

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



Veränderungen der Transkription in Embryoblast und Trophoblast der Kaninchenblastozyste nach Exposition mit polychlorierten Biphenylen

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

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

von Ina Clausen, geb. Meinicke
geboren am 08.11.1976 in Merseburg

Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. agr. Bernd Fischer
PD Dr. med. Dörte Katschinsky
Prof. Dr. med. Hans-Rudolf Tinneberg (Gießen)

09.11.2004

01.06.2005

urn:nbn:de:gbv:3-000008879

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000008879>]

Referat und bibliografische Beschreibung

Seit den 20er Jahren wurden PCB-Gemische durch die Chlorierung von Biphenyl in hohem Maße industriell hergestellt. Die in die Umwelt entlassenen PCB kumulieren aufgrund ihrer hohen Lipophilie in der Nahrungskette. Sie entfalten vielfältige toxische Wirkungen im adulten (Leberschäden, Chlorakne, Enzyminduktion, Tumorpromotion) sowie fetalen Organismus (intrauterine Wachstumsretardierung, Fehlbildungen, Aborte). Koplanare PCB können die toxischen Effekte Rezeptor-abhängig über den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) vermitteln.

In dieser Arbeit sollte der Einfluss definierter PCB-Gemische auf sechs Tage alte Präimplantationsembryonen des Kaninchens mit Hilfe molekularbiologischer Techniken untersucht werden. Anhand einer gezielten Studie an ausgewählten Enzymen und Implantationsmediatoren sollten die Mechanismen möglicher Fehlentwicklungen in der Frühschwangerschaft über die Analyse von Transkriptionsveränderungen erörtert werden. Dazu wurden sechs Tage alte Blastozysten des Kaninchens mit einem Stoffgemisch aus entweder drei koplanaren (PCB 77, 126, 169) oder sieben nicht koplanaren (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) PCB-Kongeneren in den Konzentrationen 0,1 ng und 1 µg/Kongener/ml Kulturmedium für vier Stunden kultiviert. Durch die anschließende Trennung der beiden blastozytären Zelllinien - Embryoblast und Trophoblast - und darauf folgender mRNA-Extraktion, waren erstmalig differenzierte Aussagen zu PCB-induzierten Transkriptions-veränderungen in beiden Zelllinien möglich.

Nach Exposition mit koplanaren und nicht koplanaren PCB waren die Transkripte von fünf der neun untersuchten Gene signifikant gegenüber der Kontrollgruppe exprimiert. Erhöht waren CYP 1A1 im Embryoblasten und 1B1 im Embryo- und Trophoblasten. VEGFR2, TIMP-2 und COX2 waren im Trophoblasten signifikant erhöht. HIF-1 α war im Embryoblasten signifikant und MMP-2 leicht vermindert. Nicht beeinflusst wurden VEGF und GST π 1.

Die beobachteten Veränderungen zeigen in der vulnerablen Phase der Präimplantation Alterationen der Transkription wichtiger Implantationsmediatoren und Entgiftungsenzyme. Aufgrund der nicht beobachteten Kongenerspezifität scheint eine Beteiligung des AhR an den durch PCB bedingten Effekten auf Präimplantationsembryonen des Kaninchens unwahrscheinlich zu sein.

Clausen, Ina: Veränderungen der Transkription in Embryoblast und Trophoblast der Kaninchenblastozyste nach Exposition mit polychlorierten Biphenylen.
Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 73 Seiten, 2004

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	
1.1	Polychlorierte Biphenyle	1
1.1.1	Struktur und Eigenschaften	1
1.1.2	Polychlorierte Biphenyle als Umweltkontaminanten	2
1.1.3	Wirkungen polychlorierter Biphenyle auf den Organismus	2
1.2	Der Arylhydrocarbon-Rezeptor	3
1.2.1	Struktur und Eigenschaften	3
1.2.2	Ah-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion	3
1.2.3	Ah-Rezeptor-Zielgene	4
1.3	Die frühe Embryonalentwicklung des Kaninchens	5
1.3.1	Präimplantationsentwicklung	5
1.3.2	Implantation	5
1.4	Ziel der Arbeit	8
2.	Material und Methoden	
2.1.	Versuchstierhaltung und Embryonengewinnung	9
2.2.	Kulturbedingungen und PCB-Exposition	9
2.3.	mRNA-Isolierung	10
2.4.	Erststrang-Synthese (cDNA-Synthese)	11
2.5.	Die Polymerase-Kettenreaktion	11
2.6.	Klonierung	12
2.7.	Sequenzierung	12
2.8	Statistik	13
2.9	Geräte, Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide	14
3.	Ergebnisse	
3.1	Charakterisierung der zelllinienspezifischen cDNA	16
3.2	Untersuchung sechs Tage alter Kaninchenblastozysten nach Exposition mit koplanaren PCB	
3.2.1	Xenobiotika-metabolisierende Enzyme	17
3.2.2	Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2	19

3.2.3	Hypoxia Inducible Factor-1 α	21
3.2.4	Matrix-Metalloprotease 2 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2	23
3.2.5	Cyclooxygenase-2	24
3.3	Untersuchung sechs Tage alter Kaninchenblastozysten nach Exposition mit nicht koplanaren PCB	
3.3.1	Xenobiotika-metabolisierende Enzyme	26
3.3.2	Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2	27
3.3.3	Hypoxia Inducible Factor-1 α	28
3.3.4	Matrix-Metalloprotease 2 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2	29
3.3.5	Cyclooxygenase-2	30
3.4	Tabellarische Übersicht	36
4.	Diskussion	
4.1	Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen 1A1 und 1B1	37
4.2	Gluthation-S-Transferase π 1	39
4.3	Hypoxia inducible factor-1 α	40
4.4	Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2	41
4.5	Metalloproteinase 2 und Tissue inhibitor of metalloproteinases 2	42
4.6	Cyclooxygenase-2	46
4.7	Die Rolle des Ah-Rezeptors	47
5.	Zusammenfassung	49
6.	Literaturverzeichnis	52
7.	Thesen	69

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
BSA	bovines Serumalbumin
bHLH	basische Helix-Loop-Helix-Domäne
bp	Basenpaar(e)
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
hCG	humanes Choriongonadotropin
kDa	kiloDalton
LB-Medium	Luria-Bertani-Medium
MPC [®]	Magnetic Particel Concentrator [®]
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
Oligo-dT	Oligo-desoxy-Thymidin
PAS	Per-ARNT-Sim
PBS	Phosphate Buffered Saline
p.c.	post coitum
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PMSG	Pregnant Mare Serum Gonadotropin
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
Tab.	Tabelle
TE	Trophektoderm
UV	Ultraviolett
X-Gal	5-Chlor-4-brom-3-indol- β -D-galactosid
XRE	Xenobiotic Response Element

1. Einleitung

1.1 Polychlorierte Biphenyle

1.1.1 Struktur und Eigenschaften

Polychlorierte Biphenyle (PCB) gehören zur Stoffklasse der halogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe und bilden eine Gruppe von 209 möglichen Kongeneren. Das Grundgerüst der PCB bilden 2 kovalent miteinander verbundene Phenylringe, die in Ortho-(2,6), Meta-(4) und Para-(3,5)-Positionen mit Chloridionen substituiert sein können (s. Abb. 1.1). Die allgemeine chemische Formel für PCB lautet $C_{12}H_{10-n}Cl_n$, wobei n die Anzahl der Chloratome angibt. Es gibt Mono- bis Dekachlorbiphenyle. Seit 1980 existiert neben der Nomenklatur der IUPAC eine weitere nach Ballschmiter und Zell, die jedem Kongener eine Nummer zuordnet (Ballschmiter und Zell 1980). Aufgrund der Verteilung der Substituenten und der daraus resultierenden Konformität unterscheidet man zwischen koplanaren (non-ortho) und nicht koplanaren PCB.

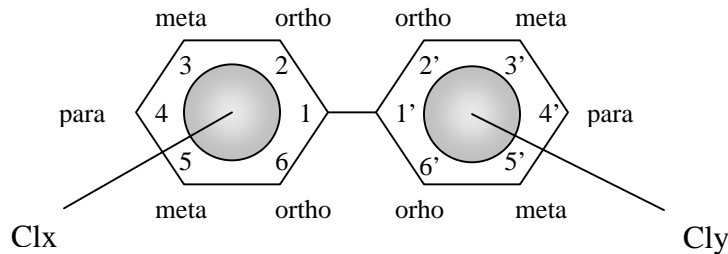


Abb. 1.1: chemisches Grundgerüst der PCB

Koplanare PCB verhalten sich aufgrund ihrer ähnlichen Konformität wie das bekannte 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD), und die drei Kongenere 77, 126 und 169, die die höchste Stereoisomerie zum TCDD aufweisen, besitzen die höchste Toxizität aller PCB. Die relative Toxizität dieser und anderer dioxinähnlicher Substanzen kann mit Hilfe des *Toxic Equivalency Factor* (TEF) abgeschätzt werden, wobei dem TCDD als toxischster Substanz der Faktor 1 zugeordnet wurde. Der TEF eines Stoffes ist speziesabhängig und beträgt für den Menschen und die drei o.g. koplanaren PCB 0,0001, 0,1 bzw. 0,01 (WHO 1997).

Wichtige physikochemische Eigenschaften der PCB sind die ausgesprochen hohe Lipophilie, der hohe Siedepunkt (170-380°C), die geringe elektrische Leitfähigkeit, die sehr hohe Wärmeleitfähigkeit und die extreme Stabilität gegenüber physikochemischer und biologischer Degradation. Diese Eigenschaften bedingten die vielfältige industrielle Nutzung der PCB weltweit.

1.1.2 Polychlorierte Biphenyle als Umweltkontaminanten

Seit den 20er Jahren wurden PCB-Gemische durch die Chlorierung von Biphenyl industriell hergestellt und unter verschiedenen Handelsnamen, z.B. Aroclor (Monsanto, USA), Clophen (Bayer, BRD) oder Kaneclor (Kanegafuchi, Japan), vermarktet. Sie dienten unter anderem als Hydraulikflüssigkeit, Schmiermittel, organische Lösungsmittel und Verdüner, Klebstoff, Wärmeleitflüssigkeit oder als dielektrische Flüssigkeit in Kondensatoren und Transformatoren. 1966 berichtete der schwedische Wissenschaftler Søren Jensen von unbekanntem Peaks in einer gaschromatografischen Analyse des Pestizids Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) aus Umweltproben (Jensen 1966). Es stellte sich heraus, dass er eine Reihe von PCB zum ersten Mal nachgewiesen hatte und nachfolgend konnten in nahezu allen ökologischen Kompartimenten PCB detektiert werden (Risebrough et al. 1968, Safe et al. 1987). Die direkt und indirekt in die Umwelt eingebrachten PCB reichern sich aufgrund ihrer hohen Lipophilie in der Nahrungskette an und können so um ein Vielfaches konzentriert werden (Evans et al. 1991). Auch im Organismus des Menschen werden PCB vor allem im Fettgewebe, in der Leber und in der Haut gespeichert (Safe 1987). Zudem wurden PCB im Serum, im Embryo und in der Muttermilch nicht spezifisch belasteter Populationen nachgewiesen (Acker und Schulte 1970, Baukloh et al. 1985, Schecter et al. 1994). Nach akzidentellen PCB-Kontaminationen (Yusho, Japan 1968; Yu-Cheng, Taiwan 1978; Seveso, Italien 1976) und nach Erkenntnissen aus Toxizitätsstudien an Labortieren wurde die kommerzielle Produktion in den 80er Jahren weitgehend eingestellt. Bis dahin wurden weltweit etwa 1,5 Millionen Tonnen PCB produziert (Rantanen 1992).

1.1.3 Wirkungen polychlorierter Biphenyle auf den Organismus

PCB werden nach Ingestion im Gastrointestinaltrakt resorbiert und durch den Blutkreislauf transportiert (Busbee und Ziprin 1994). Auch transdermal und transalveolär können geringe Mengen aufgenommen werden. PCB werden hauptsächlich in der Leber metabolisiert, wobei die beim Abbau entstehenden Verbindungen toxischer als die Ausgangskongeneren wirken können (Hansen 1987, Parkinson und Safe 1987, Safe 1994). Sie beeinflussen die Funktionen verschiedener Organe und Organsysteme.

An der Haut zeigen sich nach PCB-Exposition vermehrt Komedonen bis hin zur sogenannten Chlorakne. Kinder von PCB-belasteten Müttern aus Japan und Taiwan fielen durch eine hyperpigmentierte Haut auf (Yamashita und Hayashi 1985). Die peripartale Letalität der Kinder PCB-exponierter Mütter in Taiwan war deutlich erhöht (Hsu et al. 1985). Bei Kindern wurde eine mentale Entwicklungsverzögerung bis Retardierung durch PCB beschrieben (Rogan et al. 1988, Tilson et al. 1990). PCB wirken zudem hepatotoxisch, immunotoxisch, mutagen sowie

kanzerogen (Ahlborg et al. 1992, Safe 1984, Tryphonas 1994). In Studien zur Embryotoxizität wurden bei Labortieren eine verzögerte Blastozystenimplantation (Orberg und Kihlstrom 1973), eine erhöhte Anzahl an Früh- und Spätaborten (Villeneuve 1971), ein reduziertes embryonales Wachstum (Patnode und Curtis 1994) und eine erhöhte postpartale Mortalität der Nachkommen (Linder et al. 1974, Spencer 1982) nachgewiesen.

1.2 Der Arylhydrocarbon-Rezeptor

1.2.1 Struktur und Eigenschaften

Im Jahr 1976 wurde der Arylhydrocarbon-Rezeptor (Ah-Rezeptor, AhR) von Poland und Mitarbeitern entdeckt (Poland et al. 1976). Der AhR ist ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor und gehört zur Familie der *basic-Helix-Loop-Helix-Per-Arnt-Sim*-(bHLH-PAS-)Proteine. Er wird nahezu ubiquitär exprimiert (Okey et al. 1994). Einige molekulare Eigenschaften des AhR wie z.B. das Sedimentationsverhalten ähneln denen der Steroidhormonrezeptoren (Poellinger et al. 1985). Das Molekulargewicht und die Bindungsaffinität variieren zwischen den Spezies. Es finden sich Molekulargewichte von 95 kDa (C57BL/6-Mauslinien), 104 kDa (Kaninchen), 124 kDa (Hamster) bis 130 kDa (Wildmaus) (Poland und Glover 1987). Zudem wurden in Mäusen vier und in humanen Zelllinien zwei distinkte Ah-Rezeptorformen mit unterschiedlichen Ligand-Bindungsaffinitäten detektiert (Perdew und Hollenback 1995, Poland et al. 1994).

Zu den Liganden des AhR gehören polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane, polychlorierte und polybromierte Biphenyle, Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren, wobei die Verbindungen mit der höchsten Affinität zum AhR die höchste Toxizität aufweisen (Poland und Knutson 1982, Safe 1990, Whitlock 1990). Der stärkste Ligand des AhR ist das 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin (Safe 1984). Ein physiologischer Ligand des AhR konnte bis jetzt noch nicht eindeutig identifiziert werden. Es wurde jedoch nachgewiesen, dass Tryptophanderivate und Indol(3,2-b)carbachol (Kleman et al. 1992, Rannug et al. 1995), Bilirubin (Sinal und Bend 1997) oder Flavone (Reiners et al. 1999) mit hoher Aktivität an den AhR binden. 2001 identifizierte man im Urin die beiden Substanzen Indirubin und Indigo, die eine höhere Affinität als TCDD zum AhR aufwiesen (Adachi et al. 2001).

Durch Studien an Ah-Rezeptor-defizienten Mäusen wurde erkannt, dass der AhR eine bedeutende Rolle in physiologischen Prozessen wie Zellproliferation und -differenzierung, der normalen Entwicklung und Funktion von Organen und dem Erhalt der Homöostase spielt (Fernandez-Salguero et al. 1996).

1.2.2 Ah-Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion

Im inaktiven Zustand befindet sich der AhR im Zytoplasma, wo er unter anderem an 2 Moleküle des Hitzeschockproteins 90 (hsp90) und an das AhR-interagierende-Protein (AIP) gebunden ist (auch bekannt als XAP2 oder ARA9) (Chen und Perdew 1994, Ma und Whitlock 1997, Perdew 1988). Nach Bindung des Liganden wandert der AhR-Komplex in den Kern, wo er nach Abspaltung von hsp90 und AIP mit einem zweiten bHLH-Protein, dem AhR-Nuclear-Translocator (ARNT) heterodimerisiert. Ein 1999 identifiziertes Protein, der Ah-Rezeptor-Repressor (Ah-RR), kann die Funktion des AhR hemmen, indem es selbst mit ARNT dimerisiert und damit die Bindung des ARNT an den AhR unterdrückt (Mimura et al. 1999). AhR und ARNT besitzen Domänen für die Bindung an spezifische Sequenzen in der Promoterregion der AhR-Zielgene (Reyes et al. 1992). Diese kurzen DNA-Sequenzen (5'-TGCGTG-3') werden als *Dioxin Response Elements* (DRE) oder *Xenobiotic Response Elements* (XRE) bezeichnet (Rowlands und Gustafsson 1997). Die Kopplung des AhR-ARNT-Ligand-Komplexes an das DRE führt zur Transkription der mRNA des entsprechenden Zielgens.

1.2.3 Ah-Rezeptor-Zielgene

Zu den Mitgliedern der sogenannten Ah-Rezeptor-Genbatterie zählen Gene, deren Expression durch dioxinartige Verbindungen beeinflusst wird (Abbott et al. 1995). Einige dieser Zielgene sind die Cytochrom P450 Monooxygenasen 1A1, 1A2 oder 1B1, UDP-Glukuronosyltransferase, NAD(P)H-Quinon-Oxidoreduktase und Aldehyd-3-Dehydrogenase (Bock et al. 1990, Dunn et al. 1988, Jaiswal et al. 1988, Nebert et al. 1987). Auch im Erythropoietin-Gen, dessen Expression vor allem unter hypoxischen Bedingungen induziert wird, wurde ein DRE gefunden (Chan et al. 1999).

Es gibt aber auch Gene, die kein DRE in ihrer Sequenz aufweisen und dennoch durch dioxinartige Substanzen beeinflusst werden. Dazu gehören verschiedene Zytokine wie Plasminogen-Aktivator-Inhibitor (PAI) 2 und Interleukin (IL)-1 β (Sutter et al. 1991, Vogel et al. 1997), Gluthathion-S-Transferase π 1 (Aoki et al. 1992), Wachstumsfaktoren (Gaido et al. 1992) und Protoonkogene wie c-fos und c-jun (Puga et al. 1992). Die Regulationsmechanismen der Induktion oder Repression dieser Zielgene im weiteren Sinn sind noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.3 Die frühe Embryonalentwicklung des Kaninchens

1.3.1 Präimplantationsentwicklung

Beim Kaninchen (*Oryctolagus cuniculus*) wird die Ovulation durch den Begattungsreiz ausgelöst. Sie beginnt 10 Stunden post coitum (p.c.). Nach erfolgter Befruchtung in der Ampulle des Eileiters findet 22 bis 24 Stunden p.c. die erste Furchungsteilung der entstandenen Zygote statt. Es folgen 4-(28 Stunden), 8-(36 Stunden), 16-Zellstadium (44 Stunden) und die 32-64 Zellen enthaltende Morula (60 Stunden). Nach 72 Stunden werden erste Anzeichen einer mit Flüssigkeit gefüllten Höhle sichtbar, die die Entwicklung der Blastozyste anzeigt. Mit der Ausbildung der Blastozyste hat sich die erste Zelldifferenzierung in der Ontogenese vollzogen und es haben sich zwei distinkte Zelllinien, der Embryoblast und der Trophoblast, gebildet.

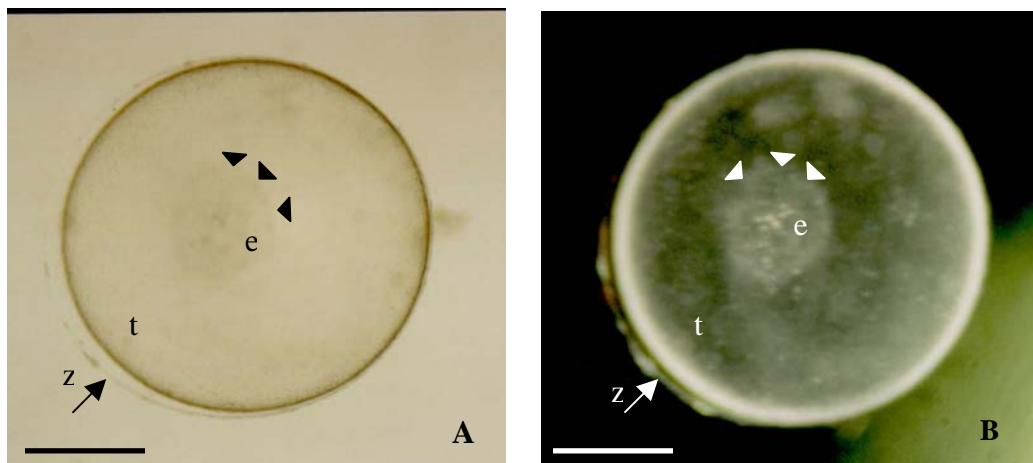


Abb. 1.2 : (A) 6 Tage alte Kaninchenblastozyste, Hellfeld und (B) Dunkelfeld (e=Embryoblast, t=Trophoblast, Z=Neozona), Balken =1mm

Die Zellen des Embryoblasten sind klein und kompakt und werden am Tag 5,5 p.c. als Keimscheibe sichtbar (s. Abb. 1.2). In dieser Phase sind die Zellen des Embryoblasten pluripotent. Aus ihnen entwickeln sich neben Dottersack, Allantois und Amnion alle Gewebe des späteren Embryos. Die epithelähnlichen Zellen des Trophoblasten gewährleisten den Stofftransport in die Blastozystenöhle und später die Anheftung an das endometriale Epithel sowie die Ausbildung des fetalen Teils der Plazenta.

1.3.2 Implantation

Die Implantation dauert beim Kaninchen etwa zwei Tage und beginnt 6 Tage und 18 Stunden p.c. mit der Anlagerung und Anheftung der Blastozyste an das antimesometriale Endometrium gegenüber dem späteren Implantationsort (Denker 1977).

- *Matrix-Metalloproteasen und ihre endogenen Inhibitoren*

Die Anheftung der Blastozyste an das uterine Epithel und die darauf folgende Invasion der Zellen des Trophoblasten in das endometriale Stroma erfordern streng regulierte Veränderungen der extrazellulären Matrix. Matrix-Metalloproteasen (MMP) und ihre endogenen Inhibitoren (*Tissue Inhibitors of Metalloproteinases*, TIMP) sind Schlüsselmediatoren der Matrixmodellierung während Implantation und Dezidualisierung (Alexander et al. 1996). Transkription und Expression der MMPs werden durch Wachstumsfaktoren, Zytokine und Steroidhormone reguliert (Librach et al. 1994, Salamonsen et al. 1997, Singer et al. 1997). Die Mehrheit der MMPs werden in einer latenten Form sezerniert und anschließend extrazellulär durch proteolytische Spaltung, die kaskadenartig untereinander stattfinden kann, aktiviert (Benaud et al. 1998). Bis jetzt konnten 24 MMP und 4 TIMP identifiziert werden (Nagase und Woessner 1999). Während der Frühschwangerschaft kommt es zu beachtlichen Veränderungen der Aktivität und des Verteilungsmusters der einzelnen MMP sowohl in den uterinen Zellen als auch im Trophoblasten (Das et al. 1997c). Die größte Bedeutung während Implantation und Dezidualisierung scheinen die Metalloproteasen 1-3, 7 und 9 zu haben (Salamonsen 1999).

- *Cyclooxygenase-2*

Cyclooxygenasen (COX) oder Prostaglandin-Endoperoxidase-H-Synthasen (PGHS) sind die Schrittmacherenzyme in der Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Es existieren zwei Isoformen, die von zwei Genen auf verschiedenen Chromosomen kodiert werden. Die COX-1 wird konstitutiv in fast allen Geweben und Zellen exprimiert während die erst 1991 identifizierte COX-2 (Xie et al. 1991) dagegen als die induzierbare Isoform bezeichnet wird. Sie ist in den meisten Geweben nicht detektierbar, kann aber rapide durch Wachstumsfaktoren, Tumorpromotoren, Hormone, bakterielle Endotoxine oder Zytokine induziert werden (Smith et al. 1996). Sie spielt eine Rolle bei Entzündungsprozessen, Fieber, Schmerz oder Tumorentstehung. Eine COX-2 Überexpression konnte in verschiedenen vor allem gastrointestinalen Karzinomen nachgewiesen werden (DuBois et al. 1996, Okami et al. 1999, Sano et al. 1995). In besonderem Maße ist die COX-2 in die Reproduktion eingebunden. Ihre Funktion ist essentiell für Ovulation, Fertilisation, Implantation und Dezidualisierung (Davis et al. 1999, Dinchuk et al. 1995, Lim et al. 1997). Während der Implantation wird die COX-2 in den Zellen des Trophoblasten und im Endometrium an den Stellen der Blastozystenanhftung exprimiert (Das et al. 1999, Kim et al. 1999). COX-2-*Knockout*-Mäuse zeigen eine fehlerhafte Ovulation und multiple Ausfälle während Fertilisation, Implantation und Dezidualisierung (Lim et al. 1997). Sie sind nicht fortpflanzungsfähig.

- *Hypoxia Inducible Factor 1 α , Vascular Endothelial Growth Factor and Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2*

Um einen suffizienten Gas- und Stoffaustausch zwischen mütterlichem und embryonalem Kreislauf zu gewährleisten, findet im Embryo und der entstehenden Dezidua eine ausgeprägte Vasculo- bzw. Angiogenese statt (Findlay 1986). Man nimmt an, dass die Gefäßentwicklung größtenteils durch lokale Hypoxie stimuliert wird (Shweiki et al. 1992). Der *Hypoxia Inducible Factor 1 α* (HIF-1 α) gehört wie der AhR zur Familie der bHLH-PAS-Proteine und ist ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor. HIF-1 α -*Knockout*-Embryonen der Maus weisen eine gestörte Vaskularisation und Entwicklungsverzögerung auf (Ryan et al. 1998). Durch Hypoxie stimuliert, heterodimerisiert HIF-1 α mit ARNT (auch HIF-1 β genannt) und bindet an die 8 bp umfassenden *Hypoxia Response Elements* (HRE) seiner Zielgene (Wang und Semenza 1995). Zu diesen Zielgenen gehören unter anderem Erythropoietin, Glukosetransporter, Enzyme der Glykolyse und der *Vascular Endothelial Growth Factor* (Semenza 1999).

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist ein endothelspezifisches Mitogen und ist wesentlich an Prozessen der Vasculo- und Angiogenese sowie an der Regulation der mikrovaskulären Permeabilität beteiligt (Berse et al. 1992, Ferrara et al. 1992). VEGF ist ein heparinbindendes homodimeres Glykoprotein, das Sequenzhomologien zum *Platelet Derived Growth Factor* (PDGF) aufweist (Keck et al. 1989). Durch alternatives *Splicing* existieren verschiedene Isoformen, von denen einige sezerniert werden können und andere mit Heparin-enthaltenden Proteoglykanen der extrazellulären Matrix assoziiert sind (Houck et al. 1992, Park et al. 1993). Während der Implantation wird VEGF-mRNA vor allem im Synzytiotrophoblast verstärkt exprimiert (Das et al. 1997b). VEGF bindet an die Tyrosinkinase-Rezeptoren *c-fms-like Tyrosin Kinase* (Flt-1 oder VEGFR1) und *Fetal Liver kinase* (Flk-1 oder VEGFR2) (de Vries et al. 1992, Terman et al. 1992). Die Expression des VEGFR2 ist der früheste Marker der sich entwickelnden endothelialen Zellen des Embryos (Millauer et al. 1993, Yamaguchi et al. 1993).

1.4 Ziel der Arbeit

Seit den 20er Jahren wurden PCB-Gemische in hohem Maße industriell hergestellt und in die Umwelt entlassen. Heute können PCBs in nahezu allen ökologischen Kompartimenten und Lebewesen nachgewiesen werden. Sie entfalten vielfältige toxische Wirkungen im adulten (Leberschäden, Chlorakne, Enzyminduktion, Tumorpromotion) sowie fetalen Organismus (intrauterine Wachstumsretardierung, Fehlbildungen, Aborte).

Koplanare PCB können die toxischen Effekte Rezeptor-abhängig über den Arylhydrocarbonrezeptor (AhR) vermitteln. Der AhR ist ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor der *basic-Helix-Loop-Helix-PAS*-Proteinfamilie und wird nahezu ubiquitär exprimiert. Zu den Liganden des AhR gehören neben koplanaren PCB auch polychlorierte Dibenzodioxine und Dibenzofurane, polychlorierte und polybromierte Biphenyle, Benzo[a]pyren und 3-Methylcholanthren, wobei die Verbindungen mit der höchsten Affinität zum AhR die höchste Toxizität aufweisen (Safe 1989). Beim Kaninchen wird der AhR ab dem 6. Tag p.c. in beiden Zelllinien der Blastozyste exprimiert (Tscheudschilsuren et al. 1999).

In dieser Arbeit sollte der Einfluss definierter PCB-Gemische auf sechs Tage alte Präimplantationsblastozysten des Kaninchens untersucht werden. Anhand einer gezielten Studie an ausgewählten Enzymen des Fremdstoffmetabolismus und Implantationsmediatoren sollten die Mechanismen möglicher Fehlentwicklungen in der sensiblen Phase der Frühschwangerschaft erörtert werden. Dazu wurden sechs Tage alte Präimplantationsembryonen des Kaninchens mit einem Stoffgemisch aus entweder drei koplanaren (PCB 77, 126, 169) oder sieben nicht-koplanaren (PCB 28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) PCB Kongeneren in den Konzentrationen 0,1 ng und 1 µg/Kongener/ml Kulturmedium für vier Stunden kultiviert. Als Kontrolle dienten mit dem Lösungsvermittler DMSO exponierte Embryonen. Durch die anschließende Trennung der beiden blastozytären Zelllinien, Embryoblast und Trophoblast, und darauf folgender mRNA-Extraktion, sollten erstmalig differenzierte Aussagen zur Vulnerabilität beider Zellarten gegenüber PCB möglich werden. Als Methode wurde die semiquantitative PCR eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchstierhaltung und Embryongewinnung

Als Versuchstiere standen uns geschlechtsreife weibliche Hybridkaninchen (ZIKA-Hybriden, Basiszucht: Fa. Krieg, Niederwünsch) mit einem Körpergewicht zwischen 3 und 4,5 kg zur Verfügung. Die Kaninchen wurden in fensterlosen, klimatisierten Versuchsterräumen mit einem 12/12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten und mit einem handelsüblichen pelletierten Trockenfutter und Wasser ad libitum versorgt. Nach Eintreffen der Tiere im Tierhaus wurde ihnen eine Adaptationsphase von mindestens 21 Tagen gewährt.

Den Spenderkaninchen wurden einmalig 150 U PMSG subkutan appliziert. Drei Tage später erfolgte die Paarung mit jeweils zwei Böcken. Anschließend wurden den Spenderkaninchen 75 U hCG und 50 µg Neutra-PMSG intravenös (Vena auricularis lateralis) injiziert. Die Tiere wurden nach weiteren 6 Tagen durch intravenöse Injektion von 80 mg Pentobarbital/kg Körpergewicht narkotisiert und durch zervikale Dissektion und Exsanguination getötet. Nach Präparation und Exzision des Genitaltraktes wurden die Blastozysten mit sterilfiltriertem Spülmedium (BSM II-Medium [Tab. 2.1] mit 0,3% BSA) ausgespült und dreimal mit frischem Spülmedium gewaschen.

BSM II Medium	
Basal Synthetic Medium II	7,64 g/l
NaHCO ₃	2,1 g/l
Glukose	1,8 g/l
Streptomycin	0,15 g/l
Penicillin	0,061 g/l

Tab. 2.1: Zusammensetzung des verwendeten BSM-II-Mediums.

Die lichtmikroskopisch als intakt beurteilten Blastozysten wurden gepoolt und anschließend auf die drei Versuchsgruppen verteilt.

2.2. Kulturbedingungen und PCB-Exposition

Die *in-vitro*-Kultur der Blastozysten erfolgte in einem Wassermantel-Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂, 5 % O₂, 90 % N₂ und gesättigter Luftfeuchte (Lindenau und Fischer 1994). Um die Adsorption der PCB an die Kulturgefäßwand zu minimieren, wurden ausschließlich sterile Glasschalen benutzt. 4-8 Blastozysten wurden jeweils in 1,5 ml BSM-II-Medium mit 1,5 % BSA

kultiviert. Verwendet wurden die hochgereinigten (99,2 % bis 99,8 % Reinheit) koplanaren Kongenere 77, 126, 169 und nicht-koplanaren Kongenere 28, 52, 101, 118, 138, 153 und 180, die jeweils in einer Konzentration von 0,1 ng/Kongener/ml bzw. 1 µg/Kongener/ml Kulturmedium zugesetzt wurden. Die Auswahl der Kongenere und die Zusammensetzung der PCB-Gemische erfolgten aufgrund der Ergebnisse vorangegangener Untersuchungen an Kaninchenblastozysten, in denen die gewählten koplanaren Kongenere in einer Konzentration von jeweils 0,1 ng die Zellproliferation am deutlichsten hemmten (Küchenhoff et al. 1999). Als Lösungsmittel der lipophilen PCB diente DMSO in einer Konzentration von 1 % im Kulturmedium. Zum Ausschluss DMSO-spezifischer Effekte wurde der Kontrollgruppe DMSO in gleicher Konzentration zugesetzt. In früheren Untersuchungen konnte nachgewiesen werden, dass 1% DMSO die Entwicklung und Zellproliferation der Kaninchenblastozyste nicht beeinträchtigt (Lindenau et al. 1994). Nach einer Kulturdauer von vier Stunden wurden die Blastozysten dreimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurde die die Blastozyste umgebende Neozona mit einer sterilen Einmalkanüle entfernt und eine mikrochirurgische Trennung des Embryoblasten (inner cell mass, ICM) vom Trophoblasten (trophectoderm, TE) unter dem Lichtmikroskop durchgeführt. Jeweils zwei Embryoblasten bzw. Trophoblasten wurden in einem 0,5 ml Reaktionsgefäß bei -80 °C bis zur weiteren Bearbeitung aufbewahrt.

2.3 mRNA-Isolierung

Die Isolierung der blastozytären RNA erfolgte als mRNA-Direktisolierung mit magnetisierbaren, an Oligo-dT gekoppelte Beads (DYNABEADS®). Zwei Embryo- bzw. Trophoblasten wurden jeweils in 200 µl Lysis Buffer (100 mM Tris-HCL, 500 mM LiCl, 10 mM EDTA, 5 mM DTT, 1 % SDS) aufgenommen und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 4 Aliquots des Homogenats zu je 50 µl hergestellt und mit 10 µl DYNABEADS® bei Raumtemperatur und 200 U/min für 10 min hybridisiert. Das Lysat wurde für 2 min in den MPC® gegeben, der als Magnet die DYNABEADS® mit der gebundenen mRNA an der hinteren Tubewand fixiert. Der Überstand wurde abpipettiert und die mRNA zunächst einmal mit 50 µl Waschpuffer A (10 mM Tris-HCL, 0,15 mM LiCl, 1 mM EDTA, 0,1 % SDS) und anschließend dreimal mit 30 µl Waschpuffer B (10 mM Tris-HCL, 0,15 mM LiCl, 1 mM EDTA) gewaschen. Dem letzten Waschschrift folgte die Eluierung bei 65 °C für 2,5 min nach Resuspendierung in 11 µl DEPC-Wasser. Nach erneuter Platzierung im MPC® konnte die sich im Überstand befindende

freie mRNA in ein frisches 0,5 ml Reaktionsgefäß zur Synthese des ersten Stranges überführt werden.

2.4 Erststrang-Synthese (cDNA-Synthese)

Zur Erststrangsynthese, d.h. zur reversen Transkription der mRNA, wurden Komponenten des „GeneAmp[®] RNA PCR Core Kit“ von Perkin Elmer verwendet. Eingesetzt wurden nur drei der vier nach der Lysierung entstandenen Aliquots, da eines als RNA-Kontrolle dienen sollte und lediglich mit 49 µl DEPC-Wasser versetzt wurde. Nach Zugabe von 2 µl 10fach Puffer, 2 µl 50 mM MgCl₂, 2 µl 10 mM dNTP, 1 µl Random Hexamer Primer, 1 µl Reverse Transkriptase und 1 µl RNase-Inhibitor entstand ein Reaktionsgemisch von 20 µl, das mit Silikonöl abgedeckt wurde. Die cDNA-Synthese erfolgte unter folgenden Bedingungen: 10 min 25 °C, 1 h 42 °C, 5 min 99 °C in einem programmierbaren Heizblock. Nach Beendigung der Synthese wurde autoklaviertes Wasser ad 60 µl aufgefüllt.

2.5 Die Polymerase-Kettenreaktion

Das PCR-Reaktionsgemisch setzte sich wie folgt zusammen: 2-10 µl cDNA, 5 µl 10fach PCR-Puffer, 1,5 µl 50 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTP, 1 µl Primer (Mix aus jeweils 25 pmol/µl Forward- bzw. Reverse-Primer), 1 U Taq-Polymerase und Wasser ad 50 µl. Zum Ausschluss der Kontamination der Blastozysten-cDNA mit genomischer DNA wurde nach jeder mRNA-Extraktion eine RNA-Probe mitgeführt. Zur Kontrolle der Reinheit aller Reagenzien im Reaktionsgemisch enthielt jede PCR eine Wasserprobe ohne cDNA. Der Enzymmix wurde in ein PCR-Reaktionsgefäß gegeben und zur Vermeidung von Evaporationen mit Mineralöl abgedeckt. Die Reaktion fand in einem programmierbaren Heizblock unter folgenden Bedingungen statt: 94 °C für 3 min, 28-45 Zyklen mit 94 °C für 30 s, 55-60 °C für 30 s, 72 °C für 45 s und abschließend 72 °C für 5 min. Überprüft wurde das PCR-Ergebnis mit einem 1,5 %igen Agarose-Gel. Zur Herstellung wurden 1,5 g Agarose in 100 ml TAE-Puffer (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA) aufgekocht und mit 50 µg Ethidiumbromid versetzt. 20 µl der PCR-Probe wurden mit 5 µl Ladepuffer versetzt und die PCR-Amplifikate bei 70 mV aufgetrennt. Zur Aufnahme der Gele stand uns ein Geldokumentationssystem mit UV-Tisch, digitaler Kamera und Bildaufnahme-Software zur Verfügung. Jedes Gel wurde mit einheitlichen Parametern belichtet, aufgenommen

und zur späteren Analyse gespeichert. Die DNA-Fragmente, die für eine Klonierung verwendet werden sollten, wurden mit einem Skalpell unter UV-Licht ausgeschnitten.

2.6 Klonierung

Für die Klonierung eines DNA-Fragmentes konnte entweder direkt das PCR-Produkt verwendet werden oder die DNA wurde aus dem Agarose-Gel mit Hilfe des „PCR-Prep-Kits“ von Promega aufgereinigt. Die PCR-Fragmente wurden über Nacht bei 4 °C in den pGEM-T-Vektor ligiert (10 µl 10fach Ligationspuffer, 8 µl DNA, 1 µl T-Vektor, 1 µl T₄-Ligase). Am nächsten Tag wurden 200 µl kompetente *E.coli-XL-1Blue*-Zellen langsam aufgetaut, mit dem Ligationsansatz versetzt und 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 2 min auf 42 °C erwärmt, auf Eis abgekühlt und in 900 µl LB-Medium (1 % Pepton, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % NaCl) 1-2 Stunden bei 37 °C und 240 U/min inkubiert. Nach der ersten Vermehrungsphase wurden die Zellen auf einem Selektionsmedium (LB-Medium mit 1,5 % Agar, 50 µg/ml Ampicillin, 40 µg/ml X-Gal, 0,2 mM IPTG) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C angezüchtet. Die weißen, das Plasmid enthaltenden Kolonien wurden in 3 ml LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin angeimpft und nochmals über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die Plasmid-DNA wurde mit dem „GFX™ Micro Plasmid Prep Kit“ entsprechend des Produkt-Protokolls extrahiert und in 30 µl sterilem Wasser resuspendiert. Anschließend wurde ein Restriktionsverdau vorgenommen. Der Restriktionsansatz setzte sich wie folgt zusammen: 5 µl Plasmid-DNA, 3 µl Wasser, 1 µl Puffer B⁺, 0,5 µl Apa I (5 U), 0,5 µl Sac I (5 U). Nach Inkubation für 2 Stunden bei 37 °C wurde das Ergebnis auf einem 1,5 %igen Agarose-Gel sichtbar gemacht.

2.7 Sequenzierung

Die im Vektor befindlichen Fragmente wurden mit dem „ABI Prism Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit“ sequenziert. Eingesetzt wurden 3 µl Plasmid-DNA, 10 pmol Primer (T7 oder SP6), 8 µl Terminator-Mix und 8 µl Wasser. Die Sequenzierungs-PCR wurde in einem Heizblock mit 28 Zyklen mit je 96 °C für 30 s, 45 °C für 15 s, 60 °C für 4 min durchgeführt. Nach Präzipitation mit Ethanol wurde die DNA in 4 µl Ladepuffer resuspendiert und im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät der MLU im automatischen Sequenzer ABI 373 (Applied Biosystems) analysiert. Die erhaltenen

Sequenzdaten wurden mit dem „*Basic Local Alignment Search Tool*“ (BLAST) im *World Wide Web* mit vorhandenen Sequenzen verglichen.

2.8 Statistik

Für jedes untersuchte Gen wurden drei unabhängige Expositionsversuche ausgewertet. Jede PCR wurde für jedes Gen zweimal wiederholt und semiquantitativ ausgewertet. Zur Analyse der mit Hilfe der Geldokumentationssoftware BioRad 1D erhaltenen optischen Dichten der PCR-Banden wurden die Programme Microsoft Excel und SPSS 10.0 benutzt. Den Referenzwert bildete das Mittel aus drei β -Aktin-PCR. Zur Vereinfachung wurde der ermittelte β -Aktin/Zielgen-Quotient der DMSO-Kontrolle jedes Versuches gleich 1 gesetzt und die Verhältnisse der beiden exponierten Gruppen dazu entsprechend berechnet. Für die Bestimmung der p-Werte wurde ein Univarianztest mit Bonferroni-Korrektur verwendet. Für ein $p < 0,05$ wurde statistische Signifikanz angenommen.

2.9 Geräte, Chemikalien, Enzyme, Oligonukleotide

Amersham (Piscataway, NJ, USA)	Sequenzierungs-Kit, <i>Micro Plasmid Prep Kit</i>
Biorad (München)	Geldokumentationssoftware BioRad 1D
Biosource (Nivelles, Belgien)	PCR-Primer
Biometra (Göttingen)	TRIO <i>Thermoblock Cycler</i> , Gelkammersysteme
Biozym (Oldendorf)	Agarose, PCR Softtubes
DYNAL (Oslo, Norwegen)	<i>Magnetic Particel Concentrator</i> [®] , DYNABEADS [®]
Heraeus (Hanau)	Zentrifugen, Wassermantelinkubator
Intervet GmbH (Tönisvorst)	PMSG, Neutra-PMSG
Life Technologies (Eggenstein)	Taq-Polymerase, PCR-Primer, PCR-Puffer, MgCl ₂ , dNTP
MBI Fermentas (Hanover, MD, USA)	Apa I, Sac I, Puffer B ⁺ (mit BSA), 100bp-Leiter
Merck (Darmstadt)	Ethanol, Isopropanol
Ökometric (Bayreuth)	hochgereinigte PCB-Kongenere
Perkin Elmer (Weiterstadt)	<i>GeneAmp</i> [®] <i>RNA PCR Core Kit</i>
Promega (Mannheim)	pGEM-T-Vektor, Ligationspuffer, T4-Ligase, PCR-Prep-Kit
Roth (Karlsruhe)	DMSO, Ethidiumbromid, X-Gal, IPTG, Agar, EDTA, NaCl, Pepton
Schering AG (Berlin)	hCG

Seromed (Berlin)	BSM-II
Serva (Heidelberg)	Ampicillin, Tris
Sigma (Louis, MO, USA)	PBS, Pentobarbital, BSA

Die verwendeten Primer sind zusammen mit den entsprechenden RT-PCR Bedingungen in der folgenden Tabelle zusammengefasst:

Gen	Primersequenz 5' → 3'	T [°C]	Z	D [μl]	G [bp]
β-Aktin	F CTA CAA TGA GCT GCG TGT GG R TAG CTC TTC TCC AGG GAG GA	60	28	2	450
CYP 1A1	F GGG CAA ACG CAA GTG CAT R AGA GGG ACA AGT CCA GAG	60	35	3	352
CYP 1B1	F CAA CCG CAA CTT CAG CAA CT R CAG GAC ATA GGG CAG GTT G	60	42	5	364
Gst π 1	F GCT GGA AGG AGG AGG TGG T R GTG ACG CAG GAT GGT ATT GG	60	33	3	132
HIF-1α	F GCC GAG GAA GAA CTA TGA AC R GTT TCT GTG TCG TTG CTG CC	60	33	6	730
VEGF	F CTT GCT GCT CTA CCT CCA CC R CTT TGG TCT GCA TTC ACA TTT G	60	35	3	361
VEGFR2	F GTC GGA GAA GAA CGT GGT GAA G R GAA CGA TGT AGT CTT TGC CAC C	60	40	5	424
TIMP-2	F GCC AAA GCG GTC AGC GAG R CCA GTC CAT CCA GAG GCA C	60	33	3	392
MMP-2	F GAC CAG AGC ACC ATC GAG R GCA GTA CTC CCC ATC GGC	60	25	3	432
COX-2	F CTG CTC CTG AAA CCC ACT CC R GCA GGG ATG TGA GGC GGG TA	60	35	3	607
Cytokeratin 18	F CAG ATT GAG GAG AGC ACC AC R AGT CCT CGC CAT CTT CCA GC	55	34	8	349

Tab. 2.2:

Primersequenzen der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide und RT-PCR-Bedingungen. F = Forward Primer, R = Reverse Primer, T = Annealing-Temperatur, Z = Anzahl der PCR-Zyklen, D = eingesetzte cDNA-Menge, G = Größe des Amplifikates.

3. Ergebnisse

3.1 Charakterisierung der zelllinienspezifischen cDNA

Die Entwicklung zweier Zelllinien, des epithelialen Trophoblasten und des pluripotenten Embryoblasten, ist der erste Differenzierungsschritt in der Embryogenese des Säugetieres. Die Entwicklung des Trophoblasten hängt von der Expression verschiedener Proteine des Zytoskeletts ab. Zu den ersten Genen, die in Trophoblastzellen differenziell exprimiert werden, gehören die Keratine (Jackson et al. 1980, Jackson et al. 1981). Mit degenerierten Primern ist es gelungen, eine partielle DNA-Sequenz von 349 bp Länge des Cytokeratin-18-Gens des Kaninchens zu identifizieren. Die neue partielle Kodonsequenz wurde mit dem Verweis AY099113 in der „GenBank“ Datenbank veröffentlicht. Die Homologie zur humanen Sequenz beträgt 87 % (Abb. 3.1).

```

Kaninchen: 1   cagattgaggagagcaccaccatcgtcacctcgagttggcggaggtcagcgcagccgag 60
|||||
Mensch:      802 cagattgaggagagcaccacagtggtcaccacacagtcgctgaggttggagctgctgag 861
|||||

Kaninchen: 61   acaactcactcacggagctgcccgcaccttccagtccttggagatcgacctggagtcctatg 120
|||
Mensch:      862 acgacgctcacagagctgagacgtacagtccttggagatcgacctggactccatg 921
|||||

Kaninchen: 121  aagaacctgaagatcagcttggagaacagcctgcgggacgtggagacgcgctacgccatg 180
|||
Mensch:      922 agaaatctgaaggccagcttggagaacagcctgagggaggtggaggcccctacgcccta 981
|||||

Kaninchen: 181  cagatggagcagctcaacggcgtgctgctgcacctggagtcagagctggcgcagaccgg 240
|||||
Mensch:      982 cagatggagcagctcaacgggatcctgctgcaccttgagtcagagctggcgcagaccgg 1041
|||||

Kaninchen: 241   gccgagggacagcgcagggcccaggagtagcgaagcctgctgaacatcaagggtcaagctg 300
|||
Mensch:      1042 gcgaggggacagcgcagggcccaggagtagcgaagcctgctgaacatcaagggtcaagctg 1101
|||||

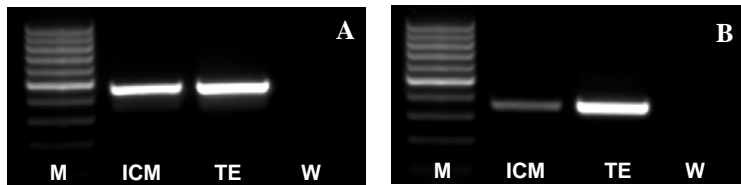
Kaninchen: 301   gaggetgaaatcgccacctaccgcccctgctggaagatggcgaggact 349
|||||
Mensch:      1102 gaggetgagatcgccacctaccgcccctgctggaagatggcgaggact 1150
|||||

```

Abb. 3.1

Alignment der neu identifizierten Cytokeratin-18-Kaninchensequenz mit der humanen Sequenz.

Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR konnte im Trophoblasten im Vergleich zum Embryoblasten ein im Durchschnitt 3,4fach stärkeres Signal für Cytokeratin 18 nachgewiesen werden (Abb. 3.2). Die statistische Auswertung ergab ein $p < 0,01$. Vergleichbare Studien an Kaninchenblastozysten existieren nicht. In der Mausblastozyste wurden mittels RT-PCR (auf β -Aktin bezogen) im Trophoblasten 7fach höhere Cytokeratin-18-Transkripte als im Embryoblasten gefunden (Brison und Schultz 1996).

**Abb. 3.2**

Repräsentative Darstellung der Ergebnisse der PCR für β -Aktin (**A**) und Cytokeratin 18 (**B**). Im Trophoblasten konnte eine im Durchschnitt 3,4fach höhere mRNA Menge an Cytokeratin 18 gegenüber der inneren Zellmasse festgestellt werden ($p=0,006$). M = Längenmarker, ICM = Embryoblast, TE = Trophoblast; W = Wasserprobe.

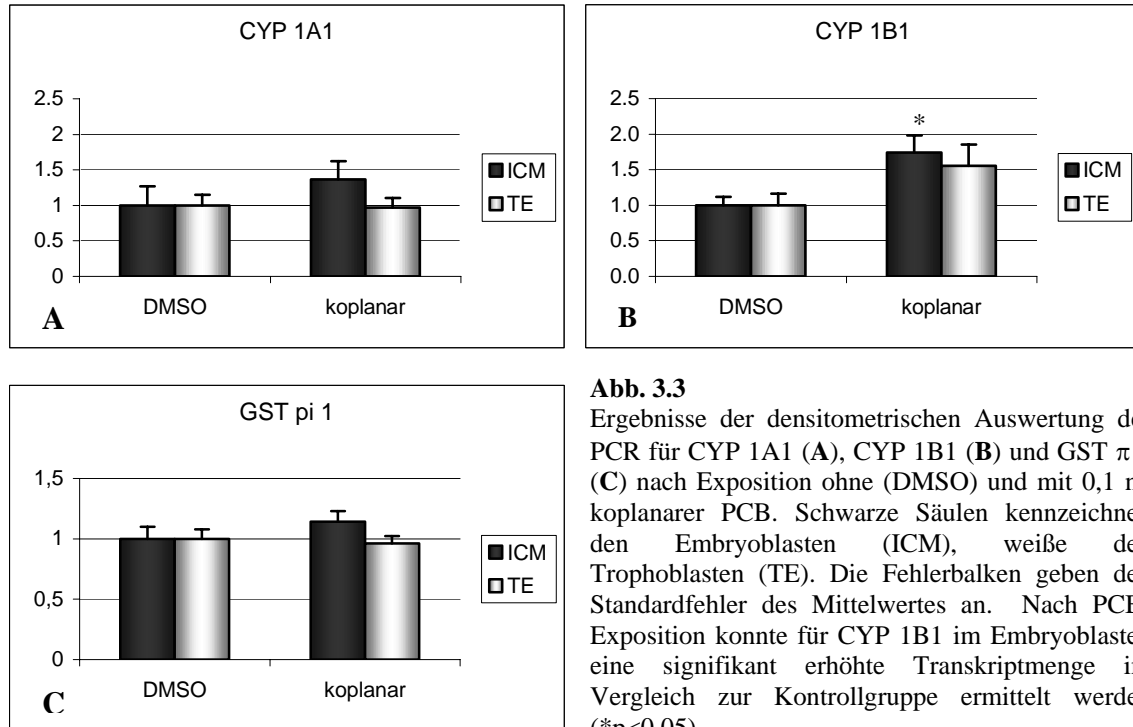
3.2 Untersuchung 6 Tage alter Blastozysten nach Exposition mit koplanaren PCB

3.2.1 Xenobiotika-metabolisierende Enzyme

Als Vertreter fremdstoffmetabolisierender Enzyme wurden in der vorliegenden Arbeit die Cytochrom P450 Monooxygenasen 1A1 und 1B1 und damit zwei typische Gene der AhR-Genbatterie ausgewählt. Ihre Expression kann durch AhR-Liganden induziert werden (Nebert und Gonzalez 1987, Shen et al. 1994). Desweiteren wurde die Glutathion-S-Transferase $\pi 1$ untersucht. Sie ist kein klassisches AhR-Zielgen, kann aber AhR-unabhängig durch PCB induziert werden (Aoki et al. 1992, Matsumoto et al. 1999).

- 0,1 ng/ml

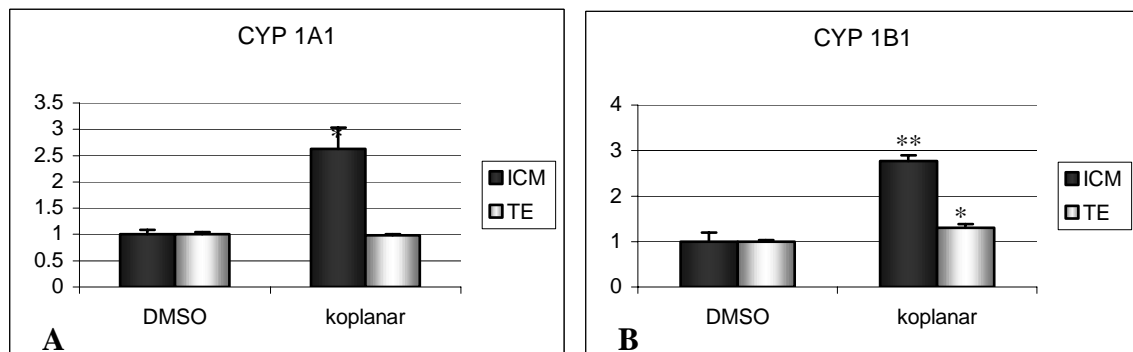
Nach einer vierstündigen Exposition mit den drei koplanaren PCB 77, 126 und 169 einer Konzentration von 0,1 ng/ml Kulturmedium für jedes Kongener konnte für CYP 1A1 im Embryoblasten eine im Durchschnitt 1,4fach erhöhte mRNA-Menge im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ermittelt werden. In einem der insgesamt drei Expositionsversuche wurde sogar ein Anstieg um 100% beobachtet, der mit einem $p<0,05$ statistische Signifikanz aufwies. Im Trophoblasten zeigten sich dagegen keine Veränderungen der relativen Transkriptmenge (Abb. 3.3 A). Die Transkripte für CYP 1B1 waren in beiden Zelllinien im Mittel um 1,7 bzw. 1,6 erhöht. Hier konnte für den Anstieg der Transkriptmenge im Embryoblasten ein $p<0,05$ ermittelt werden (Abb. 3.3 B) Für die Glutathion-S-Transferase $\pi 1$ wurden nur geringe, nicht signifikante Veränderungen gefunden (Abb. 3.3 C).

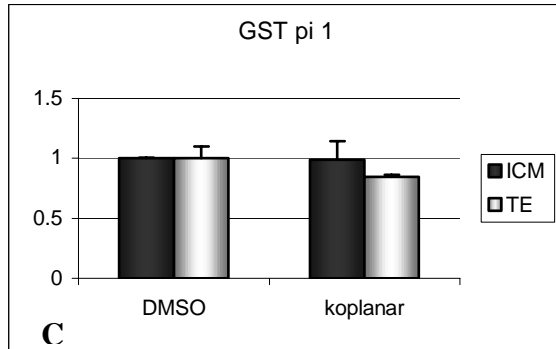
**Abb. 3.3**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 (A), CYP 1B1 (B) und GST π 1 (C) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Nach PCB-Exposition konnte für CYP 1B1 im Embryoblasten eine signifikant erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden (* $p < 0,05$).

-1 μ g/ml

Um Aussagen über eine eventuelle Konzentrationsabhängigkeit der beobachteten Veränderungen treffen zu können, wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten mit 1 μ g/Kongener/ml Kulturmedium für 4 Stunden exponiert. Es zeigte sich erneut ein Anstieg der Transkriptmenge für CYP 1A1 im Embryoblasten, diesmal um 2,6 (Abb. 3.4 A). Der Unterschied zur Kontrollgruppe war statistisch signifikant. Gleichfalls wurde eine Induktion des CYP 1B1 im Embryoblasten um 2,8 und im Trophoblasten um 1,3 festgestellt (Abb. 3.4 B). Der statistische Vergleich ergab für alle drei Versuche einen so geringen Standardfehler, dass für die Induktion von CYP 1B1 in beiden Zelllinien gegenüber der Kontrolle ein $p < 0,01$ berechnet werden konnte. Wiederum keine nennenswerten Unterschiede waren für die GST π 1 zu ermitteln (Abb. 3.4 C)



**Abb. 3.4**

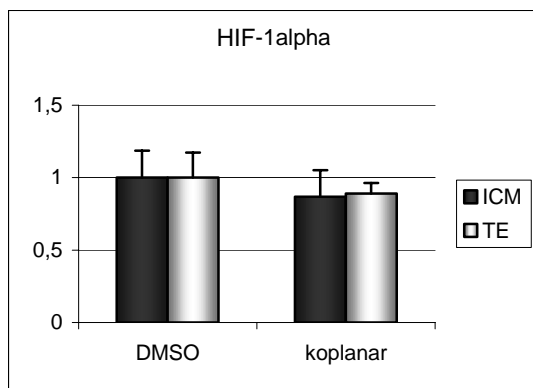
Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 (A), CYP 1B1 (B) und GST π 1 (C) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 μ g koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Nach PCB-Exposition konnte für CYP 1A1 im Embryoblasten und CYP 1B1 in beiden Zelllinien eine signifikant erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zur Kontrollgruppe ermittelt werden (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$).

3.2.2 Hypoxia Inducible Factor-1 α

HIF-1 α wurde als Hypoxie-induzierter Transkriptionsfaktor in die Untersuchungen einbezogen, da koplanare PCB hypoxischen Stress verursachen können (Hassoun et al. 2002, Hennig et al. 2002, Oakley et al. 1996). Mit Primern basierend auf der humanen HIF-1 α -mRNA ist es gelungen, die bis dahin unbekannte vollständige mRNA des Kaninchens zu sequenzieren („GenBank“ Eintrag AY273790). Sie enthält 2472 bp und die Homologie zur humanen HIF-1 α -mRNA beträgt 93%. Als Amplikon für die semiquantitative PCR wurde ein Fragment von 730 bp ausgewählt. Der Sequenzvergleich dieses Fragmentes zur humanen HIF-1 α -Sequenz ist in der Abbildung 3.7 dargestellt.

- 0,1 ng/ml

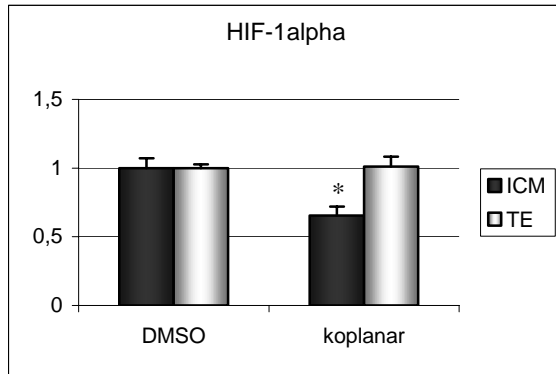
Nach Exposition von 0,1 ng der koplanaren Kongenere konnte in beiden Zelllinien der Blastozyste eine leichte jedoch nicht signifikante Reduzierung des Amplifikates beobachtet werden (Abb. 3.5).

**Abb. 3.5**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für HIF-1 α nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 µg/ml

Die Exposition mit 1µg koplanarer PCB ergab gegenüber der Kontrolle einen signifikanten Abfall der HIF-1α-mRNA auf 0,7 im Embryoblasten. Die HIF-1α-Transkripte im Trophoblasten waren unverändert (Abb. 3.6).

**Abb. 3.6**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für HIF-1α nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Im Embryoblasten konnte ein im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikanter Abfall der HIF-1α-Transkripte ermittelt werden (*p<0,05).

```

Kaninchen: 1   gccgaggaagaactatgaacataaagtctgccacctggaaggtacttcactgtacaggcc 60
              |||
Mensch:      814 gccgaggaagaactatgaacataaagtctgcaacatggaaggtattgactgcacaggcc 873
              |||

Kaninchen: 61   atattcatgtatatgataccaacagtaaccagtcaccagtgccgatataagaaacctccca 120
              |||
Mensch:      874 acattcacgtatatgataccaacagtaaccaacctcagtggtgggtataagaaaccaccta 933
              |||

Kaninchen: 121  tgacatgcttgggtgctgatttgtgaaccattcctcatccatcaaataattgaaattcctt 180
              |||
Mensch:      934 tgacctgcttgggtgctgatttgtgaaccattcctcacccatcaaataattgaaattcctt 993
              |||

Kaninchen: 181  tagacagcaagacgtttctcagtcgacacagcctggatatgaaatcttctactgtgatg 240
              |||
Mensch:      994 tagatagcaagactttcctcagtcgacacagcctggatatgaaatcttctattgtgatg 1053
              |||

Kaninchen: 241  aaagaattactgaattgatgggatatgaaccagaagaacttttgggccgttcaatttatg 300
              |||
Mensch:      1054 aaagaattaccgaattgatgggatatgagccagaagaacttttaggccgttcaatttatg 1113
              |||

Kaninchen: 301  aatattaccatgcttggactctgatcatctgacaaaactcatcatgatatgtttacta 360
              |||
Mensch:      1114 aatattatcatgcttggactctgatcatctgacaaaactcatcatgatatgtttacta 1173
              |||

Kaninchen: 361  aaggacaagtcaccacaggacagtataggatgcttgccaaaagaggtggatatgtctggg 420
              |||
Mensch:      1174 aaggacaagtcaccacaggacagtacaggatgcttgccaaaagaggtggatatgtctggg 1233
              |||

Kaninchen: 421  ttgaaactcaagcaacgggtcatatataataccaagaactctcaaccgcagtgattgtgt 480
              |||
Mensch:      1234 ttgaaactcaagcaactgtcatatataacaccaagaattctcaaccacagtgattgtat 1293
              |||

Kaninchen: 481  gtgtcaattatggtgtgagtggtattattcagcagcacttgattttctccctcaacaaa 540
              |||
Mensch:      1294 gtgtgaattacgttgtgagtggtattattcagcagcacttgattttctccctcaacaaa 1353
              |||

Kaninchen: 541  cagaatgtgtcctcaaaccagtgtaatcttcagatatgaaaatgactcagctgttcacca 600
              |||
Mensch:      1354 cagaatgtgtccttaaaccggttgtaatcttcagatatgaaaatgactcagctattacca 1413
              |||

Kaninchen: 601  aagtgaatcagcagatacaagtagtctctttgacaaactgaagaaggagcctgatgctt 660
              |||
Mensch:      1414 aagttgaatcagaagatacaagtagcctctttgacaaacttaagaaggaaacctgatgctt 1473
              |||

Kaninchen: 661  taactctgctggccccagctgctggagacacaatcatatctttagattttggcagcaacg 720
              |||
Mensch:      1474 taactttgctggccccagccgctggagacacaatcatatctttagattttggcagcaacg 1533
              |||

Kaninchen: 721  acacagaaac 730
              |||
Mensch:      1534 acacagaaac 1543

```

Abb. 3.7

Alignment des für die PCR ausgewählten 730 bp Fragmentes der neu identifizierten HIF-1 α -Kaninchensequenz mit der humanen HIF-1 α -Sequenz.

3.2.3 Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Die Primer für VEGF wurden anhand der teilweise bekannten Nukleotidsequenzen des Kaninchens und des Menschen gelegt. Dabei konnte ein neuer Teil der Kaninchensequenz von 136 bp ermittelt werden, der am 24. Februar 2003 unter dem Verweis AY196796 in der „GenBank“ Datenbank veröffentlicht wurde. Der Sequenzvergleich des erhaltenen Amplifikates ergab eine 91% Homologie zum humanen VEGF (Abb.3.8). Die Primer für VEGFR2 konnten vollständig basierend auf der Kaninchensequenz synthetisiert werden.

```

Kaninchen: 1   cttgctgctctacctccaccatgcccaagtgggccaggctgcacccatggcagaagaagg 60
               |||||
Mensch : 39   cttgctgctctacctccaccatgcccaagtgggccaggctgcacccatggcagaaggagg 98

Kaninchen: 61   agacaataaacccacgaagtggggaagttcatggaagtctaccggcgagctactgccca 120
               || | || | |||||
Mensch: 99   agggcagaatcatcacgaagtggggaagttcatggatgtctatcagcgagctactgccca 158

Kaninchen: 121  gccgatcgagaccttgggggacatctccaggagtaccctgatgagatcgagtacatatt 180
               || |||||
Mensch: 159  tccaatcgagaccctgggggacatctccaggagtaccctgatgagatcgagtacatctt 218

Kaninchen: 181  caagccttcctgctgcctctgggctgctggtggggctgctgcaatgatgaaagcctgga 240
               ||||| ||||| ||||| || ||||| || ||||| ||||| |||||
Mensch: 219  caagccatcctgtgtgccctgatgcatgctggggctgctgcaatgacgagggcctgga 278

Kaninchen: 241  gtgtgtgcccaccgaggagttcaacgtcaccatgcagatcatgaggatcaaacctacca 300
               ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Mensch: 279  gtgtgtgcccactgaggagtccaacatcaccatgcagattatgaggatcaaacctacca 338

Kaninchen: 301  gggccagcacataggggagatgagcttctacagcacaacaaatgtgaatgcagaccaa 360
               ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| ||||| |||||
Mensch: 339  agggcagcacataggagagatgagcttctacagcacaacaaatgtgaatgcagaccaa 398

Kaninchen: 361  g 361
               |
Mensch: 399  g 399

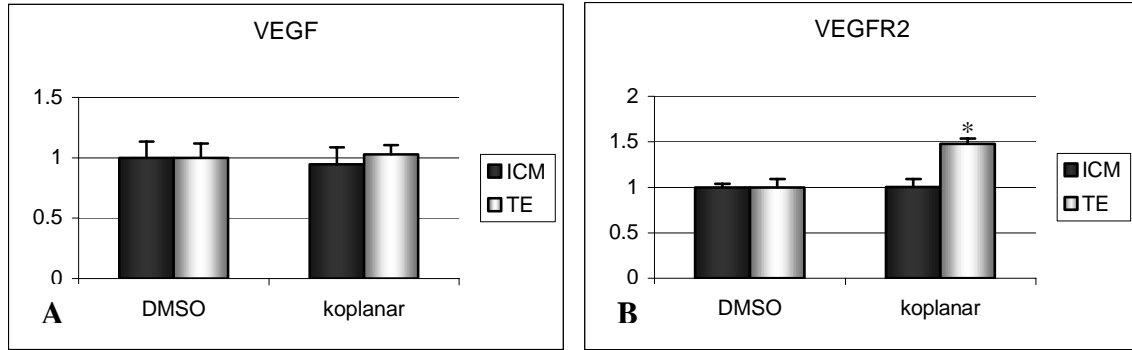
```

Abb. 3.8

Alignment der VEGF Kaninchensequenz mit der humanen VEGF-Sequenz. Der neu identifizierte Anteil von 136 bp ist grau markiert.

- 0,1 ng/ml

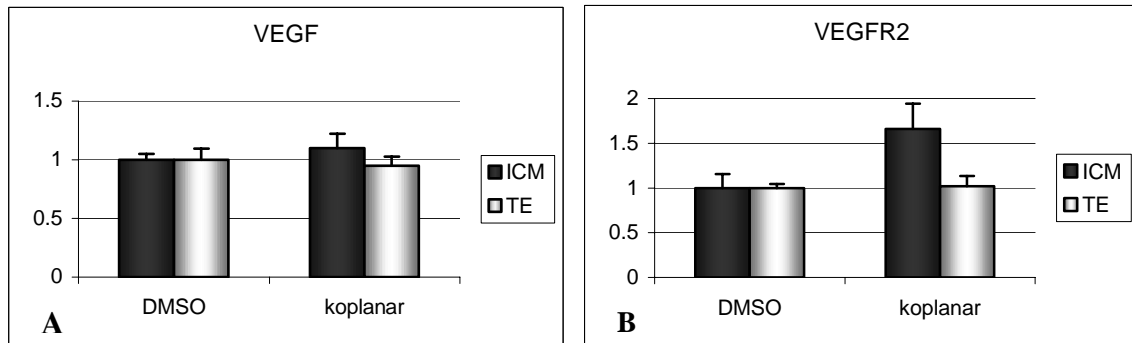
Für VEGF waren in beiden Zelllinien keine Veränderungen zu beobachten (Abb. 3.9 A). VEGFR2-Transkripte waren im Trophoblasten signifikant gegenüber der DMSO-Kontrolle um 1,5 erhöht, im Embryoblasten dagegen unverändert (Abb. 3.9 B).

**Abb. 3.9**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für VEGF (A) und VEGFR2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für VEGFR2 konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg im Trophoblasten ermittelt werden (*p<0,05).

- 1 µg/ml

Auch die Exposition mit 1 µg koplanarer PCB wirkte sich nicht auf die VEGF- mRNA aus (Abb. 3.10 A). Für VEGFR2 zeigte sich hier ein verstärktes, jedoch nicht signifikant erhöhtes Signal in der Embryoblasten-cDNA mit einem Anstieg um 1,7 während die VEGFR2-Transkripte im Trophoblasten unverändert blieben (Abb. 3.10 B).

**Abb. 3.10**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für VEGF (A) und VEGFR2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

3.2.4 Matrix-Metalloprotease 2 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2

Als Vertreter der während der Implantation aktivierten Matrix-Metalloproteasen wurde in der vorliegenden Arbeit die Typ IV-Kollagenase *Matrix Metalloproteinase 2* (MMP-2, auch Gelatinase A) gewählt. Die MMP-2 weist ein besonders hohes Substratspektrum auf (Aimes und Quigley 1995) und scheint an der frühen Phase der Dezidualisierung und Neovaskularisation beteiligt zu sein (Das et al. 1997a). Gleichmaßen wurde ihr spezifischer Inhibitor *Tissue Inhibitor of Metalloproteinases* (TIMP-2) untersucht. Die Nukleotidsequenzen von MMP-2 und TIMP-2 waren für das Kaninchen bekannt, sodass spezifische Primer gelegt werden konnten. Die Amplifikate wurden durch Sequenzierungen bestätigt.

- 0,1 ng/ml

Die MMP-2-Expression war nach Exposition mit 0,1 ng der koplaren Kongenere im Trophoblasten um 0,58 reduziert; im Embryoblasten war kein Unterschied festzustellen (Abb. 3.11 A). Für TIMP-2 konnten mit den Faktoren 0,97 für den Embryoblasten und 1,12 für den Trophoblasten keine Effekte beobachtet werden (Abb. 3.11 B).

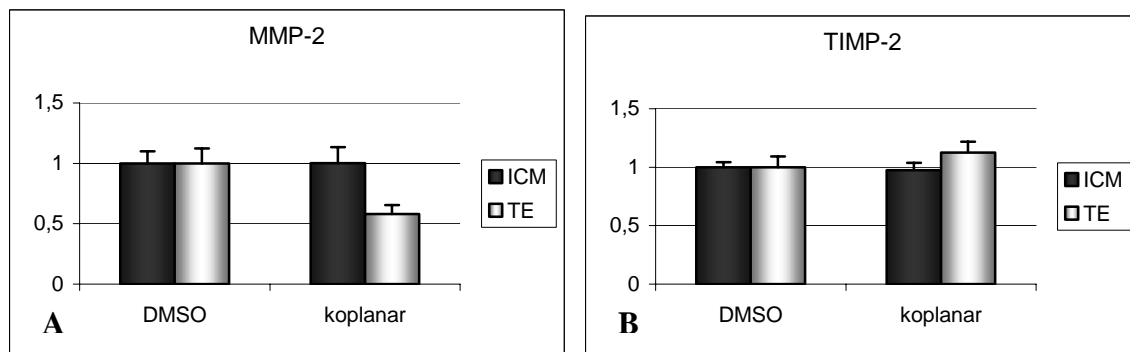
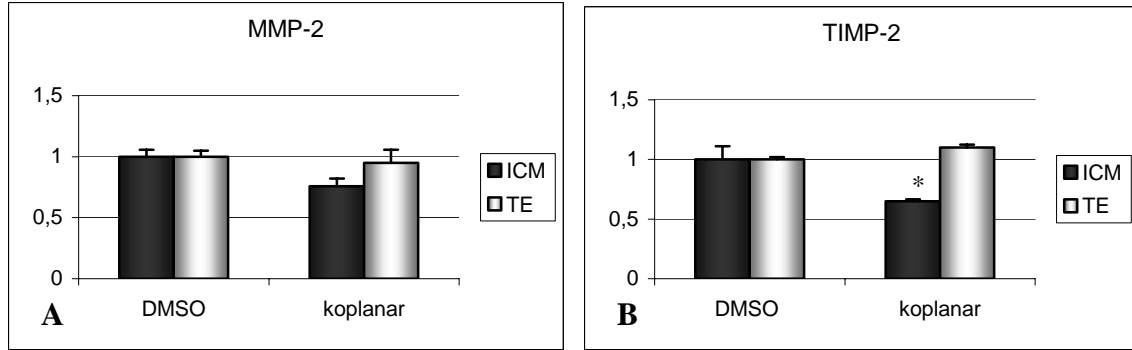


Abb. 3.11

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für MMP-2 (A) und TIMP-2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng koplaren PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 µg/ml

Nach Exposition mit 1 µg der drei koplaren Kongenere sank das MMP-2-Transkript im Trophoblasten nicht, wie erwartet, weiter ab, sondern war mit einem Faktor von 0,95 beinahe unverändert gegenüber der Kontrollgruppe. Es konnte jedoch ein nicht signifikanter leichter Abfall der MMP-2-mRNA des Embryoblasten auf 0,8 ermittelt werden (Abb. 3.12 A). Auch für TIMP-2 wurde im Embryoblasten eine verminderte Transkriptmenge (0,65) gesehen. Im Vergleich zur DMSO-Kontrolle war diese Reduktion statistisch signifikant. Die Trophoblasten-mRNA für TIMP-2 war mit einem Faktor von 1,1 eher unverändert (Abb. 3.12 B).

**Abb. 3.12**

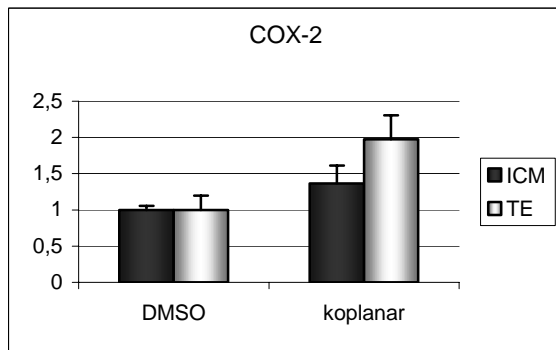
Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für MMP-2 (A) und TIMP-2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für TIMP-2 war der Abfall im Embryoblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe statistisch signifikant (* $p < 0,05$).

3.2.5 Cyclooxygenase-2

Die Cyclooxygenase-2 ist das schrittbestimmende Enzym der Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure. Sie kann durch PCB induziert werden.

- 0,1 ng/ml

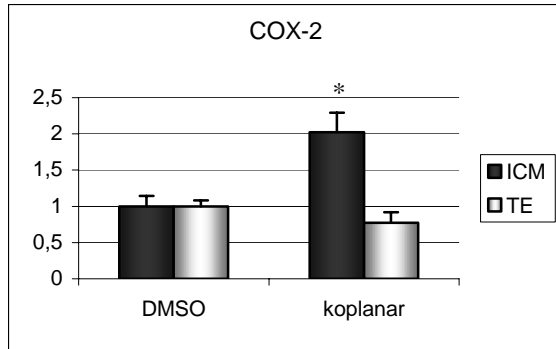
Die relative Transkriptmenge der COX-2 war nach Exposition mit 0,1 ng/ml der koplanaren PCB in beiden Zelllinien der Blastozysten erhöht (Abb. 3.13). Im Embryoblasten wurde eine Zunahme um 1,4 und im Trophoblasten um 2,0 ermittelt.

**Abb. 3.13**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für COX-2 nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 µg/ml

Nach 4stündiger Exposition mit 1 µg koplanarer PCB zeigte sich im Embryoblasten ein Anstieg der Transkripte um 2,02 im Vergleich zur DMSO-Kontrolle (Abb. 3.14). Diese Differenz erwies sich mit einem $p < 0,05$ als signifikant. Im Trophoblasten war dagegen ein leichter Abfall auf 0,77 zu beobachten.

**Abb. 3.14**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für COX-2 nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Der Anstieg im Embryoblasten war gegenüber der Kontrolle signifikant erhöht (* $p < 0,05$).

Repräsentative Elektrophorese-Daten der Transkripte nach Exposition mit koplanaren PCBs werden auf den Seiten 32 und 33 in der Abbildung 3.25 dargestellt. Alle statistisch berechneten Mittelwerte werden anschließend in Abschnitt 3.4 tabellarisch zusammengefasst.

3.3 Untersuchung 6 Tage alter Blastozysten nach Exposition mit nicht koplanaren PCB

3.3.1 Xenobiotika-metabolisierende Enzyme

Zur Untersuchung des Einflusses nicht koplanarer PCB auf die Transkription wurden 6 Tage alte Kaninchenblastozysten für vier Stunden mit einem Gemisch der nicht koplanaren Kongenere 28, 52, 101, 118, 138, 153 und 180 in einer Konzentration von jeweils 0,1 ng bzw. 1 µg/Kongener/ml Kulturmedium exponiert.

- 0,1 ng

Die Exposition mit nicht koplanaren PCB zeigte für die ausgewählten Enzyme gleichsinnige Veränderungen zu den beobachteten Effekten, die durch die koplanaren Kongenere verursacht wurden. Auch hier wurde für das CYP 1A1 eine Erhöhung der relativen Transkripte auf 1,4 in Embryoblasten festgestellt. Im Trophoblasten blieb ein deutlicher Effekt wiederum aus (Abb. 3.15 A). Für CYP 1B1 wurde eine erhöhte mRNA-Menge in beiden Zelllinien um jeweils 1,4 ermittelt (Abb. 3.15 B). Die GST π 1 war nach Exposition nahezu unverändert (Abb. 3.15 C).

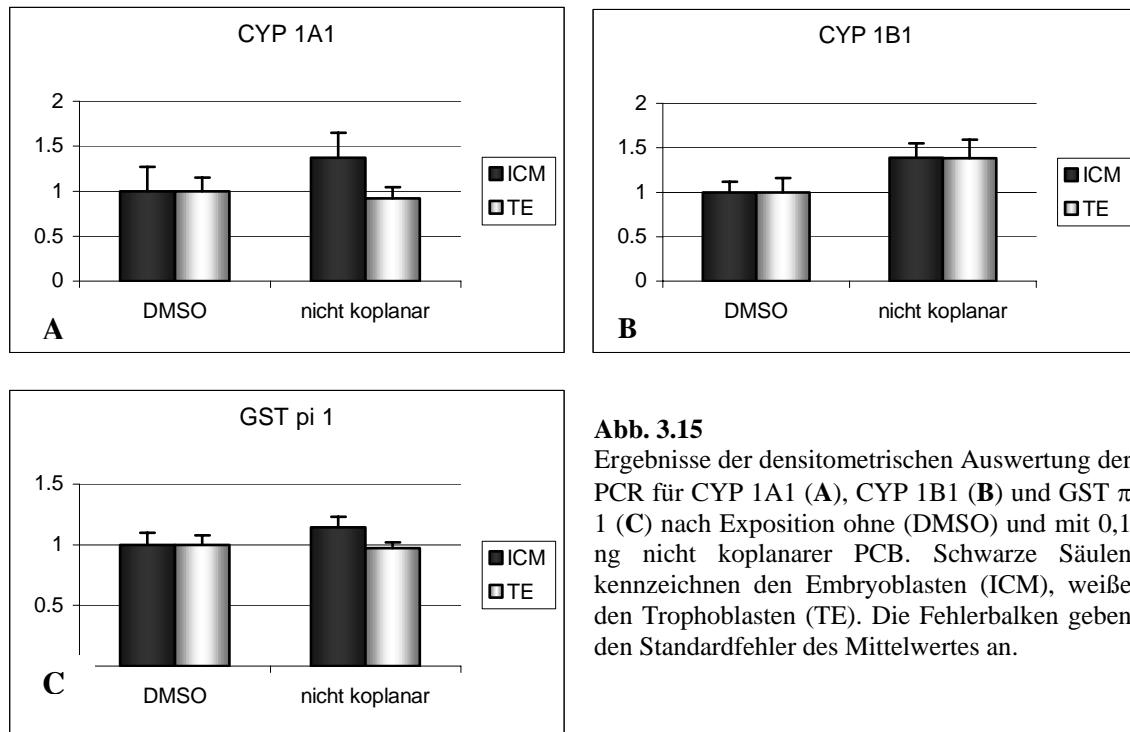


Abb. 3.15

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 (A), CYP 1B1 (B) und GST π 1 (C) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 µg/ml

Nach vierstündiger Exposition mit 1 µg nicht koplanarer PCB zeigte sich für CYP 1A1 ein im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant erhöhtes PCR-Signal um 2,4, während die Transkripte im Trophoblasten unverändert blieben (Abb. 3.16 A). CYP 1B1 war in beiden Zelllinien verglichen mit der Kontrolle signifikant erhöht (Abb. 3.16 B) und für die GST π 1-Transkripte

konnte ein geringer nicht signifikanter Abfall in Embryo- und Trophoblast beobachtet werden (Abb. 3.16 C).

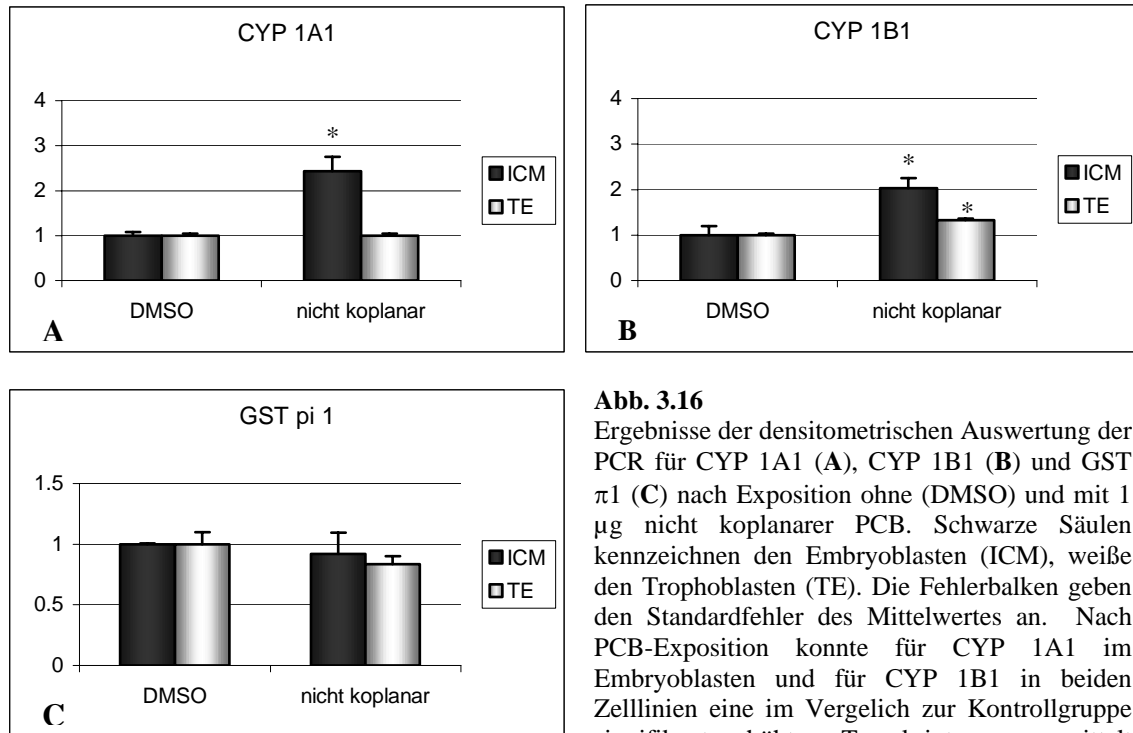


Abb. 3.16

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für CYP 1A1 (A), CYP 1B1 (B) und GST $\pi 1$ (C) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 μg nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Nach PCB-Exposition konnte für CYP 1A1 im Embryoblasten und für CYP 1B1 in beiden Zelllinien eine im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant erhöhte Transkriptmenge ermittelt werden (* $p < 0,05$).

3.3.2 Hypoxia Inducible Factor-1 α

- 0,1 ng/ml

Für HIF-1 α konnte nach Exposition mit nicht koplanaren Kongeneren einer Konzentration von 0,1 ng/ml ein leicht vermindertes Signal im Embryoblasten ermittelt werden, während im Trophoblasten keine Veränderungen zu sehen waren (Abb. 3.17).

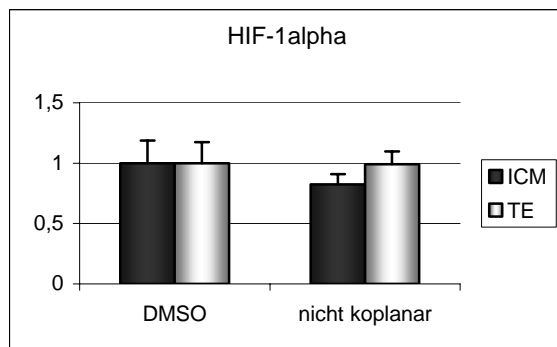


Abb. 3.17

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für HIF-1 α nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Auch nach Exposition mit 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ der nicht koplanaren Kongenere waren die HIF-1 α -Transkripte im Embryoblasten leicht verringert. Im Gegensatz zur Exposition mit 1 μg koplanarer

PCB konnte hier jedoch kein signifikanter Unterschied zur DMSO-Kontrolle ermittelt werden. Zusätzlich wurde eine geringe Erhöhung des PCR-Signals im Trophoblasten gefunden (Abb. 3.18).

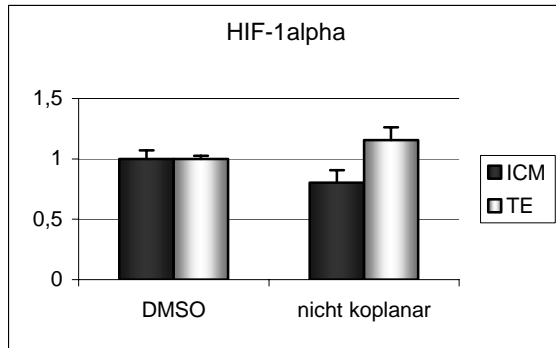


Abb. 3.18

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für HIF-1 α nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 μ g nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an

3.3.3 Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

- 0,1 ng/ml

Auch die Exposition mit nicht koplanaren PCB hatte bei 0,1 ng pro Kongener keinen Effekt auf die VEGF-Transkripte (Abb. 3.19 A). Für VEGFR2 konnte in beiden Zelllinien ein Anstieg ermittelt werden, dessen Auswertung gegenüber der Kontrollgruppe für den Trophoblasten eine Signifikanz mit einem $p < 0,01$ ergab (Abb. 3.19 B).

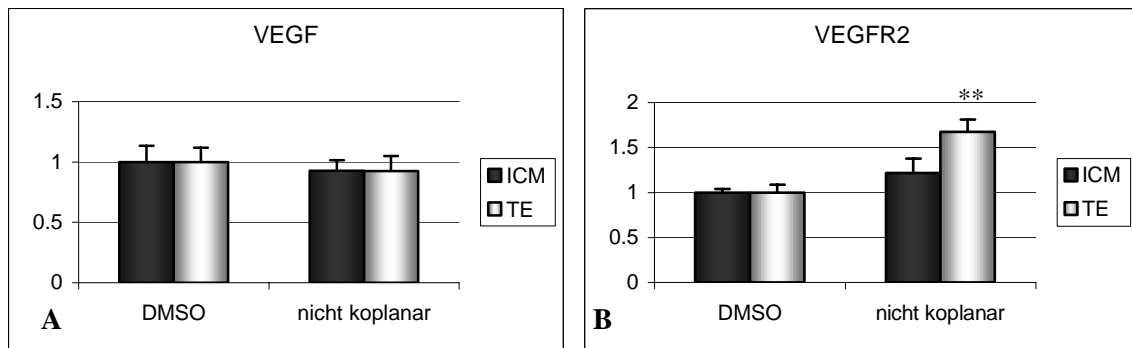
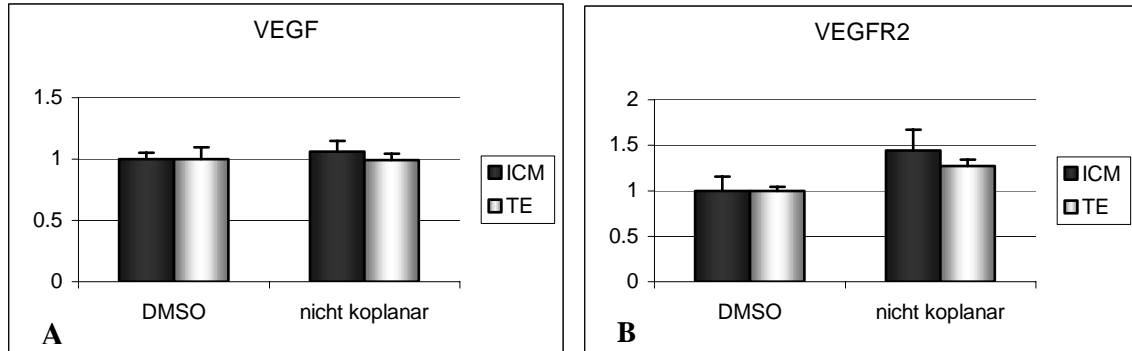


Abb. 3.19

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für VEGF (A) und VEGFR2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für VEGFR2 konnte im Trophoblasten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg ermittelt werden (** $p < 0,01$).

- 1 $\mu\text{g/ml}$

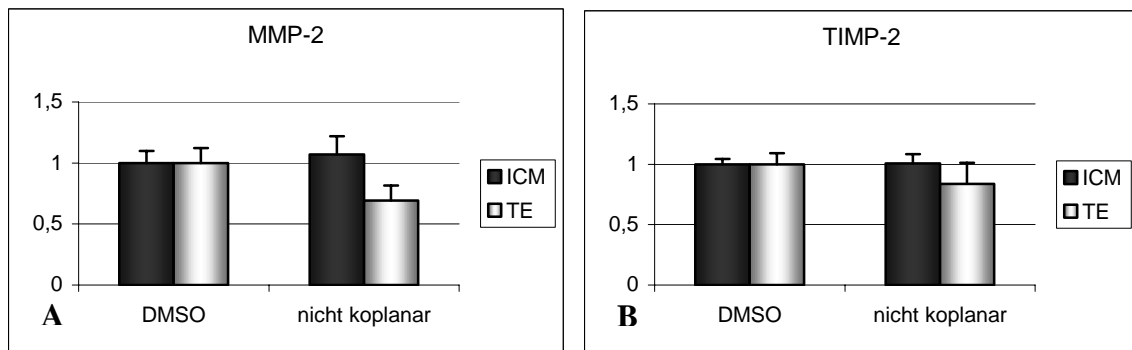
Nach Exposition mit 1 $\mu\text{g/ml}$ der sieben nicht koplanaren Kongenere konnten erneut keine Veränderung bei VEGF beobachtet werden (Abb. 3.20 A). Die VEGFR2-Transkripte waren hier in beiden Zelllinien um 1,44 bzw. 1,27 nicht signifikant erhöht (Abb. 3.20 B).

**Abb. 3.20**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für VEGF (A) und VEGFR2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 μg nicht-koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

3.3.4 Matrix-Metalloprotease 2 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2**- 0,1 ng/ml**

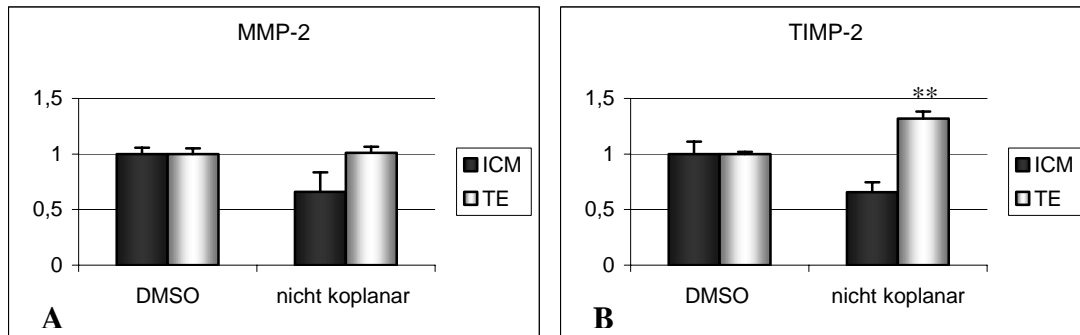
Nach Behandlung mit 0,1 ng/ml/Kongener der nicht koplanaren PCB, konnte für die Transkripte der Matrix-Metalloprotease 2 im Trophoblasten ein Abfall auf 0,7 gegenüber der Kontrolle ermittelt werden. Im Embryoblasten erschienen die Transkripte nicht verändert (Abb. 3.21 A). Für TIMP-2 wurde im Trophoblasten ein geringer Abfall auf 0,8 beobachtet. Kein Effekt wurde im Embryoblasten gefunden (Abb. 3.21 B).

**Abb. 3.21**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für MMP-2 (A) und TIMP-2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

- 1 µg/ml

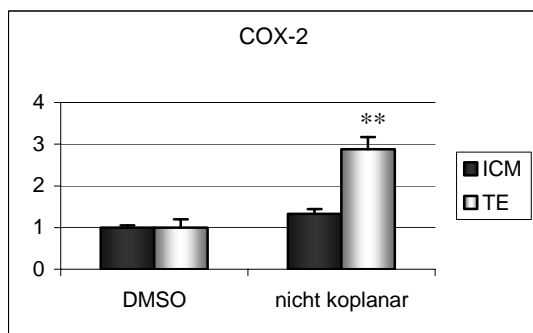
Die Exposition mit 1 µg/ml/Kongener der nicht koplanaren PCB resultierte in gegenüber den Ergebnissen der geringeren Konzentration unerwarteten Veränderungen. Für MMP-2 konnte nun im Embryoblasten ein Abfall der Transkripte auf 0,7 ermittelt werden, während die Transkripte im Trophoblasten unverändert waren (Abb. 3.22 A). TIMP-2 war vermindert im Embryoblasten (0,66) und im Trophoblasten gegenüber der Kontrollgruppe signifikant um 1,32 erhöht (Abb. 3.22 B)

**Abb. 3.22**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für MMP-2 (A) und TIMP-2 (B) nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg nicht koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für TIMP-2 konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe im Trophoblasten ein signifikanter Anstieg ermittelt werden (**p<0,01).

3.3.5 Cyclooxygenase-2**- 0,1 ng/ml**

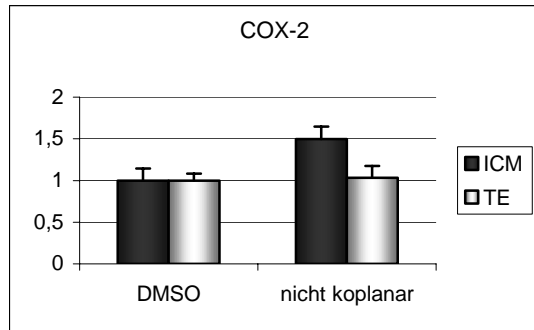
Nach Exposition der Blastozysten mit 0,1 ng/ml/Kongener des Gemisches der nicht-koplanaren PCB waren die Transkripte für die Cyclooxygenase-2 im Trophoblasten signifikant um fast das dreifache (2,9) gegenüber der DMSO-Kontrolle erhöht (Abb. 3.23). Diese Induktion fiel höher aus als bei den koplanaren Kongeneren. Im Embryoblasten zeigten sich keine nennenswerten Veränderungen.

**Abb. 3.23**

Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für COX-2 nach Exposition ohne (DMSO) und mit 0,1 ng nicht-koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an. Für den Trophoblasten konnte im Vergleich zur Kontrollgruppe ein signifikanter Anstieg ermittelt werden (**p<0,01).

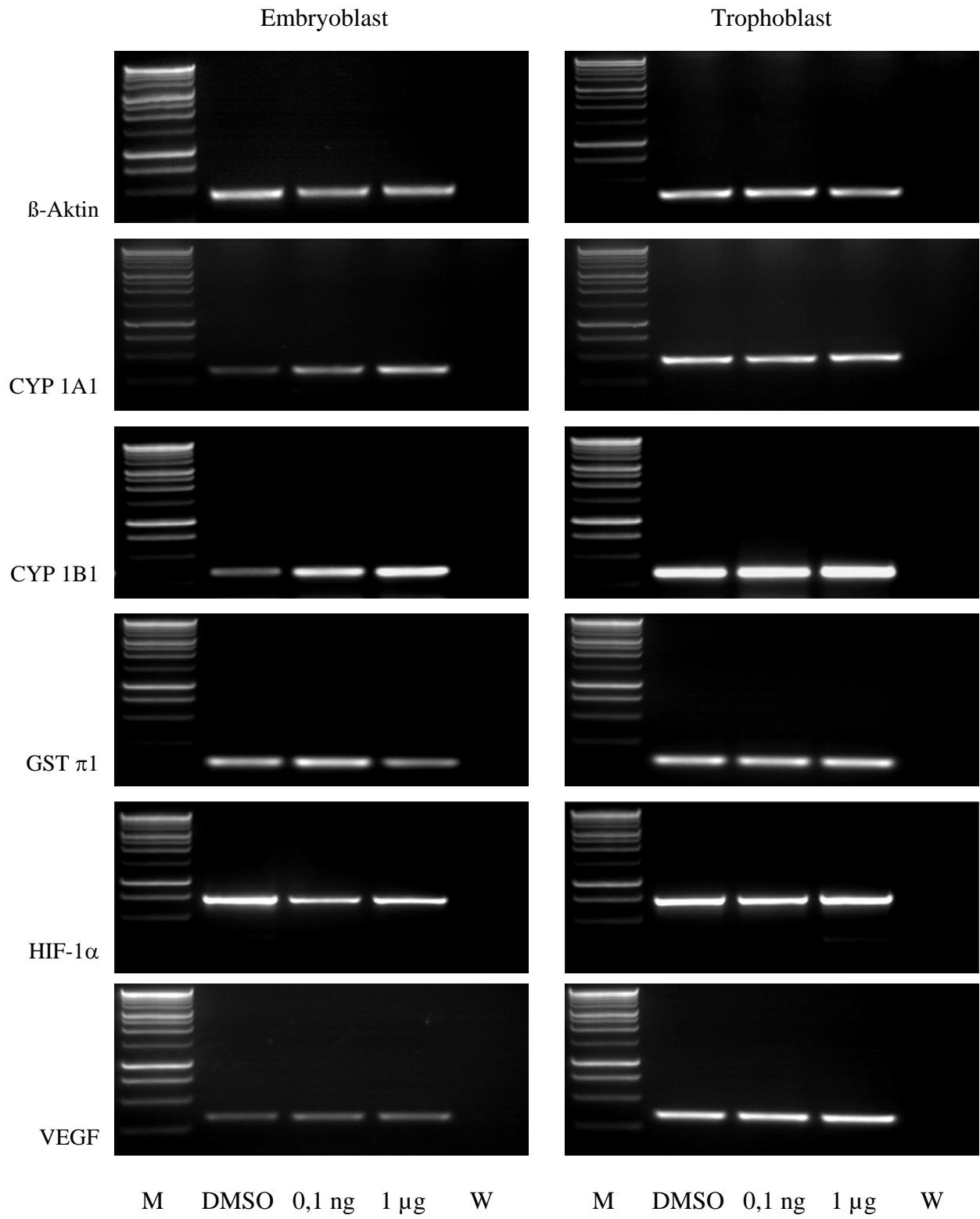
- 1 µg/ml

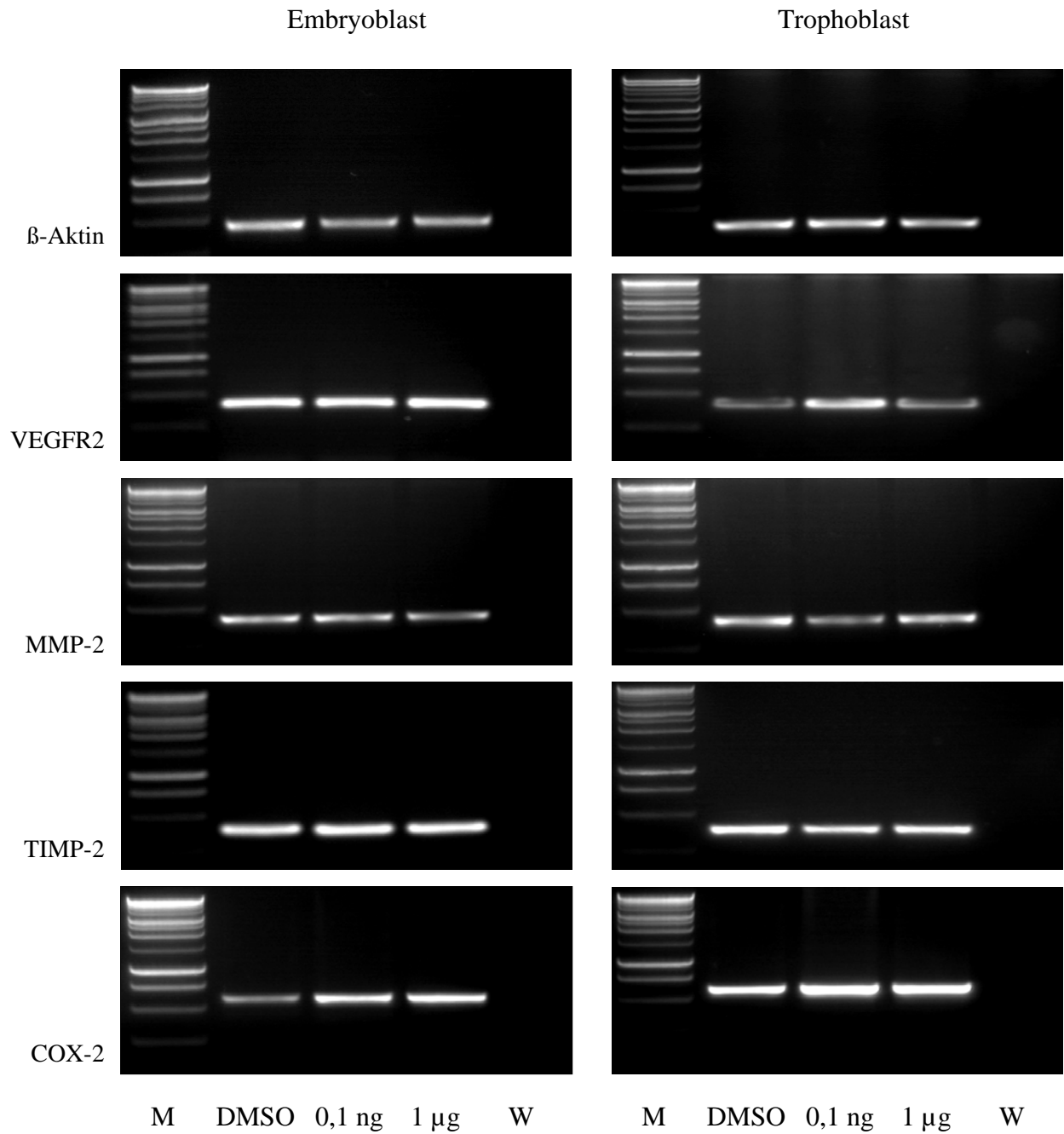
Die Erhöhung der PCB-Konzentration auf 1 µg/ml/Kongener resultierte in einem Anstieg der COX-2-Transkripte im Embryoblasten um 1,33 (Abb. 3.24). Ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden. Im Gegensatz zur beschriebenen Induktion nach 0,1 ng PCB waren die Transkripte im Trophoblasten nun unverändert gegenüber der DMSO-Kontrolle.

**Abb. 3.24**

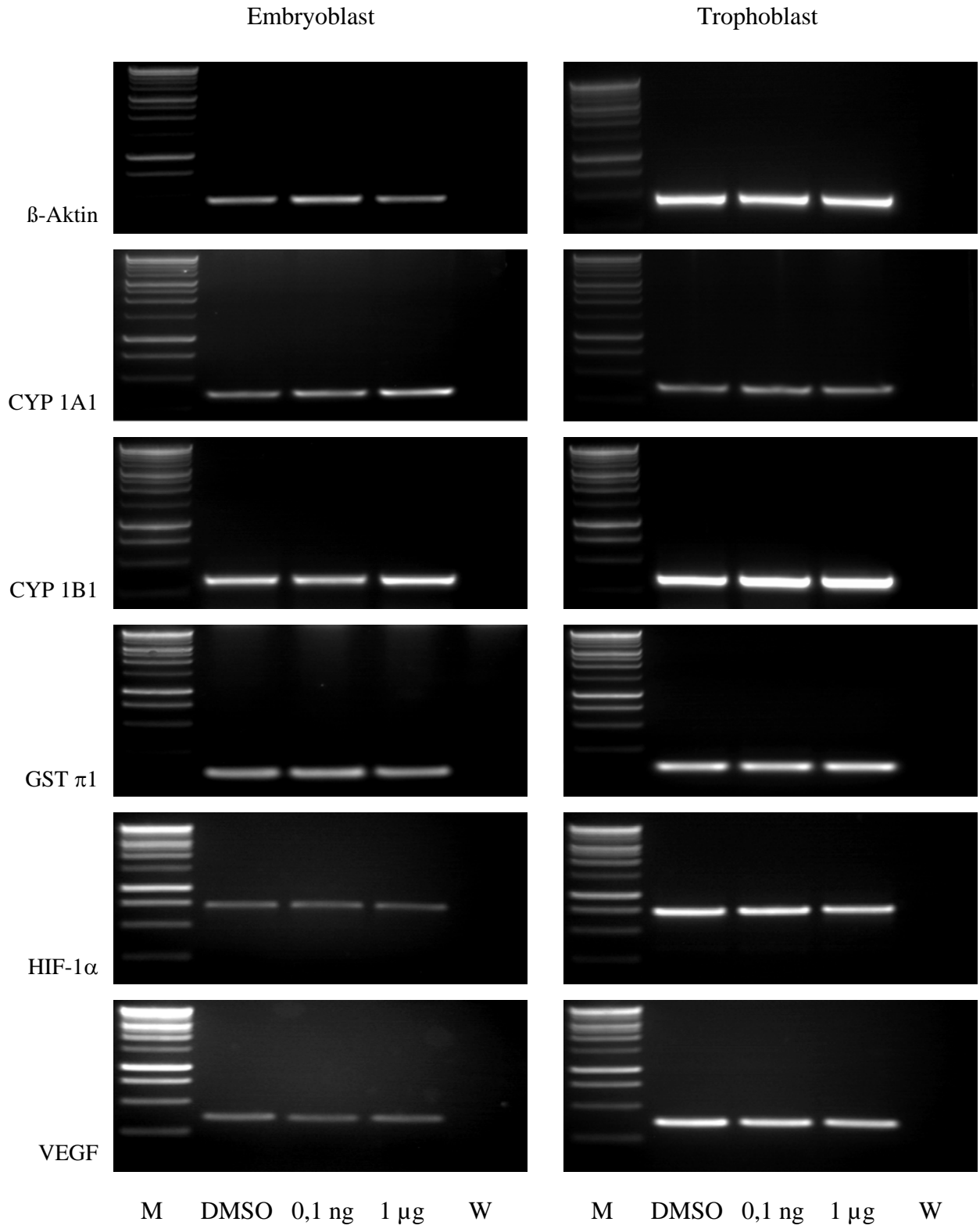
Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der PCR für COX-2 nach Exposition ohne (DMSO) und mit 1 µg nicht-koplanarer PCB. Schwarze Säulen kennzeichnen den Embryoblasten (ICM), weiße den Trophoblasten (TE). Die Fehlerbalken geben den Standardfehler des Mittelwertes an.

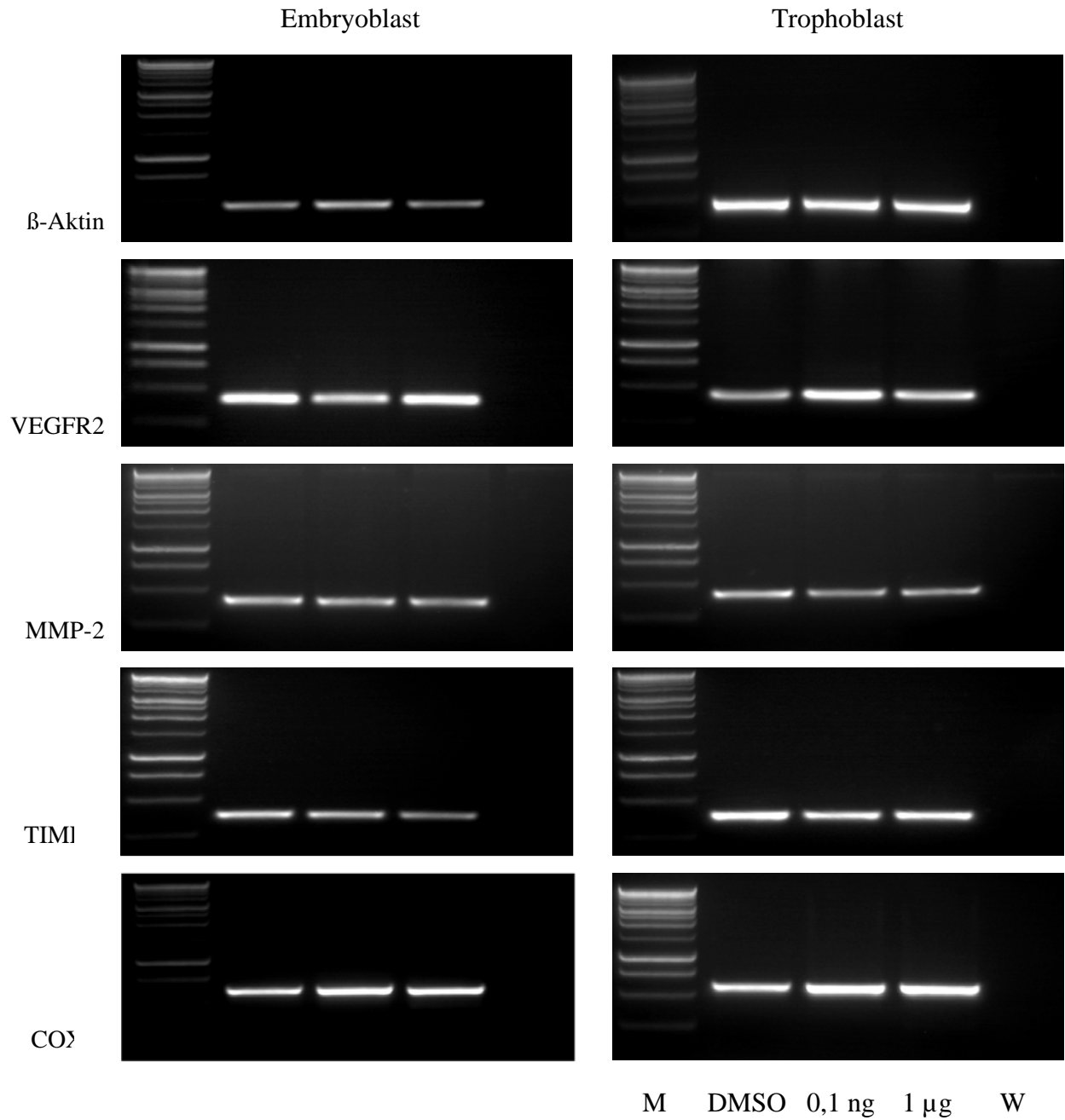
Repräsentative Elektrophorese-Daten der Transkripte nach Exposition mit nicht koplanaren PCBs werden auf den Seiten 34 und 35 in Abbildung 3.26 dargestellt. Alle statistisch berechneten Mittelwerte werden anschließend in Abschnitt 3.4 tabellarisch zusammengefasst.



**Abb. 3.25**

Gelelektrophoresen nach Exposition mit 0,1 ng und 1 µg koplanarer PCB. Die linke Reihe zeigt die Ergebnisse im Embryoblasten, in der rechten Reihe sind die Ergebnisse im Trophoblasten dargestellt. M = Längenmarker, DMSO = Kontrollgruppe, W = Wasserprobe



**Abb. 3.26**

Gelelektrophoresen nach Exposition mit 0,1 ng und 1 µg nicht koplanarer PCB. Die linke Reihe zeigt die Ergebnisse im Embryoblasten, in der rechten Reihe sind die Ergebnisse im Trophoblasten dargestellt. M = Längenmarker, DMSO = Kontrollgruppe, W = Wasserprobe

3.4 Tabellarische Übersicht

- koplanare PCB

	0,1 ng/ml		1µg/ml	
	Embryoblast	Trophoblast	Embryoblast	Trophoblast
CYP 1A1	1,36 ± 0,26	0,97 ± 0,13	2,63 ± 0,40*	0,98 ± 0,02
CYP 1B1	1,74 ± 0,24*	1,55 ± 0,30	2,77 ± 0,13**	1,30 ± 0,08*
GST π 1	1,14 ± 0,09	0,96 ± 0,06	0,99 ± 0,15	0,84 ± 0,02
HIF-1α	0,67 ± 0,18	0,89 ± 0,07	0,65 ± 0,07*	1,01 ± 0,07
VEGF	0,95 ± 0,14	1,03 ± 0,08	1,10 ± 0,12	0,95 ± 0,08
VEGFR2	1,00 ± 0,09	1,48 ± 0,06*	1,66 ± 0,29	1,02 ± 0,12
MMP-2	1,00 ± 0,13	0,58 ± 0,07	0,76 ± 0,06	0,95 ± 0,11
TIMP-2	0,97 ± 0,06	1,12 ± 0,10	0,65 ± 0,02*	1,10 ± 0,02
COX-2	1,36 ± 0,25	1,97 ± 0,33	2,02 ± 0,27*	0,77 ± 0,15

Tab. 3.1: Zusammenfassung der densitometrischen PCR-Auswertung nach Exposition mit koplanaren PCB. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (* p<0,05; ** p<0,01).

- nicht-koplanare PCB

	0,1 ng/ml		1µg/ml	
	Embryoblast	Trophoblast	Embryoblast	Trophoblast
CYP 1A1	1,37 ± 0,28	0,92 ± 0,13	2,43 ± 0,32*	0,99 ± 0,04
CYP 1B1	1,39 ± 0,16	1,38 ± 0,21	2,03 ± 0,22*	1,33 ± 0,03*
GST π 1	1,14 ± 0,09	0,97 ± 0,05	0,92 ± 0,18	0,83 ± 0,07
HIF-1α	0,82 ± 0,08	0,99 ± 0,11	0,80 ± 0,10	1,16 ± 0,12
VEGF	0,93 ± 0,09	0,93 ± 0,12	1,06 ± 0,09	0,99 ± 0,05
VEGFR2	1,22 ± 0,16	1,68 ± 0,13**	1,44 ± 0,23	1,27 ± 0,07
MMP-2	1,07 ± 0,15	0,69 ± 0,12	0,66 ± 0,17	1,01 ± 0,06
TIMP-2	1,01 ± 0,08	0,84 ± 0,17	0,66 ± 0,09	1,32 ± 0,06**
COX-2	1,33 ± 0,11	2,88 ± 0,29**	1,50 ± 0,15	1,03 ± 0,14

Tab. 3.2: Zusammenfassung der densitometrischen PCR-Auswertung nach Exposition mit nicht-koplanaren PCB. Dargestellt sind Mittelwerte ± Standardfehler des Mittelwertes (* p<0,05; ** p<0,01).

4. Diskussion

4.1 Cytochrom-P450-abhängige Monooxygenasen 1A1 und 1B1

Die Induktion von Cytochrom-P450-abhängigen Monooxygenasen (CYPs) durch Xenobiotika führt zu einer Imbalance zwischen aktivierenden und detoxifizierenden Stoffwechselfvorgängen und resultiert in schädigenden Effekten, die von den Ausgangsverbindungen und ihren Metaboliten ausgehen (Badawi et al. 1996). Die hier untersuchten CYP 1A1 und 1B1 werden in embryonalen Geweben von Säugetieren exprimiert und ihre Expression kann durch polychlorierte Kohlenwasserstoffe induziert werden (Chapman et al. 1994, Shen et al. 1994). Nach Exposition mit drei koplanaren oder sieben nicht-koplanaren PCB-Kongeneren konnten in der vorliegenden Arbeit erhöhte Transkripte der Xenobiotika-metabolisierenden Enzyme CYP 1A1 und 1B1 in der Präimplantationsblastozyste des Kaninchens nachgewiesen werden. Diese Transkriptionsveränderungen waren konzentrationsabhängig und wurden bereits nach vierstündiger Exposition mit 0,1 ng/ml/Kongener beobachtet. Dabei ergab die Auswertung der Induktion von CYP 1B1 im Embryoblasten bereits bei 0,1 ng der koplanaren und nicht koplanaren Kongenere statistische Signifikanz. Hoch signifikant zeigte sich die Induktion der CYP 1B1-mRNA durch koplanare PCB in Embryo- und Trophoblasten.

PCB-Konzentrationen im ng-Bereich wurden in Geschlechtsorganen von Individuen gefunden, die PCB durch unspezifische Umweltkontamination aufgenommen hatten (Patterson et al. 1994, Schechter et al. 1994). Die beobachteten Effekte wurden durch die Kultur mit 1 µl/ml/Kongener potenziert. Die Blastozysten waren dabei morphologisch intakt. Bemerkenswert ist, dass die CYP 1A1-mRNA ausschließlich in den Zellen des pluripotenten Embryoblasten erhöht war, während im Trophoblasten eine Veränderung ausblieb. Das könnte eine mögliche Erklärung dafür sein, dass in früheren Studien unserer Arbeitsgruppe, in denen cDNA ungetrennter Blastozysten verwendet worden war, keine erhöhten Transkripte für CYP 1A1 mittels semiquantitativer PCR beobachtet wurden (Kietz und Fischer 2003a). In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe konnte bereits die Induzierbarkeit der CYP 1B1-mRNA in Kaninchenblastozysten durch die hier verwendeten PCB-Kongenere gezeigt werden. Diese Induktion war konzentrations- und zeitabhängig und begann bereits nach einer Expositionsdauer von zwei Stunden (Kietz und Fischer 2003a).

CYP 1A1 und 1B1 sind Mitglieder der AhR-Genbatterie. In Jahr 1995 wurde der AhR in Präimplantationsembryonen erstmals in der Maus nachgewiesen (Peters und Wiley 1995). Die mRNA wurde ab dem 8-Zellstadium und das Protein ab dem Blastozystenstadium detektiert. Kürzlich wurde von Wu und Mitarbeitern die Induzierbarkeit von CYP 1A1 durch TCDD in

Mäuse-Embryonen beschrieben (Wu et al. 2002). Das Ansprechen der mRNA auf TCDD war von der Expression des AhR abhängig und erst ab dem Blastozystenstadium nachzuweisen. Beim Kaninchen wurde das AhR-Protein ab dem Morulastadium nachgewiesen. In der Kaninchenblastozyste exprimieren die Zellen des Trophoblasten den AhR konstitutiv, während in den Embryoblastzellen die Expression erst 6 Tage p.c. nach der Degeneration des Rauber'schen Trophoblasten einsetzt (Tscheudschilsuren et al. 1999).

In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe konnte zudem eine entwicklungspezifische Induktion von CYP 1B1 durch PCB in Gesamtblastozysten des Kaninchens nachgewiesen werden (Kietz und Fischer 2003b). Erst ab dem 6. Tag p.c. wurde eine Induktion der CYP 1B1-mRNA beobachtet. Es wird vermutet, dass die Induzierbarkeit mit dem Beginn der Mesodermentwicklung am Tag 6 p.c. einsetzt.

In der vorliegenden Arbeit wurden CYP 1A1 und 1B1 sowohl durch koplanare als auch durch nicht koplanare PCB zelllinienspezifisch induziert. Dieses Ergebnis stellt die Beteiligung des Ah-Rezeptors über die klassische Signaltransduktionskaskade in Frage. Eine CYP 1A1-Induzierbarkeit durch nicht koplanare PCB konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden (Foster et al. 1998, van der Burght et al. 1999). Eine vermehrte CYP 1B1-mRNA-Expression konnte nach Exposition mit Xenobiotika, die nicht an den Ah-Rezeptor binden, beobachtet werden (Ryu et al. 1996). Auch CYP 1A1 wird durch eine Reihe von Substanzen induziert, die keine Liganden des Ah-Rezeptors sind. Zu diesen Substanzen gehören zum Beispiel der Protonenpumpenhemmer Omeprazol, das Fungizid Thiabendazol oder das Malaria-Chemotherapeutikum Primaquin (Delescluse et al. 2000). Es wird vermutet, dass CYP 1A1 durch die Beteiligung von Tyrosinkinase induziert werden kann, da Tyrosinkinase-Inhibitoren wie Genistein die Omeprazol-abhängige CYP 1A1-Induktion hemmen (Kikuchi und Hossain 1999, Lemaire et al. 2004).

CYP 1A1 und 1B1 spielen eine große Rolle im Metabolismus von Steroidhormonen wie 17 β -Östradiol (E_2), einem Hormon, das für den Prozess der Implantation unverzichtbar ist. Im Mausmodell sistiert die Blastozystenimplantation in ovariectomierten Weibchen und kann durch Injektion von E_2 reaktiviert werden (Moore und Carter 1984). Die Kaninchenblastozyste besitzt im Gegensatz zur Maus die Fähigkeit, selbst E_2 zu bilden und ist damit nicht von der maternalen Östrogensynthese abhängig. Nach Instillation von Antiöstrogenen in den Uterus gravider ovariectomierter Kaninchenweibchen sistiert jedoch auch hier die Implantation der Blastozysten (Hoversland et al. 1982). E_2 wird vor allem über die Bildung von 2- und 4-Katecholöstrogenen (2-OH- E_2 , 4-OH- E_2) metabolisiert (Zhu und Conney 1998). Die Synthese des 2-OH- E_2 wird

hauptsächlich von CYP 1A1 (und 1A2) vermittelt während 4-OH-E₂ größtenteils durch CYP 1B1 gebildet wird. Badawi und Mitarbeiter berichteten, dass ein Anstieg der Transkripte für CYP 1A1 und 1B1 nach TCDD-Exposition mit einem Anstieg der 2- und 4-OH-E₂-Metaboliten in Leber, Niere und Mamma der Ratte vergesellschaftet war (Badawi et al. 2000). Chinone, die über Semichinone aus 2-OH-E₂ gebildet werden, formen stabile DNA-Addukte. Im Gegensatz dazu bilden vom 4-OH-E₂ ausgehende Chinone depurinierende Addukte, die zu Mutationen der DNA führen können (Cavalieri et al. 1997). Dieser Mechanismus wird als ein möglicher Auslöser für die sogenannte hormonelle Karzinogenese durch synthetische und endogene E₂-Verbindungen in östrogensensitiven Geweben diskutiert. Eine erhöhte CYP 1B1-Expression wurde aber auch in vielen menschlichen Tumoren verschiedener histologischer Herkunft gefunden (Murray et al. 1997). Anhand dieser Ergebnisse könnte die Induktion der Cytochrom-P450-Monooxygenasen durch Xenobiotika im Embryo einen Mechanismus für das Entstehen embryotoxischer und teratogener Effekte darstellen.

4.2 Gluthathion-S-Transferase π 1

Die Gluthathion-S-Transferasen gehören zur Klasse der Phase-II-Enzyme. Sie sind dimerische Proteine und sind in eine Reihe von detoxifizierenden Stoffwechselfvorgängen involviert. GSTs katalysieren die Konjugation von Gluthathion an hydrophobe Substrate wie Häm, Bilirubin, polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe oder Dexamethason (Rushmore und Pickett 1993). Die in der vorliegenden Arbeit untersuchte GST π 1 kann durch koplanare PCB induziert werden (Aoki et al. 1992). Diese Induktion erfolgt unabhängig vom Ah-Rezeptor über den sogenannten *GST π 1 Enhancer I* (Matsumoto et al. 1999). Die GST π 1 ist ein Markerenzym für präneoplastische Leberherde und Leberzellkarzinome (Sato et al. 1992, Satoh et al. 1985, Tsuchida und Sato 1992). In der fetalen Leber werden GSTs exprimiert (Pacifci et al. 1988).

Nach vierstündiger Exposition der Blastozysten mit 0,1 ng/ml oder 1 μ g/ml koplanarer und nicht-koplanarer PCB wurde in keiner der beiden Zelllinien der Kaninchenblastozyste eine Induktion der Transkripte gefunden. In vorangegangenen Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe an Gesamblastozysten konnten GST π 1-Transkripte durch PCB ebenfalls nicht induziert werden (Kietz und Fischer 2003a). Die noch nicht eingesetzte Organogenese könnte eine Ursache dafür sein.

4.3 Hypoxia Inducible Factor-1 α

Der *Hypoxia Inducible Factor-1 α* wurde von Semenza, Wang und Kollegen als ein Ligand-aktivierter Transkriptionsfaktor der Familie der bHLH-PAS-Proteine identifiziert, der an spezifische DNA-Sequenzen, sogenannte *Hypoxia Response Elements* (HRE), des Erythropoetins und anderer Gene bindet, die für die lokale oder systemische Adaptation an hypoxische Bedingungen bedeutsam sind (Semenza et al. 1991a, Semenza et al. 1991b, Semenza und Wang 1992, Wang und Semenza 1995). Dazu gehören unter anderem der *Vascular Endothelial Growth Factor*, Transferrin, Enzyme der Glykolyse und der Glukosetransporter 1 (Huang et al. 1996). Ryan und Mitarbeiter zeigten in Embryonen der Maus eine insuffiziente Vaskularisation und Entwicklungsverzögerung der HIF-1 α -Null-Mutanten (Ryan et al. 1998). Da PCB über die Bildung von Sauerstoffradikalen hypoxischen Stress verursachen können (Hassoun et al. 2002, Hennig et al. 2002, Oakley et al. 1996), wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von HIF-1 α in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten untersucht. Nach Exposition mit koplanaren und nicht koplanaren PCB-Kongeneren zeigten sich im Embryoblasten verminderte Transkripte für HIF-1 α . Bei einer Konzentration von 1 μ g/Kongener/ml in der koplanaren Gruppe, war dieser Abfall am deutlichsten und statistisch signifikant.

HIF-1 α -mRNA wird in einer Vielzahl von Geweben unter normoxischen Bedingungen konstitutiv exprimiert (Gradin et al. 1996, Wenger et al. 1996, Wiener et al. 1996). HIF-1 α Proteinlevel können durch Hypoxie drastisch induziert sowie stabilisiert werden (Huang et al. 1996, Jiang et al. 1996, Kallio et al. 1997). Ebenso rapide wird das HIF-1 α -Protein bei Normoxie unter Beteiligung des von-Hippel-Lindau Tumor Suppressor Proteins (pVHL) ubiquitiniert und der proteasomalen Spaltung zugeführt (Salceda und Caro 1997). Dieser Prozess wird von einer spezifischen DNA-Sequenz, der *Oxygen-Dependent-Degradation-Domain* (ODDD), des HIF-1 α -Gens vermittelt (Huang et al. 1998). Als Dimerisationspartner des HIF-1 α spielt ARNT, auch HIF-1 β genannt, eine wesentliche Rolle. ARNT-Knock-out-Mäuse sterben um den 10. Tag der Schwangerschaft aufgrund von Defekten bei der intra- und extraembryonalen Vaskularisation (Kozak et al. 1997, Ryan et al. 1998). Obwohl Wang und Kollegen einen Anstieg der HIF-1 α -Transkripte in humanen Leberzelllinien unter Hypoxie beobachteten (Wang et al. 1995), zeigten andere Studien kaum veränderte mRNA-Level (Huang et al. 1996). Zusätzlich wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen in Analogie zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit über eine geringe Suppression der HIF-1 α -mRNA unter hypoxischen Kulturbedingungen in humanen Leberzelllinien berichtet (Gradin et al. 1996, Kallio et al. 1997, Wenger et al. 1998). Diese

Downregulation der HIF-1 α -Transkripte unter Hypoxie war von einem funktionierenden ARNT abhängig und blieb in der ARNT-defizienten Zelllinie Hep1C4 aus. Der Mechanismus dieser möglicherweise negativen Feedback-Regulation ist noch unbekannt (Wenger 2002, Wenger et al. 1998). Die in dem vorliegenden Modell detektierte HIF-1 α -*Downregulation* im Embryoblasten der Kaninchenblastozyste könnte damit ein Hinweis auf durch koplanare PCB verursachten hypoxischen Stress sein.

4.4 Vascular Endothelial Growth Factor und Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2

Der *Vascular Endothelial Growth Factor* (VEGF) ist ein endothelspezifischer Wachstumsfaktor und vermittelt vaskuläre Permeabilität (Ferrara et al. 1992, Keck et al. 1989). Während Implantation und Embryonalentwicklung wird VEGF verstärkt im Synzytiotrophoblasten und während der Organogenese exprimiert (Das et al. 1997b, Jakeman et al. 1993). In humanen Embryonen wurde VEGF-mRNA erstmals ab dem 8-Zellstadium detektiert (Krüssel et al. 2000). Auch in entzündlich veränderten Geweben oder Tumoren wird VEGF induziert (Koch et al. 1994; Fava et al., 1994). Die VEGF-Transkription kann durch EGF, TNF α , TGF β 1, IL-1 β oder auch Prostaglandin E₂ und Steroidhormone induziert werden (Cullinan-Bove und Koos 1993, Harada et al. 1994, Shweiki et al. 1993, Thomas 1996). Zudem stellt Hypoxie einen potenten Reiz zur Induktion von VEGF und seinen Rezeptoren dar (Cullinan-Bove und Koos 1993, Shweiki et al. 1992). So führt myokardiale Ischämie zur erhöhten Expression von VEGF-mRNA bei Schweinen (Banai et al. 1994). Die *in-vitro*-Kultur von endometrialen Stroma- und Epithelzellen unter hypoxischen Bedingungen resultiert in einem Anstieg der VEGF-mRNA, wobei jede Spliceform des VEGF gleichwertig induziert wird (Sharkey et al. 2000). Die Hypoxie-vermittelte Induktion der VEGF-Transkription wird vom *Hypoxia Inducible Factor-1 α* vermittelt. Die VEGF Regulation erfolgt hauptsächlich über eine Regulation der Transkription, wird jedoch durch posttranskriptionale Mechanismen ergänzt (Levy et al. 1996). Obwohl im Embryoblasten der Kaninchenblastozyste nach Exposition mit koplanaren und nicht koplanaren PCB-Kongeneren verminderte HIF-1 α -Transkripte beobachtet wurden, waren Transkripte für VEGF, einem klassisches HIF-1 α -Zielgen, nicht verändert. Auch in Knock-out-Mäusen für ARNT, dem Dimerisationspartner für HIF-1 α wurde die VEGF Expression nicht beeinflusst (Abbott und Buckalew 2000). Es wird diskutiert, dass der klassische HIF-1 α -ARNT-Signalweg in der frühen Embryonalentwicklung der Maus nicht an der VEGF-Induktion beteiligt ist.

Der Tyrosinkinase-Rezeptor VEGFR2 ist der erste Marker der sich entwickelnden endothelialen Zellen des Embryos (Millauer et al. 1993, Yamaguchi et al. 1993). Die Expression des VEGFR2 ist für eine ausreichende Vaskularisierung während Implantation und Plazentation unverzichtbar (Achen et al. 1998, Shalaby et al. 1995).

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals eine Induktion der VEGFR2-mRNA in Präimplantationsblastozysten nach PCB-Exposition ermittelt werden. Dabei waren die Transkripte durch 0,1 ng/Kongener/ml in den Zellen des Trophoblasten und durch 1µg/Kongener/ml vor allem im Embryoblasten erhöht. Dies könnte eine Adaptation an durch PCB verursachten hypoxischen Stress bedeuten.

VEGFR2 ist der Partner für VEGF, VEGF-D und *Placental Growth Factor* (PlGF) (Achen et al. 1998). PlGF kann die biologische Funktion niedriger VEGF-Konzentrationen *in vivo* und *in vitro* signifikant potenzieren (Park et al. 1994). Auch VEGF-D, eine Isoform der VEGF Familie, könnte an der Koordination der Entwicklung embryonaler Gefäßsysteme beteiligt sein

4.5 Matrix-Metalloprotease 2 und Tissue Inhibitor of Metalloproteinases 2

Die erfolgreiche Implantation ist abhängig von einer gerichteten Invasion des uterinen Stromas durch die Degradation der extrazellulären Matrix (Librach et al. 1994). Matrix-Metalloproteasen bilden eine Familie Zink-abhängiger neutraler Endopeptidasen, die gemeinsam alle Bestandteile der extrazellulären Matrix abbauen können (Hidalgo und Eckhardt 2001). Man unterteilt die MMPs entsprechend ihrer Struktur und Substratspezifität in fünf Klassen: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine, membrangebundene [*Membrane Type* (MT)-] MMPs und nicht klassifizierte MMPs. MMPs und ihre endogenen Inhibitoren (TIMPs) sind Schlüsselmediatoren der Implantation und Dezidualisierung (Alexander et al. 1996). Transkription und Expression der Matrix-Metalloproteasen können durch Wachstumsfaktoren, Zytokine oder Steroidhormone reguliert werden (Salamonsen 1999). MMPs werden durch die Regulierung der Genexpression und der Proteinaktivität gesteuert. Transkriptionell werden MMP Gene durch ein AP-1 regulatorisches Element in der proximalen Promotorregion induziert (Hidalgo und Eckhardt 2001). Als Induktoren gelten unter anderem *Transforming Growth Factor* (TGF) α , *Tumor Necrosis Factor* (TNF) α , *Epidermal Growth Factor* (EGF), Interleukin-1 (IL-1) und Östradiol, wohingegen Retinoide, TGF β , Interferon γ und Progesteron die Expression hemmen (Benaud et al. 1998, Kim et al. 2002). In der vorliegenden Arbeit wurden erstmalig Effekte polychlorierter Biphenyle auf die Transkription dieser Enzymklassen nachgewiesen. Für MMP-2 konnte im Trophoblasten eine geringe Abnahme der mRNA bereits nach Exposition mit 0,1

ng/Kongener/ml des koplanaren und nicht-koplanaren Gemisches festgestellt werden. Bei einer Konzentration von 1 µg/Kongener/ml waren dagegen leicht verminderte Transkripte im Embryoblasten zu finden.

MMP-2 wird im graviden Uterus der Maus verstärkt im subepithelialen Stroma unmittelbar vor und nach der Blastozystenanhftung exprimiert (Alexander et al. 1996, Das et al. 1997c). In humanen Embryos wurde eine prominente Expression von MMP-2 im invasiven extravillösen Trophoblasten (Huppertz et al. 1998) und bei Primaten in allen Zellen des Trophoblasten entdeckt (Fernandez et al. 1992). In Schafen und Schweinen, die deren Implantation durch eine sehr geringe Invasivität gekennzeichnet ist, sind MMPs durch Immunhistochemie nicht zu detektieren (Menino et al. 1997).

Physiologischerweise ist bei prämenopausalen Frauen die MMP-2-Aktivität während der Sekretionsphase höher als während der Proliferationsphase und in der Menopause (Laird et al. 1999). Aber eine Reihe von pathologischen reproduktiven Prozessen ist mit einer unzureichenden Implantation des Konzeptus bzw. einer zu geringen Expression von Matrix-Metalloproteasen assoziiert. Beim Interspeziestransfer von Rattenblastozysten in Mausuteri wurde eine bedeutend geringere MMP-2-Aktivität in den Embryonen festgestellt, die schließlich am 13. Tag abstarben (Dai et al. 2003). Bei der Hälfte der Schwangerschaften, die ein verzögertes intrauterines Wachstum aufweisen, ist die Invasivität der Blastozyste zu gering (Gerretsen et al. 1981) und Choi und Mitarbeiter wiesen mittels semiquantitativer RT-PCR bei Frauen mit wiederholten Aborten niedrigere MMP-2-Level in den Chorionzotten nach (Choi et al. 2003). Eine zu geringe Trophoblasteninvasion mit abnormer Plazentation ist ein Hauptmerkmal der Präeklampsie, einer gefürchteten Komplikation der Spätschwangerschaft (Redman 1991, Staff et al. 2000, Zhou et al. 1993). Möglicherweise könnte die hier gezeigte durch PCB verursachte Suppression der MMP-2-mRNA in Präimplantationsembryonen eine verzögerte oder unzureichende Implantation bewirken.

Die MMP-Expression kann über eine Hemmung der Expression von Interleukin 1-β vermindert werden (Butler et al. 1989). Obwohl eine Induktion von IL-1β durch TCDD-Exposition in verschiedenen Zelltypen und Organen beobachtet wurde (Charles und Shiverick 1997, Gaido und Maness 1995, Sutter et al. 1991, Vogel und Abel 1995, Vogel et al. 1997), wurden in früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe verminderte Transkripte von IL-1β nach Exposition mit koplanaren PCB in sechs Tage alten Kaninchenblastozysten gefunden (Kietz und Fischer 2003b). Es wäre denkbar, dass PCB somit indirekt über eine Inhibition der IL-1β-Expression die Transkription von MMP-2 hemmen. Interessant ist, dass von verschiedenen Arbeitsgruppen die

Beteiligung des Ah-Rezeptors an der PCB-abhängigen Induktion von Interleukinen nachgewiesen wurde, da nur durch koplanare Kongenere das Ausmaß der Transkription von IL-1 β verringert wurde und der Ah-Rezeptor-Antagonist α -Naphthoflavon diesen Effekt vollständig hemmte (Henley et al. 2004, Tamaki et al. 2004). Zusammengefasst könnte dies ein Hinweis darauf sein, dass der typische AhR-XRE-Weg in sechs Tage alten Kaninchenblastozysten möglicherweise noch nicht funktioniert.

Im Gegensatz zum normalen Endometrium erscheint die Expression von Matrix-Metalloproteasen unphysiologisch hoch in Endometrioseherden (Osteen et al. 1996). Endometriose ist eine gynäkologische Erkrankung unbekannter Genese, die durch das ektopische Vorkommen uterinen Gewebes charakterisiert ist und Infertilität verursachen kann. Bruner-Tran und Mitarbeiter diskutierten bereits einen Zusammenhang zwischen Dioxin-ähnlichen Umwelttoxinen und der Entstehung von Endometriose (Bruner-Tran et al. 1999). Gerard und Runnebaum fanden bei unfruchtbaren Frauen mit Endometriose auch höhere PCB-Werte als in einer nicht erkrankten Kontrollgruppe (Gerhard und Runnebaum 1992). Es wird unter anderem postuliert, dass TCDD über die Inhibition von TGF β 2 die Expression von MMPs induziert. Johnson und Mitarbeiter berichteten sogar von der Beteiligung des Ah-Rezeptors an der PCB-vermittelten Endometrioseentstehung (Johnson et al. 1997). Unter Beachtung dieser Ergebnisse könnte die im vorliegenden Modell beobachtete Inhibition von MMP-2 auf Transkriptionsebene durch koplanare und nicht koplanare PCB ebenfalls auf die fehlende Beteiligung des Ah-Rezeptors hindeuten.

MMPs sind neben biologischen Prozessen wie Embryogenese, Dezidualisierung und Plazentation auch maßgeblich an pathologischen Veränderungen wie Arthritis, Tumorprogression und Metastasierung beteiligt (Curran und Murray 2000, Nelson et al. 2000). In normalen Geweben nur gering oder nicht detektierbar, ist die MMP-Expression in der Mehrzahl der malignen Tumoren bedeutend erhöht. Vor allem die beiden Gelatinasen MMP-2 und MMP-9 werden verstärkt in Malignomen exprimiert und sind nachweisbar assoziiert mit Tumoraggressivität, Metastasierungspotential und schlechter Prognose (Brown et al. 1993, Rao et al. 1993). Die Bedeutung einzelner Matrix-Metalloproteasen für Tumorinvasion und Metastasierung lässt sich mit Hilfe von Knock-out-Individuen studieren. So sind sowohl in MMP-2- als auch MMP-9-defizienten Mäusen Tumorgenese, Angiogenese und Tumorprogression vermindert (Itoh et al. 1999, Itoh et al. 1998a). Die Inhibition der Funktion der MMPs durch synthetische Metalloprotease Inhibitoren (MMPI) wird in der Krebsforschung seit einiger Zeit aktiv verfolgt.

Zur Klasse der MMPI gehören Kollagenpeptidmimetika, nichtpeptidische Inhibitoren des aktiven Zentrums der MMP, Tetrazyklinderivate und Bisphosphonate. Eine Reihe von Substanzen wurde bereits in klinischen Studien getestet (Hoekstra et al. 2001). So sind zum Beispiel die Biphenylverbindungen BAY 12-9566 und BPHA aus der Gruppe der nichtpeptidischen Mimetika potente Inhibitoren von MMP-2, -3 und -9 bzw. MMP-2, -9 und -14 (Gatto et al. 1999, Maekawa et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit konnte ein Abfall der Transkripte für MMP-2 durch polychlorierte Biphenyle gezeigt werden. Ob neben der beobachteten Inhibition auf Transkriptionsebene zusätzlich eine Hemmung des aktiven Zentrums durch PCB stattfindet, könnte durch zymografische Analysen geklärt werden.

TIMP-2 ist ein spezifischer Inhibitor der MMP-2 (Itoh et al. 1998b). Paradoxerweise aktiviert TIMP-2 in niedrigen Konzentrationen MMP-2 während es in höheren Konzentrationen die MMP-2 Aktivierung hemmt (Strongin et al. 1995). MMP-2 oder Gelatinase A wird in einer inaktiven Form, pro-MMP-2, sezerniert und durch die membrangebundene Membrane-Type 1 MMP (MT1-MMP) im Zusammenspiel mit TIMP-2 aktiviert (Strongin et al. 1995, Takino et al. 1995). Dabei agiert TIMP-2 als Adaptermolekül zwischen MT1-MMP und pro-MMP-2 (Seiki 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden nach Exposition mit 1 µg/Kongener/ml nicht koplanarer PCBs hoch signifikant erhöhte TIMP-2-Transkripte im Trophoblasten der Kaninchenblastozyste gefunden. Gleichzeitig schien die Expression im Embryoblasten vermindert zu sein. Im Schwein, das physiologisch eine besonders geringe Invasion des Konzeptus aufweist, wird TIMP-2 im Überschuss produziert (Menino et al. 1997). Überexpression von TIMP-2 in Melanomzellen resultiert in einer geringen Invasion (Ray und Stetler-Stevenson 1995). Auch in dem vorliegenden Modell könnte die Induktion von TIMP-2 in der Präimplantationsblastozyste des Kaninchens eine mögliche Ursache für die durch PCB verursachte verzögerte Implantation sein.

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Suppression der mRNA für MMP-2 und die signifikante Induktion der TIMP-2-mRNA zeigen, dass PCB zu einem Ungleichgewicht zwischen proteolytischen und Proteolyse-hemmenden Enzymen während der sensiblen Präimplantationsphase in der Kaninchenblastozyste führen können. Dies könnte ein Mechanismus für die beschriebene durch PCB verursachte verzögerte Blastozystenimplantation sein. Vermutlich können diese Veränderungen jedoch durch die Vielzahl zusätzlicher Proteasen sowie anderer Inhibitoren zum Teil kompensiert werden. Auch Studien in Knock-Out-Mäusen für diverse MMPs zeigten zwar eine verzögerte Implantation und Dezidualisierung, aber eine letztlich erfolgreiche Reproduktion (Rechtman et al. 1999, Salamonsen 1999). Um

weiterführende Aussagen treffen zu können, wären Studien zusätzlicher Metalloproteasen nach PCB-Exposition interessant.

4.6 Cyclooxygenase-2

Cyclooxygenasen sind die Schrittmacherezyme der Synthese von Prostaglandinen aus Arachidonsäure (Williams und DuBois 1996). Prostaglandine sind an der Anheftung des Trophoblasten an das Endometrium, an der erhöhten Gefäßpermeabilität im Implantationsbereich und am erhöhten lokalen Blutfluss beteiligt (Charpigny et al. 1997, Hamilton und Kennedy 1994, Kennedy 1980). In unserer Arbeitsgruppe konnte die Induktion der COX-2 durch PCB in ungetrennten Kaninchenblastozysten nachgewiesen werden (Kietz und Fischer 2003b). Nach Exposition 6 Tage alter Kaninchenblastozysten mit koplanaren und nicht-koplanaren PCB konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls eine Induktion der mRNA-Expression für die Cyclooxygenase-2 beobachtet werden. Eine Konzentration von 0,1 ng/Kongener/ml resultierte in einer erhöhten Transkriptmenge in beiden Zelllinien, wobei diese Induktion bei einer Dosis von 1 µg/Kongener/ml nur noch im Embryoblasten zu finden war. In anderen Arbeiten konnte bereits die Expression von COX-2 durch TCDD und PCBs induziert werden. Eine erhöhte mRNA-Menge korrelierte dabei mit einer erhöhten Translation und Aktivität des Enzyms (Kwon et al. 2002, Puga et al. 1997, Wölfe et al. 2000). Obwohl die Identifizierung von XRE-Sequenzen in der Promotorregion des COX-2-Gens (Sirois et al. 1993) und die stärkere Induzierbarkeit der COX-2 durch TCDD in Mausstämmen mit hochaffinem Ah-Rezeptor (C57BL/6J) gegenüber Stämmen mit niedrigaffinem AhR (DBA/2J) eine AhR-abhängige Signaltransduktion vermuten lässt, konnte kürzlich gezeigt werden, dass durch die Beteiligung der c-Src Tyrosinkinase eine Induktion der COX-2 durch TCDD unabhängig des AhR möglich ist (Vogel et al. 2000).

Neben der physiologischen Expression der COX-2 während der beschriebenen Reproduktionsprozesse, wurde eine Induktion bei verschiedenen entzündlichen Erkrankungen beschrieben. Dazu gehören rheumatoide Arthritis, Ileitis terminalis, Morbus Crohn und die *Helicobacter pylorus*-vermittelte Gastritis (Kang et al. 1996, Sawaoka et al. 1998, Singer et al. 1998). Eine Überexpression der COX-2 ist mit der Entstehung von Tumoren assoziiert (DuBois et al. 1996, Hahm et al. 2002, Oshima et al. 1996). Es zeigte sich, dass nichtsteroidale Antiphlogistika wie Acetylsalicylsäure und Indometacin, die über die Suppression der Cyclooxygenasen wirken, das Auftreten und die Progression gastrointestinaler und anderer Tumore hemmen können (Carter et al. 1989, Giovannucci et al. 1995, Lupulescu 1996). Wölfe

und Mitarbeiter zeigten, dass die PCB-vermittelte Tumorpromotion durch Indometacin gehemmt werden kann (Wölfle et al. 2000). Anhand dieser und der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnte die Induktion der COX-2 durch PCB als Marker für Xenobiotika-vermittelte Karzinogenese Bedeutung haben.

Im Gegensatz zur COX-1-Isoform ist die Expression der COX-2 essentiell für Ovulation, Implantation und Dezidualisierung. Die COX-2 wird besonders an den Stellen der Blastozystenadhäsion exprimiert und eine Hemmung durch nichtsteroidale Antiphlogistika bringt die Implantation zum Stillstand (Lau et al. 1973). COX-2 Knock-out-Mäuse sind nicht fruchtbar (Lim et al. 1997). Um zu erfahren, wie sich die bei Kaninchenblastozysten beobachtete Induktion der COX-2 nach Exposition mit koplanaren und nicht koplanaren PCB auf Implantation und Dezidualisierung auswirkt, sind weitere Untersuchungen notwendig.

4.7 Die Rolle des Ah-Rezeptors

Der Ah-Rezeptor vermittelt die Wirkungen seiner Liganden durch das Ingangsetzen einer Signaltransduktionskaskade, an deren Ende die Induktion der Ah-Rezeptor-Zielgene steht. Zu den AhR-Liganden gehören die koplanaren PCB-Kongenere, von denen die hier verwendeten PCB 77, 126 und 169 die höchste Affinität zum AhR und die höchste Toxizität aufweisen (Safe 1994). In dem vorliegenden Modell wurde die Transkription typischer Ah-Rezeptor-Zielgene sowohl durch koplanare als auch durch nicht koplanare PCB-Kongenere induziert. Das Gemisch der nicht koplanaren Kongenere enthielt ein mono- und ein diortho-PCB, die als AhR-Agonisten fungieren können. Ihre Bindungsfähigkeit ist jedoch erheblich geringer als die der koplanaren PCB (Safe 1994). Eine AhR-unabhängige Induktion konnte von anderen Autoren für CYP 1A1 und 1B1 nachgewiesen werden (Delescluse et al. 2000, Ryu et al. 1996). Es wird unter anderem eine Beteiligung von Tyrosinkinasen postuliert (Kikuchi und Hossain 1999, Lemaire et al. 2004). Vermutlich spielen auch in der Kaninchenblastozyste diese AhR-unabhängigen Mechanismen eine Rolle.

Bedeutsam ist auch der Funktionalitätstyp des AhR, der in Mäusen gut untersucht wurde. So besitzt der *AhR-responsive* Mausstamm C57BL/6 eine Bindungsaffinität von 1,8 nM und der *AhR-non-responsive* Stamm DBA/2 eine von 16 nM (Okey et al. 1989, Poland und Knutson 1982). Für den Kaninchen-AhR wurde eine Bindungsaffinität von 7,5 nM ermittelt. Interessant ist, dass CYP 1A1 in Zellen mit einem „*Low-affinity-AhR*“ wie in Kaninchenhepatozyten durch

Omeprazol in hohem Maße induzierbar ist. Auf der anderen Seite kann CYP 1A1 in Zellen mit einem „*High-affinity-AhR*“ wie in Hepa-1-Zellen durch Omeprazol nicht induziert werden (Aix et al. 1994).

Bis zum Tag 5 p.c. ist der AhR nur in den Zellen des Trophoblasten detektierbar. Nach der Degeneration des Rauber'schen Trophoblasten am Tag sechs p.c. exprimieren sowohl Trophoblast als auch Embryoblast Ah-Rezeptor und ARNT (Tscheudschilsuren et al. 1999). Trotzdem ist mit dem Vorhandensein von AhR und ARNT eine funktionierende Signaltransduktionskaskade noch nicht bewiesen.

Nach erfolgter Ligandbindung transloziert der AHR-Ligand-Komplex in den Zellkern, um mit ARNT zu dimerisieren. Nach TCDD-Exposition wurden die ersten AhR-Moleküle bereits nach 15 Minuten im Zellkern detektiert (Pollenz 1996). In sechs Tage alten Kaninchenblastozysten konnte nach Exposition mit 0,1 ng bzw. 0,1 µg definierter PCB-Gemische keine Translokation des Ah-Rezeptors in den Kern mittels Immunhistochemie nachgewiesen werden (Tscheudschilsuren et al. 1999). Enan und Matsumura konnten außerdem einen Mechanismus aufdecken, bei dem TCDD in zellfreiem Medium nach Bindung an den AhR bestimmte Proteinkinasen induziert, die maßgeblich an der Signaltransduktionskaskade von Wachstumsfaktoren beteiligt sind (Enan und Matsumura 1995). Dieser Protein-Phosphorylierungs-Mechanismus wird für einen Teil der toxischen Auswirkungen dioxinähnlicher Chemikalien verantwortlich gemacht (Matsumura 1994) und könnte auch in Kaninchenblastozysten stattfinden.

Letztlich kann anhand des vorliegenden Modells eine Beteiligung des AhR und eine funktionierende Signaltransduktionskaskade in sechs Tage alten Präimplantationsblastozysten des Kaninchens nicht bestätigt oder ausgeschlossen werden. Aufschluss könnten Untersuchungen nach gezielter Blockade des AhR geben. So könnten zum Beispiel kombinierte Expositionsversuche mit Ah-Rezeptor-Antagonisten wie α -Naphthoflavon dazu beitragen, die Rolle des Ah-Rezeptors im Xenobiotikametabolismus während der Präimplantation besser zu verstehen.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss definierter Gemische hochreiner polychlorierter Biphenyle auf die Transkription ausgewählter Gene in Präimplantationsembryonen des Kaninchens untersucht. Dabei wurden PCB in umweltrelevanten Dosen verwendet und koplanare und nicht koplanare Kongenere getrennt untersucht. Hintergrund dafür sind die frühen durch PCB ausgelösten reproduktionstoxischen Effekte wie die Störung der Implantation und der Embryonalentwicklung. Die ihnen zugrundeliegenden Ursachen sind nicht bekannt. Koplanare PCB binden an den Arylhydrocarbonrezeptor. Dieser Transkriptionsfaktor wurde in sechs Tage alten Kaninchenblastozysten nachgewiesen. Nachdem PCB-bedingte Änderungen der Transkription in Gesamtblastozysten des Kaninchens ermittelt wurden, wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals PCB-induzierte Veränderungen in den beiden Zelllinien der Kaninchenblastozyste, Embryoblast und Trophoblast, getrennt betrachtet. Für das Trophoblast-spezifische Protein Cytokeratin, dessen Expression als Kontrolle diente, konnte eine neue partielle mRNA-Sequenz identifiziert werden. Als Methode wurde die semiquantitative RT-PCR ausgewählt. Durch die Verwendung einer digitalen Bildaufnahme und -bearbeitung der PCR-Ergebnisse, konnte zudem eine statistische Auswertung erfolgen.

Nach Exposition mit koplanaren und nicht koplanaren PCB wurden in den untersuchten Kaninchenblastozysten erhöhte Transkripte für die Cytochrom-P450-Monooxygenase 1A1 ermittelt. Eindrucksvoll erschien hier die differenzielle Sensitivität der beiden blastozytären Zelllinien, da CYP 1A1 ausschließlich im Embryoblasten induziert wurde. Diese Induktion war konzentrationsabhängig und bei hohen Konzentrationen statistisch signifikant. Das könnte ein Hinweis auf die höhere Sensitivität des pluripotenten Embryoblasten gegenüber PCB im Vergleich zum Trophoblasten sein. Die Induktion der CYP 1A1 führt zum Abbau der aktivierenden Verbindungen, wobei unter anderem Metaboliten entstehen, die toxischer als die Ausgangskongenere wirken können. Zudem kann ein Anstieg der CYP 1A1-mRNA zu einem gesteigerten Abbau von dem für die Implantation unverzichtbaren Östradiol führen. Damit könnte eine mögliche Ursache der Verzögerung der Blastozystenimplantation durch PCB erklärt werden.

CYP 1B1-mRNA war in dem vorliegenden Modell in beiden blastozytären Zelllinien erhöht. Die deutlichsten Transkriptanstiege zeigten sich dabei im Embryoblasten. Die Induktion dieser Monooxygenase führte in anderen Studien zur vermehrten Bildung von 4-Katecholöstrogenen, die für die Östrogen-vermittelte Karzinogenese verantwortlich gemacht werden. So könnte durch die Induktion von CYP 1B1 durch PCB zum einen Östrogen für die Blastozystenimplantation

durch gesteigerten Abbau entzogen werden und zum anderen noch ungeklärte Schädigungen durch mutagene Verbindungen verursachen. Unklar bleibt, welche Rolle der Ah-Rezeptor spielt, da sowohl koplanare als auch nicht koplanare PCB-Kongenere zur Induktion der beiden AhR-Zielgene CYP 1A1 und 1B1 führten.

Die Gluthathion-S-Transferase- $\pi 1$, ein Phase-II-Enzym, konnte in dem vorliegenden Modell nicht durch koplanare oder nicht koplanare PCB induziert werden. Vermutlich ist die GST- $\pi 1$ in Präimplantationsembryonen des Kaninchens noch nicht funktionsfähig. Vergleichbare Studien in anderen Spezies existieren nicht.

Der *Hypoxia Inducible Factor 1 α* ist essentiell für die embryonale Entwicklung und Vaskularisierung. HIF-1 α kann rapide unter hypoxischen Bedingungen induziert und stabilisiert werden und die Transkription seiner Zielgene bewirken. Erstmals wurde die gesamte HIF-1 α -mRNA für das Kaninchen sequenziert. PCB können hypoxischen Stress verursachen. In der vorliegenden Arbeit konnten nach PCB-Exposition im Embryoblasten geringere Mengen HIF-1 α -mRNA festgestellt werden. Nach Exposition mit 1 μ g der koplanaren Kongenere war dieser Abfall statistisch signifikant. Da die Aktivität des HIF-1 α vor allem auf Proteinebene reguliert wird, kann die Auswirkung der beobachteten Effekte letztlich nicht ausreichend beurteilt werden. In Studien anderer Arbeitsgruppen wurde jedoch gezeigt, dass der Anstieg des HIF-1 α -Proteins und der Aktivität unter hypoxischen Bedingungen zwingend mit einem Abfall der HIF-1 α -mRNA verbunden ist. Bemerkenswert konnte in der vorliegenden Arbeit wiederum die besondere Reaktivität des Embryoblasten gezeigt werden.

In die Untersuchungen wurde das HIF-1 α -Zielgen VEGF und der Rezeptor VEGFR2 einbezogen. Eine neue Teilsequenz für VEGF wurde im Kaninchen identifiziert. Für VEGF-Transkripte wurden weder durch koplanare noch durch nicht koplanare PCB Veränderungen gefunden. Dagegen erwies sich VEGFR2 als zelllinienspezifisch induzierbar. Da dieser Rezeptor auch andere Liganden, wie VEGF-D und PlGF bindet, könnten in der vorliegenden Arbeit noch nicht untersuchte Signalwege zu der beobachteten Induktion beigetragen haben.

Matrix-Metalloproteasen und ihre endogenen Inhibitoren sind Schlüsselmediatoren während der Implantation der Blastozyste. Ein Ungleichgewicht zwischen Matrixdegradation und -stabilisation ist mit verschiedenen Krankheitsbildern assoziiert. Durch PCB wurden in der

vorliegenden Arbeit MMP-2-Transkripte im Trophoblasten und leicht Embryoblasten vermindert und TIMP-2-Transkripte im Embryoblasten reduziert und im Trophoblasten erhöht. Diese Beobachtung könnte die durch PCB-vermittelte Verzögerung der Implantationsphase erklären helfen. Da jedoch eine Vielzahl zusätzlicher Metallo- und anderer Proteasen an der Implantation beteiligt sind, kann hier nur ein kleiner Ausschnitt dieses Zusammenspiels beleuchtet werden.

Die Induktion der COX-2-mRNA durch PCB konnte bereits in ungetrennten Kaninchenblastozysten und anderen Geweben gezeigt werden. In der vorliegenden Arbeit wurden nach Exposition mit PCB-Gemischen konzentrations- und zelllinienabhängig vermehrte COX-2-Transkripte gefunden. Die COX-2 wird in einer Reihe von Tumoren überexprimiert und ist an Entzündungsprozessen beteiligt. Auch in der Blastozyste könnte die Induktion der COX-2 zum einen als Stressreaktion auf PCB und zum anderen als ein Hinweis auf den Mechanismus der PCB-induzierten Karzinogenese zu deuten sein.

Zusammenfassend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass PCB in umweltrelevanten Dosen nach kurzer Expositionsdauer bereits in Präimplantationsembryonen eine Vielzahl von Veränderung der transkriptionellen Aktivität bewirken. Eindrucksvoll konnte erstmals die differenzielle Aktivität der beiden blastozytären Zelllinien, Embryoblast und Trophoblast, nach PCB-Exposition nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung zelllinienspezifischer Untersuchungen in Präimplantationsembryonen.

Die Ergebnisse dieser Arbeit können Ausgangspunkte für weiterführende Studien sein. Welche Auswirkungen haben die beobachteten transkriptionellen Veränderungen auf die Translation und Aktivität der Proteine? Inwieweit können diese Veränderungen vom Embryo kompensiert werden? Welche Rolle spielt die Ah-Rezeptor-Signaltransduktionskaskade bei den PCB-vermittelten Transkriptionsänderungen?

Die vorliegende Dissertation wurde durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG) finanziell gefördert (Graduiertenkolleg 416).

6. Literaturverzeichnis

- 1 Abbott BD, Birnbaum LS, Perdew GH: Developmental expression of two members of a new class of transcription factors: I. Expression of aryl hydrocarbon receptor in the C57BL/6N mouse embryo. *Dev Dyn* 204 (1995) 133-43.
- 2 Abbott BD, Buckalew AR: Placental defects in ARNT-knockout conceptus correlate with localized decreases in VEGF-R2, Ang-1, and Tie-2. *Dev Dyn* 219 (2000) 526-38.
- 3 Achen MG, Jeltsch M, Kukk E, Makinen T, Vitali A, Wilks AF, Alitalo K, Stacker SA: Vascular endothelial growth factor D (VEGF-D) is a ligand for the tyrosine kinases VEGF receptor 2 (Flk1) and VEGF receptor 3 (Flt4). *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 548-53.
- 4 Acker L, Schulte E: [The occurrence of chlorinated biphenyls and hexachlorobenzene along with chlorinated insecticides in human milk and human adipose tissue]. *Naturwissenschaften* 57 (1970) 497.
- 5 Adachi J, Mori Y, Matsui S, Takigami H, Fujino J, Kitagawa H, Miller CA, 3rd, Kato T, Saeki K, Matsuda T: Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 276 (2001) 31475-8.
- 6 Ahlborg UG, Brouwer A, Fingerhut MA, Jacobson JL, Jacobson SW, Kennedy SW, Kettrup AA, Koeman JH, Poiger H, Rappe C, et al.: Impact of polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls on human and environmental health, with special emphasis on application of the toxic equivalency factor concept. *Eur J Pharmacol* 228 (1992) 179-99.
- 7 Aimes RT, Quigley JP: Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem* 270 (1995).
- 8 Aix L, Rey-Grobellet X, Larrieu G, Lesca P, Galtier P: Thiabendazole is an inducer of cytochrome P4501A1 in cultured rabbit hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 202 (1994) 1483-9.
- 9 Alexander CM, Hansell EJ, Behrendtsen O, Flannery ML, Kishnani NS, Hawkes SP, Werb Z: Expression and function of matrix metalloproteinases and their inhibitors at the maternal-embryonic boundary during mouse embryo implantation. *Development* 122 (1996) 1723-36.

- 10 Aoki Y, Satoh K, Sato K, Suzuki KT: Induction of glutathione S-transferase P-form in primary cultured rat liver parenchymal cells by co-planar polychlorinated biphenyl congeners. *Biochem J* 281 (Pt 2) (1992) 539-43.
- 11 Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG: Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17beta-estradiol in female Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 21 (2000) 1593-9.
- 12 Badawi AF, Stern SJ, Lang NP, Kadlubar FF: Cytochrome P-450 and acetyltransferase expression as biomarkers of carcinogen-DNA adduct levels and human cancer susceptibility. *Prog Clin Biol Res* 395 (1996) 109-40.
- 13 Ballschmiter K, Zell M: Analysis of polychlorinated biphenyls (PCB) by glass capillary gas chromatography. *Fresenius Z Anal Chem.* 302 (1980) 20-31.
- 14 Banai S, Shweiki D, Pinson A, Chandra M, Lazarovici G, Keshet E: Upregulation of vascular endothelial growth factor expression induced by myocardial ischaemia: implications for coronary angiogenesis. *Cardiovasc Res* 28 (1994) 1176-9.
- 15 Baukloh V, Bohnet HG, Trapp M, Heeschen W, Feichtinger W, Kemeter P: Biocides in human follicular fluid. *Ann N Y Acad Sci* 442 (1985) 240-50.
- 16 Benaud C, Dickson RB, Thompson EW: Roles of the matrix metalloproteinases in mammary gland development and cancer. *Breast Cancer Res Treat* 50 (1998) 97-116.
- 17 Berse B, Brown LF, Van de Water L, Dvorak HF, Senger DR: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3 (1992) 211-20.
- 18 Bock KW, Lipp HP, Bock-Hennig BS: Induction of drug-metabolizing enzymes by xenobiotics. *Xenobiotica* 20 (1990) 1101-11.
- 19 Brison DR, Schultz RM: RT-PCR-based method to localize the spatial expression of genes in the mouse blastocyst. *Mol Reprod Dev* 44 (1996) 171-8.
- 20 Brown PD, Bloxidge RE, Stuart NS, Gatter KC, Carmichael J: Association between expression of activated 72-kilodalton gelatinase and tumor spread in non-small-cell lung carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 574-8.
- 21 Bruner-Tran KL, Rier SE, Eisenberg E, Osteen KG: The potential role of environmental toxins in the pathophysiology of endometriosis. *Gynecol Obstet Invest* 48 Suppl 1 (1999) 45-56.
- 22 Busbee DL, Ziprin RL: Gastrointestinal uptake and vascular transport of 2,4'-dichlorobiphenyl. *Arch Toxicol* 68 (1994) 96-102.

- 23 Butler LD, Layman NK, Riedl PE, Cain RL, Shellhaas J, Evans GF, Zuckerman SH: Neuroendocrine regulation of in vivo cytokine production and effects: I. In vivo regulatory networks involving the neuroendocrine system, interleukin-1 and tumor necrosis factor-alpha. *J Neuroimmunol* 24 (1989) 143-53.
- 24 Carter CA, Ip MM, Ip C: A comparison of the effects of the prostaglandin synthesis inhibitors indomethacin and carprofen on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary tumorigenesis in rats fed different amounts of essential fatty acid. *Carcinogenesis* 10 (1989) 1369-74.
- 25 Cavalieri EL, Stack DE, Devanesan PD, Todorovic R, Dwivedy I, Higginbotham S, Johansson SL, Patil KD, Gross ML, Gooden JK, Ramanathan R, Cerny RL, Rogan EG: Molecular origin of cancer: catechol estrogen-3,4-quinones as endogenous tumor initiators. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 10937-42.
- 26 Chan WK, Yao G, Gu YZ, Bradfield CA: Cross-talk between the aryl hydrocarbon receptor and hypoxia inducible factor signaling pathways. Demonstration of competition and compensation. *J Biol Chem* 274 (1999) 12115-23.
- 27 Chapman DE, Yang HY, Watters JJ, Juchau MR: Induction in vitro and complete coding region sequence of cytochrome P4501A1 cDNA from cultured whole rat conceptuses during early organogenesis. *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 1807-14.
- 28 Charles GD, Shiverick KT: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin increases mRNA levels for interleukin-1beta, urokinase plasminogen activator, and tumor necrosis factor-alpha in human uterine endometrial adenocarcinoma RL95-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 238 (1997) 338-42.
- 29 Charpigny G, Reinaud P, Tamby JP, Creminon C, Guillomot M: Cyclooxygenase-2 unlike cyclooxygenase-1 is highly expressed in ovine embryos during the implantation period. *Biol Reprod* 57 (1997) 1032-40.
- 30 Chen HS, Perdew GH: Subunit composition of the heteromeric cytosolic aryl hydrocarbon receptor complex. *J Biol Chem* 269 (1994) 27554-8.
- 31 Choi HK, Choi BC, Lee SH, Kim JW, Cha KY, Baek KH: Expression of angiogenesis- and apoptosis-related genes in chorionic villi derived from recurrent pregnancy loss patients. *Mol Reprod Dev* 66 (2003) 24-31.
- 32 Cullinan-Bove K, Koos RD: Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor expression in the rat uterus: rapid stimulation by estrogen correlates with estrogen-induced increases in uterine capillary permeability and growth. *Endocrinology* 133 (1993) 829-37.

- 33 Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases: molecular aspects of their roles in tumour invasion and metastasis. *Eur J Cancer* 36 (2000) 1621-30.
- 34 Dai B, Cao Y, Zhou J, Li S, Wang X, Chen D, Duan E: Abnormal expression of matrix metalloproteinase-2 and -9 in interspecific pregnancy of rat embryos in mouse recipients. *Theriogenology* 60 (2003) 1279-91.
- 35 Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF- receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56 (1997a) 1390-9.
- 36 Das SK, Chakraborty I, Wang J, Dey SK, Hoffman LH: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF-receptor messenger ribonucleic acids in the peri-implantation rabbit uterus. *Biol Reprod* 56 (1997b) 1390-9.
- 37 Das SK, Wang J, Dey SK, Mead RA: Spatiotemporal expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 during delayed implantation and the periimplantation period in the Western spotted skunk. *Biol Reprod* 60 (1999) 893-9.
- 38 Das SK, Yano S, Wang J, Edwards DR, Nagase H, Dey SK: Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in the mouse uterus during the peri-implantation period. *PG - 44-54. Dev Genet* 21 (1997c).
- 39 Davis BJ, Lennard DE, Lee CA, Tiano HF, Morham SG, Wetsel WC, Langenbach R: Anovulation in cyclooxygenase-2-deficient mice is restored by prostaglandin E2 and interleukin-1beta. *Endocrinology* 140 (1999) 2685-95.
- 40 de Vries C, Escobedo JA, Ueno H, Houck K, Ferrara N, Williams LT: The fms-like tyrosine kinase, a receptor for vascular endothelial growth factor. *Science* 255 (1992) 989-91.
- 41 Delescluse C, Lemaire G, de Sousa G, Rahmani R: Is CYP1A1 induction always related to AHR signaling pathway? *Toxicology* 153 (2000) 73-82.
- 42 Denker HW: Implantation. The role of proteinases, and blockage of implantation by proteinase inhibitors. *Adv Anat Embryol Cell Biol* 53 (1977) 3-123.
- 43 Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Johnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al.: Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 378 (1995) 406-9.
- 44 DuBois RN, Radhika A, Reddy BS, Entingh AJ: Increased cyclooxygenase-2 levels in carcinogen-induced rat colonic tumors. *Gastroenterology* 110 (1996) 1259-62.
- 45 Dunn TJ, Lindahl R, Pitot HC: Differential gene expression in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Noncoordinate regulation of a TCDD-induced

- aldehyde dehydrogenase and cytochrome P-450c in the rat. *J Biol Chem* 263 (1988) 10878-86.
- 46 Enan E, Matsumura F: Evidence for a second pathway in the action mechanism of 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD). Significance of Ah-receptor mediated activation of protein kinase under cell-free conditions. *Biochem Pharmacol* 49 (1995) 249-61.
- 47 Evans MS, Noguchi GE, Rice CP: The biomagnification of polychlorinated biphenyls, toxaphene, and DDT compounds in a Lake Michigan offshore food web. *Arch Environ Contam Toxicol* 20 (1991) 87-93.
- 48 Fernandez PL, Merino MJ, Nogales FF, Charonis AS, Stetler-Stevenson W, Liotta L: Immunohistochemical profile of basement membrane proteins and 72 kilodalton type IV collagenase in the implantation placental site. An integrated view. *Lab Invest* 66 (1992) 572-9.
- 49 Fernandez-Salguero PM, Hilbert DM, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ: Aryl-hydrocarbon receptor-deficient mice are resistant to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin-induced toxicity. *Toxicol Appl Pharmacol* 140 (1996) 173-9.
- 50 Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW: Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13 (1992) 18-32.
- 51 Findlay JK: Angiogenesis in reproductive tissues. *J Endocrinol* 111 (1986) 357-66.
- 52 Foster EP, Vrolijk NH, Chen TT, Curtis LR: Interaction of 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl with hepatic cytochrome P-4501A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *J Toxicol Environ Health A* 53 (1998) 313-25.
- 53 Gaido KW, Maness SC: Post-transcriptional stabilization of urokinase plasminogen activator mRNA by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in a human keratinocyte cell line. *Toxicol Appl Pharmacol* 133 (1995) 34-42.
- 54 Gaido KW, Maness SC, Leonard LS, Greenlee WF: 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-dependent regulation of transforming growth factors-alpha and -beta 2 expression in a human keratinocyte cell line involves both transcriptional and post-transcriptional control. *J Biol Chem* 267 (1992) 24591-5.
- 55 Gatto C, Rieppi M, Borsotti P, Innocenti S, Ceruti R, Drudis T, Scanziani E, Casazza AM, Taraboletti G, Giavazzi R: BAY 12-9566, a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with antiangiogenic activity. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 3603-7.
- 56 Gerhard I, Runnebaum B: [The limits of hormone substitution in pollutant exposure and fertility disorders]. *Zentralbl Gynakol* 114 (1992) 593-602.

- 57 Gerretsen G, Huisjes HJ, Elema JD: Morphological changes of the spiral arteries in the placental bed in relation to pre-eclampsia and fetal growth retardation. *Br J Obstet Gynaecol* 88 (1981) 876-81.
- 58 Giovannucci E, Egan KM, Hunter DJ, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Speizer FE: Aspirin and the risk of colorectal cancer in women. *N Engl J Med* 333 (1995) 609-14.
- 59 Gradin K, McGuire J, Wenger RH, Kvietikova I, Whitelaw ML, Toftgard R, Tora L, Gassmann M, Poellinger L: Functional interference between hypoxia and dioxin signal transduction pathways: competition for recruitment of the Arnt transcription factor. *Mol Cell Biol* 16 (1996) 5221-31.
- 60 Hahm KB, Lim HY, Sohn S, Kwon HJ, Lee KM, Lee JS, Surh YJ, Kim YB, Joo HJ, Kim WS, Cho SW: In vitro evidence of the role of COX-2 in attenuating gastric inflammation and promoting gastric carcinogenesis. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 21 (2002) 165-76.
- 61 Hamilton GS, Kennedy TG: Uterine vascular changes after unilateral intrauterine infusion of indomethacin and prostaglandin E2 to rats sensitized for the decidual cell reaction. *Biol Reprod* 50 (1994) 757-64.
- 62 Hansen L: Environmental Toxicology of Polychlorinated Biphenyls. In: Safe S, Hutzinger O (Eds): Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.) (1987) 15-48.
- 63 Harada S, Nagy JA, Sullivan KA, Thomas KA, Endo N, Rodan GA, Rodan SB: Induction of vascular endothelial growth factor expression by prostaglandin E2 and E1 in osteoblasts. *J Clin Invest* 93 (1994) 2490-6.
- 64 Hassoun EA, Wang H, Abushaban A, Stohs SJ: Induction of oxidative stress in the tissues of rats after chronic exposure to TCDD, 2,3,4,7,8-pentachlorodibenzofuran, and 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *J Toxicol Environ Health A* 65 (2002) 825-42.
- 65 Henley DV, Bellone CJ, Williams DA, Ruh TS, Ruh MF: Aryl hydrocarbon receptor-mediated posttranscriptional regulation of IL-1beta. *Arch Biochem Biophys* 422 (2004) 42-51.
- 66 Hennig B, Hammock BD, Slim R, Toborek M, Saraswathi V, Robertson LW: PCB-induced oxidative stress in endothelial cells: modulation by nutrients. *Int J Hyg Environ Health* 205 (2002) 95-102.
- 67 Hidalgo M, Eckhardt SG: Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst* 93 (2001) 178-93.

- 68 Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J: Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist* 6 (2001) 415-27.
- 69 Houck KA, Leung DW, Rowland AM, Winer J, Ferrara N: Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267 (1992) 26031-7.
- 70 Hoversland RC, Dey SK, Johnson DC: Aromatase activity in the rabbit blastocyst. *J Reprod Fertil* 66 (1982) 259-63.
- 71 Hsu ST, Ma CI, Hsu SK, Wu SS, Hsu NH, Yeh CC, Wu SB: Discovery and epidemiology of PCB poisoning in Taiwan: a four-year followup. *Environ Health Perspect* 59 (1985) 5-10.
- 72 Huang LE, Arany Z, Livingston DM, Bunn HF: Activation of hypoxia-inducible transcription factor depends primarily upon redox-sensitive stabilization of its alpha subunit. *J Biol Chem* 271 (1996) 32253-9.
- 73 Huang LE, Gu J, Schau M, Bunn HF: Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O₂-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998) 7987-92.
- 74 Huppertz B, Kertschanska S, Demir AY, Frank HG, Kaufmann P: Immunohistochemistry of matrix metalloproteinases (MMP), their substrates, and their inhibitors (TIMP) during trophoblast invasion in the human placenta. *Cell Tissue Res* 291 (1998) 133-48.
- 75 Itoh T, Tanioka M, Matsuda H, Nishimoto H, Yoshioka T, Suzuki R, Uehira M: Experimental metastasis is suppressed in MMP-9-deficient mice. *Clin Exp Metastasis* 17 (1999) 177-81.
- 76 Itoh T, Tanioka M, Yoshida H, Yoshioka T, Nishimoto H, Itohara S: Reduced angiogenesis and tumor progression in gelatinase A-deficient mice. *Cancer Res* 58 (1998a) 1048-51.
- 77 Itoh Y, Ito A, Iwata K, Tanzawa K, Mori Y, Nagase H: Plasma membrane-bound tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2 specifically inhibits matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) activated on the cell surface. *J Biol Chem* 273 (1998b) 24360-7.
- 78 Jackson BW, Grund C, Schmid E, Burki K, Franke WW, Illmensee K: Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. Intermediate filaments of the cytokeratin type and desmosomes in preimplantation embryos. *Differentiation* 17 (1980) 161-79.

- 79 Jackson BW, Grund C, Winter S, Franke WW, Illmensee K: Formation of cytoskeletal elements during mouse embryogenesis. II. Epithelial differentiation and intermediate-sized filaments in early postimplantation embryos. *Differentiation* 20 (1981) 203-16.
- 80 Jaiswal AK, McBride OW, Adesnik M, Nebert DW: Human dioxin-inducible cytosolic NAD(P)H:menadione oxidoreductase. cDNA sequence and localization of gene to chromosome 16. *J Biol Chem* 263 (1988) 13572-8.
- 81 Jakeman LB, Armanini M, Phillips HS, Ferrara N: Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for vascular endothelial growth factor suggests a role for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 133 (1993) 848-59.
- 82 Jensen S: Report of a New Chemical Hazard. *New Scientist* 32 (1966) 612.
- 83 Jiang BH, Rue E, Wang GL, Roe R, Semenza GL: Dimerization, DNA binding, and transactivation properties of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 271 (1996) 17771-8.
- 84 Johnson KL, Cummings AM, Birnbaum LS: Promotion of endometriosis in mice by polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans, and biphenyls. *Environ Health Perspect* 105 (1997) 750-5.
- 85 Kallio PJ, Pongratz I, Gradin K, McGuire J, Poellinger L: Activation of hypoxia-inducible factor 1alpha: posttranscriptional regulation and conformational change by recruitment of the Arnt transcription factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 5667-72.
- 86 Kang RY, Freire-Moar J, Sigal E, Chu CQ: Expression of cyclooxygenase-2 in human and an animal model of rheumatoid arthritis. *Br J Rheumatol* 35 (1996) 711-8.
- 87 Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT: Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* 246 (1989) 1309-12.
- 88 Kennedy TG: Estrogen and uterine sensitization for the decidual cell reaction: role of prostaglandins. *Biol Reprod* 23 (1980) 955-62.
- 89 Kietz S, Fischer B: Polychlorinated Biphenyls (PCBs) affect Gene Expression in the Rabbit Preimplantation Embryo. Accepted for publication (2003a).
- 90 Kietz S, Fischer B: Polychlorinated biphenyls affect gene expression in the rabbit preimplantation embryo. *Mol Reprod Dev* 64 (2003b) 251-60.
- 91 Kikuchi H, Hossain A: Signal transduction-mediated CYP1A1 induction by omeprazole in human HepG2 cells. *Exp Toxicol Pathol* 51 (1999) 342-6.

- 92 Kim JH, Hong SH, Nah HY, Lee JY, Chae HD, Kim CH, Kang BM, Bae IH: Influence of transforming growth factor- α on expression of matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9, and epidermal growth factor receptor gene in the mouse blastocysts. *J Assist Reprod Genet* 19 (2002) 232-9.
- 93 Kim JJ, Wang J, Bambra C, Das SK, Dey SK, Fazleabas AT: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in the baboon endometrium during the menstrual cycle and pregnancy. *Endocrinology* 140 (1999) 2672-8.
- 94 Kleman MI, Overvik E, Mason GG, Gustafsson JA: In vitro activation of the dioxin receptor to a DNA-binding form by food-borne heterocyclic amines. *Carcinogenesis* 13 (1992) 1619-24.
- 95 Kozak KR, Abbott B, Hankinson O: ARNT-deficient mice and placental differentiation. *Dev Biol* 191 (1997) 297-305.
- 96 Krüssel J, Behr B, Hirchenhain J, Wen Y, Milki AA, Cupisti S, Bielfeld P, Polan ML: Expression of vascular endothelial growth factor mRNA in human preimplantation embryos derived from tripronuclear zygotes. *Fertil Steril* 74 (2000) 1220-6.
- 97 Küchenhoff A, Eckard R, Buff K, Fischer B: Stage-specific effects of defined mixtures of polychlorinated biphenyls on in vitro development of rabbit preimplantation embryos. *Mol Reprod Dev* 54 (1999) 126-34.
- 98 Kwon O, Lee E, Moon TC, Jung H, Lin CX, Nam KS, Baek SH, Min HK, Chang HW: Expression of cyclooxygenase-2 and pro-inflammatory cytokines induced by 2,2',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl (PCB 153) in human mast cells requires NF- κ B activation. *Biol Pharm Bull* 25 (2002) 1165-8.
- 99 Laird SM, Dalton CF, Okon MA, Bunning RA, Marshall R, Li TC: Metalloproteinases and tissue inhibitor of metalloproteinase 1 (TIMP-1) in endometrial flushings from pre- and post-menopausal women and from women with endometrial adenocarcinoma. *J Reprod Fertil* 115 (1999) 225-32.
- 100 Lau IF, Saksena SK, Chang MC: Pregnancy blockade by indomethacin, an inhibitor of prostaglandin synthesis: its reversal by prostaglandins and progesterone in mice. *Prostaglandins* 4 (1973) 795-803.
- 101 Lemaire G, Delescluse C, Pralavorio M, Ledirac N, Lesca P, Rahmani R: The role of protein tyrosine kinases in CYP1A1 induction by omeprazole and thiabendazole in rat hepatocytes. *Life Sci* 74 (2004) 2265-78.
- 102 Levy AP, Levy NS, Goldberg MA: Post-transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor by hypoxia. *J Biol Chem* 271 (1996) 2746-53.

- 103 Librach CL, Feigenbaum SL, Bass KE, Cui TY, Verastas N, Sadovsky Y, Quigley JP, French DL, Fisher SJ: Interleukin-1 beta regulates human cytotrophoblast metalloproteinase activity and invasion in vitro. *PG - 17125-31. J Biol Chem* 269 (1994).
- 104 Lim H, Paria BC, Das SK, Dinchuk JE, Langenbach R, Trzaskos JM, Dey SK: Multiple female reproductive failures in cyclooxygenase 2-deficient mice. *Cell* 91 (1997) 197-208.
- 105 Lindenau A, Fischer B: Effect of oxygen concentration in the incubator's das phase on the development of cultured preimplantation embryos. *Theriogenology* 41 (1994) 889-898.
- 106 Lindenau A, Fischer B, Seiler P, Beier HM: Effects of persistent chlorinated hydrocarbons on reproductive tissues in female rabbits. *Hum Reprod* 9 (1994) 772-80.
- 107 Linder RE, Gaines TB, Kimbrough RD: The effect of polychlorinated biphenyls on rat reproduction. *Food Cosmet Toxicol* 12 (1974) 63-77.
- 108 Lupulescu A: Prostaglandins, their inhibitors and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 54 (1996) 83-94.
- 109 Ma Q, Whitlock JP, Jr.: A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem* 272 (1997) 8878-84.
- 110 Maekawa R, Maki H, Yoshida H, Hojo K, Tanaka H, Wada T, Uchida N, Takeda Y, Kasai H, Okamoto H, Tsuzuki H, Kambayashi Y, Watanabe F, Kawada K, Toda K, Ohtani M, Sugita K, Yoshioka T: Correlation of antiangiogenic and antitumor efficacy of N-biphenyl sulfonyl-phenylalanine hydroxamic acid (BPHA), an orally-active, selective matrix metalloproteinase inhibitor. *Cancer Res* 59 (1999) 1231-5.
- 111 Matsumoto M, Imagawa M, Aoki Y: Identification of an enhancer element of class Pi glutathione S-transferase gene required for expression by a co-planar polychlorinated biphenyl. *Biochem J* 338 (Pt 3) (1999) 599-605.
- 112 Matsumura F: How important is the protein phosphorylation pathway in the toxic expression of dioxin-type chemicals? *Biochem Pharmacol* 48 (1994) 215-24.
- 113 Menino AR, Jr., Hogan A, Schultz GA, Novak S, Dixon W, Foxcroft GH: Expression of proteinases and proteinase inhibitors during embryo-uterine contact in the pig. *Dev Genet* 21 (1997) 68-74.
- 114 Millauer B, Wизigmann-Voos S, Schnurch H, Martinez R, Moller NP, Risau W, Ullrich A: High affinity VEGF binding and developmental expression suggest Flk-1 as a major regulator of vasculogenesis and angiogenesis. *Cell* 72 (1993) 835-46.

- 115 Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y: Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 13 (1999) 20-5.
- 116 Moore GP, Carter NB: Transcriptional activity of blastomeres in mouse embryos during delayed implantation and after oestradiol benzoate-induced resumption of development. *Cell Differ* 14 (1984) 19-23.
- 117 Murray GI, Taylor MC, McFadyen MC, McKay JA, Greenlee WF, Burke MD, Melvin WT: Tumor-specific expression of cytochrome P450 CYP1B1. *Cancer Res* 57 (1997) 3026-31.
- 118 Nagase H, Woessner JF, Jr.: Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274 (1999) 21491-4.
- 119 Nebert DW, Gonzalez FJ: P450 genes: structure, evolution, and regulation. *Annu Rev Biochem* 56 (1987) 945-93.
- 120 Nebert DW, Jaiswal AK, Meyer UA, Gonzalez FJ: Human P-450 genes: evolution, regulation and possible role in carcinogenesis. *Biochem Soc Trans* 15 (1987) 586-9.
- 121 Nelson AR, Fingleton B, Rothenberg ML, Matrisian LM: Matrix metalloproteinases: biologic activity and clinical implications. *J Clin Oncol* 18 (2000) 1135-49.
- 122 Oakley GG, Devanaboyina U, Robertson LW, Gupta RC: Oxidative DNA damage induced by activation of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for PCB-induced oxidative stress in breast cancer. *Chem Res Toxicol* 9 (1996) 1285-92.
- 123 Okami J, Yamamoto H, Fujiwara Y, Tsujie M, Kondo M, Noura S, Oshima S, Nagano H, Dono K, Umeshita K, Ishikawa O, Sakon M, Matsuura N, Nakamori S, Monden M: Overexpression of cyclooxygenase-2 in carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res* 5 (1999) 2018-24.
- 124 Okey AB, Riddick DS, Harper PA: The Ah receptor: mediator of the toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related compounds. *Toxicol Lett* 70 (1994) 1-22.
- 125 Okey AB, Vella LM, Harper PA: Detection and characterization of a low affinity form of cytosolic Ah receptor in livers of mice nonresponsive to induction of cytochrome P1-450 by 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 35 (1989) 823-30.
- 126 Orberg J, Kihlstrom JE: Effects of long-term feeding of polychlorinated biphenyls (PCB, Clophen A 60) on the length of the oestrous cycle and on the frequency of implanted ova in the mouse. *Environ Res* 6 (1973) 176-9.
- 127 Oshima M, Dinchuk JE, Kargman SL, Oshima H, Hancock B, Kwong E, Trzaskos JM, Evans JF, Taketo MM: Suppression of intestinal polyposis in Apc delta716 knockout mice by inhibition of cyclooxygenase 2 (COX-2). *Cell* 87 (1996) 803-9.

- 128 Osteen KG, Bruner KL, Sharpe-Timms KL: Steroid and growth factor regulation of matrix metalloproteinase expression and endometriosis. *Semin Reprod Endocrinol* 14 (1996) 247-55.
- 129 Pacifici GM, Franchi M, Colizzi C, Giuliani L, Rane A: Glutathione S-transferase in humans: development and tissue distribution. *Arch Toxicol* 61 (1988) 265-9.
- 130 Park JE, Chen HH, Winer J, Houck KA, Ferrara N: Placenta growth factor. Potentiation of vascular endothelial growth factor bioactivity, in vitro and in vivo, and high affinity binding to Flt-1 but not to Flk-1/KDR. *J Biol Chem* 269 (1994) 25646-54.
- 131 Park JE, Keller GA, Ferrara N: The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell* 4 (1993) 1317-26.
- 132 Parkinson A, Safe S: Mammalian Biologic and Toxic Effects of OCB. In: Safe S, Hutzinger O (Eds.): Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.) (1987) 49-75.
- 133 Patnode KA, Curtis LR: 2,2',4,4',5,5'- and 3,3',4,4',5,5'-hexachlorobiphenyl alteration of uterine progesterone and estrogen receptors coincides with embryotoxicity in mink (*Mustela vison*). *Toxicol Appl Pharmacol* 127 (1994) 9-18.
- 134 Patterson DG, Jr., Todd GD, Turner WE, Maggio V, Alexander LR, Needham LL: Levels of non-ortho-substituted (coplanar), mono- and di-ortho-substituted polychlorinated biphenyls, dibenzo-p-dioxins, and dibenzofurans in human serum and adipose tissue. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 1 (1994) 195-204.
- 135 Perdew GH: Association of the Ah receptor with the 90-kDa heat shock protein. *J Biol Chem* 263 (1988) 13802-5.
- 136 Perdew GH, Hollenback CE: Evidence for two functionally distinct forms of the human Ah receptor. *J Biochem Toxicol* 10 (1995) 95-102.
- 137 Peters JM, Wiley LM: Evidence that murine preimplantation embryos express aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 134 (1995) 214-21.
- 138 Poellinger L, Lund J, Dahlberg E, Gustafsson JA: A hydroxylapatite microassay for receptor binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 3-methylcholanthrene in various target tissues. *Anal Biochem* 144 (1985) 371-84.
- 139 Poland A, Glover E: Variation in the molecular mass of the Ah receptor among vertebrate species and strains of rats. *Biochem Biophys Res Commun* 146 (1987) 1439-49.
- 140 Poland A, Glover E, Kende AS: Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin by hepatic cytosol. Evidence that the binding species is

- receptor for induction of aryl hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251 (1976) 4936-46.
- 141 Poland A, Knutson JC: 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons: examination of the mechanism of toxicity. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22 (1982) 517-54.
- 142 Poland A, Palen D, Glover E: Analysis of the four alleles of the murine aryl hydrocarbon receptor. *Mol Pharmacol* 46 (1994) 915-21.
- 143 Pollenz RS: The aryl-hydrocarbon receptor, but not the aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator protein, is rapidly depleted in hepatic and nonhepatic culture cells exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Mol Pharmacol* 49 (1996) 391-8.
- 144 Puga A, Hoffer A, Zhou S, Bohm JM, Leikauf GD, Shertzer HG: Sustained increase in intracellular free calcium and activation of cyclooxygenase-2 expression in mouse hepatoma cells treated with dioxin. *Biochem Pharmacol* 54 (1997) 1287-96.
- 145 Puga A, Nebert DW, Carrier F: Dioxin induces expression of c-fos and c-jun proto-oncogenes and a large increase in transcription factor AP-1. *DNA Cell Biol* 11 (1992) 269-81.
- 146 Rannug U, Rannug A, Sjoberg U, Li H, Westerholm R, Bergman J: Structure elucidation of two tryptophan-derived, high affinity Ah receptor ligands. *Chem Biol* 2 (1995) 841-5.
- 147 Rantanen J: Industrial and Environmental Emergencies; Lessons Learned. *Organohalogen Compounds* 10 (1992) 291-294.
- 148 Rao JS, Steck PA, Mohanam S, Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Sawaya R: Elevated levels of M(r) 92,000 type IV collagenase in human brain tumors. *Cancer Res* 53 (1993) 2208-11.
- 149 Ray JM, Stetler-Stevenson WG: Gelatinase A activity directly modulates melanoma cell adhesion and spreading. *Embo J* 14 (1995) 908-17.
- 150 Rechtman MP, Zhang J, Salamonsen LA: Effect of inhibition of matrix metalloproteinases on endometrial decidualization and implantation in mated rats. *J Reprod Fertil* 117 (1999) 169-77.
- 151 Redman CW: Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12 (1991) 301-8.
- 152 Reiners JJ, Jr., Clift R, Mathieu P: Suppression of cell cycle progression by flavonoids: dependence on the aryl hydrocarbon receptor. *Carcinogenesis* 20 (1999) 1561-6.
- 153 Reyes H, Reisz-Porszasz S, Hankinson O: Identification of the Ah receptor nuclear translocator protein (Arnt) as a component of the DNA binding form of the Ah receptor. *Science* 256 (1992) 1193-5.

- 154 Risebrough RW, Rieche P, Peakall DB, Herman SG, Kirven MN: Polychlorinated biphenyls in the global ecosystem. *Nature* 220 (1968) 1098-102.
- 155 Rogan WJ, Gladen BC, Hung KL, Koong SL, Shih LY, Taylor JS, Wu YC, Yang D, Ragan NB, Hsu CC: Congenital poisoning by polychlorinated biphenyls and their contaminants in Taiwan. *Science* 241 (1988) 334-6.
- 156 Rowlands JC, Gustafsson JA: Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 27 (1997) 109-34.
- 157 Rushmore TH, Pickett CB: Glutathione S-transferases, structure, regulation, and therapeutic implications. *J Biol Chem* 268 (1993) 11475-8.
- 158 Ryan HE, Lo J, Johnson RS: HIF-1 alpha is required for solid tumor formation and embryonic vascularization. *Embo J* 17 (1998) 3005-15.
- 159 Ryu DY, Levi PE, Fernandez-Salguero P, Gonzalez FJ, Hodgson E: Piperonyl butoxide and acenaphthylene induce cytochrome P450 1A2 and 1B1 mRNA in aromatic hydrocarbon-responsive receptor knock-out mouse liver. *Mol Pharmacol* 50 (1996) 443-6.
- 160 Safe S: PCBs and Human Health. In: Safe S, Hutzinger O. (Eds): Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.) (1987) 133-145.
- 161 Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): biochemistry, toxicology, and mechanism of action. *Crit Rev Toxicol* 13 (1984) 319-95.
- 162 Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), dibenzofurans (PCDFs), and related compounds: environmental and mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit Rev Toxicol* 21 (1990) 51-88.
- 163 Safe S: Polychlorinated biphenyls (PCBs): mutagenicity and carcinogenicity. *Mutat Res* 220 (1989) 31-47.
- 164 Safe S, Safe L, Mullin M: Environmental Occurrence and Analysis. In: Safe, S Hutzinger O (Eds): Polychlorinated Biphenyls (PCBs): Mammalian and Environmental Toxicology. Springer, Berlin, Heidelberg, New York (usw.) (1987) 1-14.
- 165 Safe SH: Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit Rev Toxicol* 24 (1994) 87-149.
- 166 Salamonsen LA: Role of proteases in implantation. *Rev Reprod* 4 (1999) 11-22.
- 167 Salamonsen LA, Butt AR, Hammond FR, Garcia S, Zhang J: Production of endometrial matrix metalloproteinases, but not their tissue inhibitors, is modulated by progesterone

- withdrawal in an in vitro model for menstruation. *J Clin Endocrinol Metab* 82 (1997) 1409-15.
- 168 Salceda S, Caro J: Hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J Biol Chem* 272 (1997) 22642-7.
- 169 Sano H, Kawahito Y, Wilder RL, Hashiramoto A, Mukai S, Asai K, Kimura S, Kato H, Kondo M, Hla T: Expression of cyclooxygenase-1 and -2 in human colorectal cancer. *Cancer Res* 55 (1995) 3785-9.
- 170 Sato K, Satoh K, Tsuchida S, Hatayama I, Shen H, Yokoyama Y, Yamada Y, Tamai K: Specific expression of glutathione S-transferase Pi forms in (pre)neoplastic tissues: their properties and functions. *Tohoku J Exp Med* 168 (1992) 97-103.
- 171 Satoh K, Kitahara A, Soma Y, Inaba Y, Hatayama I, Sato K: Purification, induction, and distribution of placental glutathione transferase: a new marker enzyme for preneoplastic cells in the rat chemical hepatocarcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82 (1985) 3964-8.
- 172 Sawaoka H, Kawano S, Tsuji S, Tsuji M, Sun W, Gunawan ES, Hori M: Helicobacter pylori infection induces cyclooxygenase-2 expression in human gastric mucosa. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 59 (1998) 313-6.
- 173 Schecter A, Stanley J, Boggess K, Masuda Y, Mes J, Wolff M, Furst P, Furst C, Wilson-Yang K, Chisholm B: Polychlorinated biphenyl levels in the tissues of exposed and nonexposed humans. *Environ Health Perspect* 102 Suppl 1 (1994) 149-58.
- 174 Seiki M: Membrane-type matrix metalloproteinases. *Apmis* 107 (1999) 137-43.
- 175 Semenza GL: Regulation of mammalian O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15 (1999) 551-78.
- 176 Semenza GL, Koury ST, Nejfelt MK, Gearhart JD, Antonarakis SE: Cell-type-specific and hypoxia-inducible expression of the human erythropoietin gene in transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991a) 8725-9.
- 177 Semenza GL, Nejfelt MK, Chi SM, Antonarakis SE: Hypoxia-inducible nuclear factors bind to an enhancer element located 3' to the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991b) 5680-4.
- 178 Semenza GL, Wang GL: A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. *Mol Cell Biol* 12 (1992) 5447-54.

- 179 Shalaby F, Rossant J, Yamaguchi TP, Gertsenstein M, Wu XF, Breitman ML, Schuh AC: Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature* 376 (1995) 62-6.
- 180 Sharkey AM, Day K, McPherson A, Malik S, Licence D, Smith SK, Charnock-Jones DS: Vascular endothelial growth factor expression in human endometrium is regulated by hypoxia. *J Clin Endocrinol Metab* 85 (2000) 402-9.
- 181 Shen Z, Liu J, Wells RL, Elkind MM: cDNA cloning, sequence analysis, and induction by aryl hydrocarbons of a murine cytochrome P450 gene, Cyp1b1. *DNA Cell Biol* 13 (1994) 763-9.
- 182 Shweiki D, Itin A, Neufeld G, Gitay-Goren H, Keshet E: Patterns of expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and VEGF receptors in mice suggest a role in hormonally regulated angiogenesis. *J Clin Invest* 91 (1993) 2235-43.
- 183 Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E: Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 359 (1992) 843-5.
- 184 Sinal CJ, Bend JR: Aryl hydrocarbon receptor-dependent induction of cyp1a1 by bilirubin in mouse hepatoma hepa 1c1c7 cells. *Mol Pharmacol* 52 (1997) 590-9.
- 185 Singer, II, Kawka DW, Schloemann S, Tessner T, Riehl T, Stenson WF: Cyclooxygenase 2 is induced in colonic epithelial cells in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 115 (1998) 297-306.
- 186 Singer CF, Marbaix E, Kokorine I, Lemoine P, Donnez J, Eeckhout Y, Courtoy PJ: Paracrine stimulation of interstitial collagenase (MMP-1) in the human endometrium by interleukin 1alpha and its dual block by ovarian steroids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94 (1997) 10341-5.
- 187 Sirois J, Levy LO, Simmons DL, Richards JS: Characterization and hormonal regulation of the promoter of the rat prostaglandin endoperoxide synthase 2 gene in granulosa cells. Identification of functional and protein-binding regions. *J Biol Chem* 268 (1993) 12199-206.
- 188 Smith WL, Garavito RM, DeWitt DL: Prostaglandin endoperoxide H synthases (cyclooxygenases)-1 and -2. *J Biol Chem* 271 (1996) 33157-60.
- 189 Spencer F: An assessment of the reproductive toxic potential of Aroclor 1254 in female Sprague-Dawley rats. *Bull Environ Contam Toxicol* 28 (1982) 290-7.
- 190 Staff AC, Ranheim T, Henriksen T, Halvorsen B: 8-Iso-prostaglandin f(2alpha) reduces trophoblast invasion and matrix metalloproteinase activity. *Hypertension* 35 (2000) 1307-13.

- 191 Strongin AY, Collier I, Bannikov G, Marmer BL, Grant GA, Goldberg GI: Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. *J Biol Chem* 270 (1995) 5331-8.
- 192 Sutter TR, Guzman K, Dold KM, Greenlee WF: Targets for dioxin: genes for plasminogen activator inhibitor-2 and interleukin-1 beta. *Science* 254 (1991) 415-8.
- 193 Takino T, Sato H, Shinagawa A, Seiki M: Identification of the second membrane-type matrix metalloproteinase (MT-MMP-2) gene from a human placenta cDNA library. MT-MMPs form a unique membrane-type subclass in the MMP family. *J Biol Chem* 270 (1995) 23013-20.
- 194 Tamaki A, Hayashi H, Nakajima H, Takii T, Katagiri D, Miyazawa K, Hirose K, Onozaki K: Polycyclic aromatic hydrocarbon increases mRNA level for interleukin 1 beta in human fibroblast-like synoviocyte line via aryl hydrocarbon receptor. *Biol Pharm Bull* 27 (2004) 407-10.
- 195 Terman BI, Dougher-Vermazen M, Carrion ME, Dimitrov D, Armellino DC, Gospodarowicz D, Bohlen P: Identification of the KDR tyrosine kinase as a receptor for vascular endothelial cell growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* 187 (1992) 1579-86.
- 196 Thomas KA: Vascular endothelial growth factor, a potent and selective angiogenic agent. *J Biol Chem* 271 (1996) 603-6.
- 197 Tilson HA, Jacobson JL, Rogan WJ: Polychlorinated biphenyls and the developing nervous system: cross- species comparisons. *Neurotoxicol Teratol* 12 (1990) 239-48.
- 198 Tryphonas H: Immunotoxicity of polychlorinated biphenyls: present status and future considerations. *Exp Clin Immunogenet* 11 (1994) 149-62.
- 199 Tscheudschilsuren G, Kuchenhoff A, Klonisch T, Tetens F, Fischer B: Induction of arylhydrocarbon receptor expression in embryoblast cells of rabbit preimplantation blastocysts upon degeneration of Rauber's polar trophoblast. *Toxicol Appl Pharmacol* 157 (1999) 125-33.
- 200 Tsuchida S, Sato K: Glutathione transferases and cancer. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 27 (1992) 337-84.
- 201 van der Burght AS, Clijsters PJ, Horbach GJ, Andersson PL, Tysklind M, van den Berg M: Structure-dependent induction of CYP1A by polychlorinated biphenyls in hepatocytes of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*). *Toxicol Appl Pharmacol* 155 (1999) 13-23.

- 202 Villeneuve DC, Grant, D.L., Khera, K., Clegg, D.J., Baer, H., Phillips, W.E.J.: The Fetotoxicity of a Polychlorinated Biphenyl Mixture (Aroclor 1254) in the Rabbit and in the Rat. *Environmental Physiology* 1 (1971) 67-71.
- 203 Vogel C, Abel J: Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on growth factor expression in the human breast cancer cell line MCF-7. *Arch Toxicol* 69 (1995) 259-65.
- 204 Vogel C, Boerboom AM, Baechele C, El-Bahay C, Kahl R, Degen GH, Abel J: Regulation of prostaglandin endoperoxide H synthase-2 induction by dioxin in rat hepatocytes: possible c-Src-mediated pathway. *Carcinogenesis* 21 (2000) 2267-74.
- 205 Vogel C, Donat S, Dohr O, Kremer J, Esser C, Roller M, Abel J: Effect of subchronic 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin exposure on immune system and target gene responses in mice: calculation of benchmark doses for CYP1A1 and CYP1A2 related enzyme activities. *Arch Toxicol* 71 (1997) 372-82.
- 206 Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL: Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O₂ tension. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92 (1995) 5510-4.
- 207 Wang GL, Semenza GL: Purification and characterization of hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem* 270 (1995) 1230-7.
- 208 Wenger RH: Cellular adaptation to hypoxia: O₂-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O₂-regulated gene expression. *Faseb J* 16 (2002) 1151-62.
- 209 Wenger RH, Rolfs A, Marti HH, Guenet JL, Gassmann M: Nucleotide sequence, chromosomal assignment and mRNA expression of mouse hypoxia-inducible factor-1 alpha. *Biochem Biophys Res Commun* 223 (1996) 54-9.
- 210 Wenger RH, Rolfs A, Spielmann P, Zimmermann DR, Gassmann M: Mouse hypoxia-inducible factor-1alpha is encoded by two different mRNA isoforms: expression from a tissue-specific and a housekeeping-type promoter. *Blood* 91 (1998) 3471-80.
- 211 Whitlock JP, Jr.: Genetic and molecular aspects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin action. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 30 (1990) 251-77.
- 212 WHO: WHO Toxic Equivalency Factors (TEFs) for Dioxin-like Compounds for Humans and Wildlife. *DIOXIN'97, 17th International Symposium on Chlorinated Dioxins and Related Compounds*, Indianapolis, Indiana (1997).
- 213 Wiener CM, Booth G, Semenza GL: In vivo expression of mRNAs encoding hypoxia-inducible factor 1. *Biochem Biophys Res Commun* 225 (1996) 485-8.

- 214 Williams CS, DuBois RN: Prostaglandin endoperoxide synthase: why two isoforms? *Am J Physiol* 270 (1996) G393-400.
- 215 Wölfle D, Marotzki S, Dartsch D, Schafer W, Marquardt H: Induction of cyclooxygenase expression and enhancement of malignant cell transformation by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Carcinogenesis* 21 (2000) 15-21.
- 216 Wu Q, Ohsako S, Baba T, Miyamoto K, Tohyama C: Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on preimplantation mouse embryos. *Toxicology* 174 (2002) 119-29.
- 217 Xie WL, Chipman JG, Robertson DL, Erikson RL, Simmons DL: Expression of a mitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88 (1991) 2692-6.
- 218 Yamaguchi TP, Dumont DJ, Conlon RA, Breitman ML, Rossant J: flk-1, an flt-related receptor tyrosine kinase is an early marker for endothelial cell precursors. *Development* 118 (1993) 489-98.
- 219 Yamashita F, Hayashi M: Fetal PCB syndrome: clinical features, intrauterine growth retardation and possible alteration in calcium metabolism. *Environ Health Perspect* 59 (1985) 41-5.
- 220 Zhou Y, Damsky CH, Chiu K, Roberts JM, Fisher SJ: Preeclampsia is associated with abnormal expression of adhesion molecules by invasive cytotrophoblasts. *J Clin Invest* 91 (1993) 950-60.
- 221 Zhu BT, Conney AH: Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* 19 (1998) 1-27.

7. Thesen

1. Die Implantation der Blastozyste ist eine der vulnerabelsten Phasen der Embryogenese.
2. Polychlorierte Biphenyle haben sich aufgrund ihrer hohen Stabilität in allen Kompartimenten des Ökosystems angereichert.
3. Polychlorierte Biphenyle beeinflussen bereits in umweltrelevanten Dosen die Genexpression in Blastozysten des Kaninchens.
4. Durch Trennung des Embryoblasten vom Trophoblasten und anschließender cDNA-Synthese können beide Zelllinien der Blastozyste des Kaninchens mittels RT-PCR separat untersucht werden.
5. Der PCB-induzierte Anstieg der Transkription der Cytochrom-P450-Monooxygenasen 1A1 und 1B1 kann in schädigenden Effekten durch die beim Abbau entstehenden Metaboliten resultieren. Der ausschließliche Anstieg der CYP 1A1-Transkripte in den Zellen des Embryoblasten ist ein Hinweis auf mögliche teratogene Wirkungen von PCB.
6. Die Induktion der Transkription von CYP 1B1 durch PCB in beiden blastozytären Zelllinien kann als ein Marker für estradiolvermittelte Karzinogenese verstanden werden.
7. Die Gluthathion-S-Transferase $\pi 1$ wird auf der mRNA-Ebene in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten durch koplanare und nicht koplanare PCB Kongenere nicht beeinflusst.
8. Der mRNA-Gehalt des *Hypoxia Inducible Factor 1 α* war in den Zellen des Embryoblasten besonders durch koplanare PCB-Kongenere vermindert. Welche Auswirkung diese Beobachtung auf das Protein und die Expression der HIF-1 α -Zielgene hat, muss in Folgeuntersuchungen geklärt werden.
9. Der *Vascular Endothelial Growth Factor*, ein klassisches HIF-1 α -Zielgen, wird auf der Transkriptionsebene in 6 Tage alten Kaninchenblastozysten durch koplanare und nicht koplanare PCB-Kongenere nicht beeinflusst.

10. Die Transkription des *Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2* kann sowohl im Embryo- als auch im Trophoblasten durch koplanare und nicht koplanare PCB induziert werden.
11. Matrix-Metalloproteasen sind wesentlich an Prozessen der Implantation und Dezidualisierung beteiligt. Diese Vorgänge erfordern eine strenge Regulation zwischen Gewebedegradation und –stabilisation. Dieses Gleichgewicht kann durch PCB in der kurz vor der Implantation stehenden Blastozyste auf der Transkriptionsebene gestört werden.
12. Die Cyclooxygenase-2, ein schnell induzierbares Enzym, wird durch koplanare und nicht koplanare PCB transkriptional induziert. Dies könnte als ein Marker für Tumorpromovierende Eigenschaften polychlorierter Biphenyle gewertet werden.
13. Die Beteiligung des Ah-Rezeptors an den beobachteten Veränderungen der ausgewählten Gene ist unwahrscheinlich, da sowohl koplanare als auch nicht koplanare PCB zu vergleichbaren Effekten auf der Transkriptionsebene führten.

Curriculum vitae

Name: Ina Clausen, geb. Meinicke

Geburtstag: 08.11.1976

Geburtsort: Merseburg

Familienstand: verheiratet

Schulbildung: 1982-1984 Besuch der Johannes-R.-Becher-Oberschule in Halle
1984-1991 Besuch der Leo-Stern-Oberschule in Halle
1991-1995 Besuch des Albert-Schweitzer-Gymnasiums in Halle

Hochschulausbildung: 1995-2003 Studium der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
1999-2001 Doktorandin am Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg unter Förderung des Graduiertenkollegs „ Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ der Deutschen Forschungsgemeinschaft
Abschluss des Studiums am 17.11.2003
Erlaubnis zur vorübergehenden Ausübung des ärztlichen Berufes erteilt am 18.11.2003

Jetzige Tätigkeit: Ärztin im Praktikum in der Universitätsaugenklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg (seit 01.01.2004)
Seit 01.10.2004 Assistenzärztin in der Universitätsaugenklinik der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe. Diese Promotion ist an keiner weiteren Fakultät eingereicht bzw. abgelehnt worden. Ein früherer Promotionsversuch ist nicht erfolgt.

Halle, den 01.10.2004

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Dna. A.', is located below the date.

Publikationen

Meinicke I, Kietz S and Fischer B

„Induction of Cyp 1A1 and Cyp 1B1 in preimplantation rabbit blastocysts upon exposure to defined PCB mixtures.”

Poster auf dem *e.hormone*-Symposium der Tulane University, New Orleans, Louisiana, USA
10/2001

Clausen I, Kietz S. and Fischer B.

“Lineage-specific effects of polychlorinated biphenyls (PCB) on gene expression in the rabbit blastocyst”

Manuskript eingereicht bei *Reproductive Toxicology*

Danksagung

Ich möchte allen Mitarbeitern des Instituts für Anatomie und Zellbiologie danken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Ich danke Herrn Professor Fischer für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit und seine fachliche Betreuung sowie ständige Diskussionsbereitschaft.

Herrn Professor Viehbach danke ich herzlich für seine Unterstützung bei der Trennung der Kaninchenblastozysten.

Frau Dr. Silke Kietz möchte ich für die wertvolle wissenschaftliche und technische Unterstützung sowie die freundschaftliche Zusammenarbeit herzlich danken.

Frau Dr. Paola Pocar und Herrn Dr. Robert Augustin danke ich für ihre ständige Dialogbereitschaft und vielen Hinweise, die zum Gelingen beitrugen.

Herrn PD Dr. Thomas Klonisch, Dr. Sabine Klonisch und Dr. Anne Navarrete-Santos möchte ich für die gute kollegiale Zusammenarbeit und zahlreichen Hilfestellungen danken.

Allen medizinisch-technischen Assistentinnen danke ich für die Hilfsbereitschaft im Laboralltag und bei der Durchführung der Tierversuche.

Ich danke der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die die Arbeit im Rahmen des Graduiertenkollegs „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“ gefördert hat (DGF GK 416).

Meinen Eltern möchte ich herzlich für ihr Vertrauen und ihren Beistand danken.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann Tobias danken, für seine liebevolle Geduld und den nie endenden Zuspruch während der Erstellung dieser Arbeit.