

# **Programm Lebensgrundlage Umwelt und ihre Sicherung (BWPLUS)**

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

## **Charakterisierung östrogenen und antiöstrogenen Wirkungen von Umwelt(schad)stoffen in vitro.**

von

Anne-Christine Hopert<sup>1</sup>, Elke Dopp<sup>2</sup>, Elisabeth Strunck<sup>1</sup>, Dietmar Schiffmann<sup>2</sup> und  
Günter Vollmer\*<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institut für Molekulare Medizin, Medizinische Universität zu Lübeck, Ratzeburger  
Allee 160, 23538 Lübeck.

<sup>2</sup>Lehrstuhl für Tierphysiologie, Universitätsplatz 2, 18055 Rostock

\*Derzeitige Adresse: Fraunhofer Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Auf  
dem Aberg 1, 57392 Schmallenberg

Förderkennzeichen PUG U 96003 a und b

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit wurden mit Mitteln des Landes  
Baden-Württemberg gefördert

August 1999

## Zusammenfassung

Der mögliche Einfluß von Xeno- und Phytoöstrogenen auf die Gesundheit des Menschen ist zur Zeit Gegenstand kontrovers geführter Debatten. Ziel des hier vorgestellten Vorhabens war es, mögliche Wirkungen von ausgewählten Phyto- und Xenoöstrogenen gewebespezifisch in der endometrialen Adenokarzinomzelllinie RUCA-I zu erfassen und zu charakterisieren. Die untersuchten Phytoöstrogene Genistein, Daidzein, Coumestrol und Mangostin, sowie die Industriechemikalien Bisphenol A, p-tert-Octylphenol, Nonylphenol und o,p-DDT banden an den Östrogenrezeptor von RUCA-I Zellen, allerdings nur mit Bindungsaffinitäten zwischen 2 % (Coumestrol) und 0,00017 % (DDT) der Bindungsaffinität von Östradiol. Alle Substanzen mit Ausnahme von Mangostin waren in der Lage rezeptorvermittelt eine vermehrte Bildung des Östradiol abhängig regulierten Proteins Complement C3 zu induzieren, wobei verglichen zu Östradiol mindestens 100fach höhere Substanzkonzentrationen eingesetzt werden mußten. Ferner konnte erstmals gezeigt werden, daß Östradiol und Phytoöstrogene den Anstieg von intrazellulärem Kalzium in einem biphasischen Mechanismus stimulieren können. Zusammenfassend kann gesagt werden, daß RUCA-I Zellen ein geeignetes Modellsystem darstellen, um Effekte von Phyto- und Xenoöstrogenen in einem endometrialen Modell zu erfassen. Wie Östradiol sind diese Substanzen in der Lage genomische und nichtgenomische Signalübertragungswege zu aktivieren.

## Summary

The potential impact of xeno- and phytoestrogens on human health is currently under debate. With the presented work we aimed to elucidate and to characterize the potential function of selected xeno- and phytoestrogens in the endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I. The investigated substances, namely the phytoestrogens genistein, daidzein, coumestrol and mangostin, as well as the industrial chemicals Bisphenol A, p-tert-Octylphenol, Nonylphenol and o,p-DDT, bound to the estrogen receptor of RUCA-I cells. The relative binding affinity varied between coumestrol (2 % of estradiol = strongest binder) and o,p-DDT (0,00017 % = weakest binder). Nonetheless all substances except Mangostin stimulated increased production of complement C3, the major estrogen regulated protein of the rat uterus, in a receptor dependent manner. In addition, for the first time we were able to demonstrate a biphasic increase of intracellular calcium levels in response to estradiol and phytoestrogens. In summary, the endometrial adenocarcinoma cell line RUCA-I represents a suitable experimental model to elucidate potential functions of phyto- and xenoestrogens in an endometrial derived model. Like estradiol these substances are capable to trigger both genomic and nongenomic signal transduction pathways.

## 1 Einleitung

Der mögliche Einfluß von Xeno- und Phytoöstrogenen auf die Gesundheit des Menschen ist zur Zeit Gegenstand kontrovers geführter Debatten. Teilweise sind diese Diskussionen in der Tatsache des Mangels aussagefähiger epidemiologischer und experimenteller Daten begründet. Um mögliche Gesundheitsrisiken durch Substanzen mit östrogenen Wirksamkeit (Phytoöstrogene, Xenoöstrogene) zu erforschen, bedarf es geeigneter Modellsysteme *in vitro* und *in vivo*. In der Zwischenzeit sind zwar effiziente Screening-Verfahren für diese Substanzen etabliert worden (Soto et al. 1995, Körner et al. 1997), jedoch werden die Studien zu molekularen Mechanismen der Wirkung dieser Substanzen fast ausschließlich in Brustkrebszelllinien durchgeführt. Die Wirkung von Östrogenen ist gewebespezifisch, eine Tatsache, der bei Untersuchungen mit östrogenähnlich wirkenden Substanzen wenig Beachtung geschenkt wird. Ein weiteres Hauptzielorgan für weibliche Sexualhormone ist die Gebärmutter Schleimhaut (Endometrium). In diesem Gewebe wirkt z.B. das Antiöstrogen Tamoxifen, das zur Behandlung des metastasierenden Mammakarzinoms eingesetzt wird (Jordan 1997), agonistisch (Gottardis et al. 1990, Jordan et al. 1991), also wie Östradiol.

Die klassische Betrachtungsweise der Wirkung von Östrogenen in der Zielzelle setzt das Vorhandensein spezifischer Rezeptoren in der Zielzelle voraus. Die eigentliche Wirkung der Hormone besteht dann in der rezeptorvermittelten Aktivierung spezifischer Zielgene. Deshalb haben wir bei unseren Untersuchungen die relative Bindungsaffinität von Phyto- und Xenoöstrogenen als Maß für die Interaktion dieser Substanzen mit dem Östrogenrezeptor gemessen und danach die Effekte auf die Expression von Complement C3, eines östradiolabhängig regulierten Gens im Uterus erfaßt (Sundström et al. 1989, Vollmer et al. 1995). Als Modellsystem diente die von uns etablierte RUCA-I Zelllinie, die einem Endometriumkarzinom der Ratte entstammt, den Östrogenrezeptor exprimiert und in der die Expression spezieller Zielgene östradiolabhängig reguliert ist (Vollmer und Schneider 1996).

In den letzten Jahren mehrten sich Berichte, die mögliche nichtgenomische Wirkungen von Steroidhormonen belegen. Insbesondere wurden Veränderungen der intrazellulären Kalziumspiegel nach Hormonbehandlung (Revelli et al.

1998) und die Aktivierung der „Mitogen-aktivierten Proteinkinase“ (MAP-Kinase; Migliaccio et al. 1996, Endoh et al. 1997) berichtet.

Dieser Abschlußbericht enthält eine Zusammenfassung der ersten beiden Zwischenberichte (Hopert et al. 1997, 1998a), der Publikationen (Hopert et al. 1998b, Dopp et al. 1999), sowie die detailliertere Darstellung einiger wichtiger Ergebnisse der letzten sechs Monate der Förderungsperiode.

## **2 Ziele**

Ziel der Untersuchungen war es, mögliche Effekte von ausgewählten Phyto- und Xenoöstrogenen gewebespezifisch in einem endometrialen Modellsystem und einem Modellsystem aus Zellen der Mamma zu erfassen. Dazu sollte das nachfolgend aufgelistete experimentelle Arbeitsprogramm abgearbeitet werden.

### **2.1 Rezeptorvermittelte, genomische Effekte (Arbeitsgruppe Vollmer; Lübeck)**

- Ermittlung der molekularen Natur der Wirkung (östrogen versus antiöstrogen).
- Ermittlung der relativen Wirkstärke der Substanzen
- Kombinationseffekte

### **2.2 Direkte Effekte (Arbeitsgruppe Schiffmann, Rostock)**

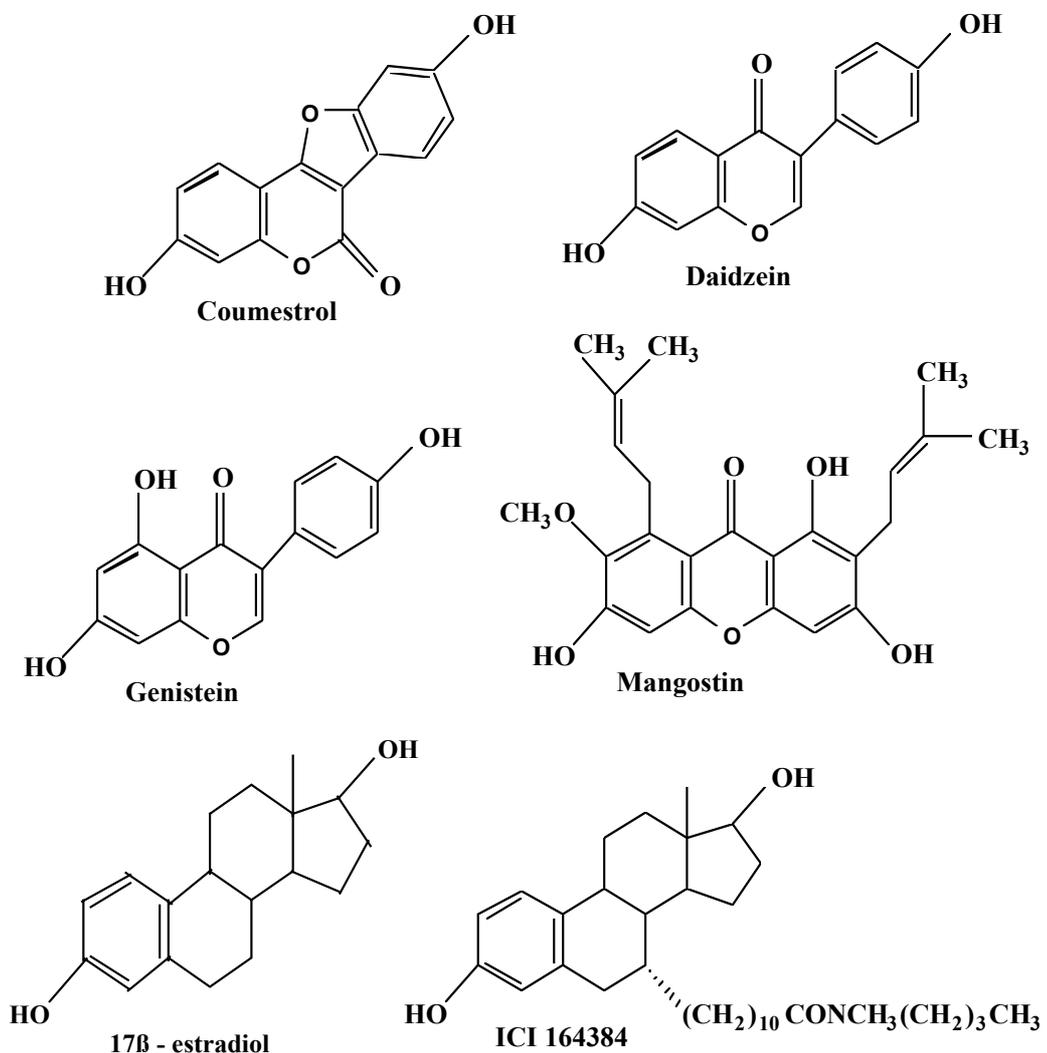
- Erfassung von Effekten auf intrazelluläre Kalziumspiegel
- Erfassung von Effekten auf das Zytoskelet
- Erfassung einer möglichen Induktion von Apoptose (programmierter Zelltod)

### **2.3 Etablierung eines Bioassays**

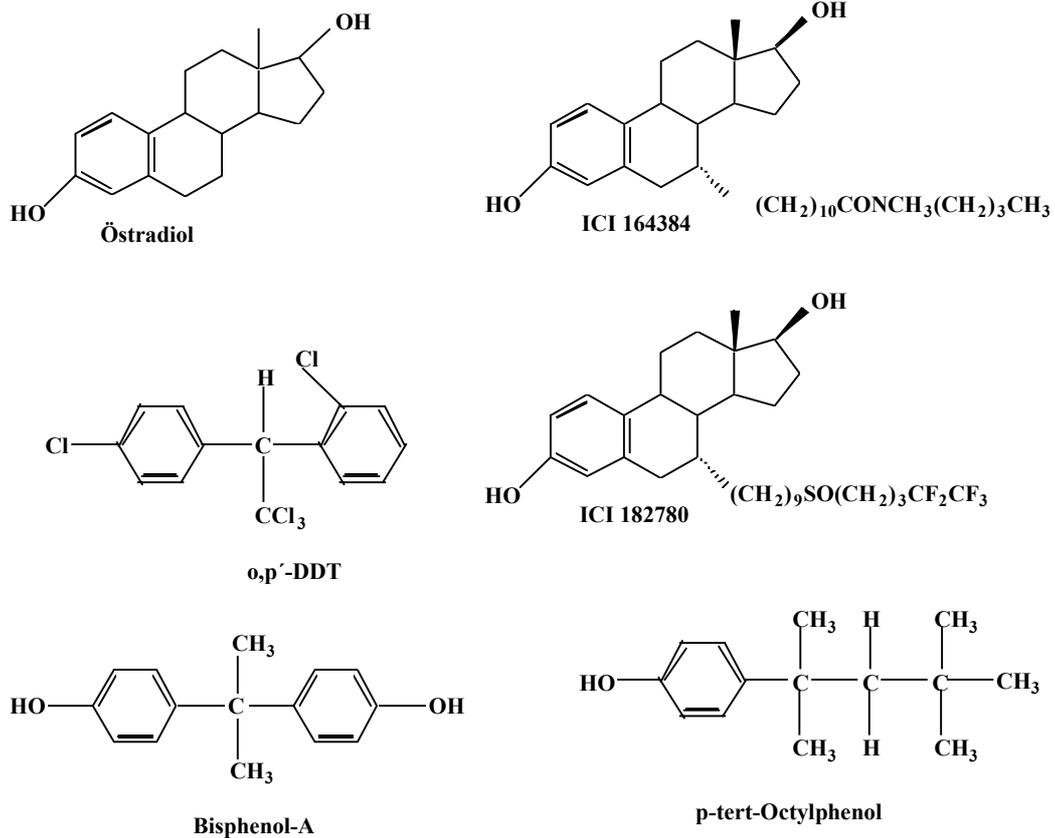
### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Getestete Substanzen

Folgende Substanzen wurden während der Projektbearbeitung verwendet: Östradiol (SIGMA, Deissenhofen), ICI 164384 (A.E. Wakeling, ZENECA, Macclesfield), ICI 182780 (Schering AG, Berlin), Genistein, Diethylstilbestrol (beide SIGMA, Deissenhofen), Daidzein (Roth, Karlsruhe), Mangostin (Dr. M. Tan, Bandung, Indonesien), Coumestrol, p-tert-Octylphenol (beide Fluka, Buchs, Schweiz), p-tert-Octylphenol, Nonylphenol (beide Hüls AG, Marl), Bisphenol A (Bayer AG, Wuppertal), o,p-DDT (SIGMA-Aldrich).



**Abb. 1:** Getestete Phytoöstrogene



**Abb. 2:** Getestete Industriechemikalien

### 3.2 Zellkultur, Hormonbehandlung von Zellkulturen, kompetitiver Ligandenbindungsassay, Metabolische Markierung von RUCA-I Zellen und SDS-Gelelektrophorese, Northern Blot, Messung intrazellulärer Kalziumkonzentration, Fluoreszenzfärbung von Aktinfasern und Nachweis der Apoptose.

Diese Methoden wurden in der Weise durchgeführt, wie dies im Zusammenhang mit Berichten zu zwei Statuskolloquien (Hopert et al. 1997, 1998a) und in den Publikationen ausführlich beschrieben wurde (Hopert et al. 1998b, Dopp et al. 1999).

### 3.3 Aktivierung der MAP-Kinasen (Erk1 und Erk2) durch Östradiol

Zur Analyse der Stimulierbarkeit von MAP-Kinasen (Erk1 und Erk2) durch Östradiol wurden MCF-7 Brustkrebszellen oder die endometrialen RUCA-I-Zellen auf 100 mm Zellkulturpetrischalen in Gegenwart eines 5%igen aktivkohlebehandelten FCS kultiviert. Die Behandlung mit Östradiol erfolgte bei fast 100%iger Konfluenz der Zellen in einem Konzentrationsbereich von  $10^{-7}$  -  $10^{-11}$

M in einem Inkubationszeitraum von 1 bis 5 min. Entsprechende Kontrollen wurden mit Ethanol behandelt.

Nach der Stimulierung wurden die Zellen 3x mit eiskaltem PBS gewaschen, sofort in SDS-Probenpuffer lysiert, in flüssigem Stickstoff fixiert und anschließend ca. 20-30 min bei 95°C denaturiert. Nach der Auftrennung der Lysate mittels einer SDS-Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Transfereffizienz wurde durch eine anschließende Ponceau S Färbung der Membran überprüft. Die Detektion aktivierter MAP-Kinasen wurde mit Hilfe von Antikörpern gegen aktivierte MAP-Kinasen (Promega) durchgeführt. Zur Visualisierung der Proteinbanden wurden Peroxidase-konjugierte Sekundär-Antikörper eingesetzt und das ECL-System (Amersham) zur Detektion verwendet.

Zur Kontrolle der Proteinkonzentrationen wurden die Membranen mit einem polyklonalen Antikörper gegen Aktin und gegen Gesamt-ERK (beide Santa Cruz Biotechnology) inkubiert und nach dem o.g. Verfahren detektiert.

## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Projektdurchführung**

Auf Empfehlung der Gutachter wurde ausschließlich mit der endometrialen Adenokarzinomzelllinie RUCA-I gearbeitet, da bereits Projekte anderer Arbeitsgruppen im PUG gefördert wurden, die ähnliche Untersuchungen in der uns ebenfalls zur Verfügung stehenden MCF-7 Mammakarzinomzelllinie durchführten. Ferner wurde ebenfalls auf Anregung der Gutachter auf eine Etablierung eines Bioassays (2.3) verzichtet.

Während die Untersuchungsmethoden im Lübecker Teilprojekt, Bestimmung der relativen Bindungsaffinität und Erfassung der östradiolabhängig regulierten Genexpression in RUCA-I Zellen, bereits etabliert waren, mußte im Rostocker Teilprojekt zur quantitativen Erfassung in intrazellulären Kalziumspiegeln, in der ersten Hälfte der Förderungsperiode intensivste Methodenetablierung und Validierung betrieben werden. Aus diesem Grund wurden von der Lübecker Arbeitsgruppe sowohl Phytoöstrogene, als auch Industriechemikalien unter-

sucht, während von der Rostocker Arbeitsgruppe publizierte Untersuchungen zu Phytoöstrogenen vorliegen.

Auf Grund von neuesten Literaturbefunden und als Konsequenz der eigenen Ergebnisse wurden in der Arbeitsgruppe Vollmer noch zusätzliche Untersuchungen ins Arbeitsprogramm aufgenommen. Da es sich gezeigt hatte, daß Complement C3 ein ideales Markergen darstellt, um Östrogenwirkung in einem endometrialen Modell zu studieren, wurde der Complement C3 Promotor kloniert (s.u.). Damit können zukünftig in einem einfach durchzuführenden Transaktivierungsassay weiterführende Untersuchungen, z.B. die Erfassung von Kombinationseffekten bearbeitet werden. Ferner mehrten sich, wie oben bereits dargestellt, die Befunde, daß MAP-Kinasen Steroidwirkung vermitteln können. Es wurde deshalb ein Assay etabliert, der den Nachweis der aktivierten MAP-Kinasen erlaubt.

## **4.2 Rezeptorvermittelte, genomische Effekte**

### *4.2.1 Ermittlung der molekularen Natur der Wirkung*

Nachdem 1996/97 ein zweiter Östrogenrezeptor, der Östrogenrezeptor- $\beta$ , beschrieben wurde (Mosselman et al. 1996, Kuiper und Gustafsson 1997), etablierten wir eine rtPCR-Methode zum Nachweis der Östrogenrezeptoren- $\alpha$  und - $\beta$ . Unsere Untersuchungen mit dieser rtPCR-Methode zeigten, daß RUCA-I ausschließlich den Östrogenrezeptor- $\alpha$  bilden.

Alle getesteten Substanzen waren in der Lage an den Östrogenrezeptor von RUCA-I Zellen zu binden. Die relativen Bindungsaffinitäten können Tabelle 1 entnommen werden.

Die Untersuchungen zur Regulation der Genexpression zeigten, daß die Phytoöstrogene Daidzein, Genistein und Coumestrol, sowie die Industriechemikalien Bisphenol-A, p-tert-Octylphenol und das technische Gemisch von Nonylphenol eindeutig agonistische Eigenschaften besaßen. Für die Industriechemikalie o,p-DDT konnte bei einer Konzentration von  $10^{-6}$  M eine sehr schwach agonistische Wirkung dargestellt werden. Mangostin besaß in einer Konzentration von  $10^{-6}$  –  $10^{-5}$  M offensichtlich schwach antagonistische Eigenschaften (Tabelle 1).

#### 4.2.2 *Ermittlung der relativen Wirkstärke der Substanzen*

Die relative Wirkstärke der getesteten Substanzen wurde konzentrationsabhängig in einem Bereich von  $10^{-8}$  –  $10^{-6}$  M getestet. Als Vergleich dienten Östradiol ( $10^{-8}$  M) und das reine Antiöstrogen ICI 182780 in einer equipotenten Konzentration ( $5 \times 10^{-7}$  M). In den anfänglichen Experimenten wurde Östradiol noch in Konzentrationen von  $10^{-7}$  M eingesetzt und es wurde das Antiöstrogen ICI 164384 verwendet.

In einer Konzentration von  $10^{-6}$  M waren alle getesteten Substanzen, mit Ausnahme von Mangostin, in der Lage die Bildung von Complement C3 Protein signifikant zu erhöhen (Tabelle 1). Das Ausmaß der Stimulierung unterschied sich dabei deutlich zwischen Phytoöstrogenen und Industriechemikalien. Während das Phytoöstrogen Coumestrol in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M ähnlich starke Effekte hervorrief wie Östradiol ( $10^{-8}$  M), stimulierten die anderen Phytoöstrogene und die Industriechemikalien in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zwar signifikant die Bildung von Complement C3, jedoch in einem deutlich geringeren Ausmaß als die Positivkontrolle Östradiol ( $10^{-8}$  M).

Bei diesen Betrachtungen muß eine weitere interessante Beobachtung festgehalten werden. Das zunächst von uns verwendete p-tert-Octylphenol (Fluka, Buchs) stimulierte keine vermehrte Bildung von Complement C3 im Gegensatz zur selben Substanz die von der Firma Hüls zur Verfügung gestellt wurde.

Für das Phytoöstrogen Mangostin wurde bei diesen Analysen eine schwache antagonistische Wirkung verzeichnet (Tabelle 1).

Analysen im Northern Blot zeigten, daß der Erhöhung der Bildungsrate von Complement C3 ein transkriptioneller Mechanismus zu Grunde liegt, d.h. die Effekte sind über eine Erhöhung der Gleichgewichts mRNA-Spiegel reguliert.

Substanz	RBA %	Konzentration M	Zunahme von C3 über Kontrollspiegel %	Wirkstärke im Ver- gleich zu E <sub>2</sub> (10 <sup>-8</sup> M) %	Hemmung durch ICI 182780
<b>Tamoxifen</b>	1 (Literaturdaten)	10 <sup>-6</sup>	76,9	<b>43,7</b>	nicht getestet
<b>Genistein</b>	0,87	10 <sup>-7</sup>	34,8	<b>19,8</b>	
		10 <sup>-6</sup>	107,1	<b>60,9</b>	ja
<b>Daidzein</b>	0,015	10 <sup>-7</sup>	34,6	<b>12,8</b>	
		10 <sup>-6</sup>	150,1	<b>55,3</b>	ja
<b>Coumestrol</b>	2	10 <sup>-8</sup>	57,1	<b>29,3</b>	
		10 <sup>-7</sup>	109,8	<b>56,4</b>	
		10 <sup>-6</sup>	221,3	<b>113,7</b>	ja
<b>Mangostin</b>	0,00076	10 <sup>-7</sup>	-10,1*	<b>19,1*</b>	
		10 <sup>-6</sup>	-16,4	<b>31</b>	nein
<b>o,p-DDTt</b>	0,00017	10 <sup>-6</sup>	30,7	<b>11,7</b>	ja
<b>Bisphenol A</b>	0,026	10 <sup>-7</sup>	105,7	<b>56,2</b>	
		10 <sup>-6</sup>	143,7	<b>78,5</b>	ja
<b>p-tert-Octylphenol</b>	0,013	10 <sup>-7</sup>	114,3	<b>42,3</b>	
		10 <sup>-6</sup>	127,7	<b>47,3</b>	ja
<b>Nonylphenol</b>	In Bearbeitung	10 <sup>-7</sup>	48,6	<b>11,7</b>	
		10 <sup>-6</sup>	226,2	<b>54,3</b>	ja

**Tabelle 1: Relative Bindungsaffinitäten und Regulation von Complement C3 Genexpression in RUCA-I. Die Tabelle faßt die wichtigsten Befunde zusammen. Die Spalte mit den fett gedruckten Zahlen zeigt den jeweiligen direkten Vergleich der Wirkstärke zu Östradiol. Abkürzungen: RBA=Relative Bindungsaffinität, C3=Complement C3.**

### 4.2.3 Kombinationseffekte

Bei diesen Untersuchungen wurde zunächst überprüft, ob sich die durch Phytoöstrogene und Industriechemikalien erzielten Effekte durch eine gleichzeitige Inkubation der Substanzen mit reinen Antiöstrogenen, entweder durch ICI 164384 oder ICI 182780, blockieren lassen. Es zeigte sich, daß die östrogene Wirkung aller untersuchten Substanzen, mit Ausnahme der bereits antagonistischen Wirkung von Mangostin, hemmbar waren (Tabelle 1). Dieser Befund belegt eindeutig, daß die Wirkung der Phytoöstrogene und der Industriechemikalien durch den Östrogenrezeptor vermittelt wird.

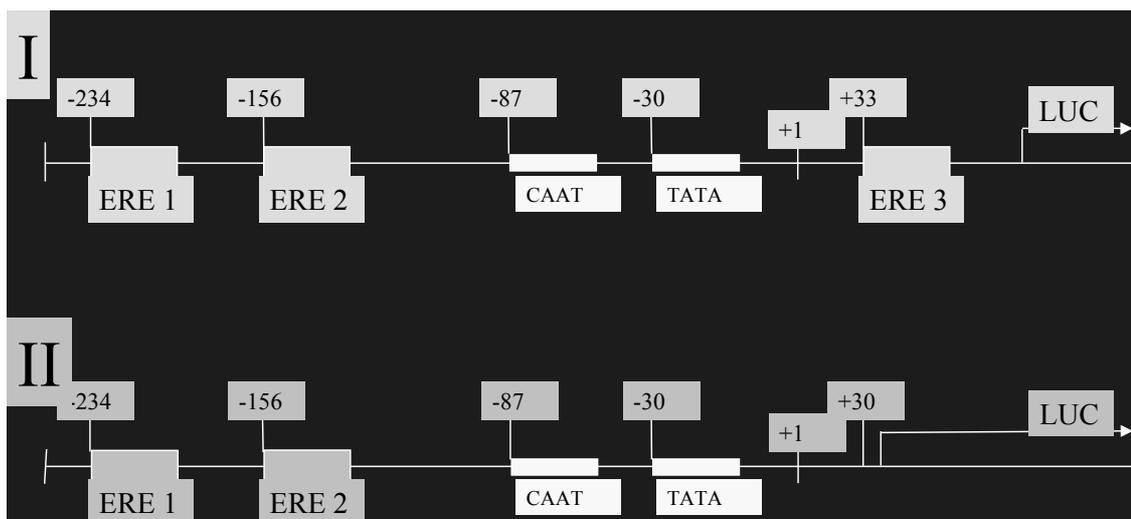
Die interessanteste Fragestellung, die sich im Zusammenhang mit Kombinationseffekten ergibt, ist folgende: Ist auf dem Hintergrund der Wirkung des physiologischen Hormons Östradiol, ein zusätzlicher Effekt der Umweltchemikalien nachweisbar? Im Laufe der Förderungsperiode haben wir untersucht, ob in der Gegenwart von suboptimalen Konzentrationen von Östradiol ( $10^{-10}$  –  $10^{-9}$  M) eine additive Wirkung durch Phytoöstrogene oder Industriechemikalien nachweisbar ist. Durchgeführt wurden diese Experimente durch metabolische Markierung der Zellen nach Hormonstimulation mit anschließender SDS-Gelelektrophorese der neugebildeten,  $^{35}\text{S}$ -Methionin markierten sezernierten Proteine. Mit dieser Methode konnten wir für keine der Umweltchemikalien nach gleichzeitiger Gabe von Östradiol eine Stimulation der Bildung von Complement C3 zeigen, die größer gewesen wäre als eine Stimulation nur durch Östradiol.

Zur Lösung dieses Problems haben wir 3 verschiedene methodische Ansätze verfolgt, wobei die dazu notwendigen experimentellen Vorarbeiten erst nach Ablauf des Förderungszeitraums abgeschlossen waren. Wir haben eine semi-quantitative rtPCR-Methode vom Labor von Dr. P. Diel (Deutsche Sporthochschule Köln) übernommen und im Labor etabliert, die sensitiver ist als das in vivo Labelling von Proteinen.

Zusätzlich haben wir eine detaillierte Studie zu Zeit- und Konzentrationsabhängigkeit der Stimulation der vermehrten Bildung von Complement C3 durch Östradiol durchgeführt. Das Ergebnis dieser Untersuchungen war, daß eine Stimulation von RUCA-I Zellen mit  $10^{-10}$  M Östradiol für 4 Stunden eine gerade nachweisbare, vermehrte Bildung der Complement C3 mRNA stimuliert. Mit

dieser präziseren Definition der suboptimalen Bedingungen für die Östradiolwirkung, sehen wir uns in die Lage versetzt die Kombinationsexperimente unter verbesserten Bedingungen noch einmal durchzuführen.

Schließlich haben wir noch eine dritte Strategie verfolgt, um die Voraussetzungen für Untersuchungen zu Kombinationseffekten zu schaffen. In der Arbeitsgruppe wurde der humane Complement C3 Promotor kloniert und ein Transaktivierungssystem bestehend aus dem Complement C3 Promotor und dem Luciferase Reportergen hergestellt. Das Complement C3-Gen enthält drei sog. östrogenresponsive Elemente, wobei zwei in der 5'-Region des Gens und eines im ersten Exon des Gens lokalisiert ist. Aus diesem Grund wurde ein Reportergenkonstrukt mit allen drei Elementen (Abb. 3) und ein Reportergenkonstrukt mit den beiden im 5'-Bereich des Gens gelegenen Elementen kloniert (Abb. 3). Mit den Konstrukten werden jetzt als Erprobungsphase erste Transaktivierungsstudien durchgeführt.



**Abb. 3: Complement C3 Reportergenkonstrukte.** Gezeigt ist eine schematische Darstellung beider erzeugten Konstrukte, die sich dadurch unterscheiden, daß dem Konstrukt II das östrogenresponsive Element im ersten Exon des Gens fehlt. Abkürzungen: ERE=östrogenresponsives Element, LUC=Luciferase.

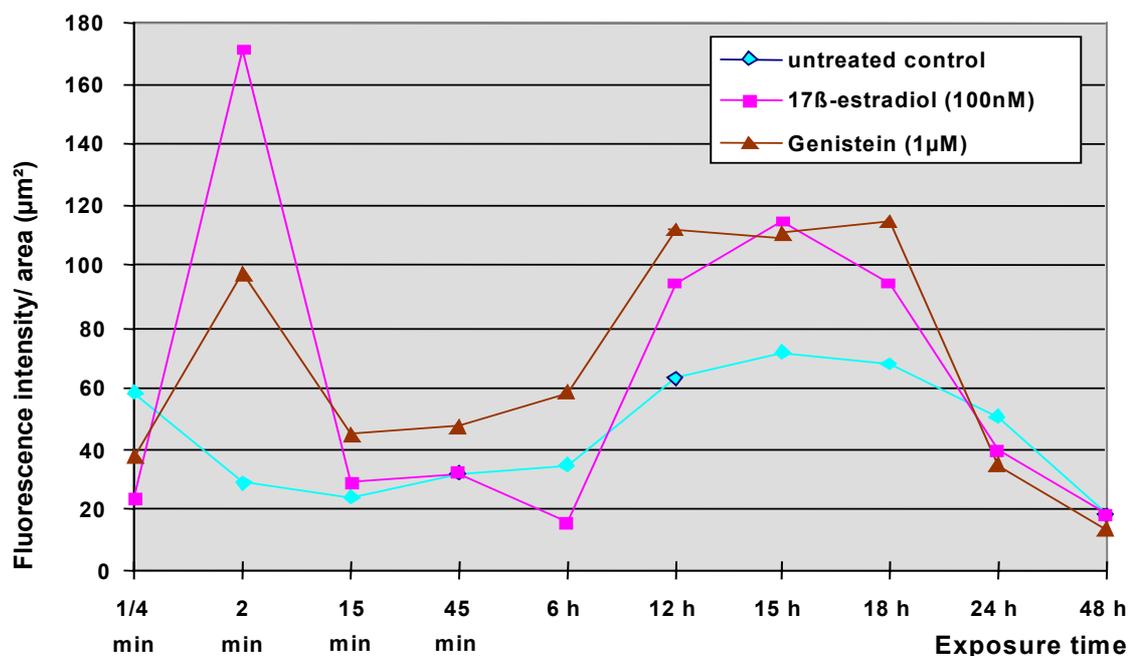
### 4.3. Direkte Effekte

#### 4.3.1 Erfassung von Effekten auf den intrazellulären Kalziumspiegel.

Wie oben schon erwähnt, mußten die zur Anwendung kommenden fluoreszenzmikroskopischen Methoden im Labor Schiffmann zunächst etabliert werden, was die erste Hälfte der Förderungsperiode in Anspruch genommen hat.

Das herausragende und neue Ergebnis dieser Untersuchungen kann in einem Satz zusammengefaßt werden: *Eine Behandlung von RUCA-I Zellen mit Östradiol führt zu einer biphasischen Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und damit zu einem Anstieg des Spiegels an intrazellulärem Kalzium ( $[Ca^{2+}]_i$ ).*

Dieser Effekt der Freisetzung von  $[Ca^{2+}]_i$  wurde in nachfolgenden Untersuchungen vertiefend charakterisiert. Nach Behandlung von RUCA-I Zellen mit Östradiol oder Phytoöstrogenen, in Abb. 4 gezeigt für Östradiol und Genistein, ergeben sich in einer zeitabhängigen Betrachtungsweise zwei Peaks für die Freisetzung von  $[Ca^{2+}]_i$ , einer nach ca. 2 min und einer nach ca. 15 h. Zumindest der späte Peak konnte durch eine gleichzeitige Behandlung der Zellen mit einem reinen Antiöstrogen unterdrückt werden, was dafür spricht, daß die zeitlich späte Freisetzung von  $[Ca^{2+}]_i$  vom Östrogenrezeptor abhängig ist.



**Abb. 4:** Bestimmung von  $[Ca^{2+}]_i$  durch eine Fluoreszenzmethode. Dargestellt ist die Fluoreszenzintensität in RUCA-I Zellen in Abhängigkeit der Behandlungsdauer der Zellen.

Es konnte ferner gezeigt werden, daß das Konzentrationsmaximum der Freisetzung von  $[Ca^{2+}]_i$  für Östradiol mit einem scharfen Peak bei  $10^{-7}$  M liegt, während eine Behandlung der Zellen mit Genistein in einer Konzentration von  $10^{-7}$  M zwar zu einem Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  führt, das Maximum des Effektes aber erst bei  $10^{-6}$  M Genistein beobachtet wird.

Beim Vergleich der relativen Potenz verschiedener Phytoöstrogene mit der Potenz von Östradiol ergab sich, daß eine Behandlung von RUCA-I Zellen mit Daidzein in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M zu einem stärkeren Anstieg von  $[Ca^{2+}]_i$  führte, als eine Behandlung der Zellen mit  $10^{-8}$  M Östradiol. Die Wirkungen von Genistein und Coumestrol, beide in einer Konzentration von  $10^{-6}$  M, waren wesentlich weniger stark ausgeprägt.

#### 4.3.2 Erfassung von Effekten auf das Zytoskelet

Bei diesen Untersuchungen wurde getestet, ob sich eine Behandlung von RUCA-I Zellen mit Östradiol und mit Phytoöstrogenen auf die Zellform und die Anordnung der Aktinfasern, als repräsentative Strukturen des Zytoskelletts, auswirkt. Eine Anfärbung von Aktinfasern mit Phalloidin zeigt, daß eine Behandlung von RUCA-I Zellen mit Genistein ( $10^{-6}$  M) eine geringfügige Veränderung der Zellform bewirkte. Die Anordnung und die Morphologie der Aktinfasern war nicht beeinträchtigt, im Gegensatz zu einer Behandlung der Zellen mit Östradiol ( $10^{-7}$  M) oder dem synthetischen Östrogen Diethylstilbestrol (DES;  $10^{-5}$  M). Östradiol und DES behandelte Zellen zeigten eine deutlich veränderte Zellform, ein Schrumpfen der Zellen begleitet von der Depolymerisierung der Aktinfasern. Der stärkste Effekt wurde für DES beobachtet.

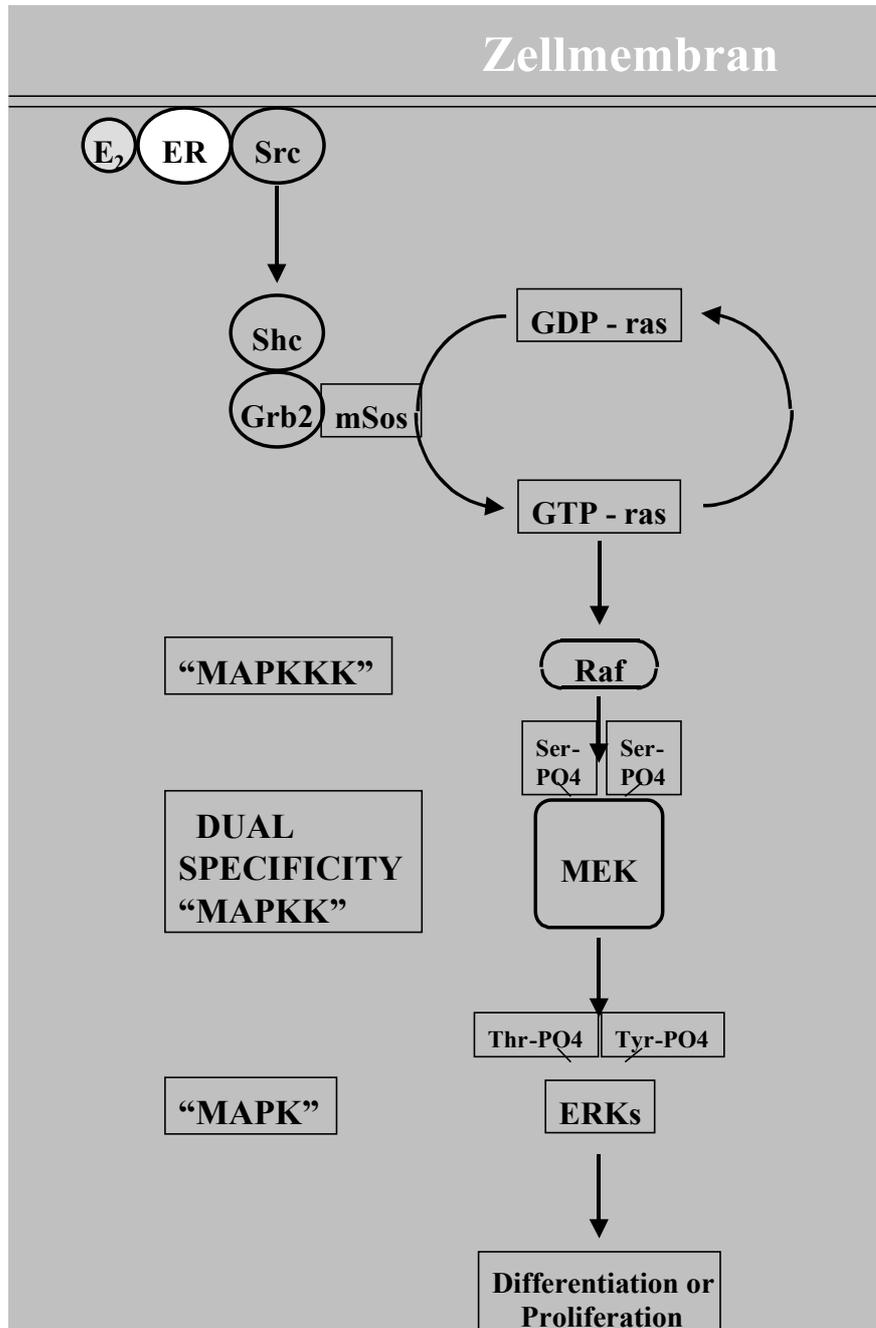
#### 4.3.3 Erfassung von möglichen Effekten auf die Apoptose

Im Vergleich zur Positivkontrolle Cisplatin (50  $\mu$ m) traten bei Behandlung mit Daizein (10  $\mu$ m), Genistein (10  $\mu$ m), Östradiol (1  $\mu$ M) und DES (40  $\mu$ m) keine signifikant erhöhten Apoptosewerte auf.

#### 4.3.4 Mögliche Aktivierung der MAP-Kinasen

Ermutigt durch die Befunde der Arbeitsgruppe Schiffmann und durch neueste Literaturbefunde zu nichtgenomischen Effekten von Steroidhormonen, die z.T. schematisch in Abb. 5 zusammengefaßt sind, entwickelte sich im Zusammen-

hang mit der Bearbeitung dieses Projektes ein neues Teilprojekt in der Arbeitsgruppe Vollmer.



**Abb.5:** Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen) durch Östradiol. Die Abbildung repräsentiert eine schematische Darstellung des vermutlichen Mechanismus der Aktivierung des o.g. Signaltransduktionsweges durch Östradiol und den Östrogenrezeptor.

Ziel dieses Teilprojektes war es, einen Assay aufzubauen, mit dessen Hilfe Einflüsse von Östradiol und von Xenoöstrogenen auf „Mitogen-aktivierte Protein Kinasen“ (**MAP-Kinasen**) untersucht werden können. Dieser Assay ist zumindest mit dem Nachweis einer Wirkung von Östradiol auf die ERK-Kina-

sen als etabliert zu betrachten. Dabei ist bemerkenswert, daß die maximale Aktivierung dieses Signalübertragungsweges durch eine Östradiolkonzentration von nur  $10^{-11}$  M nach zweiminütiger Behandlung der Zellen hervorgerufen wird.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Ziel des bearbeiteten Vorhabens war es, mögliche Wirkungen von ausgewählten Phyto- und Xenoöstrogenen in der endometrialen Adenokarzinomzelllinie RUCA-I gewebespezifisch zu erfassen und zu charakterisieren. Alle untersuchten Substanzen waren in der Lage an den Östrogenrezeptor in RUCA-I Zellen zu binden, und rezeptorvermittelt die Genexpression des Complement C3 Gens zu stimulieren. Ferner erzeugten Östradiol und die Phytoöstrogene nichtgenomisch einen Anstieg des Gehalts an intrazellulärem Kalzium.

Es gilt festzuhalten, daß die relative Bindungsaffinität nicht für jede Testsubstanz mit dem ermittelten biologischen Effekt (Stimulation der Genexpression) übereinstimmte. Beispielhaft hier sind die Phytoöstrogene Genistein und Daidzein, Genistein hat eine Bindungsaffinität von ca. 1 % verglichen mit Östradiol. Es werden hunderfach höhere Konzentrationen von Genistein benötigt, um denselben Effekt auf die Genexpression zu erzielen, wie mit Östradiol. Daidzein bindet 20fach schwächer als Genistein, stimuliert die Genexpression aber im selben Maße wie Genistein. Geht man noch einen Schritt weiter und testet beide Substanzen bezüglich ihres Effektes auf die Expression östradiolabhängiger Gene im Zusammenhang mit einem uterotrophen Assay in vivo, so stellt man fest, daß Genistein mehr als 10fach stärker wirkt als Daidzein (Vollmer, unpublizierte Daten). Unsere Hypothese ist, daß in vitro Daidzein die Genexpression von Complement C3 zum einen direkt über den Östrogenrezeptor stimuliert, zum anderen über den Anstieg des intrazellulären Kalziums, wodurch es zu einem relativ ausgeprägten biologischen Effekt kommt.

Als Vorarbeiten für zukünftige Untersuchungen wurde der Promoter des Complement C3 Gens kloniert und ein Complement C3-Luciferase Reporter gen Konstrukt hergestellt. Damit sind wir in der Lage die Untersuchungen zu Kombinationseffekten von Umweltöstrogenen mit Östradiol bzw. zu der gleichzeiti-

gen Wirkung mehrerer Umweltöstrogene experimentell einfach und spezifisch zu erfassen.

Ferner konnte gezeigt werden, daß Östradiol den Signalübertragungsweg zu den MAP-Kinasen nichtgenomisch aktivieren kann. Ziel weiterführender Untersuchungen wird es sein herauszufinden, ob diese Aktivierung auch durch Phytoöstrogene und Industriechemikalien erfolgt.

Einer der wichtigsten Befunde der durchgeführten Untersuchungen war, daß Östradiol und Phytoöstrogene eine biphasische Freisetzung von intrazellulärem Kalzium stimulieren können, was zu einer Erhöhung des Spiegels an intrazellulärem Kalzium führt. Dieser Effekt soll in Zukunft detailliert charakterisiert werden. Zunächst sollen die Speicher des intrazellulären Kalziums identifiziert werden. Danach planen wir mit spezifischen Inhibitoren in die Signaltransduktionsketten einzugreifen, die zu einer Freisetzung von intrazellulärem Kalzium führen. Besonders interessant wird dabei die Klärung der Frage sein, ob durch die Hemmung der Phospholipase C die Freisetzung von intrazellulärem Kalzium blockiert werden kann. Schließlich sollen für diesen Effekt ausführliche Dose-Response-Kurven aufgenommen werden.

## 6 Referenzen

Dopp, E., Vollmer, G., Hahnel, C., Y. Grevesmühl, Y. and Schiffmann D. (1999) Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by 17 $\beta$ -estradiol, different phytoestrogens and the antiestrogen ICI 182780. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (in press).

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

Gottardis, M.M., Ricchio, M.E., Satyaswaroop, P.G. and Jordan, V.C. (1990) Effect of steroidal and non-steroidal antiestrogens on the growth of a tamoxifen-stimulated human endometrial adenocarcinoma (EnCa101) in athymic mice. *Cancer Res.* 50: 3189-3192.

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

Hopert, A.-C., Dopp, E. Strunck, E., Schiffmann, D. and Vollmer, G. (1998b) Charakterisierung östrogenen und antiöstrogenen Wirkungen von Umweltschadstoffen in vitro. In F. Horsch, P. Friebel und A. Wiebel, eds. Diskus-

- sionskreise "Umwelt und Gesundheit" (PUG) b, Statusseminar 1998. <http://bwplus.fzk.de/pug/disk98/diskussion98.htm>.
- Hopert, A.-C., Wünsche, W., Schiffmann, D., Vollmer, G. (1997a) Charakterisierung östrogenener und antiöstrogenener Wirkungen von Umwelt(schad)stoffen in vitro. In: Horsch, F., Friebel, P., Wiebel, A. (Hrsg.), 6. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, FZKA-PUG 27.
- Jordan, V.C. (1997) Tamoxifen treatment for breast cancer: concept to gold standard. *Oncol. Huntingt.* 11 (Suppl. 1): 7-13-
- Jordan, V.C., Gottardis, M.M. and Satyaswaroop P.G. Tamoxifen-stimulated growth of human endometrial adenocarcinoma. *Ann. NY Acad. Sci.* 622: 439-446.
- Körner, W., Hanf, V., Schuller, W., Zwirner, M., Hagenmaier, H. (1997) Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien. In: Horsch, F., Friebel, P., Wiebel, A. (Hrsg.), 6. Statuskolloquium des Projektes Umwelt und Gesundheit, Karlsruhe, FZKA-PUG 27.
- Kuiper, G.G. and Gustafsson, J.A. (1997) The novel estrogen receptor-beta subtype: potential role in the cell- and promoter-specific actions of estrogens and anti-estrogens. *FEBS Lett.* 410: 87-90.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E. and Auricchio, F. (1996) Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J.* 15: 1292-1230.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R. (1996) ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett.* 392: 49-53.
- Revelli, A., Massobrio, M. and Tesarik, J. (1998) Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine Rev.* 19: 3-17.
- Soto, A.,M., Sonnenschein, C., Chung, K.,L., Olea, N., Serrano, F.O. (1995) The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health. Perspect.* 103, 113-122.
- Sundström, S.A., Komm, B.S., Ponce-de-Leon, H., Yi, Z., Teuscher, C. and Lyttle, C.R. (1989) Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J. Biol. Chem.* 264: 16941-16947.
- Vollmer, G. and 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.
- Vollmer, G., Ellerbrake, N., Hopert, A.-C., Knauthe, R., Wünsche, W. and Knuppen, R. (1995) Extracellular matrix induces hormone responsiveness and differentiation in RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52: 259-269.

## **7 Eigene Publikationen**

### **7.1 Originalarbeiten aus dem Projekt**

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

E. Strunck, A.-C. Hopert, W. Wünsche, K. Frank and G. Vollmer (1998) p-tert-octylphenol and bisphenol-A are potent stimulators of estrogenic gene expression in rat endometrial adenocarcinoma cells. (in Vorbereitung).

E. Dopp, G. Vollmer, C. Hahnel, Y. Grevesmühl and D. Schiffmann (1999) Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by 17 $\beta$ -estradiol, different phytoestrogens and the antiestrogen ICI 182780. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* (in press).

### **7.2 Kapitel in Buch**

E. Strunck, A.-C. Hopert, K. Frank, D. Schiffmann and G. Vollmer (1998) An endometrium-derived tumor model detects differential potency of phytoestrogens. In: G.E. Dunaif, S.S. Olin, J. Scimeca and J.A. Thomas (eds.) *Human diet and endocrine modulation: estrogenic and androgenic effects*, ILSI Press, Washington, DC, pp. 281-285.

### **7.3 Meeting Abstracts**

A. Hopert, E. Strunck, K. Frank, W. Wünsche and G. Vollmer (1998) Estrogenic effects of potential endocrine disruptors in endometrial adenocarcinoma cells. *Clin. Endocrinol.*, in press.

A. Hopert, E. Strunck, K. Frank, W. Wünsche and G. Vollmer (1998) Testing for environmental estrogens: the RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma model. *Archiv. Pharmacol.* 357 (Suppl.) R127.

D. Schiffmann and E. Dopp (1998) Modulation of the intracellular calcium level in mammalian cells caused by estrogens and antiestrogens. Vorgelegt auf dem Keystone Symposium "Nuclear Receptor Gene Family".

G. Vollmer, E. Strunck, A.-C. Hopert, W. Wünsche, P. Diel and H. Michna (1999) Sensitive molecular assessment of xenoestrogen action in the uterus and in endometrial cell lines. Society of Toxicology 38<sup>th</sup> Annual Meeting, eingereicht.

### **7.4 Eingeladene Vorträge**

G. Vollmer: RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells: a novel tool in endometrial carcinogenesis. 16.04.98. Institute for Pharmacology, University of Texas, Houston. Gastgeber: Prof. Dr. G.M. Stancel

G. Vollmer: RUCA-I rat endometrial adenocarcinoma cells: a novel tool in endometrial carcinogenesis. 18.04.98. Department of Veterinary Physiology

and Pharmacology, Texas A&M University, College Station. Gastgeber: Prof. Dr. S. Safe.

G. Vollmer: Wirkung von Xenoöstrogenen in der endometrialen Adenokarzinomzelllinie RUCa-I. 25.06.98. Institut für Toxikologie, Medizinische Universität zu Lübeck. Gastgeber: Prof. Dr. C.P. Siegers.