

Aus der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. med. Friedrich Röpke)



Untersuchungen zur estrogenen Potenz endokrin wirksamer Umweltchemikalien an Primärkulturen humaner Endometriumzellen

Dissertation

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

vorgelegt

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

von Sabine Hippe
geboren am 14.07.1974 in Osterburg/ Altmark

Gutachter:

1. Prof. Dr. F. Röpke
2. Frau Prof. Dr. H. Foth
3. PD Dr. L. Pitzel (Göttingen)

eingereicht am: 27.09.2005

verteidigt am: 14.09.2006

urn:nbn:de:gbv:3-000010861

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000010861>]

Kurzreferat

Endokrin wirksame Umweltchemikalien mit estrogenem Potential stellen eine mögliche Gefahr für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen dar. Sie sind selbst bei Nichtexponierten in verschiedenen Geweben nachweisbar, so auch im Endometrium, in welchem vor allem das polychlorierte Biphenyl 153 (PCB153), β -Hexachlorcyclohexan (β -HCH) und 1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2-dichlorethylen (p,p'DDE) akkumuliert werden. Mit der vorliegenden Arbeit erfolgte die *in vitro* Untersuchung estrogenereffekte dieser drei Substanzen. Als Modellsystem dienten Primärkulturen humaner Endometriumepithel- und Stromazellen (EEC und ESC), zur Kontrolle wurde die MCF-7 Mammakarzinomzelllinie mitgeführt. Es erfolgte eine 72stündige Exposition aller Kulturen mit den Umweltchemikalien, sowie mit 17β -Estradiol (E2). Als Nachweismethoden für estrogenereffekte kamen sowohl der ESCREEN Assay, als auch die Quantifizierung der immunocytochemisch bestimmten Expression des Progesteronrezeptors (PR) und von Estrogenrezeptor alpha und beta ($ER\alpha$ und $ER\beta$) mittels HSCORE zum Einsatz.

Alle getesteten Substanzen zeigten proliferative Effekte im ESCREEN Assay. Diese waren bei den epithelialen Zellen (EEC und MCF-7) stärker als bei den ESC und bei allen kultivierten Zellen nach Inkubation mit E2 am deutlichsten ausgeprägt. Die Rezeptoren $ER\alpha$, $ER\beta$ und PR der EEC wurden unter Einfluss von E2 verstärkt exprimiert, ebenso nach Exposition mit PCB153. Schwächer stellte sich die Rezeptorinduktion nach Einwirkung von β -HCH dar und war nach Inkubation mit p,p'DDE nicht nachweisbar. Bei den ESC ließ sich generell ausschließlich der PR induzieren, wiederum am stärksten durch Zugaben von E2 und PCB153. Die Inkubation mit β -HCH bewirkte schwache Expressionssteigerungen dieses Rezeptors, p,p'DDE keine. Zusammengefasst waren die Reaktionen nach 72h Exposition mit PCB153 ähnlich denen des E2, wohingegen β -HCH in beiden Nachweisverfahren schwächere estrogenereffekte zeigte und p,p'DDE ausschließlich Proliferationssteigerungen, aber keine Veränderungen der Steroidrezeptorexpression hervorrief.

Die in den Expositionsversuchen eingesetzten Schadstoffkonzentrationen sind physiologisch relevant, so dass adverse Effekte dieser Substanzen auf steroidhormonregulierte Mechanismen *in vivo* möglich erscheinen. Da der Organismus aber in der Lage ist, Störungen der hormonellen Homöostase zu begegnen, erscheint eine ernsthafte Gefährdung der Reproduktionsfähigkeit unwahrscheinlich. Dennoch sollte besonders bei idiopathischen, häufig oft multifaktoriell bedingten Erkrankungen der Einfluss von Umweltschadstoffen nicht unberücksichtigt bleiben.

Hippe, Sabine: Untersuchungen zur estrogenen Potenz endokrin wirksamer Umweltchemikalien an Primärkulturen humaner Endometriumzellen. Halle, Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2005

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Symbole		Seite
1.	Einleitung	1
1.1.	Einführung in die Problematik	1
1.2.	Begriffsbestimmungen	1
1.3.	Art und Vorkommen von Xenoestrogenen	2
1.4.	Auswirkungen von Xenoestrogenen auf die Reproduktionsfähigkeit des Menschen	3
1.5.	Physiologische Estrogenregelmechanismen im Endometrium	4
1.6.	Auswahl der Testsubstanzen	6
1.6.1.	Das PCB153	6
1.6.2.	Das β -HCH	7
1.6.3.	Das p,p'-DDE	7
1.7.	Auswahl von Modellsystem und Nachweisverfahren	8
2.	Zielsetzung der Arbeit	10
3.	Materialien und Methoden	11
3.1.	Materialien	11
3.1.1.	Chemikalien	11
3.1.2.	Materialien für die Zellkultur	11
3.1.3.	Materialien für die Immunocytochemie	12
3.1.4.	Geräte	12
3.2.	Methoden	12
3.2.1.	Die Zellkultivierung	12
3.2.2.	Die Expositionsuntersuchungen	14
3.2.3.	Die immunocytochemischen Untersuchungen	14
3.2.4.	Der ESCREEN Assay	16
4.	Ergebnisse	18
4.1.	Ergebnisse der Zellkultivierungen	18
4.1.1.	Kultivierung und Charakterisierung endometrialer Epithelzellen	18
4.1.2.	Kultivierung und Charakterisierung endometrialer Stromazellen	20

4.1.3.	Kultivierung der MCF-7 Mammakarzinomzelllinie	21
4.2.	Ergebnisse der immuncytochemischen Rezeptorbestimmungen	22
4.2.1.	Rezeptorexpression der endometrialen Epithelzellen	22
4.2.2.	Rezeptorexpression der endometrialen Stromazellen	23
4.2.3.	Rezeptorexpression der MCF-7 Zellen	24
4.3.	Ergebnisse der Steroidrezeptorquantifizierungen	25
4.3.1.	Steroidrezeptorquantifizierung nach Exposition der endometrialen Epithelzellkulturen	25
4.3.2.	Steroidrezeptorquantifizierung nach Exposition der endometrialen Stromazellkulturen	27
4.4.	Ergebnisse der immuncytochemischen Proliferationsbestimmungen	29
4.4.1.	Ki67 Expression der endometrialen Epithelzellkulturen	29
4.4.2.	Ki67 Expression der endometrialen Stromazellkulturen	31
4.4.3.	Ki67 Expression der MCF-7 Zelllinie	32
4.5.	Ergebnisse des ESCREEN Assays	32
4.5.1.	ESCREEN Assay nach Exposition der endometrialen Epithelzellkulturen	33
4.5.2.	ESCREEN Assay nach Exposition der endometrialen Stromazellkulturen	37
4.5.3.	ESCREEN Assay nach Exposition der MCF-7 Zelllinie	41
5.	Diskussion	45
5.1.	Auswertung der Zielsetzung der Arbeit	45
5.2.	Auswertung der angewandten Methoden	45
5.2.1.	Methodische Aspekte der Zellkultivierung	45
5.2.2.	Methodische Aspekte immuncytochemischer Untersuchungen	46
5.2.3.	Methodische Aspekte des ESCREEN Assay	47
5.3.	Auswertung der Ergebnisse	48
5.3.1.	Beurteilung der Zellkulturen	48
5.3.2.	Beurteilung der immuncytochemischen Bestimmungen	50
5.3.3.	Beurteilung der Ergebnisse des ESCREEN Assays	53
5.4.	Molekulare Wirkmechanismen von Estrogenen	55
5.4.1.	Interaktionen mit dem Estrogenrezeptor	55
5.4.2.	Molekulare Mechanismen der Proliferationssteigerung	57
5.5.	Interpretation der Ergebnisse und Versuch der Beschreibung spezieller molekularer Wirkmechanismen	58
5.5.1.	Interpretation der Ergebnisse für PCB153	58
5.5.2.	Interpretation der Ergebnisse für β -HCH	59

5.5.3.	Interpretation der Ergebnisse für p,p'DDE	60
5.6.	Beurteilung des Gefahrenpotentials endokriner Disruptoren	61
5.6.1.	Die Kontroverse „gute“ Phytoestrogene und „böse“ Xenoestrogene	61
5.6.2.	Die Frage der relevanten Konzentrationen	62
5.6.3.	Die Frage des Expositionszeitpunktes	63
5.6.4.	Die Frage der Wirkung von Stoffgemischen	64
5.7.	Abschließende Betrachtungen unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit	64
6.	Zusammenfassung	66
7.	Literaturverzeichnis	68
8.	Thesen	79

Lebenslauf

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Publikationen

Danksagung

Abkürzungen und Symbole

Abb.	Abbildung
A.dest.	destilliertes Wasser
AEC	3-Amino-9-ethylcarbazol
AP1	Activating Protein 1
bzw.	beziehungsweise
Chaperon	französisch: „die Anstandsdame“; unterstützt die reguläre Konfiguration von Proteinen
CO ₂	Kohlendioxid
d	Tag
DDR	Deutsche Demokratische Republik
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
EGF	Epidermal Growth Factor
et al.	und andere
FGF-9	Fibroblast Growth Factor 9
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
IGF-1 und 2	Insulin-like Growth Factor 1 und 2
IVF	In Vitro Fertilisation
M	Mol =Molarität in mol/l 10 ⁻¹² M= 0,001nM= 1pM 10 ⁻¹¹ M= 0,01nM= 10pM 10 ⁻¹⁰ M= 0,1nM= 100pM 10 ⁻⁹ M= 1nM 10 ⁻⁸ M= 10nM 10 ⁻⁷ M= 100nM 10 ⁻⁶ M= 1000nM= 1µM
MAP-Kinase	Mitogen- activated Protein Kinase
min	Minute
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
MW	Molekulargewicht

n	Anzahl der Versuche
NF- κ B	Nuclear Factor kappa B
NIEHS	National Institute of Environmental Health Sciences
NO(A)EL	No Observed (Adverse) Effect Level
OD	optische Dichte
o.g.	oben genannte
PC	Personal Computer
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
rpm	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s.o.	siehe oben
SP1	ein Transkriptionsfaktor
Tab.	Tabelle
TGF- β	Tumor Growth Factor beta
u.a.	unter anderem
u.ä.	und ähnliches
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Masse pro Volumen
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

1. Einleitung

1.1. Einführung in die Problematik

Mit voranschreitender Industrialisierung und der Synthese immer neuer Chemikalien für alle Bereiche des Lebens werden zunehmend warnende Stimmen laut, die einen vorsichtigeren Umgang mit diesen „Errungenschaften“ fordern. Zahlreiche Veränderungen in der Natur und der menschlichen Gesundheit schreibt man dem stärker werdenden Einfluss von Umweltchemikalien zu. Diese reichen von Klimaschwankungen, dem Aussterben von Pflanzen- und Tierarten, der steigenden Rate an Allergien, bis hin zu abnehmender Fruchtbarkeit. Das verstärkte Auftreten fertilitätsbeeinträchtigender Erkrankungen wird einer speziellen Gruppe von Umweltchemikalien angelastet: den endokrin wirksamen Substanzen. Die Schwierigkeit für die Beweisführung besteht darin, dass es sich nur selten um monokausale Zusammenhänge handelt, die eine einfache Zuordnung von Ursache und Wirkung erkennen ließen. Es sind zumeist sehr komplexe, global bzw. ganzheitlich zu betrachtende Veränderungen, deren teilweise Erforschung nicht ohne weiteres Rückschlüsse auf generelle Entwicklungen zulässt. Leider galten Forschungsarbeiten zu endokrin aktiven Umweltchemikalien lange Zeit als sehr unpopulär, gar als "funky science" (*Krimsky 2000*), so dass die Aufnahme dieser Thematik in etablierte wissenschaftliche Kreise erst Ende der achtziger Jahre des letzten Jahrhunderts gelang.

Tatsächlich lassen sich bei nahezu jedem Menschen Akkumulationen von endokrin aktiven Substanzen in zahlreichen Geweben und Körperflüssigkeiten nachweisen, wie z.B. im Fett (*Seliger et al. 1995*), Blut (*Koopman-Esseboom et al. 1994, Lehnert et al. 1994, Bates et al. 2004*), Muttermilch (*Koopman-Esseboom et al. 1994, Nakagawa et al. 1999*), Follikelflüssigkeit, Ejakulat (*Wagner et al. 1990*) und Endometrium (*Seliger et al. 1995, Kuntzsch 2000, Schaefer et al. 2000*). Unklarheit herrscht darüber, ob diese teilweise sehr geringen Konzentrationen überhaupt in der Lage sind, in hormonelle Regulationsmechanismen einzugreifen. Von besonderem Interesse erscheinen Akkumulationen endokriner Umweltchemikalien in hormonellen Zielgeweben, wie dem Endometrium, da diese direkt „vor Ort“ zu einer Störung steroidhormonregulierter Mechanismen und damit einer Beeinträchtigung der Fertilität führen könnten (*Kuntzsch 2000, Schaefer et al. 2000, Köller et al. 2004*).

1.2. Begriffsbestimmungen

Die Bezeichnungen endokrine Disruptoren, oder auch „endocrine disrupting chemicals“ (EDC) fanden erstmals durch *Colborn et al. (1993)* Eingang in die wissenschaftliche Literatur. Einige Autoren sprechen bevorzugt von endokrinen Modulatoren, oder hormonaktiven Chemikalien (*Bolt und Degen 2000, Schlumpf 2000*). *Per definitionem* handelt es sich um eine strukturell heterogene Gruppe von Substanzen, die mit der Produktion, der Freisetzung, dem Transport und Abbau, der Bindung an Rezeptoren und der Wirkung von natürlichen Hormonen interferieren (*Schlumpf 2000*). Damit sind nicht nur agonistische, sondern auch antagonistische Wirkmechanismen einbezogen (*Mueller et al. 2003*). Etwas drastischer formulierte *Weybridge*: „Endokrine Disruptoren sind exogene Substanzen, die adverse Gesundheitseffekte in intakten Organismen oder ihrem genetischen Material hervorrufen, welche zu Veränderungen ihrer endokrinen Funktionen führen“ (*aus Schlumpf 2000*). Der Großteil der hormonaktiven Chemikalien interagiert mit Sexual- oder Schilddrüsenhormonen. Die Gemeinsamkeit beider Systeme beruht darin, dass die Zielzellrezeptoren zur Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren gehören. Zuerst bekannt wurden Chemikalien, die wie das Sexualhormon Estradiol wirken, weshalb man den Begriff der Xenoestrogene eingeführt hat. Als Xenoestrogene (griechisch ξενος= fremdartig) bezeichnet man alle nicht endogen im Organismus gebildeten, estrogenartig wirkenden Substanzen. Dazu gehören auch die Phytoestrogene, die zu den sekundären Pflanzenstoffen gerechnet werden und Mykoestrogene, die entsprechend in Pilzen vorkommen. Etwas unklar ist die Situation bei den medikamentös eingesetzten synthetischen Estrogenen, die streng genommen auch zu den Xenoestrogenen gerechnet werden müssen. Generell gilt, dass es sich um Chemikalien handelt, deren endokrine Wirksamkeit aus ihrer Struktur nicht ohne weiteres ableitbar ist. Häufig findet man organische Verbindungen aus der Gruppe der polyhalogenierten aromatischen Kohlenwasserstoffe („polyhalogenated aromatic hydrocarbons“, PHAH), die auch als „persistent organic pollutants“ (POPs) bezeichnet werden. Viele der endokrin aktiven Chemikalien interferieren direkt mit steroidhormonregulierten Mechanismen, wohingegen andere bevorzugt das fremdstoffmetabolisierende System über Interaktionen mit dem Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) in Gang setzen.

1.3. Art und Vorkommen von Xenoestrogenen

Xenoestrogene sind ubiquitär verbreitet, mit zunehmender Forschungsarbeit werden immer neue Chemikalien und Wirkstoffgruppen entdeckt, die ein estrogenes Potential besitzen (Abb.1). Zu den Verbindungen anthropogener Herkunft gehören: Pestizide (1,1,1-Trichlor-2,2-bis(4-chlorphenyl)-

ethan [DDT], Nitrophen, Lindan), Industriechemikalien (polychlorierte Biphenyle [PCB], Alkylphenole, Bisphenol A, Phthalate), Arzneimittel (Ethinylestradiol), aber auch Kosmetika (UV-Schutzfilter) (Schlumpf 2000). Da die meisten dieser Substanzen aufgrund ihrer Lipophilie äußerst persistent sind, können sie sich in der Nahrungskette anreichern. Weiterhin gibt es Schwermetalle, wie Cadmium, Blei, Kupfer und Nickel, denen eine estrogenartige Wirkung nachgewiesen wurde (Safe 2003).

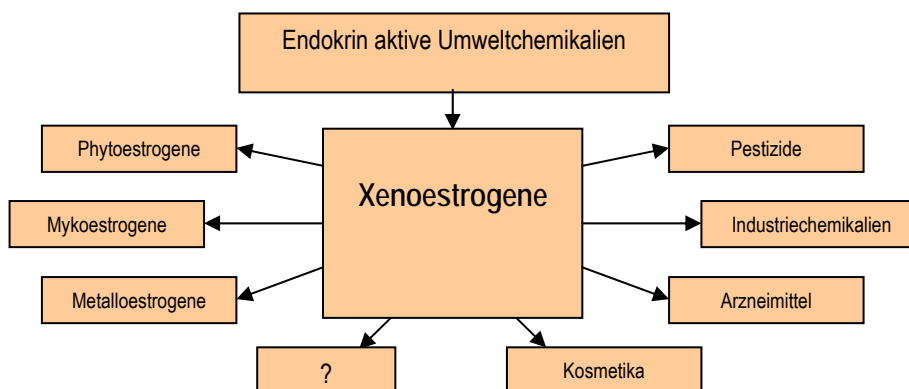


Abb.1: Art und Vorkommen von Xenoestrogenen

Zur Gruppe der Phytoestrogene gehören die Coumestane (Coumestrol) und Isoflavone (Daidzein, Genistein), vor allem in Klee und Sojaprodukten zu finden und Lignane (Enterodiol, Enterolacton), die in Leinsamen und faserreichen Lebensmitteln vorkommen. Mykoestrogene wie Zearalenon sind Schimmelpilzprodukte, die in Nahrungsmitteln als Kontaminanten verbreitet sind (Bolt und Degen 2000, Kleine-Gunk 2001). Es muss davon ausgegangen werden, dass es noch eine Vielzahl von Substanzen gibt, deren estrogenes Potential bisher nicht entdeckt wurde.

1.4. Auswirkungen von Xenoestrogenen auf die Reproduktionsfähigkeit des Menschen

Die Historie der EDC reicht zurück bis in die vierziger Jahre des letzten Jahrhunderts. Ein bedeutendes Ereignis auf dem Weg zur Erforschung endokrin wirksamer Chemikalien war die Entdeckung des synthetischen Estrogens Diethylstilbestrol (DES) im Jahr 1938 durch *Edward Charles Dodds*. Bereits ein Jahr später begann dessen Produktion und Einsatz als Medikament. Ab 1941 wurden in den USA auch schwangerschaftsassozierte Erkrankungen in die Behandlung mit DES eingeschlossen. Bis 1971 erhielten allein dort 3 Millionen Schwangere dieses synthetische Estrogen (Krimsky 2000). Erst als *Arthur Herbst* einen Zusammenhang zwischen dem gehäuften Auftreten von Adenokarzinomen der Vagina bei jungen Frauen und der Behandlung deren Mütter mit DES aufdeckte, wurde der Einsatz des Medikamentes verboten (Herbst 1981). Weitere Nachbeobachtungen wiesen

bei männlichen Nachkommen gehäuft Missbildungen des Genitaltrakts (*Gill et al. 1987*) und bei behandelten Müttern eine geringgradig erhöhte Mammakarzinominzidenz nach (*Greenberg et al. 1984*). Die Auswirkungen dieses Medikamentenzwischenfalls lassen sich nicht ohne weiteres auf die weitaus geringere, tatsächlich relevante Belastungssituation des Menschen mit Xenoestrogenen übertragen. Dennoch gibt es auch hier Hinweise auf Zusammenhänge zwischen estrogenwirksamen Umweltschadstoffen und dem gehäuften Auftreten von Reproduktionsstörungen (*McLachlan 2001*). So beobachtete man in den letzten Jahrzehnten vor allem in Industrieländern einen Rückgang der Spermienqualität und -quantität, erhöhte Hodenkrebsraten und gesteigerte Inzidenzen von Hypospadie und Kryptorchismus, was auf die starke Belastung mit endokrinen Disruptoren zurückgeführt wurde (*Sharpe und Skakkebaek 1993, Danzo 1998, Hardell et al. 2003, Hauser et al. 2003*). Auch die Entstehung von Mammakarzinomen soll durch Xenoestrogene gefördert werden (*Davis et al. 1993, Wolff et al. 1993, Güttles et al. 1998, Hoyer et al. 1998*), eine Hypothese, die nicht unumstritten ist (*DeBruin und Josephy 2002, Coyle 2004*). Eine weitere Erkrankung, die erst in jüngerer Zeit in Zusammenhang mit Umweltschadstoffen gebracht wurde, ist die Endometriose (*Koninckx 1999, Birnbaum und Cummings 2002*). Hierbei kommt es aufgrund noch weitgehend ungeklärter Mechanismen zu einer Absiedlung von Endometrium an aberranter Lokalisation, die zu Dysfunktionen wie Verhinderung der Eiaufnahme, Fehlfunktion der Eileiter, wiederholten Aborten und verminderter Implantationsrate führen kann. In einer bislang einmaligen Studie konnten *Rier et al. (1993)* einen Zusammenhang zwischen der Entstehung von Endometrioseherden bei Rhesusaffen und chronischer Dioxinbelastung nachweisen. Bei Frauen, die entweder unter Endometriose, Aborten, persistenter Infertilität oder ovarieller Insuffizienz litten, wurden signifikant erhöhte Serumkonzentrationen von PHAH gemessen (*Bercovici et al. 1983, Leoni et al. 1989, Gerhard et al. 1999, Eisenhardt et al. 2001*).

1.5. Physiologische Estrogenregelmechanismen im Endometrium

Das Endometrium ist die das Uteruslumen auskleidende Schleimhautschicht. Es setzt sich zusammen aus einer basalen (*Stratum basale*) und einer oberflächlichen Schicht (*Stratum functionale*); letztere wird während der Menstruation weitgehend abgestoßen. Die wichtigsten zellulären Bestandteile des Endometriums sind die Epithel- und Stromazellen und die blutgefäßbildenden Zellen (*Leidenberger 1998*). Das einschichtige, prismatische Epithel untergliedert sich in Luminal- und Drüsenepithel, welches kontinuierlich ineinander übergeht. Die Zellen im Inneren der Drüsen haben Stammzellcharakter. Im Gegensatz zu denjenigen der meisten anderen Organe sind die uterinen Epithelzellen mesenchymalen Ursprungs (*Gerschenson et al. 1979*). Das endometriale Stroma be-

steht ebenfalls aus einer heterogenen Zellpopulation. Den wichtigsten Zelltyp stellen die stromalen Fibroblasten dar, die regionale und zyklusabhängige Unterschiede zeigen. Neben diesen enthält das Stroma auch zahlreiche lymphoide Zellen. Das Endometrium ist wie das Myometrium ein klassisches Erfolgsorgan von Estradiol und Progesteron. Durch die Existenz spezifischer Rezeptoren mit hoher Affinität ist es in der Lage, auf diese Hormone in der bekannten Weise zu reagieren (Abb.2):

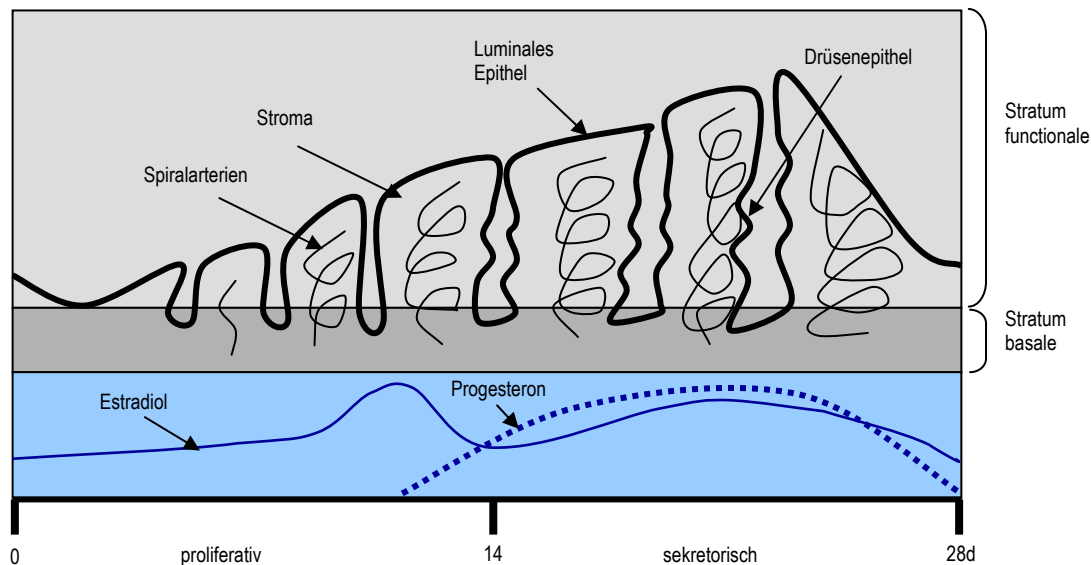


Abb.2: Zyklusabhängiger Aufbau des Endometriums

In der **Follikelphase**, die durch die Sekretion von Estradiol gekennzeichnet ist, kommt es als Folge der Estrogenwirkung zur Proliferation des Endometriums. Stroma und Endometriumdrüsen wachsen, die Endometriumschicht wird dicker. In der **Lutealphase** blockiert Progesteron die epitheliale und stromale Proliferation und verursacht die sekretorische Umwandlung der Endometriumdrüsen, so dass sich das Endometrium schließlich voll ausdifferenziert und hypertrophiert darstellt. Am Ende der Lutealphase, wenn die Lutealfunktion zusammenbricht, lassen sich im Endometrium nekrotische Prozesse nachweisen. Es kommt zur multifokalen Abstoßung von Zellen, regressiven Veränderungen der Blutgefäße und Blutaustritt. Dann beginnt die Regeneration des Endometriums (*Leidenberger 1998*).

Die wichtigsten natürlichen Estrogene sind 17β -Estradiol (E2), Estron und Estriol. Sie sind Steroide, die durch einen aromatischen A-Ring und 18 Kohlenstoffatome gekennzeichnet sind. Das E2 ist das am stärksten wirksame natürliche Estrogen der Frau und wird im geschlechtsreifen Alter vor allem in den Granulosazellen des reifen Follikels gebildet. Ein wichtiger Ort der „peripheren“ Estrogensynthese ist das Fettgewebe. Die Estrogene entfalten ihre zellspezifischen Wirkungen durch Reaktion mit intrazellulären Rezeptorproteinen, den Estrogenrezeptoren (ER), die zur Superfamilie der nukleären Transkriptionsfaktoren gehören und chaperonassoziiert im Zellkern vorliegen (siehe Abschnitt 6.3.).

Nach Bindung des E2 am Rezeptor kommt es zu einer Transaktivierung abhängiger Zielgene (*Leidenberger 1998*), wobei auch die Expression des Progesteronrezeptors (PR) auf diesem Wege induziert wird (*Tseng 1979*). Diese PR-Induktion ist Voraussetzung der Progesteronwirkung.

1.6. Auswahl der Testsubstanzen

Zahlreiche Untersuchungen beschäftigen sich mit der Bestimmung von Akkumulationsraten endokrin wirksamer Umweltchemikalien in humanen Geweben (*Wagner et al. 1990, Koopman-Esseboom et al. 1994, Lehnert et al. 1994, Seliger et al. 1995, Nakagawa et al. 1999, Kuntzsch 2000, Schaefer et al. 2000, Bates et al. 2004*). Aufgrund der Lipophilie der meisten dieser Substanzen werden generell die höchsten Anreicherungen im Fettgewebe gefunden. Betrachtet man die endokrinen Disruptoren im einzelnen, so fällt auf, dass in nahezu allen untersuchten Geweben die drei PHAH 1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2-dichlorethylen (p,p'DDE), β -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclo-hexan (β -HCH) und PCB153 am stärksten akkumuliert werden. In Endometriumproben normofertiler und steriler Frauen wurden ebenfalls Anreicherungen dieser Umweltchemikalien entdeckt (*Seliger et al. 1995, Kuntzsch 2000*). Überraschenderweise entsprachen die Konzentrationen der Substanzen im Endometrium denen im Blut oder überschritten diese Level sogar noch. In daraufhin durchgeführten *in vitro* Versuchen an primär kultivierten Endometriumepithelzellen zeigte sich, dass alle drei Chemikalien in der Lage waren, in relevanten Konzentrationen proliferative Effekte hervorzurufen (*Köller 2002*). Mit der vorliegenden Arbeit wurden diese *in vitro* Untersuchungen fortgesetzt und ausgeweitet, um die Wirkmechanismen von PCB153, β -HCH und p,p'DDE und deren „Estrogenizität“ näher aufklären zu können.

1.6.1. Das PCB153

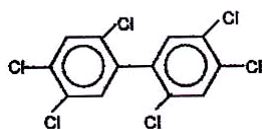


Abb.3: 2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB153)

Die PCB sind eine Chemikalienklasse, die aus 209 theoretisch möglichen Verbindungen besteht. Sie unterscheiden sich, bei gleichem Grundgerüst von 2 Phenolringen, durch Anzahl und Lage der Chloratome und werden auch als Kongenere bezeichnet. Die industrielle Produktion der PCB begann 1929. Aufgrund ihrer Eigenschaften (thermische Stabilität, Chemikalien- und Flammenresistenz, nicht stromleitend, kostengünstig produzierbar) wurden sie zunächst ohne Einschränkungen u.a. als Kühl- und Isolierflüssigkeit, Weichmacher und Flammenschutzmittel eingesetzt. Seit 1978 dürfen PCB allerdings nur noch in geschlossenen Systemen verwendet werden und unterliegen heute den Anwendungsrichtlinien der Chemikalienverbotsverord-

nung (Popp et al. 1993, Fiedler et al. 1995). Die Belastung des Menschen ist seit Jahren rückläufig (Sjödín et al. 2004), trotzdem lassen sich bestimmte Kongenere (PCB138, 153, 180) weiterhin nachweisen (Chapin et al. 2004). Die chronische Toxizität der PCB betrifft vor allem die Leber, aber auch Störungen hormoneller Regelmechanismen (vor allem thyroid- und steroidhormongesteuerte) wurden beobachtet (Fiedler et al. 1995). Bei Tieren traten Fertilitätsstörungen in beiden Geschlechtern und Embryotoxizität nach chronischer Zufuhr subtoxischer Mengen PCB auf (Popp et al. 1993). Die coplanaren PCB werden als dioxinähnliche Verbindungen gewertet, da sie eine Affinität zum AHR aufweisen (Aoki 2001). Der AHR, auch Dioxin- oder Schadstoffrezeptor genannt, ist ein ubiquitär verbreiteter ligandenaktivierter Transkriptionsfaktor, dessen natürlicher (endogener) Ligand bislang nicht bekannt ist. Man entdeckte ihn aufgrund seiner hohen Affinität zum 2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzodioxin (TCDD) (Poland et al. 1976). Den nichtcoplanaren PCB, zu denen auch das Kongener 153 gehört, wird ein estrogenes Potential zugeschrieben (Safe 1995).

1.6.2. Das β -HCH

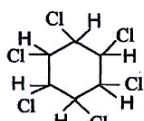


Abb.4: Hexachlorcyclohexan (HCH)

Das β -HCH ist eins von acht Stereoisomeren des Hexachlorcyclohexans und gehört zu den schwerflüchtigen Chlorverbindungen. Im Jahr 1912 gelang es von der Linden die einzelnen Isomere aus dem technischen HCH zu isolieren. Ihm zu Ehren

wurde das insektizide γ -HCH später „Lindan“ genannt (Fiedler et al. 1993). Unmittelbar nach dem zweiten Weltkrieg begann man mit der Produktion von technischem HCH, wenig später mit der Lindanherstellung. Lindan wurde bevorzugt gegen Boden-, Forst- und Vorratsschädlinge eingesetzt. In der Medizin hatte und hat es Bedeutung als Therapeutikum der Skabies. Die Anwendung des technischen HCH in Land- und Forstwirtschaft ist seit 1974 verboten. Von allen Isomeren ist das β -HCH das am stärksten lipophile und erreicht in humanen Geweben die höchsten Akkumulationsraten. Die chronische Toxizität betrifft vorwiegend Leber und Immunsystem (Fiedler et al. 1993), auch konnte eine estrogenen Wirksamkeit beschrieben werden (Coosen und van Velsen 1989, Steinmetz et al. 1996). Im Tierversuch zeigten sich nach Fütterung mit der Substanz Anovulationen und Hyperplasie des Endometriums (Loeber und van Velsen 1984).

1.6.3. Das p,p'-DDE

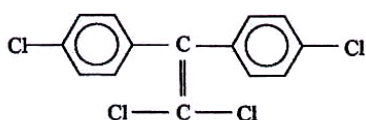


Abb.5: 1,1-Bis-(4-chlorophenyl)-2,2-dichlorethylen (p,p'-DDE)

Das p,p'-DDE ist der Hauptmetabolit des Insektizids DDT, besitzt aber dessen Wirkung nicht mehr. DDT wurde 1874 von Othmar Zeidler erstmals synthetisiert, seine insektizide Wirk-

samkeit jedoch erst 1939 von *Paul Müller* entdeckt, der dafür 1948 mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet wurde. Jahrzehntlang galt es als das wichtigste Pestizid weltweit, da Erkrankungen wie Malaria, Typhus und Cholera durch die wirksame Bekämpfung der Vektoren drastisch reduziert werden konnten. Das Auftreten von Resistenzen, sowie Berichte über Anreicherungen des DDT in der Nahrungskette und Schädigungen von Warmblütern sorgten dafür, dass die Produktion und Anwendung dieser Substanz in nahezu allen Industrieländern verboten wurde (*Schaefer et al. 1995*). In Entwicklungsländern darf DDT weiterhin für die Malariabekämpfung produziert und eingesetzt werden. Trotz der Verbote ist die Belastung mit dem Metaboliten p,p'DDE noch immer sehr hoch. Es handelt sich um die am stärksten akkumulierte Umweltchemikalie in humanen Geweben. Das deutet zum einen auf die enorme Persistenz dieser Substanz hin, andererseits muss davon ausgegangen werden, dass auch bei uns weiterhin die Aufnahme über kontaminierte Lebensmittel – vorwiegend Importe aus Ländern ohne DDT Verbot – anhält (*Chapin et al. 2004*). Es wird vermutet, dass hohe Akkumulationsraten von p,p'DDE in humanen Geweben mit dem gehäuften Auftreten von Brustkrebs korrelieren. In den meisten Untersuchungen konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang allerdings nicht nachgewiesen werden (*Snedeker 2001*). Für alle *para* substituierten DDT Abkömmlinge (wozu auch p,p'DDE gehört) wurden antiandrogene Eigenschaften aufgezeigt, wohingegen die *ortho* substituierten Metaboliten Agonisten am ER sein sollen (*Kelce et al. 1995*).

1.7. Auswahl von Modellsystem und Nachweisverfahren

Für die *in vitro* Testung endokriner Disruptoren erscheint die Verwendung von Zellkulturen besonders geeignet. Am häufigsten werden Zelllinien eingesetzt, die einen hohen Probendurchlauf gewährleisten und relativ einfach zu handhaben sind. Für Versuchsanordnungen mit Xenoestrogenen ist es zudem unerlässlich, dass die Zellen über eine entsprechende Steroidrezeptorexpression verfügen. Viele Wissenschaftler nutzen daher die MCF-7 Mammakarzinomzelllinie, da sie als ER und PR positive Zelllinie diese Eigenschaften erfüllt. Leider weist das Modellsystem Mängel auf, da zahlreiche metabolische und funktionelle Merkmale dieser Tumorzelllinie nicht denen des Ursprungsgewebes *in vivo* entsprechen (*Mueller 2004*). Aus diesem Grund fiel für die vorliegende Arbeit die Entscheidung zu Gunsten des Einsatzes von Primärkulturen. Da das Endometrium einerseits ein wichtiges Zielgewebe für estrogene Wirkungen darstellt, andererseits in der Lage ist, endokrin aktive Umweltschadstoffe zu akkumulieren (*Seliger et al. 1995, Kuntzsch 2000, Schaefer et al. 2000*), erschien die Etablierung eines Primärkultursystems für humane Endometriumzellen als Testsystem für Xenoestrogene äußerst vielversprechend. *Köller (2002)* konnte bereits erfolgreich humane Endometriumepithelzellen (EEC) kultivieren, nicht hingegen endometriale Stromazellen (ESC). In der vorliegen-

den Arbeit erfolgte die primäre Kultivierung beider Endometriumzellpopulationen vergleichend zur Kultur der Mammakarzinomzelllinie MCF-7.

Es gibt zahlreiche Nachweisverfahren, um die estrogenen Potenz einer Substanz experimentell zu belegen. Für Untersuchungen *in vivo* sind Tierversuche unerlässlich. Nur im lebenden Organismus können toxikokinetische Faktoren ausreichend Berücksichtigung finden, was besonders bei Chemikalien von Bedeutung ist, die erst im Körper zu aktiven Metaboliten umgewandelt werden. Meist kommt der Nagerbioassay zum Einsatz, bei dem Veränderungen des Uterusgewichts (*O'Connor et al. 1996*) oder der Vaginalepithelverhornung (*Odum et al. 1997*) bestimmt werden. Der Uterusgewichtsassay gilt dabei als „Goldstandard“ aller *in vivo* Testsysteme (*Scrimshaw und Lester 2004*).

Die wichtigsten *in vitro* Assays sind in Tab.1 zusammengefasst. Für diese Methoden gilt, dass sie die Möglichkeit der Untersuchung estrogenen Wirkmechanismen bieten.

Tab.1: Wichtige *in vitro* Assays zum Nachweis estrogenen/antiestrogenen Aktivität (nach Mueller 2004)

<i>In vitro</i> Assays	Endpunkte	Vorteile	Nachteile	Referenzen
ESCREEN	Proliferation ER α -positiver Zellen	misst physiologischen Endpunkt	keine genauen mechanistischen Daten	<i>Soto et al. 1995</i>
Ligandenbindung	Bindungsaffinität zu ER α oder β	einfach, hoher Proben-durchlauf	keine ER Aktivierung, keine physiologische Antwort	<i>Kuiper et al. 1997</i> <i>Bolger et al. 1998</i>
ERE Bindung	Bindungsaffinität der ER zum ERE	verschiedene EREs nutzbar	keine ER Aktivierung, keine physiologische Antwort	<i>Nikov et al. 2000</i> <i>Boyer et al. 2000</i>
Transaktivierung	ER vermittelte Reporter-genaktivierung	hoher Probendurchlauf, ER Aktivierung	keine physiologische Antwort	<i>Shelby et al. 1996</i> <i>Mueller et al. 2003</i>
Genexpression	Expression ER-regulierter Gene	physiologische Antwort	geringer Probendurchlauf	<i>Nuwaysir et al. 1999</i> <i>Jørgensen et al. 2000</i>
Enzymanalyse	Aktivität ER-regulierter Enzyme	physiologische Antwort	nur Zellen mit brauchbaren Markerenzymen einsetzbar	<i>Holinka et al. 1986</i> <i>Mueller et al. 2003</i>
Steroidogenese	Induktion/Inhibition der Estrogenbiosynthese	physiologische Antwort, ER unabhängige Mechanismen	nur Zellen mit aktiver Steroidogenese einsetzbar	<i>Ando et al. 2001</i> <i>Sanderson et al. 2002</i>

ER= Estrogen Rezeptor ERE= Estrogen Response Element

Mit Hilfe des ESCREEN Assays kann man die Proliferationssteigerung als indirekten Endpunkt einer estrogenen Wirkung bestimmen. Er wurde für MCF-7 Zellen etabliert und mit der vorliegenden Arbeit für die Durchführung an Primärkulturen adaptiert. Um seine Nachteile auszugleichen, erfolgten zusätzlich immunocytochemische Untersuchungen des Steroidrezeptorstatus mit Quantifizierung der Veränderungen des Expressionsmusters nach Schadstoffexposition durchgeführt, die bisher noch nicht als *in vitro* Assay eingesetzt wurden. Besondere Berücksichtigung erfuhr der PR als estrogenabhängig exprimiertes Protein (*Tseng 1979*).

2. Zielsetzung der Arbeit

Im Endometrium nichtexponierter Frauen ließen sich Anreicherungen von Umweltchemikalien nachweisen, die als Xenoestrogene bekannt geworden sind (*Kuntzsch 2000*). Die am stärksten akkumulierten Substanzen waren p,p'-DDE, β -HCH und PCB153. Es stellte sich die Frage, ob relevante Konzentrationen dieser Chemikalien in der Lage sind, im Endometrium estrogene Effekte hervorzurufen und damit das für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen essentielle Nidationsmilieu zu beeinflussen. Für die Untersuchung der Xenoestrogene *in vitro* konnten bereits erfolgreich Primärkulturen humaner EEC als Modellsystem eingesetzt werden. Die kultivierten Zellen reagierten auf Schadstoffexposition mit einem verstärkten Wachstum (*Köller 2002*). Es konnte allerdings nicht geklärt werden, ob die beobachteten Proliferationssteigerungen im Sinne eines estrogenen Effektes zu werten sind.

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, zunächst die primäre Kultivierung humaner Endometriumzellen fortzusetzen und auszuweiten, indem zusätzlich zu den Epithelzellen ein eigenes Kultursystem für endometriale Stromazellen etabliert wird. Die beiden Zellpopulationen sollen differenziert betrachtet und immunocytochemisch charakterisiert werden. Als Kontrolle für die Kulturbedingungen und alle durchzuführenden Versuche dient die parallele Kultivierung der bekannten MCF-7 Mammakarzinomzelllinie.

In die sich anschließenden Expositionsuntersuchungen werden die drei Testagenzien p,p'-DDE, β -HCH und PCB153, sowie das endogene Estrogen E2 als Positivkontrolle einbezogen. Als Nachweisverfahren für estrogene Effekte kommen zwei verschiedene Methoden zum Einsatz. Dies ist zum einen der ESCREEN Assay, der Veränderungen im Proliferationsverhalten der Zellen bestimmt. Er wurde für MCF-7 Zellen validiert (*Soto et al. 1995*) und ist für den Nachweis von Xenoestrogenen anerkannt. Als zweite Methode erfolgt die immunocytochemische Untersuchung des Steroidrezeptorstatus der Zellkulturen, mit Quantifizierung der Expressionsänderungen nach Schadstoffexposition. Besonderes Augenmerk ruht auf Veränderungen der PR Expression, da Estrogene eine Induktion dieses Rezeptors im Endometrium hervorrufen (*Tseng 1979*). Auch die Steroidrezeptoren ER α und β und der Schadstoffrezeptor AHR werden in die immunocytochemischen Untersuchungen einbezogen.

Im Anschluss erfolgt eine Beurteilung der estrogenen Potenz der getesteten Umweltchemikalien und der Versuch einer Darstellung möglicher molekularer Wirkmechanismen. Die Resultate werden unter Einbeziehung der aktuellen Literatur diskutiert und das Gefahrenpotential endokriner Disruptoren beurteilt.

3. Materialien und Methoden

3.1. Materialien

3.1.1. Chemikalien

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
1,1-Bis-(4-chlorphenyl)-2,2-dichlorethylen (p,p'DDE)	Aldrich Chemie, Steinheim
DMSO	Merck KGaA, Darmstadt
Eisessig	Merck KGaA, Darmstadt
17 β -Estradiol (E2)	Sigma Aldrich GmbH
Ethanol 96%	Carl Roth GmbH
Glycerol	Carl Roth GmbH
2,2',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl (PCB153)	Promochem GmbH, Wesel
β -1,2,3,4,5,6-Hexachlorcyclohexan (β -HCH)	Promochem GmbH, Wesel
Methanol 96%	Carl Roth GmbH
Natronlauge (NaOH)	Merck KGaA, Darmstadt
Phoshat-gepufferte Salzlösung (PBS)	BioWhittaker Europe
Rinderserumalbumin (BSA)	Sigma Aldrich GmbH
Salzsäure (HCl)	Carl Roth GmbH
Sulforhodamin B	Sigma Aldrich GmbH
Trichloressigsäure (TCA) 20%	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Fluka AG, Neu- Ulm
Trypanblau 0,5%	Biochrom KG, Berlin
Wasserstoffperoxid 30%	Merck KGaA, Darmstadt

3.1.2. Materialien für die Zellkultur

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Amphotericin B 250 μ g/ml	Biochrom KG, Berlin
Collagenase CLS II 318U/mg	Biochrom KG, Berlin
DNase I 2000U/vial	Sigma Aldrich GmbH
Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) - ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin, mit 1000g Glukose	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
Fetales Kälberserum (FKS)	Biochrom KG, Berlin
L-Glutamin 200mM	Biochrom KG, Berlin
Hämozytometer	Paul Marienfeld GmbH & Co KG
Ham's F12 Medium - ohne Phenolrot, ohne L-Glutamin, mit 1,176 g/l NaHCO ₃	Biochrom KG, Berlin
Hyaluronidase 300U/mg	Carl Roth GmbH
Insulin Transferrin Selenit (ITS) 250mg	Roche Diagnostics GmbH
MCF-7 Zelllinie	DSMZ GmbH
Mikrotiterplatte (MTP), 24 bzw. 96 Vertiefungen, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Objektträger mit Kammern steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Penicillin/ Streptomycin 10000U/10000 μ g/ml	Biochrom KG, Berlin
Petrischalen	Becton Dickinson, Heidelberg
Skalpell, Pinzette, Kürette	Aeskulap
Trypanblau 0,5%	Biochrom KG, Berlin
Trypsin 9300U/mg	Sigma Aldrich GmbH
Ultrareines Wasser, steril	Biochrom KG, Berlin
Zellsieb 40 μ m	Becton Dickinson, Heidelberg

3.1.3. Materialien für die Immuncytochemie

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
AEC Substrat Kit	dianova GmbH
anti Arylhydrocarbonrezeptor (Klon RPT9), Maus IgG1	dianova GmbH
anti Cytokeratin (Klon LP34, 34bE12, 35bH11), Maus IgG1	DAKO Diagnostika GmbH
anti Desmin (Klon D33), Maus IgG1	DAKO Diagnostika GmbH
anti Estrogenrezeptor alpha (Klon 33), Maus IgG1	dianova GmbH
anti Estrogenrezeptor beta (Klon PPG5/10), Maus IgG2a	labgen/ Natutec GmbH
anti Ki67 (Klon Mib-1), Maus IgG1	dianova GmbH
anti Progesteronrezeptor (Klon PR-AT4.14), Maus IgG1	dianova GmbH
anti Vimentin (Klon V9), Maus IgG1	DAKO Diagnostika GmbH
anti Maus, biotinyliert, Kaninchen IgG	dianova GmbH
3,3'-Diaminobenzidin- Tetrahydrochlorid (DAB)	DAKO Diagnostika GmbH
Streptavidin (Peroxidase konjugiert)	dianova GmbH

3.1.4. Geräte

Bezeichnung	Hersteller/ Lieferant
Brutschrank IG 750	Jouan GmbH, Unterhaching
Digitalkamera „Coolpix 995“	Nikon GmbH, Düsseldorf
Einmalpipetten, steril, verschiedene Größen	greiner labortechnik
Einmalspritzen, steril, verschiedene Größen	Braun Melsungen AG
Laminar Flow Box „Hera safe“	Heraeus Instruments
Mikroskop „Diaphot“	Nikon GmbH, Düsseldorf
Personal Computer (PC)	Highscreen
Photometer „anthos 2020“	anthos labtec instruments
pH Meter 537	wtw GmbH
Pipetten, verschiedene Volumina	Eppendorf GmbH
Pipettenspitzen, steril	Eppendorf GmbH
Pipettierhilfe „Pipet- Aid“	greiner labortechnik
Schütteltisch	Hybritech
Spritzenfilter 0,2µm, steril	Heinemann Labortechnik
Zentrifuge CR 4 22	Jouan GmbH, Unterhaching

3.2. Methoden

3.2.1. Die Zellkultivierung

Die primäre Kultivierung endometrialer Zellen erfolgte in Anlehnung an die Methode von *Satyaswaroop et al. (1979)*, wobei für die EEC auf eine in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Kulturvorschrift zurückgegriffen werden konnte (*Köller 2002*). Die MCF-7 Zelllinie wurde modifiziert nach *Soule et al. (1973)* kultiviert. Es kam das gleiche Medium wie für die Primärkulturen zum Einsatz.

Lösungen und Zubereitungen

Medium A pH 7,4:	DMEM/ Ham's F12	1:1 (v/v)
	Fetales Kälberserum	10%
	L-Glutamin	1%
	Penicillin/ Streptomycin	1%
	Amphotericin B	1%
	sterilfiltrieren	

<u>Kollagenase Lösung:</u>	Kollagenase CLS II	50mg
	Hyaluronidase	2mg
	DNAse I	0,5ml
	ad 20ml Medium A, sterilfiltrieren	
<u>Trypsin Lösung:</u>	Trypsin	0,1% (w/v)
	ad PBS, sterilfiltrieren	

Durchführung

Das **Endometrium** wurde aus Hysterektomiepräparaten von Patientinnen mit Uterus myomatosus gewonnen. Einen Tag vor der geplanten Operation erfolgte die Aufklärung der Patientin und die Unterschrift der von der Ethikkommission geprüften Einwilligungserklärung. Das Endometrium wurde noch im Operationssaal steril entnommen, in präinkubiertes Medium A überführt und gewogen. Alle weiteren Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen in der laminar flow box durchgeführt. Nach einer ersten Entfernung größerer Verunreinigungen durch fünfminütige Zentrifugation bei 100rpm erfolgte die mechanische Zerkleinerung des Endometriums mittels Skalpell und eine enzymatische Dissoziation der Gewebestücke. Dafür wurde das Material in Kollagenase Lösung aufgenommen und 1h bei RT unter stetigem Schütteln inkubiert. Danach konnte die Enzymlösung abzentrifugiert (600rpm, 5min) und verworfen werden. Das Pellet wurde in Medium A aufgenommen, mehrfach auf und ab pipettiert und auf das 40µm Zellsieb gegeben. Nach Spülen des Siebes mit reichlich Medium A (mindestens 50ml) waren im Filtrat die Stromazellen nachweisbar. Ein Aliquot dieses Filtrats wurde mit der gleichen Menge Trypanblau versetzt (je 100µl ausreichend) und im Hämozytometer ausgewertet. Alle blau gefärbten Zellen galten als nicht vital und wurden bei der Zellzahlbestimmung nicht berücksichtigt. Der Filterrückstand, der die epithelialen Anteile des Endometriums enthielt, wurde vorsichtig mit Medium A abgespült, ebenfalls ein Aliquot entnommen, gefärbt und in der Zählkammer quantifiziert. Je nach gewünschter Aussaatdichte musste die Zellsuspension daraufhin entweder mit Medium A verdünnt oder durch Zentrifugation konzentriert werden. In Abhängigkeit der geplanten Untersuchung erfolgte die Aussaat in unterschiedliche Kulturgefäße mit einer Zelldichte von 1×10^5 Zellen/cm². Die Inkubation im Brutschrank wurde bei 37°C, 5%CO₂- Zufuhr und 98% H₂O Sättigung durchgeführt. Nach vier Tagen erfolgte ein Mediumwechsel, oder bei konfluenten Zellrasen die Passagierung der Zellen. Dazu wurde das Medium aus der Kulturschale abgesaugt, mit PBS gespült und anschließend eine 0,1%ige Trypsinlösung aufgetragen. Nach einer Zeit von 5-15min (Inkubation bei RT) hatten sich die meisten Zellen abgerundet und vom Untergrund gelöst. Es wurde nun Medium A im Überschuss (zehnfaches Volumen) zugegeben und mit steriler Pipette auf und ab pipettiert, um alle Zellen abzulösen. Nach Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung erfolgte die neuerliche Aussaat. Die Passagierungen konnten mehrfach wiederholt werden.

Die **MCF-7 Zellen** wurden nach den Angaben des Lieferanten aufgetaut, in Medium A aufgenommen und primär in einer Dichte von 40000/cm² ausgesät. Alle vier Tage erfolgte ein Mediumwechsel oder die Passagierung analog zu der für die Endometriumzellen beschriebenen Methode (s.o.), wobei dann Aussaatdichten von 10000/cm² ausreichend waren.

3.2.2. Die Expositionsuntersuchungen

Lösungen und Zubereitungen

<u>Medium B pH 7,4:</u>	DMEM/ Ham's F12	1:1 (v/v)
	ITS	10mg/l
	L-Glutamin 200mM	1%
	Penicillin/ Streptomycin	1%
	Amphotericin B	1%
	sterilfiltrieren	

Verdünnungsreihe 17- β Estradiol (MW 272,4):
 Stammlösung: 100 μ M in A.dest. mit 1,2% Ethanol
 Endkonzentrationen: 1pM bis 1 μ M

Verdünnungsreihe PCB153 (MW 360,8):
 Stammlösung: 100 μ M in A.dest. mit 60% DMSO
 Endkonzentrationen: 1pM bis 1 μ M

Verdünnungsreihe β -HCH (MW 290,8):
 Stammlösung: 10 μ M in A.dest. mit 13% Ethanol
 Endkonzentrationen: 1pM bis 1 μ M

Verdünnungsreihe p,p'-DDE (MW 318,03):
 Stammlösung: 50 μ M in A.dest. mit 38% Ethanol
 Endkonzentrationen: 1pM bis 1 μ M

alle Stammlösungen sterilfiltrieren, Endkonzentrationen mit sterilem Medium B herstellen

Durchführung

Für die Expositionsuntersuchungen wurden die Kulturen am zweiten oder dritten Kulturtag auf serumfreies Medium B umgestellt und 24h im Brutschrank präinkubiert. Nach dieser Zeit erfolgte die Exposition. Für jede Untersuchung wurden eine **Negativkontrolle** (statt Testsubstanz nur Medium B), entsprechende **Leerwerte** (nur Medium B mit Lösungsmittel, keine Testsubstanz), **Positivkontrollen** (Medium B mit verschiedenen Konzentrationen E2) und die **Testansätze** (verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen in Medium B) mitgeführt. Die anschließende Inkubationszeit im Brutschrank betrug 72h.

3.2.3. Die immuncytochemischen Untersuchungen

Die immuncytochemischen Untersuchungen dienten einerseits der Charakterisierung der Zellpopulationen und Detektion der Steroidrezeptoren, als auch dem Nachweis der Veränderung von Rezeptorstatus und Proliferationsverhalten nach Schadstoffexposition. Sie erfolgten nach der Avidin- Biotin- Komplexmethode (ABC) von *Hsu et al. (1981)*.

Auswahl der Primärantikörper

Als Marker für EEC diene ein Antikörper gegen Cytokeratine. Es handelt sich dabei um Intermediärfilamente der Klassen I und II, von denen die Varianten 7,8,18 und 19 vom Endometriumepithel exprimiert werden (*Moll et al. 1983*). Das Intermediärfilament Vimentin wird von Zellen mesenchymaler Herkunft exprimiert und wurde hier als Marker für die ESC genutzt (*Matthews et al. 1992*). Zur Abgrenzung beider Zellpopulationen von eventuell vorhandenen Myometriumzellen diene die Darstellung des Intermediärfilaments Desmin, welches spezifisch in Muskelzellen nachweisbar ist (*Oliva et al. 1995*). Für die Untersuchungen des Rezeptorstatus erfolgte die Darstellung der Steroidrezeptoren PR, ER α , ER β und des AHR (*King und Greene 1984, Welshons et al. 1984*). Als Proliferationsmarker kam der von *Gerdas et al. (1983)* entwickelte Antikörper Ki67 zur Anwendung, der gegen ein nukleäres Antigen gerichtet ist, welches nur in proliferierenden Zellen exprimiert wird.

Lösungen und Zubereitungen

<u>Fixierlösung:</u>	Wasserstoffperoxid ad Methanol	0,3%
<u>Antikörperverdünner:</u>	BSA ad PBS	400mg 40ml
<u>Primärantikörper:</u>	Cytokeratin Vimentin Desmin PR ER α ER β AhR Ki67	1:80 1:150 unverdünnt 1:80 1:100 1:80 1:500 1:10
<u>Sekundärantikörper:</u>	biotinylierter Kaninchen-anti-Maus Antikörper	1:100
<u>Streptavidin, Peroxidase konjugiert:</u>		1:500
<u>0,05M Tris/HCl Puffer pH 7,6:</u>	Tris mit 1N HCl einstellen, ad A.dest.	6,057g 1l
<u>Chromogen:</u>	DAB Substrat Wasserstoffperoxid ad 0,05M Tris/HCl Puffer pH 7,6	6mg 0,03% 10ml
alternativ:	AEC Substrat (Kit) ad Acetatpuffer mit 0,03% H_2O_2 (Kit)	100 μ l 10ml

Durchführung

Auf den für die immunocytochemischen Untersuchungen eingesetzten 96MTP erfolgten jeweils achtfache Ansätze der Expositionstests für die verschiedenen Antikörper und Negativkontrollen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Brutschrank entnommen, der Mediumüberstand abpipettiert und zur Fixierung und Blockierung endogener Peroxidasen sofort die Fixierlösung

aufgetragen. Nach einer Einwirkzeit von 40min bei 4°C wurde mehrfach mit PBS gespült. Die Zellen durften zu keiner Zeit antrocknen, sie konnten mit PBS überschichtet einige Stunden im Kühlschrank gelagert werden. Dann wurde die Blockierungslösung (entspricht der Antikörperverdünnungslösung) aufgetragen und für 20min bei RT inkubiert, um unspezifischen Bindungen vorzubeugen. Nach vorsichtigem Entfernen der überschüssigen Lösung wurde der jeweilige Primärantikörper und ein Kontrollansatz ohne Antikörper aufgetragen. Nun erfolgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer. Am nächsten Tag konnte dann nach mehrmaligem Spülen mit PBS der Sekundärantikörper aufgetragen und für 1h im Brutschrank inkubiert werden. Danach wurde wiederum mehrfach mit PBS gespült, die Streptavidin- Peroxidase- Lösung zugegeben und 30min bei RT inkubiert. Nach anschließendem Spülen (3xPBS) wurde das Chromogen aufgetragen und die Farbentwicklung beobachtet. 20min später konnte der Farbstoff entfernt, mit A.dest. gespült und mit Glycerol überschichtet werden.

Berechnung des HSCORE

Bei allen Kernfärbungen erfolgte eine quantitative Auswertung mit Bestimmung des „histochemical score“ (HSCORE). Diese von *McCarty et al. (1985)* für die ER Expression in Mammakarzinomen etablierte Berechnung bezieht die Anzahl negativ und positiv gefärbter Zellkerne ein. Für die vorliegende Arbeit kam eine Modifikation von *Jiang et al. (2002)* zum Einsatz, bei der vier Intensitätsstufen der Färbung berücksichtigt werden. Insgesamt wurden jeweils mindestens 500 Zellen pro Ansatz ausgezählt.

$$\text{HSCORE} = \sum P_i (i + 1)$$

i = Färbintensität von 0 bis 3

0= keine Färbung
1= schwach gefärbt
2= normal gefärbt
3= stark gefärbt

Pi = Anteil der Zellen pro Färbintensitätsstufe (1=100 Zellen)

3.2.4. Der ESCREEN Assay

Als *in vitro* Testsystem für estrogenen Aktivität diente das von *Soto et al. (1995)* etablierte „estrogen screening“ (ESCREEN), welches in einer Modifikation von *Bitsch et al. (2002)* für die Durchführung an Primärkulturen adaptiert wurde. Endpunkt der Untersuchung war eine photometrische Bestimmung des freigesetzten Sulforhodamin B Farbstoffs.

Lösungen und Zubereitungen

<u>Fixierlösung:</u>	Trichloressigsäure ad A.dest.	10% (w/v)
<u>Färbelösung:</u>	Sulforhodamin B ad Essigsäure	0,4% (w/v) 1% (v/v)

<u>Spüllösung:</u>	Essigsäure ad A.dest.	1% (v/v)
<u>Lysepuffer 10mM, pH 10,5:</u>	Tris mit 1N NaOH einstellen ad A.dest.	121,14mg 100ml

Durchführung

Die Expositionsuntersuchungen wurden in Doppelbestimmungen auf 24MTP durchgeführt, auf jeder Platte erfolgten Negativ- und Positivkontrollen. Nach 72h Inkubation mit den Testagenzien wurde das Experimentalmedium entfernt und die Zellen mit 10% TCA (30min Inkubation bei 4°C) fixiert. Dann wurde die Platte mehrmals mit A.dest. gespült und anschließend vollständig luftgetrocknet. Dieser Schritt dauerte im allgemeinen etwa 2h. Es erfolgte nun die Zugabe der Färbelösung und zehnmütige Inkubation bei RT. Nach Entfernung des Farbstoffs wurden die Platten mit 1% Essigsäure so lange gespült, bis keine Restfärbung der Spülflüssigkeit mehr vorhanden war. Es erfolgte eine neuerliche Lufttrocknung (2h), an die sich die Farbstoffextraktion anschloss, die durch Zugabe von je 1ml Lysepuffer pro Vertiefung erreicht wurde. Nach 15min Schütteln bei RT waren die Zellen vollständig lysiert und der Farbstoff freigesetzt. Dieser wurde auf eine 96MTP überführt, wobei meistens eine Verdünnung mit Lysepuffer erforderlich war. Dann erfolgte die photometrische Bestimmung der OD bei 570nm Messwellenlänge gegen 620nm Referenzwellenlänge.

Berechnungen

$$\text{PE}(\%) = \frac{\text{OD (Testansatz oder Positivkontrolle)}}{\text{OD (Negativkontrolle)}} \times 100$$

PE(%)	= Proliferativer Effekt in Prozent
OD	= optische Dichte, gemessen am Photometer
Testansatz	= Ansatz mit Zugabe von Testchemikalien
Positivkontrolle	= Ansatz mit Zugabe von E2
Negativkontrolle	= Ansatz ohne Zusätze (nur Medium B)

$$\text{RPE}(\%) = \frac{\text{PE (Testansatz)} - 1}{\text{PE (E2max)} - 1} \times 100$$

RPE(%)	= Relativer Proliferativer Effekt in Prozent
PE(E2max)	= maximaler PE der Positivkontrolle in dieser Messung

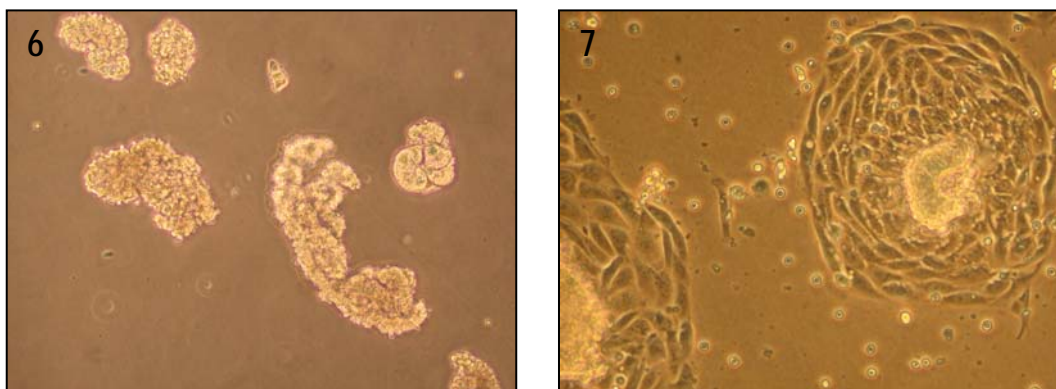
Alle Berechnungen einschließlich der Statistik wurden am PC mit dem Programm Microsoft Excel 2000 durchgeführt.

4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse der Zellkultivierungen

4.1.1. Kultivierung und Charakterisierung endometrialer Epithelzellen

Die gewonnenen endometrialen Epithelzellen lagen zum Zeitpunkt der Aussaat vorrangig in glandulären Fragmenten vor (Abb.6). Nach 12 bis 24h wuchsen aus diesen Zellverbänden Epithelzellen aus, welche unregelmäßig, wirbelig imponierten und gewundene Kolonien bildeten (Abb.7). Einzelzellen außerhalb des Verbandes wuchsen ebenfalls am Kulturgefäß an und bildeten lange, schmale Zytoplasmaausläufer, mit denen der Zellkontakt wiederhergestellt werden sollte. Gelingt dies nicht, so vakuolisierten die Zellen, rundeten sich ab und lösten sich vom Untergrund. Bei zu geringer Aussaatdichte zeigten sich neben den Zellen mit Ausläufern nach einigen Tagen zunehmend polyploide Riesenzellen mit stark zugunsten des Zytoplasmas verschobener Kern-Plasma-Relation, die einen plattenepithelartigen Charakter hatten.

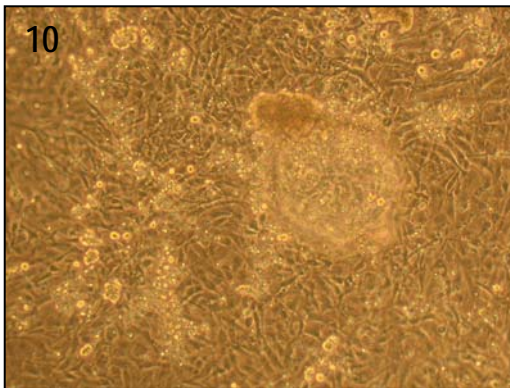
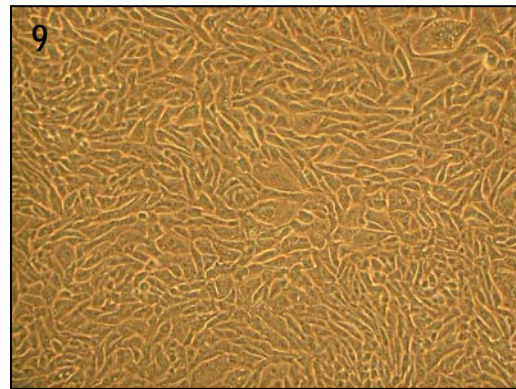
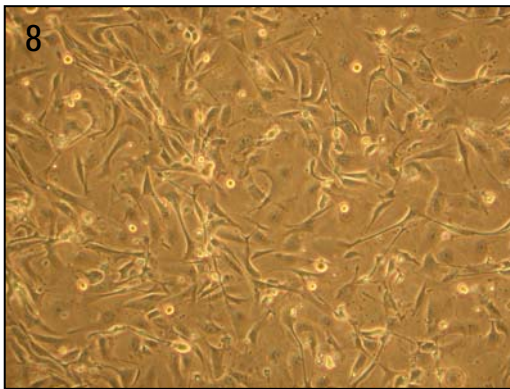


Primäre Kultivierung endometrialer Epithelzellen

Abb.6: nach Aussaat: glanduläre Fragmente (Vergrößerung 100x)

Abb.7: erster Kulturtag: aussprossende Zellen (Vergrößerung 100x)

Nach etwa 4d erschienen die EEC subkonfluent (Abb.8) und bildeten bei weiterer Inkubation innerhalb der nächsten 3-4d konfluente Zellrasen (Abb.9). Danach wuchsen die Kulturen nur noch langsam und erzeugten vereinzelt dreidimensionale Strukturen, die z.T. pseudoglandulär imponierten (Abb.10). Mit viertägigem Mediumwechsel ließen sich die EEC über drei bis vier Wochen am Leben erhalten. Erst dann begannen sie in größerem Ausmaß abzusterben. Eine Passagierung war nicht, bzw. mit unzureichender Ausbeute möglich.



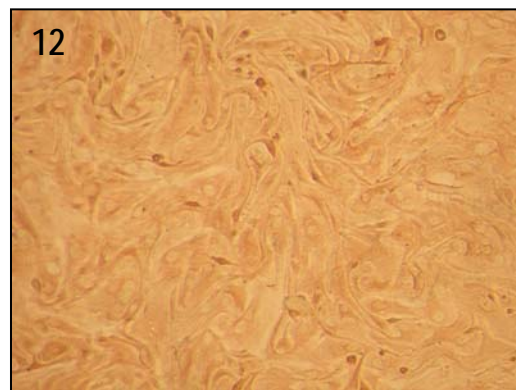
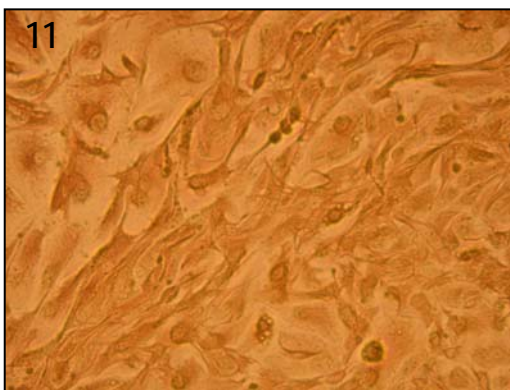
Primäre Kultivierung endometrialer Epithelzellen

Abb.8: vierter Kulturtag: subkonfluenter Zellrasen (Vergrößerung 100x)

Abb.9: siebenter Kulturtag: konfluenter Zellrasen (Vergrößerung 100x)

Abb.10: zehnter Kulturtag: Hyperkonfluenz mit pseudoglandulärer Struktur (Vergrößerung 100x)

Zur weiteren Charakterisierung der EEC erfolgten immunocytochemische Darstellungen. Abb.11 zeigt eine deutliche zytoplasmatische Expression des Epithelzellmarkers Cytokeratin, Abb.12 eine etwas schwächere Färbung des Zytoplasmas, diesmal nach Markierung des von Zellen mesenchymalen Ursprungs exprimierten Vimentin.



Immunocytochemische Charakterisierung der EEC

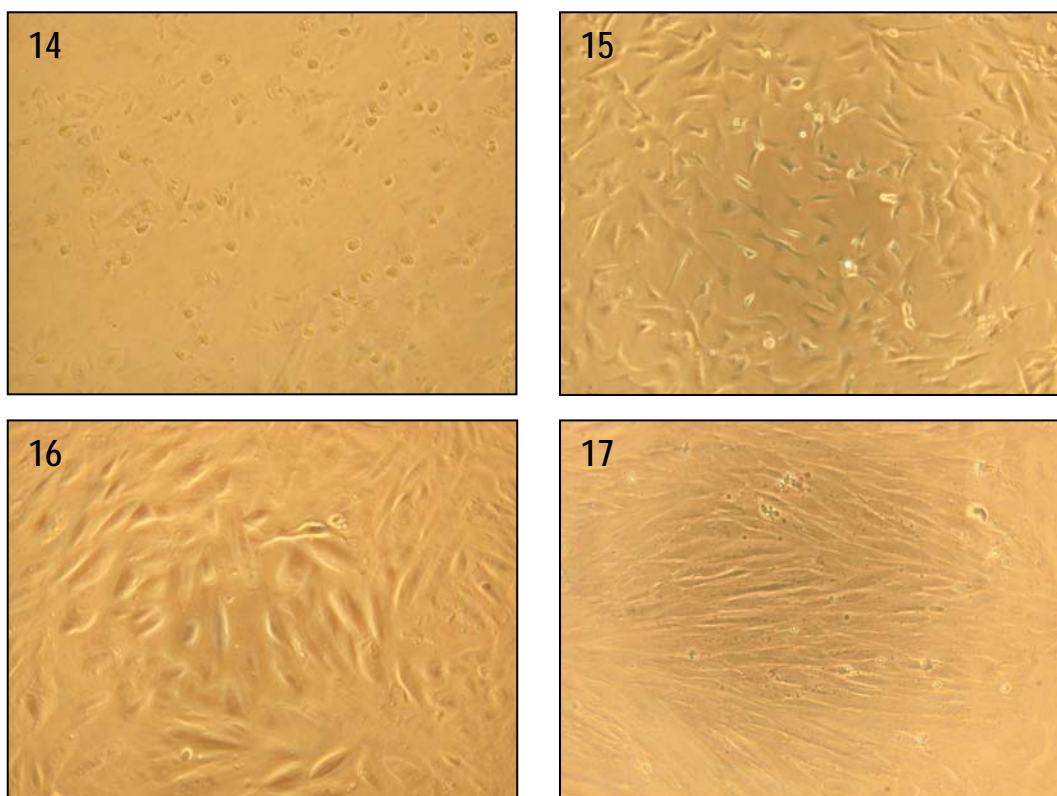
Abb.11: Cytokeratin stark positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.12: Vimentin schwach positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.13: Negativkontrolle (Vergrößerung 100x)

4.1.2. Kultivierung und Charakterisierung endometrialer Stromazellen

Ausgesäte endometriale Stromazellen (ESC) hefteten sich frühzeitig – die ersten bereits nach 30min Inkubation – an die Unterlage und bildeten zunächst multiple, kurze Zytoplasmaausläufer, bevor sie ihr typisches spindel- bis sternförmiges Aussehen annahmen (Abb.14 und 15). Bereits nach 5-6d waren konfluente Zellrasen zu erkennen, die von den nun sehr regelmäßig angeordneten, mehr spindelförmigen ESC gebildet wurden (Abb.17). Bei Subkonfluenz wirkte das Bild unruhiger, mit vermehrt mehrzipfeligen Zellen (Abb.16). Es war möglich, die ESC mehrfach zu passagieren.



Primäre Kultivierung endometrialer Stromazellen

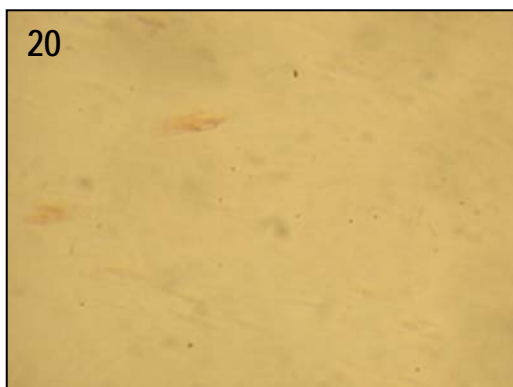
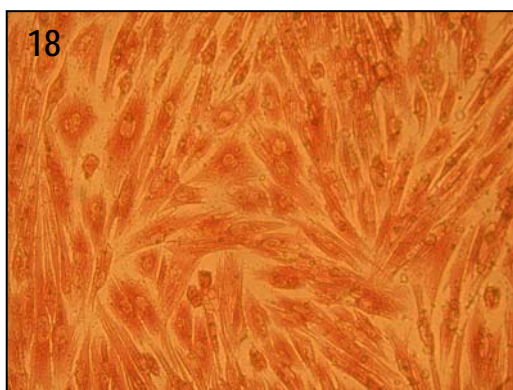
Abb.14: eine Stunde nach Aussaat: erste Zellen sprossen aus (Vergrößerung 100x)

Abb.15: zweiter Kulturtag: ausgesprossene Zellen liegen locker verteilt (Vergrößerung 100x)

Abb.16: vierter Kulturtag: subkonfluentes Zellbild (Vergrößerung 200x)

Abb.17: sechster Kulturtag: Konfluenz, sehr regelmäßige Anordnung der fibroblastenartigen Zellen (Vergrößerung 100x)

Die ESC wurden ebenfalls immunocytochemisch charakterisiert. Im Gegensatz zu den EEC wiesen Stromazellen eine starke Vimentin Expression auf (Abb.18), wohingegen Cytokeratin nur als Artefakt oder in einzelnen eingeschleppten Epithelzellen (Abb.19) nachgewiesen werden konnte. Desmin als Marker für Zellen myozytären Ursprungs war in den Stromazellkulturen nicht, bzw. nur vereinzelt nachweisbar (Abb.20). Nach mehrfachen Passagierungen kam es allerdings zu einem leichten Anstieg Desmin positiver Zellen, was als Zeichen einer beginnenden fibromyblastären Metaplasie gedeutet werden kann.



Immuncytochemische Charakterisierung der ESC

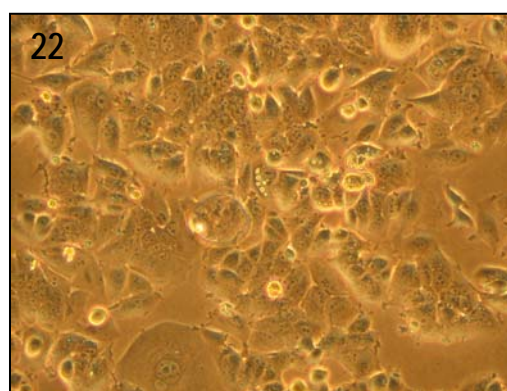
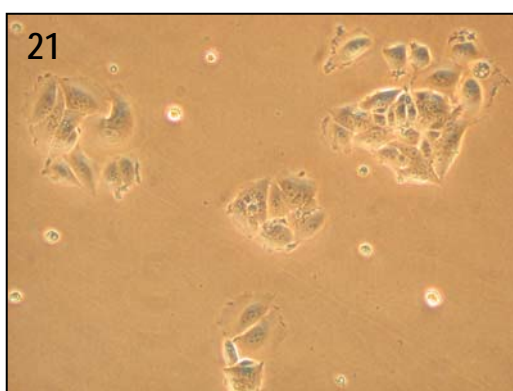
Abb.18: Vimentin stark positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.19: Cytokeratin negativ (AEC Substrat, Vergrößerung 200x)

Abb.20: Desmin negativ, (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

4.1.3. Kultivierung der MCF-7 Mammakarzinomzelllinie

Die MCF-7 Zellen wuchsen in Abhängigkeit der Aussaatkonzentration rasch zu konfluenten Zellrasen (Abb.21 und 22). Wenn man die empfohlene Zellzahl einhielt, war dies nach 5-6d der Fall, bei höheren Zelldichten entsprechend eher. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Ließ man sie hingegen weiterwachsen, dann bildeten sich übereinanderliegende Zellaggregate aus. Auf eine nähere immuncytochemische Charakterisierung der MCF-7 Zellen wurde verzichtet, da es sich um eine kommerziell erhältliche, epitheliale Zelllinie handelt, die bereits hinreichend oft charakterisiert wurde.



Kultivierung der MCF-7 Mammakarzinomzelllinie

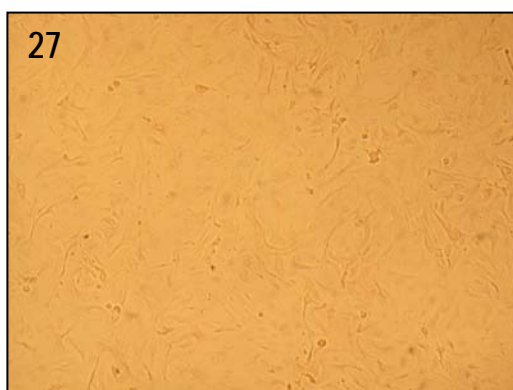
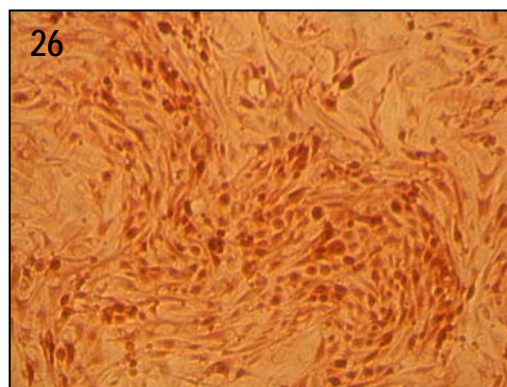
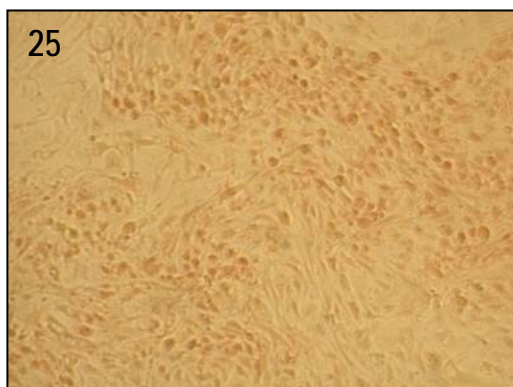
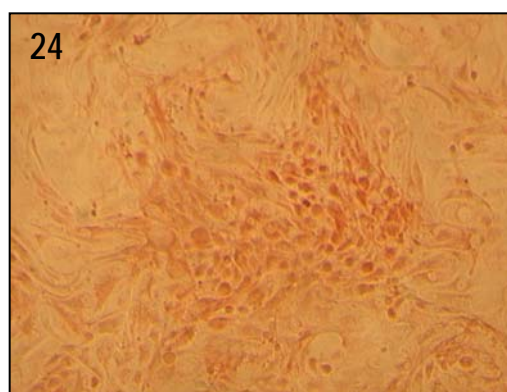
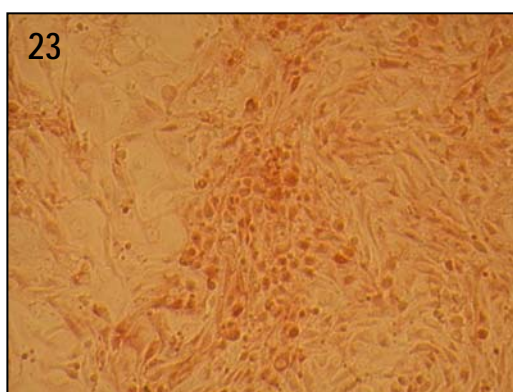
Abb.21: erster Kulturtag: aussprossende Zellen (Vergrößerung 100x)

Abb.22: fünfter Kulturtag: Konfluenz (Vergrößerung 100x)

4.2. Ergebnisse der immuncytochemischen Rezeptorbestimmungen

4.2.1. Rezeptorexpression der endometrialen Epithelzellen

ER α wurde von den EEC nukleär exprimiert (Abb.23), ebenso **ER β** (Abb.24). Bei beiden ER Subtypen war auch eine geringe zytosolische Färbung erkennbar. Der **PR** ließ sich ebenfalls vorwiegend im Zellkern nachweisen (Abb.25). Allerdings stellte sich dessen Expressionsmuster in steroidhormon- und serumfrei kultivierten EEC eher schwach positiv dar. Die Verteilung der Steroidrezeptor positiven Zellen war ungleichmäßig, was dem wirbeligen, unregelmäßigen Wachstumsmuster der Epithelzellkultur geschuldet war. Der **AHR** wurde sowohl nukleär, als auch zytosolisch exprimiert (Abb.26).



Immuncytochemische Rezeptordarstellung der kultivierten EEC

Abb.23: ER α positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.24: ER β positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

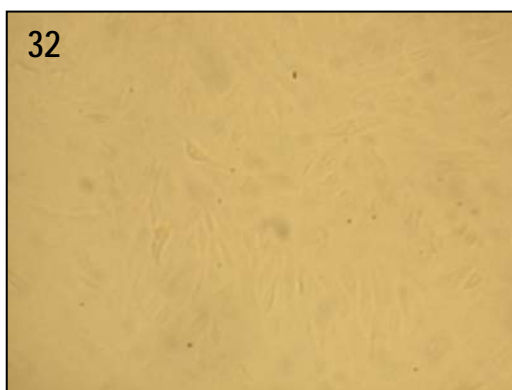
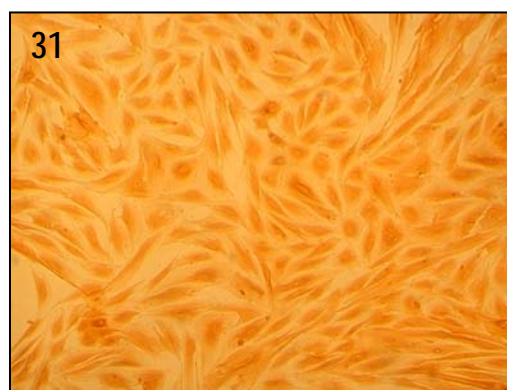
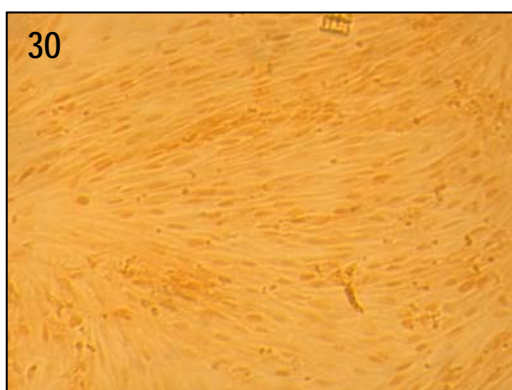
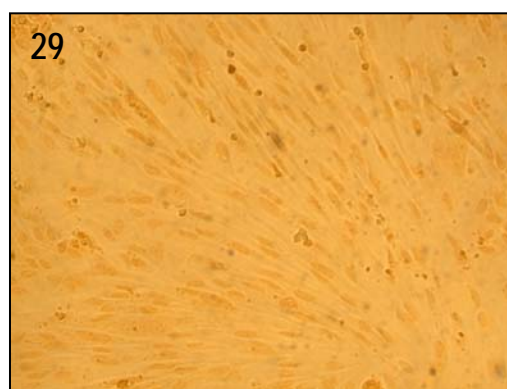
Abb.25: PR positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.26: AHR positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.27: Negativkontrolle (Vergrößerung 100x)

4.2.2. Rezeptorexpression der endometrialen Stromazellen

Die immunocytochemische Rezeptordarstellung der Stromazellen gelang ebenso wie die der Epithelzellen. Die Rezeptordichte war insgesamt nicht so hoch, wie bei den EEC. Der **ER α** zeigte eine sehr schwach positive Expression, wohingegen **ER β** gut nachweisbar war (Abb.28 und 29). Bedingt durch das sehr regelmäßige Wachstumsverhalten der ESC, wies auch die Verteilung der immunocytochemisch gefärbten Zellen ein eher disseminiertes Erscheinungsbild auf. Die Expression des **PR** war nach Kultivierung in serum- und steroidhormonfreiem Medium nur sehr gering, stieg aber nach Substitution mit E2 stark an (Abb.30). Der **AHR** zeigte bei allen Kulturen ein deutlich positives Expressionsmuster in Zytoplasma und Nukleus (Abb.31).



Immunocytochemische Rezeptordarstellung der kultivierten ESC

Abb.28: ER α schwach positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.29: ER β positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

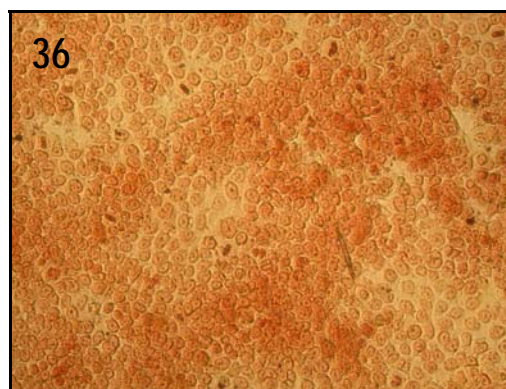
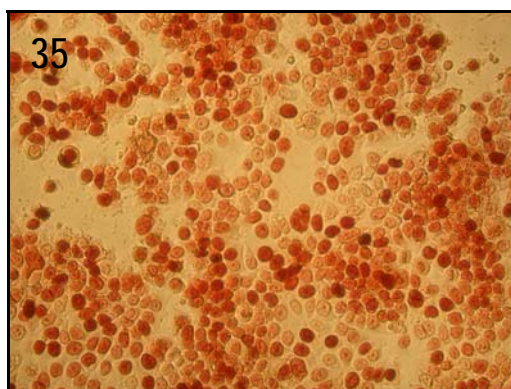
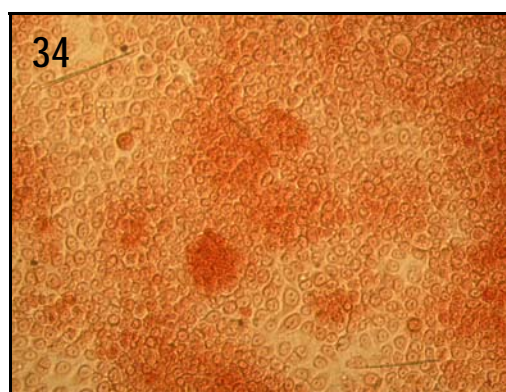
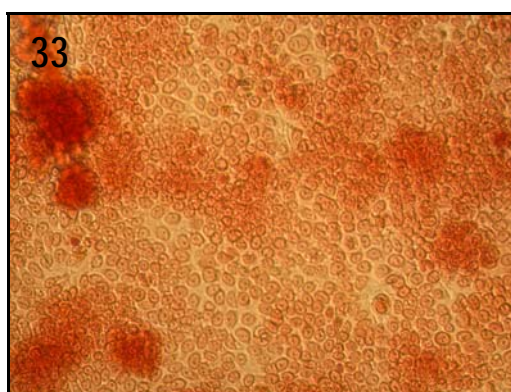
Abb.30: PR positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.31: AHR positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.32: Negativkontrolle (Vergrößerung 100x)

4.2.3. Rezeptorexpression der MCF-7 Zellen

Der Rezeptorstatus der bekanntermaßen ER und PR positiven Zelllinie MCF-7 wurde immunocytochemisch überprüft, um als Positivkontrolle für die Primärkulturen zu dienen. Alle Rezeptoren wurden deutlich nukleär exprimiert. Das Expressionsmuster beider **ER** Subtypen war ähnlich ausgeprägt (Abb.33 und 34), nahezu jede Zelle ließ eine Färbung erkennen. Noch deutlicher erschien die Expression des **PR** (Abb.35). Hier waren neben stark positiven auch einzelne negative Zellen erkennbar. Etwas schwächer wurde der **AHR** exprimiert, im Unterschied zu den Primärkulturen aber hauptsächlich nukleär (Abb.36).



Immunocytochemische Rezeptordarstellung der MCF-7 Zellen

Abb.33: ER α stark positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.34: ER β stark positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.35: PR stark positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.36: AHR positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.37: Negativkontrolle (Vergrößerung 100x)

4.3. Ergebnisse der Steroidrezeptorquantifizierungen

Nach 72h Exposition der Endometriumzellkulturen mit den Testagenzien wurden immuncytochemische Rezeptordarstellungen durchgeführt und die Expressionsänderungen anschließend mittels HSCORE quantifiziert. Die EEC kamen primär, die ESC bis zur zweiten Passage zum Einsatz. Alle Bestimmungen wurden mindestens zweimal durchgeführt. Ein HSCORE von 1 entsprach einem negativen Rezeptorstatus, maximal konnte ein Punktwert von 4 erreicht werden. In den Abbildungen 38 bis 45 wurde der HSCORE bezogen auf den dekadischen Logarithmus der Konzentration der jeweiligen Testsubstanz dargestellt. Die Konzentration „0nM“ entspricht der Negativkontrolle, d.h. dem Expressionsmuster nach 72h Inkubation der Kulturen mit serum- und steroidhormonfreiem Medium.

Da die immuncytochemischen Untersuchungen der MCF-7 Zellen auf den für die Expositionsuntersuchungen erforderlichen MTP (Plastikoberfläche) nicht durchgeführt werden konnten, musste auf eine Schadstofffestung mit anschließender Rezeptorquantifizierung verzichtet werden.

4.3.1. Steroidrezeptorquantifizierung nach Exposition der endometrialen Epithelzellkulturen

Abb.38 stellt das Expressionsmuster der Steroidrezeptoren nach Exposition der kultivierten EEC mit E2 dar. Es wird deutlich, dass insgesamt der HSCORE aller Rezeptoren anstieg, wobei die Expression des ER α bei 1nM einen Peak zeigte, die für ER β hingegen bei dieser Konzentration stark zurückging. Dadurch entstand ein nahezu gegensinniger Verlauf beider Kurven. Die Expression des PR blieb im gesamten Konzentrationsbereich oberhalb der Negativkontrolle und folgte in etwa dem Expressionsmuster für ER β .

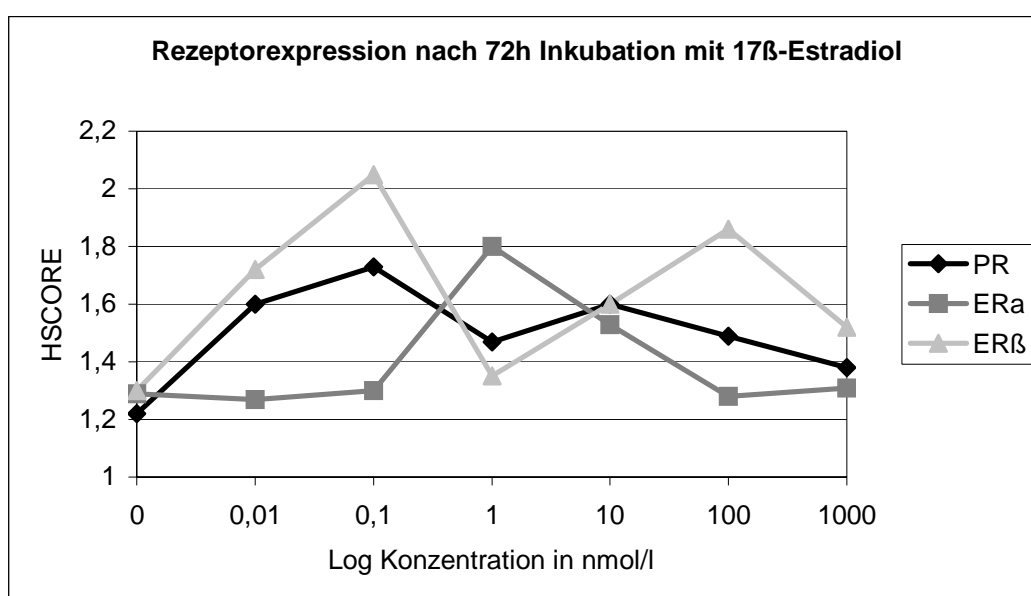


Abb.38: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der EEC mit E2

Nach Exposition mit **PCB153** (Abb.39) fiel auf, dass die Expression aller Steroidrezeptoren deutlich gesteigert wurde. Insgesamt waren die Steigerungen ähnlich stark wie bei der Positivkontrolle ausgeprägt und für ER β am höchsten. Maximale HSCORE Werte wurden nach Exposition mit 1nM erreicht, bei 1 μ M waren sie wieder auf dem Niveau der Negativkontrolle.

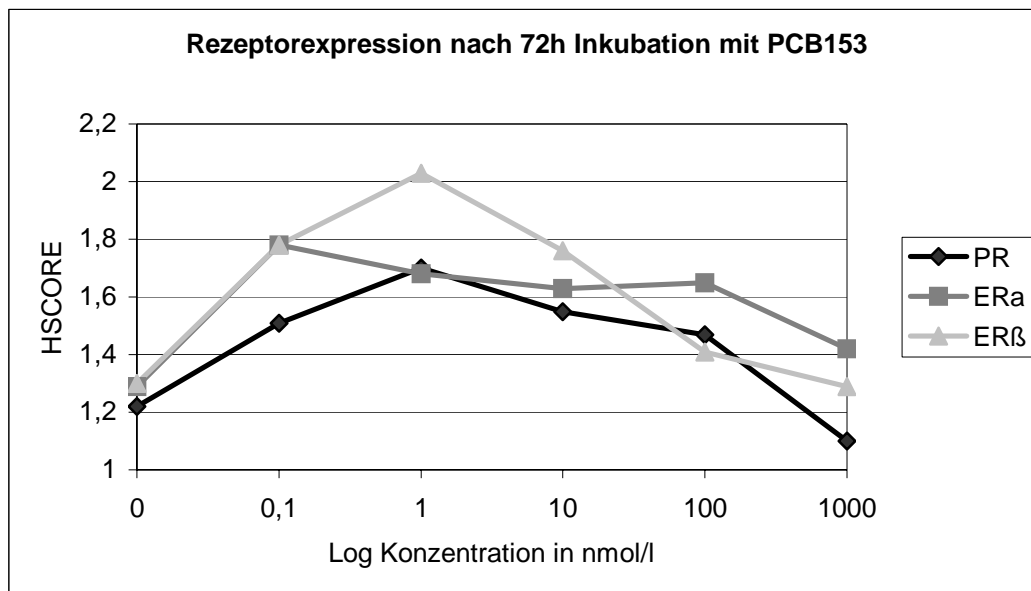


Abb.39: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der EEC mit PCB153

Auch nach Inkubation mit β -HCH (Abb.40) zeigte sich ein Anstieg der Expression sämtlicher Steroidrezeptoren, der aber nicht so stark ausgeprägt war, wie bei der Positivkontrolle. Der Verlauf der Kurven war für beide ER Subtypen parallel und erstreckte sich plateauförmig über den gesamten Konzentrationsbereich.

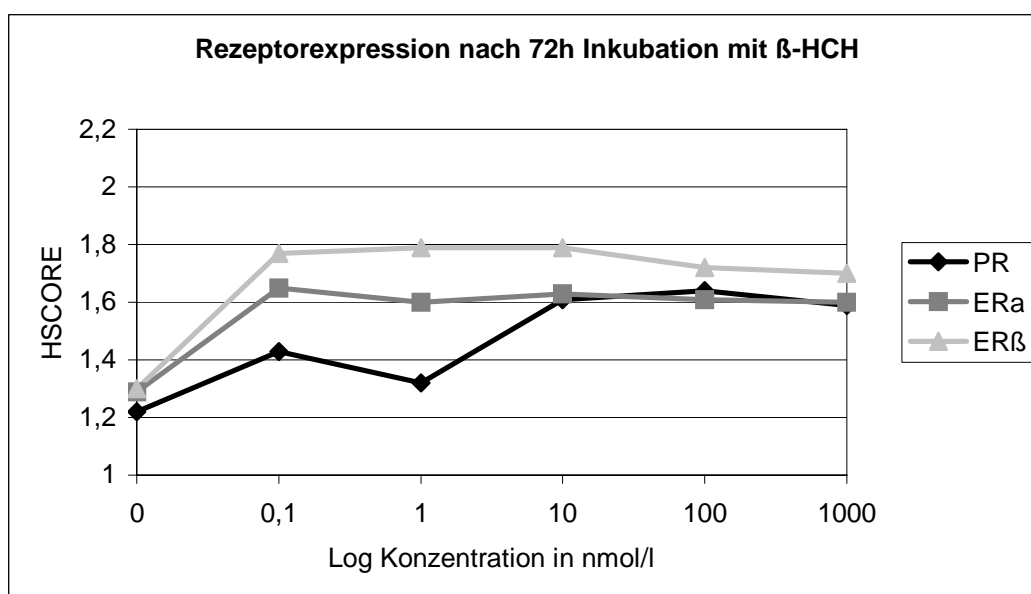


Abb.40: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der EEC mit β -HCH

Die Rezeptorexpression nach p,p'DDE Exposition (Abb.41) zeigte kaum Veränderungen. Lediglich für ER β ließ sich eine geringe Steigerung nachweisen.

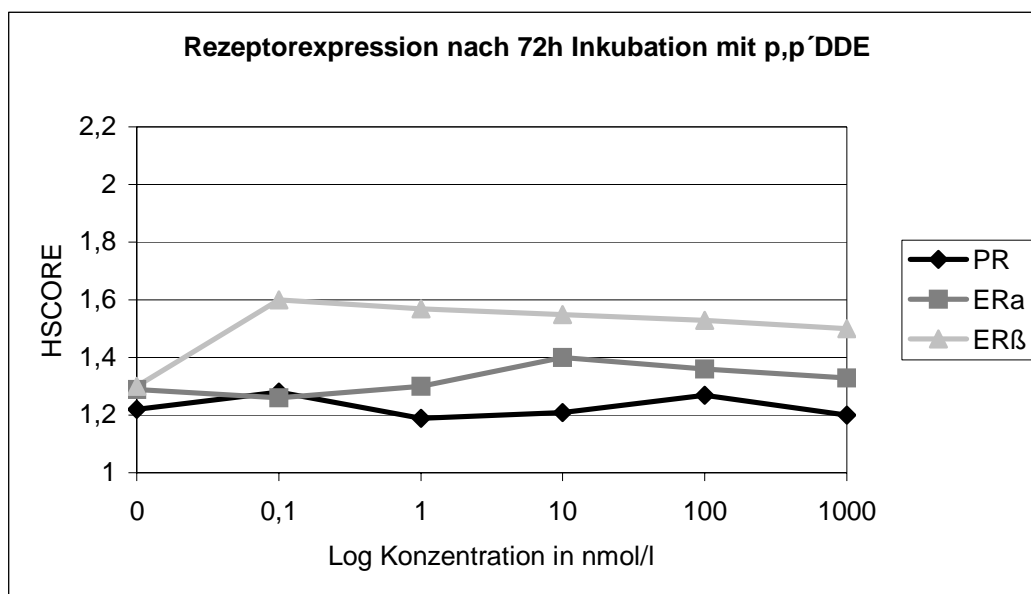


Abb.41: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der EEC mit p,p'DDE

4.3.2. Steroidrezeptorquantifizierung nach Exposition der endometrialen Stromazellkulturen

Im Vergleich mit den EEC zeigten sich bei den mit E2 exponierten Stromazellen kaum Veränderungen der ER Level, wohingegen der PR Anstieg sehr ausgeprägt erfolgte (Abb.42). Bei 100pM bis 10nM E2 wurden maximale Expressionsraten für den PR erzielt. Wie bereits in den Abb. 28 und 29 ersichtlich war, konnte ER β bei dieser Zellpopulation auch in der Negativkontrolle als deutlich stärker exprimiert nachgewiesen werden als ER α .

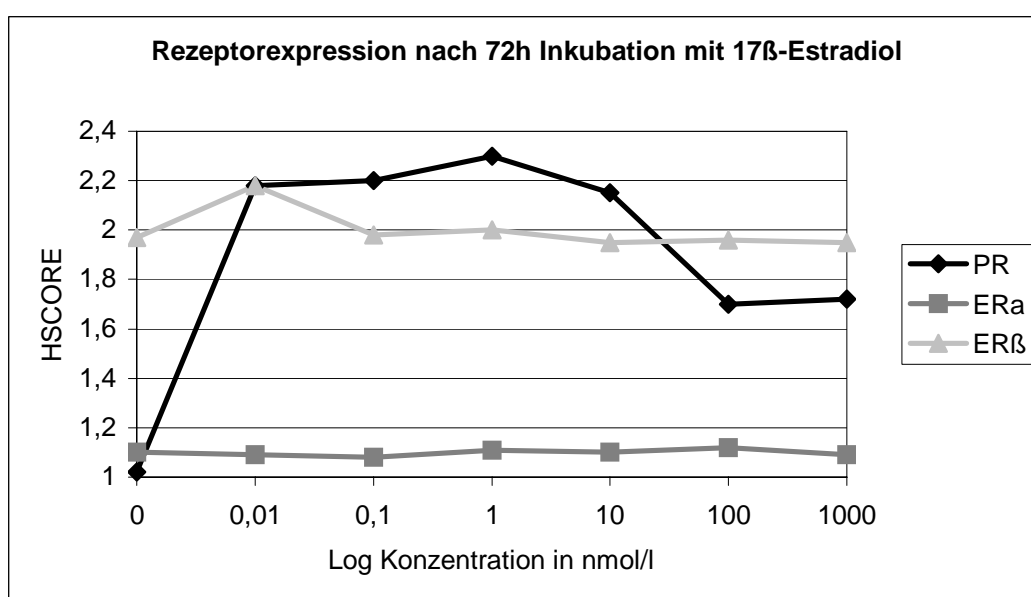


Abb.42: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der ESC mit E2

Auch nach Inkubation mit **PCB153** stieg die PR Expression deutlich an (Abb.43). Beide ER zeigten kaum Veränderungen ihrer Expressionskurven, ER α wurde hier ebenfalls auf niedrigstem Niveau exprimiert, wohingegen ER β wiederum stärker nachweisbar war.

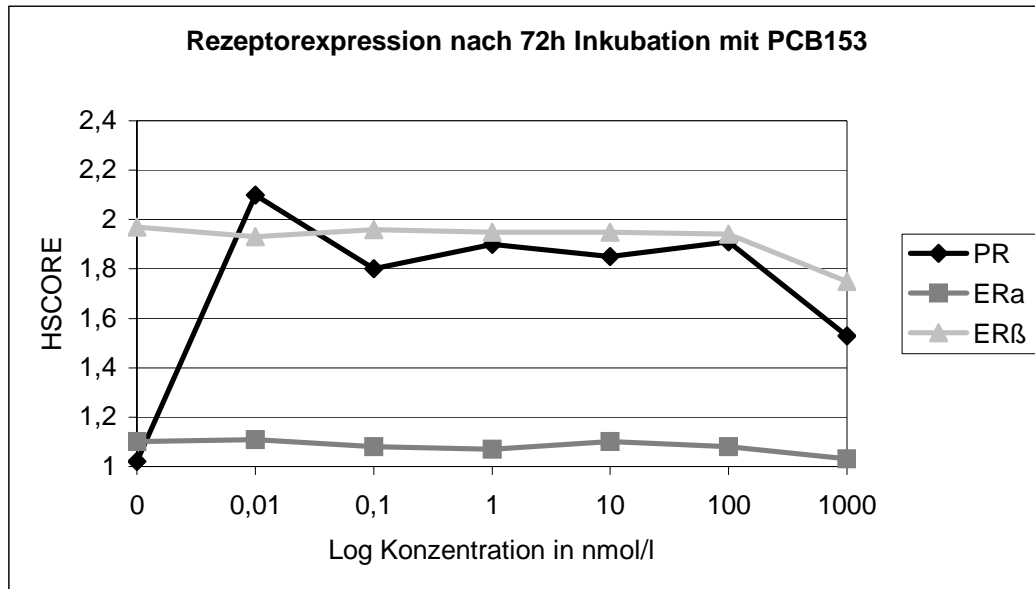


Abb.43: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der ESC mit PCB153

Nach dreitägiger Inkubation mit β -HCH zeigte sich lediglich ein schwacher Anstieg des PR (Abb.44), sonst aber keine Veränderung der Rezeptorexpression gegenüber der Negativkontrolle.

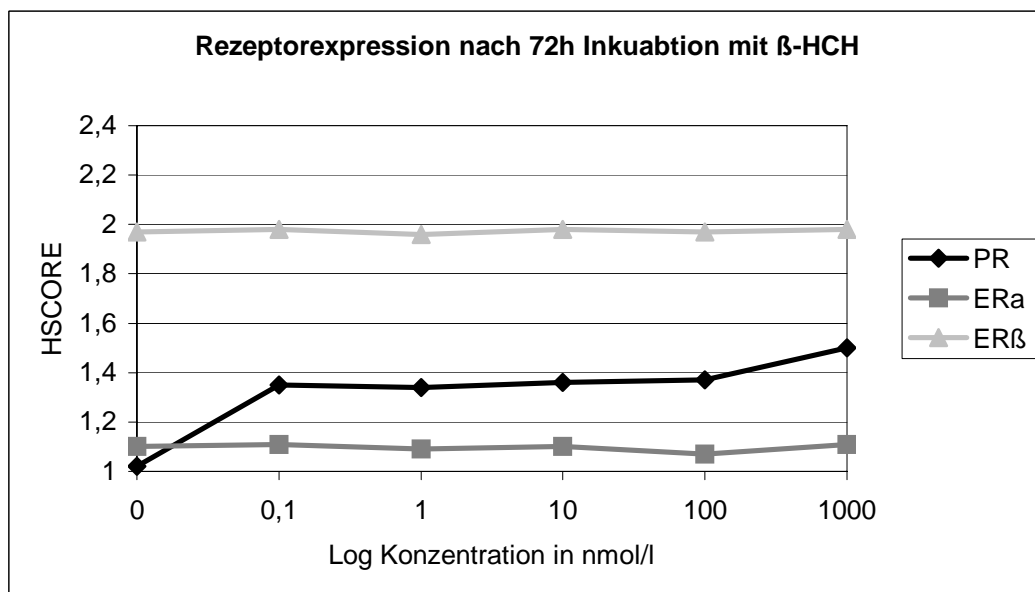


Abb.44: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der ESC mit β -HCH

Exponierte man die ESC mit p,p'DDE (Abb.45), war nur ein sehr diskreter Anstieg der PR Expression zu beobachten. ER β zeigte einen kleinen Peak bei 100pM, ER α veränderte sich nicht.

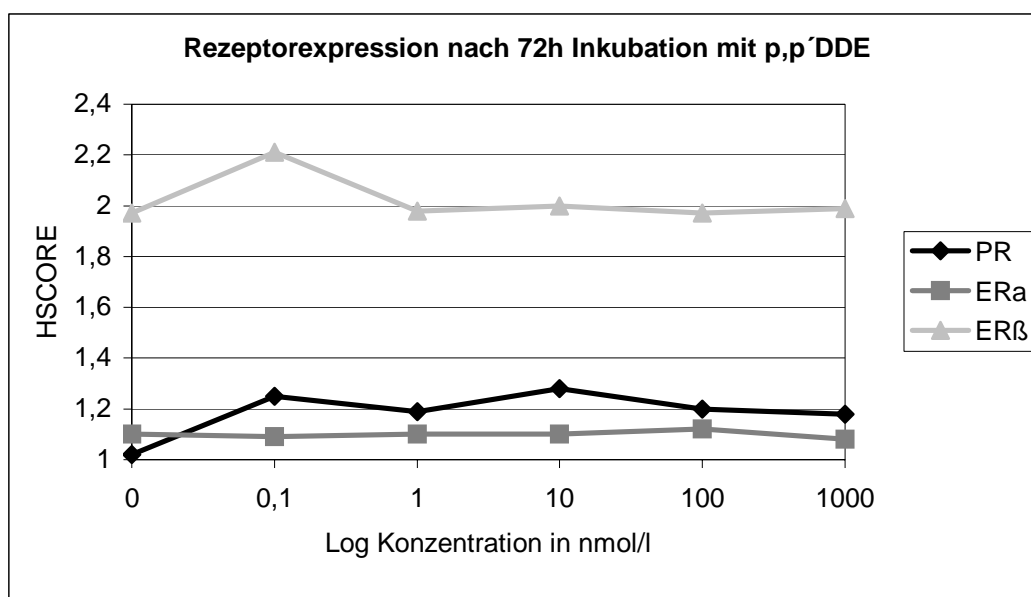


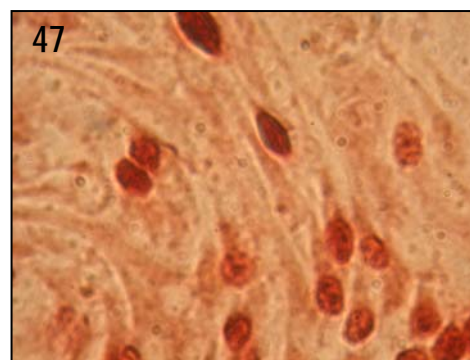
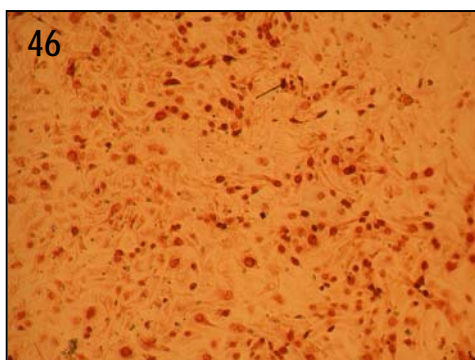
Abb.45: Veränderung der Rezeptorexpression nach dreitägiger Inkubation der ESC mit p,p'DDE

4.4. Ergebnisse der immunocytochemischen Proliferationsbestimmungen

Das Proliferationsverhalten aller Zellen in Kultur wurde immunocytochemisch anhand der Expression des Proliferationsmarkers Ki67 bestimmt. Bei den Endometriumzellen erfolgte zusätzlich eine Quantifizierung Ki67 positiver Zellen nach Schadstoffexposition mittels HSCORE Bestimmung.

4.4.1. Ki67 Expression der endometrialen Epithelzellkulturen

Die Abb.46 und 47 zeigen Bilder nichtexponierter EEC. Es zeichnen sich deutlich die gefärbten, Ki67 positiven Kerne von den negativen, mitotisch inaktiven ab.



Immunocytochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 an kultivierten EEC

Abb.46: Ki67 positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.47: Ki67 positiv (AEC Substrat, Vergrößerung 400x)

Der Anstieg der Ki67 Expression bei E2- exponierten EEC war sehr ausgeprägt (Abb.48). Die maximalen Proliferationssteigerungen erfolgten nach Inkubation mit 1nM E2. Die getesteten Umweltchemikalien waren ebenfalls in der Lage, die Proliferationsrate zu steigern. **PCB153** bewirkte einen starken Anstieg (bei 10pM), dann ein allmähliches Absinken der Ki67 Expression. Bei der eingesetzten Maximalkonzentration von 1µM PCB153 wurde die Proliferationsrate der Negativkontrolle bereits deutlich unterschritten. Nach **β-HCH**- Exposition war die Mitoserate ebenfalls erhöht, mit einem Peak bei 10nM. Auch hier lagen die HSCORE Werte nach Inkubation mit der Höchstkonzentration (1µM) unterhalb der Negativkontrolle. Die Proliferationssteigerungen nach Zugabe von **p,p'DDE** waren gering ausgeprägt und blieben insgesamt deutlich hinter denen der Positivkontrolle zurück.

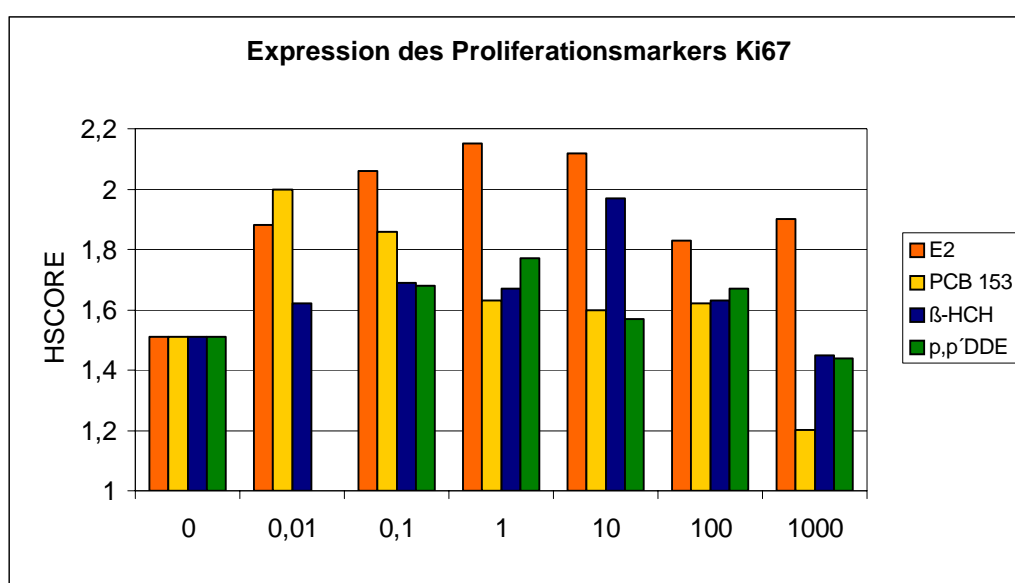
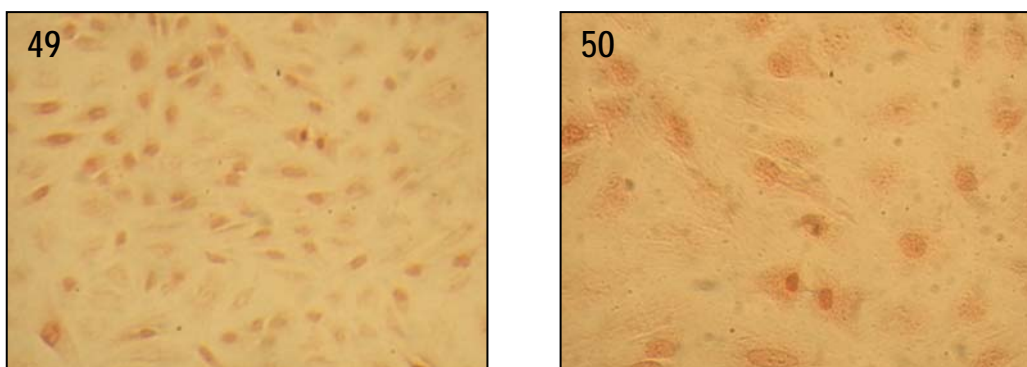


Abb.48: Veränderung des Expressionsmusters des Proliferationsmarkers Ki67 nach dreitägiger Exposition der EEC mit verschiedenen Testchemikalien

4.4.2. Ki67 Expression der endometrialen Stromazellkulturen

Anders als bei den EEC war die Dichte der Ki67 positiven, mitotisch aktiven Zellen bei den ESC von vornherein geringer (Abb.49 und 50).



Immuncytochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 an kultivierten ESC

Abb.49: Ki67 positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 100x)

Abb.50: Ki67 positiv (DAB Substrat, Vergrößerung 400x)

Aufgrund der geringeren Mitoserate lagen auch die ermittelten HSCORE Werte der Negativkontrolle von vornherein niedriger (<1,4), als bei den EEC. Nach Inkubation mit **E2** zeigte sich ein deutlicher Anstieg der Proliferationsrate, der bei einer Konzentration von 1nM sein Maximum erreichte. Diese Steigerung war aber weniger stark, als bei den Epithelzellen. Der HSCORE lag nach Inkubation mit **PCB153** und **β-HCH** nur geringfügig unterhalb der Positivkontrolle und erreichte Maximalwerte von 1,62 (1nM PCB153) und 1,6 (100pM β-HCH). Das **p,p'DDE** bewirkte Mitoseraten, die sogar höher waren als nach Inkubation mit E2 und bei 1nM ihre maximale Ausprägung zeigten (Abb.51).

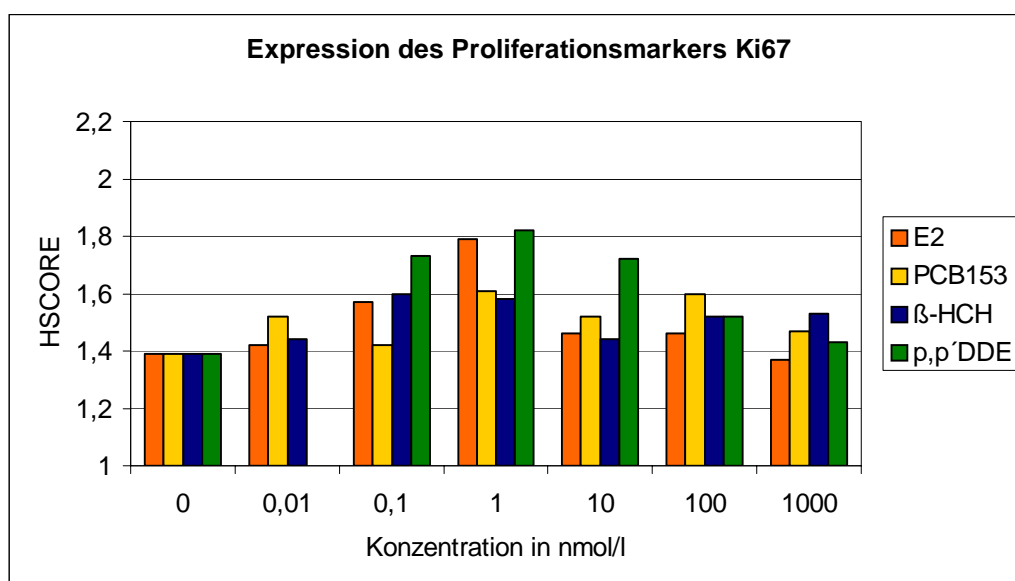


Abb.51: Veränderung des Expressionsmusters des Proliferationsmarkers Ki67 nach dreitägiger Exposition der ESC mit verschiedenen Testchemikalien

4.4.3. Ki67 Expression der MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zellen zeigten erwartungsgemäß die stärkste Expression des Proliferationsmarkers Ki67. Der HSCORE nichtexponierter Zellen lag bei 2,9. Eine Bestimmung der Ki67 Expression nach Exposition wurde nicht durchgeführt.

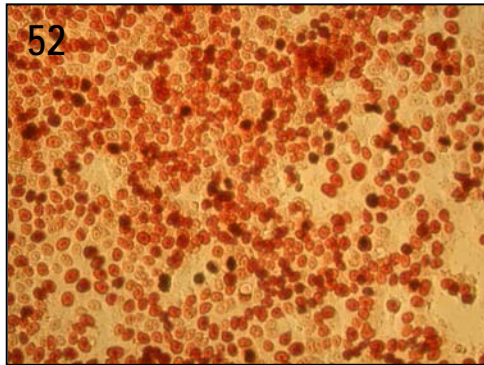


Abb.52: Immunocytochemische Darstellung des Proliferationsmarkers Ki67 an kultivierten MCF-7 Zellen

4.5. Ergebnisse des ESCREEN Assays

Auch für die Expositionsuntersuchungen mit anschließendem ESCREEN Assay kamen nur primär kultivierte EEC, bzw. ESC bis zur zweiten Passagierung zum Einsatz. Auf jeder MTP wurden Doppelbestimmungen durchgeführt und die Versuche mehrfach wiederholt. Der PE der einzelnen Testansätze entsprach der relativen OD, bezogen auf die Negativkontrolle (PE=100%). Bei der Darstellung des RPE einer Substanz wurde in den Diagrammen der RPE der Negativkontrolle (0%) und der Positivkontrolle (100%) pfeilmarkiert dargestellt.

4.5.1. ESCREEN Assay nach Exposition der endometrialen Epithelzellkulturen

Die Abb.52 stellt den mittleren PE verschiedener Konzentrationen E2 nach 72h Inkubation der EEC dar. Es handelt sich dabei um die Mittelwerte aller Positivkontrollen der einzelnen Schadstoffmessungen. Die Exposition mit E2 rief generell einen Proliferationsanstieg hervor. Das Maximum (134%) war bereits nach Inkubation mit 100pM erreicht, der PE bewegte sich bei höheren Konzentrationen um 120%.

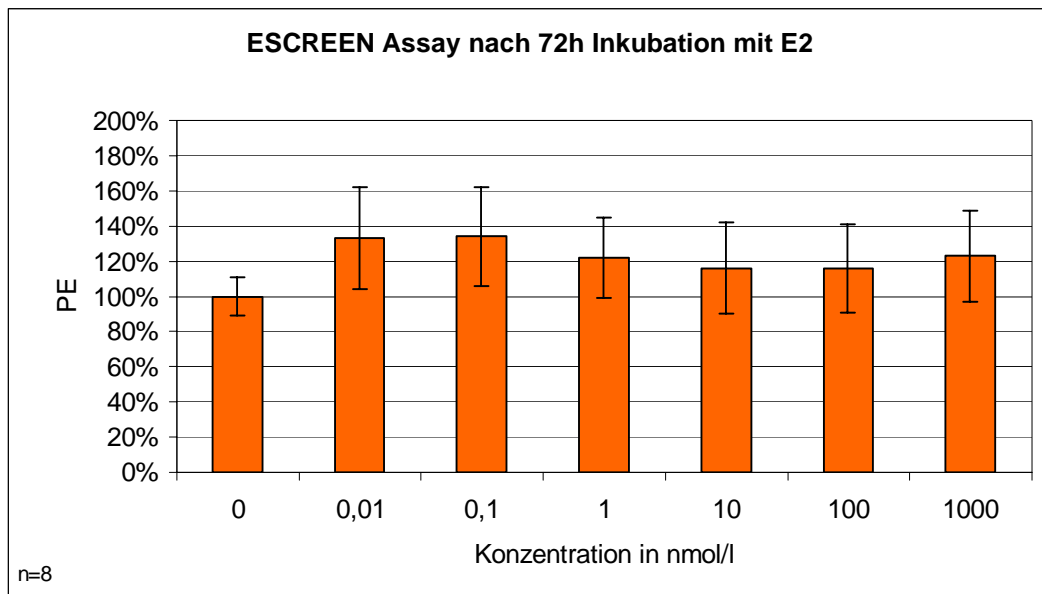


Abb.52: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen E2 auf primär kultivierte EEC
Fehlerbalken = Standardabweichung

Die Inkubation mit PCB153 führte nach 72h ebenfalls zum Anstieg des PE, der aber geringer ausfiel, als nach E2 Exposition (Abb.53). Der höchste Wert lag hier bei 117% nach Exposition mit 1nM der Substanz. Lediglich nach Zugabe der Maximalkonzentration (1µM) sank der PE leicht unter die Negativkontrolle ab. Der direkte Vergleich mit dem Maximalwert der Positivkontrolle offenbarte, dass die durch PCB153 induzierten Proliferationssteigerungen höchstens 50% des PE(E2max) erreichten (Abb.54).

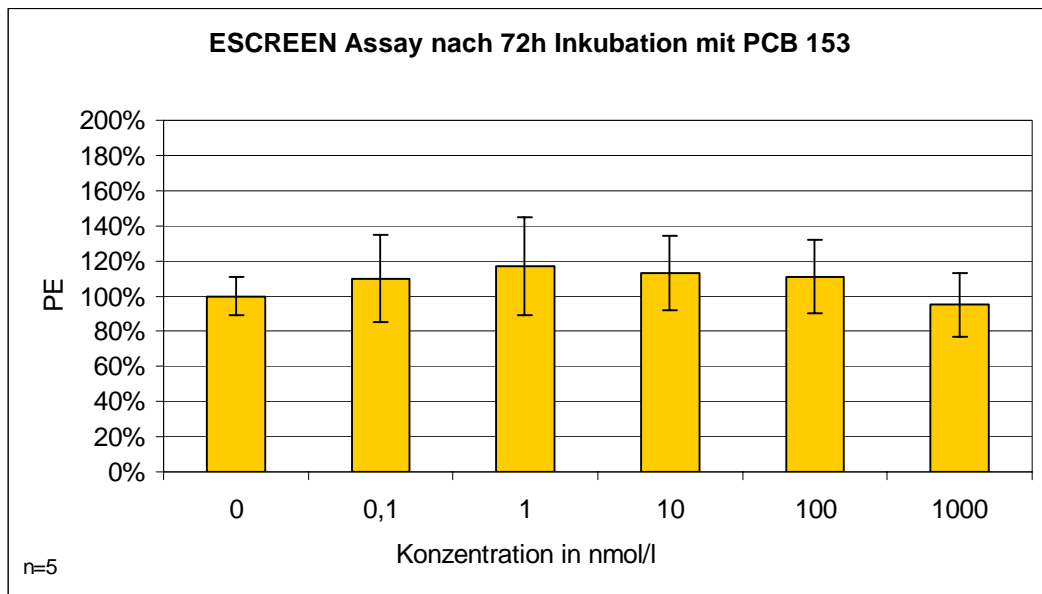


Abb.53: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf primär kultivierte EEC
Fehlerbalken = Standardabweichung

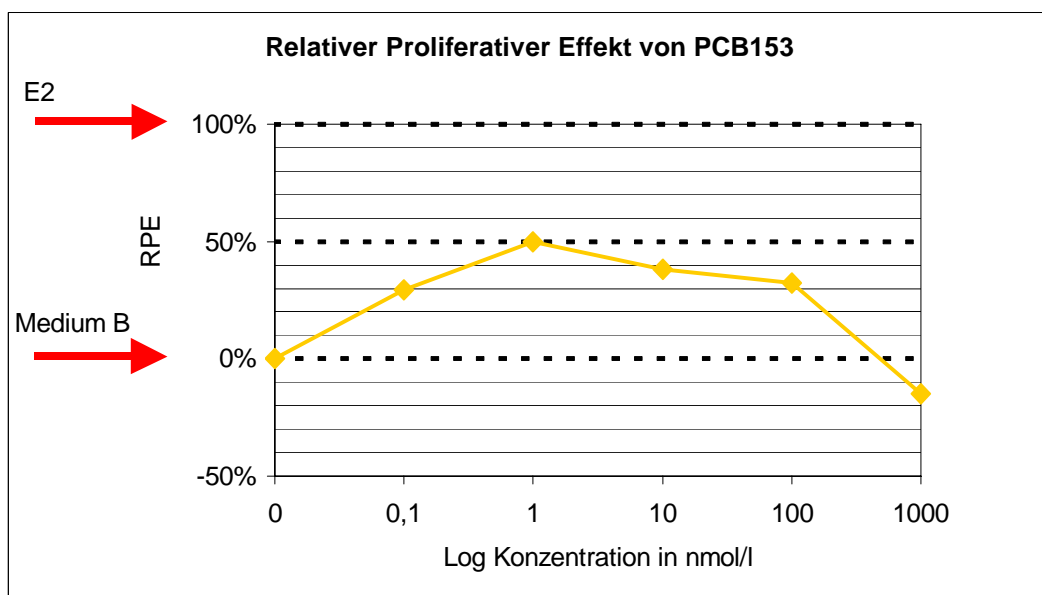


Abb.54: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf primär kultivierte EEC

Die dreitägige Inkubation mit β -HCH ergab Proliferative Effekte, die sich mehrheitlich um 120% bewegten (Abb.55) und damit geringfügig stärker waren, als die des PCB153. Alle Messwerte blieben durch den gesamten getesteten Konzentrationsbereich oberhalb der Negativkontrolle. Der RPE (Abb.56) lag etwa zwischen der Negativ- und der Positivkontrolle und erreichte maximal 68% (100pM β -HCH).

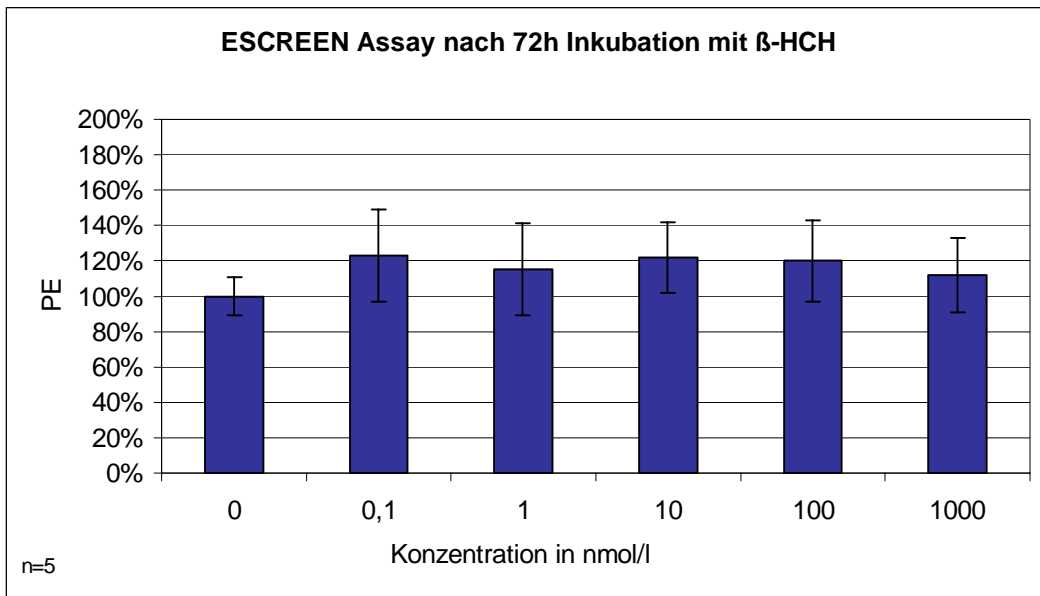


Abb.55: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf primär kultivierte EEC
Fehlerbalken = Standardabweichung

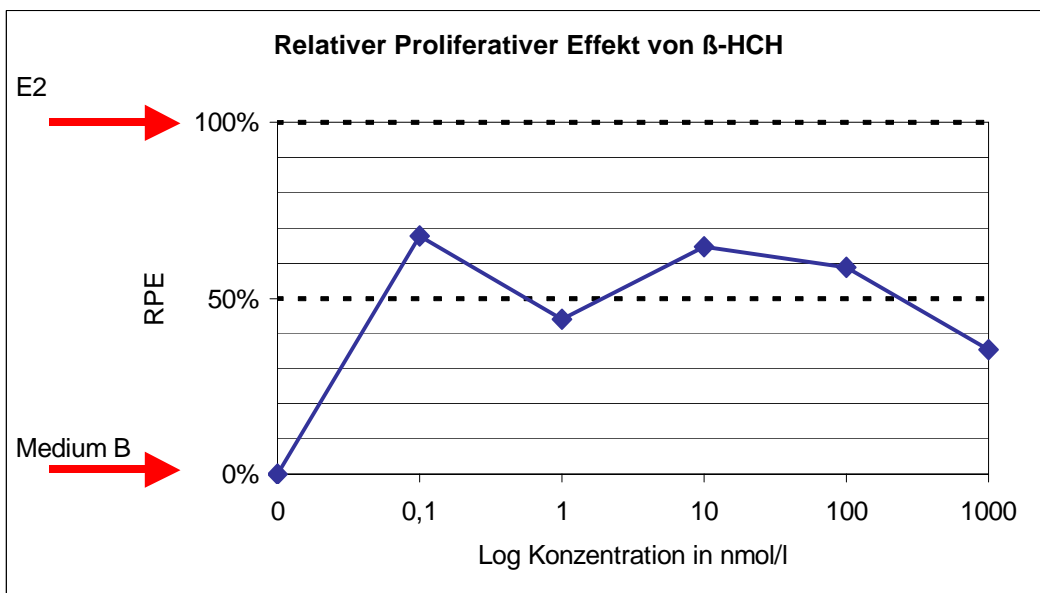


Abb.56: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf primär kultivierte EEC

Die Inkubation der EEC mit **p,p'DDE** bewirkte einen sehr stark ansteigenden PE (Abb.57), der nach Zugabe der maximalen Testkonzentration (1 μ M) einen Höchstwert von 153% erreichte. Die Proliferationsraten bewegten sich im restlichen Konzentrationsbereich um 140%. Die Berechnung des RPE zeigte, dass die beobachteten Proliferationssteigerungen nach Inkubation mit p,p'DDE sogar deutlich oberhalb von PE(E2max) lagen und damit den stärksten Effekt an dieser Zellpopulation hervorriefen (Abb.58).

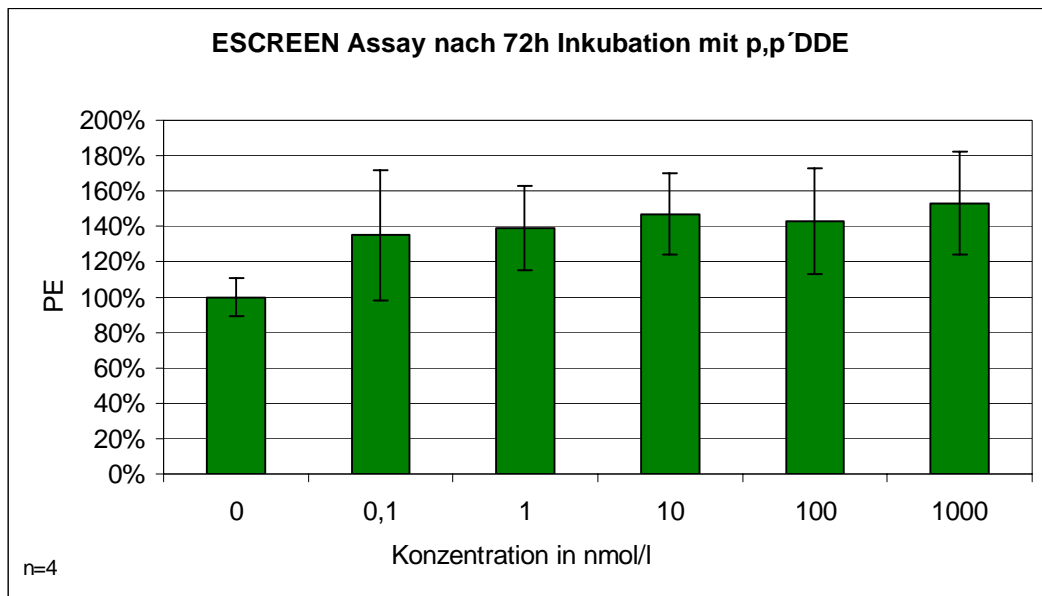


Abb.57: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf primär kultivierte EEC
Fehlerbalken = Standardabweichung

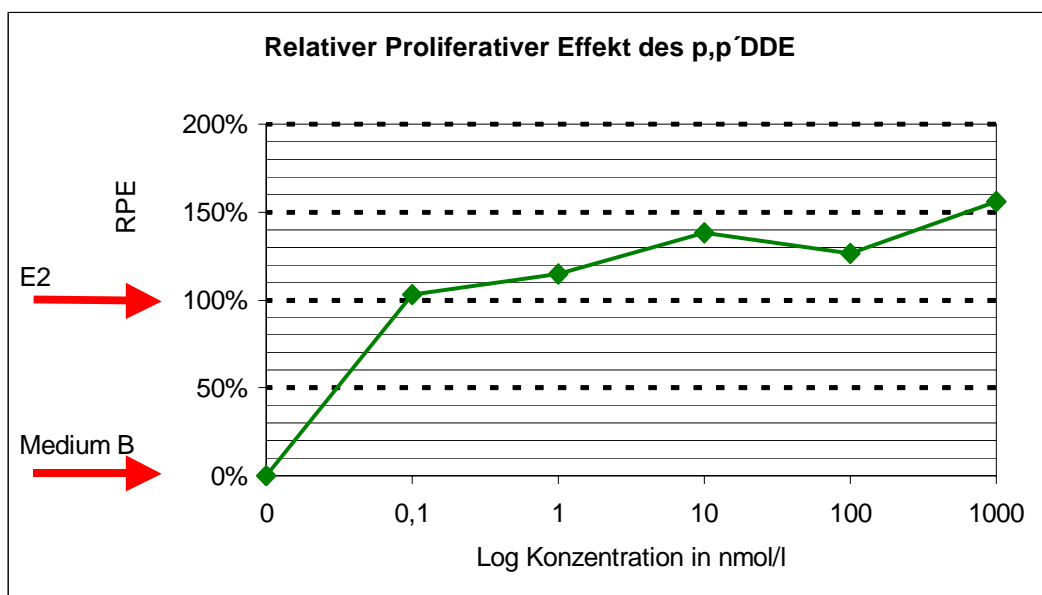


Abb.58: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf primär kultivierte EEC

4.5.2. ESCREEN Assay nach Exposition der endometrialen Stromazellkulturen

Die Abb.59 zeigt zunächst wieder den Einfluss des E2 als Positivkontrolle auf kultivierte ESC im Verhältnis zur Proliferation von in Medium B kultivierten Zellen (Negativkontrolle). Es fällt auf, dass sich über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich hinweg die Proliferativen Effekte nur um das Niveau der Negativkontrolle bewegten. Maximal wurden Werte von 107% (100nM E2) erreicht. Die Stromazellen reagierten somit auf E2 Gaben kaum mit einer Proliferationssteigerung.

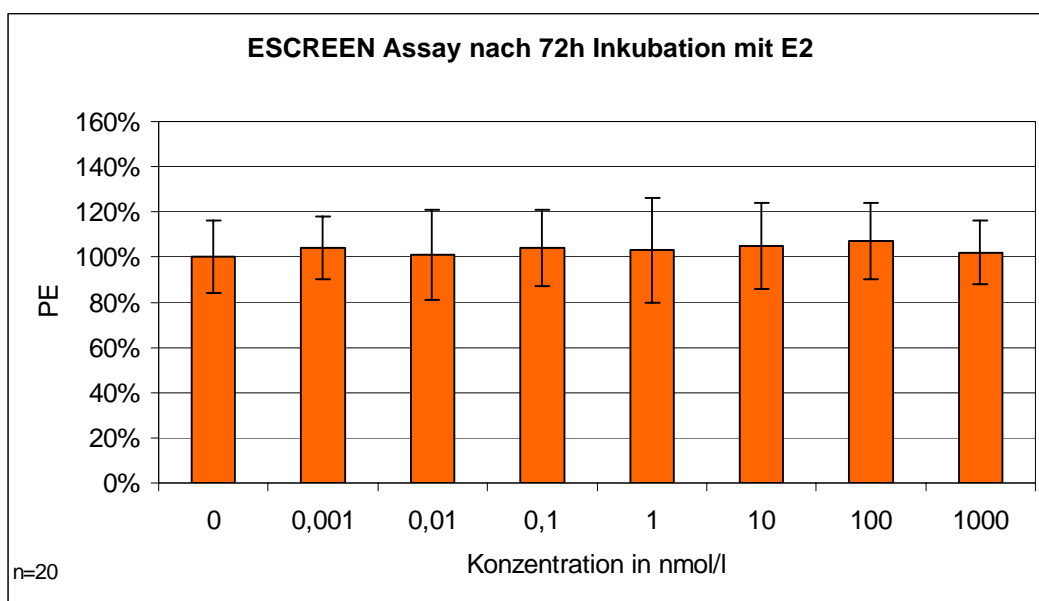


Abb.59: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen E2 auf primär kultivierte ESC
Fehlerbalken = Standardabweichung

Bedingt dadurch, dass das E2 für die Versuche als Positivkontrolle eingesetzt wurde, kam es zu Schwierigkeiten bei den RPE Berechnungen. Die durch E2 induzierten Proliferationssteigerungen wichen nur geringfügig von der Negativkontrolle ab, so dass die für die eingesetzten Testagenzien ermittelten RPE Werte als überhöht betrachtet werden müssen.

Die Proliferationsrate der ESC war nach Exposition mit PCB153 deutlich gesteigert. Die Werte bewegten sich mehrheitlich zwischen 110% und 120% (Abb.60) und waren somit stärker ausgeprägt als bei der Positivkontrolle. Das führte dazu, dass der RPE für die meisten Testkonzentrationen von PCB153 weit über 100% lag und nur bei Maximalkonzentration von 1µM unter die Negativkontrolle zurückfiel (Abb.61).

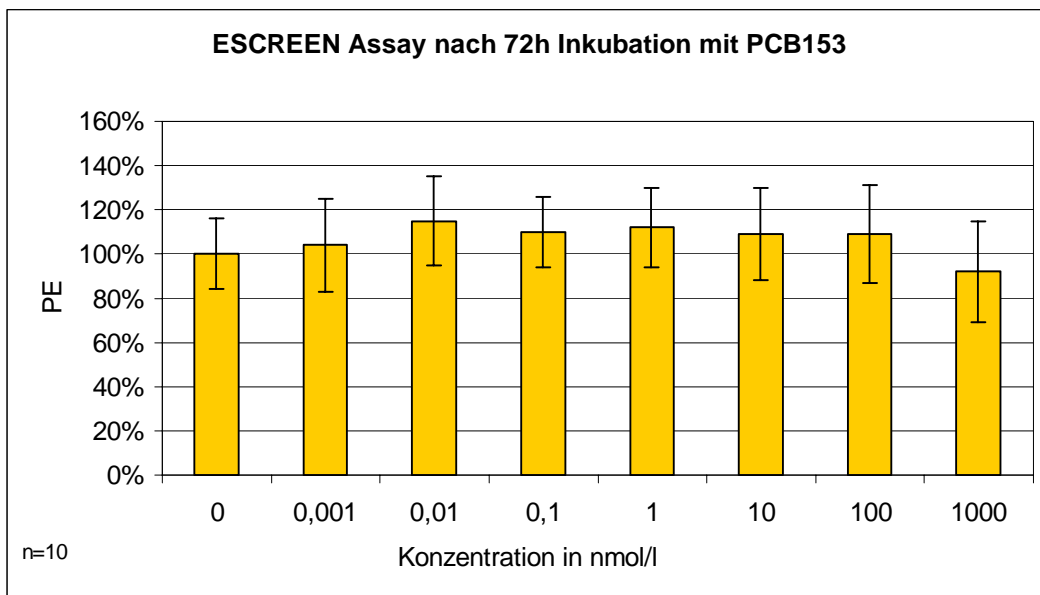


Abb.60: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf primär kultivierte ESC
Fehlerbalken = Standardabweichung

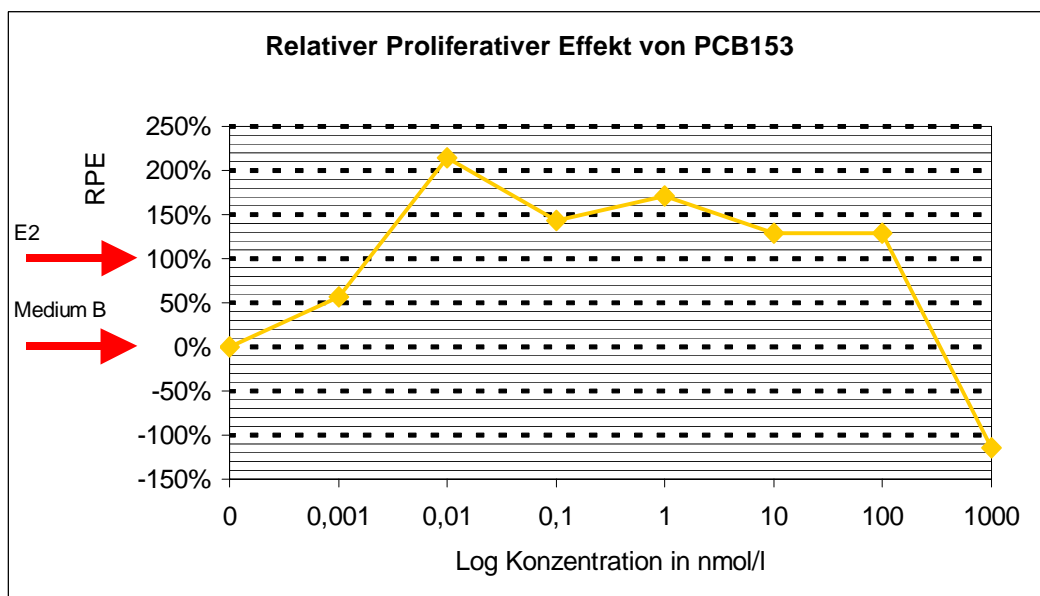


Abb.61: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf primär kultivierte ESC

Die Exposition mit β -HCH bewirkte Wachstumssteigerungen der ESC besonders im niedrigen Konzentrationsbereich bis 10pM (Abb.62). Nach Inkubation mit höheren Konzentrationen (>100pM) blieb der PE unter 110%. Entsprechend zeigte die Berechnung des RPE Peaks bei 1pM und 10pM, wohingegen sich die Werte bei Konzentrationssteigerung wieder um die Positivkontrolle bewegten (Abb.63).

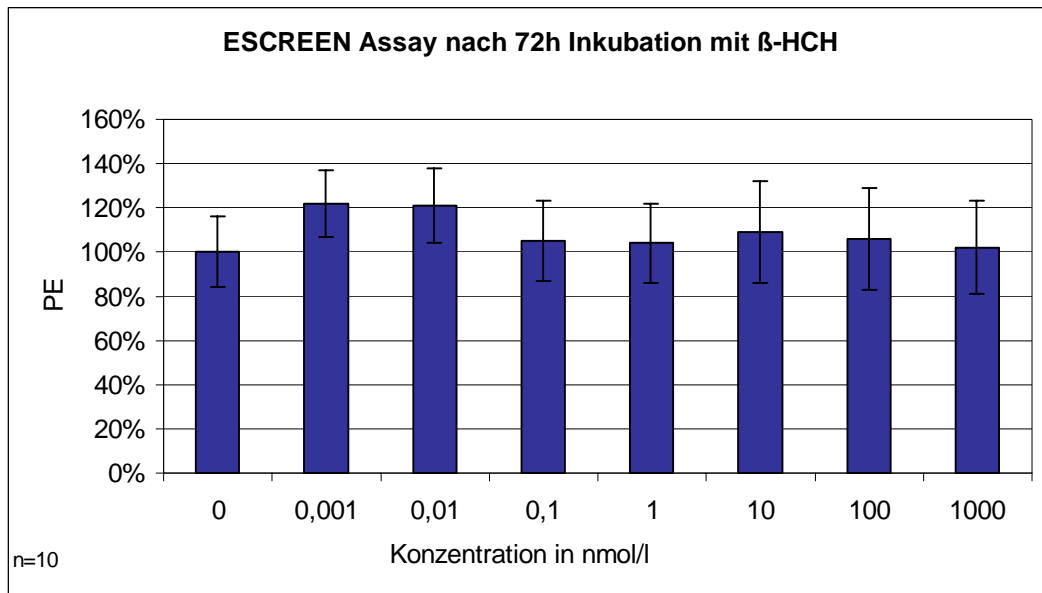


Abb.62: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf primär kultivierte ESC
Fehlerbalken = Standardabweichung

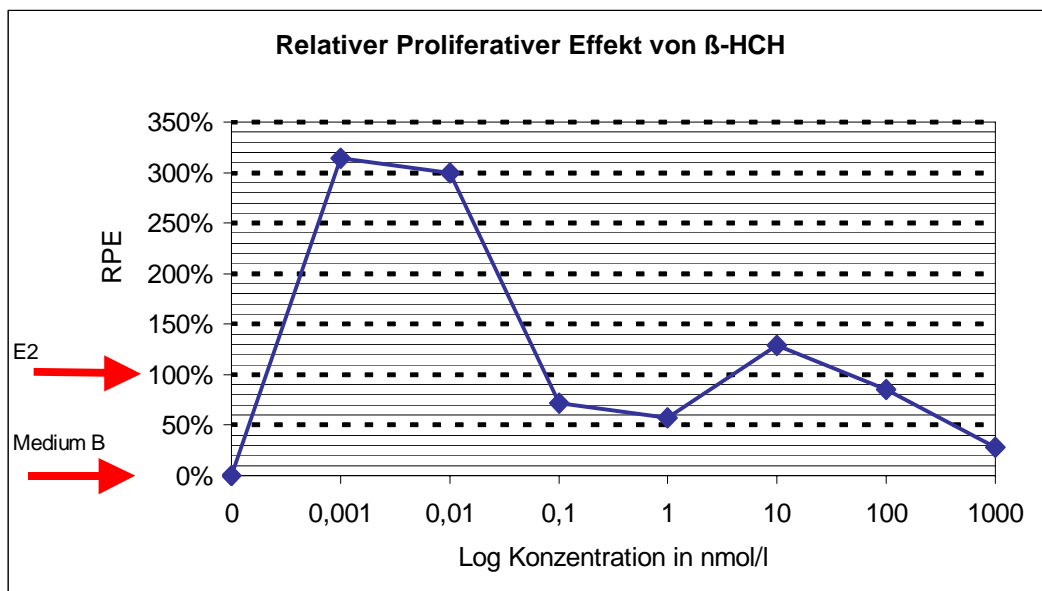


Abb.63: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf primär kultivierte ESC

Die dreitägige Inkubation der ESC mit p,p'DDE bewirkte über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich hinweg geringe Steigerungen des PE bis zu einem Maximum von 111% bei 10nM (Abb.64). Die Berechnung des RPE verdeutlichte, dass ein nahezu konzentrationsabhängiger Anstieg der Proliferationsrate auftrat, der ab einer Konzentration von 1nM oberhalb von PE(E2max) lag (Abb.65).

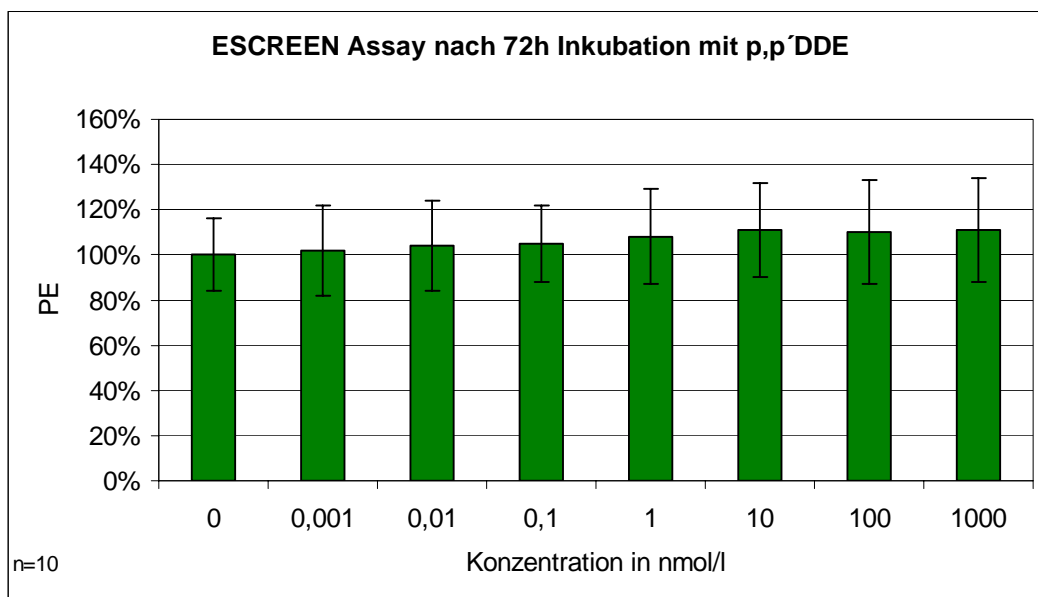


Abb.64: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf primär kultivierte ESC
Fehlerbalken = Standardabweichung

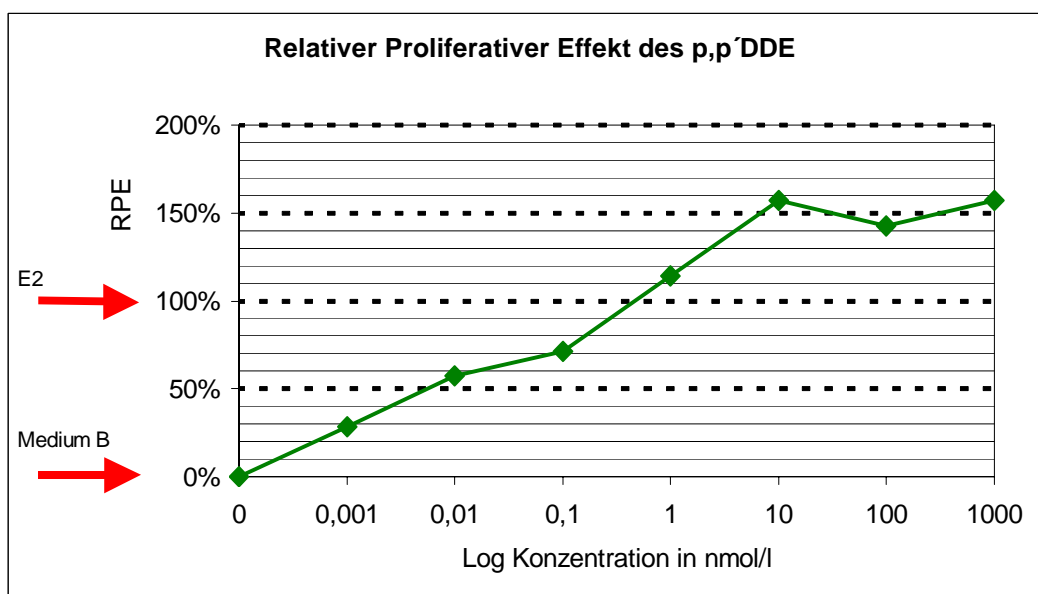


Abb.65: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf primär kultivierte ESC

4.5.3. ESCREEN Assay nach Exposition der MCF-7 Zelllinie

Die MCF-7 Zellen reagierten im ESCREEN Assay mit starken Proliferationssteigerungen nach E2 Exposition (Abb.66). Der Maximalwert (141%) wurde nach dreitägiger Inkubation mit der niedrigsten Konzentration (1pM) erreicht. Insgesamt war das Ausmaß der Proliferativen Effekte ähnlich ausgeprägt, wie bei den primär kultivierten endometrialen Epithelzellen.

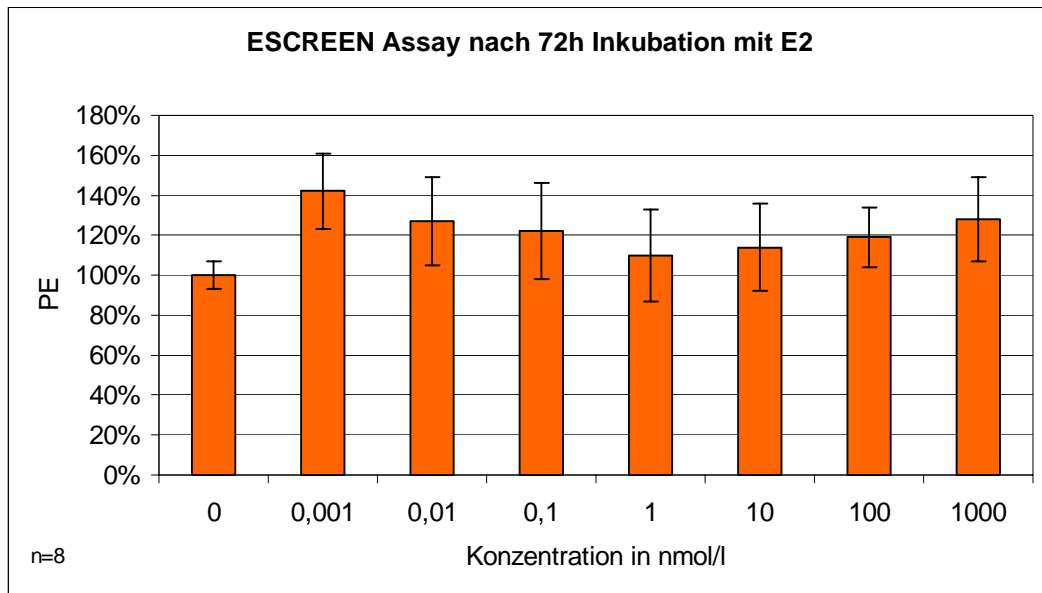


Abb.66: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen E2 auf kultivierte MCF-7 Zellen
Fehlerbalken = Standardabweichung

Auch die Exposition der Zelllinie mit **PCB153** resultierte in Steigerungen des Zellwachstums, die aber maximal bei 122% lagen (Abb.67). Bei Einsatz der Höchstkonzentration kam es bereits zu einem starken Rückgang der Proliferationsrate. Der RPE von PCB153 bewegte sich zwischen Negativ- und Positivkontrolle und schwankte um 50%. Lediglich bei 1µM wurde die 0%-Marke unterschritten (Abb.68).

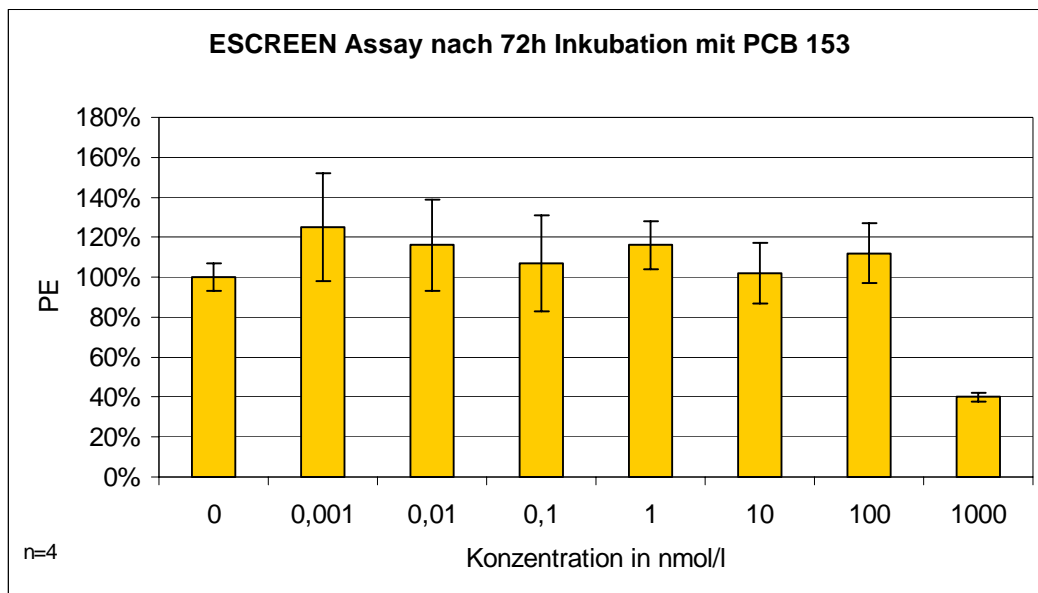


Abb.67: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf kultivierte MCF-7 Zellen
Fehlerbalken = Standardabweichung

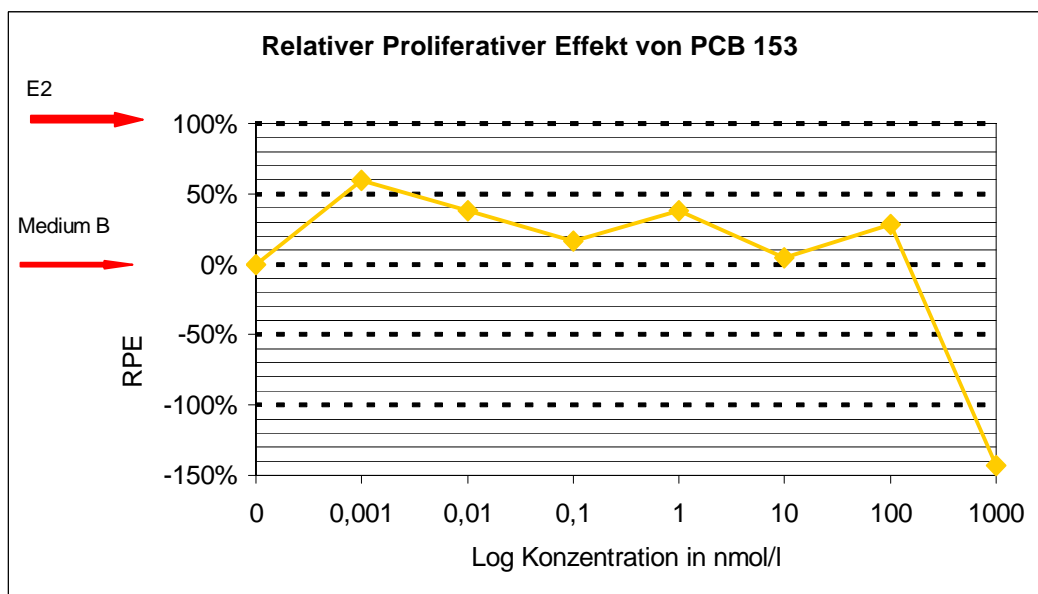


Abb.68: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen PCB153 auf kultivierte MCF-7 Zellen

Der ESCREEN Assay nach Exposition der Zelllinie mit β -HCH zeigte ähnliche Proliferationssteigerungen wie nach Einwirkung des PCBs. Die Maximalwerte lagen über 120% (Abb.69). Der RPE bewegte sich auch hier um 50% (Abb.70). Wie schon bei den anderen Zellkulturen, so wurde auch hier ein ansatzweise zweigipfelig Verlauf der Kurven sichtbar.

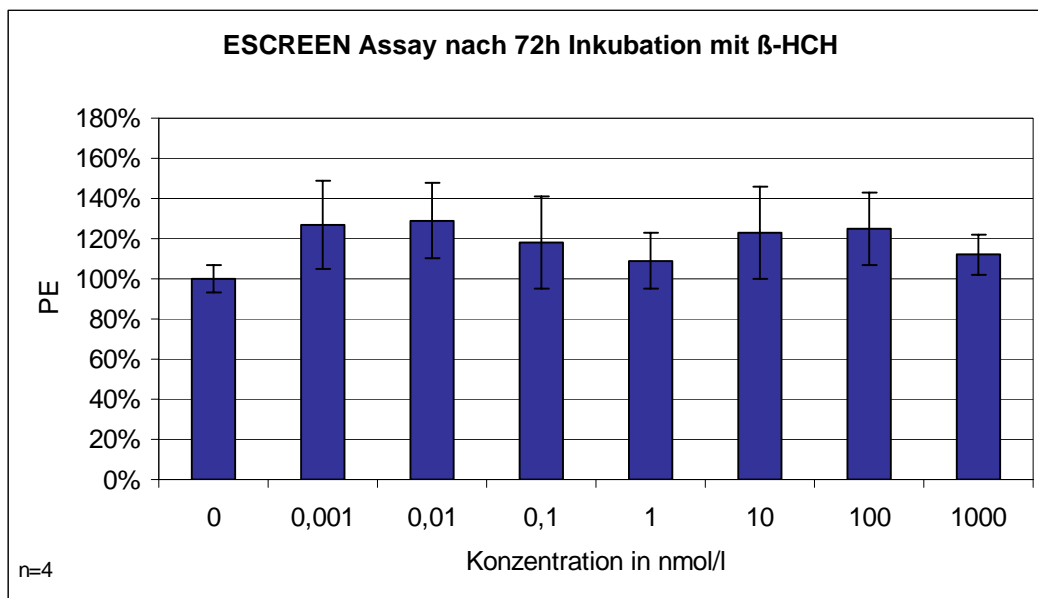


Abb.69: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf kultivierte MCF-7 Zellen
Fehlerbalken = Standardabweichung

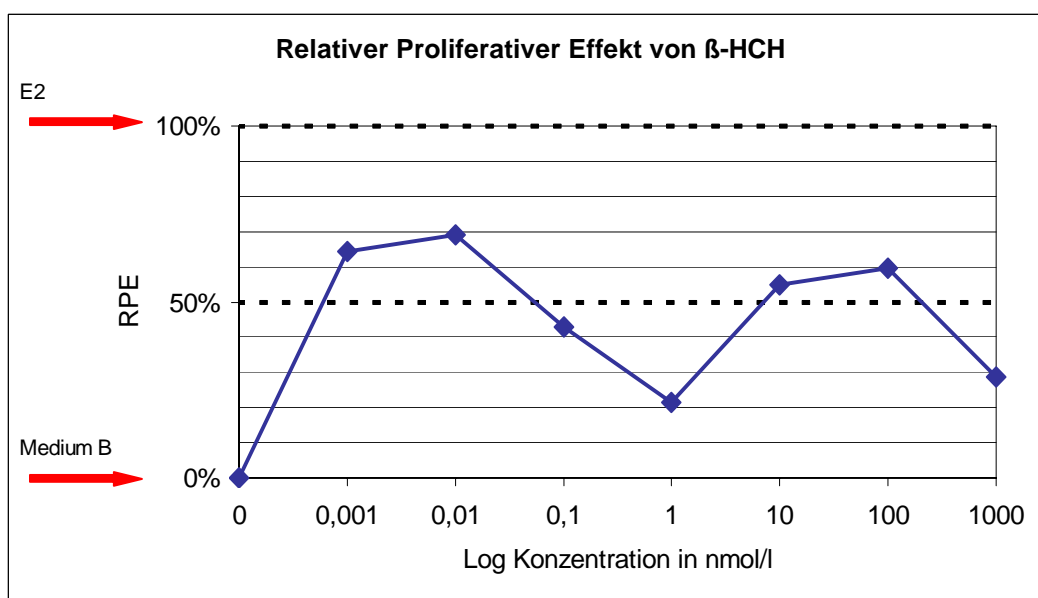


Abb.70: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen β -HCH auf kultivierte MCF-7 Zellen

Eine ähnliche Entwicklung der Proliferationsrate war nach Inkubation mit p,p'DDE zu beobachten. Auch hier lagen die Maximalwerte um 120% (Abb.71). Der Kurvenverlauf für den RPE war ebenfalls etwa zweigipflig, wobei alle Werte im Bereich zwischen Negativkontrolle und PE(E2max) platziert waren (Abb.72).

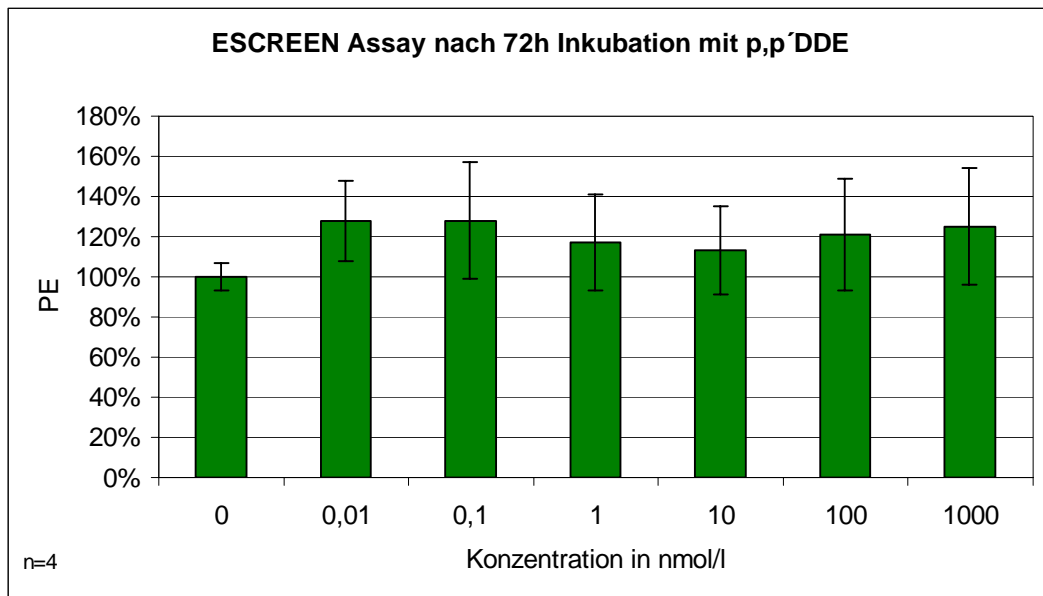


Abb.71: Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf kultivierte MCF-7 Zellen
Fehlerbalken = Standardabweichung

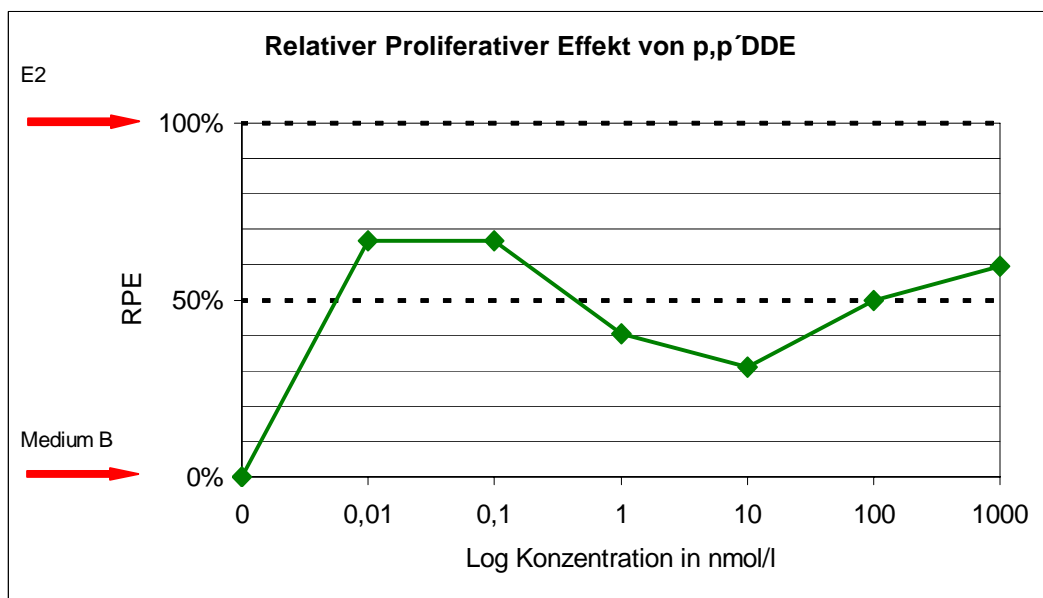


Abb.72: Relativer Proliferativer Effekt verschiedener Konzentrationen p,p'DDE auf kultivierte MCF-7 Zellen

5. Diskussion

5.1. Auswertung der Zielsetzung der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die primäre Kultivierung beider Hauptzellpopulationen des Endometriums, der EEC und ESC, sowie deren Charakterisierung und die Durchführung von Expositionsversuchen an diesen Zellkulturen. Vergleichend dazu wurde die MCF-7 Zelllinie kultiviert. Dem Nachweis der estrogenen Potenz der Testchemikalien dienten zwei verschiedene Assays, welche zum einen Veränderungen im Proliferationsverhalten der kultivierten Zellen, zum anderen Expressionsänderungen der Steroidrezeptoren ER α , ER β , PR und des AHR aufzeigen sollten.

Die primäre Kultivierung von Endometriumzellen konnte erfolgreich durchgeführt werden. Im Vergleich zur MCF-7 Zelllinie kommen Vor- und Nachteile zur Geltung, die im folgenden näher erläutert werden (siehe 5.2.1., 5.3.1.). Der im Anschluss an die Expositionsversuche durchgeführte ESCREEN Assay konnte Änderungen im Proliferationsverhalten der Zellkulturen zuverlässig nachweisen. Die Beurteilung der gewonnenen Ergebnisse und der Validität des Tests erfolgt in den Abschnitten 5.2.3., 5.3.3., 5.4.2. Die für die immunocytochemischen Untersuchungen ausgewählten Steroidrezeptoren ließen Expressionsänderungen nach Schadstoffexposition erkennen (siehe 5.2.2., 5.3.2.). Lediglich eine nähere Betrachtung des AHR war nicht möglich, da das Expressionsmuster einen Rückschluss auf spezifisches Färbeverhalten nicht zuließ.

Es erfolgt nun eine detaillierte Diskussion der verschiedenen methodischen Aspekte und der erzielten Ergebnisse, sowie eine Darstellung möglicher Mechanismen der Xenoestrogenwirkung.

5.2. Auswertung der angewandten Methoden

5.2.1. Methodische Aspekte der Zellkultivierung

Zur Erforschung estrogenen Effekte *in vitro* werden häufig immortalisierte Zellen eingesetzt, wie die als ER positiv bekannte Mammakarzinomzelllinie MCF-7. Der Nachteil dieser Zellkulturen besteht darin, dass ihre Eigenschaften nicht mehr dem Ursprungsgewebe entsprechen und Untersuchungsergebnisse nicht ohne weiteres auf die Gegebenheiten *in vivo* übertragbar sind (Mueller 2004). Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit mit Primärzellkulturen gearbeitet. Das Endometrium erschien besonders geeignet, da es sowohl ein Zielgewebe estrogenen Wirkungen darstellt, als auch in der Lage ist, Umweltchemikalien zu akkumulieren (Kuntzsch 2000). Generell erfordert der Umgang mit Zellkulturen ein hohes Maß an Sorgfalt und Geduld. Für die Kultivierung der EEC konnte

auf eine bereits etablierte Methodik von *Köller (2002)* zurückgegriffen werden, die leicht modifiziert für beide Zellpopulationen zur Anwendung kam: nur jeweils ein enzymatischer Dissoziations- und Filtrationsschritt, Einsatz einiger weniger Verdauungsenzyme, Passagierung der ESC. Auch *Selam et al. (2001)* bedienten sich erfolgreich dieses effektiven Verfahrens.

Von einigen Autoren wird speziell für die EEC die Kultivierung auf beschichteten Kulturgefäßen bevorzugt, da die Wachstumseigenschaften der Zellen dadurch verbessert würden. Häufig nutzt man Kollagen (*Casslén und Harper 1991*), oder adaptierte Extrazellulärmatrices als Basalmembranersatz (*Negami und Tominaga 1989, Ghosh und Sengupta 1995*). Kollagenbeschichtete Kulturplatten konnten wegen ihrer störenden Einflüsse auf die Nachweismethoden (zu hohe Hintergrundaktivität) in der vorliegenden Arbeit nicht eingesetzt werden. Bei der Extrazellulärmatrix „Matrigel“ handelt es sich um ein Extrakt aus dem basalmembranreichen Engelbreth-Holm-Swarm Tumor, der neben natürlichen Basalmembranbestandteilen (Kollagen Typ IV, Laminin, Heparansulfat) auch Wachstumsfaktoren wie TGF- β , EGF, IGF-1, PDGF enthält (*Negami und Tominaga 1989*). Diese Vielzahl unbeeinflussbarer und in variabler Menge enthaltener Faktoren schloss auch den Einsatz von „Matrigel“ als Basalmembranersatz aus.

Eine sehr interessante Möglichkeit der Endometriumkultur bietet die Co-Kultivierung von EEC und darunter liegenden ESC im Zwei-Kammer-System (*Classen-Linke et al. 1997, Arnold et al. 2001*). Durch den quasi physiologischen Kontakt beider Zellpopulationen können parakrine Faktoren in der Untersuchung berücksichtigt werden, die eine nicht unerhebliche Rolle in der Regulation der Epithelzellfunktion spielen sollen (*Cooke et al. 1997, Kurita et al. 1998, Weihua et al. 2000, Arnold et al. 2001*). In der vorliegenden Arbeit kam es allerdings zunächst darauf an, die Eigenschaften beider Zellpopulationen getrennt voneinander zu untersuchen. Dennoch erscheint es vielversprechend, in weiterführenden Untersuchungen auch mit Co-Kulturen zu arbeiten.

Über die Zusammensetzung eines geeigneten Kulturmediums für endometriale Primärkulturen herrscht in der Literatur weitgehend Einigkeit. Lediglich die Zugabe von FKS (5-20%) und eventuelle Zusätze von ITS werden variabel gehandhabt. Eine von *Somigliana et al. (2001)* empfohlene Kultivierung der Endometriumzellen in Follikelflüssigkeit kam aus den schon beim „Matrigel“ genannten Gründen nicht in Frage (s.o.). Für die MCF-7 Zellen ist das Spektrum möglicher Kulturmedien weit gestreut. Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde zur Kultivierung der Zelllinie das gleiche Medium wie für die Primärkulturen eingesetzt.

5.2.2. Methodische Aspekte immuncytochemischer Untersuchungen

Immunhistochemische Darstellungen von ER und PR an humanem Endometrium werden seit langem und häufig durchgeführt (*Lessey et al. 1988, Garcia et al. 1989, Snijders et al. 1992, Jones et*

al. 1995, Mylonas et al. 2000). Obwohl die Steroidrezeptoren gleichmäßig verteilt in Zytoplasma und Kern vorliegen sollen (Leidenberger 1998), gilt in der Immunhistochemie nur eine Kernfärbung als „Rezeptor positiv“ (King und Greene 1984, Welshons et al. 1984).

Immuncytochemische Untersuchungen an kultivierten Zellen sind schwieriger und störanfälliger. Eine Quantifizierung immuncytochemisch markierter Zellen, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgt ist, stellt eine zusätzliche Herausforderung dar. Um eine gewisse Objektivität dieser zwangsläufig sehr subjektiven Methode zu gewährleisten, wurden die Richtlinien befolgt, die auch bei der Bestimmung des Rezeptorstatus von Mammakarzinomen durch den Pathologen zu Grunde gelegt werden (McCarty et al. 1985). Zunächst gelten hierbei ausschließlich Kernfärbungen als quantifizierbar. Dann muss bei den niemals homogen gefärbten Kulturen der Bereich ausgewählt werden, der als repräsentativ zu werten ist: die Auszählung darf nicht am Rand oder in durch Artefakte verunreinigten Arealen erfolgen. Außerdem sollten mindestens 300 Zellen gezählt und die Färbeintensität in vier verschiedene Graduierungen unterteilt werden (negativ – schwach positiv – positiv – stark positiv). Die Berechnungen wurden mit Hilfe des HSCORE, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt. Dabei entspricht ein HSCORE von 1 einem negativen Rezeptorstatus, ein Wert von 2 einem Anteil von 50% Rezeptor positiven Zellen. Der Maximalwert (4= alle Zellen stark positiv) wird praktisch nie erreicht. Bei der ER positiven Mammakarzinomzelllinie MCF-7 liegen HSCORE Werte meist um 3, für nicht tumorigene Zellen gelten Ergebnisse bis 2 als realistisch (Selam et al. 2001). Campbell et al. (2002) stellten fest, dass die Kulturbedingungen einen erheblichen Einfluss auf die Rezeptorexpressivität von Zellen haben. Besonders die Zusammensetzung des Kulturmediums, der Grad der Konfluenz und die Zahl der Passagierungen sind für die Steroidrezeptorexpression von herausragender Bedeutung. Auch spielt die Art der Kulturoberfläche eine entscheidende Rolle (Naish 1989). So war in der vorliegenden Arbeit eine immuncytochemische Untersuchung aufgrund hydrophober Interaktionen auf kollagenbeschichteten MTP unmöglich, auf Plastikoberflächen eingeschränkt und nur auf Glas optimal. Besonders dramatisch zeigte sich dieses Problem bei den MCF-7 Zellen, bei denen Rezeptordarstellungen ausschließlich nach Kultivierung auf dem (Glas-) Objektträger durchgeführt werden konnten.

5.2.3. Methodische Aspekte des ESCREEN Assays

Zur Bestimmung der Proliferationsrate stehen zahlreiche Methoden zur Verfügung. Eine unkomplizierte Möglichkeit stellt das Auszählen vitaler Zellen nach Trypanblaufärbung dar. Auch in Arbeiten aus jüngerer Zeit wird die Proliferation primär kultivierter EEC durchaus noch solcherart bestimmt (Lee et al. 2003). Leider birgt diese Methode zahlreiche Fehlerquellen (unvollständige Trypsinierung, schlechte Vereinzlung), so dass sie sich besser zur Bestimmung der Aussaatdichte vor Kultivierung

eignet. Viel exakter sind Viabilitätstests mit anschließender photometrischer Bestimmung. Als Chromogene werden häufig Neutralrot oder MTT eingesetzt. Beide Farbstoffe erwiesen sich in der praktischen Anwendung als problematisch bezüglich der angegebenen Inkubationszeiten. Bereits nach 3h setzte ein massives Absterben der Zellen ein. Diese rundeten sich ab und lösten sich vom Boden der Kulturschale. Das führte während der anschließenden Waschschriffe zu einem Zellverlust und damit zu verfälschten Messresultaten. Deshalb kam der ESCREEN Assay nach einer Methode von *Bitsch et al. (2002)* zur Anwendung, in der Sulforhodamin B als Chromogen verwendet wurde. Der Vorteil lag darin, dass die Zellen nach Fixierung gefärbt und damit nicht den toxischen Einflüssen des Farbstoffes ausgesetzt wurden. Der Nachteil – kein Viabilitätsnachweis – ist unerheblich, da avitale Zellen schnell den Kontakt zur Kulturoberfläche verlieren und deshalb schon während der ersten Waschschriffe weggespült werden. Der ESCREEN Assay wurde für MCF-7 Zellen validiert (*Soto et al. 1995*). Es handelt sich um den am häufigsten eingesetzten *in vitro* Test zur Bestimmung estrogenen Wirkungen. Die meisten Xenoestrogene wurden mit seiner Hilfe als solche identifiziert (*Soto et al. 1995, Sonnenschein und Soto 1998*). Viele Autoren halten ihn für ein einfaches, sehr sensitives Testsystem (*Rivas et al. 1997, Andersson et al. 1999, Fang et al. 2000, Gutendorf und Westendorf 2001*). *Andersson et al. (1999)* verglichen verschiedene Proliferationstests miteinander. Sie stellten fest, dass alle Assays auf Zugabe von E2 und synthetischen Estrogenen reagierten, wohingegen das Ansprechen auf endokrine Disruptoren unterschiedlich war. Wie auch *Scrimshaw und Lester (2004)* plädierten sie dafür, mehrere verschiedene Testsysteme einzusetzen, um die Ergebnisse zu validieren. *Gutendorf und Westendorf (2001)* gaben dem ESCREEN Assay den Vorzug beim Nachweis estrogenen Effekte nach Exposition mit geringen Testsubstanzkonzentrationen. *Ashby (2002)* stellte den Test allerdings in Frage. Seiner Meinung nach können auch eine Reihe nichtestrogenen Faktoren die Zellen zur Proliferation anregen. Um diese Schwächen auszugleichen, wurde in der vorliegenden Arbeit eine zweite Nachweismethode – der immunocytochemische Steroidrezeptornachweis mit Quantifizierung – eingesetzt.

5.3. Auswertung der Ergebnisse

5.3.1. Beurteilung der Zellkulturen

Die primäre Kultivierung humaner EEC erwies sich als nicht einfach. Generell wuchsen nur etwa 40-60% der Zellen primär am Kulturgefäß an. Vorteilhaft war das Vorhandensein kleinerer Zellverbände zum Zeitpunkt der Aussaat, da die EEC bevorzugt aus diesen aussprossen. War die enzymatische Dissoziation zu intensiv, lagen die Zellen stärker vereinzelt vor und mussten entsprechend dichter ausgesät werden ($>1 \times 10^5$ Zellen/cm²). Bei zu kurzen Dissoziationszeiten waren die Epithelzellver-

bände zu groß und noch stark mit Stromazellen verunreinigt. EEC der ersten Zyklushälfte wuchsen besser, als die der Sekretionsphase. Allerdings konnte während der zweiten Zyklushälfte erheblich mehr Endometrium gewonnen werden (500-1000mg), wohingegen in der Proliferationsphase meist nur 20-100mg zur Verfügung standen. Andere Arbeitsgruppen (*Matthews et al. 1992, Arnold et al. 2001*) stellten keine zyklusabhängigen Unterschiede im Kulturverhalten der EEC fest. Ein weiteres Problem waren stromale Verunreinigungen. Epithel- und Stromazellen lassen sich zum Zeitpunkt der Aussaat optisch praktisch nicht unterscheiden. Wie bereits *Matthews et al. (1992)* und auch *Mylonas et al. (2000)* feststellten, sind immer einige Stromazellen in der Epithelzellfraktion enthalten, die sehr schnell die gesamte Kultur überwachsen können, besonders dann, wenn man EEC in geringer Dichte aussät. Bei hoher Aussaatdichte zeigte sich dieses Problem nicht. Unklar ist, ob eine Wachstumsinhibition stromaler Zellen durch die EEC stattfand, oder die verbliebenen Stromazellen einfach überlagert wurden. Angaben von 98% reinen Epithelzellfraktionen (*Arnold et al. 2001*), nach der Methode von *Satyaswaroop et al. (1979)*, erscheinen vor diesem Hintergrund eher suspekt, realistischere Schätzungen bewegen sich um 85-90%. Auch der von *Kleinman et al. (1983)* empfohlene Zusatz von Kollagenase zum Kulturmedium konnte die Reinheit der Epithelzellkulturen nicht erhöhen. Eine andere Schwierigkeit bestand darin, dass EEC praktisch nicht subkultivierbar waren. *Merviel et al. (1994)* gelang es, diese zu passagieren, wobei die Zahl Cytokeratin-positiver Zellen stark ab-, die der Vimentin-positiven hingegen zunahm. Das deutet auf eine stattfindende stromale Metaplasie hin, die aber nicht eindeutig zu belegen war.

In der immunocytochemischen Charakterisierung zeigten EEC typischerweise eine Doppelexpression von Cytokeratin und Vimentin (*Mylonas et al. 2000*), was mit der vorliegenden Arbeit bestätigt werden konnte. *Laird et al. (1996)* konnten hingegen keine Vimentin-positiven EEC nachweisen.

Wesentlich einfacher gestaltete sich die Kultivierung der anspruchsloseren ESC. Bereits bei sehr niedrigen Aussaatdichten ($<0,5 \times 10^5/\text{cm}^2$) konnten konfluente Zellrasen erreicht werden. Die Kulturen erwiesen sich als äußerst robust und waren nahezu beliebig oft subkultivierbar. In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kultur bis zur 22. Passage geführt. Trotzdem ist bei der Versuchsdurchführung an mehrfach passagierten Zellen Vorsicht geboten, da die Zellen zunehmend ein fibroblastenartiges Erscheinungsbild annehmen und sich die Rezeptorexpression ändern kann. *Per definitionem* gelten Subkulturen nicht mehr als Primärzellkulturen (*Lindl 2000*). Bereits nach einer Passage ließen sich schon Veränderungen charakteristischer Eigenschaften nachweisen (*Casslén et al. 1990*).

Die immunocytochemischen Untersuchungen primär kultivierter ESC zeigten eine starke Expression des Intermediärfilaments Vimentin, aber nur einzelne Cytokeratin bzw. Desmin positive Zellen, die als Verunreinigungen interpretiert wurden. Auch *Fasciani et al. (2003)* bestätigten dieses Expressi-

onsmuster. Im Gegensatz dazu wiesen *Merviel et al. (1994)* Desmin positive Stromazellen nach. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach mehrfachen Passagierungen eine Zunahme der Desmin-expression, was auf eine myofibroblastäre Metaplasie der ESC hindeuten könnte.

Die Kultivierung der **MCF-7 Zellen** verlief unproblematisch. Bis auf eine noch größere Bedeutung der Einhaltung steriler Arbeitsbedingungen als bei den Primärkulturen, waren keine Besonderheiten zu berücksichtigen. Die Zellen hatten ein epitheliales Erscheinungsbild und wuchsen aufgrund ihres exponentiellen Proliferationsverhaltens schnell zu konfluenten Zellrasen. Passagierungen konnten beliebig oft durchgeführt werden. Die geringe Adhäsionsfähigkeit der Zelllinie an der Kulturoberfläche verursachte z.T. Schwierigkeiten bei der Durchführung von Untersuchungen, die nicht eine primäre Fixierung der Kulturen vorsahen.

5.3.2. Beurteilung der immunocytochemischen Bestimmungen

Mittels immunhistochemischer Untersuchungen an eingebettetem Material konnte nachgewiesen werden, dass humanes Endometrium die Steroidrezeptoren ER α , ER β , PR (*Kuiper et al. 1997, Matsuzaki et al. 1999, Taylor und Al-Azzawi 2000, Wu et al. 2000*) und auch den AHR exprimiert (*Küchenhoff et al. 1999*). Immunocytochemische Bestimmungen an primär kultivierten Endometriumzellen sind diffiziler. *Merviel et al. (1994)* gelang kein Steroidrezeptornachweis an Endometriumzellkulturen, *Köller (2002)* konnte lediglich eine zytoplasmatische Expression von ER α und PR feststellen. Die Darstellung von ER β und AHR fehlte bislang gänzlich. Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zellkulturen zeigten eine vorwiegend nukleäre Expression der Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR. Die Expressionsraten waren bei den MCF-7 Zellen für alle untersuchten Rezeptoren am stärksten, etwas geringer bei den EEC und schwach ausgeprägt bei den ESC. ER α gilt im Brustdrüsenepithel als der prädominante Rezeptortyp, ist hingegen im Stroma kaum nachweisbar. Im Gegensatz dazu findet man ER β in beiden Gewebeanteilen gleichermaßen verteilt (*Speirs et al. 2004*). Dieses Expressionsmuster bestätigte sich auch bei den kultivierten Endometriumzellen. In der Literatur finden sich oft widersprüchliche Angaben zur Steroidrezeptorexpression im Endometrium. So stellten *Ishihara et al. (2003)* die Expression von ER, PR und Ki67 an Endometriumproben immunhistochemisch dar. Die Autoren gaben für den ER, der nicht näher spezifiziert wurde, eine Färbeintensität von „moderat bis stark“ an, desgleichen für das (nukleäre) Antigen Ki67, welches erstaunlicherweise ausschließlich zytoplasmatisch exprimiert wurde! Für den PR wurde ebenfalls eine starke Expression aufgeführt. Die in der Publikation gewählten Abbildungen deuteten allerdings auf ein eher schwaches Färbeverhalten der Steroidrezeptoren hin, welches nach Quantifizierung den Resultaten der vorliegenden Arbeit entsprechen würde. Dieses Beispiel zeigt, wie subjektiv die Beurteilung immunocytochemischer Untersuchungen ist, und dass diese nur mit Zurückhaltung interpretiert werden dür-

fen. Gerade wenn statt einer erwarteten Kernfärbung eine starke zytoplasmatische Reaktion auftritt, sollten die Ergebnisse intensiv überprüft werden. In der vorliegenden Arbeit tauchten Probleme beim Nachweis des AHR auf. Er wurde in allen untersuchten Zellen sowohl zytoplasmatisch, als auch im Kern nachgewiesen, wobei weiterhin unklar erscheint, ob es sich dabei um ein spezifisches Färbeverhalten handelt. Da eine genauere Abklärung (z.B. mittels Westernblot) noch nicht erfolgt ist, wurde auf eine Einbeziehung des Rezeptors in die Expositionsuntersuchungen und anschließende Quantifizierung verzichtet.

Die Exposition der EEC mit E2 führte zu einer Expressionssteigerung aller untersuchten Steroidrezeptoren nach 72h Inkubation. Dabei fiel ein gegensinniges Expressionsmuster beider ER Subtypen auf, das in einem Peak für ER α bei 1nM E2 und einem Rückgang ER β positiver Zellen bei dieser Konzentration zum Ausdruck kam. Möglicherweise spielte hier die unterschiedliche Affinität beider ER eine Rolle. Bei den ESC war lediglich eine Steigerung der PR Expression zu beobachten, die ER Subtypen veränderten sich hingegen kaum. Der Proliferationsmarker Ki67 wurde nach E2 Zufuhr in kultivierten EEC stärker exprimiert als in ESC, was auf eine höhere mitotische Aktivität dieser Zellpopulation deutet. Es ist im einzelnen noch unklar, wie Rezeptoren kultivierter Zellen „normalerweise“ auf Estrogengaben reagieren sollten. Man geht von einer estrogenabhängigen Expressionssteigerung aller Steroidrezeptoren aus (*Leidenberger 1998*), viele Untersuchungen weisen aber auf Unterschiede zwischen verschiedenen Geweben hin. Im Prinzip sind alle drei Regulationsmechanismen nach E2 Zufuhr – verstärkte, verminderte, gleichbleibende Expression – für Steroidrezeptoren beschrieben. *Martin et al. (2003)* zeigten an MCF-7 Zellen, dass E2 den ER α herunterreguliert, den PR hingegen induziert. Eine andere ER positive Mammakarzinomzelllinie (T47D) reagierte mit Hochregulation des ER nach Estrogenzugabe (*McGregor und Jordan 1998*). *Cappelletti et al. (2003)* fanden an dieser Zelllinie einen nur geringen Anstieg der ER α mRNA Expression, dafür aber eine starke Expressionssteigerung des ER β . *Wang et al. (1999)* wiesen im Endometrium der Ratte einen Anstieg der ER α mRNA Expression, hingegen dessen Rückgang auf Proteinebene durch vorherige Gaben von E2 nach; ER β wurde unverändert exprimiert. *Pillai et al. (2002)* untersuchten ER α und ER β mRNA im Rattenuterus 24h nach E2 Gabe. Sie fanden die Expression von ER β vermindert, wohingegen ER α unbeeinflusst blieb. Die einzelnen Gewebeanteile wurden nicht näher differenziert, die Herunterregulation des ER β soll aber vorwiegend in den Stromazellen erfolgen, wie *Weihua et al. (2000)* feststellten. Die Induktion des PR durch Estrogengaben gilt als typischer estrogenener Effekt, der ausschließlich bei ER positiven Zellen zu beobachten ist (*Tseng 1979, Cappelletti et al. 2003*). MCF-7 Zellen reagierten auf Estrogengaben mit einer Induktion des PR sowohl auf Gen- als auch auf Proteinebene um den Faktor 2-10 (*Nardulli et al. 1988, Krishnan et al. 1993, Petz et al. 2002, Cappelletti et al. 2003*). Endometriumzellkulturen von Ratten wiesen dessen gesteigerte Expression

auf, welche durch Zugabe eines Antiestrogens blockiert werden konnte (*Aronica und Katzenellenbogen 1991*). An kultivierten Endometriumzellen des Hundes führten Estrogengaben zu einer Induktion von ER und PR (*Galabova-Kovacs et al. 2004*). Widersprüchliche Ergebnisse existieren zur der Frage, ob die Hochregulation des PR über ER α oder ER β vermittelt wird. *Kurita et al. (2001)* wiesen in Uterusstroma und Myometrium von Estrogenrezeptor- knockout- (ERKO) Mäusen voneinander unabhängige Mechanismen sowohl über ER α , als auch über ER β nach. *Couse et al. (1999)* entdeckten hingegen einen kompletten Verlust der PR Induzierbarkeit bei α ERKO Mäusen. Lediglich in einer einzigen Untersuchung fanden *Frasor et al. (2003)* eine starke Herunterregulation des PR im Endometriumepithel der Maus nach Zugabe von E2, wohingegen die PR Expression im Stroma unbeeinflusst erschien. Dennoch wird allgemein davon ausgegangen, dass die PR Induktion als typischer Estrogeneffekt gewertet werden kann, wohingegen die Regulation der ER Expression uneinheitlich ist. Um so wichtiger erscheint die Durchführung interner Positivkontrollen, wie sie in der vorliegenden Arbeit erfolgt ist.

72h Inkubation der EEC mit **PCB153** bewirkte eine verstärkte Expression aller untersuchten Steroidrezeptoren, die ESC zeigten wie schon nach Exposition mit E2 nur einen deutlichen PR Anstieg. Die Mitoserate der Primärkulturen (bestimmt anhand Ki67 positiver Zellkerne) konnte durch PCB153 ebenfalls gesteigert werden, bei den EEC vor allem im sehr niedrigen Schadstoffkonzentrationsbereich (10-100pM PCB153). Nach Inkubation mit **β -HCH** war bei den EEC ein flacher, plateauartiger Anstieg der Expression aller Steroidrezeptoren zu erkennen, bei den ESC zeigte sich nur eine mäßige PR Induktion. Die Ki67 Expression war bei beiden Zellpopulationen erhöht, erreichte aber nicht die Werte der Positivkontrolle. Die Exposition der Endometriumzellen mit **p,p'DDE** bewirkte nur sehr geringe Expressionsänderungen. Die Ki67 Expression war nach p,p'DDE Zugabe im Verhältnis zu allen anderen Testsubstanzen bei den EEC am geringsten, bei den ESC am stärksten gesteigert.

Untersuchungen zur Rezeptorexpression nach Exposition mit EDC wurden bisher nicht sehr häufig durchgeführt. Für das Xenooestrogen β -HCH liegt eine Arbeit vor, in der diese Substanz in einer Konzentration von 10 μ M ähnliche Steroidrezeptorveränderungen an MCF-7 Zellen wie 1nM E2 hervorrufen konnte. Es handelte sich um eine Induktion des PR bei nahezu unbeeinflusster ER Expression nach 3d Inkubation. Ein Affinitätsnachweis zum ER konnte für das β -HCH nicht geführt werden, so dass die Autoren einen indirekten Wirkmechanismus propagierten (*Coosen und van Velsen 1989*). Immunhistochemische Darstellungen am Brustgewebe von Ratten, die präpubertär mit E2 oder Genistein (einem Phytoestrogen) gefüttert wurden, zeigten eine signifikant erniedrigte Expression des ER α für E2 exponierte und eine erhöhte Expression für Genistein exponierte Ratten (*Cabanes et al. 2004*). Andere Autoren fanden den gegenteiligen Effekt (*Cotroneo et al. 2002*), bei allerdings sehr viel höheren Dosierungen. Veränderungen der ER β Expression nach Genisteingaben zeigten sich

bisher nicht (*Jefferson et al. 2002*), bzw. der Versuch misslang (*Cabanes et al. 2004*). Nach Exposition mit Bisphenol A und seinen Metaboliten wurde in Mammakarzinomzelllinien ein starker Anstieg der ER β mRNA Expression festgestellt, bei nur geringen Effekten auf ER α . Die Autoren vermuteten eine ER α abhängige Induktion des ER β . Auch waren alle getesteten Xenoestrogene in der Lage, die Expression des PR zu steigern (*Cappelletti et al. 2003*).

5.3.3. Beurteilung der Ergebnisse des ESCREEN Assays

Das als Positivkontrolle eingesetzte **E2** bewirkte bei allen untersuchten Zellkulturen nach 3d Inkubation eine Steigerung der Proliferationsrate. Bei den epithelialen Zellen lagen die Werte für den PE durchschnittlich um 120%. Das Wachstum der ESC konnte mit E2 Zugabe hingegen nur schwach gesteigert werden. Dieses Verhalten lässt sich durch den geringeren ER α Gehalt dieser Zellpopulation erklären. Für primär kultivierte EEC sind E2 induzierte Proliferationssteigerungen bisher gar nicht (*Uchima et al. 1991, Marshburn et al. 1992, Whitworth et al. 1994, Cooke et al. 1997*) oder nur in geringem Umfang belegt (*Kleinman et al. 1983*). In der vorliegenden Arbeit waren proliferative Effekte nicht nachweisbar, wenn die Testsubstanzen in serumhaltigem Medium A zugegeben wurden. Eine plausible Erklärung dafür boten *Welshons et al. (2003)*, die feststellten, dass für alle Expositionsuntersuchungen von Bedeutung ist, ob die Rezeptoren bereits abgesättigt sind, oder die Estrogenkonzentrationen unterhalb der rezeptorkinetisch erforderlichen Höhe liegen. Wahrscheinlich reichen die im Medium A enthaltenen Steroidhormonmengen aus, um die Rezeptoren vollständig zu binden, so dass alle weiteren (Xeno-) Estrogenzugaben ineffektiv sind. Aus diesem Grund erfolgte bei den hier durchgeführten Experimenten die Umstellung der Kulturen auf serumfreies Medium B bereits einen Tag vor geplanter Exposition.

Nach Exposition mit **PCB153** war die Proliferationsrate aller drei Zellpopulationen gesteigert. Bei den endometrialen Zellen lagen die proliferativen Effekte um 110-120%, bei den MCF-7 Zellen etwas höher. Inkubation mit 1 μ M PCB153 führte bei allen Zellkulturen zu einem Rückgang des Zellwachstums, wobei es sich vermutlich hauptsächlich um Lösungsmittelleffekte handelte, da die enthaltene Menge von 1,2% DMSO bereits im Leerwert toxische Effekte auslösen konnte. Die Berechnung des RPE offenbarte eine Schwierigkeit: bei nahezu gleichem PE zeigten sich bei den epithelialen Zellen (realistische) Werte von etwa 50% für den RPE, bei den Stromazellen wurden hingegen mehrheitlich Werte von 150% erzielt. Dieses unrealistische Resultat entstand dadurch, weil für die Berechnung des RPE der jeweilige PE(E2max) zu Grunde gelegt wurde. War dieser aber nicht sehr hoch, ergaben sich für die Testsubstanzen überhöhte RPE Werte. Nach dreitägiger Inkubation mit **β -HCH** zeigten alle Zellkulturen ähnliche proliferative Effekte, die maximal um 120% lagen. Auch hier trat bei den ESC die oben erwähnte Schwierigkeit bei der Berechnung des RPE zu Tage. Alle exponierten

Kulturen wiesen einen annähernd zweigipfligen Kurvenverlauf der Proliferationsrate im Verhältnis zur eingesetzten Konzentration auf. Bei 1nM β -HCH erschien in allen Kulturen ein Rückgang der sonst deutlich gesteigerten Proliferation, die aber immer noch oberhalb der Negativkontrolle lag. Die Exposition mit p,p'DDE zeigte die größten Unterschiede zwischen den Zellkulturen. Während bei den EEC proliferative Effekte von 140% beobachtet wurden, lagen diese bei den MCF-7 Zellen um 120%, bei den ESC noch um 110%. Die RPE Werte waren für die endometrialen Zellen ähnlich ausgeprägt, mit Maximalwerten von 150%.

Der ESCREEN Assay wurde für MCF-7 Zellen validiert (*Soto et al. 1995*) und sollte daher bei der Zelllinie entsprechend zuverlässige Werte liefern. Vergleicht man die Zellkulturen miteinander so fällt auf, dass die epithelialen Zellen (beiderlei Ursprungs) sehr ähnlich auf Estrogen- bzw. Xenoestrogenen reagierten. EEC und ESC unterschieden sich in den Proliferationsversuchen deutlich stärker voneinander, als EEC und MCF-7 Zellen. Die Stromazellen zeigten kaum Wachstumssteigerungen nach E2 Gabe, hingegen stärkere Effekte nach Inkubation mit Xenoestrogenen. Bei den epithelialen Zellen war das Gegenteil der Fall. Ein limitierender Faktor aller durchgeführten Untersuchungen war, dass Konzentrationen $>1\mu\text{M}$ nicht getestet werden konnten, da die begrenzte Wasserlöslichkeit der sehr lipophilen Substanzen den Einsatz großer Mengen Lösungsmittel erforderlich machte, die dann ihrerseits erheblichen Einfluss auf die Zellviabilität nahmen. Auch *Payne et al. (2001)* hatten dieses Problem, weshalb sie ebenfalls keine höheren Konzentrationen testen konnten. Vor diesem Hintergrund ist es kaum verwunderlich, dass *Lee et al. (2003)* mit steigender Konzentration des getesteten Xenoestrogens (Bisphenol A und Aroclor 1254) eine teils signifikante Abnahme der Zellzahl kultivierter EEC beobachteten. Diese zeigte sich ab Schadstoffkonzentrationen von $1\mu\text{M}$ (Testbereich bis $100\mu\text{M}$), wobei nicht deutlich wurde, ob und wieviel Lösungsmittel enthalten war. Eine differenzierte Betrachtung estrogener Effekte ist in diesen Konzentrationsbereichen nicht mehr möglich, da zytotoxische Einflüsse überwiegen. *Köller et al. (2004)* untersuchten ebenfalls den Einfluss der drei Substanzen PCB153, β -HCH und p,p'DDE auf das Wachstumsverhalten primär kultivierter EEC und MCF-7 Zellen. Als Nachweismethode kam der Neutralrottest zum Einsatz. Bei den EEC waren die Proliferationssteigerungen deutlich zeitabhängig, mit maximalen Effekten nach 72h Inkubation, bei den MCF-7 Zellen hingegen nicht. PCB153 rief bei beiden Zellpopulationen PE Werte um 120% hervor, β -HCH bei den EEC 110-115% und bei den MCF-7 Zellen 115-120%. Die größten Unterschiede traten nach Exposition mit p,p'DDE zu Tage: hier lagen die proliferativen Effekte um 110% (EEC) und 140% (MCF-7). Leider wurde keine Positivkontrolle mitgeführt, so dass ein direkter Vergleich mit den Resultaten der vorliegenden Arbeit nur bedingt möglich ist. *Boué et al. (2003)* führten den ESCREEN Assay an MCF-7 Zellen durch, um verschiedene Pflanzenextrakte auf ihre Estrogenizität zu untersuchen. E2 als Positivkontrolle konnte die Proliferation bei 0,1nM maximal induzie-

ren, die Pflanzenextrakte zeigten teilweise darüber liegende PE. *Andersson et al. (1999)* konnten für einige nichtcoplanare PCB und deren hydroxylierte Metaboliten (OH-PCB) Proliferationssteigerungen von MCF-7 Zellen nachweisen. Diese waren besonders ausgeprägt bei den OH-PCB, der RPE erreichte teilweise Werte von 100%. Auch für β -HCH wurden im ESCREEN Assay bereits proliferative Effekte nachgewiesen (*Steinmetz et al. 1996*).

Die mit der vorliegenden Arbeit erzielten Resultate für die drei Umweltchemikalien PCB153, β -HCH und p,p'DDE lassen Hypothesen über deren Wirkmechanismen im menschlichen Organismus zu. Zunächst ist es jedoch erforderlich, noch einmal detailliert die molekularen Estrogenwirkungen zu beleuchten, da diese grundlegend zum Verständnis der postulierten Mechanismen sind.

5.4. Molekulare Wirkmechanismen von Estrogenen

5.4.1. Interaktionen mit dem Estrogenrezeptor

In Autoradiographiestudien stellte man eine strenge Assoziation von markiertem E₂ zum Zellkern fest, so dass die Idee eines als Transportvehikel für Steroide dienenden Rezeptors entstand, der Estrogene vom Zytoplasma zum Zellkern transportiert (*Toft und Gorsky 1966, Jensen und Desombre 1973*). Heute geht man davon aus, dass der ER zwar sowohl in Zytoplasma, als auch Nukleus vorkommt, die Ligandenbindung aber wahrscheinlich ausschließlich im Kern erfolgt (*Leidenberger 1998*), so dass der ER der Superfamilie der nukleären Rezeptoren zugeordnet wird. Im Jahr 1996 wurde eine neue Variante des Rezeptors – ER β genannt – entdeckt (*Mosselmann et al. 1996, Kuiper et al. 1996*). Den alten, klassischen ER bezeichnete man fortan als ER α . Diese beiden Rezeptorproteine sind keine Isoformen, sondern werden von verschiedenen Genen auf unterschiedlichen Chromosomen kodiert. ER α gilt als prädominanter Rezeptortyp in Brust, Uterus, Cervix und Vagina, ist aber auch in fast allen anderen Geweben zu finden. Hingegen erscheint ER β vorwiegend in Ovar, Prostata, Hoden, Milz, Lunge, Hypothalamus und Thymus (*Couse et al. 1997*). Weiterhin unklar ist, ob beide Rezeptoren in ein und der selben Zelle exprimiert werden. Viele Autoren waren bisher dieser Ansicht (*Shughrue et al. 1998, Matsuzaki et al. 1999, Weihua et al. 2000*), neuerdings geht man wieder davon aus, dass dies nicht der Fall ist (*Mueller 2004*).

Strukturell bestehen beide ER aus sechs funktionellen Domänen (A-F), die typisch sind für alle Kernrezeptoren. Die N-terminale A/B Domäne ist die am wenigsten konservierte aller Mitglieder und zeigt nur 17% Homologien zwischen ER α und β . Sie enthält die für die Transaktivierung wichtige „activation function 1“ (AF-1). Die C-Domäne ist hochkonserviert und bedeutsam für die DNA Bindung am „estrogen response element“ (ERE). Sie zeigt 97% Übereinstimmung zwischen ER α und β . Die D-

Domäne beinhaltet Signale für die nukleäre Lokalisation des Rezeptors, wohingegen die E-Domäne die Ligandenbindungsdomäne und die „activation function 2“ (AF-2) enthält. Die C-terminale F-Domäne ist spezifisch für Estrogenrezeptoren innerhalb der Superfamilie (White *et al.* 1998). Die funktionellen Aspekte des ER werden in Abb.73 schematisch dargestellt.

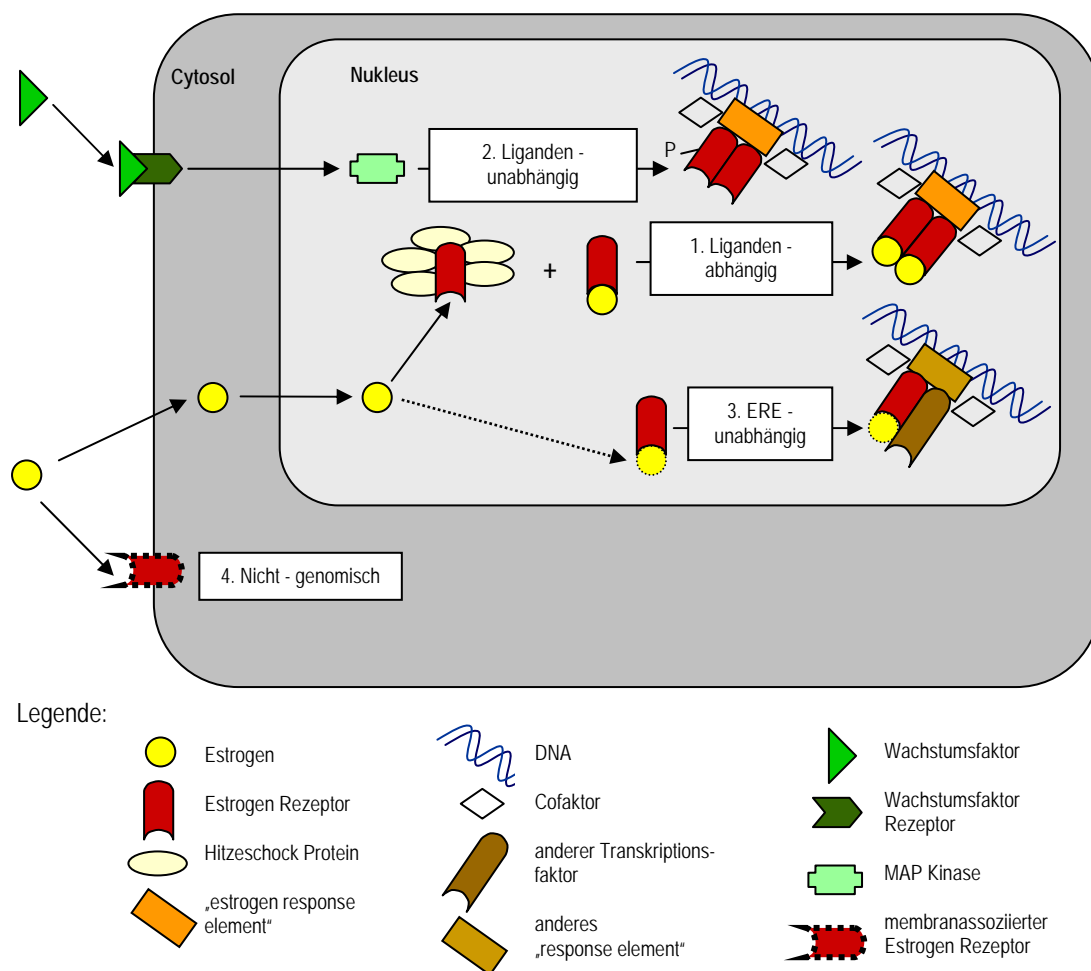


Abb.73: Estrogenrezeptor Wirkmechanismen

Der inaktive Rezeptor liegt in einem Komplex von Hitzeschockproteinen und anderen Chaperonen im Kern vor, aus welchem er sich nach Ligandenbindung löst und mit einem weiteren, ligandengebundenen Rezeptormolekül dimerisiert. Das entstandene Homodimer bindet mit Hilfe zweier Zinkfinger am „estrogen response element“ – einer 13 Basenpaare umfassenden Sequenz in der Promoterregion des entsprechenden Genabschnitts. Durch die Interaktion von bestimmten Cofaktoren mit der AF-2 des Rezeptors (McKenna *et al.* 1999) wird schließlich die Transkription von Zielgenen in Gang gesetzt, die in Abhängigkeit von Ligand und Gewebe völlig unterschiedlich sein können (Hall und

Korach 2002). Insgesamt handelt es sich um den sogenannten „klassischen“ oder auch **liganden-abhängigen** Wirkmechanismus. Eine zweite Möglichkeit ist die **ligandenunabhängige** Aktivierung des ER, z.B. durch Wachstumsfaktoren (*Klotz et al. 2002*). Über die Aktivierung von membranären Wachstumsfaktorrezeptoren und abhängiger Enzymkaskade erfolgt u.a. eine MAP-Kinase vermittelte Phosphorylierung der AF-1 und damit Aktivierung des ER, die wiederum über Bindung am ERE in eine Expression abhängiger Zielgene mündet (*Hall et al. 2001*). Wenn zusätzlich ein spezifischer Ligand vorhanden ist, wird dessen Wirkung verstärkt (*Feng et al. 2001*). Dieser Mechanismus soll von Bedeutung bei der Stroma- Epithel- Interaktion eines Gewebes sein (*Klotz et al. 2002*). Ein nächster Mechanismus ist der **ERE-unabhängige**. Hierbei kommt es zur Heterodimerisierung des ER mit anderen Transkriptionsfaktoren, wie z.B. AP1, SP1 oder NF κ B, die zu einer Transaktivierung deren abhängiger Gene führt (*McDonnell und Norris 2002*). Auch die Expression des PR kann über diesen Weg induziert werden (*Petz et al. 2002*). Die vierte Möglichkeit der Estrogenwirkung sind **nichtgenomische** Effekte. Zu diesen auch als „Sofortreaktionen“ bekannten Effekten gehören z.B. Ionen- und Glukosetransportänderungen und Calcium- und Prolaktinfreisetzung (*Campbell et al. 2002*), aber auch Wassereinlagerung im Endometrium und Hyperämie, beginnend eine halbe Stunde nach Estrogenzufuhr (*Hewitt et al. 2003*). Hierbei soll eine auf der Zelloberfläche lokalisierte Form des ER beteiligt sein – der membranassoziierte ER (*Bogh et al. 2001*). Inwieweit verwandtschaftliche Beziehungen zum intrazellulären ER bestehen, ist noch unklar. Für die verschiedenartigen Wirkungen von ER α und ER β lassen sich zahlreiche Erklärungen finden. Es erscheint u.a. möglich, dass für beide ER Subtypen unterschiedliche Cofaktoren (Aktivatoren und Repressoren) benötigt werden (*Hall et al. 2002*). Auch soll die Affinität zum ERE für ER β größer sein, als für ER α (*Kostelac et al. 2003*). Außerdem werden jeweils verschiedene Gene transaktiviert. Für die typischen Estrogenwirkungen soll in erster Linie ER α verantwortlich sein (*Harris et al. 2002, Frasor et al. 2003*). Einige Autoren sind der Meinung, dass ER β als Inhibitor für ER α fungiert (*Hanstein et al. 1999, Hall et al. 1999*).

5.4.2. Molekulare Mechanismen der Proliferationssteigerung

Die Frage, ob in estrogenen Zielgeweben nachgewiesene Proliferationssteigerungen als estrogenere Effekte zu werten sind, wird von den meisten Autoren bejaht. *Sonnenschein und Soto (1998)* betonen, dass für die Beurteilung einer Substanz als estrogenartig die Bestimmung proliferativer Effekte herangezogen werden sollte. Diese gehören zu den „Spätreaktionen“ der ER vermittelten Estrogenwirkung und setzen nach etwa 24h ein (*Hewitt et al. 2003*). Die Wirkungskaskade scheint aber wesentlich komplexer zu sein. So konnten *Haining et al. (1991)* an kultivierten Endometriumzellen nur dann proliferative Effekte beobachten, wenn sowohl E2, als auch EGF substituiert wurden. *Tsai et al.*

(2002) wiesen nach, dass endometriale Stromazellkulturen FGF-9 freisetzen konnten, welches die Proliferationsrate steigerte. Zusätzliche E2 Gaben verstärkten diesen Effekt noch. *Somigliana et al. (2001)* kultivierten Endometriumproben in Follikelflüssigkeit und verzeichneten trotz Angleichen des Steroidhormongehalts im Kontrollansatz eine erhöhte Proliferation der Zellen, die somit offensichtlich steroidhormonunabhängig war. Auch hier wurden Wachstumsfaktoren wie VEGF, IGF-1 und 2 verantwortlich gemacht. Zahlreiche Autoren sind der Meinung, dass solche indirekten Regulationsmechanismen speziell bei den EEC von größerer Bedeutung für deren Wachstumsverhalten sind, als direkt rezeptorvermittelte Effekte (*Cooke et al. 1997, Kurita et al. 1998, Weihua et al. 2000, Arnold et al. 2001*). *Cooke et al. (1998)* wiesen an ERKO-Mäusen nach, dass die proliferationssteigernde Wirkung von E2 auf EEC parakrin über die Stromazellen reguliert wird. Der ER Status der Epithelzellen war in dieser Untersuchung ohne Belang. Man vermutet, dass nach Estrogenezufuhr, als direkt ER-vermittelte Reaktion in den Stromazellen die Transkription und Freisetzung von Wachstumsfaktoren initiiert wird, welche dann ihrerseits parakrin auf die Epithelzellen (über deren Wachstumsfaktorrezeptoren) einwirken und eine ligandenunabhängige Aktivierung des ER (siehe 6.3.1.) in diesen Zellen hervorrufen (*Hall et al. 2001*). Des weiteren besteht die Möglichkeit einer Interaktion des ER mit anderen Transkriptionsfaktoren („ERE- unabhängig“, siehe 6.3.1.), z.B. AP1, welches als ubiquitär vorhandenes Protein auf eine Vielzahl von Stimuli hin u.a. auch eine Proliferationssteigerung induzieren kann. Damit wird die Beurteilung, ob die Proliferationssteigerung einen „typischen“ estrogenen Effekt darstellt noch schwieriger (*Ashby 2002, Frigo et al. 2002*) und es erscheint die alleinige Untersuchung des Zellwachstums für die Beurteilung einer Substanz als estrogenartig unzureichend.

5.5. Interpretation der Ergebnisse und Versuch der Beschreibung spezieller molekularer Wirkmechanismen

5.5.1. Interpretation der Ergebnisse für PCB153

Die durchschnittliche Konzentration für PCB153 im Vollblut der unbelasteten deutschen Normalbevölkerung liegt bei 2,2µg/l, dies entspricht etwa 6,1nM (*Bekanntmachungen des Umweltbundesamtes 2003*). Im Endometrium fertiler Frauen wurden Konzentrationen von 1-2nM PCB153 nachgewiesen (*Kuntzsch 1999*). In der vorliegenden Arbeit traten proliferative Effekte schon bei 0,1nM PCB153 auf und erreichten bei 1nM ein Maximum. Desgleichen war auch die Steroidrezeptorexpression bei dieser Konzentration maximal gesteigert. Die durch PCB153 induzierten Veränderungen der kultivierten Zellen glichen denen nach Inkubation mit E2. Die Vermutung liegt nahe, dass damit auch ähnliche Wirkmechanismen eine Rolle spielen, bzw. es sich bei PCB153 um einen Agonisten am ER

handelt (Abb.74). Für die nichtcoplanaren PCB zu denen auch das hier getestete Kongener zählt, wurden bereits estrogenische Wirkungen beschrieben (*Safe 1995*), die aber um einiges geringer waren, als die von natürlichen Estrogenen. Lediglich einige OH-PCB zeigten im ESCREEN Assay RPE Werte von 100% (*Andersson et al. 1999*). Auch die ER Bindungsaffinität soll für die OH-PCB höher sein (*Machala et al. 2004*). PCB153 rief eine deutliche antagonistische Reaktion am AHR hervor (*Chen und Bunce 2004*), wohingegen die coplanaren Kongenere Agonisten an diesem Rezeptor sind (*Aoki 2001, Chen und Bunce 2004*). *Cannavò et al. (2003)* untersuchten in ihrer Arbeit die Toxizität von Aroclor (einem PCB Gemisch) auf Myoblasten. Alle getesteten Konzentrationen ab 10µg/ml (entspricht etwa 30µM) führten konzentrationsabhängig zur Zellnekrose. Interessanterweise wurde der Konzentrationsbereich unterhalb von 10µM von den Autoren als „low dose“ bezeichnet, da hier keine toxischen Effekte mehr nachweisbar waren. Vor dem Hintergrund der oben erwähnten realen Akkumulationsraten muss nach den Ergebnissen der hier vorliegenden Arbeit davon ausgegangen werden, dass PCB153 im „low dose“ Bereich spezifische, estrogenartige Wirkungen hervorrufen kann (Abb.74). Bereits die „normalerweise“ im Endometrium nachweisbaren Konzentrationen sind ausreichend, um *in vitro* an diesem Gewebe estrogenische Effekte auszulösen.

5.5.2. Interpretation der Ergebnisse für β -HCH

Der Durchschnittswert von β -HCH im Vollblut beträgt 0,5µg/l für nichtexponierte Erwachsene. Dies entspricht etwa 1,7nM (*Bekanntmachungen des Umweltbundesamtes 2003*). Im Endometrium fertiler Frauen wurden Konzentrationen von 5-6nM detektiert (*Kuntzsch 2000*). Mit der vorliegenden Arbeit konnten estrogenische Effekte des β -HCH über den gesamten getesteten Konzentrationsbereich (0,1-1000nM) nachgewiesen werden. Es zeigten sich Steigerungen der Proliferation und der Steroidrezeptorexpression sowohl bei den Primärzellkulturen, als auch bei der Zelllinie. Diese Effekte waren deutlich, aber doch schwächer ausgeprägt, als nach Inkubation mit E2 oder PCB153. Bereits *Steinmetz et al. (1996)* entdeckten eine dosisabhängige Proliferationssteigerung von MCF-7 Zellen nach Exposition mit β -HCH, die an ER negativen Zelllinien nicht nachweisbar war. Die Autoren vermuteten deshalb einen ER vermittelten Wirkungsweg, wobei im kompetitiven Bindungsassay β -HCH auch in 40000fach höherer Konzentration E2 nicht vom Rezeptor verdrängen konnte, so dass ein direkter ER Agonismus unwahrscheinlich erschien und ein indirekter, „nichtklassischer“ Wirkmechanismus angenommen wurde. In einer aktuellen Arbeit untersuchten *Kalantzi et al. (2004)* Niedrigdosiswirkungen des Lindans und seines β -Isomers auf MCF-7 Zellen. Die Autoren entdeckten vermehrt chromosomale Störungen bereits nach Exposition mit 1-100pM (!) Lindan. Die durch β -HCH bewirkten Veränderungen waren nicht so deutlich ausgeprägt. Dennoch bestätigt diese Arbeit eindrucksvoll, dass selbst extrem niedrige Dosierungen, die weit unterhalb toxikologisch bedeutsamer Grenz-

werte liegen, deutliche Effekte *in vitro* hervorrufen können. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass β -HCH die Transaktivierung estrogenregulierter Gene initiieren kann. Wahrscheinlich erfolgt aber keine direkte Bindung am ER, sondern möglicherweise eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors z.B. über MAP- Kinasen (Abb.74).

5.5.3. Interpretation der Ergebnisse für p,p'DDE

Für p,p'DDE liegen die Durchschnittskonzentrationen im Vollblut der nichtexponierten Bevölkerung in Ostdeutschland bei 14,3 μ g/l (45nM) und damit deutlich höher, als in den alten Bundesländern (6,2 μ g/l). Die Unterschiede ergeben sich wohl daher, dass in der DDR der Einsatz von DDT längere Zeit erlaubt war (*Bekanntmachungen des Umweltbundesamtes 2003*). Die Konzentrationen im Endometrium fertiler Frauen betragen im Mittel 40-45nM (*Kuntzsch 2000*). Mit den in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Konzentrationen (1pM-1 μ M) konnten kaum Veränderungen der Steroidrezeptor-expression hervorgerufen werden, dennoch zeigten sich in diesem Bereich starke Proliferationssteigerungen besonders bei den epithelialen Zellkulturen. *Kelce et al. (1995)* wiesen nach, dass p,p'DDE mit hoher Affinität am Androgenrezeptor bindet und dessen transkriptionale Aktivität inhibiert. In einer Bindungsstudie zeigten 1,86 μ M p,p'DDE eine 50%ige Hemmung des Rezeptors (*Maness et al. 1998*). Das ist eine Konzentration, die mehr als 50fach über den meisten Akkumulationswerten liegt, weshalb die Autoren der Androgenrezeptorhemmung *in vivo* kaum eine Rolle beimessen. Direkte Affinität für ER Subtypen konnte in den meisten Untersuchungen nicht (*Kelce et al. 1995, Kuiper et al. 1998*), oder nur in geringem Umfang nachgewiesen werden (*Kojima et al. 2004*), wenn auch mit Hilfe von Reporterassays eine ER- agonistische Aktivität des p,p'DDE darstellbar war (*Willemsen et al. 2004*). Die in der vorliegenden Arbeit und auch von *Soto et al. (1995)* und *Andersen et al. (1999)* nachgewiesenen proliferativen Effekte dieser Chemikalie auf estrogene Zielorgane lassen sich somit nicht über eine direkte Bindung am ER erklären. Möglicherweise ist die induzierte Proliferationssteigerung nur bedingt als estrogener Effekt zu werten, da *Frigo et al. (2002)* herausfanden, dass sämtliche DDT Metaboliten in der Lage sind, den Transkriptionsfaktor AP1 zu aktivieren. Dieser Effekt soll in ER negativen Zellen sogar noch stärker ausgeprägt sein als in ER positiven. In einer aktuellen Arbeit der Autoren (*Frigo et al. 2004*) wurde festgestellt, dass die AP1 Aktivierung auch über MAP- Kinasen vermittelt werden kann, die bei der ligandenunabhängigen ER Aktivierung eine Rolle spielen (*Klotz et al. 2002*). Somit erscheint es am wahrscheinlichsten, dass p,p'DDE innerhalb der ER Wirkungskaskade „ERE unabhängig“ wirkt und die beobachteten proliferativen Effekte über die „response elements“ anderer Transkriptionsfaktoren induziert werden (Abb.74). Ob der ER als Heterodimerisationspartner dabei überhaupt eine Rolle spielt, verbleibt ungewiss, solange Vergleiche mit ER negativen Geweben nicht vorliegen.

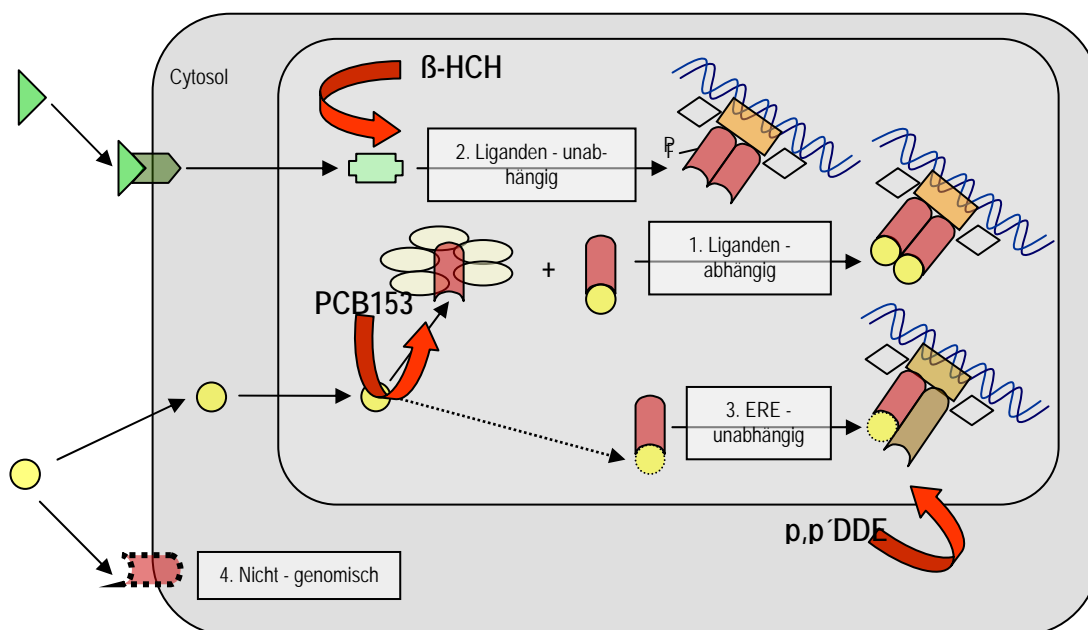


Abb.74: Mögliche molekulare Xenooestrogen-Wirkmechanismen (Legende siehe Abb.73)

5.6. Beurteilung des Gefahrenpotentials endokriner Disruptoren

5.6.1. Die Kontroverse „gute“ Phytoestrogene und „böse“ Xenooestrogene

Sehr kontrovers gestaltet sich die Diskussion um den Vergleich anthropogener Xenooestrogene mit denen pflanzlicher Herkunft. Phytoestrogenen wird für eine Vielzahl hormonbedingter Erkrankungen eine protektive Rolle zugeschrieben. Sie können im Blut bis zu 100fach höhere Konzentrationen erreichen als endogene Estrogene und übertreffen *in vitro* teilweise die proliferativen Effekte des E2 (Boué *et al.* 2003). Besonders deutlich werden Widersprüche bei der Diskussion des Mammakarzinoms. EDC stehen im Verdacht, die Inzidenz der Erkrankung zu erhöhen, bzw. den Verlauf ungünstig zu beeinflussen, da Mammakarzinome besonders häufig in Industrieländern auftreten (Davis *et al.* 1993, Demers *et al.* 2000). In vielen Untersuchungen konnte dieser Zusammenhang allerdings nicht belegt werden (Snedeker 2001). Die in asiatischen Ländern beobachtete geringere Inzidenz hormonabhängiger Malignome wird auf die dortige phytoestrogenreiche Ernährung zurückgeführt (Fowke *et al.* 2003, Hikosaka *et al.* 2004). Nilsson (2000) meinte hingegen, dass gerade in Ländern wie Indien und China große Mengen DDT und andere chlorierte Insektizide in die Umwelt eingebracht wurden und werden. Demzufolge müssten die adversen Effekte dieser Schadstoffe die positiven Ernährungsfaktoren wieder aufheben. In einer Untersuchung von Allred *et al.* (2004) wird der protektive Effekt der Phytoestrogene komplett infrage gestellt, bzw. sogar ins Gegenteil verkehrt. Die Autoren induzierten (ER positive) Mammakarzinome in weiblichen Ratten und behandelten diese

gezielt mit E2 oder Genistein (einem Phytoestrogen). In der Negativkontrollgruppe ohne Estrogen-gaben zeigte sich bald eine Regression der Tumoren, wohingegen bei den sonstigen Behandlungen das Tumorwachstum voranschritt. Da in dieser Untersuchung der Einfluss von Phytoestrogenen auf bereits manifeste Mammakarzinome untersucht wurde, sind Rückschlüsse auf eine eventuelle Kan-zerogenese nicht möglich. Trotzdem betrachten die Autoren eine Phytoestrogensubstitution nach der Menopause als sehr kritisch.

Es erscheint allerdings nicht gerechtfertigt, pflanzliche Estrogene ähnlich negativ zu belegen, wie Xenoestrogene anthropogenen Ursprungs. Einige Untersuchungen weisen darauf hin, dass unter-schiedliche molekulare Wirkmechanismen dazu führen, dass Phytoestrogene überwiegend „protekti-ve“, Umweltchemikalien hingegen eher „aggressive“ Effekte hervorrufen (*Dalton et al. 2002*). Auch ist bekannt, dass Phytoestrogene bevorzugt und mit hoher Affinität am ER β binden, dessen regula-torische Wirkung noch weitgehend unbekannt ist (*Kuiper et al. 1998, Boué et al. 2003*).

5.6.2. Die Frage der relevanten Konzentrationen

Bisher gibt es keinen eindeutigen Beweis einer speziell durch Umweltestrogene verursachten Er-krankung beim Menschen (die Vergiftungsszenarien nach akzidentieller Freisetzung großer Mengen verdächtiger Chemikalien einmal ausgenommen). Einzig für das als Medikament eingesetzte DES konnte ein Kausalzusammenhang zum Adenokarzinom der Vagina hergestellt werden (*Herbst 1981*). Die Meinungen zum Gefahrenpotential der EDC gehen daher erheblich auseinander. *Nilsson (2000)* stellte im Prinzip jegliche von Xenoestrogenen ausgehende mögliche Gefährdung in Frage. Er behauptete, dass jede Exposition mit Umweltchemikalien im Vergleich zu bewusst medikamentös verabreichten „endokrinen Disruptoren“ (im Rahmen der hormonellen Kontrazeption) zu vernachläs-sigen sei. Es handele sich dabei lediglich um homöopathische Dosen (welche der Autor *per se* als unwirksam voraussetzt). Xenoestrogene wären in erster Linie ein ökotoxikologisches Problem und keine ernsthafte Gefahr für die Menschheit. Außerdem sei der Mensch in der Lage, Schwankungen der hormonellen Homöostase in weiten Grenzen abzufangen. Die Bindungsaffinität von Xenoestro- genen am ER ist meist über 1000fach geringer, als die des E2. Für die meisten Substanzen lässt sie sich nicht einmal nachweisen (*Kuiper et al. 1997*). Selbst wenn eine tatsächliche Beeinflussung des Hormonhaushalts erfolgen sollte, so sei diese nicht gleichbedeutend mit der Auslösung adverser Effekte (*Nilsson 2000*).

Im Gegensatz dazu stehen die in jüngerer Zeit erschienenen Arbeiten, die sich mit sogenannten Niedrigdosiseffekten („low dose effects“) endokriner Disruptoren beschäftigen. Man nimmt an, dass Substanzen, die mit Hormonsystemen interferieren, nicht einer linearen Dosis- Wirkungs- Beziehung folgen, sondern sogenannte „hormetische“ Verläufe zeigen, die sich meist U-förmig, bzw. umgekehrt

U-förmig darstellen (*Calabrese und Baldwin 2001 und 2003, Welshons et al. 2003*). Rückschlüsse von Toxizitätsstudien auf Schadstoffgrenzwerte, die als ungefährlich anzunehmen sind, wären demnach nicht möglich. Der vom amerikanischen NIEHS herausgegebene Report „*National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review*“ (2001) beschäftigte sich intensiv mit der Frage möglicher Niedrigdosiseffekte von endokrinen Disruptoren. Man definierte diejenigen Substanzkonzentrationen, die unterhalb der herkömmlich festgelegten NOEL bei nichtmonotoner Dosis-Wirkungs-Beziehung einen signifikanten Effekt hervorrufen können als „low dose“. Für E2 und einige wenige Substanzen seien diese Effekte bereits nachgewiesen worden. Dennoch wird die Existenz von Niedrigdosiseffekten endokrin aktiver Umweltchemikalien von einigen Wissenschaftlern stark angezweifelt, da aufgrund der meist subtilen Versuchsbedingungen die Ergebnisse kaum reproduzierbar sind (*Ashby 2003, Ashby et al. 2004*).

5.6.3. Die Frage des Expositionszeitpunktes

Bei der Beurteilung des Gefahrenpotentials von endokrinen Disruptoren muss nicht nur die Dosis, sondern auch der Expositionszeitpunkt berücksichtigt werden. Insbesondere den Einflüssen während der Embryonal- bzw. Fetalperiode kommt dabei eine wegweisende Bedeutung zu. *Sharpe und Skakkebaek (1993)* kamen zu der Auffassung, dass die erhöhte Inzidenz von Abnormalitäten im männlichen Reproduktionstrakt (Kryptorchismus, Hypospadie, verminderte Sertolizellzahl, Oligozoospermie) durch die Exposition mit estrogenwirksamen Substanzen während dieser Entwicklungsphasen hervorgerufen wird. *Hardell et al. (2003)* fanden erhöhte Schadstoffkonzentrationen im Blut von Müttern, deren Söhne Hodenkrebs entwickelt hatten. *Younglai et al. (2002)* konnten nachweisen, dass mit steigender Konzentration von p,p'-DDE in Blut und Follikelflüssigkeit die Fertilisierungsraten der Frauen bei IVF abnahmen. Exponierte man Präimplantationsembryos von Mäusen mit sehr niedrigen Konzentrationen von Insektiziden und Düngemitteln, steigerte sich die Apoptose-rate; eine verlangsamte Blastozystenentwicklung und reduzierte Zellzahlen traten auf (*Greenlee et al. 2004*). Beim Menschen scheint der pränatalen Exposition mit Umweltchemikalien deshalb eine größere Bedeutung zuzukommen als der postnatalen, da die Schadstoffe vor Geburt schneller akkumulieren und nicht linear, sondern exponentiell zur Belastung der Mutter angereichert werden. Vermutlich ist die Vulnerabilität in dieser Entwicklungsphase größer als nach der Geburt (*Lackmann 2002*). Auch *Sharpe und Irvine (2004)* warnen vor einer Exposition mit EDC während der Schwangerschaft wegen möglicher Schädigungen des ungeborenen Kindes. Sie plädieren eindringlich dafür, negative Lebensgewohnheiten, die mit einer erhöhten Belastung durch endokrin wirksame Substanzen einhergehen (vor allem der Gebrauch von Haushaltschemikalien im weitesten Sinne), bei bestehendem Kinderwunsch aufzugeben.

5.6.4. Die Frage der Wirkung von Stoffgemischen

Der Mensch ist niemals nur klar definierbaren Einzelsubstanzen ausgesetzt, sondern es wirken in der Regel zahlreiche verschiedene endogene und exogene Einflüsse auf ihn ein. Es stellt sich daher die Frage, welche Wirkungen Stoffgemische zeigen können. Speziell für endokrin wirksame Umweltchemikalien gibt es nur sehr wenige Untersuchungen zu dieser Thematik. In einer Arbeit von *Arnold et al. (1996)* wurden synergistische Effekte von Xenoestrogengemischen nachgewiesen; die Ergebnisse mussten allerdings widerrufen werden, da sie von anderen Laboren nicht reproduziert werden konnten (*McLachlan 1997*). Als synergistisch bezeichnet man einen Effekt, der größer ist, als bei der wirksamsten Einzelsubstanz (*Payne et al. 2001*). *Rajapakse et al. (2002)* arbeiteten mit einer Mischung aus 11 Chemikalien, deren jeweilige Konzentrationen einzeln getestet keine Effekte zeigten. Dieses Chemikaliengemisch wurde gemeinsam mit E2 getestet und konnte eine deutliche Steigerung der Hormonwirkung hervorrufen. Die Autoren gehen davon aus, dass Schadstoffgemische, die Einzelsubstanzen in unwirksamen Konzentrationen enthalten, die Wirkung endogener Hormone möglicherweise auch *in vivo* dramatisch beeinflussen können.

5.7. Abschließende Betrachtungen unter Berücksichtigung der Ergebnisse dieser Arbeit

Nach den Ausführungen in Abschnitt 5.6. wird deutlich, wie schwer eine Einschätzung des tatsächlichen Gefahrenpotentials endokriner Disruptoren ist. Alle in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Testsubstanzen konnten deutliche Effekte *in vitro* hervorrufen. Dabei bewirkten sämtliche Chemikalien Proliferationssteigerungen der untersuchten Zellkulturen; PCB153 und β -HCH außerdem Änderungen der Steroidrezeptorexpression. Der getestete Konzentrationsbereich entsprach realistischen, in humanen Geweben nachweisbaren Akkumulationsraten (*Kuntzsch 2000, Bekanntmachungen des Umweltbundesamtes 2003*). Es muss demnach davon ausgegangen werden, dass die Ergebnisse tatsächlich physiologisch relevant und adverse Auswirkungen auch *in vivo* nicht auszuschließen sind.

Dennoch sollte man die Bedeutung von *in vitro* gewonnenen Resultaten nicht überbewerten. Untersuchungen an Zellkulturen tendieren generell dazu, die Komplexität der im Gesamtorganismus ablaufenden Prozesse zu trivialisieren. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte auf zahlreiche Aspekte der Estrogenregulation, wie Synthese, Metabolisierung und Wechselwirkung mit anderen (hormonellen) Regulationsmechanismen nicht eingegangen werden, da das eingesetzte Kultursystem Aussagen darüber nicht zulässt. *John Ashby* gibt zu bedenken: „Weil die Effekte einer estrogenartigen Verbindung in Abhängigkeit von Dosierung, Zeitdauer, Art des Gewebes, Organismus und Interakti-

on mit anderen Hormonen und Stoffwechselabläufen variieren können, ist es möglich, dass eine Substanz in einem Testsystem unauffällig erscheint, während sie in einem anderen deutliche estrogenische Effekte hervorruft." (aus *Krimsky 2000*). Es fällt auf, dass eine große Diskrepanz zwischen (teilweise dramatischen) Effekten *in vitro* und kaum zu beobachtenden Auswirkungen *in vivo* besteht (*Ashby 2002*). Offenbar ist der Organismus in der Lage, Störungen der Homöostase in weiten Grenzen abzufangen. Eine kritische Situation entsteht dann, wenn mehrere (hormonelle) Stressoren im Sinne eines multifaktoriellen Geschehens zu einem ungünstigen Zeitpunkt zusammenwirken, so dass eine bis dahin nebensächlich erscheinende Abweichung vom Normalzustand (z.B. Belastung durch Umweltchemikalien) auf einmal große Bedeutung gewinnt. Diese Situation besteht bei vielen reproduktionsmedizinisch relevanten Erkrankungen, die letztendlich in eine ungewollte Kinderlosigkeit münden (*Sharpe und Irvine 2004*).

Vor diesem Hintergrund erscheint es durchaus vorstellbar, dass die mit der vorliegenden Arbeit vorgestellten *in vitro* Effekte auch tatsächlich klinische Relevanz erlangen. So könnte beispielsweise bei IVF-Patienten die Belastung der Reproduktionsorgane mit PCB153 zu einer Einschränkung der Befruchtungs- bzw. Nidationsraten führen, bei einer Mammakarzinompatientin die Akkumulation von p,p'-DDE einen aggressiveren Verlauf der Erkrankung bewirken oder bei Endometriose die Zahl und Größe der Herde durch β -HCH beeinflusst werden.

6. Zusammenfassung

Endokrin wirksame Umweltchemikalien mit estrogenem Potential, sogenannte Xenoestrogene, stellen eine mögliche Gefahr für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen dar. Ihre Anreicherung ist selbst bei nicht exponierten Individuen in verschiedenen Geweben nachweisbar. Auch im humanen Endometrium werden hormonaktive Chemikalien, wie PCB 153 (ein polychloriertes Biphenyl), β -HCH (ein Isomer des Insektizids Lindan) und p,p'-DDE (ein Metabolit des Insektizids DDT) akkumuliert (*Kuntzsch 2000*). Mit der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob relevante Konzentrationen dieser Umweltchemikalien in der Lage sind, im Endometrium als Zielgewebe für Steroidhormonwirkungen Veränderungen im Sinne estrogenen Effekte hervorzurufen.

Als Modellsystem zur Untersuchung der Xenoestrogene *in vitro* kamen Primärkulturen humaner Endometriumepithel- (EEC) und Stromazellen (ESC) zum Einsatz, die ER positive MCF-7 Mammakarzinomzelllinie wurde als Kontrolle mitgeführt. Es erfolgte zunächst eine immunocytochemische Charakterisierung der Kulturen mittels spezifischer Antikörper, sowie eine Darstellung des Expressionsmusters der Steroidrezeptoren ER α , ER β , PR und des Schadstoffrezeptors AHR. Die eigentlichen Expositionsuntersuchungen wurden mit den Chemikalien p,p'-DDE, PCB153 und β -HCH in verschiedenen Konzentrationen durchgeführt. Die Inkubationszeit betrug 72h, als Positivkontrolle wurde das natürliche Estrogen E2 eingesetzt. Als Nachweismethode für estrogenen Effekte diente zum einen der von *Soto et al. (1995)* für den Einsatz an MCF-7 Zellen entwickelte ESCREEN Assay, der die Proliferationsrate kultivierter Zellen bestimmt, zum anderen die Quantifizierung der Expressionsänderungen immunocytochemisch markierter Steroidrezeptoren nach Schadstoffexposition mittels HSCORE Bestimmung (*McCarty et al. 1985*). Beide Methoden wurden für die Durchführung an Primärkulturen adaptiert.

Sowohl endometriale Epithelzellen, für die bereits ein reproduziertes Kultivierungsprotokoll vorlag (*Köller 2002*), als auch Stromazellen ließen sich erfolgreich kultivieren. Zur Differenzierung beider Zellpopulationen wurden Antikörper gegen Cytokeratin, Vimentin und Desmin eingesetzt. Die EEC exprimieren Cytokeratin und Vimentin, die ESC hingegen nur Vimentin. Bei allen Primärzellkulturen ließ sich eine Expression von ER α , ER β , PR und des AHR immunocytochemisch nachweisen. Nach 72h Inkubation mit den Testsubstanzen war im gewählten Konzentrationsbereich generell eine Proliferationssteigerung nachweisbar. Bei den epithelialen Zellen (EEC und MCF-7) zeigten sich die proliferativen Effekte stärker ausgeprägt, als bei den Stromazellen, wobei das E2 den stärksten PE induzierte. Der RPE der drei Umweltchemikalien bewegte sich bei den epithelialen Zellen um 50%. Die ESC ließen nur geringe proliferative Effekte nach E2 Gaben erkennen (PE[E2max]=107%), aber

höhere Wachstumsraten nach Inkubation mit den Xenoestrogenen. Die Steroidrezeptoren ER α , ER β und PR wurden bei den EEC nach Inkubation mit E2 verstärkt exprimiert, ebenso nach Exposition mit PCB153. Nach Einwirkung von β -HCH war die Rezeptorinduktion etwas schwächer und nach Inkubation mit p,p'-DDE kaum nachweisbar. Bei den Stromazellen ließ sich nur der PR induzieren. Diese Induktion war wiederum für E2 und PCB153 am stärksten ausgeprägt, etwas schwächer nach Exposition mit β -HCH und nicht belegbar für p,p'-DDE. Änderungen des Expressionsmusters des AHR konnten aufgrund seiner starken zytoplasmatischen und nukleären Expression nicht quantifiziert werden.

Die Ergebnisse zeigen, dass primär kultivierte Endometriumzellen generell in der Lage sind, spezifisch auf Estrogengaben zu reagieren. Betrachtet man die Effekte der drei Testagenzien, so gleichen die Reaktionen der kultivierten Zellen auf Exposition mit PCB153 sehr dem E2-Einfluss. Es erscheint möglich, dass diese Verbindung in der Lage ist, direkt als Agonist am ER zu wirken. Auch β -HCH zeigte estrogene Effekte. Die Proliferationssteigerungen waren deutlich, die Steroidrezeptorinduktionen allerdings schwächer ausgeprägt als bei der Positivkontrolle. Unter Berücksichtigung der aus der Literatur bekannten Eigenschaften, wird für das Lindanisomer eher ein indirekter, ligandenunabhängiger Mechanismus in der ER Wirkungskaskade diskutiert. Das als antiandrogen wirksam bekannte p,p'-DDE zeigte bei den EEC die stärksten proliferativen Effekte. Die Steroidrezeptorexpression erfuhr indes bei keiner der Zellkulturen eine deutliche Veränderung. Die beobachteten Proliferationssteigerungen sind somit wahrscheinlich nicht direkt ER-vermittelt. Möglicherweise spielt die ERE-unabhängige Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren eine Rolle. Mit der vorliegenden Arbeit wurde eine bereits etablierte Nachweismethode für estrogene Effekte (ESCREEN Assay) mit der Quantifizierung immunocytochemisch markierter Zellen verbunden, die in dieser Form bisher selten zur Anwendung kam. Erst durch den Einsatz beider Methoden wurde eine Aussage zur estrogenen Potenz der Testchemikalien überhaupt ermöglicht.

Alle in den Expositionsversuchen eingesetzten Testsubstanzen riefen estrogene Effekte in Konzentrationen hervor, die in dieser Größenordnung tatsächlich auch im Endometrium nachweisbar sind. Eine Beeinflussung des Gewebes durch diese Umweltchemikalien *in vivo* wäre unter diesem Aspekt möglich. Da der Organismus aber in der Lage ist, selbst weitreichenden Störungen der hormonellen Homöostase zu begegnen, erscheint eine ernsthafte Gefahr für die Fortpflanzungsfähigkeit des Menschen unwahrscheinlich. Treffen aber mehrere adverse Einflüsse (Prädisposition, Umweltfaktoren, Begleiterkrankungen u.ä.) zusammen, was speziell bei Kinderwunschpatienten häufig der Fall ist, können negative Einflüsse auf die Befruchtungsvorgänge, das Nidationsmilieu oder die Entwicklung des Embryos durch die akkumulierten Umweltchemikalien nicht ausgeschlossen werden.

7. Literaturverzeichnis

- Allred CD, Allred KF, Ju YH, Clausen LM, Doerge DR, Schantz SL, Korol DL, Wallig MA, Helferich WG: Dietary genistein results in larger MNU-induced, estrogen-dependent mammary tumors following ovariectomy of Sprague-Dawley rats. *Carcinogenesis* 25 (2004) 211-218
- Andersen HR, Andersson A-M, Arnold SF, Autrup H, Barfoed M, Beresford NA, Bjerregaard P, Christiansen LB, Gissel B, Hummel R, et al.: Comparison of short-term estrogenicity for identification of hormone-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* 107 (1999) 89-115
- Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson PE, Norrgren L: Assessment of PCBs and hydroxylated PCBs as potential xenoestrogens: in vitro studies based on MCF-7 cell proliferation and induction of vitellogenin in primary culture of rainbow trout hepatocytes. *Arch Environ Contam Toxicol* 37 (1999) 145-150
- Ando S, Sirianni R, Forastieri P, Casaburi I, Lanzino M, Rago V, Giordano F, Giordano C, Carpino A, Pezzi V: Aromatase expression in prepubertal sertoli cells: effect of thyroid hormone. *Mol Cell Endocrinol* 178 (2001) 11-21
- Aoki Y: Polychlorinated biphenyls, polychlorinated dibenzo-p-dioxins, and polychlorinated dibenzofurans as endocrine disrupters- what we have learned from yusho disease. *Environmental Research Section A86* (2001) 2-11
- Arnold JT, Kaufman DG, Seppälä M, Lessey BA: Endometrial stromal cells regulate epithelial cell growth in vitro: a new co-culture model. *Hum Reprod* 16 (2001) 836-845
- Arnold SF, Klotz DM, Collins BM, Vonier PM, Guillette LJ, McLachlan JA: Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* 272 (1996) 1489-1492
- Aronica SM, Katzenellenbogen BS: Progesterone-receptor regulation in uterine cells: stimulation by estrogen, cyclic adenosine-3',5'-monophosphate, and insulin-like growth factor-I and suppression by antiestrogens and protein-kinase inhibitors. *Endocrinology* 128 (1991) 2045-2052
- Ashby J: Scientific issues associated with the validation of in vitro and in vivo methods for assessing endocrine disrupting chemicals. *Toxicology* 181 (2002) 389-397
- Ashby J: Endocrine disruption occurring at doses lower than those predicted by classical chemical toxicity evaluations: the case of bisphenol A. *Pure Appl Chem* 75 (2003) 2167-2179
- Ashby J, Tinwell H, Odum J, Lefevre P: Natural variability and the influence of concurrent control values on the detection and interpretation of low-dose or weak endocrine toxicities. *Environ Health Perspect* 112 (2004) 847-853
- Bates MN, Buckland SJ, Garrett N, Ellis H, Needham LL, Patterson DG, Turner WE, Russell DG: Persistent organochlorines in the serum of the non-occupationally exposed New Zealand population. *Chemosphere* 54 (2004) 1431-1443
- Bekanntmachungen des Umweltbundesamtes: Aktualisierung der Referenzwerte für PCB-138,-153,-180 im Vollblut sowie Referenzwerte für HCB, β -HCH und DDE im Vollblut. *Bundesgesundheitsbl Gesundheitsforsch Gesundheitsschutz* 2 (2003) 1-8
- Bercovici B, Wassermann M, Cucos S, Ron M, Wassermann D, Pines A: Serum levels of polychlorinated biphenyls and some organochlorine insecticides in women with recent and former missed abortions. *Environ Res* 30 (1983) 169-174
- Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 83 (1986) 2496-2500
- Birnbaum LS, Cummings AM: Dioxins and endometriosis: a plausible hypothesis. *Environ Health Perspect* 110 (2002) 15-21
- Bitsch N, Körner W, Failing K, Brunn H: In vitro Screening von Pflanzenschutzmittel- Wirkstoffen auf östrogene Aktivität. *Z Umweltchem Ökotox* 14 (2002) 76-84
- Bogh IB, Christensen P, Dantzer V, Groot M, Thofner ICN, Rasmussen RK, Schmidt M, Greve T: Endocrine disrupting compounds: effect of octylphenol on reproduction over three generations. *Theriogenology* 55 (2001) 131-150

- Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W: Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 106 (1998) 551-557
- Bolt HM, Degen GH: Hormoneeffekte von Chemikalien in Nahrung und Umwelt. *Chem Unserer Zeit* 34 (2000) 30-37
- Boué SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, Shih BY, McLachlan JA, Cleveland TE: Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. *J Agric Food Chem* 51 (2003) 2193-2199
- Boyer M, Poujol N, Margeat E, Royer CA: Quantitative characterization of the interaction between purified human estrogen receptor alpha and DNA using fluorescence anisotropy. *Nucleic Acids Res* 28 (2000) 2494-2502
- Cabanes A, Wang M, Olivo S, DeAssis S, Gustafson JA, Khan G, Hilakivi-Clarke L: Prepubertal estradiol and genistein exposures up-regulate BRCA1 mRNA and reduce mammary tumorigenesis. *Carcinogenesis* 25 (2004) 741-748
- Calabrese EJ, Baldwin LA: Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. *Trends Pharmacol Science* 22 (2001) 285-291
- Calabrese EJ, Baldwin LA: Toxicology rethinks its central belief, hormesis demands a reappraisal of the way risks are assessed. *Nature* 421 (2003) 691-692
- Campbell CH, Bulayeva N, Brown DB, Gametchu B, Watson CS: Regulation of the membrane estrogen receptor alpha: role of cell density, serum, cell passage number and estradiol. *FASEB J* 16 (2002) 1917-1927
- Cannavò A, Ceci P, Coletti D, Cortesi M, Papa F, Vivarelli E, Tomei F, Adamo S, Naro F: Toxic effects of polychlorinated biphenyls in myogenic cells. *J Health Science* 50 (2003) 33-41
- Cappelletti V, Saturno G, Miodini P, Körner W, Daidone MG: Selective modulation of ERB by Estradiol and xenoestrogens in human breast cancer cell lines. *Cell Mol Life Sci* 60 (2003) 567-576
- Casslén BG, Harper MJK: Human endometrial epithelial cells grown on collagen in serum-free medium. Estrogen responsiveness and morphology. *Acta Endocrin Copenh* 125 (1991) 101-108
- Casslén BG, Siler-Khodr TM, Harper MJK: Progesterone regulation of prolactin release from human endometrial stromal cells in culture: potential bioassay for progestational activity. *Acta Endocrinologica (Copenh)* 122,1 (1990) 137-144
- Chapin RE, Robbins WA, Schieve LA, Sweeney AM, Tabacova SA, Tomashek KM: Off to a good start: the influence of pre- and periconceptual exposures, parental fertility, and nutrition on children's health. *Environ Health Perspect* 112 (2004) 69-78
- Chen G, Bunce NJ: Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway. *Environ Toxicol* 5 (2004) 480-489
- Classen-Linke I, Kusche M, Knauth R, Beier HM: Establishment of a human endometrial cell culture system and characterization of its polarized hormone responsive epithelial cells. *Cell Tissue Res* 287 (1997) 171-185
- Colborn T, vom Saal FS, Soto AM: Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ Health Perspect* 101 (1993) 378-384
- Cooke PS, Buchanan DL, Young P, Setiawan T, Brody J, Korach KS, Taylor J, Lubahn DB, Cunha GR: Stromal estrogen receptors mediate mitogenic effects of estradiol on uterine epithelium. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (1997) 6535-6540
- Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR: Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod* 59 (1998) 470-475
- Coosen R, van Velsen FL: Effects of the β -isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 101 (1989) 310-318
- Cotroneo MS, Wang J, Fritz WA, Eltoum IE, Lamartiniere CA: Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model. *Carcinogenesis* 23 (2002) 1467-1474

- Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS: Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor- alpha (ERalpha) and estrogen receptor-beta (ERbeta) messenger ribonucleic acid in the wild-type and ERalpha-knockout mouse. *Endocrinology* 138 (1997) 4613-4621
- Couse JF, Korach KS: Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocrine Reviews* 20 (1999) 358-417
- Coyle YM: The effect of environment on breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat* 84 (2004) 273-288
- Danzo BJ: The effects of environmental hormones on reproduction. *Cell Mol Life Sci* 54 (1998) 1249-1264
- Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H: Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable cause of breast cancer. *Environ Health Perspect* 101 (1993) 372-377
- DeBruin LS, Josephy PD: Perspectives on the chemical etiology of breast cancer. *Environ Health Perspect* 110, suppl 1 (2002) 119-128
- Demers A, Ayotte P, Brisson J, Dodin S, Robert J, Dewailly E: Risk and aggressiveness of breast cancer in relation to plasma organochlorine concentrations. *Cancer Epidemiol Biomark Prevention* 9 (2000) 161-166
- De Vito MJ, Thomas T, Martin E, Umbreit TH, Gallo MA: Antiestrogenic action of TCDD: Tissue specific regulation of estrogen receptor in CD1 Mice. *Toxicol Appl Pharm* 113 (1991) 284-292
- Eisenhardt S, Runnebaum B, Bauer K, Gerhard I: Nitromusk compounds in women with gynaecological and endocrine dysfunction. *Environ Res* 87 (2001) 123-130
- Fang H, Tong WD, Perkins R, Soto AM, Prechtl NV, Sheehan DM: Quantitative comparisons of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 723-729
- Fasciani A, Bocci G, Xu J, Bielecki R, Greenblatt E, Leyland N, Casper RF: Three-dimensional in vitro culture of endometrial explants mimics the early stages of endometriosis. *Fertil Steril* 80 (2003) 1137-1143
- Feng W, Webb P, Nguyen P, Liu X, Li J, Karin M, Kushner PJ: Potentiation of estrogen receptor activation function 1 by Src/JNK through a serine 118- independent pathway. *Mol Endocrinol* 15 (2001) 32-45
- Fiedler H, Hub M, Hutzinger O: Stoffbericht Hexachlorcyclohexan: Hexachlorcyclohexan in Altlasten, Text und Berichte zur Altlastenbearbeitung. Band 9, *Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg*, Karlsruhe (1993) S.1-52
- Fiedler H, Lau C, Schulz S, Wagner C, Hutzinger O: Stoffbericht Polychlorierte Biphenyle, Text und Berichte zur Altlastenbearbeitung. *Landesanstalt für Umweltschutz Baden Württemberg*, Karlsruhe (1995) S.1-54
- Fowke JH, Chung FL, Jin F, Qi D, Cai Q, Conaway C, Cheng JR, Shu XO, Gao YT, Zheng W: Urinary isothiocyanate levels, brassica, and human breast cancer. *Cancer Research* 63 (2003) 3980-3986
- Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS: Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) α activity by ER β in the Uterus. *Endocrinology* 144 (2003) 3159-3166
- Frigo DE, Burow ME, Mitchell KA, Chiang TC, McLachlan JA: DDT and its metabolites alter gene expression in human uterine cell lines through estrogen receptor-independent mechanisms. *Environ Health Perspect* 110 (2002) 1239-1245
- Frigo DE, Tang Y, Beckman BS, Scandurro AB, Alam J, Burow ME, McLachlan JA: Mechanism of AP-1-mediated gene expression by select organochlorines through the p38 MAPK pathway. *Carcinogenesis* 25 (2004) 249-261
- Galabova-Kovacs G, Walter I, Aurich C, Aurich JE: Steroid receptors in canine endometrial cells can be regulated by estrogen and progesterone under in vitro conditions. *Theriogenology* 61 (2004) 963-976
- Garcia E, Bouchard P, De Brux J, Berdah J, Frydman R, Schaison G, Milgrom E, Perrot- Applanat M: Use of immunocytochemistry of progesterone and estrogen receptors for endometrial dating. *J Clin Endocrinol Metab* 67 (1989) 80-87
- Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H: Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer* 31 (1983) 13-20

- Gerhard I, Monga B, Krahe J, Runnebaum B: Chlorinated hydrocarbons in infertile women. *Environ Res* 80 (1999) 299-310
- Gerschenson LE, Conner EA, Yang J, Anderson M: Hormonal regulation of proliferation in two populations of endometrial cells in culture. *Life Sci* 24 (1979) 1337
- Ghosh D, Sengupta J: Morphological characteristics of human endometrial epithelia cells cultured on rat-tail collagen matrix. *Hum Reprod* 10 (1995) 785-790
- Gill WB, Schuhmacher FB, Bibbo M, Strauss FH, Schoenberg HW: Association of diethylstilbestrol exposure in utero with cryptorchism, testicular hypoplasia and semen abnormalities. *J Urol* 122 (1987) 36-39
- Greenberg ER, Barnes AB, Ressegue L: Breast cancer in mothers given diethylstilbestrol in pregnancy. *N Engl J Med* 311 (1984) 1393-1398
- Greenlee AR, Ellis TM, Berg RL: Low-dose agrochemicals and lawn care pesticides induce developmental toxicity in murine preimplantation embryos. *Environ Health Perspect* 112 (2004) 703-709
- Güttes S, Failing K, Neumann K, Kleinstein J, Georgii S, Brunn H: Chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls in breast tissue of women with benign and malignant breast disease. *Arch Environ Contam Toxicol* 35 (1998) 140-147
- Gutendorf B, Westendorf J: Comparison of an array of in vitro assays for the assessment of the estrogenic potential of natural and synthetic estrogens, phytoestrogens and xenoestrogens. *Toxicology* 166 (2001) 79-89
- Haining REB, Cameron IT, van Papendorp C, Davenport AP, Prentice A, Thomas EJ, Smith SK: Epidermal growth factor in human endometrium: proliferative effects in culture and immunocytochemical localization in normal and endometriotic tissues. *Hum Reprod* 6 (1991) 1200-1205
- Hall JM, McDonnell DP: The estrogen receptor beta-isoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* 140 (1999) 5566-5578
- Hall JM, Couse JF, Korach KS: The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276 (2001) 36869-36872
- Hall JM, Korach KS: Analysis of the molecular mechanisms of the human estrogen receptor alpha and beta reveals differential specificity in target promoter regulation by xenoestrogens. *J Biol Chem* 277 (2002) 44455-44461
- Hall JM, McDonnell DP, Korach KS: Allosteric regulation of estrogen receptor structure, function and coactivator recruitment by different estrogen response elements. *Mol Endocrinol* 16 (2002) 469-486
- Hanstein B, Liu H, Yancisin MC, Brown M: Functional analysis of a novel estrogen receptor-beta isoform. *Mol Endocrinol* 13 (1999) 129-137
- Hardell L, van Bavel B, Lindström G, Carlberg M, Dreifaldt AC, Wijkström H, Starkhammar H, Eriksson M, Hallquist A, Kolmert T: Increased concentrations of polychlorinated biphenyls, hexachlorobenzene, and chlordanes in mothers of men with testicular cancer. *Environ Health Perspect* 111 (2003) 930-934
- Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS: Characterization of the biological roles of the estrogen receptors, ER α and ER β , in estrogen target tissues in vivo through the use of an ER α -selective ligand. *Endocrinology* 143 (2002) 4172-4177
- Hauser R, Chen Z, Pothier L, Ryan L, Altshul L: The relationship between human semen parameters and environmental exposure to polychlorinated biphenyls and p,p'-DDE. *Environ Health Perspect* 111 (2003) 1505-1511
- Herbst AL: Clear cell adenocarcinoma and the current status of DES-exposed females. *Cancer* 48 (1981) 484-488
- Hewitt SC, Deroo BJ, Hansen K, Collins J, Grissom S, Afshari CA, Korach KS: Estrogen receptor dependent genomic responses in the uterus mirror the biphasic physiological response to estrogen. *Mol Endocrinol* 17 (2003) 2070-2083

- Hikosaka A, Asamoto M, Hokaiwado N, Kato K, Kuzutani K, Kohri K, Shirai T: Inhibitory effects of soy isoflavones on rat prostate carcinogenesis induced by 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP). *Carcinogenesis* 25 (2004) 381-387
- Holinka CF, Hata H, Kuramoto H, Gurple E: Effects of steroid-hormones and antisteroids on alkaline-phosphatase activity in human endometrial cancer-cells (ishikawa line). *Cancer Res* 46 (1986) 2771-2774
- Hoyer AP, Grandjean P, Jorgensen T, Brock JW, Hartvig HB: Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* 352 (1998) 1816-1820
- Hsu SM, Raine L, Fanger H: Use of avidin-biotin-peroxidase complex (abc) in immunoperoxidase techniques – a comparison between abc and unlabeled antibody (pap) procedures. *J Histochem Cytochem* 29 (1981) 577-580
- Ishihara H, Kitawaki J, Kado N, Koshiba H, Fushiki S, Honjo H: Gonadotropin-releasing hormone agonist and danazol normalize aromatase cytochrome P450 expression in eutopic endometrium from women with endometriosis, adenomyosis, or leiomyomas. *Fertil Steril* 79 suppl 1 (2003) 735-742
- Jefferson WN, Couse JF, Padilla-Banks E, Korach KS, Newbold RR: Neonatal exposure to genistein induces estrogen receptor (ER)alpha expression and multiocyte follicles in the maturing mouse ovary: evidence for ERbeta-mediated and nonestrogenic actions. *Biol Reprod* 67 (2002) 1285-1296
- Jensen EV, DeSombre ER: Estrogen receptor interaction. *Science* 182 (1973) 126-134
- Jiang J, Wu R, Wang Z, Sun H, Xu Z, Xiu H: Effect of mifepristone on estrogen and progesterone receptors in human endometrial and endometriotic cells in vitro. *Fertil Steril* 77 (2002) 995-1000
- Jones RK, Bulmer JN, Searle RF: Immunohistochemical characterization of proliferation, oestrogen receptor and progesterone receptor expression in endometriosis: comparison of eutopic and ectopic endometrium with normal cycling endometrium. *Human Reprod* 10 (1995) 3272-3279
- Jørgensen M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, Leffers H: Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 403-412
- Kalantzi OI, Hewitt R, Ford KJ, Cooper L, Alcock RE, Thomas GO, Morris JA, McMillan TJ, Jones KC, Martin FL: Low dose induction of micronuclei by lindane. *Carcinogenesis* 25 (2004) 613-622
- Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM: Persistent DDT metabolite p,p'DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* 375 (1995) 581-585
- King WJ, Greene GL: Monoclonal antibodies localize estrogen receptor in the nuclei of target cells. *Nature* 307 (1984) 745-747
- Kleine-Gunk B: Phytoöstrogene. *Frauenarzt* 42,12 (2001) 1398-1405
- Kleinman D, Sharon Y, Sarov I, Insler V: Human endometrium in cell culture: a new method for culturing human endometrium as separate epithelial and stromal components. *Arch Gynecol* 234 (1983) 103-112
- Klotz DM, Hewitt SC, Ciana P, Raviscioni M, Lindzey JK, Foley J, Maggi A, DiAugustine RP, Korach KS: Requirement of estrogen receptor α in insulin-like growth factor-1 (IGF-1) induced uterine responses and in vivo evidence of IGF-1/estrogen receptor cross talk. *J Biol Chem* 277 (2002) 8531-8537
- Köller S: Untersuchungen zum Einfluß endokrin wirksamer Umweltchemikalien auf die Primärzellkultur der Epithelzellen des humanen Endometriums. *Univ Diss, Halle* (2002)
- Köller S, Seliger E, Kaltwaßer P, Röpke F: Untersuchungen zum Einfluß ökologisch relevanter Wirkstoffe auf Primärzellkulturen des humanen Endometriums. *J Fertil Reprod* 14 (2004) 7-12
- Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niyama K, Kobayashi K: Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* 112 (2004) 524-531

- Koninckx PR: The physiopathology of endometriosis: pollution and dioxin. *Gynecol Obstet Invest* 47suppl1 (1999) 47-50
- Koopman-Esseboom C, Huisman M, Weisglas-Kuperus N, Boersma ER, de Ridder MAJ, van der Paauw CG, Tuinstra LGMT: Dioxin and PCB levels in blood and human milk in relation to living areas in the netherlands. *Chemosphere* 29 (1994) 2327-2338
- Kostelac D, Rechkemmer G, Briviba K: Phytoestrogens modulate binding response of estrogen receptors α and β to the estrogen response element. *J Agric Food Chem* 51 (2003) 7632-7635
- Krimsky S: Hormonal Chaos. *The Johns Hopkins University Press*, Baltimore (2000) S.5-13, 119-120
- Krishnan AV, Stathis P, Permuth SF, Tokes L, Feldman D: Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132 (1993) 2279-2286
- Küchenhoff A, Seliger G, Klonisch T, Tscheudschilsuren G, Kaltwaßer P, Seliger E, Buchmann J, Fischer B: Arylhydrocarbon receptor expression in the human endometrium. *Fertil Steril* 71 (1999) 354-360
- Kuiper GGJM, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA: Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93 (1996) 5925-5930
- Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson J: Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138 (1997) 863-870
- Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, van der Burg B, Gustafsson JA: Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139 (1998) 4252-4263
- Kuntzsch A: Untersuchungen zum Einfluss von endokrin wirksamen Verbindungen aus der Umwelt auf die Fertilität der Frau. *Univ Diss*, Halle (2000)
- Kurita T, Young P, Brody LR, Lydon JP, O'Malley PW, Cunha GR: Stromal progesterone receptors mediate the inhibitory effects of progesterone on estrogen-induced uterine epithelial cell deoxyribonucleic acid synthesis. *Endocrinology* 139 (1998) 4708-4713
- Kurita T, Lee K, Saunders PTK, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB, Zhao C, Mäkelä S, Gustafsson JA, Dahiya R, Cunha GR: Regulation of progesterone receptors and decidualisation in uterine stroma of the estrogen receptor- α knockout mouse. *Biol Reprod* 64 (2001) 272-283
- Lackmann GM: Pränatale Aufnahme von polychlorierten Biphenylen. *Dtsch Arztebl* 99 (2002) 2262-2265
- Laird SM, Tuckerman EM, Saravelos H, Li TC: The production of tumour necrosis factor alpha by human endometrial cells in culture. *Human Reprod* 11 (1996) 1318-1323
- Lee MS, Hyun SH, Lee CK, Im KS, Hwang IT, Lee HJ: Impact of xenoestrogens on the growth of human endometrial epithelial cells in a primary culture system. *Fertil Steril* 79 (2003) 1464-1465
- Lehnert G, Angerer J, Göen T, Schaller KH: Referenzwerte für persistente Gefahrstoffe am Beispiel der Konzentrationen an Polychlorierten Biphenylen im Humanserum. *Arbeitsmed Sozialmed Umweltmed* 29 (1994) 454-458
- Leidenberger FA: Klinische Endokrinologie für Frauenärzte. *Springer Verlag*, Berlin, Heidelberg, New York (1998) S.19-23, 48-51
- Leoni V, Fabiani L, Marinelli G, Puccetti G, Tarsitani GF, De Carolis A, Vescia N, Morini A, Aleandri V, Pozzi V, Cappa F, Barbati D. PCB and other organochlorine compounds in blood of women with or without miscarriage: a hypothesis of correlation. *Ecotoxicol Environ Safety* 17 (1989) 1-11
- Lessey BA, Killam AP, Metzger DA, Haneys AF, Greene GL, McCarty KS Jr: Immunohistochemical analysis of human uterine estrogen and progesterone receptors throughout the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 67 (1988) 334-340
- Liehr JG: Is estrogen a genotoxic mutagenic carcinogen? *Endocrine Rev* (2000) 40-54
- Lindl T: Zell- und Gewebekultur. 4.Aufl. *Spektrum Akademischer Verlag*, Heidelberg, Berlin, 2000

- Loeber JG, van Velsen FL: Uterotropic effect of β -HCH, a food chain contaminant. *Food Add Cont* 1 (1984) 63-66
- Machala M, Bláha L, Lehmler HJ, Plískova M, Májkova Z, Kapplová P, Sovadinová I, Vondráček J, Malmberg T, Robertson LW: Toxicity of hydroxylated and quinoid PCB metabolites: inhibition of gap junctional intercellular communication and activation of aryl hydrocarbon and estrogen receptors in hepatic and mammary cells. *Chem Res Toxicol* 17 (2004) 340-347
- Maness SC, McDonnell DP, Gaido KW: Inhibition of androgen receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 151 (1998) 135-142
- Marshburn PB, Head JR, MacDonald PC, Casey ML: Culture characteristics of human endometrial glandular epithelium throughout the menstrual cycle: modulation of deoxyribonucleic acid synthesis by 17 β -estradiol and medroxyprogesterone acetate. *Am J Obstet Gynecol* 6 (1992) 1888-1898
- Martin MB, Reiter R, Pham T, Avellanet YR, Camara J, Lahm M, Pentecost E, Pratap K, Gilmore BA, Divekar S, Dagata RS, Bull JL, Stoica A: Estrogen-like activity of metals in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 144 (2003) 2425-2436
- Matsuzaki S, Fukaya T, Suzuki T, Murakami T, Sasano H, Yajima A: Oestrogen receptor alpha and beta mRNA expression in human endometrium throughout the menstrual cycle. *Mol Hum Reprod* 5 (1999) 559-564
- Matthews CJ, Redfern CPF, Hirst BH, Thomas EJ: Characterization of human purified epithelial and stromal cells from endometrium and endometriosis in tissue culture. *Fertil Steril* 57 (1992) 990-997
- McCarty Jr KS, Miller LS, Cox EB, Konrath J, McCarty Sr KS: Estrogen receptor analyses. Correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal anti-receptor antibodies. *Arch Pathol Lab Med* 109 (1985) 716-721
- McDonnell DP, Norris JD: Connections and regulation of the human estrogen receptor. *Science* 296 (2002) 1642-1645
- McGregor JI, Jordan VC: Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* 50 (1998) 151-196
- McKenna NJ, Lanz RB, O'Malley BW: Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. *Endocrine Rev* 20 (1999) 321-344
- McLachlan JA: Synergistic effect of environmental estrogens: report withdrawn. *Science* 277 (1997) 459-463
- McLachlan JA: Environmental signaling: what embryos and evolution teach us about endocrine disrupting chemicals. *Endocrine Rev* 22 (2001) 319-341
- Merviel P, Degeorges A, Salat-Baroux J, Calvo F: Normal human endometrial cells in culture: characterization and immortalization of epithelial and stromal cells by SV40 large T antigen. *Biol Cell* 80 (1994) 187-193
- Moll R, Levy R, Czernobilsky B, Hohlweg-Majert P, Dallenbach-Hellweg G, Franke WW: Cytokeratins of normal epithelia and some neoplasms of the female genital tract. *Lab Invest* 49 (1983) 599-610
- Mosselman S, Polman J, Dijkema R: ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392 (1996) 49-53
- Mueller SO, Kling M, Arifin Firzani P, Mecky A, Duranti E, Shields-Botella J, Delansorne R, Broschard T, Kramer P-J: Activation of estrogen receptor alpha and beta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol Lett* 142 (2003) 89-101
- Mueller SO: Xenoestrogens: mechanisms of action and detection methods. *Anal Bioanal Chem* 378 (2004) 582-587
- Mylonas I, Speer R, Makovitzky J, Richter DU, Briese V, Jeschke U, Friese K: Immunohistochemical analysis of steroid receptors and glycodefin A (PP14) in isolated glandular epithelial cells of normal human endometrium. *Histochem Cell Biol* 114 (2000) 405-411
- Naish SJ: Handbuch II immunchemischer Färbemethoden. *DAKO Corporation, Carpinteria* (1989) S.30-33
- Nakagawa R, Hirakawa H, Iida T, Matsueda T, Nagayama J: Maternal body burden of organochlorine pesticides and dioxins. *J AOAC Int* 82 (1999) 716-724

- National Toxicology Program's Report of the Endocrine Disruptors Low-Dose Peer Review. *National Toxicology Program, U.S. Department of Health and Human Services, National Institute of Environmental Health Sciences, National Institutes of Health Research Triangle Park* (2001) S.52-56
- Nardulli AM, Greene GL, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS: Regulation of progesterone receptor message ribonucleic acid and protein levels in MCF-7 cells by estradiol: analysis of estrogen's effect on progesterone receptor synthesis and degradation. *Endocrinology* 122 (1988) 935-944
- Negami AI, Tominaga T: Gland and epithelium formation in vitro from epithelial cells of the human endometrium. *Hum Reprod* 4 (1989) 620-624
- Nikov GN, Hopkins NE, Boue S, Alworth WL: Interactions of dietary estrogens with human estrogen receptors and the effect on estrogen receptor-estrogen response element complex formation. *Environ Health Perspect* 108 (2000) 867-872
- Nilsson R: Endocrine modulators in the food chain and environment. *Toxicol Pathol* 28 (2000) 420-431
- Nuwaysir EF, Bittner M, Trent J, Barrett JC, Afshari CA: Microarrays and toxicology: the advent of toxicogenomics. *Mol Carcinog* 24 (1999) 153-159
- O'Connor JC, Cook JC, Craven SC, VanPelt CS, Obourn JD: An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. *Fundam Appl Toxicol* 33 (1996) 182-195
- Odum J, Lefevre PA, Tittensor S, Paton D, Routledge EJ, Beresford NA, Sumpter JP, Ashby J: The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Regul Toxicol Pharmacol* 25 (1997) 176-188
- Ohtake F, Takeyama KI, Matsumoto T, Kitagawa H, Yamamoto Y, Nohara K, Tohyama C, Krust A, Mimura J, Chambon P, Yanagisawa J, Fujii-Kuriama Y, Kato S: Modulation of oestrogen receptor signalling by association with the activated dioxin receptor. *Nature* 423 (2003) 545-550
- Oliva E, Young RH, Clement PB, Bhan AK, Scully RE: Cellular benign mesenchymal tumors of the uterus. A comparative morphologic and immunohistochemical analysis of 33 highly cellular leiomyomas and six endometrial stromal nodules, two frequently confused tumors. *Am J Surg Pathol* 19 (1995) 757-768
- Payne J, Scholze M, Kortenkamp A: Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect* 109 (2001) 391-397
- Pearce ST, Liu H, Radhakrishnan I, Abdelrahim M, Safe S, Jordan VC: Interaction of the aryl hydrocarbon receptor ligand 6-methyl-1,3,8-trichlorodibenzofuran with estrogen receptor alpha. *Cancer Res* 64 (2004) 2889-2897
- Petz LN, Ziegler YS, Loven MA, Nardulli AM: Estrogen receptor α and activating protein-1 mediate estrogen responsiveness of the progesterone receptor gene in MCF-7 breast cancer cells. *Endocrinology* 143 (2002) 4583-4591
- Pillai SB, Jones JM, Koos RD: Treatment of rats with 17 β -estradiol or relaxin rapidly inhibits uterine estrogen receptor β 1 and β 2 messenger ribonucleic acid levels. *Biol Reprod* 67 (2002) 1919-1926
- Poland A, Glover E, Kende AS: Stereospecific, high affinity binding of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-para-dioxin by hepatic cytosol - evidence that binding species is receptor for induction of aryl- hydrocarbon hydroxylase. *J Biol Chem* 251 (1976) 4936-4946
- Popp W, Vahrenholz C, Kraus R, Norpoth K: Polychlorierte Biphenyle und Reproduktionsstörungen. *Zbl Hyg* 193 (1993) 528-556
- Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A: Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110 (2002) 917-921
- Rier SE, Martin DC, Bowman RE, Dmowski WP, Becker JL: Endometriosis in rhesus monkeys (*Macaca mulatta*) following chronic exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Fundam Appl Toxicol* 21 (1993) 433-441
- Rivas A, Olea N, Olea-Serrano F: Human exposure to endocrine-disrupting chemicals: assessing the total estrogenic xenobiotic burden. *Trends in Analytical Chemistry* 16 (1997) 613-619

- Safe S: Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem? *Environ Health Perspect* 103 (1995) 346-351
- Safe S: Cadmium's disguise dupes the estrogen receptor. *Nature Med* 9 (2003) 1000-1001
- Safe S, McDougal A: Mechanism of action and development of selective aryl hydrocarbon receptor modulators for treatment of hormone-dependent cancers. *Intern J Oncol* 20 (2002) 1123-1128
- Sanderson JT, Boerma J, Lansbergen GWA, van den Berg M: Induction and inhibition of aromatase (CYP19) activity by various classes of pesticides in H295R human adrenocortical carcinoma cells. *Tox Appl Pharmacol* 182 (2002) 44-54
- Satyaswaroop PG, Bressler RS, De la Pena MM et al. : Isolation and culture of human endometrial glands. *J Clin Endocrinol Metabol* 48 (1979) 639-641
- Schaefer WR, Zahradnik HP, Frijus- Plessen N, Schneider K: Umweltchemikalien mit endokriner Wirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Xenoestrogenen. *Umweltwissenschaften und Schadstoff- Forschung, Forschungsbericht* (1995)
- Schaefer WR, Hermann T, Meinhold-Heerlein I, Deppert WR, Zahradnik HP: Exposure of human endometrium to environmental estrogens, antiestrogens and organochlorine compounds. *Fertil Steril* 74 (2000) 558-563
- Schlumpf M, Lichtensteiger W (Hrsg): Hormonaktive Chemikalien. *Verlag Hans Huber, Bern* (2000)
- Scrimshaw MD, Lester JN: In-vitro assays for determination of oestrogenic activity. *Anal Bioanal Chem* 378 (2004) 576-581
- Selam B, Kayisli UA, Mulayim N, Arici A: Regulation of fas ligand expression by estradiol and progesterone in human endometrium. *Biol Reprod* 65 (2001) 979-985
- Seliger E, Kaltwaßer P, Buchmann J, Blüthgen A, Röpke F: Akkumulation polychlorierter Kohlenwasserstoffe im humanen Endometrium. *J Fertil Reprod* 3 (1995) 16
- Sharpe RM, Irvine DS: How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *British Medical J* 328 (2004) 447-451
- Sharpe RM, Skakkebaek NE: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet* 341 (1993) 1392-1395
- Shelby MD, Newbold RR, Tully D, Chae K, Davis VL: Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 104 (1996) 1296-1300
- Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I: Comparative distribution of estrogen receptor-alpha (ERalpha) and beta (ERbeta) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract. *Steroids* 63 (1998) 498-504
- Sjödin A, Jones RS, Focant JF, Lapeza C, Wang RY, McGahee EE, Zhang IY, Turner WE, Slazyk B, Needham LL, Patterson DG: Retrospective time trend study of polybrominated diphenyl ether and polybrominated and polychlorinated biphenyl levels in human serum from the United States. *Environ Health Perspect* 112 (2004) doi:10.1289/ehp.6826
- Snedeker SM: Pesticides and breast cancer risk: a review of DDT, DDE, and Dieldrin. *Environ Health Perspect* 109 suppl 1 (2001) 35-47
- Snijders MP, Goeij AF de, Debats- Te Baerts MJ, Rousch MJ, Koudstaal J, Bosman FT: Immunocytochemical analysis of oestrogen receptors and progesterone receptors in the human uterus throughout the menstrual cycle and after the menopause. *J Reprod Fertil* 94 (1992) 363-371
- Somigliana E, Viganò P, La Sala GB, Balasini M, Candiani M, Incerti L, Busacca M, Vignali M: Follicular fluid as a favourable environment for endometrial and endometriotic cell growth in vitro. *Hum Reprod* 16 (2001) 1076-1080
- Sonnenschein C, Soto AM: An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65 (1998) 143-150

- Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Olea-Serrano MF: The e-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103suppl 7 (1995) 113-122
- Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M: A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 51 (1973) 1409-1416
- Speirs V, Carder PJ, Lane S, Dodwell D, Lansdown MRJ, Hanby AM: Oestrogen receptor β : what it means for patients with breast cancer. *Lancet Oncol* 5 (2004) 174-181
- Spink DC, Katz BH, Hussain MM, Pentecost BT, Cao Z, Spink BC: Estrogen regulates Ah responsiveness in MCF-7 breast cancer cells. *Carcinogenesis* 24 (2003) 1941-1950
- Steinmetz R, Young PCM, Caperell-Grant A, Gize EA, Madhukar BV, Ben-Jonathan N, Bigsby RM: Novel estrogenic action of the pesticide residue β -hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Research* 56 (1996) 5403-5409
- Taylor AH, Al-Azzawi F: Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in human tissues. *J Mol Endocrinol* 24 (2000) 145-155
- Toft D, Gorski J: A receptor molecule for estrogens: isolation from the rat uterus and preliminary characterisation. *Proc Natl Acad Sci USA* 55 (1966) 1574-1581
- Tsai SJ, Wu MH, Chen HM, Chuang PC, Wing LYC: Fibroblast growth factor-9 is an endometrial stromal growth factor. *Endocrinology* 143 (2002) 2715-2721
- Tseng L: Physiologic changes in binding and metabolism of estradiol and progesterone in human endometrium during the menstrual cycle. *Obstet Gynecol Ann* 8 (1979) 1-17
- Tsuchiya Y, Nakajima M, Kyo S, Kanaya T, Inoue M, Yokoi T: Human CYP1B1 is regulated by estradiol via estrogen receptor. *Cancer Res* 64 (2004) 3119-3125
- Uchima FDA, Edery M, Iguchi T, Bern HA: Growth of mouse endometrial luminal epithelial cells in vitro: functional integrity of the estrogen receptor system and failure of estrogen to induce proliferation. *J Endocrinol* 128 (1991) 115-120
- Wagner U, Schlebusch H, van der Veen H, van der Veen K, Diedrich K, Krebs D: Accumulation of pollutants in the genital tract of sterility patients. *J Clin Chem Clin Biochem* 28 (1990) 683-688
- Wang H, Masironi B, Eriksson H, Sahlin L: A comparative study of estrogen receptors alpha and beta in the rat uterus. *Biol Reprod* 61 (1999) 955-964
- Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA: Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci USA* 97 (2000) 5936-5941
- Welshons WV, Lieberman ME, Gorski J: Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors. *Nature* 307 (1984) 747-749
- Welshons WV, Thayer KA, Judy BM, Taylor JA, Curran EM, vom Saal FS: Large effects from small exposures. I. Mechanisms for endocrine-disrupting chemicals with estrogenic activity. *Environ Health Perspect* 111 (2003) 994-1006
- White R, Parker MG: Molecular mechanisms of steroid hormone action. *Endocr Relat Cancer* 5 (1998) 1-14
- Whitworth CM, Mulholland J, Dunn RC, Glasser SR: Growth factor effects on endometrial epithelial cell differentiation and protein synthesis in vitro. *Fertil Steril* 61 (1994) 91-96
- Willemsen P, Scippo ML, Kausel G, Figueroa J, Maghuin-Rogister G, Martial JA, Muller M: Use of reporter cell lines for detection of endocrine-disrupter activity. *Anal Bioanal Chem* 378 (2004) 655-663
- Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N: Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85 (1993) 648

Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, Safe S: The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23 (2003) 1843-1855

Wu JJ, Geimonen E, Andersen J. Increased expression of estrogen receptor beta in human uterine smooth muscle at term. *Eur J Endocrinol* 142 (2000) 92-99

Younglai EV, Foster WG, Hughes EG, Trim K, Jarrell JF: Levels of environmental contaminants in human follicular fluid, serum, and seminal plasma of couples undergoing in vitro fertilization. *Arch Environ Contam Toxicol* 43 (2002) 121-126

8. Thesen

1. Im Endometrium nichtexponierter Frauen ist die Anreicherung von Xenoestrogenen, einer Gruppe von Umweltchemikalien mit hormonartiger Wirkung, nachweisbar. Am stärksten werden die polychlorierten Kohlenwasserstoffe p,p'-DDE, β -HCH und PCB153 akkumuliert. Erste Expositionsversuche mit diesen Substanzen *in vitro* belegten proliferative Effekte auf primär kultivierte Endometriumepithelzellen.
2. Gegenstand dieser Arbeit war die Untersuchung typischer estrogenereffekte der genannten Substanzen auf primär kultivierte Endometriumepithel- (EEC) und Stromazellen (ESC). Als Nachweisverfahren wurden der ESCREEN Assay und immunocytochemische Untersuchungen des Steroidrezeptorstatus einschließlich einer Quantifizierung der Expressionsänderungen nach Exposition gewählt.
3. Alle Zellkulturen wurden 72 Stunden mit den Testsubstanzen p,p'-DDE, β -HCH und PCB153 in relevanten Konzentrationen inkubiert. Das natürliche Estrogen 17 β -Estradiol (E2) kam als Positivkontrolle für estrogenereffekte zum Einsatz. Als Vergleichskultur für den ESCREEN Assay diente die Estrogenrezeptor (ER)-positive Mammakarzinomzelllinie MCF-7.
4. Der ESCREEN Assay zeigte nach Inkubation der Zellkulturen mit E2 eine deutliche Proliferationssteigerung bei den MCF-7 Zellen, eine etwas schwächere bei den EEC und kaum Veränderungen des Wachstumsverhaltens der Stromazellen.
5. Der proliferative Effekt (PE) der Testsubstanzen war bei den EEC und MCF-7 Zellen gegenüber der Positivkontrolle schwächer ausgeprägt. PCB153 und β -HCH zeigten PE-Werte um 120%, p,p'-DDE um 130%. Das Wachstumsverhalten der Stromazellen änderte sich insgesamt nur geringfügig. Die proliferativen Effekte der Testsubstanzen lagen bei den ESC unter 120%, damit aber höher, als nach Inkubation mit dem in der Positivkontrolle eingesetzten E2.
6. Die Estrogenrezeptoren ER α und ER β , der Progesteronrezeptor (PR) und auch der Arylhydrocarbonrezeptor (AHR) waren in den Zellkulturen immunocytochemisch nachweisbar. Die MCF-7 Zellen zeigten für alle Rezeptortypen ein stark positives Expressionsmuster, die EEC eine moderate und die ESC eine eher schwache Anfärbung.

7. Durch Inkubation mit E2 wurden bei den Endometriumepithelzellen alle Steroidrezeptoren verstärkt exprimiert, bei den ESC war nur eine Induktion des Progesteronrezeptors zu verzeichnen. Das Expressionsmuster des PR zeigte die größte Variabilität aller untersuchten Rezeptoren: in Abwesenheit von Estrogenen wurde er nur vereinzelt exprimiert, nach Substitution mit E2 hingegen stark induziert.
8. Nach Exposition mit PCB153 stellte sich bei beiden Primärkulturen ein ähnliches Expressionsmuster wie nach E2- Zugabe dar: Induktion aller Steroidrezeptoren bei den EEC, alleinige Expressionssteigerung des PR bei den Stromazellen. Nach Einwirkung von β -HCH zeigte sich eine ähnliche, aber schwächer ausgeprägtes Rezeptorinduktion. Die Inkubation mit p,p'-DDE ließ kaum einen Effekt auf die Rezeptorexpression erkennen.
9. Methodisch erscheint der ESCREEN Assay eher für die Anwendung an der MCF-7 Zelllinie geeignet, wohingegen an den Primärzellkulturen bevorzugt die Rezeptorquantifizierung durchgeführt werden sollte.
10. Die durch Exposition mit PCB153 an kultivierten Zellen hervorgerufenen Effekte kamen denen der Positivkontrolle nahe. Auf Grund der festgestellten Analogien erscheint es möglich, dass diese Substanz als Agonist im Estrogenrezeptor gesteuerten Regelkreis wirkt.
11. Auch β -HCH zeigte estrogene Effekte. Die Proliferationssteigerungen waren deutlich, die Steroidrezeptorinduktion schwach ausgeprägt. Für diese Substanz wird ein indirekter, ligandenunabhängiger Einfluss auf die estrogenvermittelte Wirkungskaskade diskutiert.
12. Das als antiandrogen wirksam bekannte p,p'-DDE zeigte die stärksten proliferativen Effekte bei den EEC. Die Steroidrezeptorexpression wurde kaum beeinflusst. Somit sind die induzierten Proliferationssteigerungen wahrscheinlich nicht ER- vermittelt. Möglicherweise spielt die Aktivierung anderer Transkriptionsfaktoren eine Rolle.
13. Alle in den Expositionsversuchen eingesetzten Testsubstanzen riefen estrogene Effekte in Konzentrationen hervor, die in dieser Größenordnung tatsächlich auch im Endometrium nachweisbar sind. Es muss deshalb davon ausgegangen werden, dass eine Beeinflussung dieses Gewebes auch *in vivo* möglich ist.

Lebenslauf

Name: Sabine Hippe
Geburtsdatum: 14. Juli 1974
Geburtsort: Osterburg/ Altmark
Wohnort: Halle/ Saale
Familienstand: eheähnliche Lebensgemeinschaft, drei Kinder

Schulbildung

1981-1985 Polytechnische Oberschule „Wilhelm Pieck“ in Osterburg
1985-1990 Polytechnische Oberschule „Herbert Warnke“ in Bergwitz
1990-1993 Gymnasium „Paul Gerhardt“ in Gräfenhainichen
Erwerb der Hochschulreife mit dem Prädikat „sehr gut“

Ausbildung und beruflicher Werdegang

1993-2001 Medizinstudium an der Martin-Luther-Universität in Halle,
Hochschulabschluss in der Fachrichtung Humanmedizin mit dem
Gesamtprädikat „gut“
2001-2004 Promotionsstudium an der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und
Reproduktionsmedizin im Rahmen des DFG- geförderten
Graduiertenkollegs „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf
ökologisch relevante Schadstoffe“
01.10.2004 Approbation als Ärztin
seit Nov. 2004 Assistenzärztin an der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und
Reproduktionsmedizin

.....

.....

Selbständigkeitserklärung und Erklärung über frühere Promotionsversuche

Ich versichere hiermit an Eides statt,

1. dass ich die dem Rat der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Titel „ selbständig 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.
2. dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.
3. dass ich die Arbeit in dieser oder ähnlicher Form keiner anderen Prüfungsbehörde weder im In- noch im Ausland vorgelegt habe.
4. dass ich keine früheren Promotionsversuche unternommen habe.

Die vorliegende Arbeit entstand im Rahmen der zweiten Förderperiode des von der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützten Graduiertenkollegs „Adaptive physiologisch-biochemische Reaktionen auf ökologisch relevante Wirkstoffe“.

.....

.....

Hinweise auf Publikationen von Ergebnissen dieser Arbeit

Vorträge im Rahmen des Graduiertenkollegs, Halle, Nov. **2001**; Freyburg, 14.-16.11.**2002**

Hippe S, Köller S, Seliger E, Herrmann A, Kaltwaßer P, Röpke F: Primärzellkulturen humaner Endometriumzellen als geeignete Testsysteme für Schadstoffwirkungen. *Arch Gynecol Obstet* 267 suppl 1 (**2002**) 115

Hippe S, Köller S, Seliger E, Herrmann A, Kaltwaßer P, Röpke F: Umweltchemikalien mit teratogenem Potential – Primärkulturen humaner Endometriumzellen als in vitro Testsysteme. Vortrag im Rahmen der Herbsttagung der Gesellschaft für Gynäkologie und Geburtshilfe Sachsen Anhalt, Magdeburg, Nov. **2002**

Hippe S, Kuntzsch A, Köller S, Seliger E, Krause U, Röpke F: Low dose effects of environmental pollutants on primary cultured stromal cells of human endometrium. Posterpräsentation im Rahmen des "*Low Dose Workshop on Endocrine Active Compounds*", Berlin, 20-22.11.**2003**

Hippe S, Köller S, Thäle V, Seliger E, Röpke F: Bedeutung endokrin aktiver Umweltschadstoffe für die Reproduktionsmedizin – eine Kontroverse. *IVF-News* 2 (**2004**) 3-4

Danksagungen

Ich danke dem Direktor der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin **Herrn Professor Dr. med. Friedrich Röpke** für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Erstellung der Arbeit.

Besonderer Dank gilt auch **Herrn Dr. rer. nat. Ewald Seliger** für die fachliche Betreuung und die Bereitschaft, für alle unmittelbar und mittelbar mit der Arbeit zusammenhängenden Belange jederzeit ansprechbar zu sein.

Nicht zu vergessen sei die tatkräftige Unterstützung aller Mitarbeiter der Klinik und Poliklinik für Geburtshilfe und Reproduktionsmedizin, insbesondere des Bio- und Hormonlabors, der Kinderwunschambulanz, der Station G3 und des OP Teams. Insbesondere die Zusammenarbeit mit **Frau Gabriele Albrecht** und **Frau Sabine Moosdorf** hat dazu beigetragen, ein sehr positives Arbeitsklima entstehen zu lassen, in welchem die Lösung vieler Probleme auch ganz unkonventionell möglich war.