

**Ishikawa Zellen als *in vitro* Testsystem für Estrogenität:
Etablierung und Anwendung auf verschiedene Klassen endokrin
aktiver Substanzen**

Zur Erlangung des akademischen Grades eines
DOKTORS DER NATURWISSENSCHAFTEN
(Dr. rer. nat.)
von der Fakultät für Chemie und Biowissenschaften
der
Universität Karlsruhe
angenommene

DISSERTATION

von

Harald Esch

aus Karlsruhe

Dekan: Prof. Dr. Dr. M. Metzler
1. Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Metzler
2. Gutachter: Prof. Dr. A. Hartwig

Tag der mündlichen Prüfung: 14.02.2003

Danksagung

Ich danke ...

- Herrn Prof. Dr. M. Metzler für die Überlassung des interessanten Themas und seine Diskussionsbereitschaft und Unterstützung meiner Arbeit.
- Erika Pfeiffer für die gute Betreuung und die wertvollen Anregungen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.
- Leane Lehmann für Diskussion, Rat und Tat.
- David Schumacher für die Idee mit dem LateX.
- Rosi Förster für die Arbeit in der Zellkultur
- meiner ersten und einzigen Forschungspraktikantin Ines Newill.
- Stefan Kranz und Ingo Ehleben für die Aufmunterungen im grauen Alltag.
- allen nichtgenannten Mitgliedern der Arbeitskreise Metzler und Hartwig, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Estrogene und ihre hormonelle Wirkung	1
1.2	Aufbau und Funktion des Estrogen-Rezeptors	1
1.3	Körperfremde endokrin aktive Substanzen	3
1.3.1	Diethylstilbestrol	4
1.3.2	Tamoxifen	5
1.3.3	Zearalenon	6
1.3.4	Isoflavone	7
1.3.5	Bisphenol A	8
1.4	Testsysteme für die Bestimmung der Estrogenität einer Substanz	10
1.4.1	<i>In vivo</i> -Testsysteme	11
1.4.2	<i>In vitro</i> -Testsysteme	11
1.4.3	Estrogen-stimulierte Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) in Ishikawa Zellen	12
1.5	Aneuploide	14
1.5.1	Mikrotubuli und assoziierte Proteine	15
1.5.2	Kinetochor	17
1.5.3	Centrosomen	18
2	Problemstellung	19
3	Ergebnisse und Diskussion	21
3.1	Etablierung des Estrogenitätstests	21
3.1.1	Einfluss von 17β -Estradiol auf die Zellproliferation von Ishikawa Zellen	21
3.1.2	Einflußfaktoren auf die Aktivität der AP in Ishikawa Zellen	24
3.1.3	Einfluss von 17β -Estradiol auf die AP-Aktivität	24
3.1.4	Inkubationsprotokoll	28
3.1.5	Bestimmung der Enzymaktivität	36
3.1.6	Einfluß der Zellzahl auf die AP-Aktivität	38
3.1.7	Einfluss des Lösungsmittels	49
3.1.8	Einfluß von Mediumbestandteilen auf die AP-Aktivität	51
3.2	Anwendung des Estrogenitätstests	57
3.2.1	Positivkontrollen: Diethylstilbestrol und Tamoxifen	57
3.2.2	Resorcylsäure-Lactone	60
3.2.3	Isoflavone	62
3.2.4	Bisphenole	64
3.2.5	Curcuminoide	70
3.2.6	Zusammenfassung der Wirkung verschiedener endokrin aktiver Substanzen auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen	72
3.3	Genotoxische Effekte von 17β -Estradiol	74
3.3.1	Bekannte Effekte	74
3.3.2	Kinetochor Funktions-Assay	75

4	Zusammenfassung	79
5	Material und Methoden	82
5.1	Geräte	82
5.2	Verbrauchsmaterialien	83
5.3	Methoden in der Zellkultur	84
5.4	Herstellung von Aktivkohle–Dextran behandeltem fetalem Kälberserum	85
5.5	Zellzahlbestimmung	86
5.5.1	Erstellen einer Wachstumskurve	86
5.5.2	Zellzahlbestimmung in Mikrotiterplatten	87
5.6	Kolorimetrische <i>in vitro</i> Zytotoxizitätstests	87
5.6.1	Methythiazolyldiphenyl–tetrazolium–Test	87
5.6.2	Sulforhodamin B–Test	90
5.7	Bestimmung der AP–Aktivität in Ishikawa Zellen	91
5.7.1	Ausstreuen und Substanzinkubation	93
5.7.2	Messung der Enzymaktivität	93
5.7.3	Auswertung	93
5.8	Immunologische Färbung	95
5.9	Synchronisation von HeLa Zellen	97
5.10	Herstellung Polylysin–beschichteter Objektträger	99
5.11	Isolation mitotischer Chromosomen nach der Polyamid–Methode	99
5.11.1	Isolation	100
5.11.2	Aufreinigung über Saccharose–Dichtegradient	100
5.12	Tubulinpräparation	101
5.12.1	Präparation von Mikrotubuli–Protein aus Rinderhirn	101
5.12.2	Aufreinigung der Mikrotubuli–Proteine über Phosphocellulose	103
5.12.3	Proteinbestimmung nach Bradford	104
5.12.4	SDS–Polyacrylamid Gelelektrophorese	105
5.13	Zellfreie Tubulinpolymerisation	107
5.13.1	Polymerisation in Reaktionsgefäßen	108
5.13.2	Polymerisation auf Polylysin–beschichteten Objektträger	108
5.13.3	Kinetochor–Funktions Assay	108
6	Literatur	110
	Anhang	120

Abkürzungsverzeichnis

α -ZAL	Zeranol oder α -Zearalanol
α -ZEL	α -Zearalenol
β -ZAL	Taleranol oder β -Zearalanol
β -ZEL	β -Zearalenol
4-NP	4-Nitrophenol
AP	Alkalische Phosphatase
BCA	Biochanin A
BDMC	Bis-demethoxycurcumin
BPA	Bisphenol A
BPB	Bisphenol B
BPF	Bisphenol F
CDFKS	Charcoal-Dextran behandeltes FKS
CREST	Akronym aus C alcinosis cutis, R aynaud Phänomen, M otilitätsstörungen des Ösophagus (engl. esophagus), S klerodaktylie u. T eleangiektasien
CUR	Curcumin
CY3	Cyanin 3
DAI	Daidzein
DAPI	4', 6-Diamidino-2-phenylindol
DBD	DNA-bindende Domäne
DES	Diethylstilbestrol
DMBPA	Dimethyl-BPA
DMC	Mono-demethoxycurcumin
DMSO	Dimethylsulfoxid
E2	17 β -Estradiol
EAS	Endokrin aktive Substanzen
ER	Estrogen-Rezeptor

ERE	Estrogen-responsives Element
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fetales Kälberserum
GEN	Genistein
GLU	L-Glutamin
HO-TAM	4-Hydroxy-Tamoxifen
LBD	Ligand-bindende Domäne
MAP	Mikrotubuli-assoziierte Proteine
MTP	Mikrotubuli-Protein
MTT	Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium
NOAEL	No-Observable-Adverse-Effect-Level
p-NPP	p-Nitrophenylphosphat
PC	Phosphocellulose
PL-OT	Polylysin-beschichteter Objektträger
PrPrBPA	4,4'-Bis(4-hydroxy-phenyl)heptan
PRU	Prunetin
RAL	Resorcylsäure-Lactone
SCF	Scientific Committee of Food, Wissenschaftlicher Lebensmittelausschuss der EU
SERM	Selektive ER Modulatoren
SHBG	Sexualhormon-bindendes Globulin
SRB	Sulforhodamin B
TAM	Tamoxifen
TMBPA	Tetramethyl-BPA
VK%	relativer Variationskoeffizient
ZAN	Zearalanon
ZEN	Zearalenon

1 Einleitung

1.1 Estrogene und ihre hormonelle Wirkung

Estrogene sind Steroidhormone mit wichtigen Funktionen in der Zellproliferation und Zelldifferenzierung im menschlichen Organismus. Das bekannteste Estrogen ist das weibliche Sexualhormon 17β -Estradiol (E2, Abb. 1), das u.a. die Ausprägung der sekundären weiblichen Geschlechtsmerkmale steuert.

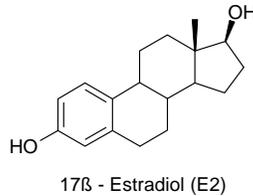


Abb. 1: Strukturformel von 17β -Estradiol.

E2 wird hauptsächlich in den Ovarien gebildet, der Plasmaspiegel bei erwachsenen Frauen beträgt etwa 20 – 60 pg/ml und kann während des Menstruationszyklus bis zu 400 pg/ml erreichen (Jordan et al., 1992). Männer produzieren ebenfalls geringe Mengen E2, überwiegend durch Aromatisierung von Androstendion. Der E2-Plasmaspiegel bei erwachsenen Männern beträgt ~ 20 pg/ml E2 (Jordan et al., 1992). Für den Transport im Blut wird E2 an spezifische Transportproteine (Sexualhormon-bindendes Globulin, SHBG) gebunden. Hormonell wirksam ist allerdings nur ungebundenes E2, denn nur freies E2 kann im Zielgewebe die Zellmembran durch passive Diffusion passieren. In der Zelle bindet E2 an den Estrogen-Rezeptor, der dann zell- und gewebespezifisch die Expression der Ziel-Gene aktiviert.

1.2 Aufbau und Funktion des Estrogen-Rezeptors

Der Estrogen-Rezeptor (ER) gehört zur Familie der Steroidhormon Rezeptoren (SHR). SHR sind überwiegend im Zellkern lokalisiert (King und Greene, 1984; Bourguet et al., 2000). Sie liegen als Monomere in einer inaktiven Form vor. Durch die Bindung des Liganden wird der SHR aktiviert, dimerisiert und bindet dann an eine spezifische DNA-Sequenz in der Promotorregion eines Gens. Es sind zwei Formen des ER, der $ER\alpha$ (Greene et al., 1986; Green et al., 1986) und der $ER\beta$ (Kuiper et al., 1996) bekannt. Der $ER\alpha$ ist in hohen Konzentrationen in den klassischen E2-Zielgeweben Brust, Uterus und Ovarien lokalisiert. Vom $ER\beta$ findet sich große Mengen in den Ovarien und Prostata aber, auch in der Blase und Lunge (Kuiper et al., 1997).

Der ER α ist ein 66 kD Protein, das aus 595 Aminosäuren aufgebaut ist. Die einzelnen ER α -Domänen und ihre Funktionen sind in Abb. 2 schematisch dargestellt.

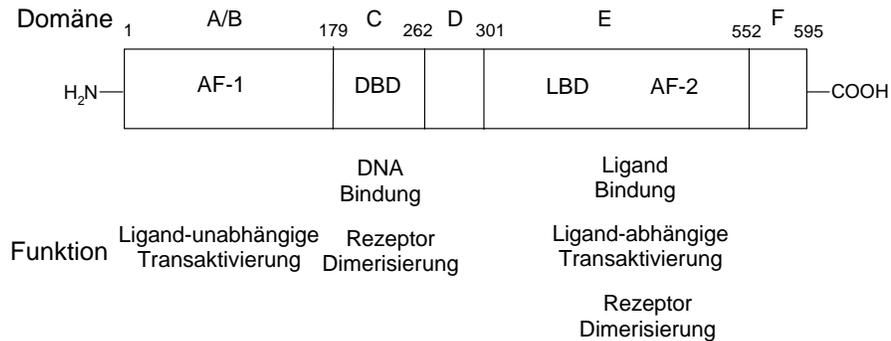


Abb. 2: Aufbau des ER α .

Die verschiedenen Domänen werden mit A–E bezeichnet, beginnend am N–Terminus. Die A/B–Domäne enthält die Ligand–unabhängige Transaktivierungsfunktion AF–1. Die DNA–bindende Domäne (DBD) im Bereich C enthält zwei Zinkfinger, von denen je einer für die Rezeptordimerisierung und die Interaktion mit der DNA benötigt wird. In der Domäne E bindet der Ligand an den Rezeptor (Ligand–bindende Domäne, LBD). Dort ist zusätzlich die Ligand–abhängige Transaktivierungsfunktion AF–2 lokalisiert.

Der von Gustafsson charakterisierte ER β besteht aus 485 Aminosäuren (Kuiper et al., 1996) mit einem berechneten Molekulargewicht von 54,2 kDa. Die Aminosäuresequenz von ER α zeigt eine große Homologie zum ER α besonders in der DBD (95 %) und in der LBD (55 %).

Wenn kein Ligand an der ER gebunden ist, liegt er an Chaperone (Chap) gebunden in einer inaktiven Form vor (Abb 3). Chaperone binden reversibel an die Aggregationszentren von Proteinen, um spontane Protein–Protein Interaktionen zu verhindern. Aus der Klasse der Chaperone sind u.a. die Hitzeschockproteine Hsp90, Hsp70 und Hsp56 am inaktiven ER lokalisiert.

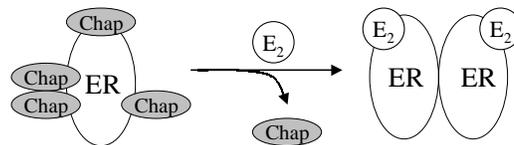


Abb. 3: Aktivierung des ER durch E2.

Nach der Bindung von E2 spalten sich die Chaperone ab, der ER dimerisiert und bindet an die ER-Erkennungssequenz auf der DNA (*estrogen-responsive elements*, ERE), die sich in der Kontrollregion der Ziel-Gen Promotoren befinden. Über AF-2 binden E2-abhängige Co-Aktivatoren (z.B. SRC-1, CBP/p300) an den ER-DNA Komplex und ermöglichen so die Bindung der Transkriptionsmaschinerie (TATA-Box bindendes Protein, TBP; Transkriptionsfaktoren, TF und RNA-Polymerase, RNA-Pol) an die TATA-Box in der Promotorregion (Mueller und Korach, 2001). Der ER kann daher auch als Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor bezeichnet werden (Abb. 4).

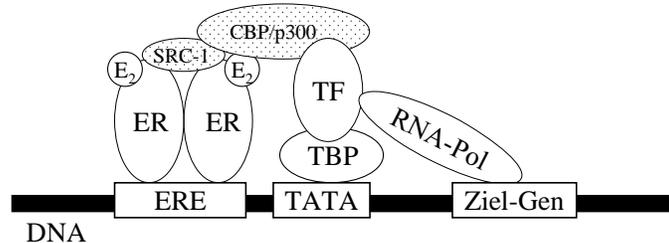


Abb. 4: Transaktivierung von Genen durch aktiven ER.

Neben der Ligand-abhängigen Genexpression können Gene auch über die Transaktivierungsfunktion AF-1 Ligand-unabhängig exprimiert werden. Dabei werden vor allem Gene aktiviert, die vom dimeren Transkriptionsfaktor Jun/Fos kontrolliert werden (Kushner et al., 2000). Der estrogene Stimulus einer Zelle hängt also von AF-1 und AF-2 ab (McDonnell et al., 1995). Welche Transaktivierungsfunktion aktiviert wird, hängt nicht alleine vom Liganden ab, sondern vor allem von den Co-Aktivatoren. Co-Aktivatoren werden zell- und gewebespezifisch exprimiert und begründen letztlich die Vielfalt der ER-vermittelten Prozesse während der menschlichen Entwicklung und der Zelldifferenzierung.

Die Gene, die ER-vermittelt exprimiert werden, sind demzufolge prinzipiell von Zelle zu Zelle verschieden. Generell wird die Genexpression von Steroidhormon-Rezeptoren (ER, Progesteron Rezeptor), Wachstumsfaktoren und Cyclin D1 verstärkt. Die daraus resultierende verstärkte Zellproliferation (Henderson und Feigelson, 2000; Nandi et al., 1995) kann promotionsfördernd bei der Entstehung hormonabhängiger Tumore (Brust-, Uterus- Prostatakrebs u.a.) wirken.

1.3 Körperfremde endokrin aktive Substanzen

Substanzen, die an den ER binden, können eine ER-vermittelte Antwort auslösen oder inhibieren. Dementsprechend können sie in Estrogene bzw. ER-Agonisten und Anti-Estrogene bzw. ER-Antagonisten unterteilt werden. Wie bereits geschildert ist die ER-vermittelte Ant-

wort einer Zelle nicht allein eine Frage des Liganden, sondern auch der Ausstattung der Zelle mit spezifischen Co-Aktivatoren und Co-Repressoren. Das führt dazu, dass z.B. Tamoxifen in Knochen und Uterus als ER-Agonist und in der Brust als ER-Antagonist wirkt. Für solche Substanzen wurde der Begriff selektive ER Modulatoren (SERM) eingeführt (Mitlak und Cohen, 1997). Eine Vielzahl von Substanzklassen können mit dem ER interagieren, darunter:

- Phytoestrogene, z.B. Isoflavone, Lignane
- Mykoestrogene, z.B. Zearalenon
- Umweltestrogene, z.B. Bisphenole, Phthalate
- Synthetische Estrogene, z.B. Diethylstilbestrol, Ethinylestradiol
- Synthetische ER-Antagonisten, z.B. ICI 182,780, ICI 164,384
- Selektive ER Modulatoren, z.B. Tamoxifen, 4-HO-Tamoxifen

Diese Substanzen lassen sich nicht immer eindeutig als ER-Agonist oder ER-Antagonist klassifizieren. Alle diese Substanzklassen werden daher unabhängig von ihrer Wirkungsweise unter dem Begriff endokrin aktive Substanzen (EAS) zusammengefasst (Barton und Andersen, 1998), von denen einige in den folgenden Kapitel näher beschrieben werden.

1.3.1 Diethylstilbestrol

Diethylstilbestrol (DES, Abb 5) wurde von Dodds et al. (1938) als eines der ersten nichtsteroidalen Estrogene synthetisch hergestellt.

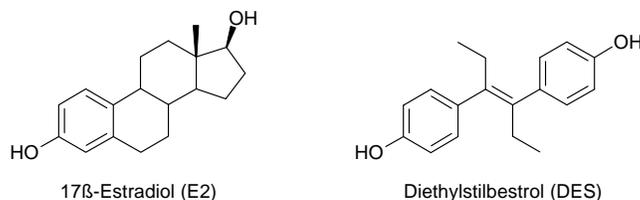


Abb. 5: Vergleich der Strukturformel von E2 und DES.

Aufgrund seiner hohen Affinität zum ER und der guten oralen Verfügbarkeit wurde DES als synthetisches Estrogen u.a. zum Schutz vor Fehlgeburten und Komplikationen bei Risikoschwangerschaften eingesetzt. In den 70er Jahren konnten Herbst et al. (1971) zeigen, dass in der Tochtergeneration DES-behandelter Mütter vermehrt seltene vaginale Adenokarzinome

und Cervixtumore auftraten. Nachfolgend wurde noch eine Vielzahl von Fehlfunktionen im Reproduktionstrakt bei männlichen und weiblichen Nachkommen von DES-behandelten Müttern festgestellt (Übersicht in Newbold (2002)). DES wurde als erste Substanz bekannt, die transplazentar die Nachkommen schädigen und Tumore induzieren kann.

In Tierversuchen wurde die Kanzerogenität von DES durch die Tumorinduktion in der Niere des syrischen Hamsters (Kirkman und Bacon, 1950) und im Uterus von neonatalen Mäusen (Newbold et al., 1990) bestätigt. Allerdings ist der Mechanismus der Krebsentstehung durch DES nicht vollständig aufgeklärt. Diskutiert wird die Entstehung reaktiver Metabolite im oxidativen Metabolismus mit nachfolgender Bildung von DNA-Addukten (Yager und Liehr, 1996). Tsutsui et al. (1983) zeigten, dass DES darüberhinaus in kultivierten Zellen numerische Chromosomenaberrationen (Aneuploidie) durch Bindung an Mikrotubuli-Proteine induzieren kann.

1.3.2 Tamoxifen

Tamoxifen (TAM) und einer seiner oxidativen Metabolite, 4-Hydroxy-Tamoxifen (HO-TAM, Abb. 6) werden klinisch bei der Chemotherapie von Brustkrebspatienten eingesetzt. Die Überlegung, TAM in gesunden Frauen präventiv gegen Brustkrebs einzusetzen, wird derzeit kontrovers diskutiert.

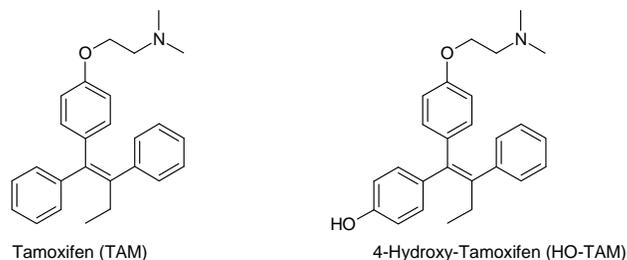


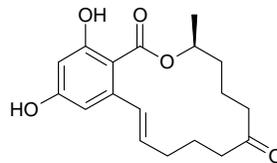
Abb. 6: Strukturformel von TAM und HO-TAM.

TAM und HO-TAM besitzen eine hohe Affinität zum $ER\alpha$ (Fang et al., 2001). Sie gehören zur Gruppe der SERM, da sie gewebespezifisch als ER-Antagonisten (Brust) und ER-Agonisten (Uterus und Knochen) wirken (Webb et al., 1995). Die agonistische Wirkung im Uterus wird als Ursache für das leicht erhöhte Tumorrisiko im Endometrium bei TAM-behandelten Frauen diskutiert (White, 1999). Kushner et al. (2000) erklären die estrogenische Wirkung von TAM und HO-TAM mit der Ligand-unabhängigen Transaktivierung von Genen über die AF-1 Domäne des ER. Die AF-2-Domäne des ER ist zwar blockiert, beeinflusst aber die Funktion von AF-1 nicht.

In adulten Ratten ist TAM ein starkes Leberkanzerogen (White, 1999), während Tumore im Uterus nur nach postnataler TAM-Gabe auftreten (Carthew et al., 2000). Als Mechanismus der Krebsentstehung in der Rattenleber wird die Bildung von DNA-Addukten nach metabolischer Aktivierung durch Sulfotransferasen diskutiert (Glatt et al., 1998). Beim Menschen besitzen die entsprechenden Sulfotransferasen in der Leber und im Uterus eine 20-fach geringere Aktivität (Glatt et al., 1998), so dass eine Aktivierung von TAM und HO-TAM zum ultimalen Kanzerogen auf diesem Wege von geringer Bedeutung ist.

1.3.3 Zearalenon

Zearalenon (ZEN, Abb. 7) ist ein Resorcylsäure-Lakton, das als Mykotoxin von *Fusarium spp.* gebildet wird und vor allem in verschimmelten Getreide nachgewiesen werden kann.



Zearalenon (ZEN)

Abb. 7: Strukturformel von ZEN.

Expositionsquellen für den Menschen sind daher hauptsächlich Getreideprodukte und Lebensmittel, die aus kontaminiertem Getreide hergestellt wurden. ZEN kann in Getreide frei oder als β -Glucosid gebunden vorliegen. Die gefundenen Konzentrationen variieren sehr stark und sind von der Getreideart (Mais, Weizen, Gerste, Hirse, Reis) und vom Herkunftsland abhängig. Schneewis et al. (2002) konnten in bayerischen Weizenproben 11 bis 860 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ZEN und 17 bis 104 $\mu\text{g}/\text{kg}$ des ZEN-Glucosids nachweisen. ZEN wird durch großtechnische Prozesse nicht zerstört. Das Glucosid kann im Darm gespalten werden, so dass auch in dieser Form ZEN in den menschlichen Körper gelangen kann. In Deutschland ist in der Mykotoxin-Verordnung die Höchstmenge für Zearalenon in Getreide/Getreideerzeugnissen, Teigwaren, Brot und Backwaren auf 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ festgelegt. Der wissenschaftliche Lebensmittelausschuss der EU (*Scientific Committee of Food*, SCF) legte im Juni 2000 die tolerierbare tägliche Aufnahme für ZEN bei 0,2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht fest (SCF, 2000).

Beim Menschen wird ZEN und sein Hauptmetabolit α -Zearalenol (α -ZEL) hauptsächlich als Glucuronid über den Urin ausgeschieden. Die biliär ausgeschiedenen Glucuronide unterlie-

gen einem enterohepatischen Kreislauf mit einer hohen Reabsorptionsrate im Darm (Kuiper-Goodman et al., 1987).

Die estrogenere Wirkung von ZEN ist schon lange bekannt (Hearnshaw et al., 1972). Der *No-Observable-Adverse-Effect-Level*, (NOAEL) für reproduktionstoxische Effekte beträgt in der empfindlichsten Spezies, dem pubertierenden Schwein, 0,06 mg/kg Körpergewicht und Tag. Der Hauptmetabolit α -ZEL ist noch stärker estrogen. Die Bindungsaffinität von ZEN zum ER α ist etwa 20-fach schwächer als die von E2 (Kuiper-Goodman et al., 1987). Akut toxische (Kuiper-Goodman et al., 1987) und genotoxische Effekte (Ghedira-Chekir et al., 1998; Grosse et al., 1997) sowie die Kanzerogenität von ZEN tritt erst bei Dosen ab 2 mg/kg Körpergewicht auf (Kuiper-Goodman et al., 1987).

Tomaszewski et al. (1998) untersuchten ZEN-Gehalte in gesunden, hyperplastischen und neoplastischen Endometrium-Geweben von 48 Frauen. In gesundem Gewebe konnte kein ZEN nachgewiesen werden, in hyperplastischen und neoplastischen Geweben konnten im Mittel je 167 ng/ml (525 nM) und 48 ng/ml (150 nM) ZEN nachgewiesen werden.

1.3.4 Isoflavone

Isoflavone sind Pflanzeninhaltsstoffe, die wichtige biologische Funktionen als Signalsubstanzen erfüllen. Sie kommen vorwiegend glykosidisch gebunden in Leguminosen vor und werden in besonders großen Mengen in Sojabohnen und den daraus gewonnenen Produkten gefunden. In einem kg getrockneter Sojaprodukte können bis zu 2000 mg Gesamtisoflavon enthalten sein, in nichtgetrockneten Produkten (Tofu, Sojabohne) etwa 200 mg/kg (Franke et al., 1995). Genistein (GEN, Abb. 8) und Daidzein (DAI) sind die Hauptisoflavone in Soja.

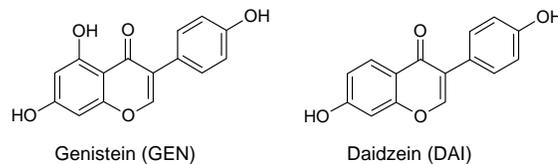


Abb. 8: Strukturformel verschiedener Isoflavone.

Bei normaler Ernährung wird die tägliche Isoflavon-Aufnahme in westlichen Ländern auf < 5 mg geschätzt, während in asiatischen Ländern täglich 20–40 mg aufgenommen werden (Setchell und Cassidy, 1999; Barnes et al., 1995). Seit geraumer Zeit sind Isoflavonpräparate als Nahrungsergänzungsmittel auf dem Markt, die GEN und DAI in Milligramm bis Gramm-Mengen enthalten können.

Der größten Isoflavon Exposition sind Säuglinge ausgesetzt, die mit Säuglingsnahrung auf Sojabasis ernährt werden. Die tägliche Dosis wird auf 6–9 mg/kg Körpergewicht geschätzt, das ist etwa die zehnfach Dosis dessen, was Asiaten zu sich nehmen. Die höchsten Plasmaspiegel (bis zu 6 μM) wurden dann auch in Säuglingen gefunden (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000; Setchell et al., 1997).

Die Isoflavon-Glykoside werden im Darm gespalten und das Aglycon gut resorbiert. Schon im Darm können die Aglycone durch die Darmflora reduziert und im Dünndarmepithel oxidativ metabolisiert werden. Die Isoflavone werden hauptsächlich als Glucuronide ausgeschieden. Die über die Galle ausgeschiedenen Glucuronide unterliegen einem enterohepatischen Kreislauf. Etwa 7–30 % der aufgenommenen Isoflavon-Menge wird im Urin wiedergefunden (Messina, 1995). Über den oxidativen Metabolismus und das weitere Schicksal der Metabolite im menschlichen Körper ist noch relativ wenig bekannt, Untersuchungen dazu wurden von Kulling et al. (2002) in unserem Arbeitskreis angefertigt.

Epidemiologische Studien zeigten, dass in Asien weniger hormonabhängige Tumore, wie das Mammakarzinom und das Prostatakarzinom auftreten. Nach Analyse der Essgewohnheiten wurden GEN und DAI die protektiven Eigenschaften zugeschrieben (Gesellschaft Deutscher Chemiker, 2000). Weitere Effekte, die bei *in vivo* und *in vitro* Studien mit Isoflavonen gefunden wurden, sind:

- Antikancerogenität im Tierversuch (Barnes und Peterson, 1995)
- Schutz vor Herz-Kreislauf-Krankheiten durch Absenkung des Plasma-Cholesterinspiegels (Potter et al., 1996)
- estrogene und antiestrogene Wirkung (Willard und Frawley, 1998; Lamartiniere et al., 1995)
- antioxidative Eigenschaften (Wei et al., 1995)
- antiproliferative Eigenschaften (Barnes und Peterson, 1995)
- Hemmung der Topoisomerase II durch GEN (Constantinou et al., 1995)

1.3.5 Bisphenol A

Bisphenol A (BPA, Abb. 9) wird in der Kunststoffindustrie als Monomer für die Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen eingesetzt. Polycarbonate finden weitläufige Anwendung bei der Herstellung von CD-Rohlingen, Behältern für Lebensmittel oder in Zahnfüllungen. Mit

Epoxidharzen wird u.a. das Innere von Konservendosen ausgekleidet. Von BPA werden weltweit mehrere hundert Millionen Tonnen jährlich hergestellt; im Jahre 1995 rund 750 Millionen Tonnen allein in den USA (Markey et al., 2001).

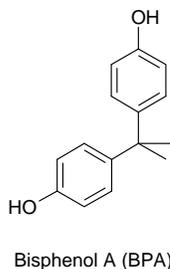


Abb. 9: Strukturformel von BPA.

Nach Migration von BPA aus Epoxidharzen oder Gefäßwandungen kann der Mensch durch Getränke oder Lebensmittelkonserven exponiert werden (SCF, 2002). Daneben kann durch den Speichel BPA aus frisch hergestellten Kunststoffzahnfüllungen herausgelöst werden (Olea et al., 1996).

Das SCF schätzt die maximale Exposition mit BPA aus Lebensmittel im Falle eines “worst-case” auf $0,48 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht bei Erwachsenen und auf $1,6 \mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht bei Säuglingen bis 12 Monate, die mit künstlicher Voll- oder Zusatznahrung ernährt werden (SCF, 2002). Studien in der Ratte (Pottenger et al., 2000) zeigten, dass die Bioverfügbarkeit von BPA sehr gering ist. Nur 2–8 % der oral aufgenommenen Menge wird im Blut wiedergefunden, über 80 % werden innerhalb 72 h überwiegend (≈ 90 %) als BPA–Glucuronid ausgeschieden, so dass nur wenig BPA im Körper zirkuliert. Durch Untersuchungen an isolierten menschlichen Hepatozyten schätzten Pritchett et al. (in SCF (2002)) die Clearance-Rate von BPA unabhängig vom Geschlecht auf $0,3\text{--}0,9 \text{ ml}/\text{min}/\text{mg}$ Protein. Gebildet wurde überwiegend das Monoglucuronid. Über den oxidativen Metabolismus ist bisher wenig bekannt, da BPA nur zu einem geringen Anteil mikrosomal umgesetzt wird (Pfeiffer und Metzler, 2003).

In Studien zur akuten und chronischen Toxizität zeigte BPA nur eine geringe Wirksamkeit. Der NOAEL in der Ratte liegt bei $25 \text{ mg}/\text{kg}$ Körpergewicht/Tag (SCF, 2002). Nach oraler Aufnahme von BPA wurde in Nagern kein erhöhtes Krebsrisiko festgestellt (Haighton et al., 2002). Während *in vivo*–Genotoxizitätsstudien in Nagern negativ ausfallen, zeigen *in vitro*–Studien in V79–Hamsterzellen (Pfeiffer et al., 1997) und in menschlichen Primärzellen ein aneuploidogenes Potential von BPA und anderen Bisphenolen, allerdings bei fast zytotoxischen Konzentrationen (Lehmann, 2002). Tsutsui et al. (2000a) zeigten, dass BPA transformierendes und aneuploidogenes Potential in embryonalen Zellen des syrischen Hamsters besitzen.

In Rezeptorbindungsstudien zeigt BPA eine um drei Größenordnungen schwächere Affinität zum ER als E2 (Fang et al., 2001). BPA induziert in verschiedenen *in vivo* und *in vitro*-Studien schwache estrogene Effekte in unterschiedlichen Dosen. In Ratten verursacht BPA eine Zunahme des Uterusgewichtes (Reid und Wilson, 1944). In einer Dreigenerationen-Studie mit Ratten reduziert BPA das Körpergewicht der Nachkommen der F1, F2 und F3 Generation. Der NOAEL in dieser Studie beträgt 5 mg/kg Körpergewicht/Tag (SCF, 2002). Colerangle und Roy (1997) zeigten ebenfalls in der Ratte, dass die Proliferation von Brustdrüsenepithelzellen schon bei viel geringeren Dosen (0,1 mg/kg Körpergewicht/Tag) stimuliert werden kann. Die Arbeitsgruppe um vom Saal wich von den Standardprotokollen reproduktionstoxischer Studien ab und beschrieb nach *in utero*-Exposition von Mäusen mit weniger als 20 µg BPA/kg Körpergewicht Entwicklungsstörungen der männlichen und weiblichen Nachkommen (Nagel et al., 1997). Dieser Befund wird derzeit kontrovers diskutiert, weil er als sogenannter low-dose Effekt der bisherigen Vorstellung der Toxikologie widerspricht, dass eine Dosis unterhalb eines NOAEL keinen toxischen Effekt mehr bewirkt .

1.4 Testsysteme für die Bestimmung der Estrogenität einer Substanz

Eine Grundvoraussetzung für die estrogene Wirkung einer Substanz ist die Bindung an den ER. Bei der Suche nach EAS wird deshalb zuerst die Affinität der Substanz zum ER in einem kompetitiven ER-Bindung Assay relativ zu E2 bestimmt (Gaido et al., 2002). Der ER kann aus dem Uterus der Ratte oder aus kultivierten Zellen isoliert werden und wird mit verschiedenen E2- oder EAS-Konzentrationen und einer konstanten Konzentration von radioaktiv markiertem E2 für 16–20 h inkubiert. Wenn die Substanz mit E2 um die ER-Bindungsstellen konkurriert, verringert sie konzentrationsabhängig den Anteil des radioaktiven E2 am ER. Die ungebundenen Liganden werden chromatografisch abgetrennt und die Radioaktivität des verbliebenen E2 bestimmt. Danach werden die IC₅₀-Werte (Konzentration die 50 % des markierten E2 verdrängt) berechnet und mit dem IC₅₀-Wert von E2 ins Verhältnis gesetzt. Der ER-Bindung Assay ist schnell und einfach durchführbar mit einem hohen Probendurchsatz.

Dieser Assay kann jedoch nicht zwischen ER-Agonisten oder Antagonisten unterscheiden. Metabolische Aktivierung und Bioverfügbarkeit werden ebensowenig berücksichtigt wie eine mögliche Denaturierung des ER durch EAS. Wenn eine EAS eine Affinität zum ER besitzt, kann die estrogene Wirksamkeit mit Hilfe der folgenden verschiedenen *in vivo* oder *in vitro* Tests genauer charakterisiert werden.

1.4.1 *In vivo*-Testsysteme

Der klassische *in vivo* Test ist die Bestimmung des Uterusgewichts nach Gabe von EAS an Mäuse oder Ratten (Rubin et al., 1951; Black und Goode, 1980). Jugendlichen oder ovariectomierten weiblichen Tieren wird an drei bis fünf aufeinanderfolgenden Tagen die Substanz alleine oder in Kombination mit E2 verabreicht. Einen Tag nach der letzten Applikation wird das Tier getötet, der Uterus herauspräpariert und das Nass- oder Trockengewicht bestimmt. Eine Erhöhung des Uterusgewicht bezogen auf das Körpergewicht wird als estrogene Wirkung bewertet. Neben dem Uterusgewicht kann auch die Morphologie von Epithelzellen der Vagina oder der Cervix als Endpunkt herangezogen werden (Riecke und Stahlmann, 2000).

Der Vorteil bei *in vivo* Tests liegt vor allem in der Berücksichtigung der Bioverfügbarkeit und Pharmakokinetik einer Substanz. Ein Nachteil bei der Bestimmung des Uterusgewichts ist die geringe Spezifität des Endpunktes. Toxische Effekte einer Substanz können Körpergewicht und Organengewichte des Tieres reduzieren oder Abweichungen bei der Uterusentnahme können zu Schwankungen des Nassgewichtes führen, ohne dass eine estrogen Wirkung der Substanz besteht.

Ausgelöst durch die Diskussion um die transplazentare Kanzerogenität von DES wurden Teststrategien entwickelt, die nicht nur kurzzeitige Studien im exponierten Tier, sondern das Reproduktionsverhalten von exponierten Tieren und deren Nachkommen bewerten (Riecke und Stahlmann, 2000).

1.4.2 *In vitro*-Testsysteme

In vivo-Studien sind zeitaufwendig, sehr kostspielig und ethisch nicht unproblematisch. Daher wurden *in vitro* Testverfahren in Nager-, Hefe- und Humanzellen entwickelt, die im Vergleich dazu kostengünstig und schnell durchzuführen sind. Als Endpunkte werden die Zellproliferation oder die Aktivierung oder Inaktivierung eines ER-regulierten Gens herangezogen (Gaido et al., 2002; Soto et al., 1995).

Eine Übersicht über gängige *in vitro* Testverfahren ist in Tabelle 1 zusammengestellt. Eine ausführliche Beschreibung der Testverfahren findet sich in Soto et al. (1995) und Gaido et al. (2002), Sulforhodamin B- und Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium-Test sind in Kap. 5.6 beschrieben.

Tabelle 1: Endpunkte gängiger *in vitro* Testverfahren zur Bestimmung der Estrogenität.

Endpunkt	Stimulation oder Inhibierung der Zellproliferation estrogen-sensitiver Zellen
Zellen	Brustkrebs Zelllinien (MCF-7, ZR-75)
Methoden	elektronische Zellzahlbestimmung Bestimmung der Zellmasse (Sulforhodamin B-TEST) Bestimmung der Zellvitalität (Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium-Test)
Endpunkt	Aktivierung oder Inaktivierung ER-regulierter Gene (Reporter-Gen Assay)
Zellen	Vorrübergehend oder stabil transfizierte Zellen Hefezellen, HepG2, HeLa u.a.
Methoden	Bestimmung der Enzymaktivität
Zellen	Nichtmodifizierte estrogen-responsive Zellen (Ishikawa Zellen, MCF-7)
Methoden	Bestimmung der Enzymaktivität und/oder mRNA-Spiegel

In transfizierten Zellen wird ein Enzym, dessen Aktivität einfach zu bestimmen ist (Luciferase oder β -Galaktosidase), in einem Reporterplasmid zusammen mit einer ERE-Sequenz in die Zelle eingeschleusst. Wenn die Zelle selber keinen ER besitzt (z.B. Hefezellen), wird auch die Gensequenz des ER eingebracht. In dem resultierenden System sind die Bedingungen für eine Expression des Enzyms genau bekannt, und die Transaktivierungsaktivität des ER kann in Abhängigkeit vom Liganden untersucht werden.

In diesen Systemen kann allerdings keine Aussage über das gewebespezifische Verhalten einer Substanz gemacht werden. Dafür eignen sich Zellen aus estrogenen Zielgeweben wie die Ishikawa Zelllinie oder MCF-7 Zellen, die in Abhängigkeit vom ER ein Enzym oder Protein exprimieren, dessen Enzymaktivität oder mRNA-Spiegel bestimmt werden können.

1.4.3 Estrogen-stimulierte Aktivität der alkalischen Phosphatase (AP) in Ishikawa Zellen

Die Ishikawa Zelllinie wurde 1985 von Nishida aus einem Adenokarzinom im menschlichen Endometrium isoliert und etabliert (zitiert in Gravanis und Gurspide (1986)). Diese Zelllinie exprimiert einen funktionellen ER (Hata und Kuramoto, 1992; Croxtall et al., 1990), einen E2-induzierbaren Progesteron-Rezeptor (Hata und Kuramoto, 1992; Lessey et al., 1996) und einen Androgen-Rezeptor (Le Guevel und Pakdel, 2001). E2 steigert ausserdem die Expression der wachstumsfördernden Gene c-erbB-2 und TGF- α (Hata et al., 1998), was nach frühestens einer Woche zu einer verstärkten Zellproliferation der Ishikawa Zellen führt (Holinka et al., 1986c).

Die Enzymaktivität der DNA-Polymerase (Gravanis und Gulpide, 1986) und der alkalischen Phosphatase (AP) (Holinka et al., 1986b; Albert et al., 1990) werden ebenfalls konzentrationsabhängig durch E2 gesteigert. Übereinstimmend mit der *in vivo*-Situation reagieren Ishikawa Zellen auf mikromolare TAM-Konzentrationen mit einer Steigerung der Zellproliferation, die Aktivität der AP wird jedoch nicht stimuliert (Anzai et al., 1989).

Über die Ausstattung fremdstoffmetabolisierender Enzyme von Ishikawa Zellen ist wenig bekannt. Hata et al. (1987) zeigte durch Konzentrationsbestimmung von E2-Sulfat (Abb. 10) und Estron im Medium inkubierter Zellen, dass die Zelllinie über Steroid-Sulfotransferase und 17β -Hydroxysteroid Dehydrogenase (HSD) verfügt.

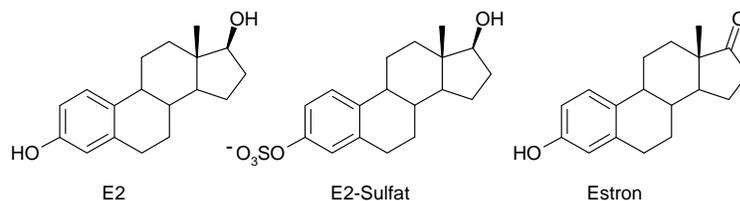


Abb. 10: Strukturformel von E2-Sulfat und Estron.

In geringen Konzentration bis 10 nM wird E2 zu mehr als 90 % als Sulfat innerhalb von 24 h ausgeschieden, bei größeren Konzentrationen spielt die Oxidation zum Estrone durch HSD eine wichtigere Rolle (Hata et al., 1987; Chetrite und Pasqualini, 1997). Die endogene Bildung von E2 durch die Aromatase-katalysierte Umwandlung von Androstendion in Ishikawa Zellen konnte von Tada et al. (1993) gezeigt werden.

Basierend auf der E2-vermittelten Steigerung der AP-Aktivität etablierten Holinka et al. (1986b) einen Estrogenitätstest, der von Littlefield et al. (1990) für die Durchführung in Mikrotiterplatten modifiziert wurde. Die Bestimmung der AP-Aktivität mit p-Nitrophenylphosphat (Kap. 5.7) ist einfach und schnell durchführbar. Das entstehende 4-Nitrophenol besitzt eine intensive gelbe Farbe, die Quantifizierung erfolgt photometrisch bei 405 nm.

Neben der Estrogen-responsiven Ishikawa Zelllinie gibt es noch eine weitere Ishikawa Zelllinie, die zwar ebenfalls aus einem Adenokarzinom des menschlichen Endometriums isoliert wurde, aber keinen funktionellen ER enthält und somit nicht Estrogen-responsiv ist (Persönliche Mitteilung von Stefan O. Müller (Merck, Darmstadt)).

Die alkalischen Phosphatasen (EC 3.1.3.1.) sind eine Gruppe membrangebundener Phosphomonoesterasen, die bei hohen pH-Werten den hydrolytischen Transfer von Phosphatgruppen katalysieren (She et al., 2000). Zur Gruppe der AP gehören gewebspezifische und -unspezifische

Phosphatasen, die AP der Ishikawa Zellen ist plazentaspezifisch. Die physiologische Bedeutung der AP ist weitgehend unklar, da sie nur eine geringe Substratspezifität besitzt. Im Serum von Krebspatienten, in der Plazenta und in menschlichen fetalen Hautfibroblasten lassen sich erhöhte AP-Aktivitäten nachweisen (She et al., 2000). Daher wird der AP eine entscheidende Rolle bei der Zellproliferation zugeschrieben.

1.5 Aneuploide

Anomalien in der Chromosomenzahl einer Zelle werden unter dem Begriff Aneuploidie zusammengefasst (Dellarco et al., 1985). Aneuploidie ist die verbreitetste Chromosomenaberration beim Menschen. Sie tritt in mindestens 0,3 % der Neugeborenen und zu ungefähr 50 % bei spontanen Fehlgeburten auf und gilt als häufigste Ursache für geistige Störungen und Schwangerschaftsabbrüche (Abruzzo und Hassold, 1995).

In menschlichen Tumoren wird fast immer Aneuploidie beobachtet, wobei die Frage, ob Aneuploidie eine Ursache oder eine Folgeerscheinung der Kanzerogenese ist, kontrovers diskutiert wird (Bialy, 2001).

Sen (2000) entwickelte auf der Basis der Mutationstheorie ein Konzept, das Aneuploidie als eigenständiges Ereignis in der malignen Transformation mutierter Zellen beschreibt. Dabei beruft er sich u.a. auf eine Arbeit von Cahill et al. (1998), in der Mutationen in Mitose-regulierenden Genen menschlicher Tumore beschrieben werden.

Im Gegensatz dazu stellen Li et al. (2000) die Kanzerogenese als einen zweistufigen Aneuploidie-induzierten Prozess dar, der keine Genmutation benötigt. Dabei stützen sie sich vor allem auf die lange Latenzzeit zwischen der Initiation und Manifestation des Tumors und das Auftreten von Tumoren mit stabilem Karyotyp. Nach der Initiation durch präneoplastische Aneuploidie entwickelt sich die initiierte Zelle autokatalytisch durch numerisch und strukturell veränderte Centrosomen und an der Mitose beteiligten Proteine weiter. Analog zur Entwicklung neuer Spezies führt dies zu einer Vielzahl neuer Karyotypen, von denen einige zufällig überlebensfähig und neoplastisch sein können (Carere et al., 1999).

Aneuploidie kann durch Hormone induziert werden, die selber nicht oder nur schwach mutagen sind. So berichtet Liehr (2000) zusammenfassend, dass E2 *in vivo* und *in vitro* Aneuploidie und strukturelle Chromosomenaberrationen induziert. Weiterhin ist bekannt, dass E2 in Ratten, Mäusen und Hamstern Tumore induzieren kann. Beim Menschen korrelieren erhöhte Plasma-Estrogen-Spiegel, ausgelöst durch erhöhte endogene E2-Produktion oder Aufnahme von EAS mit einem erhöhten Risiko, an Uterus- oder Brustkrebs zu erkranken. Diskutiert wird ein dualer Mechanismus aus unkontrollierter E2-vermittelter Zellproliferation nach DNA-Adduktbildung

reaktiver E2–Metabolite (Liehr, 2000). Tsutsui et al. (2000b) berichten allerdings, dass embryonale syrische Hamsterzellen, die keinen ER exprimieren, durch E2 morphologisch transformiert werden. Dabei wird ein erhöhter Anteil aneuploider Zellen beobachtet.

Zur Bestimmung des aneuploidogenen Potentials einer Substanz sind in der Literatur zahlreiche *in vivo* und *in vitro* Methoden beschrieben (zusammengefasst von Parry et al. (1996)). Am weitesten verbreitet sind der Mitosearrest–Test und der Mikrokerntest. Aneuploidie kann nur in proliferierenden Zellen induziert werden. Ein erhöhter Anteil mitotischer Zellen unter Substanzeinwirkung im Vergleich zu unbehandelten Zellen liefert erste Hinweise auf das aneuploidogene Potential einer Substanz. Ein zweiter Aspekt ist das Auftreten von Mikrokerneln im Cytoplasma. Mikrokerne sind kleine chromatinhaltige Partikel, die von einer eigenen Membran umschlossen sind. Sie können Chromosomenbruchstücke oder ganze Chromosomen enthalten, die durch Fluoreszenz *in situ* Hybridisierung mit markierten Centromersonden oder durch Markierung mit CREST–Antikörpern unterschieden werden können. CREST–Antikörper werden aus dem Serum von Patienten mit einer Autoimmun–Erkrankung gewonnen und binden an Proteine in der Centromerregion von Chromatiden und Chromosomen (Moroi et al., 1980). Mikrokerne, in denen CREST–Signale zu sehen sind, beinhalten ein vollständiges Chromosom. Der Mechanismus der Aneuploidieinduktion ist noch nicht geklärt. Ausgehend von etablierten aneuploidogenen Substanzen beschreiben Liang und Brinkley (1985) mögliche zelluläre Ziele in mitotischen Zellen (Abb. 11)

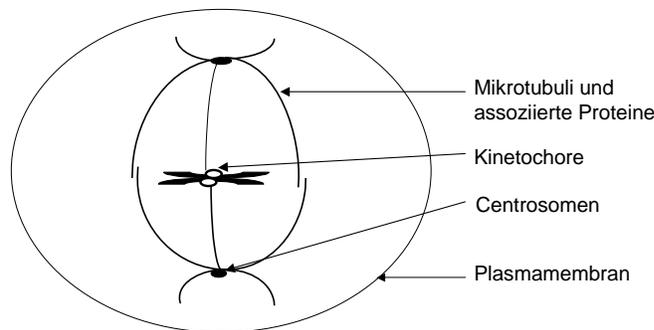


Abb. 11: Zelluläre Ziele von aneuploidogenen Substanzen.

1.5.1 Mikrotubuli und assoziierte Proteine

Mikrotubuli sind zusammen mit Aktin–Mikrofilamenten und Intermediärfilamenten am Aufbau des Cytoskeletts einer eukaryotischen Zelle beteiligt. Sie sind beim Aufbau der Mitose–Spindel von elementarer Bedeutung und wirken u.a. bei intrazellulären Transportvorgängen mit.

Mikrotubuli werden durch Polymerisation aus dimeren α/β -Tubulineinheiten gebildet. Die Mikrotubuluswand besteht aus 13 longitudinal angeordneten Reihen (Protofilamente), die um einen zentralen Hohlkörper angeordnet sind. Die Protofilamente sind so gegeneinander versetzt, dass die Wand aus abwechselnd angeordneten α - und β -Tubulin-Molekülen aufgebaut ist (Abb. 12).

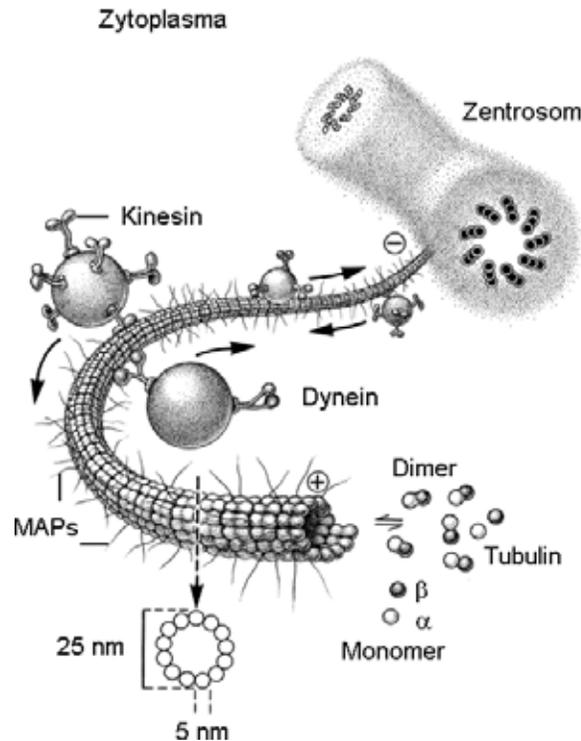


Abb. 12: Aufbau von Mikrotubuli (aus: Roche Lexikon on-line).

Das α/β -Dimer ist 8 nm lang und wird vereinfacht als Tubulin bezeichnet. Die Tubulindimere folgen in den Protofilamenten einer “Kopf-Schwanz”-Anordnung mit der Sequenz $\alpha\beta \rightarrow \alpha\beta \rightarrow \alpha\beta$ usw. So besitzen die Mikrotubuli eine definierte Polarität und die beiden Enden sind nicht gleichwertig. Die Bildung von Mikrotubuli steht in einem Gleichgewicht zwischen Polymerisation und Depolymerisation, das als “dynamische Instabilität” bezeichnet wird (Kirschner und Mitchison, 1986). Mikrotubuli wachsen an den Enden der Protofilamente unterschiedliche schnell, das schnell wachsende Ende wird als “Plus-Ende”, das langsame Ende als “Minus-Ende” bezeichnet. In der Zelle ist das Minus-Ende während der Interphase im Mikrotubuliorganisierenden Zentrum, während der Mitose in den Spindelpolen verankert. Die dynamische Instabilität wird von Inoue und Salmon (1995) wie folgt erklärt: GTP-tragende Tubulin-Dimere lagern sich an das Plus-Ende eines Protofilaments an, so dass diese, stabilisiert durch benachbarte Protofilamente, in gestreckter Form wachsen kann. Beim Zusammenbau der Dimere wird

das GTP hydrolysiert und es kommt zu einer Konformationsänderung in den Dimeren. Ohne Stabilisierung wäre der einzelne Strang gekrümmt. Die Protofilamente werden vor allem durch eine stabile "Kappe" GTP-haltiger Dimere gestreckt gehalten. Geht die GTP-Kappe verloren, kommt es zum explosionsartigen Schrumpfen der Mikrotubuli.

Die Tubulin-Polymerisation ist ein komplexer Prozess, der von einigen Aneugenen gestört werden kann (Hsu und Satya-Prakash, 1985; Liang und Brinkley, 1985). Für zellfreie *in vitro*-Untersuchungen kann isoliertes Tubulin in einer Photometerküvette bei 37 °C in Anwesenheit von Mg²⁺ und GTP zur Polymerisation gebracht werden. Die Bildung von Mikrotubuli wird mittels Trübungsmessung verfolgt. Die Depolymerisation wird durch Abkühlen auf 4 °C erreicht (Weisenberg, 1972). Aneugene können sowohl die Polymerisation (DES, Colcemid) als auch die Depolymerisation (Taxol) beeinträchtigen.

Mikrotubuli bestehen neben Tubulin aus Motorproteinen und strukturgebenden Proteinen, die unter dem Begriff Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) zusammengefasst werden. Dyneine und Kinesine sind zwei Motor-Proteine, die am intrazellulären Transport von Proteinen oder Zellorganellen beteiligt sind. Dyneine bewegen sich immer zum Minus-Ende, Kinesine immer zum Plus-Ende eines Mikrotubulus. Selbstverständlich können auch die MAP Angriffspunkt von Aneugenen sein (Liang und Brinkley, 1985).

1.5.2 Kinetochor

Das Kinetochor ist ein Proteinkomplex, der am Verknüpfungspunkt der Schwesterchromatiden eukaryotischer Chromosomen (Centromer) lokalisiert ist. Jedes Chromosom besitzt zwei Kinetochore die gegenüberliegend am Centromer angeordnet sind (Abb 11). Der Aufbau der Kinetochore findet während des ganzen Zellzyklus statt. In der Interphase binden strukturgebende Proteine an die Chromatiden. Zu Beginn der Mitose binden weitere Proteine an das Centromer, die die drei wesentlichen Funktionen der Kinetochore während der Mitose ausführen (Maney et al., 2000):

1. Anheften der Chromosomen an die Mitosespindel
2. Aufrechterhaltung des Mitose-Kontrollpunktes
3. Vermittlung der Chromosomenbewegung während der Mitose

Wird eine dieser Funktionen gestört, kann dies zu einer Fehlverteilung von Chromosomen während der Mitose führen (Zinkowski et al., 1990; Vig et al., 1991). Vor dem Übergang von

der Metaphase in die Anaphase der Mitose verharren die Chromosomen in einer Ebene zwischen den Spindelpolen (Metaphaseplatte) solange bis der Mitose-Kontrollpunkt überschritten werden kann. Dazu ist es notwendig, dass alle Chromosomen korrekt an die Mikrotubuli der Spindel angeheftet sind (Campbell et al., 2000; Gardner und Burke, 2000). Sind die Chromosomen fehlerhaft angeheftet, wird durch den Kontrollpunkt der Beginn der Anaphase verzögert, bis der Fehler behoben ist. Kann der Schaden nicht repariert werden, sterben die Zellen ab. Bei Störungen dieses Kontrollsystems kann es zu einer fehlerhaften Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen kommen. Chromosomenbewegungen sind vor der Metaphase notwendig, um die Chromosomen in der Metaphaseplatte zu bringen. Nach dem Überschreiten des Mitose-Kontrollpunktes müssen die getrennten Chromatiden zu den Spindelpolen transportiert werden. In beiden Fällen spielt die Anheftung der Kinetochore an die Mikrotubuli eine entscheidende Rolle (Inoue, 1996; Inoue und Salmon, 1995). So kann auch noch nach dem Überschreiten des Mitose-Kontrollpunktes Aneuploidie induziert werden.

1.5.3 Centrosomen

Die Centrosomen bilden die Pole der Mitosespindel. Sie bestehen aus zwei Centriolen und einer Vielzahl assoziierter Proteine, darunter das γ -Tubulin. Die Replikation und Separation der Zentriolen erfolgt in der S bzw. G₂-Phase. Durch eine Störung während der Replikation können mehrere Spindelpole entstehen, was zu Aneuploidie führen kann (Pihan et al., 1998).

2 Problemstellung

In den letzten Jahren häufen sich Berichte über Substanzen mit hormonartigen Wirkungen in Lebensmitteln, sowohl in der wissenschaftlichen Literatur, als auch in der öffentlichen Presse. Die Substanzen und ihre biologischen Effekte sind so vielfältig, dass sie allgemein als endokrine Disruptoren oder endokrin aktive Substanzen bezeichnet werden. Unser Arbeitskreis beschäftigt sich unter anderem mit dem oxidativen Metabolismus von Phyto- und Umweltestrogenen, die zu den endokrin aktiven Substanzen gehören. Ein Testsystem für die Bestimmung der estrogenen Wirkung dieser Substanzen und ihrer Metabolite stand unserem Arbeitskreis bisher nicht zur Verfügung. Daher sollte eine *in vitro* Methode zum Screening der estrogenen Wirkung etabliert werden.

Bekanntes *in vitro* Estrogenitätstests sind die Bestimmung der Affinität zum Estrogen-Rezeptor, der Zellproliferation von menschlichen MCF-7 Brustkrebszellen oder der Genexpression in Reporter-Gen-Assays. Der Nachweis endokrin aktiver Substanzen durch die Expression Estrogen-abhängiger Gene ist spezifischer als der Einfluss auf die Zellproliferation, die auch durch eine Stimulation von Wachstumsfaktoren ausgelöst werden kann, daher wird ein Reporter-Gen-Assay bevorzugt.

Ziel eines Reporter-Gen-Assays ist es, Menge oder Aktivität eines Genprodukts zu bestimmen, dessen Gen in Abhängigkeit eines aktiven Estrogen-Rezeptors transaktiviert wird. Dazu werden üblicherweise Zellen mit einem Gen transfiziert. Die menschliche Ishikawa Zelllinie, 1985 von Nishida aus einem Endometriumkarzinom isoliert und etabliert, bietet sich als Testsystem an, weil sie natürlicherweise Estrogen-abhängig die alkalische Phosphatase exprimieren. Ohne die Zellen transfizieren zu müssen, steht somit ein Reporter-Gen zur Verfügung, dessen Genprodukt durch die Umsetzung von p-Nitrophenylphosphat zum 4-Nitrophenol einfach und empfindlich bestimmt werden kann.

Endokrin aktive Substanzen können oft nur in geringen Mengen, verbunden mit einem hohen Preis, erworben werden und auch ihre Metabolite fallen nur in geringer Menge an. Deshalb soll der Estrogenitäts-Test mit Ishikawa Zellen in Mikrotiterplatten etabliert werden. Damit der Test eingesetzt werden kann, muss die Empfindlichkeit der Zellen auf 17β -Estradiol, das wichtigste menschliche Estrogen, bestimmt werden. Ausserdem muss das Testprotokoll bezüglich Wachstumverhalten der Zellen und Inkubationsdauer optimiert werden. Anschließend soll die Eignung des Estrogenitätstests mit den Positivkontrollen Diethylstilbestrol und Tamoxifen überprüft werden.

Wenn der Test auf die Positivkontrollen die erwarteten Ergebnisse liefert, kann er auf verschiedene endokrin aktive Substanzen angewendet werden. Dabei sollen die Substanzklassen getestet

werden, die zur Zeit Gegenstand unserer Forschung sind: Isoflavone, Bisphenole, Resorcylsäure-Laktone und Curcumine.

Wie in unserem Arbeitskreis gezeigt werden konnte, können endokrin aktive Substanzen auch aneuploidogenes Potential besitzen. Beispielsweise induzieren 17β -Estradiol, Isoflavone und Bisphenole *in vitro* Mitosearrest und Chromosomenverlust während der Mitose in menschlichen Hautfibroblasten und V79 Nagerzellen. Über den Mechanismus der genotoxischen Effekte ist bisher wenig bekannt. Als mögliche Angriffspunkte kommen die Proteine des Spindelapparates, die Anheftung der Chromosomen an die Mitosespindel oder die Chromosomenbewegung in Frage. Die Wirkung von 17β -Estradiol auf die Proteine des Spindelapparates ist bereits an anderer Stelle beschrieben. Daher ist das Ziel, eine Methode zu entwickeln, mit der die Anheftung der Chromosomen an die Mitosespindel durch die Kinetochore im zellfreien System nachgestellt werden kann. Abschließend sollte dann geprüft werden, ob dieser Vorgang von 17β -Estradiol und andere endokrin aktiven Substanzen gestört werden kann.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Etablierung des Estrogenitätstests

3.1.1 Einfluss von 17β -Estradiol auf die Zellproliferation von Ishikawa Zellen

Die bekannteste Wirkung von E2 ist die Steigerung der Zellproliferation in Estrogen-sensitiven Zellen. Deshalb sollte zuerst der Einfluss von E2 auf das Wachstumverhalten von Ishikawa Zellen in mittelgroßen Petrischalen (Grundfläche: 69 cm^2) untersucht werden. Der Estrogenitätstest wird in Mikrotiterplatten durchgeführt, in denen den Zellen dort eine wesentlich geringere Grundfläche für das Wachstum zur Verfügung ($0,33 \text{ cm}^2$) steht. Die Wachstumskurve in Mikrotiterplatten soll zeigen, wie die Ishikawa Zellen auf eine räumliche Begrenzung reagieren. Je nach Versuchsbedingungen (ausgestreute Zellzahl, Inkubationsdauer) können die Zellen von der Proliferationsphase in ein konfluentes Zellstadium übergehen, was die Zellphysiologie nachhaltig verändern kann.

Wachstum in mittelgroßen Petrischalen

Das Wachstumsverhalten von Ishikawa Zellen, die in mittelgroßen Petrischalen mit unterschiedlichen E2-Konzentrationen inkubiert wurden ist in Abb. 13 dargestellt.

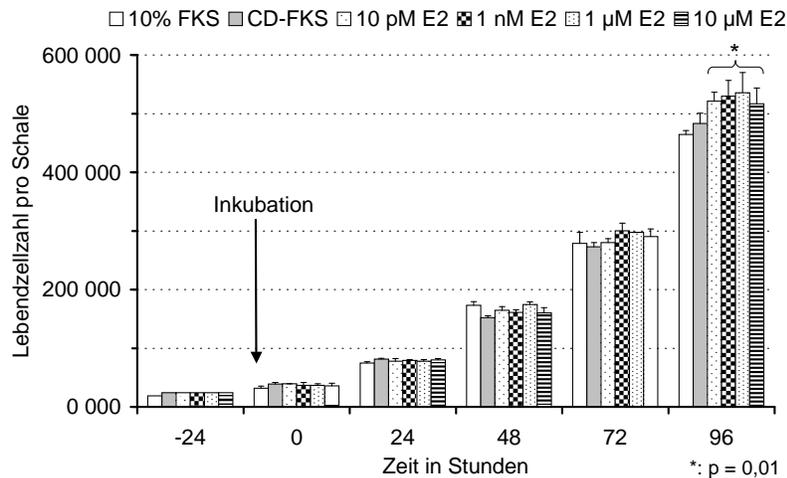


Abb. 13: Entwicklung der Lebendzellzahl von Ishikawa Zellen in mittelgroßen Petrischalen nach Inkubation mit unterschiedlichen E2-Konzentrationen. Beim Zeitpunkt $t = -24 \text{ h}$ wurden die Zellen ausgestreut, bei $t = 0$ mit Mediumwechsel inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Fehlerbalken aus einem von zwei unabhängigen Versuchen.

Ausgestreut und inkubiert wurden Zellen in Medium mit 5 % steroidfreies FKS (CD-FKS), die eingesetzten E2-Konzentrationen reichen von 10 pM bis 10 μ M. Zusätzlich wurde in einer Petrischale in Medium mit unbehandeltem FKS (10 % FKS) ausgestreut und inkubiert (ohne E2). Während der gesamten Inkubationszeit erfolgte kein weiterer Mediumwechsel, die Bestimmung der Zellzahl ist in Kap. 5.5.1 beschrieben.

Zwischen den Lebendzellzahlen der E2-inkubierten und substanzfrei wachsenden Zellen besteht nach 72 h Inkubation kein Unterschied. Nach 96 h unterscheiden sich die Zellzahlen der E2 inkubierten Zellen signifikant ($p = 0,01$) von den substanzfrei wachsenden Zellen (Abb. 13). Zwischen den Zellen in Medium mit CD-FKS und unbehandeltem FKS ist kein Unterschied nach 96 h zu erkennen.

Bei einmaliger Zugabe ohne weiteren Mediumwechsel reichen bereits 10 pM E2 aus um eine Steigerung der Zellzahl gegenüber den substanzfrei wachsenden Zellen hervorzurufen. Höhere E2-Konzentration führen nicht zu einer Verstärkung des Effektes. In Abb. 13 sind die Daten eines Versuches dargestellt, in einem weiteren Versuch konnte das Ergebnis bestätigt werden. Somit konnte gezeigt werden, dass E2 ab 10 pM nach 96 h Inkubation zu einer verstärkten Proliferation von Ishikawa Zellen führt.

Wachstum in Mikrotiterplatten

Der Einfluss von E2 auf das Wachstum von Ishikawa Zellen in Mikrotiterplatten wurde bestimmt, indem 10 000 bis 30 000 Zellen pro Kavität ausgestreut und mit 1 nM E2 oder 0,1 % DMSO inkubiert wurde. Die Bestimmung der Lebendzellzahl ist in Kapitel 5.5.2 beschrieben, in Abb. 14 sind die Ergebnisse dargestellt.

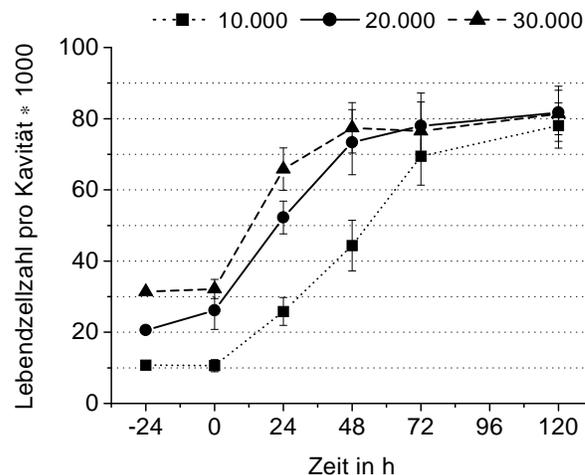


Abb. 14: Entwicklung der Lebendzellzahl in Mikrotiterplatten in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl nach Inkubation mit 1 nM E2. Dargestellt ist der Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Versuchen.

In der Mikrotiterplatte unterscheidet sich Entwicklung der Lebendzellzahl zwischen den E2-inkubierten Zellen und der Lösungsmittelkontrolle nicht (Abb. 56 im Anhang). Der Platz, der den Zellen in der Kavität einer Mikrotiterplatte für das Wachstum zur Verfügung steht ist limitiert, daher erreicht die Lebendzellzahl in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl früher oder später einen konstanten Wert. Die Zellpopulation ist dann 100 % konfluent. Die maximale Zellzahl pro Kavität liegt in Abb. 14 bei etwa 80 000 Zellen.

In den ersten 24 Stunden nach dem Ausstreuen befinden sich die Zellen in der lag-Phase. Während dieser Zeit wachsen die Zellen an der Oberfläche der Kavität an und entwickeln keine bzw. eine geringe Teilungsaktivität. Nach 24 Stunden beginnen sich die angewachsenen Zellen zu teilen und befinden sich dann in der exponentiellen Wachstumsphase mit einer Verdopplungszeit von ca. 24 h. Sind die Zellen mehr als 70 % konfluent, verlangsamen sie das Wachstum bis kein Platz mehr für das Wachstum zur Verfügung steht.

Die Zeitspanne zwischen Inkubationsbeginn und Erreichen der maximalen Zellzahl in Mikrotiterplatten beträgt bei 20 000 und 30 000 ausgestreuten Zellen 48 h, bei 10 000 ausgestreuten Zellen 72 h.

Im Vergleich zum Wachstum in mittelgroßen Petrischalen, in denen auch nach 96 h noch Zellteilung stattfand, erreicht die Zellpopulation in Mikrotiterplatten in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl nach 48–72 h die maximale Zellzahl. 1 nM E2 zeigte keinen Einfluss auf die Entwicklung der Lebendzellzahl.

3.1.2 Einflußfaktoren auf die Aktivität der AP in Ishikawa Zellen

Holinka et al. (1986b) zeigten, dass die alkalische Phosphatase (AP) in Ishikawa Zellen konstitutiv exprimiert wird und die Enzymaktivität durch E2 konzentrationsabhängig induziert werden kann. Albert et al. (1990) konnten die erhöhte AP-Aktivität nach Inkubation mit E2 auf eine verstärkte Genexpression zurückführen. Nach Inkubation mit ER-Antagonisten (z.B. ICI 164,384) waren mit und ohne E2 keine erhöhte AP-Aktivität (Simard et al., 1997) und keine mRNA für AP mehr nachweisbar (Albert et al., 1990). Daraus folgt, dass die AP in Ishikawa Zellen ER-abhängig exprimiert wird.

Die Aktivität der AP in Ishikawa Zellen kann von vielen Faktoren beeinflusst werden, z.B.:

- Konzentration von E2
- Inkubationsprotokoll (Inkubationsbeginn und -dauer)
- Bestimmung der Enzymaktivität (Lysezeit, pH Wert der Substratlösung)
- Ausgestreute Zellzahl
- Art und Konzentration des Lösungsmittels
- Mediumzusätze (Phenolrot, L-Glutamin, FKS)

In den nachfolgenden Abschnitten soll der Einfluss der oben genannten Faktoren auf die Enzymaktivität beschreiben werden. Alle Versuche wurden vom Ausstreuen bis zur Messung in Mikrotiterplatten durchgeführt. Wenn nicht anders beschrieben, wurde E2 in 0,1 % DMSO eingesetzt, dementsprechend wurde mit 0,1 % DMSO im Medium die Grundaktivität bestimmt. Für die Bestimmung der Enzymaktivität wird die AP-katalysierte Hydrolyse des fast farblosen p-Nitrophenylphosphat (p-NPP) zum intensiv gelb-gefärbten 4-Nitrophenol (4-NP) benutzt (Albert et al., 1990). Die Produktbildung wird photometrisch bei 405 nm an einem Plattenlesegerät verfolgt, und die Kinetik der 4-NP-Bildung der Berechnung der Enzymaktivität zugrunde gelegt. Neben der Enzymaktivität der Zellen wurde auch das Verhältnis der E2-stimulierten Enzymaktivität zur Grundaktivität berechnet; diese Größe wird nachfolgend als Vielfaches der Kontrolle bezeichnet. Mit diesem Quotienten wird die Induzierbarkeit der AP beschrieben. Die Versuchsdurchführung und Auswertung sind in Kapitel 5.7 beschrieben.

3.1.3 Einfluss von 17 β -Estradiol auf die AP-Aktivität

In Abb. 15 ist die AP-Aktivität gegen die E2-Konzentration aus zwei unabhängigen Versuchen aufgetragen. Die Versuche unterscheiden sich im eingesetzten E2-Konzentrationsbereich. Im ersten Versuch wurde 1 pM bis 100 μ M E2, im zweiten Versuch 1 pM bis 100 nM E2 eingesetzt.

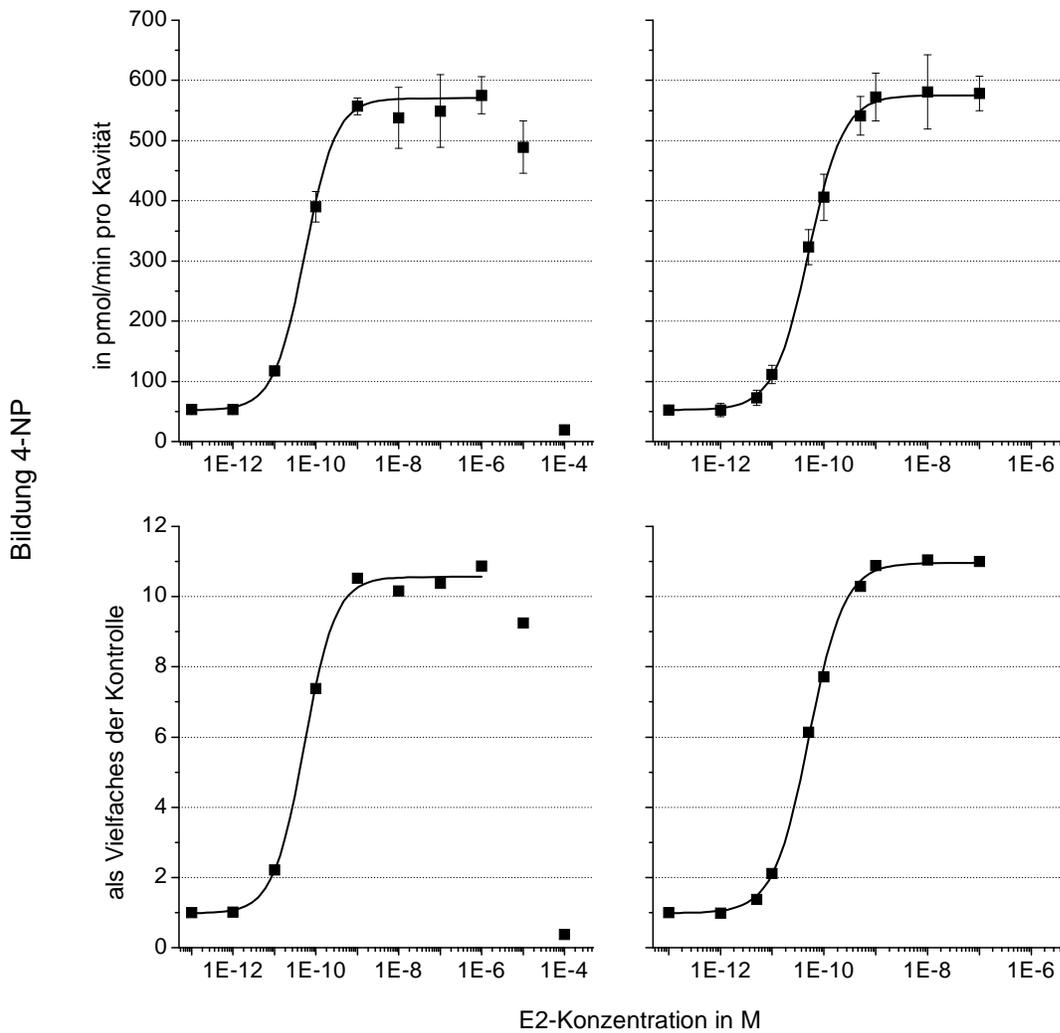


Abb. 15: Abhängigkeit der AP-Aktivität von E2 nach 48 h Inkubation. In der oberen Grafik sind die gemessenen AP-Aktivität aufgetragen, in der unteren Grafik sind sie als Vielfaches der Grundaktivität berechnet. Links wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 μ M (1E-4) E2 inkubiert, rechts von 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7). Die Grundaktivität, nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus einem Versuch.

Die in Abb. 15 dargestellten AP-Aktivitäten zeigen, dass die AP in den Ishikawa Zellen konstitutiv exprimiert wird. Die Grundaktivität beträgt in den dargestellten Versuchen etwa 50 pmol 4-NP/min pro Kavität. Die maximale AP Aktivität nach Inkubation mit E2 ist

bei den hier gewählten Versuchsbedingungen 10–12 mal höher als in der Kontrolle und beträgt etwa 550 pmol 4-NP/min pro Kavität.

Eine Erhöhung der AP-Aktivität wird bereits nach 48 h Inkubation mit 5 pM E2 beobachtet und erreicht bei nanomolaren Konzentrationen ein Maximum. Ab 1 μ M E2 nimmt die AP-Aktivität ab (Abb. 15 links). Vermutlich spielen hierbei zytotoxische Effekte von E2 eine Rolle. Der lineare Bereich der Stimulation liegt zwischen 10 pM und etwa 500 pM E2. Die maximale Enzymaktivität wird mit 1 nM E2 erreicht. Ein Vergleich mit dem E2-Gehalt im Blut von Männer und Frauen (Tabelle 2) zeigt, dass die AP Expression in Ishikawa Zellen durch physiologische E2-Konzentrationen induzierbar ist.

Tabelle 2: E2-Konzentrationen im Blutplasma von Frauen und Männern (Jordan et al., 1992).

	Konzentration	
	pg/ml	pM
Frau vor der Menopause	23 – 361	85 – 1300
Frau in der Menopause	< 30	< 110
Frau vor der Pubertät	< 20	< 74
Mann	< 50	< 184 pM

Die Schwankungsbreite der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit 1 nM E2 ist in Abb. 16 dargestellt.

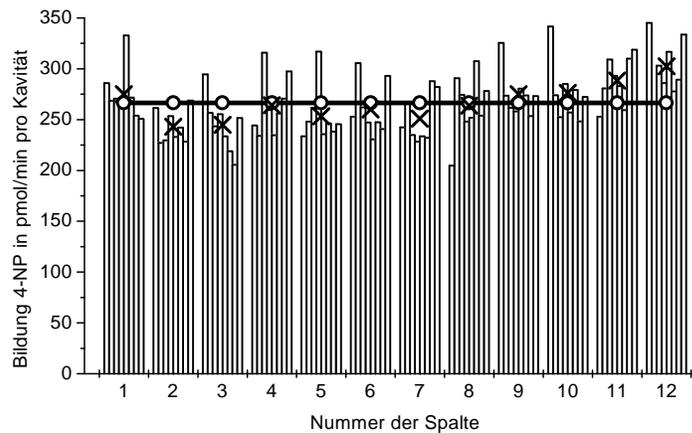


Abb. 16: Schwankungsbreite der AP-Aktivität nach Inkubation mit 1 nM E2 für 48 h. Jeder Balken steht für die AP-Aktivität der Zellen in einer Kavität der Mikrotiterplatte. Der Mittelwert der Enzymaktivität ist als Querstrich eingezeichnet, die X-Symbole stehen für den Mittelwert jeder Spalte.

Der Mittelwert aus allen AP-Aktivitäten beträgt 266 pmol 4-NP/min pro Kavität, der relative Variationskoeffizient (VK%) beträgt 12 %. Die kleinste (200 pmol 4-NP/min pro Kavität) und größte AP-Aktivität (350 pmol 4-NP/min pro Kavität) unterscheiden sich um den Faktor 1,5. Die Schwankungsbreite der Enzymaktivitäten innerhalb einer Spalte beträgt 7 bis 12 %. Die Mittelwerte der Spalten steigen zwar leicht von links nach rechts an, jedoch liegen die Werte innerhalb der Standardabweichung des Mittelwertes der Platte.

Die AP-Aktivitäten nach Inkubation von Ishikawa Zellen ohne ER mit 1 pM bis 50 nM E2 sind in Abb. 17 dargestellt.

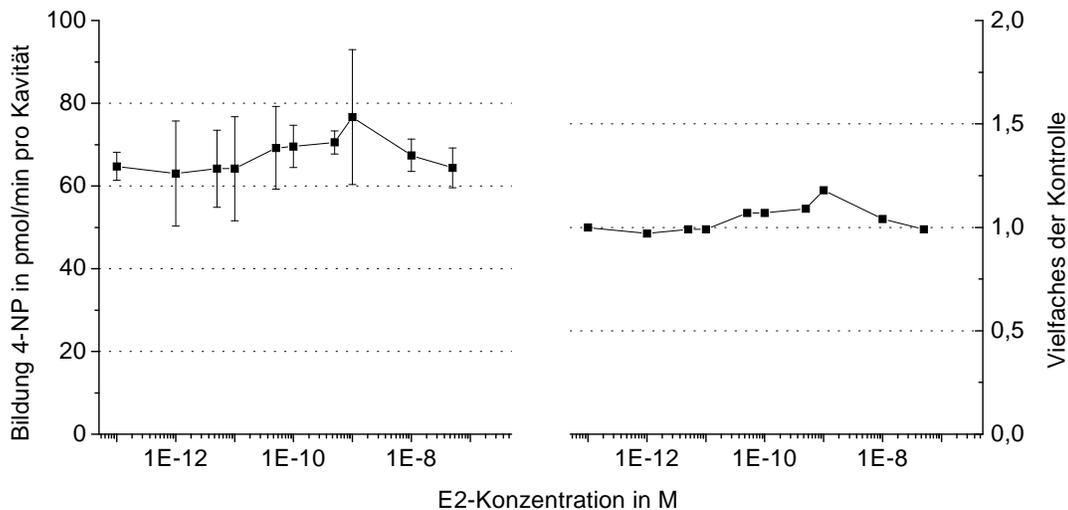


Abb. 17: AP-Aktivität in ER-negativen Ishikawa Zellen in Abhängigkeit der E2 Konzentration. Inkubiert wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2. Die Grundaktivität, nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Die Aktivität der DMSO Kontrolle liegt mit 65 pmol 4-NP/min pro Kavität (Abb. 17) etwas höher als bei den ER-positiven Zellen, allerdings lässt sich mit steigender E2-Konzentration keine höhere Enzymaktivität induzieren. Damit konnte gezeigt werden, dass auch in der ER-negativen Ishikawa Zelllinie die AP konstitutiv exprimiert wird, die E2 vermittelte Steigerung der AP-Aktivität allerdings einen funktionellen ER erfordert.

3.1.4 Inkubationsprotokoll

Für die Bestimmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach Inkubation mit Estrogen-aktiven Substanzen in Mikrotiterplatten finden sich in der Literatur verschiedene Inkubationsprotokolle. Littlefield et al. (1990) und Zielinski et al. (1991) inkubieren sofort beim Ausstreuen der Zellen mit den Substanzen, während andere Arbeitsgruppen (Albert et al., 1990; Simard et al., 1997) 24 h nach dem Ausstreuen verbunden mit einem Mediumwechsel inkubierten. Der Unterschied besteht darin, dass bei Inkubation 24 h nach dem Ausstreuen die Zellen ohne Substanzeinwirkung anwachsen können und erst dann der Substanz ausgesetzt werden, wenn sie sich in der exponentiellen Wachstumsphase befinden. Die beschriebenen Protokolle unterscheiden sich auch in der Zeit, die die Zellen mit der Substanz inkubiert wurden (Inkubationsdauer). Die Inkubationsdauer variiert zwischen 48 h (Le Guevel und Pakdel, 2001) und 96 h (Kotov et al., 1999).

Ein Vergleich der AP-Aktivität nach Anwendung verschiedener Inkubationsprotokolle soll den Einfluss von Inkubationsdauer und -zeitpunkt auf das Testsystem zeigen. In Tabelle 3 sind die Inkubationsprotokolle aufgelistet, die gegeneinander verglichen werden sollen. Ausgestreut wurden immer 20 000 Zellen, inkubiert wurde mit 1 pM bis 100 nM E2.

Tabelle 3: Inkubationsprotokolle zur Bestimmung der E2 induzierten AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. A, Ausstreuen der Zellen; I, Inkubation mit E2; M, Messung der Enzymaktivität; in Klammern steht die Inkubationsdauer.

	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Protokoll 1 (P1)	A und I	M (24 h)	M (48 h)	M (72 h)	M (96 h)	M (120 h)
Protokoll 2 (P2)	A	I	M (24 h)	M (48 h)	M (72 h)	M (96 h)
Protokoll 3 (P3)	A	I (96 h)	I (72 h)	I (48 h)	I (24 h)	M

In P1 werden die Zellen direkt beim Ausstreuen, in P2 und P3 24 h nach dem Ausstreuen, verbunden mit einem Mediumwechsel, mit E2 versetzt. Der Unterschied zwischen P2 und P3 besteht darin, dass bei P2 die Zellen zu Beginn ihrer exponentiellen Wachstumsphase inkubiert werden, während in P3 auch Zellen im konfluenten Stadium inkubiert werden. Ziel ist es zu zeigen, ob es zu einem Unterschied in der Enzyminduktion führt, wenn die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase oder im konfluenten Zustand mit E2 inkubiert werden. Bei den ersten beiden Protokollen wird je eine Platte an den darauffolgenden Tagen gemessen, während bei P3 jeden Tag eine Mikrotiterplatte inkubiert wird und am letzten Versuchstag alle Platten gemessen werden. Während der gesamten Versuchsdauer wurde kein weiterer Mediumwechsel vorgenommen. Die AP-Aktivitäten, die nach P1 und P2 gemessen wurden sind in Abb. 18 gegenübergestellt.

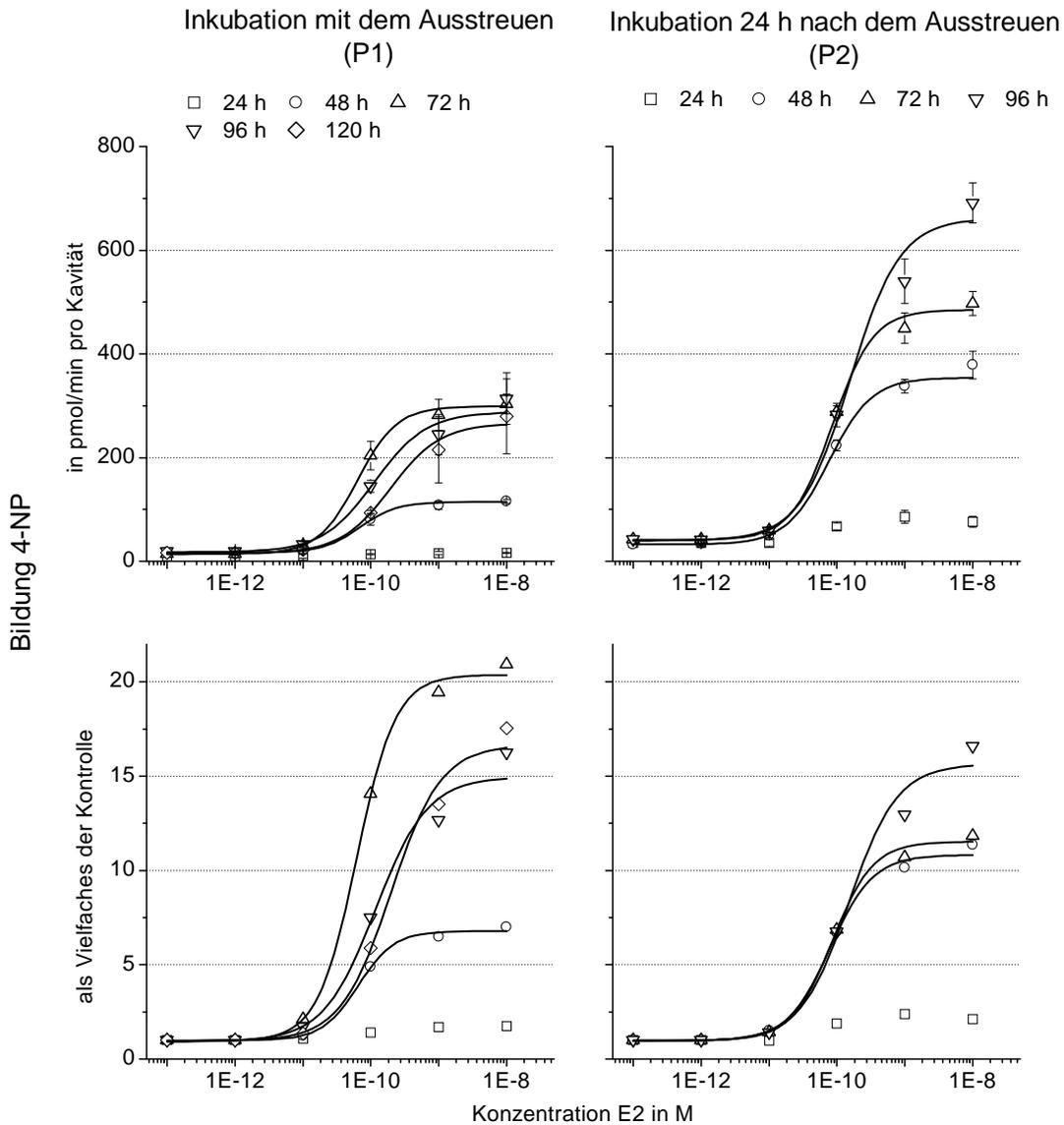


Abb. 18: Vergleich von P1 und P2 zur Bestimmung der E2-induzierten AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Links sind die AP-Aktivitäten nach P1, rechts nach P2 dargestellt. Inkubiert wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2. Die Grundaktivität nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Unabhängig vom Inkubationsprotokoll wurde nach 24 h Inkubation mit E2 keine Erhöhung der Enzymaktivität gemessen. Bei längeren Inkubationszeiten fallen die konstitutive und induzierte Enzymaktivität bei P1 etwa um den Faktor 2 geringer aus, als bei P2 (Abb. 18, obere Zeile). Nach P1 erreichen die AP-Aktivitäten und die Induzierbarkeit der AP nach 72 h Inkubation einen Maximalwert und fallen danach stetig ab. In P2 steigt die Enzymaktivität und die Induzierbarkeit der AP mit der Inkubationsdauer an (Abb. 18, untere Zeile). Dennoch unterscheiden sich die beiden Protokolle nicht in der Induzierbarkeit der AP. Sie liegt in beiden Fällen zwischen 10 und 15, was im Rahmen der Variabilität des Systems liegt, der Vorteil von P2 ist jedoch, dass höhere AP-Aktivitäten erreicht werden. Dadurch können substanzbedingte Effekte auf die AP-Aktivität (z.B. Hemmung) besser erkannt und erfasst werden.

In Abb. 19 sind die AP-Aktivitäten aus dem Vergleich der beiden Protokolle P2 und P3 vergleichend dargestellt.

Nach 24 h Inkubation ist bei P3, wie schon beim Vergleich von P1 und P2, keine erhöhte AP-Aktivität messbar. Die AP-Aktivität nimmt nach Inkubation mit E2 mit steigender Inkubationsdauer in P2 und P3 zu (Abb. 19), ebenso die Induzierbarkeit der AP. Die Enzymaktivität und die Induzierbarkeit der AP nach 24–96 h Inkubation mit E2 sind zwar in P3 generell etwas größer als in P2, unterscheiden sich aber nicht wesentlich voneinander.

Wie bereits in Abb. 14 und dargestellt, erreicht die Zellpopulation etwa 48 h nach Beginn der Exposition mit E2 die maximale Zellzahl, wenn 20 000 Zellen ausgestreut werden. Das entspricht Tag 4 des Versuchs (Tabelle 3). Demzufolge wurde in P3 an Tag 4 und 5 bei konfluentem Zustand inkubiert. Da sich die AP-Aktivität und die Induzierbarkeit der AP in beiden Protokollen nicht unterscheiden, scheint es unerheblich zu sein, ob die Zellen während der exponentiellen Wachstumsphase oder in konfluentem Zustand mit E2 inkubiert werden.

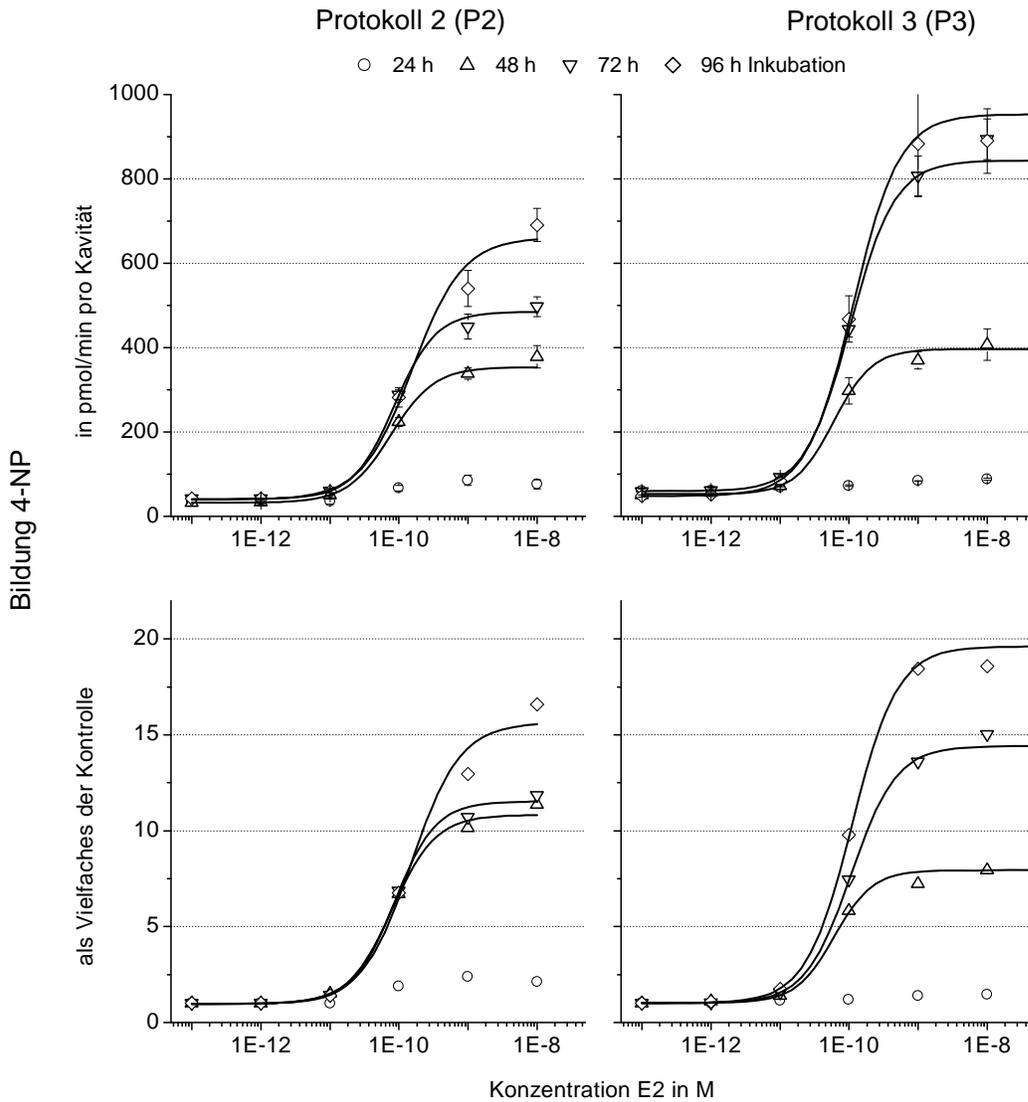


Abb. 19: Vergleich von P2 und P3 zur Bestimmung der E2-induzierten AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Die AP-Aktivitäten, die nach P2 erhalten werden sind in der linken Spalte, die nach P3 in der rechten Spalte dargestellt. Inkubiert wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2. Die Grundaktivität, nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Aus dem Vergleich der drei Inkubationsprotokolle lassen sich folgenden Schlüsse ziehen:

- Nach 24 h Inkubation mit E2 ist unabhängig vom Inkubationsprotokoll keine Erhöhung der AP-Aktivität messbar.
- Wenn die Zellen während der Anwachszeit mit E2 inkubiert werden (P1) fallen die AP-Aktivitäten geringer aus als bei Inkubation nach Anwachsen der Zellen. Ausserdem erreicht die Enzymaktivität in P1 nach 72 h Inkubation mit E2 ein Maximum, während in P2 und P3 die Aktivität bis 96 h Inkubation mit zunehmender Inkubationsdauer ansteigt.
- Die Induktion der AP ist unabhängig vom Beginn der Inkubation mit E2. Sie hängt allein von der E2-Konzentration und der Inkubationsdauer ab.

Beim Vergleich der drei Inkubationsprotokolle ist der EC_{50} -Wert aus den Dosis-Wirkung Kurven ein Maß für die Empfindlichkeit des Systems unter den jeweiligen Bedingungen. Der EC_{50} -Wert entspricht der Konzentration, mit der 50 % der maximalen AP-Aktivität erreicht wird. Je geringer der EC_{50} -Wert ist, desto empfindlicher ist das Testsystem.

In Tabelle 4 sind die EC_{50} -Werte der drei Testprotokolle nach 48 h, 72 h und 96 h Inkubation mit E2 aufgelistet.

Tabelle 4: Vergleich der drei Inkubationsprotokolle P1, P2 und P3 anhand der EC_{50} -Werte.

Inkubationsdauer:	48 h	72 h	96 h
P1	68 pM	62 pM	117 pM
P2	80 pM	86 pM	150 pM
P3	61 pM	106 pM	110 pM

Die EC_{50} -Werte der drei Inkubationsprotokolle unterscheiden sich nach 48 h Inkubation nicht voneinander. Mit zunehmender Inkubationsdauer steigen die EC_{50} -Werte an, wodurch das System allerdings nur unwesentlich unempfindlicher wird (maximal Faktor 2).

Bezogen auf die Induzierbarkeit der AP und die Empfindlichkeit des Testsystems lässt sich kein Unterschied zwischen den drei Inkubationsprotokollen ausmachen. Die Stimulation der AP ist allein abhängig von der E2-Konzentration und der Inkubationsdauer mit E2. Wenn Substanzen in Ishikawa Zellen auf ihr estrogenes Potential untersucht werden, sollte regelmäßig eine E2-Platte mitgeführt werden, um die Variabilität der Enzymaktivität ausreichend zu berücksichtigen.

In den weiteren Versuchen wird P2 bevorzugt, da Effekte, die das Anwachsen der Zellen beeinflussen könnten, ausgeschlossen werden sollen. Andererseits kann eine direkte Wechselwirkung

einer Substanz mit dem Enzym gut erfasst werden, da hohe Enzymaktivitäten erreicht werden. Weiter spricht für P2 die einfacheren Arbeitsschritte im Vergleich zu P1 und die kürzere Versuchsdauer im Vergleich zu P3. Eine Inkubationsdauer von 48 h ist ausreichend, um eindeutige Dosis–Wirkung Kurven zu erhalten, ausserdem gibt es keine Probleme mit der Stabilität von Mediumbestandteilen (Antibiotika, L–Glutamin).

Nachinkubation

Hata et al. (1987) und Chetrite und Pasqualini (1997) zeigen übereinstimmend, dass nach Inkubation von Ishikawa Zellen mit 10 nM E2 innerhalb von 24 h 95–98 % vom eingesetzten E2 als Sulfat im Medium wiedergefunden werden konnte. Bei höheren E2–Konzentrationen geht der Anteil an konjugiertem E2 zurück, und es bildet sich mehr nichtkonjugiertes Estron. Dementsprechend müssten 24 h Inkubation mit E2 ausreichen, um eine AP–Stimulation zu erreichen. Da in den Abb. 18 und 19 nach 24 h Inkubation mit E2 bis 100 nM keine erhöhte AP–Aktivität im Vergleich zur Grundaktivität messbar war, soll in den folgenden Versuchen substanzfrei nachinkubiert werden.

Dazu wurden die Zellen 24 h mit E2 (1 pM bis 100 nM) inkubiert, nach 24 h ein Mediumwechsel durchgeführt und 24 bzw. 48 h substanzfrei nachinkubiert. In einem zweiten Ansatz wurde für 48 h mit E2 inkubiert und 24 h substanzfrei nachinkubiert. Zum Vergleich wurde jeweils 48 und 72 h mit E2 ohne Mediumwechsel inkubiert. Die Ergebnisse sind in Abb. 20 dargestellt.

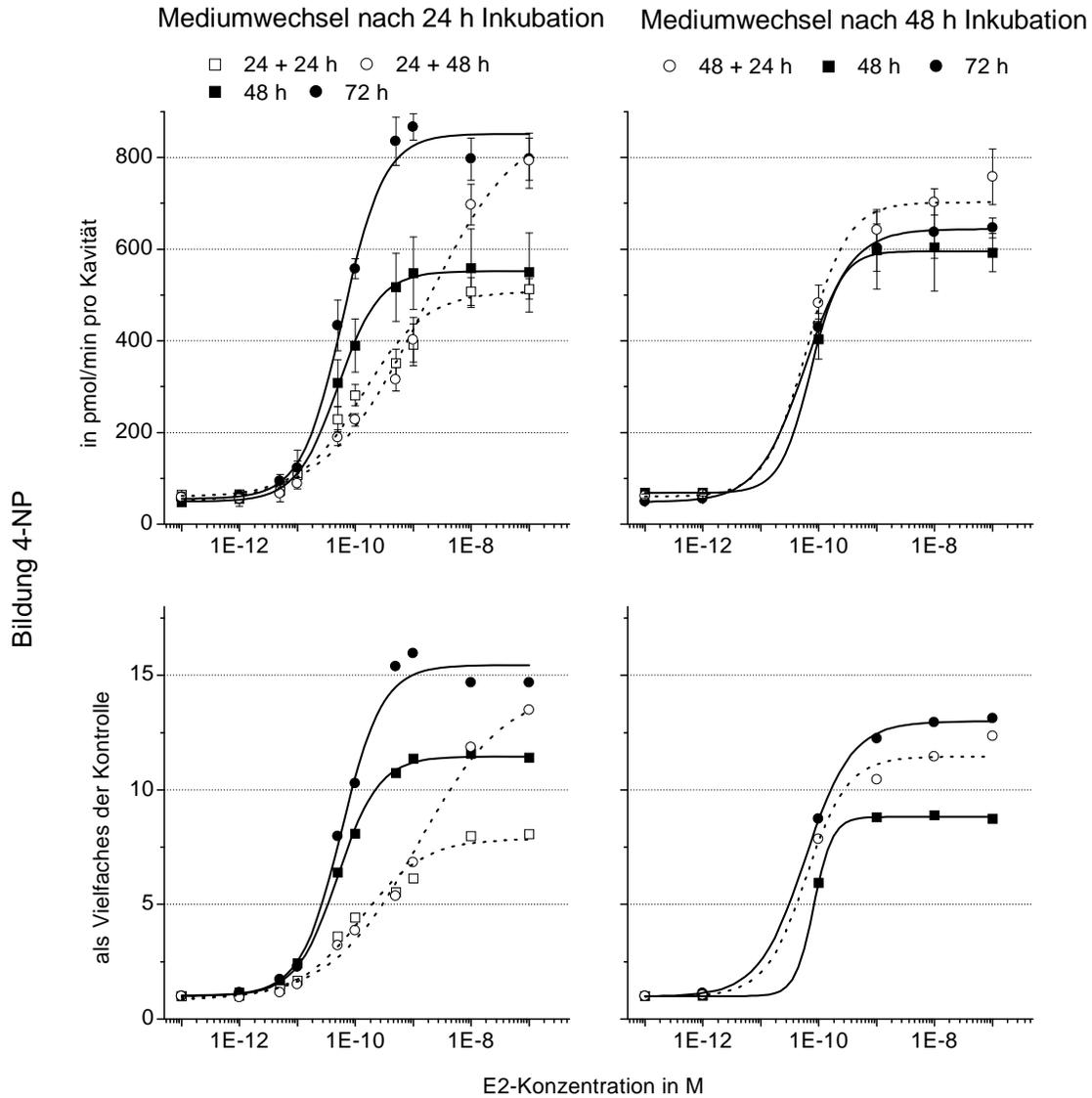


Abb. 20: AP-Aktivität in Ishikawa Zellen in Abhängigkeit der Inkubationsdauer mit und ohne Mediumwechsel. Links wurde 24 h mit E2 inkubiert und 24 und 48 h nachinkubiert. Rechts wurde 48 h mit E2 inkubiert und 24 h nachinkubiert. Die gestrichelten Kurven geben die Versuche mit Mediumwechsel wieder, die durchgezogenen Kurven zeigen die Aktivitäten ohne Mediumwechsel. Inkubiert wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2, die Grundaktivität nach Inkubation mit 0,1 % DMSO ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Obwohl nach 24 h Inkubation mit E2 keine erhöhte Enzymaktivität messbar ist (Abb. 19), kommt es nach Mediumwechsel und substanzfreier Inkubation für 24 h und 48 h zu einer Erhöhung der AP-Aktivität. Allerdings induzieren E2-Konzentrationen bis 10 nM eine geringere AP-Aktivität, als bei entsprechender Inkubationsdauer ohne Mediumwechsel. Verglichen mit der entsprechenden Inkubationsdauer ohne Mediumwechsel (48 h und 72 h) reagieren die Zellen aber unempfindlicher auf die eingesetzten E2-Konzentrationen. Der Mediumwechsel führt zu einer Rechtsverschiebung der Kurven (Abb. 20, linke Spalte) und damit verbunden zu einer deutlichen Erhöhung der EC_{50} -Werte (Tabelle 5).

Tabelle 5: Vergleich der EC_{50} -Werte aus substanzfreier Nachinkubation und Inkubation ohne Mediumwechsel.

		Inkubationsdauer	
		mit MW	ohne MW
24+24	135 pM	48	50 pM
24+48	1471 pM	72	61 pM
48+24	61 pM	48	82 pM
		72	59 pM

Anders verhalten sich die E2-induzierten AP-Aktivitäten, wenn 48 h mit E2 inkubiert und danach für 24 h substanzfrei nachinkubiert wird (Abb. 20, rechte Spalte). Es ist kein Unterschied zwischen den AP-Aktivitäten, der Induzierbarkeit der AP und den EC_{50} -Werten zu erkennen.

Die Ergebnisse in Abb. 20 können wie folgt interpretiert werden: Nach Inkubation mit E2 kommt es u.a. zu einer verstärkten Bildung von ER. Ist weiterhin E2 vorhanden (Inkubation ohne Mediumwechsel), können die Rezeptoren aktiviert werden und es kommt zu einer verstärkten Expression der Ziel-Gene (in Ishikawa Zellen z.B. Bildung von AP). Wird E2 nach 24 h Inkubation aus dem Medium entfernt, können keine Rezeptorstellen mehr besetzt werden und die AP-Aktivität resultiert aus der bis dato ausgelösten Genexpression bzw. Transkription. Deshalb führt der Mediumwechsel nach 24 h zu einer Rechtsverschiebung der Kurven in Abb. 20 relativ zu den Kurven ohne Mediumwechsel. Nach 48 h Inkubation scheinen alle Rezeptorstellen besetzt zu sein, und die AP wird maximal exprimiert.

Die Befunde stimmen auch gut mit der Ausscheidungsrate von E2 in Ishikawa Zellen überein. Werden 95 % der eingesetzten E2-Konzentration nach 24 h zum Sulfat konjugiert, verbleiben beispielsweise von 10 nM E2 noch 500 pM E2 um die AP in den Zellen zu stimulieren. Mit dieser Konzentration kann fast die maximale AP-Aktivität stimuliert werden (Abb. 15). Wird substanzfrei nachinkubiert, wird das nichtkonjugierte E2 dem Medium entzogen und eine weitere Stimulation der AP-Aktivität ist nicht mehr möglich.

3.1.5 Bestimmung der Enzymaktivität

Bei der Bestimmung der AP-Aktivität werden die Zellen vor Zugabe des Substrates durch Einfrieren bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ lysiert. Nach dem Wiederauftauen wird die Bildung von 4-NP bei pH 9,8 gemessen (Kap. 5.7). Der Einfluss der Einfrierzeit und der pH-Wert der Substratlösung auf die Bestimmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen wird in den nachfolgenden Abbildungen beschrieben.

Einfluss der Lysezeit

Der Einfluss der Lysezeit auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit E2 ist in Abb. 21 dargestellt.

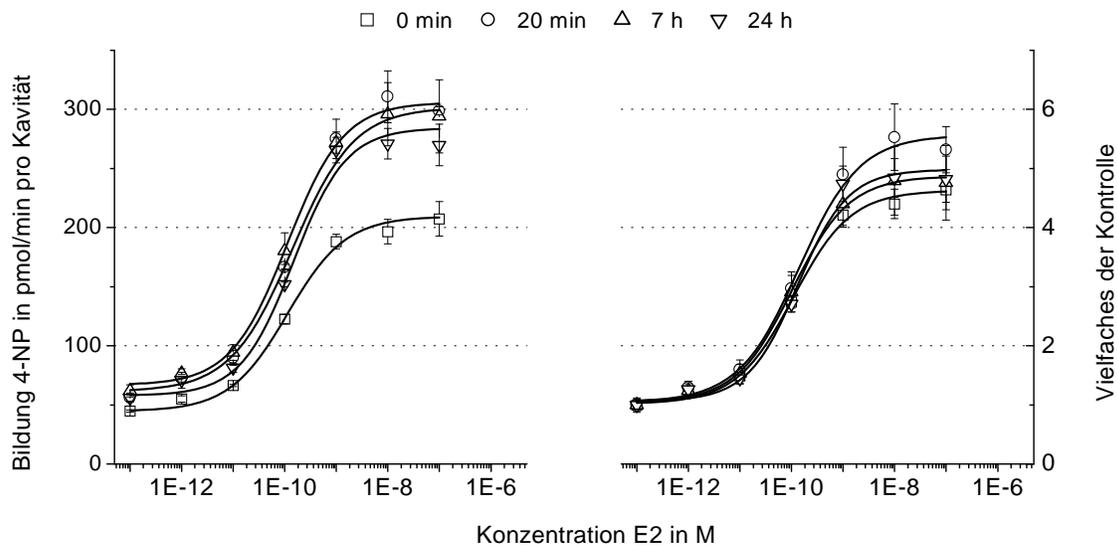


Abb. 21: Aktivität (links) und Induzierbarkeit (rechts) der AP in Ishikawa Zellen in Abhängigkeit der Lysezeit bei -80°C . Gemessen wurde ohne Lyse (0 min), nach 20 min, 7 und 24 h Lysezeit. Inkubiert wurde mit 1 pM ($1\text{E-}12$) bis 100 nM ($1\text{E-}7$) E2. Die Grundaktivität nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei $1\text{E-}13$ aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Die Lysezeit hat im Bereich von 20 min bis 24 h keinen Einfluss auf die AP-Aktivität oder auf die Induzierbarkeit der AP. Wird die Platte ohne vorherige Lyse gemessen, führt dies zu einem Verlust von etwa 25 % AP-Aktivität. Dagegen wird die Induzierbarkeit der AP (Abb. 21, rechte

Grafik), nicht reduziert, da sowohl die Kontrollaktivität, als auch E2-stimulierte Aktivität von Aktivitätsverlust betroffen ist. Für vergleichbare Bedingungen bei der Messung der AP-Aktivität sollte daher die Lysezeit mindestens 20 min betragen, gegebenenfalls kann die Lysezeit bis zu 24 h ausgedehnt werden.

Einfluss des pH-Wertes der Substratlösung

Die AP gehört zur Gruppe der Phosphatasen, die bei alkalischem pH-Wert Phosphatgruppen von ihren Substraten abspalten können. Littlefield et al. (1990) und She et al. (2000) bestimmen die AP-Aktivität mit 4-NPP bei einem pH-Wert von 9,8; Albert et al. (1990) bei pH 7,6 und Telfer und Green (1993) bei pH 10,7.

In Abb. 22 ist der Einfluss des pH-Wertes der Substratlösung auf die E2-induzierte AP-Aktivität in Ishikawa Zellen dargestellt. Der pH-Wert wurde ausgehend vom Standardprotokoll (pH 9,8) um 0,3 Einheiten nach oben und nach unten verändert.

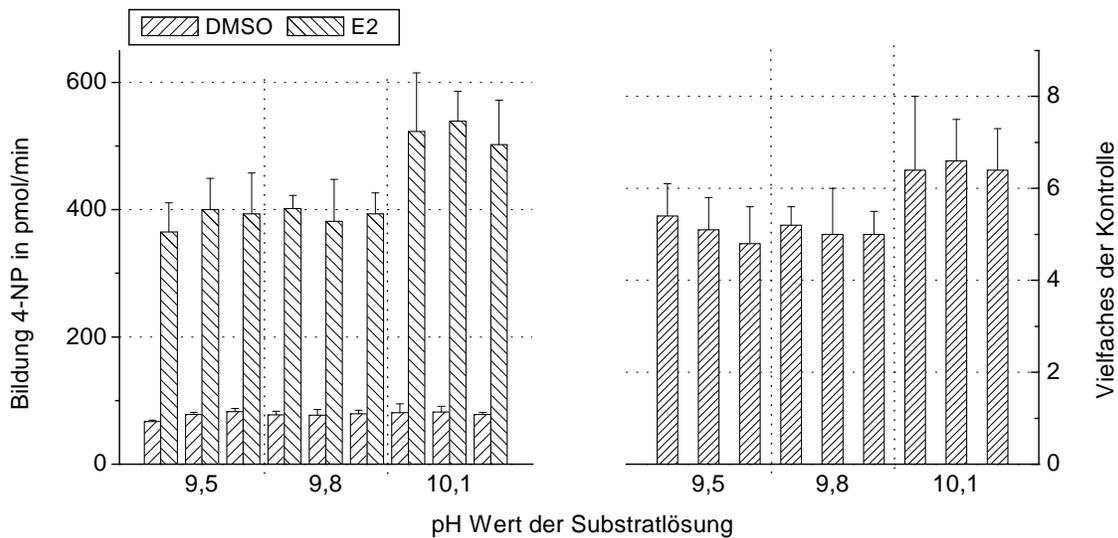


Abb. 22: AP-Aktivität in Abhängigkeit des pH-Wertes der eingesetzten Substratlösung. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Messungen nach Inkubation mit 0,1 % DMSO oder 1 nM E2. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Eine Verringerung des pH-Wertes von 9,8 auf 9,5 hat keinen Einfluss auf die Enzymaktivität, eine Erhöhung des pH-Wertes auf 10,1 führt jedoch zur Messung größerer Aktivitäten. Wie in der Enzymatik üblich, muss daher auf eine genaue Einhaltung der Bedingungen geachtet werden, damit die Ergebnisse miteinander vergleichbar sind.

3.1.6 Einfluß der Zellzahl auf die AP-Aktivität

In den zurückliegenden Abschnitten wurde die Entwicklung der Zellzahl in den Kavitäten einer Mikrotiterplatte und die Abhängigkeit der AP-Aktivität von der E2-Konzentration und der Inkubationsdauer beschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass sich die Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit DMSO oder E2 im konfluenten Zustand befinden, also die maximale Zellzahl erreicht wird, wenn etwa 20 000 Zellen ausgestreut werden (Abb. 14). Die AP-Aktivität bzw. die Induzierbarkeit nimmt unter diesen Bedingungen mit zunehmender Inkubationsdauer zu (Abb. 19). Jedoch ist noch unklar, welchen Einfluß die ausgestreute Zellzahl auf die AP-Aktivität hat, und ob es einen Zusammenhang zwischen der Lebendzellzahl und der AP-Aktivität nach 48 bzw. 72 h Inkubation mit E2 gibt. Ausserdem sollte gezeigt werden, ob die Zellzahl durch den Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium- (MTT) oder Sulforhodamin B-Test (SRB) abgeschätzt werden kann. In Abb. 23 ist das Inkubationsschema beschrieben, nach dem der Einfluss der Zellzahl auf die AP-Aktivität untersucht wurde. Inkubation der Zellen und Bestimmung der Enzymaktivität wurden wie in Kapitel 5.7 beschrieben durchgeführt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte wie in Kapitel 5.5.2, MTT-Test wie in Kapitel 5.6.1 und der SRB-Test wie in Kapitel 5.6.2 beschrieben.

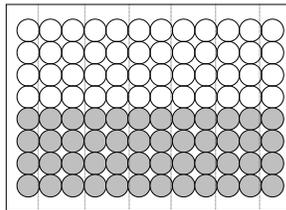


Abb. 23: Inkubationsschema zur Bestimmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen in Mikrotiterplatten in Abhängigkeit der Zellzahl. Die gestrichelten, vertikalen Linien grenzen die Bereiche gleicher Zellzahl voneinander ab. In die erste und letzte Spalte wurden keine Zellen ausgestreut (Blindwert). Die Zellen in den grau unterlegten Kavitäten wurden mit 1 nM E2 inkubiert, die farblos unterlegten mit DMSO.

Entwicklung der Zellzahl

In fünf voneinander unabhängigen Versuchen wurden Zellzahlen im Bereich von 10 000 bis 30 000 ausgestreut und mit 1 nM E2 für die maximale Genexpression der AP inkubiert. Als Kontrolle bzw. zur Bestimmung der Grundaktivität wurde mit 0,1 % DMSO 48 und 72 h inkubiert. Zu jedem der Zeitpunkte wurde die Lebendzellzahl und die Aktivität der AP bestimmt. In Abb. 24 ist die Entwicklung der Lebendzellzahl in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl nach 48 und 72 h Inkubation grafisch dargestellt. Die Lebendzellzahlen von E2- und DMSO-behandelten Zellen unterscheiden sich normalerweise nicht signifikant (Tabelle 17 im Anhang) und werden deshalb als ein Datenpunkt wiedergegeben.

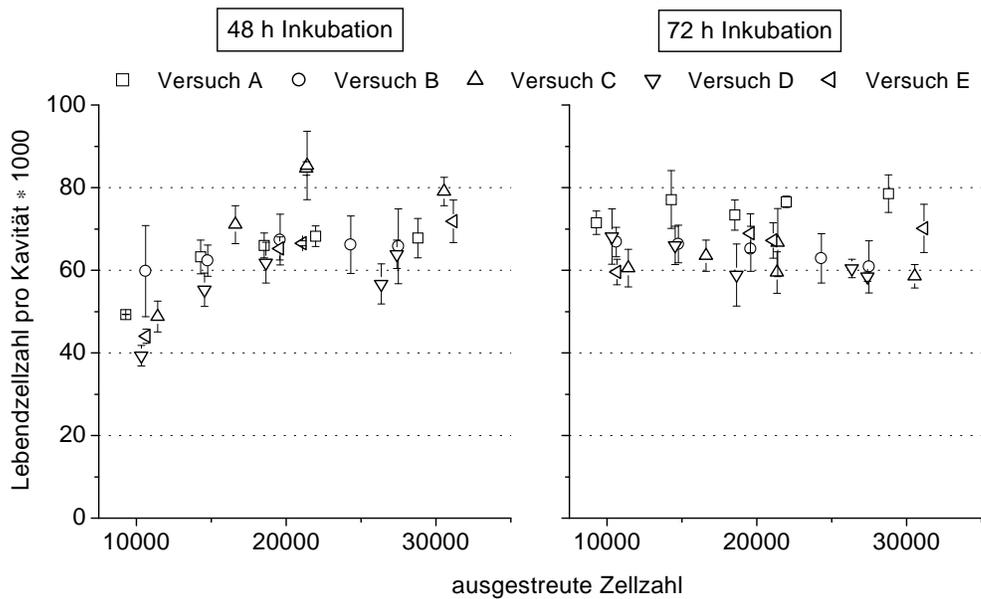


Abb. 24: Lebendzellzahl pro Kavität einer Mikrotiterplatte in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl und der Inkubationsdauer. Links nach 48 h, rechts nach 72 h Inkubation mit DMSO oder E2. Die Daten, die aus einem Versuch stammen, sind mit dem gleichen Symbol versehen.

Anhand der ausgestreuten Zellzahl kann auf die Konfluenz der Zellpopulation rückgeschlossen werden, bzw. wie lange sich die Zellen im konfluenten Zustand befinden. Bei 20 000 und mehr ausgestreuten Zellen wird, wie bereits in Abb. 14 gezeigt, 48 Stunden nach Beginn der Inkubation das Maximum der Lebendzellzahl erreicht. Werden 10–15 000 Zellen ausgestreut, wird in Übereinstimmung mit Abb. 14 frühestens 72 Stunden nach Inkubationsbeginn die maximale Zellzahl erreicht. Die maximale Zellzahl liegt in diesen Versuchen bei etwa 65–70 000 (Tabelle 6).

Tabelle 6: Mittlere maximal erreichte Zellzahl (max Zz) nach 48 und 72 h Inkubationsdauer auf 1000 Zellen gerundet.

Versuch	max Zz 48 h	max Zz 72 h
A	68 000	76 000
B	65 000	64 000
C	80 000	64 000
D	59 000	64 000
E	69 000	68 000

Zellzahl und MTT-Formazan Bildung

Die Umsetzung von MTT zum MTT-Formazan gilt als Maß für die metabolische Aktivität und den Redox-Status einer Zelle (Bernas und Dobrucki, 2002) und wird u.a. zur Zytotoxizitätsbestimmung (Scudiero et al., 1988) und indirekten Bestimmung der Zellzahl beim E-SCREEN eingesetzt.

Mit dem Ziel, die zeitintensive Zellzahlbestimmung zu ersetzen, wurde geprüft, ob die MTT-Formazan Bildung von der Lebendzellzahl nach Ende der Inkubation abhängt. In Abb. 25 wurde sowohl die ausgestreute Zellzahl als auch die Lebendzellzahl gegen die Extinktion des MTT-Formazans aufgetragen. Da sich die Extinktionen von den E2- und DMSO-behandelten Zellen normalerweise nicht signifikant unterscheiden (Tabelle 18 im Anhang), wurde in Abb. 25 der Mittelwert wiedergegeben. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde auf die Darstellung von Fehlerbalken verzichtet, der VK% liegt zwischen 5 und 15 % (Tabelle 19 im Anhang).

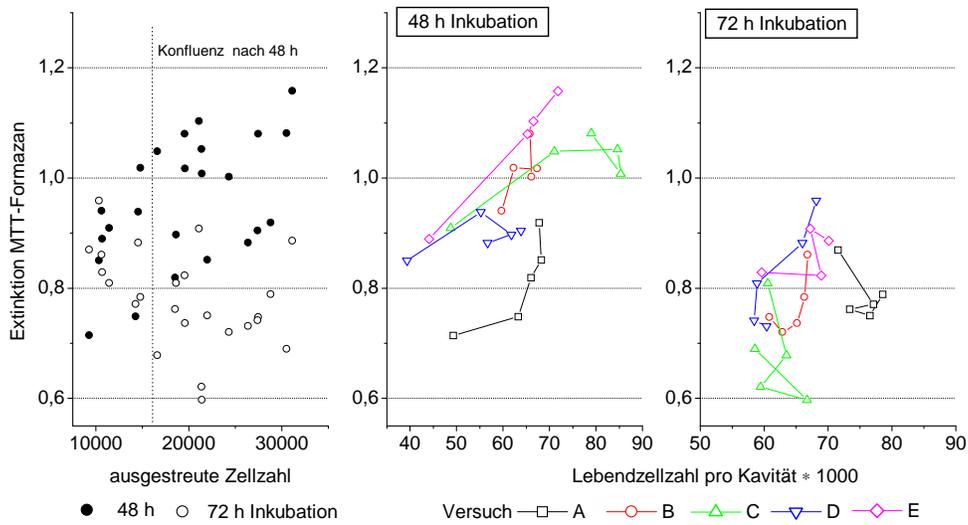


Abb. 25: Bildung von MTT-Formazan in Abhängigkeit der Zellzahl und Konfluenz der Zellen. In der linken Grafik ist die Bildung von MTT-Formazan nach 48 h und 72 h Inkubation gegen die ausgestreute Zellzahl aufgetragen. Die anderen beiden Grafiken zeigen die Abhängigkeit der Formazan-Bildung von der Lebendzellzahl nach 48 h und 72 h Inkubation. Die Datenpunkte, die aus einem Versuch stammen, sind mit dem selben Symbol gekennzeichnet und sind in der Reihenfolge, in der sie in der Tabelle auftreten miteinander verbunden.

Beim Vergleich der MTT-Formazan Extinktion mit der Zellzahlentwicklung (Abb.25) zeigt sich, dass der MTT-Test unter den gegebenen Bedingungen nur bedingt den Verlauf der Zellzahl wiedergibt. Nach 48 h Inkubation ist eine mäßige Korrelation zwischen Zellzahl und Formazan Extinktion zu erkennen: mit steigender Zellzahl wird eine größere Extinktion gemessen, allerdings sind die Unterschiede in den Extinktionen für eine zuverlässige Bestimmung der Zellzahl zu gering. Ausserdem verändert sich die Formazan-Extinktion nach 48 h Inkubationszeit bei Zellzahlen $> 70\,000$ nicht mehr. Nach 72 h Inkubation sind die Extinktionen deutlich geringer als nach 48 h, obwohl die Zellzahl konstant bleibt (Abb. 25, rechtes Diagramm). Ein Zusammenhang zwischen der MTT-Formazan Bildung und der Zellzahl lässt sich nicht ableiten. Jedoch nimmt die Formazan Bildung ab, je länger die Zellen im konfluenten Zustand verweilen (Abb. 25, linkes Diagramm). Demzufolge verändert sich die metabolische Aktivität oder der Redox-Status von Zellen wenn sie sich längere Zeit im konfluenten Zustand befinden. Für eine Bestimmung der Zellzahl ist der MTT-Test unter diesen Bedingungen nicht geeignet.

Zellzahl und SRB-Extinktion

Sulforhodamin B (SRB) bindet unspezifisch an zelluläre Proteine (Skehan et al., 1990) und kann zur Zytotoxizitätsbestimmung *in vitro* eingesetzt werden. Mit dem Ziel die Zellzahlbestimmung zu ersetzen, wurde geprüft, ob die SRB-Extinktion nach Ende der Inkubation (48 und 72 h) mit 0,1 % DMSO und 1 nM E2 von der Lebendzellzahl abhängt (Abb. 26).

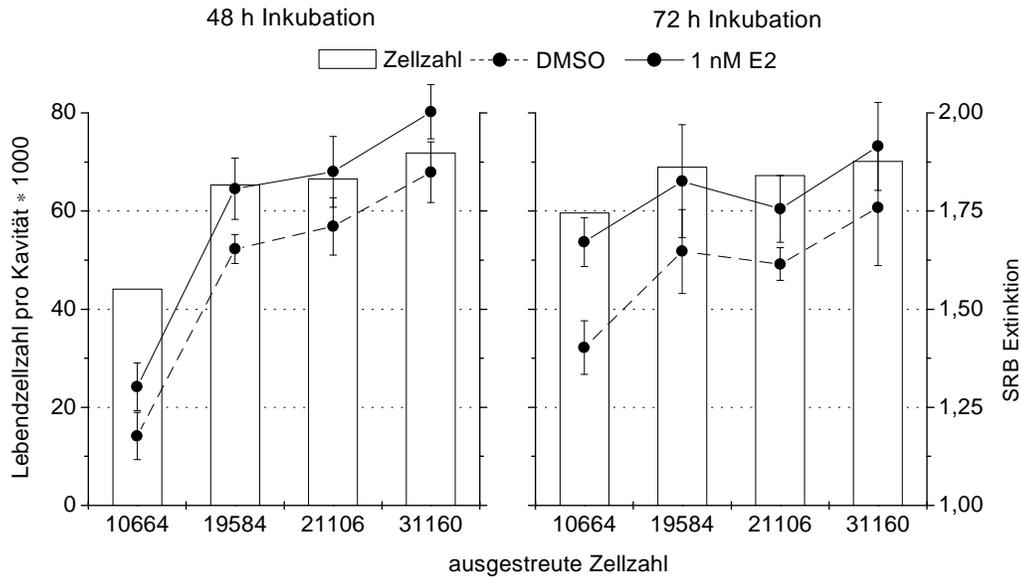


Abb. 26: SRB-Extinktion in Abhängigkeit der Zellzahl nach 48 h und 72 h Inkubation mit 0,1 % DMSO und 1 nM E2. Die Lebendzellzahl wurde als Säulen dargestellt und auf die linke Achse bezogen. Die SRB-Extinktionen nach Inkubation mit DMSO (gestrichelte Linie) und E2 (durchgezogene Linie) wurden auf die rechte Achse bezogen. Ein Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 8 Messungen, die Fehlerbalken wurden als Standardabweichung der Stichprobe berechnet.

Die SRB-Extinktion nach Inkubation mit DMSO oder E2 gibt den Verlauf der Zellzahl ziemlich gut wieder. Jedoch unterscheiden sich die Extinktionen zwischen der Lösungsmittelkontrolle und E2-inkubierten Zellen statistisch signifikant ($p > 99$). Daher kann der SRB-Test unter den gegebenen Bedingungen nicht als Ersatz für die Zellzahlbestimmung herangezogen werden.

Zellzahl und AP-Aktivität

Wie wirkt sich nun der Verlauf der Zellzahl auf die Enzymaktivität maximal stimulierter und konstitutiv exprimierter AP bzw. der Induzierbarkeit der AP aus? Zuerst soll in Abb. 27 die Induzierbarkeit der AP betrachtet werden.

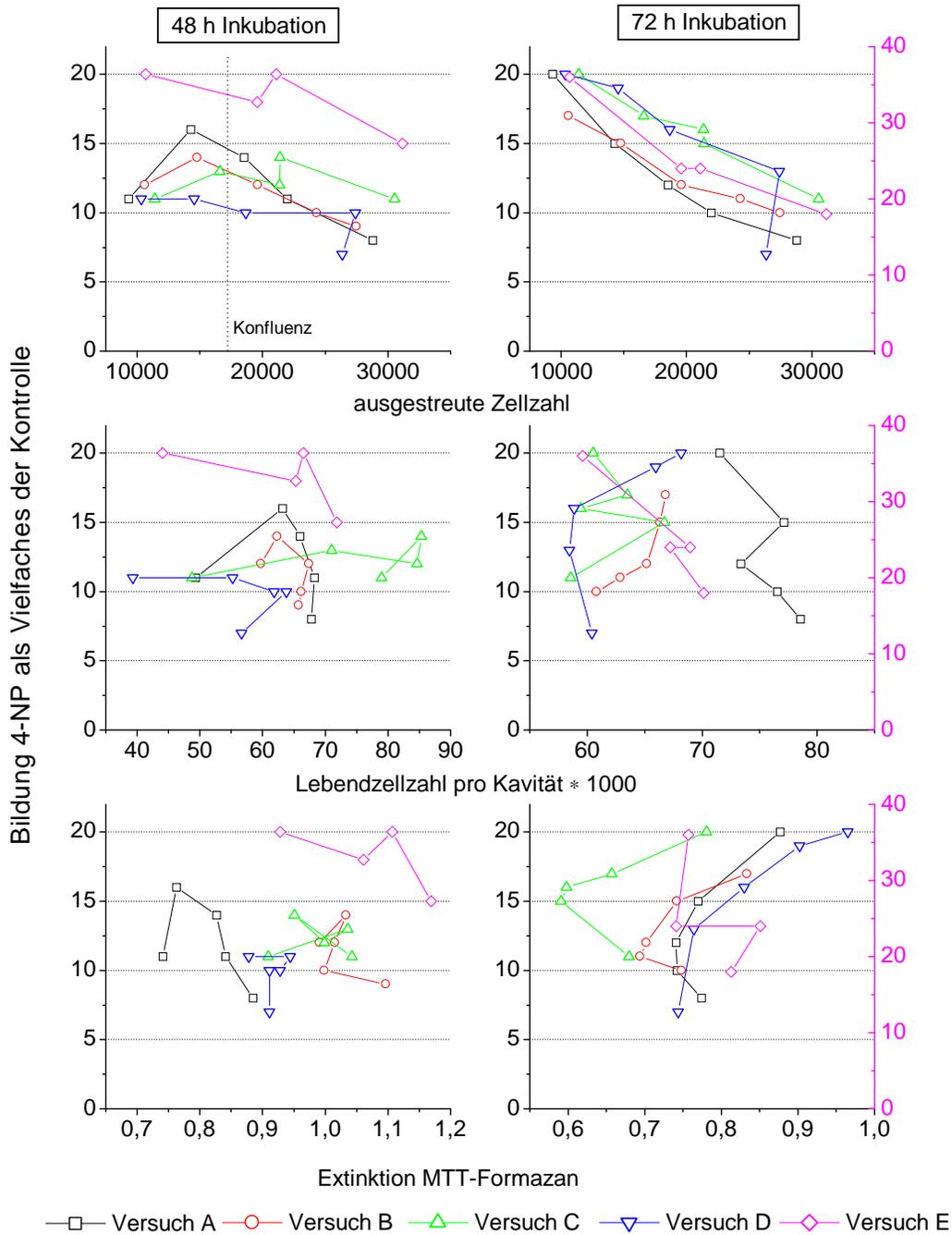


Abb. 27: Induzierbarkeit der AP in Ishikawa Zellen nach Inkubation mit 1 nM E2 für 48 und 72 h. Die Reihenfolge der Daten in der Tabelle (nach ausgestreuter Zellzahl) legt den Verlauf der Linie fest. Obere Zeile: Abhängigkeit der Induzierbarkeit von der ausgestreuten Zellzahl, mittlere Zeile: bezogen auf die gemessene Lebendzellzahl, untere Zeile bezogen auf die Bildung von MTT-Formazan. Die Daten, die aus einem Versuch stammen, sind mit dem selben Symbol und Farbe versehen. Die Werte aus Versuch E nach 72 h Inkubation beziehen sich auf die rechte Achse.

Die Enzymaktivitäten betragen nach 48 h Inkubation etwa das 10 bis 15-fache der Kontrolle unabhängig von der Zellzahl (Abb. 27). Sie unterscheiden sich damit quasi nicht voneinander, da dieser Bereich die natürliche Schwankungsbreite umfasst. Jedoch ist der Trend erkennbar, dass nach 48 h Inkubation die Induzierbarkeit der AP mit steigender ausgereuter Zellzahl stetig abnimmt. Nach 72 h Inkubation tritt dieser Trend stärker zutage. Bei Zellen, die erst kurze Zeit in der Konfluenz verweilen ($\leq 20\,000$ ausgereuten Zellen), ist die Induzierbarkeit der AP am größten (etwa 20-fach) und nimmt dann kontinuierlich ab. Bei Zellen, die schon längere Zeit konfluent sind, beträgt die Induktion der Enzymaktivität nur noch 50 % des größten Wertes. Daraus folgt, dass die Induzierbarkeit der AP zum einen von der Inkubationsdauer abhängig ist und zum anderen davon ob, und wie lange die Zellen schon konfluent sind, also von der ausgereuten Zellzahl. Ein linearer Zusammenhang zwischen der Lebendzellzahl und der Induzierbarkeit der AP-Aktivität konnte nicht festgestellt werden (Abb. 27, mittlere Zeile).

Qualitativ ändern sich die Ergebnisse nicht, wenn nach 48 h Inkubation stellvertretend für die Lebendzellzahl die Extinktion des MTT-Formazans gegen die Induzierbarkeit der AP aufgetragen wird (Abb. 27, untere Zeile): Keine Erhöhung der Induzierbarkeit mit steigender Formazan-Bildung. Die Werte streuen im Bereich ihrer normalen Schwankungsbreite über die gesamte X-Achse. Nach 72 h Inkubation geht ein Trend proportional zur Extinktion des MTT-Formazans. Zellen, die erst kurze Zeit konfluent sind, bilden mehr MTT-Formazan und besitzen eine höhere Induzierbarkeit der AP als Zellen, die schon längere Zeit konfluent sind.

In Tabelle 7 ist die Korrelation zwischen der Induzierbarkeit und der Zellzahl noch einmal zusammengefasst. Daneben ist auch die Abhängigkeit der Enzymaktivitäten (Kontrolle und E2-stimuliert) von der Zellzahl dargestellt.

Tabelle 7: Einfluß der Zellzahl auf die Induzierbarkeit der AP und die konstitutive und estrogen stimulierte Enzymaktivität in Ishikawa Zellen. Der Einfluß der Zellzahl wurde dabei als Lebendzellzahl (LebZZ), die damit verbundene Bildung des MTT-Formazans und Konfluenz der Zellpopulation beschrieben. Ein + bedeutet, dass eine Korrelation besteht; (+), eingeschränkte Korrelation; -, keine Korrelation.

	LebZZ		MTT-Formazan		Konfluenz		Abbildung
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	
Induzierbarkeit	-	-	-	-	-	+	Abb. 27
konstitutive Aktivität	+	-	+	+	(+)	(+)	Abb. 28, Abb. 29
stimulierte Aktivität	+	-	(+)	-	(+)	+	Abb. 28, Abb. 29

Die nachfolgenden Ausführungen werden sich im einzelnen mit dem Einfluss der Zellzahl auf die Aktivität der konstitutiv exprimierten AP und der mit 1 nM E2 maximal exprimierten AP beschäftigen (Abb. 28 und 29).

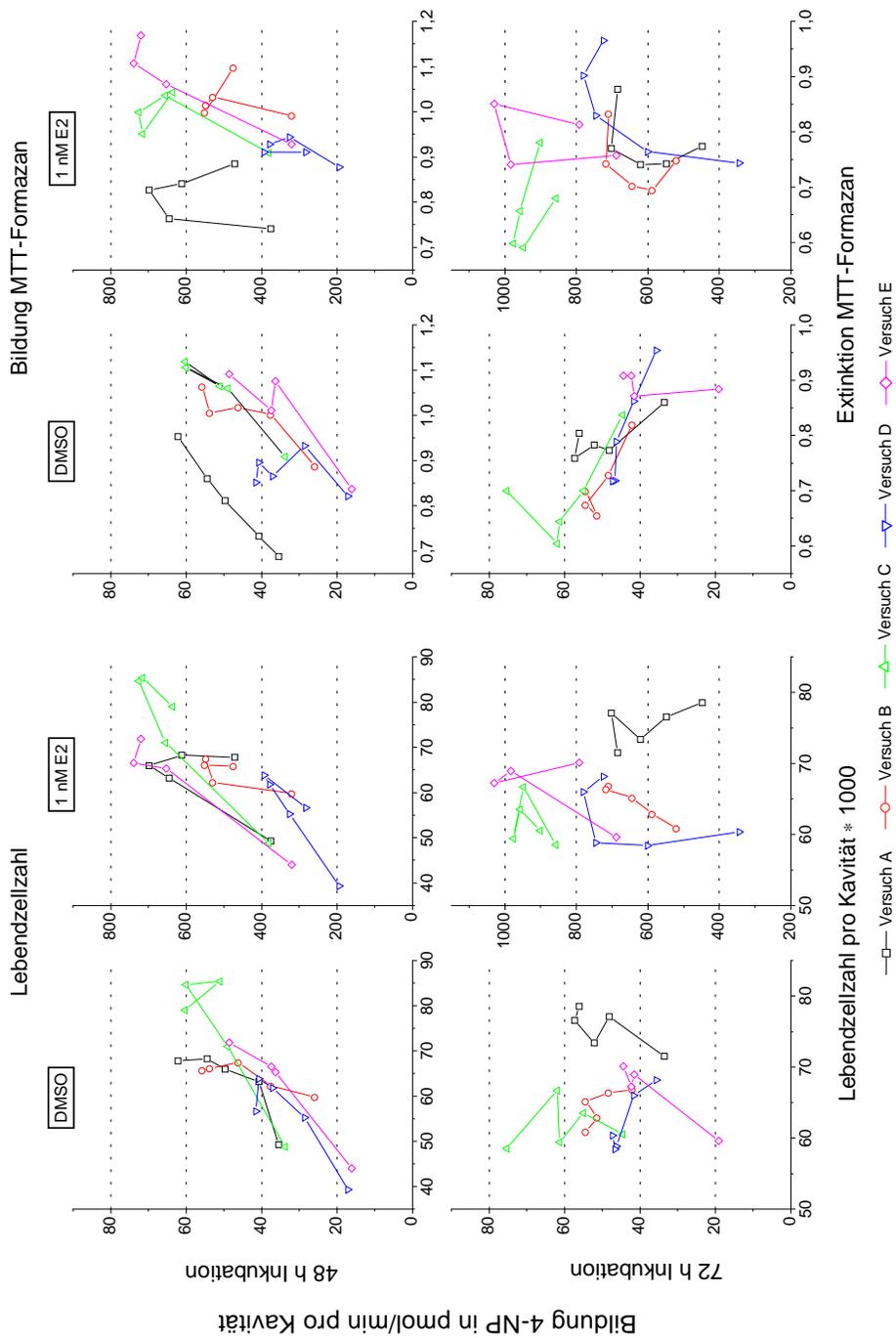


Abb. 28: Zusammenhang zwischen der Lebendzellzahl, der MTT-Formazan Bildung und den Enzymaktivitäten konstitutiver und E2 stimulierter AP Expression nach 48 und 72 h Inkubation. Die Grafiken sind als Punkt-Strich Diagramme dargestellt, die Reihenfolge der Daten in Tabelle 20 (nach ausgestreuter Zellzahl) legt den Verlauf der Linie fest. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Messungen. Die Daten, die aus einem Versuch stammen, sind mit dem selben Symbol und Farbe versehen.

Die Aktivitäten der konstitutiv exprimierten und der estrogen-stimulierten AP zeigen nach 48 h Inkubation in den Einzelversuchen eine relative gute Korrelation zur Lebendzellzahl (Abb. 28, links). Die Einzelversuche lassen sich jedoch nicht untereinander vergleichen, da z.B. im Bereich von 60 000 Zellen große Schwankungen zu beobachten sind. Nach 72 h Inkubation ist kein Zusammenhang zwischen Zellzahl und Grundaktivität feststellbar.

Werden die konstitutiven Enzymaktivitäten mit der metabolischen Aktivität in Form der MTT-Formazan Bildung bezogen, ergibt sich für beide Inkubationszeitpunkte eine Korrelation (Abb. 28, rechts). Nach 48 h Inkubation mit DMSO steigt die Aktivität proportional zur Formazan Bildung, nach 72 h Inkubation mit DMSO verhält sich die Enzymaktivität jedoch umgekehrt proportional zur metabolischen Aktivität. Bei der estrogen stimulierten AP-Aktivität steigt nach 48 h Inkubation mit 1 nM E2 die Enzymaktivität proportional mit der metabolischen Aktivität der Zellen. Nach 72 h Inkubation mit 1 nM E2 besteht kein Zusammenhang mehr zwischen der stimulierten Enzymaktivität und der metabolischen Aktivität der Zellen.

Die Abhängigkeit der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen von der Konfluenz der Zellpopulation nach Inkubation mit DMSO oder 1 nM E2 ist in Abb. 29 dargestellt.

Der Einfluss der Proliferation bzw. der Konfluenz auf die Grundaktivität ist relativ gering (Abb. 29). Nach 48 h Inkubation korreliert die Grundaktivität schwach mit der ausgestreuten Zellzahl. Bei mehr als 20 000 ausgestreuten Zellen besteht nach 48 h Inkubation kein Unterschied mehr in der Lebendzellzahl (Abb. 24). Dementsprechend sollte sich auch die Grundaktivität der AP in den Ishikawa Zellen in diesem Bereich nicht mehr verändern. Das ist nur bedingt der Fall (Abb. 29 und Abb. 57 im Anhang). Nach 72 h Inkubation beträgt die Lebendzellzahl pro Kavität etwa 70 000, unabhängig von der ausgestreuten Zellzahl. Die Grundaktivität erreicht bei Zellen, die schon mindestens 24 h konfluent sind ($> 20\,000$ ausgestreute Zellen) einen konstanten Wert von 40 bis 60 pmol 4-NP/min pro Kavität.

Der Einfluss der ausgestreuten Zellzahl auf die AP-Aktivität nach maximaler Estrogen-stimulierter Genexpression ist etwas komplexer als der auf die Grundaktivität. Hier wird ein unterschiedliches Verhalten zwischen proliferierenden Zellen und der konfluenten Population beobachtet. Nach 48 h Inkubation steigt bei proliferierenden Zellen ($\leq 20\,000$ ausgestreute Zellen) die Aktivität mit zunehmender ausgestreuter Zellzahl. Das ist auch eine logische Konsequenz der vorherigen Beobachtungen. Es wurde bereits festgestellt, dass die Zellzahl sich zu diesem Zeitpunkt einigermaßen linear mit der ausgestreuten Zellzahl entwickelt (Abb. 24) und die Enzymaktivität zur Lebendzellzahl proportional ist. Bei Zellen die nach 48 h Inkubation konfluent leben, bleibt die Enzymaktivität konstant oder nimmt ab (Abb. 29). Nach 72 h Inkubation wird deutlich, dass die Aktivität der E2 stimulierten AP abnimmt, je länger sich die Zellen im konfluenten Zustand befinden. Der Aktivitätsverlust kann bis zu 60 % betragen. Wie in Abb. 24

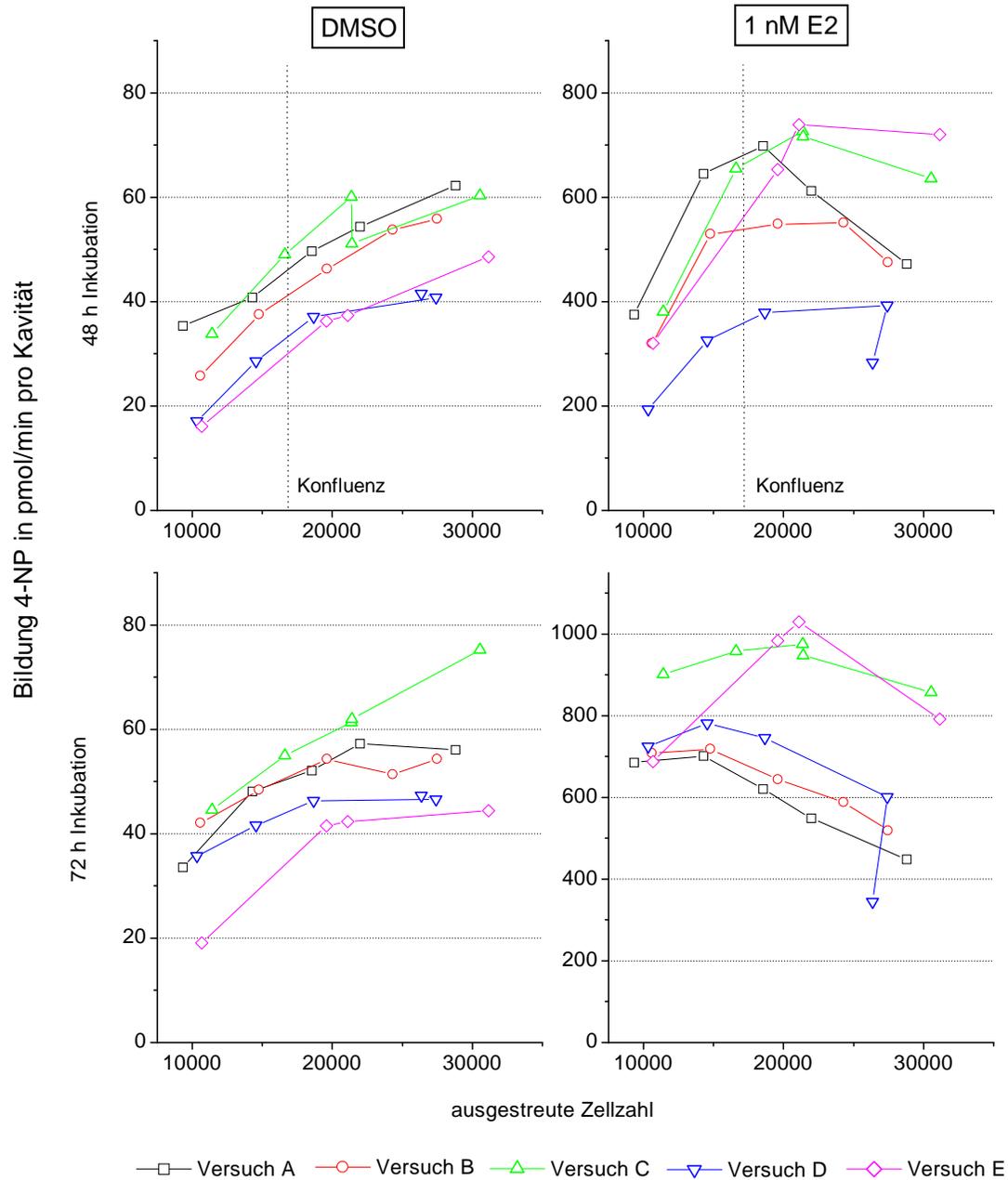


Abb. 29: Zusammenhang zwischen AP-Aktivität und Konfluenz der Zellpopulation, dargestellt als ausgestreute Zellzahl. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 8 Messungen. Die Daten, die aus einem Versuch stammen, sind mit dem selben Symbol und Farbe versehen.

gezeigt, sind die Lebendzellzahlen in einer Mikrotiterplatte nach 72 h Inkubation unabhängig von der ausgestreuten Zellzahl, aber sie befinden sich unterschiedlich lange im konfluenten Stadium.

Die wesentlichen Punkte des Einflusses der Zellzahl auf die Estrogen-stimulierbare AP-Aktivität in Ishikawa Zellen, bei Inkubation in Mikrotiterplatten, sollen im Folgenden noch einmal zusammengefasst werden. Mit zunehmender Inkubationsdauer verändern die Ishikawa Zellen unter den gegebenen Versuchsbedingungen ihre Eigenschaften, die in erster Linie darauf beruhen, dass die Zellen durch den limitierten Platz in den Kavitäten der Mikrotiterplatten früher oder später die Proliferation einstellen und in ein konfluentes Stadium übergehen. Dadurch verändern sich unter anderem der Zellzyklus (größerer Anteil Zellen in der G_0 Phase) und die metabolische Aktivität der Zellen. Daraus resultieren folgende Veränderungen in der AP-Aktivität:

- Die Induzierbarkeit der AP ist von der Inkubationsdauer abhängig. Nach 48 h und 72 h Inkubation ist sie unabhängig von der aktuellen Lebendzellzahl. Nach 48 h ist die Induzierbarkeit relativ konstant und liegt 10 bis 15-fach über der Grundaktivität. Je länger die Zellen konfluent sind (Abb. 27) desto geringer ist die Induzierbarkeit der AP. Bei proliferierenden Zellen bzw. Zellen, die erst kurze Zeit konfluent wachsen, ist die Induzierbarkeit am größten.
- Die Enzymaktivitäten (Grundaktivität und E2-stimuliert) verhalten sich nach 48 h Inkubation einigermaßen proportional zur Lebendzellzahl. Nach 72 h Inkubation gibt es keine Korrelation zwischen Enzymaktivität und Lebendzellzahl. Wenn die Zellpopulation schon länger als 24 h konfluent ist, kann die E2-stimulierte AP-Aktivität bis zu 60 % Prozent geringer sein als bei einer Population, die weniger lange konfluent ist, obwohl sich die Lebendzellzahlen dieser Populationen nicht voneinander unterscheiden.
- Die AP-Aktivität verändert sich nach 48 h Inkubation proportional zur MTT-Formazan Bildung in den Zellen. Die Induzierbarkeit der AP ist davon jedoch nicht betroffen. Nach 72 h Inkubation lässt sich nur noch die konstitutive Enzymaktivität mit der MTT-Formazan Bildung korrelieren.

Für die Bedingungen im Estrogenitätstest (20 000 ausgestreute Zellen, 48 h Inkubation) lassen sich folgende Voraussagen treffen:

- Die Induzierbarkeit der AP sollte in etwa zwischen 10 und 15 liegen.
- Die Lebendzellzahlen nach Ablauf der Inkubationszeit können von Versuch zu Versuch sehr unterschiedlich sein, und damit schwanken auch die gemessenen Enzymaktivitäten und die Bildung von MTT-Formazan.

Abschließend soll noch darauf hingewiesen werden, dass zwar ein Zusammenhang zwischen der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen und der Lebendzellzahl nach 48 h Inkubation festgestellt wurde, dieser aber darauf beruht, dass unterschiedliche Zellzahlen ausgestreut wurden. Ob ein Zusammenhang zwischen der Enzymaktivität und der Lebendzellzahl unter zytotoxischen oder wachstumshemmenden Bedingungen besteht, also ausgehend von konstant ausgestreuter Zellzahl (z.B. Enzymaktivität nach Inkubation mit 10 bis 100 μM E2 für 48 h in Abb. 15), kann nicht beantwortet werden. Besteht bei einer Substanz die Vermutung, dass sie wachstumshemmend in Ishikawa Zellen wirkt, wird empfohlen, parallel zur AP-Aktivität eine Zellzahlbestimmung mit dem CASY[®] durchzuführen, da die elektronische Zellzählung zuverlässige und nachvollziehbare Daten liefert.

3.1.7 Einfluss des Lösungsmittels

In der Zellkultur stellt sich immer wieder die Frage, ob die Substanz in DMSO oder in anderen Lösungsmittel wie z.B. Ethanol (EtOH) gelöst und in das Medium gegeben werden soll. DMSO besitzt sehr gute Eigenschaften als Lösungsvermittler, die besonders bei der Untersuchung von unpolaren Verbindungen, z.B. Steroide, zum Tragen kommen. Jedoch gilt DMSO zytotoxischer als EtOH.

Der Einfluss der DMSO- und EtOH-Konzentration (0,1 und 1 %) auf die E2-stimulierte AP-Aktivität in Ishikawa Zellen ist in Abb. 30 dargestellt. Nach Inkubation mit E2 in 0,1 und 1 % DMSO im Medium wurde zusätzlich eine Zellzahlbestimmung (Kap. 5.5.2) durchgeführt.

Nach 48 h Inkubation mit DMSO als Lösungsmittel (Abb. 30 linke Spalte) zeigt sich die AP-Aktivität und die Lebendzellzahl abhängig von der eingesetzten DMSO-Konzentration. Die Induzierbarkeit der AP bleibt jedoch unbeeinflusst. Die Lebendzellzahl erreicht nach Inkubation mit 1 % DMSO im Medium nur 85 % der Zellzahl, die nach Inkubation mit 0,1 % DMSO erreicht wird. In einem Wiederholungsversuch konnte diese Differenz bestätigt werden. Der Unterschied in der AP-Aktivität fällt noch deutlicher aus. Die Enzymaktivität nach Inkubation mit 1 % DMSO im Medium erreicht nur 70 % der Aktivität nach Inkubation mit 0,1 % DMSO im Medium. Im Wiederholungsversuch betrug die Differenz 50 %. Die AP-Aktivität reagiert offensichtlich empfindlicher auf das veränderte Wachstumsverhalten der Zellen als die Entwicklung der Zellzahl. Zum Beispiel wäre denkbar, dass die DMSO-Konzentration die Verdopplungszeit der Zellpopulation vergrößert, was zu einer Abnahme der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen führen könnte. Abschließende Klärung könnte die parallele Bestimmung der AP-Aktivität und der Verdopplungszeit von Ishikawa Zellen bringen, die mit E2 in unterschiedlichen DMSO-Konzentrationen über einen längeren Zeitraum inkubiert werden.

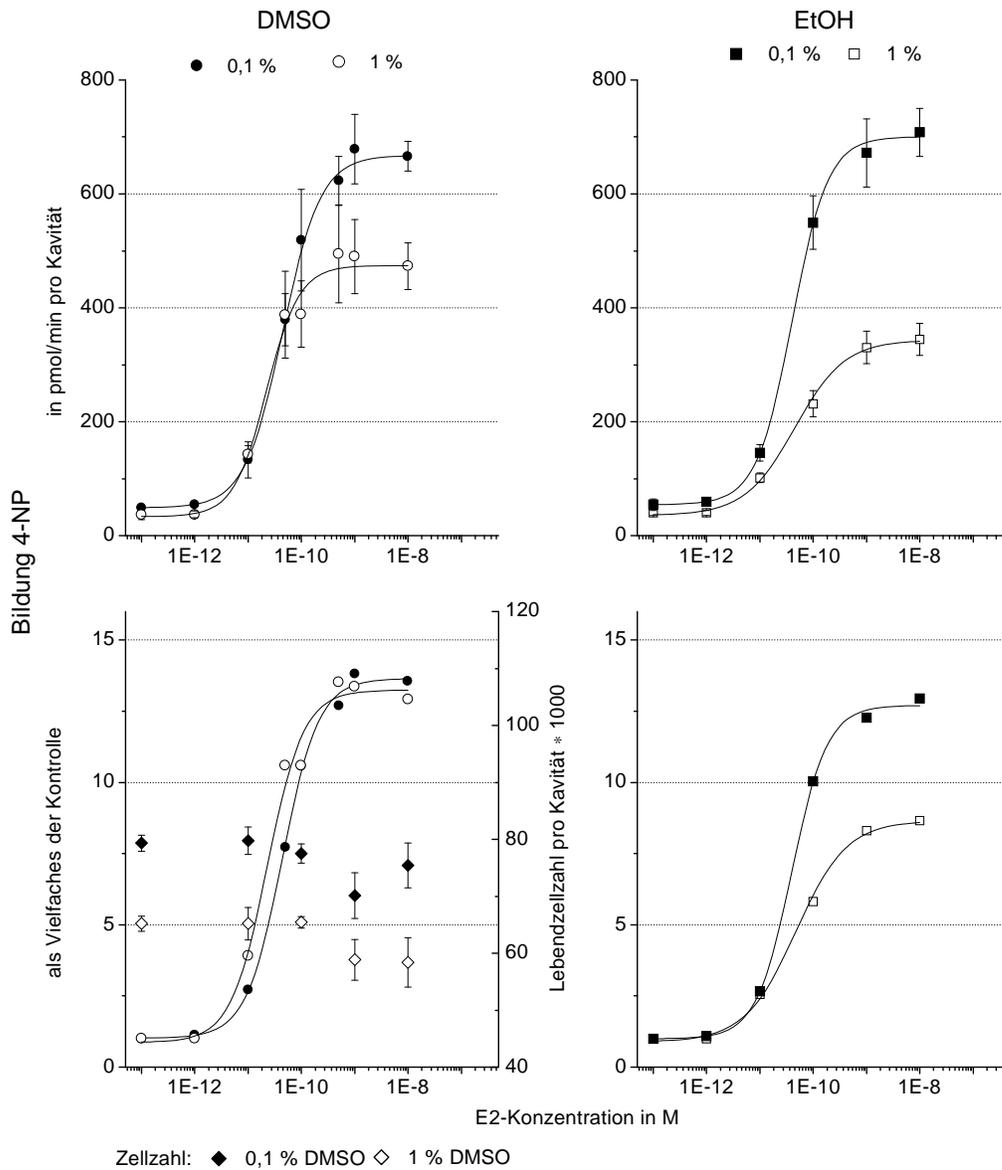


Abb. 30: Einfluss der Lösungsmittelkonzentration auf die E2-induzierte AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation. Links sind die AP-Aktivitäten nach Inkubation in 0,1 und 1 % DMSO, rechts nach Inkubation in 0,1 und 1 % EtOH dargestellt. Zusätzlich ist die Lebendzellzahl bei DMSO-inkubierten Zellen aufgetragen, die sich auf die rechte Achse bezieht. Inkubiert wurde mit 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2. Die Grundaktivität nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Der Einfluss von EtOH auf die AP-Aktivität in den Ishikawa Zellen ist mit dem von DMSO vergleichbar. Mit 1 % EtOH im Medium während der Inkubation, erreicht die AP-Aktivität nur etwa 50 % der Aktivität, die mit 0,1 % EtOH erreicht wird. Allerdings nimmt auch die Induzierbarkeit um 25 % ab. Dieser Unterschied kann durchaus im Rahmen der natürlichen Schwankung liegen, ist in diesem Fall aber sicher darauf zurückzuführen, dass die Kontrollaktivität bei Inkubation mit EtOH in Abb. 30 stärker beeinflusst wurde, als bei der Inkubation mit DMSO. Abschließend wurden die AP-Aktivitäten von nichtinkubierten und Lösungsmittel-behandelten Zellen verglichen (Tabelle 8).

Tabelle 8: Einfluss von DMSO und EtOH auf die AP Aktivitäten. Aufgelistet sind die Grundaktivitäten als Bildung 4-NP in pmol/min pro Kavität nach Inkubation mit und ohne Lösungsmittel (LM) aus Abb. 30.

Versuch	ohne LM	mit LM			
	Medium	0,1 % DMSO	1 % DMSO	0,1 % EtOH	1 % EtOH
AP-Aktivität	54	49	37	55	40

DMSO- oder EtOH-behandelte Ishikawa Zellen zeigen bei 0,1 % Lösungsmittel im Medium keinen Unterschied in der AP-Aktivität zu unbehandelten Zellen (Tabelle 8). Auch größere DMSO-Konzentrationen (bis 0,4 % im Medium) zeigten keinen Einfluss auf die AP-Aktivität (Daten nicht gezeigt), können also bei schwerlöslichen Substanzen oder bei Koinkubationen eingesetzt werden. Dagegen führt 1 % Lösungsmittel im Inkubationsmedium zu einer deutlichen Abnahme der Enzymaktivität.

Es macht also keinen Unterschied, ob DMSO oder EtOH zur Substanzinkubation von Ishikawa Zellen verwendet wird. Es ist vielmehr eine Frage der Konzentration, ob adverse Effekt vom Lösungsmittel auf die Zellen ausgehen. Da DMSO die besseren Eigenschaften als Lösungsvermittler besitzt, wird bei der Durchführung des Estrogenitätstest DMSO zur Inkubation eingesetzt. Der DMSO-Anteil im Inkubationsmedium wird immer möglichst klein gehalten und sollte 0,4 % nicht überschreiten.

3.1.8 Einfluß von Mediumbestandteilen auf die AP-Aktivität

Zusätze zum Zellkulturmedium können die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen beeinflussen, wenn sie das Wachstumsverhalten der Zellen beeinflussen (L-Glutamin) oder wenn sie ein estrogenes Potential besitzen, wie das beim fetalen Kälberserum oder Phenolrot der Fall ist.

Phenolrot (Abb. 31) wird Zellkulturmedien als Indikator zugesetzt, um Veränderungen im pH-Wert des Kulturmediums schnell erkennen zu können. Allerdings ist eine Verunreinigung des

Indikators (Abb. 31) bekannt, die estrogenes Potential besitzt, und deren Anteil bis zu 5 % betragen kann. Um eine Stimulation der AP-Aktivität durch das Medium auszuschließen, wurde daher zum Kultivieren der Zellen und während der Versuchsdurchführung nur phenolrot-freies Medium verwendet.

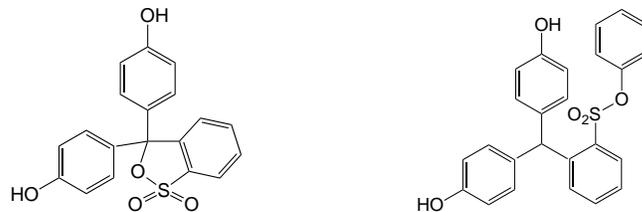


Abb. 31: Strukturformel von Phenolrot (links) und der estrogen-aktiven Verunreinigung (rechts).

Eigene Untersuchungen wurden zum Einfluss von L-Glutamin und FKS auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen durchgeführt. Der Einfluss von Bisphenol A auf die AP-Aktivität wird in Kapitel 3.2.4 beschrieben. Aufgrund der Estrogenität von Bisphenol A in *in vitro*-Tests (Krishnan et al., 1993) wurden in der Zellkultur keine Behälter oder Gefäße aus Polycarbonat zum Erhitzen von Lösungen verwendet.

Einfluss von L-Glutamin auf die AP-Aktivität

L-Glutamin (GLU) (Abb. 32) spielt eine wichtige Rolle in der Zellproliferation und im Metabolismus der Zelle. Schon in den 50er Jahren zeigten Eagle et al. (1955), dass GLU essentiell für die Proliferation von HeLa-Zellen ist. In zahlreichen Studien wurde die Rolle von GLU als Energiequelle in schnell proliferierenden Krebszellen (Mates et al., 2002), (Irani et al., 1999) und in der Protein- und Nukleotid-Biosynthese (Wasa et al., 1996), (Yamauchi et al., 2002) beschrieben.

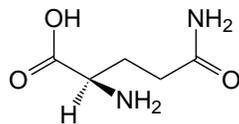


Abb. 32: Strukturformel von L-Glutamin.

Zellkulturmedien wird vor dem Einsatz in der Zellkultur, abhängig von der Zelllinie, 2–5 mM GLU zugesetzt. GLU ist im Zellkulturmedium bei 37°C nicht stabil. Collins et al. (1998) zeigten,

dass GLU zum Glutamat oxidiert werden kann. Durch den geringeren GLU-Gehalt im Medium verlangsamte sich das Zellwachstum von verschiedenen Tumorzelllinien. Dadurch könnten Enzyme, die an der Zellproliferation beteiligt sind (z.B. die AP), nachhaltig in ihrer Aktivität verändert werden.

Um den Einfluss von GLU auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen zu bestimmen wurden GLU-frei kultivierte Zellen mit E2 inkubiert. Ein Teil der GLU-freien Zellen wurde in den letzten 7 Tagen vor Versuchsbeginn in GLU-haltigem Medium kultiviert. Die AP-Aktivitäten sind in Abb. 33 dargestellt. In beiden Ansätzen wurden die Zellen in GLU-haltigem Medium ausgestreut und inkubiert.

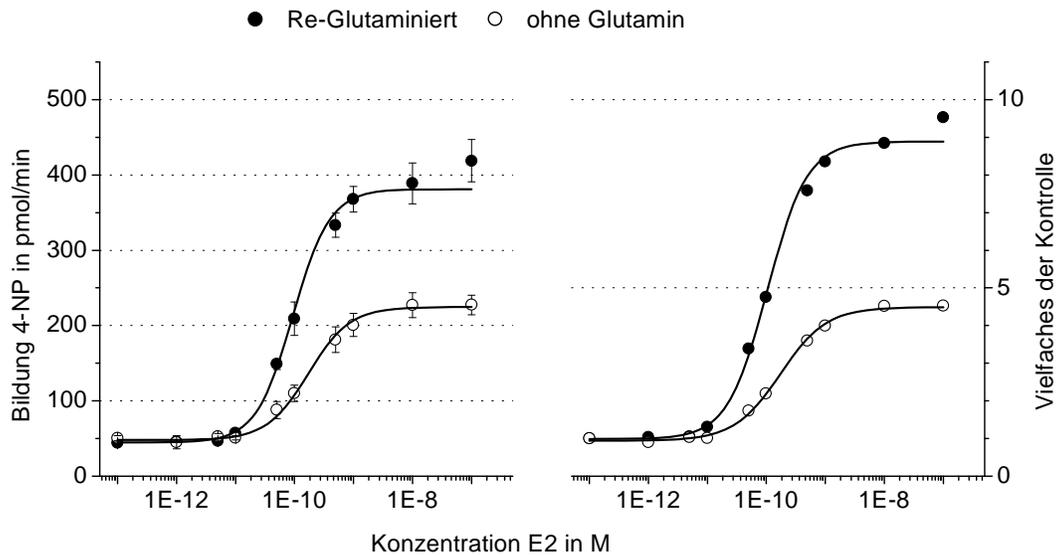


Abb. 33: Einfluss von GLU auf die E2-induzierte AP-Aktivität in Ishikawa Zellen, die ohne Glutamin kultiviert (ohne Glutamin) bzw. 1 Woche vor Versuchsbeginn re-glutaminiert wurden. Inkubiert wurde von 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) E2. Die Grundaktivität, nach Inkubation mit 0,1 % DMSO, ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Die AP-Aktivität und Induzierbarkeit bei glutaminfrei kultivierten und inkubierten Ishikawa Zellen beträgt etwa 50 % der Aktivität von Zellen, die eine Woche vor Versuchsbeginn mit glutaminhaltigem Medium re-glutaminiert wurden (Abb. 33).

In einem weiteren Versuch sollte überprüft werden, ob ein kurzzeitiger GLU-Entzug im Medium zu Veränderungen in der E2-stimulierten AP-Aktivität von Ishikawa Zellen führt. Dazu wurden Zellen, die in glutaminhaltigem Medium kultiviert wurden, mit glutaminfreiem Medium ausgestreut und mit E2 inkubiert. Als Kontrollen wurden Zellen, die mit und ohne GLU kultiviert, ausgestreut und inkubiert wurden, mitgeführt. In Abb. 34 ist die AP-Aktivität nach 48 h Inkubation mit E2 dargestellt.

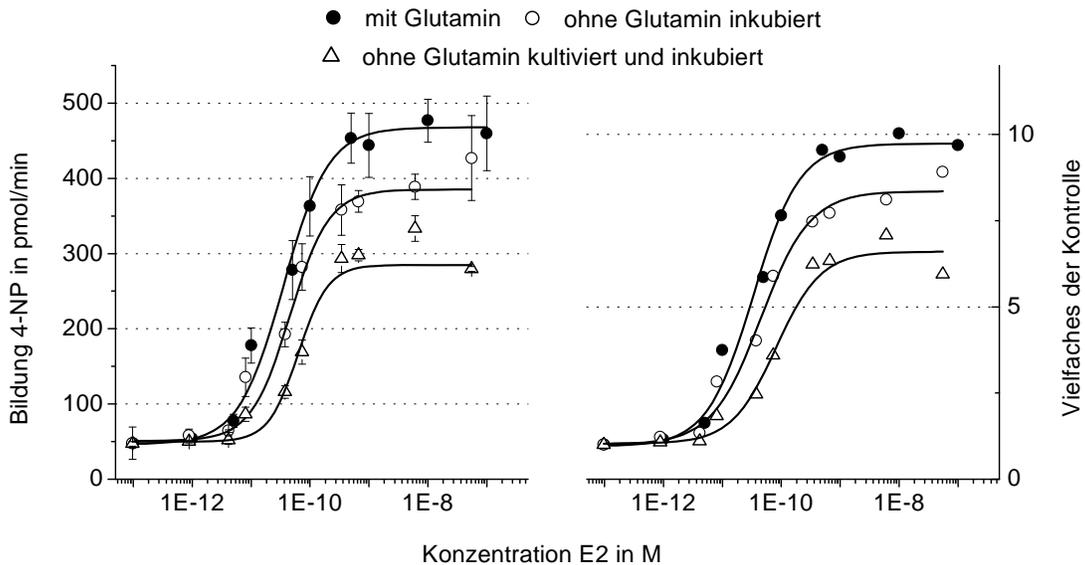


Abb. 34: Einfluss von kurzzeitigem GLU-Entzug auf die E2-stimulierte AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Links dargestellt als Bildung 4-NP in pmol/min pro Kavität, rechts als Vielfaches der Kontrolle. Mit einem Kreis sind die Aktivitäten von Zellen, die mit glutaminhaltigem Medium kultiviert und ausgestreut wurden, dargestellt. Ausgefüllter Kreis, 48 h Inkubation mit E2 in glutaminhaltigem Medium; offener Kreis, in glutaminfreiem Medium. Offenes Dreieck, Zellen wurden in glutaminfreiem Medium kultiviert und inkubiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Die E2-induzierte AP-Aktivität ist nach 48 h Inkubation mit 1 nM E2 in GLU-freiem Medium deutlich geringer als nach Inkubation in GLU-haltigem Medium (Abb. 34). Damit sinkt auch die Induzierbarkeit der AP nach 48 h Inkubation mit E2 auf etwa 5, was eine Abnahme um 50 % verglichen mit dem Normalwert (≈ 10) bedeutet. Nach 72 h Inkubation mit 1 nM E2 sind die AP-Aktivitäten größer als nach 48 h und die Induzierbarkeit erreicht ≈ 10 . Ein kurzzeitiger GLU-Entzug genügt demnach, um die AP-Aktivität bzw. deren Induzierbarkeit zu reduzieren.

Die EC_{50} -Werte der beiden Kontrollen unterscheidet sich allerdings nicht wesentlich voneinander (EC_{50} mit GLU, 35 pM; EC_{50} ohne GLU, 86 pM)

Die geringere E2-induzierte AP-Aktivität GLU-frei inkubierter Zellen könnte seine Ursache im veränderten Wachstumverhalten haben. Zur Überprüfung wurden 10 bis 30 000 GLU-frei kultivierte Zellen mit DMSO bzw. 1 nM E2 in GLU-freiem Medium inkubiert. Nach 48 h und 72 h Inkubation wurde die Zellzahl und die AP Aktivität bestimmt. Die Daten wurden mit den Ergebnissen aus Kapitel 3.1.6 verglichen. Die Abhängigkeit der AP-Aktivität von der Zellzahl bei Inkubation in GLU-freiem Medium ist in Abb. 35 dargestellt.

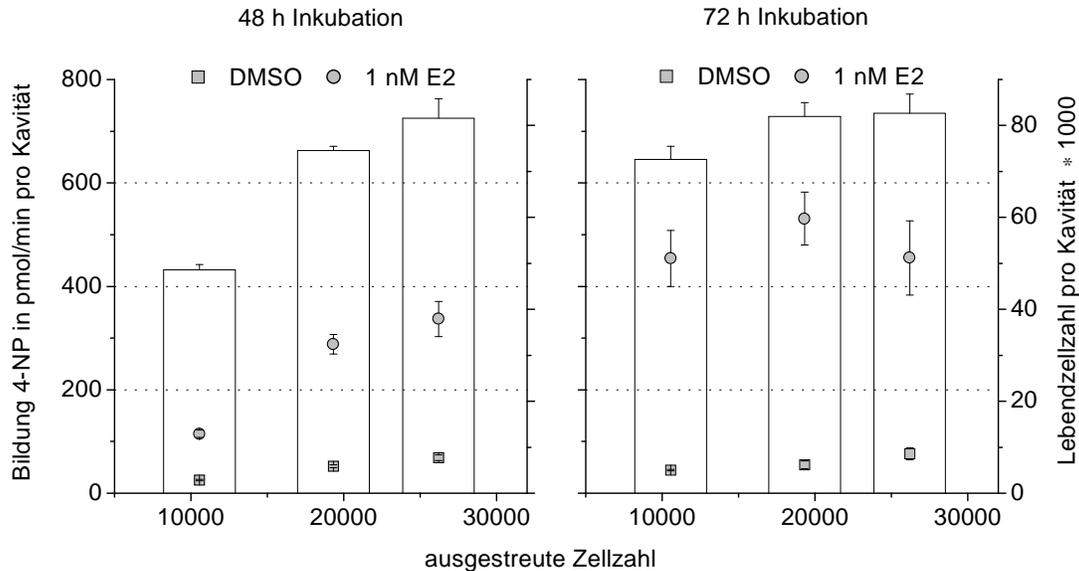


Abb. 35: AP-Aktivität und Verlauf der Zellzahl in glutaminfrei kultivierten Ishikawa Zellen nach Inkubation mit 0,1 % DMSO und 1 nM E2. Die Zellzahlen nach 48 h (links) und 72 h Inkubation (rechts) sind als Säulen dargestellt, die AP-Aktivitäten als Punkte über den Säulen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus einem Versuch.

Die Entwicklung der Zellzahl in Mikrotiterplatten unterscheidet sich nicht zwischen GLU-frei kultivierten Zellen und Zellen, die in GLU-haltigem Medium kultiviert wurden. Bei $\geq 20\,000$ ausgestreuten Zellen wird nach 48 h Inkubation mit E2 oder DMSO die maximale Zellzahl erreicht. Die Grundaktivität der Ishikawa Zellen ist nach 48 h oder 72 h Inkubation gegenüber Zellen, die in GLU-haltigem Medium kultiviert und inkubiert wurden, nicht verändert, dagegen ist die E2-stimulierte AP-Aktivität reduziert. In Tabelle 9 sind die Ergebnisse zusammengefasst.

Tabelle 9: Einfluss von GLU auf die Entwicklung der Zellzahl und AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Die Zellzahl ist als Lebendzellzahl pro Kavität angegeben, die AP-Aktivitäten als Bildung 4-NP in pmol/min pro Kavität und als Vielfaches der Kontrolle

	GLU-frei	mit GLU
maximale Zellzahl	60 000–80 000	60 000–80 000
Grundaktivität	40–60	40–60
	abhängig von der Zellzahl	
E2-stimulierte AP-Aktivität bei $\geq 20\,000$ ausgestreuten Zellen	200–300	400–800
Induzierbarkeit der AP nach 48 h Inkubation	4–6	7–15
	unabhängig von der Zellzahl	
Induzierbarkeit der AP nach 72 h Inkubation	7–10	15–20

Fetales Kälberserum

Fetales Kälberserum (FKS) wird dem Kulturmedium für Ishikawa Zellen zu 10 % zugesetzt, um ein optimales Wachstum der Zellen zu gewährleisten. Neben Proteinen enthält das FKS auch endogene Steroide, die Estrogen-wirksam sein können. Damit diese im Estrogenitätstest keine unerwünschte Stimulation der AP hervorrufen, wird das käufliche FKS mit Aktivkohle und Dextran steroidfrei gemacht (Kapitel 5.4). Das CDFKS) (Charcoal-Dextran FKS) wird zu 5 % dem Medium zugesetzt, mit dem der Versuch ausgestreut und inkubiert wird.

Littlefield et al. (1990) empfehlen die Ishikawa Zellen 24 h vor dem Ausstreuen mit steroidfreiem Medium zu inkubieren. In eigenen Versuchen, bei denen die Zellen 24 h vor dem Ausstreuen mit steroidfreiem Medium inkubiert wurden, konnte kein Unterschied zu nicht-vorinkubierten Zellen in den Punkten Entwicklung der Zellzahl, AP-Aktivität und Induzierbarkeit der AP festgestellt werden (Vergleich Abb. 57 mit Abb. 59 im Anhang). Die Wartezeit zwischen Ausstreuen und Inkubieren der Zellen genügt demnach, um eine eventuell vorhandene estrogene Aktivität des FKS "auszuwaschen". Eine Vorbehandlung der Zellen mit steroidfreiem Medium wird deshalb nicht als notwendig erachtet.

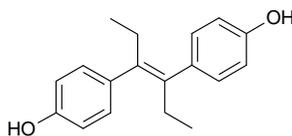
3.2 Anwendung des Estrogenitätstests

Nachdem der Estrogenitätstest in Ishikawa Zellen mit E2 etabliert und die Versuchsbedingungen optimiert wurden, sollte er auf verschiedene Substanzen angewendet werden. Zunächst wurden mit Diethylstilbestrol (DES) und Tamoxifen (TAM) zwei Positivkontrollen ausgewählt. Ihre Wirkung auf den ER ist in der Literatur ausführlich beschrieben (Kap. 1.3.1 und 1.3.2). Danach wird der Estrogenitätstest auf Resorcylnsäure-Lactone, Isoflavone, Bisphenole und Curcumine angewendet. Neben den EC_{50} -Werten, wird auch das Verhältnis zwischen maximaler E2-stimulierter und maximaler Substanz-induzierter AP-Aktivität bei der Bewertung einer Substanz berücksichtigt. Bezugswert ist die mitgeführte E2-Kontrolle auf jeder Platte (Kapitel 5.7.1). Daher kann das berechnete Verhältnis der beiden AP-Aktivitäten von den dargestellten Kurven abweichen.

3.2.1 Positivkontrollen: Diethylstilbestrol und Tamoxifen

Diethylstilbestrol (DES)

DES (Abb. 36) ist ein synthetisches Estrogen, dessen Bindungsaffinität zum ER mit E2 vergleichbar ist (Fang et al., 2001).



Diethylstilbestrol (DES)

Abb. 36: Strukturformel von DES.

DES und wirkt in Estrogen-Assays (z.B. E-SCREEN) als starker ER-Agonist (Soto et al., 1995). Die starke estrogene Wirkung von DES wird auf die Strukturähnlichkeit mit E2 zurückgeführt. Der Abstand der beiden OH-Gruppen (d_{O-O}), ein wichtiger Parameter für die Rezeptorbindung und estrogene Wirkung, unterscheiden sich bei DES und E2 ($d_{O-O}E2 = 11,0 \text{ \AA}$, $d_{O-O}DES = 12,1 \text{ \AA}$) nur geringfügig (Fang et al., 2001). In Ishikawa Zellen induziert DES konzentrationsabhängig die AP-Aktivität (Abb. 37).

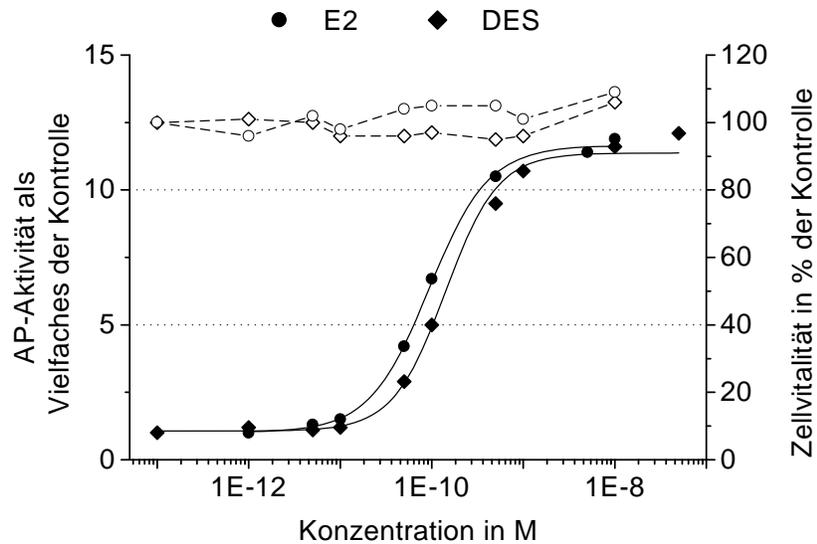


Abb. 37: AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit DES und E2. Die Enzymaktivität ist als Vielfaches der Kontrolle berechnet (linke Achse), die Zellvitalität stammt aus dem MTT-Test (rechte Achse, gestrichelte Linie). Beide Substanzen wurden von 1 pM (1E-12) bis 100 nM (1E-7) eingesetzt, dargestellt sind die Daten aus einem Versuch.

Die AP-Aktivitäten nach Inkubation mit gleicher E2- und DES-Konzentration unterscheiden sich nicht. Die EC_{50} -Werte von DES und E2 und die daraus berechnete relative stimulatorische Aktivität (RSA) aus dieser Versuchsreihe sind in Tabelle 10 gegenübergestellt.

Tabelle 10: EC_{50} -Werte und RSA von E2 und DES. SD, Standardabweichung aus n unabhängigen Versuchen

	E2	DES
EC_{50}	105 pM	222 pM
SD	46 pM	133 pM
RSA (%)	100	47
n	10	7

Die RSA von DES bezogen auf E2 beträgt etwa 50 %. In den Einzelversuchen variiert die RSA von DES zwischen 40 und 70 %. Die estrogenische Wirkstärke von DES ist demnach mit der von E2 vergleichbar. In diesem neu etablierten Test besitzt DES die estrogenische Wirkung, die aufgrund der Strukturähnlichkeit mit E2 zu erwarten ist und die auch in anderen *in vitro*-Testsystemen beschrieben ist (Littlefield et al., 1990; Soto et al., 1995)

Tamoxifen (TAM)

TAM (Abb. 6) und einer seiner oxidativen Metabolite, 4-Hydroxy-Tamoxifen (HO-TAM), sind bekannte SERM, d.h. ER-Antagonisten, die selber eine geringe, gewebespezifische Estrogenität besitzen, aber die ER-vermittelte biologische Wirkung von E2 verhindern. TAM und HO-TAM sollen als Antiestrogene eingesetzt werden, die bei Koinkubation mit E2 die E2-stimulierte AP-Aktivität reduzieren.

Inkubation mit 1 pM bis 10 μ M TAM oder HO-TAM steigert die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nicht, die konstitutive AP-Aktivität bleibt jedoch erhalten (Abb. 38).

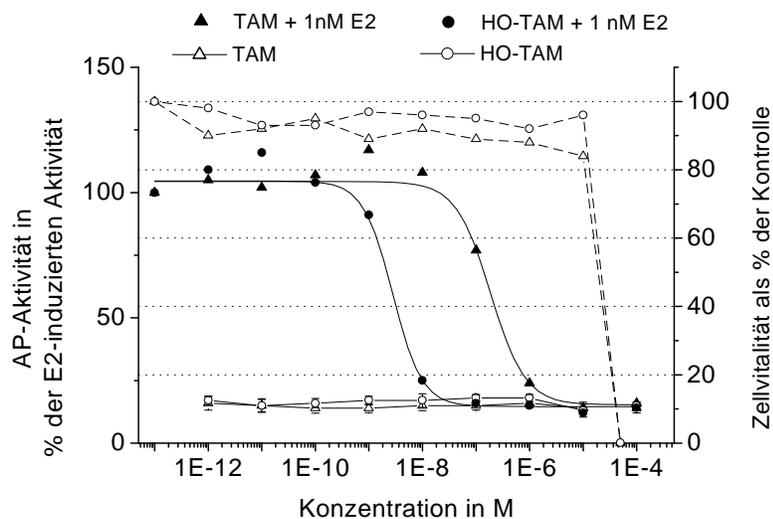


Abb. 38: Einfluss von TAM und HO-TAM auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit und ohne Koinkubation mit 1 nM E2. Die AP-Aktivität ist als Anteil der mit 1 nM E2 induzierten AP-Aktivität berechnet (linke Achse), die Zellvitalität stammt aus dem MTT-Test (gestrichelte Linie, rechte Achse). Eingesetzt wurden 1 pM ($1E-12$) bis 50μ M ($5E-5$) TAM und HO-TAM. Die Aktivität der E2-Kontrolle ist bei $1E-13$ eingezeichnet, die LM-Kontrolle (0,2 % DMSO) bei $1E-4$, dargestellt ist jeweils ein Versuch.

Für beide Substanzen konnten in diesem Konzentrationsbereich im MTT-Test keine zytotoxischen Effekte nachgewiesen werden, erst bei 50μ M TAM oder HO-TAM erwiesen sich beide Substanzen als zytotoxisch.

Nach Koinkubation mit 1 nM E2 hemmt HO-TAM die E2-induzierte AP-Aktivität bei geringeren Konzentrationen als TAM. Die EC_{50} -Werte für TAM und HO-TAM unterscheiden sich um zwei Größenordnungen, der EC_{50} -Wert beträgt für HO-TAM 2,45 nM, für TAM 200 nM.

Übereinstimmend mit den EC_{50} -Wert unterscheiden sich auch die Affinitäten von TAM und HO-TAM zum ER um zwei Größenordnungen.

Die Hemmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach Koinkubation mit 1 nM E2 kann als antiestrogene Wirkung einer Substanz interpretiert werden, wenn keine direkte Interaktion mit dem Enzym vorliegt. Zur Bewertung des antiestrogenen Potentials der in den folgenden Kapiteln untersuchten EAS wird das relative antiestrogene Potential (RAP) bezogen auf HO-TAM berechnet. Dazu werden die EC_{50} -Werte nach Koinkubation der Substanz mit 1 nM E2 mit dem EC_{50} -Werte von HO-TAM analog der Berechnung des RSA (s. Kapitel 5.7) zueinander ins Verhältnis gesetzt.

3.2.2 Resorcylsäure-Lactone

Zu den Resorcylsäure-Lactonen (RAL, Abb. 39) gehören neben dem bereits in Kapitel 1.3.3 vorgestellten Zearalenon (ZEN) auch das Masthilfsmittel Zeranol (α -ZAL) und sein Isomeres Taleranol (β -ZAL).

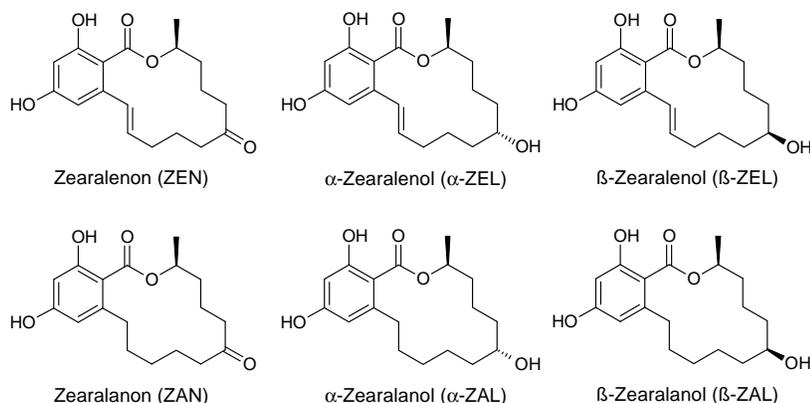


Abb. 39: Strukturformel von verschiedenen RAL.

In den USA und Kanada darf α -ZAL in der Tiermast zur Wachstumsförderung verwendet werden. Die EU verbietet die Behandlung von Masttieren mit Wachstumshormonen und die Einführung von hormonbehandeltem Fleisch. In Masttieren und im Mensch kann ZEN durch Reduktasen und die 3α -Hydroxysteroid-Dehydrogenase zu Zearalanon (ZAN), Zearalenol (α - und β -ZEL) und Zearalanol (α - und β -ZAL) metabolisiert werden (Abb. 39). Alle genannten RAL induzieren konzentrationsabhängig die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen (s. Abb. 40).

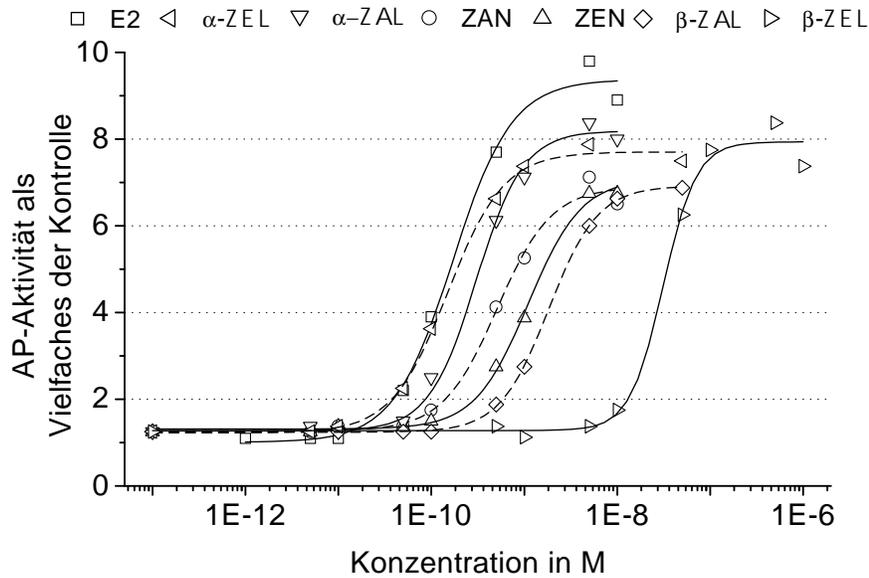


Abb. 40: AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit verschiedenen RAL und E2. Inkubiert wurde mit Konzentrationen von 1 pM (1E-12) bis 1 μ M (1E-7), dargestellt sind die Daten aus je einem Versuch.

Die maximale AP-Aktivität kann je nach Versuch unbedeutende 10–20 % geringer sein, als die maximale E2-induzierte Aktivität. Das stärkste Estrogen unter den getesteten RAL ist α -ZEL, das schwächste ist β -ZEL. Die EC_{50} -Werte von E2 und den untersuchten RAL und die daraus berechneten RSA sind in Tabelle 11 gegenübergestellt.

Die Zytotoxizität der RAL wurde im MTT-Test getestet. Eingesetzt wurden die höchsten Konzentrationen aus dem Estrogenitätstest (10 nM, bei β -ZEL 1 μ M), gefunden wurden keine zytotoxischen Effekte bei allen getesteten RAL.

Tabelle 11: EC_{50} -Werte und RSA von E2 und verschiedenen RAL in Ishikawa Zellen. SD, Standardabweichung aus n unabhängigen Versuchen

	E2	α -ZEL	α -ZAL	ZAN	ZEN	β -ZAL	β -ZEL
EC_{50}	105 pM	99 pM	250 pM	418 pM	1,5 nM	2,0 nM	26 nM
SD	46 pM	40 pM	110 pM	100 pM	0,5 nM	1,1 nM	11 nM
RSA (%)	100	106	42	25	7	5	0,41
n	10	10	7	6	4	5	5

Die Reihenfolge in der Tabelle gibt die Rangfolge der Wirkstärke der RAL in Ishikawa Zellen wieder:

$$E2 \approx \alpha\text{-ZEL} > \alpha\text{-ZAL} \geq ZAN > ZEN \approx \beta\text{-ZAL} > \beta\text{-ZEL}.$$

ZEN und seine Metabolite α -ZEL, α -ZAL und ZAN sind in diesem Testsystem als starke Estrogene einzustufen, deren Wirksamkeit mit der von E2 vergleichbar ist. α -ZEL zeigte dabei die stärkste estrogene Wirksamkeit, die sich nicht von der von E2 unterscheidet. Die Aktivität des natürlich vorkommenden ZEN ist eine Größenordnung geringer als die von E2 und die Metabolite mit β -ständiger OH-Gruppe erwiesen sich als die schwächsten Estrogene. Leffers et al. (2001) untersuchten die Estrogenität von RAL in menschlichen Brustkrebszellen (MCF-7). Als Endpunkt wurde der Einfluss auf die Expression verschiedener estrogen-abhängiger Gene gewählt, und es wurde dieselbe Rangfolge und Wirksamkeit wie in den Ishikawa Zellen gefunden. Auch von Fang et al. (2001) ermittelten Bindungsaffinitäten der RAL an den ER α aus dem Uterus der Ratte stimmen gut mit deren Estrogenität in Ishikawa Zellen überein.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass ZEN und seine Metabolite auch in Ishikawa Zellen eine starke estrogene Wirkung besitzen, die schon in pM Konzentrationen die AP stimulieren können. Der Metabolismus von ZEN führt dabei keineswegs zu einer Inaktivierung der Substanz, da α -ZEL und α -ZAL eine Größenordnung stärker estrogen wirken als die Muttersubstanz.

3.2.3 Isoflavone

Biochanin A (BCA) und Prunetin (PRU) sind nur in geringen Mengen in der menschlichen Nahrung nachweisbar, da sie vorwiegend in Pflanzen vorkommen, die nicht der menschlichen Ernährung dienen (z.B. roter Klee). Neben Genistein (GEN) und Daidzein (DAI) werden aber BCA und PRU (Abb. 41) als Roter-Klee Extrakten in Präparaten zur Selbstmedikation gegen Menopausebeschwerden vermehrt auf den Markt gebracht.

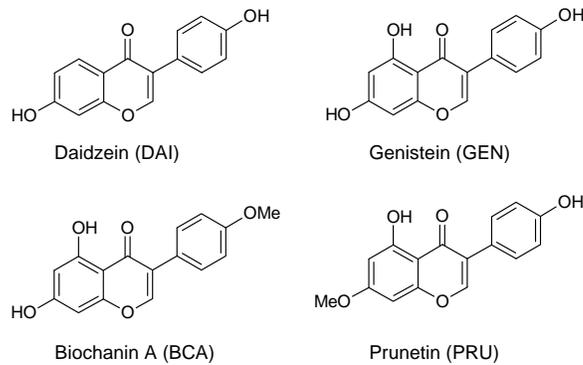


Abb. 41: Strukturformel verschiedener Isoflavone

Die Bindungsaffinität von BCA und PRU (Fang et al., 2001) entspricht etwa der von DAI, die wiederum eine Größenordnung geringer ist als die von GEN (Kapitel 1.3.4).

Der Einfluss von DAI, GEN, BCA und PRU auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen ist in Abb. 42 zusammengefasst.

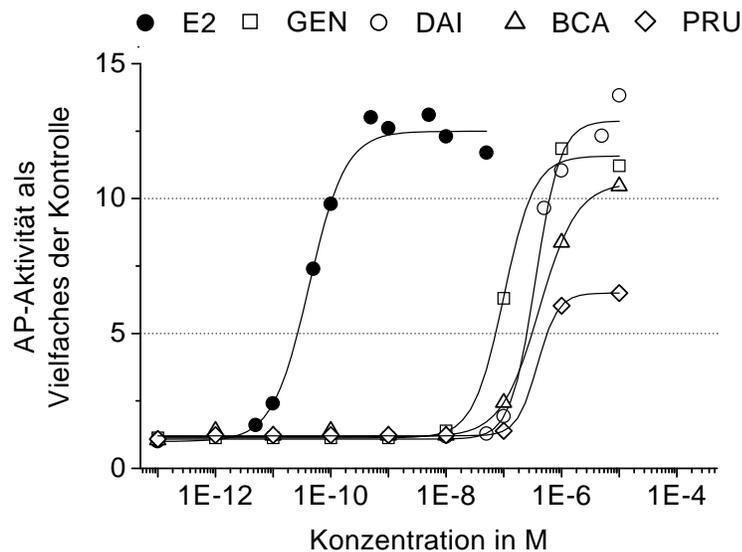


Abb. 42: AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Isoflavonen und E2. Die Enzymaktivität wurde als Vielfaches der Kontrolle berechnet und bezieht sich auf die linke Achse. Inkubiert wurde mit Konzentrationen von 1 pM (1E-12) bis 100 μ M (1E-4), die LM-Kontrolle ist bei 1E-13 aufgetragen, dargestellt sind die Daten aus einem Versuch.

Von den vier getesteten Isoflavonen wirkt GEN am stärksten estrogen in Ishikawa Zellen. Verglichen mit E2 ist die Aktivität von GEN drei bis vier Größenordnungen geringer. Eine Größenordnung kleiner sind die EC_{50} -Werte von BCA, DAI und PRU, die sich nur wenig voneinander unterscheiden. Nach Inkubation mit PRU erreicht die maximale AP-Aktivität nur ca. 50 % der maximalen E2-stimulierten AP-Aktivität, deshalb wird PRU schwächer estrogen wirksam als BCA und DAI eingestuft. Zytotoxische Effekte der getesteten Isoflavone wurden im SRB-Test erst bei Konzentrationen über 10 μ M festgestellt. Die EC_{50} -Werte für GEN und DAI (Tabelle 12) stimmen sehr gut mit den Ergebnissen von Markiewicz et al. (1993) im selben Testsystem überein.

Tabelle 12: EC_{50} -Werte und RSA von E2 und verschiedenen Isoflavonen in Ishikawa Zellen. Anzahl der Versuche = 2, deshalb wurde keine SD berechnet.

	E2	GEN	BCA	DAI	PRU
EC_{50}	40 pM	72,3 nM	407 nM	656 nM	379 nM
RSA (%)	100	0,06	0,01	0,006	0,01

Nach Koinkubation mit 1 nM E2 hemmt keines der vier getesteten Isoflavone bis 100 μ M die AP. Ab 10 μ M sind zytotoxische Effekte im SRB-Test messbar, die E2-stimulierte AP-Aktivität war bis zu dieser Isoflavon-Konzentration nicht beeinträchtigt (Ergebnisse sind nicht grafisch dargestellt).

3.2.4 Bisphenole

Bisphenole (Abb. 43) werden in der Kunststoffindustrie als Monomere für die Herstellung von Polycarbonaten und Epoxidharzen und als Antioxidantien für Kunststoffe und hydraulische Flüssigkeiten eingesetzt. Bisphenol B (BPB) und Bisphenol F (BPF) werden verwendet, um die physikalischen Eigenschaften der Polycarbonate bzw. Epoxidharze zu variieren. Dimethyl-BPA (DMBPA), auch Bisphenol C genannt, und seine Derivate werden zugesetzt um feuerfeste Polycarbonate und Epoxidharze zu erhalten, die dann in Flugzeugbau eingesetzt werden sollen (Rusanov, 1994).

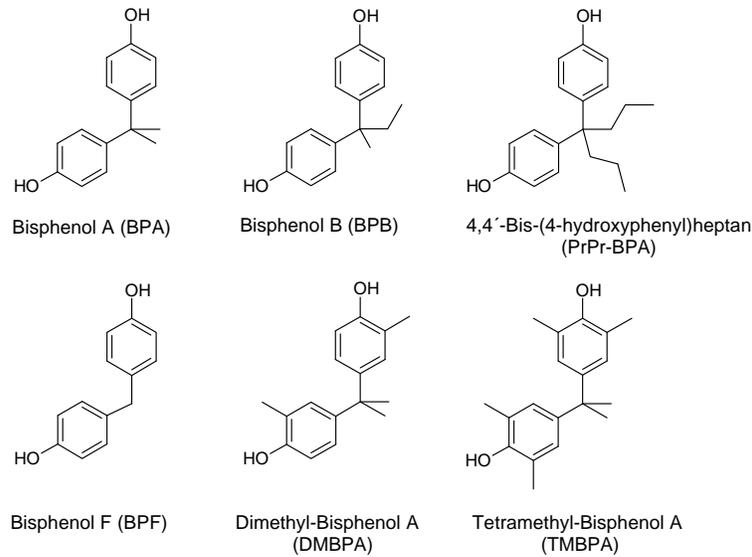


Abb. 43: Strukturformel verschiedener Bisphenole.

Der Einfluss von BPA, BPB, DMBPA, TMBPA, PrPrBPA und BPF auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen im Vergleich mit E2 ist in Abb. 44 dargestellt. Die Zellvitalität wurde aus der Formazan-Bildung im MTT-Test berechnet.

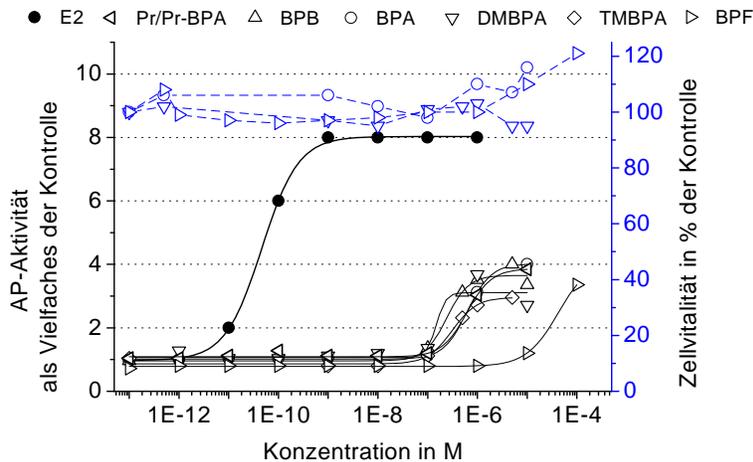


Abb. 44: AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach 48 h Inkubation mit verschiedenen Bisphenolen und E2. Die Enzymaktivität wurde als Vielfaches der Kontrolle berechnet und bezieht sich auf die linke Achse, die Zellvitalität aus dem MTT-Test (gestrichelte Linie) von 3 ausgewählten Beispielen bezieht sich auf die rechte Achse. Inkubiert wurde mit Konzentrationen von 1 pM (1E-12) bis 100 μ M (1E-4), die LM-Kontrolle ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Daten aus einem Versuch.

Die untersuchten Bisphenole induzieren konzentrationsabhängig die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen. Eine Steigerung der AP-Aktivität wird unabhängig vom Bisphenol erst ab 100 nM ($1E-7$) beobachtet, bei BPF ab 10 μ M beobachtet. Die maximale Enzymaktivität wird je nach Bisphenol zwischen 1 μ M und 5 μ M erreicht, bei BPF erst bei 100 μ M. Allerdings erreichen die AP-Aktivitäten nach Inkubation mit den Bisphenolen nur ca. 50 % der mitgeführten E2-Kontrolle (1 nM). Die EC_{50} -Werte der untersuchten Bisphenole und E2 sind in Tabelle 13 zusammengefasst.

Tabelle 13: EC_{50} -Werte und relative stimulatorische Aktivität (RSA) von verschiedenen Bisphenolen. SD, Standardabweichung der EC_{50} -Werte aus n unabhängigen Versuchen.

	E2	BPB	DMBPA	PrPrBPA	TMBPA	BPA	BPF
EC_{50}	58 pM	328 nM	360 nM	475 nM	537 nM	1042 nM	< 10 μ M
SD	5 pM	141 nM	141 nM	148 nM	492 nM	541 nM	
RSA (%)	100	0,018	0,016	0,012	0,011	0,006	< 0,0006
n	6	4	4	2	3	4	1

Im MTT-Test konnte keine Zytotoxizität der Bisphenole bis 10 μ M, BPF sogar bis 100 μ M festgestellt werden, so dass die reduzierte AP-Aktivität wahrscheinlich nicht auf zytotoxischen Effekten beruht. Jedoch zeigten BPA und BPB bei 50 μ M eine starke Erhöhung der MTT-Formazan Bildung (Abb. 45), die eine Steigerung der Zellvitalität um etwa 50 % bedeuten würde. Die lichtmikroskopische Betrachtung der mit 50 μ M BPA und BPB inkubierten Zellen wies allerdings eine geringere Zelldichte auf als die Kontrollpopulation, weshalb die Steigerung der Zellvitalität als falsch-positives Ergebnis interpretiert wurde. Als zusätzliche Zytotoxizitätstests wurden deshalb der SRB-Test durchgeführt (Kapitel 5.6.2) und die Lebendzellzahl (Kapitel 5.5) bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 45 zusätzlich zum MTT-Test dargestellt.

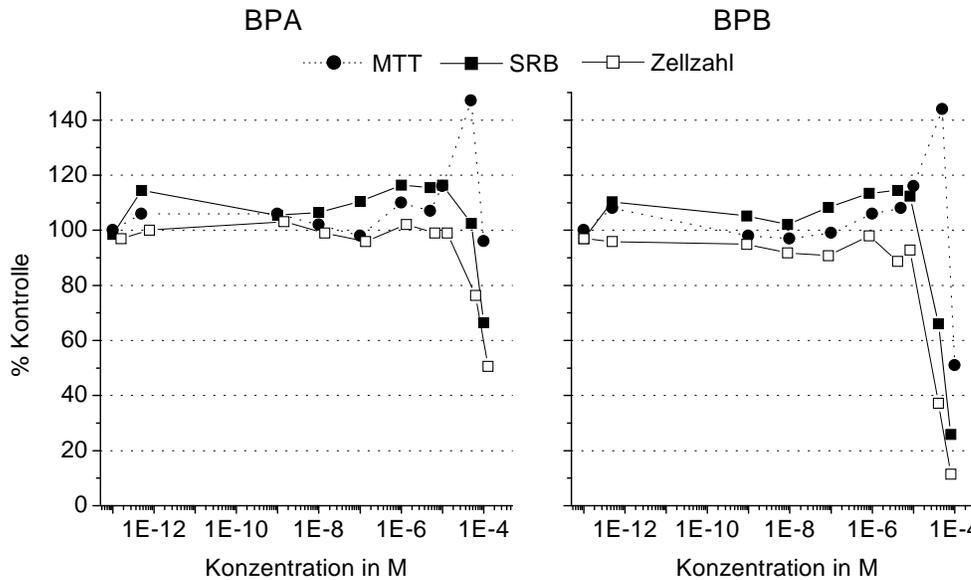


Abb. 45: Zytotoxizität von BPA und BPB in Ishikawa Zellen. Vergleich von MTT-Test, SRB-Test und Lebendzellzahl. Inkubiert wurde mit Konzentrationen von 1 nM (1E-9) bis 100 μ M (1E-4), die LM-Kontrolle ist bei 1E-13 aufgetragen. Dargestellt sind die Ergebnissen aus einem Versuch.

Die verstärkte Formazan-Bildung im MTT-Test nach 48 h Inkubation mit 50 μ M BPA oder BPB steht nicht im Zusammenhang mit einer Erhöhung der Lebendzellzahl. Eine Erhöhung des Proteingehaltes relativ zur Kontrolle konnte mittels SRB-Test ebenfalls nicht festgestellt werden.

Theoretisch sollte die Bildung von MTT-Formazan proportional zur Lebendzellzahl einer Zellpopulation sein, jedoch berichteten schon mehrere Arbeitsgruppen, dass dies nicht immer der Fall ist (zusammengefasst in Holian und Walter (2001)). Dabei zeigte sich, dass die Reduktion von MTT zum Formazan vom Zelltyp, pH-Wert des Kulturmediums, Alter der Zellpopulation, Zellzyklus, NADH und NADPH-Spiegel der Zelle abhängig ist. Substanzkonzentrationen, die einen Zellzyklusarrest bewirken, können das Ergebnis des MTT-Tests genauso beeinträchtigen wie reduzierende oder Redox-Cycling auslösende Verbindungen. Bei solchen Effekten wird eine erhöhte Reduktion von MTT beobachtet, was mit einer größeren Zellzahl assoziiert wird. Es-Saady et al. (1996) zeigten durch einen Zellzyklusarrest von MCF-7 Zellen in der G2/M-Phase, dass sich das Zellvolumen vergrößerte und die damit verbundene Steigerung der Mitochondrienzahl zu einer vermehrten MTT-Reduktion führte.

Die Ursache für die erhöhte MTT Reduktion durch 50 μM BPA und BPB ist ungeklärt. Eigene vorläufige durchflusszytometrische Messungen ergaben, dass 50 μM BPB nach 48 h Inkubation in Ishikawa Zellen einen starken G2/M-Block verursachen. Die erhöhte MTT-Formazan Bildung könnte demnach durch einen Zellzyklusarrest ausgelöst werden.

Nach Koinkubation mit 1 nM E2 reduzieren BPA, BPB, DMBPA und TMBPA konzentrationsabhängig die AP-Aktivität (Abb. 46).

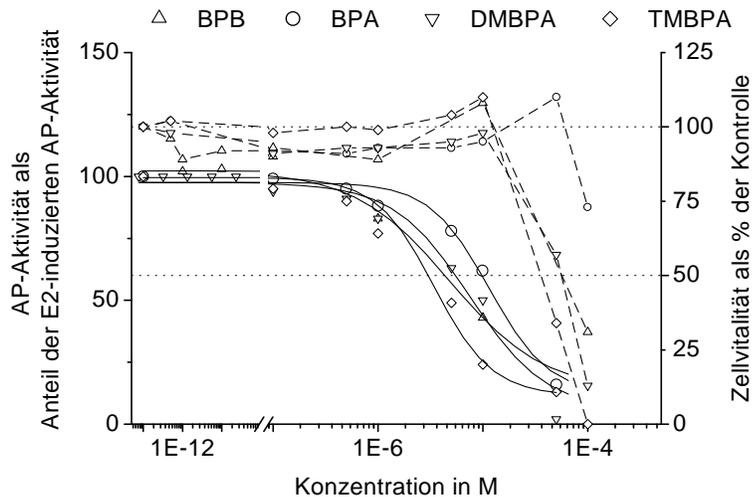


Abb. 46: Einfluß verschiedener Bisphenole auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach Koinkubation mit 1 nM E2 für 48 h. Die Enzymaktivität ist als Anteil der E2-induzierten AP-Aktivität berechnet und bezieht sich auf die linke Achse, die Zellvitalität aus dem MTT-Test (gestrichelte Linie) bezieht sich auf die rechte Achse. Inkubiert wurde von 1 pM (1E-12) bis 100 μM (1E-4), die X-Achse ist zwischen 1E-10 und 1E-7 unterbrochen. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch.

Die hemmende Wirkung der vier getesteten Bisphenole auf die AP nach Koinkubation mit E2 wird zwischen 2 und 20 μM beobachtet, dabei ist BPA am schwächsten wirksam und TMBPA am stärksten. Bezogen auf HO-TAM sind die Bisphenole jedoch um vier bis fünf Größenordnungen schwächer wirksam. In Tabelle 14 sind die EC_{50} -Werte der hemmenden Wirkung zusammengefasst und das relative antiestrogene Potential (RAP) bezogen auf HO-TAM berechnet.

Tabelle 14: EC₅₀-Werte und RAP von HO-TAM und verschiedenen Bisphenolen.

	HO-TAM	TMBPA	BPB	DMBPA	BPA
EC ₅₀	2 nM	2 µM	8 µM	10 µM	20 µM
RAP (%)	100	0,1	0,025	0,02	0,01
n	1	2	2	2	2

Die EC₅₀-Werte der AP-Hemmung liegen um eine Größenordnung über den EC₅₀-Werten aus der Estrogenitätsstudie (Tabelle 13). Dieses Ergebnis ist nicht einfach zu erklären, zumal noch in Betracht gezogen werden muss, dass Bisphenole bei alleiniger Inkubation nur etwa 50 % der maximalen, E2-stimulierten AP-Aktivität in Ishikawa Zellen induzieren.

Die hemmende Wirkung der Bisphenole auf die AP nach Koinkubation mit E2 könnte auf einer Konkurrenz um den ER beruhen. Da die EC₅₀-Werte der Bisphenole nach Koinkubation mit 1 nM E2 sehr groß sind, könnte die Antiestrogenität auch auf zytotoxischen Effekten beruhen. Jedoch konnte im MTT-Test keine Reduktion der Formazan-Bildung durch BPB, DMBPA und TMBPA bis 10 µM, bei BPA sogar bis 50 µM nachgewiesen werden (Abb. 46).

Untersuchungen im eigenen Arbeitskreis (Pfeiffer, persönliche Mitteilung) zeigten, dass BPA membrangebundene Enzyme hemmen kann. Die reduzierte AP-Aktivität könnte daher auf einer direkten Inhibierung der stimulierten AP beruhen. Zur Überprüfung wurden 0,0015 Einheiten käufliche, rekombinant hergestellte AP der menschlichen Plazenta mit 0,1, 1 und 10 µM BPA, BPB, DMBPA bzw. TMBPA bei 37 °C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde 4-NPP als Substrat zugegeben und die Enzymaktivität bestimmt. Keines der vier untersuchten Bisphenole zeigte einen Einfluß auf die isolierte AP (Ergebnisse nicht dargestellt). Daher wird ausgeschlossen, dass die hemmende Wirkung der Bisphenole auf die AP auf einer direkten Interaktion mit der AP beruht.

Arbeiten von Misumi et al. (1986) und Misumi et al. (1986) zeigten, dass die AP-Aktivität in isolierten Hepatozyten aus der Ratte auch dadurch gehemmt werden kann, dass nach der Biosynthese der Transport vom Zytosol zur Zellmembran gestört wird. Nach Inkubation mit Colchizin, das die Polymerisation von Mikrotubuli inhibiert, wodurch ein wichtiges Transportsystem in der Zelle zum Erliegen kommt, wurde eine geringere AP-Aktivität in den Hepatozyten gemessen. Untersuchungen in unserem Arbeitskreis zeigten, dass BPA, DMBPA und TMBPA *in vitro* in hohen Konzentrationen adverse Effekte auf das Mikrotubuligerüst einer Zelle haben (Lehmann, 2002). Im zellfreien System störten TMBPA, BPB, DMBPA und BPA die Tubulinpolymerisation (Pfeiffer, persönliche Mitteilung). Wie schon bei der Hemmung der E2-stimulierten AP-Aktivität (Tabelle 14), ist TMBPA stärkster wirksam als BPB, DMBPA und BPA.

Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass Bisphenole durch Störung des Mikrotubuli-vermittelten Transportes der AP zur Zellmembran die AP-Aktivität beeinträchtigen können. Um zu zeigen, dass die Hemmung der AP-Aktivität auf einer Störung der ER-vermittelten Transkription beruht, müsste ausserdem geprüft werden, ob der Spiegel an mRNA der AP nach Koinkubation mit Bisphenolen geringer ist als nach Inkubation mit E2.

3.2.5 Curcuminoide

In verschiedenen asiatischen Ländern wird der Extrakt aus dem Rhizom der Curcumpflanze *Curcuma longa* seit Jahrhunderten in der Volksmedizin eingesetzt. In westlichen Ländern ist Curcuma als natürlicher Lebensmittelfarbstoff vor allem als Bestandteil im Curry-Gewürz bekannt. Seit Forschungen der letzten Jahre den drei Hauptbestandteilen des Curcuma-Extraktes Curcumin (CUR), Mono-demethoxycurcumin (DMC) und Bis-demethoxycurcumin (BDMC) (s. Abb. 47) anti-inflammatorische, antimutagene und antikanzerogene Wirkung im Tier nachweisen konnten (Anto et al., 1996; Ruby et al., 1995), werden in den USA Curcuminoide auch für die Selbstmedikation zum Verkauf angeboten. Die Bestätigung dieser Effekt in einer klinischen Studie steht allerdings noch aus. Hahm et al. (2002) zeigten, dass Curcuminoide *in vitro* die Bildung des DNA-Komplexes von Fos und Jun inhibieren können und führen die antikanzerogene Wirkung darauf zurück.

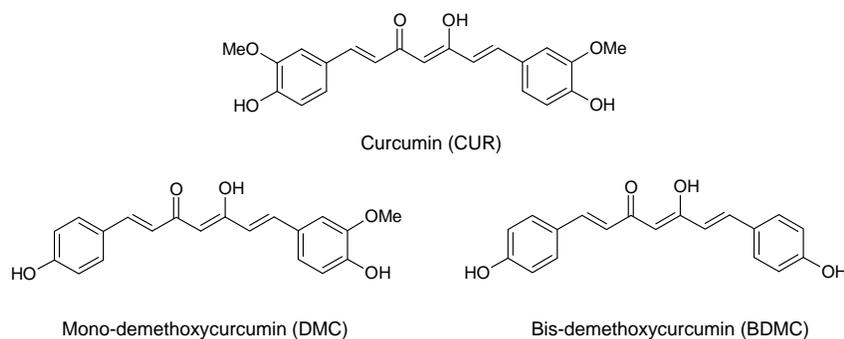


Abb. 47: Strukturformeln der Hauptbestandteile des Curcuma-Extraktes.

Bisher ungeklärt ist, ob Curcuminoide ein estrogenes oder antiestrogenes Potential besitzen. Deshalb wurde die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nach Inkubation mit CUR, DMC und BDMC allein, und nach Koinkubation mit 1 nM E2 bestimmt (s. Abb. 48).

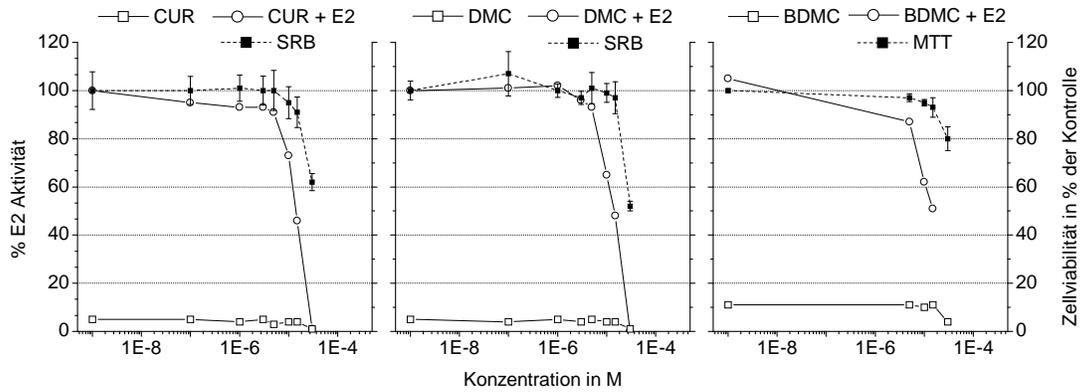


Abb. 48: Einfluß von CUR, DMC und BDMC auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen mit und ohne Koinkubation mit 1 nM E2. Die Enzymaktivität ist als Anteil der E2-induzierten AP-Aktivität berechnet (linke Achse), die Zellvitalität aus dem MTT-Test (gestrichelte Linie) bezieht sich auf die rechte Achse. Eingesetzt wurden 0,1 μM ($1\text{E}-7$) bis 30 μM ($3\text{E}-5$) CUR, DMC und BDMC. Dargestellt sind die Ergebnisse aus einem Versuch.

Die drei Hauptbestandteilen der Curcuma (CUR, DMC und BDMC) stimulieren die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen nicht. Die Hemmung der estrogen-induzierten AP-Aktivität nach Koinkubation mit 1 nM E2 bewegt sich in der Nähe des zytotoxischen Bereichs (30 μM , Abb. 48, gestrichelte Linie). Ab 15 μM CUR, DMC oder BDMC war bei der Zellpopulation eine veränderte Morphologie und Zelldichte zu beobachten. Deshalb kann nicht ausgeschlossen werden, dass die Reduktion der estrogen-stimulierten AP-Aktivität nicht auf Hemmung der Transkriptionsaktivität beruht, sondern auf anderen, z.B. zytotoxischen oder wachstumshemmenden Effekten beruht. Zur Klärung könnte beispielsweise während der Inkubation das Zellwachstum anhand der Lebendzellzahl und Zellzyklusanalyse überprüft werden.

3.2.6 Zusammenfassung der Wirkung verschiedener endokrin aktiver Substanzen auf die AP-Aktivität in Ishikawa Zellen

Die Positivkontrollen DES für estrogene Wirkung und TAM für antiestrogene Wirkung konnten etabliert werden. Aus der Gruppe der endokrin aktiven Substanzen (EAS) wurden Myko-, Phyto- und Umweltestrogene auf ihre Fähigkeit getestet, die AP in Ishikawa Zellen zu induzieren.

DES zeigte erwartungsgemäß die selbe Wirkstärke wie E2. ZEN und seine Metabolite erwiesen sich als starke Estrogene in den Ishikawa Zellen. Die Metabolite mit α -ständiger Hydroxygruppe induzierten die AP stärker als ZEN oder ZAN, am schwächsten wirksam waren die Metabolite mit β -ständiger Hydroxygruppe. Dennoch waren alle getesteten RAL estrogener als die getesteten Isoflavone, von denen GEN die größte Estrogenität zeigte. BCA, DAI und PRU zeigten sich eine Größenordnung schwächer wirksam als GEN. Die Fähigkeit der Bisphenole die AP zu stimulieren war fünf bis sechs Größenordnungen schwächer als die von E2, außerdem erreicht die AP-Aktivität nicht den selben Wert wie nach maximaler Stimulation mit 1 nM E2. Ausgehend von Arbeiten aus unserem Arbeitskreis wird vermutet, dass die Bisphenole durch Störung des Mikrotubuli-abhängigen Transportes der AP zur Zellmembran einen direkten Einfluß auf die AP-Aktivität ausüben können. Bei den bisher wenig untersuchten Curcuminoiden konnte keine Estrogenität in Ishikawa Zellen festgestellt werden.

Die Estrogenität der getesteten Substanzen lässt sich wie folgt zusammenfassen:

$E2 \approx DES \geq RAL > \text{Isoflavone} > \text{Bisphenole}$. In Tabelle 15 sind die relativen Wirkstärken der getesteten Substanzen bezogen auf E2 in absteigender Reihenfolge aufgelistet.

Tabelle 15: Relative stimulatorische Aktivität (RSA) von von allen untersuchten EAS in absteigender Reihenfolge

EAS	E2	α -ZEL	DES	α -ZAL	ZAN	ZEN	β -ZAL
RSA (%)	100	106	47	42	25	7	5
	GEN	BCA	β -ZEL	DAI	PRU	BPB	DMBPA
	0,45	0,043	0,041	0,023	0,018	0,018	0,016
	PrPrBPA	TMBPA	BPA	BPF			
	0,012	0,011	0,006	< 0,0006			

Die SERM TAM und HO-TAM induzierten keine Steigerung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen, die konstitutive Aktivität wurde jedoch nicht reduziert. Nach Koinkubation mit 1 nM E2

reduzierten TAM und HO-TAM konzentrationsabhängig die AP-Aktivität bis auf das Niveau der Grundaktivität. Dabei zeigte sich HO-TAM um zwei Größenordnungen wirksamer als TAM. Von den getesteten Substanzen zeigten die Bisphenole und die Curcuminoide eine Hemmung der AP nach Koinkubation mit E2. Jedoch waren sie drei bis vier Größenordnungen schwächer als HO-TAM, und überlagerten sich zum Teil mit zytotoxischen Effekten. Eindeutigere Ergebnisse zur antiestrogenen Wirkung ist von der Bestimmung der AP mRNA-Level nach Koinkubation mit E2 zu erwarten.

3.3 Genotoxische Effekte von 17β -Estradiol

3.3.1 Bekannte Effekte

Untersuchungen in unserem Arbeitskreis zeigten, dass durch mikromolare E2-Konzentrationen aneuploidogene Effekte (Kap. 1.5) in Nagerzellen (V79) und menschlichen Hautfibroblasten induziert werden können. Lehmann (2002) konnte zeigen, dass

- unter Substanzeinfluss CREST-positive Mikrokerne induziert werden.
- unter Substanzeinfluss die Zellen in der Mitose arretieren.
- während substanzfreier Nachinkubation weitere CREST-positive Mikrokerne induziert werden.

Beim genaueren Betrachten der Mitosen fiel auf, dass bei etwa 30 % der Metaphasen einige Chromosomen nicht in der Metaphaseplatte zwischen den beiden Spindelpolen angeordnet waren, sondern oberhalb bzw. unterhalb einer der Spindelpole, wie in Abb. 49 dargestellt.



Abb. 49: Mikroskopisches Erscheinungsbild eines „off-plate“-Chromosoms nach Inkubation von AG01522C-Fibroblasten mit E2. Das linke Bild zeigt die Aufnahme der DAPI-gefärbten Zellkerne, das rechte die immunologisch gegen α -Tubulin fluoreszenzmarkierte Mitosespindel zusammen mit den Zellkernen. Die grüngelben Signale stammen von immunologisch FITC-markierten Kinetochorproteinen.

Wenn die Zelle den Schaden nicht repariert ehe die Mitose beendet ist können daraus Mikrokerne entstehen. Die Mechanismen der Entstehung von „off-plate“ Chromosomen sind noch ungeklärt und waren das Ziel eigener Untersuchungen.

Zuerst musste eine andere Zelllinie gewählt werden, weil die CREST-Signale in V79-Zellen schlechter zu sehen sind als in den menschlichen Hautfibroblasten, diese aber nur begrenzt zur Verfügung standen. Die Spezifität der Antikörper ist in erster Linie gegen menschliche Kinetochorproteine gerichtet (Moroi et al., 1980), deshalb wurde mit HeLa-Zellen eine menschliche

Tumorzelllinie gewählt, die gut auswertbare CREST-Signal liefert und in ausreichender Menge zur Verfügung steht.

Mit 20 μM E2 konnte in HeLa-Zellen ein erhöhter Mitosearrest (Mitoseindex 10-15 %) im Vergleich zur Kontrolle (Mitoseindex 3-5 %) induziert werden. Während Substanzinkubation und substanzfreier Nachinkubation werden CREST-positive Mikrokerne induziert und bei fluoreszenzmikroskopischer Betrachtung der Mitosen ist ein beträchtlicher Anteil an "off-plate" Chromosomen zu sehen. Diese Effekte bestätigen die Befunde aus V79-Zellen und primären Hautfibroblasten, daher kann diese Zelllinie für weitere Untersuchungen eingesetzt werden.

Der Mitosearrest könnte durch E2-bedingten Einfluss auf die Tubulinpolymerisation ausgelöst werden. Jedoch zeigt E2 keine Effekte auf das zelluläre Mikrotubuli-Gerüst (Lehmann, 2002) und eine Störung der zellfreien Polymerisation von Tubulin ist nicht zu beobachten (Pfeiffer, persönliche Mitteilung).

3.3.2 Kinetochor Funktions-Assay

Nachdem ein Einfluß von E2 auf die Mikrotubuli ausgeschlossen werden konnte, sollte als nächstes geprüft werden ob die Anheftung der Chromosomen an den Spindelapparat über die Kinetochor-Proteine durch E2 beeinträchtigt wird. Dazu sollten mitotische Chromosomen aus HeLa Zellen isoliert und die Anheftung über ihre Kinetochor-Proteine an polymerisierendes Tubulin fluoreszenzmikroskopisch qualitativ und quantitativ beschrieben werden.

Tubulin polymerisiert im zellfreien System (Kap. 5.13) in Gegenwart von Mg^{2+} und 1 mM GTP durch Erwärmen auf 37 °C, vorausgesetzt es ist eine bestimmte Menge freies Tubulin vorhanden (kritische Konzentration), um die Polymerisation zu initiieren (Gaskin, 1982). Unterhalb dieser kritischen Konzentration startet die Polymerisation nur dann, wenn Mikrotubuli-stabilisierende Bedingungen gewählt werden (z.B. Zugabe von Taxol).

Beim Kinetochor Funktions-Assay wird das Plus Ende der Mikrotubuli (Kap. 1.5.1) durch die Kinetochore isolierter mitotischer Chromosomen stabilisiert. Dadurch können die Mikrotubuli eine Größe erreichen, die nach Antikörper-Markierung fluoreszenzmikroskopisch auswertbar ist (Mitchison und Kirschner, 1985). Nach Etablierung des Assays sollte der Einfluss von E2 auf die Anheftung der Chromosomen an die Kinetochor-stabilisierten Mikrotubuli untersucht werden.

Isolation mitotischer Chromosomen

Um eine möglichst große Ausbeute mitotischer Chromosomen zu erhalten werden die HeLa Zellen mit einem zweifachen G1-Block im Zellzyklus, ausgelöst durch Thymidin, synchronisiert

(Kapitel 5.9). Anschließend werden die Zellen mit Colcemid, das die Tubulinpolymerisation hemmt, in der Mitose arretiert. Die Ausbeute mitotischer Zellen beträgt zirka 80 %.

Ein Einfluss von Colcemid auf die Kinetochor-Funktion wird von zahlreichen Autoren nicht beobachtet (Valdivia und Brinkley, 1986; Mitchison und Kirschner, 1985), dennoch ist nicht auszuschließen, dass eine Fehlfunktion des Kinetochors schon während seines Aufbaus in der Interphase und in frühen Mitosephasen induziert werden kann. Deshalb werden die Zellen für die Chromosomenisolation nicht nur mit Colcemid, sondern auch mit E2 in der Mitose arretiert.

Für die Isolation mitotischer Chromosomen sind in der Literatur verschiedene Protokolle beschrieben, z.B. die Hexylenglycol- (Valdivia und Brinkley, 1985) und die Polyamid-Methode (Mitchison und Kirschner, 1985). Da der Hexylenglycol-Puffer Ca-Ionen enthält, die bekanntermaßen die Tubulinpolymerisation hemmen (Weisenberg, 1972), wird die Polyamid-Methode bevorzugt (Kap. 5.11). Nach der Zellyse werden die Chromosomen durch Zentrifugation über einen Saccharose-Dichtegradienten (10–60 %) aufgereinigt (Kap. 5.11.2). Die vereinzelt Chromosomen werden bei zirka 30 % Saccharose wiedergefunden. Nach CREST-Färbung (Kap. 5.8) konnte fluoreszenzmikroskopisch gezeigt werden, dass die Mehrzahl der isolierten Chromosomen zwei Kinetochore besitzt.

Die Isolation und Aufreinigung der Chromosomen nach der Polyamid-Methode ist innerhalb eines Tages durchführbar und liefert eine gute Ausbeute. Die Chromosomensuspension kann vor oder nach der Gradientenzentrifugation im Kühlschrank bei 4 °C ein bis zwei Wochen aufbewahrt werden.

Tubulinpräparation

Tubulin kann aus tierischen Zellen oder Geweben isoliert werden. Besonders viel Tubulin enthalten Nervengewebe, weshalb häufig Hirn zur Isolation benutzt wird. Standardprotokolle existieren zur Tubulinisolation aus Rinder- und Schweinehirn (Williams et al., 1982). In unserem Arbeitskreis ist die Isolation aus Rinderhirn durch mehrere Zentrifugationsschritte etabliert (Kapitel 5.12.1). Die resultierende Fraktion wird als Mikrotubuli-Protein (MTP) bezeichnet, denn sie enthält neben Tubulin noch verschiedene Mikrotubuli-assoziierte Proteine (MAP) (Kap. 1.5.1). Aus 700–800 g frischem Rinderhirn konnten mit dieser Methode 250–270 mg MTP in einer Konzentration von 10–12 mg/ml (≈ 100 mM) isoliert werden.

Durch Vergleich der Bandenintensität nach elektrophoretischer Auftrennung und Färbung mit Coomassieblau (Kap. 5.12.4) wird der Tubulin-Anteil in der MTP-Fraktion auf zirka 80–90 % geschätzt.

Im zellfreien System verringern die MAP die kritische Konzentration von Tubulin (Williams und Detrich, 1979), begünstigen also die Polymerisation. Um MAP-induzierte Effekte auf die Tubulinpolymerisation auszuschließen, werden die MAP weitgehend aus der MTP-Fraktion entfernt. Dafür gibt es zwei gängige Methoden: die Aufreinigung über Phosphocellulose (PC) nach Weingarten et al. (1975), und über DEAE-Sephacel (Hamel und Lin, 1981). Durchgeführt wurde die Aufreinigung über PC wie in Kapitel 5.12.2 beschrieben. Der Proteingehalt ergab $1,7 \mu\text{g/ml}$ ($15 \mu\text{M}$). Während der Aufreinigung erfolgte demnach eine Verdünnung von etwa 1:6000. Die Reinheit des PC-Tubulins beträgt ca. 99 %, wie durch Elektrophorese (Kap. 5.12.4) bestimmt wurde.

Durchführung des Kinetochor Funktions-Assay

Der Kinetochor Funktions-Assay sollte nach Mitchison und Kirschner (1985) durch Inkubation von PC-Tubulin unterhalb der kritischen Konzentration mit Chromosomen, die ein funktionsfähiges Kinetochor (CREST-Färbung, Kap. 5.8) besitzen, etabliert werden.

Die kritische Konzentration des PC-Tubulins im zellfreien Polymerisationsassay (Kap. 5.13) konnte nicht bestimmt werden, weil der Tubulin-Gehalt der Ausgangslösung ($15 \mu\text{M}$) nicht ausreichte um eine Polymerisation zu initiieren. Davon ausgehend, dass die einzusetzende Konzentration unterhalb der kritischen Konzentration liegen soll (Mitchison und Kirschner, 1985), wurde die PC-Tubulin Lösung weitgehend unverdünnt ($14 \mu\text{M}$) mit den Chromosomen inkubiert. Der Ansatz wurde auf Polylysin-beschichtete Objektträger (PL-OT) aufzentrifugiert, fixiert und immunologisch gefärbt. Bei der abschließenden fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung waren keine Mikrotubuli zu erkennen.

Als Gegenprobe wurde PC-Tubulin ($14 \mu\text{M}$) im Polymerisationsassay (Kap. 5.13) mit $10 \mu\text{M}$ Taxol inkubiert. Die Trübungsmessung ergab keine Polymerisation, während bei der fluoreszenzmikroskopische Betrachtung des Ansatzes eine schwache Mikrotubuli-Bildung zu erkennen war.

Dagegen war nach Polymerisation von $10 \mu\text{M}$ MTP ohne und mit Chromosomen in einem Reaktionsgefäß oder direkt auf PL-OT bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung ein gut ausgeprägtes Mikrotubuli Netzwerk zu sehen. Die Mikrotubuli setzten erwartungsgemäß nicht an den Kinetochoren der Chromosomen an.

In Tabelle 16 sind die Ergebnisse der Tubulinpolymerisation aus dem Kinetochor-Funktions Assay noch einmal zusammengefasst.

Tabelle 16: Ergebnisse der Tubulinpolymerisation im Kinetochor-Funktions Assay. ++, starke Polymerisation; +, schwache Polymerisation; 0, keine Polymerisation; n.g., nicht getestet.

	PC-Tubulin	MTP
+ Mg ²⁺ und GTP	0	++
+ Mg ²⁺ , GTP und Taxol	+	n.g.
+ Mg ²⁺ , GTP und Chromosomen	0	++

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die eingesetzte PC-Tubulin Konzentration (14 μM) zu niedrig war, um eine Polymerisation einleiten zu können. Dass unter den gegebenen Bedingungen eine Polymerisation möglich gewesen wäre, konnte mit der Polymerisation von MTP gezeigt werden.

4 Zusammenfassung

Für das Screening der estrogenen Wirkung endokrin aktiver Substanzen wurde ein Rezeptorgen-Assay in Ishikawa Zellen in unserem Arbeitskreis etabliert. Ishikawa Zellen exprimieren estrogenabhängig die alkalische Phosphatase; der Test basiert auf der Messung der erhöhten Enzymaktivität nach Inkubation mit einer Testsubstanz. Die Versuchsbedingungen wurden bezüglich Zellzahl und Inkubationsdauer dahingehend optimiert, dass der Test in Mikrotiterplatten durchgeführt werden kann.

Die alkalische Phosphatase in Ishikawa Zellen konnte mit physiologisch relevanten Konzentrationen von 17β -Estradiol stimuliert werden. Die maximale Enzymaktivität wurde mit Konzentrationen ab 1 nM erreicht. Weiter konnte gezeigt werden, dass unter diesen Bedingungen der Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium-Test in diesem Testsystem nicht mit der gemessenen Zellzahl korreliert, jedoch Aussagen über die metabolische Aktivität der Zellpopulation zulässt.

Anhand der Positivkontrollen Diethylstilbestrol für die estrogenen und Tamoxifen für die antiestrogenen Wirkung konnte die Eignung des Estrogenitätstest festgestellt werden und der Test auf weitere endokrin aktive Substanzen angewendet werden. Getestet wurden Resorcylsäure-Laktone aus der Klasse der Mykoestrogene, Isoflavone aus der Klasse der Phytoestrogene, Bisphenole aus der Klasse der Umweltestrogene und Curcumine, die bisher noch nicht bezüglich ihrer hormonellen Wirkung charakterisiert wurden.

Die Bewertung der Estrogenität von endokrin aktiven Substanzen basierte auf den errechneten EC_{50} -Werten der induzierten Aktivität der alkalischen Phosphatase. Der EC_{50} -Wert einer Substanz wurde mit dem EC_{50} -Wert von 17β -Estradiol ins Verhältnis gesetzt und die daraus resultierende relative stimulatorische Aktivität als Maß für die Estrogenität herangezogen. Es zeigten sich auch Unterschiede in der maximal erreichbaren Enzymaktivität im Vergleich zu 17β -Estradiol, die in die Bewertung miteinbezogen wurden. Die Rangfolge der Estrogenität der einzelnen Substanzklassen bezogen auf 17β -Estradiol kann wie folgt zusammengefasst werden: 17β -Estradiol \geq Resorcylsäure-Laktone $>$ Isoflavone $>$ Bisphenole. Bei den Curcuminen konnte keine Estrogenität festgestellt werden.

Die getesteten Resorcylsäure-Laktone erwiesen sich in den Ishikawa Zellen als starke Estrogene. Die Wirkung von Zearalenon, das als Mykotoxin verschiedener Fusarienstämme in Getreideprodukten vorkommen kann, ist nur eine Größenordnung geringer als die von 17β -Estradiol. Der Hauptmetabolit α -Zearalenol zeigte die stärkste estrogenen Wirkung innerhalb der getesteten Substanzen, die identisch mit der von 17β -Estradiol war. Die Rangfolge der eingesetzten sechs Resorcylsäure-Laktone lässt sich wie folgt beschreiben:

17β -Estradiol = α -Zearalenol $>$ α -Zearalanol \geq Zearalanon $>$ Zearalenon \approx β -Zearalanol $>$ β -Zearalenol.

Die Isoflavone erwiesen sich als schwache Estrogene in Ishikawa Zellen. Von den getesteten Isoflavonen war Genistein am stärksten estrogen, das estrogenene Potential war jedoch drei Größenordnungen geringer als von 17β -Estradiol. Die drei anderen getesteten Isoflavone Biochanin A, Daidzein und Prunetin waren eine Größenordnung schwächer wirksam als Genistein und unterschieden sich nur geringfügig in ihren EC_{50} -Werten. Jedoch induzierte Prunetin nur etwa 50 % der Enzymaktivität die bei maximaler Stimulation mit 17β -Estradiol erreicht werden kann. Die Rangfolge der getesteten Isoflavone lässt sich wie folgt zusammenfassen:

17β -Estradiol \gg Genistein $>$ Biochanin A \approx Daidzein $>$ Prunetin.

Antiestrogene Effekte der Isoflavone Genistein und Daidzein, werden vor allem im Zusammenhang mit der Chemoprevention vor hormonabhängigen Krebsarten wie Brust- und Uteruskrebs diskutiert. In Ishikawa Zellen zeigte keines der vier getesteten Isoflavone bei Koinkubation mit 17β -Estradiol eine Hemmung der Aktivität der alkalischen Phosphatase bei nicht-zytotoxischen Konzentrationen.

Alle getesteten Bisphenole erwiesen sich als sehr schwache Estrogene in Ishikawa Zellen. Bisphenol B, Dimethylbisphenol A, Tetramethylbisphenol A und 4,4'-Bis(4-hydroxy-phenyl)heptan waren am stärksten wirksam. Sie unterschieden sich praktisch nicht in ihrer Fähigkeit die alkalische Phosphatase zu induzieren, waren aber im Vergleich zu 17β -Estradiol vier Größenordnungen schwächer wirksam. Das stark diskutierte Bisphenol A war sogar um fünf Größenordnungen schwächer in seiner Estrogenität, während das estrogenene Potential von Bisphenol F nur geschätzt werden konnte. Die Rangfolge der Bisphenole lautet demnach:

17β -Estradiol \gg Bisphenol B \approx Dimethylbisphenol A \approx Tetramethylbisphenol A \approx 4,4'-Bis(4-hydroxy-phenyl)heptan $>$ Bisphenol A $>$ Bisphenol F.

Auffällig war allerdings, dass keines der Bisphenole in der Lage war, die gleiche Enzymaktivität zu stimulieren die nach maximaler Stimulation mit 1 nM 17β -Estradiol erreicht wurde. Die erreichten Aktivitäten der alkalischen Phosphatase betrugten nur zirka 50 % der maximal stimulierbaren Aktivität. Von Bisphenol A ist bekannt, dass es membrangebundene Enzyme in ihrer Aktivität hemmen kann, deshalb wurde der Einfluss der Bisphenole auf die Aktivität isolierter alkalischer Phosphatase untersucht. Keines der sechs untersuchten Bisphenole zeigte einen Einfluss auf die Aktivität von isolierter alkalischer Phosphatase.

Nach Koinkubation mit 17β -Estradiol zeigte die Bisphenole Tetramethylbisphenol A, Bisphenol B, Dimethylbisphenol A und Bisphenol A einen hemmenden Einfluss auf die estrogen-stimulierte Enzymaktivität. Die hemmenden Konzentrationen befanden sich allerdings im Bereich beginnender Zytotoxizität.

Die Curcumine Curcumin, Mono-demethoxycurcumin und Bis-demethoxycurcumin zeigten keinen stimulierenden Effekt auf die alkalische Phosphatase. Im Bereich zytotoxischer Konzentrationen hemmten die Curcumine nach Koinkubation mit 17β -Estradiol die stimulierte Enzymaktivität. Allerdings konnte nicht geklärt werden, ob dieser Effekt über eine Interaktion mit dem Estrogenrezeptor bewirkt wird oder ob er rein zytotoxischer Natur ist.

Bei der Untersuchung zum aneuploidogenen Potential von 17β -Estradiol sollte ein Kinetochor-Funktions Assay etabliert werden. Nach erfolgreicher Isolierung mitotischer Chromosomen aus HeLa-Zellen und Tubulinaufreinigung aus Rinderhirn gelang es jedoch nicht, die Anheftung der Chromosomen an polymerisierendes Tubulin im zellfreien System nachzustellen.

5 Material und Methoden

Nicht näher spezifizierte Chemikalien stammen vom Carl Roth (Karlsruhe), Sigma–Aldrich (Deisenhofen) oder SERVA (Heidelberg) 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

Brutschrank Sanyo CO₂ -Inkubator MCO-17AI

Zellzählgerät, elektronisch CASY[®]1 Schärfe Systeme

Fluoreszenzmikroskop

Zeiss Axioskop Plan Neofluor

Okular: 10x; Objektive: 63x/100x (Öl)

Filterblocks: A (DAPI), I2/3 (FITC), N2 (Rhodamin), Tripelfilter

Nikon Eclipse E400

Okular: 10x; Objektive: Plan Apo 60x, 100x (Öl)

Filterblocks: UV-2A (DAPI, Ex¹: 330-380, DM²: 400, BA³: 420), G-2A (Rhodamin, Ex: 510-560, DM: 575, BA: 590), FITC (Ex: 465-495, DM: 505, BA: 515-555), Tripelfilter

Dokumentation: Spot-RT monochrom CCD-Digitalkamera (Diagnostic Instruments), MetaView (Universal Imaging Corp.)

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

Mikrotiterplattenlesegerät GENios (Tecan) mit Auswertesoftware XFluor

Elektrophorese Mini-PROTEAN II (BioRad); Power supply, Modell 1000/500 (BioRad)

Handzählgeräte

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

Eppendorf 50 µl / 100 µl / Research 2 – 20 µl / Oktapette / Multipette

Abimed Pipetman P1000 / P200 / P100

¹Anregung, Wellenlänge in nm

²Dichroitischer Spiegel, Wellenlänge in nm

³Emissionsfilter, Wellenlänge in nm

Zentrifugen Hereaus Megafuge 1.0R

Kühlzentrifuge Centrikon T-124 mit Rotor A 6.14 (Kontron)

Ultrazentrifuge Centrikon T-1080 mit Rotor TFT 55.38 (Kontron)

Trockenschrank Heraeus

Wasserbad mgw Lauda, Thermostar

Waagen Handy H 51 und PT 1200 (Sartorius)

Präzisionswaage Modell 434 (Kern)

Heizplatte Omnilab Jürgens (Bremen) PST100

Magnetrührer

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

Photometer UV/VIS-Spektralphotometer Uvikon 930 (Kontron) mit Thermostatic Cicatorator

Kontainer für die Cytozentrifuge für Hereaus Megafuge 1.0R (Heraeus)

Vakuumpumpe Membran-Vakuumpumpe Typ: N86KN.18 Förderleistung l/min: 6,0 (Roth)

5.2 Verbrauchsmaterialien

CASYTON (Schärfesysteme)

CASY[®]cup (Schärfesysteme)

Reaktionsgefäße 1,5 ml (Sarstedt)

Pipettenspitzen, Plastik 1 ml, 200 µl (Sarstedt)

Mikrotiterplatten Nunclon 96-Loch, steril (Nunc)

„Quatriperm“-Inkubationsgefäße (Heraeus) Multischalen 132x82 mm², 4 Vertiefungen

Zellkulturflaschen Cellstar 550 ml 175 cm² (Greiner)

Petrischalen 94/16 mm (Greiner)

Objektträger, superfrost (Menzel)

Deckgläser 24x60 mm (Roth)

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

Coplinbecher (Glas) (Merck)

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

Sterilfilter Porengröße 0,45 μm und 0,22 μm (Roth)

Spritzenkanüle Einmal-Kanülen, kurzer Schliff Abmessungen (Durchmesser x Länge): 0,55 x 25 mm Gauge: 24 G x 1”

5.3 Methoden in der Zellkultur

Zellen

HeLa Zelllinie aus einem humanen Cervixkarzinom. Die Verdopplungszeit beträgt ungefähr 24 h.

Ishikawa Zelllinien aus einem Adenokarzinom des menschlichen Endometriums. Zwei Spezies mit dem selben Namen. Eine ist ER-positiv, die andere ER-negativ. Beide Zelllinien stammen aus dem selben Gewebe, besitzen dieselbe Morphologie haben aber unterschiedliche physiologische Eigenschaften. Unklar ist, weshalb beide Zelllinien denselben Namen tragen. Die Verdopplungszeit der ER-positiven Zelllinie beträgt ungefähr 24 h, die der ER-negativen etwa 36 h. Beide Zelllinien wurden freundlicherweise von Stefan O. Müller (Merck, Darmstadt) aus dem Bestand des National Institute of Environmental Health Sciences (Research Triangle Park, North Carolina) zur Verfügung gestellt.

Lösungen

Medien und Medienzusätze ausser FKS stammen von Sigma, FKS von GibcoBRL. Allen Medien, die zur Kultivierung von Zellen eingesetzt werden, ist Penizillin (Endkonzentration: 100 U/ml), Streptomycin (Endkonzentration 100 $\mu\text{g/ml}$) und 10 % FKS zugesetzt.

Medien

HeLa Ham's F12 mit 2 mM L-Glutamin.

Ishikawa Ham's F12/DMEM im Verhältnis 1+1 (v/v) mit 2,5 mM L-Glutamin.

10x PBS-CMF Es werden 80 g NaCl (1,37 M), 2 g KCl (27 mM), 11,1 g Na_2HPO_4 (wasserfrei) (78 mM) und 2 g KH_2PO_4 (15 mM) in 1 l Wasser gelöst.

PBS 7,4 Ein Volumenteil 10x PBS-CMF wird in etwa 5 Volumenteilen Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird auf 7,4 eingestellt. Es wird mit Wasser auf 10 Volumenteile aufgefüllt.

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.

Kultivierung und Passagieren

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

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

Zum Passagieren wird das Medium abgegossen, der Zellrasen zwei Mal mit 10 ml PBS 7,4 und ein Mal mit 10 ml Trypsin–EDTA gewaschen und mit 5 – 10 ml Trypsin–EDTA bedeckt. Die Zellkulturflasche wird 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 1 Mio. Zellen werden in 20 ml frischem Medium ausgestreut.

Alle zwei Tage wird ein Mediumwechsel durchgeführt. Dazu wird das Medium aus der Kulturflasche gegossen, der Zellrasen mit PBS 7,4 gewaschen und 20 ml frisches Medium in die Flasche gefüllt.

5.4 Herstellung von Aktivkohle–Dextran behandeltem fetalem Kälberserum

Die Herstellung von Aktivkohle–Dextran behandeltem FKS (CDFKS) erfolgt durch zweimalige Inkubation von FKS mit 0,25 % Aktivkohle und 0,025 % Dextran T70 wie in (Holinka et al., 1986a) beschrieben.

Chemikalien und Lösungen

Aktivkohle Norit A, Säure gewaschen (Sigma) wird 2x mit kaltem, autoklaviertem Wasser gewaschen und dann getrocknet.

Dextran T70 (Sigma).

FKS (GibcoBRL).

Durchführung

0,25 g Aktivkohle und 0,025 g Dextran T70 werden mit 100 ml FKS für 30 min im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 56°C inkubiert und dann abzentrifugiert (3000 g, 15 min). Der Überstand wird mit 0,25 g Aktivkohle und 0,025 g Dextran T70 für 30 min im Schüttelinkubator bei 200 rpm und 37°C inkubiert und wieder abzentrifugiert (3000 g, 15 min).

Für die Sterilfiltration wird zuerst mit einem 0,45 μm Filter vorfiltriert, die Hauptfiltration erfolgt mit sterilen 0,22 μm Filtern.

5.5 Zellzahlbestimmung

Neben dem klassischen Auszählen der Zellen mit einer Neubauer Zählkammer besteht auch die Möglichkeit der elektronischen Zellzahlbestimmung mit dem CASY®. Das Prinzip dieser elektronischen Bestimmungsmethode beruht auf einer Leitfähigkeitsmessung. Zellen wirken als Isolatoren und verringern die Leitfähigkeit. Aus dem Leitfähigkeitsverlust wird das Zellvolumen berechnet und nach vorheriger Kalibrierung mit lebende und toten Zellen kann die Lebendzellzahl bestimmt werden.

Lösungen

PBS 7,4 (Kap. 5.3)

Trypsin-EDTA (Kap. 5.3)

Medium (Kap. 5.3)

5.5.1 Erstellen einer Wachstumskurve

20 000 Ishikawa Zellen werden nach dem Abtrypsinieren (Kapitel 5.3) in eine Petrischale (Grundfläche: 69 cm^2) ausgestreut und alle 24 h die Zellzahl bestimmt. Wenn das Wachstumverhalten unter Substanzeinfluss untersucht werden soll, kann 24 h nach dem Ausstreuen mit Substanz inkubiert werden.

Für die elektronische Zellzahlbestimmung wird das Medium abgegossen, der Zellrasen zweimal mit PBS-CMF gewaschen, 2,5 ml Trypsin-EDTA zugegeben und 5 min im Brutschrank bei 37 °C belassen. Die abgekugelten Zellen werden durch Klopfen von der Petrischale gelöst und 5 ml Medium zugegeben. Die Zellsuspension wird vereinzelt und quantitativ (2x mit je 2,5 ml

Medium nachspülen) in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen gut vereinzelt, ein Aliquot in ein 10 ml CASYTON enthaltendes CASY® cup gegeben und sofort mittels CASY® die Zellzahl bestimmt.

5.5.2 Zellzahlbestimmung in Mikrotiterplatten

Ishikawa Zellen werden nach dem Abtrypsinieren (Kapitel 5.3) in eine Mikrotiterplatte ausgestreut und alle 24 h die Zellzahl gemessen. Wenn das Wachstumsverhalten unter Substanzeinfluss untersucht werden soll, kann 24 h nach dem Ausstreuen mit Substanz inkubiert werden.

Für die elektronische Zellzahlbestimmung wird das Medium aus der Mikrotiterplatte vorsichtig abgesaugt, der Zellrasen zweimal mit 150 μ l PBS-CMF gewaschen (absaugen), 150 μ l Trypsin-EDTA zugegeben und 5 min im Brutschrank bei 37 °C belassen. Die abkugelten Zellen werden durch Zupipettieren von 100 μ l Medium mit einer Oktapette von der Platte gelöst und durch mehrmaliges Aufziehen vereinzelt (gleichzeitig maximal 4 Kanäle der Oktapette benutzen). Die Zellsuspension wird quantitativ (1x mit 100 μ l Medium nachspülen) in ein Zentrifugenröhrchen überführt, die Zellen gut vereinzelt, ein Aliquot in ein 10 ml CASYTON enthaltendes CASY® cup gegeben und sofort mittels CASY® die Zellzahl bestimmt.

5.6 Kolorimetrische *in vitro* Zytotoxizitätstests

Für die Bestimmung der Zellproliferation gibt es neben der direkten Bestimmung der Zellzahl (Neubauer-Zählkammer, elektronische Zellzählung) eine Reihe photometrischer Verfahren, die schneller durchzuführen sind. Als Endpunkte der photometrischen Verfahren dienen die Umsetzung oder Bindung eines Farbstoffes. Nach Substanzbehandlung der Zellen kann die Absorption relativ zur Lösungsmittelkontrolle bestimmt werden.

5.6.1 Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium-Test

Der Methythiazolyldiphenyl-tetrazolium (MTT)-Test beruht auf der zellulären Reduktion des MTT zum MTT-Formazan (Abb.50), das bei 570 nm sein Absorptionsmaximum besitzt. Die Reduktion des MTT ist ein Maß für den Redox-Status einer Zellpopulation und kann als Lebensfähigkeit (Viabilität) oder metabolische Aktivität wiedergegeben werden (Holian und Walter, 2001).

Auswertung

Nach Abzug des Reagenzienblindwertes werden die Extinktion auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und als % der Kontrolle angegeben.

5.6.2 Sulforhodamin B–Test

Bei dem Sulforhodamin B (SRB)–Test bindet das SRB (Abb. 51) im sauren an die Proteine der Zelle (Skehan et al., 1990). Nach Auswaschen des ungebundenen Farbstoffes wird das gebundene SRB mit einer basischen Tris–Lösung wieder in Lösung gebracht. SRB kann photometrisch bei 570 nm bestimmt werden.

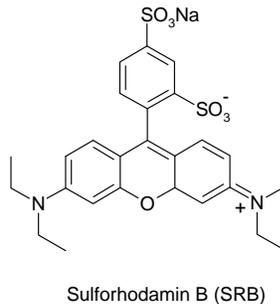


Abb. 51: Strukturformel SRB.

Lösungen

Trichloressigsäure–Lösung 10% (w/v) 50 g Trichloressigsäure (Fluka) werden in 500 ml Wasser gelöst und im Kühlschrank aufbewahrt.

Essigsäure 1 % (v/v) 50 ml Eisessig (Roth) werden mit Wasser auf 5 l aufgefüllt.

SRB–Lösung 0,4 % (w/v) 0,4 g Sulforhodamin B werden in 100 ml 1 % Essigsäure gelöst.

Tris–Puffer (10 mM, ungepuffert) 0,6 g Tris Base werden in 500 ml Wasser gelöst.

Durchführung

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium vorsichtig aus der Mikrotiterplatte abgesaugt und die Zellen für 30 min mit 100 μ l Trichloressigsäure (4 °C) im Kühlschrank fixiert. Danach wird die Platte fünf Mal mit Wasser gewaschen und über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

In jede Kavität der Platte werden 70 μ l SRB–Lösung pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird solange mit 1 % Essigsäure gewaschen, bis kein ungebun-

dener Farbstoff mehr in der Platte zu sehen ist (in der Regel reichen fünf Mal waschen aus), und die Platte über Nacht bei Raumtemperatur getrocknet.

Der gebundene Farbstoff wird zur Messung mit 200 μ l Tris-Puffer solubilisiert. Nach 5 min wird die Farbstofflösung in neuen Mikrotiterplatten 1:4 mit Tris-Puffer verdünnt und nach kurzem Schütteln (15 s) die Absorption bei 570 nm im Plattenlesegerät gemessen.

Auswertung

Nach Abzug des Reagenzienblindwertes werden die Extinktion auf die Lösungsmittelkontrolle bezogen und als % der Kontrolle angegeben.

5.7 Bestimmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen

Die Bestimmung der Enzymaktivität beruht auf der AP-katalysierten Umsetzung von 4-Nitrophenylphosphat (4-NPP) zu 4-Nitrophenol. Die Bestimmung der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen wird in Mikrotiterplatten durchgeführt und basiert auf dem Protokoll von Littlefield et al. (1990).

Das Standard-Versuchsprotokoll zur Bestimmung der AP-Aktivität ist in Abb. 52 dargestellt, parallel wird ein Zytotoxizitätstest (SRB oder MTT) unter den selben Bedingungen durchgeführt.

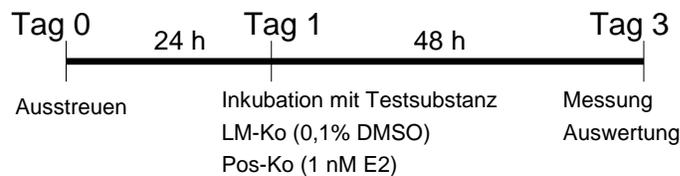


Abb. 52: Standard-Protokoll zur Bestimmung der Substanz-induzierten AP-Aktivität in Ishikawa Zellen.

Lösungen

PBS 7,4 s. Kapitel 5.3

Steroidfreies Medium DMEM/F-12 Medium wird anstelle von 10 % unbehandeltem FKS 5 % CD-FKS (s. Kapitel 5.4) zugesetzt.

MgCl₂-Stammlösung (24 nM) 0,49 g MgCl₂·6H₂O werden in 100 ml Wasser gelöst, zu 1,2 ml portioniert und eingefroren.

4-NPP-Lösung 0,186 g 4-NPP (5 mM), 10,51 g Diethanolamin (1 M) und 1 ml MgCl₂-Stammlösung (0,24 mM) werden in Wasser gelöst, der pH-Wert mit konz. HCl auf 9,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

Testsubstanzen

Alle Testsubstanzen werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst.

17 β -Estradiol (Sigma)

Diethylstilbestrol (Sigma)

Zearalenon (Sigma)

Zearalanon (Sigma)

α - und β - **Zearalenol** (Sigma)

α - und β - **Zearalanol** (Sigma)

5,7,4'-Trihydroxyisoflavon, Genistein (Fluka)

5,4'-dihydroxyisoflavon, Daidzein (Indofine)

5,7-Dihydroxy-4'-methoxyisoflavon, Biochanin A (Sigma)

5,4'-Dihydroxy-7-methoxyisoflavon, Prunetin (Indofine)

2,2'-Bis(4-hydroxy-phenyl)propan, Bisphenol A (Sigma)

2,2'-Bis(4-hydroxy-phenyl)butan, Bisphenol B (eigene Herstellung)

4,4'-Bis(4-hydroxy-phenyl)heptan (eigene Herstellung, Pfeiffer)

2,2-Bis(4-hydroxy-3-methyl-phenyl)propan, Dimethylbisphenol A (Sigma)

2,2-Bis(4-hydroxy-3,5-dimethyl-phenyl)propan, Tetramethylbisphenol A (Sigma)

Bis(4-hydroxy-phenyl)methan, Bisphenol F (Sigma)

Curcumin Nach Isolation aus Curcuma-Pulver zur Verfügung gestellt von Solyom, A. M.; Arizona Center for Phytomedicine Research, Arizona, Tuscon (USA).

Mono-Demethoxycurcumin Nach Isolation aus Curcuma-Pulver zur Verfügung gestellt von Solyom, A. M.; Arizona Center for Phytomedicine Research, Arizona, Tuscon (USA).

Bis-demethoxycurcumin Nach Isolation aus Curcuma-Pulver zur Verfügung gestellt von Solyom, A. M.; Arizona Center for Phytomedicine Research, Arizona, Tuscon (USA).

5.7.1 Ausstreuen und Substanzinkubation

Die Zellen werden abtrypsiniert (Kap. 5.3) und die benötigte Zellzahl (2 Mio/20 ml für 1 Platte) bei 1500 rpm 5 min abzentrifugiert. Das Pellet wird zwei Mal mit PBS gewaschen, zentrifugiert und in estrogenfreiem DMEM/F12 Medium resuspendiert. Mit einer Oktapette werden 20 000 Zellen pro Kavität ausgestreut.

24 h später wird das Medium vorsichtig abgesaugt und die angewachsenen Zellen mit der Testsubstanz in 200 μ l frischem Medium inkubiert. Die Testsubstanzen werden mit 0,1 % DMSO im Medium gelöst. Auf jeder Platte werden 1 nM E2 als Positivkontrolle und die Lösungsmittelkontrolle (0,1 % DMSO) mitgeführt.

5.7.2 Messung der Enzymaktivität

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Medium aus der Platte ausgeschüttet und drei Mal mit PBS 7,4 gewaschen. Die Platte wird 5 min umgedreht auf ein Küchentuch gelegt und dann zur Zelllyse für mindestens 20 min bei -80 °C aufbewahrt.

Die tiefgefrorene Platte wird 5 min bei Raumtemperatur angetaut, weitere 5 min auf Eis gestellt und dann 50 μ l einer eiskalten 4-NPP-Lösung in jede Kavität pipettiert.

Danach wird die Platte 5 min bei Raumtemperatur temperiert und bei Raumtemperatur in einem Plattenlesegerät die Absorption bei 405 nm alle 10 min über einen Zeitraum von 1 h gemessen.

5.7.3 Auswertung

Die Enzymaktivität (AP) wird als Bildung einer bestimmten Stoffmenge 4-NP (Δn (4-NP)) in einem bestimmten Zeitraum Δt berechnet:

$$AP = \frac{\Delta n(4-NP)}{\Delta t} \quad (1)$$

Aus dem Lambert-Beerschen Gesetz ergibt sich die gebildete Stoffmenge von 4-NP nach:

$$n(4-NP) = \frac{E}{\varepsilon \cdot d} \cdot V \quad (2)$$

mit n (4-NP): Stoffmenge 4-NP in mol; E: Extinktion; ε : molarer Extinktionskoeffizient in $\text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; d: Schichtdicke; V: Volumen der Messlösung.

Eingesetzt in Gleichung (1) ergibt sich für die Enzymaktivität:

$$AP = \frac{\Delta E}{\Delta t \cdot \varepsilon \cdot d} \cdot V \quad (3)$$

werden die Konstanten ε bei 405 nm in $0,01 \text{ M NaOH} = 18,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$; $d = 0,15 \text{ cm}$; $V = 50 \mu\text{l}$ eingesetzt, vereinfacht sich Gleichung (3) zu:

$$AP = \frac{\Delta E}{\Delta t} \cdot 18,1 \frac{\text{nmol}}{\text{min}} \quad (4)$$

Die Bildungsgeschwindigkeit $\frac{\Delta E}{\Delta t}$ = Bildungsgeschwindigkeit 4-NP wird aus dem linearen Teil der gemessenen Kinetik mit der Funktion "Steigung" im Computerprogramm EXCEL® berechnet.

In der grafischen Darstellung der Ergebnisse werden die Enzymaktivität und die Induzierbarkeit gegenübergestellt. Die Konzentrationen sind logarithmisch dargestellt. Die Lösungsmittelkontrolle wird eine Größenordnung unterhalb der kleinsten eingesetzten Konzentration aufgetragen.

Die Berechnung der Dosis-Wirkung Kurven erfolgt mit Computerprogramm Origin®, das mit dem Levenberg-Marquardt-Algorithmus eine nichtlineare Ausgleichsgerade nach dem Prinzip der kleinsten Abweichungsquadrate durch die Meßpunkte berechnet. Der sigmoidale Kurvenverlauf wird mit der Logistic-Funktion beschrieben (DeLean et al., 1978):

$$y = \frac{A_1 - A_2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p} + A_2 \quad (5)$$

mit A_1 : Minimalwert (Kontrolle); A_2 : Maximalwert (Maximale AP Stimulation); X : Konzentration in mol/l; X_0 : EC_{50} Wert; p : Steigung.

In Abb. 53 ist beispielhaft eine Kurve mit den berechneten Parametern dargestellt.

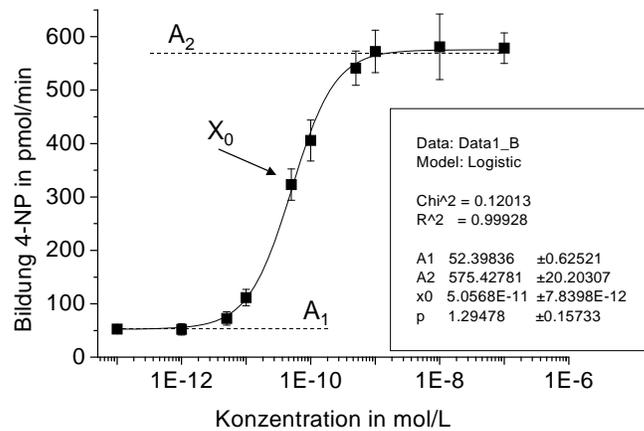


Abb. 53: Rechnerisch erstellte sigmoidale Dosis–Wirkung Kurve und ihre Parameter.

Der EC_{50} -Wert (effective concentration) beschreibt die Konzentration einer Substanz, mit der 50 % des maximalen Effekts erreicht werden. Bei der E2-abhängigen Stimulation der AP-Aktivität in Ishikawa Zellen, entspricht er der Konzentration mit der 50 % der maximalen, substanzinduzierten AP-Aktivität erreicht wird.

Nach der Berechnung der EC_{50} -Werte wird die relative stimulatorische Aktivität (RSA) der endokrin aktiven Substanz (EAS) bezogen auf E2 nach der folgenden Gleichung berechnet:

$$RSA(\%) = \frac{EC_{50}(E2)}{EC_{50}(EAS)} \cdot 100 \quad (6)$$

5.8 Immunologische Färbung

Lösungen

2x CB-Puffer Der Puffer besteht aus NaCl (137 mM), KCl (5 mM), Na_2HPO_4 (1,1 mM), KH_2PO_4 (0,4 mM), $MgCl_2$ (2 mM), EDTA (2 mM), Pipes (5 mM), Glucose (5,5 mM). Der pH-Wert ist 6,1.

Triton X-100-Lösung Triton-X-100 (Sigma) wird als 10%ige (w/v) Lösung in Wasser eingesetzt.

Formaldehyd-Fixans Es werden 3,5 g Paraformaldehyd (Merck) in 50 ml Wasser suspendiert und mit 1 ml NaOH-Lösung (1 M) gemischt. Für 5 min auf 60 °C erhitzen. Davon 40 ml mit dem gleichen Volumen 2x CB-Puffer mischen und den pH-Wert auf 6,1 einstellen. Es

werden 2 ml Triton X-100-Lösung zugemischt. Die Lösung ist im Kühlschrank etwa 4 h haltbar.

Antifade-Lösung 100 mg p-Phenylendiamin-dihydrochlorid (Sigma) in 10 ml PBS-Lösung lösen und mit NaHCO_3 -Lösung (0,5 M, pH 9,0 mit NaOH) auf pH 8,0 einstellen. Mit Glycerin auf 100 ml auffüllen. Sterilfiltrieren und bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ lichtgeschützt aufbewahren.

DAPI-Antifade-Lösung In 10 ml Antifade-Lösung werden 10 μl DAPI-Lösung (1 mg/ml in H_2O) gelöst (Konz.: 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$). In Portionen à ca. 0,7 ml lichtgeschützt bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahren.

DAPI-Antifade-Verdünnung DAPI-Antifade-Lösung wird mit Antifade-Lösung 1:50 (v/v) verdünnt (Konz.: 0,02 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Die Lösung wird lichtgeschützt bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt.

PBS 8,0 Ein Volumenteil 10x PBS-CMF wird in etwa 5 Volumenteilen Wasser aufgenommen. Der pH-Wert wird auf 8,0 eingestellt und mit Wasser auf 10 Volumenteile aufgefüllt.

Ziegenmullserum (GibcoBRL)

BSA-Lösung (1 % (m/v)) Rinderserumalbumin (Serva) wird in PBS 8,0 gelöst.

Primäre Antikörper

Centromer positive Control („CREST-Antikörper“) (DPC Biermann, Bad Nauheim)

Monoclonaler Anti- α -Tubulin-Antikörper aus Maus-Ascitesflüssigkeit (Sigma)

Primärantikörper-Lösung Die Primärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (CREST: 1:15; Tubulin: 1:500).

Sekundäre Antikörper

Polyvalenter Anti-Human-Antikörper der Ziege (Sigma); FITC-konjugiert

Anti-Maus-Antikörper der Ziege (Jackson Immuno Research); CY3-konjugiert

Sekundärantikörper-Lösung Die Sekundärantikörper werden mit BSA-Lösung verdünnt (Anti-Human: 1:200; Anti-Maus: 1:250).

Fixierung der Zellen

Die Objektträger werden für 5 min in Formaldehyd-Fixans gestellt. Anschließend bis zur Verwendung (mindestens 30 min) in Methanol ($-20\text{ }^\circ\text{C}$) gelagert.

Färbung der Zellen

Alle Inkubationsschritte erfolgen in einer feuchten Kammer bei 37 °C.

Die Objektträger werden dreimal für 5 min in PBS 8,0 gewaschen.

Es wird mit 200 µl Ziegenserum (Deckglas) für 1 h inkubiert. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger in PBS 8,0 geschwenkt.

Mit 100 µl Primärantikörper-Lösung (Deckglas) für 1 h inkubieren. Die Deckgläser werden entfernt und die Objektträger dreimal für 5 min in PBS 8,0 gewaschen.

Die OT für 1 h mit je 100 µl Sekundärantikörper-Lösung (Deckglas) behandeln. Die Objektträger dreimal für 5 min in PBS 8,0 gewaschen.

Die Objektträger werden mit etwa 30 µl DAPI-Antifade-Lösung eingedeckt.

Die Markierung ist im Dunkeln mehrere Wochen haltbar.

5.9 Synchronisation von HeLa Zellen

Die Synchronisation von HeLa Zellen erfolgt mit dem Ziel, eine große Ausbeute mitotischer Zellen zu erhalten, die dann zur Isolierung von Chromosomen eingesetzt werden können. Die Ausbeute mitotischer Zellen nach Inkubation mit Colcemid oder einem anderen Spindelgift kann nicht durch beliebig lange Inkubationszeiten erhöht werden, da Zellen, die lange in der Mitose arretiert sind, durch Apoptose absterben. Deshalb ist es angebracht die Zellen an einem früheren Stadium des Zellzyklus anzuhalten, bevor sie mit dem Spindelgift inkubiert werden. Compton (1998) beschreibt, dass die Zellen zum Zeitpunkt der "Ernte" ca. 90 % konfluent sein sollten, um einen hohen Mitoseindex zu erreichen. Die Synchronisation soll bei etwa 40 % Konfluenz beginnen. Zunächst werden die Zellen zweimal mit Thymidin am G1-Restriktionspunkt arretiert, bevor abschließend mit einem Spindelgift (Colcemid, Nocodazol o.ä.) die Mitose gestört wird (Compton, 1998). Die Zellen werden zweimal am G1-Restriktionspunkt arretiert, um den Anteil synchronisierter Zellen zu erhöhen, da Zellen, die sich während der ersten Thymidinbehandlung in der S-Phase befinden, dort arretiert werden.

Lösungen

Medium für HeLa Zellen Kap. 5.3.

PBS 7,4 Kap. 5.3.

Thymidin (200 mM) 96 mg Thymidin (Sigma) werden in 2 ml Wasser gelöst und durch sterile 0,22 μm Filter filtriert. Die sterile Lösung wird im Kühlschrank aufbewahrt.

Colcemid (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gebrauchsfertig (Serva).

Durchführung

Der Ablauf der Synchronisation ist in Abb. 54 dargestellt. Die Thymidin-freie Zwischeninkubation muss so lange sein, dass sowohl die Zellen in der S-Phase als auch die durch Thymidin bereits in der G1-Phase angesammelten Zellen die S-Phase vollständig durchlaufen können.

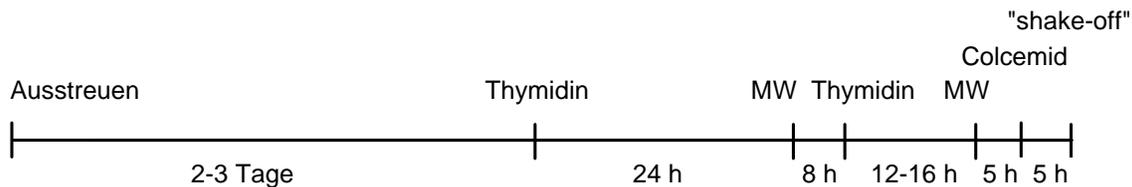


Abb. 54: Schematischer Ablauf der Synchronisation von HeLa-Zellen

In eine Zellkulturflasche (Grundfläche 175 cm^2) werden 1,5 Mio HeLa Zellen in 20 ml Medium ausgestreut. Nach 2-3 Tagen wird das Medium entfernt, einmal mit PBS 7,4 gewaschen und durch 20 ml frisches Medium mit 2 mM Thymidin ersetzt. Nach 24 h wird das Thymidin-haltige Medium entfernt, die Zellen zweimal mit PBS 7,4 gewaschen und mit Thymidin-freiem Medium für 8 h inkubiert. Danach wird erneut mit 2 mM Thymidin im Medium über Nacht (12–16 h) in der G1-Phase arretiert. Nach einer Zwischeninkubation mit Medium für 5 h werden die Zellen weitere 5 h mit 20 ml Medium, dem 120 μl Colcemid (Endkonzentration 0,06 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugesetzt werden, inkubiert.

Durch sanftes Schlagen der Zellkulturflasche gegen den Handballen ("shake-off") werden die mitotischen Zellen von der Oberfläche der Flasche gelöst und zur Chromosomenisolation eingesetzt.

5.10 Herstellung Polylysin-beschichteter Objektträger

Lösungen

Ethanol (70 % v/v) 70 ml EtOH (96 %, vergällt) + 30 ml Wasser.

Polylysin Lösung (0,5 ml/ml) 10 mg Polylysin (Molekulargewicht > 150 kDa) werden in 20 ml Wasser im Wasserbad bei 30 °C gelöst. Anschließend wird die Lösung portioniert (1 ml) und bei -20 °C aufbewahrt.

Durchführung

Die Objektträger (OT) werden mit Spülmittel unter fließendem Leitungswasser gereinigt und mit Wasser klargespült. Danach werden die OT in einem Coplin-Becher 15 min in 70 % Ethanol gestellt und anschließend an der Luft getrocknet. Die trockenen OT werden mit 80 µl Polylysin-Lösung bedeckt und bei Raumtemperatur für mindestens 1 h in einer feuchten Kammer inkubiert.

Danach werden die Polylysin-beschichteten OT (PL-OT) in einem Coplin-Becher drei Mal für 5 min mit bidest. Wasser gewaschen und an der Luft getrocknet. Die trockenen PL-OT werden in einen sterilen trockenen Coplin-Becher gestellt und unter einer UV-Lampe 45 min sterilisiert.

5.11 Isolation mitotischer Chromosomen nach der Polyamid-Methode

Lösungen

Polyamid-Puffer 10x (100 mM Pipes, 20 mM EDTA, 800 mM KCl, 2 mM Spermin, 5 mM Spermidin, pH 6,8) 3,024 g Pipes; 584 mg EDTA; 5,964 g KCl; 70 mg Spermin und 125 mg Spermidin werden in ca. 50 ml Wasser gelöst, mit NaOH auf pH 6,8 eingestellt und in einem 100 ml Messkolben mit Wasser bis zur Marke aufgefüllt. Die Lösung wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

PMSF-Lösung (10 mM) 17,4 mg Phenylmethylsulfonyl-fluorid (PMSF) werden in 10 ml Isopropanol gelöst. Die Lösung wird im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Polyamid-Puffer (PA-Puffer) (10 mM Pipes, 2 mM EDTA, 80 mM KCl, 0,2 mM Spermin, 0,5 mM Spermidin, pH 6,8) 5 ml Polyamid-Puffer 10x werden mit 45 ml gemischt und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt. Vor Gebrauch werden 500 µl PMSF-Lösung (Endkonzentration 0,1 mM) zupipettiert.

Detergenz-Lösung (10 %) 1 g Nonylphenol oder Triton X-100 werden in 9 ml Wasser gelöst und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Lyse-PA 5 ml PA werden mit 50 μ l Detergenz-Lösung versetzt (Endkonzentration Detergenz 0,1 %).

PA-Puffer mit 20 % Saccharose 20 g Saccharose werden mit PA-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und wird bei -20 °C aufbewahrt.

PA-Puffer mit 30 % Saccharose 30 g Saccharose werden mit PA-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und wird bei -20 °C aufbewahrt.

PA-Puffer mit 40 % Saccharose 40 g Saccharose werden mit PA-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und wird bei -20 °C aufbewahrt.

PA-Puffer mit 50 % Saccharose 50 g Saccharose werden mit PA-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und wird bei -20 °C aufbewahrt.

PA-Puffer mit 60 % Saccharose 50 g Saccharose werden mit PA-Puffer auf 100 ml aufgefüllt und wird bei -20 °C aufbewahrt.

DAPI-Antifade s. Kap 5.8.

5.11.1 Isolation

Die Zellsuspension mit den mitotischen Zellen (Kap. 5.9) wird 5 min bei 500 g abzentrifugiert und das Zellpellet zwei Mal mit jeweils 10 ml PA gewaschen und zentrifugiert. Danach werden die Zellen in 10 ml PA für 10 min bei 37 °C inkubiert und abzentrifugiert (5 min bei 1500 g, Raumtemperatur). Zum Zellpellet werden sofort 5 ml eiskalter Lyse-PA zugegeben und mit einer Nadel (Gauge: 24 G) durch mehrmaliges Aufziehen (15x) in eine Spritze lysiert.

5.11.2 Aufreinigung über Saccharose-Dichtegradient

In ein 15 ml Zentrifugenröhrchen werden jeweils 1 ml von jeder Saccharose-Lösung mit aufsteigendem Saccharose-Gehalt unterschichtet. Der Stufengradient wird auf Eis gekühlt, die lysierte Chromosomensuspension vorsichtig auf die oberste Stufe des Gradienten gelegt und für 1 h bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert.

Nach der Zentrifugation werden die einzelnen Stufen vorsichtig mit einer Glas-Pasteurpipette aufgezogen. Von jeder Fraktion werden 20 μ l auf Polylysin-beschichtete Objektträger (Kap. 5.10)

für 15 min bei 3000 g und 4 °C aufzentrifugiert, fixiert (Kap. 5.8), mit 20 µl DAPI-Antifade eingedeckt und fluoreszenzmikroskopisch betrachtet.

5.12 Tubulinpräparation

Die Isolierung von Tubulin aus schlachtfischem Rinderhirn basiert auf der Methode von Shelanski et al. (1973). Mikrotubulin-Protein (MTP) wird durch zwei Zyklen von Polymerisation und Depolymerisation mit anschließender Ultrazentrifugation von anderen Zellbestandteilen abgetrennt. MTP polymerisiert im zellfreien System in Gegenwart von 0,5 mM Mg²⁺-Ionen und 1 mM GTP bei 37 °C, 4 M Glycerin in der Lösung erhöhen die Ausbeute der Polymerisation. Unter Eiskühlung depolymerisieren die gebildeten Mikrotubuli in ihre Tubulin-Dimere.

In der anschließenden Säulenchromatographie werden die Mikrotubuli-assoziierten Proteine (MAP) von MTP abgetrennt. Die Abtrennung der MAP erfolgt mit dem Kationentauscher Phosphocellulose (PC). Die alkalischen MAP binden an die PC während die sauren Tubulin-Dimere fast unretardiert eluieren.

5.12.1 Präparation von Mikrotubuli-Protein (MTP) aus Rinderhirn

Lösungen

Die angegebenen Mengen reichen für eine Tubulinpräparation aus drei schlachtfischen Rinderhirnen aus.

REA-Puffer 10x (pH 6,4) MES (100 mM); EGTA (1 mM) und MgCl₂ (0,5 mM) werden in 200 ml Wasser gelöst, der pH mit konz. NaOH auf pH 6,4 eingestellt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

REA-Puffer (100 mM MES, 1 mM EGTA, 0,5 mM MgCl₂, pH 6,4) 500 ml REA-Puffer 10x wird mit Wasser auf 5 l aufgefüllt.

REA 4M (pH 6,4) 100 ml REA 10x und 386 g Glycerin (wasserfrei) werden mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt.

REA 8M (pH 6,4) 25 ml REA 10x und 184 g Glycerin (wasserfrei) werden mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

GTP Na₂-Guanosin-5'-triphosphat · 3 H₂O (Serva).

Flüssiger Stickstoff

Durchführung

Alle Lösungen und Rotoren werden 24 h vor Beginn der MTP-Präparation im Kühlschrank auf 4 °C gekühlt. Eine Übersicht der MTP-Präparation ist in Abb. 55 zu sehen.

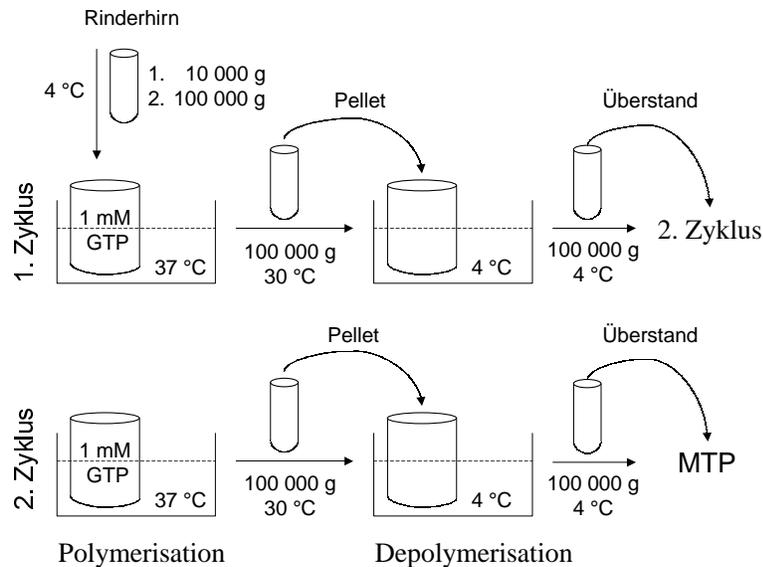


Abb. 55: Schematische Darstellung der MTP-Präparation

Für eine Präparation werden drei schlachtfrischen Rinderhirne (nicht länger als 2 h post mortem) mit einem Gesamtgewicht von 700 bis 800 g verwendet. Das schlachtwarne Material wird eisgekühlt ins Labor transportiert.

Aufarbeitung des Rinderhirns

Im Labor werden die Hirne unter ständiger Eiskühlung mit einer Pinzette vorsichtig von der Hirnhaut und anhängenden Blutgefäßen befreit. Die verbleibende Masse wird zweimal mit eiskaltem REA-Puffer gewaschen und gewogen.

Portionen von etwa 200 g Hirn werden in zirka 150 ml eiskaltem REA 4M (70 ml Puffer pro 100 g Hirn) mit einer Schere grob zerkleinert und anschließend mit dem Pürierstab unter Eiskühlung homogenisiert. In einer Zentrifuge wird das Homogenat 30 min bei 4 °C und 10 000 g zentrifugiert. Der Überstand wird vorsichtig abdenkantiert und in einer Ultrazentrifuge (UZ) 60 min bei 4 °C und 100 000 g zentrifugiert. Diese Lösung wird dem ersten Polymerisations-/Depolymerisationszyklus (Abb. 55) unterworfen.

Erster Polymerisations-/Depolymerisationszyklus

Vom Überstand wird das Volumen bestimmt (ca. 350 ml) und GTP bis zu einer Endkonzentration von etwa 1 mM (ca. 200 mg) zugegeben, und die Lösung im Wasserbad bei 37 °C für 30 min inkubiert. Die Bildung der Mikrotubuli ist an der zunehmenden Trübung der Lösung zu erkennen. Zwischenzeitlich werden Rotor und UZ auf 30 °C temperiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit werden die Mikrotubuli in der UZ abzentrifugiert.

Der Überstand wird verworfen, das Pellet zweimal mit 30 °C warmem REA-Puffer gewaschen und in 80 ml eiskaltem REA-Puffer suspendiert. Damit das Pellet sich auflöst wird sanft unter Eiskühlung gepottert und anschließend 30 min auf Eis depolymerisiert. Währenddessen werden Rotor und UZ auf 4 °C gekühlt. Im Anschluß daran werden die nichtdepolymerisierten Bestandteile bei 60 min bei 30 °C und 100 000 g abzentrifugiert. Der Überstand wird in den zweiten Zyklus eingesetzt, kann aber gegebenenfalls über Nacht bei –20 °C gelagert werden.

Zweiter Polymerisations-/Depolymerisationszyklus

Vom Überstand wird das Volumen bestimmt (ca. 80 ml), mit gleichem Volumen REA 8M ergänzt und GTP bis zu einer Endkonzentration von 1 mM (ca. 90 mg) zugegeben. Die Polymerisation und Zentrifugation erfolgt wie im ersten Zyklus beschrieben.

Der Überstand wird verworfen, das Pellet mit zweimal mit warmem REA-Puffer gewaschen und in 20 ml kaltem REA-Puffer suspendiert, wie im ersten Zyklus beschrieben. Nach 30 min Depolymerisation auf Eis wird der nichtpolymerisierte Anteil wie im ersten Zyklus beschrieben abzentrifugiert.

Der MTP-haltige Überstand (20-25 ml) wird gesammelt, durchmischt und in Kryoröhrchen portioniert (1 ml). Die Lagerung der MTP erfolgt in in flüssigem Stickstoff. Die Proteinbestimmung erfolgt mit der Methode nach Bradford (Kap. 5.12.3). Die Reinheitskontrolle erfolgt mittels Gelelektrophorese Kap. 5.12.4).

5.12.2 Aufreinigung der Mikrotubuli-Proteine über Phosphocellulose

Lösungen

REA-Puffer 10x (pH 6,4) (s. Kapitel 5.12.1)

Säulenpuffer I 100 ml REA-Puffer 10x werden mit 309 mg Dithiothreitol (2 mM) versetzt und mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt (pH 6,4).

Säulenpuffer II 25 ml REA-Puffer 10x werden mit 77 mg Dithiothreitol (2 mM) und 11 g NaCl (0,75 M) versetzt und mit Wasser auf 250 ml aufgefüllt (pH 6,4).

MgSO₄-Lösung (100 mM) werden in REA-Puffer (pH 6,4) (s. Kapitel 5.12.1) gelöst.

GTP Na₂-Guanosin-5'-triphosphat · 3 H₂O

P-23 Servacel

Durchführung

Alle Lösungen kommen eisgekühlt zum Einsatz, die Glassäule muss auf 4 °C gekühlt werden.

15–20 g Phosphocellulose (PC) P-23 werden nach Angaben des Herstellers mit HCl und NaOH gewaschen und in einem Becherglas mit 250 ml kaltem Säulenpuffer I resuspendiert. Das Säulenmaterial wird in die gekühlte Glassäule (2,5 x 45 cm) gefüllt und mit 500 ml Säulepuffer equilibriert.

Die MTP-Lösung wird auf die Säule gegeben und mit Säulenpuffer I eluiert (Fließgeschwindigkeit 20 ml/h). Das Eluat wird in Fraktionen von 2–3 ml gesammelt und der Proteingehalt mit der Methode nach Bradford (Kap. 5.12.3) bestimmt. Tubulin ist in der ersten Proteinfraction enthalten, weil es unretardiert eluiert. Fraktionen mit einem Proteingehalt größer als 0,5 mg/ml werden gesammelt, durchmischt und mit MgSO₄-Lösung auf 1 mM Endkonzentration gebracht. Das erhaltene PC-Tubulin wird nach Proteinbestimmung und Reinheitskontrolle über Gelelektrophorese (Kap. 5.12.4) in flüssigem Stickstoff gelagert.

Die auf der Säule verbliebenen MAP können mit Säulenpuffer II eluiert werden. Proteinbestimmung, Reinheitskontrolle und Konservierung erfolgt wie bei PC-Tubulin beschrieben.

5.12.3 Proteinbestimmung nach Bradford

Der Coomassie-Farbstoff Brilliant-Blau G-250 bindet in saurer Lösung an Proteine. Die dadurch verursachte Verschiebung des Absorptionsmaximums von 495 nm auf 595 nm ermöglicht die Bestimmung von Proteingehalten (Bradford, 1976).

Lösungen

Färbereagenz 10 mg Coomassie Brilliant-Blau G-250 in 5 ml Ethanol lösen, 10 ml ortho-Phosphorsäure (85 %) zugeben und mit Wasser auf 100 ml auffüllen, filtrieren.

BSA–Stammlösung (1 mg/ml w/v) 10 mg Rinderserumalbumin (BSA) in einem Messkolben mit Wasser auf 100 ml auffüllen.

Durchführung

Von der Proteinlösung werden 100 μ l in einem Reaktionsgefäß mit 1 ml Färbereagenz durchmischt. Nach 5 min erfolgt die photometrische Bestimmung in Kunststoffküvetten bei 595 nm. Die Kalibriergerade wird von 10–150 μ g/ml erstellt. Jede Messung wird einer Dreifachbestimmung unterworfen. Vorsicht: hoher Blindwert.

5.12.4 SDS–Polyacrylamid Gelelektrophorese

Die Protein Elektrophorese wurde nach dem Prinzip der denaturierenden diskontinuierlichen SDS–Polyacrylamid Gelelektrophorese (PAGE) im Tris–HCl/Tris–Glycin Puffer nach Laemmli (1970) durchgeführt. Hierbei wird durch das anionische Detergenz Natrium–Dodecylsulfat (SDS) und einem Disulfid–reduzierende Agens eine vollständige Entfaltung der Proteine bewirkt, verbunden mit einem konstanten Ladung/Masse–Verhältnis. Dadurch erfolgt die elektrophoretische Trennung nach dem Molekulargewicht (Weber und Osborn, 1969). Der Gelaufbau als diskontinuierliches System bewirkt mittels Isotachophorese eine Aufkonzentrierung der Proteinlösung vor der eigentlichen Trennung und verbessert dadurch die Auflösung.

Als Gelstand wurde das vertikale Mini–PROTEAN® II System der Firma BioRad mit einer Gelgröße von 60 x 85 x 2 mm für das Trenngel und 15 x 85 x 2 mm für das Sammelgel verwendet.

Lösungen

Probenpuffer (2x), 3,21 g Tris; 2 g SDS; 1,35 ml Eisessig; 10 mg Bromphenolblau; 10 ml Glycerin; 1 ml 3–Mercapto–1,2–propandiol werden Wasser auf 50 ml aufgefüllt.

Acrylamid Stammlösung (AA, 30 % T, 3 % C) 29,1 g Acrylamid; 0,9 g Bisacrylamid werden mit Wasser auf 100 ml aufgefüllt.

Gelpuffer Trenngel (4x, pH 8,8) 18,18 g Tris; 0,4 g SDS werden in etwas Wasser gelöst, mit HCl auf pH 8,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

Gelpuffer Sammelgel (4x, pH 6,8) 6,06 g Tris; 0,4 g SDS werden in etwas Wasser gelöst, mit HCl auf pH 6,8 eingestellt und auf 100 ml aufgefüllt.

APS Starterlösung 40 % (w/v) 40 mg Ammoniumperoxodisulfat in 100 μ l Wasser lösen (jeweils frisch herstellen).

TEMED N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Fluka).

Elektrodenpuffer 10x 30,3 g Tris; 10 g SDS werden mit Wasser auf 1 l Wasser aufgefüllt.

Kathodenpuffer Elektrodenpuffer 10x 1:10 mit Wasser verdünnen.

Andodenpuffer 14,4 g Glycerin; 100 ml Elektrodenpuffer 10x mit Wasser auf 1000 ml auffüllen.

Fixierlösung 40 ml Ethanol + 10 ml Eisessig + 50 ml Wasser.

Färbelösung A 25 mg Coomassie Brilliant Blue (R-250, oder G-250) in einer Mischung aus 45 ml Ethanol + 5 ml Wasser lösen.

Färbelösung B 20 ml Eisessig + 80 ml Wasser.

Entfärbelösung A = Fixierlösung

Entfärbelösung B 20 ml Ethanol + 10 ml Eisessig + 70 ml Wasser.

Glycerinlösung 3 % (w/v) 3 g Glycerin (wasserfrei) + 100 ml Wasser.

Probenvorbereitung

Die Proteinlösung wird mit dem Probenpuffer 1+1 verdünnt, so dass ein Proteingehalt von etwa 1–2 mg/ml resultiert. Zur vollständigen Denaturierung der Proteine wird die Lösung 5 min im kochenden Wasserbad erhitzt. Nach dem Abkühlen ist die Proteinlösung für die Elektrophorese einsatzbereit, und kann im Kühlschrank über mehrere Wochen aufbewahrt werden. Bei komplexen Proteinmischungen (MTP-Lösung) sollten etwa 100–200 mg Protein, bei weniger komplexen Mischungen 10–50 mg Protein für die PAGE eingesetzt werden.

Elektrophorese

Die Gele werden nach folgendem Schema hergestellt:

Trenngel (10 % T, 3 % C)		Sammelgel (4 % T, 3 % C)	
Lösung	Volumen	Lösung	Volumen
AA (30 % T, 3 % C)	5,0 ml	AA (30 % T, 3 % C)	0,6 ml
Gelpuffer, pH 8,8	3,75 ml	Gelpuffer, pH 6,8	1,25 ml
Wasser	7,5 ml	Wasser	3,15 ml
TEMED	20 μ l	TEMED	10 μ l
APS-Lösung	10 μ l	APS-Lösung	10 μ l
Gesamtvolumen	15 ml		5 ml

Die PAGE erfolgt bei Raumtemperatur mit konstanter Spannung von 200 V. Die Laufzeit beträgt etwa 45 min. Für schärfere Banden können die Elektrodenpuffer eisgekühlt eingesetzt werden.

Fixierung und Färbung

Die Färbung der Gele erfolgt bei Raumtemperatur nach folgendem Schema:

Schritt	Lösung	Zeit
Fixierung	100 ml Fixierlösung	30 min
Färbung	50 ml Färbelösung A + 50 ml Färbelösung B	10 min
Entfärbung I	Entfärbelösung A	5 min
Entfärbung II	Entfärbelösung B	solange notwendig
Waschen	Wasser	mehrmals 5 min, oder über Nacht

Bevor das Gel im Geltrockner zur Archivierung auf Filterpapier getrocknet wird, muss das Gel für 20 min in eine 3 %ige Glycerinlösung gelegt werden. Danach wird das Gel im Geltrockner für 2 h auf Filterpapier getrocknet.

5.13 Zellfreie Tubulinpolymerisation

Tubulin polymerisiert im zellfreien System bei 37 °C in Gegenwart von 1 mM GTP und 1 mM Mg²⁺-Ionen. MTP (Kap. 5.12.1) polymerisiert bei geringeren Konzentrationen als PC-Tubulin (Kap. 5.12.2), weil die MAP die Polymerisation begünstigen und die Mikrotubuli stabilisieren.

Lösungen

REA-Puffer Kap. 5.12.1

GTP-Lösung (25 mM) 3 mg Na₂-Guanosin-5'-triphosphat · 3 H₂O werden in 200 µl Wasser gelöst. Die Lösung immer frisch ansetzen.

5.13.1 Polymerisation in Reaktionsgefäßen

In einem Reaktionsgefäß ($V = 1,5$ ml) werden die MTP (Endkonzentration 10 µM) oder PC-Tubulin in 480 µl REA-Puffer vorgelegt. Soll mit Substanz inkubiert werden, wird diese in 5 µl DMSO (Endkonzentration 1 % DMSO) in den Ansatz eingebracht. Bei 37 °C wird für 20 min vorinkubiert, dann die Polymerisation durch Zugabe von 20 µl GTP-Lösung (Endkonzentration 1 mM) gestartet.

Die polymerisationsbedingte Trübungszunahme kann photometrisch bei 350 nm verfolgt werden, dazu wird die Polymerisation in Quarzküvetten und in einem beheizbaren Photometer durchgeführt (Gaskin, 1982).

Die gebildeten Mikrotubuli können nach Zentrifugation für 15 min bei 3000 g und 37 °C auf PL-OT (Kap. 5.10) und anschließender Fixierung und Immunofärbung (Kap. 5.8) fluoreszenzmikroskopisch betrachtet werden.

5.13.2 Polymerisation auf Polylysin-beschichteten Objektträger

In einem Reaktionsgefäß ($V = 1,5$ ml) werden die MTP (Endkonzentration 10 µM) oder PC-Tubulin in 480 µl REA-Puffer vorgelegt. Soll mit Substanz inkubiert werden, wird diese in 5 µl DMSO (Endkonzentration 1 % DMSO) in den Ansatz eingebracht und bei 37 °C für 20 min vorinkubiert und danach auf Raumtemperatur abgekühlt. Die Polymerisation durch Zugabe von 20 µl GTP-Lösung (Endkonzentration 1 mM) gestartet. Sofort nach der GTP-Zugabe werden jeweils 100 µl aus dem Polymerisationsansatz auf zwei PL-OT (Kap. 5.10) pipettiert, mit einem Deckglas bedeckt und bei 37 °C in einer feuchten Kammer 30 min inkubiert.

Die Mikrotubuli können nach Fixierung und Immunofärbung (Kap. 5.8) fluoreszenzmikroskopisch ausgewertet werden.

5.13.3 Kinetochor-Funktions Assay

Damit das Tubulin an den Kinetochoren anpolymerisiert, muss die PC-Tubulin Endkonzentration unterhalb der kritischen Kontrolle liegen. Das heisst, dass unter nicht-stabilisierenden

Bedingungen (Kinetochore, Taxol) keine Polymerisation stattfindet (Mitchison und Kirschner, 1985).

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß werden PC-Tubulin und 10 μ l mitotische Chromosomen in 240 μ l REA-Puffer vorgelegt und für 15 min bei 37 °C vorinkubiert. Die Polymerisation wird nach Zugabe von 10 μ l GTP-Lösung (Endkonzentration 1 mM) gestartet (nach Mitchison und Kirschner (1985)).

Die Bildung von Mikrotubuli kann nach Zentrifugation für 15 min bei 3000 g und 37 °C auf PL-OT (Kap. 5.10) und anschließender Fixierung und Immunofärbung (Kap. 5.8) fluoreszenzmikroskopisch überprüft werden.

6 Literatur

- Abruzzo, M. A. und Hassold, T. J., 1995. Etiology of nondisjunction in humans. *Environ Mol Mutagen*, 25(Suppl 26), 38–47.
- Albert, J. L., Sundstrom, S. A. und Lyttle, C. R., 1990. Estrogen regulation of placental alkaline phosphatase gene expression in a human endometrial adenocarcinoma cell line. *Cancer Research*, 50(11), 3306–3310.
- Anto, R. J., George, J., Babu, K. V., Rajasekharan, K. N. und Kuttan, R., 1996. Antimutagenic and anticarcinogenic activity of natural and synthetic curcuminoids. *Mutation Research*, 370(2), 127–131.
- Anzai, Y., Holinka, C. F., Kuramoto, H. und Gulpide, E., 1989. Stimulatory effects of 4-hydroxytamoxifen on proliferation of human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *Cancer Research*, 49(9), 2362–2365.
- Barnes, S. und Peterson, T. G., 1995. Biochemical targets of the isoflavone genistein in tumor cell lines. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 103–108.
- Barnes, S., Peterson, T. G. und Coward, L., 1995. Rationale for the use of genistein-containing soy matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. *Journal of cellular biochemistry / Supplement*, 22, 181–187.
- Barton, H. A. und Andersen, M. E., 1998. Endocrine active compounds: from biology to dose response assessment. *Critical reviews in toxicology*, 28(4), 363–423.
- Bernas, T. und Dobrucki, J., 2002. Mitochondrial and nonmitochondrial reduction of MTT: interaction of MTT with TMRE, JC-1, and NAO mitochondrial fluorescent probes. *Cytometry*, 47(4), 236–242.
- Bialy, H., 2001. Aneuploidy and cancer—the vintage wine revisited. *Nat Biotechnol*, 19(1), 22–23.
- Black, L. J. und Goode, R. L., 1980. Uterine bioassay of tamoxifen, trioxifene and a new estrogen antagonist (LY117018) in rats and mice. *Life Sci*, 26(17), 1453–1458.
- Bourguet, W., Germain, P. und Gronemeyer, H., 2000. Nuclear receptor ligand-binding domains: three-dimensional structures, molecular interactions and pharmacological implications [In Process Citation]. *Trends in pharmacological sciences*, 21(10), 381–388.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72, 248–254.
- Cahill, D. P., Lengauer, C., Yu, J., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S. D., Kinzler, K. W. und Vogelstein, B., 1998. Mutations of mitotic checkpoint genes in human cancers [see comments]. *Nature*, 392(6673), 300–303.
- Campbell, M. S., Daum, J. R., Gersch, M. S., Nicklas, R. B. und Gorbsky, G. J., 2000. Kinetochores memory of spindle checkpoint signaling in lysed mitotic cells. *Cell motility and the cytoskeleton*, 46(2), 146–156.
- Carere, A., Antoccia, A., Cimini, D., Crebelli, R., Degrassi, F., Leopardi, P., Marcon, F., Sgura, A., Tanzarella, C. und Zijno, A., 1999. Analysis of chromosome loss and non-disjunction in cytokinesis-blocked lymphocytes of 24 male subjects. *Mutagenesis*, 14(5), 491–496.

- Carthew, P., Edwards, R. E., Nolan, B. M., Martin, E. A., Heydon, R. T., White, I. N. und Tucker, M. J., 2000. Tamoxifen induces endometrial and vaginal cancer in rats in the absence of endometrial hyperplasia. *Carcinogenesis*, 21(4), 793–797.
- Chakrabarti, R., Kundu, S. und Kumar, S., 2000. Vitamin A as an enzyme that catalyzes the reduction of MTT to formazan by vitamin C. *Journal of cellular biochemistry*, 80(1), 133–138.
- Chetrite, G. und Pasqualini, J. R., 1997. Steroid sulphotransferase and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase activities in Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cells. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 61(1-2), 27–34.
- Colerangle, J. B. und Roy, D., 1997. Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 60(1-2), 153–160.
- Collins, C. L., Wasa, M., Souba, W. W. und Abcouwer, S. F., 1998. Determinants of glutamine dependence and utilization by normal and tumor-derived breast cell lines. *Journal of cellular physiology*, 176(1), 166–178.
- Compton, D. A., 1998. Production of M-Phase and I-Phase Extracts from Mammalian Cells. *Molecular Endocrinology*, 298, 331–339.
- Constantinou, A., Mehta, R., Runyan, C., Rao, K., Vaughan, A. und Moon, R., 1995. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure- activity relationships. *J Nat Prod*, 58(2), 217–225.
- Croxtall, J. D., Elder, M. G. und White, J. O., 1990. Hormonal control of proliferation in the Ishikawa endometrial adenocarcinoma cell line. *The journal of steroid biochemistry*, 35(6), 665–669.
- DeLean, A., Munson, P. J. und Rodbard, D., 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *American journal of physiology*, 235(2), E97–102.
- Dellarco, V., Voytek, P. und Hollaender, A., 1985. *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*. Plenum Press, New York.
- Dodds, E. C., Golberg, L., Lawson, W. und Robinson, R., 1938. Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature*, 141, 247.
- Eagle, H. B., Oyama, V. I., Levy, M., Horton, C. L. und Fleischmann, R., 1955. The growth response of mammalian cells in tissue culture to L-glutamine and L-glutamic acid. *The Journal of Biological Chemistry*, 218, 607–616.
- Es-Saady, D., Simon, A., Jayat-Vignoles, C., Chulia, A. J. und Delage, C., 1996. MCF-7 cell cycle arrested at G1 through ursolic acid, and increased reduction of tetrazolium salts. *Anticancer research*, 16(1), 481–486.
- Fang, H., Tong, W., Shi, L. M., Blair, R., Perkins, R., Branham, W., Hass, B. S., Xie, Q., Dial, S. L., Moland, C. L. und Sheehan, D. M., 2001. Structure-activity relationships for a large diverse set of natural, synthetic, and environmental estrogens. *Chemical Research in Toxicology*, 14(3), 280–294.
- Franke, A. A., Custer, L. J., Cerna, C. M. und Narala, K., 1995. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 18–26.

- Gaido, K. W., McDonnell, D. P. und Safe, S., 2002. In vitro methods for characterizing chemical interactions with steroid hormone receptors. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors Part I, Band Part 3 von The Handbook of Environmental Chemistriy*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Gardner, R. D. und Burke, D. J., 2000. The spindle checkpoint: two transitions, two pathways. *Trends in cell biology*, 10(4), 154–158.
- Gaskin, F., 1982. Techniques for the study of microtubule assembly in vitro. *Molecular Endocrinology*, 85, 433–439.
- Gesellschaft Deutscher Chemiker (Hg.), 2000. Genistein Modellstoff zur Beschreibung endokriner Wirkungen von Phytoöstrogenen BUA-Stoffbericht 222. S. Hirzel Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart.
- Ghedira-Chekir, L., Maaroufi, K., Zakhama, A., Ellouz, F., Dhoub, S., Creppy, E. E. und Bacha, H., 1998. Induction of a SOS repair system in lysogenic bacteria by zearalenone and its prevention by vitamin E. *Chemico-Biological Interactions*, 113(1), 15–25.
- Glatt, H., Davis, W., Meinel, W., Hermersdorfer, H., Venitt, S. und Phillips, D. H., 1998. Rat, but not human, sulfotransferase activates a tamoxifen metabolite to produce DNA adducts and gene mutations in bacteria and mammalian cells in culture. *Carcinogenesis*, 19(10), 1709–1713.
- Gravanis, A. und Gursipide, E., 1986. Effects of estradiol on deoxyribonucleic acid polymerase alpha activity in the Ishikawa human endometrial adenocarcinoma cell line. *The journal of clinical endocrinology & metabolism*, 63(2), 356–359.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J. M., Argos, P. und Chambon, P., 1986. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature*, 320(6058), 134–139.
- Greene, G. L., Gilna, P., Waterfield, M., Baker, A., Hort, Y. und Shine, J., 1986. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science*, 231(4742), 1150–1154.
- Grosse, Y., Chekir-Ghedira, L., Huc, A., Obrecht-Pflumio, S., Dirheimer, G., Bacha, H. und Pfohl-Leszkowicz, A., 1997. Retinol, ascorbic acid and alpha-tocopherol prevent DNA adduct formation in mice treated with the mycotoxins ochratoxin A and zearalenone. *Cancer Letters*, 114(1-2), 225–229.
- Hahm, E. R., Cheon, G., Lee, J., Kim, B., Park, C. und Yang, C. H., 2002. New and known symmetrical curcumin derivatives inhibit the formation of Fos-Jun-DNA complex. *Cancer Letters*, 184(1), 89–96.
- Haighton, L. A., Hlywka, J. J., Doull, J., Kroes, R., Lynch, B. S. und Munro, I. C., 2002. An evaluation of the possible carcinogenicity of bisphenol A to humans. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 35(2 Pt 1), 238–254.
- Hamel, E. und Lin, C. M., 1981. Glutamate-induced polymerization of tubulin: Characteristics of the reaction and application to the large-scale purification of tubulin. *Archives of biochemistry and biophysics*, 209, 29–40.
- Hata, H., Hamano, M., Watanabe, J. und Kuramoto, H., 1998. Role of estrogen and estrogen-related growth factor in the mechanism of hormone dependency of endometrial carcinoma cells. *Oncology*, 55 Suppl 1, 35–44.
- Hata, H., Holinka, C. F., Pahuja, S. L., Hochberg, R. B., Kuramoto, H. und Gursipide, E., 1987. Estradiol metabolism in Ishikawa endometrial cancer cells. *The journal of steroid biochemistry*, 26(6), 699–704.

- Hata, H. und Kuramoto, H., 1992. Immunocytochemical determination of estrogen and progesterone receptors in human endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa cells). *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 42(2), 201–210.
- Hearnshaw, H., Brown, J. M., Cumming, I. A., Goding, J. R. und Nairn, M., 1972. Endocrinological and histopathological aspects of the infertility in the ewe caused by oestrogenic clover. *Journal of reproduction and fertility*, 28(1), 160–161.
- Henderson, B. E. und Feigelson, H. S., 2000. Hormonal carcinogenesis. *Carcinogenesis*, 21(3), 427–433.
- Herbst, A. L., Ulfelder, H. und Poskanzer, D. C., 1971. Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *New England Journal of Medicine*, 284(15), 878–881.
- Holian, O. und Walter, R. J., 2001. Resveratrol inhibits the proliferation of normal human keratinocytes in vitro. *Journal of cellular biochemistry / Supplement*, Suppl(36), 55–62.
- Holinka, C. F., Hata, H., Gravanis, A., Kuramoto, H. und Gulpide, E., 1986a. Effects of estradiol on proliferation of endometrial adenocarcinoma cells (Ishikawa line). *The journal of steroid biochemistry*, 25(5B), 781–786.
- Holinka, C. F., Hata, H., Kuramoto, H. und Gulpide, E., 1986b. Effects of steroid hormones and anti-steroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa line). *Cancer Research*, 46(6), 2771–2774.
- Holinka, C. F., Hata, H., Kuramoto, H. und Gulpide, E., 1986c. Responses to estradiol in a human endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa). *The journal of steroid biochemistry*, 24(1), 85–89.
- Hsu, T. C. und Satya-Prakash, K. L., 1985. Aneuploidy Induction by Mitotic Arrestants in Animals Cell Systems: Possible Mechanisms. In Dellarco, Voytek und Hollaender (Hg.), *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*, Band 36, 279–287. Plenum Press, New York and London.
- Inoue, S., 1996. Mitotic organization and force generation by assembly/disassembly of microtubules. *Cell structure and function*, 21(5), 375–379.
- Inoue, S. und Salmon, E. D., 1995. Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell*, 6(12), 1619–1640.
- Irani, N., Wirth, M., van Den Heuvel, J. und Wagner, R., 1999. Improvement of the primary metabolism of cell cultures by introducing a new cytoplasmic pyruvate carboxylase reaction. *Biotechnology & bioengineering*, 66(4), 238–246.
- Jordan, D. C., Flood, J. G., LaPosata, M. und Lewandrowski, K. B., 1992. Normal Reference laboratory values. *New England Journal of Medicine*, 327, 718.
- King, W. J. und Greene, G. L., 1984. Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature*, 307(5953), 745–747.
- Kirkman, G. und Bacon, R. L., 1950. Malignant renal tumors in male hamsters (*Cricetus auratus*) treated with estrogen. *Cancer Research*, 10, 122.
- Kirschner, M. und Mitchison, T., 1986. Beyond self-assembly: from microtubules to morphogenesis. *Cell*, 45(3), 329–342.

- Kotov, A., Falany, J. L., Wang, J. und Falany, C. N., 1999. Regulation of estrogen activity by sulfation in human Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 68(3-4), 137–144.
- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permut, S. F., Tokes, L. und Feldman, D., 1993. Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving [see comments]. *Endocrinology*, 132(6), 2279–2286.
- Kuiper, G. G., Carlsson, B., Grandien, K., Enmark, E., Haggblad, J., Nilsson, S. und Gustafsson, J. A., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*, 138(3), 863–870.
- Kuiper, G. G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S. und Gustafsson, J. A., 1996. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(12), 5925–5930.
- Kuiper-Goodman, T., Scott, P. M. und Watanabe, H., 1987. Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regulatory toxicology and pharmacology*, 7(3), 253–306.
- Kulling, S. E., Lehmann, L. und Metzler, M., 2002. Oxidative metabolism and genotoxic potential of major isoflavone phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 777(1-2), 211–218.
- Kushner, P. J., Agard, D. A., Greene, G. L., Scanlan, T. S., Shiau, A. K., Uht, R. M. und Webb, P., 2000. Estrogen receptor pathways to AP-1. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 74(5), 311–317.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(259), 680–685.
- Lamartiniere, C. A., Moore, J., Holland, M. und Barnes, S., 1995. Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 120–123.
- Le Guevel, R. und Pakdel, F., 2001. Assessment of oestrogenic potency of chemicals used as growth promoter by in-vitro methods. *Human reproduction*, 16(5), 1030–1036.
- Leffers, H., Naesby, M., Vendelbo, B., Skakkebaek, N. E. und Jorgensen, M., 2001. Oestrogenic potencies of Zeranol, oestradiol, diethylstilboestrol, Bisphenol-A and genistein: implications for exposure assessment of potential endocrine disrupters. *Human reproduction*, 16(5), 1037–1045.
- Lehmann, L., 2002. Untersuchungen zum genotoxischen Potential von Substanzen mit estrogenen Wirkung. Dissertation, Universität Karlsruhe.
- Lessey, B. A., Ilesanmi, A. O., Castelbaum, A. J., Yuan, L., Somkuti, S. G., Chwalisz, K. und Satyaswaroop, P. G., 1996. Characterization of the functional progesterone receptor in an endometrial adenocarcinoma cell line (Ishikawa): progesterone-induced expression of the alpha1 integrin. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 59(1), 31–39.
- Li, R., Sonik, A., Stindl, R., Rasnick, D. und Duesberg, P., 2000. Aneuploidy vs. gene mutation hypothesis of cancer: recent study claims mutation but is found to support aneuploidy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(7), 3236–3241.
- Liang, J. und Brinkley, B., 1985. Chemical probes and possible targets for the induction of aneuploidy. In Dellarco, V., Voytek, P. und Hollaender, A. (Hg.), *Aneuploidy: Etiology and Mechanisms*, 491–505. Plenum Press, New York.

- Liehr, J. G., 2000. Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine reviews*, 21(1), 40–54.
- Littlefield, B. A., Gurbide, E., Markiewicz, L., McKinley, B. und Hochberg, R. B., 1990. A simple and sensitive microtiter plate estrogen bioassay based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells: estrogenic action of delta 5 adrenal steroids. *Endocrinology*, 127(6), 2757–2762.
- Liu, Y., Peterson, D. A., Kimura, H. und Schubert, D., 1997. Mechanism of cellular 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction. *Journal of neurochemistry*, 69(2), 581–593.
- Maney, T., Ginkel, L. M., Hunter, A. W. und Wordeman, L., 2000. The kinetochore of higher eucaryotes: a molecular view. *International review of cytology*, 194, 67–131.
- Markey, C. M., Michaelson, C. L., Sonnenschein, C. und Soto, A. M., 2001. Alkylphenols and Bisphenol A as Environmental Estrogens. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors Part 1, Band Part 3 von The Handbook of Environmental Chemistry*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H. und Gurbide, E., 1993. In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 45(5), 399–405.
- Mates, J. M., Perez-Gomez, C., Nunez de Castro, I., Asenjo, M. und Marquez, J., 2002. Glutamine and its relationship with intracellular redox status, oxidative stress and cell proliferation/death. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 34(5), 439–458.
- McDonnell, D. P., Dana, S. L., Hoener, P. A., Lieberman, B. A., Imhof, M. O. und Stein, R. B., 1995. Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone- activated estrogen receptor. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 761, 121–137.
- Messina, M., 1995. Isoflavone intakes by Japanese were overestimated. *The American journal of clinical nutrition*, 62(3), 645.
- Misumi, Y., Oda, K. und Ikehara, Y., 1986. Induction of alkaline phosphatase and its transport to cell surface in primary culture of rat hepatocytes: effect of the antimicrotubular agent colchicine. *Journal of biochemistry*, 100(2), 433–438.
- Mitchison, T. J. und Kirschner, M. W., 1985. Properties of the kinetochore in vitro. I. Microtubule nucleation and tubulin binding. *The Journal of Cell Biology*, 101(3), 755–765.
- Mitlak, B. H. und Cohen, F. J., 1997. In search of optimal long-term female hormone replacement: the potential of selective estrogen receptor modulators. *Hormone research*, 48(4), 155–163.
- Moroi, Y., Peebles, C., Fritzler, M. J., Steigerwald, J. und Tan, E. M., 1980. Autoantibody to centromere (kinetochore) in scleroderma sera. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 77(3), 1627–1631.
- Mueller, S. und Korach, K. S., 2001. Mechanisms of Estrogen Receptor-Mediated Agonistic and Antagonistic Effects. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors, Band 3 von The Handbook of Environmental Chemistry*, 3–25. Springer, Berlin, Heidelberg, New York.
- Nagel, S. C., vom Saal, F. S., Thayer, K. A., Dhar, M. G., Boechler, M. und Welshons, W. V., 1997. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative in vivo bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol [see comments]. *Environ Health Perspect*, 105(1), 70–76.

- Nandi, S., Guzman, R. C. und Yang, J., 1995. Hormones and mammary carcinogenesis in mice, rats, and humans: a unifying hypothesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 92(9), 3650–3657.
- Newbold, R. R., 2002. Effect of perinatal estrogen exposure on fertility and Cancer in mice. In Metzler, M. (Hg.), *Endocrine Disruptors Part II, Band Part 3 von The Handbook of Environmental Chemistriy*. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- Newbold, R. R., Bullock, B. C. und McLachlan, J. A., 1990. Uterine adenocarcinoma in mice following developmental treatment with estrogens: a model for hormonal carcinogenesis. *Cancer Research*, 50(23), 7677–7681.
- Olea, N., Pulgar, R., Perez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A. M. und Sonnenschein, C., 1996. Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry. *Environ Health Perspect*, 104(3), 298–305.
- Parry, J. M., Parry, E. M., Bourner, R., Doherty, A., Ellard, S., O'Donovan, J., Hoebee, B., de Stopelaar, J. M., Mohn, G. R., Onfelt, A., Renglin, A., Schultz, N., Soderpalm-Berndes, C., Jensen, K. G., Kirsch-Volders, M., Elhajouji, A., Van Hummelen, P., Degrassi, F., Antocchia, A., Cimini, D., Izzo, M., Tanzarella, C., Adler, I. D., Kliesch, U., Hess, P. und et al., 1996. The detection and evaluation of aneugenic chemicals. *Mutat Res*, 353(1-2), 11–46.
- Pfeiffer, E. und Metzler, M., 2003. Effect of Bisphenol A on Drug Metabolizing Enzymes in Rat Hepatic Microsomes and Precision-Cut Rat Liver Slices. *Chemical Research in Toxicology*, submitted for Publication.
- Pfeiffer, E., Rosenberg, B., Deuschel, S. und Metzler, M., 1997. Interference with microtubules and induction of micronuclei in vitro by various bisphenols. *Mutation Research*, 390(1-2), 21–31.
- Pihan, G. A., Purohit, A., Wallace, J., Knecht, H., Woda, B., Quesenberry, P. und Doxsey, S. J., 1998. Centrosome defects and genetic instability in malignant tumors. *Cancer Research*, 58(17), 3974–3985.
- Pottenger, L. H., Domoradzki, J. Y., Markham, D. A., Hansen, S. C., Cagen, S. Z. und Waechter, J. M., J., 2000. The relative bioavailability and metabolism of bisphenol A in rats is dependent upon the route of administration. *Toxicol Sci*, 54(1), 3–18.
- Potter, S. M., Pertile, J. und Berber-Jimenez, M. D., 1996. Soy protein concentrate and isolated soy protein similarly lower blood serum cholesterol but differently affect thyroid hormones in hamsters. *J Nutr*, 126(8), 2007–2011.
- Reid, E. E. und Wilson, E., 1944. The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-Dihydroxydiphenylmethanes. *J Am Chem Soc*, 66, 967–971.
- Riecke, K. und Stahlmann, R., 2000. Test systems to identify reproductive toxicants. *Andrologia*, 32(4-5), 209–218.
- Rubin, B. L., Dorfman, A. S. und Black, L., 1951. Bioassay of estrogens using the mouse uterine response. *Endocrinology*, 49, 429–439.
- Ruby, A. J., Kuttan, G., Babu, K. D., Rajasekharan, K. N. und Kuttan, R., 1995. Anti-tumour and antioxidant activity of natural curcuminoids. *Cancer Letters*, 94(1), 79–83.
- Rusanov, A. L., 1994. Condensation polymers based on chloral and its derivatives. *Progress in Polymer Science*, 19, 589–662.

- SCF, 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins. Part 2: Zearalenone (ZEA). Technischer Bericht SCF/CS/CNTM/MYC/22 Rev 3 Final, European Commission.
- SCF, 2002. Opinion of the Scientific Committee on Food on Bisphenol A. Technischer Bericht SCF/CS/PM/3936/Final, European Commission.
- Schneweis, I., Meyer, K., Engelhardt, G. und Bauer, J., 2002. Occurrence of zearalenone-4-beta-D-glucopyranoside in wheat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(6), 1736–1738.
- Scudiero, D. A., Shoemaker, R. H., Paull, K. D., Monks, A., Tierney, S., Nofziger, T. H., Currens, M. J., Seniff, D. und Boyd, M. R., 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Research*, 48(17), 4827–4833.
- Sen, S., 2000. Aneuploidy and cancer. *Curr Opin Oncol*, 12(1), 82–88.
- Setchell, K. D. und Cassidy, A., 1999. Dietary isoflavones: biological effects and relevance to human health. *J Nutr*, 129(3), 758S–767S.
- Setchell, K. D., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J. und Heubi, J. E., 1997. Exposure of infants to phytoestrogens from soy-based infant formula. *The Lancet*, 350(9070), 23–27.
- She, Q. B., Mukherjee, J. J., Huang, J. S., Crilly, K. S. und Kiss, Z., 2000. Growth factor-like effects of placental alkaline phosphatase in human fetus and mouse embryo fibroblasts. *FEBS letters*, 469(2-3), 163–167.
- Shelanski, M. L., Gaskin, F. und Cantor, C. R., 1973. Microtubule assembly in the absence of added nucleotides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 70(3), 765–768.
- Simard, J., Sanchez, R., Poirier, D., Gauthier, S., Singh, S. M., Merand, Y., Belanger, A., Labrie, C. und Labrie, F., 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 Research*, 57(16), 3494–3497.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J., Bokesch, H., Kenney, S. und Boyd, M., 1990. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, 82, 1107–1112.
- Soto, A., Sonnenschein, C., Chung, K., Fernandez, M. F., Olea, N. und Serrano, F. O., 1995. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103 (Suppl. 7), 113–122.
- Tada, A., Sasaki, H., Nakamura, J., Yoshihama, M. und Terashima, Y., 1993. Aromatase activity and the effect of estradiol and testosterone on DNA synthesis in endometrial carcinoma cell lines. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 44(4-6), 661–666.
- Takahashi, S., Abe, T., Gotoh, J. und Fukuuchi, Y., 2002. Substrate-dependence of reduction of MTT: a tetrazolium dye differs in cultured astroglia and neurons. *Neurochemistry international*, 40(5), 441–448.
- Telfer, J. F. und Green, C. D., 1993. Placental alkaline phosphatase activity is inversely related to cell growth rate in HeLaS3 cervical cancer cells. *FEBS letters*, 329(3), 238–244.

- Tomaszewski, J., Miturski, R., Semczuk, A., Kotarski, J. und Jakowicki, J., 1998. [Tissue zearalenone concentration in normal, hyperplastic and neoplastic human endometrium]. *Ginekologia polska*, 69(5), 363–366.
- Tsutsui, T., Maizumi, H., McLachlan, J. A. und Barrett, J. C., 1983. Aneuploidy induction and cell transformation by diethylstilbestrol: a possible chromosomal mechanism in carcinogenesis. *Cancer Research*, 43(8), 3814–3821.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Suzuki, A., Hirose, Y., Kobayashi, M., Nishimura, H., Metzler, M. und Barrett, J. C., 2000a. Mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols. *Int J Cancer*, 86(2), 151–154.
- Tsutsui, T., Tamura, Y., Yagi, E. und Barrett, J. C., 2000b. Involvement of genotoxic effects in the initiation of estrogen-induced cellular transformation: studies using Syrian hamster embryo cells treated with 17beta-estradiol and eight of its metabolites. *International journal of cancer*, 86(1), 8–14.
- Valdivia, M. M. und Brinkley, B. R., 1985. Fractionation and initial characterization of the kinetochore from mammalian metaphase chromosomes. *The Journal of Cell Biology*, 101(3), 1124–1134.
- Valdivia, M. M. und Brinkley, B. R., 1986. Isolation of a kinetochore-centromere fraction from HeLa metaphase chromosomes. *Molecular Endocrinology*, 134, 268–280.
- Vig, B. K., Yoo, H. J. und Schiffmann, D., 1991. Kinetochore proteins, peripheral location of chromosomes and nuclear budding: another look at the genesis of aneuploidy. *Mutagenesis*, 6(5), 361–367.
- Wasa, M., Bode, B. P., Abcouwer, S. F., Collins, C. L., Tanabe, K. K. und Souba, W. W., 1996. Glutamine as a regulator of DNA and protein biosynthesis in human solid tumor cell lines. *Annals of surgery*, 224(2), 189–197.
- Webb, P., Lopez, G. N., Uht, R. M. und Kushner, P. J., 1995. Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens. *Molecular Endocrinology*, 9(4), 443–456.
- Weber, K. und Osborn, M., 1969. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *The Journal of Biological Chemistry*, 244(16), 4406–4412.
- Wei, H., Bowen, R., Cai, Q., Barnes, S. und Wang, Y., 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proc Soc Exp Biol Med*, 208(1), 124–130.
- Weingarten, M. D., Lockwood, A. H., Hwo, S. Y. und Kirschner, M. W., 1975. A protein factor essential for microtubule assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 72(5), 1858–1862.
- Weisenberg, R. C., 1972. Microtubule formation in vitro in solutions containing low calcium concentrations. *Science*, 177(54), 1104–1105.
- White, I. N., 1999. The tamoxifen dilemma. *Carcinogenesis*, 20(7), 1153–1160.
- Willard, S. T. und Frawley, L. S., 1998. Phytoestrogens have agonistic and combinatorial effects on estrogen-responsive gene expression in MCF-7 human breast cancer cells. *Endocrine*, 8(2), 117–121.
- Williams, C. R., Lee, J. R. und Lee, J. C., 1982. Preparation of tubulin from brain. *Molecular Endocrinology*, 85, 377–385.

- Williams, R. C. und Detrich, W. H., 1979. Separation of tubulin from microtubule-associated proteins on phosphocellulose. Accompanying alterations in concentrations of buffer components. *Biochemistry*, 18(12), 2499–2503.
- Yager, J. D. und Liehr, J. G., 1996. Molecular mechanisms of estrogen carcinogenesis. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 36, 203–232.
- Yamauchi, K., Komatsu, T., Kulkarni, A. D., Ohmori, Y., Minami, H., Ushiyama, Y., Nakayama, M. und Yamamoto, S., 2002. Glutamine and arginine affect Caco-2 cell proliferation by promotion of nucleotide synthesis. *Nutrition*, 18(4), 329–333.
- York, J. L., Maddox, L. C., Zimniak, P., McHugh, T. E. und Grant, D. F., 1998. Reduction of MTT by glutathione S-transferase. *Biotechniques*, 25(4), 622–624, 626–628.
- Zielinski, J. E., Pahuja, S. L., Lerner, J. M. und Hochberg, R. B., 1991. Estrogenic action of estriol fatty acid esters. *The journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 38(4), 399–405.
- Zinkowski, R. P., McCune, S. L., Balczon, R. D., Rao, P. N. und Brinkley, B. R., 1990. The centromere and aneuploidy: II. Drug induced detachment and fragmentation of kinetochores of mammalian chromosomes. *Progress in clinical and biological research*, 340B, 223–236.

Anhang

Tabellen und Abbildungen

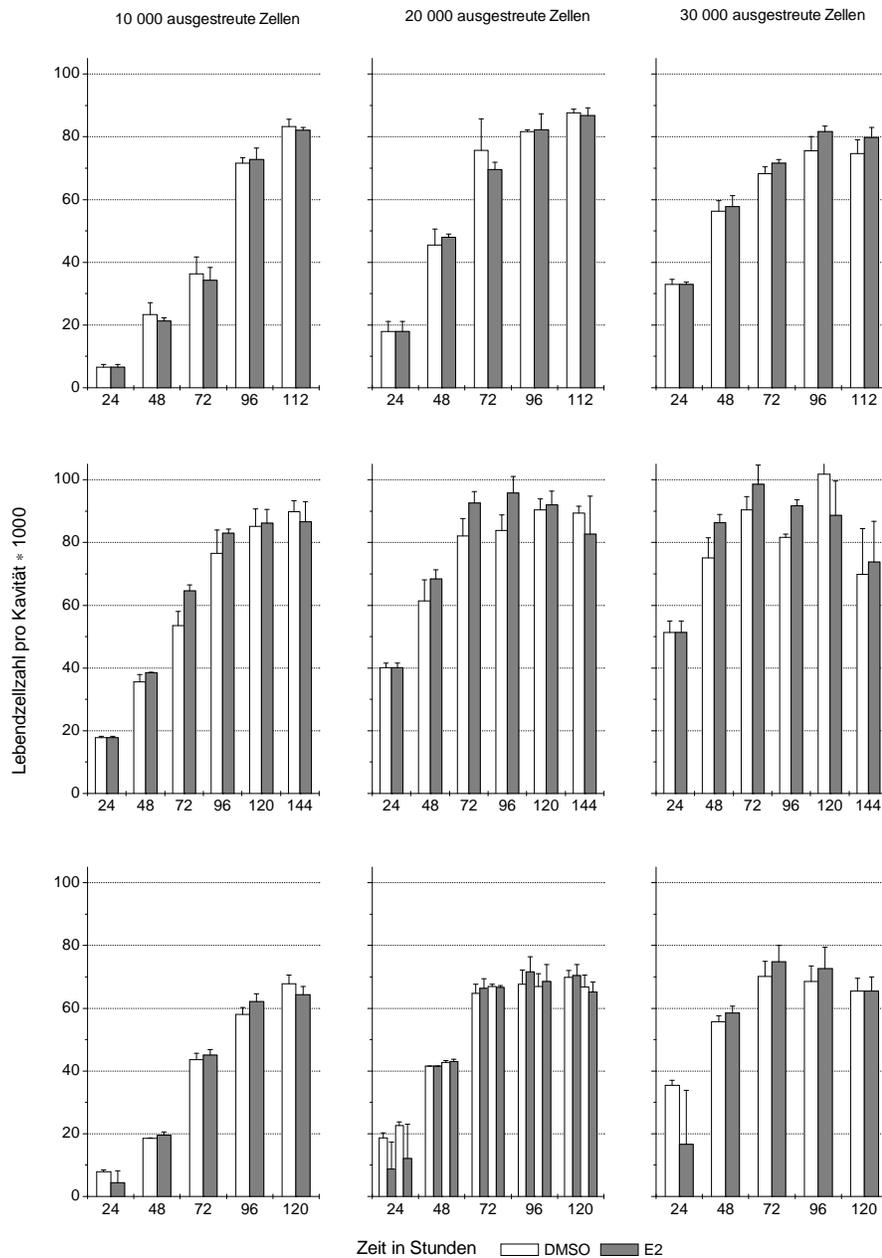


Abb. 56: Vergleich der Zellzahlen nach Inkubation von Ishikawa Zellen mit 1 nM E2 oder 0,1 % DMSO in Mikrotiterplatten. Jede Zeile steht für einen unabhängigen Versuch, die linke Spalte zeigt die Entwicklung der Lebendzellzahl für 10 000, die mittlere für 20 000 und die rechte für 30 000 Zellen. Die helleren Balken in jedem Diagramm stehen für die Zellzahlen nach Inkubation mit DMSO, die dunkleren für die Inkubation mit 1 nM E2.x

Tabelle 17: Vergleich der Lebendzellzahlen nach Inkubation mit 0,1 % DMSO und 1 nM E2 für 48 und 72 Stunden. SD, Standardabweichung; p, Wahrscheinlichkeit t-Test; *, Unterschied signifikant; Signifikanzniveau 95 %.

Versuch	t = 0			48 h DMSO			48 h E2			72 h DMSO			72 h E2		
	Zellzahl	Zellzahl	SD	Zellzahl	SD	p	Zellzahl	SD	p	Zellzahl	SD	Zellzahl	SD	p	
A	9308	47164	3349	51934	3668	0,10	70580	1776		75455	6209	0,18			
A	14290	59284	77333	63746	3943	0,30	79737	6235		74472	7540	0,32			
A	18548	64324	2888	69806	3394	0,05	75440	3237		74510	8014	0,84			
A	21980	67609	2987	71224	4409	0,22	76542	1688		77517	6821	0,79			
A	28800	64136	1534	71434	3919	0,01*	77562	5575		79535	3855	0,58			
B	10616	55011	7504	64528	12925	0,25	67328	3250		66338	4327	0,73			
B	14778	64251	2754	60373	4034	0,16	66750	4851		65955	4879	0,82			
B	19612	65233	4409	69538	7486	0,36	61650	4807		68685	3518	0,06			
B	24320	62211	3357	70153	7750	0,11	60743	5203		65033	6673	0,35			
B	27480	60553	7216	71031	8156	0,10	55853	4171		65798	3070	0,01*			
C	11428	45840	2180	51727	2193	0,01*	57722	3046		66452	5140	0,03*			
C	16610	67800	2605	74272	3862	0,03*	63790	4598		73847	16898	0,29			
C	21360	85185	899	81960	4420	0,20	58825	5818		66437	12908	0,32			
C	21400	84525	12174	90105	6348	0,45	62425	8543		70990	6113	0,15			
C	30540	79275	3559	78757	3833	0,85	56545	1392		63062	3899	0,02*			
D	10336	37832	3804	41102	4399	0,30	67559	12454		73312	2631	0,40			
D	14552	50837	1731	60527	3541	< 0,001*	63742	3063		68767	9380	0,35			
D	18668	58907	4108	64742	4236	0,1	55889	5648		62354	13661	0,42			
D	27400	59222	3655	66144	1830	0,01*	59872	2116		66052	9595	0,26			
D	26360	57219	4161	52337	8988	0,36	56287	6478		62759	10831	0,09			
E	10664	62281	21962	48006	5757	0,33	57532	2192		61672	2527	0,10			
E	19584	64476	2853	66076	2987	0,54	67270	4492		71182	4753	0,32			
E	21106	71094	8936	67659	5134	0,53	66505	4119		68162	5326	0,66			
E	31160	63017	4720	74456	5315	0,28	59979	11239		76585	10530	0,69			

Tabelle 18: Vergleich der MTT-Formazan Extinktionen nach Inkubation mit 0,1 % DMSO und 1 nM E2 für 48 und 72 Stunden. SD, Standardabweichung; p, Wahrscheinlichkeit t-Test; *, Unterschied signifikant; Signifikanzniveau 95 %.

Versuch	t = 0 Zellzahl	48 h DMSO			48 h E2			72 h DMSO			72 h E2		
		Ext.	SD	p	Ext.	SD	p	Ext.	SD	p	Ext.	SD	p
A	9308	0,688	0,044	0,22	0,741	0,067	0,22	0,860	0,072	0,877	0,091	0,87	
A	14290	0,733	0,037	0,30	0,763	0,086	0,30	0,773	0,054	0,770	0,060	0,76	
A	18548	0,811	0,047	0,90	0,827	0,050	0,90	0,783	0,095	0,741	0,073	0,86	
A	21980	0,860	0,031	0,60	0,841	0,034	0,60	0,759	0,086	0,742	0,055	0,83	
A	28800	0,953	0,043	0,21	0,885	0,059	0,21	0,804	0,040	0,774	0,049	0,83	
B	10616	0,888	0,053	< 0,001*	0,991	0,035	< 0,001*	0,820	0,083	0,833	0,059	0,95	
B	14778	1,002	0,075	0,38	1,033	0,051	0,38	0,728	0,047	0,742	0,034	0,78	
B	19612	1,018	0,049	0,44	1,015	0,053	0,44	0,674	0,061	0,702	0,049	0,63	
B	24320	1,006	0,038	0,66	0,998	0,058	0,66	0,655	0,073	0,694	0,051	0,32	
B	27480	1,063	0,109	0,28	1,097	0,057	0,28	0,699	0,022	0,748	0,051	0,09	
C	11428	0,909	0,012	0,34	0,909	0,045	0,34	0,837	0,065	0,781	0,058	0,38	
C	16610	1,060	0,050	0,35	1,036	0,031	0,35	0,700	0,058	0,657	0,040	0,15	
C	21360	1,106	0,096	0,07	0,999	0,036	0,07	0,644	0,030	0,598	0,024	0,31	
C	21400	1,065	0,077	0,08	0,951	0,050	0,08	0,604	0,036	0,591	0,020	0,73	
C	30540	1,119	0,086	0,15	1,043	0,047	0,15	0,700	0,071	0,680	0,067	0,88	
D	10336	0,821	0,053	1,28	0,878	0,036	1,28	0,954	0,072	0,965	0,025	0,85	
D	14552	0,933	0,065	0,46	0,944	0,030	0,46	0,862	0,050	0,902	0,029	0,25	
D	18668	0,866	0,046	0,23	0,928	0,023	0,23	0,789	0,032	0,830	0,041	0,28	
D	27400	0,896	0,047	0,67	0,911	0,026	0,67	0,718	0,029	0,764	0,021	0,13	
D	26360	0,852	0,038	0,03*	0,911	0,037	0,03*	0,717	0,011	0,744	0,041	0,13	
E	10664	0,837	0,059	< 0,001*	0,928	0,011	< 0,001*	0,884	0,097	0,757	0,081	0,002*	
E	19584	1,076	0,073	0,85	1,061	0,038	0,85	0,871	0,044	0,741	0,069	< 0,001*	
E	21106	1,011	0,057	0,11	1,107	0,058	0,11	0,908	0,044	0,851	0,035	0,02*	
E	31160	1,091	0,057	0,01*	1,169	0,041	0,01*	0,908	0,059	0,813	0,033	0,002*	

Tabelle 19: Vergleich der Lebendzellzahlen und MTT-Formazan Extinktion nach 48 und 72 Stunden Inkubation. SD, Standardabweichung; p, Wahrscheinlichkeit t-Test; *, Unterschied signifikant; Signifikanzniveau 95 %.

Versuch	t = 0		48 h		72 h		48 h		72 h			
	Zellzahl	SD	Zellzahl	SD	Zellzahl	SD	p	Ext	SD	Ext	SD	p
A	9308	4132	49549	4132	73017	4966	< 0,001*	0,714	0,060	0,869	0,079	< 0,001*
A	14290	6163	61515	6163	77105	6996	< 0,001*	0,748	0,065	0,771	0,054	0,4
A	18548	4135	67065	4135	74975	5680	0,009*	0,819	0,047	0,762	0,084	0,04*
A	21980	3986	69416	3986	77030	4629	0,005*	0,851	0,032	0,750	0,069	< 0,001*
A	28800	4775	67785	4775	78548	4561	< 0,001*	0,919	0,061	0,789	0,045	< 0,001*
B	10616	11028	59769	11028	66833	3582	0,05	0,940	0,069	0,860	0,087	< 0,001*
B	14778	3810	62312	3810	66353	4525	0,02	1,018	0,063	0,784	0,096	< 0,001*
B	19612	6136	67386	6136	65168	5417	0,85	1,017	0,048	0,736	0,099	< 0,001*
B	24320	69711	66182	69711	62888	5995	0,62	1,002	0,047	0,720	0,101	< 0,001*
B	27480	9066	65792	9066	60825	6305	0,41	1,080	0,085	0,747	0,061	< 0,001*
C	11428	3742	48784	3742	62087	6089	< 0,001*	0,909	0,031	0,809	0,066	< 0,001*
C	16610	4612	71036	4612	68819	12663	0,83	1,048	0,042	0,678	0,053	< 0,001*
C	21360	3419	83572	3419	62631	10123	< 0,001*	1,052	0,089	0,621	0,035	< 0,001*
C	21400	9470	87315	9470	66707	8261	< 0,001*	1,008	0,086	0,597	0,029	< 0,001*
C	30540	3435	79016	3435	59804	4414	< 0,001*	1,081	0,077	0,690	0,066	< 0,001*
D	10336	4189	39467	4189	70435	8882	< 0,001*	0,850	0,053	0,959	0,052	< 0,001*
D	14552	5787	55682	5787	66254	6996	0,001*	0,938	0,049	0,882	0,044	0,008*
D	18668	4965	61824	4965	59122	10276	0,88	0,897	0,047	0,809	0,041	< 0,001*
D	27400	4566	62683	4566	62962	7231	0,45	0,904	0,037	0,741	0,034	< 0,001*
D	26360	6990	54778	6990	62759	10831	0,04*	0,882	0,047	0,731	0,032	< 0,001*
E	10664	17619	56163	17619	59602	3101	0,64	0,889	0,059	0,829	0,059	0,2*
E	19584	2755	65276	2755	68947	4690	0,11	1,080	0,073	0,823	0,073	< 0,001*
E	21106	6992	69376	6992	67215	4327	0,52	1,103	0,057	0,908	0,057	< 0,001*
E	31160	5148	71849	5148	74972	10229	0,46	1,158	0,057	0,886	0,057	< 0,001*

Tabelle 20: Enzymaktivität der AP nach 48 h und 72 h Inkubation mit DMSO (AP DMSO) und 1 nM E2 (AP E2) im Vergleich zur Lebendzellzahl (Zz). Die Enzymaktivität (AP) wurde als Bildung 4-NP in pmol/min berechnet.

Versuch	ausg. Zz	48 h Inkubation		72 h Inkubation			
		Zz	AP DMSO	AP E2	Zz	AP DMSO	AP E2
A	9308	49279	35,4	375	71529	33,6	96
A	14290	63237	40,8	645	77105	48,1	91
A	18548	65980	49,7	698	73363	52,1	85
A	21980	68237	54,4	612	76545	57,3	72
A	28800	67785	62,2	472	78548	56,1	57
B	10616	59769	25,8	319	66833	42,1	106
B	14778	62312	37,5	529	66353	48,4	108
B	19612	67386	46,2	548	65186	54,3	99
B	24320	66182	53,7	551	62888	51,4	93
B	27480	65792	55,8	475	60825	54,3	85
C	11428	48784	33,8	381	60533	44,6	149
C	16610	71036	49,0	655	63519	55,0	151
C	21360	84657	60,1	726	59453	61,3	164
C	21400	85355	51,1	716	66707	62,0	142
C	30540	79016	60,3	636	58553	75,3	147
D	10336	39322	17,1	194	68185	35,7	106
D	14552	55252	28,6	326	65979	41,6	118
D	18668	61842	37,1	379	58879	46,3	127
D	27400	63842	40,8	393	58469	46,6	103
D	26360	56676	41,5	283	60395	47,3	57
E	10664	44056	16,1	320	59602	19,1	115
E	19584	65276	36,3	653	68947	41,5	143
E	21106	66526	37,4	739	67215	42,3	153
E	31160	71849	48,6	720	70127	44,4	113

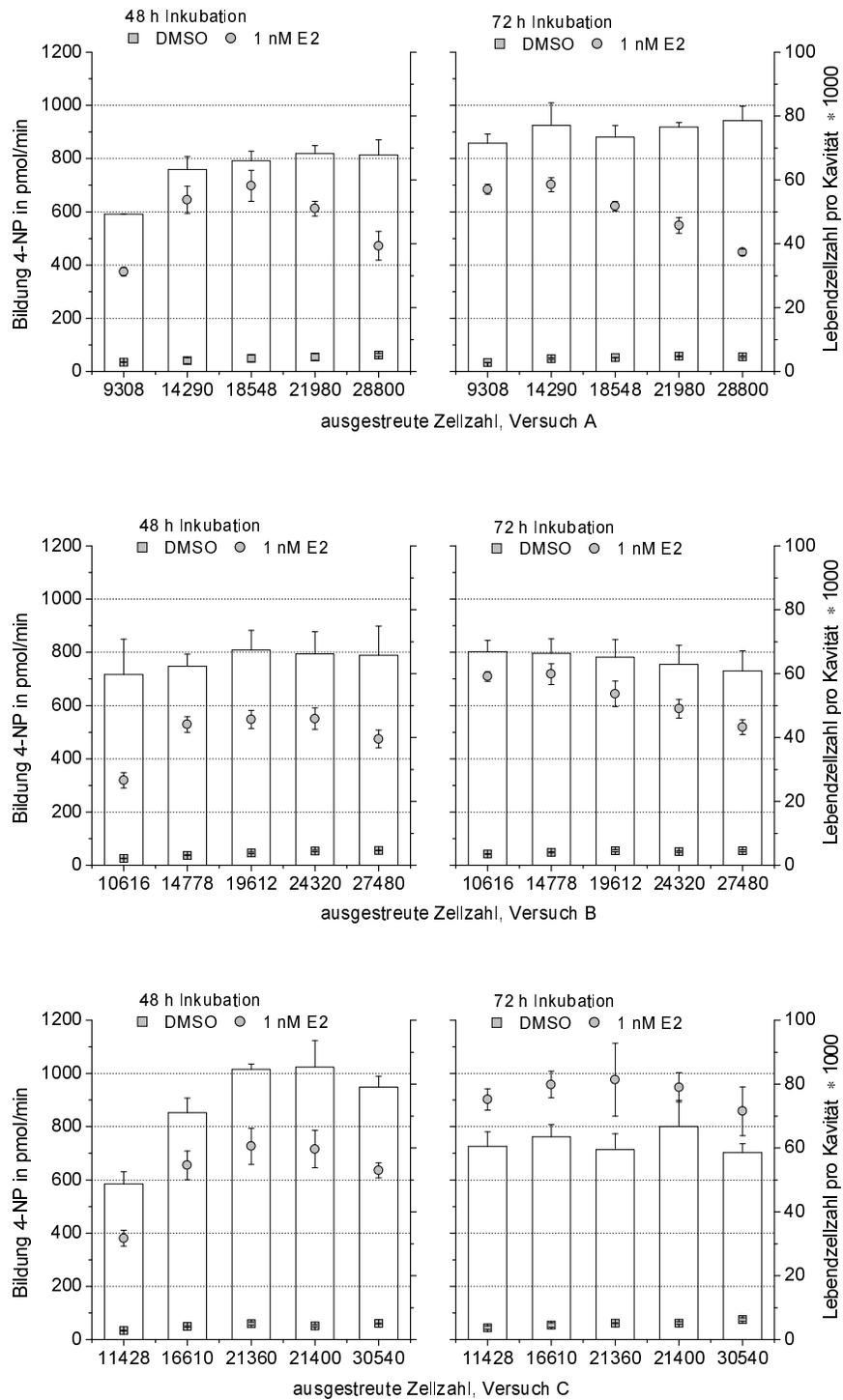


Abb. 57: Einzeldarstellung der Versuche zur Bestimmung der Lebendzellzahl und Enzymaktivität in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl zu unterschiedlichen Inkubationszeiten. Die AP-Aktivität wurde als Bildung 4-NP in pmol/min pro Kavität berechnet, als Punkte mit Fehlerbalken dargestellt und bezieht sich auf die linke Achse. Die Lebendzellzahl ist als Säule dargestellt und bezieht sich auf die rechte Achse. (Fortsetzung nächste Seite)

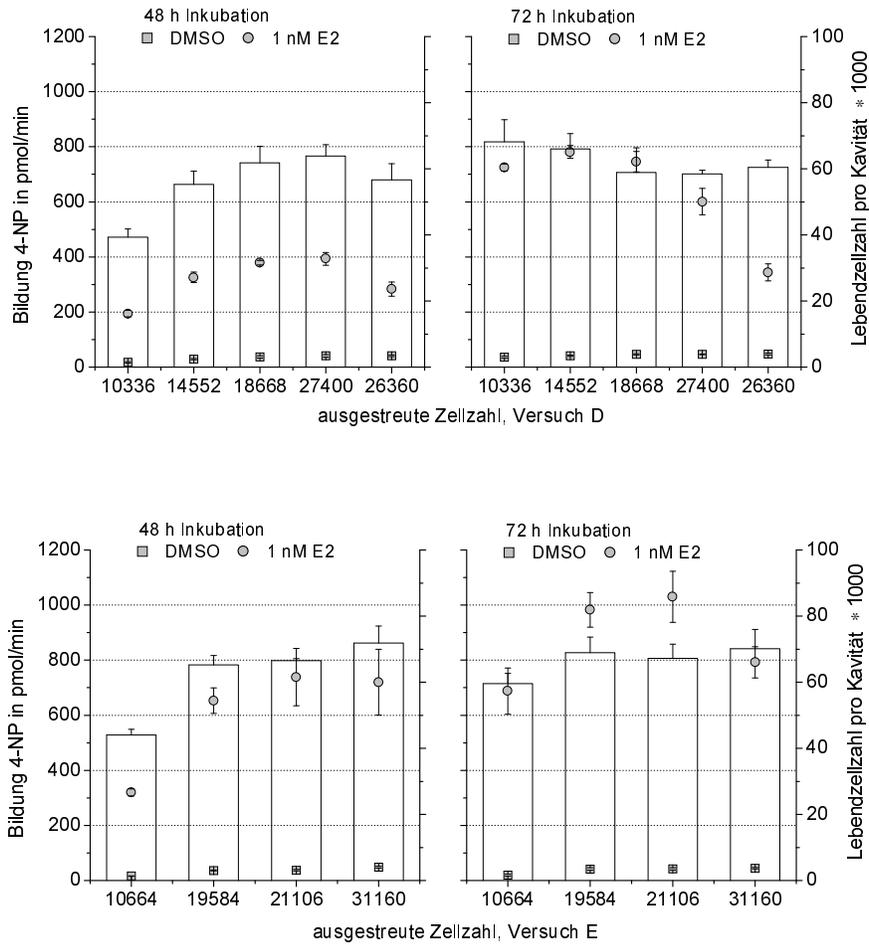


Abb. 58: Fortsetzung Abb. 57

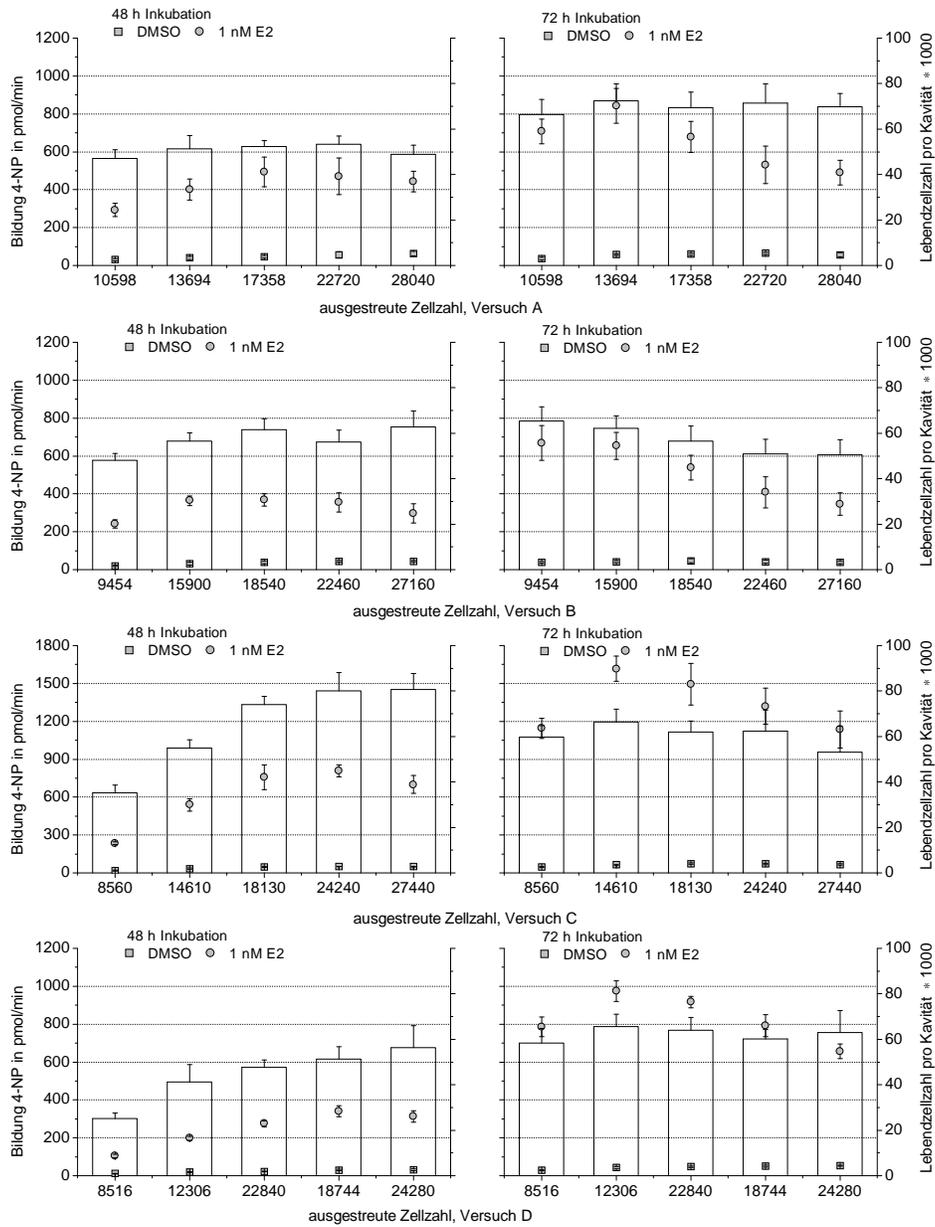


Abb. 59: Einzeldarstellung der Versuche zur Bestimmung der Lebendzellzahl und Enzymaktivität in Abhängigkeit der ausgestreuten Zellzahl zu unterschiedlichen Inkubationszeiten, nach Vorinkubation der Zellen mit estrogenfreiem Medium 24 h vor dem Ausstreuen. Die AP-Aktivität wurde als Bildung 4-NP in pmol/min pro Kavität berechnet, als Punkte mit Fehlerbalken dargestellt und bezieht sich auf die linke Achse. Die Lebendzellzahl ist als Säule dargestellt und bezieht sich auf die rechte Achse.

Veröffentlichungen aus dieser Arbeit

- H.L. Esch, E. Pfeiffer, M. Metzler: Estrogenic and antiestrogenic properties of bisphenol A and related bisphenols in Ishikawa Cells. 42. Annual Meeting of the Society of Toxicology, 9.–13. March 2003 in Salt Lake City/Utah. *Fundamental and Applied Toxicology – The Toxicologist* 72 (S–1), 654 (2003).
- E. Pfeiffer, H.L. Esch, S. Höhle, A.M. Solyom, B.N. Timmermann, M. Metzler: In vitro studies on the estrogenic activity and the metabolism of curcumin. Symposium of the DFG Senate Commission on Food Safety of Functional Food: Safety Aspects, Karlsruhe, Germany, 5.–7. May 2002. Abstract: Eisenbrand et al. (eds), *Functional food: safety aspects*, Deutsche Forschungsgemeinschaft, Wiley–VCH Verlag, Weinheim, im Druck.
- E. Pfeiffer, H.L. Esch, S. Höhle, M. Metzler, A.M. Solyom, B.N. Timmermann: Chemical stability of curcuminoids and their estrogenic activity in Ishikawa cells. 41. Annual Meeting of the Society of Toxicology 9.–13. March 2002. *Fundamental and Applied Toxicology, The Toxicologist* 66 (S–1), LB112 (2002).
- H.L. Esch, I. Newill, E. Pfeiffer, M. Metzler: Estrogenic activity assessment for xenoestrogens based on the stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells. 43. Frühjahrstagung der Deutschen Gesellschaft für experimentelle und klinische Pharmakologie und Toxikologie, 12.–14. März in Mainz. *Naunyn–Schmiedeberg’s Archives of Pharmacology* 365 (Suppl. 1), R 155 (2002)
- H.L. Esch, I. Newill, E. Pfeiffer, M. Metzler: Estrogenic activity assessment of xenoestrogens based on stimulation of alkaline phosphatase in Ishikawa cells. 9. Gordon Research Conference on Hormonal Carcinogenesis, Meriden, USA, 8.–13. Juli 2001.
- H. Esch, I. Newill, E. Pfeiffer, M. Metzler: Estrogen–abhängige Expression von alkalischer Phosphatase in Ishikawa Zellen. Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Kaiserslautern, 2.–3. April 2001. *Lebensmittelchemie* 55 (2001)
- H. Esch, E. Pfeiffer, M. Metzler: Die Mitosespindel als Angriffsort für die aneuploidogene Wirkung von 17β -Estradiol in kultivierten Säugerzellen. Jahrestagung des Regionalverbandes Südwest der Lebensmittelchemischen Gesellschaft, Karlsruhe, 3.–4. April 2000. *Lebensmittelchemie* 54 (2000)

Lebenslauf

Name Harald Lothar Esch

Geburtsdatum 18. Juli 1971

Geburtsort Karlsruhe

Staatsangehörigkeit deutsch

Schulbildung

1977-1981 Grund- und Hauptschule Grötzingen (Karlsruhe)

1981-1987 Friedrich-Realschule Karlsruhe, Abschluss: Mittlere Reife

1987-1990 Ausbildung zum Chemielaboranten an der LUFA Augustenberg, Karlsruhe

1990-1992 Technische Oberschule (Oberstufe der Berufsoberschule) an der Carl-Engler-Schule,
Abschluss: Fachgebundene Hochschulreife

Wehrdienst

1992-1993 Ersatzdienst in der evangelischen Diakonissenanstalt (Karlsruhe)

Hochschulbildung

Oktober 1993-November 1997 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Karlsruhe

24. Oktober 1995 Staatliche Vorprüfung

Mai-Juni 1997 Wissenschaftliche Abschlussarbeit

November 1997 1. Staatsexamen

Januar-Juli 1998 Wissenschaftliche Forschungsarbeit an der Universität Santiago de Compostela, Institut für Analytische Chemie, Ernährung und Bromatologie, AK Prof. Dr. P. Bermejo Barrera

Seit 1. November 1998 Wissenschaftlicher Angestellter an der Universität Karlsruhe (TH), Fakultät für Chemie, Institut für Lebensmittelchemie und Toxikologie, AK Prof. Dr. M. Metzler