

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

Interaktion zweier Signalwege in Granulosazellen:
Wechselwirkung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) und der
Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) in der
humanen Granulosazelllinie KGN

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

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

von Johann-Christoph Jann

geboren am 02.10.1989 in Dresden

Gutachter: Prof. Dr. Hubertus Jarry
PD Dr. Andreas Schüring
Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer

05.05.2015

29.09.2016

Referat

In der vorliegenden Arbeit ist die Bedeutung der Signalwege des Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR)- und der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) für die Physiologie und Funktion von Granulosazellen in der immortalisierten Granulosazelllinie KGN, als ein humanes *in vitro* Modell, untersucht worden.

Diese Rezeptoren sind umweltmedizinisch relevant, da sich ihre Liganden wie PCB (Polychlorierte Biphenyle) und Phthalate (Diethylhexylphthalat DEHP) als ubiquitäre Kontaminaten in Nahrungsmitteln finden.

Die KGN-Zelllinie bietet die Möglichkeit, die Mechanismen der Rezeptorregulationen und Interaktion ohne die übergeordnete Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse zu untersuchen.

Schwerpunkte lagen im ersten Teil der Arbeit in der Charakterisierung beider Signalwege und deren Wechselwirkungen.

KGN wurden mit DEHP, TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin) und einem Mix beider Stoffe exponiert, um die Expression der Transkriptionsfaktoren selbst und deren nachgeschalteter Signalwege zu bestimmen. Die Akkumulation von MEHP (Monoethylhexylphthalat), einem Metabolit von DEHP zeigte, dass KGN-Zellen zur Metabolisierung von DEHP fähig sind. Mittels der synthetischen PPAR-Agonisten Bezafibrat und Rosiglitazon konnte die funktionelle Signalkaskade belegt werden. DEHP induzierte die AhR-Expression; durch selektive Antagonisierung konnte dieser Effekt einer Aktivierung des PPAR γ -Signalweges zugeschrieben werden.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden die endokrinen Rahmenbedingungen dieser Interaktion für die Granulosazellfunktion anhand funktioneller Granulosazellmarker (FSHR, LHR, Estradiol-Synthese) untersucht. TCDD und DEHP reduzierten die Synthese von Estradiol additiv und für beide Signalwege konnte ein beschleunigter Estradiolkatabolismus gezeigt werden.

DEHP hatte unterschiedliche Auswirkungen auf die Gonadotropin-Rezeptoren: LHR wurde verstärkt, FSHR geringer exprimiert.

Umweltmedizinisch relevant ist, dass DEHP die AhR-Expression via PPAR γ beeinflusst. Eine nachgeschaltete AhR-Aktivierung kann rückwirkend die PPAR-vermittelten Effekte hemmen. DEHP beeinflusst die Ovarfunktion damit in zwei Wegen: erstens durch PPAR γ -Aktivierung und zweitens durch Koaktivierung des AhR. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ubiquitär vorkommende Umweltkontaminaten, die PPARs und AhR binden, sowohl alleine als auch kooperativ die Granulosazellfunktion beeinflussen können.

Jann, Johann-Christoph: Interaktion zweier Signalwege in Granulosazellen: Wechselwirkung des Arylhydrocarbon-Rezeptors (AhR) und der Peroxisomen-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR) in der humanen Granulosazelllinie KGN, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 78 Seiten, 2015

Abkürzungsverzeichnis

17bHSD	17 β -Hydroxy-steroiddehydrogenase	FSHR	Follikel stimulierendes Hormon Rezeptor
ACOX	Acyl-CoA dehydrogenase	GnRH	Gonadotropin Releasing- Hormon
AD	4-Androstene-3,17-dion	GW9662	synthetischer PPAR γ - Antagonist
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor	hCG	humanes Choriongonadotropin
AhRKO	Arylhydrocarbon-Rezeptor <i>knockout</i>	HPG	Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden (<i>hypothalamic- pituitary-gonadal</i>)
AhRR	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Repressor	HSP	<i>heat shock protein</i>
AMH	Anti-Müller-Hormon	IPTG	Isopropyl- β - D-thiogalactopyranosid
ANF	α -Naphthoflavin	IVF	<i>in vitro</i> -Fertilisation
Aqua dest.	destilliertes Wasser	k.A.d.H.	keine Angaben des Herstellers
ARNT	Arylhydrocarbon-Rezeptor-Nuclear-Translocator	KO	knockout
bHLH	basische <i>helix loop helix</i>	LH	Luteinisierendes Hormon
B[a]P	Benz[a]pyren	LHR	Luteinisierendes Hormon Rezeptor
BSA	bovines Serum Albumin	LPL	Lipoproteinlipase
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat	MEHP	Monoethylhexylphthalat
cDNA	complementary DNA	NA	nicht analysiert
CDK	Cyclin dependent kinase	NCBI	National Center for Biotechnology Information
CDS	<i>Cell Dissoziation Solution</i>	PAH	polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
c-kit	stem cell factor	PEPCK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
COX	Cylooxygenase	PBS	saliner Phosphatpuffer
CT	Cycle Threshold	PCB	Polychlorierte Biphenyle
Cyp19	CytochromP450 Isoform19 (Aromatase)	PCOS	Polyzystisches Ovarsyndrom
DEHP	Diethylhexylphthalat	PCR	Polymerasekettenreaktion
DEPC-H ₂ O	Diethylpyrocarbonat-Wasser	PI3-Kinase	Phosphatidylinositol-3 Kinase
DHEA	Dehydroepiandrosteron	PKA	Proteinkinase A
DMEM	Dulbecco`s modified Eagle`s medium	PPAR	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid	PPRE	PPAR <i>response elements</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure	rpm	Rounds per minute
dNTP	desoxy-Nukleotid-Triphosphat	RNA	Ribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol	RT	Reverse Transkription
EDCs	<i>Endocrine disrupting chemicals</i>	RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
EC50	mittlere effektive Konzentration	qPCR	quantitative PCR
ER α / β	Estrogenrezeptor α / β	RXR	<i>Retinoic acid receptor</i>
FABP	fatty acid binding protein	StaR	<i>Steroidogenic Acute Regulatory Protein</i>
FCS	fötales Kälberserum		
FICZ	6-formylindolo [3,2-b]carbazole		
FKS	Fetalem Kälberserum		
FSH	Follikel stimulierendes Hormon		

TAE Puffer	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	Tris gepufferte Kochsalzlösung
TBST	Tris mit Tween
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- p - dioxin
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TGFβ	Transforming growth factor β
Tween	Polyoxyethylen-sorbitan monolaurat
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Ü/N	über Nacht
WT	<i>wild type</i>
X-GAL	5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β- D-galactopyranosid
XME	Xenobiotia metabolisierende Enzyme
XRE	xenobiotic response element

Verwendete Maßeinheiten und Präfixe

Da	Dalton
M	mol
l	liter
g	Gramm
bp	Basenpaare
k	10^3
m	10^{-3}
μ	10^{-6}
n	10^{-9}
p	10^{-12}

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Rolle der Granulosazellen in der Follikelreifung	2
1.1.1	Follikelreifung.....	3
1.1.2	Regulation der Hormonbiosynthese im Ovar	5
1.1.3	KGN als <i>in vitro</i> Granulosazellmodell	7
1.2	Signalkaskade des Arylhydrocarbon-Rezeptors	7
1.2.1	Struktur und Liganden.....	7
1.2.2	Signaltransduktion und Zielgene.....	9
1.3	Signaltransduktion der PPARs	11
1.3.1	Struktur	11
1.3.2	Liganden des PPAR-Isotypen.....	11
1.3.3	Signaltransduktion	14
1.4	AhR und PPAR im Ovar	15
1.4.1	Bekannte Einflüsse des AhR	15
1.4.2	Bekannte Einflüsse der PPARs.....	16
1.5	Zielstellung	17
2	Material und Methoden	18
2.1	Zelllinie KGN	18
2.2	Kultivierung der Zellen	18
2.2.1	Kryokonservierung der Zellen	18
2.2.2	Exposition mit Agonisten/Antagonisten	19
2.3	Genexpressionanalyse	20
2.3.1	RNA-Isolation	20
2.3.2	RNA-Quantifizierung	20
2.3.1	Agarosegel-Elektrophorese.....	21
2.3.2	Reverse Transkription (cDNA-Synthese)	21
2.3.3	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)	22
2.3.4	Primerdesign und –sequenzen.....	23
2.3.5	Klonierung der PCR-Fragmente für die Standardreihe	23
2.3.6	Sequenzierung.....	25
2.4	Proteinexpression	26
2.4.1	Isolation von Gesamtprotein.....	26
2.4.2	Konzentrationsbestimmung.....	26
2.4.3	Western Blot	26
2.5	Bestimmung der Steriodhormonsynthese	28
2.5.1	Durchführung der ELISAs	28
2.6	Statistische Auswertung.....	29
2.7	Chemikalien, Verbrauchsmittel, Geräte und Software	29
3	Ergebnisse.....	34
3.1	MEHP-Anreicherung durch KGN-Zellen	34
3.2	Untersuchungen der intrinsischen Rezeptorfunktion des AhR, PPAR α und PPAR γ ...	35
3.2.1	Einfluss von pharmakologischen Agonisten auf spezifische Zielgene.....	35

3.2.2	Beeinflussung der PPAR-Isotypen-Expression	36
3.2.3	Einfluss der AhR-Expression	38
3.2.4	Zielgenaktivierung durch Signalwegausschaltung	40
3.2.5	Beeinflussung des AhR-Signalweges durch selektive Aktivierung der PPAR-Isotypen	41
3.3	Untersuchung charakteristischer Granulosazellmarker	42
3.3.1	Einfluss auf die Expression des FSH-Rezeptors	42
3.3.2	Einfluss auf die Expression des LH-Rezeptors	43
3.3.3	Einfluss auf die Estrogenrezeptor-Expression.....	44
3.4	Beeinflussung der endokrinen Funktion	46
3.4.1	Cyp19-Expression	46
3.4.2	Estrogensynthese	47
3.4.3	Estradiolmetabolisierung	48
4	Diskussion	50
4.1	Exposition durch endokrine Disruptoren	50
4.2	Charakterisierung des Zellkulturmilieus.....	51
4.2.1	KGN sind zur Anreicherung des aktiven Metaboliten MEHP fähig	51
4.3	Signalkaskade der Rezeptoren	52
4.3.1	Der AhR- und der PPAR-Signalweg sind funktionell aktiv	52
4.3.2	Beschreibung der Wechselwirkung: AhR ist dem PPAR γ nachgeschaltet.....	53
4.4	Beeinflussung von Granulosazellmerkmalen	56
4.4.1	Die Gonadotropinrezeptorausstattung wird auf unterschiedlichem Weg von beiden Signalwegen dysreguliert.....	56
4.4.2	AhR- und PPAR-vermittelte Effekte auf die Estradiolhomöostase	58
4.4.3	Beeinflussung des Estradiol-Feedbacks der Granulosazellen	60
4.5	Beeinträchtigte Follikelreifung durch DEHP.....	61
5	Zusammenfassung und Ausblick	62
6	Literatur	64
7	Thesen	76
8	Anlagen.....	i
8.1	Lebenslauf	i
8.2	Erklärungen	ii
8.3	Danksagungen.....	iii

1 Einleitung

Angaben zur Häufigkeit ungewollt kinderlosen Paaren schwanken sehr. Modernen Autoren zufolge sollen bis zu 15% der Menschen davon betroffen sein. Obwohl bei 85% dieser Paare die Ursache für die Fertilitätsstörung gefunden werden kann, bleibt ein nicht zu vernachlässigender Anteil ohne Diagnose [1].

Die Ursachen für Kinderlosigkeit verteilen sich näherungsweise gleich zwischen Faktoren bei Männern, Frauen und Wechselwirkung beider. Bei den Frauen leiden die Hälfte unter Ovulationsstörungen [2]. Diese können auf verschiedenen Ebenen auftreten und können in der hypothalamisch-hypophysäre Regulation oder im Ovar selbst beeinträchtigt sein. So kann es zu Störungen der Follikelentwicklung, der Steroidhormonsynthese, Oozytenreifung, Ovulation oder der Differenzierung zum Corpus luteum kommen. Ein weiterer wichtiger Grund für weibliche Sterilität ist das Polyzystische Ovarsyndrom (PCOS), das mit Insulinresistenz und erhöhten Androgenspiegeln assoziiert ist. Daneben zeigt sich eine Zunahme bei den sogenannten *Lifestyle*-assoziierten Fertilitätsstörungen wie Rauchen, Adipositas und ein höheres Reproduktionsalter [3].

Mittlerweile häufen sich die wissenschaftlichen Hinweise darauf, dass auch Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung, sogenannte endokrine Disruptoren (*endocrine disrupting chemicals*, EDC), die Fruchtbarkeit negativ beeinträchtigen. EDC sind exogene, meist synthetisch hergestellte Substanzen, die die endokrine Homöostase aus dem Gleichgewicht bringen können. Sie sind in der Lage, die endogenen Hormonwirkungen zu verstärken oder zu blockieren. Insbesondere chlorhaltige Phenylverbindungen wie 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) als Hauptvertreter der Dioxine und PCB (Polychlorierte Biphenyle), Plastikweichmacher wie Phthalate und Schwermetalle werden als Ursache endokriner Störungen untersucht und diskutiert [4,5]. In der stetig wachsenden industrialisierten Umgebung ist eine Exposition durch mehrere Schadstoffe der Normalfall. Über mögliche Auswirkungen einer solchen Mehrfachexposition ist bisher wenig bekannt.

Viele pathophysiologische Mechanismen endokriner Disruptoren wurden in tierexperimentellen Studien beleuchtet. Jedoch ist die Übertragbarkeit auf den Menschen nicht gut untersucht.

Zur Risikoabschätzung und Bewertung potenzieller EDC bedarf es daher weiterer Studien.

Im Ovar nehmen die Granulosazellen zum einen durch ihren direkten Kontakt mit den reifenden Oozyten als auch durch ihre Eigenschaft als Hormonproduzenten eine Schlüsselrolle für die Fertilität der Frau ein. Sie regulieren durch para- und autokrine Mechanismen das Follikelwachstum [6,7] und die lokale und systemische Estrogensynthese. Dabei unterliegt die Hormonproduktion

der Granulosazellen einer übergeordneten endokrinen Kontrolle. Es ist wahrscheinlich, dass sowohl die hormonelle Ansteuerung von Granulosazellen als auch deren intrinsische Funktionalität durch EDC gestört werden kann, was letztlich zu Beeinträchtigungen der Reproduktionsfähigkeit führt.

1.1 Rolle der Granulosazellen in der Follikelreifung

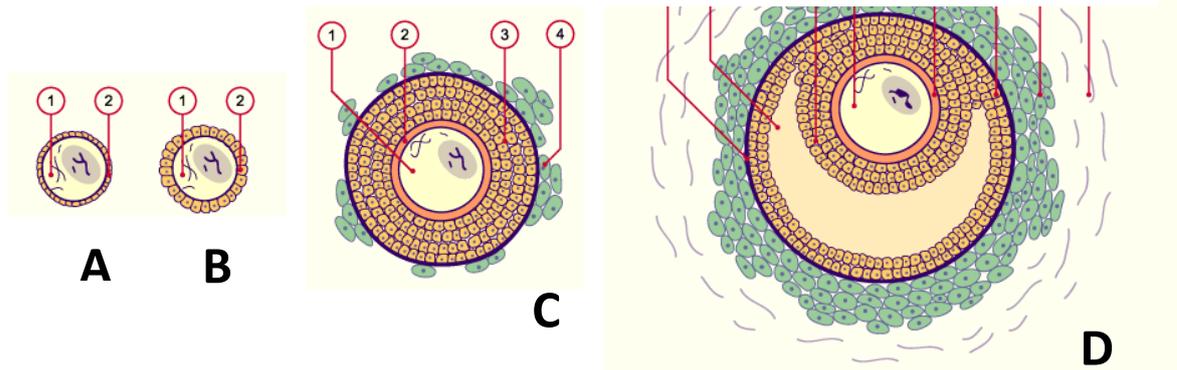
Eine der Hauptfunktionen der weiblichen Gonaden, dem Ovar, ist die Differenzierung und Freisetzung reifer Oozyten, damit diese befruchtet werden können und damit der Fortbestand der Spezies gesichert ist [8]. Zusätzlich dazu unterstützt es durch die Produktion von Steroidhormonen die Reifung der Follikel, die Ausbildung eines Menstruationszyklus und sekundärer Geschlechtsorgane sowie die Aufrechterhaltung einer Schwangerschaft [9].

Das Ovar muss als Ort der Keimzellreifung und als periphere Hormondrüse einer präzisen Steuerung durch verschiedene Regelkreise unterliegen. Systemisch wird die terminale Follikelreifung durch die neuroendokrine Kontrolle der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse (HPG) gesteuert. Das im Hypothalamus in ein *rete mirabilis* abgegebene Gonadoliberin (*Gonadotropin-Releasing-Hormon*, GnRH) gelangt über die Blutweg in ein zweites arterielles Gefäßbett in der Adenohypophyse, wo daraufhin die Gonadotropine Follikel-stimulierendes Hormon (FSH) und Luteinisierendes Hormon (LH) produziert werden.

1.1.1 Follikelreifung

Der Follikel entwickelt sich vom Primordial- über den Primär- und Sekundärfollikel zum antralen Follikel, der eine mit Flüssigkeit gefüllten Antrumhöhle ausgebildet hat und reift schließlich zum sprungreifen Graaf'schen Follikel (benannt nach Reinier de Graaf) (Abbildung 1) [10].

Abbildung 1: Stadien der Follikelentwicklung. (A) Primordialfollikel, (B) Primärfollikel, (C) Sekundärfollikel, (D) Tertiärfollikel (1) Oozyte, (2 in A+B) Follikelepithelzellen, (2 in C+D) Zona pellucida, (3) Granulosazellen, (4) Theka interna, (5) Theka externa, (6) Antrum folliculi, (7) Cumulus oophorus, (8) Basalmembran. Nach [228]



Erhalt der Primordialfollikel und initiale Follikelreifung

Zuerst wird durch intraovarielle Prozesse das Wachstum von Primordialfollikeln angeregt oder von inhibitorischen Stimuli losgelöst, sodass einige Keimzellen zu Primär- und Präantralfollikeln reifen können. Die molekularen Prozesse sind in Abbildung 2 als Übersicht zusammengefasst.

Die Granulosazellen nehmen einen wichtigen Einfluss auf die Steuerung des initialen Wachstums der Follikel. Sie bilden den löslichen kit-Liganden, dessen Rezeptor (c-kit) auf den Oozyten und Thekazellen exprimiert wird [13]. In Studien mit murinen kit-Mangelmutanten erreichen die Follikel keine Ausreifung jenseits primärer Stadien [14]. Das Anti-Müller-Hormon (AMH) ist ein wichtiger Regulator des ruhenden Pools der Primordialfollikel, indem es die initiale Follikelreifung inhibiert [15–17]. Da es von den Granulosazellen als negatives Feedback gebildet wird, wird es klinisch als Marker für den verbleibenden Follikelpool genutzt [18,19].

Zusätzlich zu auto- und parakrinen Faktoren sind direkte Zell-Zellverbindungen über *gap junctions* für die Follikelausreifung verantwortlich. Die Expression von verschiedenen Connexinen konnte im Ovar festgestellt und ein Einfluss auf die Follikulogenese gezeigt werden. So bildet Connexin43 *gap junctions* zwischen den Granulosazellen aus [20], Connexin37 zwischen Oozyten und Granulosazellen [21]. Obwohl Mausmodelle mit gezielten Defekten in diesen Genen rasch postnatal aufgrund kardialer Malformationen versterben, zeigten beide einen Ausreifungsstopp im präantralen Follikelstadium.

Antrale Follikelformation

Die terminale, zyklisch stattfindende Ausreifung der präantralen Follikel wird hauptsächlich durch die neuroendokrine Gonadotropinausschüttung bestimmt [8].

FSH und LH sind beide heterodimere Glycoproteine, die aus einer einzigartigen α -Untereinheit und einer evolutionär verbreiteten β -Untereinheit bestehen, welche auch im TSH und Choriongonadotropin vorhanden ist. Sie sind die bestimmenden Signale für Überleben und Wachstum der antralen Follikel, die Estradiolproduktion und Granulosazellproliferation. Fehlen sie, kommt es zu Atresie und Apoptose in den Follikeln [22]. Zum Ende eines jeden Menstruationszyklus entwickelt sich nach Überschreiten eines kritischen FSH-Spiegels eine Kohorte von Sekundärfollikeln, die weiter zum springreifen Follikel differenzieren. Währenddessen steigt durch die erhöhte Expression der Gonadotropinrezeptoren die Empfindlichkeit der Granulosazellen für FSH [23]. Die neu geformte murale Granulosazellschicht an der äußeren Wand des Follikels übernimmt kritische Aufgaben der Steriodbiosynthese und Ovulationsregulation, während die Cumulus-Granulosazellen die Oozyte umgeben und für deren Wachstum und Differenzierung sorgen. Diese beiden Zellpopulationen werden durch gegenläufige Gradienten von FSH und von der Oozyte sezernierten (Wachstums-)Faktoren beschrieben [24]. Der Übergang vom präantralen zum antralen Follikelstadium markiert den Übergang von intraovarieller zur extraovariellen Steuerung durch die Hypothalamus-Hypophysen-Achse.

Die klassische Signalkaskade des FSH wird durch Bindung an einen G-Protein-gekoppelte heptahelikalen, transmembranären Rezeptor ausgelöst. Dadurch bildet die gekoppelte Adenylatzyklase zyklisches Adenosinmonophosphat (cAMP), das an die Proteinkinase A (PKA) bindet. Diese phosphoryliert den Transkriptionsfaktor *cAMP-response element-binding protein* (CREB), der die Expression verschiedener Zielgene, wie die Aromatase (Cyp19), Inhibin oder den LH-Rezeptor induziert [10]. Daneben sind in den letzten Jahren einige PKA-unabhängige Signale des FSHR identifiziert worden, die Einfluss auf andere Signalwege wie PI3K/AKT und SRC-Tyrosin-Kinasen nehmen [25,26].

Auch das Signal des Insulin ähnlichen Wachstumsfaktor (*insulin like growth factor 1*, IGF1) nimmt Einfluss auf die Follikelreifung. IGF1-defiziente Mäuse zeigen einen Phänotyp ähnlich dem FSH β - oder FSH-R-defizienter Mäuse [27,28]. Viele dieser Signalwege modulieren die Proliferation der Granulosazellen, die letztlich durch den Zellzyklus reguliert wird. Die D- und E-Isoformen der Cycline steuern über Cyclin-abhängige Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, CDK4/6 and CDK2) den Eintritt in den Zellzyklus, indem sie die G₁-S Transition ermöglichen. CDK2-defiziente Mäuse zeigen eine verminderte Proliferation von Granulosazellen und einen Stopp der Follikulogenese im präantralen Stadium [29].

Die antralen Follikel reifen zu Tertiärfollikeln heran. Gleichzeitig findet die Selektion des dominanten Follikels statt. Die übrigen Follikel werden atretisch und in Apoptose geführt [8]. Der dominante Graaf'sche Follikel ovuliert und das Corpus luteum bildet sich [30]. Welche Mechanismen im Einzelnen für die Selektion des einen Graaf'schen Follikels beitragen, ist nicht abschließend geklärt. Einfluss nehmen sicher die Dichte der Gonadotropinrezeptoren auf dem dominanten Follikel [31]. Aktivine, ebenfalls Mitglieder der TGF β -Superfamilie, die von Granulosazellen produziert werden, sind an der Auswahl des dominanten Follikels beteiligt [32,33]. Die gleichzeitige Estrogen- und Inhibinausschüttung der Follikel wirken als negatives Feedback auf die FSH-Freisetzung, sodass diese sinkt und nur der dominante Follikel, der eine hohe FSH-Rezeptor-Dichte aufweist, weiter wächst [34,35].

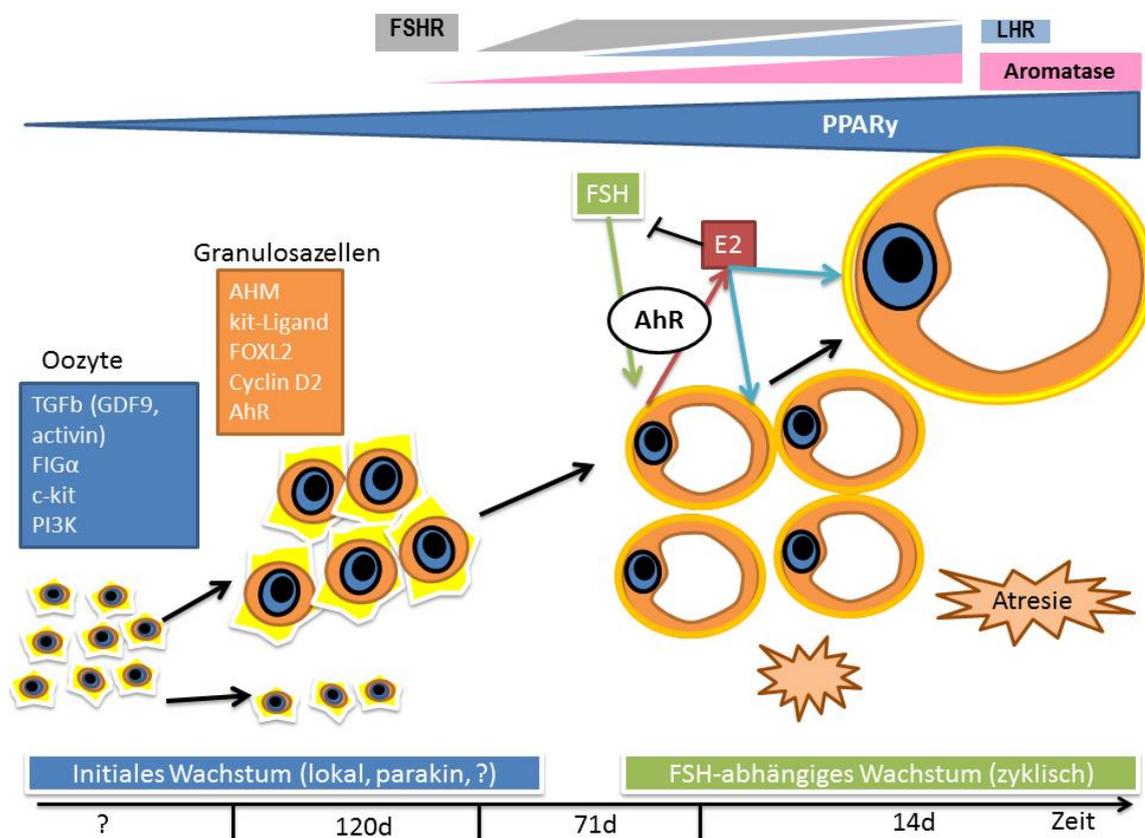


Abbildung 2: Übersicht über die Follikelreifung und Steuerung dieses Prozesses. Primordialfollikel werden durch intraovarielle Prozesse rekrutiert und reifen zu präantralen Follikeln. Dieser Prozess kann über Jahrzehnte stattfinden. Erst mit Eintritt in die Pubertät wachsen Follikel unter FSH-Einfluss weiter. Zyklisch entsteht ein dominanter Follikel, der ovuliert. Alle anderen Follikel werden atretisch.

1.1.2 Regulation der Hormonbiosynthese im Ovar

Die Steriodbiosynthese findet synergistisch zwischen den beiden gonadotropinabhängigen Zellschichten im Ovar statt: Die Hauptaufgabe der Thekazellen während der Follikulogenese ist die Produktion von Steroiden. Obwohl diese zur *de novo* Biosynthese von Androgenen fähig sind,

fehlt ihnen Cyp19, das den letzten, geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Estradiolbiosynthese katalysiert (Abbildung 3). Die Thekazellen reagieren auf basale Level von LH mit höherer Expression der Enzyme, die mit der Steriodbiosynthese verbunden sind: *Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR)*, Cytochrom p450 Isoform 11A (Cyp11A), Cyp17A1 und 3 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3 β -HSD). StAR steuert den Transport von Cholesterin zur inneren Mitochondrienmembran, wo es durch Cyp11A1 zu Pregnenolon konvertiert wird. Cyp17A1 stellt daraus Dehydroepiandrosteron (DHEA) her, das schlussendlich durch 3 β HSD zu Androstenedion (AD) oxidiert wird. AD diffundiert durch die Basalmembran zu den Granulosazellen. Als Antwort auf FSH exprimieren diese Cyp19, um Androgene in Estradiol bzw. Estron zu konvertieren [36].

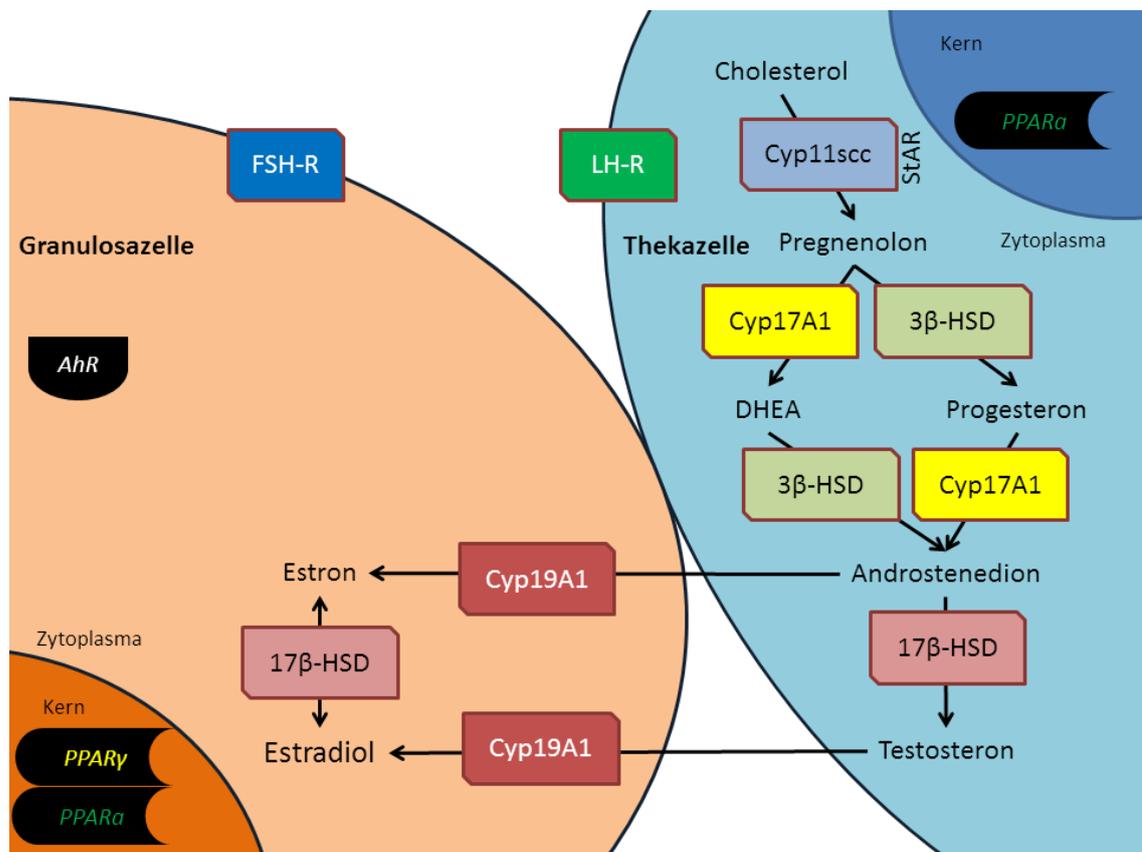


Abbildung 3: Steriodbiosynthese im Ovar nach [5]. DHEA: Dehydroepiandrosteron; StAR: *Steroidogenic Acute Regulatory Protein*

Cyp19-defiziente Mäuse zeigen eine massiv gestörte Follikelstruktur, erhöhte Apoptose der Granulosazellen und erhöhte FSH und LH-Werte, was durch das Feedback der HPG-Achse erklärt werden kann [37].

Die Effekte des Estradiols werden durch die beiden Estrogenrezeptoren ER α und ER β vermittelt, die ligandenaktive Transkriptionsfaktoren sind. Schnelle, nicht-genomische Estradioleffekte werden über den membranassoziierten G-Protein-gekoppelten Rezeptor GPR30 vermittelt [38]. ER β ist auf Granulosazellen der wachsenden Follikel exprimiert und wird durch die Gonadotropine reguliert, wohingegen ER α hauptsächlich im Interstitium und den Thekazellen exprimiert

wird [39]. ER α -Defizienz führt zu völliger Infertilität mit gestörter Follikelstruktur ähnlich der, die bei Cyp19-Defizienz beobachtet wurde, was auf die ER α -abhängige Androgenproduktion in den Thekazellen zurückzuführen ist [40]. Fehlt der ER β liegt eine Subfertilität aufgrund einer Ovulationsstörung vor. Dies ist auf eine verminderte Expression des LHR auf den Granulosazellen zurückzuführen, dessen höchste Expression präovulatorisch vorliegt und von dem gleichzeitigen FSH- und Estradiol-Stimulus abhängig ist [41]. Zusammenfassend legen die Daten aus den defizienten Tiermodellen nahe, dass anders als FSH Estradiol nicht essentiell für die antrale Follikelformation ist, aber kritisch für das Wachstum und die Differenzierung der Granulosazellen sowie den Erhalt der antralen Follikelreifung und die Ovulation [10].

1.1.3 KGN als *in vitro* Granulosazellmodell

Primäre Granulosazellen können im Rahmen von *in vitro*-Fertilisation (IVF)-Behandlungen nach kontrollierter exogener Follikelstimulation gewonnen werden [42,43]. Diese zeichnen sich aber oft durch große Heterogenität aus und sind auch nur über kurze Zeiträume stabil kultivierbar [44]. So konnte beispielweise gezeigt werden, dass der Modus der hormonellen Stimulation Einfluss auf das Expressionsmuster der gewonnenen Zellen hat [45]. Darüber hinaus befinden sich die so gewonnenen Zellen nach Ende des Stimulationsprotokolls in fortgeschrittener luteinierter Differenzierung, sodass die Empfindlichkeit für FSH und LH und das Steroidprofil einem sehr späten Stadium entspricht [46]. Viele Effekte der EDCs greifen schon in weit früheren Stadien. Aufgrund dieser Tatsachen wurde für diese Arbeit eine immortalisierte Granulosazelllinie ausgewählt, um die Prozesse der zyklischen Rekrutierung, wie sie in einem Sekundärfollikel stattfinden, untersuchen und charakterisieren zu können. Derzeit liegen 7 verschiedene immortalisierte humane Granulosazelllinien vor [47], die sich in ihrer Herkunft und endokrinen Charakteristika unterscheiden. Neben den KGN-Zellen sind zwei weitere aus ovariellen Tumoren entwickelt worden. Die übrigen 4 wurden durch gezielte onkogene Transformation erzeugt. Die KGN-Zelllinie wurde aufgrund ihrer FSH-Sensitivität, Enzymexpression und -aktivität, der Steroidsynthese und damit der größten Ähnlichkeit zu nativen Granulosazellen eines Sekundärfollikels ausgewählt [47–52].

1.2 Signalkaskade des Arylhydrocarbon-Rezeptors

1.2.1 Struktur und Liganden

Der Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR, auch Dioxin-Rezeptor) ist ein nahezu ubiquitär vorkommender Liganden-aktivierter Transkriptionsfaktor. 1976 wurde er erstmals von Poland et al. als

Mediator der Toxizität von Xenobiotika wie halogenierten Dibenzo-p-dioxinen (TCDD) in murinen Hepatozyten beschrieben [53]. In den vergangenen 30 Jahren ist er bzw. ein Homolog in nahezu allen Vertebraten und deren Organsystemen und in manchen Invertebraten beschrieben worden [54,55]. Das phylogenetisch weit gestreute Vorkommen des AhR sowie die ubiquitäre Expression und das funktionelle Wirken als Rezeptor deuten auf eine evolutionär frühe Bildung hin, dessen physiologische Rolle und endogene Liganden sich verändert haben mögen. AhR-defiziente Mäuse haben einen auffälligen, aber nicht letalen Phänotyp. Sie fallen auch durch Fertilitätsstörungen auf [56].

Der AhR gehört in die Gruppe der basischen *helix loop helix* (bHLH) Transkriptionsfaktoren. Des Weiteren besitzt er eine hochkonservierte Domäne, über die eine Reihe anderer Regulatoren verschiedenster biologischer Prozesse ebenfalls verfügen. Sowohl der AhR als auch der Arylhydrocarbon Receptor nuclear translocator (ARNT) teilen diese zweite Domäne mit den zwei nahe verwandten Proteinen *single-minded* (SIM) und *period* (PER) aus *Drosophila* [57]. Aus der Homologie dieser Gruppe hat man die PAS-Domäne abgeleitet (PER, ARNT, SIM). SIM scheint ein kritischer Regulator der Entwicklung des zentralen Nervensystems zu sein, PER ist in den circadianen Rhythmus involviert.

Der AhR hat mittlerweile eine gut etablierte Rolle in der Erklärung der Toxizität halogener Dioxine, an deren Beispiel mechanistisch die Wirkung verschiedener Umweltschadstoffe gezeigt werden konnte [58]. Jedoch hat sich in den letzten Jahren der Fokus auch weiter über die Vermittlung toxikologischer Effekte hin zur Suche nach physiologischen Aspekten verschoben. So wurde versucht, insbesondere die pharmakokinetischen Eigenschaften des AhR mittels synthetisch hergestellter Agonisten zu klären. In der Gruppe der exogenen Liganden lassen sich prinzipiell 3 Subtypen unterscheiden. Die erste Gruppe sind die halogenierten Dioxine (HAH), deren Hauptvertreter 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) gleichzeitig auch der am besten charakterisierte AhR-Agonist ist. Durch die Halogenierung mit Chlorid sind Dioxine chemisch äußerst inert, werden also metabolisch kaum abgebaut und akkumulieren so in der Umwelt und in exponierten Organismen. Für diese Gruppe konnte gezeigt werden, dass AhR-defiziente Mäuse unempfindlich für die Toxizität von TCDD sind [59]. Die zweite sehr heterogene Gruppe sind PCB, die 209 Isomere und Kongenere umfasst [60]. Durch ihre chemische Stabilität sind sie Bestandteil von Isolatoren und Feuerschutzmitteln [61]. Die dritte Gruppe wird durch die polyzyklischen aromatischen Kohlenwasserstoffe (PAH) repräsentiert, deren Hauptvertreter das Benza[a]pyrene (B[a]P) ist. Diese Verbindungen sind in Zigarettenrauch oder Grillfleisch enthalten [62]. Diese Substanzen können im Sinne einer Giftung durch AhR-induzierte Enzyme zu Diol-Epoxiden transformiert werden, die als Makromoleküle Addukte an der DNA bilden und so direkt karzinogen wirken können.

Obwohl PAH auch bei Waldbränden entstehen können, sind größere Expositionen solcher Stoffe zeitgeschichtlich eher neuere Ereignisse, die nicht die evolutionäre Konservierung des AhR erklären können [58]. Dies erschwert es einen kausalen Zusammenhang zwischen Umweltschadstoffen und dem Aufkommen bzw. der Selektion des AhR zu ziehen. Lange wurde der AhR daher als *orphan receptor* beschrieben.

Mit dem Wissen um den chemischen Aufbau dieser exogenen Liganden wurde versucht, mittels *structure-activity relationship* mögliche endogenen Liganden zu finden. Die zuerst beschriebenen und charakterisierten endogenen Liganden sind Indigo und Indirubin, beides Farbstoffe aus der Indigopflanze.

Tabelle 1 Beschriebene Liganden des AhR: 1) Cyp1a1 – Induktion, 2) Reporterassay

	Ligand	ED ₅₀ [mol/kg] (Spezies)	TCDD Äquivalenz-dosis	Publikation
Exogene Agonisten	TCDD ¹⁾	10 ⁻⁹ (Maus)	1	[63]
	¹⁾	10 ⁻¹¹ (Ratte: Hepatomazelllinie)		[64]
	3,3',4,4',5'-penta-chloriertes Biphenyl ¹⁾	5 x 10 ⁻⁸ (Ratte)	50	[65]
	3-Methylcholanthren ¹⁾	2,9 x 10 ⁻⁴ (Ratte)	1000-10.000	[66]
Endogene Liganden	Indirubin ²⁾	2 x 10 ⁻¹⁰ (Hefe)	30	[67]
	²⁾	10 ⁻⁷ (humane Hepatoma)	50	[68]
	6-Formylindolo[3,2-b]carbazole ¹⁾	5.3 x 10 ⁸ (human)	1.89	[69]
	Kynurenin ^{1,2)}	12.3 x 10 ⁶ (human)	n.a.	[70]

1.2.2 Signaltransduktion und Zielgene

Die Aktivierung des AhR umfasst folgende Schritte: Ligandenbindung, Translokation in den Nukleus, Heterodimerisierung mit ARNT und DNA-Bindung (Abbildung 4) [71]. Der AhR liegt in Abwesenheit eines Liganden ruhend im Zytoplasma als Komplex mit den Chaperonen Hitzeschockprotein 90 (Hsp90), p23 und Hepatitis B Virus X- assoziiertes Protein 2 (XAP2) vor [72–75]. Hsp90 interagiert mit der bHLH und PAS Domäne [76]. Letztere enthält die Region, die für die Ligandenbindung verantwortlich ist [77]. Die Bindung eines Liganden an den AhR induziert eine Konformationsänderung, sodass das N-terminale Kernlokalisierungssignal (NLS: *nuclear localization signal*) frei und der Import in den Zellkern eingeleitet wird [78]. Die gebundenen Chaperone werden freigesetzt und ARNT lagert sich dem AhR an [79]. Das ligandengebundene Dimer aus AhR/ARNT kann nun über die bHLH-Domäne an typische promotorassoziierten Xenobiotika-

Responseelement (XRE) der DNA binden. Die C-terminale Transaktivierungsdomäne interagiert mit Transkriptionsfaktoren und so die Transkription verschiedener Gene initiiert werden. Die Sequenz typischer Responseelemente ist: 5' TnGCGG 3' [57].

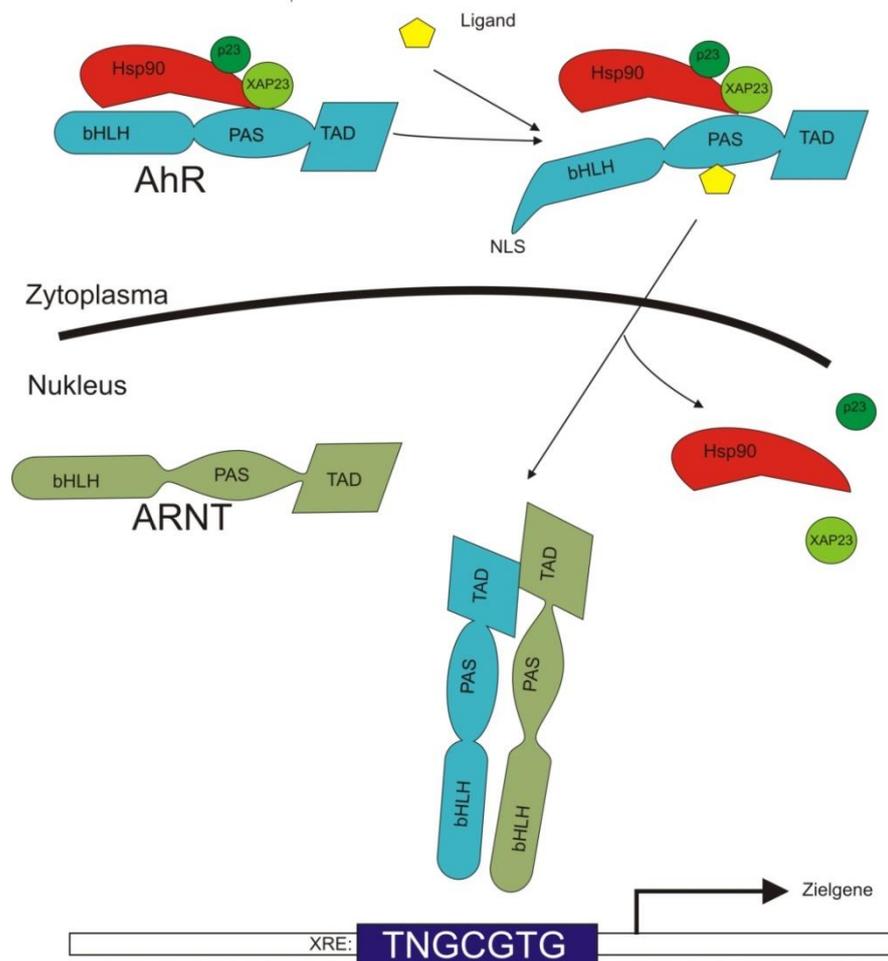


Abbildung 4: Schematische Darstellung der klassischen Signaltransduktion des AhR nach [57,80] ARNT: AhR-nuclear-translocator, bHLH: basische helix-loop-helix-Domäne, Hsp90: Hitzeschockprotein 90, NLS: Kernlokalisierungssignal, PAS: PER-ARNT-SIM-Domäne, TAD: Transaktivierungsdomäne, XAP23: Hepatitis B Virus X-assoziiertes Protein 23, XRE: Xenobiotika-Responseelement.

Die am besten charakterisierten Zielgene des AhR sind die Monooxygenasen Cyp1a1, Cyp1a2 und Cyp1b1, welche auf Grund ihrer Funktion auch als Xenobiotika-metabolisierende Enzyme (XMEs) bezeichnet werden. Weitere Zielgene sind die Phase II-konjugierenden Enzyme Glutathione-S-transferase (GST) und die UDP-Glucuronosyltransferase 1A1 (UDPGT) sowie die Aldehyd-Dehydrogenase und die NADPH-Quinone-oxidoreductase. Durch die Induktion dieser Enzyme kommt es jedoch nicht nur zur Metabolisierung und Entgiftung von Xenobiotika, sondern es können ebenso äußerst karzinogene Verbindungen entstehen. Ein Beispiel ist die Umwandlung von Benzo[a]pyren in 7,8-dihydroxy-9,10-epoxy-7,8,9,10-Tetrahydro-benzo[a]pyren durch das Cyp1a1 [81]. Auch endogene Verbindungen wie 17 β -Estradiol können durch eine Xenobiotika-induzierte Enzymaktivität von Cyp1a1, Cyp1a2 oder Cyp1b1 verstärkt metabolisiert werden

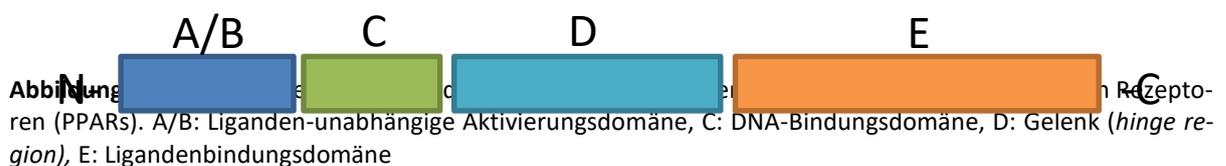
[82,83]. Neben diesen Zielgenen des AhR wurde in den vergangenen Jahren für eine Reihe anderer Gene eine AhR-abhängige Regulation bzw. ein funktionelles XRE im Promotorbereich nachgewiesen. Zu diesen gehören der AHR-Repressor (AhRR [84]), aber auch Gene, welche für die Funktion und Regulation der Granulosazellen essentiell sind, beispielsweise die Cyp19 [56] oder der FSHR [85].

1.3 Signaltransduktion der PPARs

1.3.1 Struktur

Die Peroxisomen Proliferator-aktivierten Rezeptoren (*Peroxisome proliferator-activated receptor*; PPAR) sind eine Familie nukleärer Hormonrezeptoren, die zur Steroidrezeptor-Superfamilie gehören. 1990 wurden sie erstmals von Issemann und Green als Vermittler der Hepatokarzinogenese in Nagern identifiziert, die mit der Proliferation der intrazellulären Peroxisomen einherging [86]. In nachfolgenden Arbeiten wurden zwei weitere Mitglieder der Familie identifiziert, sodass sich heute die Nomenklatur von PPAR α , β (auch delta) und γ durchgesetzt hat. Die PPARs haben große Strukturähnlichkeit mit Mitgliedern der Steroidrezeptorfamilie.

Die mäßig konservierte N-terminale A/B-Domäne ist verantwortlich für die Liganden-unabhän-



gige Aktivierung (AF-1). Die C-terminale E-Domäne enthält die Ligandenbindungsdomäne (AF-2). Dazwischen liegen die C-Domäne, die für die DNA-Bindung verantwortlich ist und die D-Domäne, die für Heterodimerisierung notwendig ist und als Gelenk (*hinge region*) bezeichnet wird [87]. Wenngleich alle drei PPAR-Isotypen von drei *single copy*-Genen auf den humanen Chromosomen 22, 6 und 3 codiert werden, gibt es gute Evidenz dafür, dass alle aus einem Vorgängergen entsprungen sind [88,89].

Neben der reinen Rezeptorfunktion ist eine Transkriptvariante von PPAR α beschrieben worden, deren Anteile der Gelenkregion und der gesamten Ligandenbindungsdomäne durch alternatives Splicing verloren gehen. Damit kann sie mit anderen PPAR und nukleären Rezeptoren um Koaktivatoren kompetieren [90]. Von PPAR γ sind beim Menschen zwei Transkriptvarianten (PPAR γ 1/2) bekannt, die zu unterschiedlichen Proteinen führen [91].

1.3.2 Liganden des PPAR-Isotypen

Die Menge der Liganden ist sehr breit, was typisch für die nukleären Rezeptoren ist. Viele dieser, insbesondere der endogenen Substanzen haben eine gut beschriebene endokrine Funktion oder

sogar Einfluss auf die ovarielle Homöostase.

Tabelle 2: Übersicht über die Liganden der PPAR mit Quelle und Spezifität für die Isotypen nach [92]

		Quelle	Spezifität für PPAR-Isotypen	Referenz
Endogene Liganden	Mehrfach ungesättigte Fettsäuren	Diät	PPAR α > PPAR δ >>PPAR γ	[93]
	Acharchidonsäure-metabolite	Entzündung, Metabolisch	PPAR α , PPAR δ , PPAR γ	[94]
	8-HETE			[95]
	PGJ2		PPAR α	[95]
	PGA1		PPAR γ >>>PPAR α > PPAR δ	[95]
	Leukotriene B4		PPAR δ >> PPAR α , PPAR γ	[96]
	Oxidiertes LDL		PPAR γ	[97]
Exogene Liganden	Herbizide/Fungizide	Umwelt	PPAR γ	[98]
	Phthalate/Plastik-weichmacher	Chemische Industrie		[99]
	NSAIDS	Pharmazie	PPAR γ > PPAR α >> PPAR δ	[100]
	Fibrat	Pharmazie	PPAR α	[101]
	Glitazon	Pharmazie	PPAR γ	[101]
	PAH	Umwelt, Chem. Industrie	PPAR α , PPAR δ	[102]
	Pflanzliche Inhaltsstoffe	Komplementär-medicin	PPAR γ	[103]
	Genistein	dizin		

Es wird deutlich, dass insbesondere die endogenen Liganden eine unterschiedliche Affinität zu den Isotypen haben. Trotz der großen Heterogenität zeichnen sich alle Liganden als amphiphile Moleküle aus, die ein hydrophobes Grundgerüst (entweder aliphatisch oder aromatisch) und eine Säuregruppe bzw. eine funktionelle Gruppe besitzen, die zur Säure oxidiert werden kann [104]. Verschiedene synthetisch erzeugte und pharmakologisch genutzte Agonisten sind bekannt: Die beiden wichtigsten Gruppen sind die der Fibrate (Bezafibrat, Clofibrat und Fenofibrat) als PPAR α -Agonisten [105] und die Thiazolidinedione (TZDs) (Rosiglitazon, Pioglitazon und Troglitazon) als PPAR γ Agonisten [106].

Auch für Phthalate konnte die Aktivierung der PPAR α - und PPAR γ -Isotypen in Transaktivierungsassay mehrfach mechanistisch [104,107,108] und vor Estrogen-abhängigem Hintergrund [109–111] gezeigt werden. Die Phthalate gehören mit einer Einsatzmenge von 2 Mio. Tonnen/Jahr weltweit zu den wichtigsten Industriechemikalien und werden in Kunststoffen (PVC), in Textilhilfsmitteln sowie in kosmetischen Präparaten (Parfüms, Deodorants, Nagellacken etc.) einge-

setzt. Di(2-ethylhexyl)phthalat (DEHP) gehört zu den am häufigsten als Weichmacher eingesetzten Phthalaten. DEHP ist chemisch sehr stabil. Da es nicht kovalent an PVC gebunden ist, kann es entweichen bzw. beim Kontakt mit Flüssigkeiten oder Fetten herausgelöst werden. Die Verwendung von phthalathaltigem Verpackungsmaterial für Lebensmittel birgt die Gefahr des Übertritts v.a. in fettreiche Nahrungsmittel. Zudem bedeutet die gute Fettlöslichkeit, dass DEHP im Fettgewebe akkumuliert und auch in Muttermilch, aber auch in „natürlichen“ Lebensmitteln wie Butter und Käse nachgewiesen werden kann [112,113].

Die physiologischen Funktionen der PPARs sind weit besser bekannt als die des AhR: Der PPAR α -Isotyp ist vorrangig für den Lipidkatabolismus verantwortlich. Er reguliert verschiedene Gene der Lipidoxidation, die hauptsächlich in der Leber, oxidativ arbeitenden Muskeln und im Herz vorkommen [87]. In der Leber werden Lipoproteinlipase (LPL), Fettsäuretranslokase (CD36) und das *fatty acid transport protein* durch PPAR α induziert [114]. Beispielhaft für die Fettsäureoxidation in den Mitochondrien wird im Rahmen der β -Oxidation die *medium chain acyl-CoA dehydrogenase* (ACOX) induziert [115].

Die ubiquitäre, geringe Expression von PPAR β und die Tatsache, dass bisher keine selektiven Liganden für PPAR β identifiziert worden sind, machen es schwer, dieser Isoform eine spezifische Funktion zuzuschreiben [87].

PPAR γ , der hoch in Fettgewebe exprimiert ist, konnte als Schlüsseltranskriptionsfaktor in der terminalen Differenzierung weißen Fettgewebes identifiziert werden [116,117]. Beide Transkriptvarianten induzieren die Adipozyten-spezifische Isoform des fettsäurebindenden Proteins (*fatty acid binding protein*, FABP4, aP2) [118]. Im Heterodimer mit dem Retinsäurerezeptor (RXR) reguliert PPAR γ die zytosolische Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase (PEPCK1) [119], die den wichtigsten Schritt der Gluconeogenese katalysiert. Die Kontrolle der Zelldifferenzierung von PPAR γ ist aber nicht nur auf Präadipozyten beschränkt. In MCF7-Zellen und anderen Brustkrebszelllinien führt die Behandlung mit einem synthetischen PPAR γ zu einer Lipidakkumulation und Expression von Genen, die erst in späteren Differenzierungsphasen anzutreffen sind [120], oder zu Apoptose und Fibrosierung [121].

Auch eine klinische Relevanz hat sich für die beiden Isotypen PPAR α und PPAR γ gezeigt. Die Behandlung mit PPAR α -Aktivatoren wie Fibraten haben sich in der Therapie von Dyslipidämien als sinnvoll erwiesen, da diese eine Senkung des Plasma-Triglyzeridspiegels und eine Verschiebung der LDL/HDL-Verhältnisses (*high* bzw. *low densitiv lipoprotein*) zugunsten des gefäßprotektiven HDLs herbeiführen [105,122,123]. TZD als synthetische Liganden des PPAR γ werden derzeit unter anderem in der Behandlung des Typ-2-Diabetes eingesetzt, da sie eine Verbesserung in der Insulinsensitivität gezeigt haben [124–126].

Dass auch Prostaglandine, Leukotriene und andere proinflammatorischer Cytokine als Liganden

der PPARs wirken, machen ihren Einfluss in der Entzündungsreaktion deutlich, welche für die Auslösung der Ovulation essentiell ist. PPAR α -defiziente Mäuse zeigen einen verzögerten Ablauf der Entzündungsreaktion, was durch die Rolle von PPAR α im Katabolismus des proinflammatorischen Leukotriens B4 erklärt wird [127]. In glatter Muskulatur hemmt PPAR α den Interleukin-1-Signalweg indem es Cyclooxygenase-2 (COX-2) induziert [128,129]. Andere Studien zeigen, dass auch PPAR γ -Agonisten die Aktivierung von Makrophagen im Entzündungsgeschehen hemmen können [130].

1.3.3 Signaltransduktion

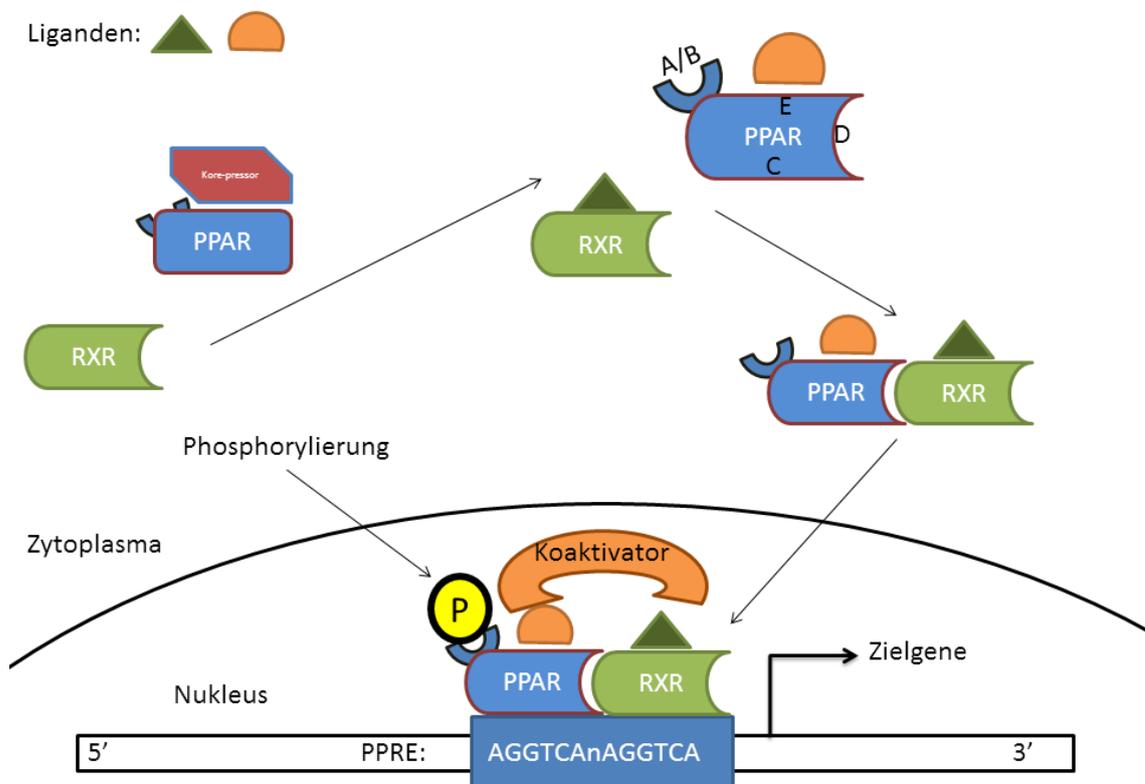


Abbildung 6: Schematische Darstellung der Signaltransduktion der PPARs nach [131] RXR: retinoic acid receptor, P: Phosphorylierung A/B/C/D/E Domänen aus Abbildung 5.

Die Signaltransduktion der PPARs ist in Abbildung 6 schematisch dargestellt [131]. Die Rezeptormoleküle liegen als Komplex mit verschiedenen Korepressoren vor [92]. Eine Ligandenbindung führt zur Freisetzung des Rezeptormoleküls aus dem Komplex und einer Konformationsänderung [87]. Nach Bildung des PPAR:RXR-Komplexes können nun Koaktivatoren binden, so dass das Heterodimer mit den PPAR-Responseelementen der DNA (PPRE) interagieren kann. Essentiell dafür ist die Bildung eines Heterodimers mit RXR, der ebenfalls zur Familie der nukleären Rezeptoren gehört. Diese Interaktion kann auch in Abwesenheit von Liganden vorkommen

[132]. Das PPAR:RXR-Heterodimer bindet kurze DNA-Sequenzen der PPRE, die in der Promotorregion verschiedener Zielgene zu finden sind. Dabei handelt es sich um eine wiederholte Sequenz von 5'AGGTCA3', die durch ein beliebiges Nukleotid getrennt ist [93]. Durch kurze Motive am 5'-Ende der PPREs wird eine Polarität geschaffen, die die Richtung der Bindung des Heterodimers auf der DNA bestimmt [93]. Diese 5'-Sequenzen geben auch die Möglichkeit zur präferentiellen Bindung verschiedener Isotypen. Die Kofaktoren haben Histonacetyltransferase-Aktivität, um die Nukleosomenstruktur zu modifizieren und Kontakt zu den allgemeinen Transkriptionsfaktoren aufnehmen zu können [133]. Die transkriptionelle Aktivität des PPAR:RXR-Heterodimers kann einerseits durch Ligandenbindung, andererseits auch durch Phosphorylierung der A/B-Domäne moduliert werden [134].

Aufgrund der Ähnlichkeit des Signaltransduktionsweges der PPARs mit denen anderer nukleärer Rezeptoren und dem AhR sind auch andere Interaktionen vorstellbar. Diese konnten bereits für den Glucokortikoidrezeptor [135–137] oder den Schilddrüsenhormonrezeptor [138–140] mit den PPARs gezeigt werden.

1.4 AhR und PPAR im Ovar

1.4.1 Bekannte Einflüsse des AhR

Sowohl die AhR-Defizienz im Mausmodell als auch die Aktivierung des AhR-Signalweges durch Liganden kann zu adversen Effekten in der weiblichen Reproduktionsphysiologie führen (Abbildung 2) [141]. Erstmals beobachtet wurde dies bei AhR-defizienten Mäusen, die ursprünglich zum Nachweis der hepatischen Toxizität von PAHs entwickelt worden waren [142–144]. Die Subfertilität der weiblichen Tiere zeigte sich durch eine geringere Wurfgröße und eine erhöhte Letalität der Nachkommen während der Laktationsphase. Mechanistisch konnten verschiedene Ursachen dafür gefunden werden, wobei der AhR zu unterschiedlichen Zeitpunkten Einfluss nimmt: Während der pränatalen Einwanderung der Urkeimzellen in die Ovaranlage wird ein großer Teil der Oozyten in Apoptose geführt. In diesem Stadium wirkt der AhR proapoptotisch [145]: So zeigten Ovarien aus AhR-defizienten Mäusen kurz nach der Geburt bis zu doppelt so viele Primordialfollikel als Wildtyp (WT)-Mäuse [141]. Umgekehrt wiesen *in-utero* oder postnatal mit AhR-Liganden exponierte Versuchstiere weniger Primordialfollikel auf [146]. Ursächlich konnten zwei XREs in der Promotorregion des proapoptotischen *Bcl2-associated X protein* (Bax) gefunden werden [147]. Zur Rolle des AhR in den somatischen Zellen in der pränatalen Follikulogenese liegen dagegen wenig Daten vor [148].

Auch während der initialen und zyklischen Follikelreifung ist der AhR in das Wachstum und die Ausdifferenzierung der Follikel involviert. Jedoch hat hier das Fehlen des AhR einen gegenteiligen Effekt: Es wurde festgestellt, dass bei fehlender AhR-Signalwirkung weniger pränatale und

antrale Follikel vorhanden sind als im WT [141]. Ein Grund dafür scheint die notwendige Anwesenheit des AhR für die Zellzyklusprogression in den Granulosazellen über Cyclin D2 (CCND2) und die cyclinabhängige Kinase 4 (CDK4) zu sein [85]. Eine Aktivierung des AhR mittels β -Naphthoflavon führte zu gesteigerter Proliferation der Granulosazellen *in vitro* [149]. Der Untergang der Follikel scheint zu diesem Zeitpunkt aber nicht mehr durch den AhR beeinflusst zu sein [150,151]. Eine weitere Ursache für das reduzierte Follikelwachstum wird in der Änderung der Steroidbiosynthese gesehen. So führen sowohl AhR-Depletion als auch die exogene Aktivierung zu einer verminderten Estradiolproduktion [85,152]. Auch auf Seiten der Thekazellen zeigt sich ein negativer Einfluss exogener AhR-Aktivierung auf die Steroidbiosynthese [151,153]. Die Steuerung der Steroidbiosynthese über ER α , ER β , LHR und FSHR ist bei AhR-defizienten Mäusen und bei TCDD-Exposition durch geringere Rezeptor-Expression negativ beeinflusst [85,154,155]. Weiterhin wurden physiologische Effekte des AhR in der Tuba uterina, dem Uterus, der Vagina und der Mamma gezeigt [148].

1.4.2 Bekannte Einflüsse der PPARs

Beschrieben als Regulatoren der Energiehomöostase, vor allem in der Leber und der quergestreiften Muskulatur, sind die Erkenntnisse über eine physiologische Rolle der PPARs in ovariellen Prozessen erst seit kurzem Gegenstand aktueller wissenschaftlicher Untersuchungen: Eine der ersten Verbindungen der PPARs mit weiblicher reproduktiver Gesundheit wurde erkannt, als synthetische PPAR γ -Agonisten der Glitazon-Familie, die im Rahmen von Typ-2-Diabetes mellitus eingesetzt werden, auch zu Verbesserung sekundärer, Insulinresistenz-vermittelter Effekte wie dem Polyzystischen Ovarsyndrom führten [156]. Dies ist einer der häufigsten weiblichen Endokrinopathien, die mit Hyperandrogenismus, der damit einhergehender Virilisierung, sowie polyzystischen Ovarien und Oligo- bzw. Anovulation verbunden ist. Häufig sind die Frauen übergewichtig und insulinresistent [157]. Aus phylogenetischer Sicht ist die Verbindung von Ernährungszustand und Reproduktion sinnvoll. So konnten viele Energiesensoren wie Glukose, Insulin und Leptin mit jeder Ebene der HPG in Verbindung gebracht werden [158].

Die Deletion von PPAR α , der vorrangig in Thekazellen exprimiert wird, führte zu keinen negativen Auswirkungen in der Fertilität [159,160]. PPAR γ hingegen wird um ein Vielfaches stärker in Granulosazellen exprimiert. Er kann zu allen Zeitpunkten der Follikulogenese nachgewiesen werden, nimmt aber stetig in späteren Reifungsstadien zu (Abbildung 2) [92,161]. Auch die Proliferation der Granulosazellen wird durch Behandlung mit Glitazonen beeinflusst [162]. Die Elimination von PPAR γ ist schon *in utero* letal [163]. Verschiedene gewebsspezifische Knockouts liegen vor, deren Focus jedoch auf den metabolischen Eigenschaften von PPAR γ liegt [164].

1.5 Zielstellung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in der immortalisierten humanen Granulosazelllinie KGN, einem etablierten *in vitro* Modell, die Auswirkungen von TCDD und DEHP auf die Hormonbiosynthese untersucht. Der besondere Schwerpunkt lag dabei auf der Aufklärung der Interaktionen der Signalwege des AhR und der PPARs. Grundlage der vorliegenden Arbeit ist die Dissertation von Frau Dr. Katja Horling [51] mit dem Nachweis, dass der AhR in KGN-Zellen exprimiert wird und funktionell konstitutiv aktiv ist. Die vorgelegte Arbeit hat folgende Ziele:

- (A) die Charakterisierung der Umwandlung von industriell produzierten DEHP in dessen Hauptmetaboliten Monoethylhexylphthalat (MEHP)
- (B) der molekulare Nachweis der PPARs sowie einer aktiven Signalkaskade im verwendeten Zellkulturmodell
- (C) die Untersuchung der Interaktion des AhR- und des PPAR-Signalweges durch gleichzeitige Aktivierung und selektive Inhibierung der verschiedenen Signalwege
- (D) die funktionelle Charakterisierung der Aktivierung beider Rezeptoren bezüglich wichtiger Granulosazellmarker.

2 Material und Methoden

Die folgenden Arbeiten wurden im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchgeführt.

2.1 Zelllinie KGN

Die bei dieser Studie benutzte KGN-Zelllinie entstammt einem Granulosazelltumor einer 63jährigen Japanerin. Die Etablierung erfolgte 1994 aus einem Rezidiv [49].

2.2 Kultivierung der Zellen

Die Zellen wurden in DMEM/F-12-Medium kultiviert. Dieses wurde mit 10% fetalem Kälberserum (FKS), 2mM L-Glutamin als zusätzliche Stickstoffquelle und 50U/ml Penicillin sowie 50µg/ml Streptomycin als Antibiotikum supplementiert. Die Kultivierung erfolgte in T75 Flaschen bei 37°C unter 5% CO₂ [51]. Bei einer Konfluenz von ca. 80% wurden die Zellen passagiert. Dazu wurde das Medium abgenommen, die Zellen mit vorgewärmten PBS gewaschen und anschließend bei 37°C mit Zelldissoziationslösung (CDS) inkubiert. Nach 3 min wurde die Reaktion durch Mediumzugabe gestoppt und die Zellsuspension 1:3 in vorgewärmte Flaschen überführt. Das Ablösen wurde unter dem Phasenkontrast-Mikroskop kontrolliert und durch seitliches Beklopfen der Kulturflasche unterstützt. Für Versuche wurden die Zellen mithilfe einer Neubauer-Zählkammer gezählt und anschließend angepasst an die Fläche der Kulturflasche ausgesät.

2.2.1 Kryokonservierung der Zellen

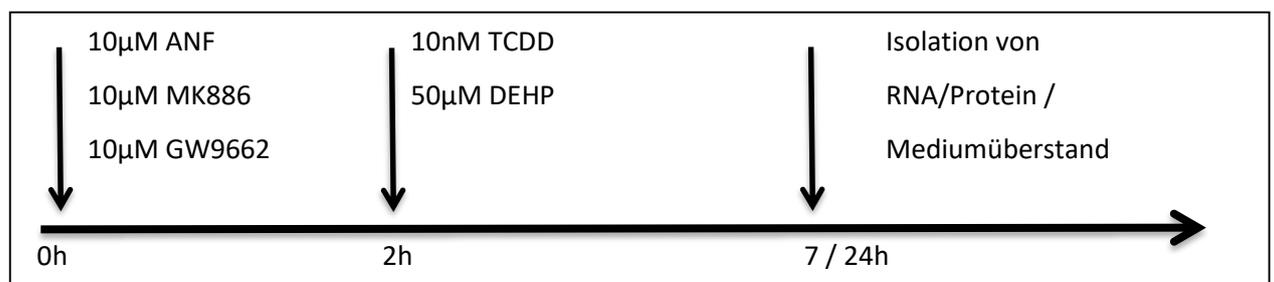
Zur Lagerung der Zellen sind diese in einem speziellen Medium eingefroren worden. Dazu wurden die Zellen aus konfluente T75-Flaschen wie oben beschrieben abgelöst. Die Zellen wurden anschließend in einem Flacon für 5 min bei 1000 U/min zentrifugiert und der Mediumüberstand verworfen. Das Pellet wurde mit einem Einfriermedium, bestehend aus 60% DMEM, 30% FKS und 10% Dimethylsulfoxid (DMSO), bei 4°C gelöst und in ein Kryoröhrchen überführt. Über Nacht wurden diese in einem mit Isopropanol gefüllten Einfriergerät bei -80°C gelagert und am nächsten Tag in flüssigen Stickstoff gelagert.

Zum Auftauen wurden diese Kryoröhrchen schnell im Wasserbad angetaut und sofort in 5ml vorgewärmtes Medium überführt. Nach Zentrifugation wurde der Mediumüberstand verworfen und das Pellet in normal Medium resuspendiert. Nach Überführung in T75-Flaschen sind diese wie geschildert weiter kultiviert worden.

2.2.2 Exposition mit Agonisten/Antagonisten

Von folgenden Chemikalien wurden Stammlösungen hergestellt: Agonisten: TCDD (10 μ M), DEHP und MEHP (10mM), Bezafibrat (100mM), Rosiglitazon (1mM); Antagonisten (je 1mM): α -Naphthoflavin (AhR), MK886 (PPAR α) und GW 9662 (PPAR γ). Aufgrund der äußerst lipophilen Eigenschaften insbesondere von TCDD und DEHP wurde für alle Stoffe DMSO als Lösungsmittel verwendet. Die weiteren Verdünnungen zur Zielkonzentration erfolgten in Kulturmedium. Dabei wurde darauf geachtet, dass DMSO nicht mehr als 0,1% des Medium ausmachte.

Die Versuche wurden unter subkonfluenten Bedingungen in T25-Kulturflaschen oder 6-well Platten durchgeführt. Zur Kontrolle dienten Zellen, die unter gleichen Bedingungen kultiviert wurden. Um immer wieder beobachtete unspezifische Effekte des Lösungsmittels auszuschließen, wurde den Kontrollen DMSO in gleicher Konzentration zugesetzt, sodass nur Effekte unter gleichen Lösungsmittelmengen verglichen wurden. Für die Studien wurde folgendes Expositionsschema gewählt:



Im ersten Schritt wurde nur je ein Antagonist mit TCDD, DEHP oder einem Mix aus beiden appliziert. Im zweiten Schritt erfolgte eine Doppel- bzw. Dreifachantagonisierung.

Abbildung 7: Expositionsschema zur Inhibierung oder Aktivierung der Transkriptionsfaktoren

ziert. Im zweiten Schritt erfolgte eine Doppel- bzw. Dreifachantagonisierung.

2.2.2.1 FSH-Stimulation

Für Studien unter FSH-Stimulation wurde rekombinantes FSH in einer Konzentration von 2 μ g/ml in PBS gelöst und dem Kulturmedium 1:100 beigefügt. Ebenso wurde 10 μ M Androstendion als androgene Vorstufe zugesetzt, um einen Effekt auf die Estradiolbildung zu untersuchen. Nach 24 Stunden wurde der Versuch gestoppt, der Mediumüberstand abgenommen und bei -20°C gelagert sowie mRNA und Protein aus den Zellen isoliert. Die Zellen wurden nach folgender Stimulationstabelle behandelt:

Tabelle 3: Schema der Versuchsbedingungen unter FSH-Stimulation

10 μ M Androstendion	+	+	+	+	+
20ng/ml FSH	-	+	+	+	+
10nM TCDD	-	-	+	-	+
50 μ M DEHP	-	-	-	+	+

2.2.2.2 Vergleichende Stimulation mit Bezafibrat und Rosiglitazon

Um eine Aktivierung der PPARs in den KGN-Zellen dokumentieren zu können, wurden in einem weiteren Versuch die Zellen mit den pharmakologisch genutzten Agonisten Bezafibrat und Rosiglitazon für 24h stimuliert. Nach Versuchsende wurden die mRNA und Proteinlysate aus den Zellen isoliert. Folgender Stimulationsplan wurde gewählt:

Tabelle 4: Schema der Versuchsbedingungen unter Exposition mit Bezafibrat oder Rosiglitazon

10nM TCDD	-	+	-	-	+	+
50µM MEHP	-	-	+	-	+	-
500nM Rosiglitazon	-	-	-	+	-	+

10nM TCDD	-	+	-	-	+	+
50µM MEHP	-	-	+	-	+	-
25µM Bezafibrat	-	-	-	+	-	+

2.3 Genexpressionanalyse

2.3.1 RNA-Isolation

Zur Analyse oben genannter Versuche wurde die RNA mittels des Qiagen Allprep-Kits entsprechend Herstellerangaben isoliert. Zum Entfernen von Medium- oder Serumresten wurde zweimal mit PBS (4°C) gewaschen. Anschließend erfolgte die Zelllyse mit 600µl (für T75-Flaschen) RLT-Buffer. Das Lysat wurde mehrfach durch eine 22G-Kanüle gezogen und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -80°C gelagert. Zuerst wurde das Lysat über eine DNA-bindende Silica-Säule geschichtet, zentrifugiert und das Eluat für die weitere Isolation von RNA und Protein genutzt. Die RNA wurde mit 400µl absolutem Ethanol gefällt. Anschließend wurde die RNA über eine weitere Silica-Säule gebunden und das Eluat zur Proteinaufreinigung genutzt. Nach einem Waschschriff mit RW1-Puffer wurden eventuell vorhandene DNA-Reste mit je 10µl DNase1 und 70µl RDD-Puffer für 15 min bei Raumtemperatur entfernt. Nach zweimaligem Waschen mit RPE Puffer wurde die RNA mit 50µl DEPC-bzw. RNAase freiem Wasser eluiert.

2.3.2 RNA-Quantifizierung

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch am NanoVue. Dabei wurde die Absorption bei 230, 260, 280 und 320 nm bestimmt. Einer Absorptionseinheit bei 260nm entspricht 40µg ssRNA/ml. Dabei lässt sich die Konzentration der RNA durch $c_{\text{RNA}} [\mu\text{g/ml}] = A_{260} \times 40$ bestimmen. Das Absorptionsverhältnis A_{260}/A_{280} zeigt die Reinheit der RNA an und sollte zwischen 1,9 und 2,1 liegen. Dazu wurden 1µl RNA für die Messung, die in Doppelwertbestimmung erfolgte, verwendet.

2.3.1 Agarosegel-Elektrophorese

Aufgrund ihrer negativen Ladung sind Nukleinsäuregemische durch Gel-Elektrophorese trennbar, wobei die Geschwindigkeit im elektrischen Feld abhängig von der Länge der Nukleinsäure und ihrer Sekundärstruktur ist. Entsprechend der Größe der zu erwartenden Nukleinsäurefragmente wurden 1,5-2,2 %ige Gele hergestellt. Dazu wurde die Agarose mit 1x TAE-Puffer suspendiert, kurz aufgekocht und zum Abkühlen auf Eis gestellt. Nachdem eine handwarme Temperatur erreicht war, erfolgte die Zugabe von 0,5µl Ethidiumbromid pro 50ml Gel. Anschließend wurde die Agarose in eine Gelkammer mit Kamm ausgegossen. 3µL des PCR-Produkts wurde mit einem 10x-Loading-Puffer, der Glycerin zur Dichtesteigerung und Bromphenolblau zur optischen Kontrolle der Laufweite enthält, gemischt und nach der Verfestigung der Agarose in die entsprechenden Geltaschen gegeben. Zusätzlich wurde ein Längenstandard zur Bestimmung der Fragmentlänge mitgeführt. Die Auftrennung erfolgte bei 80mV für 20-40 min. Anschließend wurde das Gel in einem Geldokumentationssystem fotografiert.

2.3.2 Reverse Transkription (cDNA-Synthese)

Um die RNA in eine chemisch stabile Form zu konvertieren wurde cDNA (copyDNA) synthetisiert. Die reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase mit Exoribonuklease-Aktivität, die einen einzelsträngigen DNA-Strang synthetisiert, der der RNA komplementär ist.

Für die Herstellung von cDNA wurde auf Eis zum Volumen eines µg RNA 1µl Random-Primer gegeben und mit DEPC-Wasser auf 12,5µl aufgefüllt. Um etwaige Sekundärstrukturen der RNA aufzulösen und damit das Binden der Primer überall sicherzustellen, wurde dieser Ansatz für 5min bei 65°C in einem Thermoblock erhitzt und anschließend auf Eis abgekühlt. Anschließend wurde nach folgendem Protokoll vorgegangen:

Reaktionsansatz pro Probe		Reaktionsverlauf	
5x Puffer (enthält DTT)	4µl	10min	25°C
10mM dNTPs	2µl	60min	42°C
RNase-Inhibitor	0,5µl	10min	70°C

Nach Ablauf der reversen Transkription wurde die cDNA mit 70µl auf eine Endkonzentration von 0,001µg cDNA/µl verdünnt. Zur Kontrolle der Qualität der reversen Transkription erfolgte eine Kontroll-PCR für das ribosomale Protein 18S.

2.3.3 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)

Zur Quantifizierung der Kopienzahl genspezifischer Transkripte wurde das Verfahren der qRT-PCR gewählt. Dieses basiert darauf, dass der verwendete Fluoreszenzfarbstoff *SYBR Green™* in doppelsträngige DNA interkaliert. Der Reaktionsverlauf kann im Wesentlichen in drei Abschnitte unterteilt werden. Im ersten Teil der Reaktion sind so wenige DNA-Moleküle vorhanden, dass die Amplifikation erst langsam startet. In der dritten Phase dagegen kommt durch zunehmend störende Einflüsse (Verbrauch der dNTPs und Primer sowie abnehmende Aktivität der Taq-Polymerase) die Reaktion zum Erliegen. Nur in der dazwischen liegenden Phase mit einem ausgewogenen Verhältnis von Substrat und Enzymen kommt es zu einer exponentiellen Vervielfältigung der cDNA. Der Übergang in diesen exponentiellen Reaktionsverlauf und dem damit exponentiell ansteigenden Fluoreszenzsignal wird mit dem Ct-Wert (*Cycle threshold*) angegeben. Grund für die Verwendung dieses interkalierenden Farbstoffes und nicht etwa die Verwendung sequenzspezifischer, fluoreszenzmarkierter DNA-Sonden liegt in seiner universellen Einsetzbarkeit. Der Nachweis der spezifischen Amplifikation bzw. der Interkalierung des SYBR-Greens erfolgte durch Anfügen einer Schmelzkurve im Anschluss an die PCR. Dabei wird die unterschiedliche Hydrolysierungsenergie ausgenutzt, die abhängig von der Länge der DNA-Fragmente ist. Das Aufschmelzen der Doppelstränge geht mit einem Abfall des Fluoreszenzsignals einher. Bei einer spezifisch stattgefundenen qRT-PCR-Reaktion ergibt sich also nur ein einziger Signalpeak, während bei unspezifischen Produkten zusätzliche Schmelzkurven erkennbar wären. Weiterhin erfolgte eine Kontrolle der qRT-PCR mittels Agarosegel-Elektrophorese.

Zur Quantifizierung der Transkriptmenge wurde eine genspezifische Standardkurve mitgeführt.

qRT-PCR-Reaktionsansatz		qRT-PCR-Reaktionsverlauf		
<i>SYGB-Green™</i> Mastermix	10µl	5min	95°C	Denaturieren
fwd-Primer	0,5µl	40 Zyklen		
rev-Primer	0,5µl	10sec	95°C	Denaturieren
cDNA	3-4µl	15sec	60°C	Annlealing
		20sec	72°C	Elongation, <i>plate read</i>
		1 sec alle	+0,8°C	Schmelzkurvenanalyse

Dafür wurde das zu amplifizierende DNA-Fragment in ein Plasmid kloniert, daraus eine Verdünnungsreihe von 10^3 bis 10^6 Kopien erstellt. Anhand der Ct-Werte der zu untersuchenden Probe kann entsprechend der Ct-Werte der genspezifischen Standardkurve die Transkriptmenge der Probe berechnet werden. Zur Normalisierung der Genexpression wurde als Referenzgen 18S verwendet.

2.3.4 Primerdesign und –sequenzen

Die Primersequenzen wurden unter Zuhilfenahme der Primer3Plus Software [165] erstellt. Die dazu nötigen Gen- und cDNA-Sequenzen wurden vorher in der *ensemble genome browse* Datenbank [166] ermittelt. Ein Teil der Primer konnten schon aus Vorarbeiten genutzt werden. Die Primer mussten folgenden Kriterien entsprechen: A) Ampliconlänge zwischen 130-240bp B) eine G/C-clamp am 3'-Ende, C) nicht mehr als 4 Nukleotidwiederholungen, D) keine zu große Bindungsaffinität am 3' Ende der Primerpaare, E) Exon-Exon-übergreifend, um die Amplifikation von Verunreinigungen durch genomische DNA und damit falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Abschließend wurde die Produktspezifität mit Hilfe der BLAST-Software (Basic Local Alignment Search Tool) [167] überprüft und nur solche Primer, die F) ausschließlich das gewünschte Produkt ergaben, ausgewählt.

Tabelle 5: Übersicht über die verwendeten Primer und die Produktlänge

Name	fwd	rev	Produktlänge[bp]
17bHSD	GGAGAATGGTGGCTTGTTTG	TGGATACTCTGAGGCTTGCTG	174
18S	CCTGTATTGTTATTTTTCGTCACTACCT	AGAAACGGCTACCACATCCAA	105
ACOX	GCTCAAAAATCCCTCCTTTCC	TCAGTTTCCTGGCACTCCTC	193
AhR	AGAGTTGGACCGTTTGGCTA	AGTTATCCTGGCCTCCGTTT	167
Cyp19	ATGTGGACGTGTTGACCCTTCT	AGGAGAGCTTGCCATGCATCAA	133
Cyp1a1	CCTCTTTGGAGCTGGGTTTG	GCTGTGGGGGATGGTGAA	229
Cyp1b1	TTGGACAAGGATGGCCTCATC	TTTCGCAGGCTCATTTGGGT	171
Cyp7a1	TGTCTATGGCTTATTCTTGG	TGTTTCCTTTGATTGCTC	140
ER α	CAATGACTATGCTTCAGGCTAC	CCACCTTTCATCATTCCCAC	198
ER β	AGCCACCATGAATATCCAGCCA	TGGCCACAACACATTTGGGCTT	129
FABP3	GGCCAGCATGACCAAGCCTACA	AGCTCCCCGCACAAGTGTGGTC	228
FSHR	TCCTTGCTCAATGTCCTG	ACCTTGAGGGAGGCAGAAT	196
LHR	TTTGCCATCTCAGCTGCCTT	AGTTCAGCCCGACGTTTACA	188
NRF1	AATGACCCAGGCCAGCTTCG	AAAGGTCTTCCCGCCCATGC	239
PEPCK1	CTTTTTCGGTGTCGCTCCT	CACAAGGTTCCCATCCTC	206
PPAR α	TCATCACGGACACGCTTTCAC	AAGCCCTTGAGCCTTTCAC	175
PPAR γ	AGATCATCTACACCATGCTGGCCT	TGTCCTCGATGGGCTTCACATTCA	255

2.3.5 Klonierung der PCR-Fragmente für die Standardreihe

2.3.5.1 Isolation und Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach erfolgreicher Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments wurde das PCR-Produkt aus dem Agarosegel ausgeschnitten und entweder direkt weiterverarbeitet oder bei -20°C gelagert. Die Extraktion des PCR-Produkts aus dem Gelstück erfolgte mit dem Qiagen Gel-Extraction Kit entsprechend Herstellerangaben. Dabei wird der Agarosequader mit dem 3fachen Volumen (1mg entspr. 1 μ l) an QC-Puffer bei 50°C über 10min gelöst. Um die Ausbeute besonders kleiner

PCR-Produkte mit einer Länge unter 500bp zu erhöhen, wurde das einfache Volumen an Isopropanol zu dem Ansatz gegeben. Die folgenden zwei Waschschriffe dienten der Entfernung von a) restlicher Agarose (mit QG-Puffer) und b) residueller Nukleotide, Enzyme und Salze (mit PE-Puffer). Um anschließende salz- oder ethanolempfindliche Prozeduren nicht zu stören, wurde bei 13.000 rpm trocken zentrifugiert und mit 30µl Reinst-Wasser eluiert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.3.5.2 Ligation

Für die Ligation des PCR-Produkts in einen Vektor wurde der pGEM-T-Vektor 1 genutzt. Dazu wurde folgender Reaktionsansatz entweder ü/N bei 4°C oder 4h bei Raumtemperatur inkubiert. Der ligierte Vektor wurde entweder direkt zur Transformation genutzt oder bei -20°C gelagert.

Ligationsansatz	
pGEM-T-Vektor (50ng)	1µl
gereinigtes PCR-Produkt	4µl
T4-Ligase	1µl
2x rapid Ligationspuffer	5µl

2.3.5.3 Transformation in E.coli X1 blue

Das Ligationsprodukt wurde durch einen Hitzeschock in den Mangelmutante-Stamm E.coli X1 blue transformiert. Dazu wurden ein bei -80°C gelagertes Aliquot auf Eis aufgetaut und anschließend das Ligationsprodukt mit den kompetenten Zellen für 30min bei 4°C inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 42°C für 45s und einer folgenden Ruhephase von 2min (4°C) wurde der Transformationsansatz mit 1ml LB-Medium gemischt und für 1h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert.

2.3.5.4 Selektion positiver Klone auf Selektionsmedium

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurde dem LB-Medium vor dem Autoklavieren 1,5g/100ml Agar zugefügt. Des weiteren wurde dem durch Erwärmen verflüssigtem Medium für Selektionszwecke Ampicillin (Endkonzentration 50µg/ml), Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG, Endkonzentration 40µg/ml) und 5-Brom-4-chlor-3-indoxyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal, Endkonzentration 40µg/ml) zugegeben. Zum Erstarren wurde es in Petrischalen gegossen.

Das LacZ'-Gen innerhalb der *multiple cloning site* des pGEM*-T-Vectors kodiert für das N-terminale α-Fragment der β-Galactosidase, das gemeinsam mit dem C-terminalen ω-Fragment eine β-Galactosidase-Aktivität besitzt. Wird das LacZ'-Gen durch die Insertion eines DNA-Fragments zerstört, bleiben nach der Inkubation auf einer IPTG- (als Induktor der β-Galaktosidase) und X-

Gal-haltigen LB-Agarplatte die Insert-tragenden Klone weiß, während sich die Klone ohne Insertion durch das entstehende 5-Bromo-4-Chloro-3-Indol blau färben. Vom Transformationsansatz wurden auf zwei Platten 200µl bzw. 800µl ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag konnte anhand der weißen und blauen Färbung der gewachsenen Kolonien ein Insert-tragender Klon (weiß) ausgewählt werden.

2.3.5.5 Insertkontrolle mithilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen besitzen spezifische Schnittstellen. Dies ermöglicht eine Kontrolle, ob die Plasmide das korrekte Insert tragen. Dazu wurde folgender Restriktionsansatz für 30min bei 21°C (Temperaturoptimum für Enzym Apa 1) und nachfolgend 30min bei 37°C (Optimum für Apa 2) im Thermoblock inkubiert. Der komplette Restriktionsansatz wurde anschließend auf ein 1,8%iges Agarosegel zur Beurteilung der entstandenen Fragmente aufgetragen.

Restriktionsansatz	
Enzym 1 Apa 1 (Fermentas)	0,5µl 5U
Enzym 2 Apa 2 (Fermentas)	0,5µl 5U
Puffer NEB 4	1µl
Plasmid	5µl
PCR-H ₂ O	ad 10µl

2.3.6 Sequenzierung

Vorbereitend für die Sequenzierung durch den Sequenzierservice des Zentrums für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät Halle wurde das Plasmid mit dem enthaltenen PCR-Fragment in einer Sequenzreaktion nach Sanger markiert. Hierfür wurde das BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler mit folgendem Standardprogramm:

Ansatz für Sequenzierung	
BigDye Terminator v1.1	2µl
BigDye Terminator 5x Buffer	1,5µl
fwd bzw. rev Primer	0,5µl
Plasmid	1,5µl
PCR-H ₂ O	3,5µl

Reaktionsverlauf		
	95°C	Denaturieren
20-40 Zyklen		
10 sec	95°C	Denaturieren
20 sec	55°C	Annealing
4min	60°C	Elongation
Ende	4°C	Abkühlen

Nach Ablauf der Reaktion erfolgte eine Aufreinigung, indem 1µl 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 40µl 96%iger Ethanol zum Ansatz pipettiert und anschließend bei 13000rpm (4°C) zentrifugiert

wurde. Darauf folgten zwei Waschschr tte mit 70%igem Ethanol (13000rpm, 4°C) und die Vakuum-Trocknung des Pellets. Durch den Sequenzierservice des ZMG wurde unter Nutzung des ABI 3100 Genetic Analyzer C (Applied Biosystem) die automatische Auftrennung durchgeführt. Die ermittelten Sequenzen wurden mit Hilfe der BLASTn-Software [167] auf das Vorhandensein des Inserts hin analysiert.

2.4 Proteinexpression

Zur Bestimmung der Proteinexpression wurden mittels einer SDS-Gelelektrophorese die Proteine elektrophoretisch aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, die Proteine mit Antikörpern detektiert und quantifiziert.

2.4.1 Isolation von Gesamtprotein

Die Isolation des Gesamtproteins erfolgte mit Hilfe des AllPrep-Kit von Qiagen entsprechend Herstellerangaben. Das Eluat der RNA-Säule wurde zur weiteren Proteinisolation genutzt. Diesem wurde das einfache Volumen des APP-Puffers zugegeben, der die Proteine aus ihrer Hydrathülle verdrängt, so dass sie bei gutem Durchmischen präzipitieren. Nach einem 30-minütigen Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm wurde das Pellet mit 70% Ethanol gewaschen und anschließend bei Raumtemperatur getrocknet, bis sämtliche Alkoholreste verdunstet waren. Je nach Größe des Pellet wurde es mit 30-70µl Reswell-Puffer resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung erfolgte eine Lagerung bei -80°C.

2.4.2 Konzentrationsbestimmung

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde die Methode nach Bradford [168] verwendet. Hier bindet Coomassie-Brillant-Blau an kationische und unpolare Aminosäure-Seitenketten. Die Extinktion der sich bildenden farbigen Komplexe kann so bestimmt werden.

2.4.3 Western Blot

Durch Western Blot werden Proteine zuerst entsprechend ihrer Größe aufgetrennt und anschließend auf eine Membran übertragen (*blotting*), um sie dort mit spezifischen Antikörpern zu detektieren.

Probenvorbereitung

Zum Auftrennen der Proteine gemäß ihres Molekulargewichts müssen alle Ladungen entlang der Aminosäureseitenketten maskiert werden. Dafür wurden 20µg der Probe mit 2x Natriumdodecyl-(SDS) haltigem Laemmli-Puffer inkubiert. SDS ist ein stark negativ geladenes amphiphi-

les Molekül, das sich mit seinem hydrophoben Anteil zwischen die unpolaren Aminosäuren interkaliert und mit der polaren Seite die Sulfatgruppe präsentiert. Durch den negativen Ladungsüberschuß verlieren sämtliche Proteine ihre Tertiärstruktur. Um mögliche Disulfidbrücken innerhalb der Tertiärstruktur aufzubrechen, wurde dieser Ansatz für 5min bei 90°C aufgeköcht.

Elektrophoretische Auftrennung mittels Gelelektrophorese

Die so linearisierten Proteine können nun durch ihre polyanionische Ladung in der Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Dazu wurde ein diskontinuierliches SDS-Polyacrylamid-Gel benutzt, das aus einem 3% Sammelgel und einem darauf folgenden 10% Trenngel besteht.

Zusammensetzung der SDS-Gele		
	3% Sammelgel	10% Trenngel
Reinst-H ₂ O	3,25ml	4,18ml
Solution 2	---	2,5ml
Solution 3	1,25ml	---
Acrylamid (30%)	0,5ml	3,32ml

Um einen gleichmäßigen Gellauf sicherzustellen wurde in einer NOVEX-Gelkammer für die Sammelphase mit einer Spannung von 100mV bzw. in der Trennphase mit 125mV gearbeitet. Zusätzlich wurde ein Längenstandard (PageRuler™) zur Bestimmung der Proteinelänge mitgeführt.

Blotting auf die Nitrocellulosemembran

Um die aufgetrennten Proteine auf eine Matrix, die die Detektion mittels Antikörpern erlaubt, zu bringen, wurden die aufgetrennten Proteine im *Wet-Blot*-Verfahren auf eine Nitrocellulosemembran übertragen. 15min vor Ende der Gelelektrophorese wurde diese Membran in 1x Transferpuffer angefeuchtet. Im Anschluss wurde das Trenngel nach Entfernen des Sammelgels auf der Membran zwischen Filterpapieren und Schwämmen blasenfrei aufgelegt. Der Transfer erfolgte in einer XCell II™ Kammer für 2h bei 130mA.

Überprüfen der Blots mittels Ponceau- und Coomassiefärbung

Um die Auftrennung der Proteine zu kontrollieren wurde die Membran für 5-10 min mit Ponceau-S Lösung bei Raumtemperatur gefärbt. Zur Überprüfung der Transfereffizienz wurde das Gel für 25min in einer Coomassie Blue Lösung gefärbt und anschließend über Nacht mit einer Destaining-Lösung entfärbt, wodurch sich unspezifisch Proteine färben.

Tabelle 6: Übersicht über die verwendeten Antikörper (AS: Aminosäure)

Primärantikörper	Epitop	Hersteller	Größe [kDa]	Verdünnung
Mouse-Anti-AhR	AS 12-31, Maus	Dianova	95	1:1000

Rabbit-Anti-Cyp1a1	k.A.d.H	Abcam	54	1:1000
Rabbit-Anti-Cyp1b1	C-Terminus, Mensch	Abcam	70	1:500
Rabbit-Anti-FSHR	N-Terminus	Sigma-Aldrich	42	1:500
Rabbit-Anti-LHR	N-Terminus	Sigma-Aldrich	68	1:1000
Rabbit-Anti-ER α	C-Terminus, Mensch	Santa Cruze	66	1:200
Rabbit-Anti-ER β	AS 55-70, Ratte	Santa Cruze	55	1:1000
Mouse-Anti-Cyp19	AS 376-390, Mensch	Acris	55	1:500
Mouse-Anti-A Tubu- lin	N-Terminus	Acris	55	1:1000
Mouse-Anti-B Aktin	k.A.d.H	Dianova	50	1:40000
Rabbit-Anti-PPAR α	AS 22-36, Ratte	Cayman	57	1:1000
Rabbit-Anti-PPAR γ	um His494, Maus	Cell Signaling	53	1:1000
Sekundärantikörper				
Goat-Anti-Rabbit	-	DAKO	-	1:150000
Goat-Anti-Mouse	-	Dianova	-	1:20000

Nach Fotodokumentation wurde die Intensität der Banden mittels Quantity One v4.4.0 quantifiziert und der relative Anteil zu β -Aktin bestimmt.

2.5 Bestimmung der Steriodhormonsynthese

Zur Bestimmung der Steroidhormonproduktion der KGN-Zellen wurden kommerziell erhältliche ELISAs für die Bestimmung von Estradiol und Estron von DRG-Instruments genutzt. Untersucht wurde der Mediumüberstand aus FSH-stimulierten Versuchsreihen, denen zusätzlich AD beige-fügt wurde. Granulosazellen sind nicht in der Lage, Estradiolvorstufen selbst zu bilden. Diese werden *in vivo* durch Thekazellen zur Verfügung gestellt. Nach Ende der Kulturzeit wurde der Mediumüberstand abgenommen und aliquotiert bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C gelagert.

2.5.1 Durchführung der ELISAs

Die Proben wurden auf Eis aufgetaut und kurz homogenisiert. Vor Gebrauch wurden alle Reagenzien auf Raumtemperatur gebracht. Für jede Messreihe wurde eine im Kit enthaltene Standardreihe mitgeführt (Estradiol: 0-2000pg/ml; Estron: 0-2000pg/ml). Die ELISAs wurden nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Um mit den Proben innerhalb des Bereiches der Standardreihen zu sein, wurden die Proben verdünnt eingesetzt. Zu Beginn wurden je 25 μl (Estradiol) bzw. 100 μl (Estron) der Proben bzw. Standards in die Antikörper-beschichteten Kavitäten

pipettiert. Danach wurde 200µl Estradiol- bzw. 100µl Estron-Enzymkonjugat zugegeben und gut durchmischt. Nach einer Inkubationszeit von 2 bzw. 1h erfolgte ein dreimaliger Waschschrift mit 400µl vorbereiteter Waschlösung, um ungebundenes Enzym zu entfernen. Durch Zugabe des Substrates wurde eine Farbreaktion hervorgerufen, die nach 15 min mit einer schwefelsäurehaltigen Stopplösung beendet wurde. Es erfolgte die Messung der Absorption bei 450 nm in einem Absorptionsphotometer, die Anpassung der Standardkurve mittels interner Software und die Auswertung der Konzentrationen mittels Microsoft Excel (Microsoft Office 2003).

2.6 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse wurden Microsoft Excel und Graphpad Prism 5.0. Für mehrere Gruppen wurde ein Ein-Weg-ANOVA mit einem Post-hoc Test nach Dunnett gegen die jeweilige DMSO bzw. FSH-DMSO-Kontrolle angewendet. Das Signifikanzniveau der p-Werte wurde wie folgt definiert: $p < 0,05$ (* oder #), $p < 0,01$ (** oder ##), $p < 0,001$ (***) oder ###). * bezieht sich auf DMSO-Kontrollen, # auf FSH-stimulierte DMSO Kontrollen. In den Diagrammen wurden die jeweiligen Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) dargestellt. N gibt die Anzahl der unabhängigen Versuchswiederholungen an; n die Anzahl biologischer Replikate innerhalb eines Versuchs. Die Betrachtung und Diskussion der Versuchsergebnisse erfolgte anhand der Mittelwerte.

2.7 Chemikalien, Verbrauchsmittel, Geräte und Software

Zellkultur- und Verbrauchsmaterialien

bakteriologische Kulturschalen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
CDS	Invitrogen, Karlsruhe
Cell Proliferation ELISA,	BrdU Roche Applied Science, Mannheim
Corex-Röhrchen 30ml	Thermo Fisher Scientific, Waltham (US)
Deckgläschen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DMEM/ F12	Invitrogen, Karlsruhe
Einwegspritze Omnifix B.	Braun Melsungen AG, Melsungen
FCS, Kälberserum, fötal	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
PBS	Biochrom AG, Berlin
Penicillin	PAA, Pasching
Streptomycin	PAA, Pasching
PP Röhrchen	Cryo 2ml Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
QIAGEN-tip-100	Qiagen GmbH, Hilden
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
TCDD	Amchro, Bad Soden
DEHP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MEHP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
α -Naphthoflavon	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
MK886	Caymann Chemicals, Ann Arbor, MI, USA
GW9662	Caymann Chemicals, Ann Arbor, MI, USA

Reaktionsgefäße

0,2 ml Full-Height Tube Strips	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
0,5ml; 1,5ml; 2ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15ml; 50ml Röhrchen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
T25/ T75 Zellkulturflaschen	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
24Well/ 96Well Zellkulturplatten	TPP AG, Trasadingen (CH)

Substanzen für die Molekularbiologie

Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ampicillin	Serva GmbH, Heidelberg
BigDye® Terminator v 1.1 Cycle Sequencing Kit;	Applied Biosystem, Darmstadt
Bromphenolblau	Fluka Chemie GmbH, Buchs (CH)
Chloroform	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
DEPC	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
DNase1	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
dNTP Mix (100mM)	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
DTT	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
E.coli XI 1 blue	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethidiumbromid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
GFX <i>Micro</i> Plasmid Prep Kit	GE Healthcare, München
Glycerol	Serva GmbH, Heidelberg
Guanidiniumthiocyanat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hefe-Extrakt	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
IPTG	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kanamycin	Serva GmbH, Heidelberg
MassRuler™ DNA Ladder, Low Range DNA ladder, 1Kb Gene Ruler;	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Methanol (100%)	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumacetat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumcitrat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydrogencarbonat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumlaurosylsarcosinat	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Oligonukleotide	metabion international AG, Martinsried
10x PCR-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Pepton	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
pGEM®-T Vector System 1	Promega GmbH, Mannheim
Phenol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Qiagen® Plasmid Kit	Qiagen GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen GmbH, Hilden
random Primer	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Restriktionsenzyme	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Restriktionspuffer	New England Biolabs, Ipswich (US)
RNase Inhibitor	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
5xRT-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe
Seakem Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Sucrose	Serva Electrophoresis GmbH
SuperScript™ II Reverse Transkriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe
SYBR® Green 1	Applied Biosystem, Darmstadt
iQ SYBR Green Supermix	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Taq DNA Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

X-Gal

Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

Substanzen für die Proteinbiochemie

Acrylamid 30%	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
APS 10%	Merck KGaA, Darmstadt
Bradford	Reagenz Bio-Rad Laboratories GmbH, München
BSA Fluka	Chemie GmbH, Buchs (CH)
Coomassie-Brilliantblau	Biomol GmbH, Hamburg
ECL WesternBlotting System	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
ELISA: 17 β -Estradiol, Estron	DRG Instruments GmbH, Marburg
Essigsäure	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Hoechst 33258	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Hybond ECL Nitrozellulose Membrane	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Igepal Ca-630	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Immobilon Western Detection Reagenz	Millipore, Billerica (USA)
β -Mercaptoethanol	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
MOPS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Moviol® 4-88	Calbiochem, Darmstadt
Natrium-Deoxycholat	Serva GmbH, Heidelberg, Deutschland
PageRule Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Phosphatase Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Ponseau-S	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
ProteJet™ Cytoplasmatic and Nuclear Protein Extraction Kit;	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Saponine	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
SDS	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris-Base	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Tris/HCl	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Magermilchpulver	Sucofin TSI GmbH&CoKG, Zeven
Tween	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Wasserstoffperoxid	Merck KGaA, Darmstadt
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

Verwendete Geräte

ABI-PRISM 5700 Sequence Detection System;	Applied Biosystems, Darmstadt
Agarosegel-Dokumentationsgerät	LTF Labortechnik, Wasserburg
Axiocam Digitalkamera	Carl Zeiss GmbH, Jena
ChemiDoc-IT Imaging System	Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge (UK)
Elektrische Präzisionswaage	Sartorius AG, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop Axioplan 2	Carl Zeiss GmbH, Jena
Gel-Dokumentationssystem	LTF, Wasserburg
Gelkammer	Biometra, Göttingen
Kühlzentrifugen	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Mikrotiterplatten-Lesegerät	Promega, Fitchburg, USA
Minishaker MS1	Schütt Labortechnik, Göttingen
Multikanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Neubauer Zählkammer	Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
NOVEX-Gelkammer	Invitrogen, Karlsruhe
Opticon II System	MJ Research, München
Photometer Ultrospec 3300 pro	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg

Schüttelinkubator	Infors AG, Bottingen (CH)
Schüttler 3006 Schütt	Labortechnik, Göttingen
Sirius Luminometer	Berthold Detection Systems, Pforzheim
Stereomikroskop	Carl Zeiss GmbH, Jena
Sterilbank Hera Safe	Heraeus Holding GmbH, Hanau
Thermocycler, TRIO-Thermoblock	Biometra, Göttingen
Ultra-Turrax T25 IKA	Werke GmbH & Co. KG, Staufen
XCell IITM Blot Modul	Invitrogen, Karlsruhe
Zellkultur-Inkubatoren	Heraeus 6000 Heraeus Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge	Biofuge

Verwendete Software

Quantity One v.4.40	Bio-Rad, Hercules, CA, USA
BLAST Software	NCBI, Bethesda (US)
Microsoft Office 2003	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Lab Works Image Aquisition and Analysis	Ultra-Violet Products Ltd, Cambridge (UK)
Primer3Plus	Whitehead Ins. for Biomedical Research, Cambridge (UK)
StepOne Plus	ABI, Cambride, UK

Verwendete Puffer

6xloading buffer	0,0625% Bromphenolblau 40% (w/v) Sucrose in <i>Aqua dest.</i>
Agarosegel	1-2,2g Agarose 100ml 1xTAE Puffer 1µl Ethidiumbromid 10mg/ml
Blockierungslösung	2,5g Magermilchmilchpulver 50ml 0,1% TBST
Coomassie-Färbelösung	2,5g Coomassie-Brilliantblau 450ml Methanol 100ml Technische Essigsäure; 450ml <i>Aqua dest.</i>
Coomassie-Entfärber	300ml Methanol 100ml Technische Essigsäure; 600ml <i>Aqua dest.</i>
DEPC-H ₂ O	1ml Diethylpyrocarbonat ; 1l <i>Aqua dest.</i> Inkubation für 4h bei 37°C, anschließend zur Deaktivierung autoklaviert
GTC-Lösung	4M GTC 100mM β-Mercaptoethanol 25mM Natriumcitrat 17mM Natriumlaurosylsarcosinat β-Mercaptoethanol wurde unmittelbar vor Gebrauch zu gegeben.
Lämmli (10x)	144,25 g Glycin 2,5M (pH 8,3) 30,25g Tris/HCL 250mM (pH 6,8) 10g SDS 10%; <i>Aqua dest.</i> ad 1l
LB-Medium (Luria-Bertani) 10g Pepton	5g Hefeextrakt

	10g	Natrumchlorid; <i>Aqua dest.</i> ad 1l pH 6,4-7,5
Moviol	6g Glycerol (Serva GmbH)	
	2,4g	Moviol® 4-88 Reagent
	16ml	Tris/ HCL 0,2M pH 8,5; 6ml <i>Aqua dest.</i>
PBS 1x (pH 7,4)	9,55g PBS ; <i>Aqua dest.</i> ad 1l	
Ponceau S-Lösung	0,26mM	Ponceau S
	18mM	Trichloressigsäure
	12mM	Sulfosalicylsäure
RIPA-Puffer	20ml 5x PBS	
	1ml	Igepal CA-630
	100µl	10x SDS
	0,5g	Natrium-Deoxycholat; <i>Aqua dest.</i> ad 100ml
SDS-Ladepuffer 2x	1ml Tris/HCl 1M pH6,8	
	2ml	DTT 1M
	4ml	SDS 10%
	2g	Bromphenolblau
	2ml	Glycerol
Solution 2 (Western Blot)	36,3g Tris/Base	
	8,0ml	SDS 10%; <i>Aqua dest.</i> ad 200ml pH 8,8
Solution 3 (Western Blot)	6,0g Tris/Base	
	4,0ml	SDS 10% ; <i>Aqua dest.</i> ad 200ml pH 6,8
<i>stripping</i> -Puffer	20ml SDS 10%	
	12,5ml	Tris/HCl pH6,8
	700µl	β-Mercaptoethanol; 66,8ml <i>Aqua dest.</i>
10xTAE Puffer pH8,0	242g Tris-Base	
	57,1ml Eisessig	
	100ml	EDTA (0,5M; pH 8,0); <i>Aqua dest.</i> ad 5l
TBST	1l TBS	
	1ml	Tween 20
1x Transferpuffer	80ml 12,5fach Puffer	
	200ml	Methanol
	2ml	SDS 10%; <i>Aqua dest.</i> ad 1l

3 Ergebnisse

Zu Beginn dieser Studie wurde die KGN-Zelllinie in Hinblick auf ihre Fähigkeit der Metabolisierung von DEHP in MEHP untersucht. Anschließend erfolgten die Charakterisierung der Rezeptorsignalwege und deren Interaktionen.

3.1 MEHP-Anreicherung durch KGN-Zellen

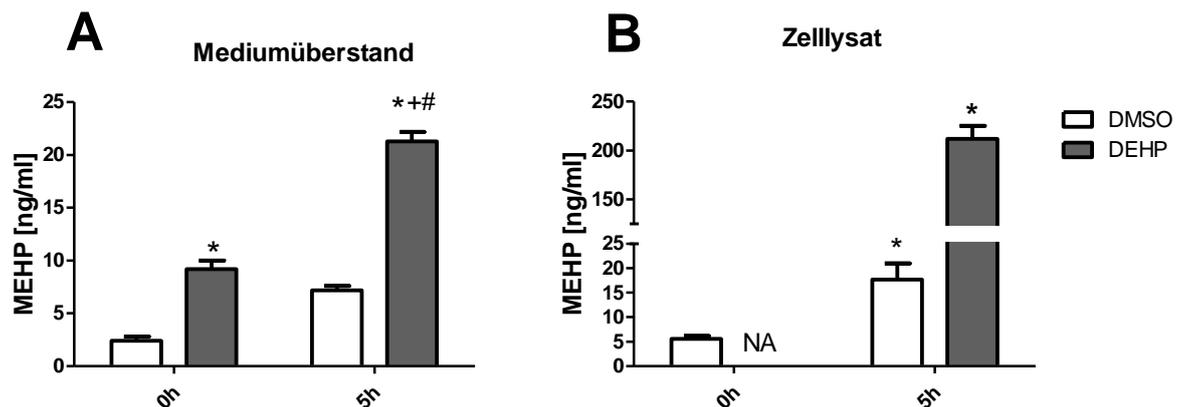


Abbildung 8: Konzentration von MEHP im Zellkulturmediumüberstand und im Zelllysat von KGN-Zellen nach Exposition mit 50µM DEHP über 5 Stunden. Dargestellt ist die absolute Konzentration nach Quantifizierung mittels Tandem-Massenspektrometrie. (N=3, *relativ zu 0h ohne DEHP, + zu 0h mit DEHP und # relativ zu 5h ohne DEHP)

Um im Rahmen dieser Studie zu untersuchen, ob KGN-Zellen *in vitro* zur Bildung aktiver Metabolite fähig sind, wurden die Konzentration des Hauptmetaboliten MEHP nach einer 5-stündigen Inkubation mit 50µM DEHP mittels Massenspektrometrie von unserem Kooperationspartner Dr. Koch am Institut für Prävention und Arbeitsmedizin der Deutschen Gesetzlichen Unfallversicherung der Ruhr-Universität Bochum bestimmt. Um auch den Beweis anzuführen, dass MEHP in KGN-Zellen akkumuliert wurde neben dem Spiegel im Mediumüberstand (Abbildung 8A) auch die Menge von MEHP in lysierten Zellen bestimmt (Abbildung 8B). Dabei zeigte sich, dass im Mediumüberstand zum Zeitpunkt 0 Stunden bereits MEHP im DEHP-haltigen Kulturmedium in signifikant höherer Konzentration als im Kulturmedium ohne DEHP nachweisbar war. Auch nach 5 Stunden war die MEHP-Konzentration im DEHP-haltigen Mediumüberstand signifikant höher (Abbildung 8A). Im Zelllysat zeigte sich eine signifikante und starke Konzentrationserhöhung von MEHP auf 220ng/ml nach 5 Stunden Inkubation mit DEHP-haltigem Kulturmedium und übersteigt damit die Konzentration im Mediumüberstand um das 10fache. Auch ohne Zugabe von DEHP ergab sich ein signifikanter Anstieg der MEHP-Konzentration auf 20ng/ml (Abbildung 8B). Gleiches gilt für die Betrachtung der relativen Daten, die auf den Proteingehalt standardisiert wurden (ohne Abbildung).

Der in der Literatur gezeigte Konzentrationsbereich für DEHP mit Induktionseffekt liegt im $\mu\text{mol/l}$ -Bereich. Verschiedene Voruntersuchungen im Rahmen dieser Studie ergaben im Bereich von 5 bis $500\mu\text{M}$ keine Änderung der Zellvitalität oder Anzeichen von Toxizität, sodass $50\mu\text{M}$ als Expositionskonzentration von DEHP festgelegt wurde.

3.2 Untersuchungen der intrinsischen Rezeptorfunktion des AhR, PPAR α und PPAR γ

3.2.1 Einfluss von pharmakologischen Agonisten auf spezifische Zielgene

Um eine Aktivität der Rezeptoren nachzuweisen, war die Expression der am besten charakterisierten AhR-Zielgene, der Cytochrom P450 Monooxygenasen Cyp1a1 und Cyp1b1 bereits in Vorstudien untersucht worden. Im Gegensatz dazu lagen zum Zeitpunkt der Arbeit keine Daten zur PPAR-Expression sowie deren Aktivität in KGN-Zellen vor. Die Charakterisierung der PPAR-Aktivität erfolgte durch die Untersuchung der Expression folgender Zielgene: PEPCCK1 als Zielgen für des PPAR γ und ACOX für PPAR α , sowie FABP3 als gemeinsames Zielgen beider Isotypen.

3.2.1.1 Reversible Induktion von Cyp1a1 und Cyp1b1

Aus Vorarbeiten im gleichen Zellmodell [51] waren Konzentration und zeitlicher Verlauf der TCDD-abhängigen AhR- Induktion bekannt. In Abbildung 9 ist die mRNA-Expression von Cyp1a1 und Cyp1b1 nach 5-stündiger Inkubation mit TCDD, DEHP und einem Mix aus beidem sowie mit TCDD nach Vorinkubation mit dem AhR-Antagonisten ANF gezeigt. So zeigte sich mit 10nM TCDD eine signifikante 2,5fache Steigerung der Transkriptmenge von Cyp1a1 im Vergleich mit der DMSO-Kontrolle. Eine Exposition mit $50\mu\text{M}$ DEHP führte zu keiner Induktion der Cyp1a1-Transkriptmenge. Die Koinkubation mit TCDD und DEHP zeigte eine ähnliche Steigerung der Transkripte wie die alleinige TCDD-Exposition (Abbildung 9A). Die Inkubation mit TCDD oder DEHP zeigte bei Cyp1b1 eine signifikant erhöhte Expression (Abbildung 9B).

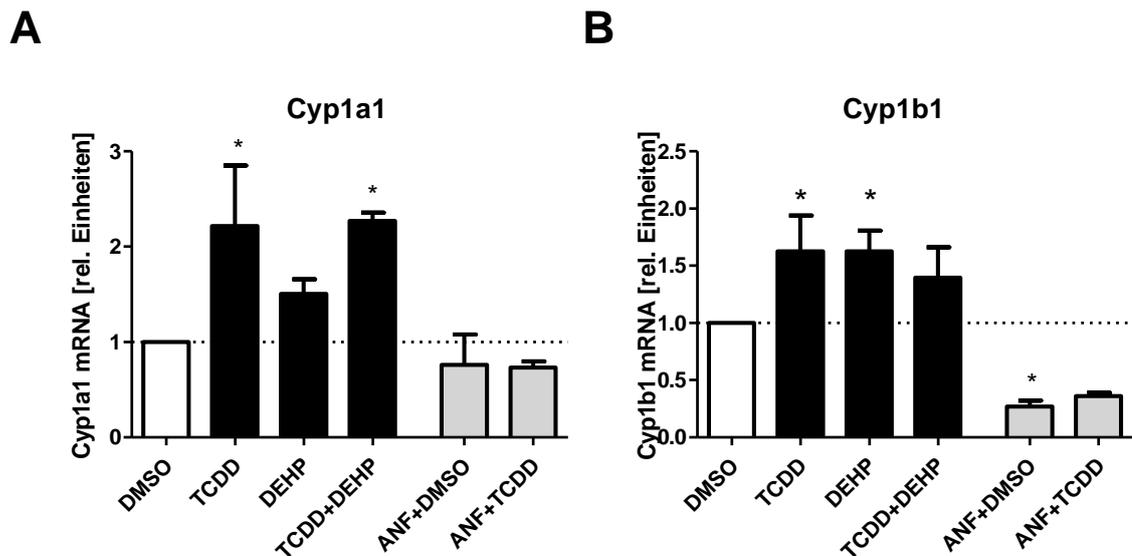


Abbildung 9: Expression der Cyp1a1 (A) bzw. Cyp1b1 (B) auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem nach 5h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=3)

Ein nächster Schritt war der Nachweis der Abhängigkeit dieser Induktion von der AhR-Aktivität. Die alleinige Anwesenheit von ANF schon führt zu einer Hemmung der konstitutiven Expression von Cyp1b1 auf 26% (Abbildung 9B). Bei Cyp1a1 zeigte sich dieser Effekt nicht bzw. war nicht statistisch signifikant nachweisbar (Abbildung 9A). ANF verhindert die Induktion von Cyp1a1 und Cyp1b1 durch TCDD, die durch ANF-Vorbehandlung ausbleibt und sich nicht von der ANF+DMSO Kontrolle unterscheidet.

3.2.2 Beeinflussung der PPAR-Isotypen-Expression

Zuerst wurde der Nachweis durch RT-PCR erbracht, dass beide PPARs exprimiert werden. Anschließend sollte gezeigt werden, ob diese auch funktionell aktiviert werden können. Dies wurde einerseits durch die Veränderungen der Rezeptorexpression gezeigt (Abbildung 10). Weiterhin wurde die nachgeschaltete Signalkaskade durch die Aktivierbarkeit typischer Zielgene untersucht (Abbildung 11).

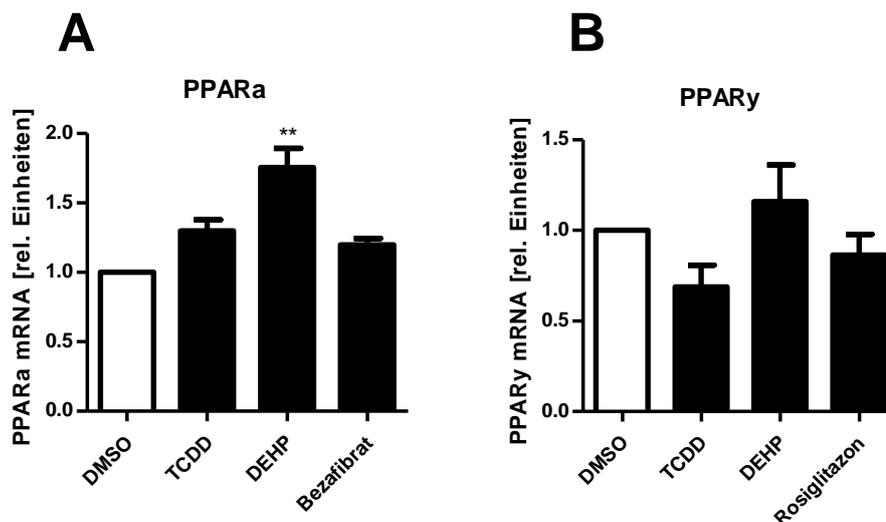


Abbildung 10: Expression von PPAR α (A) bzw. PPAR γ (B) auf mRNA-Ebene nach 5h mit 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder beidem sowie mit 25 μ M Bezafibrat bzw. 500nM Rosiglitazon nach 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=3)

Wie in Abbildung 10A ersichtlich ergab sich nach einer 5-stündigen Inkubation der KGN-Zellen mit DEHP eine signifikante Expressionserhöhung von PPAR α um 75%. Die TCDD-Exposition und die Bezafibrat-Exposition veränderten die Expression nicht. Weder die Exposition mit TCDD und/oder DEHP noch die Stimulation mit Rosiglitazon führten bei PPAR γ zu einer geänderten Transkriptmenge (Abbildung 10B).

3.2.2.1 Zielgeninduktion durch klassische Agonisten

Um die Aktivität der PPARs in KGN-Zellen nachzuweisen wurde überprüft, ob die pharmakologisch genutzten Agonisten Bezafibrat bzw. Rosiglitazon zu einer Induktion von typischen Zielgenen des PPAR α bzw. PPAR γ führen. Dabei zeigte sich nach 24-stündiger Inkubation mit 50 μ M Bezafibrat eine geringe Steigerung der Expression von ACOX um 20% gegenüber der DMSO-Kontrolle (Abbildung 11A). Nach 24-stündiger Inkubation mit 500nM Rosiglitazon konnte eine signifikante 4,6-fache Steigerung der mRNA-Expression von PEPCCK1 verglichen mit der DMSO-Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 11B). Als gemeinsames Zielgen der PPARs zeigte sich für FABP3 eine signifikante Induktion der mRNA-Transkriptmenge um 40% gegenüber der DMSO-Kontrolle. Auch die selektive Aktivierung von PPAR α mit Bezafibrat erhöht die Expression um 50%, PPAR γ -Aktivierung mit Rosiglitazon führt zur höchsten und signifikanten Induktion von FABP3 um 90% (Abbildung 11C). TCDD hatte keine Effekte auf die Expression aller drei untersuchten Gene (Daten nicht gezeigt).

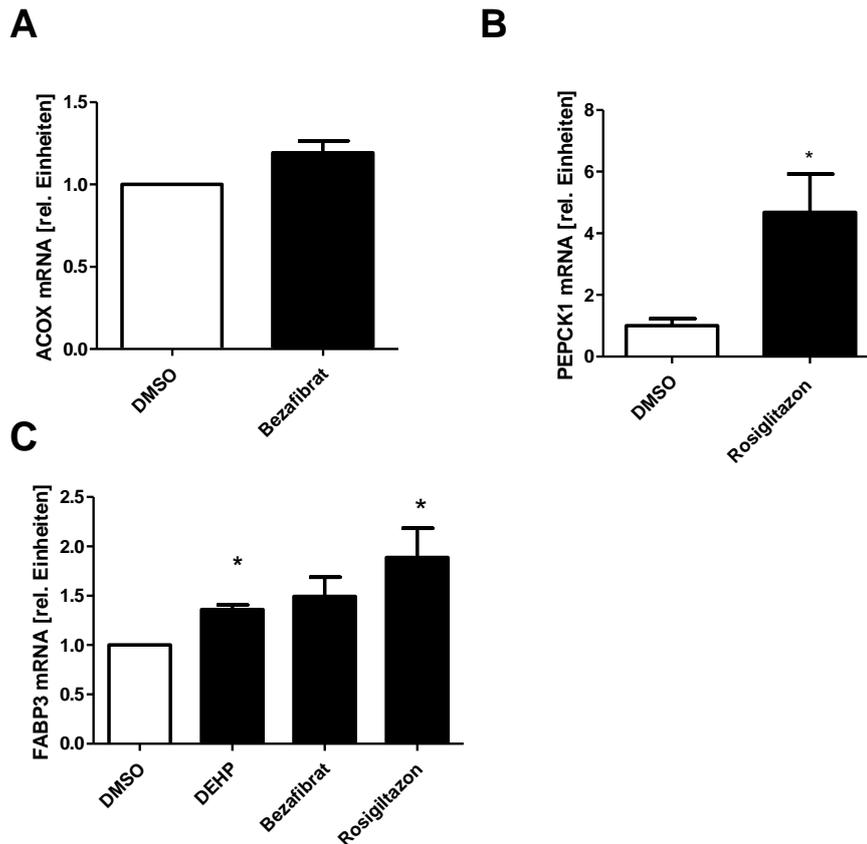


Abbildung 11: Expression der spezifischen PPAR-Zielgene ACOX (PPAR α) (A), PEPCK1 (PPAR γ) (B) und FABP3 als gemeinsames Zielgen für PPARs (C) auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 25 μ M Bezafibrat, 500nM Rosiglitazon bzw. 50 μ M DEHP nach 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=3)

3.2.3 Einfluss der AhR-Expression

Im Folgenden wurde untersucht, ob der AhR selbst sowie dessen Zielgene durch DEHP-vermittelte PPAR-Stimulation aktiviert wird. Nach 5-stündiger Inkubation mit TCDD und/oder DEHP konnte keine Expressionsänderung des AhR durch TCDD auf mRNA-Ebene festgestellt werden. Bei Exposition mit DEHP stieg die mRNA-Expression des AhR signifikant um 77% an (Abbildung 12A). Die Quantifizierung des AhR-Proteins zeigte eine um 60% geringe AhR-Expression durch TCDD, die auch in der Koexposition mit TCDD und DEHP zu beobachten war (Abbildung 12B).

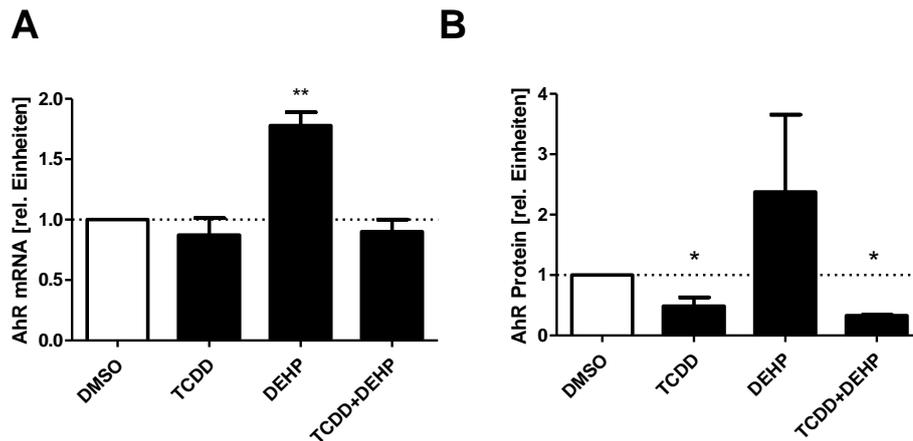


Abbildung 12: Expression des AhR nach Exposition mit 10nM TCDD oder 50µM DEHP oder beidem nach 5h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR (A) bzw. Western Blot (B). (N=3)

Um diese Effekte spezifisch den unterschiedlichen Rezeptoren zuordnen zu können, wurden in einem anschließenden Experiment untersucht, welche selektive Antagonisierung die AhR-Induktion aufheben kann (Abbildung 13). Dabei wurden AhR, PPAR α und PPAR γ jeweils einzeln antagonisiert.

Dabei ist die DEHP-abhängige Steigerung der AhR-Transkriptmenge nicht mehr bei PPAR γ - Antagonisierung zu beobachten, wenn man die Transkriptmenge betrachtet (Abbildung 13A), jedoch zeigt sich noch eine erhöhte Proteinmenge (Abbildung 13B), die aber durch die Streuung nicht statistisch signifikant wird. Unter Hemmung des AhR oder PPAR α ist die Expression des AhR unter DEHP weiterhin erhöht, wenn man nur das Transkriptlevel betrachtet. Auf Proteinebene bleibt die Induktion des AhR durch DEHP nur unter PPAR α -Blockade bestehen. Die erhöhte Transkriptmenge des AhR unter AhR-Blockade wird aber nicht in vermehrtes Protein übersetzt.

Zusammenfassend kann die Induktion des AhR durch DEHP nur durch PPAR α -Hemmung nicht umgekehrt werden und so scheint PPAR α nicht in diesen Prozess eingebunden zu sein. Sowohl der AhR selbst als auch PPAR γ führen auf unterschiedlichen Ebenen zu einer Reversibilität dieses Phänomens.

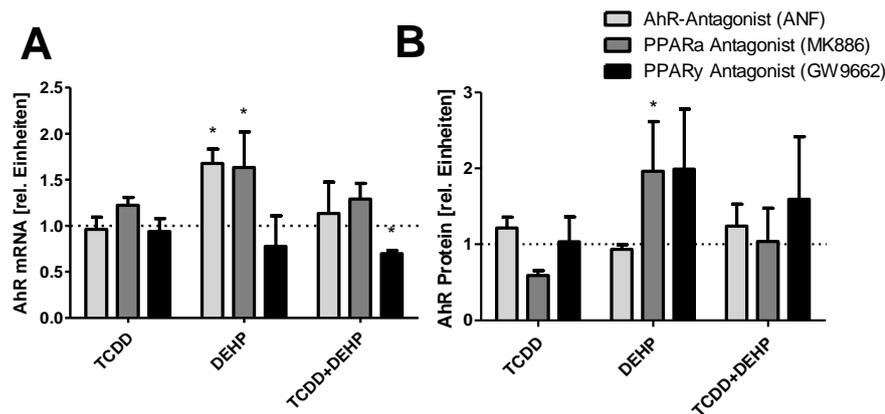


Abbildung 13: Expression des AhR nach Exposition mit 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem sowie den Antagonisten ANF, MK886 bzw. GW9662 (je 10µM) für 5h. Dargestellt ist die relative Änderung zur jeweiligen DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR (A) bzw. Western Blot (B). (N=3)

3.2.4 Zielgenaktivierung durch Signalwegausschaltung

Da sich zeigte, dass auch der AhR selbst durch DEHP reguliert wird, sollte im Folgenden untersucht werden, wie sich AhR-Zielgene unter DEHP-Exposition verhalten und welcher PPAR-Signalweg diesen Effekt vermittelt. Dazu wurden selektiv die einzelnen Rezeptoren mit Antagonisten inhibiert. Aus Gründen der Übersicht werden TCDD-vermittelte Effekte hier nicht gezeigt.

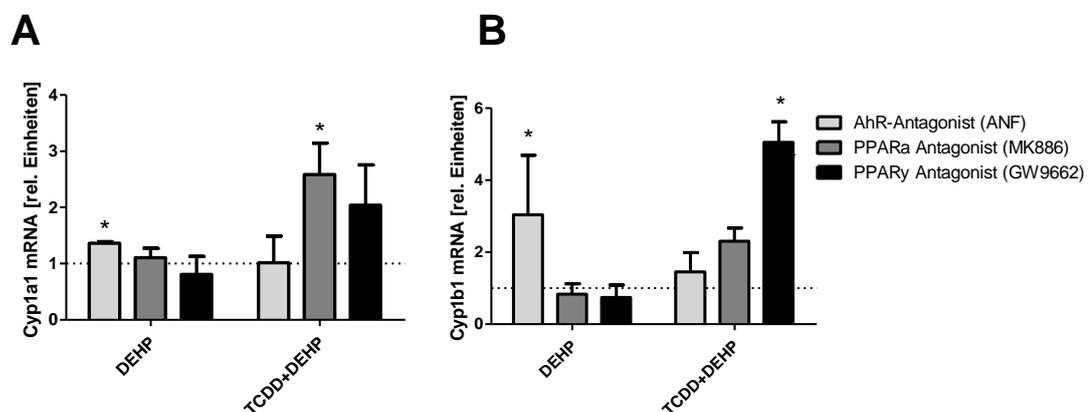


Abbildung 14: Expression von Cyp1a1 (A) und Cyp1b1 (B) auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 50µM DEHP oder zusätzlich mit 10nM TCDD sowie den Antagonisten 10µM ANF, MK886 bzw. GW9662 für 5h. Dargestellt ist die relative Änderung zur jeweiligen DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR.

Cyp1a1 war unter AhR-Antagonisierung bei DEHP-Exposition signifikant erhöht exprimiert. Nach Koexposition mit TCDD und DEHP war eine signifikante Expressionserhöhung auf das 2,58fache von Cyp1a1 unter PPARα-Antagonisierung zu beobachten (Abbildung 14A).

Für Cyp1b1 führte die Einzelexposition mit DEHP zu einer gesteigerten mRNA-Expression (siehe Abbildung 9B). Abbildung 14B zeigt nun, dass nur unter AhR-Antagonisierung diese DEHP-indu-

zierte Steigerung der Cyp1b1-Expression auf 303% bestehen bleibt, während die Antagonisierung beider PPAR-Antagonisten diese inhibiert. Bei Koexposition mit TCDD und DEHP konnte keine erhöhte Expression von Cyp1b1 unter AhR- und PPAR α -Antagonisierung festgestellt werden, während unter PPAR γ -Antagonisierung die Cyp1b1-Expression auf das fünffache erhöht war.

3.2.5 Beeinflussung des AhR-Signalweges durch selektive Aktivierung der PPAR-Isotypen

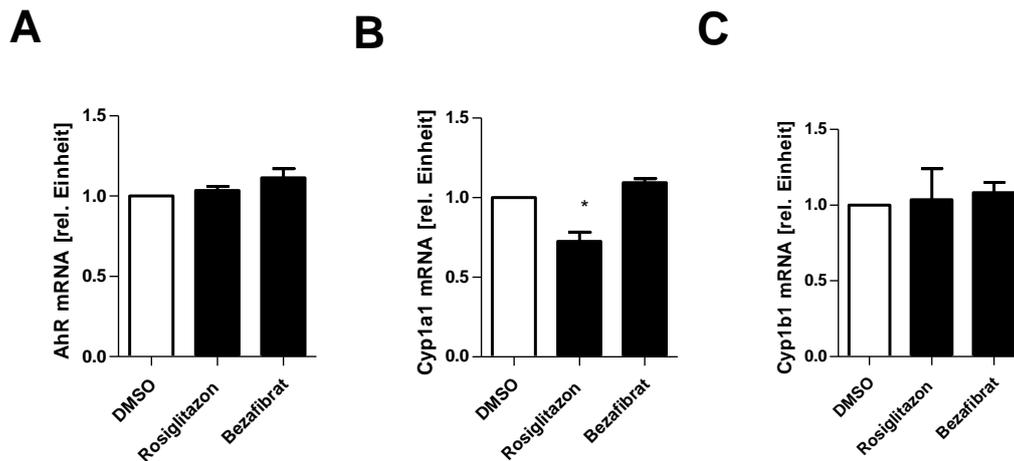


Abbildung 15: Expression von AhR (A), Cyp1a1 (B) und Cyp1b1 (C) auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 500nM Rosiglitazon oder 25 μ M Bezafibrat für 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=2, n=2)

Nach 24-stündiger Inkubation mit Bezafibrat oder Rosiglitazon konnte keine Induktion des AhR, Cyp1a1 und Cyp1b1 auf mRNA-Ebene festgestellt werden (Abbildung 15A,B,C). Jedoch zeigte sich unter Rosiglitazon eine um 30% geringere Expression von Cyp1a1 (Abbildung 15B).

In Hinblick auf die Zielstellung konnte also bisher gezeigt werden, dass DEHP und TCDD im KGN-Milieu relevante Effekte auf die vernetzte Signalgebung der PPARs und des AhR haben. Insbesondere der PPAR γ Signalweg kann untergeordnete AhR-vermittelte Effekte auslösen.

3.3 Untersuchung charakteristischer Granulosazellmarker

Endokrin aktive Chemikalien können an verschiedenen Stellen des Hormonsystems eingreifen. Einer der sensibelsten Angriffspunkte von EDCs mit systemischen Auswirkungen ist die Estradiolbiosynthese und deren präzise abgestimmte Regulation, die maßgeblich über die Gonadotropin-Rezeptorexpression gesteuert wird.

3.3.1 Einfluss auf die Expression des FSH-Rezeptors

Um zu untersuchen, ob TCDD und/oder DEHP als endokrine Disruptoren Einfluss auf die hormonelle Achse des Hypophysenvorderlappens auf das Ovar ausüben können, wurde der Rezeptorbesatz der KGN-Zellen mit FSH- und LH-Rezeptoren untersucht.

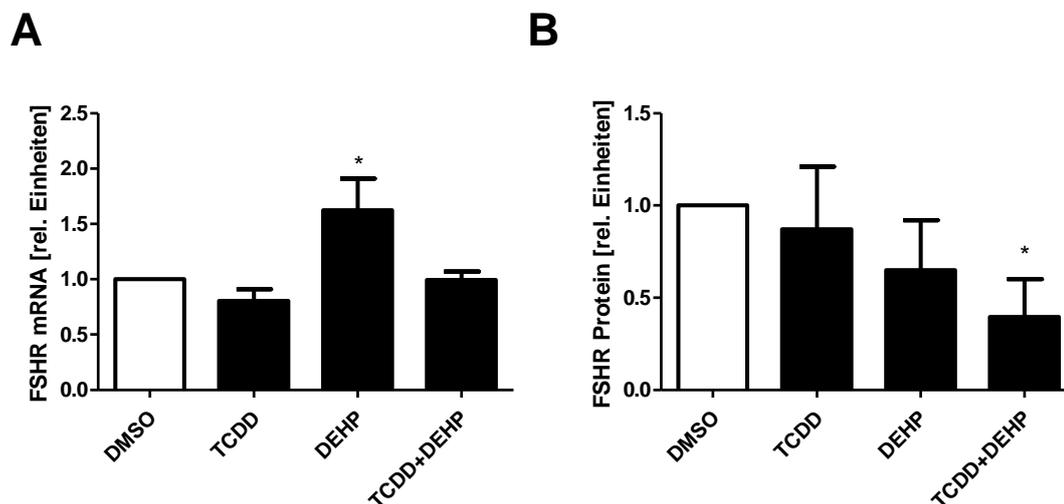


Abbildung 16: Expression des FSHR nach Exposition mit 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem für 5 h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR (A) bzw. Western Blot (B). (N=3)

Für den FSHR zeigte sich ein differentielles Bild zwischen mRNA- und Proteinexpression. Nach Exposition mit DEHP konnte eine signifikante Expressionserhöhung auf mRNA-Ebene des FSHR um 62% beobachtet werden. TCDD allein bzw. in Koexposition mit DEHP führte zu keiner Änderung der mRNA-Expression (Abbildung 16A). Auf Proteinebene war unter TCDD- bzw. DEHP-Exposition keine Änderung feststellbar, während die Koexposition zu einer signifikant verringerten Proteinmenge des FSHR um 61% führte (Abbildung 16B).

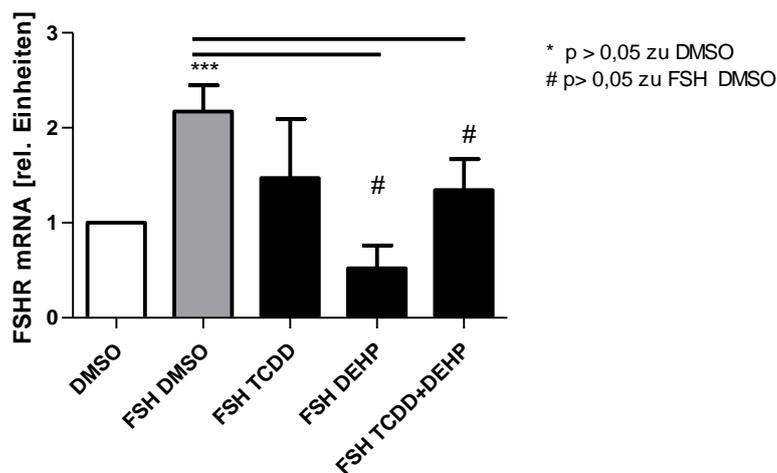


Abbildung 17: Expression des FSHR auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 20ng/ml FSH sowie 10nM TCDD, 50µM DEHP und beidem für 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=3)

Unter FSH-Stimulation zeigte sich zunächst eine Induktion des FSHR mit einer signifikanten 2,1-fachen Erhöhung im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ohne FSH. DEHP verhindert nicht nur die FSH-induzierte Expression, sondern führte darüber hinaus zu einer signifikanten Hemmung auf 50% des Kontroll-Niveaus (Abbildung 17).

3.3.2 Einfluss auf die Expression des LH-Rezeptors

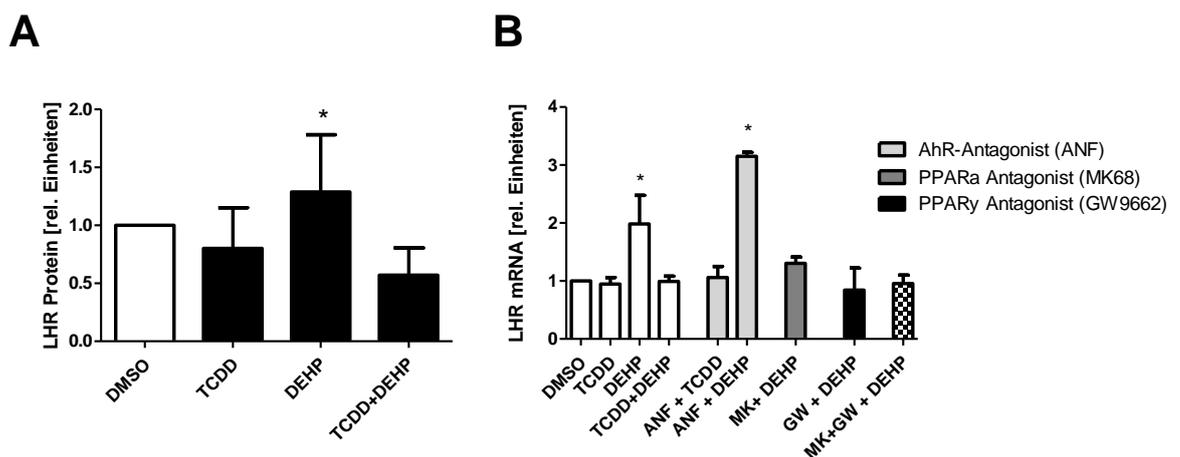


Abbildung 18: Expression des LHR nach Exposition mit 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem (A), sowie TCDD sowie den Antagonisten 10µM ANF, MK886 bzw. GW9662 für 5h. Dargestellt ist die Änderung der Expression zur jeweiligen DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels Western Blot (A) bzw. qRT-PCR (B). (N=3)

Die DEHP-Exposition führte zu einer signifikanten Expressionserhöhung von LHR: DEHP induziert den LHR auf 198% auf mRNA- (Abbildung 18B) bzw. 130% auf Proteinebene (Abbildung 18A). Bei

gleichzeitiger TCDD-Exposition war diese Induktion nicht nachweisbar. Wie Abbildung 18B weiterhin zeigt, verursachte die DEHP-Exposition unter Antagonisierung des AhR eine noch größere Induktion des LHR auf 315%, während die Antagonisierung von PPAR α oder PPAR γ den DEHP-vermittelten Effekt hemmt.

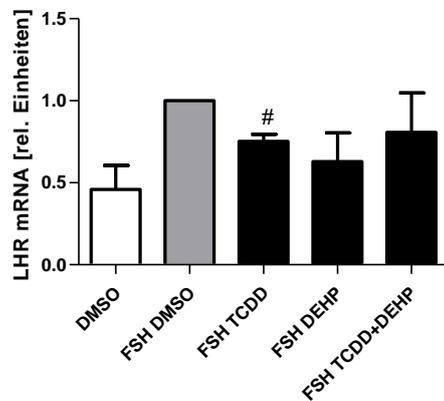


Abbildung 19: Expression des LHR auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 20ng/ml FSH und 10nM TCDD, 50 μ M DEHP und beidem für 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO Kontrolle nach Quantifizierung mittels RT-PCR. (N=3)

Unter FSH-Stimulation konnte eine Induktion des LHR festgestellt werden. Eine gleichzeitige TCDD-Exposition verringerte die Expression signifikant auf 75%, die DEHP- bzw. kombinierte TCDD-DEHP-Exposition zeigten keinen Effekt (Abbildung 19).

3.3.3 Einfluss auf die Estrogenrezeptor-Expression

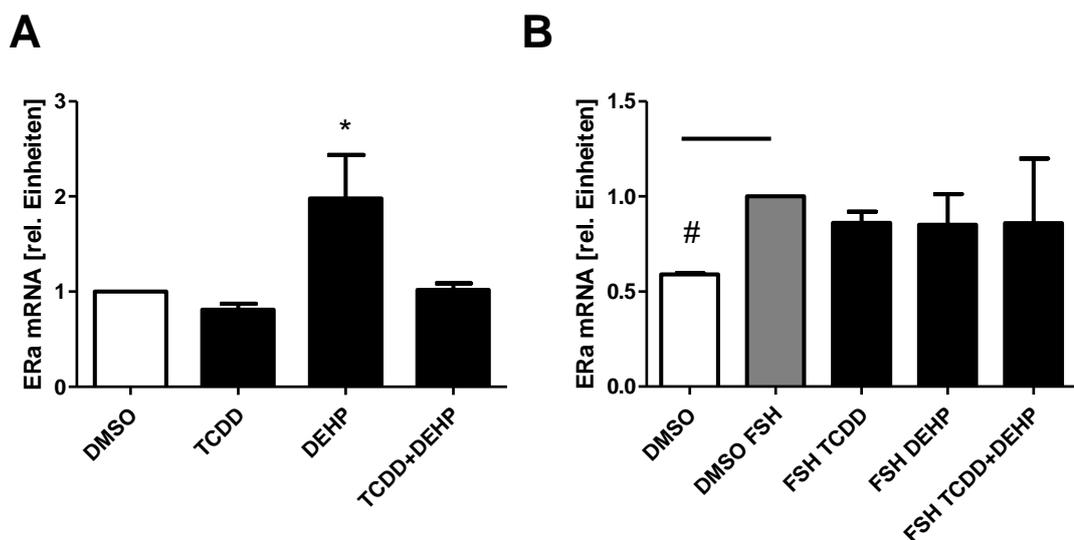


Abbildung 20: Expression des ER α auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder beidem für 5h. Dargestellt ist die relative Änderung der Expression zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR (A) bzw. Western Blot (B). (N=3)

Die DEHP-Exposition der KGN ohne FSH-Stimulation führte zu einem signifikanten Anstieg der mRNA-Transkriptmenge des ER α auf das 1,7-fache (Abbildung 20A). Unter FSH Substitution ist dieser Effekt nicht mehr zu beobachten, dagegen zeigte sich die physiologisch erwartete Zunahme der ER α -Expression durch FSH (Abbildung 20B). Für die TCDD-Exposition wie auch die Koexposition von TCDD und DEHP konnte kein Einfluss beobachtet werden. Wie schon aus Vorarbeiten [51] bekannt war, wird ER α in KGN nicht als Protein exprimiert.

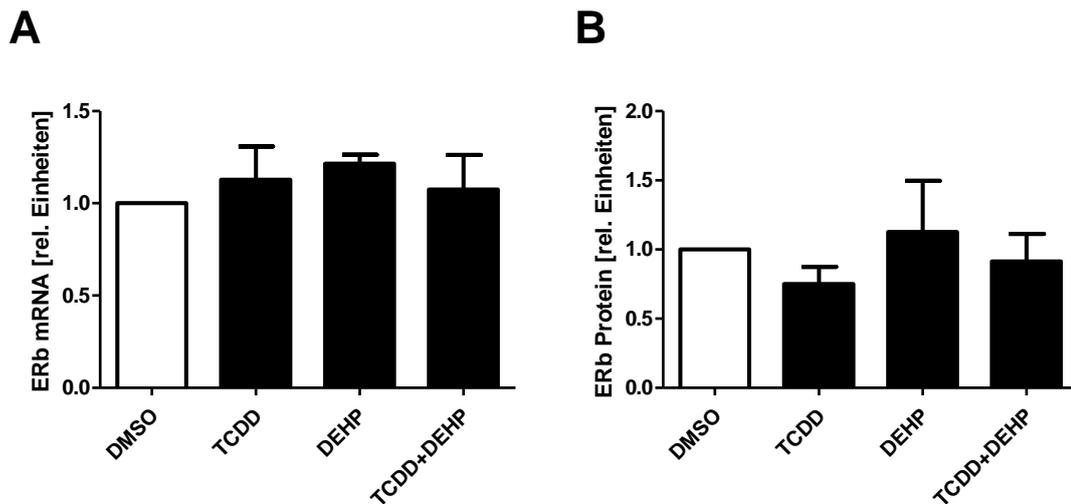


Abbildung 21: Expression des ER β auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder beidem für 5h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR (A) bzw. Western Blot (B). (N=3)

Bei der Untersuchung der ER β -Expression wurde mit TCDD und/oder DEHP keine Veränderung festgestellt (Abbildung 21).

3.4 Beeinflussung der endokrinen Funktion

3.4.1 Cyp19-Expression

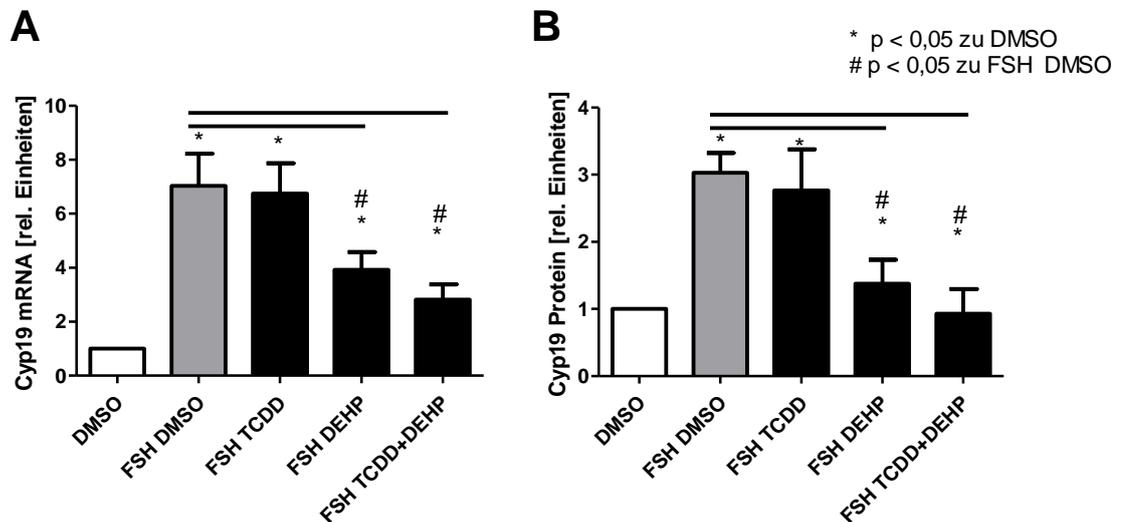


Abbildung 22: Expression von Cyp19 nach Exposition mit 20ng/ml FSH und 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem für 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR(A) bzw. Western Blot (B) (N=2, n=2)

Es zeigte sich eine Induktion von Cyp19 um das 7-fache auf mRNA- bzw. 3-fache auf Proteinebene durch die FSH-Stimulation. Die gleichzeitige TCDD-Exposition führte zu keiner Expressionsänderung von Cyp19, während DEHP allein bzw. in Kombination mit TCDD signifikant die Expression um 55% (mRNA) und 45% (Protein) allein bzw. um 40% (mRNA) und 30% (Protein) in Kombination hemmt (Abbildung 22).

3.4.1.1 Cyp19 Regulation durch PPAR-Isoformen

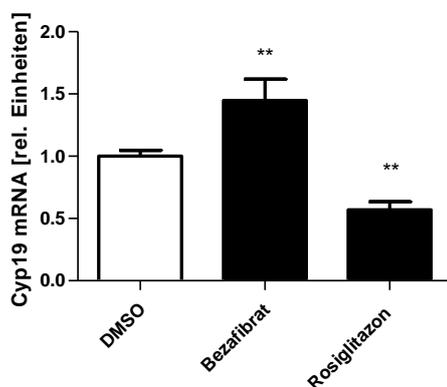


Abbildung 23: Expression von Cyp19 auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 25µM Bezafibrat bzw. 500nM Rosiglitazon für 24h. Dargestellt ist die relative Änderung zur DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=2, n=2)

Nachdem eine DEHP-vermittelte Hemmung der Expression von Cyp19 nachgewiesen werden

konnte (Abbildung 22), wurde mit selektiven Agonisten für PPAR α und PPAR γ untersucht, welche Isoform diesen Effekt verursacht. Dabei zeigte sich, dass die PPARs unterschiedlich auf die Cyp19-Expression wirken: Durch die selektive Aktivierung des PPAR α mittels Bezafibrat wurde eine um 45% gesteigerte Expression von CYP19 beobachtet, während der selektive PPAR γ -Agonist Rosiglitazon eine Hemmung der Expression um 57% bewirkte (Abbildung 23).

3.4.2 Estrogensynthese

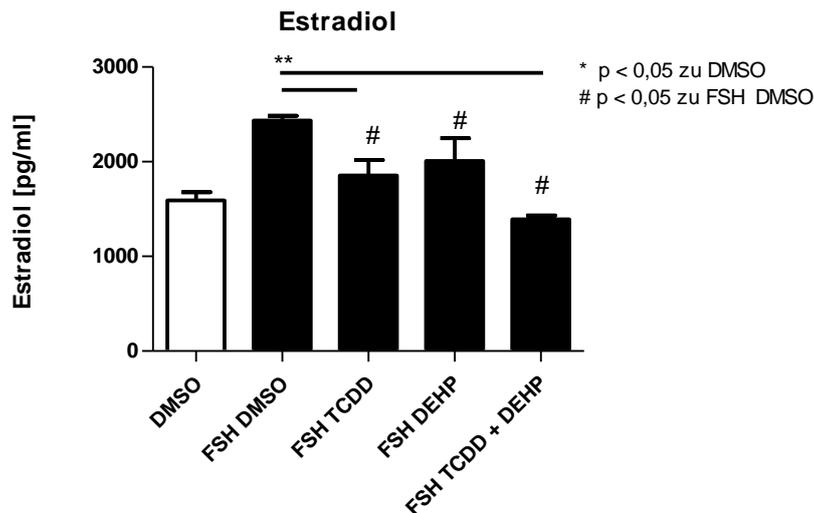


Abbildung 24: Estradiol-Bildung nach Exposition mit 20ng/ml FSH und 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder bei dem in Anwesenheit von 10 μ M Androstendion für 24h. Dargestellt ist die Estradiol-Konzentration im Mediumüberstand nach Quantifizierung mit ELISA. (N=2, n=2)

Um den Effekt von TCDD und DEHP bis zum biologisch relevanten Endpunkt der Estradiolsynthese zu verfolgen, wurde nach 24 Stunden mittels ELISA der Estradiolgehalt im Mediumüberstand FSH-stimulierter KGN-Zellen quantifiziert. Die Estradiolsynthese unter TCDD war um 24% signifikant geringer als in der DMSO-behandelten FSH-Kontrolle. Auch DEHP vermindert die Estradiolkonzentration im Mediumüberstand auf 2ng/ml. Bei der Koexposition von TCDD und DEHP war die Estradiolsynthese so stark vermindert, dass sie sogar unter das Niveau der nicht mit FSH stimulierten Kontrolle sank (Abbildung 24).

3.4.3 Estradiolmetabolisierung

3.4.3.1 Expression von Estradiol-metabolisierender 17 β Hydroxysteroid-Dehydrogenase (17bHSD)

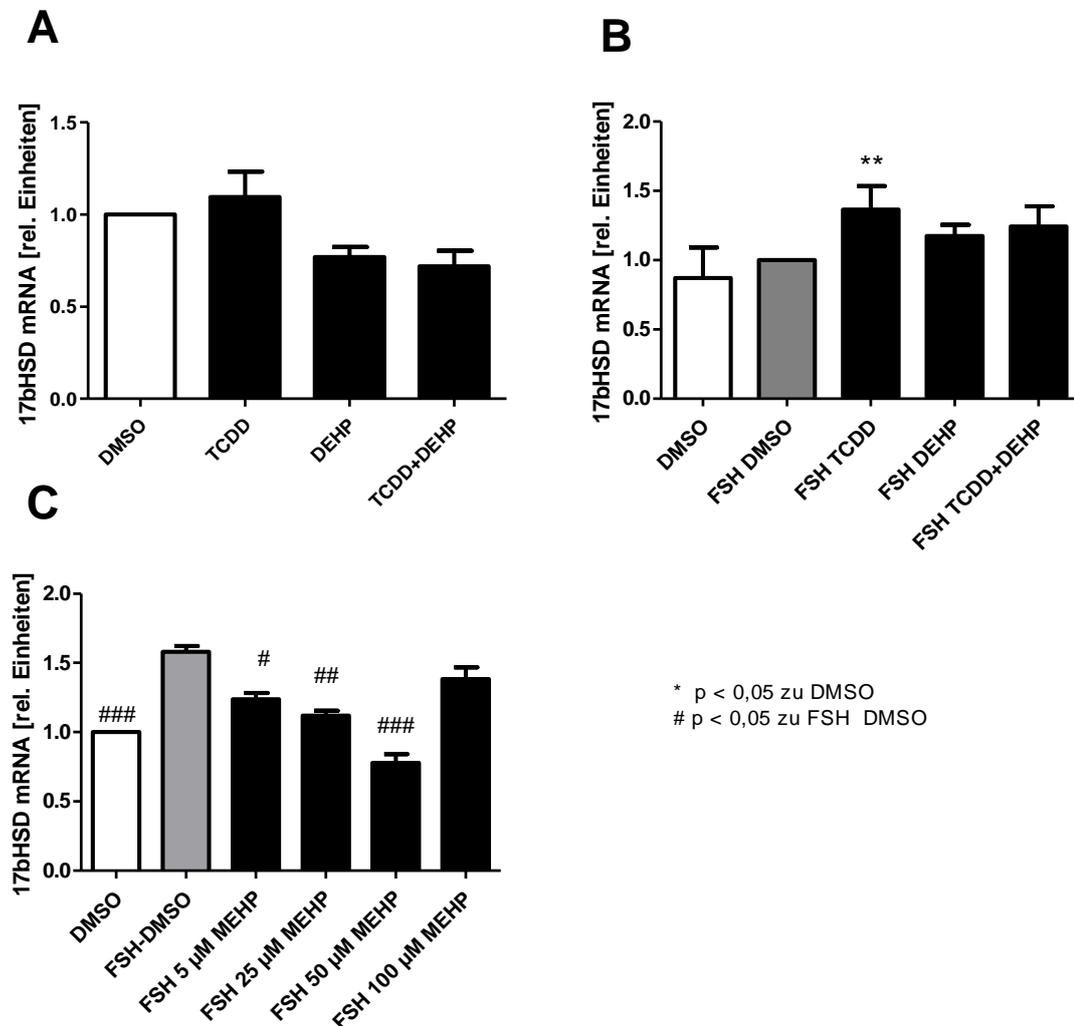


Abbildung 25: Expression der 17bHSD auf mRNA-Ebene nach Exposition mit 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder beidem für 5h. (B) 17bHSD nach Exposition mit 50ng/ml FSH und 10nM TCDD, 50 μ M DEHP oder beidem für 24h. (C) Expression nach Exposition mit 5, 25, 50 μ M oder 100 μ M MEHP für 24h. Dargestellt ist jeweils die relative Änderung zur jeweiligen DMSO-Kontrolle nach Quantifizierung mittels qRT-PCR. (N=3 (A), N=2, n=2 (B und C))

Nach 5-stündiger Exposition mit TCDD und DEHP war keine signifikante Änderung der Expression von 17bHSD zu beobachten (Abbildung 25A). Mit 24-stündiger FSH-Stimulation zeigte sich ein etwas verändertes Bild (Abbildung 25B): unter TCDD-Exposition war eine signifikante Steigerung der 17bHSD-Expression um 36% feststellbar. Des Weiteren wurde die mRNA-Expression von 17bHSD nach 24-stündiger Inkubation in der Anwesenheit von FSH mit aufsteigender MEHP-Konzentration untersucht. Dabei war eine dosisabhängige Expressionshemmung bis 50 μ M zu erkennen. Bei 100 μ M ist die Expression ähnlich der DMSO-Kontrolle, was neben den Daten aus

Proliferationsassays im Rahmen von Vorarbeiten unterstreicht, dass MEHP in diesem Dosisbereich noch nicht toxisch wirkt.

3.4.3.2 Beeinflussung der Estronkonzentration

Zuerst wurden in einem ersten Schritt die absoluten Konzentrationen von Estradiol und Estron im Mediumüberstand mittels ELISA bestimmt und anschließend der Quotient von Estron zu Estradiol gebildet. Betrachtet man die Änderung der absoluten Konzentrationen von Estron im Mediumüberstand nach Exposition mit TCDD und DEHP, so ist feststellbar, dass DEHP zu einer geringeren Konzentration von Estron führt und auch in der Koexposition ist die Estronmenge signifikant vermindert (Abbildung 26A). Änderungen zur FSH-stimulierten Kontrolle werden erst signifikant erkennbar, wenn man die relativen Verhältnisse von Estron zu Estradiol vergleicht (Abbildung 26B). Dabei zeigte sich unter FSH-TCDD ein gesteigerter Anteil von Estron, der auch in der Koexposition mit DEHP erhalten blieb. DEHP hatte keinen additiven Effekt und änderte selbst auch nicht den Anteil von Estron.

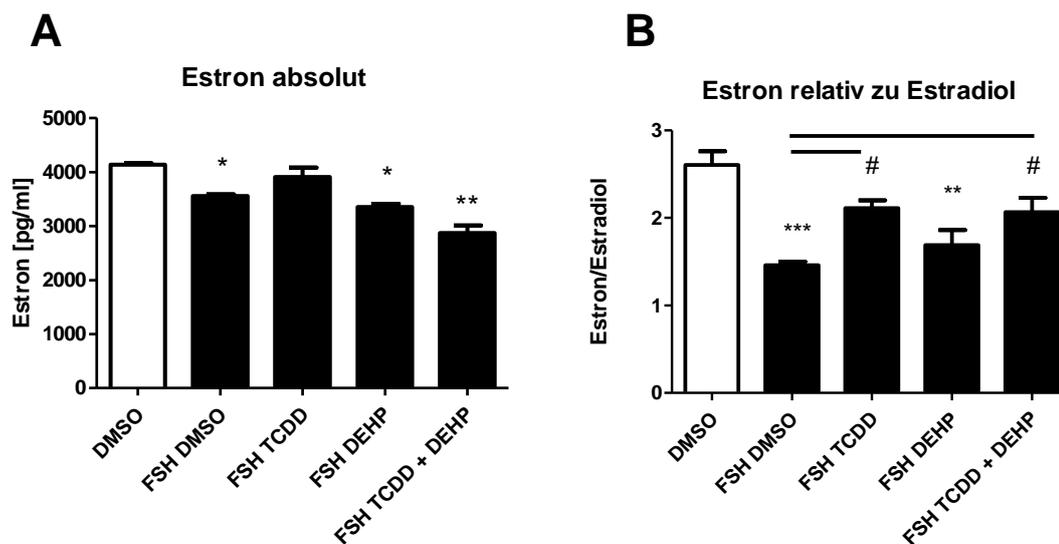


Abbildung 26: Estron-Bildung nach Exposition mit 20ng/ml FSH und 10nM TCDD, 50µM DEHP oder beidem in Anwesenheit von 10µM Androstendione für 24h. Dargestellt ist die Estron-Konzentration im Mediumüberstand nach Quantifizierung mit ELISA (A) sowie die Estron-Konzentration relativ zum gebildeten Estradiol (B) (N=2, n=2)

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen von Dioxinen und Phthalaten auf die endokrine Funktion von ovariellen Granulosazellen zu untersuchen. Dafür wurde als Grundlage für ein standardisiertes, experimentelles Umfeld die immortalisierte humane Granulosazelllinie KGN als ein etabliertes *in vitro* Modell ausgewählt. Insbesondere für die PPAR-vermittelten Effekte, die sich zwischen Nagern und Primaten grundlegend unterscheiden, können relevante Ergebnisse nur im humanen System erzielt werden [169]. Es liegen einzelne Befunde zu TCDD- oder DEHP-Effekten vor, die meist aus akzidentiellen Expositionen gewonnen wurden, eine systematische Untersuchung schließt sich aus ethischen Gründen *a priori* aus. Obwohl Daten aus verschiedenen Studien zur Exposition einzelner Substanzen vorliegen, gibt es unseres Wissens nach keine, die eine Koexposition untersucht haben. Auch Endpunktanalysen für eine reale Koexposition sind nicht beschrieben.

4.1 Exposition durch endokrine Disruptoren

Zur Exposition von Menschen gegenüber persistenten Pestiziden wie TCDD liegen wenig Daten vor: Aus dem Chemieunfall 1976 in Seveso, Italien [170], dem Einsatz von Agent Orange im Vietnam-Krieg [171] oder einer Nahrungsmittelkontamination in Michigan, USA [172], sind einige Erkenntnisse über akzidentielle Exposition mit relativ großen Mengen von Dioxinen bekannt, die auch eine Beeinflussung der Fertilität bei Frauen zeigen. Aus der *Seveso-Women's-Health-Study Group* war erkennbar, dass in Abhängigkeit der aufgenommenen TCDD-Menge die Zeit bis zum Eintreten einer Schwangerschaft zunimmt [173]. Auch konnte eine dosisabhängige Steigerung der Inzidenz von Brustkrebs in der gleichen Kohorte gezeigt werden [174].

Für nicht-akzidentielle Exposition mit PCBs ist eine Steigerung der Endometrioseraten gezeigt worden [175–177]. Weiterhin haben Mädchen, die *in utero* oder durch das Stillen mit hohen Konzentrationen von PCBs exponiert waren, eine frühere Menarche als die Kontrollgruppe [172].

Aktuelle Daten zur Exposition von vielen dioxin-ähnlichen PCBs wurden in der Duisburger Geburtenkohorte im Zeitraum von 2000 bis 2003 erhoben. Dort wurden Blut- und Muttermilchproben auf ihren Gehalt von Dioxinen und PCBs untersucht. TCDD zeigte dort eine mittlere Konzentration von 1,4pg/g Protein im Blut bzw. 1,5pg/g Protein in der Milch. Andere polychlorierten Dioxine wie Octa-CDD zeigten wesentlich höhere Mengen von bis zu 268pg/g Protein in Blutproben [178]. In der gleichen Kohorte konnten diese Exposition mit reduzierten Steroidhormonspiegeln von Neugeborenen korreliert werden [179]. Auch zu späteren Zeitpunkten wirkte sich die frühe Exposition gegenüber PCBs noch negativ auf endokrine Endpunkte, wie das adrenale Androgen DHEA-S aus. Dies ist ein frühes Zeichen der Adrenarche in präpubertären Kindern [180].

Phthalate sind ubiquitär vorkommende Umweltschadstoffe, weil sie u.a. als Plastikweichmacher genutzt werden und damit in vielen Produkten des alltäglichen Lebens vorkommen. Für diese ist die Datenlage wesentlich besser. Viel Aufmerksamkeit galt den xenoestrogenen Effekten. Insbesondere das männliche Reproduktionssystem wurde dahingehend untersucht und mit Biomonitoringdaten korreliert. Amerikanische Daten zeigen eine negative Korrelation der Spermienmotilität mit der im Urin messbaren Konzentrationen verschiedener Phthalate. Interessant dabei ist der zeitliche Verlauf der Exposition, da sich seit Beginn der Studie im Jahr 2000 die Exposition bis 2004 fast verdoppelt hat [181].

Mithilfe dieser Untersuchungen, ersten Biomonitoringdaten [182] sowie einigen pharmakokinetischen [183] Studien kann auf tägliche Aufnahmemengen und Expositionslevel geschlossen werden. Die amerikanische *Agency for Toxic Substances and Disease Registry* schätzt, dass die allgemeine Bevölkerung mit bis zu 2mg/d DEHP exponiert ist [184]. Jedoch können im beruflichen oder medizinischen Umfeld weitaus größere Expositionen erreicht werden. So wurden zum Beispiel DEHP-Mengen von bis zu 300mg in Erythrozytenkonzentraten gefunden, die einer Äquivalenzdosis von 3,5 – 4,5mg/kg eines 70kg schweren Menschen ausmacht [185]. Insbesondere Kinder sind durch ihr geringes Verteilungsvolumen für solche Expositionen gefährdet. Bei Untersuchungen an Neugeborenen, die intensivmedizinisch betreut werden, wurden mittlere Ausscheidungsmengen von 86ng MEHP/ml Urin (0,3µM) gefunden [182]. Amerikanische Daten von 2004 zeigten im Urin gesunder erwachsener Männer mittlere MEHP-Konzentration von 11,7ng/mg (0,04µM) [181].

4.2 Charakterisierung des Zellkulturmilieus

4.2.1 KGN sind zur Anreicherung des aktiven Metaboliten MEHP fähig

Aus murinen Untersuchungen ist bekannt, dass DEHP nicht der aktive Metabolit dieser Phthalatspezies ist, sondern dass *in vivo* nach Hydrolyse durch teilweise unspezifische Esterasen verschiedene aktiv wirksame Metabolite entstehen. Darunter befinden sich der Hauptmetabolit MEHP, 5OH-MEHP, 5oxo-MEHP und wenige andere, die auch im menschlichen Urin detektierbar sind [186].

Diskrepanz zwischen Mediumüberstand und Zelllysate

In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass KGN-Zellen zu einer Metabolisierung von DEHP befähigt sind. Es konnte eine MEHP-Akkumulation nach 5-stündiger DEHP-Exposition im Zelllysate (212ng/ml, entspricht 0,7µM) nachgewiesen werden. Diese Konzentration entspricht der bei intensivmedizinisch betreuten Neugeborenen MEHP-Menge im Urin. Im Mediumüberstand ist eine wesentlich geringere Konzentration feststellbar. Diese Umverteilung lipophiler

Substanzen in das zelluläre Kompartiment ist typisch für lipophile Xenobiotika und wurde ebenfalls bei lipophilen Anästhetika beobachtet [187]. Dies macht die Relevanz und kritische Analyse von Biomonitorprojekten deutlich, bei denen i.d.R. extrazelluläre, hydrophile Substanzen (Urin) untersucht werden [188].

Nachweisbare MEHP-Kontamination im Mediumüberstand

Auch ohne Zugabe von DEHP ist MEHP in geringen Konzentrationen nachweisbar (20ng/ml, entspricht 0,06µM), die als „Hintergrund“ Kontamination angenommen werden kann. Sie liegt über der messbaren Konzentration von MEHP im Urin gesunder, nicht exponierter Männer [181]. Dies kann auf den wenig beachteten Effekt der Kontamination von *in vitro* Experimenten mit Phthalaten aus Plastik Kulturschalen zurückgeführt werden [69]. Im Kulturmedium von IVF-Behandlungen wurden MEHP-Konzentrationen bis 132ng/ml (0,4µM) festgestellt, vereinzelte Proben enthielten bis 1840ng/ml (6,3µM) [189]. Die biologischen Effekte solcher Exposition der Oozyte sind bisher völlig unbeachtet.

Insgesamt gibt es wenige Daten, die in *in vitro* den Metabolismus von DEHP untersuchen [190,191]. Gupta et al. haben vergleichende Untersuchungen zu den Auswirkungen von DEHP und MEHP in Mausfollikeln angestellt [192]. Konsistent mit diesen Studien bestätigt die vorliegende Arbeit, dass DEHP auch extra-intestinal hydrolysiert werden kann. *In vivo* Untersuchungen im humanen System zur Metabolisierung von Phthalaten liegen wenig vor [186,193], zeigen aber ähnliche Effekte. Die Quantifizierung des relativen Anteils des metabolisierten DEHP ist schwer, da zwar definierte DEHP-Mengen zu den einzelnen Versuchsansätzen gegeben wurden, aber bei mikroskopischer Betrachtung der Zellkulturflaschen mizellenartige Fetttropfchen auf der Mediumoberfläche zu beobachten waren. Bisher liegen dafür keine in der Literatur verfügbaren Daten vor, die die Lösungskinetik von D/MEHP untersucht haben. Weiterhin wäre es interessant zu untersuchen, ob der Metabolisierung von DEHP spezifische, ggf. sogar induzier- oder hemmbare enzymatische Prozesse zugrunde liegen. Solche Untersuchungen könnten aufklären, ob durch die Koexposition mit Dioxinen möglicherweise eine Kompetition um spezifische Bindungsstellen besteht oder ob sich Dioxine und Phthalate nicht-allosterisch hemmen.

4.3 Signalkaskade der Rezeptoren

4.3.1 Der AhR- und der PPAR-Signalweg sind funktionell aktiv

4.3.1.1 AhR-Signalkaskade und Zielgenexpression

In dieser Studie wurde 2,3,7,8-Tetrachloro-dibenzo-p-dioxin (TCDD) als AhR-Agonist verwendet, weil dieser sich durch seine große Affinität zum AhR als potentester Agonist erwiesen hat [194].

Aus Vorarbeiten [51] waren Konzentration und zeitlicher Verlauf der TCDD-abhängigen Induktion bekannt, die im gleichen Modell etabliert wurden. Die AhR-Aktivierung mittels TCDD führte zu einer Erhöhung der Cyp1a1- und Cyp1b1-Transkriptmenge, was die erwartete AhR-Signalkaskade widerspiegelt. Die Koinkubation mit TCDD und DEHP zeigte eine ähnliche Zunahme der Cyp1a1-Transkripte.

4.3.1.2 PPARs werden exprimiert und sind funktionell aktiv

Da PPAR α *in vivo* in Granulosazellen typischerweise gering exprimiert wird [92], war es in diesem Zusammenhang wichtig, die Expression von PPAR α und die Induktion von ACOX in KGN-Zellen zu charakterisieren. Die funktionelle Aktivität des PPAR α sollte in dieser Studie durch die ACOX-Induktion mittels Bezafibratexposition nachgewiesen werden. Obwohl dieses Enzym typischerweise in der Leber exprimiert wird, konnte ACOX ebenso wie PPAR α in KGN nachgewiesen werden. Für PPAR γ zeigte sich eine erhöhte Expression des Zielgens PECK durch Rosiglitazon-vermittelte Aktivierung. Ebenso konnte FABP3 als gemeinsames PPAR α - und β -Zielgen durch Rosiglitazon induziert werden. Der Nachweis der Induktion von typischen PPAR-Zielgenen, die auch in anderen Geweben induziert werden können, zeigt die funktionelle Aktivität der PPAR in KGN und damit ein potentielles Zielmolekül für endokrine Disruptoren in Granulosazellen. TCDD wirkt nicht auf die Expression von FABP3, sodass der PPAR Signalweg nicht vom AhR-Aktivitätszustand beeinflusst wird.

4.3.2 Beschreibung der Wechselwirkung: AhR ist dem PPAR γ nachgeschaltet

Zunächst stellt sich ein komplexes Bild dar:

1. Die AhR-Zielgene Cyp1a1 und Cyp1b1 werden durch DEHP induziert (Abbildung 9 und 14). Cyp1a1 wird darüber hinaus durch TCDD reguliert.
2. Die AhR-Zielgene Cyp1a1 und Cyp1b1 werden insbesondere unter AhR-Antagonisierung bei gleichzeitiger DEHP-Exposition stärker exprimiert (Abbildung 14).
3. DEHP induziert die AhR-Expression, was durch TCDD verhindert wird (Abbildung 12).
4. PPAR α scheint keinen Einfluss auf die DEHP-vermittelte AhR-Induktion zu haben (Abbildung 13). Die Antagonisierung von AhR und PPAR γ kann dies verhindern. Hemmung von PPAR α oder AhR verändern nicht die Wirkungsweise von DEHP auf die AhR-Expression. Daraus folgt, dass PPAR γ der AhR-Induktor ist.
5. Weder PPAR α -Aktivierung noch PPAR γ -Aktivierung durch pharmakologische Agonisten induzieren die AhR-Expression (Abbildung 15A) in ähnlicher Weise.
6. Die PPAR α -Expression selbst kann selbst durch DEHP gesteigert werden (Abbildung 10A).

7. Die PPAR-Expression bleiben durch TCDD unbeeinflusst (Abbildung 10).

4.3.2.1 Gleichzeitige Aktivierung des AhR hemmt DEHP-Effekte auf die PPAR-Expression

Die AhR-Expression in KGN wurde in Vorarbeiten von Frau Dr. Horling ausführlich untersucht [51] und wird deswegen nur unter dem neuen Aspekt der DEHP- und Koexposition mit TCDD und DEHP diskutiert.

Aus immunohistochemischen Untersuchungen von Ovarien ist bekannt, dass die PPAR-Expression im Ovar sehr unterschiedlich bezüglich a) der Isotypen und b) des zeitlichen Verlaufs im Menstruationszyklus ist [92]. PPAR α ist sowohl *in vivo* [195] als auch unter Kontrollbedingungen im KGN-Modell äußerst niedrig exprimiert. Mittels DEHP konnte die PPAR α -Expression induziert werden, während die Aktivierung des AhR-Signalweges zu keiner Änderung führte. Die DEHP-abhängige Induktion von PPAR α konnte jedoch durch Koexposition mit TCDD verhindert werden. Es zeigt sich also, dass beide EDCs eigene Effekte vermitteln können, deren Richtungen aber unterschiedlich bzw. gegensätzlich sind und sich in Summe aufheben.

Eine mögliche Erklärung dafür können Degradationsmechanismen des AhR sein, die für den AhR gut belegt ist: Es gibt Hinweise auf eine negative Feedback-Schleife, die der AhR in seiner typischen Rezeptorantwort induziert [84], und dass der AhR selbst als E3-Ubiquitin-Ligase wirken kann [196]. Das könnte auch die auf Proteinebene verringerte AhR-Expression und die unbeeinflusste PPAR-Expression in der Koexposition erklären.

Daraus können folgende Schlüsse gezogen werden:

- A) Der AhR-Signalweg ist dem der PPARs nachgeschaltet. Er kann die DEHP vermittelten Effekte antagonisieren.
- B) Obwohl sich Effekte von TCDD und DEHP in Koexposition auf die Rezeptorexpression nivellieren, müssen biologische Effekte dies keineswegs.

Für andere Endpunkte liegen hierzu schon einige Daten vor: Insbesondere PPAR α reguliert lokale Entzündungsprozesse über die COX2-Expression mittels zwei PPRE in dessen Promotorbereich [127,197]. Durch die Expressionerhöhung von PPAR α unter DEHP kann zunächst von einer erhöhten Suszeptibilität für proinflammatorisches Signalling in den Granulosazellen ausgegangen werden. Auch der AhR ist fähig, COX-2 über den NF-kappaB-Signalweg zu induzieren [198] und lokal die Inflammation zu beschleunigen. Dies wurde von Villard et al. bestätigt, die im AhR-Promotor ein PPRE für PPAR α beschrieben haben. In deren experimentellem Umfeld überwiegen die proinflammatorischen Effekte des AhR den anti-inflammatorischen des PPAR α -Liganden [199]. Diese Ergebnisse müssen vorsichtig übertragen werden, da es sich hier um die Frage nach empfindlichen Gleichgewichten handelt und diese nicht zwischen verschiedenen experimentellen Modellen (Caco-2 Zelllinien) vergleichbar sind.

4.3.2.2 Die DEHP-abhängige Induktion von AhR und PPAR α wird durch AhR-Aktivierung verhindert.

Auch in einer anderen Granulosazelllinie konnten geringe Mengen von Benzylbutyl-phthalaten die AhR-, ARNT-, Cyp1a1- bzw. Cyp1b1-Expression steigern [200] (vgl. Abbildung 10 und 12). Die Autoren spekulieren, dass hierin PPAR-Signalwege involviert sein können. Die Tatsache, dass DEHP zu einer gesteigerten Expression des AhR und Cyp1b1 führt, dieser Effekt aber unter alleiniger Aktivierung von PPAR α oder PPAR γ nicht zu beobachten war, ist ein Hinweis darauf, dass die DEHP-abhängige Induktion nicht allein durch einen PPAR verursacht wird, sondern diese beispielsweise synergistisch wirken. Zumindest teilweise müssen daran alle drei Regulatoren kausal beteiligt sein, denn bei Antagonisierung jedes einzelnen ist dieses Phänomen nicht mehr zu beobachten.

4.3.2.3 Auch auf Zielgenebene ist der AhR dem PPAR nachgeschaltet.

Die These, dass der AhR dem PPAR nachgeschaltet ist, wird auch durch die Ergebnisse auf Zielgenebene bestätigt: AhR-Zielgene konnten durch DEHP, insbesondere unter AhR-Antagonisierung induziert werden. Unter PPAR-Antagonisierung konnte dies jedoch nicht festgestellt werden. Die PPARs scheinen also entweder für die Vermittlung der DEHP-Effekte auf den AhR verantwortlich zu sein oder unabhängig die Gene zu induzieren. Letzteres kann durch die Untersuchungen von Serée et al. belegt werden, bei denen für Cyp1a1 ein PPRE im 5'-Promotorbereich gefunden wurde, für Cyp1b1 konnten keines identifiziert werden [201]. Welcher PPAR-Isotyp dafür verantwortlich ist, ist zunächst nicht zu klären. Signifikante Unterschiede im Muster der Cyp1b1-Induktion konnte durch PPAR α - und PPAR γ -Antagonisierung auf mRNA-Ebene nicht festgestellt werden. Zusammen mit der Beobachtung, dass die selektive Aktivierung von PPAR α oder PPAR γ nicht zu einer erhöhten Expression von Cyp1a1 führt (Abbildung 14), wird deutlich, dass auch dieser Effekt nicht alleinig einem Isotypen zugeschrieben werden kann. Verwirrend kommt dazu, dass unter Rosiglitazon eine niedrigere Expression von Cyp1a1 zu messen ist. Dies stimmt aber mit Serée et al. [201] überein, der unter Thiazolidinedione, einem weiteren selektiven PPAR γ -Agonisten, auch eine geringere Expression von Cyp1a1 beobachtete. Jedoch konnten die Autoren in der Zelllinie Caco-2 einen Bezafibrat-abhängigen Anstieg der Cyp1a1-Expression zeigen. Diese Studie und unsere Daten zeigt das antagonistische Wirken der PPAR-Isotypen. DEHP scheint als selektiver PPAR α - oder PPAR γ -Modulator zu wirken

Dieses heterogene Bild ist auch für andere promiskuitive nukleäre Rezeptoren gezeigt worden und wird als selektive PPAR-Modulation bezeichnet. Liganden-spezifische Veränderungen der Konformation der Rezeptoren erlauben nur einem Teil der Koregulatoren die Interaktion mit

dem PPAR, sodass nachfolgend auch nur ein Teil der Zielgene induziert wird [202]. Globale Genexpressionsdaten zeigen solche Unterschiede zwischen MEHP und Rosiglitazon [203] und bestätigen MEHP als selektiven PPAR γ -Modulator.

Auch eine direkte Wirkung von DEHP auf den AhR kommt in Betracht. Krüger et al. [191] beobachteten eine um mehr als 9-Log-Stufen geringe ED50 von DEHP im Vergleich mit TCDD mittels pharmakologischer Dosis-Wirkungsbeziehungen in einem Transaktivierungsassay.

Eine weitere Möglichkeit der Untersuchung der Wechselwirkung ist die Nutzung von Reporter-genassays. Dabei werden genetische Konstrukte in Zellen transfiziert, die nach den *response elements* (XRE bzw. PPRE) für Luziferasen codieren, die als Reporter dienen. Bindet ein Rezeptor spezifisch an diesen DNA-Abschnitt wird der Reporter exprimiert und anschließend kann dessen Chemilumineszenz detektiert werden. Dies entspricht der relativen Bindung an spezifische DNA-Loci bspw. in Promotorregionen von Zielgenen. Diese Untersuchungen waren jedoch im KGN-Zellmodell unter verschiedenen Transfektionsbedingungen nicht suffizient möglich und brachten in einem anderen Zellsystem (C3H/10T1/2-Zellen) keine signifikanten Informationen (Daten nicht gezeigt).

4.4 Beeinflussung von Granulosazellmerkmalen

4.4.1 Die Gonadotropinrezeptorausstattung wird auf unterschiedlichem Weg von beiden Signalwegen dysreguliert

Um zu untersuchen, ob TCDD und/oder DEHP als endokrine Disruptoren Einfluss auf die Endstrecke der hormonellen Achse zwischen Hypophysenvorderlappen und dem Ovar als periphere Hormondrüse nehmen, wurde der Rezeptorbesatz der Granulosazellen mit FSH- und LH-Rezeptoren untersucht. Für mechanistische Fragen dieser Vielschichtigkeit bieten sich eine so gut definierte Granulosazellpopulation wie das KGN-Zelllinie an, weil diese von übergeordneten Regelkreisen losgelöst ist.

4.4.1.1 PPAR und AhR hemmen nicht synergistisch die FSH-Sensitivität

Für den FSHR zeigte sich ein differentielles Bild in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad der KGN:

- A) Ohne FSH-Stimulation führte DEHP zu einer erhöhten Expression des FSHR. In Koexposition mit TCDD wurde dieser signifikant niedriger exprimiert (Abbildung 16B).
- B) Unter FSH-Stimulation verhinderte eine Aktivierung des AhR durch TCDD die physiologische Induktion des FSHR (Abbildung 17). Die Aktivierung der PPARs durch DEHP verhinderte nicht nur die physiologische Induktion, sondern verursachte auch eine geringere Expression als ohne FSH-Stimulation.

Die Beobachtung veränderter Expressionsantworten mit und ohne Gonadotropinstimulation zeigt sich auch bei humanen Choriongonadotropin (hCG) und der Cholesterin-Biosynthese in murinen Granulosazellen [204]. Untersuchungen mit *knockout*-Modellen legen nahe, dass die Anwesenheit des AhR für eine normale FSHR-Expression im gesamten Ovar nötig ist [85]. Auch eine Interaktion des AhR mit dem FSHR-Promotor durch eine E-Box *binding site* konnte in Transaktivierungsassays gezeigt werden [205]. Andere Arbeiten beobachteten ähnliche Effekte: So führte eine Exposition von kultivierten Rattengranulosazellen mit 100µM MEHP zu einer geringen cAMP-Bildung nach FSH-Stimulation [206]. Obwohl FSH ein wesentlicher Stimulus für die Estradiolbiosynthese ist, konnte in Granulosazellen von Ratten gezeigt werden, dass MEHP cAMP-unabhängig die Estradiolsynthese von Granulosazellen bzw. Progesteronsynthese von Granulosaluteinzellen senken kann [207]. Im Umkehrschluss ist anzunehmen, dass auch andere Effekte der FSHR-Signalkaskade, z.B. auf genomischer Ebene, mit DEHP beeinflusst werden können. Daher ist die Frage nach der FSHR-Expression auch unabhängig von der hauptsächlich cAMP-gesteuerten Estradiolbiosynthese z.B. hinsichtlich der Luteinisierung der Granulosazellen wichtig.

4.4.1.2 PPAR-vermittelte Steigerung der LH-Sensitivität wird durch AhR verhindert

Auch für den LHR zeigten sich unter FSH-Stimulation unterschiedliche Effekte insbesondere in Bezug auf die DEHP-Exposition:

- A) Ohne FSH-Stimulation führte DEHP zu einer Induktion des LHR, die unter PPAR-Antagonisierung reversibel war (Abbildung 18).

Auch humane *in vivo* Daten aus systematischer Analyse akzidentieller Expositionen zeigen, dass eine chronische TCDD-Exposition die LHR-Expression dosisabhängig verringert [208]. Dies entspricht den Beobachtungen aus AhR-defizienten Mäusen, die zeigen, dass der AhR für eine physiologische LHR-Expression nötig ist [85].

Die PPAR-abhängige LHR-Induktion kann aber durch die TCDD-Aktivierung des AhR gehemmt werden (Abbildung 18). Dies zeigt wie schon bei der PPAR α -Expression, dass beide Signalwege in unterschiedliche Richtungen wirken, die diese Endpunkte in Koexposition normalisieren.

- B) Unter FSH-Stimulation hemmte DEHP die LHR-Expression (Abbildung 19).

Studien in murinen Leydigzellen im Testis zeigen, dass DEHP zu einer niedrigeren Expression von LHR führt [209]. In weiblichen Zebrafischen konnte auch eine DEHP-abhängige LHR-Hemmung gezeigt werden [210].

Damit scheinen insbesondere die Effekte von DEHP vom physiologischen Aktivitätszustand der KGN-Zellen abzuhängen. Da sich solche Effekte zwischen den Aktivitätszuständen der Granulosazellen unterscheiden, werden in der Literatur auch immer wieder unterschiedliche Effekte

beschrieben. Adverse Effekt von EDCs sind häufig stadienspezifisch und greifen in zeitlich bzw. funktionell umschriebenen Rahmenbedingungen spezifisch ein.

Die vorgelegte Arbeit ist nach unserem Kenntnisstand die erste, die die Auswirkungen von Dioxinen und Phthalaten gleichzeitig auf die Gonadotropinrezeptorexpression untersucht hat. Es zeigt sich unter der physiologisch näheren FSH-stimulierten Situation kein additiver Effekt auf die Dysregulation für den FSHR. Insgesamt zeigen diese Untersuchungen, dass beide Signalwege, wenngleich unterschiedlich, die Ansteuerbarkeit der Granulosazellen a) als periphere Geschlechtsdrüse und b) als funktionell adaptierendes Organ aus dem Gleichgewicht bringen können. Die geänderte Gonadotropinrezeptorausstattung kann viele *in vivo* Beobachtungen im Mausmodell erklären: AhR-defiziente Mäuse zeigen nach exogener Gonadotropinbehandlung eine reduzierte Anzahl ovulierter Follikel [56]. Auch die Exposition mit TCDD führt in nicht-defizienten Mausmodellen zu einer reduzierten oder teilweise ganz aufgehobenen Ovulation [211–213].

Eine PPAR α -Defizienz hat keine nachteiligen Effekte auf die Fertilität [164]. Ob die Expression des LHR, beispielsweise auch in Thekazellen, dadurch beeinträchtigt wird, ist bisher nicht untersucht. Der Einfluss von exogenen PPAR γ -Liganden auf die Steroidbiosynthese zeigt aber widersprüchliche Effekte zwischen verschiedenen Spezies [214–217]. Anzunehmen ist, dass PPAR γ vor und nach dem LH-Anstieg unterschiedliche Aufgaben übernimmt. Komplex sind die Effekte auch dadurch, weil PPAR γ direkt auf die Expression von Enzymen der Steroidbiosynthese Einfluss nimmt. So deuten verschiedene Untersuchungen auf eine Steuerung der Expression und Aktivität von 3 β -HSD [218], Cyp11 [161], Cyp17 [216] und Cyp19 [219] hin.

4.4.2 AhR- und PPAR-vermittelte Effekte auf die Estradiolhomöostase

4.4.2.1 Beide Signalwege hemmen additiv die Estradiolproduktion

Die Estradiolbiosynthese ist eine der wichtigsten systemischen Leistungen der Granulosazellen. Diese Arbeit und andere konnten zeigen, dass TCDD alleine Cyp19, Schlüsselenzym der Estradiolbiosynthese, vermindern kann [51,152,220]. Dies bestätigen Daten aus dieser Arbeit unter TCDD-Exposition sowohl mit als auch ohne FSH-Stimulation. Weiterhin ist die beobachtete Hemmung der Expression von Cyp19 durch DEHP ebenfalls bei beiden Versuchsabläufen mit den Befunden anderer Studien kongruent [192,221,222].

Darüber hinaus beschreiben die gefundenen Daten einen additiven Effekt sowohl auf die Cyp19-Expression, also auch auf den systemisch relevanten Estradiolspiegel (Abbildung 22 und 26). Aus

der Beobachtung einer additiven Wirkung von TCDD und DEHP müssen zunächst zwei unterschiedliche Wirkmechanismen angenommen werden, die bis zur Transkriptionsregulation von Cyp19 unterschiedliche Wege nehmen, um dann zusätzliche Effekte auszulösen.

Jedoch scheinen PPAR α und PPAR γ unterschiedlich in KGN-Zellen auf die Cyp19-Expression zu wirken. Unter den gegebenen experimentellen Umständen zeigte die selektive Aktivierung von PPAR α mit Bezafibrat eine erhöhte Expression von Cyp19, während PPAR γ , selektiv aktiviert durch Rosiglitazon, die Expression hemmt (Abbildung 23). Zusammen mit den Befunden unter DEHP-Exposition und der relativ niedrigeren Expression von PPAR α in Granulosazellen [161,195] kann der Effekt der DEHP-vermittelten Cyp19-Hemmung folglich PPAR γ zugeschrieben werden. Diese Heterogenität, die auch schon bei der Zielgen-Induktion beobachtet wurden ist, macht deutlich, dass DEHP bzw. MEHP als selektive PPAR α - bzw. PPAR γ -Modulatoren wirken können [244].

4.4.2.2 Die Estradiolmetabolisierung wird durch AhR und PPAR über unterschiedliche Wege beschleunigt.

Das in den Granulosazellen produzierte Estradiol entfaltet seine Wirkung an verschiedenen sekundären Zielorganen. Die Wirkung dort wird aber durch die systemische Konzentration am Endorgan bestimmt. Auch verschiedene Estradiol-katabolisierende Prozesse steuern dieses homöostatische Level [223]:

DEHP und MEHP hemmt die Expression von 17bHSD

Die 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17bHSD) steht unter der transkriptionellen Kontrolle der PPARs. 17bHSD konvertiert Estradiol zu Estron [224] und wirkt so auf die systemische Menge von Estradiol. Für die Expression von 17bHSD wurden vorrangig Effekte unter DEHP beobachtet (Abbildung 25). Außerdem wurde gezeigt, dass MEHP in Abhängigkeit zur aufsteigenden Konzentration zu einer Reduktion von 17bHSD führte. Die höchste Konzentration von MEHP (100 μ M) verursachte eine Expression ähnlich der DMSO-Kontrolle. Dies ist ein weiteres Indiz für nicht toxische Effekte von MEHP in diesem Dosisbereich. Solche nicht monotone Dosis-Wirkungsbeziehungen sind ein immer wieder beobachtetes Phänomen von EDCs, was meist durch pleiotrope, ineinandergreifende Mechanismen erklärt werden kann [225].

TCDD führt zu einer relativ erhöhten Konzentration von Estron

Erwartungsgemäß zeigte sich, dass die physiologische Induktion der Estradiolbiosynthese durch FSH-Zugabe gleichzeitig eine verminderte Estronkonzentration bewirkte (Abbildung 26). Erklärt werden kann dies dadurch, dass unter diesen Bedingungen Androstendion durch Cyp19 verstärkt zu Estradiol metabolisiert wird. Daher steht im Reaktionsgleichgewicht zur Estronbildung weniger Androstendion zur Verfügung. Zwar konnten in den Untersuchungen im Rahmen dieser

Arbeit keine allein durch AhR vermittelten Effekt auf die 17bHSD-Expression beobachtet werden, jedoch belegen andere Studien in kultivierten Follikeln mit längerer Expositionszeit für TCDD einen negativen Effekt auf die Transkriptmenge von 17bHSD [226]. Wenngleich die vorliegende Arbeit keine funktionelle Aussage über das Estrogen-Verhältnis gibt, wurde aber eine erhöhte Estronsynthese durch TCDD-Exposition nachgewiesen (Abbildung 26B). Ob dieser Effekt allein auf 17bHSD zurückzuführen ist, wurde in dieser Studie nicht weiter untersucht. Auch eine Metabolisierung von 17 β -Estradiol in Folge einer verstärkten Cyp1b1 –Expression ist möglich [83].

4.4.3 Beeinflussung des Estradiol-Feedbacks der Granulosazellen

Die Expression von ER β konnte uneingeschränkt gezeigt werden. ER α , der ohnehin erst spät in Granulosazellen exprimiert wird, konnte nur als Transkript, jedoch nicht als Protein nachgewiesen werden. Dies deckt sich mit anderen Charakterisierungsuntersuchungen der KGN-Zelllinie [49,51], sodass von einem frühen Stadium vor dem Sekundärstadium ausgegangen werden muss. Darüber hinaus zeigte eine Studie, dass das ER α -Protein AhR-vermittelt durch Proteasomen degradiert wird [227].

Die ER β -vermittelte Wirkung von Estrogenen ist essentiell für die späte Granulosazellendifferenzierung, Follikelreifung und adäquate Sensitivität für den durch LH ausgelösten Ovulationsreiz. Die unbeeinflusste ER β -Expression in den KGN-Zelle (Abbildung 21) wird durch andere Studien bestätigt [51] und zeigt ebenfalls im AhR-defizienten Mausmodell keine wesentliche Veränderung [85]. Zusammen betrachtet unterstützen diese Befunde, dass, anders als FSH, Estradiol nicht essentiell für die antrale Follikelformation ist, aber kritisch für das Granulosazellwachstum und die -differenzierung, sowie für den Erhalt der antralen Follikelformation und die Ovulation [10]. Dass die intraovarielle Estrogenwirkung über den ER β vom AhR unterstützt wird, kann aus Daten aus dem AhR-defizienten Mausmodell geschlossen werden: So wurde beobachtet, dass nur im Ovar Auswirkungen der verminderten Estrogenproduktion feststellbar waren, andere Estrogenzielgewebe wie das Vaginalepithel waren jedoch nicht betroffen [85]. Eine mögliche Ursache scheint die hier weitestgehend ER α -vermittelte Wirkung des Estrogens zu sein [228]. Eine Interaktion der AhR-Signalkaskade mit ER β wurde durch Brunberg et al. 2003 beschrieben. Der Dimerisierungspartner ARNT fungiert für beide Estrogenrezeptoren als Koaktivator und löst so antiestrogene Effekte von Dioxinen auch an peripheren Zielgeweben aus [229]. Inwieweit diese weitere Rezeptorinteraktion auch die Estrogenwirkung in Granulosazellen funktionell beeinträchtigt, ist bisher nicht untersucht. Auch bleibt unklar, ob sich hier so viele Signalwege überlagern, dass kein eindeutiger Effekt an diesen Endpunkten mehr zu erkennen ist.

Für ER α konnte unter DEHP-Exposition eine erhöhte Transkriptmenge festgestellt werden (Abbildung 20). Die TCDD-Exposition führte allein und in Koexposition zu keiner Expressionsänderung von ER α . Studien zufolge können PPAR γ und sein Heterodimerisierungspartner RXR die ER-induzierte Genexpression durch kompetitive Bindung an ein *estrogen response element* verschiedener Zielgene unterdrücken [230]. Entsprechend einer bidirektionalen Interaktion können ERs die ligandeninduzierte PPAR γ -Aktivierung in MCF-7-Zellen unterbinden [231]. Diese aber zeigen im Vergleich zu Adipozyten eine wesentlich geringere Expression von PPAR γ und PPRE-Aktivierung nach Ligandbindung [232].

4.5 Beeinträchtigte Follikelreifung durch DEHP

Zusammenfassend lassen sich diese Befunde zu folgendem Bild zusammenfügen: Nimmt man die Tatsache des unter DEHP-Exposition erhöhten ER α -Transkripts, das physiologisch erst im späten Follikel exprimiert wird, zusammen mit der gleichzeitig erhöhten Expression von LHR, gibt das Anhalt zu der These, dass DEHP die Follikelreifung beschleunigt. Das wird auch dadurch untermauert, dass PPAR γ mit steigender Follikelreifung immer höher exprimiert wird [195]. Pocar et al. zeigten ebenfalls, dass *in utero* mit DEHP exponierte C3H/N Mäuse weniger unreife Follikel tragen, diese aber verstärkt atretisch degradieren [233]. Mechanistisch wurde auch in dieser Studie die geringere FSHR-Expression unter DEHP-Exposition festgestellt, das wiederum unsere Daten bestätigt. Dies ist ähnlich den Beobachtungen, dass repetitiv oral zugeführtes DEHP zu verlängertem Zyklus und verminderten Schwangerschaftsfrequenzen in Ratten [234] führt. Die Autoren interpretieren dies zusammen mit der verminderten Anzahl von Corpora lutea als Störung der Ovulation, die sich durch eine Desynchronisierung intraovarieller und hypothalamisch-hypophysärer Regelkreise erklären lässt. Ähnliche Befunde wurden während der Laktationsperiode mit DEHP-exponierten Ratten beobachtet [235]. Epidemiologische Studien, die eine frühere Thelarche Phthalat-exponierter Mädchen beschreiben, stützen diese These [236,237], auch wenn dies in anderen Kohorten nicht beobachtet werden konnte [238]. Ähnlich den klinischen Befunden von Frauen mit PCOS stört die Aktivierung der PPARs durch DEHP nach der Ovulation aber die Granulosa-Luteale Transformation [239]. Im Tiermodell machen verkleinerte Hypophysen und Veränderungen innerhalb hypothalamisch-hypophysärer Neurone [240] aber auch deutlich, dass adverse reproduktive Effekte nicht allein durch intraovarielle Effekte erklärt werden können. Auch die Oozytenreifung von *in vitro* mit DEHP exponierten Cumulus-Oozyten-Komplexen ist negativ beeinflusst [241–243]. Welchen Stellenwert die unterschiedlichen Zelltypen auf die Suszeptibilität für endokrine Disruption nehmen, ist in solchen Modellen schwer zu untersuchen. Die vorliegende Arbeit zeigt aber, dass auch ohne die Wechselwirkung mit der Oocyte Granulosazellen negativ beeinflusst werden.

5 Zusammenfassung und Ausblick

Transkriptionsfaktoren, die Umweltschadstoffe binden, vermitteln adverse Effekte auf das reproduktive System. Der AhR und die PPARs sind kritische Transkriptionsfaktoren für eine normale Ovarfunktion. Eine AhR-Aktivierung führte zu veränderter Genexpression der Gonadotropin- und Estrogenrezeptoren sowie zu einer verminderten Estradiolbiosynthese in KGN-Granulosazellen. Auch eine PPAR-abhängige endokrine Disruption konnte in dieser Zelllinie bereits gezeigt werden. Wenngleich einiges über beide Signalwege bekannt ist, gibt es keine Studien, die die Ovarfunktion bei gleichzeitiger Aktivierung beider Signalwege durch Umweltschadstoffe untersucht haben.

Die KGN-Zelllinie, die sowohl den AhR als auch PPAR α und γ exprimiert, bietet die Möglichkeit, die regulatorischen Mechanismen dieser Rezeptorinteraktion ohne die übergeordnete Steuerung der Hypothalamus-Hypophysen-Achse und / oder die lokale Interaktion mit Thekazellen zu untersuchen.

KGN-Zellen wurden mit DEHP, TCDD und einem Mix beider Stoffe exponiert, um die Expression der Transkriptionsfaktoren selbst, deren nachgeschalteter Signalwege sowie funktioneller Granulosazellmarker mittels qRT-PCR und Western Blot zu bestimmen. Die Estrogensynthese sowie dessen Abbau zu Estron wurden durch ELISA untersucht. Die MEHP-Akkumulation in KGN-Zellen zeigte, dass diese Zelllinie zur Metabolisierung von DEHP fähig ist. Mittels der synthetischen PPAR-Agonisten Bezafibrat und Rosiglitazon konnte die funktionelle Signalkaskade belegt werden. DEHP induzierte die AhR-Expression; durch selektive Antagonisierung konnte dieser Effekt einer Aktivierung des PPAR γ -Signalweges zugeschrieben werden. Die FSH-Stimulation führte zu einer Expressionserhöhung von Cyp19 und verstärkter Synthese von Estradiol und Estron. Ebenfalls war eine Expressionszunahme von LHR feststellbar. TCDD und DEHP reduzierten die Synthese von Estradiol additiv und für beide Signalwege konnte ein beschleunigter Estradiolkatabolismus gezeigt werden. Abhängig von einer FSH-Stimulation wies DEHP unterschiedliche Effekte auf die Gonadotropinrezeptoren auf. So führte DEHP nativ zu einer PPAR-abhängigen erhöhten Expression von LHR, während sie mit FSH vermindert war. Der FSHR wurde durch DEHP geringer exprimiert.

Insbesondere die DEHP-vermittelten Effekte auf die Gonadotropinrezeptoren müssen weiter untersucht werden, da die unterschiedlichen Auswirkungen in Abhängigkeit vom Aktivierungsgrad der Granulosazellen in Zusammenschau mit aktueller Literatur nahelegen, dass die Phthalat-vermittelte Estradiolsyntheseminderung in Granulosazellen cAMP-unabhängig ist. Dies lässt auf eine Interaktion von DEHP mit genomischen Effekten der FSH-Signalkaskade schließen.

DEHP reguliert die AhR-Expression via PPAR γ . DEHP reduziert die Estradiolsynthese und Expression von Cyp19 und FSHR allein und synergistisch mit TCDD. DEHP beeinflusst die Ovarfunktion auf zwei Wegen: durch PPAR γ -Aktivierung und durch eine Koaktivierung des AhR. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass ubiquitär vorkommende Schadstoffe, die PPARs und AhR binden, sowohl alleine als auch kooperativ die Granulosazellfunktion negativ beeinflussen können.

6 Literatur

- 1 Giudice LC. Infertility and the environment: the medical context. *Semin Reprod Med* 2006; **24**: 129–33.
- 2 Unuane D, Tournaye H, Velkeniers B, Poppe K. Endocrine disorders & female infertility. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 2011; **25**: 861–73.
- 3 Kelly-Weeder S, Cox CL. The impact of lifestyle risk factors on female infertility. *Women Health* 2006; **44**: 1–23.
- 4 Caserta D, Mantovani A, Marci R, *et al.* Environment and women's reproductive health. *Hum Reprod Update* 2011; **17**: 418–33.
- 5 Craig ZR, Wang W, Flaws JA. Endocrine-disrupting chemicals in ovarian function: effects on steroidogenesis, metabolism and nuclear receptor signaling. *Reproduction* 2011; **142**: 633–46.
- 6 Knight PG, Glister C. TGF-beta superfamily members and ovarian follicle development. *Reproduction* 2006; **132**: 191–206.
- 7 Webb R, Campbell BK. Development of the dominant follicle: mechanisms of selection and maintenance of oocyte quality. *Soc Reprod Fertil Suppl* 2007; **64**: 141–63.
- 8 McGee EA, Hsueh AJ. Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocr Rev* 2000; **21**: 200–14.
- 9 Adhikari D, Liu K. Molecular mechanisms underlying the activation of mammalian primordial follicles. *Endocr Rev* 2009; **30**: 438–64.
- 10 Edson MA, Nagaraja AK, Matzuk MM. The Mammalian Ovary from Genesis to Revelation. *Endocr Rev* 2009; **30**: 624–712.
- 11 BLOCK E. A quantitative morphological investigation of the follicular system in newborn female infants. *Acta Anat (Basel)* 1953; **17**: 201–6.
- 12 BLOCK E. Quantitative morphological investigations of the follicular system in women; variations at different ages. *Acta Anat (Basel)* 1952; **14**: 108–23.
- 13 Bedell MA, Brannan CI, Evans EP, Copeland NG, Jenkins NA, Donovan PJ. DNA rearrangements located over 100 kb 5' of the Steel (Sl)-coding region in Steel-panda and Steel-contrasted mice deregulate Sl expression and cause female sterility by disrupting ovarian follicle development. *Genes Dev* 1995; **9**: 455–70.
- 14 Huang EJ, Manova K, Packer AI, Sanchez S, Bachvarova RF, Besmer P. The murine steel panda mutation affects kit ligand expression and growth of early ovarian follicles. *Dev Biol* 1993; **157**: 100–9.
- 15 Durlinger ALL, Gruijters MJG, Kramer P, *et al.* Anti-Müllerian hormone inhibits initiation of primordial follicle growth in the mouse ovary. *Endocrinology* 2002; **143**: 1076–84.
- 16 Durlinger AL, Kramer P, Karels B, *et al.* Control of primordial follicle recruitment by anti-Müllerian hormone in the mouse ovary. *Endocrinology* 1999; **140**: 5789–96.
- 17 Durlinger AL, Gruijters MJ, Kramer P, *et al.* Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology* 2001; **142**: 4891–9.
- 18 Visser JA, de Jong FH, Laven JSE, Themmen APN. Anti-Müllerian hormone: a new marker for ovarian function. *Reproduction* 2006; **131**: 1–9.
- 19 Kevenaar ME, Meerasahib MF, Kramer P, *et al.* Serum anti-mullerian hormone levels reflect the size of the primordial follicle pool in mice. *Endocrinology* 2006; **147**: 3228–34.
- 20 Juneja SC, Barr KJ, Enders GC, Kidder GM. Defects in the germ line and gonads of mice lacking connexin43. *Biol Reprod* 1999; **60**: 1263–70.
- 21 Simon AM, Goodenough DA, Li E, Paul DL. Female infertility in mice lacking connexin 37. *Nature* 1997; **385**: 525–9.
- 22 Nahum R, Beyth Y, Chun SY, Hsueh AJ, Tsafirri A. Early onset of deoxyribonucleic acid fragmentation during atresia of preovulatory ovarian follicles in rats. *Biol Reprod* 1996; **55**: 1075–80.
- 23 McNatty KP, Hillier SG, van den Boogaard AM, Trimpos-Kemper TC, Reichert LE Jr, van Hall EV. Follicular development during the luteal phase of the human menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 1983; **56**: 1022–31.

- 24 Diaz FJ, Wigglesworth K, Eppig JJ. Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *J Cell Sci* 2007; **120**: 1330–40.
- 25 Richards JS, Russell DL, Ochsner S, *et al.* Novel signaling pathways that control ovarian follicular development, ovulation, and luteinization. *Recent Prog Horm Res* 2002; **57**: 195–220.
- 26 Ulloa-Aguirre A, Zariñán T, Pasapera AM, Casas-González P, Dias JA. Multiple facets of follicle-stimulating hormone receptor function. *Endocrine* 2007; **32**: 251–63.
- 27 Wayne CM, Fan H-Y, Cheng X, Richards JS. Follicle-stimulating hormone induces multiple signaling cascades: evidence that activation of Rous sarcoma oncogene, RAS, and the epidermal growth factor receptor are critical for granulosa cell differentiation. *Mol Endocrinol* 2007; **21**: 1940–57.
- 28 Baker J, Hardy MP, Zhou J, *et al.* Effects of an Igf1 gene null mutation on mouse reproduction. *Mol Endocrinol* 1996; **10**: 903–18.
- 29 Sicinski P, Donaher JL, Geng Y, *et al.* Cyclin D2 is an FSH-responsive gene involved in gonadal cell proliferation and oncogenesis. *Nature* 1996; **384**: 470–4.
- 30 Fauser BC, Van Heusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev* 1997; **18**: 71–106.
- 31 Hillier SG. Regulatory functions for inhibin and activin in human ovaries. *J Endocrinol* 1991; **131**: 171–5.
- 32 Miró F, Hillier SG. Modulation of granulosa cell deoxyribonucleic acid synthesis and differentiation by activin. *Endocrinology* 1996; **137**: 464–8.
- 33 Harlow CR, Davidson L, Burns KH, Yan C, Matzuk MM, Hillier SG. FSH and TGF-beta superfamily members regulate granulosa cell connective tissue growth factor gene expression in vitro and in vivo. *Endocrinology* 2002; **143**: 3316–25.
- 34 Laven JSE, Fauser BCJM. Inhibins and adult ovarian function. *Mol Cell Endocrinol* 2004; **225**: 37–44.
- 35 Zeleznik AJ, Hutchinson JS, Schuler HM. Passive immunization with anti-oestradiol antibodies during the luteal phase of the menstrual cycle potentiates the perimenstrual rise in serum gonadotrophin concentrations and stimulates follicular growth in the cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*). *J Reprod Fertil* 1987; **80**: 403–10.
- 36 Magoffin DA. Ovarian theca cell. *Int J Biochem Cell Biol* 2005; **37**: 1344–9.
- 37 Britt KL, Drummond AE, Cox VA, *et al.* An age-related ovarian phenotype in mice with targeted disruption of the Cyp 19 (aromatase) gene. *Endocrinology* 2000; **141**: 2614–23.
- 38 Prossnitz ER, Arterburn JB, Smith HO, Oprea TI, Sklar LA, Hathaway HJ. Estrogen signaling through the transmembrane G protein-coupled receptor GPR30. *Annu Rev Physiol* 2008; **70**: 165–90.
- 39 Britt KL, Findlay JK. Regulation of the phenotype of ovarian somatic cells by estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **202**: 11–7.
- 40 Taniguchi F, Couse JF, Rodriguez KF, Emmen JMA, Poirier D, Korach KS. Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression. *FASEB J* 2007; **21**: 586–95.
- 41 Couse JF, Yates MM, Deroo BJ, Korach KS. Estrogen receptor-beta is critical to granulosa cell differentiation and the ovulatory response to gonadotropins. *Endocrinology* 2005; **146**: 3247–62.
- 42 Chabrolle C, Tosca L, Ramé C, Lecomte P, Royère D, Dupont J. Adiponectin increases insulin-like growth factor I-induced progesterone and estradiol secretion in human granulosa cells. *Fertil Steril* 2009; **92**: 1988–96.
- 43 Huang Q, Cheung AP, Zhang Y, Huang H-F, Auersperg N, Leung PCK. Effects of growth differentiation factor 9 on cell cycle regulators and ERK42/44 in human granulosa cell proliferation. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2009; **296**: E1344–1353.
- 44 Erickson GF. Primary cultures of ovarian cells in serum-free medium as models of hormone-dependent differentiation. *Mol Cell Endocrinol* 1983; **29**: 21–49.
- 45 Breckwoldt M, Selvaraj N, Aharoni D, *et al.* Expression of Ad4-BP/cytochrome P450 side chain cleavage enzyme and induction of cell death in long-term cultures of human granulosa cells. *Mol Hum Reprod* 1996; **2**: 391–400.

- 46 Lindeberg M, Carlström K, Ritvos O, Hovatta O. Gonadotrophin stimulation of non-luteinized granulosa cells increases steroid production and the expression of enzymes involved in estrogen and progesterone synthesis. *Hum Reprod* 2007; **22**: 401–6.
- 47 Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. Ovarian granulosa cell lines. *Mol Cell Endocrinol* 2004; **228**: 67–78.
- 48 Ohno S, Yukinawa F, Noda M, Nakajin S. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate induces NR4A subfamily and GIOT-1 gene expression, and suppresses CYP19 expression in human granulosa-like tumor cell line KGN. *Toxicol Lett* 2009; **191**: 353–9.
- 49 Nishi Y, Yanase T, Mu Y, *et al.* Establishment and characterization of a steroidogenic human granulosa-like tumor cell line, KGN, that expresses functional follicle-stimulating hormone receptor. *Endocrinology* 2001; **142**: 437–45.
- 50 Miyoshi T, Otsuka F, Suzuki J, *et al.* Mutual regulation of follicle-stimulating hormone signaling and bone morphogenetic protein system in human granulosa cells. *Biol Reprod* 2006; **74**: 1073–82.
- 51 Horling K, Santos AN, Fischer B. The AhR is constitutively activated and affects granulosa cell features in the human cell line KGN. *Mol Hum Reprod* 2011; **17**: 104–14.
- 52 Rosario R, Araki H, Print CG, Shelling AN. The transcriptional targets of mutant FOXL2 in granulosa cell tumours. *PLoS ONE* 2012; **7**: e46270.
- 53 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* 1976; **251**: 4936–46.
- 54 Hahn ME. Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact* 2002; **141**: 131–60.
- 55 Hahn ME. The aryl hydrocarbon receptor: a comparative perspective. *Comp Biochem Physiol C, Pharmacol Toxicol Endocrinol* 1998; **121**: 23–53.
- 56 Baba T, Mimura J, Nakamura N, *et al.* Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 10040–51.
- 57 Rowlands JC, Gustafsson JA. Aryl hydrocarbon receptor-mediated signal transduction. *Crit Rev Toxicol* 1997; **27**: 109–34.
- 58 Nguyen LP, Bradfield CA. The search for endogenous activators of the aryl hydrocarbon receptor. *Chem Res Toxicol* 2008; **21**: 102–16.
- 59 Peters JM, Narotsky MG, Elizondo G, Fernandez-Salguero PM, Gonzalez FJ, Abbott BD. Amelioration of TCDD-induced teratogenesis in aryl hydrocarbon receptor (AhR)-null mice. *Toxicol Sci* 1999; **47**: 86–92.
- 60 Safe S, Bandiera S, Sawyer T, *et al.* PCBs: structure-function relationships and mechanism of action. *Environ Health Perspect* 1985; **60**: 47–56.
- 61 Safe S. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems. *Environ Health Perspect* 1993; **100**: 259–68.
- 62 Conney AH. Induction of microsomal enzymes by foreign chemicals and carcinogenesis by polycyclic aromatic hydrocarbons: G. H. A. Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 1982; **42**: 4875–917.
- 63 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* 1982; **22**: 517–54.
- 64 Sawyer T, Safe S. PCB isomers and congeners: induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin O-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells. *Toxicol Lett* 1982; **13**: 87–93.
- 65 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* 1990; **21**: 51–88.
- 66 Poland A, Glover E. Comparison of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, a potent inducer of aryl hydrocarbon hydroxylase, with 3-methylcholanthrene. *Mol Pharmacol* 1974; **10**: 349–59.
- 67 Adachi J, Mori Y, Matsui S, *et al.* Indirubin and indigo are potent aryl hydrocarbon receptor ligands present in human urine. *J Biol Chem* 2001; **276**: 31475–8.

- 68 Peter Guengerich F, Martin MV, McCormick WA, Nguyen LP, Glover E, Bradfield CA. Aryl hydrocarbon receptor response to indigoids in vitro and in vivo. *Arch Biochem Biophys* 2004; **423**: 309–16.
- 69 Wincent E, Amini N, Luecke S, *et al.* The suggested physiologic aryl hydrocarbon receptor activator and cytochrome P4501 substrate 6-formylindolo[3,2-b]carbazole is present in humans. *J Biol Chem* 2009; **284**: 2690–6.
- 70 Opitz CA, Litzenburger UM, Sahm F, *et al.* An endogenous tumour-promoting ligand of the human aryl hydrocarbon receptor. *Nature* 2011; **478**: 197–203.
- 71 Kewley RJ, Whitelaw ML, Chapman-Smith A. The mammalian basic helix-loop-helix/PAS family of transcriptional regulators. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 189–204.
- 72 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* 1997; **272**: 8878–84.
- 73 Kazlauskas A, Sundström S, Poellinger L, Pongratz I. The hsp90 chaperone complex regulates intracellular localization of the dioxin receptor. *Mol Cell Biol* 2001; **21**: 2594–607.
- 74 Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem* 2000; **275**: 41317–24.
- 75 Carver LA, Bradfield CA. Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem* 1997; **272**: 11452–6.
- 76 Antonsson C, Whitelaw ML, McGuire J, Gustafsson JA, Poellinger L. Distinct roles of the molecular chaperone hsp90 in modulating dioxin receptor function via the basic helix-loop-helix and PAS domains. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 756–65.
- 77 Pongratz I, Mason GG, Poellinger L. Dual roles of the 90-kDa heat shock protein hsp90 in modulating functional activities of the dioxin receptor. Evidence that the dioxin receptor functionally belongs to a subclass of nuclear receptors which require hsp90 both for ligand binding activity and repression of intrinsic DNA binding activity. *J Biol Chem* 1992; **267**: 13728–34.
- 78 Ikuta T, Eguchi H, Tachibana T, Yoneda Y, Kawajiri K. Nuclear localization and export signals of the human aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem* 1998; **273**: 2895–904.
- 79 Lees MJ, Whitelaw ML. Multiple roles of ligand in transforming the dioxin receptor to an active basic helix-loop-helix/PAS transcription factor complex with the nuclear protein Arnt. *Mol Cell Biol* 1999; **19**: 5811–22.
- 80 Beischlag TV, Luis Morales J, Hollingshead BD, Perdew GH. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2008; **18**: 207–50.
- 81 Doehmer J, Holtkamp D, Soballa V, *et al.* Cytochrome P450 mediated reactions studied in genetically engineered V79 Chinese hamster cells. *Pharmacogenetics* 1995; **5 Spec No**: S91–96.
- 82 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* 2000; **21**: 1593–9.
- 83 Hayes CL, Spink DC, Spink BC, Cao JQ, Walker NJ, Sutter TR. 17 beta-estradiol hydroxylation catalyzed by human cytochrome P450 1B1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; **93**: 9776–81.
- 84 Mimura J, Ema M, Sogawa K, Fujii-Kuriyama Y. Identification of a novel mechanism of regulation of Ah (dioxin) receptor function. *Genes Dev* 1999; **13**: 20–5.
- 85 Barnett KR, Tomic D, Gupta RK, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor is required for normal gonadotropin responsiveness in the mouse ovary. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007; **223**: 66–72.
- 86 Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. , *Published online: 18 October 1990; | doi:101038/347645a0* 1990; **347**: 645–50.
- 87 Escher P, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: insight into multiple cellular functions. *Mutat Res* 2000; **448**: 121–38.
- 88 Zhu Y, Qi C, Korenberg JR, *et al.* Structural organization of mouse peroxisome proliferator-activated receptor gamma (mPPAR gamma) gene: alternative promoter use and different splicing yield two mPPAR gamma isoforms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; **92**: 7921–5.
- 89 Larsen LK, Amri E-Z, Mandrup S, Pacot C, Kristiansen K. Genomic organization of the mouse peroxisome proliferator-activated receptor beta/delta gene: alternative promoter usage and splicing yield transcripts exhibiting differential translational efficiency. *Biochem J* 2002; **366**: 767–75.

- 90 Gervois P, Torra IP, Chinetti G, *et al.* A truncated human peroxisome proliferator-activated receptor alpha splice variant with dominant negative activity. *Mol Endocrinol* 1999; **13**: 1535–49.
- 91 Brélivet Y, Rochel N, Moras D. Structural analysis of nuclear receptors: from isolated domains to integral proteins. *Mol Cell Endocrinol* 2012; **348**: 466–73.
- 92 Komar CM. Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and ovarian function—implications for regulating steroidogenesis, differentiation, and tissue remodeling. *Reprod Biol Endocrinol* 2005; **3**: 41.
- 93 Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; **20**: 649–88.
- 94 Forman BM, Chen J, Evans RM. Hypolipidemic drugs, polyunsaturated fatty acids, and eicosanoids are ligands for peroxisome proliferator-activated receptors alpha and delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997; **94**: 4312–7.
- 95 Yu K, Bayona W, Kallen CB, *et al.* Differential activation of peroxisome proliferator-activated receptors by eicosanoids. *J Biol Chem* 1995; **270**: 23975–83.
- 96 Lim H, Dey SK. A novel pathway of prostacyclin signaling-hanging out with nuclear receptors. *Endocrinology* 2002; **143**: 3207–10.
- 97 Bocher V, Pineda-Torra I, Fruchart J-C, Staels B. PPARs: transcription factors controlling lipid and lipoprotein metabolism. *Ann N Y Acad Sci* 2002; **967**: 7–18.
- 98 Kanayama T, Kobayashi N, Mamiya S, Nakanishi T, Nishikawa J. Organotin compounds promote adipocyte differentiation as agonists of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma/retinoid X receptor pathway. *Mol Pharmacol* 2005; **67**: 766–74.
- 99 Reddy JK, Reddy MK, Usman MI, Lalwani ND, Rao MS. Comparison of hepatic peroxisome proliferative effect and its implication for hepatocarcinogenicity of phthalate esters, di(2-ethylhexyl) phthalate, and di(2-ethylhexyl) adipate with a hypolipidemic drug. *Environ Health Perspect* 1986; **65**: 317–27.
- 100 Forman BM, Chen J, Evans RM. The peroxisome proliferator-activated receptors: ligands and activators. *Ann N Y Acad Sci* 1996; **804**: 266–75.
- 101 Kim J-H, Yamaguchi K, Lee S-H, *et al.* Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons in the activation of early growth response-1 and peroxisome proliferator activated receptors. *Toxicol Sci* 2005; **85**: 585–93.
- 102 Huang TH-W, Kota BP, Razmovski V, Roufogalis BD. Herbal or natural medicines as modulators of peroxisome proliferator-activated receptors and related nuclear receptors for therapy of metabolic syndrome. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2005; **96**: 3–14.
- 103 Dang Z-C, Audinot V, Papapoulos SE, Boutin JA, Löwik CWGM. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) as a molecular target for the soy phytoestrogen genistein. *J Biol Chem* 2003; **278**: 962–7.
- 104 Corton JC, Lapinskas PJ. Peroxisome proliferator-activated receptors: mediators of phthalate ester-induced effects in the male reproductive tract? *Toxicol Sci* 2005; **83**: 4–17.
- 105 Chapman MJ. Fibrates in 2003: therapeutic action in atherogenic dyslipidaemia and future perspectives. *Atherosclerosis* 2003; **171**: 1–13.
- 106 Lehmann JM, Moore LB, Smith-Oliver TA, Wilkison WO, Willson TM, Kliewer SA. An antidiabetic thiazolidinedione is a high affinity ligand for peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR gamma). *J Biol Chem* 1995; **270**: 12953–6.
- 107 Hurst CH, Waxman DJ. Activation of PPARalpha and PPARgamma by environmental phthalate monoesters. *Toxicol Sci* 2003; **74**: 297–308.
- 108 Lampen A, Zimnik S, Nau H. Teratogenic phthalate esters and metabolites activate the nuclear receptors PPARs and induce differentiation of F9 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 2003; **188**: 14–23.
- 109 Maloney EK, Waxman DJ. trans-Activation of PPARalpha and PPARgamma by structurally diverse environmental chemicals. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **161**: 209–18.
- 110 Lapinskas PJ, Brown S, Leesnitzer LM, *et al.* Role of PPARalpha in mediating the effects of phthalates and metabolites in the liver. *Toxicology* 2005; **207**: 149–63.
- 111 Venkata NG, Robinson JA, Cabot PJ, Davis B, Monteith GR, Roberts-Thomson SJ. Mono(2-ethylhexyl)phthalate and mono-n-butyl phthalate activation of peroxisome proliferator activated-receptors alpha and gamma in breast. *Toxicol Lett* 2006; **163**: 224–34.

- 112 Main KM, Mortensen GK, Kaleva MM, *et al.* Human breast milk contamination with phthalates and alterations of endogenous reproductive hormones in infants three months of age. *Environ Health Perspect* 2006; **114**: 270–6.
- 113 Hines EP, Calafat AM, Silva MJ, Mendola P, Fenton SE. Concentrations of phthalate metabolites in milk, urine, saliva, and Serum of lactating North Carolina women. *Environ Health Perspect* 2009; **117**: 86–92.
- 114 Motojima K, Passilly P, Peters JM, Gonzalez FJ, Latruffe N. Expression of putative fatty acid transporter genes are regulated by peroxisome proliferator-activated receptor alpha and gamma activators in a tissue- and inducer-specific manner. *J Biol Chem* 1998; **273**: 16710–4.
- 115 Gulick T, Cresci S, Caira T, Moore DD, Kelly DP. The peroxisome proliferator-activated receptor regulates mitochondrial fatty acid oxidative enzyme gene expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; **91**: 11012–6.
- 116 Tontonoz P, Hu E, Spiegelman BM. Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell* 1994; **79**: 1147–56.
- 117 Sears IB, MacGinnitie MA, Kovacs LG, Graves RA. Differentiation-dependent expression of the brown adipocyte uncoupling protein gene: regulation by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Mol Cell Biol* 1996; **16**: 3410–9.
- 118 Tontonoz P, Graves RA, Budavari AI, *et al.* Adipocyte-specific transcription factor ARF6 is a heterodimeric complex of two nuclear hormone receptors, PPAR gamma and RXR alpha. *Nucleic Acids Res* 1994; **22**: 5628–34.
- 119 Tontonoz P, Hu E, Devine J, Beale EG, Spiegelman BM. PPAR gamma 2 regulates adipose expression of the phosphoenolpyruvate carboxykinase gene. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 351–7.
- 120 Mueller E, Sarraf P, Tontonoz P, *et al.* Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol Cell* 1998; **1**: 465–70.
- 121 Elstner E, Müller C, Koshizuka K, *et al.* Ligands for peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoic acid receptor inhibit growth and induce apoptosis of human breast cancer cells in vitro and in BNX mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**: 8806–11.
- 122 Staels B, Dallongeville J, Auwerx J, Schoonjans K, Leitersdorf E, Fruchart J-C. Mechanism of Action of Fibrates on Lipid and Lipoprotein Metabolism. *Circulation* 1998; **98**: 2088–93.
- 123 Sacks FM. The relative role of low-density lipoprotein cholesterol and high-density lipoprotein cholesterol in coronary artery disease: evidence from large-scale statin and fibrate trials. *Am J Cardiol* 2001; **88**: 14N–18N.
- 124 Saltiel AR, Olefsky JM. Thiazolidinediones in the treatment of insulin resistance and type II diabetes. *Diabetes* 1996; **45**: 1661–9.
- 125 Maggs DG, Buchanan TA, Burant CF, *et al.* Metabolic effects of troglitazone monotherapy in type 2 diabetes mellitus. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Ann Intern Med* 1998; **128**: 176–85.
- 126 Fonseca V, Rosenstock J, Patwardhan R, Salzman A. Effect of metformin and rosiglitazone combination therapy in patients with type 2 diabetes mellitus: a randomized controlled trial. *JAMA* 2000; **283**: 1695–702.
- 127 Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. The PPARalpha-leukotriene B4 pathway to inflammation control. *Nature* 1996; **384**: 39–43.
- 128 Staels B, Koenig W, Habib A, *et al.* Activation of human aortic smooth-muscle cells is inhibited by PPARalpha but not by PPARgamma activators. *Nature* 1998; **393**: 790–3.
- 129 Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF-kappa B and AP-1. *J Biol Chem* 1999; **274**: 32048–54.
- 130 Ricote M, Li AC, Willson TM, Kelly CJ, Glass CK. The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a negative regulator of macrophage activation. *Nature* 1998; **391**: 79–82.
- 131 Nolte RT, Wisely GB, Westin S, *et al.* Ligand binding and co-activator assembly of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma. *Nature* 1998; **395**: 137–43.
- 132 Feige JN, Gelman L, Tudor C, Engelborghs Y, Wahli W, Desvergne B. Fluorescence imaging reveals the nuclear behavior of peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor heterodimers in the absence and presence of ligand. *J Biol Chem* 2005; **280**: 17880–90.

- 133 Spencer TE, Jenster G, Burcin MM, *et al.* Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 1997; **389**: 194–8.
- 134 Chakravarti D, LaMorte VJ, Nelson MC, *et al.* Role of CBP/P300 in nuclear receptor signalling. *Nature* 1996; **383**: 99–103.
- 135 Hewitt DP, Mark PJ, Waddell BJ. Placental expression of peroxisome proliferator-activated receptors in rat pregnancy and the effect of increased glucocorticoid exposure. *Biol Reprod* 2006; **74**: 23–8.
- 136 Hinds TD Jr, Stechschulte LA, Cash HA, *et al.* Protein phosphatase 5 mediates lipid metabolism through reciprocal control of glucocorticoid receptor and peroxisome proliferator-activated receptor- γ (PPAR γ). *J Biol Chem* 2011; **286**: 42911–22.
- 137 Huang W, Glass CK. Nuclear receptors and inflammation control: molecular mechanisms and pathophysiological relevance. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2010; **30**: 1542–9.
- 138 Yuan C, Nguyen P, Baxter JD, Webb P. Distinct ligand-dependent and independent modes of thyroid hormone receptor (TR)/PGC-1 α interaction. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2013; **133**: 58–65.
- 139 Wege N, Schutkowski A, König B, Brandsch C, Weiwad M, Stangl GI. PPAR α modulates the TSH β -subunit mRNA expression in thyrotrope T α T1 cells and in a mouse model. *Mol Nutr Food Res* 2013; **57**: 376–89.
- 140 Jow L, Mukherjee R. The human peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) subtype NUC1 represses the activation of hPPAR alpha and thyroid hormone receptors. *J Biol Chem* 1995; **270**: 3836–40.
- 141 Benedict JC, Lin TM, Loeffler IK, Peterson RE, Flaws JA. Physiological role of the aryl hydrocarbon receptor in mouse ovary development. *Toxicol Sci* 2000; **56**: 382–8.
- 142 Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, *et al.* Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science* 1995; **268**: 722–6.
- 143 Gonzalez FJ, Fernandez-Salguero P, Lee SS, Pineau T, Ward JM. Xenobiotic receptor knockout mice. *Toxicol Lett* 1995; **82-83**: 117–21.
- 144 Abbott BD, Schmid JE, Pitt JA, *et al.* Adverse reproductive outcomes in the transgenic Ah receptor-deficient mouse. *Toxicol Appl Pharmacol* 1999; **155**: 62–70.
- 145 Robles R, Morita Y, Mann KK, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology* 2000; **141**: 450–3.
- 146 Matikainen TM, Moriyama T, Morita Y, *et al.* Ligand activation of the aromatic hydrocarbon receptor transcription factor drives Bax-dependent apoptosis in developing fetal ovarian germ cells. *Endocrinology* 2002; **143**: 615–20.
- 147 Matikainen T, Perez GI, Jurisicova A, *et al.* Aromatic hydrocarbon receptor-driven Bax gene expression is required for premature ovarian failure caused by biohazardous environmental chemicals. *Nat Genet* 2001; **28**: 355–60.
- 148 Hernández-Ochoa I, Karman BN, Flaws JA. The role of the aryl hydrocarbon receptor in the female reproductive system. *Biochemical Pharmacology* 2009; **77**: 547–59.
- 149 Bussmann UA, Bussmann LE, Baraño JL. An aryl hydrocarbon receptor agonist amplifies the mitogenic actions of estradiol in granulosa cells: evidence of involvement of the cognate receptors. *Biol Reprod* 2006; **74**: 417–26.
- 150 Benedict JC, Miller KP, Lin T-M, *et al.* Aryl hydrocarbon receptor regulates growth, but not atresia, of mouse preantral and antral follicles. *Biol Reprod* 2003; **68**: 1511–7.
- 151 Heimler I, Trewin AL, Chaffin CL, Rawlins RG, Hutz RJ. Modulation of ovarian follicle maturation and effects on apoptotic cell death in Holtzman rats exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in utero and lactationally. *Reprod Toxicol* 1998; **12**: 69–73.
- 152 Dasmahapatra AK, Wimpee BA, Trewin AL, Wimpee CF, Ghorai JK, Hutz RJ. Demonstration of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin attenuation of P450 steroidogenic enzyme mRNAs in rat granulosa cell in vitro by competitive reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Mol Cell Endocrinol* 2000; **164**: 5–18.
- 153 Grochowalski A, Chrzaszcz R, Pieklo R, Gregoraszczyk EL. Estrogenic and antiestrogenic effect of in vitro treatment of follicular cells with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Chemosphere* 2001; **43**: 823–7.

- 154 Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, *et al.* Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of follicle-stimulating hormone receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Endocrinology* 2000; **141**: 1470–6.
- 155 Hirakawa T, Minegishi T, Abe K, Kishi H, Ibuki Y, Miyamoto K. Effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin on the expression of luteinizing hormone receptors during cell differentiation in cultured granulosa cells. *Arch Biochem Biophys* 2000; **375**: 371–6.
- 156 Ehrmann DA, Schneider DJ, Sobel BE, *et al.* Troglitazone improves defects in insulin action, insulin secretion, ovarian steroidogenesis, and fibrinolysis in women with polycystic ovary syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; **82**: 2108–16.
- 157 Norman RJ, Dewailly D, Legro RS, Hickey TE. Polycystic ovary syndrome. *The Lancet* 2007; **370**: 685–97.
- 158 Poretsky L, Cataldo NA, Rosenwaks Z, Giudice LC. The insulin-related ovarian regulatory system in health and disease. *Endocr Rev* 1999; **20**: 535–82.
- 159 Lee SS, Pineau T, Drago J, *et al.* Targeted disruption of the alpha isoform of the peroxisome proliferator-activated receptor gene in mice results in abolishment of the pleiotropic effects of peroxisome proliferators. *Mol Cell Biol* 1995; **15**: 3012–22.
- 160 Barak Y, Liao D, He W, *et al.* Effects of peroxisome proliferator-activated receptor delta on placenta, adiposity, and colorectal cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 303–8.
- 161 Froment P, Fabre S, Dupont J, *et al.* Expression and functional role of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma in ovarian folliculogenesis in the sheep. *Biol Reprod* 2003; **69**: 1665–74.
- 162 Lovekamp-Swan T, Chaffin CL. The peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligand troglitazone induces apoptosis and p53 in rat granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2005; **233**: 15–24.
- 163 Barak Y, Nelson MC, Ong ES, *et al.* PPAR gamma is required for placental, cardiac, and adipose tissue development. *Mol Cell* 1999; **4**: 585–95.
- 164 Barak Y, Kim S. Genetic manipulations of PPARs: effects on obesity and metabolic disease. *PPAR Res* 2007; **2007**: 12781.
- 165 Primer3Plus. <http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi> (accessed 21 Jun2012).
- 166 Ensembl Genome Browser. <http://www.ensembl.org/index.html> (accessed 21 Jun2012).
- 167 Nucleotide BLAST: Search nucleotide databases using a nucleotide query. http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=mega-Blast&PAGE_TYPE=BlastSearch&SHOW_DEFAULTS=on&LINK_LOC=blasthome (accessed 21 Jun2012).
- 168 Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; **72**: 248–54.
- 169 Rusyn I, Peters JM, Cunningham ML. Modes of action and species-specific effects of di-(2-ethylhexyl)phthalate in the liver. *Crit Rev Toxicol* 2006; **36**: 459–79.
- 170 Di Domenico A, Silano V, Viviano G, Zapponi G. Accidental release of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) at Sèveso, Italy. II. TCDD distribution in the soil surface layer. *Ecotoxicol Environ Saf* 1980; **4**: 298–320.
- 171 Young AL, Giesy JP, Jones PD, Newton M. Environmental fate and bioavailability of Agent Orange and its associated dioxin during the Vietnam War. *Environ Sci Pollut Res Int* 2004; **11**: 359–70.
- 172 Blanck HM, Marcus M, Tolbert PE, *et al.* Age at menarche and tanner stage in girls exposed in utero and postnatally to polybrominated biphenyl. *Epidemiology* 2000; **11**: 641–7.
- 173 Eskenazi B, Warner M, Marks AR, *et al.* Serum dioxin concentrations and time to pregnancy. *Epidemiology* 2010; **21**: 224–31.
- 174 Warner M, Eskenazi B, Mocarelli P, *et al.* Serum dioxin concentrations and breast cancer risk in the Seveso Women’s Health Study. *Environ Health Perspect* 2002; **110**: 625–8.
- 175 Bruner-Tran KL, Osteen KG. Dioxin-like PCBs and endometriosis. *Syst Biol Reprod Med* 2010; **56**: 132–46.
- 176 Pauwels A, Schepens PJ, D’Hooghe T, *et al.* The risk of endometriosis and exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls: a case-control study of infertile women. *Hum Reprod* 2001; **16**: 2050–5.

- 177 Simsa P, Mihalyi A, Schoeters G, *et al.* Increased exposure to dioxin-like compounds is associated with endometriosis in a case-control study in women. *Reprod Biomed Online* 2010; **20**: 681–8.
- 178 Wittsiepe J, Fürst P, Schrey P, *et al.* PCDD/F and dioxin-like PCB in human blood and milk from German mothers. *Chemosphere* 2007; **67**: S286–294.
- 179 Cao Y, Winneke G, Wilhelm M, *et al.* Environmental exposure to dioxins and polychlorinated biphenyls reduce levels of gonadal hormones in newborns: results from the Duisburg cohort study. *Int J Hyg Environ Health* 2008; **211**: 30–9.
- 180 Rennert A, Wittsiepe J, Kasper-Sonnenberg M, *et al.* Prenatal and early life exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins, dibenzofurans and biphenyls may influence dehydroepiandrosterone sulfate levels at prepubertal age: results from the Duisburg birth cohort study. *J Toxicol Environ Health Part A* 2012; **75**: 1232–40.
- 181 Hauser R, Meeker JD, Duty S, Silva MJ, Calafat AM. Altered semen quality in relation to urinary concentrations of phthalate monoester and oxidative metabolites. *Epidemiology* 2006; **17**: 682–91.
- 182 Green R, Hauser R, Calafat AM, *et al.* Use of di(2-ethylhexyl) phthalate-containing medical products and urinary levels of mono(2-ethylhexyl) phthalate in neonatal intensive care unit infants. *Environ Health Perspect* 2005; **113**: 1222–5.
- 183 Lorber M, Angerer J, Koch HM. A simple pharmacokinetic model to characterize exposure of Americans to di-2-ethylhexyl phthalate. *J Expo Sci Environ Epidemiol* 2010; **20**: 38–53.
- 184 Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for Di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP). *US Department of Health and Human Services, Public Health Service* 2002; **Atlanta**. <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp.asp?id=684&tid=65> (accessed 3 Jan 2013).
- 185 Lovekamp-Swan T, Davis BJ. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system. *Environ Health Perspect* 2003; **111**: 139–45.
- 186 Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Angerer J. New metabolites of di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP) in human urine and serum after single oral doses of deuterium-labelled DEHP. *Arch Toxicol* 2005; **79**: 367–76.
- 187 Kazemi A, Harvey M, Cave G, Lahner D. The effect of lipid emulsion on depth of anaesthesia following thiopental administration to rabbits. *Anaesthesia* 2011; **66**: 373–8.
- 188 Silva MJ, Barr DB, Reidy JA, *et al.* Urinary levels of seven phthalate metabolites in the U.S. population from the National Health and Nutrition Examination Survey (NHANES) 1999–2000. *Environ Health Perspect* 2004; **112**: 331–8.
- 189 Takatori S, Akutsu K, Kondo F, Ishii R, Nakazawa H, Makino T. Di(2-ethylhexyl)phthalate and mono(2-ethylhexyl)phthalate in media for in vitro fertilization. *Chemosphere* 2012; **86**: 454–9.
- 190 Ambruosi B, Uranio MF, Sardanelli AM, *et al.* In vitro acute exposure to DEHP affects oocyte meiotic maturation, energy and oxidative stress parameters in a large animal model. *PLoS ONE* 2011; **6**: e27452.
- 191 Krüger T, Long M, Bonefeld-Jørgensen EC. Plastic components affect the activation of the aryl hydrocarbon and the androgen receptor. *Toxicology* 2008; **246**: 112–23.
- 192 Gupta RK, Singh JM, Leslie TC, Meachum S, Flaws JA, Yao HH-C. Di-(2-ethylhexyl) phthalate and mono-(2-ethylhexyl) phthalate inhibit growth and reduce estradiol levels of antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2010; **242**: 224–30.
- 193 Koch HM, Bolt HM, Preuss R, Eckstein R, Weisbach V, Angerer J. Intravenous exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP): metabolites of DEHP in urine after a voluntary platelet donation. *Arch Toxicol* 2005; **79**: 689–93.
- 194 Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta* 2003; **1619**: 263–8.
- 195 Froment P, Gizard F, Defever D, Staels B, Dupont J, Monget P. Peroxisome proliferator-activated receptors in reproductive tissues: from gametogenesis to parturition. *J Endocrinol* 2006; **189**: 199–209.
- 196 Ohtake F, Baba A, Takada I, *et al.* Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature* 2007; **446**: 562–6.
- 197 Abbott BD. Review of the expression of peroxisome proliferator-activated receptors alpha (PPAR alpha), beta (PPAR beta), and gamma (PPAR gamma) in rodent and human development. *Reprod*

- Toxicol* 2009; **27**: 246–57.
- 198 Baglole CJ, Maggirwar SB, Gasiewicz TA, Thatcher TH, Phipps RP, Sime PJ. The aryl hydrocarbon receptor attenuates tobacco smoke-induced cyclooxygenase-2 and prostaglandin production in lung fibroblasts through regulation of the NF-kappaB family member RelB. *J Biol Chem* 2008; **283**: 28944–57.
- 199 Villard PH, Caverni S, Baanannou A, *et al.* PPARalpha transcriptionally induces AhR expression in Caco-2, but represses AhR pro-inflammatory effects. *Biochem Biophys Res Commun* 2007; **364**: 896–901.
- 200 Chen H-S, Chiang P-H, Wang Y-C, *et al.* Benzyl butyl phthalate induces necrosis by AhR mediation of CYP1B1 expression in human granulosa cells. *Reprod Toxicol* 2012; **33**: 67–75.
- 201 Sérée E, Villard P-H, Pascussi J-M, *et al.* Evidence for a new human CYP1A1 regulation pathway involving PPAR-alpha and 2 PPRE sites. *Gastroenterology* 2004; **127**: 1436–45.
- 202 Gelman L, Feige JN, Desvergne B. Molecular basis of selective PPARgamma modulation for the treatment of Type 2 diabetes. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1771**: 1094–107.
- 203 Feige JN, Gelman L, Rossi D, *et al.* The endocrine disruptor monoethyl-hexyl-phthalate is a selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma modulator that promotes adipogenesis. *J Biol Chem* 2007; **282**: 19152–66.
- 204 Gunnarsson D, Leffler P, Ekwurtzel E, Martinsson G, Liu K, Selstam G. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate stimulates basal steroidogenesis by a cAMP-independent mechanism in mouse gonadal cells of both sexes. *Reproduction* 2008; **135**: 693–703.
- 205 Teino I, Kuuse S, Ingerpuu S, Maimets T, Tiido T. The Aryl Hydrocarbon Receptor Regulates Mouse Fshr Promoter Activity Through an E-Box Binding Site. *Biology of Reproduction* 2012; **86**: 77.
- 206 Treinen KA, Dodson WC, Heindel JJ. Inhibition of FSH-stimulated cAMP accumulation and progesterone production by mono(2-ethylhexyl) phthalate in rat granulosa cell cultures. *Toxicol Appl Pharmacol* 1990; **106**: 334–40.
- 207 Davis BJ, Weaver R, Gaines LJ, Heindel JJ. Mono-(2-ethylhexyl) phthalate suppresses estradiol production independent of FSH-cAMP stimulation in rat granulosa cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 1994; **128**: 224–8.
- 208 Valdez KE, Shi Z, Ting AY, Petroff BK. Effect of chronic exposure to the aryl hydrocarbon receptor agonist 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in female rats on ovarian gene expression. *Reprod Toxicol* 2009; **28**: 32–7.
- 209 Moyer B, Hixon ML. Reproductive effects in F1 adult females exposed in utero to moderate to high doses of mono-2-ethylhexylphthalate (MEHP). *Reprod Toxicol* 2012; **34**: 43–50.
- 210 Carnevali O, Tosti L, Speciale C, Peng C, Zhu Y, Maradonna F. DEHP impairs zebrafish reproduction by affecting critical factors in oogenesis. *PLoS One* 2010; **5**: e10201.
- 211 Li X, Johnson DC, Rozman KK. Reproductive effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in female rats: ovulation, hormonal regulation, and possible mechanism(s). *Toxicol Appl Pharmacol* 1995; **133**: 321–7.
- 212 Son DS, Ushinohama K, Gao X, *et al.* 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) blocks ovulation by a direct action on the ovary without alteration of ovarian steroidogenesis: lack of a direct effect on ovarian granulosa and thecal-interstitial cell steroidogenesis in vitro. *Reprod Toxicol* 1999; **13**: 521–30.
- 213 Petroff BK, Roby KF, Gao X, *et al.* A review of mechanisms controlling ovulation with implications for the anovulatory effects of polychlorinated dibenzo-p-dioxins in rodents. *Toxicology* 2001; **158**: 91–107.
- 214 Gasic S, Bodenbunrg Y, Nagamani M, Green A, Urban RJ. Troglitazone inhibits progesterone production in porcine granulosa cells. *Endocrinology* 1998; **139**: 4962–6.
- 215 Mu YM, Yanase T, Nishi Y, *et al.* Insulin sensitizer, troglitazone, directly inhibits aromatase activity in human ovarian granulosa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; **271**: 710–3.
- 216 Schoppee PD, Garmey JC, Veldhuis JD. Putative activation of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma impairs androgen and enhances progesterone biosynthesis in primary cultures of porcine theca cells. *Biol Reprod* 2002; **66**: 190–8.
- 217 Lohrke B, Viergutz T, Shahi SK, *et al.* Detection and functional characterisation of the transcription factor peroxisome proliferator-activated receptor gamma in lutein cells. *J Endocrinol* 1998;

- 159: 429–39.
- 218 Gasic S, Nagamani M, Green A, Urban RJ. Troglitazone is a competitive inhibitor of 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase enzyme in the ovary. *Am J Obstet Gynecol* 2001; **184**: 575–9.
- 219 Fan W, Yanase T, Morinaga H, *et al.* Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma and retinoid X receptor inhibits aromatase transcription via nuclear factor-kappaB. *Endocrinology* 2005; **146**: 85–92.
- 220 Cheshenko K, Brion F, Le Page Y, *et al.* Expression of zebra fish aromatase cyp19a and cyp19b genes in response to the ligands of estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor. *Toxicol Sci* 2007; **96**: 255–67.
- 221 Lovekamp-Swan T, Jetten AM, Davis BJ. Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 2003; **201**: 133–41.
- 222 Xu C, Chen J-A, Qiu Z, *et al.* Ovotoxicity and PPAR-mediated aromatase downregulation in female Sprague-Dawley rats following combined oral exposure to benzo[a]pyrene and di-(2-ethylhexyl) phthalate. *Toxicol Lett* 2010; **199**: 323–32.
- 223 Sasano H, Suzuki T, Nakata T, Moriya T. New development in intracrinology of breast carcinoma. *Breast Cancer* 2006; **13**: 129–36.
- 224 Pelletier G, Luu-The V, Li S, Labrie F. Localization of type 7 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase in mouse tissues. In situ hybridization studies. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2005; **93**: 49–57.
- 225 Vandenberg LN, Colborn T, Hayes TB, *et al.* Hormones and Endocrine-Disrupting Chemicals: Low-Dose Effects and Nonmonotonic Dose Responses. *Endocrine Reviews* 2012. doi:10.1210/er.2011-1050.
- 226 Karman BN, Basavarajappa MS, Craig ZR, Flaws JA. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activates the aryl hydrocarbon receptor and alters sex steroid hormone secretion without affecting growth of mouse antral follicles in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol* 2012; **261**: 88–96.
- 227 Wormke M, Stoner M, Saville B, *et al.* The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 2003; **23**: 1843–55.
- 228 Horling K. Die KGN-Zelllinie als Modell zur Untersuchung der Rolle des Arylhydrocarbon-Rezeptors für die Physiologie und Funktion von Granulosazellen. 2010.
- 229 Rüegg J, Swedenborg E, Wahlström D, *et al.* The transcription factor aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator functions as an estrogen receptor beta-selective coactivator, and its recruitment to alternative pathways mediates antiestrogenic effects of dioxin. *Mol Endocrinol* 2008; **22**: 304–16.
- 230 Keller H, Givel F, Perroud M, Wahli W. Signaling cross-talk between peroxisome proliferator-activated receptor/retinoid X receptor and estrogen receptor through estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 1995; **9**: 794–804.
- 231 Wang X, Kilgore MW. Signal cross-talk between estrogen receptor alpha and beta and the peroxisome proliferator-activated receptor gamma1 in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* 2002; **194**: 123–33.
- 232 Foryst-Ludwig A, Clemenz M, Hohmann S, *et al.* Metabolic actions of estrogen receptor beta (ERbeta) are mediated by a negative cross-talk with PPARgamma. *PLoS Genet* 2008; **4**: e1000108.
- 233 Pocar P, Fiandanese N, Secchi C, *et al.* Exposure to di(2-ethyl-hexyl) phthalate (DEHP) in utero and during lactation causes long-term pituitary-gonadal axis disruption in male and female mouse offspring. *Endocrinology* 2012; **153**: 937–48.
- 234 Takai R, Hayashi S, Kiyokawa J, *et al.* Collaborative work on evaluation of ovarian toxicity. 10) Two- or four-week repeated dose studies and fertility study of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) in female rats. *J Toxicol Sci* 2009; **34 Suppl 1**: SP111–119.
- 235 Lee K-Y, Shibutani M, Takagi H, *et al.* Diverse developmental toxicity of di-n-butyl phthalate in both sexes of rat offspring after maternal exposure during the period from late gestation through lactation. *Toxicology* 2004; **203**: 221–38.
- 236 Colón I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O. Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 2000; **108**: 895–900.
- 237 Larriuz-Serrano MC, Pérez-Cardona CM, Ramos-Valencia G, Bourdony CJ. Natural history and incidence of premature thelarche in Puerto Rican girls aged 6 months to 8 years diagnosed between 1990 and 1995. *P R Health Sci J* 2001; **20**: 13–8.

-
- 238 McKee RH. Phthalate Exposure and Early Thelarche. *Environ Health Perspect* 2004; **112**: A541–A543.
- 239 Komar CM, Braissant O, Wahli W, Curry J. Expression and localization of PPARs in the rat ovary during follicular development and the periovulatory period. *Endocrinology* 2001; **142**: 4831–8.
- 240 Carbone S, Samaniego YA, Cutrera R, *et al.* Different effects by sex on hypothalamic–pituitary axis of prepubertal offspring rats produced by in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP). *NeuroToxicology* 2012; **33**: 78–84.
- 241 Mlynarčíková A, Nagyová E, Ficková M, Scsuková S. Effects of selected endocrine disruptors on meiotic maturation, cumulus expansion, synthesis of hyaluronan and progesterone by porcine oocyte–cumulus complexes. *Toxicology in Vitro* 2009; **23**: 371–7.
- 242 Pocar P, Brevini TA, Fischer B, Gandolfi F. The impact of endocrine disruptors on oocyte competence. *Reproduction* 2003; **125**: 313–25.
- 243 Zhang X-F, Zhang L-J, Li L, *et al.* Diethylhexyl phthalate exposure impairs follicular development and affects oocyte maturation in the mouse. *Environ Mol Mutagen* 2013. doi:10.1002/em.21776.
- 244 Higgins LS, Depaoli AM. Selective peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR-gamma) modulation as a strategy for safer therapeutic PPARgamma activation. *Am J Clin Nutr* 2010. doi: 10.3945/ajcn.2009.28449E.

7 Thesen

1. KGN-Zellen metabolisieren DEHP (Diethylhexylphthalat) zu MEHP (Monoethylhexylphthalat).
2. KGN-Zellen exprimieren PPAR α (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) und PPAR γ . Diese Signalwege sind funktionell aktiv.
3. Die PPAR-Signalwege werden durch DEHP aktiviert.
4. Die AhR -Signalkaskade (Arylhydrocarbon-Rezeptor) ist funktionell aktiv.
5. Die DEHP-vermittelte AhR-Aktivierung ist PPAR γ -abhängig.
6. Die FSH-Stimulation (Follikel stimulierendes Hormon) erhöht das Aktivierungsniveau der KGN-Zellen.
7. TCDD (Tetrachlorodibenzodioxin) und DEHP hemmen additiv die Estradiolbiosynthese.
8. Zusätzlich wird die Estradiol-Metabolisierung beschleunigt.
9. Die zelluläre Reaktion der KGN-Zellen auf DEHP ist insbesondere für LHR (Luteinisierendes Hormon Rezeptor) abhängig von externer Stimulation mittels FSH.
10. Trotz teilweise konträrer Daten sollte von einer Expressionshemmung des FSH-Rezeptors durch DEHP ausgegangen werden. Die beobachtete Hemmung der Estradiolbiosynthese ist aber nicht durch geänderte FSH-Sensitivität zu erklären, da es a) auch ohne FSH zu beobachten ist und b) es Literaturhinweise für eine Unabhängigkeit von cAMP (zyklisches Adenosimonophosphate) gibt.
11. DEHP vermittelt Effekte in Granulosazellen auf zwei Wegen: erstens durch PPAR γ -Aktivierung und zweitens durch Koaktivierung des AhR.
12. Die Wechselwirkung des AhR und der PPARs verstärkt die adversen Effekte, die beide einzeln vermitteln.
13. Mit DEHP bzw. MEHP wird keine eindeutige PPAR α - oder PPAR γ -Reaktion in KGN provoziert, vielmehr scheinen diese als eine selektive PPAR α - und PPAR γ -Modulation zu wirken.
14. Der AhR verhindert in Koexposition teilweise die Ausbildung DEHP-vermittelter Effekte, sodass ein Feedback auch auf die PPAR-Signalkaskade wirkt.

8 Anlagen

8.1 Lebenslauf

Persönliche Daten

Johann-Christoph Jann
geb. 02.10.1989 in Dresden
ledig

Studium

ab Oktober 2012 Studium der Medizin an der Ruprecht-Karls-Universität, Fakultät Mannheim
März 2012 Famulatur an der III. Medizinischen Klinik der Universitätsmedizin Mannheim und wissenschaftliche Mitarbeit in der MDS-Arbeitsgruppe um Herrn Prof. Hofmann
September 2011 Abschluss des Ersten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (Gesamtnote: 2,0; im Schriftlichen Teil unter den bundesweit besten 6% der Teilnehmer)
Juli 2010 Beginn mit experimentellen Arbeiten zu:
„Interaktion der Signalwege des Arylhydrocarbon-Rezeptors und der Peroxisome-Proliferator-activated-Rezeptors in humanen Granulosa-Zellen“ am Institut für Anatomie und Zellbiologie Halle (Saale)
Oktober 2009-September 2012 Studium der Medizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Seit April 2011 Stipendiat der Studienstiftung des deutschen Volkes

Praktika

August 2009 Pflegepraktikum auf der Station für Hämatologie und Onkologie der Berliner Charité Campus Benjamin Franklin
Juli 2009 Praktikum auf dem Notarzteinsatzfahrzeug des DRK Dresden
Juni 2009 Pflegepraktikum auf der Station für Intensivmedizin und Anästhesie in der Asklepios-ASB- Klinik Radeberg
Nov. 2007 – Mai 2008 Zivildienst auf der Jugendakutstation des Sächsischen Krankenhaus Arnsdorf
zeitgleich Fernausbildung zum Rettungssanitäter
2005 zweiwöchiges Sozialpraktikum im Krankenhaus Dresden Friedrichstadt

Schulischer Werdegang

1996-1999 Grundschule Lohmen
1999-2000 63. Grundschule Dresden, Außenstelle Dresdner Kreuzchor
2000 – 2008 Evangelisches Kreuzgymnasium Dresden, Abschluss Allg. Hochschulreife (mit Erwerb des Latinums, Graecum und Hebraicums, Gesamtnote: 1,6)
1999 –2008 Mitgliedschaft im Dresdner Kreuzchor

8.2 Erklärungen

Selbständigkeitserklärung

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erkläre ich hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar Geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit der vorgelegten Dissertation stehen. Die Arbeit wurde bisher weder im In- und Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mannheim, 15.06.2013

Erklärung über frühere Promotionsversuche

Gemäß §6 der Promotionsordnung der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg erkläre ich hiermit, dass ich außer der vorliegenden Arbeit keine weiterer Promotionsversuche durchgeführt habe.

Mannheim, 15.06.2013

8.3 Danksagungen

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. Dr. Bernd Fischer für das Vertrauen, mich an diesem interessanten Projekt arbeiten zu lassen und mir früh die Möglichkeit gab, meine Promotion am Institut für Anatomie und Zellbiologie anzufertigen.

Darüber hinaus war für mich die Erfahrung des grundlegend wissenschaftlichen Anteils der Medizin sehr prägend, was meinen Lebensweg sicher langfristig lenken wird.

Für das Vorleben eines strukturierten akademischen, universitären und wissenschaftlichen Schaffens möchte ich Ihm ebenfalls danken.

Ein besonderer Dank gilt Frau Dr. Jana Ernst für deren stetige Betreuung meiner praktischen Arbeit für die ich mich nachhaltig und ausdrücklich bedanken möchte, nicht zuletzt weil sie mir die Möglichkeit gab, selbstständig zu arbeiten.

Ebenfalls danke ich Frau PD Dr. Navarrete Santos, deren Anmerkungen und Hinweise immer äußerst wertvoll gewesen waren und ich ihre Wendigkeit und andauernde Hilfsbereitschaft keinesfalls als selbstverständlich angesehen habe.

Hervorheben möchte ich Christine Fröhlich, die mich mit Geduld und Gründlichkeit in die verschiedenen molekularbiologischen Methoden eingearbeitet hat und mir ein steter Ansprechpartner im Labor war.

Dem Team der AG Fischer möchte ich besonders für das offene und freundliche Arbeitsklima danken, ebenso für die Hilfsbereitschaft und Unterstützung.

Herrn Prof. Holger Koch danke ich für die Durchführung und Auswertung der massenspektrometrischen Untersuchungen zur MEHP-Metabolisierung.

Die vorliegende Arbeit wurde durch das 7. Rahmen Programm der EU finanziell unterstützt.