT CGC TAG GT -3'	5'-CTC GCG GCT GCC TAT CTG -3'	5'-CTC GCG GCT GCC TAT CTG CCT TCG ATG TCG GAA T -3'
Wnt7a	270	184	5'- CTTCTGAAGA TCAAGAAGCCA -3'	5'- CTGCACGTGTTGCA CTTGACATAGCAG -3'	5'-CTGCACGTGTTGCA CTTGACATAGCAGGAG GTCACAGCCGCT -3'

Durchführung der kompetitiven PCR Der Arbeitsplatz sollte möglichst sauber sein, um mögliche Verunreinigungen zu vermeiden. Hierzu wird er vor und nach jeder Nutzung mit Ethanol (70%) gereinigt und ausschließlich für PCR-Arbeiten genutzt. Die Amplifizierung der cDNA wird nach folgendem Pipettierschema durchgeführt:

Tab. 12: Pipettierschema für einen 25 μ l PCR-Ansatz

Reagenz	Menge in μ l
10x Reaktionspuffer mit (NH ₄)SO ₄ (Endkonz. 1x)	2,5 μ l
MgCl ₂ (Endkonz. 2,5 mM)	2,5 μ l
dNTPs (Endkonz. 200 μ M)	0,5 μ l
Taq-DNA-Polymerase	0,125 μ l
Primer-Mix	2 μ l
cDNA	1,5 μ l
DNA-Standard	5 μ l
Sterilfiltriertes Wasser	10,875 μ l
Gesamtmenge	25 μ l

Temperaturprogramm für die PCR Das folgende Temperaturprogramm ist beispielhaft für HPRT dargestellt. Dabei sind die Zeiten für die Denaturierung, die Extension und das Kühlen bei allen untersuchten Genen gleich. Die Annealingtemperatur variiert aufgrund der unterschiedlichen Zusammensetzung der Primer innerhalb der untersuchten Gene. Für alle E2-metabolisierenden Enzyme wurde eine Annealingtemperatur von 60°C benutzt. Für HPRT, Wnt5a, Wnt7a, ER α und ER β wurde eine Annealingtemperatur von 58°C benutzt. Für die AIP wurde 53°C als Annealingtemperatur verwendet.

Tab. 13: Temperaturprogramm bei der Durchführung einer PCR

Anzahl Cyclen	Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
1x	Denaturierung	95°C	5 min
30x	Denaturierung	95°C	30 sec
	Annealing	58°C	1 min
	Extension	72°C	1 min
1x	Extension	72°C	5 min
	Abkühlen	10°C	∞

5.10 Elektrophorese der Reaktionsprodukte

5.10.1 Lösungen

50x TAE-Puffer Es werden 242,2 g TRIS-Base, 57 ml Eisessig und 100 ml EDTA-Lösung (0,5 M, pH 8,0) gemischt. Die Mischung wird mit Wasser auf 1 l Volumen aufgefüllt. Die Lösung ist bei Raumtemperatur haltbar.

1x TAE-Puffer Ein Volumenteil 50x TAE-Puffer wird mit 49 Volumenteilen Wasser gemischt.

SybrGreen Stammlösung 10000x in DMSO (MolecularProbes)

SybrGreen Verdünnung I Stammlösung 1:100 in TAE-Puffer verdünnen

SybrGreen Verdünnung II Verdünnung I 1:10 in 50% Glycerin verdünnen

10x Gelpuffer Der Puffer besteht aus je 0,42% Bromphenolblau und Xylencyanol FF, sowie 50 % Glycerin in Wasser.

50bp DNA-Leiter (New England BioLabs)

Agarose NEEO Ultra-Qualität, RotiRGarose (Roth)

5.10.2 Durchführung

Die Trennung erfolgt in einem 3%igen Agarose-Gel (AIP: 2%ig) (1,5 g Agarose (NEEO) in 50 ml 1xTAE). Die Mischung wird in einem Mikrowellen-Herd zum Sieden erhitzt. Nach Abkühlen auf etwa 60 °C wird das Gel gegossen. Es werden jeweils

- 10 µl PCR-Produkt und 1 µl 10x Gelpuffer
- 0,5 µl DNA-Leiter, 9,5 µl Wasser (sterilfiltriert) und 1 µl 10x Gelpuffer

gemischt. Davon werden jeweils 10 µl in eine Proben tasche pipettiert. Die Trennung erfolgt während einer Stunde (AIP: 2 h) bei Raumtemperatur bei 5 V/cm Elektrodenabstand.

5.10.3 Quantitative Auswertung der PCR-Produkte im Agarosegel

Mittels des Fotodokumentationsgerätes LAS 3000 wird das Gel unter Anregung von Blue LED (470 nm) fotografiert. Die relativen Bandenintensitäten von gesuchter cDNA und DNA-Standard werden mit dem Computerprogramm AIDA ausgewertet. Aus dem Verhältnis der Bandenintensitäten von cDNA zu Standard wird der Logarithmus gebildet. Dieser wird gegen den Logarithmus der zugehörigen bekannten Standardkopienzahl aufgetragen. Durch lineare Regression der Messpunkte wird der Gehalt bestimmt, bei dem der Gehalt von cDNA und Standard identisch ist. Mit der erhaltenen Gleichung kann der relative mRNA-Gehalt berechnet werden (Anderson *et al.*, 1997). Zur Normierung der Ergebnisse wird abschließend das Verhältnis vom mRNA-Gehalt der untersuchten Gene durch Division durch den mRNA-Gehalt von HPRT gebildet, um den relativen mRNA-Gehalt des Gens zu bekommen.

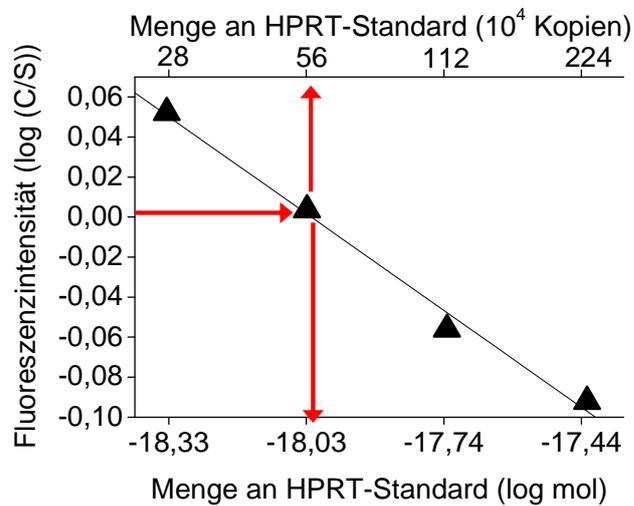
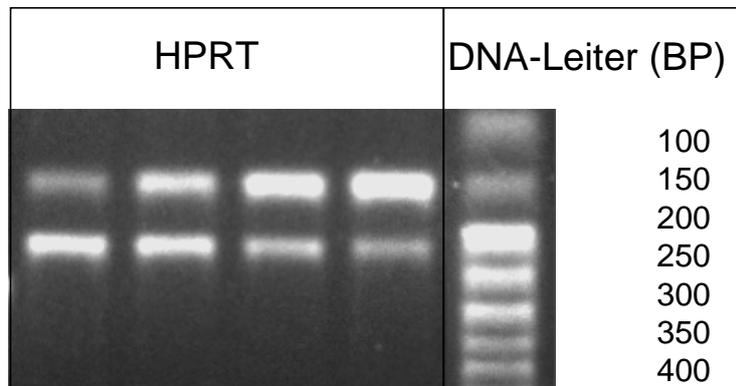


Abb. 84: PCR-Produkte von HPRT von Standard (S) und cDNA-Probe (C) nach Agarosegelelektrophorese und anschließender Färbung mit SybrGreen (oben). Schematische Darstellung der Auswertung einer kompetitiven PCR mittels linearer Regression (unten).

5.10.4 Bestimmung der AIP-Aktivität

Reagenzien

PBS-CMF 1x

Diethanolamin

MgCl*6H₂O

4-Nitrophenylphosphat (4-NPP)-Lösung 0,186 g p-Nitrophenylphosphat (5 mM), 4,9 mg MgCl*6H₂O (0,24 mM) und 10,51 g Diethanolamin (1 mM)) werden in ca. 80 ml H₂O gelöst, mit HCl konz. auf pH 9,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt. Nach 24 und 48 h muss der pH-Wert erneut gemessen und eventuell eingestellt werden.

Ausstreuen und Substanzinkubation Versuche ohne Transfektion von siRNA

Ishikawazellen werden ausgestreut (96-Lochplatte: 20000 Zellen pro Loch, 24-Lochplatte: 115000 Zellen pro Loch, 6-Lochplatte: 600000 Zellen pro Loch), 24 h anwachsen gelassen und anschließend inkubiert. Nach 72 h (96-Lochplatte) beziehungsweise 48 h (24-Lochplatte) werden die Zellen zur Bestimmung der AIP abgestoppt.

Versuche mit Transfektion von siRNA

Ishikawazellen werden ausgestreut (96-Lochplatte: 10000 Zellen pro Loch, 24-Lochplatte: 55000 Zellen pro Loch, 6-Lochplatte: 300000 Zellen pro Loch), 24 h anwachsen gelassen und für 24 h mit siRNA transfiziert. Anschließend wird eine 24-stündige Substanzbehandlung durchgeführt. Nachfolgend wird die AIP-Aktivität bestimmt.

Durchführung Das Medium wird aus der Platte herausgeschüttelt und die Zellen 3x mit PBS-CMF (pH 7,4) gewaschen. Anschließend wird die Flüssigkeit 5 min bei Raumtemperatur abtropfen gelassen. Daraufhin wird die Platte zur Zellyse für mindestens 30 min bei -80°C im Biofreezer aufbewahrt. Die 96-Lochplatte wird bei Raumtemperatur 5 min (24-Loch: 7,5 min; 6-Loch: 10 min) aufgetaut und danach 5 min (24-Loch: 2,5 min; 6-Loch: 0 min) auf Eis gestellt. 50 µl (96-Lochplatte), 300 µl (24-Lochplatte) beziehungsweise 1500 µl (6-Loch-Platte) kalte 4-NPP-Lösung wird auf Eis auf die Zellen pipettiert. Die Platte wird 5 min bei Raumtemperatur stehen gelassen. Die Messung der Extinktionsänderung erfolgt photometrisch bei 405 nm in einem Plattenlesegerät in Intervallen von 10 min über einen Zeitraum von 1 h. Dabei wird vor jeder Messung die Platte für 15 sec linear geschüttelt.

Auswertung Die Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase wird als Bildung einer bestimmten Stoffmenge 4-NP in einem bestimmten Zeitraum berechnet:

$$\text{AIP} = \Delta n(4\text{-NP}) / \Delta t \quad (1)$$

n = Stoffmenge an 4-Nitrophenol t = bestimmter Zeitraum

Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich für n (4-NP):

$$n(4\text{-NP}) = E \cdot V / (\epsilon \cdot d) \quad (2)$$

n(4-NP) = Stoffmenge (mol) E = Extinktion ϵ = molarer Extinktionskoeffizient (1 /mol/cm) d = Schichtdicke V = Volumen der Messlösung

Durch Einsetzen von Gleichung (2) in (1), erhält man die Gleichung für die ALP-Aktivität:

$$\text{ALP} = \Delta E \cdot V / \Delta t \cdot \epsilon \cdot d \quad (3)$$

$\epsilon = 18,4 \text{ /mMcm}$ (bei 405 nm in 0,01 M NaOH) d (96-Loch-Platte) = 0,15 cm d (6-Loch-Platte) = 0,16 cm V (96-Loch-Platte) = 50 μl V (96-Loch-Platte) = 300 μl V (6-Loch-Platte) = 1500 μl

Zur Berechnung der Produktmenge an p-NPP wurde jeweils der lineare Bereich der Kinetik gewählt.

5.11 Zytotoxizitätstest durch Zellzahlbestimmung

5.11.1 Lösungen

PBS-CMF (Kap. 5.4.2)

Trypsin-EDTA (Kap. 5.4.2)

Medium (Kap. 5.4.2)

5.11.2 Durchführung

Substanzinkubation Ishikawazellen werden in 24-Lochplatten ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. Danach werden sie für 48 h mit den Testsubstanzen inkubiert. Anschliessend erfolgt die Zellzahlbestimmung.

Elektronische Zellzahlbestimmung Das Medium wird abgegossen, der Zellrasen zweimal mit PBS-CMF gewaschen, 1 ml Trypsin-EDTA zugegeben und 5 min im Brutschrank bei 37 °C belassen.

Die abgekugelten Zellen werden durch Klopfen von der PS gelöst und 1 ml Medium zugegeben. Die Zellsuspension wird quantitativ (2x mit je 0,5 ml Medium nachspülen) in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen gut vereinzelt und ein Aliquot in ein 10 ml CASYTON enthaltendes CASY®cup gegeben und sofort mittels CASY® die Zellzahl bestimmt.

5.12 Statistik

Unterschiede zwischen den Behandlungen wurden mit ANOVA beziehungsweise mit dem Student t-Test für unabhängige Werte statistisch untersucht. Die Daten sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung angegeben.

Literatur

- J. B. Adams, N. S. Phillips (1990) *Properties of estrogen and hydroxysteroid sulphotransferases in human mammary cancer*. J Steroid Biochem, **36**(6) 695–701.
- A. A. Adjei, R. M. Weinshilboum (2002) *Catecholesterogen sulfation: possible role in carcinogenesis*. Biochem Biophys Res Commun, **292**(2) 402–408.
- P. N. Adler (2002) *Planar signaling and morphogenesis in Drosophila*. Dev Cell, **2**(5) 525–535.
- H. Adlercreutz, S.-M. Heinonen, J. Penalvo-Garcia (2004) *Phytoestrogens, cancer and coronary heart disease*. Biofactors, **22**(1-4) 229–236.
- N. Albin, L. Massaad, C. Toussaint, M. C. Mathieu, J. Morizet, O. Parise, A. Gouyette, G. G. Chabot (1993) *Main drug-metabolizing enzyme systems in human breast tumors and peritumoral tissues*. Cancer Res, **53**(15) 3541–3546.
- C. D. Allred, K. F. Allred, Y. H. Ju, L. M. Clausen, D. R. Doerge, S. L. Schantz, D. L. Korol, M. A. Wallig, W. G. Helferich (2004) *Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats*. Carcinogenesis, **25**(2) 211–218.
- A. R. Amaro, G. G. Oakley, U. Bauer, H. P. Spielmann, L. W. Robertson (1996) *Metabolic activation of PCBs to quinones: reactivity toward nitrogen and sulfur nucleophiles and influence of superoxide dismutase*. Chem Res Toxicol, **9**(3) 623–629.
- H. R. Andersen, A. M. Andersson, S. F. Arnold, H. Autrup, M. Barfoed, N. A. Beresford, P. Bjerregaard, L. B. Christiansen, B. Gissel, R. Hummel, E. B. Jørgensen, B. Korsgaard, R. L. Guevel, H. Leffers, J. McLachlan, A. Møller, J. B. Nielsen, N. Olea, A. Oles-Karasko, F. Pakdel, K. L. Pedersen, P. Perez, N. E. Skakkeboek, C. Sonnenschein, A. M. Soto (1999) *Comparison of short-term estrogenicity tests for identification of hormone-disrupting chemicals*. Environ Health Perspect, **107** Suppl 1 89–108.
- K. M. Anderson, P. H. Cheung, M. D. Kelly (1997) *Rapid generation of homologous internal standards and evaluation of data for quantitation of messenger RNA by competitive polymerase chain reaction*. J Pharmacol Toxicol Methods, **38**(3) 133–140.
- K. F. Arcaro, J. F. Gierthy (2001) *Assessing modulation of estrogenic activity of environmental and pharmaceutical compounds using MCF-7 focus assay*. Methods Mol Biol, **176** 341–351.
- J. T. Arnold, B. A. Lessey, M. Seppälä, D. G. Kaufman (2002) *Effect of normal endometrial stroma on growth and differentiation in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells*. Cancer Res, **62**(1) 79–88.
- S. M. Aronica, W. L. Kraus, B. S. Katzenellenbogen (1994) *Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, **91**(18) 8517–8521.
- S. Arulmozhiraja, F. Shiraishi, T. Okumura, M. Iida, H. Takigami, J. S. Edmonds, M. Morita (2005) *Structural requirements for the interaction of 91 hydroxylated polychlorinated biphenyls with estrogen and thyroid hormone receptors*. Toxicol Sci, **84**(1) 49–62.

- S. Aust, W. Jaeger, M. Klimpfnger, K. Mayer, G. Baravalle, C. Ekmekcioglu, T. Thalhammer (2005a) *Biotransformation of melatonin in human breast cancer cell lines: role of sulfotransferase 1A1*. J Pineal Res, **39**(3) 276–282.
- S. Aust, P. Obrist, M. Klimpfnger, G. Tucek, W. Jäger, T. Thalhammer (2005b) *Altered expression of the hormone- and xenobiotic-metabolizing sulfotransferase enzymes 1A2 and 1C1 in malignant breast tissue*. Int J Oncol, **26**(4) 1079–1085.
- A. F. Badawi, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan (2001) *Role of human cytochrome P450 1A1, 1A2, 1B1, and 3A4 in the 2-, 4-, and 16alpha-hydroxylation of 17beta-estradiol*. Metabolism, **50**(9) 1001–1003.
- P. Ball, R. Knuppen (1980) *Catecholestrogens (2- and 4-hydroxyestrogens): chemistry, biogenesis, metabolism, occurrence and physiological significance*. Acta Endocrinol Suppl (Copenh), **232** 1–127.
- S. Barnes, B. Boersma, R. Patel, M. Kirk, V. M. Darley-Usmar, H. Kim, J. Xu (2000) *Isoflavonoids and chronic disease: mechanisms of action*. Biofactors, **12**(1-4) 209–215.
- K. el Bayoumy, B. Y. Ji, P. Upadhyaya, Y. H. Chae, C. Kurtzke, A. Rivenson, B. S. Reddy, S. Amin, S. S. Hecht (1996) *Lack of tumorigenicity of cholesterol epoxides and estrone-3,4-quinone in the rat mammary gland*. Cancer Res, **56**(9) 1970–1973.
- I. Bergheim, C. Bode, A. Parlesak (2005) *Decreased expression of cytochrome P450 protein in non-malignant colonic tissue of patients with colonic adenoma*. BMC Gastroenterol, **5** 34.
- A. Bergman, E. Klasson-Wehler, H. Kuroki (1994) *Selective retention of hydroxylated PCB metabolites in blood*. Environ Health Perspect, **102**(5) 464–469.
- K. P. Bhat, J. M. Pezzuto (2001) *Resveratrol exhibits cytostatic and antiestrogenic properties with human endometrial adenocarcinoma (Ishikawa) cells*. Cancer Res, **61**(16) 6137–6144.
- A. Bélanger, S. Caron, F. Labrie, C. Naldoni, L. Dogliotti, A. Angeli (1990a) *Levels of eighteen non-conjugated and conjugated steroids in human breast cyst fluid: relationships with cyst type*. Eur J Cancer, **26**(3) 277–281.
- A. Bélanger, F. Labrie, A. Angeli (1990b) *Unconjugated and glucuronide steroid levels in human breast cyst fluid*. Ann N Y Acad Sci, **586** 93–100.
- E. C. Bonefeld-Jørgensen, H. R. Andersen, T. H. Rasmussen, A. M. Vinggaard (2001) *Effect of highly bio-accumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity*. Toxicology, **158**(3) 141–153.
- M. Brangi, T. Litman, M. Ciotti, K. Nishiyama, G. Kohlhagen, C. Takimoto, R. Robey, Y. Pommier, T. Fojo, S. E. Bates (1999) *Camptothecin resistance: role of the ATP-binding cassette (ABC), mitoxantrone-resistance half-transporter (MXR), and potential for glucuronidation in MXR-expressing cells*. Cancer Res, **59**(23) 5938–5946.
- V. Breinholt, J. C. Larsen (1998) *Detection of weak estrogenic flavonoids using a recombinant yeast strain and a modified MCF7 cell proliferation assay*. Chem Res Toxicol, **11**(6) 622–629.

- Q. Bui, J. Weisz (1988) *Identification of microsomal, organic hydroperoxide-dependent catechol estrogen formation: comparison with NADPH-dependent mechanism*. *Pharmacology*, **36**(5) 356–364.
- T. D. Bui, L. Zhang, M. C. Rees, R. Bicknell, A. L. Harris (1997) *Expression and hormone regulation of Wnt2, 3, 4, 5a, 7a, 7b and 10b in normal human endometrium and endometrial carcinoma*. *Br J Cancer*, **75**(8) 1131–1136.
- L. Carta, D. Sassoon (2004) *Wnt7a is a suppressor of cell death in the female reproductive tract and is required for postnatal and estrogen-mediated growth*. *Biol Reprod*, **71**(2) 444–454.
- G. Castoria, A. Migliaccio, A. Bilancio, M. D. Domenico, A. de Falco, M. Lombardi, R. Fiorentino, L. Varricchio, M. V. Barone, F. Auricchio (2001) *PI3-kinase in concert with Src promotes the S-phase entry of oestradiol-stimulated MCF-7 cells*. *EMBO J*, **20**(21) 6050–6059.
- E. Cavaliere, D. Chakravarti, J. Guttenplan, E. Hart, J. Ingle, R. Jankowiak, P. Muti, E. Rogan, J. Russo, R. Santen, T. Sutter (2006) *Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention*. *Biochim Biophys Acta*, **1766**(1) 63–78.
- F. S. Celi, M. E. Zenilman, A. R. Shuldiner (1993) *A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR*. *Nucleic Acids Res*, **21**(4) 1047.
- D. Chakravarti, P. C. Mailander, K. M. Li, S. Higginbotham, H. L. Zhang, M. L. Gross, J. L. Meza, E. L. Cavaliere, E. G. Rogan (2001) *Evidence that a burst of DNA depurination in SENCAR mouse skin induces error-prone repair and forms mutations in the H-ras gene*. *Oncogene*, **20**(55) 7945–7953.
- G. D. Charles (2004) *In vitro models in endocrine disruptor screening*. *ILAR J*, **45**(4) 494–501.
- Y. Chen, X. Liu, E. Pisha, A. I. Constantinou, Y. Hua, L. Shen, R. B. van Breemen, E. C. Elguindi, S. Y. Blond, F. Zhang, J. L. Bolton (2000) *A metabolite of equine estrogens, 4-hydroxyequilenin, induces DNA damage and apoptosis in breast cancer cell lines*. *Chem Res Toxicol*, **13**(5) 342–350.
- Z. Chen, I. S. Yuhanna, Z. Galcheva-Gargova, R. H. Karas, M. E. Mendelsohn, P. W. Shaul (1999) *Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen*. *J Clin Invest*, **103**(3) 401–406.
- C. Y. S. Cheung, J. Chen, T. K. H. Chang (2004) *Evaluation of a real-time polymerase chain reaction method for the quantification of CYP1B1 gene expression in MCF-7 human breast carcinoma cells*. *J Pharmacol Toxicol Methods*, **49**(2) 97–104.
- S. Chouinard, O. Barbier, A. Bélanger (2007) *UDP-glucuronosyltransferase 2B15 (UGT2B15) and UGT2B17 enzymes are major determinants of the androgen response in prostate cancer LNCaP cells*. *J Biol Chem*, **282**(46) 33466–33474.
- S. Chouinard, M. Tessier, G. Vernouillet, S. Gauthier, F. Labrie, O. Barbier, A. Bélanger (2006) *Inactivation of the pure antiestrogen fulvestrant and other synthetic estrogen molecules by UDP-glucuronosyltransferase 1A enzymes expressed in breast tissue*. *Mol Pharmacol*, **69**(3) 908–920.

- G. A. Colditz (1998) *Relationship between estrogen levels, use of hormone replacement therapy, and breast cancer*. J Natl Cancer Inst, **90**(11) 814–823.
- K. Connor, K. Ramamoorthy, M. Moore, M. Mustain, I. Chen, S. Safe, T. Zacharewski, B. Gillesby, A. Joyeux, P. Balaguer (1997) *Hydroxylated polychlorinated biphenyls (PCBs) as estrogens and antiestrogens: structure-activity relationships*. Toxicol Appl Pharmacol, **145**(1) 111–123.
- P. S. Cooke, D. L. Buchanan, P. Young, T. Setiawan, J. Brody, K. S. Korach, J. Taylor, D. B. Lubahn, G. R. Cunha (1997) *Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium*. Proc Natl Acad Sci U S A, **94**(12) 6535–6540.
- M. W. Coughtrie, S. Sharp, K. Maxwell, N. P. Innes (1998) *Biology and function of the reversible sulfation pathway catalysed by human sulfotransferases and sulfatases*. Chem Biol Interact, **109**(1-3) 3–27.
- J. M. Courval, J. V. DeHoog, A. D. Stein, E. M. Tay, J. He, H. E. Humphrey, N. Paneth (1999) *Sport-caught fish consumption and conception delay in licensed Michigan anglers*. Environ Res, **80**(2 Pt 2) S183–S188.
- J. F. Couse, D. Dixon, M. Yates, A. B. Moore, L. Ma, R. Maas, K. S. Korach (2001) *Estrogen receptor-alpha knockout mice exhibit resistance to the developmental effects of neonatal diethylstilbestrol exposure on the female reproductive tract*. Dev Biol, **238**(2) 224–238.
- J. F. Couse, K. S. Korach (2004) *Estrogen receptor-alpha mediates the detrimental effects of neonatal diethylstilbestrol (DES) exposure in the murine reproductive tract*. Toxicology, **205**(1-2) 55–63.
- S. Danson, T. H. Ward, J. Butler, M. Ranson (2004) *DT-diaphorase: a target for new anticancer drugs*. Cancer Treat Rev, **30**(5) 437–449.
- S. Dawling, D. L. Hachey, N. Roodi, F. F. Parl (2004) *In vitro model of mammary estrogen metabolism: structural and kinetic differences between catechol estrogens 2- and 4-hydroxyestradiol*. Chem Res Toxicol, **17**(9) 1258–1264.
- S. Dawling, N. Roodi, R. L. Mernaugh, X. Wang, F. F. Parl (2001) *Catechol-O-methyltransferase (COMT)-mediated metabolism of catechol estrogens: comparison of wild-type and variant COMT isoforms*. Cancer Res, **61**(18) 6716–6722.
- L. Debrauwer, E. Rathahao, I. Jouanin, A. Paris, G. Clodic, H. Molines, O. Convert, F. Fournier, J. C. Tabet (2003) *Investigation of the regio- and stereo-selectivity of deoxyguanosine linkage to deuterated 2-hydroxyestradiol by using liquid chromatography/ESI-ion trap mass spectrometry*. J Am Soc Mass Spectrom, **14**(4) 364–372.
- E. Deutscher, H. H.-C. Yao (2007) *Essential roles of mesenchyme-derived beta-catenin in mouse Müllerian duct morphogenesis*. Dev Biol, **307**(2) 227–236.
- P. Diel, T. Schulz, K. Smolnikar, E. Strunck, G. Vollmer, H. Michna (2000) *Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotopic activity*. J Steroid Biochem Mol Biol, **73**(1-2) 1–10.

- D. R. Doerge, N. C. Twaddle, E. P. Banks, W. N. Jefferson, R. R. Newbold (2002) *Pharmacokinetic analysis in serum of genistein administered subcutaneously to neonatal mice*. *Cancer Lett*, **184**(1) 21–27.
- T. P. Dooley, R. Haldeman-Cahill, J. Joiner, T. W. Wilborn (2000) *Expression profiling of human sulfotransferase and sulfatase gene superfamilies in epithelial tissues and cultured cells*. *Biochem Biophys Res Commun*, **277**(1) 236–245.
- M. B. M. van Duursen, J. T. Sanderson, P. C. de Jong, M. Kraaij, M. van den Berg (2004) *Phytochemicals inhibit catechol-O-methyltransferase activity in cytosolic fractions from healthy human mammary tissues: implications for catechol estrogen-induced DNA damage*. *Toxicol Sci*, **81**(2) 316–324.
- R. L. Eckert, A. Mullick, E. A. Rorke, B. S. Katzenellenbogen (1984) *Estrogen receptor synthesis and turnover in MCF-7 breast cancer cells measured by a density shift technique*. *Endocrinology*, **114**(2) 629–637.
- R. M. Evans (1988) *The steroid and thyroid hormone receptor superfamily*. *Science*, **240**(4854) 889–895.
- J. L. Falany, D. E. Pilloff, T. S. Leyh, C. N. Falany (2006) *Sulfation of raloxifene and 4-hydroxytamoxifen by human cytosolic sulfotransferases*. *Drug Metab Dispos*, **34**(3) 361–368.
- H. S. Feigelson, B. E. Henderson (1996) *Estrogens and breast cancer*. *Carcinogenesis*, **17**(11) 2279–2284.
- M. R. Fielden, I. Chen, B. Chittim, S. H. Safe, T. R. Zacharewski (1997) *Examination of the estrogenicity of 2,4,6,2',6'-pentachlorobiphenyl (PCB 104), its hydroxylated metabolite 2,4,6,2',6'-pentachloro-4-biphenylol (HO-PCB 104), and a further chlorinated derivative, 2,4,6,2',4',6'-hexachlorobiphenyl (PCB 155)*. *Environ Health Perspect*, **105**(11) 1238–1248.
- E. Förster (1994) *Rapid generation of internal standards for competitive PCR by low-stringency primer annealing*. *Biotechniques*, **16**(6) 1006–1008.
- N. Gamage, A. Barnett, N. Hempel, R. G. Duggleby, K. F. Windmill, J. L. Martin, M. E. McManus (2006) *Human sulfotransferases and their role in chemical metabolism*. *Toxicol Sci*, **90**(1) 5–22.
- P. E. Ganey, S. A. Boyd (2005) *An approach to evaluation of the effect of bioremediation on biological activity of environmental contaminants: dechlorination of polychlorinated biphenyls*. *Environ Health Perspect*, **113**(2) 180–185.
- S. A. Gestl, M. D. Green, D. A. Shearer, E. Frauenhoffer, T. R. Tephly, J. Weisz (2002) *Expression of UGT2B7, a UDP-glucuronosyltransferase implicated in the metabolism of 4-hydroxyestrogens and all-trans retinoic acid, in normal human breast parenchyma and in invasive and in situ breast cancers*. *Am J Pathol*, **160**(4) 1467–1479.
- H. Geyer, G. Rimkus, I. Scheunert, A. Kaune, K. Schramm, M. Zeeman, D. Muir, L. Hansen, D. Mackay, *Biocumulation and occurrence of endocrine-disrupting chemicals (EDCs), persistent organic pollutants (POPs), and other organic compounds in fish and other organisms including humans*. (Springer-Verlag Heidelberg, 2000).

- J. F. Gierthy, K. F. Arcaro, M. Floyd (1997) *Assessment of PCB estrogenicity in a human breast cancer cell line*. Chemosphere, **34**(5-7) 1495–1505.
- J. F. Gierthy, D. W. Lincoln, K. E. Roth, S. S. Bowser, J. A. Bennett, L. Bradley, H. W. Dickerman (1991) *Estrogen-stimulation of postconfluent cell accumulation and foci formation of human MCF-7 breast cancer cells*. J Cell Biochem, **45**(2) 177–187.
- R. Goth-Goldstein, C. Erdmann, M. Russell (2001) *CYP1B1 expression, a potential risk factor for breast cancer*. Lawrence Berkeley National Laboratory.
- G. L. Greene, M. F. Press (1986) *Structure and dynamics of the estrogen receptor*. J Steroid Biochem, **24**(1) 1–7.
- R. L. Guevel, F. Pakdel (2001) *Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods*. Hum Reprod, **16**(5) 1030–1036.
- C. Guillemette, A. Bélanger, J. Lépine (2004) *Metabolic inactivation of estrogens in breast tissue by UDP-glucuronosyltransferase enzymes: an overview*. Breast Cancer Res, **6**(6) 246–254.
- C. Guillemette, R. C. Millikan, B. Newman, D. E. Housman (2000) *Genetic polymorphisms in uridine diphospho-glucuronosyltransferase 1A1 and association with breast cancer among African Americans*. Cancer Res, **60**(4) 950–956.
- H. C. Guldborg, C. A. Marsden (1975) *Catechol-O-methyl transferase: pharmacological aspects and physiological role*. Pharmacol Rev, **27**(2) 135–206.
- J. Hakkola, M. Pasanen, O. Pelkonen, J. Hukkanen, S. Evisalmi, S. Anttila, A. Rane, M. Mäntylä, R. Purkunen, S. Saarikoski, M. Tooming, H. Raunio (1997) *Expression of CYP1B1 in human adult and fetal tissues and differential inducibility of CYP1B1 and CYP1A1 by Ah receptor ligands in human placenta and cultured cells*. Carcinogenesis, **18**(2) 391–397.
- E. H. Han, Y. P. Hwang, T. C. Jeong, S. S. Lee, J.-G. Shin, H. G. Jeong (2007) *Eugenol inhibit 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced genotoxicity in MCF-7 cells: Bifunctional effects on CYP1 and NAD(P)H:quinone oxidoreductase*. FEBS Lett, **581**(4) 749–756.
- J. R. Harmon, W. S. Branham, D. M. Sheehan (1989) *Transplacental estrogen responses in the fetal rat: increased uterine weight and ornithine decarboxylase activity*. Teratology, **39**(3) 253–260.
- W. R. Harrington, S. Sengupta, B. S. Katzenellenbogen (2006) *Estrogen regulation of the glucuronidation enzyme UGT2B15 in estrogen receptor-positive breast cancer cells*. Endocrinology, **147**(8) 3843–3850.
- R. M. Harris, R. H. Waring, C. J. Kirk, P. J. Hughes (2000) *Sulfation of estrogenic alkylphenols and 17beta-estradiol by human platelet phenol sulfotransferases*. J Biol Chem, **275**(1) 159–166.
- D. M. Harvell, T. E. Strecker, M. Tochacek, B. Xie, K. L. Pennington, R. D. McComb, S. K. Roy, J. D. Shull (2000) *Rat strain-specific actions of 17beta-estradiol in the mammary gland: correlation between estrogen-induced lobuloalveolar hyperplasia and susceptibility to estrogen-induced mammary cancers*. Proc Natl Acad Sci U S A, **97**(6) 2779–2784.

- G. Hausmann, C. Bänziger, K. Basler (2007) *Helping Wingless take flight: how WNT proteins are secreted*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **8**(4) 331–336.
- K. Hayashi, T. E. Spencer (2006) *WNT pathways in the neonatal ovine uterus: potential specification of endometrial gland morphogenesis by SFRP2*. *Biol Reprod*, **74**(4) 721–733.
- C. L. Hayes, D. C. Spink, B. C. Spink, J. Q. Cao, N. J. Walker, T. R. Sutter (1996) *17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(18) 9776–9781.
- H. Hearnshaw, J. M. Brown, I. A. Cumming, J. R. Goding, M. Nairn (1972) *Endocrinological and histopathological aspects of the infertility in the ewe caused by oestrogenic clover*. *J Reprod Fertil*, **28**(1) 160–161.
- M. Heikkilä, H. Peltoketo, S. Vainio (2001) *Wnts and the female reproductive system*. *J Exp Zool*, **290**(6) 616–623.
- H. Hellmold, T. Rylander, M. Magnusson, E. Reihner, M. Warner, J. A. Gustafsson (1998) *Characterization of cytochrome P450 enzymes in human breast tissue from reduction mammoplasties*. *J Clin Endocrinol Metab*, **83**(3) 886–895.
- E. C. Henry, R. K. Miller, R. B. Baggs (1984) *Direct fetal injections of diethylstilbestrol and 17 beta-estradiol: a method for investigating their teratogenicity*. *Teratology*, **29**(2) 297–304.
- C. Her, C. Szumlanski, I. A. Aksoy, R. M. Weinshilboum (1996) *Human jejunal estrogen sulfotransferase and dehydroepiandrosterone sulfotransferase: immunochemical characterization of individual variation*. *Drug Metab Dispos*, **24**(12) 1328–1335.
- J. S. Hernández, R. W. Watson, T. C. Wood, R. M. Weinshilboum (1992) *Sulfation of estrone and 17 beta-estradiol in human liver. Catalysis by thermostable phenol sulfotransferase and by dehydroepiandrosterone sulfotransferase*. *Drug Metab Dispos*, **20**(3) 413–422.
- T. Hirota, I. Ieiri, H. Takane, S. Maegawa, M. Hosokawa, K. Kobayashi, K. Chiba, E. Nanba, M. Oshimura, T. Sato, S. Higuchi, K. Otsubo (2004) *Allelic expression imbalance of the human CYP3A4 gene and individual phenotypic status*. *Hum Mol Genet*, **13**(23) 2959–2969.
- C. F. Holinka, E. Gurbide (1981) *Hormone-related enzymatic activities in normal and cancer cells of human endometrium*. *J Steroid Biochem*, **15** 183–192.
- C. F. Holinka, H. Hata, H. Kuramoto, E. Gurbide (1986) *Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line)*. *Cancer Res*, **46**(6) 2771–2774.
- H. Hu, M. J. Hilton, X. Tu, K. Yu, D. M. Ornitz, F. Long (2005) *Sequential roles of Hedgehog and Wnt signaling in osteoblast development*. *Development*, **132**(1) 49–60.
- W.-W. Huang, Y. Yin, Q. Bi, T.-C. Chiang, N. Garner, J. Vuoristo, J. A. McLachlan, L. Ma (2005) *Developmental diethylstilbestrol exposure alters genetic pathways of uterine cytodifferentiation*. *Mol Endocrinol*, **19**(3) 669–682.

- Z. Huang, M. J. Fasco, H. L. Figge, K. Keyomarsi, L. S. Kaminsky (1996) *Expression of cytochromes P450 in human breast tissue and tumors*. Drug Metab Dispos, **24**(8) 899–905.
- D. W. Hum, A. Bélanger, E. Lévesque, O. Barbier, M. Beaulieu, C. Albert, M. Vallée, C. Guillemette, A. Tchernof, D. Turgeon, S. Dubois (1999) *Characterization of UDP-glucuronosyltransferases active on steroid hormones*. J Steroid Biochem Mol Biol, **69**(1-6) 413–423.
- T. Iguchi, N. Takasugi (1987) *Postnatal development of uterine abnormalities in mice exposed to DES in utero*. Biol Neonate, **52**(2) 97–103.
- T. Improta-Brears, A. R. Whorton, F. Codazzi, J. D. York, T. Meyer, D. P. McDonnell (1999) *Estrogen-induced activation of mitogen-activated protein kinase requires mobilization of intracellular calcium*. Proc Natl Acad Sci U S A, **96**(8) 4686–4691.
- M. Iscan, T. Klaavuniemi, T. Coban, N. Kapucuoglu, O. Pelkonen, H. Raunio (2001) *The expression of cytochrome P450 enzymes in human breast tumours and normal breast tissue*. Breast Cancer Res Treat, **70**(1) 47–54.
- C. Ishida, N. Koga, N. Hanioka, H. K. Saeki, H. Yoshimura (1991) *Metabolism in vitro of 3,4,3',4'- and 2,5,2',5'-tetrachlorobiphenyl by rat liver microsomes and highly purified cytochrome P-450*. J Pharmacobiodyn, **14**(5) 276–284.
- M. Iwanari, M. Nakajima, R. Kizu, K. Hayakawa, T. Yokoi (2002) *Induction of CYP1A1, CYP1A2, and CYP1B1 mRNAs by nitropolycyclic aromatic hydrocarbons in various human tissue-derived cells: chemical-, cytochrome P450 isoform-, and cell-specific differences*. Arch Toxicol, **76**(5-6) 287–298.
- S. Katayama, K. Ashizawa, T. Fukuhara, M. Hiroyasu, Y. Tsuzuki, H. Tatemoto, T. Nakada, K. Nagai (2006) *Differential expression patterns of Wnt and beta-catenin/TCF target genes in the uterus of immature female rats exposed to 17alpha-ethynyl estradiol*. Toxicol Sci, **91**(2) 419–430.
- M. Katoh, T. Matsui, H. Okumura, M. Nakajima, M. Nishimura, S. Naito, C. Tateno, K. Yoshizato, T. Yokoi (2005) *Expression of human phase II enzymes in chimeric mice with humanized liver*. Drug Metab Dispos, **33**(9) 1333–1340.
- U. A. Kayisli, C. A. H. Aksu, M. Berkkanoglu, A. Arici (2002) *Estrogenicity of isoflavones on human endometrial stromal and glandular cells*. J Clin Endocrinol Metab, **87**(12) 5539–5544.
- M. K. Kelley, A. Engqvist-Goldstein, J. A. Montali, J. B. Wheatley, D. E. Schmidt, L. M. Kauvar (1994) *Variability of glutathione S-transferase isoenzyme patterns in matched normal and cancer human breast tissue*. Biochem J, **304** (Pt 3) 843–848.
- M. H. Kester, S. Bulduk, D. Tibboel, W. Meinl, H. Glatt, C. N. Falany, M. W. Coughtrie, A. Bergman, S. H. Safe, G. G. Kuiper, A. G. Schuur, A. Brouwer, T. J. Visser (2000) *Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated PCB metabolites: a novel pathway explaining the estrogenic activity of PCBs*. Endocrinology, **141**(5) 1897–1900.
- A. Kikuchi, H. Yamamoto, S. Kishida (2007) *Multiplicity of the interactions of Wnt proteins and their receptors*. Cell Signal, **19**(4) 659–671.

- S. Kim, Y. Choi, F. W. Bazer, T. E. Spencer (2003) *Identification of genes in the ovine endometrium regulated by interferon tau independent of signal transducer and activator of transcription 1*. *Endocrinology*, **144**(12) 5203–5214.
- R. D. Kimbrough, C. A. Krouskas (2003) *Human exposure to polychlorinated biphenyls and health effects: a critical synopsis*. *Toxicol Rev*, **22**(4) 217–233.
- J. Kitajewski, D. Sassoon (2000) *The emergence of molecular gynecology: homeobox and Wnt genes in the female reproductive tract*. *Bioessays*, **22**(10) 902–910.
- S. Kitamura, N. Jinno, T. Suzuki, K. Sugihara, S. Ohta, H. Kuroki, N. Fujimoto (2005) *Thyroid hormone-like and estrogenic activity of hydroxylated PCBs in cell culture*. *Toxicology*, **208**(3) 377–387.
- T. Kogai, T. Endo, T. Saito, A. Miyazaki, A. Kawaguchi, T. Onaya (1997) *Regulation by thyroid-stimulating hormone of sodium/iodide symporter gene expression and protein levels in FRTL-5 cells*. *Endocrinology*, **138**(6) 2227–2232.
- A. D. Kohn, R. T. Moon (2005) *Wnt and calcium signaling: beta-catenin-independent pathways*. *Cell Calcium*, **38**(3-4) 439–446.
- K. S. Korach, P. Sarver, K. Chae, J. A. McLachlan, J. D. McKinney (1988) *Estrogen receptor-binding activity of polychlorinated hydroxybiphenyls: conformationally restricted structural probes*. *Mol Pharmacol*, **33**(1) 120–126.
- W. A. Koss, D. R. Gehlert, A. Shekhar (2004) *Different effects of subchronic doses of 17-beta estradiol in two ethologically based models of anxiety utilizing female rats*. *Horm Behav*, **46**(2) 158–164.
- A. Kotov, J. L. Falany, J. Wang, C. N. Falany (1999) *Regulation of estrogen activity by sulfation in human Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **68**(3-4) 137–144.
- V. J. Kramer, W. G. Helferich, A. Bergman, E. Klasson-Wehler, J. P. Giesy (1997) *Hydroxylated polychlorinated biphenyl metabolites are anti-estrogenic in a stably transfected human breast adenocarcinoma (MCF7) cell line*. *Toxicol Appl Pharmacol*, **144**(2) 363–376.
- G. G. Kuiper, E. Enmark, M. Peltö-Huikko, S. Nilsson, J. A. Gustafsson (1996) *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(12) 5925–5930.
- G. G. Kuiper, J. A. Gustafsson (1997) *The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens*. *FEBS Lett*, **410**(1) 87–90.
- G. G. Kuiper, J. G. Lemmen, B. Carlsson, J. C. Corton, S. H. Safe, P. T. van der Saag, B. van der Burg, J. A. Gustafsson (1998) *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. *Endocrinology*, **139**(10) 4252–4263.
- T. Kuiper-Goodman, P. M. Scott, H. Watanabe (1987) *Risk assessment of the mycotoxin zearalenone*. *Regul Toxicol Pharmacol*, **7**(3) 253–306.
- P. J. Kushner, D. A. Agard, G. L. Greene, T. S. Scanlan, A. K. Shiau, R. M. Uht, P. Webb (2000) *Estrogen receptor pathways to AP-1*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **74**(5) 311–317.

- J. A. Lavigne, J. E. Goodman, T. Fonong, S. Odwin, P. He, D. W. Roberts, J. D. Yager (2001) *The effects of catechol-O-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells*. *Cancer Res*, **61**(20) 7488–7494.
- G. Lecce, G. Meduri, M. Ancelin, C. Bergeron, M. Perrot-Appinat (2001) *Presence of estrogen receptor beta in the human endometrium through the cycle: expression in glandular, stromal, and vascular cells*. *J Clin Endocrinol Metab*, **86**(3) 1379–1386.
- L. Lehmann, H. L. Esch, J. Wagner, L. Rohnstock, M. Metzler (2005) *Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of Daidzein in cultured human Ishikawa cells*. *Toxicol Lett*, **158**(1) 72–86.
- L. Lehmann, L. Jiang, J. Wagner (2008) *SOY ISOFLAVONES DECREASE THE CATECHOL-O-METHYLTRANSFERASE-MEDIATED INACTIVATION OF 4-HYDROXYESTRADIOL IN CULTURED MCF-7 CELLS*. *Carcinogenesis*.
- J. J. Li, S. A. Li (1987) *Estrogen carcinogenesis in Syrian hamster tissues: role of metabolism*. *Fed Proc*, **46**(5) 1858–1863.
- K.-M. Li, R. Todorovic, P. Devanesan, S. Higginbotham, H. Köfeler, R. Ramanathan, M. L. Gross, E. G. Rogan, E. L. Cavalieri (2004) *Metabolism and DNA binding studies of 4-hydroxyestradiol and estradiol-3,4-quinone in vitro and in female ACI rat mammary gland in vivo*. *Carcinogenesis*, **25**(2) 289–297.
- M. H. Li, L. G. Hansen (1996) *Enzyme induction and acute endocrine effects in prepubertal female rats receiving environmental PCB/PCDF/PCDD mixtures*. *Environ Health Perspect*, **104**(7) 712–722.
- J. G. Liehr (2000) *Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?* *Endocr Rev*, **21**(1) 40–54.
- J. G. Liehr, W. F. Fang, D. A. Sirbasku, A. Ari-Ulubelen (1986) *Carcinogenicity of catechol estrogens in Syrian hamsters*. *J Steroid Biochem*, **24**(1) 353–356.
- J. G. Liehr, M. J. Ricci (1996) *4-Hydroxylation of estrogens as marker of human mammary tumors*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**(8) 3294–3296.
- J. G. Liehr, D. Roy, A. Ari-Ulubelen, Q. D. Bui, J. Weisz, H. W. Strobel (1990) *Effect of chronic estrogen treatment of Syrian hamsters on microsomal enzymes mediating formation of catecholestrogens and their redox cycling: implications for carcinogenesis*. *J Steroid Biochem*, **35**(5) 555–560.
- X. Liu, J. Yao, E. Pisha, Y. Yang, Y. Hua, R. B. van Breemen, J. L. Bolton (2002) *Oxidative DNA damage induced by equine estrogen metabolites: role of estrogen receptor alpha*. *Chem Res Toxicol*, **15**(4) 512–519.
- C. Y. Logan, R. Nusse (2004) *The Wnt signaling pathway in development and disease*. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **20** 781–810.
- J. Lépine, O. Bernard, M. Plante, B. Têtu, G. Pelletier, F. Labrie, A. Bélanger, C. Guillemette (2004) *Specificity and regioselectivity of the conjugation of estradiol, estrone, and their catecholestrogen*

- and methoxyestrogen metabolites by human uridine diphospho-glucuronosyltransferases expressed in endometrium. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**(10) 5222–5232.
- K. Lundström, M. Salminen, A. Jalanko, R. Savolainen, I. Ulmanen (1991) *Cloning and characterization of human placental catechol-O-methyltransferase cDNA*. *DNA Cell Biol*, **10**(3) 181–189.
- B. Mahadevan, A. Luch, J. Atkin, M. Haynes, T. Nguyen, W. M. Baird (2007) *Inhibition of human cytochrome p450 1b1 further clarifies its role in the activation of dibenzo[a,l]pyrene in cells in culture*. *J Biochem Mol Toxicol*, **21**(3) 101–109.
- S. Maiti, S. Grant, S. M. Baker, S. Karanth, C. N. Pope, G. Chen (2004) *Stress regulation of sulfotransferases in male rat liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, **323**(1) 235–241.
- M. Manjanatha, S. Shelton, M. Bishop, L. Lyn-Cook, A. Aidoo (2006) *Dietary effects of soy isoflavones daidzein and genistein on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary mutagenesis and carcinogenesis in ovariectomized Big Blue transgenic rats*. *Carcinogenesis*, **27**(10) 1970–1979.
- M. G. Manjanatha, S. D. Shelton, B. S. Rhodes, M. E. Bishop, L. E. Lyn-Cook, A. Aidoo (2005) *17 Beta-estradiol and not genistein modulates lacI mutant frequency and types of mutation induced in the heart of ovariectomized big blue rats treated with 7, 12-dimethylbenz[a]anthracene*. *Environ Mol Mutagen*, **45**(1) 70–79.
- M. Marino, F. Acconcia, F. Bresciani, A. Weisz, A. Trentalance (2002) *Distinct nongenomic signal transduction pathways controlled by 17beta-estradiol regulate DNA synthesis and cyclin D(1) gene transcription in HepG2 cells*. *Mol Biol Cell*, **13**(10) 3720–3729.
- L. Markiewicz, J. Garey, H. Adlercreutz, E. Gurbide (1993) *In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **45**(5) 399–405.
- S. Matsuzaki, T. Fukaya, T. Suzuki, T. Murakami, H. Sasano, A. Yajima (1999) *Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle*. *Mol Hum Reprod*, **5**(6) 559–564.
- J. Maubach, M. E. Bracke, A. Heyerick, H. T. Depypere, R. F. Serreyn, M. M. Mareel, D. D. Keukeleire (2003) *Quantitation of soy-derived phytoestrogens in human breast tissue and biological fluids by high-performance liquid chromatography*. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, **784**(1) 137–144.
- U. Mayr, A. Butsch, S. Schneider (1992) *Validation of two in vitro test systems for estrogenic activities with zearalenone, phytoestrogens and cereal extracts*. *Toxicology*, **74**(2-3) 135–149.
- D. P. McDonnell, S. L. Dana, P. A. Hoener, B. A. Lieberman, M. O. Imhof, R. B. Stein (1995) *Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor*. *Ann N Y Acad Sci*, **761** 121–137.
- J. D. McKinney, C. L. Waller (1994) *Polychlorinated biphenyls as hormonally active structural analogues*. *Environ Health Perspect*, **102**(3) 290–297.

- R. Meech, P. I. Mackenzie (1997) *Structure and function of uridine diphosphate glucuronosyltransferases*. Clin Exp Pharmacol Physiol, **24**(12) 907–915.
- P. Mendola, G. M. Buck, L. E. Sever, M. Zielezny, J. E. Vena (1997) *Consumption of PCB-contaminated freshwater fish and shortened menstrual cycle length*. Am J Epidemiol, **146**(11) 955–960.
- M. L. Menone, J. E. A. de Moreno, V. J. Moreno, A. L. Lanfranchi, T. L. Metcalfe, C. D. Metcalfe (2000) *PCBs and organochlorines in tissues of silverside (Odontesthes bonariensis) from a coastal lagoon in Argentina*. Arch Environ Contam Toxicol, **38**(2) 202–208.
- M. Mericskay, L. Carta, D. Sassoon (2005) *Diethylstilbestrol exposure in utero: a paradigm for mechanisms leading to adult disease*. Birth Defects Res A Clin Mol Teratol, **73**(3) 133–135.
- M. Mericskay, J. Kitajewski, D. Sassoon (2004) *Wnt5a is required for proper epithelial-mesenchymal interactions in the uterus*. Development, **131**(9) 2061–2072.
- M. Messina, W. McCaskill-Stevens, J. W. Lampe (2006) *Addressing the soy and breast cancer relationship: review, commentary, and workshop proceedings*. J Natl Cancer Inst, **98**(18) 1275–1284.
- A. Migliaccio, M. D. Domenico, G. Castoria, A. de Falco, P. Bontempo, E. Nola, F. Auricchio (1996) *Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells*. EMBO J, **15**(6) 1292–1300.
- C. Miller, K. Degenhardt, D. A. Sassoon (1998a) *Fetal exposure to DES results in de-regulation of Wnt7a during uterine morphogenesis*. Nat Genet, **20**(3) 228–230.
- C. Miller, A. Pavlova, D. A. Sassoon (1998b) *Differential expression patterns of Wnt genes in the murine female reproductive tract during development and the estrous cycle*. Mech Dev, **76**(1-2) 91–99.
- J. R. Miller (2002) *The Wnts*. Genome Biol, **3**(1) REVIEWS3001.
- M. M. Montano, N. R. Bianco, H. Deng, B. M. Wittmann, L. C. Chaplin, B. S. Katzenellenbogen (2005) *Estrogen receptor regulation of quinone reductase in breast cancer: implications for estrogen-induced breast tumor growth and therapeutic uses of tamoxifen*. Front Biosci, **10** 1440–1461.
- M. Moore, M. Mustain, K. Daniel, I. Chen, S. Safe, T. Zacharewski, B. Gillesby, A. Joyeux, P. Balaguer (1997) *Antiestrogenic activity of hydroxylated polychlorinated biphenyl congeners identified in human serum*. Toxicol Appl Pharmacol, **142**(1) 160–168.
- S. O. Mueller, K. S. Korach (2001) *Estrogen receptors and endocrine diseases: lessons from estrogen receptor knockout mice*. Curr Opin Pharmacol, **1**(6) 613–619.
- S. Nandi, R. C. Guzman, J. Yang (1995) *Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, **92**(9) 3650–3657.
- R. R. Newbold, E. P. Banks, B. Bullock, W. N. Jefferson (2001) *Uterine adenocarcinoma in mice treated neonatally with genistein*. Cancer Res, **61**(11) 4325–4328.

- R. R. Newbold, J. A. McLachlan (1982) *Vaginal adenosis and adenocarcinoma in mice exposed prenatally or neonatally to diethylstilbestrol*. *Cancer Res*, **42**(5) 2003–2011.
- R. R. Newbold, A. B. Moore, D. Dixon (2002) *Characterization of uterine leiomyomas in CD-1 mice following developmental exposure to diethylstilbestrol (DES)*. *Toxicol Pathol*, **30**(5) 611–616.
- H. Newill, R. Loske, J. Wagner, C. Johannes, R. L. Lorenz, L. Lehmann (2007) *Oxidation products of stigmaterol interfere with the action of the female sex hormone 17beta-estradiol in cultured human breast and endometrium cell lines*. *Mol Nutr Food Res*, **51**(7) 888–898.
- S. Nilsson, S. Mäkelä, E. Treuter, M. Tujague, J. Thomsen, G. Andersson, E. Enmark, K. Pettersson, M. Warner, J. A. Gustafsson (2001) *Mechanisms of estrogen action*. *Physiol Rev*, **81**(4) 1535–1565.
- M. Nishida (2002) *The Ishikawa cells from birth to the present*. *Hum Cell*, **15**(3) 104–117.
- M. Nishida, K. Kasahara, M. Kaneko, H. Iwasaki, K. Hayashi (1985) [*Establishment of a new human endometrial adenocarcinoma cell line, Ishikawa cells, containing estrogen and progesterone receptors*]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*, **37**(7) 1103–1111.
- M. Nishimura, H. Yaguti, H. Yoshitsugu, S. Naito, T. Satoh (2003) *Tissue distribution of mRNA expression of human cytochrome P450 isoforms assessed by high-sensitivity real-time reverse transcription PCR*. *Yakugaku Zasshi*, **123**(5) 369–375.
- T. Nishiyama, K. Ogura, H. Nakano, T. Kaku, E. Takahashi, Y. Ohkubo, K. Sekine, A. Hiratsuka, S. Kadota, T. Watabe (2002) *Sulfation of environmental estrogens by cytosolic human sulfotransferases*. *Drug Metab Pharmacokinet*, **17**(3) 221–228.
- S. Nowell, B. Green, Y. M. Tang, R. Wiese, F. F. Kadlubar (2005) *Examination of human tissue cytosols for expression of sulfotransferase isoform 1A2 (SULT1A2) using a SULT1A2-specific antibody*. *Mol Pharmacol*, **67**(2) 394–399.
- L. M. Nutter, E. O. Ngo, Y. J. Abul-Hajj (1991) *Characterization of DNA damage induced by 3,4-estrone-o-quinone in human cells*. *J Biol Chem*, **266**(25) 16380–16386.
- T. G. Obrig, W. J. Culp, W. L. McKeehan, B. Hardesty (1971) *The mechanism by which cycloheximide and related glutarimide antibiotics inhibit peptide synthesis on reticulocyte ribosomes*. *J Biol Chem*, **246**(1) 174–181.
- Y. Osawa, T. Higashiyama, Y. Shimizu, C. Yarborough (1993) *Multiple functions of aromatase and the active site structure; aromatase is the placental estrogen 2-hydroxylase*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **44**(4-6) 469–480.
- E. Padilla-Banks, W. N. Jefferson, R. R. Newbold (2006) *Neonatal exposure to the phytoestrogen genistein alters mammary gland growth and developmental programming of hormone receptor levels*. *Endocrinology*, **147**(10) 4871–4882.
- C. Punyadeera, H. Dassen, J. Klomp, G. Dunselman, R. Kamps, F. Dijcks, A. Ederveen, A. de Goeij, P. Groothuis (2005) *Oestrogen-modulated gene expression in the human endometrium*. *Cell Mol Life Sci*, **62**(2) 239–250.

- L. C. Quattrochi, R. H. Tukey (1989) *The human cytochrome Cyp1A2 gene contains regulatory elements responsive to 3-methylcholanthrene*. Mol Pharmacol, **36**(1) 66–71.
- R. Raftogianis, C. Creveling, R. Weinshilboum, J. Weisz (2000) *Estrogen metabolism by conjugation*. J Natl Cancer Inst Monogr, **27**(27) 113–124.
- K. Ramamoorthy, C. Vyhlidal, F. Wang, I. Chen, S. Safe, D. P. McDonnell, L. S. Leonard, K. W. Gaido (1997) *Additive estrogenic activities of a binary mixture of 2',4',6'-trichloro- and 2',3',4',5'-tetrachloro-4-biphenylol*. Toxicol Appl Pharmacol, **147**(1) 93–100.
- M. Razandi, A. Pedram, G. L. Greene, E. R. Levin (1999) *Cell membrane and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ERalpha and ERbeta expressed in Chinese hamster ovary cells*. Mol Endocrinol, **13**(2) 307–319.
- J. M. Rey, P. Pujol, H. Dechaud, E. Edouard, B. Hedon, T. Maudelonde (1998) *Expression of oestrogen receptor-alpha splicing variants and oestrogen receptor-beta in endometrium of infertile patients*. Mol Hum Reprod, **4**(7) 641–647.
- J. A. Robertson, Y. Farnell, L. S. Lindahl, N. H. Ing (2002) *Estradiol up-regulates estrogen receptor messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma (Ishikawa) cells by stabilizing the message*. J Mol Endocrinol, **29**(1) 125–135.
- E. Rodriguez-Boulan, G. Kreitzer, A. Müsch (2005) *Organization of vesicular trafficking in epithelia*. Nat Rev Mol Cell Biol, **6**(3) 233–247.
- D. Roy, J. G. Liehr (1999) *Estrogen, DNA damage and mutations*. Mutat Res, **424**(1-2) 107–115.
- D. Roy, J. Weisz, J. G. Liehr (1990) *The O-methylation of 4-hydroxyestradiol is inhibited by 2-hydroxyestradiol: implications for estrogen-induced carcinogenesis*. Carcinogenesis, **11**(3) 459–462.
- J. Russo, I. H. Russo (2004) *Genotoxicity of steroidal estrogens*. Trends Endocrinol Metab, **15**(5) 211–214.
- M. Saeed, S. J. Gunselman, S. Higginbotham, E. Rogan, E. Cavalieri (2005) *Formation of the depurinating N3adenine and N7guanine adducts by reaction of DNA with hexestrol-3',4'-quinone or enzyme-activated 3'-hydroxyhexestrol. Implications for a unifying mechanism of tumor initiation by natural and synthetic estrogens*. Steroids, **70**(1) 37–45.
- M. Saeed, E. Rogan, S. V. Fernandez, F. Sheriff, J. Russo, E. Cavalieri (2007) *Formation of depurinating N3Adenine and N7Guanine adducts by MCF-10F cells cultured in the presence of 4-hydroxyestradiol*. Int J Cancer, **120**(8) 1821–1824.
- S. H. Safe (1994) *Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment*. Crit Rev Toxicol, **24**(2) 87–149.
- B. Safford, A. Dickens, N. Halleron, D. Briggs, P. Carthew, V. Baker (2003) *A model to estimate the oestrogen receptor mediated effects from exposure to soy isoflavones in food*. Regul Toxicol Pharmacol, **38**(2) 196–209.

- M. Salminen, K. Lundström, C. Tilgmann, R. Savolainen, N. Kalkkinen, I. Ulmanen (1990) *Molecular cloning and characterization of rat liver catechol-O-methyltransferase*. *Gene*, **93**(2) 241–247.
- C. D. Sandau, P. Ayotte, E. Dewailly, J. Duffe, R. J. Norstrom (2000) *Analysis of hydroxylated metabolites of PCBs (OH-PCBs) and other chlorinated phenolic compounds in whole blood from Canadian Inuit*. *Environ Health Perspect*, **108**(7) 611–616.
- I. Schneweis, K. Meyer, G. Engelhardt, J. Bauer (2002) *Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat*. *J Agric Food Chem*, **50**(6) 1736–1738.
- T. W. Schultz (2002) *Estrogenicity of biphenylols: activity in the yeast gene activation assay*. *Bull Environ Contam Toxicol*, **68**(3) 332–338.
- A. G. Schuur, F. F. Legger, M. E. van Meeteren, M. J. Moonen, I. van Leeuwen-Bol, A. Bergman, T. J. Visser, A. Brouwer (1998) *In vitro inhibition of thyroid hormone sulfation by hydroxylated metabolites of halogenated aromatic hydrocarbons*. *Chem Res Toxicol*, **11**(9) 1075–1081.
- T. Shimada, C. L. Hayes, H. Yamazaki, S. Amin, S. S. Hecht, F. P. Guengerich, T. R. Sutter (1996) *Activation of chemically diverse procarcinogens by human cytochrome P-450 1B1*. *Cancer Res*, **56**(13) 2979–2984.
- M. Shou, K. R. Korzekwa, E. N. Brooks, K. W. Krausz, F. J. Gonzalez, H. V. Gelboin (1997) *Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone*. *Carcinogenesis*, **18**(1) 207–214.
- J. D. Shull, T. J. Spady, M. C. Snyder, S. L. Johansson, K. L. Pennington (1997) *Ovary-intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17beta-estradiol rapidly develop mammary carcinoma*. *Carcinogenesis*, **18**(8) 1595–1601.
- J. Simard, R. Sanchez, D. Poirier, S. Gauthier, S. M. Singh, Y. Merand, A. Belanger, C. Labrie, F. Labrie (1997) *Blockade of the stimulatory effect of estrogens, OH-tamoxifen, OH-toremifene, droloxifene, and raloxifene on alkaline phosphatase activity by the antiestrogen EM-800 in human endometrial adenocarcinoma Ishikawa cells*. *Cancer Res*, **57**(16) 3494–3497.
- S. Singh, D. Chakravarti, J. A. Edney, R. R. Hollins, P. J. Johnson, W. W. West, S. M. Higginbotham, E. L. Cavalieri, E. G. Rogan (2005) *Relative imbalances in the expression of estrogen-metabolizing enzymes in the breast tissue of women with breast carcinoma*. *Oncol Rep*, **14**(4) 1091–1096.
- D. C. Slusarski, V. G. Corces, R. T. Moon (1997) *Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling*. *Nature*, **390**(6658) 410–413.
- T. Smuc, R. Ruprecht, J. Sinkovec, J. Adamski, T. L. Rizner (2006) *Expression analysis of estrogen-metabolizing enzymes in human endometrial cancer*. *Mol Cell Endocrinol*, **248**(1-2) 114–117.
- Soontornchat, Li, Cooke, Hansen (1994) *Toxicokinetic and Toxicodynamic Influences on Endocrine Disruption by Polychlorinated Biphenyls*. *Environ Health Perspect*, **102**(6-7) 568–571.
- A. M. Soto, C. Sonnenschein, K. L. Chung, M. F. Fernandez, N. Olea, F. O. Serrano (1995) *The*

- E-SCREEN* assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect*, **103 Suppl 7** 113–122.
- D. C. Spink, H. P. Eugster, D. W. Lincoln, J. D. Schuetz, E. G. Schuetz, J. A. Johnson, L. S. Kaminsky, J. F. Gierthy (1992) *17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1A1: a comparison of the activities induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in MCF-7 cells with those from heterologous expression of the cDNA*. *Arch Biochem Biophys*, **293**(2) 342–348.
- D. C. Spink, C. L. Hayes, N. R. Young, M. Christou, T. R. Sutter, C. R. Jefcoate, J. F. Gierthy (1994) *The effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on estrogen metabolism in MCF-7 breast cancer cells: evidence for induction of a novel 17 beta-estradiol 4-hydroxylase*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **51**(5-6) 251–258.
- D. C. Spink, B. H. Katz, M. M. Hussain, B. T. Pentecost, Z. Cao, B. C. Spink (2003) *Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells*. *Carcinogenesis*, **24**(12) 1941–1950.
- D. C. Spink, B. C. Spink, J. Q. Cao, J. A. DePasquale, B. T. Pentecost, M. J. Fasco, Y. Li, T. R. Sutter (1998) *Differential expression of CYP1A1 and CYP1B1 in human breast epithelial cells and breast tumor cells*. *Carcinogenesis*, **19**(2) 291–298.
- D. E. Stack, J. Byun, M. L. Gross, E. G. Rogan, E. L. Cavalieri (1996) *Molecular characteristics of catechol estrogen quinones in reactions with deoxyribonucleosides*. *Chem Res Toxicol*, **9**(5) 851–859.
- J. J. Stegeman, M. E. Hahn, R. Weisbrod, B. R. Woodin, J. S. Joy, S. Najibi, R. A. Cohen (1995) *Induction of cytochrome P4501A1 by aryl hydrocarbon receptor agonists in porcine aorta endothelial cells in culture and cytochrome P4501A1 activity in intact cells*. *Mol Pharmacol*, **47**(2) 296–306.
- H. Stopper, E. Schmitt, K. Kobras (2005) *Genotoxicity of phytoestrogens*. *Mutat Res*, **574**(1-2) 139–155.
- A. Sumida, K. Kinoshita, T. Fukuda, H. Matsuda, I. Yamamoto, T. Inaba, J. Azuma (1999) *Relationship between mRNA levels quantified by reverse transcription-competitive PCR and metabolic activity of CYP3A4 and CYP2E1 in human liver*. *Biochem Biophys Res Commun*, **262**(2) 499–503.
- J. Sun, Y. R. Huang, W. R. Harrington, S. Sheng, J. A. Katzenellenbogen, B. S. Katzenellenbogen (2002) *Antagonists selective for estrogen receptor alpha*. *Endocrinology*, **143**(3) 941–947.
- T. Suzuki, T. Nakata, Y. Miki, C. Kaneko, T. Moriya, T. Ishida, S. Akinaga, H. Hirakawa, M. Kimura, H. Sasano (2003) *Estrogen sulfotransferase and steroid sulfatase in human breast carcinoma*. *Cancer Res*, **63**(11) 2762–2770.
- H. Takemura, J.-Y. Shim, K. Sayama, A. Tsubura, B. T. Zhu, K. Shimoi (2007) *Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **103**(2) 170–177.
- J. Taskinen, B. T. Ethell, P. Pihlavisto, A. M. Hood, B. Burchell, M. W. H. Coughtrie (2003) *Conjugation of catechols by recombinant human sulfotransferases, UDP-glucuronosyltransferases, and soluble catechol O-methyltransferase: structure-conjugation relationships and predictive models*. *Drug Metab Dispos*, **31**(9) 1187–1197.

- J. Thibaudeau, J. Lépine, J. Tojcic, Y. Duguay, G. Pelletier, M. Plante, J. Brisson, B. Têtu, S. Jacob, L. Perusse, A. Bélanger, C. Guillemette (2006) *Characterization of common UGT1A8, UGT1A9, and UGT2B7 variants with different capacities to inactivate mutagenic 4-hydroxylated metabolites of estradiol and estrone*. *Cancer Res*, **66**(1) 125–133.
- H. Tian, J. Ou, S. C. Strom, R. Venkataramanan (2005) *Activity and expression of various isoforms of uridine diphosphate glucuronosyltransferase are differentially regulated during hepatic regeneration in rats*. *Pharm Res*, **22**(12) 2007–2015.
- Y. Tsuchiya, M. Nakajima, T. Yokoi (2005) *Cytochrome P450-mediated metabolism of estrogens and its regulation in human*. *Cancer Lett*, **227**(2) 115–124.
- R. H. Tukey, C. P. Strassburg (2000) *Human UDP-glucuronosyltransferases: metabolism, expression, and disease*. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, **40** 581–616.
- S. Tulac, N. R. Nayak, L. C. Kao, M. V. Waes, J. Huang, S. Lobo, A. Germeyer, B. A. Lessey, R. N. Taylor, E. Suchanek, L. C. Giudice (2003) *Identification, characterization, and regulation of the canonical Wnt signaling pathway in human endometrium*. *J Clin Endocrinol Metab*, **88**(8) 3860–3866.
- V. K. Turan, R. I. Sanchez, J. J. Li, S. A. Li, K. R. Reuhl, P. E. Thomas, A. H. Conney, M. A. Gallo, F. C. Kauffman, S. Mesia-Vela (2004) *The effects of steroidal estrogens in ACI rat mammary carcinogenesis: 17beta-estradiol, 2-hydroxyestradiol, 4-hydroxyestradiol, 16alpha-hydroxyestradiol, and 4-hydroxyestrone*. *J Endocrinol*, **183**(1) 91–99.
- D. Turgeon, J. S. Carrier, E. Lévesque, D. W. Hum, A. Bélanger (2001) *Relative enzymatic activity, protein stability, and tissue distribution of human steroid-metabolizing UGT2B subfamily members*. *Endocrinology*, **142**(2) 778–787.
- M. T. Veeman, J. D. Axelrod, R. T. Moon (2003) *A second canon. Functions and mechanisms of beta-catenin-independent Wnt signaling*. *Dev Cell*, **5**(3) 367–377.
- O. Wada-Hiraike, H. Hiraike, H. Okinaga, O. Imamov, R. P. A. Barros, A. Morani, Y. Omoto, M. Warner, J.-A. Gustafsson (2006) *Role of estrogen receptor beta in uterine stroma and epithelium: Insights from estrogen receptor beta^{-/-} mice*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**(48) 18350–18355.
- J. Wagner, L. Jiang, L. Lehmann (2008) *Phytoestrogens modulate the expression of 17beta-estradiol-metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells*. *Hormonal Carcinogenesis*, **5** in press.
- J. Wagner, L. Lehmann (2006) *Estrogens modulate the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells*. *Mol Nutr Food Res*, **50**(4-5) 368–372.
- H. Wang, H. Eriksson, L. Sahlin (2000) *Estrogen receptors alpha and beta in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle*. *Biol Reprod*, **63**(5) 1331–1340.
- K. Wang, S. Ramji, A. Bhatena, C. Lee, D. S. Riddick (1999) *Glutathione S-transferases in wild-type and doxorubicin-resistant MCF-7 human breast cancer cell lines*. *Xenobiotica*, **29**(2) 155–170.
- L.-Q. Wang, M. O. James (2005) *Sulfotransferase 2A1 forms estradiol-17-sulfate and celecoxib switches*

- the dominant product from estradiol-3-sulfate to estradiol-17-sulfate.* J Steroid Biochem Mol Biol, **96**(5) 367–374.
- M. Watanabe, T. Kumai, N. Matsumoto, M. Tanaka, S. Suzuki, T. Satoh, S. Kobayashi (2004) *Expression of CYP3A4 mRNA is correlated with CYP3A4 protein level and metabolic activity in human liver.* J Pharmacol Sci, **94**(4) 459–462.
- K. M. Waters, S. Safe, K. W. Gaido (2001) *Differential gene expression in response to methoxychlor and estradiol through ERalpha, ERbeta, and AR in reproductive tissues of female mice.* Toxicol Sci, **63**(1) 47–56.
- J. Weisz, G. Fritz-Wolz, S. Gestl, G. A. Clawson, C. R. Creveling, J. G. Liehr, D. Dabbs (2000) *Nuclear localization of catechol-O-methyltransferase in neoplastic and nonneoplastic mammary epithelial cells.* Am J Pathol, **156**(6) 1841–1848.
- R. D. Whelan, L. K. Hosking, A. J. Townsend, K. H. Cowan, B. T. Hill (1989) *Differential increases in glutathione S-transferase activities in a range of multidrug-resistant human tumor cell lines.* Cancer Commun, **1**(6) 359–365.
- R. Wilkinson (1993) *The Effect Of Charcoal/Dextran Treatment On Select Serum Components.* Art To Science, **12**(3/4) 4–9.
- K. Willert, J. D. Brown, E. Danenberg, A. W. Duncan, I. L. Weissman, T. Reya, J. R. Yates, R. Nusse (2003) *Wnt proteins are lipid-modified and can act as stem cell growth factors.* Nature, **423**(6938) 448–452.
- H. Wiseman, K. Casey, E. A. Bowey, R. Duffy, M. Davies, I. R. Rowland, A. S. Lloyd, A. Murray, R. Thompson, D. B. Clarke (2004) *Influence of 10 wk of soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults.* Am J Clin Nutr, **80**(3) 692–699.
- J. Wober, I. Weisswange, G. Vollmer (2002) *Stimulation of alkaline phosphatase activity in Ishikawa cells induced by various phytoestrogens and synthetic estrogens.* J Steroid Biochem Mol Biol, **83**(1-5) 227–233.
- T. Xie, S. L. Ho, D. Ramsden (1999) *Characterization and implications of estrogenic down-regulation of human catechol-O-methyltransferase gene transcription.* Mol Pharmacol, **56**(1) 31–38.
- J. D. Yager, N. E. Davidson (2006) *Estrogen carcinogenesis in breast cancer.* N Engl J Med, **354**(3) 270–282.
- H. Yoshimura, Y. Yonemoto, H. Yamada, N. Koga, K. Oguri, S. Saeki (1987) *Metabolism in vivo of 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl and toxicological assessment of the metabolites in rats.* Xenobiotica, **17**(8) 897–910.
- E. V. Younglai, W. G. Foster, E. G. Hughes, K. Trim, J. F. Jarrell (2002) *Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization.* Arch Environ Contam Toxicol, **43**(1) 121–126.

- Z. Yu, D. Hu, Y. Li (2004) *Effects of zearalenone on mRNA expression and activity of cytochrome P450 1A1 and 1B1 in MCF-7 cells*. *Ecotoxicol Environ Saf*, **58**(2) 187–193.
- W. Yue, R. J. Santen, J.-P. Wang, Y. Li, M. F. Verderame, W. P. Bocchinfuso, K. S. Korach, P. Devanesan, R. Todorovic, E. G. Rogan, E. L. Cavalieri (2003) *Genotoxic metabolites of estradiol in breast: potential mechanism of estradiol induced carcinogenesis*. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **86**(3-5) 477–486.
- T. Zacharewski (1997) *In vitro bioassays for assessing estrogenic substances*. *Environ Sci Technol*, **31**(3) 613–623.
- M. Zahid, E. Kohli, M. Saeed, E. Rogan, E. Cavalieri (2006) *The greater reactivity of estradiol-3,4-quinone vs estradiol-2,3-quinone with DNA in the formation of depurinating adducts: implications for tumor-initiating activity*. *Chem Res Toxicol*, **19**(1) 164–172.
- F. Zhang, S. M. Swanson, R. B. van Breemen, X. Liu, Y. Yang, C. Gu, J. L. Bolton (2001) *Equine estrogen metabolite 4-hydroxyequilenin induces DNA damage in the rat mammary tissues: formation of single-strand breaks, apurinic sites, stable adducts, and oxidized bases*. *Chem Res Toxicol*, **14**(12) 1654–1659.
- S. Zhao, A. Narang, X. Ding, G. Eadon (2004) *Characterization and quantitative analysis of DNA adducts formed from lower chlorinated PCB-derived quinones*. *Chem Res Toxicol*, **17**(4) 502–511.
- B. T. Zhu (2002) *Catechol-O-Methyltransferase (COMT)-mediated methylation metabolism of endogenous bioactive catechols and modulation by endobiotics and xenobiotics: importance in pathophysiology and pathogenesis*. *Curr Drug Metab*, **3**(3) 321–349.
- B. T. Zhu, A. H. Conney (1998) *Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives*. *Carcinogenesis*, **19**(1) 1–27.
- B. T. Zhu, A. J. Lee (2005) *NADPH-dependent metabolism of 17beta-estradiol and estrone to polar and nonpolar metabolites by human tissues and cytochrome P450 isoforms*. *Steroids*, **70**(4) 225–244.

A Anhang

Daten zu Abb. 12: Relative ER α und ER β mRNA-Gehalte in exponentiell wachsenden kultivierten Ishikawazellen ohne Behandlung. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MW	Stabw.
ER α	2,56	0,27965
ER β	0,0362	0,0039

Daten zu Abb. 13: Ishikawazellen wurden ausgestreut (10000 Zellen pro Loch einer 96-Lochplatte) und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurde nach 6, 12, 24, 48 und 72 h nach dem Anwachsen sowohl die Bildung von 4-Nitrophenol als auch die Zellzahl bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 (4-NP) beziehungsweise 3 (Zellzahl) Bestimmungen.

h	Bildung 4-NP	Bildung 4-NP	Zellzahl	Zellzahl
	MW	Stabw.	MW	Stabw.
6,0	23,6	2,1	21055,0	628,4
12,0	25,0	1,6	25000,0	1628,3
24,0	35,0	2,8	31441,3	2028,6
48,0	53,2	4,2	60433,6	739,5
72,0	100,2	7,7	118833,4	2117,3

Daten zu Abb. 14: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) nach Behandlung von Ishikawazellen mit E2 für 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

E2-Konzentration (log M)	MW	Stabw.
-13	66,84	7,69
-12	63,86	11,93
-11	77,41	5,13
-10	158,89	16,15
-9	343,94	25
-8	426,19	39,59
-7	414	20
-6	417,17	25

Daten zu Abb. 15: Wachstumskurve von Ishikawazellen. 20000 Zellen wurden in einer 96-Lochplatte ausgestreut und 24 h anwachsen gelassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,1% DMSO, 100 pM und 10 nM E2 für 72 h behandelt. Direkt nach Anwachsen sowohl als auch 24, 48 und 72 h nach der Inkubation wurde die Zellzahl bestimmt. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen.

Zeit	DMSO		100 pM E2		10 nM E2	
	MW	Stabw.	MW	Stabw.	MW	Stabw.
-24	10000,0		10000,0		10000	
0	33374,9	1256,7	34351,3	1713,0	34327,0	842,7
24	62882,6	4057,1	63460,2	4899,3	64864,2	2351,6
48	120867,1	1478,9	122381,2	2681,0	123792,0	1219,9
72	118833,4	2117,3	115440,5	3339,7	123889,0	6554,1

Daten zu Abb. 16: ALP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit E2 für 72 h. Die Konzentration (-13) entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Bestimmungen.

Konzentration (log M)	MW	Stabw.
-13	0,55986	0,0644
-12	0,5349	0,09993
-11	0,6484	0,0429
-10	1,33088	0,13527
-9	2,88088	0,2094
-8	3,56982	0,33161
-7	3,46771	0,1675
-6	3,49427	0,2094

Daten zu Abb. 17: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 24-Lochplatte und Lebendzellzahl pro Loch einer 24-Lochplatte nach 24-stündiger Vorbehandlung von Ishikawazellen mit verschiedenen Konzentrationen an Transfektionsmittel (TM) und anschließender Inkubation mit 0,1% DMSO für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

TM (%)	Bildung 4-NP	Bildung 4-NP _t	Zellzahl _t	Zellzahl
	MW	Stabw.	MW	Stabw.
0	116,8998	9,2954	478518	53302
0,05	127,968	17,30091	503934	75804
0,10	118,551	11,5668	499272	79110
0,25	126,5232	12,02948	526164	25192
0,50	115,2486	19,73584	479469	24718

Daten zu Abb. 18: Relative ER α mRNA Gehalte nach 24-stündiger Transfektion von Ishikawazellen mit 0,25% Transfektionsmittel (TM) mit und ohne siRNA_{ER α} (10 nM) und weiterer anschließender Inkubation mit Lösungsmittel (0,1% DMSO) für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen.

A Anhang

	0 h	24 h	48 h
MW	16	26	39
Stabw.	3	2	9

Daten zu Abb. 19: Relative AIP mRNA-Gehalte (oben) und AIP-Aktivität (unten) in Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen nach 24-stündiger (mRNA) beziehungsweise 48-stündiger Behandlung mit DMSO (0,1%) bzw. 10 nM E2. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 (mRNA) beziehungsweise 6 (Aktivität) Bestimmungen.

	mRNA			
	TK		ER α -KO	
	MW	Stabw.	MW	Stabw.
DMSO	1,02	0,16	1,418	0,5
E2	15,4	0,2	1,985	0,36

	AIP-Aktivität			
	TK		ER α -KO	
	MW	Stabw.	MW	Stabw.
DMSO	24,72137	3,72252	13,26142	2,59219
E2	440,27392	23,28463	48,95781	12,50618

Daten zu Abb. 20: AIP-Aktivität nach 24-stündiger Vorbehandlung von Ishikawazellen mit verschiedenen Konzentrationen an Transfektionsmittel (TM) und anschliessender Inkubation mit Lösungsmittel (0,1% DMSO) oder 10 nM E2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

siRNAER α	TR(0,1%)			
0	0,27856	0,0491	5,23891	0,69745
1	0,2443	0,06607	3,77699	0,31911
2,5	0,26528	0,02372	3,15549	0,34664
5	0,21669	0,03438	2,47679	0,2439
10	0,25894	0,07819	2,45912	0,30558
25	0,34289	0,16866	2,23114	0,42188
50	0,23584	0,05315	2,13645	0,17925

siRNAER α	TR(0,25%)			
0	0,24721	0,03723	4,40274	0,23285
1	0,16804	0,02465	1,38565	0,17169
2,5	0,14307	0,01774	0,95309	0,14529
5	0,14082	0,06993	0,57952	0,14868
10	0,13261	0,02592	0,48958	0,12506
25	0,12706	0,08196	0,28592	0,04185
50	0,10697	0,01155	0,42442	0,13359

Daten zu Abb. 21: AIP-Aktivität von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen nach Inkubation mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 für 6-72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

Zeit(h)	E2		ER α -KO		
	TM				
6		1,1	0,1	1,05	0,07
12		1,27	0,21	0,96	0,06
24		2,09	0,09	0,8	0,06
48		5,07	0,76	0,63	0,13
72		7,83	0,59	1,72	0,14
DMSO					
	TM		ER α -KO		
6		1,18	0,1	1,12	0,03
12		1,39	0,06	1,16	0,09
24		1,05	0,09	1,07	0,05
48		0,88	0,07	0,8	0,23
72		0,84	0,06	0,82	0,05

Daten zu Abb. 22: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit GEN für 72 h. Die Konzentration 10^{-11} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

GEN-Konzentration (log M)	DMSO		E2	
	MW	Stabw.	MW	Stabw.
-11	61,27	6,49	629,21	41,3
-10	53,83	5,04	648,63	32,9
-9	53,31	3,65	642,42	16,12
-8	57,74	3,17	638,18	30,25
-7	214,08	16,92	607,37	39,46
-6	572,55	57,22	614,52	22,56
-5	441,89	40,64	464,6	53,11

Daten zu Abb. 23: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit ZEN für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Bestimmungen.

A Anhang

Konzentration (log M)	MW	Stabw.
-13	44,06	5,11
-12	32,78	19,82
-11	36,97	14,75
-10	51,08	16,84
-9	241,08	40,29
-8	340	24
-7	354,9	20,5

Daten zu Abb. 24: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1, 3 und 9 für 72 h in An- und Abwesenheit von 10 nM E2. Die Konzentration 10^{-12} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

	Konzentration (log M)	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
PCB1	-12	30,06111	2,07222	559,31667	31,78333
	-11	29,48889	2,76111	511,33889	29,72778
	-10	29,80556	5,08333	544,35556	19,77222
	-9	31,00556	1,7	509,55556	42,29444
	-8	33,76111	4,76667	533,43889	56,38889
	-7	35,97778	6,76667	527,40556	32,99444
	-6	30,68333	5,63333	572,08889	30,43889
	-5	28,55	5,07778	516,53889	37,16667
PCB3	-12	34,66	1,29	253,28	20,21
	-11	35,93	2,69	284,44	17,16
	-10	38,36	1,71	286,24	22,27
	-9	36,67	2,65	268,94	9,56
	-8	36,84	1,91	283,41	37,43
	-7	36	1,23	255,78	16,85
	-6	34,5	3,1	238,64	33,61
	-5	31,28	1,21	233,58	29,09
PCB9	-12	56,01	7,53	712	35
	-11	56,01	7,53	712	35
	-10	54,36	8,43	694,92	50,49
	-9	52,75	7,76	689,2	60,69
	-8	54,09	3,05	642,75	45,77
	-7	52,24	9,05	633,89	36,1
	-6	48,44	7,4	656,86	99,2
	-5	47,36	5,7	603,43	69,32

A Anhang

Daten zu Abb. 25: Einfluss von 2-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2-HO-PCB3 für 48 h in einer 24-Lochplatte. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	39,81	10,79	337,41	33,54
	-10	33,17	2,17	347,2	34,01
	-9	36,14	5,31	323,82	30,12
	-8	46,31	13,79	333,94	21,14
	-7	36,4	8,37	331,19	7,3
	-6	40,42	10,1	327,76	24,59
	-5	38,44	8,17	220,91	17,37
24-Loch	μ M				
	0	0,22	0,03	2,7	0,12
	1	0,21	0,03	2,84	0,16
	10	0,27	0,04	3,24	0,3
	25	0,3	0,06	1,21	0,33
	50	0,17	0,07	0,31	0,2

Daten zu Abb. 26: Einfluss von 3-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3-HO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	31,95	8,37	332,9	25,6
	-10	31,57	6,73	329,12	26,92
	-9	36,3	11,02	319,61	20,14
	-8	30,35	3,92	298,43	35,23
	-7	36,1	17,26	318,9	26,65
	-6	48,1	21,18	281,78	20
	-5	67,46	23,38	270,2	13,11
24-Loch	μM				
	0	0,21	0,04	2,28	0,13
	1	0,19	0,04	2,4	0,12
	10	0,43	0,05	2,58	0,25
	25	0,7	0,07	2,15	0,34
	50				

Daten zu Abb. 27: Einfluss von 4-HO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	37	7,45	322,35	20,54
	-10	45,61	17,19	357,2	47,84
	-9	45,86	19,88	375,46	42,51
	-8	47,14	17,47	332,45	27,04
	-7	40,74	21,28	328,44	20,38
	-6	48,92	22,98	317,05	16,84
	-5	178,84	39,64	304,39	27,42
24-Loch	μM				
	0	0,2	0,03	2,62	0,15
	1	0,2	0,03	2,62	0,15
	10	1,19	0,31	3,05	0,41
	25	2,04	0,33	2,75	0,14
	50				

Daten zu Abb. 28: Einfluss von 4-HO-PCB9 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB9 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht

A Anhang

0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB9 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	42,81204	5,36676	379,57956	41,42075
	-10	38,47469	6,36765	400,50869	36,52495
	-9	37,91329	4,31258	420,40554	18,90317
	-8	37,31566	5,57972	413,59014	42,46976
	-7	43,60284	9,60072	423,2307	12,34598
	-6	210,64345	15,21612	450,00935	48,38458
	-5	294,37201	25,26991	396,6754	44,54568
24-Loch	μ M				
	0	0,09	0,09	2,13	0,32
	1	0,96	0,18	2,16	0,26
	10	1,79	0,36	2,07	0,27
	25	1,15	0,22	1,97	0,39
	50				

Daten zu Abb. 29: Einfluss von 4-HO-PCB12 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB12 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 4-HO-PCB12 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	43,59077	2,95124	351,02251	27,02041
	-10	40,25249	2,20632	380,70842	28,09774
	-9	34,73498	6,22674	374,31861	45,53425
	-8	36,02683	6,08121	388,55005	23,5734
	-7	35,14547	10,27632	338,89545	23,09279
	-6	90,91824	14,8447	379,24453	19,1725
	-5	211,06843	20,8895	315,70861	20,42478
24-Loch	μ M				
	0	0,21	0,02	2,11	0,17
	1	0,23	0,02	2,36	0,19
	10	0,51	0,04	2,55	0,22
	25	2,45	0,11	2,66	0,52
	50				

A Anhang

Daten zu Abb. 30: Einfluss von 2,5-diHO-PCB1 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB1 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB1 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	42,5917	3,16668	414,80955	45,06382
	-10	44,72566	4,01235	453,41403	54,4834
	-9	40,95275	3,94656	423,7414	43,15391
	-8	38,38414	3,14499	485,05371	35,37763
	-7	41,8673	3,17741	469,40818	57,29958
	-6	40,8622	4,70559	458,48181	37,96198
	-5	42,19328	4,46086	392,23242	35,21581
24-Loch	μ M				
	0	0,24	0,03	2,39	0,05
	1	0,31	0,12	2,56	0,06
	10	0,45	0,15	2,23	0,04
	25	0,65	0,05	1,69	0,04
	50				

Daten zu Abb. 31: Einfluss von 2,5-diHO-PCB2 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB2 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

A Anhang

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	36,09927	4,22924	385,59812	17,28978
	-10	35,66161	4,65657	421,38952	23,02253
	-9	37,51788	2,29909	396,87461	46,16321
	-8	36,06908	4,48261	401,81864	28,16456
	-7	36,4011	2,04009	384,38777	41,17716
	-6	35,08812	1,90004	373,85077	24,8653
	-5	24,46359	1,17285	189,81393	7,9997
24-Loch	μM				
	0	0,55524	0,08034	5,80748	0,67089
	1	0,59367	0,04362	5,84692	0,64045
	10	0,46459	0,05412	4,38267	0,50051
	25	0,43656	0,06728	2,54452	0,21249
	50				

Daten zu Abb. 32: Einfluss von 2,5-diHO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 2,5-diHO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	65,33786	9,54176	473,95681	15,28176
	-10	58,63656	14,10307	493,05381	24,14405
	-9	48,48047	6,71299	501,1701	47,87438
	-8	54,93125	14,56707	467,53863	28,66187
	-7	54,9385	12,94437	523,44238	8,57905
	-6	55,59408	7,84519	438,49743	34,26859
	-5	34,42711	6,63248	112,82832	13,77027
24-Loch	μM				
	0	0,10695	0,02272	1,17758	0,06699
	1	0,1174	3,35E-04	1,14056	0,06515
	10	0,04787	0,01624	0,15908	0,023
	25				
	50				

Daten zu Abb. 33: Einfluss von 3,4-diHO-PCB3 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB3 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht

A Anhang

0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB3 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	36,82367	3,14016	254,04104	22,73424
	-10	38,72823	4,75954	256,74547	25,94972
	-9	35,69179	2,75675	250,86878	28,97579
	-8	39,63072	4,63136	258,70859	30,86384
	-7	36,72406	3,84035	286,14102	27,83892
	-6	37,10437	4,40807	258,17616	40,10816
	-5	23,62751	2,91398	102,14644	13,6577
24-Loch	μ M				
	0	0,36596	0,07712	2,59138	0,32921
	1	0,36596	0,07712	2,59138	0,32921
	10	0,38809	0,04807	0,88814	0,14778
	25				
	50				

Daten zu Abb. 34: Einfluss von 3,4-diHO-PCB12 auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB12 für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 3,4-diHO-PCB12 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	35,50767	1,49544	253,6547	14,2976
	-10	35,06398	2,56507	262,77912	19,4029
	-9	35,9725	1,84973	263,66953	16,22654
	-8	34,93117	1,94132	264,32752	23,92407
	-7	34,41806	4,74562	254,45456	23,1089
	-6	34,02869	2,61397	242,47177	13,2768
	-5	22,6	3,9	81,5	10,7
24-Loch	μ M				
	0	0,23	0,02	1,61	0,09
	1	0,23	0,02	1,61	0,09
	10	0,18	0,03	0,65	0,09
	25				
	50				

A Anhang

Daten zu Abb. 35: Einfluss von PCB1-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB1-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	42,73598	2,42226	534,9042	58,30166
	-10	45,37159	5,07971	584,58627	73,38149
	-9	46,95319	5,93527	591,57221	65,1705
	-8	46,27407	4,52866	548,9141	55,94543
	-7	49,05697	5,22946	571,31013	79,42493
	-6	47,89371	2,01622	559,90687	64,1837
	-5	172,07217	18,95595	402,43137	34,21478
24-Loch	μ M				
	0	0,78176	0,04662	3,53327	0,14864
	1	0,85418	0,03752	4,04309	0,19536
	10	1,39715	0,06923	4,35748	0,31957
	25	3,06559	0,07416	4,70345	0,23444
	50	4,56954	0,05769	4,39138	0,55578

Daten zu Abb. 36: Einfluss von PCB2-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB2-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB2-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

A Anhang

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	39,42849	3,79594	410,55823	18,4102
	-10	42,40155	2,94018	429,35188	30,10566
	-9	41,05839	2,69457	435,1833	37,81028
	-8	42,76676	1,8103	455,09706	20,61116
	-7	43,47607	2,66077	448,75856	24,99381
	-6	84,13182	6,37826	448,22854	34,39165
	-5	195,13827	14,56859	263,77517	23,38225
24-Loch	μM				
	0	0,2	0,03	2,62	0,15
	1	0,2	0,03	2,62	0,15
	10	1,19	0,31	3,05	0,41
	25	2,04	0,33	2,75	0,14
	50				

Daten zu Abb. 37: Einfluss von PCB3-2,5-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-2,5-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-2,5-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	39,86313	1,28524	325	31,95588
	-10	41,20025	0,96905	300,2638	35,28038
	-9	45,04319	4,09253	292,93529	23,34879
	-8	44,14494	4,80834	330	38,98539
	-7	42,61585	5,10186	331	47,15372
	-6	44,19444	4,41081	318,72876	36,06248
	-5	48,57706	3,2016	237,34362	36,94468
24-Loch	μM				
	0	0,34	0,08	2,43	0,05
	1	0,36	0,08	1,98	0,17
	10	0,42	0,11	1,34	0,24
	25				
	50				

Daten zu Abb. 38: Einfluss von PCB3-3,4-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-3,4-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht

A Anhang

0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB3-3,4-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	45,82618	3,96225	323,10612	47,61389
	-10	45,37368	3,88128	306,5235	45,65347
	-9	42,96337	4,7725	281,33433	32,50563
	-8	46,1731	4,74808	312,36075	46,18427
	-7	43,21375	4,59904	273,43972	10,60802
	-6	48,48085	6,00906	274,87384	48,73311
	-5	112,1114	8,0726	201,06988	12,69891
24-Loch	μ M				
	0	0,31	0,07	1,97	0,07
	1	0,35	0,08	2,29	0,05
	10	0,44	0,11	2,21	0,32
	25	0,52	0,27	0,89	0,27
	50				

Daten zu Abb. 39: Einfluss von PCB12-3,4-Q auf die Bildung von 4-Nitrophenol und die AIP-Aktivität in Ishikawazellen. Oben: AIP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB12-3,4-Q für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen. Unten: AIP-Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit PCB12-3,4-Q für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-12	34,75913	1,39476	288,3776	15,32873
	-10	34,42107	3,15903	277,88286	31,65518
	-9	38,16501	5,06476	296,44863	38,29404
	-8	37,31384	3,63584	295,83892	24,55675
	-7	37,20699	6,83316	293,1345	25,7852
	-6	36,09927	3,85527	269,48887	12,38199
	-5	110,16615	6,6574	226,94547	14,07533
24-Loch	μM				
	0	0,38	0,13	5,01	0,73
	1	0,59	0,11	4,77	0,36
	10	1,97	0,15	4,84	0,34
	25	3,11	0,05	4,72	0,29
	50				

Daten zu Abb. 42: ALP-katalysierte Bildung von 4-Nitrophenol (4-NP) pro Loch einer 96-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 72 h. Die Konzentration 10^{-13} entspricht 0,1% DMSO. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 12 Bestimmungen.

	Konzentration	DMSO MW	Stabw.	E2 MW	Stabw.
	log M				
96-Loch	-13	75	10	416	11
	-12	67	15	404	11
	-11	75	13	433	12
	-10	190	9	439	46
	-9	365	17	429	45
	-8	402	15	402	40
	-7	408	37	396	57

Daten zu Abb. 44: Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 2 bis 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–6 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 4 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Zeit (h)	1 nM DES		10 nM DES		100 nM DES	
	MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.
2	144	22	107	3		
6	62	13	53	19	26	4
12	57	14	40	12		
24	65	11	37	16		
48	49	7	64	22	37	3,7
72	68	7	67	11		

A Anhang

Daten zu Abb. 45: Relativer mRNA Gehalt von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit DES für 2 bis 72 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–6 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 4 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Zeit (h)	1 nM DES		10 nM DES		100 nM DES	
	MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.
2	100	10	99	6		
6	74	4	76	9	68	10
12	80	4	92	4		
24	84	7	85	5		
48	46	14	55	9	33	3,3
72	72	6	77	10		

Daten zu Abb. 46: Anzahl Zellen pro Loch einer 24-Lochplatte nach Behandlung von Ishikawazellen mit Cycloheximid für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten.

Konzentration μ M	Zellzahl (x1000 Zellen/Loch)	
	MW	Stabw.
0	835,701	24,55164
0,035	798,5	25,72
0,07	752,354	20,451
0,14	552,4	18,203
0,28	400,5	15,201
0,56	375,002	18,4
1,12	250,3	15,32
2,14	128,5	25,2

Daten zu Abb. 47: AIP Aktivität nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h in An- und Abwesenheit von Cycloheximid. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 Bestimmungen.

Konzentration μ M	AIP-Aktivität		10 nM DES	
	DMSO MW	Stabw.	MW	Stabw.
0	0,21671	0,02719	1,41329	0,03539
0.03	0,16226	0,02007	1,03809	0,07625
0.06	0,14731	0,0159	0,88813	0,03968
0.12	0,1265	0,03162	0,59742	0,13344
0.24	0,13779	0,03373	0,51283	0,12607
0.48	0,13668	0,05555	0,21637	0,02629
0.96	0,1763	0,05499	0,19478	0,0402

Daten zu Abb. 48, 49 : Relative Wnt5a und Wnt7a mRNA-Gehalte nach Behandlung von Ishikawazellen

mit 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 0,75 μ M Cycloheximid (CHX) für 6 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 4 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

		DMSO MW (% K)	Stabw.	0,75 μ M CHX MW (% K)	Stabw.
WNT5A	6 h	73	6	93	24
	48 h	61	26	115	1
WNT7A	6 h	78	10	86	9
	48 h	61,5	10,5	105	2

Daten zu Abb. 48, 51 : AIP-Aktivität in Ishikawazellen nach Behandlung mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES in An- und Abwesenheit von 1 μ M ICI. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Bestimmungen.

	AIP-Aktivität DMSO MW	Stabw.	10 nM DES MW	Stabw.
DMSO	0,45522	0,045	3,79535	0,08
ICI	0,3768	0,03	0,31438	0,025

Daten zu Abb. 52 : Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a (links) und Wnt7a (rechts) nach Behandlung von Ishikawazellen mit 10 nM DES in Abwesenheit und Anwesenheit des ER-Antagonisten ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	mRNA-Gehalte (% K) ohne ICI MW	Stabw.	mit ICI MW	Stabw.
Wnt5a	53,23383	15,9204	109,56522	20,86957
Wnt7a	50,31185	7,48441	110,83437	21,41968

Daten zu Abb. 53 : Relative AIP mRNA-Gehalte von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen unmittelbar nach der Transfektionsperiode (0 h) und nach Behandlung mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Zeit (h)	Relative AIP-mRNA-Gehalte Transfektionskontrolle		Stabw.	DMSO	
	DES MW (% K)	Stabw.		MW (% K)	Stabw.
0	0,289	0,035	0,035	0,289	0,035
24	5,49	1,65	1,65	1,16	0,51
48	16,32	1,08	1,08	2,29	0,03

Zeit (h)	ER α -KO DMSO		Stabw.	DES	
	MW (% K)	Stabw.		MW (% K)	Stabw.
0	0,28	0,0281	0,0281	0,28	0,0281
24	1,37	0,2	0,2	2,3	0,42
48	2,51	0,55	0,55	3,18	1,26

Daten zu Abb. 54 : AIP-Aktivität von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen unmittelbar nach der Transfektionsperiode (0 h) und nach Behandlung mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

Zeit (h)	AIP-Aktivität Transfektionskontrolle		Stabw.	DES	
	DMSO MW	Stabw.		MW	Stabw.
12	0,598	0,1687	0,1687	0,762	0,038
24	0,4905	0,0521	0,0521	1,5024	0,1077
48	0,361	0,0277	0,0277	3,9538	0,274
72	0,3746	0,0375	0,0375	6,1141	0,1917

Zeit (h)	ER α -KO DMSO		Stabw.	DES	
	MW	Stabw.		MW	Stabw.
12	0,4743	0,0887	0,0887	0,59	0,0553
24	0,4308	0,0503	0,0503	0,5615	0,147
48	0,2117	0,05	0,05	0,4549	0,0597
72	0,1779	0,0667	0,0667	1,0406	0,1155

Daten zu Abb. 55 : Relativer mRNA Gehalt von Wnt5a (links) und Wnt7a (rechts) nach Behandlung von Ishikawazellen und ER α -Knockdownzellen mit 10 nM DES für 24 h (Wnt5a) und 48 h (Wnt7a). Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	relative mRNA-Gehalte (% K)		Stabw.	ER α -KO	
	TK MW			MW	Stabw.
Wnt5a	55		18	134	12
Wnt7a	57		6	92	2

Daten zu Abb. 56 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Transfektion von Ishikawazellen mit 10 nM siRNA_C beziehungsweise 10, 20 und 50 nM siRNA_{Wnt5a}. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

siRNA _{Wnt5a} nM	Relative Wnt5a mRNA-Gehalte MW (% K)	Stabw.
0	100	18,5124
10	5,53719	1,23967
20	7,35537	1,15702
50	2,14876	0,793

Daten zu Abb. 57 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Relative Wnt5a mRNA-Gehalte		Stabw.	DES	
	DMSO MW (% K)			MW (% K)	Stabw.
TK	0,121		0,0224	0,0854	0,0053
Wnt5a-KO	0,00253		2,30E-04	0,00513	8,20E-04

Daten zu Abb. 58 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a in Prozent der Lösungsmittelkontrolle nach Behandlung von Ishikawazellen Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte		Stabw.	DES	
	DMSO MW (% K)			MW (% K)	Stabw.
TK	100		8,83794	60,18551	11,37557
Wnt5a-KO	100		13,11569	107,56014	12,42841

Daten zu Abb. 59 : Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen und Wnt5a-Knockdownzellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 10 nM DES für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten aus jeweils bis zu 3 PCR-Experimenten mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

A Anhang

	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte		Stabw.	DES	
	DMSO MW			MW	Stabw.
TK	5,714		0,505	3,439	0,65
Wnt5a-KO	3,492		0,458	3,756	0,434

Daten zu Abb. 60 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO oder 0,1 bis 100 nM E2 für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 2–8 unabhängigen Experimenten.

E2 Konzentration (log M)	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte MW (% K)	Stabw.
0	100	0
-10	80,25033	25,01437
-9	62,76475	13,06043
-8	45,73325	11,08271
-7	43,2915	1,51392

Daten zu Abb. 61 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO oder 10 nM E2 in An- und Abwesenheit von ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten.

	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte MW (% K)	Stabw.
DMSO	45,46417	11,98651
E2	106,22617	23,89207

Daten zu Abb. 62 : Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 1 und 10 μ M GEN in An- und Abwesenheit von ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten

GEN Konzentration (log M)	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte MW (% K)	Stabw.
0	100	0
-6	63,24202	5,82901
-5	42,43975	12,28

Daten zu Abb. 63 : Relative mRNA Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO beziehungsweise 1 bis 100 nM ZEN in An- und Abwesenheit von ICI (1 μ M) für 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 6 unabhängigen Experimenten

A Anhang

ZEN Konzentration (log M)	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte MW (% K)	Stabw.
0	100	0
-9	46,07	20,4919
-8	40,5245	13,89536
-7	43,5115	8,41952

Daten zu Abb. 64 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt5a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO, 25 μ M PCB9 oder 4-HO-PCB9 für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten.

	Relative Wnt5a mRNA-Gehalte		48 h	
	24 h MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.
PCB9	136	14	101	1
4-HO-PC9	32	5	62	24

Daten zu Abb. 65 : Relative mRNA-Gehalte von Wnt7a nach Behandlung von Ishikawazellen mit 0,1% DMSO, 25 μ M PCB9 oder 4-HO-PCB9 für 24 und 48 h. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichungen von 3 Experimenten.

	Relative Wnt7a mRNA-Gehalte		48 h	
	24 h MW (% K)	Stabw.	MW (% K)	Stabw.
PCB9	91	9	102	3
4-HO-PC9	106	16	39	14

Daten zu Abb. 66 : Prozentualer Anteil der cDNA E2-metabolisierender Enzymfamilien in der GesamtcDNA von steroidhaltig (MCF-7) und steroidfrei (MCF-7cd) kultivierten MCF-7-Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7		MCF-7cd	
	MW (%)	Stabw.	MW (%)	Stabw.
COMT	26,76288	10	91,67134	6
QR	1,48075	4	0,27142	9
UGT	0	4	0,00488	4
SULT	1,49892	7	0,057	5
GST	7,19863	14	0,56153	9
CYP	63,05882	6	7,43383	10

Daten zu Abb. 67 : Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender CYPs in der GesamtcDNA von MCF-7-Zellen und MCF-7cd-Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase

kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7		MCF-7cd	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
CYP1A1	2,08	1,42	1,39	0,374
CYP1B1	30,2	5,56	11	0,692
CYP1A2			0,0171	0,00267
CYP3A4				

Daten zu Abb. 68 : Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender SULT-Isoenzyme in der Gesamt-cDNA von MCF-7-Zellen und MCF-7cd-Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7		MCF-7cd	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
SULT1A1	0,73	0,091	0,0949	0,0208
SULT1A2	0,0373	0,01	2,36E-04	1,56E-04
SULT2A1	0	0	0	0
SULT2E1	0	0	0	0

Daten zu Abb. 69 : Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender UGT-Isoenzyme in der Gesamt-cDNA von MCF-7-Zellen und MCF-7cd-Zellen, die für 24 h während der exponentiellen Wachstumsphase kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7		MCF-7cd	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
UGT1A1	0	0	0	0
UGT1A3	0	0	0	0
UGT1A4	0	0	5,29E-04	1,50E-04
UGT1A8	0	0	0,00104	1,05E-04
UGT1A9	0	0	0	0
UGT2B7	0	0	0,0073	6,00E-04

Daten zu Abb. 70 : Relativer Anteil der cDNA verschiedener E2-metabolisierender GST-Isoenzyme und der QR in der Gesamt-cDNA von von MCF-7-Zellen und MCF-7cd-Zellen für 24 h kultiviert wurden. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7		MCF-7cd	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
GSTM1	0,155	0,0974	0,0372	0,0177
GSTP1	0	0	0	0
GSTT1	3,53	0,0274	0,9	0,081
QR	0,758	0,292	0,453	0,0715

Daten zu Abb. 71 : Prozentualer Anteil der Expression verschiedener E2-metabolisierender Enzymfamilien in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsen Gewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Brustgewebe	
	MW (%)	Stabw.
COMT	52,70831	10
QR	1,18256	4
UGT	0,00811	4
SULT	1,18256	7
GST	1,97318	14
CYP	43,75466	6

Daten zu Abb. 72 : Relative Expression von E2-metabolisierenden CYPs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsen Gewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Brustgewebe	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
CYP1A1	3,21	1,54
CYP1B1	9,74	3,71

Daten zu Abb. 73 : Relative Expression von SULTs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsen Gewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Brustgewebe	
	Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
SULT1A1	0,109	0,0369
SULT1A2	0,00145	3,30E-05
SULT2A1	0	0
SULT2E1	0,0019	0

Daten zu Abb. 74 : Relative Expression von UGTs in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsen Gewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

A Anhang

	Brustgewebe Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
UGT1A1	0	0
UGT1A3	0	0
UGT1A4	0	0
UGT1A8	0	0
UGT1A9	0	0
UGT2B7	0,0024	5,76E-04

Daten zu Abb. 75 : Relative Expression von GSTs und QR in der Gesamt-cDNA des menschlichen Brustdrüsengewebes. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	MCF-7 Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
GSTM1	0,406	0,0274
GSTP1	1,65	0,29
GSTT1	0,178	0,039
QR	0,35	0,0856

Daten zu Abb. 76 : Prozentualer Anteil der Expression verschiedener E2-metabolisierender Enzymfamilien in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Leber MW (%)	Stabw.
COMT	48,5322	10
QR	1,00616	4
UGT	4,85618	4
SULT	4,20662	7
GST	10,84724	14
CYP	30,55161	6

Daten zu Abb. 77 : Relative Expression von CYPs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Leber Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
CYP1A1	18,6	2,36
CYP1A2	168	21,1
CYP3A4	17,4	2,52
CYP1B1	2,48	0,26

A Anhang

Daten zu Abb. 78 : Relative Expression von GSTs und QR in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Leber Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
GSTM1	70	14,6
GSTP1	6,8	2,64
GSTT1	3,31	0,838
QR	0,88	0,1

Daten zu Abb. 79 : Relative Expression von UGTs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 PCR-Bestimmungen mit jeweils 4 Standardkonzentrationen.

	Leber Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
UGT1A1	24,1	4,7
UGT1A3	0	0
UGT1A4	7,48	3,28
UGT1A8	0	0
UGT1A9	2,14	0,816
UGT2B7	23,2	4,18

Daten zu Abb. 80 : Relative Expression von SULTs in der Gesamt-cDNA einer humanen Leber. Daten repräsentieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von 3 Bestimmungen.

	Leber Relative mRNA-Gehalte	Stabw.
SULT1A1	2,06	0,231
SULT1A2	5,57	2,02
SULT2A1	20,8	8,05
SULT2E1	5,5	0,42

Veröffentlichungen

Zeitschriftenpublikationen

- Lehmann L, Jiang L, Wagner J (2008). Soy isoflavones decrease the catechol-o-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. *Carcinogenesis*, 29(2), 363-70.
- Zettner MA, Flor S, Ludewig G, Wagner J, Robertson LW, Lehmann L (2007). Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl induce gene mutations in cultured Chinese hamster V79 cells. *Toxicol. Sci.*, 100(1), 88-98.
- Newill H, Loske R, Wagner J, Johannes C, Lorenz RL, Lehmann L (2007). Oxidation products of stigmaterol interfere with the action of the female sex hormone 17beta-estradiol in cultured human breast and endometrium cell lines. *Mol. Nutr. Food Res.*, 51(7), 888-98.
- Brugger E-M, Wagner J, Schumacher DM, Podlech J, Metzler M, Lehmann L (2006). Mutagenicity of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Toxicol. Lett.*, 164(3), 221-30.
- Wagner J, Lehmann L (2006). Estrogens modulate the gene expression of Wnt-7a in cultured endometrial adenocarcinoma cells. *Mol. Nutr. Food Res.*, 50(4-5), 368-72.
- Lehmann L, Wagner J, Metzler M (2006). Estrogenic and genotoxic potential of the mycotoxin alternariol in cultured mammalian cells. *Food Chem. Toxicol.* 44, 398-408.
- Lehmann L, Esch HL, Wagner J, Rohnstock L, Metzler M (2005). Estrogenic and genotoxic potential of equol and two hydroxylated metabolites of daidzein in cultured human Ishikawa cells. *Toxicol. Lett.* 158, 72-86.
- Schumacher DM, Wagner J, Metzler M, Lehmann L (2005). Influence of decreased intracellular glutathione level on the mutagenicity of patulin in cultured mouse lymphoma cells. *Mycotoxin Res.* 21, 150-152.

Tagungsbeiträge

- Wagner J, Liang L, Lehmann L (2007). Soy isoflavones decrease the catechol-O-methyltransferase-mediated inactivation of 4-hydroxyestradiol in cultured MCF-7 cells. Abstract book. Poster presentation at the Sixth Annual Frontiers in Cancer Prevention Research Conference, (December 5-8, 2007, Philadelphia, USA).
- Wagner J, Robertson LW, Lehmann L (2007). Diethylstilbestrol-ähnliche Wirkung von Oxidationsprodukten niedrig chlorierter Biphenyle in einem zellulären Modell des weiblichen menschlichen Reproduktionstrakts. Poster presentation at 36. Lebensmittelchemikertag (September 10-12, 2007, Nürnberg).
- Lehmann L, Wagner J, Metzler M (2007). Role of the estrogen receptor in the diethylstilbestrol-induced disruption of the expression of WNT5A and WNT7A in human endometrial Ishikawa cells. *Fund. Appl. Toxicol. - The Toxicologist* 96, 385. Platform presentation at 46th Annual Meeting of the Society of Toxicology (March 25-29, 2007, Charlotte, USA).
- Wagner J, Sauermann AM, Rittmann P, Lehmann L (2007). Role of the estrogen receptor in the diethylstilbestrol-induced disruption of the expression of WNT5A and WNT7A in human endometrial Ishikawa cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 375 Suppl. 1, 451. Platform presentation at 48. Frühjahrstagung der DGPT (March 13-15, 2007, Mainz).
- Müller C, Wagner J, Johannes C, Lorenz RL, Lehmann L (2007). Oxidation products of the phytosterol stigmasterol interact with estrogen receptor-dependent processes in cultured human breast and endometrium cell lines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 375 Suppl. 1, 392. Poster presentation at 48. Frühjahrstagung der DGPT (March 13-15, 2007, Mainz).
- Sauermann AM, Wagner J, Lehmann L (2007). Induction of alkaline phosphatase by 17beta-estradiol is dependent on the presence of estrogen receptor alpha in the endometrial Ishikawa cell line. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 375 Suppl. 1, 488. Poster presentation at 48. Frühjahrstagung der DGPT (March 13-15, 2007, Mainz).
- Wagner J, Jiang L, Lerch E, Lehmann M, Metzler M, Lehmann L (2006). Soy isoflavones modulate the expression of 17beta-estradiol-metabolizing enzymes in cultured breast adenocarcinoma MCF-7 cells. *Drug Metab. Rev.* 38 Suppl. 2, 130. Poster presentation at 14th North American ISSX Meeting (October 21-26, 2006, Rio Grande, Puerto Rico).

- Wagner J, Jiang L, Lehmann L (2006). Phytoestrogens modulate the expression of 17beta-estradiol-metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. Abstract book. Poster presentation at 5th International Symposium on Hormonal Carcinogenesis (September 10-13, 2006, Montpellier, France).
- Lehmann L, Wagner J (2006). Comparison of the gene expression of 17beta-estradiol-metabolizing isozymes in normal human mammary gland, liver, and cultured MCF-7 cells. Abstract book. Poster presentation at 5th International Symposium on Hormonal Carcinogenesis, (September 10-13, 2006, Montpellier, France).
- Lehmann L, Jiang L, Lerch EW, Wagner J, Lehmann M, Metzler M (2006). Phytoestrogens modulate the expression of 17 -estradiol-metabolizing enzymes in cultured MCF-7 cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 95. Poster presentation at 47. Frühjahrstagung der DGPT (April 04-06, 2006, Mainz).
- Wagner J, Newill H, Lehmann L (2006). Antiestrogenic potential of oxystigmasterols. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 372, 107. Poster presentation at 47. Frühjahrstagung der DGPT (April 04-06, 2006, Mainz).
- Wagner J, Zettner, M, Robertson LW, Ludewig G, Lehmann L (2006). Quinoid metabolites of 4-monochlorobiphenyl are mutagenic in cultured V79 cells. Abstract book. Poster presentation at 22. Tagung der GUM 2006 (February 21-24, 2006, Darmstadt).
- Brugger E-M, Wagner J, Schumacher DM, Podlech J, Metzler M, Lehmann L (2006). Mutagenität des Mykotoxins Alternariol in kultivierten Säugerzellen. *Lebensmittelchemie*. Platform presentation at Jahrestagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (March 06-07, 2006, Karlsruhe).
- Newill H, Wagner J, Lehmann L (2006). Untersuchungen zur biologischen Aktivität von Oxystigmasterol. *Lebensmittelchemie*. Poster presentation at Jahrestagung des Regionalverbands Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft (March 06-07, 2006, Karlsruhe).
- Wagner J, Lehmann L (2006). Einfluss von Estrogenen in Nahrungsmitteln auf die Genexpression von Wnt 7a. *Lebensmittelchemie*, 60, 43-44. Poster presentation at 34. Lebensmittelchemikertag (September 19-21, 2005, Hamburg).
- Wagner J, Lehmann L (2005). 17 -estradiol downregulates WNT7a in the human adenocar-

cinoma Ishikawa cell line in an estrogen receptor independent way. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 371, R105. Poster presentation at 46. Frühjahrstagung der DGPT (March 15-17, 2005, Mainz).

- Schumacher DM, Wagner J, Lehmann L, Metzler M (2004). Vergleich einer durchflußzytometrischen und einer mikroskopischen Methode zur Bestimmung von Mikrokernen. Abstract book. Poster presentation at 21. Tagung der GUM 2004 (October 05-08, 2004, Würzburg).
- Schumacher DM, Wagner J, Lehmann L, Metzler M (2004). Einfluss eines erniedrigten zellulären GSH-Spiegels auf die Mutagenität von Patulin in kultivierten Maus-Lymphomzellen. Schriftenreihe der Bayerischen Landesanstalt für Landwirtschaft 3, 94. Poster presentation at Mycotoxin Workshop der Gesellschaft für Mykotoxinforschung (May 17-19, 2004, Herrsching).
- Schumacher DM, Wagner J, Lehmann L, Metzler M (2004). Assessment of the genotoxic and mutagenic potential of patulin in cultured mouse lymphoma cells. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 369, R127. Poster presentation at 45. Frühjahrstagung der DGPT (March 09-11, 2004, Mainz).

Lebenslauf

Name Jörg Wagner
Geburtsdatum 05.02.1978
Geburtsort Lahr/Schwarzwald
Staatsangehörigkeit Deutsch

Schulbildung

August 1984 bis Juni 1988 Grundschrift: Luisenschule Lahr
August 1988 bis Juni 1997 Max-Planck-Gymnasium in Lahr
24.6.1997 Hochschulreife

Wehrdienst

September 1997 bis Juni 1998 Wehrdienst in Stetten a.k.M.

Hochschulausbildung

Oktober 1998 bis Juli 2003 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe (TH)
Juni 2001 Erster Prüfungsabschnitt (Vorprüfung) der Staatsprüfung
Oktober 2003 bis Juni 2004 Wissenschaftliche Abschlussarbeit (Prof. Dr. Dr. M. Metzler, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, Universität Karlsruhe (TH))
1. Juni 2004 Zweiter Prüfungsabschnitt der Staatsprüfung für Lebensmittelchemiker
1. Juni 2004 Abschluss als Diplom-Lebensmittelchemiker an der Universität Karlsruhe (TH)
seit August 2004 Wissenschaftlicher Angestellter am Institut für Angewandte Biowissenschaften, Abteilung für Lebensmittelchemie und Toxikologie der Universität Karlsruhe (TH)