

**Aus der Arbeitsgruppe Experimentelle Endokrinologie  
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen**

---

**Östrogenes Potential des endokrinen Disruptors 4-MBC  
im Reproduktionstrakt von ovariectomierten Ratten**

**INAUGURAL-DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg-August-Universität zu Göttingen**

**vorgelegt von  
Leonie Hilgendorf  
aus  
Northeim**

**Göttingen 2010**

**Dekan:** **Prof. Dr. med. C. Frömmel**

**I. Berichterstatter:** **Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry**

**II. Berichterstatter/in:** **Prof. Dr. rer. nat. C. Gründker**

**Tag der mündlichen Prüfung:** **16.05.2011**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	1
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	3
<b>1 Einleitung</b> .....	5
1.1 Hormone als Signalüberträger.....	5
1.2 Endokrinologie des Östrogens .....	5
1.2.1 Synthese, Regulation und Metabolisierung.....	5
1.2.2 Östrogenrezeptoren .....	6
1.2.3 Östrogene Wirkungen .....	8
1.2.4 Uterus .....	9
1.2.5 Vagina .....	10
1.2.6 Leber.....	10
1.2.7 Mamma.....	11
1.2.8 Hypophyse.....	12
1.3 Endokrine Disruptoren (EDs).....	13
1.3.1 Xenoöstrogene.....	14
1.3.2 Identifizierung von EDs .....	14
1.3.3 Mögliche Gesundheitsrisiken .....	15
1.3.4 UV-Filter als EDs.....	15
1.3.5 4-MBC als endokriner Disruptor.....	17
1.4 Ziel dieser Arbeit.....	19
<b>2 Material und Methoden</b> .....	20
2.1 Aufbau und Durchführung des Tierversuchs .....	20
2.1.1 Versuchstiere .....	20
2.1.2 Ovariectomie .....	20
2.1.3 Testsubstanzen .....	20
2.1.4 Behandlungsgruppen .....	21
2.1.5 Versuchsende .....	21
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	22
2.2.1 Gewebeaufarbeitung und RNA-Isolierung.....	22
2.2.2 cDNA-Synthese.....	23
2.2.3 Taqman™-PCR .....	24
2.3 Histologische Methoden.....	27
2.3.1 Vaginalzytologie .....	27
2.3.2 Histologische Aufarbeitung.....	28
2.3.3 HE-Färbung .....	28
2.3.4 Immunhistochemie (PCNA).....	29
2.3.5 Mikroskopische Auswertung.....	32
2.4 Statistische Analyse und Darstellungsweise .....	33

<b>3 Ergebnisse</b> .....	35
3.1 Futtermittelverbrauch .....	35
3.2 Körpergewichte .....	36
3.3 Uterus .....	37
3.3.1 Uterotrophie-Test .....	37
3.3.2 ER $\alpha$ -Genexpression.....	38
3.3.3 ER $\beta$ -Genexpression.....	39
3.3.4 IGF1-Genexpression .....	40
3.3.5 C3-Genexpression .....	41
3.4 Vagina .....	41
3.4.1 Vaginalzytologie .....	41
3.4.2 Cornifin-Genexpression .....	43
3.5 Leber.....	44
3.5.1 IGF1-Genexpression .....	44
3.6 Histologie der Mamma.....	45
3.6.1 Morphologie .....	45
3.6.2 PCNA-Expression .....	47
3.7 Hypophyse.....	49
3.7.1 ER $\alpha$ -Genexpression.....	49
3.7.2 ER $\beta$ -Genexpression.....	50
3.7.3 LH $\beta$ -Genexpression .....	51
<b>4 Diskussion</b> .....	52
4.1 Effekte auf Stoffwechselfparameter .....	52
4.2 Beeinflussung der Reproduktionsorgane und übergeordneter Zentren.....	54
4.2.1 Uterus .....	54
4.2.2 Vagina .....	56
4.2.3 Mamma.....	57
4.2.4 Hypophyse.....	59
4.3 Abschließende Bemerkungen.....	62
<b>5 Zusammenfassung</b> .....	64
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	67

## Abkürzungsverzeichnis

Abb	Abbildung
AF	Aktivierungsfunktion
C3	Komplementfaktor C3
cDNA	Copy desoxyribonucleic acid
Ct	Cycle threshold
CYP	Cytochrom P
DAB	3,3-Diaminobenzidine
DNA	Desoxyribonucleic acid
DPN	Diarylpropionitrile
E2	17 $\beta$ -Östradiol
ED	Endokriner Disruptor
EGF	Epidermal growth factor
ER $\alpha$	Estrogen receptor alpha
ER $\beta$	Estrogen receptor beta
ERE	Estrogen responsive Element
EURISKED	Multi-organic risk assessment of selected endocrine disrupters
FET	Fluoreszenzenergietransfer
FSH	Follikelstimulierendes Hormon
GH	Growth hormone
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormon
HB-EGF	Heparin-binding Epidermal Growth Factor
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HE	Hämatoxylin-Eosin
IGF1	Insulin-like growth factor
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
KO	Kontrolle
LH	Luetinisierendes Hormon
LH $\beta$	$\beta$ -Untereinheit des LH
LOAEL	Lowest observed adverse effect level
LOEL	Lowest observed effect level
4-MBC	4-methyl-benzylidene camphor
MCF	Michigan Cancer Foundation

mRNA	Messenger ribonucleic acid
NOAEL	No observed adverse effect level
NOEL	No observed effect level
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
OH	Hydroxyl
PBS	Phosphate buffered saline
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
SEM	Standard error of the mean
SERM	Selektiver Östrogenrezeptormodulator
TEBs	Terminal end buds
TR	Schilddrüsenhormonrezeptor
TSH	Thyroideastimulierendes Hormon
UNG	Uracil DNA N-Glykosylase
UV	Ultraviolettstrahlung
UVA	Ultraviolettstrahlung A
UVB	Ultraviolettstrahlung B
ZNS	Zentrales Nervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Hormone als Signalüberträger

Hormone regulieren, koordinieren und modifizieren viele Funktionen und Prozesse des menschlichen Körpers. Sie werden von endokrinen Zellen produziert und sind extrazelluläre Botenstoffe, die eine Signalübermittlung von Zelle zu Zelle ermöglichen. Die Voraussetzung für eine Hormonwirkung in der Zielzelle ist, dass diese über einen entsprechenden spezifischen Rezeptor verfügt. Bei den Hormonrezeptoren wird prinzipiell unterschieden, ob sich der Rezeptor auf der Zelloberfläche (Plasmamembranrezeptoren) oder in der Zelle (Kernrezeptoren) befindet. Intrazelluläre Hormonrezeptoren stellen ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren dar, die ihre Wirkung über Änderungen der Genexpression entfalten. Der Wirkeintritt dieser genomischen Effekte dauert Stunden bis Tage, während bei Hormonen mit zellmembranständigen Rezeptoren schon nach Sekunden eine Wirkung auftreten kann.

## 1.2 Endokrinologie des Östrogens

### 1.2.1 Synthese, Regulation und Metabolisierung

Östrogene gehören zur Familie der Steroidhormone, die sich vom Cholesterin ableiten und durch Demethylierung (C<sub>19</sub>-Atom) und Aromatisierung (A-Ring) mittels des Cytochrom-P450-Aromatasekomplexes aus Androgenen gebildet werden. Von den natürlich vorkommenden Östrogenen ist Östradiol (E<sub>2</sub>) die biologisch aktivste Form. Neben dem Ovar besitzen auch andere Gewebe eine Aromataseaktivität, wodurch sie befähigt sind, aus den androgenen Vorstufen Östrogene zu bilden. Östrogene agieren dann als parakrine Faktoren, z.B. in Knochen, Brustdrüse und Fettgewebe (Simpson 2003).

Der Abbau der Östrogene erfolgt in der Leber durch Konjugation an Schwefel- und Glukuronsäure, wodurch sie biliär oder renal ausgeschieden werden können (Gruber et al. 2002).

In der geschlechtsreifen Frau variiert die Östrogenproduktion in Abhängigkeit vom Menstruationszyklus. Dabei finden sich die höchsten Serumkonzentrationen von Östrogen präovulatorisch (bis 500pg/ml), die niedrigsten prämenstruell (bis 50pg/ml). Die Steuerung der Östrogenproduktion und Sekretion erfolgt durch den Regelkreis Hypothalamus-Hypophyse-Ovar: Der im Hypothalamus lokalisierte Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Pulsgenerator erzeugt eine pulsatile Abgabe von GnRH in das Pfortadersystem der

Hypophyse (Ordög und Knobil 1995). GnRH bewirkt in der Adenohypophyse via GnRH-Rezeptoren die Produktion und ebenfalls stoßweise Sekretion der Gonadotropine LH und FSH (Knobil 1980). Diese beiden Proteohormone bewirken die ovarielle Östrogensynthese: FSH über eine Proliferation der Granulosazellen sowie die Induktion des Aromatasekomplexes in diesen Zellen, LH über eine Stimulation der Androgensynthese in den Theka-interna-Zellen. Östrogen reguliert wiederum die Gonadotropinsekretion zum einen auf hypothalamischer Ebene über Änderungen von Amplitude und Frequenz der GnRH-Sekretion und zum anderen mit direkter Wirkung auf die Hypophysenzellen, wobei sowohl negative als auch positive *Feedback*-Mechanismen bestehen. Fällt die Östrogenproduktion des Ovars im Rahmen einer Kastration weg, kommt es zu einer ungehemmten Sekretion der Gonadotropine aufgrund des überaktiven GnRH-Pulsgenerators (Wuttke et al. 1996).

### 1.2.2 Östrogenrezeptoren

Östrogene vermitteln ihre Funktion über Steroidhormonrezeptoren, die zur Großfamilie der nukleären Rezeptoren gezählt werden. Steroidhormonrezeptoren sind Proteine, die als ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren agieren und aus strukturell ähnlichen Domänen (A bis F) aufgebaut sind. Dabei werden funktionelle Domänen unterschieden. Die N-terminale Domäne (A/B) enthält die ligandenunabhängige Aktivierungsfunktion (AF1) des Rezeptors. Die DNA-Bindungsdomäne (C) beinhaltet zwei Zinkfingerstrukturen, die an sog. *responsive elements* der DNA binden können. Die Ligandenbindungsdomäne (E) liegt C-terminal und vermittelt neben der Ligandenbindung die ligandenabhängige Aktivierungsfunktion (AF2) (Nilsson et al. 2001). Die beiden Aktivierungsfunktionen AF1 und AF2 interagieren mit dem Transkriptionsapparat via Protein-Protein-Kontakte und rekrutieren synergistisch verschiedene Koaktivatoren.

Inaktiviert liegen die Rezeptoren zytoplasmatisch oder nukleär in einem Verbund mit Proteinen (Hitzeschockproteine) vor, die als sog. *chaperones* die DNA-Bindungsdomäne maskieren und den inaktiven Zustand stabilisieren (Smith und Toft 1993). Wenn ein Ligand an den Rezeptor bindet, wird eine Konformationsänderung ausgelöst, wodurch die Proteine abdissoziieren und eine Dimerisierung des Rezeptors erfolgt. Daraufhin wird der Hormon-Rezeptor-Komplex im Falle einer zytoplasmatischen Lokalisation in den Zellkern transloziert, wo er an spezifische Promotorsequenzen der DNA (*hormone-responsive elements*) bindet und mit Koaktivatoren, Korepressoren und Modulatoren der Genexpression interagiert. Dies führt zu einer Änderung der Transkription der entsprechend regulierten Gene.

Von dieser klassischen ligandenabhängigen Aktivierung der Rezeptoren ist für die Östrogenrezeptoren ein alternativer Signalweg beschrieben, bei dem diese Rezeptoren auch



ohne ihre physiologischen Liganden aktiviert werden können (Cenni und Picard 1999). Die Funktion der Rezeptoren wird dabei über Änderungen ihres Phosphorylierungsstatus moduliert (Shao und Lazar 1999). Dadurch können z.B. Wachstumsfaktoren wie EGF oder IGF1 Einfluss auf östrogenregulierte Gene nehmen. Andererseits können auch Östrogene die Transkription von Genen ohne sog. *estrogen-responsive elements* (ERE) regulieren, indem sie die Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren verändern. Ungefähr ein Drittel aller bekannten östrogenregulierten Gene verfügt nicht über *estrogen-responsive elements* (Bjornstrom und Sjoberg 2005). Es sei hier darauf hingewiesen, dass Östrogene auch sehr kurzfristige Effekte, wie z.B. die NO-vermittelte Vasodilatation der uterinen Arterien haben (Chen et al. 2004), die vermuten lassen, dass Östrogene auch eine nicht-genomische Wirkungsweise besitzen, die über Rezeptoren der Zellmembran erfolgen könnte. Die daraus resultierenden zytoplasmatischen Veränderungen können dann jedoch auch wieder zu einer veränderten Genexpression führen. Von den membranären Rezeptoren wird vermutet, dass sie Membranversionen ihrer intrazellulären Pendanten darstellen (Norfleet et al. 1999).

Von den nukleären Östrogenrezeptoren sind inzwischen zwei Subtypen, ER $\alpha$  und ER $\beta$ , bekannt, von denen auch verschiedene Isoformen (Spleißvarianten) beschrieben wurden. 1986 gelang es, den heutigen ER $\alpha$  zu klonieren (Green et al. 1986). Zehn Jahre später wurde ER $\beta$  in der Prostata und den Ovarien von Ratten entdeckt (Kuiper et al. 1996). Strukturelle Vergleiche der beiden Rezeptoren haben gezeigt, dass die DNA-Bindungsdomänen zu 96% identisch sind, was die Vermutung nahe legt, dass beide an ähnliche, wenn nicht sogar identische *estrogen-responsive elements* binden (Pace et al. 1997). Die zum Teil unterschiedliche Aminosäuresequenz für die Ligandenbindungsdomäne könnte erklären, dass die beiden Östrogenrezeptoren 17 $\beta$ -Östradiol zwar mit gleicher Affinität binden (Kuiper et al. 1997), sich aber in ihrer Bindungsaffinität zu anderen Liganden unterscheiden (Katzenellenbogen BS und Katzenellenbogen JA 2000). Während sich die AF2 sehr ähnelt (Dechering et al. 2000), finden sich größere Unterschiede in der die AF1 beinhaltenden N-terminalen A/B Domäne, worauf Unterschiede im Ansprechen auf verschiedene Liganden, im Aktivierungspotential und der Transkriptionsaktivität der beiden Östrogenrezeptoren zurückzuführen sein könnten (McInerney et al. 1998).

Die relative Expression der beiden Östrogenrezeptoren variiert zwischen den verschiedenen Organen. Die höchsten ER $\alpha$ -Expressionen finden sich vorwiegend in Organen des Reproduktionsgeschehens und deren übergeordneten Zentren (Hypothalamus, Hypophyse, Ovarien, Uterus, Vagina und Mamma), in der Leber und im ZNS. ER $\beta$  ist in ZNS, Ovar, Uterus, Mamma, Knochen, Thymus und im kardiovaskulären System mit ER $\alpha$  koexprimiert

(Nilsson et al. 2001). Hohe ER $\beta$ -Level sind neben dem Ovar auch in Prostata und Lunge beschrieben, andere Organe mit ER $\beta$ -Expression sind der Nebenhoden, die Niere, die Darmmukosa, die Speicheldrüsen und der Urogenitaltrakt (Diez-Perez 2006, Couse et al. 1997, Dechering et al. 2000). Über die Funktion dieses Verteilungsmusters, das auch in Abhängigkeit vom Individuum, Alter und dem Zyklusstand variiert, gibt es keine gesicherten Erkenntnisse. Eine Möglichkeit für das Zusammenspiel der beiden Rezeptoren bietet die Ying-Yang-Theorie (Lindberg et al. 2003), wonach bei einer Koexpressierung ER $\beta$  die ER $\alpha$ -vermittelte Transkription abstimmt oder in Geweben ohne ER $\alpha$ -Expression die östrogenregulierte Transkription ersetzt. Auch könnte das Verhältnis der beiden Rezeptoren in den verschiedenen Organen einen Einfluss auf die Übersetzung des Signals in Differenzierung oder Proliferation ausüben. An Zelllinien zeigte sich, dass ein via ER $\alpha$  vermittelter östrogen Proliferationsreiz durch ER $\beta$  verhindert wird (Strom et al. 2004). Unterschiede in gewebeabhängigen Antworten ergeben sich daneben auch durch die Ausstattung der Zielzelle mit verschiedenen Kofaktoren der Transkription und den Promotorregionen der DNA.

Zusätzliche Regulationsmechanismen im System der östrogenregulierten Gene sind zum einen die mögliche Heterodimerbildung zwischen den ERs bzw. zwischen den ERs und ihren Isoformen einerseits und die gewebespezifische Autoregulation der ER-Expression durch den Östrogen-ER-Komplex andererseits (Castles et al. 1997, Li et al. 2004, Tena-Sempere et al. 2004).

Zusammenfassend hängt die östrogene Wirkung in einer Zelle von dem Liganden, dem Rezeptortyp und den ausführenden Komponenten der Transkription ab (Katzenellenbogen JA et al. 1996). Welchen Effekt ein Ligand an den Östrogenrezeptoren hat (Agonist, Antagonist, Partialagonist), ist von der induzierten Konformationsänderung und der Fähigkeit abhängig, die AF teilweise bzw. komplett zu aktivieren oder zu blockieren, wodurch Unterschiede in der Rekrutierung von Kofaktoren entstehen. Gewebespezifische und genspezifische Profile von Liganden können durch die Zellausstattung mit den verschiedenen Rezeptorsubtypen und deren Isoformen sowie koregulatorischen Proteinen und Promotorregionen erklärt werden. Dies ist die Grundlage zum Verständnis von selektiven Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs), wie z.B. Tamoxifen, das in der Mamma antiöstrogene, in Knochen und Uterus jedoch eine östrogenagonistische Wirkung entfaltet (Hall JM et al. 2001).

### **1.2.3 Östrogene Wirkungen**

Östrogene regulieren Wachstum, Differenzierung und Funktionen von diversen Zielgeweben, sowohl innerhalb als auch außerhalb des Reproduktionstrakts. Eine wichtige Rolle kommt den

Östrogenen bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der primären und sekundären weiblichen Geschlechtsorgane zu. Innerhalb des Menstruationszyklus induzieren sie mittels Wachstumsfaktoren die Proliferationsphase des Endometriums und bereiten den Uterus auf die anschließende Gestagenwirkung und somit auf eine Schwangerschaft vor. Extragenitale Zielorgane und Systeme einer Östrogenwirkung sind ZNS, Knochen, Leber, Darm und Haut sowie das Immunsystem und das kardiovaskuläre System. Im ZNS beeinflusst Östrogen Lernen, Gedächtnis, Bewusstsein, Feinmotorik, Temperaturregulation, Stimmungslage und Libido (Nilsson und Gustafsson 2002).

Im Anschluss sind die für diese Arbeit relevanten östrogenen Effekte der untersuchten Organe und Gene ausführlicher dargestellt.

#### **1.2.4 Uterus**

Der Uterus entspricht dem klassischen östrogenen Zielorgan und wird als solches im sog. Uterotrophie-Test benutzt, um die östrogenen Eigenschaften einer Substanz anhand des induzierten uterinen Wachstums zu demonstrieren. Östrogen wirkt im Uterus als starkes Mitogen, sowohl am Endo- als auch am Myometrium. Östrogenrezeptoren finden sich in den Epithelzellen und in den Bindegewebszellen, wobei letzteren eine zentrale Bedeutung in der Umsetzung in ein Proliferationssignal zukommt (Cooke et al. 1998): Östrogene bedienen sich verschiedener Wachstumsfaktoren, indem sie deren Gen- und Proteinexpression induzieren. Diese Wachstumsfaktoren wie z.B. IGF1 (Murphy et al. 1987) oder HB-EGF (Zhang et al. 1998) vermitteln in parakriner Weise das Wachstum. Die mitotische Aktivität erreicht 18-24h nach Östrogenapplikation in ovariectomierten Ratten ein Maximum und schlägt sich in histomorphologischen Veränderungen und einem Anstieg des Uterusgewichts nieder.

Neben diesen Effekten wird durch Östrogenexposition eine Reihe weiterer molekularbiologischer Veränderungen hervorgerufen. Für den physiologischen Ablauf des Menstruationszyklus ist die Induktion von Progesteronrezeptoren im Endometrium essentiell. Des Weiteren wird die Immunabwehr aktiviert, um einer periovulatorischen Infektgefährdung (Öffnung des Zervikalkanals) des Endometriums entgegen zu wirken. Einen besonderen Stellenwert hat in diesem Zusammenhang die Hochregulierung der Genexpression des Komplementfaktors C3 in den luminalen Epithelzellen (Sundstrom et al. 1989).

Das Verhältnis der beiden ERs ist im Uterus abhängig von der Geschlechtsreife. Während im geschlechtsunreifen Uterus ER $\alpha$  und ER $\beta$  in vergleichbaren Mengen exprimiert werden, wird durch Zunahme der Östrogenexposition ER $\beta$  herunterreguliert, so dass im geschlechtsreifen Uterus hauptsächlich ER $\alpha$  vorzufinden ist (Weihua et al. 2000). An ER $\alpha$ -*knock-out*-Mäusen konnten im Gegensatz zu ER $\beta$ -*knock-out*-Mäusen bei einer Behandlung mit Östradiol keine

östrogenen Effekte nachgewiesen werden (Couse und Korach 1999, Harris 2007). Zudem ruft die Applikation des selektiven ER $\alpha$ -Agonisten Propylpyrazoltriol bei ovariectomierten Ratten die bekannten östrogeninduzierten Gewebeantworten hervor (Harris et al. 2002). Der ER $\alpha$  hat daher in Bezug auf den Uterus vermutlich die dominante Rolle in der Vermittlung des östrogenen Signals. ER $\beta$  wird im Uterus eine der ER $\alpha$ -induzierten Proliferationsanregung entgegengesetzte Funktion sowie eine Rolle bei den elastischen Rückstellkräften des uterinen Halteapparats zugeschrieben (Koehler et al. 2005). Da bei ER $\beta$ -*knock-out*-Mäusen eine extrem gesteigerte Östrogenempfindlichkeit vorliegt, könnte ER $\beta$  eine Art Ruhefunktion für den Uterus vor Beginn der ovariellen Östrogensekretion haben (Morani et al. 2008).

### **1.2.5 Vagina**

In der Vagina steht vor allem das auskleidende Plattenepithel unter einem östrogenen Einfluss. Östrogen reguliert hier die Proliferation, die Gliederung der einzelnen Schichten und die Kornifizierung, was man sich in der Diagnostik zur Erfassung des aktuellen Hormonstatus im Zyklus mit Vaginaausstrichen zu nutze macht. Aus Studien an ovariectomierten Tieren ist bekannt, dass das mehrschichtige, unverhornte Plattenepithel unter der Behandlung mit Östradiol sich in ein verhorntes Epithel verwandelt. Molekularbiologisches Korrelat dieser Veränderung ist die erhöhte Expression von Cornifin (Jetten et al. 1996). Ähnlich wie in der Gebärmutter wird das östrogene Signal auch in der Vagina durch ER $\alpha$  in Stroma- und Epithelzellen vermittelt (Buchanan et al. 1998).

### **1.2.6 Leber**

Die Leber beteiligt sich als zentrales Stoffwechselorgan an der Exkretion der endogenen Östrogene. Weiterhin kann auch die Leber als endokrines Organ aufgefasst werden, das auf das in der Adenohypophyse synthetisierte Wachstumshormon (GH) mit einer Produktion des IGF1 reagiert. Lange hatte man angenommen, dass dieses von der Leber ins Blutsystem abgegebene IGF1 exklusiv das postnatale Wachstum vermittelt. Neuere Erkenntnisse haben jedoch gezeigt, dass IGF1 in nahezu allen Geweben exprimiert wird und dass ein normales Wachstum auch ohne die hepatische IGF1-Produktion möglich ist, weshalb diese Hypothese korrigiert wurde (Le Roith et al. 2001). Eine Konzepterweiterung erfolgte durch die GH-stimulierte lokale, parakrin wirkende IGF1-Produktion und eine direkte Wirkung von GH ohne den Mediator IGF1. Für Östrogene konnte gezeigt werden, dass sie die Hypophysen-Leber-Achse beeinflussen, indem sie die hepatische IGF1-Genexpression und somit die IGF1-Serumkonzentrationen herunterregulieren (Murphy und Friesen 1988, Bottner und Wuttke 2006). Gleichzeitig steigen die GH-Konzentrationen an. Diese östrogene Wirkung ist

abhängig von der Dauer der Exposition und der Applikationsweise (Ho et al. 2003). Hepatozyten exprimieren selektiv ER $\alpha$  (Alvaro et al. 2002), so dass die Verringerung der IGF1-Produktion wahrscheinlich über diesen Rezeptor vermittelt ist.

### 1.2.7 Mamma

Die weibliche Brustdrüse besteht aus Fettgewebe, Bindegewebe und dem Funktionsgewebe, dem Drüsenkörper mit dem dazugehörigen Milchgangsystem. Die alveolären Endstücke und die Anfangsteile des Gangsystems sind das sekretorische Organ der Mamma. Das Mammaepithel untersteht einer multihormonalen Kontrolle durch Östrogen, Progesteron und Prolaktin. Östrogen spielt in den zwei Hauptphasen der Brustdrüsenentwicklung während Pubertät und Schwangerschaft eine entscheidende Rolle (Cheng et al. 2004).

Die von der Brustwarze ausgehenden, sich verzweigenden Milchgänge enden in Morphologie und Differenzierungsgrad sich unterscheidenden Strukturen. Die differenzierteste Form stellen die alveolären Endstücke dar, die undifferenziertesten sind die sog. *terminal end buds* (TEBs) (Masso-Welch et al. 2000). TEBs bestehen aus unreifen, haufenförmigen Epithelzelllagen, die sich unter den hormonalen Einflüssen des Zyklus sowohl zu alveolären als auch duktalem Vorläuferstrukturen entwickeln können (Russo IH und Russo J 1978). Die TEBs sind die epithelialen Ressourcen der Brustdrüse und ermöglichen die Plastizität dieses Organs, z.B. in der Schwangerschaft. Da die TEBs eine hohe Proliferationsrate besitzen und die enthaltenen *cap cells* als pluripotente Stammzellen interpretiert werden (Hilakivi-Clarke et al. 2001), wird vermutet, dass die TEBs besonders anfällig für Karzinogene sind (Russo J und Russo IH 1980).

Untersuchungen an verschiedenen *Knock-out*-Tieren haben zu der Annahme geführt, dass das duktales Wachstum vor allem ein östrogenener Effekt ist, während die lobuloalveoläre Differenzierung hauptsächlich unter Progesteroneinfluss stattfindet (Cheng et al. 2004). Dennoch trägt auch Östrogen zur lobuloalveolären Entwicklung bei, indem es im Mammaepithel die Expression der Progesteronrezeptoren induziert (Bocchinfuso et al. 2000). Während des Zyklus unterliegt die Brustdrüse einer zyklischen Proliferation, Differenzierung und Involution. Entsprechend der vorwiegenden hormonalen Beeinflussung findet sich in der Follikularphase eine vorwiegend duktales Histoarchitektur, während sich die Lutealphase durch eine überwiegend lobuloalveoläre Morphologie auszeichnet (Schedin et al. 2000). Diese Veränderungen werden im Gegensatz zum Uterus nicht vom ganzen Epithel, sondern nur von einigen Epithelzellen durchlaufen, weshalb hier eine asynchrone Antwort der Epithelzellen auf die ovariellen Hormone postuliert wird. Die höchsten Proliferationsraten werden zumeist in der Lutealphase beobachtet und von den Autoren als synergistische

Östrogen-Progesteron-Wirkung gedeutet (Navarrete et al. 2005, von Schoultz et al. 1996, Nazario et al. 1995).

Man vermutet, dass die proliferativen Effekte von Östrogen auf die Brustdrüse durch ER $\alpha$  via Wachstumsfaktoren (EGF) vermittelt werden, weil sie bei ER $\alpha$ -*knock-out*-Mäusen nicht zu beobachten sind, wohl aber bei ER $\beta$ -*knock-out*-Mäusen (Hewitt et al. 2000, Couse und Korach 1999). Trotzdem ist ER $\beta$  der häufiger exprimierte Subtyp in den Epithelzellen und Bindegewebszellen (Saji et al. 2001, Cheng et al. 2004). Die ER $\alpha$ -Expression der Epithelzellen ist in größerem Maße abhängig von der Lebensphase und vom Menstruationszyklus (Saji et al. 2000, Soderqvist et al. 1993). Kontrovers wird zurzeit diskutiert, ob das duktales Wachstum ähnlich den Mechanismen in Uterus und Vagina nur über den bindegewebigen ER $\alpha$  oder über epithelialen und bindegewebigen ER $\alpha$  vermittelt wird. Experimente mit Transplantationen von teilweise genetisch veränderten Mammagewebe zeigen widersprüchliche Ergebnisse (Cunha et al. 1997, Mueller et al. 2002). Immunhistochemische Untersuchungen ergaben, dass in proliferierenden Epithelzellen kein ER $\alpha$  nachweisbar ist. Eine mögliche Erklärung ist die frühe Abdissoziation des ER $\alpha$  aus dem Zellkern nach Vermittlung des Proliferationssignals (Cheng et al. 2004, Koehler et al. 2005). Von ER $\beta$  wird vermutet, dass er prodifferenzierende und antiproliferative Effekte in der Mamma besitzt (Köhler et al. 2005). Es gibt jedoch keine gesicherten Erkenntnisse über die physiologischen Funktionen des hier höher exprimierten ER $\beta$ . Auch die Rolle der zahlreichen ER $\beta$ -Spleißvarianten bleibt bislang unklar.

### **1.2.8 Hypophyse**

Das in der Hypophyse produzierte LH ist ein Heterodimer, wobei die  $\alpha$ -Untereinheit identisch mit Untereinheiten des TSH, FSH und HCG ist und die  $\beta$ -Untereinheit sich durch ihre Hormonspezifität auszeichnet. Die Produktion und Sekretion der Gonadotropine LH und FSH unterliegen einem negativen Rückkopplungsmechanismus durch Östrogen. Die direkte Wirkung von E2 auf die LH-Spiegel ist in der Hypophyse durch ER $\alpha$  vermittelt (Hewitt und Korach 2003, Sanchez-Criado et al. 2004). Für die indirekte östrogene Regulation der Gonadotropinproduktion und Sekretion über die hypothalamischen GnRH-Neurone sind zwei Mechanismen beschrieben. Zum einen nehmen mehrere östrogensensitive, afferente Systeme Einfluss auf die GnRH-produzierenden Zellen. Zum anderen konnte für die GnRH-Neurone selbst gezeigt werden, dass sie beide Östrogenrezeptoren, vorwiegend ER $\beta$ , exprimieren (Petersen et al. 2003). Eine ER $\beta$ -Aktivierung könnte dabei das Ansprechverhalten der GnRH-Neurone auf andere Stimuli verändern. Der Umstand, dass die Serumkonzentrationen von LH in ER $\beta$ -*knock-out*-Mäusen nahezu normal erscheint, während hohe Konzentrationen in ER $\alpha$ -

*knock-out*-Mäusen gefunden werden, scheint nahezu liegen, dass ER $\beta$  für die östrogenen Rückkopplungsmechanismen von untergeordneter Bedeutung ist. Unterstützung findet diese Hypothese weiterhin dadurch, dass in den für die Reproduktionsregulation wichtigen Strukturen im Gehirn die ER $\alpha$ -Expression überwiegt (Scott et al. 2000).

### **1.3 Endokrine Disruptoren (EDs)**

Endokrine Disruptoren sind körperfremde Substanzen, die die normale hormonale Regulation beeinflussen und verändern und sich somit nachteilig auf die Gesundheit von exponierten Populationen und Individuen oder ihren Nachkommen auswirken können. Diese Substanzen können, wie z.B. Phytoöstrogene, natürlich vorkommen oder aber als industriell hergestellte Chemikalien vom Menschen produziert sein. Mögliche Angriffspunkte der EDs sind Produktion, Sekretion, Transport, biologische Verfügbarkeit, Metabolisierung und Exkretion eines Hormons sowie eine Veränderung der regulatorischen Rückkopplungsmechanismen. Weiterhin können sie durch Interaktion mit dem Hormonrezeptor diesen vollständig oder teilweise aktivieren oder blockieren, in die Synthese oder den Abbau des Rezeptors eingreifen oder eine Veränderung des intrazellulären Signals hervorrufen, indem sie die an der Signaltransduktion beteiligten Komponenten, wie z.B. Transkriptionsfaktoren, verändern (Witorsch 2002).

Die Mehrzahl der bisher untersuchten EDs wirkt über Interaktionen mit Rezeptoren und agiert als mehr oder weniger starkes Östrogen bzw. Antiöstrogen oder Antiandrogen, wodurch die hormonale Kontrolle des Reproduktionstrakts gestört werden kann. Dabei können Substanzen ihre Effekte auch über mehrere Rezeptoren medieren und an den Rezeptoren unterschiedliche Auswirkungen haben (Vinggaard et al. 2006).

Durch Induktion bzw. Inhibition der CYP-450-Enzyme können EDs die Hormonsynthese (Steroidbiosynthese) beeinflussen (Li et al. 2004). Des Weiteren kann die biologische Verfügbarkeit von Östrogenen in Zielgeweben geändert werden, indem die Substanzen das Sulfotransferase-Sulfatase-System beeinflussen (Kirk et al. 2001), welches durch Sulfatierung der endogenen Östrogene deren biologische Aktivität heruntersetzt bzw. durch Entfernung der Sulfatreste ein Eindringen der Östrogene in die Zelle ermöglicht. Beschrieben wurde auch die Induktion des Rezeptorabbaus des ER $\alpha$  durch den Arylhydrocarbon-Rezeptor (Wormke et al. 2003), was als Beispiel für eine indirekte antiöstrogene Wirkung zu deuten ist.

Neben dem Reproduktionstrakt könnten auch das Schilddrüsenhormonsystem, die GH-IGF1-Achse und das Kortikosteroidsystem mögliche Ziele von EDs darstellen (Jahnke et al. 2004, Tabuchi et al. 2006, Filby and Tyler 2007).

### **1.3.1 Xenoöstrogene**

Eine große Anzahl nichtsteroidaler Chemikalien binden an die ERs und werden als Xenoöstrogene bezeichnet. Durch die Bindung an die Rezeptoren können die Substanzen analog zur Signalvermittlung der physiologischen Liganden eine veränderte Genexpression der entsprechenden Gene hervorrufen oder die Funktion des Hormons durch Rezeptorblockade antagonisieren. Die meisten Xenoöstrogene besitzen eine schwache östrogene Aktivität, ca. 1/1000 bis 1/1000000 der Aktivität des Östradiols. Im pharmakologischen Sinne sind sie daher als Partialagonisten bzw. Partialantagonisten zu bezeichnen (Mueller 2004).

Durch die Vielzahl der ER-exprimierenden Gewebe können diese Substanzen u.a. auf den Stoffwechsel und die Funktion der Reproduktionsorgane (Ovar, Uterus, Hoden, Prostata, Mamma), der Harnblase, der Leber, der Niere, der Lunge, des Gehirns, des Immunsystems, des kardiovaskulären Systems, des Fettgewebes und des Knochens Einfluss nehmen.

Da sich z.B. ER und Schilddrüsenhormonrezeptor (TR) in ihren Funktionen beeinflussen, ist auch eine Beeinträchtigung anderer Hormonsysteme denkbar (Vasudevan et al. 2002, Zhao et al. 2005).

### **1.3.2 Identifizierung von EDs**

Ob eine Substanz ein endokrin aktives Potential besitzt und ob gesundheitliche Risiken durch eine Exposition mit EDs für den Menschen entstehen könnten, wird versucht durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Versuche abzuschätzen. Zunächst kann man mit Hilfe von Computerprogrammen einen strukturellen Vergleich von einer Chemikalie mit denen von Hormonrezeptorliganden durchführen, um eine Substanz als möglichen Liganden zu identifizieren (Hong et al. 2002). Durch *in-vitro*-Testsysteme wie Proliferations- und Transaktivierungs-Assays sowie Liganden-Bindungs-Assays kann eine Substanz anhand bestimmter Endpunkte (Induktion von ligandenabhängigem Wachstum, Transaktivierungspotential eines Reportergens mit *hormone-responsive element* des Promotors, Konkurrenz einer Substanz mit physiologischem Liganden um Rezeptorbindung) auf ihre endokrine Aktivität geprüft werden (Soto et al. 1995, Bolger et al. 1998). Die Unzulänglichkeit dieser Tests ist generell die mangelnde Aussagekraft bezüglich einer potentiellen Metabolisierung einer Substanz. So könnte die Giftung einer Substanz übersehen werden.



Zur Untersuchung einer potentiellen xenoöstrogenen Substanz wird nach den OECD-Richtlinien (Kanno et al. 2003) in geschlechtsunreifen oder adulten, ovariectomierten Ratten die Wirkung auf das uterine Wachstum bestimmt (Uterotrophie-Test), wobei sich ein xenoöstrogenes Potential durch die Zunahme des Uterusgewichts zeigen würde. Da sich aber ERs in vielen Geweben des Körpers finden, werden gewebeabhängige Eigenschaften der Testsubstanz im Sinne eines möglichen SERM nicht erfasst. Da das uterine Wachstum eine ER $\alpha$ -vermittelte Funktion darstellt, können auch mögliche Effekte durch ER $\beta$  übersehen werden.

### **1.3.3 Mögliche Gesundheitsrisiken**

Eine mögliche Beteiligung der EDs an Entstehung oder Progression bestimmter Erkrankungen bezieht sich vorwiegend auf den Reproduktionstrakt. Wichtig erscheinen in diesem Zusammenhang Zeitfenster, Dauer und Dosis einer Exposition. Besonders empfindliche Perioden für hormonelle Dysregulationen sind v.a. die Prä- und Perinatalphase, in denen eine Exposition permanente Effekte produzieren könnte, aber auch die Pubertät und die reproduktive Phase. Effekte durch EDs könnten sich jedoch auch durch DNA-Modifizierungen an aufeinander folgenden Generationen manifestieren (Anway und Skinner 2006).

Bei folgenden Erkrankungen wird ein Zusammenhang mit EDs diskutiert (Waring und Harris 2005, Crews und McLachlan 2006, Safe und Papineni 2006):

- Fehlbildungen der Geschlechtsorgane
- Infertilität
- Hoden- und Prostatakarzinom
- Vaginalkarzinom
- Mammakarzinom.

### **1.3.4 UV-Filter als EDs**

UV-Licht absorbierende Chemikalien werden weit verbreitet in Sonnenschutzmitteln und anderen Kosmetikprodukten wie Lippenstiften, Körperlotionen, Haarsprays, Haarfärbemitteln und Shampoos als Schutz gegen UV-Strahlung benutzt. In Abhängigkeit von Umfang und Faktor des Lichtschutzes werden sie Sonnenschutzprodukten als Einzelkomponente oder aber in Kombination hinzugefügt. Zudem werden sie in zunehmendem Ausmaß auch anderen Materialien zugesetzt, um einem Produktverfall durch UV-Strahlung vorzubeugen. Durch die allgemeine Sorge über UV-Strahlen-induzierte Schäden der menschlichen Haut ist der Gebrauch von UV-Filtern stark angestiegen.

UVB-Strahlen (290-320nm) verursachen Sonnenbrand, durch induzierte DNA-Schäden präkanzeröse Entartungen (aktinischen Keratosen) und letztendlich auch bestimmte Karzinome der Haut. UVA-Strahlen (320-400nm) können photoallergische und phototoxische Reaktionen auslösen, weiterhin sollen sie zur Hautalterung beitragen (Schreurs et al. 2002). UV-Filter schützen vor akuten Lichtschäden wie Sonnenbrand, aber reduzieren auch das Risiko von chronischen Hautschäden wie präkanzerösen Läsionen und dem spinozellulärem Karzinom (Gallagher 2005).

Unterschieden werden anorganische UV-Filter wie Titaniumoxid und Zinkoxid von organischen Substanzen. Letztere können selbst Allergien auslösen, dennoch ist ihre Akzeptanz für kosmetische Produkte größer (Maier und Korting 2005). Die organischen UV-Filter sind im chemischen Sinne eine sehr heterogene Gruppe. Gemeinsam ist ihnen, dass sie aufgrund ihrer kondensierten und häufig aromatischen Bindungssysteme UV-Strahlen absorbieren und die Energie in Form von Wärme wieder abgeben können.

Im Gegensatz zu den anorganischen Verbindungen können sie jedoch wegen ihrer lipophilen Eigenschaften die Haut penetrieren. Außerdem tendieren sie zur Bioakkumulation in der aquatischen Umwelt und lassen sich im Wasser von Seen, unbearbeiteten Abwässern und in Geweben von Fischen nachweisen. Der Mensch kann daher diesen Substanzen zum einen durch eine dermale Absorption und zum anderen durch die Nahrungskette ausgesetzt sein. Für einige dieser Substanzen konnte gezeigt werden, dass sie in nachweisbaren Mengen im menschlichen Urin oder sogar in menschlicher Muttermilch zu finden sind (Kunz und Fent 2006).

Für mehrere dieser UV-Filter konnte mit *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen ein endokrines Potential nachgewiesen werden, so dass UV-Filter eine neue Klasse endokriner Disruptoren darstellen. Die Mehrzahl zeichnet sich durch xenoöstrogene oder antiandrogene Eigenschaften aus (Schlumpf et al. 2001, Ma et al. 2003). In Transaktivierungs-Assays konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die östrogenen Eigenschaften der Einzelsubstanzen in Kombination synergistisch agieren können, um die ERs zu aktivieren (Heneweer et al. 2005).

### 1.3.5 4-MBC als endokriner Disruptor

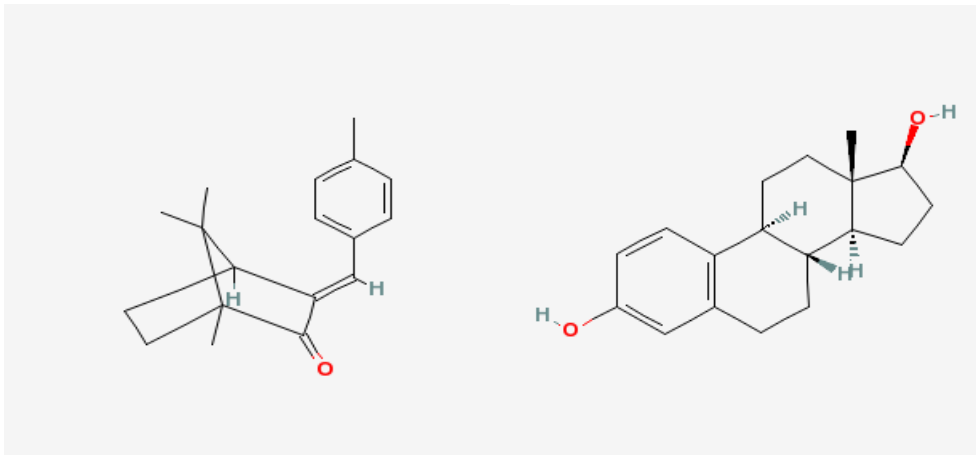


Abb.1 Strukturformel 4-MBC links und E2 rechts ([www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov))

4-MBC (Eusolex 6300) ist ein Kampferderivat mit der Summenformel  $C_{18}H_{22}O$  und einem Molekulargewicht von 254,37 g/mol. Es ist wasserunlöslich und liegt bei Raumtemperatur als weißes kristallines Pulver vor.

4-MBC ist ein häufig benutzter UV-Filter, der in der EU in Konzentrationen bis zu 4% kosmetischen Produkten zugesetzt werden darf (Positivliste, Council Directive 76/768/EEC). *In-vitro*- und *in-vivo*-Studien zeigten, dass dieses Kampfer-Analogon östrogene Eigenschaften besitzt.

Damit eine Substanz mit dem Östrogenrezeptor interagieren kann, müssen gewisse Voraussetzungen erfüllt sein. Zunächst kann die Bindungstasche der ERs nur Liganden aufnehmen, die eine des E2 vergleichbare Größe (Summenformel  $C_{18}H_{24}O_2$ , MW 272,38 g/mol) aufweisen (Anstead et al. 1997). Zudem ist E2 abgesehen von terminalen Molekülstrukturen eine hydrophobe und unpolare Substanz. Analysen von Kristallstrukturen des E2-ER-Komplexes und strukturelle Vergleiche verschiedener Liganden haben ergeben, dass für eine Interaktion mit dem Rezeptor vor allem drei Strukturmerkmale eine besondere Bedeutung besitzen: der aromatische A-Ring, die phenolische Hydroxyl(OH)-Gruppe am C<sub>3</sub>-Atom sowie die OH-Gruppe am C<sub>17</sub>-Atom, wobei die beiden OH-Gruppen über die Bildung von Wasserstoffbrückenbindungen die Konformationsänderung des ER auslösen (Brzowski et al. 1997). 4-MBC erfüllt die Attribute eines relativ unpolaren Moleküls, einer etwa dem E2 entsprechenden Größe sowie eines aromatischen Ringsystems, so dass eine Interaktion mit dem ER möglich erscheint.

In Bezug auf die beiden ERs zeigt 4-MBC in Liganden-Bindungs-Assays eine Präferenz für ERβ. Da es nicht in der Lage ist, E2 aus der ERα-Bindung zu verdrängen, wurde ein selektiver ERβ-Agonismus vermutet (Schlumpf et al. 2004a). Trotzdem kann 4-MBC in

humanen Endometriumzellen eine ER $\alpha$ -vermittelte Transaktivierung auslösen (Mueller et al. 2003), wobei im Vergleich eine ER $\beta$ -Transaktivierung bei geringeren Konzentrationen möglich war. Auch in anderen selektiv ER $\alpha$ - oder ER $\beta$ -exprimierenden Zelllinien erfolgte durch 4-MBC bei beiden eine Aktivierung der Transkription (Schreurs et al. 2002). Kontroverse Ergebnisse liefern Untersuchungen an anderen Steroidhormonrezeptoren. Während einige Untersuchungen für 4-MBC keine antiandrogenen Eigenschaften finden konnten (Ma et al. 2003), können andere einen Androgen- sowie einen Progesteronantagonismus beobachten (Schreurs et al. 2005).

MCF-7 Zellen (humane Brustkrebszelllinie) wurden von 4-MBC zur Proliferation angeregt. Im Vergleich zur Negativkontrolle steigerten sie die Proliferation um den Faktor 13, bezogen auf die Potenz des Östradiols erreichten sie ca. 80% des maximalen Proliferationseffekts. Die proliferativen Effekte des 4-MBC konnte durch einen reinen Östrogenrezeptorantagonisten aufgehoben werden, so dass hier von einer rezeptorvermittelten Antwort ausgegangen werden kann. In mehreren Transaktivierungs-Assays zeigte 4-MBC eine Induktion von E2-regulierten Reporter genen (Schlumpf et al. 2001, Mueller et al. 2003, Schreurs et al. 2002).

In mehreren *in-vivo*-Versuchen an verschiedenen Rattenstämmen fiel der von der OECD geforderte Uterotrophie-Test positiv aus, wobei auch unterschiedliche Darreichungsformen wie die orale, subkutane oder dermale Applikation das Uterusgewicht ansteigen ließen (Schlumpf et al. 2001, Tinwell et al. 2002). Auch in Fischen konnte eine östrogene Aktivität nachgewiesen werden (Inui et al. 2003).

Etwaige Beeinflussungen der Entwicklung von F1-Generationen wurde mit einem Modell simuliert, in dem die Eltern generation mindestens 10 Wochen vor der Paarung bis einschließlich der Stillzeit und die Nachkommenschaft weiterhin einer Behandlung mit 4-MBC unterzogen wurden (Schlumpf et al. 2004b). 4-MBC verursachte eine geringere Wurfgröße, eine verringerte postnatale Überlebensrate sowie die Verzögerung der männlichen Pubertät. Des Weiteren wurden in der F1-Generation eine Zunahme des Schilddrüsengewichts und eine Abnahme des Thymusgewichts beobachtet. Außerdem konnte in diesen Tieren ein verändertes Ansprechverhalten auf Östrogen einiger östrogenregulierter Gene nachgewiesen werden (Durrer et al. 2005).

## 1.4 Ziel dieser Arbeit

Im Rahmen des von der Europäischen Union geförderten EURISKED-Projekts erfolgten eine systematische Analyse und eine multiorganbezogene Risikostratifizierung endokriner Disruptoren. Ein standardisiertes Protokoll der OECD zum Test auf endokrine Aktivität schloss bisher neben dem Uterotrophie-Test noch den Hershberger-Test sowie Richtlinien für Transaktivierungs-Assays ein. Diese besitzen jedoch eher einen *screening*-artigen Charakter. Bislang war noch unklar, ob es durch die mehrheitlich xenoöstrogenen Substanzen auch zu Auswirkungen östrogenrezeptiver Organe außerhalb des Uterus kommen kann und ob Interaktionen mit anderen Steroidhormonrezeptoren existieren.

In dieser Arbeit soll das östrogene Potential von 4-MBC weiter charakterisiert werden. Anhand eines subakuten *in-vivo*-Versuchs sollen an ovariectomierten Ratten die xenoöstrogenen Eigenschaften des 4-MBC an mehreren Organen untersucht werden. Die ovariectomierte Ratte ist ein ideales Modell zur Untersuchung einer östrogenen Aktivität, da der Einfluss der endogenen Östrogene fast gänzlich entfällt. Im Vergleich zu einer mit E2 behandelten Gruppe soll überprüft werden, ob sich gewebespezifische und genspezifische Unterschiede zwischen E2 und 4-MBC finden lassen. Dazu werden in Hypophyse, Uterus, Vagina, Mamma und Leber mit Hilfe molekularbiologischer und histologischer Methoden die Auswirkungen von 4-MBC untersucht.

Ein zentraler Aspekt in der Risikobewertung einer Substanz ist das Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung, um Mengen oder Konzentrationen einer Substanz zu ermitteln, bei denen noch kein Effekt (NOEL) oder bei der gerade erst ein Effekt eintritt (LOEL). Diese in der Ratte ermittelten Grenzen sollen eine Hilfe in der Risikobewertung für den Menschen sein.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Aufbau und Durchführung des Tierversuchs**

#### **2.1.1 Versuchstiere**

Als Versuchstiere wurden zwei Monate alte, weibliche Sprague Dawley Ratten verwendet (Winkelmann, Borcheln), die in Gruppen von je 6 Tieren pro Käfig (Makrolon® Typ IV) bei einer Raumtemperatur von  $23\pm 1^\circ\text{C}$ , einer Luftfeuchtigkeit von 50-55% und einer Beleuchtung des Raumes von 06:00-18:00 Uhr gehalten wurden. Als Futter erhielten sie eine sojafreie Rattendiät (Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest), die ihnen genauso wie Leitungswasser zur freien Verfügung stand. Für den Versuch lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig (Az.509.42502/01-36.03) vor.

#### **2.1.2 Ovariectomie**

17 Tage vor der ersten Verabreichung der Testsubstanzen wurde bei den Ratten eine bilaterale Ovariectomie unter Isoflurannarkose (Forene, Abbott, Wiesbaden) durchgeführt. Nach Rasur und Desinfektion des rechten Unterbauchs wurde die Bauchdecke eröffnet und beide Ovarien nach Ligatur des Gefäßstiels entfernt. Die abdominalen Muskelschichten wurden genäht (3-0 Vicryl, Ethicon, Norderstedt) und durch Klammerung (Michel-Klammern, Martin, Tuttlingen) der Haut wurde die Bauchhöhle wieder verschlossen. Zur Dehydratationsprophylaxe wurde den Tieren 5ml isotope Kochsalzlösung subkutan verabreicht. Anschließend erfolgte bei jedem Tier die zur Identifizierung notwendige, subkutane Implantation eines Transponders (Transponder-UNO MICRO-ID-System, ISO-Transponder (12mm), Uno-Roesvaststaal BV, Zenevaar, Holland) in den Nacken.

#### **2.1.3 Testsubstanzen**

Für alle Testsubstanzen wurde Olivenöl (EuAB/DAB) als Vehikel zur Applikation verwendet. Die Lösung des Östradiol-17 $\beta$ -Valerats (Sigma-Aldrich, München) mit einer Konzentration von 180 $\mu\text{g/ml}$  Olivenöl wurde einmalig angesetzt, aliquotiert und bei  $4^\circ\text{C}$  im Kühlschrank aufbewahrt. Mit einer Konzentration von 300mg/ml wurde mit 4-MBC (Merck, Darmstadt) ca.1h vor Applikation eine Stammlösung zubereitet, aus der Lösungen der Konzentrationen 100mg/ml, 30mg/ml, 10mg/ml und 3mg/ml generiert wurden. Durch ständiges Vermischen mit einem Magnetrührer bis zur Applikation wurden Konzentrationsunterschiede in der Suspension vermieden.

### 2.1.4 Behandlungsgruppen

Die Tiere wurden in 7 Gruppen gleicher Gewichtsverteilung zu je 12 Tieren aufgeteilt, wobei immer 6 Tiere in einem Käfig gehalten wurden. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Behandlungsgruppen und die verabreichten Substanzen:

<b>Gruppenname</b>	<b>Testsubstanz</b>	<b>Konzentration der verabreichten Testlösung</b>	<b>Masse der verabreichten Testsubstanz</b>
Kontrolle (KO)	Vehikel Olivenöl		
Östradiol (E2 0,6)	Östradiol-17 $\beta$ -Valerat	180 $\mu$ g/ml	600 $\mu$ g/kg/d
4-MBC 10	4-MBC	3 mg/ml	10 mg/kg/d
4-MBC 33	4-MBC	10 mg/ml	33 mg/kg/d
4-MBC 100	4-MBC	30 mg/ml	100 mg/kg/d
4-MBC 333	4-MBC	100 mg/ml	333 mg/kg/d
4-MBC 1000	4-MBC	300 mg/ml	1000 mg/kg/d

*Tabelle1 Behandlungsgruppen und Dosierung der Testsubstanzen*

Den ovariektomierten Ratten wurden die Testsubstanzen als Olivenöllösung durch fünfmalige Gavage in einem 24h-Intervall verabreicht. Das applizierte Volumen der Testlösungen betrug in allen Behandlungsgruppen 1ml pro Tag. Bei den Berechnungen der zu applizierenden Dosis wurde ein durchschnittliches Körpergewicht von 0,3kg veranschlagt. Während des gesamten Behandlungszeitraums erfolgten täglich eine Messung des Körpergewichts und des Futtermittelsverbrauchs sowie eine Untersuchung der Tiere auf Symptome von Toxizität.

### 2.1.5 Versuchsende

Mindestens vier Stunden nach der letzten Substanzgabe wurden die Tiere unter CO<sub>2</sub>-Narkose durch Dekapitation mit einer Guillotine getötet. Durch Ausbluten der Körper wurden Blutproben für Serumanalysen gewonnen. Anschließend wurden Vaginalabstriche genommen. Es folgte die Entnahme von Hypophyse, des fünften Brustdrüsenpaars, Uterus, Vagina und Leber. Wenn es erforderlich war, wurde überschüssiges Fett- und Bindegewebe entfernt. Die Uteri wurden feucht gewogen. Anschließend wurden die Brustdrüsen für 24h in

10%iger Formalinlösung fixiert. Ein Uterushorn wurde wie auch die Vagina, Hypophyse und Teile der Leber in Eppendorf-Cups in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -70°C gelagert.

## **2.2 Molekularbiologische Methoden**

Zunächst wurde aus den verschiedenen Geweben die RNA mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Quiagen, Hilden) isoliert und danach durch reverse Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Genexpression wurde durch den real-time Taqman™-PCR-Assay gemessen.

Da nicht alle Proben eines Organs in einem Durchgang verarbeitet werden konnten, wurden diese in vier Aufarbeitungsgruppen mit jeweils drei Tieren einer Behandlungsgruppe aufgeteilt. Dadurch wurde vermieden, dass sich zufällige labortechnische Schwankungen nur auf bestimmte Behandlungsgruppen auswirken.

Die folgenden Maßangaben von Reaktionsansätzen beziehen sich jeweils auf eine Probe eines Organs.

### **2.2.1 Gewebeaufarbeitung und RNA-Isolierung**

Die tiefgefrorenen Gewebeproben wurden mit Hilfe eines Gewebehomogenisators (Microdismembrator™, Braun, Melsungen) bei 2500rpm für 15sec zerkleinert. Jeweils eine Spatelspitze des Gewebepulvers wurde in 500µl (Leber, Hypophyse und Uterus) oder 350µl (Vagina) Lyse-Puffer und 5µl bzw. 3,5µl β-Mercaptoethanol (Merck, Darmstadt) gelöst und für 15sec im Ultraschallbad (Bransonic 32, Branson Sonic, Branbury, USA) homogenisiert. Zur weiteren Verarbeitung wurde diese Suspension in QIAshredder-Säulen (Quiagen, Hilden) pipettiert und bei 12000 rpm für 2min zentrifugiert (Microcentrifuge MC13, Amicon). Das entstandene Filtrat wurde dann zu gleichen Teilen mit 70%igem Ethanol verdünnt und in RNeasy Spin Säulen (Kit-Bestandteil) nochmals bei 12000rpm für 15sec zentrifugiert. Die zu extrahierende RNA befand sich danach in der Säulenmembran. Es folgte ein Waschschriff mit 350µl RW1-Waschpuffer und anschließender Zentrifugation bei 12000rpm für 15sec. Es schloß sich die enzymatische Verdauung der in den Proben verbliebenen DNA durch Inkubation mit jeweils 80µl DNase-Lösung (RNAse free DNase Set, Quiagen, Hilden) für 15min bei Raumtemperatur an. Danach wurde der Waschschriff mit RW1-Waschpuffer wiederholt und die Säule in ein neues Collection-Röhrchen überführt. Es folgten zwei Waschschriffe mit jeweils 500µl RPE-Puffer, zunächst 15sec dann 2min Zentrifugation bei 9800G. Um die RNA aus der Membran der Säule herauszulösen wurde sie in ein 1,5 ml



Eppendorf-Cup (Sarstedt, Nümbrecht) überführt und mit 50µl RNase-freiem Wasser (Kit-Bestandteil) bestellt. Durch Zentrifugation bei 7000G für 60sec erfolgte die Eluierung der RNA. Um RNase-Aktivitäten gering zu halten, wurden die Proben während der RNA-Verdünnung nur auf Eis weiterverarbeitet. Um die RNA-Konzentrationen mit Hilfe eines Biophotometers (Eppendorf, Hamburg) zu messen, wurden 5µl der RNA-Lösung mit 75µl Velcorin-Wasser (1ml Velcorin® (Dimethylpyrocarbonat, Bayer, Leverkusen), 1l Aqua dest.) verdünnt und nach der Messung verworfen. Durch Verdünnung mit Velcorin-Wasser wurden die RNA-Lösungen auf eine Konzentration von 20ng/µl eingestellt und bis zur weiteren Verarbeitung bei -70°C aufbewahrt.

### 2.2.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese mit der RNA-abhängigen DNA-Polymerase Reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase (RT), RNase H Minus, Point Mutant (Set), Promega, Mannheim) wurden 200ng RNA in einem Reaktionsvolumen von 20µl pro Ansatz eingesetzt. Um die Random Primer (1µl Random Primers (Invitrogen, Karlsruhe), 29µl Velcorin-Wasser) an die RNA anzulagern, wurde folgender Ansatz hergestellt:

10µl RNA-Lösung [20 ng/µl]  
1µl Random Primer [100 ng/µl]  
3µl Velcorin-Wasser.

Dieser Ansatz wurde für 10 min bei 70°C inkubiert, um Sekundärstrukturen zu lösen und die gewünschte Anlagerung bei Raumtemperatur zu ermöglichen. Dann wurde ein Gemisch aus folgenden Komponenten hinzugefügt, das zuvor als 25-facher Ansatz vorbereitet worden war:

4µl M-MLV RT 5x Reaktionspuffer (Setbestandteil)  
1µl dNTP-Mix (Invitrogen) [10 mM]  
1µl M-MLV RT  
0,1µl RNasin (RNasin Ribonucleaseinhibitor, Promega, Mannheim).

Im Thermocycler (TRIO Thermoblock, Biometra, Göttingen) wurden folgende Inkubationsschritte durchlaufen:

10min bei 22°C	Primer-Annealing
50min bei 42°C	cDNA-Synthese
10min bei 95°C	Inaktivierung der Enzyme und Denaturierung von RNA-cDNA-Hybriden.

Bis zur Weiterverarbeitung wurden die cDNA-Proben bei -20°C aufbewahrt.

### 2.2.3 Taqman™-PCR

Durch die Taqman™-PCR ist es möglich, gleichzeitig Gensequenzen exponentiell zu amplifizieren und nachzuweisen. Diese quantitative Echtzeitanalyse der PCR basiert auf der 5'-3'-Exonuklease-Aktivität der AmpliTaq DNA-Polymerase, die während der Extensionsphase Y-förmige Sekundärstrukturen durch Hydrolyse entfernt (Schild, Erscheinungsjahr unbekannt). Das zugrunde liegende Prinzip der Messung ist die Fluoreszenzemission des *Reporter*-Farbstoffs (6-carboxy-fluorescein FAM), der, sowie ein *Quencher*-Farbstoff (6-carboxy-tetramethyl-rhodamin TAMRA), Bestandteil einer fluorogenen Sonde ist. Diese Sonde wird dem Reaktionsansatz hinzugefügt. Der *Reporter*-Farbstoff befindet sich am 5'-Ende der Sonde, während das *Quencher*-Molekül vom 3'-Sondenende getragen wird. Durch die räumliche Nähe von *Reporter*- und *Quencher*-Farbstoff wird die Fluoreszenzemission des Reporterfarbstoffs durch einen Fluoreszenzenergietransfer (FET) unterdrückt. Diese spezifische, an die zu amplifizierende Gensequenz angelagerte Sonde wird während der Extensionsphase einer PCR hydrolysiert, wodurch der FET vom *Reporter*- auf den *Quencher*-Farbstoff unterbrochen wird und das Fluoreszenzsignal des *Reporter*-Farbstoffs gemessen werden kann. Durch Wiederholung der PCR-Zyklen steigt die Anzahl der DNA-Kopien und des daraus resultierenden Signals an. Die Veränderung der Fluoreszenz wurde mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detector (PE Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) erfasst. Eine Quantifizierung dieser Änderung war über die Berechnung einer Standardkurve möglich, bei der mindestens 6 bekannte cDNA-Konzentrationen in 1:10 Verdünnungsintervallen eingesetzt wurden. Neben der Standardkurve und den zu untersuchenden Proben enthielt jeder Taqman™-PCR-Lauf sog. *no template controls*, um eventuelle Kontaminationen zu erkennen. Alle Reagenzien wurden in eine 96-well Microtiterplatte (MicroAmp® Optical 96-Well Reaction Plate, PE Applied Biosystems,

Weiterstadt) pipettiert und die *wells* mit optischen Deckeln (MicroAmp® Optical Caps, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verschlossen.

Folgende *Primer* und Sonden wurden für die jeweiligen Gene verwendet:

Östrogenrezeptor alpha: (Spreafico et al.1992)

*Sense Primer:* 5'-AAG CTG GCC TGA CTC TGC AG-3'

*Antisense Primer:* 5'-GCA GGT CAT AGA GAG GCA CGA-3'

Sonde: 5'-FAM-CGT CTG GCC CAG CTC CTC CTC ATC-TAMRA3'

Östrogenrezeptor beta: (GenBank Accession No.:NM\_012754)

*Sense Primer:* 5'-CTT AGT TCC CTG CTT CCT-3'

*Antisense Primer:* 5'-TAC TCA TGG CGG TTG TCT-3'

Sonde: 5'-FAM-TAC ATC CCT TCC TCC T-TAMRA3'

IGF1: (Schoenfeld et al. 1998)

*Sense Primer:* 5'-TGT CGT CTT CAC ATC TCT TCT ACC TG-3'

*Antisense Primer:* 5'-CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCG T-3'

Sonde: 5'-FAM-TTA CCA GCT CGG CCA CAG CCG GAC-TAMRA3'

C3: (Misumi et al. 1990)

*Sense Primer:* 5'-CTG TAC GGC ATA GGG ATA TCA CG-3'

*Antisense Primer:* 5'-ATG TGG CCT GAC CTT CAA GA-3'

Sonde: 5'-FAM-TGC CAT CCT CAC AAC ACT TCC GCA G-3'

LH beta: (Chin et al. 1983)

*Sense Primer:* 5'-ACC TTC ACC ACC AGC ATC TGT-3'

*Antisense Primer:* 5'-AGC TCA CGG TAG GTG CAC ACT-3'

Sonde: 5'-FAM-CTG CCT TGC CTC CCG TGC CTC A-3'

Cornifin:(Tesfaigzi et al. 1996)

*Sense Primer:* 5'-CCA ACT GTC ACT CCA TCA CCA TAC-3'

*Antisense Primer:* 5'-GCA ATG GGA CTC ATA AGC AGG AT-3'

Sonde: 5'-FAM-CCA AGC CTG AAG ATC TGA TCA CCA GAT GC-3'.

In Abhängigkeit von der zu amplifizierenden Gensequenz wurden *Sense* und *Antisense* Primer in verschiedenen Verhältnissen zugesetzt:

<b>Gen</b>	ER $\alpha$	ER $\beta$	C3	LH $\beta$	IGF1	Cornifin
<b>Sense Primer in nM</b>	50	300	900	300	300	300
<b>Antisense Primer in nM</b>	900	300	900	300	300	300

Tabelle2 Eingesetzte Mengen der Primer in Abhängigkeit von der Gensequenz

Der Reaktionsansatz enthielt pro *well* insgesamt 25 $\mu$ l, die sich folgendermaßen zusammensetzten:

2-4 $\mu$ l	cDNA (1:100 verdünnt nur bei LH $\beta$ , Hypophyse)
12,5 $\mu$ l	2x Taqman-PCR-Mastermix
0,5625 $\mu$ l	Sonde (entsprechend 225nM)
0,125-2,25 $\mu$ l	<i>Sense Primer</i> (entsprechend 50-900nM)
0,75-2,25 $\mu$ l	<i>Antisense Primer</i> (entsprechend 300-900nM)
X $\mu$ l	Ampuwa H <sub>2</sub> O (Aqua ad iniectabilia, Braun, Melsungen).

Da es technisch nicht möglich ist, diese geringen Mengen zu pipettieren, wurde aus den Reagenzien (2x Taqman-PCR-Mastermix, Sonde, Primer und H<sub>2</sub>O) in Abhängigkeit von der Probenanzahl ein 60- bis 80facher Ansatz hergestellt. Der 2x Taqman-PCR-Mastermix wurde als 200facher Ansatz vorbereitet.

Der 2x Taqman-PCR-Mastermix enthielt:

2,5 $\mu$ l	10x Reaktionspuffer
1,75 $\mu$ l	50mM MgCl <sub>2</sub>
1 $\mu$ l	5mM dNTP-Mix
0,125 $\mu$ l	PCR-Enzym
0,25 $\mu$ l	UNG (Uracil DNA N-Glykosylase)
6,875 $\mu$ l	Ampuwa H <sub>2</sub> O.

Alle Reagenzien für den 2x Taqman-PCR-Mastermix sowie die Sonden und *Primer* wurden von der Fa. Eurogentec, Köln, bezogen.

Die *real-time* PCR wurde dann durch den eingebauten Thermocycler gestartet. Dabei wurden zunächst zwei Schritte durchlaufen:

2min bei 50°C	Schutz vor <i>Carryover</i> -Kontaminationen durch UNG
10min bei 95°C	Inaktivierung von UNG, Aktivierung des PCR-Enzyms.

Es folgten 40 Zyklen:

15sec bei 95°C	Denaturierung von Doppelstrang-DNA in Einzelstränge
1min bei 60°C	Hybridisierung mit <i>Primern</i> , Extension (Entstehung des <i>Reporter</i> -Signals).

Die Fluoreszenzanregung durch einen Argon-Laser (488nm) wird über ein optisches System in die *wells* der Microtiterplatte geleitet. Dasselbe System ist in der Lage die entstandene Fluoreszenzemission (518nm) zu detektieren. Mit Hilfe der Standardkurve können den Emissionen der zu untersuchenden Proben Werte zugewiesen werden. Die Standardkurve entsteht durch Auftragen der bekannten cDNA-Konzentrationen gegen den dazugehörigen Zyklus (*cycle threshold* (Ct)), ab dem ein signifikantes Signal messbar ist.

## 2.3 Histologische Methoden

### 2.3.1 Vaginalzytologie

Die Vaginalabstriche wurden durch eine mit Leitungswasser gefüllte Pipette (Pipettenspitze (Biosphere® Filtertips, Sarstedt, Nümbrecht) mit aufgesetztem Peleusball) als Spülzytologie gewonnen. Die Zelllösung wurde auf einem Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet. Anschließend wurden sie für 5 min mit Methanol (J.T. Baker, Deventer, Holland) fixiert und später 20 min in einer 3%igen Giemsalösung (3ml Giemsa-Tammlösung (Merck, Darmstadt), 97ml Aqua dest.) gefärbt. Hierbei werden die Zellkerne blau, das Zytoplasma leicht pink bis blau angefärbt. Danach wurden die Präparate kurz in Aqua dest. gewaschen und nach dem Trocknen mit Deckgläschen beklebt.

### 2.3.2 Histologische Aufarbeitung

Nachdem die Brustdrüsen in 10%iger Formalinlösung (100ml 37% Formaldehydlösung (Sigma-Aldrich, München), 900ml Aqua dest., 4g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 6,5g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7-7,4) für 24h fixiert worden waren, wurden sie für die weitere Aufarbeitung getrimmt. Sie wurden durch einen vertikalen Schnitt durch die Brustwarze in zwei Hälften unterteilt. Anschließend wurde das Gewebe maschinell (TP1020, Leica, Wetzlar) dehydriert, dabei wurden folgende Einzelschritte durchlaufen:

2x 1,5h	70% Ethanol
2x 1,5h	96% Ethanol
3x 1,5h	100% Ethanol
2x 1h	Xylol
2x 1,5h	Paraffin.

Danach erfolgte mit Hilfe eines Automaten (EG 1060, Leica, Wetzlar) die Paraffineinbettung. In erkaltetem Zustand (-20°C) konnten von den Paraffinblöcken 3µm dicke Schnitte mit einem Mikrotom (RM2135, Leica, Wetzlar) angefertigt werden. Diese wurden in einem 50°C warmen Wasserbad faltenfrei auf einen Objektträger aufgezogen und danach auf einer Wärmeplatte getrocknet wurden.

### 2.3.3 HE-Färbung

Die HE-Färbung ist eine der gebräuchlichsten Übersichtsfärbungen, die eine gute Darstellung von Geweben und ihrer Architektur ermöglicht. Die Zellkerne werden durch die überwiegend basischen Bestandteile blau-violett (Hämatoxylin), das Zytoplasma durch dort vorwiegend azidophile Strukturen rosa (Eosin) gefärbt.

Um die Gewebeschnitte anzufärben war es zunächst erforderlich das Paraffin zu entfernen (3x 5min Xylol) und sie durch eine Alkoholreihe in absteigender Konzentration zu bewässern (3x 2min 100% Ethanol, 2x 2min 96% Ethanol, 1x 2 in 70% Ethanol, mindestens 1x 3min destilliertes Wasser). Danach erfolgte die eigentliche Färbung mit Hämatoxylin (Mayers Hämalaunlösung, Merck, Darmstadt) und Eosin (Eosin gelblich, Merck, Darmstadt). Die verwendeten Hämatoxylinlösungen wurden dabei vorher auf ihre Färbestärke getestet und die Färbedauer ggf. variiert.

Nach folgendem Protokoll wurde gefärbt:

ca. 2min	Hämatoxylinlösung (Stammlösung)
5min	fließendes Leitungswasser
1min	Aqua dest.
1min	0,25% Eosinlösung (0,5g Eosin in 200ml 80% Ethanol)
1sec	Aqua dest..

Danach wurden die Schnitte durch eine aufsteigende Alkoholreihe (1x 2min 70% Ethanol, 2x 2min 96% Ethanol, 3x 2min 100% Ethanol, 3x 3min Xylol) dehydriert. Zum Schluss wurden sie mit Deckgläschen beklebt (1Tropfen DePeX mounting medium (Gurr, BDH, Poole, UK)) und bei Raumtemperatur ausgehärtet.

#### **2.3.4 Immunhistochemie (PCNA)**

PCNA (*proliferating nuclear cell antigen*) ist als Kofaktor der DNA-Polymerase  $\delta$  ein essentieller Bestandteil der DNA-Replikation eukaryoter Zellen und wird während der frühen G1- und S-Phase des Zellzyklus synthetisiert. Außerdem ist es Bestandteil der Signalkette bei Entscheidungen über das Schicksal der Zelle (Paunesku et al. 2001). Ein hoher Gehalt an PCNA findet sich während der DNA-Replikation (Abwesenheit von p53) und der DNA-Reparatur (Anwesenheit von p53). Die Markierung dieses Proteins verbessert die Möglichkeiten, sich reproduzierende Zellen zu identifizieren (Hall PA et al. 1990) und findet daher als Hilfsmittel in der Untersuchung und Prognose von Brustkrebs Verwendung.

Mit Hilfe der Immunhistochemie ist es möglich, mit spezifischen Antikörpern bestimmte Antigene und deren Verteilungsmuster in Gewebeschnitten nachzuweisen. Der an das darzustellende Antigen angelagerte Antikörper wird als primärer Antikörper bezeichnet. Das Prinzip der hier verwendeten indirekten Zwei-Schritt-Methode ist der Gebrauch eines sog. Sekundärantikörpers, der zum einen an den primären Antikörper bindet und zum anderen mit einem Dextranpolymer konjugiert ist, das wiederum Träger zahlreicher Peroxidasen ist (Two-step EnVision® System). Diese Peroxidasen setzen Wasserstoffperoxid um. Durch diese Reaktion wird gleichzeitig vorhandenes DAB (3,3 Diaminobenzidin) zu einem unlöslichen braunen Endprodukt oxidiert, welches am Ort des Zielantigens präzipitiert. Der verwendete primäre monoklonale Antikörper gegen PCNA (PC-10, sc56, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg) der Ratte stammte aus der Maus. Der sekundäre Ziegenantikörper war Bestandteil des benutzten Kits REAL™ EnVision™ Detection System, Peroxidase/DAB+,

Rabbit/Mouse von Dako, Glostrup, Dänemark und richtete sich gegen Immunglobuline der Maus. Es wurden immer 20 Schnitte in einem Arbeitsdurchgang gefärbt.

Die Paraffinschnitte wurden zunächst entparaffinisiert (3x 5min Xylol), durch eine absteigende Alkoholreihe rehydriert (3x 2min 100% Ethanol, 2x 2min 96% Ethanol, 2min 70% Ethanol) und für 3min in Aqua dest. gegeben.

Um formalinbedingte Eiweißvernetzungen aufzubrechen, die Antigene maskieren und die Proben einer immunhistologischen Untersuchung unzugänglich machen können, wurden die Schnitte einer Mikrowellenbehandlung unterzogen (Brown und Chirala 1995). Vermutlich werden dadurch die durch Fixierung in ihrer räumlichen Struktur veränderten Proteine wieder renaturiert. Die Schnitte wurden hierzu in ein hitzestabiles, mit 0,01M Zitratpuffer (2,94g  $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \times 2\text{H}_2\text{O}$  in 1l Aqua dest., pH 6) aufgefülltes Plastikgefäß gestellt und gekocht. Während dieser Behandlung mussten die Schnitte jederzeit vollständig mit Flüssigkeit bedeckt sein. Folgende Schritte wurden für die Rückgewinnung des Epitops durchgeführt:

6min bei 750Watt

Ersatz des verlorenen Puffervolumens

1min Abkühlung bei Raumtemperatur

6min bei 750Watt

Ersatz des verlorenen Puffervolumens

20min Abkühlung bei Raumtemperatur.

Anschließend erfolgte ein Bad für 3min in Aqua dest. und eine Dehydrierung mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe (2min 75% Ethanol, 2x 2min 96% Ethanol, 2min 100% Ethanol). Um falsch-positive Reaktionen durch endogene Peroxidasen zu vermeiden, wurde die Peroxidaseaktivität durch Behandlung mit einer Wasserstoffperoxidlösung (0,9 ml Methanol, 0,1 ml 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$ ) gehemmt:

35min Inkubation mit 1ml 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Lösung pro Schnitt.

Danach wurden sie abermals rehydriert (2min 100%, 2x 2min 96% Ethanol, 2min 70% Ethanol) und zunächst für 3min in Aqua dest. gewaschen. Eine weitere Reinigung erfolgte durch zweimaliges Spülen à 5min in 1x PBS-Puffer (8g NaCl, 0,2g KCl, 1,3g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 0,2g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  in 1l Aqua dest., pH 7,4) unter sanftem Schütteln. Alle nachfolgenden Schritte wurden in einer Feuchtigkeitskammer durchgeführt. Überschüssiger Puffer wurde wegen der



Gefahr einer Verdünnung entfernt. Die Gewebeschnitte waren aber immer mit ausreichend Flüssigkeit bedeckt, um ein Austrocknen zu verhindern. Zur Vermeidung von Hintergrundfärbungen wurden mit Hilfe einer 1%igen Ziegen Serumlösung (400µl 7,5%ige Rinderalbuminlösung, 30µl Ziegen Serum, 2570µl 1x PBS-Puffer) unspezifische Bindungen des Primärantikörpers abgefangen:

30min Inkubation mit 0,5ml 1% Ziegen Serumlösung pro Schnitt.

Es erfolgte eine erneute Reinigung durch Abspülen und 10min in 1x PBS-Puffer mit einem Schüttelinkubator. Folgende Stationen wurden für die immunhistochemische Markierung durchlaufen:

30min Inkubation mit 200µl PCNA-Antikörper-Lösung pro Schnitt  
5min 1x PBS-Puffer im Schüttelinkubator  
30min Inkubation mit 2-3 Tropfen Sekundärantikörper (EnVision™ Polymer)  
Abspülen mit 1x PBS-Puffer  
5min 1x PBS-Puffer im Schüttelinkubator  
10-15min Inkubation mit 200µl Substratlösung (Inkubationszeit nach Farbwechsel)  
Abspülen mit Aqua dest.  
3min Aqua dest..

Der PCNA-Antikörper der Fa. Santa Cruz Biotechnology wurde 1:1000 mit dem Antikörperlösungsmittel (DakoCytomation Antibody Diluent, Dako, Glostrup) verdünnt. Dieses Antikörperlösungsmittel soll Störungen der Färbung durch zu extreme pH-Werte und ionische Ladungen vermeiden. Die Substratlösung wurde aus 20µl des Dako Real™ DAB+ Chromogen und 1ml des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-haltigem Dako REAL™ Substrate Buffer generiert (beides Kitbestandteile).

Zum Abschluss wurde mit Hämatoxylin nach obiger Anleitung eine Gegenfärbung gemacht. Anschließend wurden die Proben dehydriert (2x 3min 75% Ethanol, 2x 3min 96% Ethanol, 3x 3min 100% Ethanol) und 3x 5min in Xylol eingelegt. Danach wurden Deckgläser aufgeklebt. Nach dem Aushärten erfolgte die Auszählung unter dem Mikroskop.

### 2.3.5 Mikroskopische Auswertung

Die histologische Beurteilung wurde mit dem Axiophot Mikroskop (Zeiss, Jena) durchgeführt. Mit Hilfe einer angeschlossenen Digitalkamera (Color View 12, Sooft Imaging System, Münster) konnten Bilder gemacht werden, die durch das Programm AnalySIS 3.0 (Soft Imaging System GmbH, Münster) an einen Rechner übertragen wurden und bewertet werden konnten.

Die Vaginalzytologien wurden mit Hilfe des Handbook of Toxicologic Pathology (Haschek 1991) beurteilt.

#### Vagina

Der Zyklus der Ratte wird in Proöstrus, Östrus und Diöstrus eingeteilt und dauert 4-5 Tage. In Bezug auf die Vagina ist hauptsächlich das Epithel zyklischen Veränderungen unterworfen. Durch E2 werden die Anzahl der vaginalen Epithelschichten erhöht und eine Verhornung der Zellen induziert. Durch den Östrogenanstieg im Proöstrus finden sich zunächst mittelgroße, kernhaltige Epithelzellen im Abstrich, die teilweise vakuolisiert sind. Diese entwickeln sich zu sehr großen, polygonalen, verhornten Zellen (Östrus), hauptsächlich ohne Zellkern. Während des Diöstrus besteht die vorherrschende Zellpopulation aus Leukozyten, wobei im frühen Diöstrus (Metöstrus) außerdem noch große verhornte Epithelzellen gefunden werden. Hingegen zeigen sich im späten Diöstrus neben den Leukozyten mittelgroße, nicht verhornte Epithelzellen. In Anlehnung an diese zytologischen Bilder des Rattenzyklus wurden die erhobenen Abstriche befundet.

#### Mamma

Zur morphologischen Beurteilung der HE-gefärbten Brustdrüsen wurde ein Bewertungssystem (*Score*) entwickelt, das die östrogenabhängigen Veränderungen an den terminalen Strukturen des Mammaepithels, d.h. den Drüsenendstücken, beschreibt. Diese Strukturen werden während Pubertät, Östruszyklus und der Schwangerschaft von E2 beeinflusst.

Der Entwicklungsgrad der Endstücke wurde von 0 bis 5 anhand der Entwicklung ihrer Lumen bewertet:

- 0: Die meisten terminalen Epithelstrukturen sind dicht gepackt in Haufen, keine Anzeichen für eine Ausbildung der Lumen
- 1: Der Großteil der terminalen Strukturen kommt in Haufen vor, wobei bei bis zu 50% dieser Haufen kleine Azini mit einsetzender oder kleiner luminaler Entwicklung zeigen. Die Durchmesser der Lumen sind bis zu 1 Epithelzelle groß.
- 2: Die überwiegende Zahl der Epithelstrukturen besteht aus Azini mit kleinem Lumen (Durchmesser 1-2 Epithelzellen)
- 3: Die meisten Epithelstrukturen zeigen Azini mit mittlerem Lumen (Durchmesser 2-5 Epithelzellen)
- 4: Die epithelialen Strukturen bestehen überwiegend aus voll entwickelten Azini (Durchmesser 5-10 Epithelzellen)
- 5: Das meiste terminale Epithel zeigt voll entwickelte Azini mit großen Lumen (Durchmesser mehr als 10 Epithelzellen)

Die Untersuchung erfolgte in einer Einfach-Blind-Studie.

Die Anzahl der PCNA-immunreaktiven Zellen der terminalen Alveolarknospen wurde auf einem Gewebeschnitt von jedem Tier beurteilt. Hierzu wurden in jeder Probe insgesamt 500 Zellen ausgezählt und anschließend der Anteil der PCNA-positiven Zellen bestimmt.

## **2.4 Statistische Analyse und Darstellungsweise**

Die statistische Analyse erfolgte mit Hilfe des Programms PRISM® (San Diego, USA). Mit Ausnahme des Futtermittelsverbrauchs und der Körpergewichte sind bei den mit parametrischen Tests (ANOVA mit Dunnett's Test) geprüften Daten die Mittelwerte der verschiedenen Behandlungsgruppen mit den Standardfehlern der Mittelwerte (SEM) als Säulendiagramme dargestellt. Daten, die mit verteilungsfreien Tests (Kruskal-Wallis-Test mit Dunns-Test) ausgewertet wurden, werden als *Box-Whisker-Plot* mit den Medianen der Behandlungsgruppen sowie Minimum und Maximum der Messwerte gezeigt. In den Graphen wurden signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe mit \* gekennzeichnet.

### Futtermverbrauch, Körper- und Uterusgewicht

Eine statistische Analyse des Futtermittelsverbrauchs und der Körpergewichte im Verlauf der Behandlung, der Gewichtsänderungen sowie der absoluten und relativen Uterusgewichte wurde mit einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließendem Dunnett's Test als Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen zur Kontrollgruppe durchgeführt. Als signifikant wurden Unterschiede im Vergleich zur Kontrollgruppe betrachtet, wenn die Irrtumswahrscheinlichkeit  $p < 0,05$  war.

### Taqman™-PCR

Die Messwerte der quantitativen PCR wurden in Relation zum Mittelwert der Kontrollgruppe der jeweiligen Aufarbeitungsgruppe gesetzt, wobei dieser Mittelwert als 100% definiert wurde. Durch diese Prozentrelativierung wurden labortechnische Schwankungen in den Absolutwerten der zu verschiedenen Zeitpunkten durchgeführten PCRs umgangen und die Werte konnten miteinander verglichen werden. Statistische Signifikanzen wurden mit ANOVA und anschließendem Dunnett's Test bei  $p < 0,05$  berechnet.

### Mammahistologie

Da es sich bei den Werten des *Scores* um dimensionslose Daten handelt, wurde die statistische Analyse mit einem Kruskal-Wallis-Test und anschließendem Dunns Test durchgeführt. Für die PCNA Expression wurde eine einfache Varianzanalyse (ANOVA) mit anschließendem Dunnett's Test durchgeführt, um Vergleiche zwischen den Gruppen anzustellen. Auch hier wurde bei beiden Analysen das Signifikanzniveau auf  $p < 0,05$  festgelegt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Futtermittelverbrauch

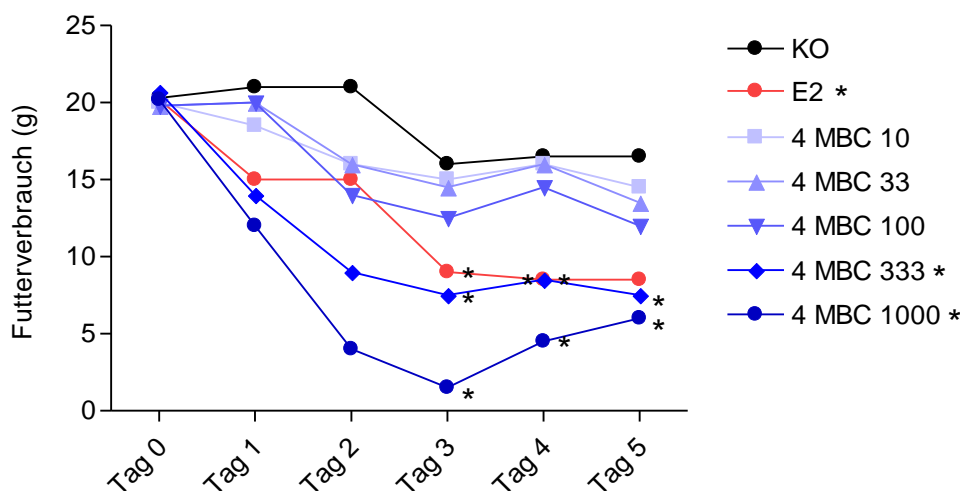


Abb.2 Zeitlicher Verlauf des durchschnittlichen täglichen Futtermittelverbrauchs in Gramm der verschiedenen Behandlungsgruppen ohne (Tag 0) und während Substanzgabe  
Mittelwerte,  $n=12/\text{Gruppe}$ , \*  $p<0,05$  versus Kontrolle  
Aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Abbildung der SEM

Der durchschnittliche Futtermittelverbrauch pro Tier ohne Substanzgabe variierte zwischen 20,7g und 19,8g/Tag und Tier. Anhand der Kontrollgruppe war zu sehen, dass die alleinige Gavage-Applikation von Olivenöl zu einer Reduktion der Futteraufnahme auf 16,5g/Tag und Tier (fünfter Tag) führte. Unter der Behandlung mit Östradiol kam es zu einer kontinuierlichen, ab dem dritten Tag zu einer signifikanten Abnahme des Futtermittelverbrauchs. Die Futteraufnahme sank am vierten Tag der Behandlung um 57% auf 8,5g ab. Im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen sank unter der Behandlung mit 1000mg/kg KG 4-MBC die Futteraufnahme am stärksten ab. Zunächst fiel sie auf 1,5g/tag und Tier am dritten Tag und stieg dann auf 6,0g am fünften Tag der Behandlung an. Eine signifikante Reduktion der Futteraufnahme war neben der 4-MBC-Höchstdosis auch durch 4-MBC 333 ab dem dritten Tag der Behandlung auslösbar. Jedoch auch die anderen mit 4-MBC behandelten Gruppen nahmen weniger Futter auf als die Kontrollgruppe. Dabei sank der Futtermittelverbrauch mit steigender 4-MBC-Dosis.

### 3.2 Körpergewichte

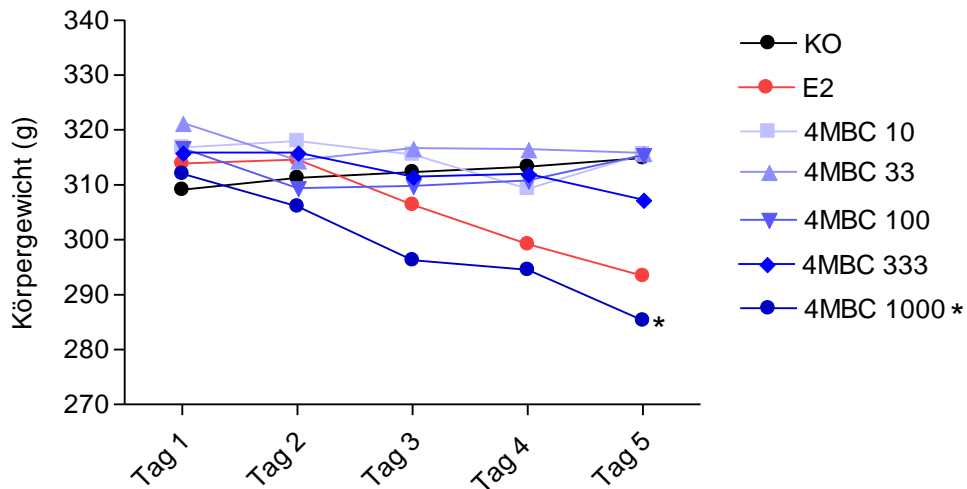


Abb.3 Zeitlicher Verlauf des durchschnittlichen Körpergewichts der verschiedenen Behandlungsgruppen während der Substanzapplikation an den einzelnen Behandlungstagen  
Mittelwerte, n=12/Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle  
Aus Gründen der Übersichtlichkeit keine Abbildung der SEM

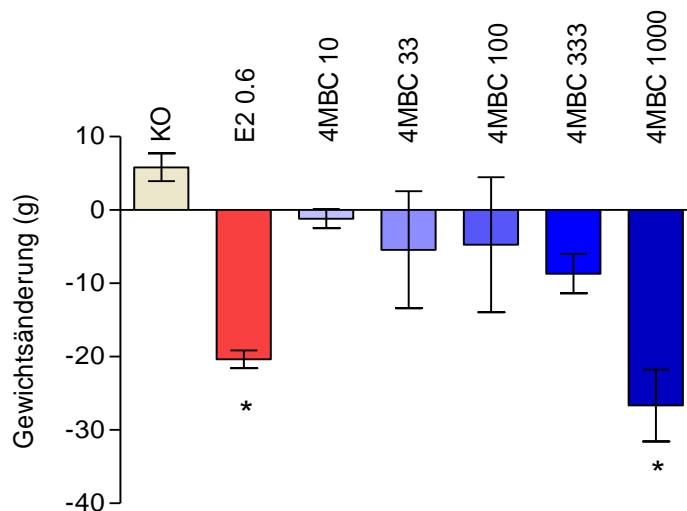


Abb.4 Gewichtsänderung des Körpergewichts der verschiedenen Behandlungsgruppen vom 1. auf den 5. Behandlungstag in Gramm  
Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

Zu Beginn der Behandlung wog jedes Tier durchschnittlich 315,1g. Im Verlauf der Behandlung nahmen die Tiere der Kontrollgruppe um durchschnittlich 5,8g zu. Hingegen war bei allen anderen Behandlungsgruppen eine Gewichtsabnahme zu verzeichnen. Die stärkste Gewichtsreduktion wurde bei den mit 1000mg/kg KG behandelten Tieren ausgelöst; in den fünf Behandlungstagen sank das durchschnittliche Gewicht um 26,7g, was 8,6% des

Ausgangsgewichts entsprach. Eine signifikante Abnahme dieser Gruppe konnte ab dem fünften Behandlungstag verzeichnet werden. Die Abnahme in der Östradiol-Gruppe betrug 20,5g. Bei den Tieren der anderen 4-MBC-Gruppen war der Gewichtsverlust nicht so stark ausgeprägt. Am geringsten fiel er mit 1,2 g bei 4-MBC 10 aus, während er bei 4-MBC 333 immerhin noch 8,6g betrug. Eine signifikante Änderung des Körpergewichts vom ersten auf den fünften Behandlungstag als Vergleich der verschiedenen Behandlungsgruppen zur Kontrolle wurde sowohl durch Behandlung mit Östradiol als auch mit 4-MBC 1000 hervorgerufen.

### 3.3 Uterus

#### 3.3.1 Uterotrophie-Test

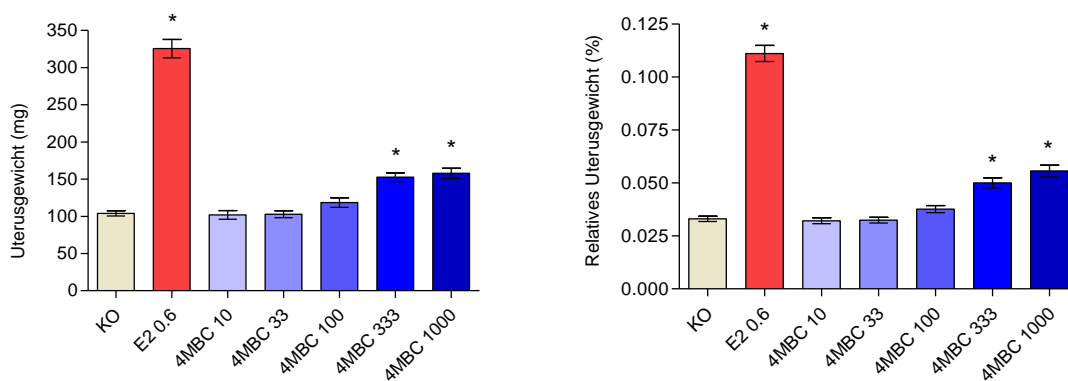


Abb.5 Absolute (links) und relative (rechts) Uterusgewichte der verschiedenen Behandlungsgruppen nach Substanzapplikation in Milligramm bzw. in Prozent des Körpergewichts  
Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

Eine signifikante Erhöhung des Uterusfeuchtgewichts im Vergleich zur Kontrollgruppe war sowohl in der Östradiol-Gruppe als auch in den höheren 4-MBC-Dosen, 333 und 1000mg/kg KG, zu sehen. Im Durchschnitt wogen die Uteri der Kontrollgruppe 104mg. Die mit Östradiol behandelten Tiere zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe ein um den Faktor drei erhöhtes Uterusgewicht (325,5mg). Das durchschnittliche Uterusgewicht der Gruppen 4-MBC 333 und 4-MBC 1000 betrug 152,5mg bzw. 157,8mg, was einer Zunahme um den Faktor 1,46 bzw. 1,52 entspricht. Insgesamt stieg unter der Behandlung mit 4-MBC das Uterusgewicht dosisabhängig an. Auch bei der Relativierung des Uterusgewichts auf das Körpergewicht konnte beobachtet werden, dass die Behandlungen mit Östradiol und den beiden höchsten Dosen 4-MBC eine signifikante Erniedrigung des Körpergewichts zur Folge hatte.

### 3.3.2 ER $\alpha$ -Genexpression

Die uterine Genexpression von ER $\alpha$  wurde im Vergleich zur Kontrollgruppe durch Östradiol leicht gehemmt, wobei hier aufgrund Streuung der Messwerte keine signifikanten Unterschiede zur Kontrollgruppe gefunden werden konnten. Zusammenfassend zeigten sich keine Effekte von 4-MBC auf die ER $\alpha$ -Transkriptmenge des Uterus.

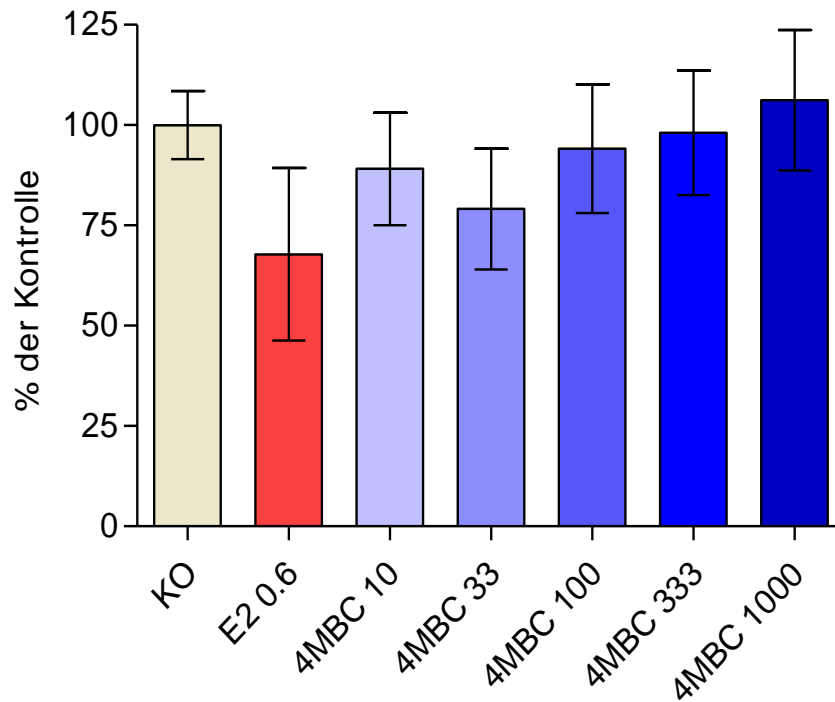


Abb.6 Uterine ER $\alpha$ -Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle  
Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe



### 3.3.3 ER $\beta$ -Genexpression

Alle Behandlungen waren in der Lage, die uterine ER $\beta$ -Expression signifikant zu unterdrücken, wobei Östradiol der stärkste Suppressor war. Die geringste Wirkung auf die Abnahme der Genexpression hatte die niedrigste 4-MBC-Dosis (10mg/kg KG). Von den mit 4-MBC behandelten Tieren führte 4-MBC in der 333mg/kg KG Dosierung zur stärksten Reduktion der ER $\beta$ -Transkriptmenge, gefolgt von den anderen Dosierungen in der Reihenfolge 1000 > 33 > 100mg/kg KG.

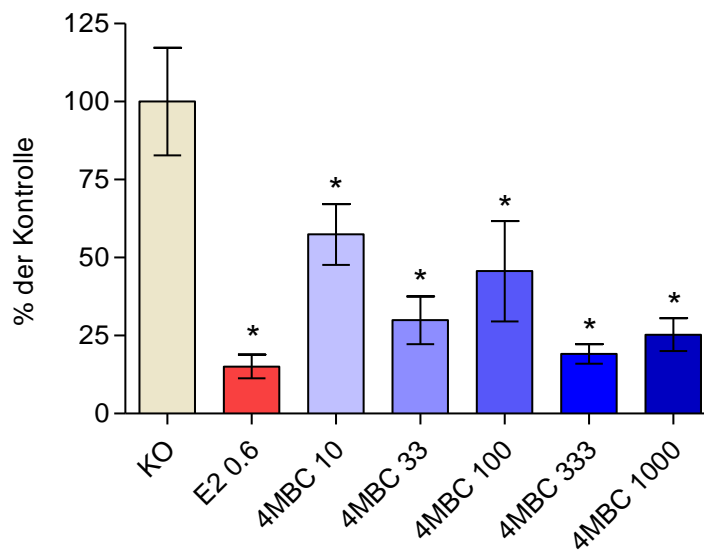


Abb.7 Uterine ER $\beta$ -Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

### 3.3.4 IGF1-Genexpression

Die Genexpression von IGF1 im Uterus wurde am stärksten und signifikant durch die höchste 4-MBC-Dosis stimuliert. Eine starke, wenn auch nicht signifikante Zunahme der Transkriptmenge wurde auch unter der Behandlung mit Östradiol und 4-MBC 333 beobachtet. Bei den drei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen zeigte sich keine Wirkung auf die uterine IGF1-Expression.

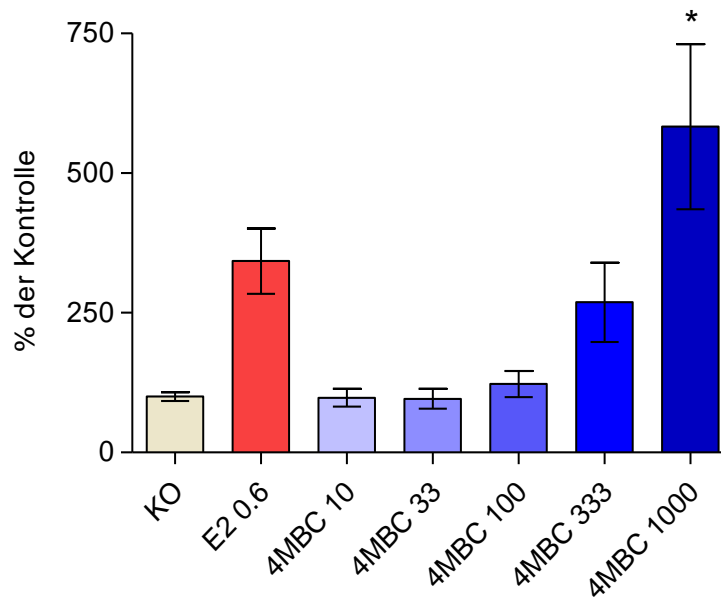


Abb.8 IGF1-Genexpression des Uterus der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle

### 3.3.5 C3-Genexpression

Eine starke Zunahme der uterinen C3-Transkription erfolgte zum einen unter der Behandlung mit Östradiol, zum anderen in den beiden höheren 4-MBC-Dosierungen, 333 und 1000mg/kg KG. Dabei waren nur die Stimulation der C3-Expression durch Östradiol und die 4-MBC-Höchstdosis signifikant. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die drei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen minimal erhöhte Transkriptmengen von C3.

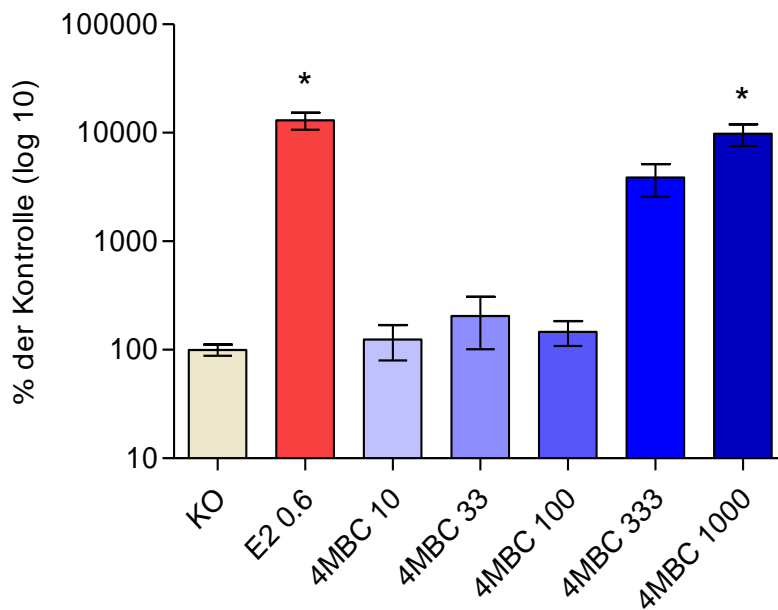
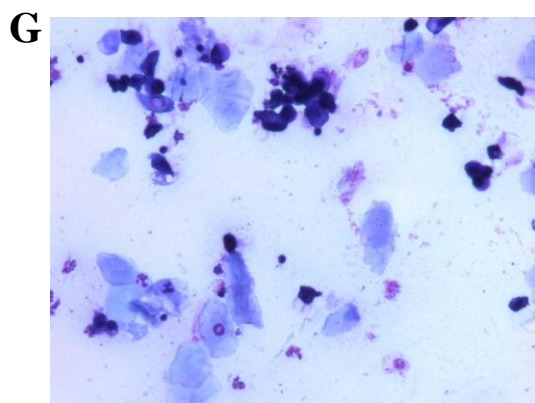
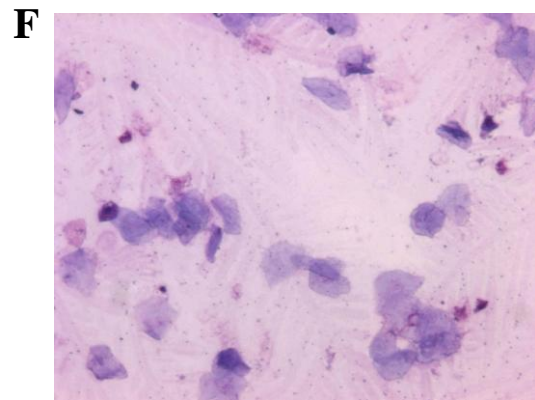
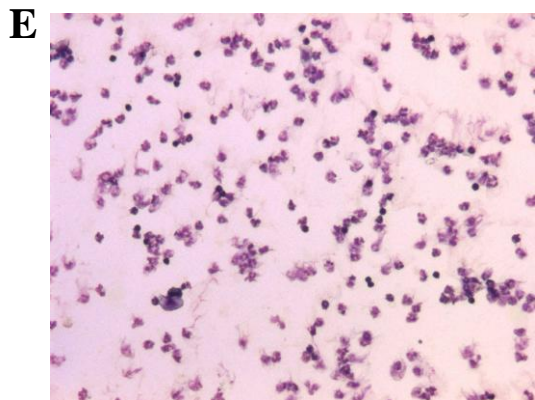
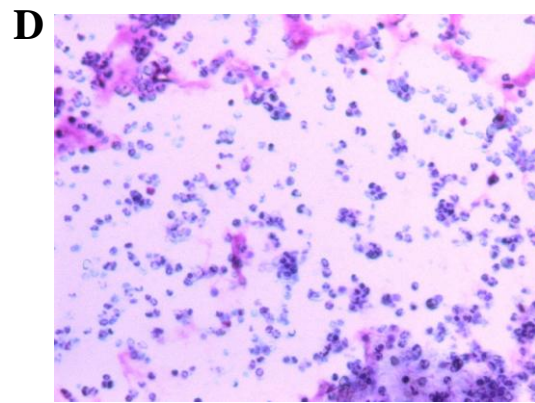
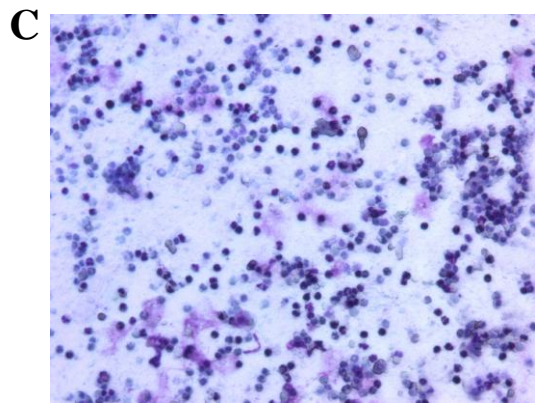
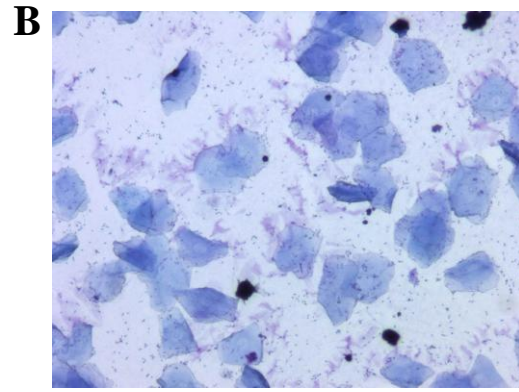
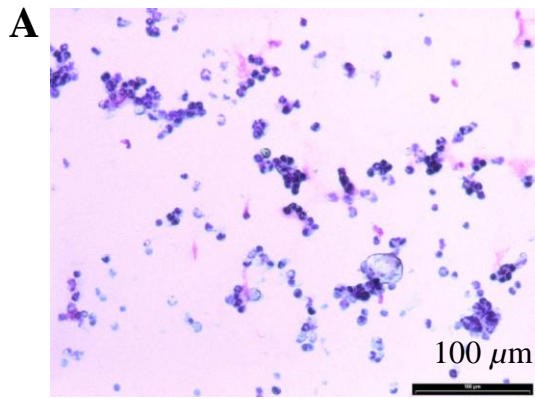


Abb.9 Uterine C3-Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

## 3.4 Vagina

### 3.4.1 Vaginalzytologie

Der zytologische Vaginalbefund der Kontrolltiere zeigte ein überwiegend aus Leukozyten bestehendes Zellbild entsprechend einem späten Diöstrus mit vereinzelt mittelgroßen, zellkernhaltigen Epithelzellen. Hingegen wurde durch die Behandlung mit Östradiol ein östrusartiger Befund mit sehr großen zellkernlosen, verhornten Epithelzellen hervorgerufen. In den Behandlungsgruppen 4-MBC 10, 33 und 100 fanden sich diöstrusartige Vaginalzytologien. Bei den mit 333 und 1000mg/kg KG behandelten Tieren fanden sich große polygonale Epithelzellen wie durch die Östrogeneinwirkung im Östrus.



*Abb.10 Repräsentative Vaginalzytologien der verschiedenen Behandlungsgruppen in 20facher Vergrößerung (Giemsafärbung)*

- A: KO
- B: E2 0,6
- C: 4-MBC 10
- D: 4-MBC 33
- E: 4-MBC 100
- F: 4-MBC 333
- G: 4-MBC 1000

### 3.4.2 Cornifin-Genexpression

Die vaginale Genexpression von Cornifin wurde im Vergleich zu den Kontrolltieren signifikant durch Östradiol stimuliert. Unter jeder Behandlung mit 4-MBC kam es, wenn auch nicht signifikant, zu einer Zunahme der Cornifin-Transkription. Die stärkste stimulierende Wirkung wurde dabei von 4-MBC 1000mg/kg KG erzielt, gefolgt von 4-MBC 333mg/kg KG. Die drei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen zeigten eine weniger deutliche Zunahme der Genexpression, wobei die Gruppen 4-MBC 10 und 33 eine ähnliche Wirkung hatten. Im Vergleich zu diesen Gruppen kam es in der 100mg/kg KG Gruppe zu einer leichten Abnahme der Transkriptmenge.

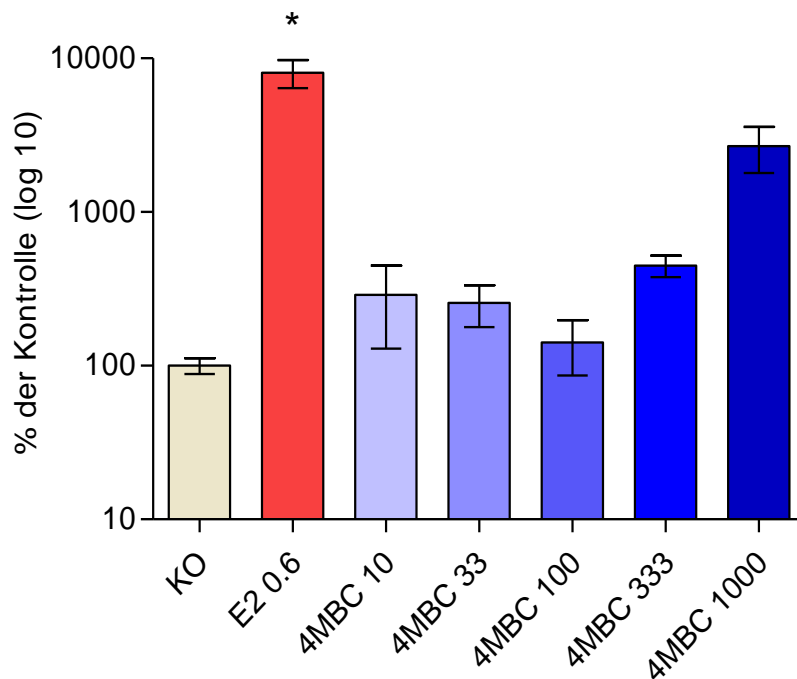


Abb.11 Vaginale Genexpression von Cornifin der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle, Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

## 3.5 Leber

### 3.5.1 IGF1-Genexpression

Unter der Behandlung mit Östradiol kam es zu einer signifikanten Abnahme der IGF1-Transkription in der Leber. Auch die beiden höheren 4-MBC-Dosierungen waren in der Lage, diese Genexpression signifikant zu verringern. Insgesamt zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der IGF1-Expression durch 4-MBC.

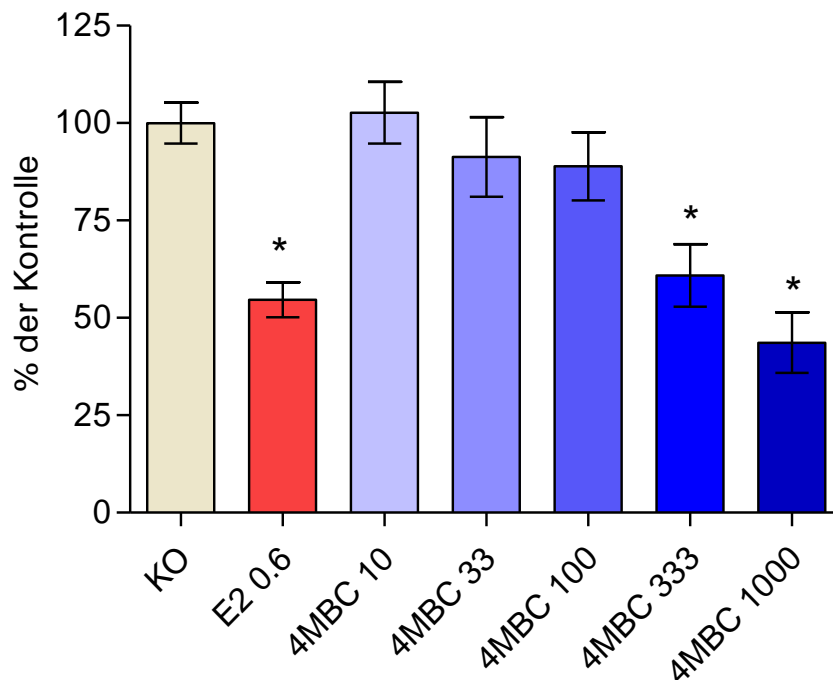


Abb.12 Hepatische IGF1-Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

## 3.6 Histologie der Mamma

### 3.6.1 Morphologie

Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnten sowohl für Östradiol als auch für die drei höheren 4-MBC-Dosierungen signifikante Veränderungen der luminalen Entwicklung gefunden werden. Hingegen blieben die zwei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen ohne signifikanten Effekt auf die alveolären Endstücke. Es zeigte sich das Bild einer dosisabhängigen Beeinflussung der Lumen durch 4-MBC. Zu bemerken ist, dass nie *Score 5* vergeben wurde. Sowohl Östradiol und noch deutlicher 4-MBC 1000 führten zu einer Sekreteinlagerung in den Lumen, wobei bei 4-MBC 1000 ein stark bläschenartiges Erscheinungsbild vorzufinden war.

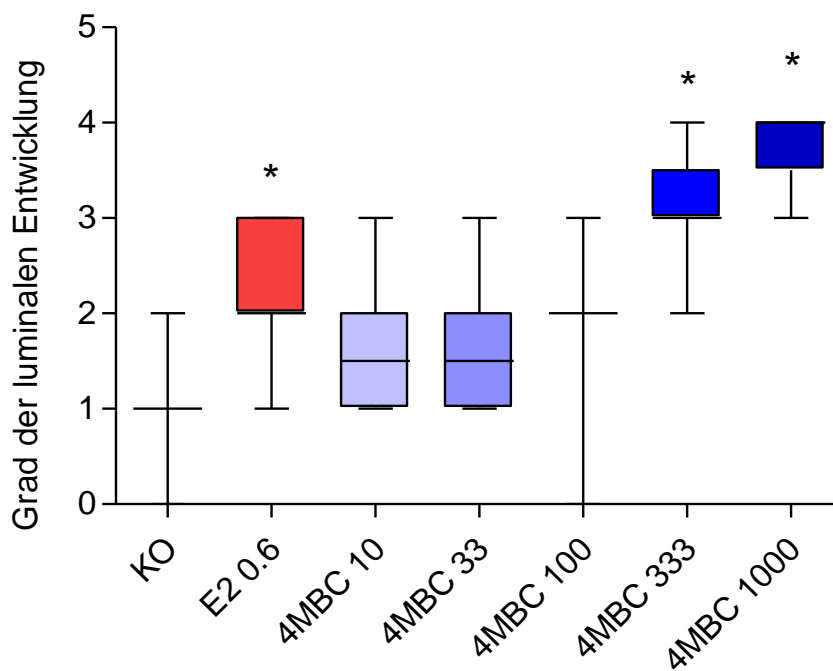
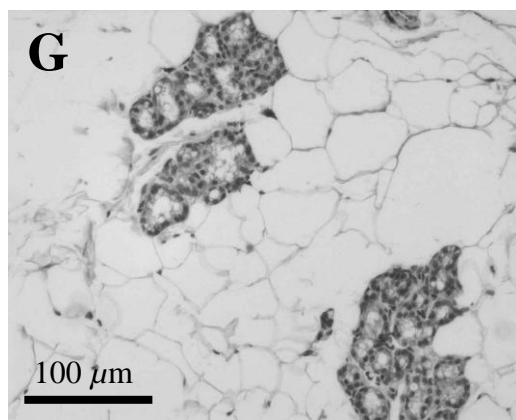
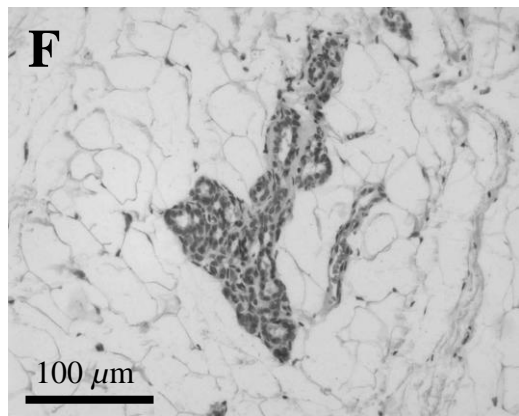
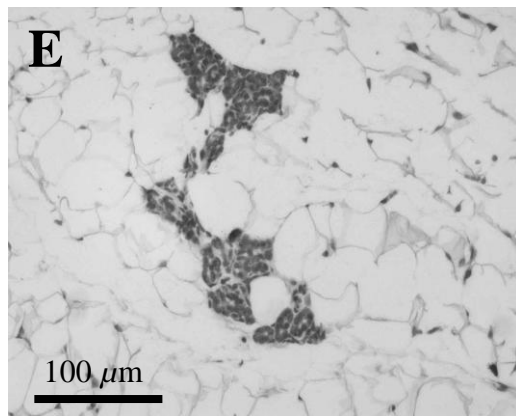
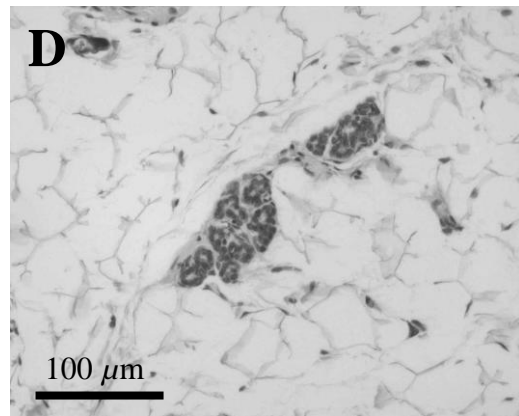
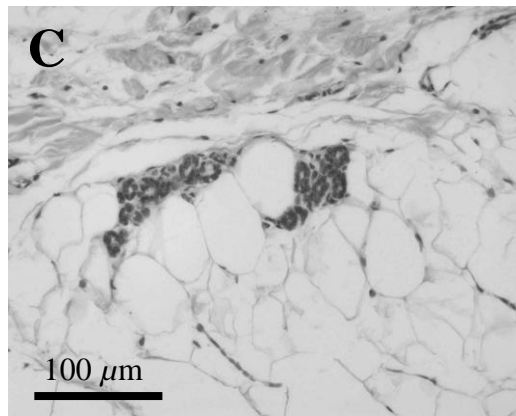
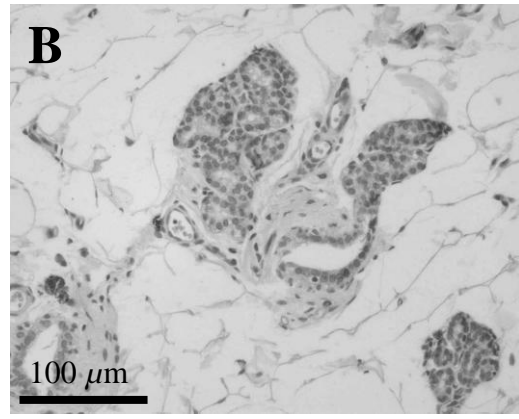
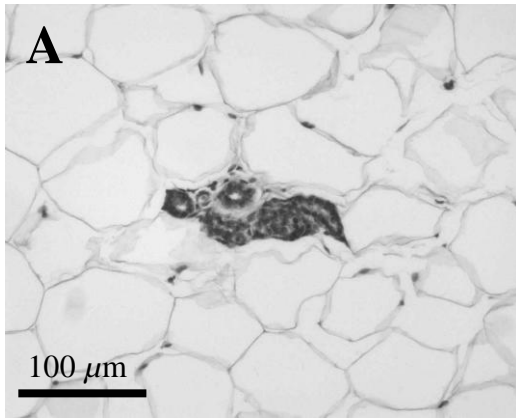


Abb.13 Morphologie der mammären Drüsenendstücke der verschiedenen Behandlungsgruppen anhand des Entwicklungsgrades als Box-Whisker-Plot  
Mediane, obere und untere Quartile, min. und max. Messwert, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle



*Abb.14 Mamma-Morphologie  
Repräsentative Brustdrüsenschnitte der  
verschiedenen Behandlungsgruppen  
in 20facher Vergrößerung  
(HE-Färbung)*

- A: Kontrolle*
- B: E2 0,6*
- C: 4-MBC 10*
- D: 4-MBC 33*
- F: 4-MBC 100*
- G: 4-MBC 333*
- H: 4-MBC 1000*



### 3.6.2 PCNA-Expression

Eine signifikante Zunahme der PCNA-Expression in der Brustdrüse konnte nur durch eine Behandlung mit Östradiol hervorgerufen werden. Dabei erhöhte sich der Anteil der PCNA positiven Zellen um das vierfache im Vergleich zu den Kontrolltieren. Tendenziell deutete sich eine dosisabhängige Steigerung der Expression von PCNA durch zunehmende 4-MBC-Dosen an.

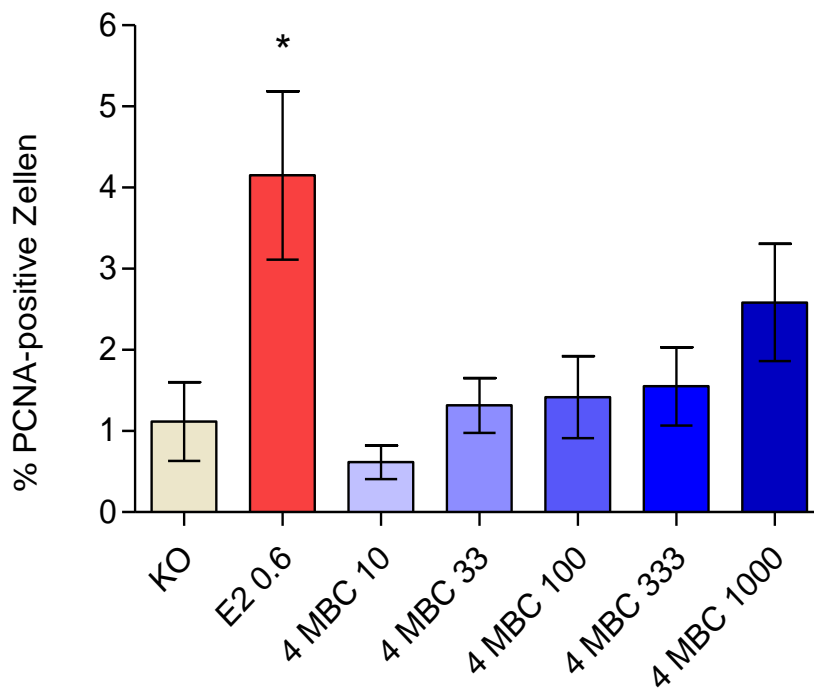
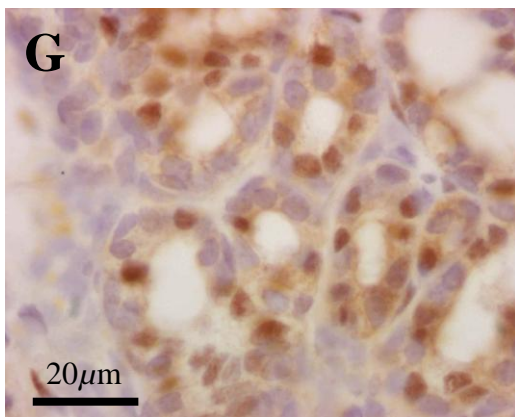
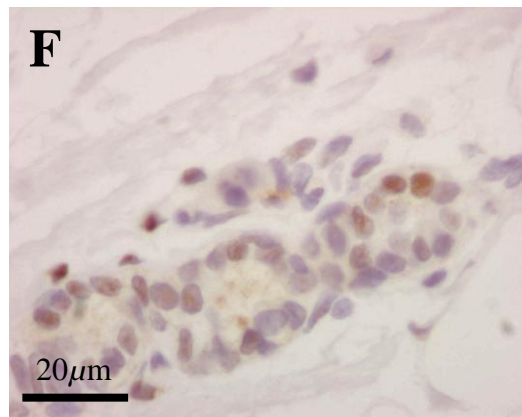
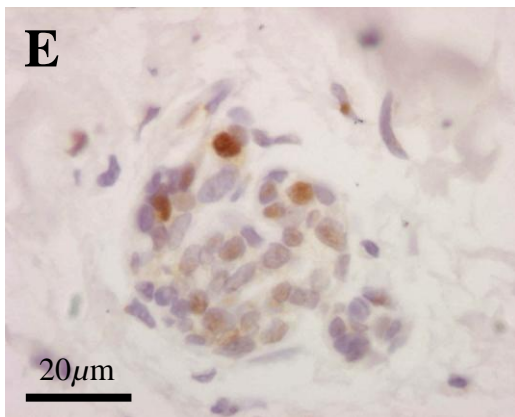
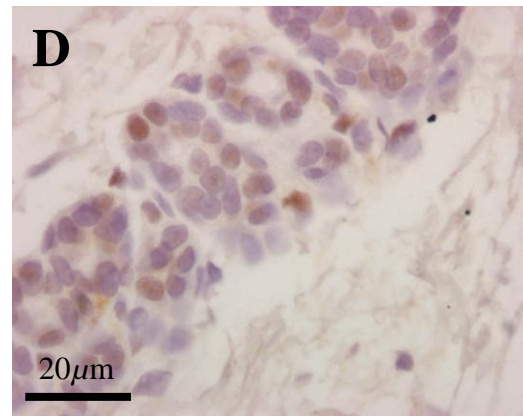
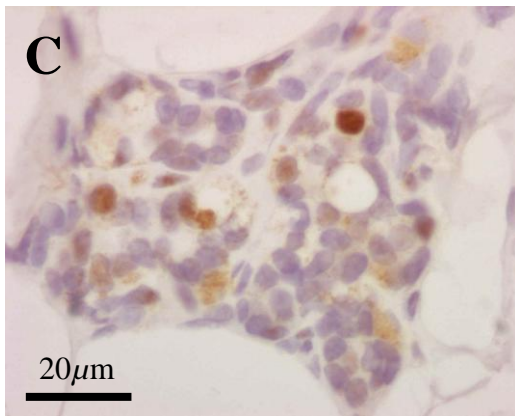
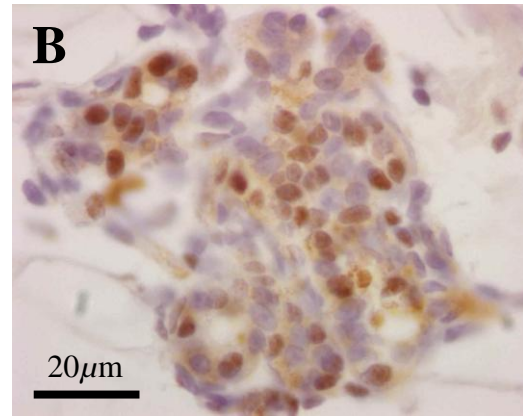
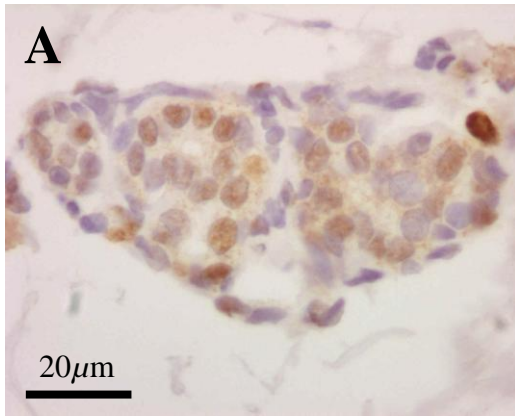


Abb.15 Anteil PCNA-positiver Zellen an den Zellen der mamären Drüsenendstücke der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent

Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \*  $p < 0,05$  versus Kontrolle



*Abb.16 PCNA Expression der Mamma  
Repräsentative Immunhistochemische Färbungen  
von PCNA in Brustdrüsen Schnitten der verschiedenen  
Behandlungsgruppen in 80facher Vergrößerung*

- A: Kontrolle*
- B: E2 0,6*
- C: 4-MBC 10*
- D: 4-MBC 33*
- E: 4-MBC 100*
- F: 4-MBC 333*
- G: 4-MBC 1000*

## 3.7 Hypophyse

### 3.7.1 ER $\alpha$ -Genexpression

Die hypophysäre ER $\alpha$ -Genexpression wurde durch alle Behandlungen erhöht, am stärksten durch 4-MBC 10. Mit Ausnahme der höchsten 4-MBC-Dosis waren diese auch signifikant. Es zeigte sich mit zunehmender 4-MBC-Dosis eine Abnahme der stimulierenden Wirkung, wobei die drei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen eine höhere Transkriptmenge hervorgerufen haben als Östradiol.

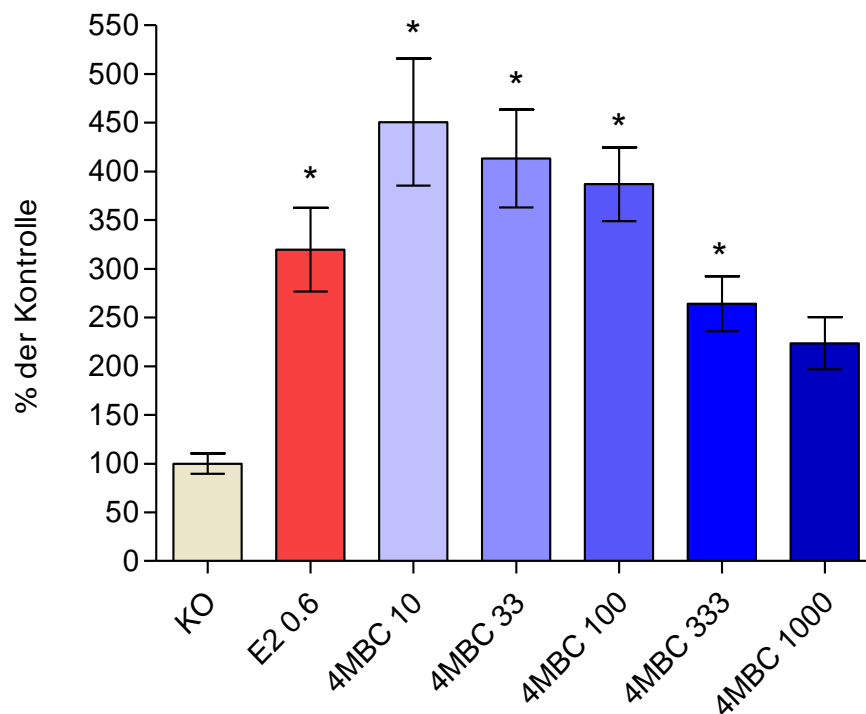


Abb.17 Hypophysäre ER $\alpha$ -Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12 / Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

### 3.7.2 ER $\beta$ -Genexpression

Alle Behandlungen konnten im Vergleich zu den Kontrolltieren eine stimulierende Wirkung auf die ER $\beta$ -Genexpression der Hypophyse entfalten, die für 4-MBC 10, 33, 100, 333 signifikant war. Die mit 4-MBC 33mg/kg Kg behandelten Tiere zeigten die höchste ER $\beta$ -Expression gefolgt von den anderen Behandlungsgruppen in der Reihenfolge 10 > 100 > 333 > 1000 > Östradiol. Wie auch bei der ER $\alpha$ -Expression nahm die insgesamt erhöhte ER $\beta$ -Transkriptmenge dosisabhängig ab.

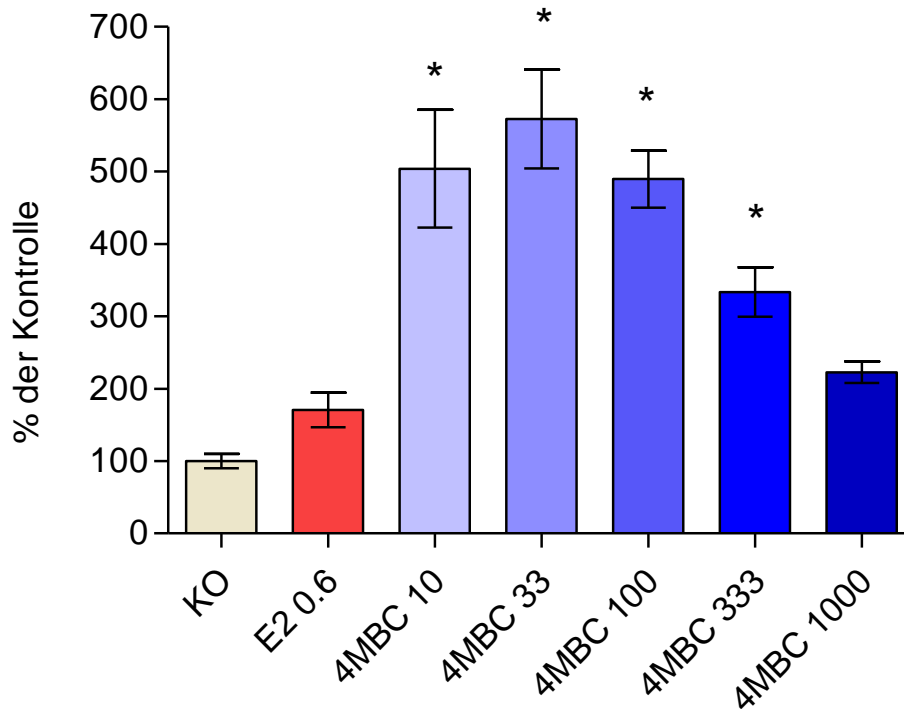


Abb.18 Hypophysäre ER $\beta$ -Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

### 3.7.3 LH $\beta$ -Genexpression

Durch Östradiolbehandlung konnte die hypophysäre LH $\beta$ -Genexpression signifikant supprimiert werden. Ohne signifikante Wirkung auf die Expression von LH $\beta$  war die Applikation von 33 und 100mg/kg KG 4-MBC, wobei 4-MBC 33 als einziges Regime eine leicht erhöhte LH $\beta$ -Transkription zeigte. Eine signifikante Verminderung konnte bei den mit 4-MBC 10, 333 und 1000mg/kg KG behandelten Tieren beobachtet werden. Zusammenfassend war eine glockenförmige Dosis-Wirkungs-Beziehung erkennbar, bei der 4-MBC sowohl in der getesteten niedrigsten Dosierung als auch in den hohen Dosen eine signifikante Suppression der Genexpression von LH $\beta$  herbeiführt, während die mittleren Dosierungen keine Veränderungen hervorrufen konnten.

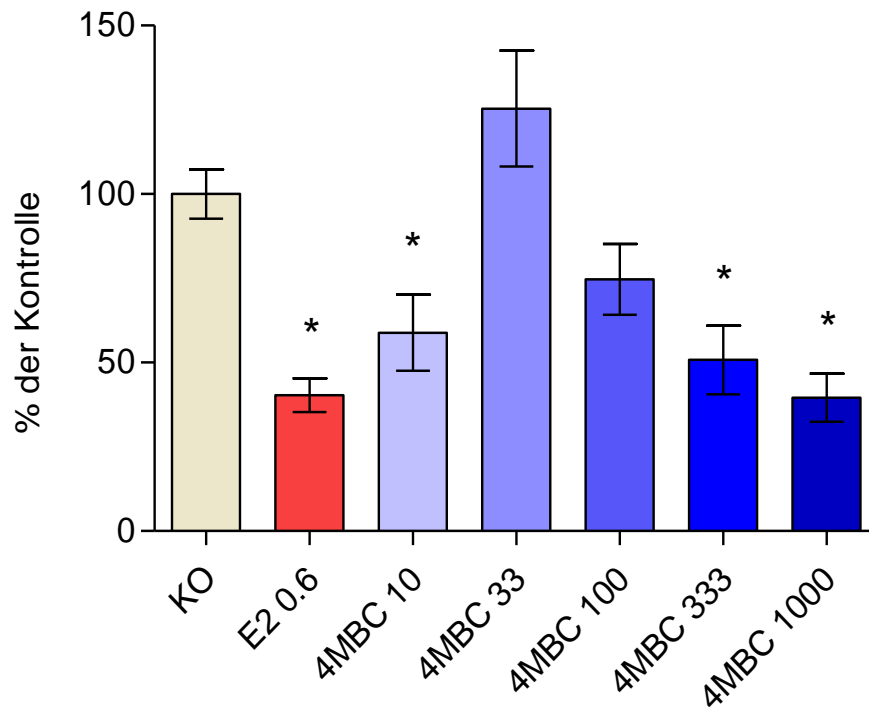


Abb.19 Hypophysäre LH $\beta$ -Genexpression der verschiedenen Behandlungsgruppen in Prozent der Kontrolle Mittelwerte und SEM, n=12/Gruppe, \* p<0,05 versus Kontrolle

## 4 Diskussion

Die durch diese Arbeit entstandenen Ergebnisse demonstrieren neben den uterotropen Effekten das östrogene Potential von 4-MBC. In allen untersuchten Organen zeigen vor allem die höheren 4-MBC-Dosierungen eine dem E2 gleichsinnige Wirkung, so dass der UV-Filter 4-MBC eindeutig xenoöstrogene Eigenschaften besitzt. Diese sind aufgrund der Erkenntnisse aus *in-vitro*-Versuchen (Mueller et al. 2003) vermutlich rezeptormediiert. Dabei konnte dargestellt werden, dass 4-MBC nicht nur molekularbiologisch nachweisbare Veränderungen, sondern auch zytologische und histomorphologische Effekte hervorruft.

Ein besonderes Anliegen dieser Untersuchung war eine Aufstellung von Dosiswirkungsbeziehungen, die letztlich eine Dosis der untersuchten Substanz festlegen sollte, bei der ein adverser Effekt ausgeschlossen werden kann (NOAEL) bzw. bei der ein signifikanter Effekt verursacht wird (LOAEL). Daher wurde für diesen Versuch ein breiter Dosisbereich des 4-MBC gewählt.

Neben dem von der OECD geforderten Uterotrophie-Test sollten dabei auch andere Organe auf mögliche Beeinflussungen durch die Testsubstanz untersucht werden, um hier möglicherweise organabhängige Effekte und Schwellenwerte aufzudecken. In den ausgewählten Organen des Reproduktionstrakts wurden mehrere Gene untersucht, um genspezifische Antworten eines Organs aufzeigen zu können. Auch Verhältnisänderungen der beiden Östrogenrezeptoren zueinander in den jeweiligen Organen können Auswirkungen auf die hormonelle Homöostase haben, weshalb auch diese in die Untersuchung miteinbezogen wurde. Damit wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals über die bisher bekannte östrogene Wirkung von 4-MBC im Uterus hinaus die hormonelle Aktivität dieses UV-Filters im Sinne des Konzepts des *multi-organic risk assessment* untersucht.

### 4.1 Effekte auf Stoffwechselfparameter

Während der fünftägigen Behandlung wurde durch die Gavage-Applikation mit E2 eine kontinuierliche, aber nicht signifikante Verringerung des absoluten Körpergewichts im Vergleich zur Kontrolle, wohl aber eine signifikante Änderung des Körpergewichts über den Behandlungszeitraum verursacht. Es ist bekannt, dass eine Ovariectomie eine Gewichtszunahme bewirkt, wohingegen eine zusätzliche E2-Administration oder aber die Gabe eines selektiven ER $\alpha$ -Liganden diesen Effekt rückgängig macht (Harris et al. 2002).

Alle mit 4-MBC behandelten Versuchsgruppen zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe eine Reduktion des Körpergewichts, dabei sank das Körpergewicht der mit 4-MBC-1000-Gruppe noch deutlich unter das durchschnittliche Gewicht der E2-Gruppe, so dass hier signifikante Änderungen sowohl des Körpergewichts als auch der Gewichtsänderung während der Behandlung zu beobachten waren. In Bezug auf die Gewichtsänderung der 4-MBC Gruppen zeigte sich eine deutliche Dosisabhängigkeit, d.h. mit zunehmender Dosis kam es zu einer stärkeren Gewichtsabnahme. Eine Ursache hierfür scheint die deutlich reduzierte Futterraufnahme vor allem bei den höheren 4-MBC-Dosen zu sein. Auch beim Futterverbrauch zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion. Hierbei ist anzumerken, dass beim Futterverbrauch schon eine signifikante Änderung ab 4-MBC 333 zu vermerken war, wohingegen eine signifikante Reduktion des Gewichts im Vergleich zur Kontrolle bzw. eine signifikante Gewichtsänderung erst ab 4-MBC 1000 zu beobachten war.

Durch die in der Leber stattfindenden Stoffwechselprozesse wird die Ausscheidung des Östrogens bewerkstelligt, gleichzeitig unterliegt dieses Organ dabei der hormonalen Kontrolle des Östrogens. Beispielhaft für diese Regulation wurde die Genexpression des IGF1 bestimmt, die durch E2 eine Repression erfährt (Krattenmacher et al. 1994). Zudem konnte nachgewiesen werden, dass es durch eine E2-Exposition nach Ovariectomie oder in der Postmenopause zu einer Senkung des IGF1-Serumspiegels bei gleichzeitig ansteigender GH-Sekretion kommt (Bottner und Wuttke 2006, Ho et al. 2003). Auch in diesem Versuch kam es durch E2 zu einer signifikanten Reduktion der IGF1-Transkriptmenge in der Leber. Die Behandlung mit 4-MBC führte zu einer dosisabhängigen Verringerung der IGF1-Expression, so dass hier ein dem Östrogen entsprechender Effekt nachgewiesen werden konnte. Außerdem kam es in der 4-MBC-1000-Gruppe zu einer noch stärkeren Inhibition als durch E2.

Interessanterweise exprimieren Hepatozyten ausschließlich den ER $\alpha$ -Subtyp (Alvaro et al. 2002). Eine Rezeptorvermittlung vorausgesetzt, erscheint in diesem Zusammenhang eine Signaltransduktion durch den ER $\alpha$ -Subtyp wahrscheinlich. ER $\beta$ , der sich in der Leber nur in Zellen des Gallengangsystems und den Kupffer'schen Sternzellen finden lässt, ist der ER $\alpha$ -Expression mengenmäßig stark unterlegen (Pelletier 2000). Der ER $\beta$ -Subtyp scheint in der hepatischen Genexpression östrogenregulierter Gene eine ER $\alpha$  modifizierende, wenn nicht gar entgegengesetzte Wirkung zu haben (Lindberg et al. 2003).

## 4.2 Beeinflussung der Reproduktionsorgane und übergeordneter Zentren

### 4.2.1 Uterus

Die besondere Bedeutung der Messung des Uterusfeuchtgewichts zur Aufdeckung der östrogenen Potenz einer Substanz liegt in der Handhabbarkeit als *screening*-Methode. Östrogene stimulieren bei ovariectomierten oder geschlechtsunreifen Ratten das Uteruswachstum, welches sich als erhöhtes Gewicht messen lässt. Im Gegensatz zu biochemischen Testsystemen wie Liganden-Bindungs-Assays kann auch eine Aussage zu einem biologischen Parameter gemacht werden.

Ein positiver Uterotrophie-Test des 4-MBC wurde erstmals 2001 beschrieben (Schlumpf et al. 2001) und ist zwischenzeitlich mehrfach bestätigt worden. Dabei ist ein positives Testergebnis offenbar unabhängig von der Darreichungsform (Tinwell et al. 2002). Auch in dem hier vorliegenden Experiment wurde als Positivkontrolle durch die E2-Behandlung eine Steigerung des Uterusgewichts um den Faktor drei im Vergleich zur Kontrolle bewirkt. Durch 4-MBC-Gabe kam es zu einer dosisabhängigen Zunahme des uterinen Feuchtgewichts. Signifikante Ergebnisse zeigten auch hier die beiden höheren 4-MBC-Dosierungen, wobei 4-MBC 1000 48,5% des E2-Effektes verursachte.

Untersuchungen an ER-*knock-out*-Mäusen haben den Stellenwert des ER $\alpha$  für den Uterus eindrücklich dargelegt. Der Verlust des ER $\beta$  resultiert bei einigen Parametern sogar in einer erhöhten Sensibilität des Uterus gegenüber E2 (Weihua et al. 2000) und es ist eine dem Wildtyp ähnliche Zunahme des Uterusgewichts durch E2 möglich (Harris 2007). Daher kann davon ausgegangen werden, dass 4-MBC in Abwesenheit des physiologischen Liganden E2 seine hormonelle Wirkung im Uterus über eine Aktivierung des ER $\alpha$  erfüllt.

Molekularbiologisches Korrelat des uterinen Wachstums stellt unter anderem die Hochregulation des Wachstumsfaktors IGF1 dar. Die Bedeutung dieses Faktors für eine Uterushypertrophie ist eindrücklich an IGF1-*knock-out*-Mäusen demonstriert worden, bei denen durch E2-Gabe kein Uteruswachstum erzeugt werden kann (Adesanya et al. 1999).

Erwartungsgemäß erhöhte E2 die IGF1-Transkription um das 3,5-Fache im Vergleich zur Kontrolle. Durch 4-MBC konnte eine dosisabhängige Steigerung der IGF1-Expression erzeugt werden. Interessanterweise kam es nur durch die höchste 4-MBC-Dosis zu einer signifikanten Stimulation; diese entsprach einer Verdopplung des E2-Effekts.

In Anbetracht des Uterotrophie-Tests würde man zumindest auch Signifikanzen der zweithöchsten 4-MBC-Dosis und des E2 erwarten. Eine mögliche Erklärung könnte sein, dass sich hier die molekularbiologischen Veränderungen bereits in makroskopischen



Veränderungen niedergeschlagen haben. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass es sich bei der IGF1-Hochregulation durch E2 auch bei Fortführung einer E2-Behandlung um eine flüchtige Veränderung handelt (Sahlin et al. 1994), d.h. die maximale Expression könnte vor dem Zeitpunkt der Messung bzw. Probengewinnung am Behandlungstag fünf liegen und würde daher nicht erfasst.

Die ER $\alpha$ -Genexpression wird sowohl durch E2 als auch durch 4-MBC nicht signifikant beeinflusst, wohingegen die ER $\beta$ -Transkriptmenge analog dem E2 durch alle 4-MBC-Dosierungen, wenn auch nicht eindeutig dosisabhängig, herunterreguliert wird. Die stärkste Repression durch 4-MBC erfährt die ER $\beta$ -Expression durch die Dosierung 333mg/kg und erreicht damit 95% des E2-Effekts. Dadurch ergibt sich eine Veränderung des uterinen ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Status zu Gunsten von ER $\alpha$  mit einem maximalen Verhältnis von 1:5. ER $\beta$  werden prodifferenzierende Eigenschaften und den ER $\alpha$ -vermittelten mitogenen Wirkmechanismen entgegengesetzte Funktionen zugeschrieben. Daher könnte eine subakute 4-MBC-Belastung unter der Voraussetzung eines unveränderten Rezeptorabbaus eine zumindest zeitweise erhöhte ER $\alpha$ -medierte Östrogenempfindlichkeit provozieren. Ähnliche Beobachtungen einer Verschiebung des ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Verhältnisses wird während der Pubertät mit Beginn der ovariellen Östrogensynthese beobachtet und wird in diesem Zusammenhang als rezep tive Reifung des Uterus gewertet (Morani et al. 2008). Zudem beobachteten Murata et al. in den Uteri ovariectomierter Ratten eine Hochregulation der ER $\beta$ -Expression, was durch eine E2-Substitution rückgängig gemacht wird (Murata et al. 2003). Die ER $\alpha$ -Expression wurde dabei weder durch Ovariectomie noch durch anschließende E2-Gabe verändert. Ausgehend von einer Ying-Yang-Beziehung der beiden ERs könnte das relative Überwiegen des ER $\alpha$  durch E2-Exposition erst eine uterine Reifung bzw. die Wiederherstellung nach Ovariectomie ermöglichen.

Eine chronische E2-Exposition hingegen führt im Sinne einer Sensitivitätsverminderung auch zu einer *Down*-Regulation des ER $\alpha$ . Vermutlich ist dieser Effekt durch die subakute Exposition weder durch E2 noch durch 4-MBC auslösbar gewesen. Aus Langzeitstudien ist bekannt, dass 4-MBC dosisabhängig auch eine Verringerung der ER $\alpha$ -Genexpression verursacht (Durrer et al. 2005), interessanterweise blieb in dieser Studie die ER $\beta$ -Expression auf mRNA- und Proteinebene nahezu unangetastet.

Der Komplementfaktor C3 ist im Uterus östrogenreguliert. Die physiologische Funktion besteht wahrscheinlich in der periovulatorischen Abwehr ascendierender Infektionen bei leicht geöffnetem Muttermund und dünnflüssigem Zervikalpfropf.

Die Aktivierung der Komplementfaktor-C3-Expression durch 4-MBC unterstreicht einen östrogenen Effekt des UV-Filters im Uterus. Ab einer Dosierung von 4-MBC 333 stieg sie sprunghaft an, wobei nur die höchste Dosis mit 75% des E2-Effekts eine signifikante Änderung hervorrief. Da die Hochregulation der C3-Genexpression durch selektive ER $\alpha$ -Liganden zwar in einer etwas geringeren Effizienz im Vergleich zu E2 hervorgerufen werden kann, liegt die Vermutung einer ER $\alpha$ -Mediation nahe (Harris et al. 2002). Im Falle der C3-Expression ist auch eine überspitzte Empfindlichkeit der ER $\beta$ -*knock-out*-Mäuse gegenüber E2 beschrieben (Weihua et al. 2000). Hingegen kann der ER $\beta$ -Agonist DPN keine C3-Expression induzieren (Frasor et al. 2003).

#### **4.2.2 Vagina**

Die Vaginalwand unterliegt wie auch die Gebärmutterschleimhaut zyklischen Veränderungen durch den Einfluss der Ovarialhormone. Anhand von zytologischen Abstrichen können die einzelnen Phasen des Zyklus verfolgt werden. In diesem Versuch wurden solche zytologischen Befunde erhoben, wobei in den Kontrolltieren und den 4-MBC-Dosierungen bis 100 mg/kg im Vaginalabstrich eine dem Diöstrus entsprechende Zellpopulation aus Leukozyten gefunden wurde. Unter Östrogenbehandlung treten keratinisierte, aufgequollene, abgeschilferte Epithelzellen in Erscheinung. Auch in dieser zytologischen Analyse verursachten die beiden höchsten 4-MBC-Dosierungen eine dem Östradiol entsprechende Zellbildveränderung, wie sie während des Östrus vorgefunden wird.

Im Gegensatz zu den Epithelzellen des Uterus wird durch Östrogen in den vaginalen Zellen eine Keratinisierung hervorgerufen, wodurch die Zellen Cornifin produzieren (Jetten et al. 1996). Laktobazillen benutzen die verhornten Zellen zur Produktion von Milchsäure, die das Scheidenmilieu sauer halten und somit einen Schutz vor ascendierenden Infektionen darstellen (Heinemann und Reid 2005).

Cornifin ist ein prolinreiches Protein, das als Vorläufer der inneren Schutzhülle von Korneozyten während der Keratinisierung auftritt. Als Ausdruck des vermehrten Zellumsatzes durch einen östrogenen Proliferationsreiz stellt die Verhornung der Epithelzellen eine spezielle Form des programmierten Zelltods dar (Ishida-Yamamoto et al. 1999). Die bekannte signifikante Steigerung der Cornifin-Expression durch Östradiol konnte in der vorliegenden Studie bestätigt werden. Hingegen zeichnet sich bei den mit 4-MBC behandelten Gruppen zwar eine im oberen Dosisbereich dosisabhängige Steigerung der Transkription ab, signifikante Steigerungen konnten jedoch nicht beobachtet werden. Durch 4MBC 1000 wurde nur ein Drittel im Vergleich zur E2-verursachten Genexpression induziert.

Der Kornifizierungsprozess des vaginalen Epithels beinhaltet sowohl proliferative als auch differenzierende Elemente. Die Epithelproliferation wird dabei über den ER $\alpha$  im Stroma, die simultane, funktionelle Differenzierung wie die Expression bestimmter Proteine über den ER $\alpha$  im Epithel selbst vermittelt (Cunha et al. 2004)

Für die vorliegende Diskrepanz zwischen offenkundigem zytologischem Befund und der Ebene der Genexpression liegt keine direkte Erklärung auf der Hand. Möglicherweise spielen auch hier zeitliche Faktoren eine Rolle. Ursächlich könnte auch eine im Vergleich zum Östradiol reduzierte Östrogenizität des 4-MBC sein, wodurch der Kornifizierungsprozess nicht in vollem Umfang getragen wird.

### **4.2.3 Mamma**

Wie alle weiblichen Reproduktionsorgane ist auch die Brustdrüse ein östrogenrezeptives Organ. Eine besonders lange Exposition durch Östrogene, z.B. durch frühe Menarche und späte Menopause, stellt einen etablierten Risikofaktor für Brustkrebs dar (Safe und Papineni 2006). Zurückgeführt wird dies unter anderem auf die proliferativen Eigenschaften des Östrogens, da bei erhöhten Proliferationsraten mehr Fehler bei der DNA-Replikation entstehen können (Gadducci et al. 2005). Mit der Entdeckung von östrogenaktiven Chemikalien ist die Sorge aufgetreten, dass auch sie das Brustkrebsrisiko beeinflussen könnten. Daher sollten bei der Evaluierung des 4-MBC auch mögliche Effekte auf dieses Organ miteinbezogen werden.

Histomorphologisch erschienen in den Kontrolltieren alle epithelialen Strukturen atrophisch. Es zeigten sich nur wenige Haufen von dicht gepackten terminalen Strukturen. Entsprechend des *Score*-Bewertungssystems konnten neben E2 auch die beiden höchsten 4-MBC-Dosierungen eine signifikante Änderung der Lumenausbildung in den terminalen Strukturen des Mammaepithels auslösen. Interessanterweise konnten die hohen 4-MBC-Gaben bei einigen Tieren auch einen *Score* 4 erreichen, wohingegen Östrogen maximal *Score* 3 verursachte. Auch die drei niedrigeren 4-MBC-Dosierungen führten zu leichteren morphologischen Veränderungen, die aber im Vergleich zur Kontrollgruppe keine signifikanten Unterschiede ergaben. Zudem konnte in manchen Lumen bei den östrogenbehandelten Tieren ein Sekret mit z.T. vesikulärem Erscheinungsbild festgestellt werden, das in den Kontrolltieren nicht zu finden war. Durch die Applikation von 4-MBC 1000 kam es zu einer deutlichen Ausprägung dieses sekretorischen Effekts.

Diese Beobachtungen decken sich bezüglich der E2-Wirkung mit denen der Arbeitsgruppe von Gallo et al. (Gallo et al. 2006). Durch Ovariectomie wird in der Mamma in Bezug auf das Epithel ein regressiver Prozess in Gang gesetzt: die kennzeichnenden Strukturen, terminale

Duktuli und Alveolarknospen, atrophieren, so dass nur noch schmale Milchgänge zu finden sind und eine lobuloalveoläre Morphologie fehlt. Der Niedergang der Histoarchitektur konnte durch Östrogensubstitution zum Teil restauriert werden. Hierbei blieb sowohl die ER $\alpha$ - als auch die ER $\beta$ -Expression des Epithels unverändert, wohingegen sowohl ER $\alpha$  und ER $\beta$  im Stroma leicht vermindert waren.

Die erste Beschreibung einer östrogeninduzierten, luminalen Entwicklung im postmenopausalen Rattenmodell wurde für eine chronische Applikationsform beschrieben (Rimoldi et al. 2007). Dabei zeigte die Kontrollgruppe auch ein Fehlen oder nur eine beginnende Entwicklung der Lumen. Bei beiden gewählten Östradioldosierungen kam es zu vollentwickelten Lumen, wobei die kleinere Dosis keine Sekretion zeigte. Die höhere E2-Dosis hingegen zeichnete sich hingegen bei ballonartiger Aufweitung der Lumen mit massiver Sekreteinlagerung durch ein Fehlen von terminalen Strukturen aus. Mit den Beobachtungen aus dem hier vorliegenden Subkutversuch sind Lumenentwicklung und Sekretion wahrscheinlich abhängig von Dosis und Dauer der E2-Exposition.

In Gesamtdarstellungen (*whole-mount analyses*) von Brustdrüsen von ovariectomierten Mäusen konnte durch E2 eine begrenzte Dilatation der Milchgänge induziert werden (Bocchinfuso et al. 2000). Der hier gemessene Effekt der Lumenerweiterung und Auflockerung der terminalen Strukturen entspricht daher wahrscheinlich dem östrogeninduzierten Wachstum von duktalem Strukturen. Ob die Sekretion dabei durch eine supraphysiologische Reizung des Epithels entsteht, kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Zur proliferationspezifischen Analyse wurde eine immunhistochemische Färbung mit PCNA gewählt, das in der S-Phase des Zellzyklus exprimiert wird und als Hilfsmittel in der Prognosebewertung des Mammakarzinoms Anwendung findet (Kurki et al 1986, Schimmelpennig et al.1993). Entsprechend den morphologischen Veränderungen zeigte sich auch hier eine dosisabhängige Expressionssteigerung von PCNA durch 4-MBC, jedoch waren diese Veränderungen aufgrund der strengen Statistik nicht signifikant. Östrogen hingegen führte zu einer signifikanten Steigerung der PCNA-Expression. Im Vergleich zu den Kontrolltieren entsprach dies einer Vervierfachung. Die Steigerung der PCNA-Expression durch Östrogen deckt sich mit Beobachtungen bei ähnlichen Versuchen (Gallo et al. 2006, Rimoldi et al. 2007)

Östrogen mediiert wahrscheinlich dabei seine proliferativen Eigenschaften über den ER $\alpha$ -Subtyp, da ein Fehlen des Rezeptors u.a. mit einer erniedrigten PCNA-Expression einhergeht (Tekmal et al. 2005). Neben direkt genotoxischen Effekten und Aneuploidie-Induktion

werden dem Östrogen durch rezeptormediierte Zellproliferation karzinogene Eigenschaften zugeschrieben (Russo J und Russo IH 2006). Dabei ist die via ER $\alpha$  direkte oder indirekte Stimulation von Wachstumsfaktoren der bis heute am besten erforschte Mechanismus (Russo J et al. 2006).

Safe und Papineni postulieren für die Veränderung des Brustkrebsrisikos durch xenoöstrogene Verbindungen eine Abhängigkeit von Dosis, pharmakologischem Charakter und Zeitpunkt der Exposition (Safe und Papineni 2006). Fetalentwicklung, Pubertät und Schwangerschaft stellen dabei kritische Perioden dar. Es wurde sogar vermutet, dass eine Exposition während der Fetalperiode ein Grund für die gestiegene Brustkrebsinzidenz in den letzten 50 Jahren sein könnte (Soto et al. 2008). Eine auffällige Störung durch Xenoöstrogene während der Entwicklungsphasen ist die beschleunigte oder verzögerte Differenzierung der TEBs, also genau den epithelialen Strukturen, die am meisten anfällig für Karzinogene sind (Fenton 2006).

Ziel dieser Arbeit war es, möglichst viele östrogenrezeptive Organe auf eine Beeinflussung durch 4-MBC zu untersuchen. Das hiernach gewählte Modell der ovariektomierten Ratte entspricht einem postmenopausalen Zustand. Nach der Fentonschen Definition liegt somit keine entwicklungsbedingte Störanfälligkeit der Mammae gegenüber Xenoöstrogenen vor. Als Untersuchungsobjekt diente das inguinale Brustdrüsenpaar, dass von den sechs Paaren das differenzierteste ist (Masso-Welch et al. 2000). Auch dies spräche für eine relative Unempfindlichkeit. Trotzdem konnte dieser Versuch zeigen, dass 4-MBC in der Lage ist, bei hoher Dosierung morphologische und zwar östrogenähnliche Veränderungen der Brustdrüsen hervorzurufen, auch wenn die Zellteilung hierbei nicht signifikant beeinflusst wurde. Daher sind adverse Effekte von 4-MBC auf die Brustdrüse nicht auszuschließen. Mögliche Veränderungen des Brustkrebsrisikos durch 4-MBC kann nur eine weitergehende Forschung zeigen.

#### **4.2.4 Hypophyse**

Als wichtiges Steuerungselement des hormonalen Gleichgewichts integriert die Hypophyse Informationen des Hypothalamus und der zirkulierenden Hormonspiegel. Für den physiologischen Ablauf des Zyklus ist ein präovulatorischer LH-*Peak* notwendig, der über einen positiven *Feedback*-Mechanismus durch fortlaufend ansteigende Östrogenkonzentrationen ausgelöst wird. Ansonsten supprimiert Östrogen die LH-Sekretion direkt in der Hypophyse sowie indirekt über die hypothalamische GnRH-Sekretion. Inzwischen ist bekannt, dass sowohl positive als auch negative *feedbacks* durch den ER $\alpha$ -Subtyp vermittelt werden. Dabei werden wahrscheinlich negative Mechanismen hauptsächlich

von einem ERE-unabhängigen Signalweg, positive über einen ERE-abhängigen getragen (Glidewell-Kenney et al. 2007 und 2008). Die genauen zellulären Wirkmechanismen sind aber bislang unbekannt.

Durch Ovariectomie kommt es aufgrund der fehlenden negativen Rückkopplung durch den überaktiven, hypothalamischen GnRH-Pulsgenerator und die hypertrophen Hypophysenvorderlappenzellen zu einem Anstieg der LH-Sekretion, die durch exogene Östrogenzufuhr aufgehoben werden kann (Sanchez-Criado et al. 2006). Das kann auf Ebene der hypophysären Genexpression für Östrogen anhand der  $\beta$ -Untereinheit des LH in diesem Experiment bestätigt werden. E2 suppressierte im Vergleich zur Kontrollgruppe die Transkriptmenge auf zwei Fünftel. Im Falle des 4-MBC zeigte sich, dass die östrogene Eigenschaft, die LH-Expression zu unterdrücken, dosisabhängig ist. Dabei konnten besonders hohe und niedrige Dosen diesen Effekt imitieren. Die mittleren Dosierungen führten zu keiner signifikanten Änderung im Vergleich zur Kontrollgruppe. Ob 4-MBC in diesem Bereich keine Auswirkungen hat oder ob sich hier verschiedene Wirkungen aufheben, kann anhand der erhobenen Daten nicht abschließend beurteilt werden.

Außerdem muss hier angemerkt werden, dass 4-MBC bei einer dreimonatigen Applikation von ca. 59 oder 285 mg 4-MBC als Futterzusatz eine Steigerung des Serum-LHs verursachte (Seidlova-Wuttke et al. 2006), was von den Autoren als möglicherweise antiöstrogener Effekt gedeutet wird. Die in diesem Versuch parallel erhobenen LH-Serum-Werte sind Thema einer separaten Dissertation und zeigten weder für 4-MBC noch für E2 signifikante Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Es zeigten sich jedoch leicht erhöhte LH-Werte im niedrigen Dosisbereich, wohingegen bei zunehmender Dosis sich dieser Effekt verkleinerte und die höchste Dosis sogar einen im Vergleich zur Kontrolle niedrigeren Wert zeigte (Kirschmeyer 2006). Diese Daten könnten für eine unterschiedliche Beeinflussung von LH-Sekretion und Produktion in Abhängigkeit der Dosis und dem Behandlungszeitraum sprechen. Besonders eindrücklich sind die Ergebnisse bezüglich  $ER\alpha$ - und  $ER\beta$ -Expression. Die  $ER\alpha$ -Expression wird durch Östrogen verdreifacht, wohingegen die  $ER\beta$ -Transkription nicht signifikant beeinflusst wird. Die  $ER\alpha$ -Expression zeigte für eine 4-MBC-Behandlung eine umgekehrt proportionale Dosisabhängigkeit, so dass die niedrigste 4-MBC-Dosierung im Vergleich zur Kontrolle eine Steigerung der  $ER\alpha$ -Transkriptmenge um den Faktor 4,5 verursachte. Ähnliche Ergebnisse lieferten die PCR-Analysen der  $ER\beta$ -Expression, wobei hier die zweitniedrigste 4-MBC Dosierung die höchsten Transkriptmengen hervorrief und zwar fast das Sechsfache der Expression in den Kontrolltieren. Im Gegensatz zu Östradiol, bei dem sich das Rezeptorverhältnis zu Gunsten des  $ER\alpha$  verschiebt, werden durch 4-MBC beide

ERs signifikant hochreguliert. Dabei kommt es durch 4-MBC sogar noch zu einer stärkeren Hochregulation der ER $\beta$ -Transkription. Somit muss die hypophysäre Wirkung in Bezug auf ER-Expression andere Mechanismen als E2 beinhalten. Denkbar wäre eine unterschiedliche Rekrutierung von Kofaktoren durch 4-MBC und E2, woraus möglicherweise eine genspezifische Regulation durch beide östrogen wirkenden Stoffe resultieren könnte. 4-MBC ist in der Lage sowohl ER $\alpha$  als auch ER $\beta$  zu induzieren und unterscheidet sich daher grundlegend in seiner hypophysären Wirkung von E2. Die gewebeabhängige Fähigkeit die verschiedenen ERs zu induzieren könnte eine SERM-Qualität des 4-MBC aufzeigen.

Von der östrogenen Autoregulation der ERs und deren Spleißvarianten in der Hypophyse wird vermutet, dass dies das Ansprechverhalten auf Östrogene moduliert und somit das *feedback* verändern könnte (Tena-Sempere et al. 2004). Untersuchungen zur zyklusabhängigen Expression der Rezeptoren zeigen allerdings bis heute kontroverse Ergebnisse.

Die Arbeitsgruppe um Sanchez-Criado et al. beobachtete eine erhöhte ER $\alpha$ -Expression im Proöstrus bei zyklusunabhängigem ER $\beta$  (Sanchez-Criado et al. 2005). Ähnliche immunhistochemische Ergebnisse zeigen sich bei Schafen in der Follikularphase, wobei auch hier eine Östrogensubstitution nach Ovariectomie erhöhte ER $\alpha$ -Werte in den gonadotropen Zellen verursachte (Clarke et al. 2005). Hingegen beobachteten Schreihöfer et al. auf mRNA-Ebene proöstrisch eine reduzierte ER $\beta$ -Transkription bei unverändertem ER $\alpha$  (Schreihöfer et al. 2000). Gemeinsam ist den Ergebnissen jedoch die Verschiebung des ER $\alpha$ /ER $\beta$ -Verhältnisses bei hoher GnRH-Pulsfrequenz und erhöhten Östrogenspiegeln.

Umso erstaunlicher sind daher die Beobachtungen bei ovariectomierten Tieren, die nach E2-Gabe keine veränderte ER $\alpha$ - oder ER $\beta$ -Expression zeigen (Mitchner et al. 1998, Sanchez-Criado 2005). Andere Untersuchungen hingegen zeigen eine unveränderte ER $\alpha$ -Expression bei reduzierter ER $\beta$ -Transkription (Tena-Sempere et al. 2004, Schreihöfer et al. 2000). Auch würde man nach Ovariectomie durch die fehlende Rückkopplung eine erhöhte ER $\alpha$ -Expression erwarten, jedoch wurde bislang nur eine erhöhte ER $\beta$ -Expression beobachtet (Tena-Sempere et al. 2004).

### 4.3 Abschließende Bemerkungen

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass alle untersuchten Organe des weiblichen Genitaltrakts einer Beeinflussung durch 4-MBC unterliegen und das 4-MBC eine östrogene Aktivität besitzt, die im Vergleich zu Östradiol aber eine geringere Potenz besitzt. Von 15 erhobenen Parametern zeigte sich am häufigsten (fünf Parameter) ein NOEL von 100mg/kg/d entsprechend einem LOEL von 333 mg/kg/d, drei von 15 Parametern wiesen ein NOEL von 333mg/kg/d auf. Dabei zeigten Stoffwechselfparameter, Leber, Uterus, Vagina und Mamma mindestens einen NOEL von 100 mg/kg/d. Eine Ausnahme besteht bei der Hypophyse sowie bei der ER $\beta$ -Genexpression des Uterus, bei denen ein solcher Wert nicht festgelegt werden kann, da alle getesteten Dosen einen Effekt verursachten. Das Steuerungselement Hypophyse und die Gebärmutter reagieren offensichtlich empfindlicher als andere Organe. Da jedwede Beeinflussung eines Organismus durch 4-MBC außer der gewünschten UV-Absorption als adverser Effekt zu bewerten ist, kann bei den getesteten Dosierungen kein Wert festgelegt werden, bei dem eine Störung des hormonellen Gleichgewichts ausgeschlossen werden kann. Erstaunlicherweise konnten bei Uterus und Vagina makroskopische bzw. zytologische Veränderungen schon bei niedrigen Dosen beobachtet werden, obwohl auf molekularbiologischer Ebene erst bei höheren Dosierungen oder aber gar keine Veränderungen zu finden waren. Es erscheint daher sinnvoll, bei der Evaluation endokriner Disruptoren jedes Organ mit unterschiedlichen Methoden und auf verschiedenen Ebenen zu untersuchen.

Voruntersuchungen haben gezeigt, dass 4-MBC eine Präferenz für ER $\beta$  zeigt, aber ebenso eine, wenn auch schwache, ER $\alpha$ -vermittelte Transaktivierung herbeiführen kann (Schreurs et al. 2002, Schlumpf et al. 2001 und 2004a, Müller et al. 2002). In einer Östrogenmangelsituation zeigt 4-MBC *in vivo* einen Agonismus am ER $\alpha$ , wofür zwei Effekte in Frage kommen. Zum einen findet sich diese Aktivität vor allem im höheren Dosisbereich, so dass ein Selektivitätsverlust in Bezug auf die Rezeptoren stattgefunden haben könnte, d.h. es erfolgt auch eine Aktivierung der Genexpression durch beide ER-Subtypen. Zum anderen kommt im Gegensatz zu *in-vitro*-Versuchen auch eine Metabolisierung des 4-MBC in Frage. Die Arbeitsgruppe um Völkel et al. beschreibt nach oraler Administration des 4-MBC mehrere Metabolite, wobei das 4-MBC einem hepatischen *first-pass*-Effekt unterliegt und es selbst nur in verhältnismäßig geringen Konzentrationen messbar ist (Völkel et al. 2006). Von den Metaboliten selbst existieren bisher keine Erkenntnisse über eine mögliche Östrogenizität oder Rezeptorpräferenz.



Wichtig für die Risikoevaluation für den Menschen ist, ob es durch eine dermale Applikation von 4-MBC überhaupt zu einer systemischen Exposition kommen kann. Dies konnte die Arbeitsgruppe um Janjua et al. für eine einwöchige Applikation einer Hautcreme mit 10% 4-MBC-Gehalt nachweisen. Dabei ließ sich 4-MBC sowohl im Plasma in einer Konzentration von 20ng/ml und Urin von 5 bzw. 7ng/ml finden, wobei sich keine Interferenzen mit der Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse zeigten (Janjua et al. 2004). Soeborg et al. vermuten jedoch eine höhere dermale Permeation bei geschädigter Haut (Soeborg et al. 2007). Auch Schauer et al. konnten nach dermalen Applikation systemisch messbare Konzentrationen des 4-MBC oder dessen Metabolite bei Menschen und Ratten finden, sehen aber eine vergleichsweise ausgedehntere Biotransformation in der Ratte (Schauer et al. 2006).

In dem gewählten Versuchsmodell wurde 4-MBC oral appliziert. Eine Exposition des Menschen über eine Akkumulation dieses lipophilen UV-Filters in der Nahrung erscheint daher möglich, zumal Untersuchungen an Fischen in Schweizer Seen und Flüssen messbare Belastungen mit diesem UV-Filter gezeigt haben (Buser et al. 2006). Bedacht werden sollte an dieser Stelle, dass eine mögliche Akkumulation des Stoffes im Fettgewebe zu höheren Expositionswerten und längerer Expositionsdauer führen kann, als es durch einen kurzfristigen Kontakt wie z.B. das Auftragen einer Sonnencreme kommen könnte.

Hinweise verdichten sich, dass Gemische von xenoöstrogenen Substanzen zu einem Synergismus ihrer Effekte führen können. Unlängst wurde in *in-vitro*-Versuchen dieser Sachverhalt auch für 4-MBC dargestellt (Kunz und Fent 2006, Heneweer et al. 2005). Alarmierend erscheint in diesem Zusammenhang die Vielfalt möglicher oder nachweislicher endokriner Disruptoren.

Auch wenn in diesem Versuch die getesteten Dosierungen im Vergleich zum E2 sich um den Faktor 17 (10 mg/kg/d) bis Faktor 1700 (1000 mg/kg/d) unterscheiden, kann dem 4-MBC eine Unbedenklichkeit in der Verwendung als Lichtabsorber nicht bescheinigt werden.

Zwar ist eine Extrapolation der Ergebnisse im Rattenmodell auf den Menschen nicht ohne weiteres möglich und als kritisch zu bewerten, jedoch kann bei hoch konserviertem Hormonsystem ein Risiko für den Menschen, insbesondere während hormonempfindlicher Phasen nicht ausgeschlossen werden. Von einem weiteren Gebrauch von 4-MBC als UV-Filter ist daher abzusehen.

## 5 Zusammenfassung

UV-Filter repräsentieren eine neue Klasse endokriner Disruptoren mit zumeist xenoöstrogenen Eigenschaften, die im überwiegenden Anteil wahrscheinlich rezeptorvermittelt sind. Durch mehrere *Screening*-Verfahren insbesondere den Uterotrophie-Test wurde dabei der Lichtabsorber 4-MBC als Chemikalie mit östrogenen Potenz identifiziert.

Im Rahmen des EURISKED-Projekts sollte in diesem Versuch neben dem von der OECD geforderten *screening*-artigen Uterotrophie-Test das xenoöstrogene Potential des 4-MBC auch in weiteren Organen charakterisiert werden. Da nahezu alle Organe östrogenrezeptiv sind, die Östrogenwirkung jedoch abhängig von Zellausstattung und Liganden gewebe- und genspezifisch ausfallen kann, erscheint eine gewissenhafte Risikobewertung eines solchen Stoffes nur multi-organ bezogen sinnvoll (*multi-organ risk assesment*). Daher wurden mehrere Organe des weiblichen Reproduktionstrakts (Uterus, Vagina, Mamma), die übergeordnete Hypophyse und die Leber untersucht, um organabhängigen Auswirkungen Rechnung zu tragen. Zudem wurden sie auf molekularbiologischer und histologischer Ebene untersucht, um letztlich NOEL und LOEL des 4-MBC benennen zu können.

In einem fünftägigen Versuch wurden hierzu ovariektomierte Sprague-Dawley-Ratten in fünf Dosierungen und einem breiten Dosisbereich (10mg/kg/d bis 1000mg/kg/d) mit 4-MBC durch Gavage-Applikation behandelt und mit den Kontrollgruppen verglichen. Als Kontrollen fungierten ovariektomierte Ratten ohne Behandlung (alleinige Gavage mit Olivenöl) sowie eine mit Östradiol behandelte Gruppe (600µg/mg/d).

In dieser Arbeit konnte 4-MBC eindeutig als xenoöstrogene Substanz identifiziert werden, wenn auch mit einer vielfach schwächeren Potenz als Östradiol.

Neben der Bestätigung des positiven Uterotrophie-Tests, bei dem die 4-MBC-Höchstdosis 48,5% des Effekts von E2 auslöste, konnte gezeigt werden, dass 4-MBC auch auf molekularbiologischer Ebene eine E2-Wirkung imitiert. 4-MBC zeigte dem Östrogen entsprechende Eigenschaften wie z.B. im Uterus eine signifikante Expression des Wachstumsfaktors IGF1 zu induzieren bzw. in der Leber zu reprimieren. Hierbei zeigte sich eine klare Dosisabhängigkeit. Entsprechende Ergebnisse zeigten sich für die uterine Expression des Komplementfaktors C3.

In der Vagina kam es ab einer Dosierung von 333mg/kg/d zum Nachweis eines östrusartigen Zellbildes mit aufgequollenen, keratinisierten Epithelzellen. Auch die Cornifinexpression

erfährt analog dem Östradiol zumindest im oberen Dosisbereich eine dosisabhängige, wenn auch nicht signifikante Steigerung durch 4-MBC.

Aufgrund der Gewebheterogenität der Brustdrüse sind PCR-Analysen schwierig zu beurteilen, weshalb für xenoöstrogene Effekte des 4-MBC auf dieses Organ histomorphologische und immunhistochemische Methoden gewählt wurden. Für die morphologische Beurteilung wurde ein *Score*-Bewertungssystem herangezogen, in dem die luminale Entwicklung der Endstücke des Drüsenepithels von eins bis fünf bewertet wurde. Im Median erreichten die beiden höheren 4-MBC Dosierungen einen *Score* von 3 bzw. 4, wohingegen Östradiol nur *Score* 2 bzw. 3 erreichte. Erwähnenswert ist auch die durch Östrogen induzierte Sekreteinlagerung in das Lumen, die in der 4-MBC Höchstdosis ein fulminant vesikuläres Erscheinungsbild bekommt.

Aufgrund seiner mitogenen Eigenschaften wird dem Östrogen eine Rolle in der Entstehung des Mammakarzinoms zugeschrieben. Durch eine immunhistochemische Färbung konnte eine klar dosisabhängige Steigerung der Expression des Proliferationsmarkers PCNA durch 4-MBC nachgewiesen werden, die hingegen zu Östradiol aber keine Signifikanzen zur Negativkontrolle erreichte.

Interessante Ergebnisse konnten bei der Expression der  $\beta$ -Untereinheit des luteinisierenden Hormons (LH) in der Hypophyse gefunden werden, wo sich ein glockenförmiges Abhängigkeitsverhältnis abzeichnet. Nur die hohen und niedrigen 4-MBC-Konzentrationen konnten entsprechend einem östrogenen Effekt eine signifikante Repression herbeiführen. Diese Daten könnten für eine unterschiedliche Beeinflussung von LH-Sekretion und LH-Produktion in Abhängigkeit der Dosis sprechen. Möglicherweise deuten sich hier partialagonistische / -antagonistische Effekte an.

Die Expression beider ERs in der Hypophyse, insbesondere des ER $\beta$ , wurde durch 4-MBC induziert, wobei diese Fähigkeit mit steigender Dosierung sank. E2 induziert hingegen nur die ER $\alpha$ -Expression. 4-MBC verursacht somit eine zum Östrogen komplementäre Verschiebung der Rezeptorverhältnisse, was Folgen für die *Feedback*-Mechanismen in diesem Steuerungselement haben könnte. Im Gegensatz hierzu zeigt 4-MBC im Uterus eine dem Östrogen analoge Aktionsweise, die ER $\beta$ -Expression zu reprimieren, wohingegen die ER $\alpha$ -Expression unangetastet bleibt. Dieser Sachverhalt könnte 4-MBC als SERM identifizieren.

Von 15 erhobenen Parametern zeigte sich am häufigsten (fünf Parameter) ein NOEL von 100mg/kg, entsprechend einem LOEL von 333 mg/kg, drei von 15 Parametern wiesen ein NOEL von 333mg/kg auf. Die Ergebnisse weisen jedoch Hypophyse und Uterus als sensible Organe aus, bei denen kein NOEL festgelegt werden kann. Da jedwede Beeinflussung eines

Organismus durch 4-MBC außer der gewünschten UV-Absorption als adverser Effekt zu bewerten ist, kann bei den getesteten Dosierungen eine Störung des hormonellen Gleichgewichts nicht ausgeschlossen werden. Von einem weiteren Gebrauch des 4-MBC als Lichtabsorber sollte daher abgesehen werden.

## 6 Literaturverzeichnis

Adesanya OO, Zhou J, Samathanam C, Powell-Braxton L, Bondy CA (1999): Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 3287-3291

Alvaro D, Alpini G, Onori P, Franchitto A, Glaser SS, Le Sage G, Folli F, Attili AF, Gaudio E (2002): Alpha and beta estrogen receptors and the biliary tree. *Mol Cell Endocrinol* 193, 105-108

Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA (1997): The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* 62(3), 268-303

Anway MD, Skinner MK (2006): Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors. *Endocrinology* 147(6 Suppl), S43-49

Bjornstrom L, Sjoberg M (2005): Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol* 19(4), 833-842

Bocchinfuso WP, Lindzey JK, Hewitt SC, Clark JA, Myers PH, Cooper R, Korach KS (2000): Induction of mammary gland development in estrogen receptor-alpha knockout mice. *Endocrinology* 141(8), 2982-2994

Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W (1998): Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect* 106(9), 551-557

Bottner M, Wuttke W (2006): Chronic treatment with physiological doses of estradiol affects the GH-IGF-1 axis and fat metabolism in young and middle-aged ovariectomized rats. *Biogerontology* 7, 91-100

Brown RW, Chirala R (1995): Utility of microwave-citrate antigen retrieval in diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* 8(5), 515-520

Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* 389(6652), 753-758

Buchanan DL, Kurita T, Taylor JA, Lubahn DB, Cunha GR, Cooke PS (1998): Role of stromal and epithelial estrogen receptors in vaginal epithelial proliferation, stratification, and cornification. *Endocrinology* 139(10), 4345-4352

Buser HR, Balmer ME, Schmid P, Kohler M (2006): Occurrence of UV filters 4-methylbenzylidene camphor and octocrylene in fish from various Swiss rivers with inputs from wastewater treatment plants. *Environ Sci Technol* 40(5), 1427-1431

Castles CG, Oesterreich S, Hansen R, Fuqua SA (1997): Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* 62(2-3), 155-163

Cenni B, Picard D (1999): Ligand-independent Activation of Steroid Receptors: New Role for Old Players. *Trends Endocrinol Metab* 10, 41-46

Chen DB, Bird IM, Zheng J, Magness RR (2004): Membrane estrogen receptor-dependent extracellular signal-regulated kinase pathway mediates acute activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen in uterine artery endothelial cells. *Endocrinology* 145(1), 113-125

Cheng G, Weihua Z, Warner M, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptors ER alpha and ER beta in proliferation in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(11), 3739-3746

Chin WW, Godine JE, Klein DR, Chang AS, Tan LK, Habener JF (1983): Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of lutropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80(15), 4649-4653

Clarke IJ, Tobin VA, Pompolo S, Pereira A (2005): Effects of changing gonadotropin-releasing hormone pulse frequency and estrogen treatment on levels of estradiol receptor-alpha and induction of Fos and phosphorylated cyclic adenosine monophosphate response element binding protein in pituitary gonadotropes: studies in hypothalamo-pituitary disconnected ewes. *Endocrinology* 146(3), 1128-1137

Cooke PS, Buchanan DL, Lubahn DB, Cunha GR (1998): Mechanism of estrogen action: lessons from the estrogen receptor-alpha knockout mouse. *Biol Reprod* 59(3), 470-475

Couse JF, Korach KS (1999): Estrogen receptor null mice: what have we learned and where will they lead us? *Endocr Rev* 20(3), 358-417

Couse JF, Lindzey J, Grandien K, Gustafsson JA, Korach KS (1997): 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(11), 4613-4621

Crews D, McLachlan JA (2006): Epigenetics, Evolution, Endocrine Disruption, Health and Disease. *Endocrinology* 147(Supplement), 4-10

Cunha GR, Young P, Hom YK, Cooke PS, Taylor JA, Lubahn DB (1997): Elucidation of a role for stromal steroid hormone receptors in mammary gland growth and development using tissue recombinants. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2(4), 393-402

Cunha GR, Cooke PS, Kurita T (2004): Role of stromal-epithelial interactions in hormonal responses. *Arch Histol Cytol* 67(5), 417-434

Dechering K, Boersma C, Mosselman S (2000): Estrogen receptors alpha and beta: two receptors of a kind? *Curr Med Chem* 7(5), 561-576

Diez-Perez A (2006): Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq Bras Endocrinol Metabol* 50(4), 720-734

Durrer S, Maerkel K, Schlumpf M, Lichtensteiger W (2005): Estrogen target gene regulation and coactivator expression in rat uterus after developmental exposure to the ultraviolet filter 4-methylbenzylidene camphor. *Endocrinology* 146, 2130-2139

Fenton SE (2006): Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: early exposure and later life consequences. *Endocrinology* 147(6 Suppl), S18-24

Filby AL, Tyler CR (2007): Cloning and characterization of cDNAs for hormones and/or receptors of growth hormone, insulin-like growth factor-I, thyroid hormone, and corticosteroid and the gender-, tissue-, and developmental-specific expression of their mRNA transcripts in fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Gen Comp Endocrinol* 150(1), 151-163

Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS (2003): Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* 144(7), 3159-3166

Gadducci A, Biglia N, Sismondi P, Genazzani AR (2005): Breast cancer and sex steroids: critical review of epidemiological, experimental and clinical investigations on etiopathogenesis, chemoprevention and endocrine treatment of breast cancer. *Gynecol Endocrinol* 20(6), 343-360

Gallagher RP (2005): Sunscreens in melanoma and skin cancer prevention. *CMAJ* 173(3), 244-245

Gallo D, Zannoni GF, Martinelli E, Ferlini C, Fabrizi M, Riva A, Morazzoni P, Bombardelli E, Scambia G (2006): Estradiol and phytoestrogens differently influence the rodent postmenopausal mammary gland. *Menopause* 13(1), 72-79

Glidewell-Kenney C, Hurley LA, Pfaff L, Weiss J, Levine JE, Jameson JL (2007): Nonclassical estrogen receptor alpha signaling mediates negative feedback in the female mouse reproductive axis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(19), 8173-8177



Glidewell-Kenney C, Weiss J, Hurley LA, Levine JE and Jameson JL (2008): Estrogen receptor alpha signaling pathways differentially regulate gonadotropin subunit gene expression and serum follicle-stimulating hormone in the female mouse. *Endocrinology* 149(8), 4168-4176

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornert JM, Argos P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320(6058), 134-139

Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002): Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346(5), 340-352

Hall JM, Couse JF, Korach KS (2001): The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 276(40), 36869-36872

Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, Barnes DM, Gillett CE, Camplejohn R, Dover R (1990): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 162(4), 285-294

Harris HA (2007): Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 21(1), 1-13

Harris HA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS (2002): Characterization of the Biological Roles of the Estrogen Receptors, ERalpha and ERbeta, in Estrogen Target Tissues in Vivo through the Use of an ERalpha-Selective Ligand. *Endocrinology* 143, 4172-4177

Haschek WM: *Handbook of Toxicologic Pathology*. 1.Auflage; Academic Press Inc, o.O., 1991

Heinemann C, Reid G (2005): Vaginal microbial diversity among postmenopausal women with and without hormone replacement therapy. *Can J Microbiol* 51(9), 777-781

Heneweer M, Muusse M, van den Berg M, Sanderson JT (2005): Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* 208(2), 170-177

Hewitt SC, Korach KS (2003): Oestrogen receptor knockout mice: roles for oestrogen receptors alpha and beta in reproductive tissues. *Reproduction* 125(2), 143-149

Hewitt SC, Couse JF, Korach KS (2000): Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor knockout mice: what their phenotypes reveal about mechanisms of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2, 345-352

Hilakivi-Clarke L, Cho E, de Assis S, Olivo S, Ealley E, Bouker KB, Welch JN, Khan G, Clarke R, Cabanes A (2001): Maternal and prepubertal diet, mammary development and breast cancer risk. *J Nutr* 131(1), 154S-157S

Ho KK, O'Sullivan AJ, Wolthers T, Leung KC (2003): Metabolic effects of oestrogens: impact of the route of administration. *Ann Endocrinol* 64: 170-177

Hong H, Tong W, Fang H, Shi L, Xie Q, Wu J, Perkins R, Walker JD, Branham W, Sheehan DM (2002): Prediction of estrogen receptor binding for 58,000 chemicals using an integrated system of a tree-based model with structural alerts. *Environ Health Perspect* 110(1), 29-36

Inui M, Adachi T, Takenaka S, Inui H, Nakazawa M, Ueda M, Watanabe H, Mori C, Iguchi T, Miyatake K (2003): Effect of UV screens and preservatives on vitellogenin and choriogenin production in male medaka (*Oryzias latipes*). *Toxicology* 194, 43-50

Ishida-Yamamoto A, Tanaka H, Nakane H, Takahashi H, Hashimoto Y, Iizuka H (1999): Programmed cell death in normal epidermis and loricrin keratoderma. Multiple functions of profilaggrin in keratinization. *J Investig Dermatol Symp Proc* 4(2), 145-149

Jahnke GD, Choksi NY, Moore JA, Shelby MD (2004): Thyroid toxicants: assessing reproductive health effects. *Environ Health Perspect* 112(3), 363-368

Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, Wulf HC (2004): Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Invest Dermatol* 123(1), 57-61

Jetten AM, De Luca LM, Nelson K, Schroeder W, Burlingame S, Fujimoto W (1996): Regulation of cornifin alpha expression in the vaginal and uterine epithelium by estrogen and retinoic acid. *Mol Cell Endocrinol* 123(1), 7-15

Kanno J, Onyon L, Peddada S, Ashby J, Jacob E, Owens W (2003): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect* 111(12), 1530-1549

Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA (2000): Estrogen receptor transcription and transactivation: Estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta: regulation by selective estrogen receptor modulators and importance in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2(5), 335-344

Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS (1996): Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endocrinol* 10(2), 119-131

Kirk CJ, Harris RM, Wood DM, Waring RH, Hughes PJ (2001): Do dietary phytoestrogens influence susceptibility to hormone-dependent cancer by disrupting the metabolism of endogenous oestrogens? *Biochem Soc Trans* 29(Pt 2), 209-216

Kirschmeyer P (2006): Schriftliche Mitteilung, unveröffentlicht

Knobil E (1980): The neuroendocrine control of menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res* 36: 53-88

Koehler KF, Helguero LA, Haldosen LA, Warner M, Gustafsson JA (2005): Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr Rev* 26(3), 465-478

Krattenmacher R, Knauthe R, Parczyk K, Walker A, Hilgenfeldt U, Fritzemeier KH (1994): Estrogen action on hepatic synthesis of angiotensin and IGF-1: direct and indirect estrogen effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* 48, 207-214

Kuiper GG, Enmark E, Pelto-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(12), 5925-5930

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3), 863-870

Kunz PY, Fent K (2006): Estrogenic activity of UV filters mixtures. *Toxicol Appl Pharmacol* 217(1), 86-99

Kurki P, Vanderlaan M, Dolbeare F, Gray J, Tan EM (1986): Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 166(1), 209-219

Le Roith D, Bondy C, Yakar S, Liu JL, Butler A (2001): The somatomedin hypothesis: 2001. *Endocr Rev* 22(1), 53-74

Li X, Huang J, Yi P, Bambara RA, Hilf R, Muyan M (2004): Single-chain estrogen receptors (ERs) reveal that the ERalpha/beta heterodimer emulates functions of the ERalpha dimer in genomic estrogen signaling pathways. *Mol Cell Biol* 24(17), 7681-7694

Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)- $\beta$  reduces ER $\alpha$ -regulated gene transcription, supporting a ``Ying Yang`` relationship between ER $\alpha$  and ER $\beta$  in mice. *Mol Endocrinol* 17, 203-208

Ma R, Cotton B, Lichtensteiger W, Schlumpf M (2003): UV filters with antagonistic action at androgen receptors in the MDA-kb2 cell transcriptional-activation assay. *Toxicol Sci* 74, 43-50

Maier T, Korting HC (2005): Sunscreens - which and what for? *Skin Pharmacol Physiol* 18(6), 253-262

Masso-Welch PA, Darcy KM, Stangle-Castor NC, Ip MM (2000): A developmental atlas of rat mammary gland histology. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2), 165-185

McInerney EM, Weis KE, Sun J, Mosselman S, Katzenellenbogen BS (1998): Transcription activation by the human estrogen receptor subtype beta (ER beta) studied with ER beta and ER alpha receptor chimeras. *Endocrinology* 139(11), 4513-4522

Misumi Y, Sohda M, Ikehara Y (1990): Nucleotide and deduced amino acid sequence of rat complement C3. *Nucleic Acids Res* 18(8), 2178

Mitchner NA, Garlick C, Ben-Jonathan N (1998): Cellular distribution and gene regulation of estrogen receptors alpha and beta in the rat pituitary gland. *Endocrinology* 139(9), 3976-3983

Morani A, Warner M, Gustafsson JA (2008): Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alpha and beta in epithelial tissues. *J Intern Med* 264(2), 128-142

Mueller SO (2004): Xenoestrogens: mechanisms of action and detection. *Anal Bioanal Chem* 378(3), 582-587

Mueller SO, Clark JA, Myers PH and Korach KS (2002): Mammary gland development in adult mice requires epithelial and stromal estrogen receptor alpha. *Endocrinology* 143(6), 2357-2365

Mueller SO, Kling M, Arifin Firzani P, Mecky A, Duranti E, Shields-Botella J, Delansorne R, Broschard T, Kramer PJ (2003): Activation of estrogen receptor alpha and ERbeta by 4-methylbenzylidene-camphor in human and rat cells: comparison with phyto- and xenoestrogens. *Toxicol Lett* 142(1-2), 89-101

Murata T, Narita K, Honda K, Matsukawa S, Higuchi T (2003): Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. *Endocr J* 50(5), 579-587

Murphy LJ, Friesen HG (1988): Differential effects of estrogen and growth hormone on uterine and hepatic insulin-like growth factor I gene expression in the ovariectomized rat. *Endocrinology* 122, 325-332

Murphy LJ, Murphy LC, Friesen HG (1987): Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* 1, 445-450

Navarrete MA, Maier CM, Falzoni R, Quadros LG, Lima GR, Baracat EC, Nazario AC (2005): Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. *Breast Cancer Res* 7(3), R306-313

Nazario AC, De Lima GR, Simoes MJ, Novo NF (1995): Cell kinetics of the human mammary lobule during the proliferative and secretory phase of the menstrual cycle. *Bull Assoc Anat (Nancy)* 79(244), 23-27

Nilsson S, Gustafsson JA (2002): Biological role of estrogen and estrogen receptors. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 37(1), 1-28

Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81(4), 1535-1565

Norfleet AM, Thomas ML, Gametchu B, Watson CS (1999): Estrogen receptor-alpha detected on the plasma membrane of aldehyde-fixed GH3/B6/F10 rat pituitary tumor cells by enzyme-linked immunocytochemistry. *Endocrinology* 140(8), 3805-3814

Ordög T, Knobil E (1995): Estradiol and the inhibition of the hypothalamoc gonadotropin-releasing hormone pulse generator activity in the rhesus monkey. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 5813-5816

Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S (1997): Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 272(41), 25832-25838

Paunesku T, Mittal S, Protic M, Oryhon J, Korolev SV, Joachimiak A, Woloschak GE (2001): Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int J Radiat Biol* 77(10), 1007-1021

Pelletier G (2000): Localization of androgen and estrogen receptors in rat and primate tissues. *Histol Histopathol* 15(4), 1261-1270

Petersen SL, Ottem EN, Carpenter CD (2003): Direct and indirect regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons by estradiol. *Biol Reprod* 69(6), 1771-1778

Rimoldi G, Christoffel J, Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2007): Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus, and vagina. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1, 62-68

Russo IH, Russo J (1978): Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst* 61(6), 1439-1449

Russo J, Russo IH (1980): Influence of differentiation and cell kinetics on the susceptibility of the rat mammary gland to carcinogenesis. *Cancer Res* 40(8 Pt 1), 2677-2687

Russo J, Russo IH (2006): The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102(1-5), 89-96

Russo J, Fernandez SV, Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, Garber J, Russo IH (2006): 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J* 20(10), 1622-1634

Safe S, Papineni S (2006): The role of xenoestrogenic compounds in the development of breast cancer. *Trends Pharmacol Sci* 27(8), 447-454

Sahlin L, Norstedt G, Eriksson H (1994): Estrogen regulation of the estrogen receptor and insulinlike growth factor-I in the rat uterus: a potential coupling between effects of estrogen and IGF-I. *Steroids* 59(7), 421-430

Saji S, Jensen EV, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptors alpha and beta in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1), 337-342

Saji S, Sakaguchi H, Andersson S, Warner M, Gustafsson J (2001): Quantitative analysis of estrogen receptor proteins in rat mammary gland. *Endocrinology* 142(7), 3177-3186

Sanchez-Criado JE, Martin De Las Mulas J, Bellido C, Tena-Sempere M, Aguilar R, Blanco A (2004): Biological role of pituitary estrogen receptors ERalpha and ERbeta on progesterone receptor expression and action and on gonadotropin and prolactin secretion in the rat. *Neuroendocrinology* 79(5), 247-258

Sanchez-Criado JE, de Las Mulas JM, Bellido C, Aguilar R, Garrido-Gracia JC (2005): Gonadotrope oestrogen receptor-alpha and -beta and progesterone receptor immunoreactivity after ovariectomy and exposure to oestradiol benzoate, tamoxifen or raloxifene in the rat: correlation with LH secretion. *J Endocrinol* 184(1), 59-68

Sanchez-Criado JE, de Las Mulas JM, Bellido C, Navarro VM, Aguilar R, Garrido-Gracia JC, Malagon MM, Tena-Sempere M, Blanco A (2006): Gonadotropin-secreting cells in ovariectomized rats treated with different oestrogen receptor ligands: a modulatory role for ERbeta in the gonadotrope? *J Endocrinol* 188(2), 167-177

Schauer UM, Volkel W, Heusener A, Colnot T, Broschard TH, von Landenberg F, Dekant W (2006): Kinetics of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats and humans after dermal application. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(2), 339-346

Schedin P, Mitrenga T, Kaeck M (2000): Estrous cycle regulation of mammary epithelial cell proliferation, differentiation, and death in the Sprague-Dawley rat: a model for investigating the role of estrous cycling in mammary carcinogenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 5(2), 211-225

Schild TA: Einführung in die Real-Time TaqMan PCR-Technologie. Vers. 2.1, Applied Biosystems, Life Technologies Corporation, Carlsbad, California, o.J.



Schimmelpenning H, Eriksson ET, Franzen B, Zetterberg A, Auer GU (1993): Prognostic value of the combined assessment of proliferating cell nuclear antigen immunostaining and nuclear DNA content in invasive human mammary carcinomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 423(4), 273-279

Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W (2001): In Vitro and In Vivo Estrogenicity of UV Screens. *Environ Health Perspect* 109, 239-244

Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtensteiger W (2004a): Estrogenic activity and estrogen receptor binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology* 199, 109-120

Schlumpf M, Schmid P, Durrer S, Conscience M, Maerkel K, Henseler M, Gruetter M, Herzog I, Reolon S, Ceccatelli R (2004b): Endocrine activity and developmental toxicity of cosmetic UV filters-an update. *Toxicology* 205, 113-122

Schoenfeld JR, Vasser M, Jhurani P, Ng P, Hunter JJ, Ross J Jr, Chien KR, Lowe DG (1998): Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 30(11), 2269-2280

Schreihof DA, Stoler MH, Shupnik MA (2000): Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* 141(6), 2174-2184

Schreurs R, Lanser P, Seinen W, van der Burg B (2002): Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch Toxicol* 76, 257-261

Schreurs R, Sonneveld E, Jansen J, Seinen W, van der Burg B (2005): Interaction of polycyclic musks and UV filters with the estrogen receptor (ER), androgen receptor (AR), and progesterone receptor (PR) in reporter gene bioassays. *Toxicol Sci* 83, 264-272

Scott CJ, Tilbrook AJ, Simmons DM, Rawson JA, Chu S, Fuller PJ, Ing NH and Clarke IJ (2000): The distribution of cells containing estrogen receptor-alpha (ERalpha) and ERbeta messenger ribonucleic acid in the preoptic area and hypothalamus of the sheep: comparison of males and females. *Endocrinology* 141(8), 2951-2962

Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W (2006): Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicol Appl Pharmacol* 214(1), 1-7

Shao D, Lazar MA (1999): Modulating nuclear receptor function: may the phos be with you. *J Clin Invest* 103(12), 1617-1618

Simpson ER (2003): Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Biochem Mol Biol* 86(3-5), 225-230

Smith DF, Toft DO (1993): Steroid receptors and their associated proteins. *Mol Endocrinol* 7(1), 4-11

Soderqvist G, von Schoultz B, Tani E, Skoog L (1993): Estrogen and progesterone receptor content in breast epithelial cells from healthy women during the menstrual cycle. *Am J Obstet Gynecol* 168(3 Pt 1), 874-879

Soeborg T, Basse LH, Halling-Sorensen B (2007): Risk assessment of topically applied products. *Toxicology* 236(1-2), 140-148

Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO (1995): The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 113-122

Soto AM, Vandenberg LN, Maffini MV, Sonnenschein C (2008): Does breast cancer start in the womb? *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 102(2), 125-133

Spreafico E, Bettini E, Pollio G, Maggi A (1992): Nucleotide sequence of estrogen receptor cDNA from Sprague-Dawley rat. *Eu J Pharmacol* 227(3), 353-356

Strom A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson JA (2004): Estrogen receptor beta inhibits 17beta-estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(6), 1566-1571

Sundstrom SA, Komm BS, Ponce-de-Leon H, Yi Z, Teuscher C, Lyttle CR (1989): Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J Biol Chem* 264(28), 16941-16947

Tabuchi M, Veldhoen N, Dangerfield N, Jeffries S, Helbing CC, Ross PS (2006): PCB-related alteration of thyroid hormones and thyroid hormone receptor gene expression in free-ranging harbor seals (*Phoca vitulina*). *Environ Health Perspect* 114(7), 1024-1031

Tekmal RR, Liu YG, Nair HB, Jones J, Perla RP, Lubahn DB, Korach KS, Kirma N (2005): Estrogen receptor alpha is required for mammary development and the induction of mammary hyperplasia and epigenetic alterations in the aromatase transgenic mice. *J Steroid Biochem Mol Biol* 95(1-5), 9-15

Tena-Sempere M, Navarro VM, Mayen A, Bellido C, Sanchez-Criado JE (2004): Regulation of estrogen receptor (ER) isoform messenger RNA expression by different ER ligands in female rat pituitary. *Biol Reprod* 70(3), 671-678

Tesfaigzi J, Th'ng J, Hotchkiss JA, Harkema JR, Wright PS (1996): A small proline-rich protein, SPRR1, is upregulated early during tobacco smoke-induced squamous metaplasia in rat nasal epithelia. *Am J Respir Cell Mol Biol* 14(5): 478-486

Tinwell H, Lefevre PA, Moffat GJ, Burns A, Odm J, Spurway TD, Orphanides G, Ashby J (2002): Confirmation of uterotrophic activity of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in immature rat. *Environ Health Perspect* 110, 533-536

Vasudevan N, Ogawa S, Pfaff D (2002): Estrogen and thyroid hormone receptor interactions: physiological flexibility by molecular specificity. *Physiol Rev* 82(4), 923-944

Vinggaard AM, Hass U, Dalgaard M, Andersen HR, Bonefeld-Jorgensen E, Christiansen S, Laier P, Poulsen ME (2006): Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int J Androl* 29(1), 186-192

Völkel W, Colnot T, Schauer UM, Broschard TH, Dekant W (2006): Toxokinetics and biotransformation of 3-(4-methylbenzylidene)camphor in rats after oral administration. *Toxicol Appl Pharmacol* 216(2), 331-338

von Schoultz B, Soderqvist G, Cline M, von Schoultz E, Skoog L (1996): Hormonal regulation of the normal breast. *Maturitas* 23 Suppl, S23-25

Waring RH, Harris RM (2005): Endocrine disruptors: A human risk? *Mol Cell Endocrinol* 244, 2-9

Weihua Z, Saji S, Makinen S, Cheng G, Jensen EV, Warner M, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptor (ER) beta, a modulator of ERalpha in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(11), 5936-5941

Witorsch RJ (2002): Endocrine Disruptors: Can Biological Effects and Environmental Risks Be Predicted? *Regul Toxicol Pharmacol* 36, 118-130

Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, Safe S (2003): The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23(6), 1843-1855

Wuttke W, Jarry H, Feleder C, Moguilevsky J, Leonhardt S, Seong JY, Kim K (1996): The neurochemistry of the GnRH pulse generator. *Acta Neurobiol Exp* 56, 707-713

Zhang Z, Laping J, Glasser S, Day P, Mulholland J (1998): Mediators of estradiol-stimulated mitosis in the rat uterine luminal epithelium. *Endocrinology* 139(3), 961-966

Zhao X, Lorenc H, Stephenson H, Wang YJ, Witherspoon D, Katzenellenbogen B, Pfaff D, Vasudevan N (2005): Thyroid hormone can increase estrogen-mediated transcription from a consensus estrogen response element in neuroblastoma cells. Proc Natl Acad Sci U S A 102(13), 4890-4895

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. rer. nat. Hubertus Jarry für die wissenschaftliche Betreuung dieser Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke danke ich für die Vergabe der Arbeit und Supervision des gesamten Projekts.

Ich bedanke mich bei den medizinisch-technischen Assistentinnen der Abteilung insbesondere Frau Claudia Neitzel und Frau Annette Witt für ihre Hilfe bei der praktischen Einarbeitung, Herrn Guillermo Rimoldi für die Unterstützung bei allen histologischen Methoden sowie Herrn Dr. rer. nat. Holger Klammer und Frau Dr. rer. nat. Christiane Schlecht für die Mitbetreuung des Tierversuchs.

Frau Dr. med. Susanne Vatterodt danke ich für die Unterstützung bei der EDV und Textverarbeitung.