

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

Genomische und nichtgenomische Effekte von Xenoöstrogenen

G. Vollmer, J. Wober, K. Heinrich, M. Krumbholz, I. Weißwange
Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie, Institut für Zoologie
TU-Dresden.

Förderkennzeichen: BWB 99008

Die Arbeiten des Programms Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung werden mit Mitteln des
Landes Baden-Württemberg gefördert

Juli 2002

Genomische und nichtgenomische Effekte von Xenoöstrogenen

G. Vollmer, J. Wober, K. Heinrich, M. Krumbholz, I. Weißwange

Molekulare Zellphysiologie und Endokrinologie, Institut für Zoologie, TU-Dresden.

Zusammenfassung

Mögliche schädliche Effekte von Xenoöstrogenen auf Mensch und Tier werden nach wie vor kontrovers diskutiert. Um an dieser Diskussion mitzuwirken, war es Ziel des beantragten Projektes, zur Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen von Xenoöstrogenen beizutragen. Schwierigkeiten im Verständnis der zellulären Wirkmechanismen von Xenoöstrogenen liegen im Zusammenspiel genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen, in unterschiedlichen Wirkspektren der Substanzen an homodimeren bzw. heterodimeren Komplexen aus Östrogenrezeptor- α und - β , sowie in der Organselektivität der Wirkung von Xenoöstrogenen begründet. In den jetzt durchgeführten Untersuchungen haben wir uns auf genomische Effekte konzentriert, die mittels transfizierter Zellen gemessen werden können. Als Zielorgan für Organselektivität der Wirkung wurde das Endometrium ausgewählt und die schlecht transfizierbare endometriale Adenokarzinomzelllinie RUCA-I als Modell für Transfektionsexperimente durch die humane endometriale Zelllinie HEC-1B ersetzt. In dieser Zelllinie wurde die Wirkung ausgewählter Phytoöstrogene und der Industriechemikalien Bisphenol A und o,p'-DDT an zahlreichen Kombinationen der Östrogenrezeptoren - α und - β mit verschiedenen Reporterkonstrukten geprüft. Nach erheblichem experimentellen Aufwand zur Standardisierung der Transfektionen konnte gezeigt werden, dass der Complement C3 Promotor in HEC 1B-Zellen durch den mit Phytoöstrogenen beladenen Östrogenrezeptor- β aktiviert wird, während diese Aktivierung durch die Industriechemikalien Bisphenol-A und o,p'-DDT nicht zu erfolgen scheint. Es konnte ausgeschlossen werden, dass Schwierigkeiten bei Transfektionsexperimenten in den Zellkulturbedingungen begründet sind. Alle o.g. Substanzen, mit Ausnahme von o,p'-DDT aktivierten die Alkalische Phosphatase Aktivität in der endometrialen Adenokarzinomzelllinie Ishikawa in einer dosisabhängigen Weise.

Summary

Adverse effects of xenoestrogens on humans and animals are still controversially discussed. To contribute to this discussion, we aimed to elucidate molecular modes of action of xenoestrogens. Molecular mechanisms of cellular functions of xenoestrogens are difficult to understand because an interplay of genomic and non-genomic functions exists. Further it has been shown that functions of xenoestrogens differ if bound to homo- or heterodimers of the estrogen receptors- α or - β and that there is a considerable organ selectivity of their functions. Within the presented study we concentrated on genomic functions, which were measured in transfection studies. Uterine tissue was selected as target organ. Since RUCA-I cells are hard to transfect we substituted them as a model cell line by HEC 1B human endometrial adenocarcinoma cells. In this cell line selected phytoestrogens and the industrial chemicals Bisphenol A and o,p'-DDT were tested towards their functionality on various combinations of the estrogen receptors- α and - β and of several reporter constructs. Following considerable efforts to standardize the transfection protocol it could be shown, that the complement C3 promoter in HEC 1B cells is activated by Genistein and Daidzein if bound to the estrogen receptor- β , whereas Bisphenol A and o,p'-DDT do not show this activity. We could exclude, that the difficulties in the transfection experiments were due to problems with cell culture conditions. All substances tested activated alkaline phosphatase activity in endometrial Ishikawa cells in a dose dependent manner.

1. Einleitung

Mögliche Schädwirkungen von Xenoöstrogenen sind Gegenstand kontrovers geführter Diskussionen unter Wissenschaftlern, politischen Entscheidungsträgern, aber auch in der Bevölkerung. Bei Wildtieren aus stark mit Xenoöstrogenen kontaminierten Lebensräumen und bei entsprechend behandelten Labortieren wurden reproduktions- und entwicklungsbiologische, endokrine, sowie onkologische Effekte beobachtet. Es ist unklar in wieweit gegebenenfalls Befunde bei niedriger Exposition auf den Menschen übertragbar sind, und ob für den Menschen ein Risiko durch Xenoöstrogene besteht. Diese Unsicherheit ist u.a. auf einen Mangel an Daten für eine umfassende Risikobewertung zurückzuführen.

Experimentell steht weltweit eine große Bandbreite von Modellen für die Identifizierung von Xenoöstrogenen zur Verfügung (Soto et al. 1991, Gaido et al. 1997 u.a.m.). Dem steht eine geringe Anzahl experimenteller Modelle gegenüber, die zur Beantwortung molekularer, mechanistischer, spezies- und gewebespezifischer Fragestellungen genutzt werden können. Die in unserer Arbeitsgruppe etablierte RUCA-I Zelllinie (Schütze et al. 1992) ist eine der wenigen Zelllinien, mit deren Hilfe auf einer zellulären Ebene molekulare Aspekte des genomischen und nichtgenomischen Wirkmechanismus von Xenoöstrogenen in Zellen endometrialen Ursprungs gewebespezifisch erfasst werden können (Vollmer et al. 1995, Vollmer und Schneider 1996, Hopert et al. 1998, Strunck et al. 2000).

Der genomische Weg der rezeptorvermittelten Genexpression ist der "klassische" Weg der Wirkung von Östradiol, d.h. eine Substanz mit östrogenen Aktivität bewirkt Rezeptor-vermittelt eine Veränderung der Expressionsspiegel Östradiol-abhängig regulierter Gene. Dieser Weg wird sowohl durch den seit langem bekannten Östrogenrezeptor- α aktiviert, als auch durch den 1996 erstmals beschriebenen Östrogenrezeptor- β (Kuiper et al. 1996). Interessanterweise sind erhebliche Diskrepanzen zwischen den Aktivitäten der beiden Rezeptoren beschrieben worden, wenn man die relative Potenz ihrer Wirksamkeit in Abhängigkeit des Liganden oder an individuellen Promotoren vergleicht (Paech et al. 1997, Kuiper et al. 1998, Pennie et al. 1998).

In mehreren Berichten wurde außerdem gezeigt, dass Östrogene mit und ohne Beteiligung des Östrogenrezeptors auf nichtgenomischem Weg verschiedene Signalkaskaden aktivieren können, und z.B. eine Erhöhung des intrazellulären Calciumspiegels (Revelli et al. 1998) hervorrufen oder zu einer Aktivierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (Endoh et al. 1997, Migliaccio et al. 1996, Zhang et al. 2000) führen.

Eine Schwierigkeit im Verständnis des zellulären Wirkens von Xenoöstrogenen besteht im Zusammenspiel genomischer und nicht-genomischer Wirkmechanismen. Ferner wird das Verständnis dadurch erschwert, dass sich unterschiedliche Wirkspektren ergeben, wenn die Wirkung durch Wildtyp (Kuiper et al. 1998) und Varianten (Wang et al. 1999) der Östrogenrezeptoren- α oder - β vermittelt wird (Kuiper et al. 1998), oder eventuell durch den heterodimeren Rezeptorkomplex (Tremblay et al. 1999). Schließlich ergibt sich die Schwierigkeit der Organselektivität der Wirkung, die besonders für synthetische Östrogen-Rezeptor-Modulatoren (SERMS) belegt wurde. Diese wirken z.B. in der Mamma antagonistisch, im Knochen agonistisch und bleiben in der Gebärmutter weitgehend wirkungslos (Jordan 2001).

Ursprünglich waren im Projekt vergleichende Untersuchungen zu genomischen und nichtgenomischen Effekten von Xenoöstrogenen vorgesehen. Auf Anraten der Gutachter haben wir uns auf die genomischen Effekte konzentriert, die mittels transfizierter Zellen gemessen werden sollen. Als Zielorgan wurde die Gebärmutter, als eines der Hauptzielorgane weiblicher Sexualhormone, ausgewählt. Da es sich gezeigt hatte, dass die endometriale Adenokarzinomzelllinie RUCA-I für Transfektionsexperimente schlecht geeignet ist, haben wir die humane endometriale Zelllinie HEC 1B als Modellsystem gewählt, die ebenso endometrialen Ursprungs ist und sich einfacher transfizieren lässt (Bamberger et al. 1997).

In Anbetracht der Kürze der verbleibenden Restlaufzeit des Projekts wurde die Wirkung von Xenööstrogenen an Hand ausgewählter Liganden/Rezeptor/Reporter-Kombinationen untersucht, die im Methodenteil dieses Berichts zur besseren Übersicht tabellarisch dargestellt sind (Tabelle 1).

2. Material und Methoden

2.1 Zellkulturen

Die verwendete Zelllinie ist die humane endometriale Adenokarzinomzelllinie HEC 1B. Vor der experimentellen Nutzung wurden diese in DMEM/F12 ohne Phenolrot und mit 10% FCS (Gibco, Karlsruhe) vorkultiviert. Die nachfolgende Kultivierung erfolgte in DMEM/F12 mit 5% DCC-behandeltem FCS (DCC = dextran-coated charcoal). Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

Für weitere funktionelle Untersuchungen verwendeten wir Ishikawa-Zellen, eine ebenfalls humane endometriale Karzinomzelllinie. Vor der experimentellen Nutzung wurde diese in DMEM/F12 ohne Phenolrot und mit 10% FCS (Gibco, Karlsruhe) und Insulin vorkultiviert. Die nachfolgende Kultivierung erfolgte in DMEM/F12 mit 5% DCC-behandeltem FCS (DCC = dextran-coated charcoal). Die Zellen wurden bei 5% CO₂ und 37°C inkubiert.

2.2 Hormonbehandlung der Zellkulturen

Für die Hormonbehandlung wurden 17 β -Östradiol (Sigma), Genistein (Sigma), Daidzein (Roth), Bisphenol A und DDT (beide Sigma-Aldrich) in entsprechenden Konzentrationen eingesetzt.

2.3 Verfügbare Expressionsplasmide für die Östrogenrezeptoren- α und - β

Das Expressionsplasmid HEGO für den humanen Östrogenrezeptor- α , sowie die Plasmide GAL4ER und 17m5x-GLOB β -Luc, wurde uns von Prof. Dr. P. Chambon (Strassburg) und ein Expressionsplasmid für den humanen Östrogenrezeptor- β wurde uns von Dr. L. Toschi (Schering AG, Berlin) zur Verfügung gestellt. Das Reporterkonstrukt rC3 stammte von Helga Ponce-de-Leon (Weyeth-Ayerst, Radnor, PA, USA).

2.4 Transfektion von Zellen

Die HEC 1B-Zellen werden am Tag 0 mit einer Dichte von 120.000 Zellen pro Well in einer 24 Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag liegen die Zellen adhärent vor, etwa 50 % der Fläche sind bewachsen. Die Transfektion erfolgt mittels TfxTM-20 (Promega), wobei die Mengen und ihre Relationen der Einzelkomponenten (Gesamt-DNA, Rezeptorkonstrukt, Reporterkonstrukt, Transfektionssuspension) zueinander zu beachten sind. Am Tag 2 werden die Zellen mit den zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen stimuliert. Nach 24stündiger Inkubation werden die Zellen lysiert und mit Hilfe eines Luciferase Assay Systems (Promega) die Luciferase-Aktivität gemessen. Der Proteininhalt wurde mit dem BCA-Kit (Sigma) bestimmt. In Abb. 1 ist der zeitliche Ablauf eines Transfektionsexperiments grafisch dargestellt.

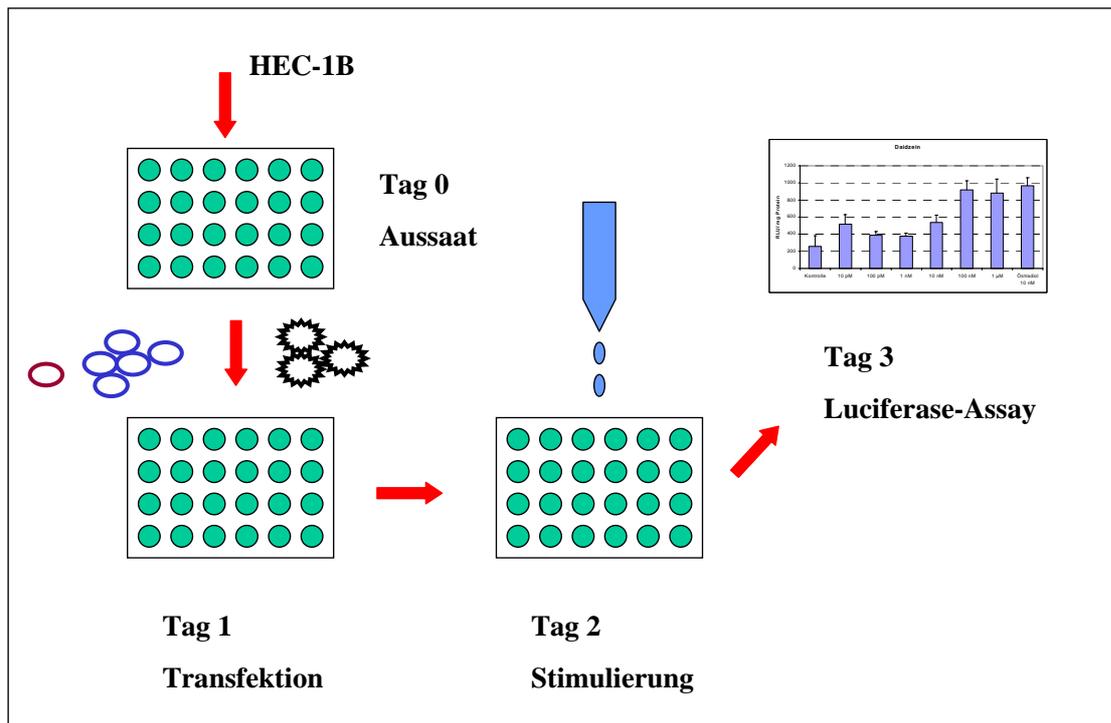


Abb. 1: Zeitlicher Ablauf eines Transfektionsexperiments

2.5 Bestimmung der Alkalischen Phosphatase- Aktivität in Zellkulturen

Die Ishikawa-Zellen wurden am Tag 1 mit einer Dichte von 125.000 Zellen pro Well in einer 12 Well-Platte ausgesät. Dem Kulturmedium wurden sofort die zu untersuchenden Substanzen in den entsprechenden Konzentrationen zugesetzt. Nach 72 Stunden Inkubation wurden die Zellen geerntet und mittels Ultraschall-Desintegration (10 sec, 50%, ½ Impuls) im Reaktionspuffer (274 mM Mannitol, 100 mM CAPS, 4 mM MgCl₂, pH 10,4) bei 4°C lysiert. Für die Bestimmung der Aktivität der Alkalische Phosphatase (AlkP) wurde die Hydrolyse von p-Nitrophenylphosphat zu p-Nitrophenol spektrophotometrisch bei 405 nm verfolgt. Die Proteinbestimmung erfolgte mittels BCA-Kit (Sigma).

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Optimierung der Transfektionsexperimente

Nach anfänglich erfolgreichen Transfektionsexperimenten mit der Referenzsubstanz Östradiol mit guter Effizienz (Vergleich Kontrolle zu Östradiol stimulierten Kulturen) zeigten sich erhebliche Probleme bei der Durchführung der Transaktivierungsstudien mit Phytoöstrogenen und synthetischen Östrogenen. Dies überraschte, da alle Experimente, die wir mit dem Konstrukt (GAL4ER), das nur die Ligandbindungsdomäne des Östrogenrezeptors enthält, und seinem entsprechenden Reporterkonstrukt (17m5x-GLOBß-Luc) durchführten, gute reproduzierbare Resultate brachten.

Um den Ursachen für die mangelnde Effizienz und Reproduzierbarkeit auf den Grund zu gehen, konzentrierten wir unsere Arbeiten zunächst auf die Optimierung der einzelnen Östrogenrezeptor-Subtyp/Promoter-Reporter Systeme. Es ist bekannt, dass die Effizienz der Trans-

fektion von einer Vielzahl an Faktoren abhängig ist, die die Optimierung und Reproduzierbarkeit recht schwierig gestalten.

- Zelllinie, Zellzahl
- Zellkulturbedingungen
- einzubauende(s) Konstrukt(e), besonders bei Kotransfektion von zwei Konstrukten
- Konzentration Gesamt-DNA
- Verhältnis Rezeptor-/Reporterplasmid
- TF-Methode (hier: Liposomvermittelte TF)
- Art der TF-Agens
- Konzentration TF-Agens
- Verhältnis Gesamt-DNA/ TF-Agens
- Inkubationszeit

Die besondere Schwierigkeit bei unseren Experimenten liegt vermutlich in der Kotransfektion von zwei Plasmiden. Dabei muss für jede Paarung das Optimum gefunden werden. In der folgenden Tabelle sind die Art und Anzahl der durchgeführten Experimente und deren Bewertung dargestellt.

Tabelle 1: Durchgeführte Transfektionsexperimente

	β-GLOB	VTL	rc3
LBD	(2/2) +++ [4/3] [2/4] +++	/	/
ER-α	/	(5/2) + [7/1] -	(5/1) -
ER-β	/	(5/2)* -	(4/1)* ++ [7/2]* +

LBD Ligandbindungsdomäne
ER-α Östrogenrezeptor α
ER-β Östrogenrezeptor β
β-GLOB Konstrukt mit Bindungsstelle für LBD-Komplex
VTL Konstrukt mit Vitellogeninpromoter
rc3 Konstrukt mit Complement c3-Promoter

(n/m) (Anzahl der Optimierungsexperimente/ Anzahl der Wiederholungen)
[s/m] [Anzahl der getesteten Substanzen/ Anzahl der Wiederholungen]
* repräsentatives Experiment dargestellt

- +++ Ergebnisse verwendbar und reproduzierbar
- ++ Ergebnisse verwendbar
- + Ergebnisse unbefriedigend, da Streuung zu groß
- Ergebnisse nicht verwendbar

Ergebnisse zur Optimierung des Verhältnisses zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid für das ER β /VTL-System sind anhand eines repräsentativen Experiments in Abb. 2 dargestellt. Es wurde der Einsatz der Östrogenrezeptor- β - und VTL-Promoter-Luciferase-Konstrukte in den Verhältnissen 1:3, 1:5 und 1:10 vorgenommen. Hierbei konnte kein ausreichend signifikanter Unterschied zwischen Kontrolle (Ethanol) und östrogenstimulierter Probe erreicht werden. Damit bleibt kein vertretbarer Spielraum für konzentrationsabhängige Untersuchungen. Außerdem sind die Standardabweichungen der Positivkontrollen trotz Vierfachbestimmung sehr hoch. Ähnliche Ergebnisse zeigten auch die Experimente für das ER α /VTL- und das ER α /rc3-System.

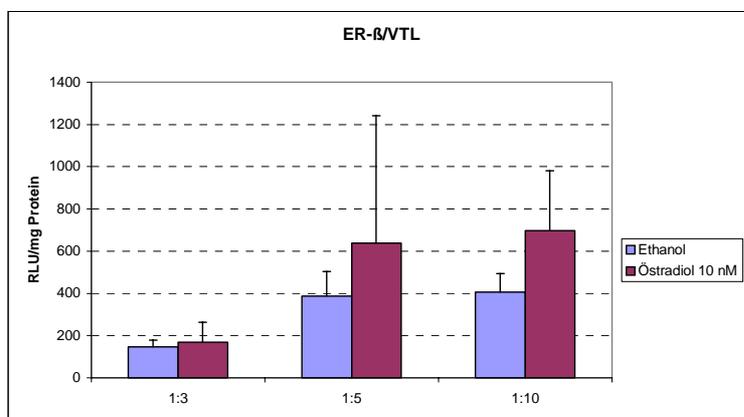


Abb. 2: Repräsentatives Experiment zur Optimierung des Verhältnisses zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid für das ER β /VTL -System

Für das ER β /rc3-System konnten wir bei einem Verhältnis der beiden Konstrukte zueinander von 1:10 einen signifikanten Unterschied erreichen, der einen zufriedenstellenden Spielraum für konzentrationsabhängige Untersuchungen bietet. Abb. 3 zeigt ein repräsentatives Experiment zur Optimierung des Verhältnisses zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid für das ER β /rc3-System.

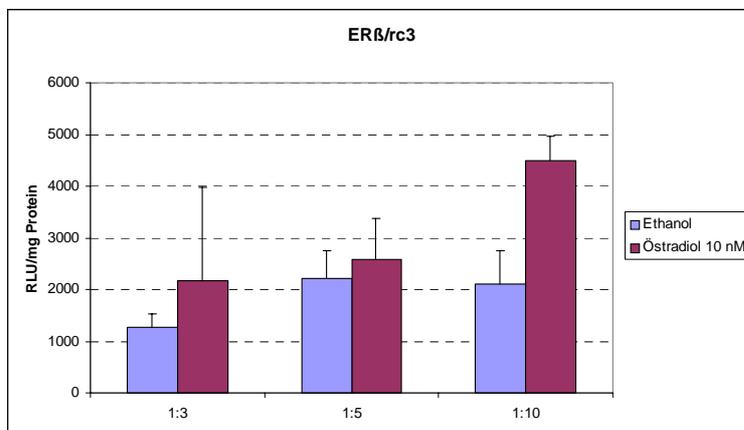


Abb. 3: Repräsentatives Experiment zur Optimierung des Verhältnisses zwischen Rezeptor- und Reporterplasmid für das ER β /rc3 -System

Weitere Veränderungen des Verhältnisses der Konstrukte zueinander (1:25, 1:100) brachten keine Steigerung der „Ausbeute“. Mit diesem System wurden erste pflanzliche und synthetische Östrogene konzentrationsabhängig untersucht.

3.2 Aktuelle Befunde mit Transfektionsstudien

In den folgenden Abbildungen 4-8 sind Ergebnisse der Transaktivierungsexperimente für Östradiol (10^{-10} – 10^{-6} M), Genistein (10^{-10} – 10^{-6} M), Daidzein (10^{-10} – 10^{-6} M), Coumestrol (10^{-10} – 10^{-6} M) und Zearalanon (10^{-10} – 10^{-6} M) dargestellt, die seit Januar 2002 im Rahmen einer Diplomarbeit nach erfolgreicher Optimierung des ER β /rc3-Systems durchgeführt wurden. Als Kontrolle wurden die Kulturen mit der entsprechenden Menge Ethanol inkubiert. Als Positivkontrolle diente in jedem Experiment Östradiol in einer Konzentration von 10^{-8} M, da bei dieser Konzentration ein Wirkungsmaximum vorliegt (Abb. 4). Alle Werte sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten, die als Dreifachbestimmung durchgeführt wurden.

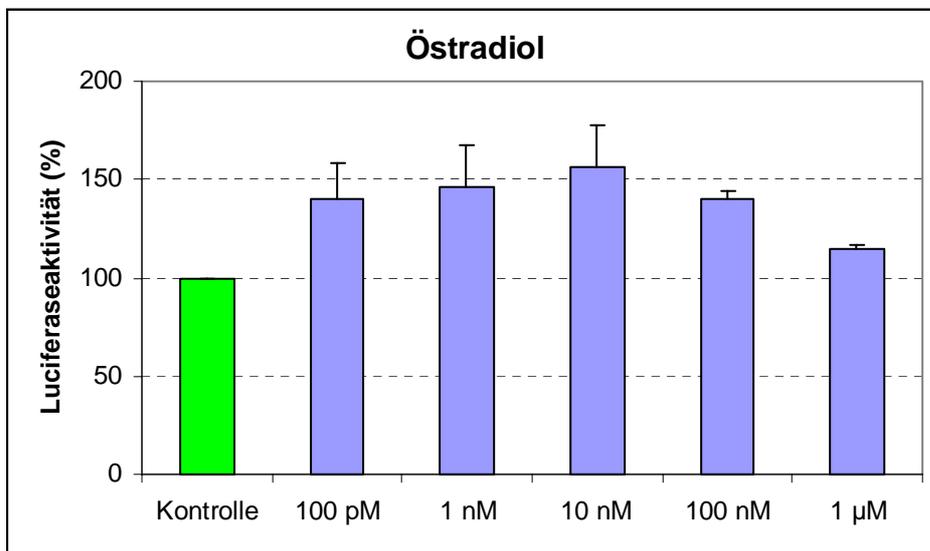


Abb. 4: Wirkung von Östradiol auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

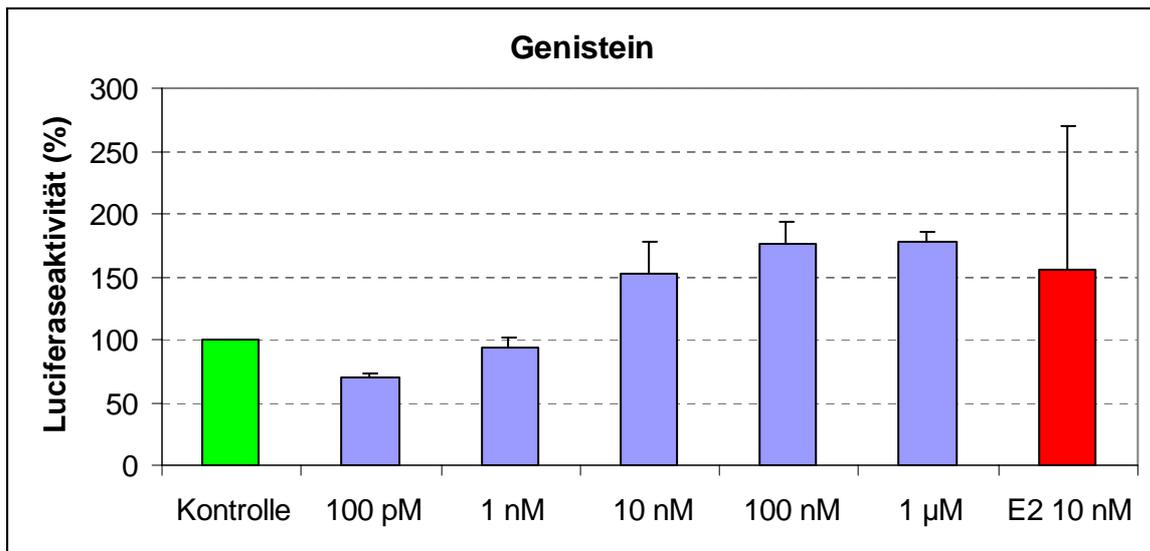


Abb. 5: Wirkung von Genistein auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

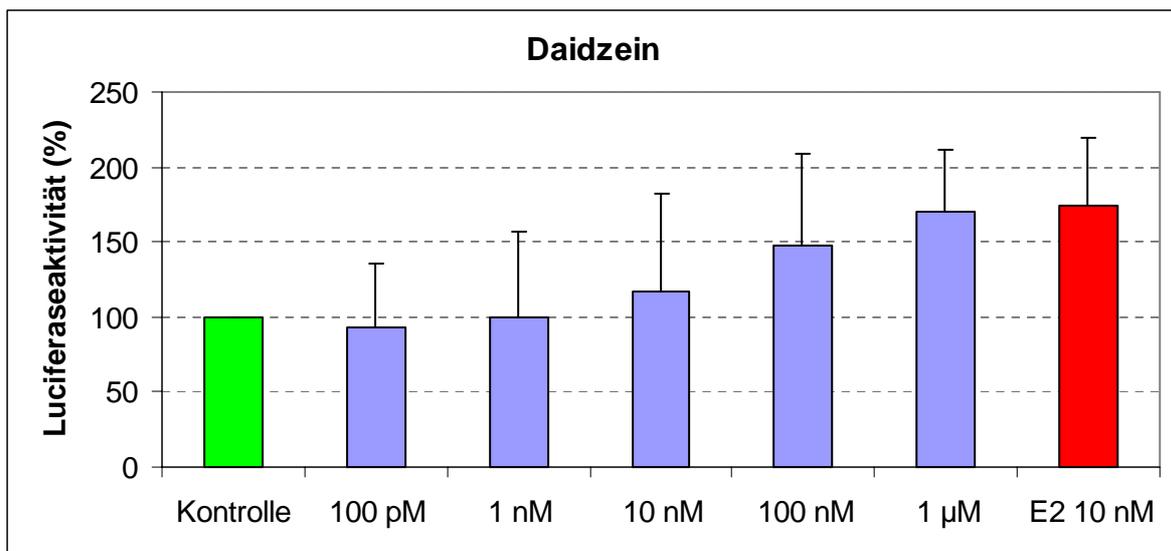


Abb. 6: Wirkung von Daidzein auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

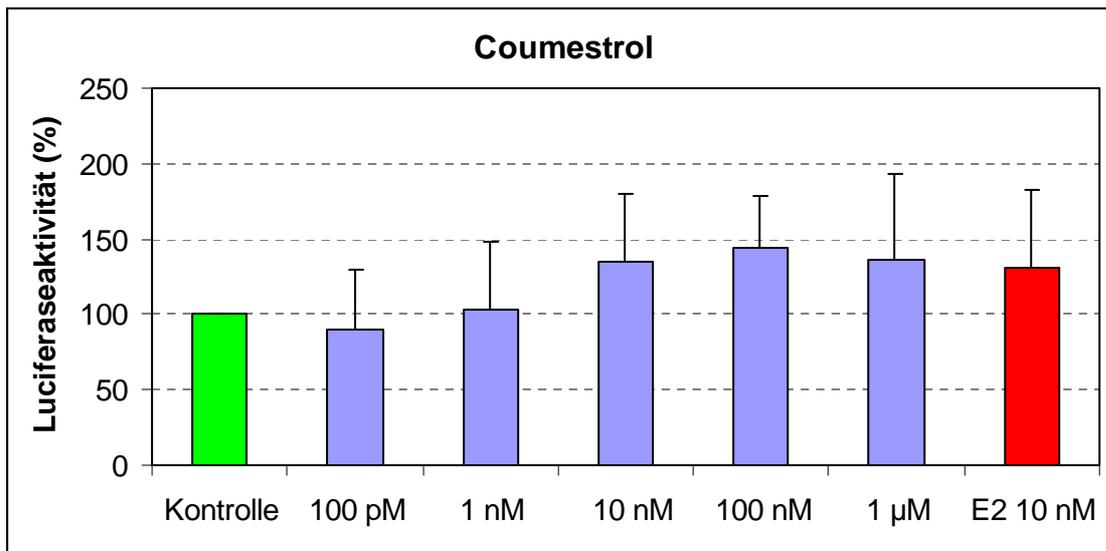


Abb. 7: Wirkung von Coumestrol auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

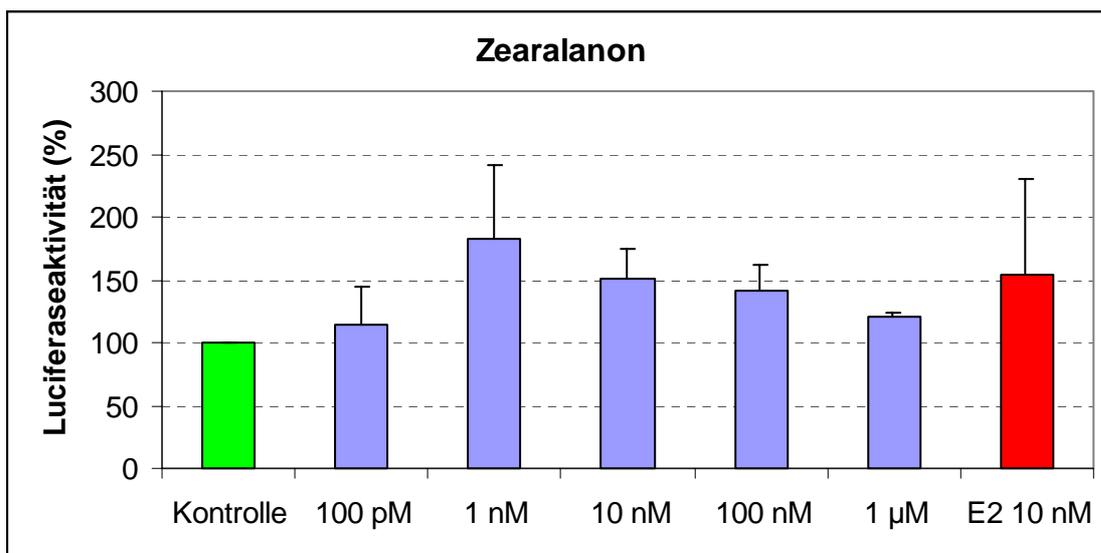


Abb. 8: Wirkung von Zearalanon auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

Die nun bisher vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass alle untersuchten Phyto- bzw. Mycoöstrogene am Östrogenrezeptor- β in Kombination mit dem Complement C3 Promotor aktiv sind. Die Stärke der Aktivität ist vergleichbar mit Östradiol. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die HEC-1B Zelllinie als endometriales Modellsystem für diese Transaktivierungsstudien geeignet sind, jedoch der Optimierungsaufwand vergleichsweise hoch ist.

3.3 Vorläufige Befunde mit Transfektionsstudien

In den folgenden Abb. 9 und 10 sind die vorläufigen Ergebnisse der Transaktivierungsexperimente mit dem ER β /rc3-System für Bisphenol A (10^{-11} – 10^{-6} M) und DDT (10^{-10} – 10^{-5} M) dargestellt, die im Zusammenhang mit der oben zitierten Diplomarbeit nicht mehr vertiefend untersucht werden konnten. Als Kontrolle wurden die Kulturen mit der entsprechenden Menge Ethanol inkubiert. Als Positivkontrolle diente in jedem Experiment Östradiol in einer Konzentration von 10^{-8} M, da bei dieser Konzentration ein Wirkungsmaximum vorliegt (Abb. 4). Alle Werte sind Dreifachbestimmungen.

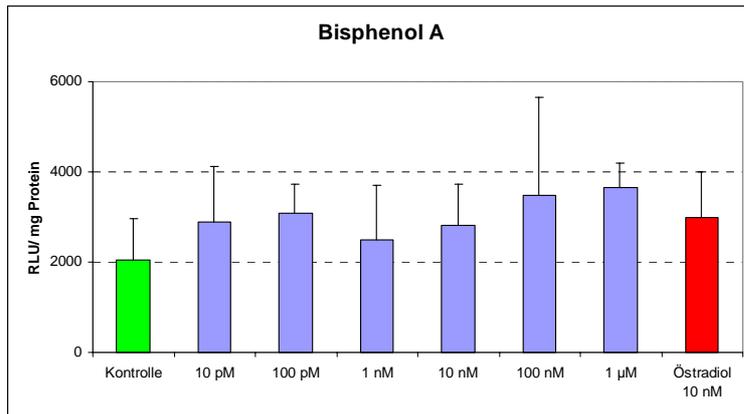


Abb. 9: Wirkung von Bisphenol A auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

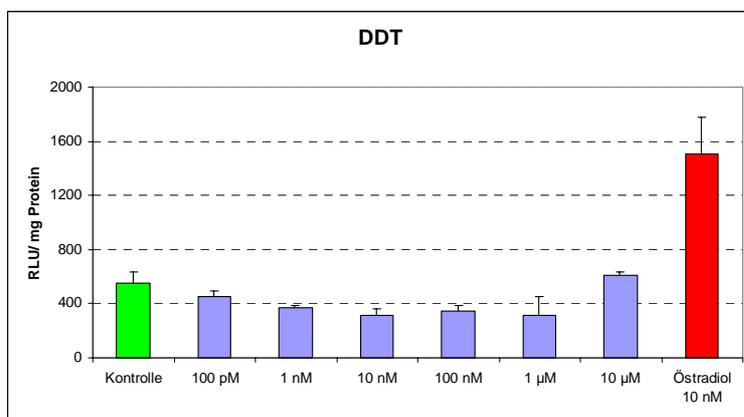


Abb. 10: Wirkung von o,p'-DDT auf HEC-1B Zellen, die mit ER β /rc3-Konstrukten cotransfiziert wurden. Gemessen wurde die Luciferaseaktivität nach 24 Stunden Inkubation. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellen mit Ethanol inkubiert.

Schwierigkeiten ergaben sich ursprünglich bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Einerseits unterlag die resultierende Luciferase-Aktivität enormen Schwankungen von Experiment zu Experiment. Beispielsweise schwanken die Werte für die unbehandelte Kontrolle in den Experimenten zwischen 256 RLU/mg Protein und 2045 RLU/mg Protein. Andererseits streuen schon innerhalb eines Experiments trotz Dreifachbestimmung die Messwerte teilweise recht stark.

Die im letzten Bericht dargestellten Schwierigkeiten bezüglich der Reproduzierbarkeit der Ergebnisse konnten durch erfolgreiche Optimierung beseitigt werden. Wichtigste Veränderung dabei war der Wechsel des Transfektionsagences. Die HEC-1B Zellen wurden mit Hilfe von DOTAP transfiziert. Dieses Transfektionsagens scheint von den Zellen besser vertragen zu werden.

Voruntersuchungen mit dem ER β /VTL-System zeigen, dass auch hier zunächst die experimentellen Parameter optimiert werden müssen.

Ganz generell scheint es sehr schwierig zu sein, organrepräsentative Zellkultursysteme für Promotorstudien zu etablieren. Diese Schlussfolgerung wird auch durch die Tatsache unterstützt, dass die in der Literatur beschriebenen Transfektionsstudien mit den Östrogenrezeptoren- α und - β in wenigen Zelllinien durchgeführt wurden. Diese lassen sich entweder gut mit den Rezeptorkonstrukten transfizieren wie z.B. Ovarialzellen des Hamsters (CHO, 41 Einträge in PubMed), Affennierenzellen (COS, 97 Einträge in PubMed) oder sie exprimieren bereits den Östrogenrezeptor, wie z.B. die Brustkrebszelllinien MCF-7 (Htun et al. 1999, Nutall et al. 2001) oder T47D (Legler et al. 1999, Htun et al. 1999) durchgeführt wurden. Im Sinne der Organselektivität sind die gut transfizierbaren Zelllinien, abgesehen von den Brustkrebszelllinien, wenig repräsentativ.

3.4 Untersuchungen zur generellen Funktionalität endometrial Zellkultursysteme

In Anbetracht der Schwierigkeiten bei der Durchführung der Transfektionsexperimente, stellte sich die Frage, ob die Ursachen dafür auch in der verwendeten Zellkulturmethode liegen könnten. Für Transfektionsexperimente sind Rahmenbedingungen wie Wachstum auf Plastik und Einsatz von Serum notwendig. Bereits beschriebene Experimente, die die Östrogenabhängigkeit von Gebärmutterkrebszellen *in vitro* belegen, wurden mit RUCA-1 Zellen auf Matrigel in serumfreiem Medium ausgeführt. Die dabei beobachtete *in vitro* Differenzierung der RUCA-1 Zellen auf extrazellulärer Matrix war Voraussetzung für die Östrogensensitivität dieser Zellen (Vollmer et al. 1995).

Ein weiteres Kultursystem, das *in vitro* und in konventioneller Kultivierung, also auf Plastik in Gegenwart von serumhaltigem Medium, als östrogenaktiv beschrieben ist, sind die Ishikawa-Zellen, eine humane endometriale Karzinomzelllinie (Holinka et al., 1986). Mit diesem System, Aktivierung der Alkalischen Phosphatase (AlkP) in Ishikawa-Zellen durch Östradiol, wollten wir prüfen, ob für die Substanzen Genistein, Daidzein, Bisphenol A und o,p'-DDT die Funktionalität einer Gebärmutterzelllinie unter den konventionellen Kultivierungsbedingungen überhaupt gegeben ist.

Das für unsere Bedingungen modifizierte Testsystem (nach Holinka et al. 1986) zeigt nach 72 Stunden Inkubation der Ishikawa-Zellen, die den Östrogenrezeptor- α besitzen, mit Östradiol (10^{-10} M – 10^{-6} M) eine deutlich dosisabhängige Zunahme der AlkP-Aktivität (Abb. 11). Alle Experimente wurden dreimal als Doppelbestimmung durchgeführt. Die Aktivität der AlkP ist in mU/mg Protein angegeben.

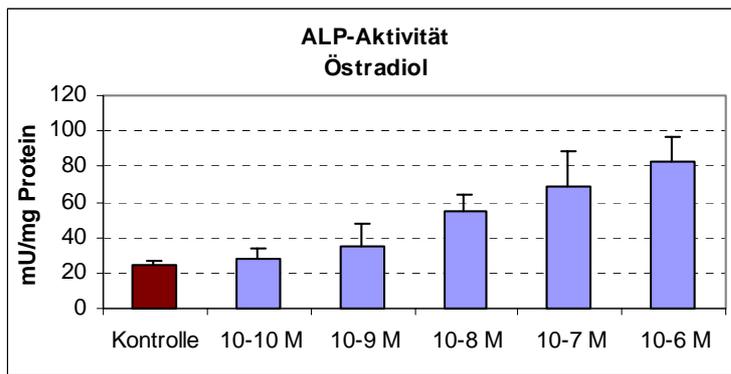


Abb. 11: AlkP-Aktivität in Ishikawa-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Östradiol (10^{-10} M – 10^{-6} M). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Analog dazu wurden die Kulturen mit den Phytoöstrogenen Genistein (10^{-10} M – 10^{-5} M) und Daidzein (10^{-10} M – 10^{-5} M) und den synthetischen Östrogenen Bisphenol A (10^{-10} M – 10^{-6} M) und o,p'-DDT (10^{-10} M – 10^{-6} M) inkubiert. Die Ergebnisse sind in den Abb. 12 bis 15 dargestellt. Als unbehandelte Kontrolle wurden die Zellkulturen mit der entsprechenden Menge Ethanol inkubiert.

Genistein, Daidzein und Bisphenol A zeigten ab einer Konzentration von 1 μ M einen signifikanten Anstieg der AlkP-Aktivität im Vergleich zur Kontrollkultur. Für o,p'-DDT konnte in dem untersuchten Konzentrationbereich keine Wirkung nachgewiesen werden. Bemerkenswert ist die sehr hohe Reproduzierbarkeit, nicht nur innerhalb eines Experimentes, sondern auch die Möglichkeit eines direkten Vergleichs der AlkP-Aktivität aller Experimente.

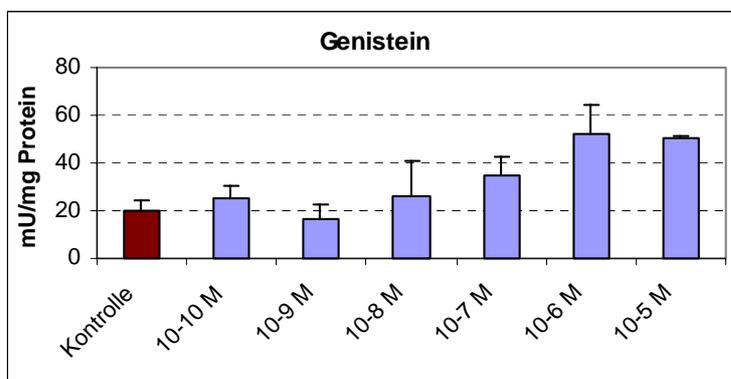


Abb. 12: AlkP-Aktivität in Ishikawa-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Genistein (10^{-10} M – 10^{-5} M). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

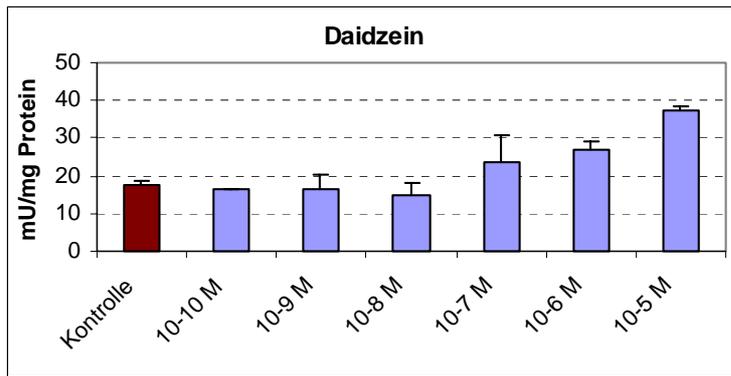


Abb. 13: AlkP-Aktivität in Ishikawa-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Daidzein (10^{-10} M – 10^{-5} M). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

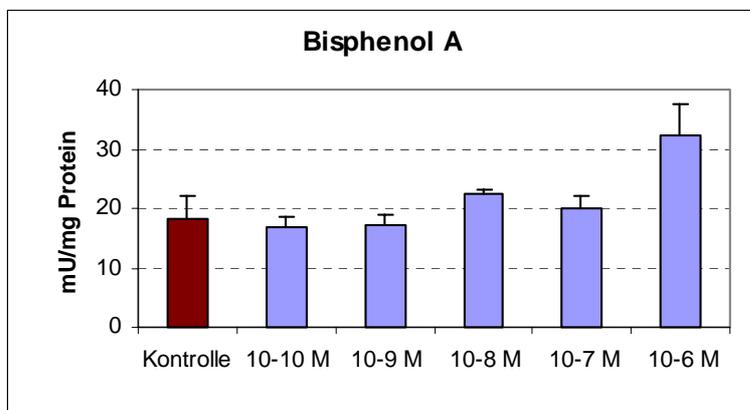


Abb. 14: AlkP-Aktivität in Ishikawa-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit Bisphenol A (10^{-10} M – 10^{-6} M). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

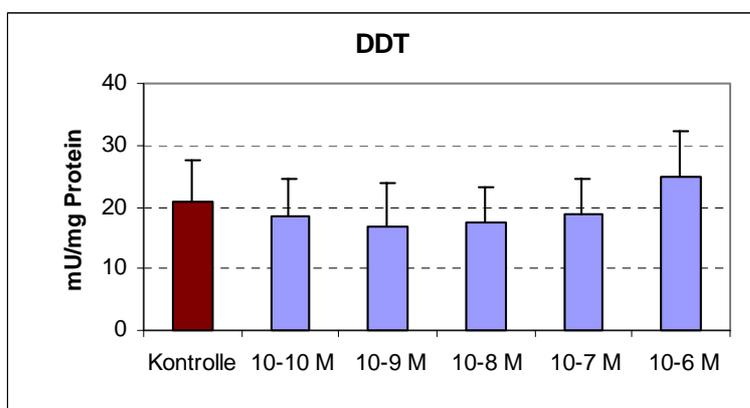


Abb. 15: AlkP-Aktivität in Ishikawa-Zellen nach 72 Stunden Inkubation mit o,p'-DDT (10^{-10} M – 10^{-6} M). Als Kontrolle wurden die Zellen mit der entsprechenden Menge Ethanol behandelt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils einer Doppelbestimmung.

Damit konnte gezeigt werden, dass es höchstwahrscheinlich nicht die Kultivierungsbedingungen sind, von denen der Erfolg und die Reproduzierbarkeit der Transfektionsexperimente abhängen.

Außerdem steht uns mit diesem AlkP-Assay ein gut etabliertes, einfaches System zur Bewertung der Östrogenität auf metabolischer Ebene zur Verfügung.

4 Literatur

Bamberger, A.M., Erdmann, I., Jenatschke, S., Bamberger, C.M., Schulte, H.M. (1997) Regulation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) promoter in HEC-1B endometrial adenocarcinoma cells. *Mol. Hum. Reprod.* **3**, 789-793.

Endoh, H., Sasaki, H., Maruyama, K., Takeyama, K., Waga, I., Shimizu, T., Kato, S., Kawashima, H. (1997) Rapid activation of MAP kinase by estrogen in the bone cell line. *Biochem Biophys Res Commun* **235**, 99-102.

Gaido, K.W., Leonard, L.S., Lovell, S., Gould, J.C., Babai, D., Portier, C.J., McDonnell, D.P., (1997): Evaluation of chemicals with endocrine modulating activity in a yeast-based steroid hormone receptor gene transcription assay. *Toxicol Appl. Pharmacol.* **143**, 205-212.

Holinka, C.F., Hata, H., Kuramoto, H., Gurpide, E. (1986) Effects of steroid hormones and antisteroids on alkaline phosphatase activity in human endometrial cancer cells (Ishikawa Line). *Cancer Res.* **46**, 2771-2774.

Hopert, A.-C., Beyer, A., Frank, K., Strunck, E., Wünsche, W., Vollmer, G. (1998) Characterization of estrogenicity of phytoestrogens in an endometrial-derived experimental model. *Env. Health Persp.* **106**, 581-586.

Htun, H., Holth, L.T., Walker, D., Davie, J.R., Hager, G.L. (1999) Direct visualization of the human estrogen receptor α reveals a role for ligand in the nuclear distribution of the receptor. *Mol. Biol. Cell* **10**, 471-486.

Jordan, V.C. (2001) The past, present and future of selective estrogen receptor modulation. *Ann. NY Acad. Sci.* **949**: 72-79.

Kuiper, G.G.J.M., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1996) Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5925-5930.

Kuiper, G.G.J.M., Lemmen, J.G., Carlson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., van der Burg, B., Gustafsson, J.A. (1998) Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with the estrogen receptor- β . *Endocrinology* **139**, 4252-4263.

Legler, J., van den Brink, C.E., Brouwer, A., Murk, A.J., van der Saag, P.T., Vethaak, A.D., van der Burg, B. (1999) Development of a stable transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol. Sci.* **48**, 55-66.

- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., Auricchio, F. (1996): Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* **15**, 1292-300.
- Nuttall, M.E., Pendrak, I., Emery, J.G., Nadeau, D.P., Fisher, P.W., Nicholson, T.A., Zhu, Y., Suva, L.J., Kingsbury, W.D., Gowen, M. (2001) Antagonism of oestrogen action in human breast and endometrial cells in vitro: potential novel antitumour agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **47**, 437-443.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G.J.M., Nilsson, S., Gustafsson, J.-A., Kushner, P.J., Scanlan, T.S. (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* **277**, 1508-1510.
- Pennie, W.D., Aldridge, T.C., Brooks, A.N. (1998) Differential activation by xenoestrogens of ER α and ER β when linked to different response elements. *J. Endocrinol.* **158**, R11-R14.
- Revelli, A., Massobrio, M., Tesarik, J. (1998): Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Rev.* **19**, 3-17.
- Schütze, N., Kraft, V., Deerberg, F., Winking, H., Knuppen, R., Vollmer, G. (1992) Functions of estrogens and antiestrogens in the rat endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I. *Int. J. Cancer* **52**, 941-949.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Ferrano, F.O. (1995) The E-screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environ Health Perspect* **103**, 113-22.
- Strunck, E., Stemmann, N., Hopert, A.-C., Wünsche, W., Frank, K., Vollmer, G. (2000) Relative binding affinity does not predict biological response to xenoestrogens in rat endometrial adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **74**, 73-81.
- Tremblay, G.B., Tremblay, A., Labrie, F., Giguere, V. (1999) Dominant activity of activation function 1 (AF-1) and differential stoichiometric requirements for AF-1 and -2 in the estrogen receptor alpha-beta heterodimeric complex. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 1919-1927.
- Vollmer, G., Ellerbrake, N., Hopert, A.-C., Knauth, R., Wünsche, W., Knuppen, R. (1995) Extracellular matrix induces hormone responsiveness and differentiation in RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **52**, 259-269.
- Vollmer, G., Schneider, M.R. (1996) The rat endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I: a novel hormone-responsive *in vivo/in vitro* tumor model. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **58**, 103-115.
- Wang, H., Zeng, X., Khan S.A. (1999) Estrogen receptor variants ER δ 5 und ER δ 7 down regulate wild-type estrogen receptor activity. *Mol. Cell. Endocrinol.* **156**, 159-168.
- Zhang, C.C., Shapiro, D.J. (2000) Activation of the p38 mitogen activated protein kinase pathway by estrogen or by 4-hydroxytamoxifen is coupled to estrogen receptor-induced apoptosis. *J. Biol. Chem.* **275**, 479-486.