Beeinflussung der Zellfunktionen von immortalisierten Leydigzellen R2C der Ratte durch Chlororganika

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Cornelia Elisabeth Droste
aus Wesel

Gießen 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Kommissarischer Leiter: Prof. Dr. med. P. Mayser
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

Gutachter: Prof. Dr. H.-C. Schuppe
Gutachter: PD Dr. I. Schroeder-Printzen

Tag der Disputation: 29.05.2007

INHALTSVERZEICHNIS

1 Einleitung 1

1.1 Steroidbiosynthese der Leydigzelle 4

1.2 R2C Leydigzellen der Ratte als In-vitro-Modell für Partialfunktionen der Steroidbiosynthese 8

1.3 Aromataseaktivität und Östradiolbiosynthese im männlichen Organismus 9

1.3.1 Wirkung von Östrogenen auf die männliche Fertilität und Steroidsynthese ... 10

1.3.2 Grundlagen und Wirkmechanismus der PCB 13

1.3.3 Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM) 17

2 Aufgabenstellung 20

3 Material und Methoden 21

3.1 Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit halogenierten Kohlenwasserstoffen 21

3.2 Die R2C-Zelllinie und ihre Kulturbedingungen 22

3.2.1 Wachstumskurve 22

3.2.2 Zellzählung 23

3.2.3 MTT-Assay 23

3.3 Untersuchung der Steroidsyntheseleistung von R2C-Zellen 24

3.3.1 Basale Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen 24

3.3.2 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zusatz einzelner Steroidhormonvorstufen 24

3.4 Hormonsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren und –induktoren sowie Stimulatoren und Induktoren von Signaltransduktionswegen 26

3.5 Proteinbestimmung 27

3.6 Hormonsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss von zwei verschiedenen polychlorierten Kohlenwasserstoffen 28

3.6.1 Einbringung lipophiler Fremdstoffe in wässriges Kulturmedium 28

3.6.2 Versuchsaufbau und –ablauf 29

3.7 Hormonbestimmung im Zellüberstand 29

3.7.1 Kompetitiver Enzymimmunoassay (EIA) zur Ermittlung der Östradiol-, Testosteron-, und Progesteron-Konzentration 29

3.7.2 Östradiolbestimmung 30
3.7.3 Testosteronbestimmung 31
3.7.4 Progesteronbestimmung 31
3.8 Statistische Auswertung 31

4 Ergebnisse 33

4.1 Wachstumskurven der R2C-Zellen 33
4.2 Untersuchung der Steroidsyntheseleistung von R2C-Zellen 35
4.2.1 Basale Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen 35
4.2.2 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zugabe von Pregnenolon, Progesteron, 17α-Hydroxypregenolon und 17α-Hydroxyprogesteron 36
4.2.3 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zugabe von DHEAS, DHEA, Androstendion und Testosteron 37
4.3 Östradiolsekretion und Vitalität der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren und –induktoren, sowie Stimulatoren und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen 38
4.3.1 Effekte des Aromatase-Inhibitors 4-OHA auf die Östradiolsekretion 38
4.3.2 Effekte des Proteinkinase-A-Aktivators und Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin auf die Östradiolsekretion 42
4.3.3 Effekte des Proteinkinase-C-Inhibitors H7 auf die Östradiolsekretion 45
4.3.4 Effekte des Aromatase-Induktors PDA auf die Östradiolsekretion 48
4.3.5 Effekte des Proteinkinase-C-Aktivators PMA auf die Östradiolsekretion 51
4.4 Effekte von PCB 126 auf die Östradiolsekretion der R2C-Zellen 54
4.5 Effekte von TCPM auf die Östradiolsekretion 57

5 Diskussion 60

5.1 Allgemeine Betrachtungen 60
5.2 Diskussion von Material und Methoden 61
5.2.1 Medienkontamination mit DMSO 61
5.2.2 Beurteilung der Zellvitalität in vitro 62
5.3 Diskussion der Ergebnisse 62
5.3.1 Untersuchung der Sekretionseigenschaften der R2C-Zellen in vitro im Vergleich zur Leydigzelle in vivo 62

5.3.2 Östradiolsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Stimulatoren und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen 65
5.4 Effekte von verschiedenen Chlororganika auf die Östradiolsekretion und die Partialfunktion der R2C-Zellen 69
5.4.1 PCB-Konzentrationen im menschlichen Organismus 69
5.4.2 Effekte von PCB auf Enzymsysteme im männlichen Reproduktionstrakt..... 70
5.4.3 TCPM..... 75
6 Zusammenfassung 77
7 Summary..... 80
8 Literaturverzeichnis 82
9 Abbildungsverzeichnis..... 101
10 Tabellenverzeichnis 102
11 Abkürzungen 103
12 Erklärung 106
13 Lebenslauf..... 107
14 Danksagung 109

1 Einleitung

Zirka 15% aller Ehen in Industriestaaten bleiben ungewollt kinderlos (Beyeler et al., 2002). Lange ging man davon aus, dass die Ursache der Unfruchtbarkeit bei Paaren in den weitaus meisten Fällen bei der Frau lag. Mittlerweile hat sich jedoch gezeigt, dass in etwa der Hälfte der Fälle die Gründe auch beim Mann zu suchen sind (Seshagiri, 2001).

Zahlreiche Autoren berichten von einer zunehmenden Zahl an Entwicklungsstörungen der männlichen Geschlechtsorgane beim Menschen und in der Tierwelt (Guillette et al., 1994; Skakkebaek et al., 2001). Die erhöhte Inzidenz von testikulären Tumoren, Maldeszensus testis (Kryptorchismus) und Hypospadien beim Menschen scheint unbestritten (Chilvers et al., 1984; Giwercman et al., 1993; Adami et al., 1994; Toppari et al., 2001; Pierik et al., 2004). Parallel dazu wurden zahlreiche Arbeiten publiziert, die von einer Abnahme der Spermienqualität fertiler Männer in den vergangenen 50 Jahren berichten (Carlsen et al., 1992, 1993; Auger et al., 1995; Irvine et al., 1996; Swan et al., 1997; Andersen et al., 2000). Gleichzeitig ist die Zahl der künstlichen Befruchtungsverfahren in den letzten Jahren gestiegen (Skakkebaek et al., 2001). Darüber hinaus haben Paare heutzutage zu einem Zeitpunkt einen Kinderwunsch, an dem die natürliche Fertilität bereits wieder abnimmt (Dunson et al., 2004). Durch schädliche Umwelteinflüsse können diese Prozesse noch weiter verstärkt werden.

Seit einigen Jahren besteht vermehrtes Interesse an den Effekten endokrin aktiver Umweltchemikalien auf die männliche Fertilität. Diese so genannten „Endokrinen Disruptoren“ sind laut Definition der amerikanischen Umweltbehörde EPA 1997 (Environmental Protection Agency) exogene Substanzen, die mit der Synthese, der Sekretion, dem Transport, der Bindung, der Wirkung oder der Elimination von natürlichen Hormonen im Körper konkurrieren, welche für die Aufrechterhaltung der Homöostase, der Reproduktion, der Entwicklung und des Verhaltens zuständig sind (Bruhn et al., 1999).

Im Zusammenhang mit den oben genannten Entwicklungen haben die angeführten Studien zu einer breiten wissenschaftlichen und gesellschaftlichen Diskussion hinsichtlich des Einflusses von Umweltfaktoren auf die Fertilität geführt. Von besonderem Interesse sind hierbei Umweltschadstoffe im Allgemeinen und

Chlororganika im Besonderen (Sharpe, 1995). Polychlorierte Biphenyle (PCB) spielen dabei eine große Rolle, da diese Substanzgruppe aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Stabilität bis in die achtziger Jahre vielfältig technisch eingesetzt wurde. Aufgrund ihrer Persistenz, ihrer langen Halbwertszeit und ihrer Bioakkumulation kommen sie ubiquitär in unserem Lebensraum vor. Bedingt durch ihre Lipophilie sind sie geradezu prädestiniert, sich im Fettgewebe und damit in der Nahrungskette, anzureichern. Demnach stellt der Verzehr tierischer Fette, insbesondere von Fisch, Fleisch und Milchprodukten die Hauptexpositionsquelle für den Menschen dar. In der Vergangenheit sorgten Zwischenfälle mit Chlororganika immer wieder für Aufsehen. Der jüngste Zwischenfall mit PCB ereignete sich 1999 in Belgien, wo PCB-belastetes Tierfutter an Tiermastbetriebe ausgeliefert und verfüttert wurde (van Larebeke et al., 2001).

Auch das Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM), welches ebenso wie die PCB eine chlororganische Verbindung ist, kommt ubiquitär in der Umwelt vor. Vermutlich entsteht TCPM als Nebenprodukt bei der DDT-Herstellung (Dichlor-diphenyl-trichloräthan), welches lange Zeit als Pflanzenschutzmittel eingesetzt wurde (Walker et al., 1989; De Boer et al., 1994). Chlororganika können auf verschiedenen Wegen in das Hormonsystem, speziell in das Wirkungsgefüge der Steroidhormone, eingreifen. Es kann zu Wechselwirkungen mit den körpereigenen Hormonrezeptoren, der Hormonbiosynthese, dem Transport und dem Abbau körpereigener Hormone kommen (Thierfelder et al., 1995).

Zu den Steroidhormonen gehören die für die Entwicklungs- und Reproduktionsprozesse wichtigen Sexualhormone Östrogen, Progesteron und Testosteron. Für die männliche Fertilität sind Testosteron und Östrogene unentbehrlich. Störungen der endokrinen Homöostase können reversible oder irreversible Auswirkungen auf die männliche Fertilität haben. Die Steroidhormone werden überwiegend in den Leydigzellen des Hodens gebildet. Ausgehend vom Cholesterin werden in verschiedenen enzymvermittelten Schritten unter anderem Testosteron und Östrogene gebildet. Die Östrogene sind dabei ein relevanter Bestandteil des fragilen Hormonsystems des Mannes und für die normale männliche Reproduktionsfunktion unerlässlich (O'Donnell et al., 2001).

Die Synthese von Östrogenen erfolgt durch die Cytochrom-P450-abhängige Aromatase (CYP450arom.). Sie ist ein mikrosomales Enzym, das die irreversible

Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen katalysiert. Dieses Enzym wird in zahlreichen tierischen und menschlichen Geweben nachgewiesen (Conley et al., 2001). Im männlichen Reproduktionstrakt vieler Säugetiere findet sich die Aromatase in Sertolizellen, Spermatozyten, Spermatiden sowie testikulären und epididymalen Spermatozoen (Carreau et al., 2003).
Es wäre denkbar, dass Umweltchemikalien, die die CYP450arom. beeinflussen und somit zu einer Abnahme oder Zunahme der Östrogensynthese führen, auch eine Beeinträchtigung der Steroidsynthese, der Spermatogenese oder der Spermatozoenreifung bewirken können.
Während die verschiedensten Hormonaktivitäten denkbar sind, wurde bisher die östrogene, antiöstrogene und antiandrogene Wirkung verschiedener Industriechemikalien nachgewiesen (Cummings et al., 2004). Diese Untersuchungen erstreckten sich hauptsächlich auf Östrogen- bzw. Androgen-Rezeptor vermittelte Effekte. Es gibt jedoch Hinweise, dass die endokrinen Disruptoren nicht nur über Rezeptor vermittelte Abläufe, sondern auch indirekt über die Beeinflussung von Enzymsystemen ihre Wirkung entfalten können (Fisher, 2004). Hierüber ist bisher nur wenig bekannt.

Ziel dieser Arbeit war es zunächst, die permanente, maligne entartete R2C-Leydigzelllinie der Ratte hinsichtlich ihrer Steroidsynthese- und Enzymeigenschaften zu untersuchen. Diese Zelllinie, ihr Enzymsystem und ihre Hormonsyntheseleistung sind bisher nur wenig untersucht worden. Im Vorfeld hierzu sollte zunächst die Eignung der R2C-Zellen als In-vitro-Modell für Partialfunktionen der Steroidhormonsynthese im Allgemeinen und der Östradiolsynthese im Besonderen überprüft werden.
Im weiteren sollten die R2C-Zellen zur Untersuchung von Effekten von zwei chlorierten Kohlenwasserstoffen, einem PCB-Kongener und dem bislang wenig untersuchten TCPM, auf Partialfunktionen der Steroidsynthese unter Umgehung von Tierversuchen verwendet werden.

1.1 Steroidbiosynthese der Leydigzelle

Sowohl die Produktion von Testosteron und Östrogen, als auch die Spermatogenese setzen einen funktionsfähigen Regelkreis, die Hypothalamus-Hypophysen-Hoden-Achse, voraus. Dabei steht die Ausschüttung der Gonadotropine Follikelstimulierendes Hormon (FSH) und luteinisierendes Hormon (LH) durch gonadotrope Zellen der Adenohypophyse unter der Kontrolle des Peptidhormons Gonadotropin-Releasinghormon (GnRH). Dieses wird von hypothalamischen Neuronen pulsatil in das Portalgefäßsystem der Hypophyse freigesetzt, was wiederum synchrone Pulse von FSH und LH zur Folge hat. FSH reguliert durch FSH-Rezeptoren auf den Sertolizellen die Spermatogenese, während LH über LH-Rezeptoren die Testosteronproduktion der Leydigzellen im Hoden steuert.

Leydigzellen sind die endokrin aktiven Zellen des Hoden. Morphologisch sind diese steroidproduzierenden Zellen durch ein glattes endoplasmatisches Retikulum und eine hohe Dichte von Mitochondrien gekennzeichnet in denen Enzyme der Steroidsynthese lokalisiert sind. Die Leydigzellen liegen einzeln oder in kleinen Gruppen im interstitiellen Bindegewebe und verfügen über spezifische Rezeptoren für das aus dem Hypophysenvorderlappen stammende LH. Durch die Bindung von LH an membranständige Rezeptoren der Leydigzelle wird die Biosynthese des männlichen Sexualhormons Testosteron stimuliert (Catt et al., 1974). Die freigesetzten Androgene, wie auch die daraus entstehenden Östrogene, sind dabei essentiell für die Hodenfunktion.

Das Hauptsekretionsprodukt der Leydigzellen stellt das Testosteron dar. Dieses Hormon ist unerlässlich für die Spermienproduktion (Awoniyi et al., 1989), die Spermienreifung in den Nebenhoden, die Differenzierung der akzessorischen Sexorgane (Coffey, 1988) und das Sexualverhalten (Sachs et al., 1988). Im Laufe des Lebens unterliegt die Testosteronkonzentration im peripheren Blut ausgeprägten Schwankungen (Payne et al., 1996). Bereits ab dem 4. Schwangerschaftsmonat sezerniert die fetale Leydigzelle hohen Mengen an Testosteron, welches in dieser Phase für die Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane notwendig ist. Schon vor der Geburt des männlichen Kindes reduziert sich die Zahl der Leydigzellen um 50% aufgrund erniedrigter Gonadotropinwerte, womit auch die Testosteronkonzentration wieder rapide abnimmt. Durch Anstieg der LH-Sekretion

findet man ab dem 2. Monat postnatal einen erneuten Peak der Testosteronproduktion. Schon bald danach degenerieren diese Leydigzellen, sodass im Alter von 1 Jahr nur noch sehr wenige vorhanden sind. In der Pubertät werden neue, erwachsene Leydigzellen gebildet und die Testosteronkonzentration steigt an. In fortgeschrittenem Alter nimmt die Testosteronkonzentration von 7 mg/Tag beim jungen Erwachsenen auf Werte um 4 mg/Tag beim alternden Mann ab. Offensichtlich ist die Leydigzelle trotz gleich bleibender LH-Stimulation nicht mehr in der Lage genügend Testosteron zu produzieren (Cook et al., 1999).

Steroidhormone können nicht gespeichert werden, sondern werden in Abhängigkeit des Bedarfes de-novo synthetisiert. LH stimuliert dabei sowohl die de-novo Synthese als auch die Freisetzung der Steroidhormone aus dem Hoden. Ausgehend vom Cholesterin werden in den Zellen die Steroidhormone gebildet.
Das Cholesterin wird entweder in den Mikrosomen aus Acetat neu gebildet, über Lipoproteine niedriger Dichte (LDL) aus dem Blut aufgenommen oder aus intrazellulären Lipidtröpfchen freigesetzt. Ausgelöst wird die de-novo Steroidsynthese durch die Bindung von LH an den LH-Rezeptor, wodurch die membranständige Adenylatcyclase stimuliert wird. Aus Adenosintriphosphat (ATP) entsteht cyclisches 3'5'–Adenosinmonophosphat (cAMP) dessen Konzentration innerhalb weniger Minuten ansteigt (Catt et al., 1974; Hansson et al., 1980). Die primäre Wirkung des cAMP innerhalb der Leydigzelle ist die Aktivierung der Proteinkinase A (Corbin et al., 1978). Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung nachgeordneter Proteine, unter anderem der Cholesterolesterhydroxylase, welche für die Bereitstellung des freien Cholesterols zuständig ist. StAR (steroidogenic acute regulatory protein) vermittelt die Cholesterin-Translokation vom Zytoplasma zur inneren Mitochondrienmembran. Hier befindet sich das P450-abhängige Cholesterin-Side-Chain-Cleavage-Enzymsystem ($P450_{scc}$), das die Konversion von Cholesterin (C27-Steroid) zu Pregnenolon (C21) unter Abspaltung einer Seitenkette des Cholesterins katalysiert (Simpson, 1979; Boyd et al., 1983). Der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Steroidsynthese ist dabei die Bereitstellung des Cholesterols (Stocco et al., 1996). Pregnenolon gelangt vom Mitochondrium zum glatten endoplasmatischen Retikulum der Leydigzelle, wo zwei alternative Steroidsyntheseschritte ablaufen können die letztlich zur Bildung von Testosteron und Östradiol führen.

Der Δ^5-Weg wird hauptsächlich beim Menschen und höheren Primaten gefunden (Hammer et al., 1986; Payne et al., 1996). Hierbei wird das Pregnenolon durch die Cytochrom-P450-abhängige 17α-Hydroxylase/$C_{17,20}$-Lyase ($P450_{17\alpha}$) zu 17α-Hydroxypregnenolon (C21) umgewandelt. Das 17α-Hydroxypregnenolon wird durch die $P450_{17\alpha}$ zu DHEA und weiter durch die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase Δ4/5 Isomerase (3β-HSD) zu Androstendion (C19) umgewandelt.

Der Δ^4-Weg wird unter anderem bei Ratten, Mäusen und Hunden gefunden (Payne et al., 1996). Pregnenolon wird durch die 3β-HSD zu Progesteron (C21), dieses durch die $P450_{17\alpha}$ zu 17α-Hydroxyprogesteron und dieses wiederum durch das gleiche Enzym zu Androstendion umgewandelt.

Das Androstendion kann bei beiden Synthesewegen entweder über die 17β-Hydroxysteroiddehydrogenase (17β-HSD) zu Testosteron (C19) und weiter über die 5α-Reduktase zu Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt werden, oder über die Cytochrom-P450-abhängige Aromatase zu Östradiol (C18) konvertiert werden, s. Abbildung 1.

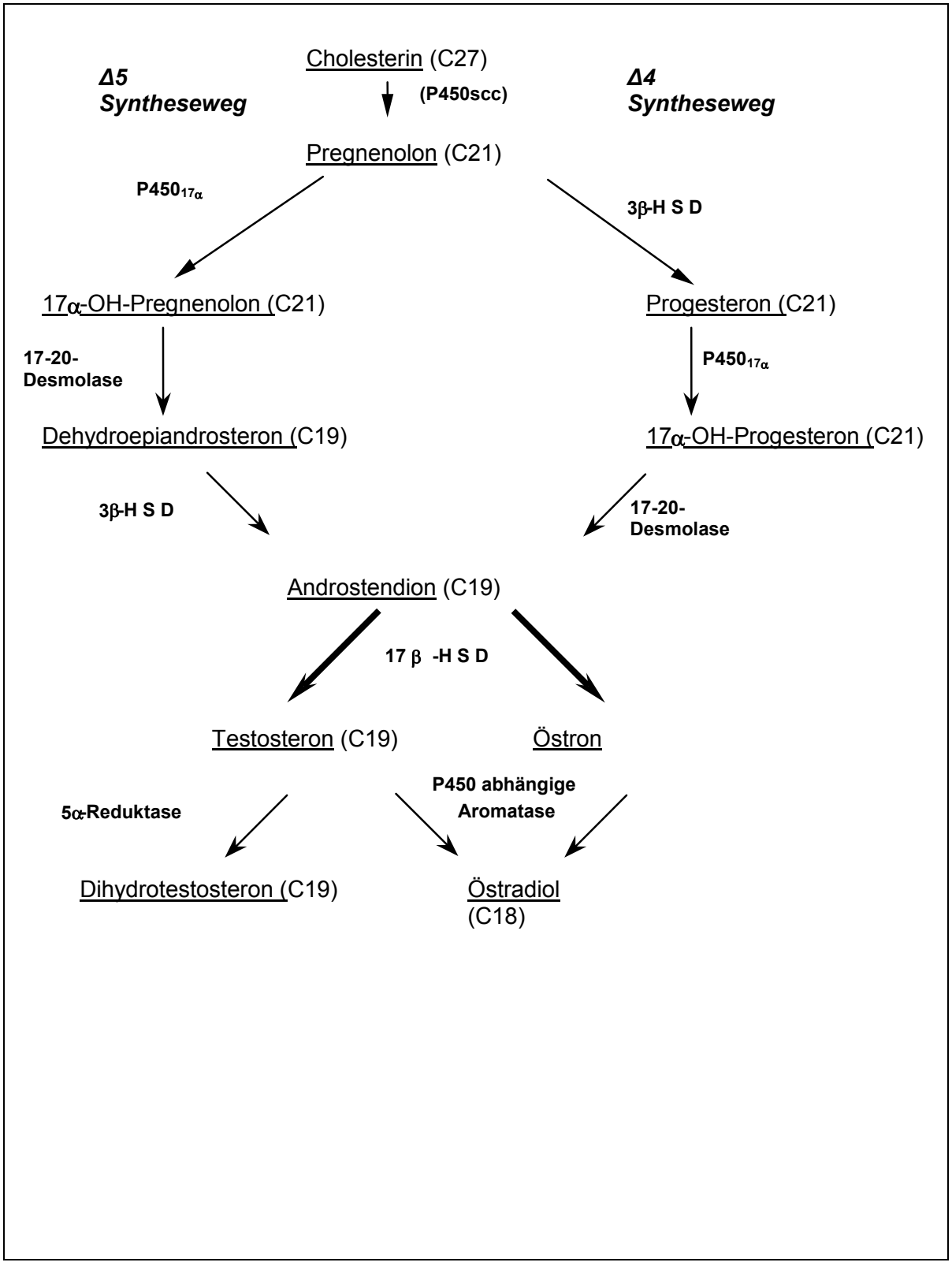

Abbildung 1: Steroidhormonsyntheseweg der Leydigzellen. $P450_{scc}$: Cholesterin-Side-Chain-Cleavage-Enzymsystem, 3 β-HSD: 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase

Δ4/5 Isomerase, $P450_{17\alpha}$: Cytochrom-P450-abhängige 17α-Hydroxylase/ $C_{17,20}$-Lyase, 17β-HSD:17β-Hydroxysteroiddehydrogenase.

1.2 R2C Leydigzellen der Ratte als In-vitro-Modell für Partialfunktionen der Steroidbiosynthese

Zur Untersuchung der Leydigzellphysiologie kann man zunächst Primärkulturen, d.h. dem Hoden entnommene Zellen, verwenden. Diese Art der Kultur weist allerdings einige Limitierungen auf. Die Menge Leydigzellen pro Testis ist im Vergleich zum Testisvolumen gering, wodurch die Isolierung einer ausreichenden Menge an Leydigzellen schwierig ist (Payne et al., 1996). Nur frühe embryonale Zellen und ursprüngliche Keimzellen besitzen die Fähigkeit in Kulturen zu wachsen, alle anderen Säugetierzellen sind dazu nicht in der Lage (Cuzin et al., 1998).

Kultivierte Leydigzellen hingegen werden unempfindlich gegenüber der Stimulation durch Gonadotropin und verlieren ihre Fähigkeit zur Steroidsynthese innerhalb von 24 Stunden (Rommerts et al., 1982; Ascoli et al., 1996). Die Verfügbarkeit von transplantablen Maus- und Ratten- Leydigtumorzellen, die Gonadotropin sensibel waren, machte es zwar möglich eine große Anzahl homologer Zellen anzuzüchten, jedoch ist die Steroidsynthese abhängig vom Wirt und vom Alter des Tumors (Cooke et al., 1979). Diese Tatsache erschwert die Langzeitkultur und die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Es wurde dazu übergegangen diese Tumorzellen in Kulturen anzuzüchten (Ascoli, 1981; Rebois, 1982). Die damit gewonnenen immortalisierten Leydigzellen sind schnell und einfach in homologen Kulturen anzüchtbar und experimentell einsetzbar. Da es sich um transformierte Zellen handelt ist ihre Lebensdauer unbegrenzt und ihr Proliferationsverhalten ist durch eine exponentielle Zellvermehrung gekennzeichnet. In Abhängigkeit von der Fragestellung können zahlreiche Zellfunktionsparameter wiederholt und reproduzierbar erfasst werden. Abhängig von der Zelllinie und der Spezies sind Partialfunktionen der Steroidsynthese durchaus mit der in vivo Situation vergleichbar, da einige physiologische Eigenschaften in den immortalisierten Zellen erhalten sind.

Shin et al. (1968) setzen als erstes diese Zellkulturen ein und etablierten unter anderem die immortalisierte Zellpopulation eines Leydigzelltumors der Ratte, die als R2C-Leydigzelle bezeichnet wurde. Dieses maligne entartete permanente Zellkultursystem wurde in dieser Arbeit zur Untersuchung der Auswirkungen von

verschiedenen Konzentrationen einzelner Chlororganika auf die Östradiolsynthese herangezogen. Bereits Doody et al. (1990) und Heneweer et al. (2004) proklamierten die Eignung dieser Zelllinie als Screening-Methode zur Erfassung von P450-Aromatase-inhibierenden Substanzen.

Sämtliche immortalisierte Leydigzelllinien, mit Ausnahme der MA-10 Zellen der Maus, haben die Stimulierbarkeit durch LH/hCG verloren. Vermutet wird, dass die Anzahl der Rezeptoren zu gering ist oder die Rezeptoren funktionsunfähig sind (Payne et al., 1996). Zusätzlich haben diese Zellen die cAMP-Stimulation durch LH eingebüßt. Die immortalisierten Leydigzellen sind zwar alle in der Lage Steroide zu produzieren, aber ihr Syntheseweg ist gegenüber der normalen Leydigzelle verändert. So produzieren die R2C-Zellen als Hauptprodukt Progesteron, 20α-Hydroxyprogesteron und Östradiol.

1.3 Aromataseaktivität und Östradiolbiosynthese im männlichen Organismus

Die traditionelle Sicht von Östrogenen, als einem ausschließlich weiblichen und Testosteron, als einem ausschließlich männlichen Hormon wurde in den letzten Jahren zunehmend angezweifelt und es stellte sich heraus, dass Östrogene weit wichtiger für die normale Funktion der Reproduktion des Mannes sind, als bisher immer angenommen wurde (Sharpe, 1998). Östrogene sind ein wichtiger Bestandteil der hormonellen Gesundheit des Mannes (O'Donnell et al., 2001). Sie wirken auf den Knochenstoffwechsel, den Lipidstoffwechsel, die Gefäßreagibilität, das kardiovaskuläre System, die reproduktive Aktivität und die Fertilität (Sharpe, 1998). Dabei ist Östradiol das wichtigste biologisch aktive Östrogen beim Mann und stammt zu etwa 20% unmittelbar aus den Leydigzellen der Testes. Der überwiegende Teil des zirkulierenden Östradiols entsteht in peripheren Geweben aus der Aromatisierung von androgenen Vorstufen.

Die Östradiolkonzentrationen junger Männer sind vergleichbar mit den Konzentrationen in der frühen Follikelphase junger Frauen und liegen deutlich oberhalb der Spiegel von postmenopausalen Frauen. Normalerweise beträgt der Serumspiegel des Gesamtöstradiols bei Männern 7 bis 23 ng/L (Jockenhövel et al.,

2004) und zeigt im Gegensatz zum bekannten Testosteronabfall im Alter keine altersspezifische Veränderung (Feldman et al., 2002).

Die Synthese von Östrogenen erfolgt durch die Cytochrom-P450-abhängige Aromatase. Diese ist ein im endoplasmatischen Retikulum lokalisierter Enzymkomplex, bestehend aus einem spezifischen Cytochrom P450-Häm und einer Flavoprotein NADPH-abhängigen Cytochrom-P450-Reduktase (Kelloff et al., 1998). Sie ist ein mikrosomales Enzym, das die irreversible Umwandlung von Androgenen zu Östrogenen katalysiert und ein Produkt des CYP19 Gens darstellt. Dieses Enzym wird in zahlreichen tierischen und menschlichen Geweben nachgewiesen. Beim Menschen findet sich die CYP19 unter anderem in Gehirn, Knochen, Ovar, Plazenta, Muskulatur, Fettgewebe, Haut, Testes und verschiedenen Malignomen (z.B. Mammakarzinom, Chorionkarzinom, Hodenkarzinom) (Carreau et al., 2001). Bei zahlreichen anderen Spezies findet sie sich zusätzlich in Sertolizellen, Spermatozyten, Spermatiden sowie testikulären und epididymalen Spermatozoen. Auch beim Menschen konnte die Aromatase in Spermien und Keimzellen nachgewiesen werden (Lambard et al., 2004).

1.3.1 Wirkung von Östrogenen auf die männliche Fertilität und Steroidsynthese

Die Wichtigkeit des Östrogens in der männlichen Entwicklung wurde bereits durch die Verwendung von DES (Diethylstilbestrol) bestätigt. DES ist ein nicht-steroidales synthetisches Östrogen, das sowohl beim Menschen als auch beim Tier extensiv untersucht wurde. Diese Substanz weist eine höhere östrogene Potenz auf als das endogene Östrogen 17β-Östradiol (Golden et al., 1998). In den 50er Jahren bis hin in die frühen 70er Jahre wurden Frauen mit DES in hohen Dosen behandelt um drohende Fehl- oder Frühgeburten zu verhindern. Jungen, die in utero DES ausgesetzt waren, wiesen genitale Abnormalitäten auf, die epididymale Zysten, Hypospadie, Kryptorchismus und schlechte Samenqualität umfassten. Mädchen hatten eine höhere Inzidenz vaginaler und ovarieller Karzinome (Toppari et al., 2002). Verschiedene Studien an endometrialen Ratten-Zellen in vivo zeigen, dass eine DES-Exposition zu einer Abnahme der Östrogen-Rezeptoren (ER) führt und der Uterus somit nicht mehr auf Östrogene reagiert (Medlock et al., 1992). Diese Entdeckung führte zu zahlreichen Untersuchungen über die Langzeiteffekte von

Östrogenexposition auf die männliche Reproduktion, welche auch heute noch anhalten (Sharpe et al., 2003).

Östrogene wirken über die Rezeptoren α und β. Diese Wirkung konnte mit Hilfe der Östrogen-Rezeptor-α-Knockout Maus (ERαKO) untersucht werden. Den Mäusen fehlte der Östrogen-α-Rezeptor (ERα). Mittels der ERαKO Maus wurde erstmals gezeigt, dass ERα wichtig für die männliche Fertilität ist. Die Mäuse waren hauptsächlich durch einen Defekt der Spermatogenese, reduzierte Spermienanzahl und reduzierte Spermienbeweglichkeit unfruchtbar (Lee et al., 2000). Darüber hinaus zeigten diese Mäuse völliges sexuelles Desinteresse, so dass Östrogene offensichtlich nicht nur bedeutend für die Spermienproduktion, sondern auch ein wichtiger Stimulus der männlichen Sexualität sind (O'Donnell et al., 2001).

Der ERα ist von allen Geweben am häufigsten in den Ductuli efferentes gefunden worden. Diese sind verantwortlich für die Reabsorption von bis zu 90% der Flüssigkeit des Rete testis. Daher wird angenommen, dass der ERα eine Rolle in der Flüssigkeitsreabsorption spielt, welche essentiell für die Fertilität ist (Hess, 2000).

Durkee et al. (1998) berichteten über die Existenz der Östrogenrezeptoren auch in menschlichen Spermien. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass die Spermienmembran ein Östrogen-Rezeptor ähnliches Protein besitzt, das zur Steroidbindung fähig ist (Luconi et al., 2002). Pentikainen et al. (2000) zeigten, dass beim Menschen die Östrogenrezeptoren α und β in den meiotischen Spermatozyten und den elongierten Spermatiden vorkommen und niedrige 17β-Estradiolkonzentrationen die Apoptose von Keimzellen reduzieren. Demnach kommt den Östrogenen in humanen Testes auch eine keimzellprotektive Wirkung zu.

Die Funktion des Östrogen-Rezeptor β (ERβ) ist bisher noch nicht vollständig geklärt. Bekannt ist, dass ERβ-KO-Mäuse eine normale Fertilität und Testisfunktion zeigen (Hess et al., 2003).

Eine übermäßige Östrogenexposition führt zu einer Down-Regulation der ER (O'Donnell et al., 2001). Hieraus resultiert ein Östrogen-Mangel-Syndrom, ähnlich dem der ERαKO-Mäuse. Männliche transgene Mäuse, denen der Östrogenrezeptor alpha oder die Aromatase fehlt, zeigen einen Spermatogenese-Stop auf der Höhe der runden Spermatiden. Sie haben eine reduzierte epididymale Spermienanzahl, eine reduzierte Spermienmotilität, eine Leydigzellhyperplasie und eine Reduktion der

Fruchtbarkeit sowie ein verändertes reproduktives Verhalten (Ogawa et al., 1997; Simpson et al., 2000).
Bisher ist beim Menschen erst ein Fall eines Mannes bekannt, bei dem aufgrund einer Mutation im Östrogen-Rezeptor alpha die östrogene Wirkung fehlt. Dieser Mann fiel durch offene Epiphysenfugen und dadurch bedingte eunuchoide Skelettproportionen, verzögerte Skelettreifung und schwere Osteoporose mit erhöhtem Knochenabbau auf. Die genitale Untersuchung ergab keine Auffälligkeiten. Allerdings zeigte die Spermienanalyse eine Reduktion der Spermienbeweglichkeit bei normaler Spermienanzahl. Die Östradiol-, FSH-, und LH-Konzentrationen waren erhöht (Smith et al., 1994).

Einen eigenständigen Östrogenmangel, ohne gleichzeitigen Mangel an Testosteron, gibt es nur bei einem angeborenen Aromatasemangel. Beim Menschen wurde gezeigt, dass ein Aromatasemangel aufgrund einer Gen-Mutation zu Sterilität führt. Von 6 Fällen zeigten 3 eine niedrige Spermienanzahl (Carreau et al., 2003). Zunächst war bei diesen Männer die kindliche Entwicklung normal. Ab einem Alter von ca. 20 Jahren fielen sie jedoch durch fehlenden Epiphysenfugenschluss und enormes Längenwachstum auf. Zusätzlich wiesen sie verzögertes Knochenalter, Osteopenie und Entmineralisierung der Knochen auf. Im Blut fanden sich erhöhte Gonadotropinkonzentrationen, niedrige Östradiol- und stark erhöhte Testosteronwerte (Herrmann et al., 2002).
Bei Mäusen, denen die Aromatase fehlte (ArKO), wurde im Laufe der Entwicklung eine Infertilität festgestellt. Ursächlich hierfür war ein Spermatognese-Arrest und Zellapoptose runder Spermatiden. Aufgrund erhöhtem zirkulierenden LH fand sich darüber hinaus eine Leydigzellhyperplasie und -hypertrophie (Robertson et al., 1999, 2001). Toda et al. (2001) fanden bei Aromatase-Gen-knock-out Mäusen ein verändertes Sexualverhalten.
Die Langzeitbehandlung von Affen (M. radiata) mit einem nicht-steroidalen Aromatase-Hemmer (CGP 47645) führte zu einer Reduktion der Spermatozoendichte und der Motilität. Die epididymalen Spermatozoen zeigten eine gestörte Chromatinkondensation (Shetty et al., 1998). Bei Ratten bewirkt ein Aromatasehemmer einen Verlust der Keimzellen, wobei Testosteron erhöht und Östradiol erniedrigt war (Turner et al., 2000).

Östrogene bewirken ein negatives Feedback auf die Ausschüttung von FSH und LH, reduzieren die Pulshöhe und -frequenz von LH und üben somit über das negative Feedback an der Hypophyse eine regulatorische Funktion für die Androgenbiosynthese im Hoden aus.

1.3.2 Grundlagen und Wirkmechanismus der PCB

Chlorierte Kohlenwasserstoffe kommen aufgrund ihrer chemischen und physikalischen Stabilität ubiquitär in unserem Lebensraum vor. Zu dieser Substanzklasse werden unter anderem polychlorierte Biphenyle (PCB), polychlorierte Dibenzofurane (PCDF) und polychlorierte Dibenzo-p-dioxine (PCDD) gerechnet. In letztere Gruppe gehört auch die wohl giftigste Substanz anthropogenen Ursprungs, das 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (2,3,7,8-TCDD), besser bekannt als "Seveso-Dioxin". Diese Substanz wurde im Rahmen eines Chemieunfalls 1976 in Seveso, Italien, in größeren Mengen freigesetzt und kontaminierte die umliegenden Gebiete (Rehder et al., 1978). In der Folge war das 2,3,7,8-TCDD in vergangenen Jahren Gegenstand intensivster Forschung.

Die PCB sind chemisch eng mit den PCDD verwandt, wenngleich sie als weniger toxisch eingestuft werden (Ahlborg et al., 1994). Bei den PCB handelt es sich um stark lipophile polyzyklische Aromaten unterschiedlichen Chlorierungsgrades. In Abhängigkeit von der Anzahl und Stellung der Chloratome im Molekül unterscheidet man bei den PCB theoretisch 209 homologe und isomere Verbindungen (Kongenere) (Popp et al., 1993), wovon bisher 130 in biologische Proben identifiziert wurden (Ahlborg et al., 1992).

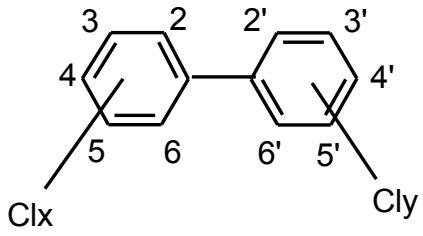

Abbildung 2: Allgemeine Strukturformel der polychlorierten Biphenyle und Reihenfolge der Bezifferung der Chlorsubstitution

Das Biphenyl-Grundgerüst besteht aus zwei Phenylringen, die durch eine C-C-Bindung in der 1,1'-Position miteinander verknüpft sind. Die beiden Ringe sind dabei frei drehbar und befinden sich in einer Ebene (planare Anordnung). Die Abbildung 2 zeigt das Grundgerüst mit der Bezifferung der Position möglicher Substituenten. In Bezug auf die C-C-Bindung der beiden Ringe werden die Positionen 2, 2', 6 und 6' als ortho-, die Positionen 3, 3', 5 und 5' als meta- und die Positionen 4 und 4' als para-Positionen bezeichnet. Das PCB-Molekül kann 1-10 Chlorsubstituenten tragen, daraus resultieren insgesamt 209 theoretisch mögliche PCB-Kongenere. Innerhalb der Gruppe der 209 PCB werden aufgrund von Struktur- und Wirkungsunterschieden Einteilungen in Untergruppen vorgenommen, wobei die sogenannten coplanaren PCB (keine Chlorsubstitution an der ortho-Position, aber an beiden para- und mindestens zwei meta-Positionen) und die an einer ortho-Position zusätzlich chlorsubstituierten Analoge (sog. monoortho-coplanare PCB) als PCB mit dioxinähnlichen Eigenschaften (d. h. Bindung an cytosolische Ah-Rezeptoren) von den übrigen PCB-Kongeneren unterschieden werden.

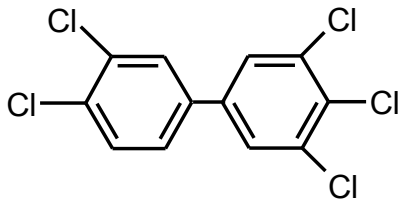

Abbildung 3: Strukturformel PCB 126

Aufgrund der verschiedenen Stellungen der Chloratome unterscheiden sich die einzelnen Kongenere erheblich voneinander. Auch die Halbwertzeiten der verschiedenen PCB variieren sehr stark aufgrund ihres Chlorierungsgrades. Niedrig chlorierte PCB haben eine Halbwertzeit von Stunden bis Tagen (Safe, 1994), wohingegen höher chlorierte bis zu 10 Jahren und mehr im Körper verweilen (Brown, 1994).

Die Toxizität der PCB wurde beschrieben, indem man dem giftigsten Dioxin, dem 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, den Wert 1 zuordnete und die anderen PCB damit verglich (TEQ, Toxic Equivalente, Toxizitätsäquivalenzfaktor) (NATO, 1988). Das in dieser Studie verwendete PCB 126 hat einen TEQ von 0,1, und erreicht somit die höchste Toxizität der PCB.

PCB-Gemische sind unbrennbar, haben einen hohen Siedepunkt, eine hohe Viskosität und sind thermisch und chemisch stabil. Aufgrund dieser Eigenschaften wurden sie seit den dreißiger Jahren vielfältig technisch eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden sie synthetisch hergestellt, da sie in der natürlichen Umwelt nicht vorkommen. Sie dienten in der "offenen Anwendung" unter anderem als Flammschutz-, Schmiermittel, Weichmacher für Druckfarben, Klebstoffe und Dichtungsmassen. In geschlossenen Systemen finden sie als Hydrauliköle und als Kühl- und Isolierflüssigkeit in Kondensatoren und Transformatoren bis heute Verwendung. Als sich ihre Akkumulation in der Umwelt herausstellte (Jensen, 1966), wurden die Herstellung und Verwendung von PCB 1977 in den USA und 1983 in Deutschland verboten.

Die PCB-Konzentration in biologischen Proben hat zwar in den letzten 20 Jahren weltweit abgenommen (Kimbrough, 1995), trotzdem ist die menschliche Exposition aufgrund der Verwendung als Hydrauliköle, Kühl- und Isolierflüssigkeit in Kondensatoren und Transformatoren immer noch sehr bedenklich. Darüber hinaus werden sie auch weiterhin bei Verbrennungsvorgängen freigesetzt (Hagenmaier et al., 1995). Die PCB werden auch heute noch in Russland hergestellt (Carpenter, 1998) und in Entwicklungsländern werden sie immer noch eingesetzt. So stellen sie nicht nur für die Anwenderländer ein Expositionsrisiko dar, sondern verteilen sich ubiquitär über Atmosphäre und Ozean.

Für PCB sind eine Vielzahl speziesspezifischer toxischer Effekte bekannt, allerdings sind wegen der Mischexposition keine exakten Dosiswirkungsangaben möglich. In der Regel wurden PCB in kommerziellen Gemischen eingesetzt (z.B. Aroclor), daher sind Risikoabschätzungen für den Menschen sehr schwierig. Von besonderer Bedeutung ist die Langzeitexposition gegenüber niedrigen Dosen. Die humane Datenlage diesbezüglich ist allerdings spärlich.

Daten über die Toxizität von PCB beim Menschen konnten im Rahmen von Unglücksfällen in Japan 1968 (Yusho-Krankheit) und in Taiwan 1979 (Yu-Cheng-Erkrankung) gesammelt werden. Bei beiden Zwischenfällen kam es zur versehentlichen oralen Aufnahme von Reisöl, das mit PCB, PCDF und PCDD kontaminiert war (Kashimoto et al., 1985). Im Vordergrund der Symptomatik standen dermale Läsionen in Form einer Chlorakne. Inwieweit PCB für diese Effekte verantwortlich zu machen sind, bleibt umstritten, denn beide Personenkreise waren

auch PCDD und insbesondere hochgiftigem PentaCDF in nicht genau ermittelbaren Mengen ausgesetzt (Safe, 1984). Neugeborene von betroffenen Frauen des Yusho-Unglücks fielen unter anderem durch verzögertes Längenwachstum, verzögerte Gewichtszunahme und mentale Retardierung im Vergleich zu nicht exponierten Säuglingen auf (Rogan et al., 1990).
Der jüngste Zwischenfall ereignete sich in Belgien 1999, wo 500 Tonnen Tierfutter, welches mit 50 kg PCB und 1 g Dioxin kontaminiert war, an Tiermastbetriebe in Belgien, den Niederlanden, Frankreich und Deutschland ausgeliefert und verfüttert wurde (van Larebeke et al., 2001). Die Folgen auf die Menschen, die die kontaminierten Produkte verzehrten, sind noch nicht absehbar.

Die Hauptexpositionsquelle für PCB bei beruflich nicht exponierten Menschen stellen zu 90% der Verzehr von belasteten Nahrungsmitteln sowie die Inhalation belasteter Innenluft dar. Die dermale Exposition ist in der Normalbevölkerung vernachlässigbar. PCB werden im Gastrointestinaltrakt gut absorbiert. Des Weiteren gelangen sie bei Schwangeren über die Plazenta in den Fötus und über die Muttermilch in den Neugeborenen (Ando et al., 1985). Für Säuglinge ist das Stillen eine Expositionsquelle, allerdings sanken die mittleren PCB-Konzentrationen in deutschen Muttermilchproben um bis zu 60% in den vergangenen Jahren (Heinzow et al., 1998). Boersma et al. (2000) zeigten, dass pränatale PCB-Exposition einen negativen Effekt auf die neurologische und kognitive Entwicklung von Kindern bis hin zum Schulalter hat.
Nach der Aufnahme von PCB gehen sie in das Blut über und binden letztlich an High Density Lipoproteine und andere Fettbestandteile. Die weitere Verteilung im Organismus verläuft biphasisch. Das bedeutet, dass es zunächst zu einer Anreicherung im Leber- und Muskelgewebe kommt. Von hieraus findet eine Umverteilung in das schlechter durchblutete Fettgewebe der Haut statt (Bridges, 1993). Verteilung und Metabolisierung hängen im Wesentlichen von der Anzahl und der Stellung der Chloratome im Molekül ab. Dabei werden PCB in der Phase-I-Reaktion durch CYP450-abhängige mischfunktionelle Monooxygenasen und Glutathion-S-Transferasen biotransformiert. Die Metabolisierungsrate in vivo wie in vitro ist insbesondere für PCB mit mehr als 6 Chloratomen sehr langsam. Beim Menschen wurden von Steele et al. (1986) die Halbwertszeiten niedrig chlorierter

PCB auf 6-7 Monate und für höher chlorierter PCB auf 33-34 Monate geschätzt. Demzufolge ergibt sich mit ansteigendem Alter eine Anreicherung höher chlorierter Kongenere im Organismus. Die Metabolisierung erfolgt hauptsächlich durch Hydroxylierung über Epoxid-Intermediate zu Hydroxy-PCB. Durch erneute Oxidation der phenolischen Hydroxy-Gruppe erfolgt die Bildung von Katecholen. Weitere Metabolite können durch die Reaktion von Epoxiden mit Glutathion entstehen. Die endgültige Ausscheidung erfolgt über die Galle, Faeces oder Urin, nachdem die gebildeten Metabolite in der Phase-II-Reaktion zu wasserlöslichen Glucuroniden und Acetaten konjugiert werden. Art und Geschwindigkeit der Metabolisierung ist speziesabhängig (Safe et al., 1991).

1.3.3 Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM)

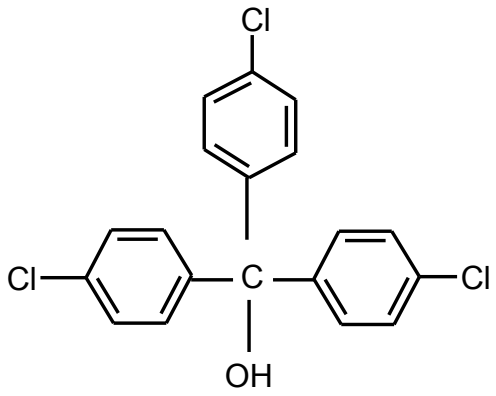

Abbildung 4: Strukturformel TCPM

1989 berichteten Walker et al. zum ersten Mal über Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM). Diese Substanz wurde überall in der Welt in Meeressäugetieren, Fischen und Vögeln gefunden, und zwar in ähnlichen Konzentrationen wie das Dichlor-diphenyl-trichloräthan (DDT) (Jarman et al., 1992; Zook et al., 1992; De Boer et al., 1994). DDT, ein halogenierter Kohlenwasserstoff, wurde lange Zeit als Pflanzenschutzmittel eingesetzt, ist aber wegen der hohen Persistenz und Bioakkumulation seit den 70er Jahren in Deutschland verboten.

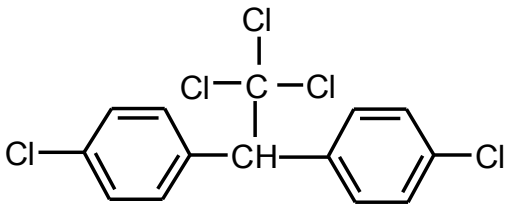

Abbildung 5: Strukturformel DDT

TCPM ist ein organischer Fremdstoff mit globaler Verteilung und starker Anreicherung in der Nahrungskette. Selbst in der Muttermilch wurde diese Substanz entdeckt, allerdings in 2 bis 3mal schwächerer Konzentration als die PCB (Rahman et al., 1993). Bei Säugetieren der Nordsee fanden sich Konzentrationen von 1-2 mg/kg (de Boer, 1997). Minh et al. (2001) fanden hohe TCPM-Anreicherungen (bis zu 18 ng/g) im Fettgewebe von Japanern sowie eine niedrigere Anreicherung von TCPM in Leber und Gallenblase. Aufgrund der genannten Datenlage ist von einem ubiquitären Vorkommen dieser Substanz auszugehen.

Die Herkunft des TCPM ist weitgehend unbekannt. Diskutiert wird die Freisetzung aus optisch aktiven Polymeren, landwirtschaftlichen Chemikalien und Verbindungen zur Farbenherstellung (Jarman et al., 1992). Nach einer Studie von Buser (1995) entsteht Tris(4-chlorophenyl)methanol durch Abbau des Tris(4-chlorophenyl)methan, ein Nebenprodukt bei der DDT-Herstellung.

Über die Toxizität und den Wirkmechanismus des TCPM ist bisher noch wenig bekannt. Die orale Kurzzeitexposition von Ratten führte zu Leberveränderungen, Milzvergrößerung und einer Zunahme der Leukozyten und Lymphozyten (Poon et al., 1997). Foster et al. (1999) untersuchten FSH, LH und Testosteronkonzentrationen nach oraler Aufnahme von bis zu 100 µM TCPM pro Tag bei der Ratte. Dabei konnte eine cAMP-Reduktion, wie auch eine Affinität zum Androgenrezeptor festgestellt werden. Eine Veränderung der Serumtestosteronwerte konnte nicht gezeigt werden, allerdings fand sich eine FSH-Erhöhung bei unveränderten LH-Konzentrationen im Serum. Lascombe et al. konnten 2000 zum ersten Mal an einer humanen Brusttumor-Zelllinie (MCF-7) auch eine Bindung an Östrogenrezeptoren zeigen.

Beim DDT hingegen wurde schon früh (Bitman et al., 1970) ein östrogener Effekt durch Bindung an Östrogen-Rezeptoren gezeigt.
Ebenso scheint TCPM nach oraler Aufnahme bei Ratten verschiedene Cytochrom P450 Enzymsysteme der Leber zu aktivieren (Poon et al., 1997). Ob TCPM eine Ah-Rezeptoraffinität aufweist ist bisher nicht bekannt.
Obwohl diese Substanz ubiquitär vorkommt, dem DDT strukturell sehr ähnlich ist und bioakkumuliert, ist über die Toxizität und die Wirkung auf Mensch und Tier kaum etwas bekannt. Aufgrund der momentanen spärlichen Datenlage wird von einer moderaten humanen TCPM-Belastungssituation ausgegangen. Durch seine endokrine Aktivität in vitro erscheint das TCPM im Hinblick auf seine reproduktionstoxikologische Relevanz untersuchenswert, und soll in dieser Arbeit weiter charakterisiert werden.

2 Aufgabenstellung

- Anzüchtung und Etablierung der malignen, immortalisierten Leydigzelllinie R2C der Ratte.
- Überprüfung der Steroidhormonsekretion der immortalisierten R2C-Leydigzellen der Ratte durch trophische Stimulation.
- Überprüfung der Eignung der R2C-Zelllinie als In-vitro-Modell zur Untersuchung von Partialfunktionen der Steroidbiosynthese mit besonderer Berücksichtigung der Östradiolsekretion.
- Überprüfung der Steroidhormonsekretion der R2C-Zellen unter Inkubation mit Enzyminhibitoren oder Enzyminduktoren.
- Bestimmung der Zellvitalität der R2C-Zellen unter dem Einfluss von Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM) und 3,3´,4,4´,5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126).
- Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Zellvitalität und den verschiedenen Konzentrationen von PCB 126.
- Erstellung einer Dosis-Wirkungs-Beziehung zwischen der Zellvitalität und den verschiedenen Konzentrationen von TCPM.
- Untersuchung der Östradiolsynthese der R2C-Zellen unter dem Einfluss von PCB 126.
- Untersuchung der Östradiolsynthese der R2C-Zellen unter dem Einfluss von TCPM.

3 Material und Methoden

Die hier beschriebenen Versuche wurden im Labor der andrologischen Forschungsabteilung des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen durchgeführt.

3.1 Sicherheitsvorkehrungen beim Arbeiten mit halogenierten Kohlenwasserstoffen

Bei der Arbeit mit halogenierten Kohlenwasserstoffen wurden bestimmte Maßnahmen zur Verminderung einer Kontamination der Umgebung und der Labormitarbeiter ergriffen. Mitarbeiter, die mit den Fremdstoff-kontaminierten Proben zu tun hatten, wurden eingehend über die Sicherheitsmaßnahmen informiert.

Die Sicherheitsvorkehrungen bei der Arbeit mit toxischen Substanzen, wie beispielsweise PCB und TCPM, entsprachen den Empfehlungen des ehemaligen Bundesgesundheitsamtes („Sicherheitsvorkehrungen für Arbeiten mit 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo-p-dioxin, anderen chlorierten Dibenzodioxinen (PCDD), Dibenzofuranen (PCDF) und ähnlichen hochtoxischen Stoffen“, Bundesgesundheitsamt). PCB und TCPM wurden grundsätzlich unter einem Abzug und mit doppelten Gefäßen abgewogen und verarbeitet. Ferner wurden auf der Arbeitsfläche einseitig plastifizierte Polytrap-Unterlagen (Firma Multimed, Baden, Schweiz) ausgelegt. Nach Beendigung der Arbeiten wurden diese, zusammen mit Resten der kontaminierten Medien und Gefäßen, gemäß der Abfallentsorgung für Gefahrenstoffe in Absprache mit dem Gefahrenstoffbeauftragten der Justus-Liebig-Universität Gießen entsorgt.

Bei den Arbeiten mit Fremdstoffen wurde grundsätzlich unter einem Abzug gearbeitet und zum persönlichen Schutz Einmalschutzkittel, Kopfbedeckung, Mundschutz und doppelte Handschuhe getragen.

3.2 Die R2C-Zelllinie und ihre Kulturbedingungen

Die R2C-Leydigzellen der Ratte wurden in tiefgefrorenem Zustand von der American Type Tissue Collection (R2C; ATCC CCL-97) bezogen. In unserem Labor wurden die Zellen aufgetaut und als Monolayer in 250 ml Zellkulturflaschen (Greiner Labortechnik, Frickenhausen) in Kulturmedium (KM) gehalten. Das Kulturmedium bestand aus Ham's F10 Medium (Gibco Karlsruhe, Deutschland) mit 15% Pferdeserum (Gibco, Karlsruhe), 2,5% fetalem Kälberserum (Gibco, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin).

Zweimal pro Woche wurden die am Boden haftenden Zellen mittels Trypsin gelöst, in neue Kulturflaschen mit frischem Medium überführt und weiter kultiviert. Zunächst erfolgte die Vitalitätskontrolle der Zellen lichtmikroskopisch. Lebende Zellen hafteten am Boden der Kulturflasche, während tote Zellen sich vom Boden gelöst hatten und im Medium frei flottierten. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Trypsin (0,25% in Dulbecco's Phosphatpuffer ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}, Biochrom, Berlin) gespült um oberflächliche, abgestorbene Zellen zu lösen. Schließlich wurden die subkonfluent gewachsene Zellen mittels Trypsin vom Boden der Kulturflaschen abgelöst. Je nach Bedarf wurden 1 bis 5 ml der Zellsuspension in eine neue, mit 20 ml Medium gefüllte Kulturflasche transferiert.

Bei dem Umgang mit Zellkulturen wurde besonders auf die Verhinderung möglicher mikrobieller Kontamination geachtet. Hierfür wurde unter Verwendung von sterilen Einmalartikeln unter der Sicherheitsbank gearbeitet. Die Inkubation der Zellen erfolgte in sterilen Kulturflaschen (250 ml, Greiner, Frickenhausen) mit 0,2 µm Deckelfilter bei 37°C, 5% CO_2-Anreicherung und feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre im Brutschrank. Die hohe Luftfeuchtigkeit war dabei wichtig, um die Verdampfung von Medium aus den Kulturflaschen so gering wie möglich zu halten.

3.2.1 Wachstumskurve

Dieser Vorversuch diente der Austestung der Wachstumskinetik der R2C-Zellen in einer 24-Well-Platte (Well = Vertiefung) (Falcon, New Jersey, USA) ausgehend von verschiedenen Ausgangskonzentrationen. Hierfür wurde zunächst eine Standard-Zellsuspension erstellt, von der ausgehend weitere Zellsuspensionen angelegt wurden. Am Tag 0 wurden 24-Well-Platten mit den Ausgangskonzentrationen 20000,

40000, 60000 und 80000 Zellen/ml/Well bestückt. Pro Ausgangszellkonzentration wurden 4 Wells bestückt. Die Auszählung der Zellen erfolgte an den Tagen 1 bis 11, wobei die Tag-1-Auszählung nach 24-stündiger Inkubation erfolgte. Die Inkubation erfolgte unter den bekannten Bedingungen. Parallel dazu erfolgte die Durchführung des MTT-Assays.

3.2.2 Zellzählung

Vor dem Auszählen wurde der Zellüberstand vorsichtig abgesaugt und mit 500 µl Dulbecco's Phosphatpuffer (PBS, Phosphate Buffered Saline Oxoid, Unipath, England) einmal gespült. Anschließend wurden die Zellen mit 300 µl Trypsin (Biochrom, Berlin) abtrypsiniert und vorsichtig zu einer Einzelzellsuspension homogenisiert. Die Zellzahl wurde mittels lichtmikroskopischer Auszählung in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Es ergaben sich insgesamt vier verschiedene Wachstumskurven.

3.2.3 MTT-Assay

Der Test dient dem Nachweis der Stoffwechselaktivität der Mitochondrien und damit der Lebensfähigkeit der Zelle. Analog der Zellzählung wurden 24-Well-Platten mit den Ausgangkonzentrationen 20000, 40000, 60000 und 80000 Zellen/ml/Well bestückt. Von Tag 1 bis 11 wurde jeweils der MTT-Assay durchgeführt. Bei diesem Assay nehmen lebende Zellen gelbes Tetrazoliumsalz (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid, Boehringer Ingelheim, Deutschland) auf und reduzieren es durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zu blauem unlöslichem MTT-Formazan.

Zunächst wurde eine MTT-Stammlösung mit 5 mg MTT/ml PBS erstellt. Die Zellüberstände wurden vorsichtig aus den Wells abgesaugt, anschließend wurden die am Boden haftenden Zellen mit 250 µl MTT-Stammlösung überschichtet und 3 Stunden lichtgeschützt bei 37°C inkubiert. Darauf folgend wurde der MTT-Überstand abgesaugt und 500 µl Dimethylsulfoxid (DMSO) (Merck, Darmstadt) in jedes Well eingebracht. Unter vorsichtigem Schütteln der Wellplatte wurde das blaue Formazan-Produkt aus den Zellen gelöst. Nach 10 Minuten bei Raumtemperatur wurden je Well der 24-Well Platte 400 µl Probe entnommen und auf eine 96-Well Platte mit je 100 µl Probe pro Well verteilt. D.h. pro Testsubstanz wurden 16 Well auf der 96-Well-Platte gemessen. Die Absorption wurde in Doppelbestimmung photometrisch bei einer

Testwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlängen von 630 nm im MTP Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Österreich) ermittelt.

3.3 Untersuchung der Steroidsyntheseleistung von R2C-Zellen

3.3.1 Basale Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen

Zunächst wurde die Hormonsyntheseleistung der R2C-Zellen unter basalen Bedingungen, d.h. in serumfreiem Medium ohne Stimulation, untersucht. Das serumfreie Medium (SM) setzte sich zusammen aus: Ham's F10 Medium (Gibco, Karlsruhe), 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin (Gibco, Karlsruhe) und 2 mM L-Glutamin (Biochrom, Berlin).

Hierfür wurden 60000 Zellen/ml/Well in 24-Well-Platten für 4 Tage in KM kultiviert. Am 4. Tag wurde das Medium abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen mit 500 µl PBS zweimal gespült. Anschließend wurden die Zellen in serumfreiem Medium gehalten und für weitere 24 Stunden inkubiert. Daraufhin erfolgte das Einfrieren der Proben bei –20°C bis zur Hormonbestimmung. Insgesamt wurden die Zellen im Vierfachansatz getestet und jeweils drei Wiederholungsexperimente durchgeführt.

3.3.2 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zusatz einzelner Steroidhormonvorstufen

Mit den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit verschiedene Steroidvorstufen die Hormonsekretion der Zelllinie beeinflussen.

Folgende Steroidpräkursoren wurden dabei eingesetzt:

1. Androstendion (4-Androstene-3,17-dion, $C_{19}H_{26}O_2$, MG 286,4)

2. Testosteron (4-Androsten-17β-ol-3-on, $C_{19}H_{28}O_2$, MG 288,4)

3. Dehydroepiandrosteron-3-sulfat (5-Androsten-3β-ol-17-one-sulfat, $C_{19}H_{27}O_5SNa$, MG 390,5)

4. Dehydroepiandrosteron (5-Androsten-3β-ol-17-on, $C_{19}H_{28}O_2$, MG 288,4)

5. Progesteron (4-Pregnene-3,20-dion, $C_{21}H_{30}O_2$, MG 314,5)

6. Pregnenolon (5-Pregnen-3β-ol-20-on, $C_{21}H_{32}O_2$, MG 316,5)

7. 17α-Hydroxyprogesteron (4-Pregnen-17α-ol-3,20-dion, $C_{21}H_{30}O_3$, MG 330,5)

8. 17α-Hydroxypregnenolon (5-Pregnene-3β-17α-diol-20-on, $C_{21}H_{32}O_3$, MG 332,5)

Alle Substanzen wurden in einer Konzentration von 10 µM pro Well eingesetzt. Sie wurden von der Firma Sigma (Taufkirchen, Deutschland) in Pulverform bezogen und in Äthanol gelöst. Es wurde eine Standardlösung von 0,1 M hergestellt und mit serumfreiem Ham's F10 Medium entsprechend verdünnt. 0,1% (v/v) Äthanol pro Well wurde dabei nicht überschritten.
60000 Zellen/ml KM/Well wurden auf einer 24-Wellplatte ausgesät. Am 4. Tag wurde das Medium abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen mit 500 µl PBS zweimal gespült. Anschließend erfolgte Die Überschichtung der Zellen mit dem serumfreiem Medium und der entsprechenden Steroidvorstufe. Jedes Steroid wurde im Vierfachansatz getestet und für weitere 24 Stunden inkubiert. Daran schlossen sich die Protein- und Hormonbestimmung sowie der MTT-Assay an. Insgesamt wurden drei Wiederholungsexperimente durchgeführt.

3.4 Hormonsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren und –induktoren sowie Stimulatoren und Induktoren von Signaltransduktionswegen

Mit den folgenden Versuchen sollte untersucht werden, ob die Hormonsekretion der R2C-Zellen durch die Zugabe verschiedener Enzyminhibitoren bzw. -induktoren beeinflusst wird. Folgende Substanzen wurden dabei eingesetzt:

1. **4-Hydroxyandrostendion (4-Androsten-4-ol-3,17-dion), (4-OHA) MG: 302,4**
   4-OHA wurde in Äthanol gelöst. Durch entsprechende Verdünnung mit Kulturmedium (KM) wurden Arbeitskonzentrationen von 100 µM, 1 µM und 10 nM erstellt.
2. **Forskolin (7β-Acetoxy-8,13-epoxy-1α,6β,9α-trihydroxylabd-14-en-11-on) MG: 410,5**
   Forskolin wurde in DMSO gelöst. Durch entsprechende Verdünnung mit KM wurden Arbeitskonzentrationen von 100 µM und 1 µM erstellt.
3. **H7 (1-(5-isoquinolinylsulfonyl)-2methylpiperazin) MG: 291,4**
   H7 wurde in DMSO gelöst. Durch entsprechende Verdünnung mit KM wurden Arbeitskonzentrationen von 50 µM und 20 µM erstellt.
4. **Phorbol-12,13-Diacetat (PDA) MG: 448,5**
   PDA wurde in DMSO gelöst. Durch entsprechende Verdünnung mit KM wurden Arbeitskonzentrationen von 10 µM und 1 µM erstellt.
5. **Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) MG: 616,8**
   PMA wurde in DMSO gelöst. Durch entsprechende Verdünnung mit KM wurden Arbeitskonzentrationen von 10 µM, 100 nM und 1 nM erstellt.

Sämtliche Substanzen wurden von der Firma Sigma, Taufkirchen, bezogen.
Zunächst säte man 60000 Zellen/ml Medium/Well auf einer 24-Well Multikulturplatte aus. Am Tag 1, nach 24-stündiger Inkubation, wurde der Zellüberstand abgesaugt und die am Boden haftenden Zellen mit 500 µl PBS zweimal gespült, 1 ml KM mit dem jeweiligen Enzyminhibitor bzw. -induktor in den entsprechenden Arbeitskonzentrationen zugegeben und bis zum Tag 5 inkubiert. Als Kontrollen liefen gleichzeitig KM mit 0,1% Äthanol beziehungsweise 0,1% DMSO mit. Jede Substanz wurde im Vierfachansatz und in zehn Wiederholungsexperimenten getestet. Für die

Proteinbestimmung und für den MTT-Assay wurden entsprechende Multikulturplatten angesetzt. Am Tag 5 überführten wir die Zellüberstände in Plastikröhrchen und frohren diese bis zur Bestimmung der Testosteron-, Progesteron- und Östradiolkonzentration bei –20°C ein.

3.5 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit dem BIO-Rad Protein Assay (München).

Verwendete Lösungen:

- Lysis-Puffer: 0,5 M NaOH mit 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS)
- Reagenz A: alkalische Kupfer-Tartrat- Lösung
- Reagenz B: verdünntes Folin-Reagenz

Der Assay basiert auf einer Proteinreaktion zwischen alkalischer Kupfer-Tartrat-Lösung und Folin-Reagenz. Es gibt 2 Schritte, welche zur Farbreaktion führen: Die Reaktion zwischen Protein und Kupfer in einem alkalischen Medium, und die anschließende Reduktion von Folin-Reagenz durch das Kupfer-behandelte Protein. Die Farbentwicklung ist hauptsächlich bedingt durch die Aminosäuren Tyrosin und Tryptophan, zu einem geringerem Teil aber auch durch Cystein und Histidin. Proteine bewirken eine Reduktion des Folin-Reagenz durch den Verlust von Sauerstoffatomen. Dabei nehmen die Endprodukte die charakteristische blaue Farbe an und können darauf photometrisch bestimmt werden.

Zunächst wurden die Zellüberstände der zu untersuchenden Zellen entfernt, und die Zellen mit 500 µl PBS gespült. Anschließend wurden diese mit Lysis-Puffer überschichtet und für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Transferierung von 20 µl des jeweiligen Homogenats auf eine 96-Wellplatte. Sämtliche Proteinbestimmungen wurden doppelt angesetzt. Folgende Arbeitsschritte wurden schematisch durchgeführt:

1. Zugabe von 200 µl Reagenz A zu je 20 µl Probe in einer 96-Well-Platte. Dabei bindet der Farbstoff unspezifisch an die Aminogruppe der in der Probe enthaltenen Proteine.
2. Zugabe von je 25 µl Reagenz B. Dadurch wurde eine Farbreaktion ausgelöst, die umso stärker ausfällt, je mehr Protein vorhanden ist.
3. Inkubation für 30 min. bei Raumtemperatur.

4. Messung der Absorption der Lösung am MTP-Reader EAR 400 ATC (SLT Labinstruments, Österreich) bei einer Wellenlänge von 750 nm.
5. Bestimmung des Proteingehaltes mittels einer Standardkurve. Die Standardkurve wurde mit Rinderserumalbumin (BSA) (Sigma, Taufkirchen) ermittelt. Ausgehend von einer Stammlösung mit 1400 µg Protein wurde eine Verdünnungsreihe mit 1000 µg, 600 µg und 200 µg erstellt. Im Konzentrationsbereich von 200 – 1400 µg/ml verlief die Standardkurve linear. Die untere Nachweisgrenze lag bei 200 µg/ml.

3.6 Hormonsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss von zwei verschiedenen polychlorierten Kohlenwasserstoffen

Die folgenden Experimente wurden durchgeführt um den Einfluss des coplanaren 3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl (PCB 126) und des Tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM) auf die Zellvitalität und die Hormonsekretion von R2C-Zellen zu untersuchen.
Folgende Substanzen wurden dabei eingesetzt:

1. PCB 126 („non-ortho“-3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl) (Promochem, Wesel). Zunächst wurde eine Stammlösung mit 4 mg/ml in DMSO/Toluol 3:2 erstellt. Ausgehend hiervon wurden folgende rechnerischen Arbeitskonzentrationen eingesetzt:
4 µg/ml, 2 µg/ml und 1 µg/ml PCB 126 pro Well.

2. TCPM (Tris(4-chlorophenyl)methanol), (Lancaster, England). Zunächst wurde eine Stammlösung mit 100 mM (36,37 mg/ml) TCPM in DMSO hergestellt. Ausgehend hiervon wurden rechnerische Arbeitslösungen mit den Konzentrationen 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM, und 100 nM durch Verdünnung mit KM hergestellt.

3.6.1 Einbringung lipophiler Fremdstoffe in wässriges Kulturmedium

Durch die extreme Lipophilie der verwendeten Chemikalien mussten diese mittels einer geeigneten Trägersubstanz in die wässrige Lösung eingebracht werden. Die

Kontamination des Mediums erfolgte mittels Lösung des Fremdstoffes in DMSO oder DMSO/Toluol im Verhältnis 3:2.
Für die Aufbewahrung der Medien wurden ausschließlich Glasgefäße eingesetzt. Da die Fremdstoffkonzentrationen in den experimentellen Medien teilweise sehr niedrig lagen und eine Interferenz mit eventuell vorbestehenden PCB-Blindwerten aus der Raumluft nicht auszuschließen war, wurden alle Glasgefäße dreimal im Wechsel mit Toluol und Aceton pro Analyse und zuletzt mit PBS gespült. Abschließend wurden die Glasgefäße autoklaviert.

3.6.2 Versuchsaufbau und –ablauf

Der Versuchsaufbau entsprach weitestgehend dem der Vorversuche wie unter 3.4 beschrieben. Am Tag 0 wurden 60000 Zellen/ml Medium/Well auf eine 24-Well Multikulturplatte ausgesät. Am Tag 1, nach 24-stündiger Inkubation, wurde das KM abgesaugt, und durch 1 ml des fremdstoffhaltigen Mediums in den oben beschriebenen Arbeitskonzentrationen ersetzt. Als Kontrolle wurde 0,1% (v/v) DMSO beziehungsweise 0,1% (v/v) DMSO/Toluol 3:2 in KM mitgeführt. Analog erfolgte die Bestückung der Multikulturplatten für die Proteinbestimmung und den MTT-Assay. Die Inkubation erfolgte im Brutschrank bei 37°C und 5% CO_2-Anreicherung bis zum 5. Tag. Am 5. Tag konnten die Überstände abpipettiert und die Östradiolbestimmung durchgeführt (s. 3.7.2). Pro Fremdstoffkonzentration und pro Kontrolle wurden je 4 Wells angesetzt und insgesamt zehn Wiederholungsexperimenten durchgeführt.

3.7 Hormonbestimmung im Zellüberstand

3.7.1 Kompetitiver Enzymimmunoassay (EIA) zur Ermittlung der Östradiol-, Testosteron-, und Progesteron-Konzentration

Der verwendete Immunoassay ist ein vollautomatischer, immunologischer Test mit Magnettrenntechnik (Serono Diagnostika, Freiburg). Der Nachweis erfolgt über eine Enzym/Substrat-Reaktion und photometrischer Messung des chromogenen Signals. Hiermit konnten Testosteron, Progesteron und Östradiol in Serum, Plasma oder Zellüberständen quantitativ bestimmt werden.
Pro Test wurden für die Testosteronbestimmung 50 µl Zellüberstand unverdünnt, für die Östradiolbestimmung 200 µl Zellüberstand im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest.

verdünnt und für die Progesteronbestimmung 50 µl Zellüberstand im Verhältnis 1:100 mit Aqua dest. verdünnt verwendet.

3.7.2 Östradiolbestimmung

Die eingesetzten Teströhrchen wurden mit einem Östradiol-Derivat, an das die alkalische Phosphatase (AP) gekoppelt war, und mit einem fluoreszierenden polygonalen Anti-Östradiol-Antikörper (Fluorescein Isothiocyanat, FITC-AK) bestückt. Das AP-gekoppelte Östradiolderivat und das im Überschuss zugefügte nicht-markierte Östradiol der Zellüberstände konkurrierten kompetitiv um die begrenzte Menge an FITC-AK. Die gebundene Menge an FITC-markiertem Reagenz war umgekehrt proportional zur Konzentration an Östradiol in den Zellüberständen. Anschließend wurden Anti-FITC-Antikörper, an die magnetisierbare Partikel gebunden waren, hinzugegeben. Die Anti-FITC-Antikörper banden sowohl an das freie FITC-markierte Reagenz wie auch an die mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörper. Es entstanden Antigen-Antikörper-Komplexe. Das freie FITC-markierte Reagenz und die FITC-markierten Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mit Hilfe eines Magnetfeldes aus den Ansätzen entfernt. Nach dem Absaugen der Flüssigphase und nach einem Waschvorgang wurde Phenolphthalein Monophosphat hinzugefügt und inkubiert. Die alkalische Phosphatase des Magnet-Antikörper-Komplexes spaltete eine Phosphatgruppe des Phenolphthalein ab. Eine alkalische Beendigungslösung wurde hinzugegeben um die Enzymreaktion zu stoppen. Gleichzeitig nahm das Phenolphthalein eine rosa Farbe an. Diese gefärbte Lösung wurde bei 650, 554 und 490 nm photometrisch gemessen. Die gebildete Farbintensität war umgekehrt proportional zur Konzentration des Hormons in der Probe.

Mit diesem Assay wurde ein Östradiolkonzentrationsbereich von 0 bis 3000 pg/ml erfasst. Die Sensitivität, d.h. die Nachweisgrenze definiert als der kleinste von Null unterscheidbare Wert, wurde vom Hersteller mit 5 pg/ml angegeben.
Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Standards mit Konzentrationen von 0, 25, 50, 100, 250, 750 1500 und 3000 pg /ml verwendet. Damit konnte die unbekannte Konzentration des jeweiligen Zellüberstandes bestimmt werden.

Durch wiederholte Messung von Proben ergab sich ein Intra-Assay-Variationskoeffizient, als Maß für die Genauigkeit des Tests, der zwischen 5 und 16% und ein Inter-Assay-Variationskoeffizient der zwischen 10 und 11% lag.

3.7.3 Testosteronbestimmung

Analog der Östradiolbestimmung wurde die Progesteronbestimmung mit dem oben genannten Assay durchgeführt. Das genaue Vorgehen wird unter 3.7.2 beschrieben.
Mit diesem Assay wurde ein Testosteronkonzentrationsbereich von 0 – 17 ng/ml erfasst.
Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Standards mit Konzentrationen von 0, 0,2, 1, 4, 8 und 17 ng/ml verwendet. Damit konnte die unbekannte Konzentration des jeweiligen Zellüberstandes bestimmt werden.
Durch wiederholte Messung von Proben ergab sich ein Intra-Assay-Variationskoeffizient der zwischen 6 und 10% und ein Inter-Assay-Variationskoeffizient der zwischen 11 und 12% lag. Die Sensitivität betrug 0,1 ng/ml.

3.7.4 Progesteronbestimmung

Analog der Östradiolbestimmung wurde die Testosteronbestimmung mit dem oben genannten Assay durchgeführt. Das genaue Vorgehen wird unter 3.7.2 beschrieben.
Mit diesem Assay wurde ein Progesteronkonzentrationsbereich von 0 - 40 ng/ml erfasst.
Zur Erstellung einer Standardkurve wurden Standards mit Konzentrationen von 0, 1, 5, 10, 20 und 40 ng/ml verwendet. Damit konnte die unbekannte Konzentration des jeweiligen Zellüberstandes bestimmt werden.
Durch wiederholte Messung der Proben ergab sich ein Intra-Assay-Variationskoeffizient zwischen 8 und 17%, ein Inter-Assay-Variationskoeffizient zwischen 9 und 20% und eine Sensitivität von 2 ng/ml.

3.8 Statistische Auswertung

Zum Vergleich der einzelnen Konzentrationen mit der Kontrolle wurde jede einzelne Stichprobe mit der Kontrollstichprobe (abhängige Stichproben) verglichen. Hierfür

wurde der Wilcoxon-Test angewandt. Es handelt sich um einen üblichen Test zum nichtparametrischen Vergleich zweier abhängiger Stichproben. Er basiert auf einer Rangreihe der absoluten Wertepaardifferenzen. Einheitlich wurden zwei Stichproben miteinander verglichen. Die Mediane, Standardabweichungen und das konventionelle α-Fehler-Niveau von 5% (Irrtumswahrscheinlichkeit, $p < 0,05$) wurden errechnet und in Graphiken gegenübergestellt. Es wurden Signifikanzen erst ab dem 5% Niveau angenommen ($p < 0,05$).

Hinzuweisen ist auf den explorativen Charakter der Arbeit. Die Vorgehensweise ist nicht konfirmatorisch, sondern explorativ und die gefundenen Effekte wären in weiteren Versuchen zu verifizieren.

4 Ergebnisse

4.1 Wachstumskurven der R2C-Zellen

Beide Untersuchungen der Wachstumskurven wurden, wie unter 3.2.1 beschrieben, durchgeführt. Es ergaben sich vier verschiedene Wachstumskurven. Man sieht bei allen Kurven einen bis zum 2. Tag nur leichten Anstieg der Zellzahl, ab dem 2., besonders aber ab dem 3. Tag steigt die Zellzahl sehr rasch an. Ein Wachstumsmaximum wird zwischen dem 7. und 9. Tag erreicht, um danach bis zum 11. Tag wieder abzufallen. Für das weitere experimentelle Vorgehen erwies sich eine Ausgangskonzentration von 60000 Zellen/Well als optimal, wobei das Wachstum bis zum fünften Tag von besonderem Interesse war. Bei niedrigeren Ausgangszellkonzentrationen wurde die exponentielle Wachstumsphase im Verlauf der ersten 5 Tage nur zögerlich erreicht (Abbildung 6). Ähnlich verhielt es sich mit dem MTT-Assay. Man sieht bei allen Ausgangskonzentrationen ab dem 3. Tag einen Anstieg der Extinktion mit einem Maximum am 6. Tag. Vom 6. bis zum 11. Tag fällt die Extinktion wieder ab (Abbildung 7).

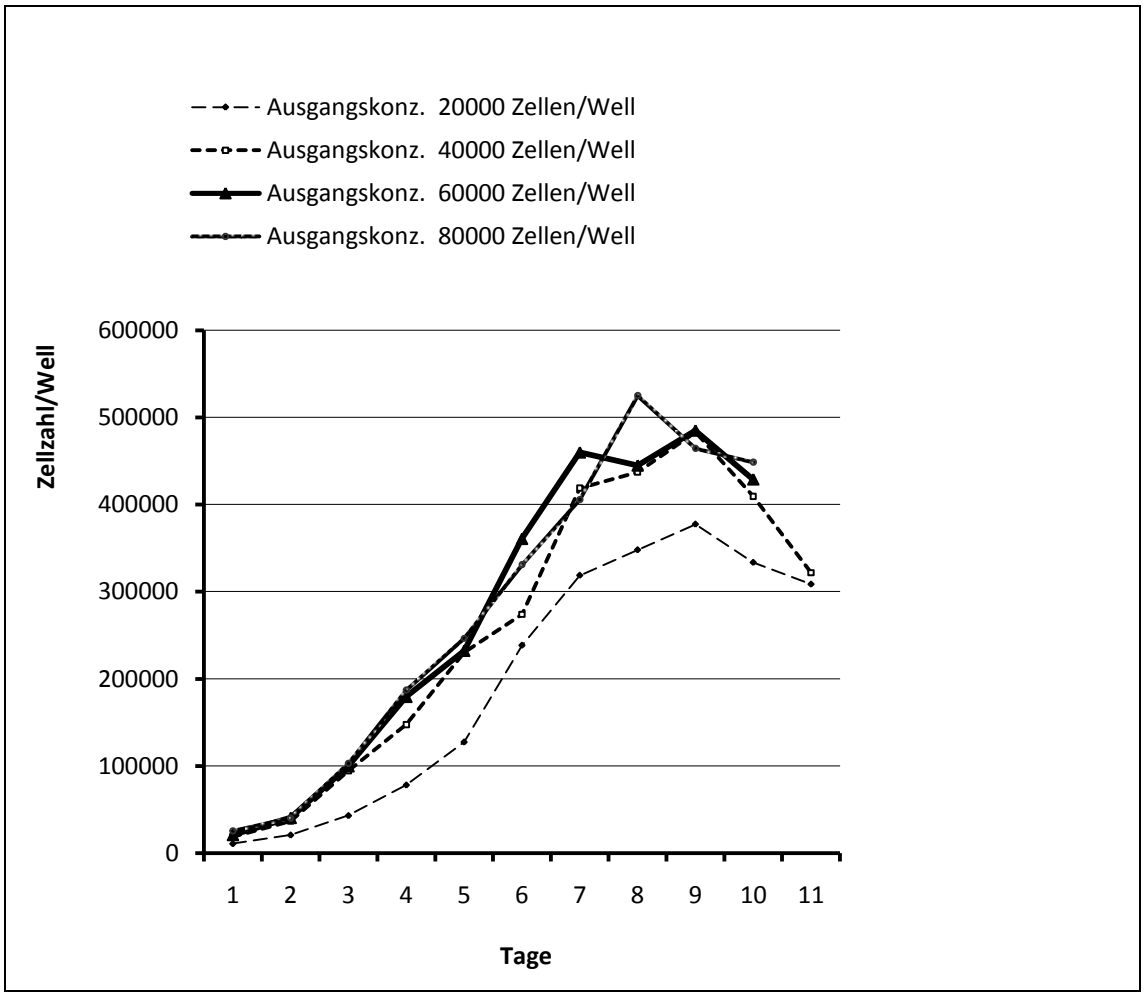

Abbildung 6: Wachstumskurven der R2C-Zellen in 24-Wellplatten in Abhängigkeit von verschiedenen Ausgangszellkonzentrationen. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 4 Ansätzen pro Zellkonzentration und Tag.

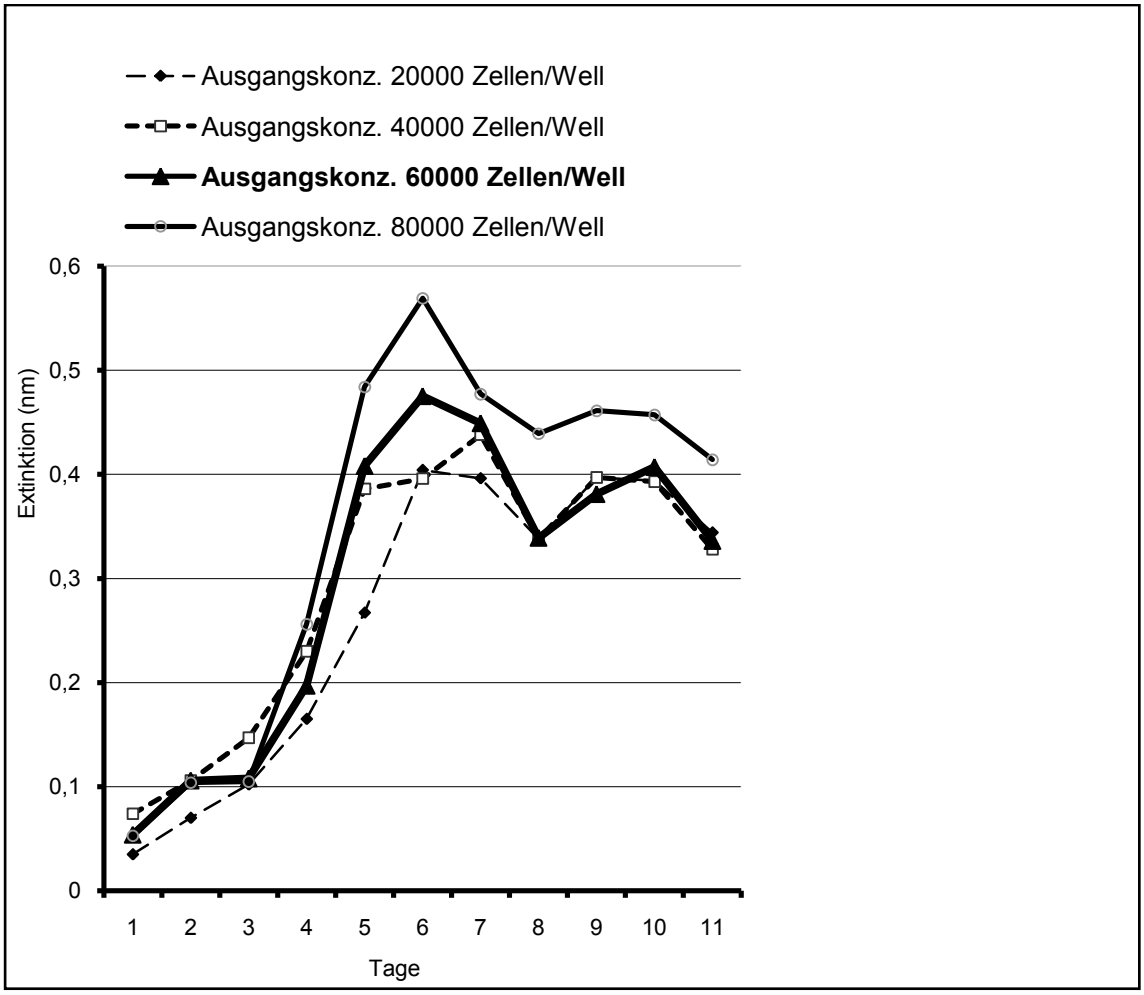

Abbildung 7: MTT-Assay. Extinktion bei 570 nm (Referenzwellenlänge 630 nm) in Abhängigkeit von der Zellzahl und dem Kulturtag. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Ansätzen pro Zellkonzentration und Tag.

4.2 Untersuchung der Steroidsyntheseleistung von R2C-Zellen

Das methodische Vorgehen dieser Vorversuche ist unter 3.3 beschrieben.

4.2.1 Basale Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen

Bei der Untersuchung der basalen Steroidsyntheseleistung zeigte sich, dass die R2C-Zellen als Hauptprodukt Progesteron und Östradiol sezernierten. Testosteron wurde lediglich in geringeren Mengen synthetisiert. Dargestellt sind die Mediane der Einzelmessungen (Tabelle 1).

Tabelle 1: Basale Östradiol-, Progesteron- und Testosteronsekretion über 24h in serumfreiem Medium.

ng Östradiol/mg Protein	ng Progesteron/mg Protein	ng Testosteron/mg Protein
329,71	2933,74	41,16
282,18	1760,23	30,99
202,83	3199,30	22,69

4.2.2 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zugabe von Pregnenolon, Progesteron, 17α-Hydroxypregenolon und 17α-Hydroxyprogesteron

Das Hauptaugenmerk liegt hierbei auf der Östradiolsynthese. Die Östradiolkonzentrationen in den Zellüberständen waren nach Zugabe der verschiedenen C21-Derivaten weitestgehend unverändert im Vergleich zur Äthanolkontrolle. Dargestellt sind die Mediane der jeweiligen Einzelmessungen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Darstellung der Östradiolkonzentrationen im Zellüberstand nach Zugabe der verschiedenen C21-Vorstufen im Vergleich zur Äthanolkontrolle.

	Pregnenolon	17α-Hydroxy-pregenolon	Progesteron	17α-Hydroxy-progesteron
Östradiol ng/ml	9,95	11,80	17,60	17,30
Östradiol ng/ml Äthanolkontrolle (ohne C21-Steroidzugabe)	11,00	10,80	12,90	11,10

4.2.3 Steroidsyntheseleistung der R2C-Zellen unter Zugabe von DHEAS, DHEA, Androstendion und Testosteron

Die Östradiolkonzentrationen im Überstand waren nach Zugabe von DHEAS und DHEA gegenüber der Äthanolkontrolle leicht erhöht. Ein deutlicher Anstieg der Östradiolwerte im Zellüberstand ergab sich nach Zugabe von Androstendion bzw. Testosteron. Dargestellt sind die Mediane der jeweiligen Einzelmessungen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Darstellung der Östradiolkonzentrationen im Zellüberstand nach Zugabe der verschiedenen C19 Vorstufen ohne Steroidzusatz im Vergleich zur Äthanolkontrolle.

	DHEAS	DHEA	Androstendion	Testosteron
Östradiol ng/ml	25,25	92,40	233,00	300,00
Östradiol ng/ml Äthanolkontrolle (ohne C19-Steroidzugabe)	11,00	10,80	12,20	11,60

Abbildung 8 zeigt den Vergleich der Östradiolsekretion aller verwendeten Steroidvorstufen. Dargestellt sind Mediane und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%. Insgesamt wurden 3 Wiederholungsexperimente à 4 Wells pro Präkursor durchgeführt.

Dabei war nach Zugabe von Androstendion und Testosteron ein deutlicher Anstieg der Östradiolkonzentration zu verzeichnen, die anderen Substanzen zeigten wenig bis gar keine Wirkung.

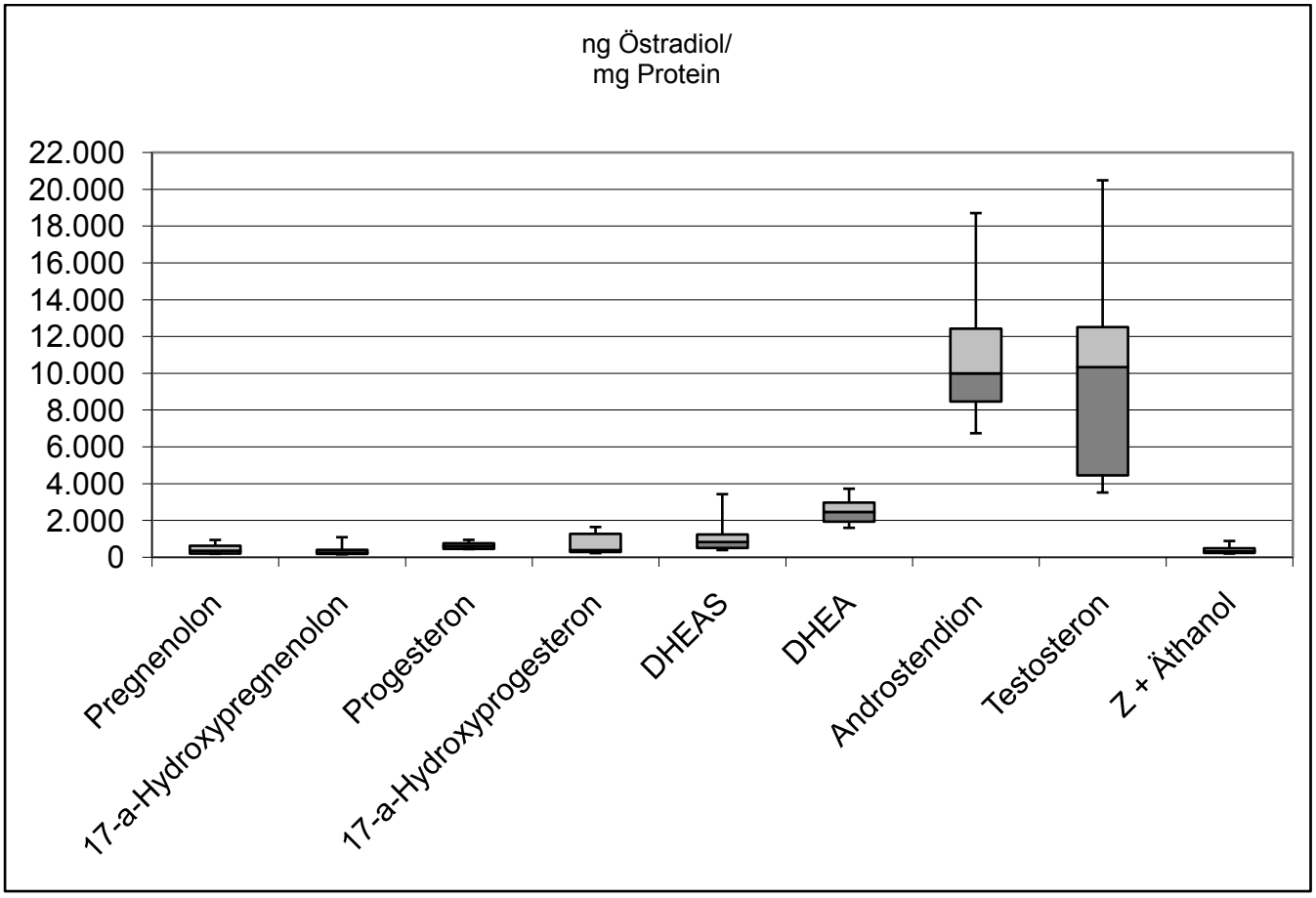

Abbildung 8: Östradiolsekretion in 24 Stunden unter Zugabe von einzelnen Steroidpräkursoren.

4.3 Östradiolsekretion und Vitalität der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Enzyminhibitoren und –induktoren, sowie Stimulatoren und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen

4.3.1 Effekte des Aromatase-Inhibitors 4-OHA auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen ist unter 3.4 beschrieben. In der Tabelle 4 sind die Östradiolkonzentrationen in den Zellüberständen pro Well aufgeführt. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche bei jeweils 4 Einzelmessungen. Dabei findet sich bei allen 4-OHA-Konzentrationen eine Reduktion der sezernierten Östradiolmenge, am deutlichsten nach Zugabe von 100 µM 4-OHA.

Im Gegensatz dazu wurden die in der Abbildung 9 dargestellten Hormonkonzentrationen auf mg Protein bezogen. 4-OHA-Konzentrationen von 1 µM und 100 µM führten zu einer signifikanten Abnahme der Östradiolsekretion gegenüber der Kontrolle (Wilcoxon-Test, $p < 0,05$). 10 nM führten zwar zu einer Reduktion der Östradiolsekretion, diese zeigte sich statistisch jedoch nicht signifikant. Die Zellvitalität wurde durch 4-OHA nicht beeinflusst.

Tabelle 4: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe von verschiedenen 4-OHA-Konzentrationen.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand			
100 µM 4-OHA	1 µM 4-OHA	10 nM 4-OHA	Äthanolkontrolle
9,70	14,20	38,00	49,35
9,95	19,90	33,30	58,35
11,70	13,90	25,60	30,20
11,30	20,20	32,00	49,15
11,50	14,20	17,95	16,60
8,05	10,00	14,65	11,55
9,80	12,00	15,90	16,80
10,80	11,35	12,55	14,10
8,70	9,70	25,20	12,05
9,90	9,20	12,25	12,20

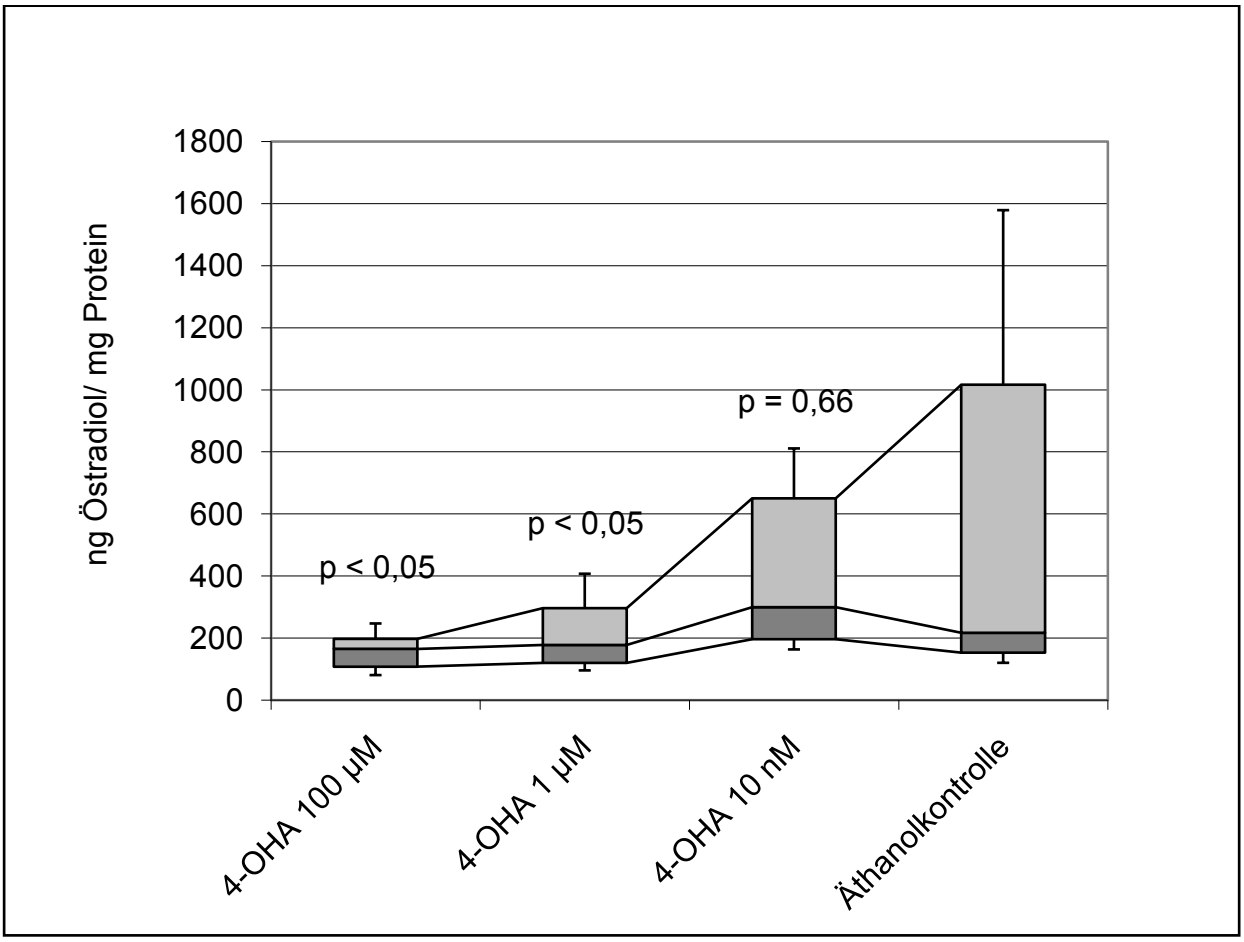

Abbildung 9: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen 4-OHA-Konzentrationen.

Dosisabhängige Inhibierung der Östradiolsekretion unter 4-OHA im Vergleich zur Äthanol-Kontrolle mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von 4-OHA auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwies sich lediglich die Konzentration von 100 µM als beginnend zytotoxisch (Tabelle 5).

Tabelle 5: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 100 µM, 1 µM und 10 nM 4-OHA im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

4-OHA-Konzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
4-OHA 100 µM	90%
4-OHA 1 µM	101%
4-OHA 10 nM	102%
Äthanolkontrolle	100%

4.3.2 Effekte des Proteinkinase-A-Aktivators und Adenylatcyclase-Aktivators Forskolin auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind der Tabelle 6 und der Abbildung 10 zu entnehmen. Die Östradiolkonzentration ist bei einer Konzentration von 100 µM Forskolin gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant erhöht ($p<0,05$, Wilcoxon-Test), allerdings ist dabei die Zellvitalität auf 75% reduziert, wie Tabelle 7 zeigt. Somit ist die Erhöhung der Östradiolkonzentration unter der Inkubation mit 100 µM Forskolin als Artefakt zu werten, da gleichzeitig eine deutliche Zytotoxizität nachzuweisen war. Bei einer Konzentration von 1 µM konnte keine wesentliche Veränderung der Östradiolkonzentration festgestellt werden.

Tabelle 6: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen Forskolin-Konzentrationen. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand		
Forskolin 100 µM	Forskolin 1 µM	DMSO-Kontrolle
81,50	68,60	64,35
55,15	38,00	56,50
28,65	23,90	28,90
63,75	49,00	66,15
17,40	17,20	15,60
13,70	12,15	12,65
15,95	13,75	13,80
30,15	26,45	22,45
20,05	19,30	27,10
12,25	14,15	15,25

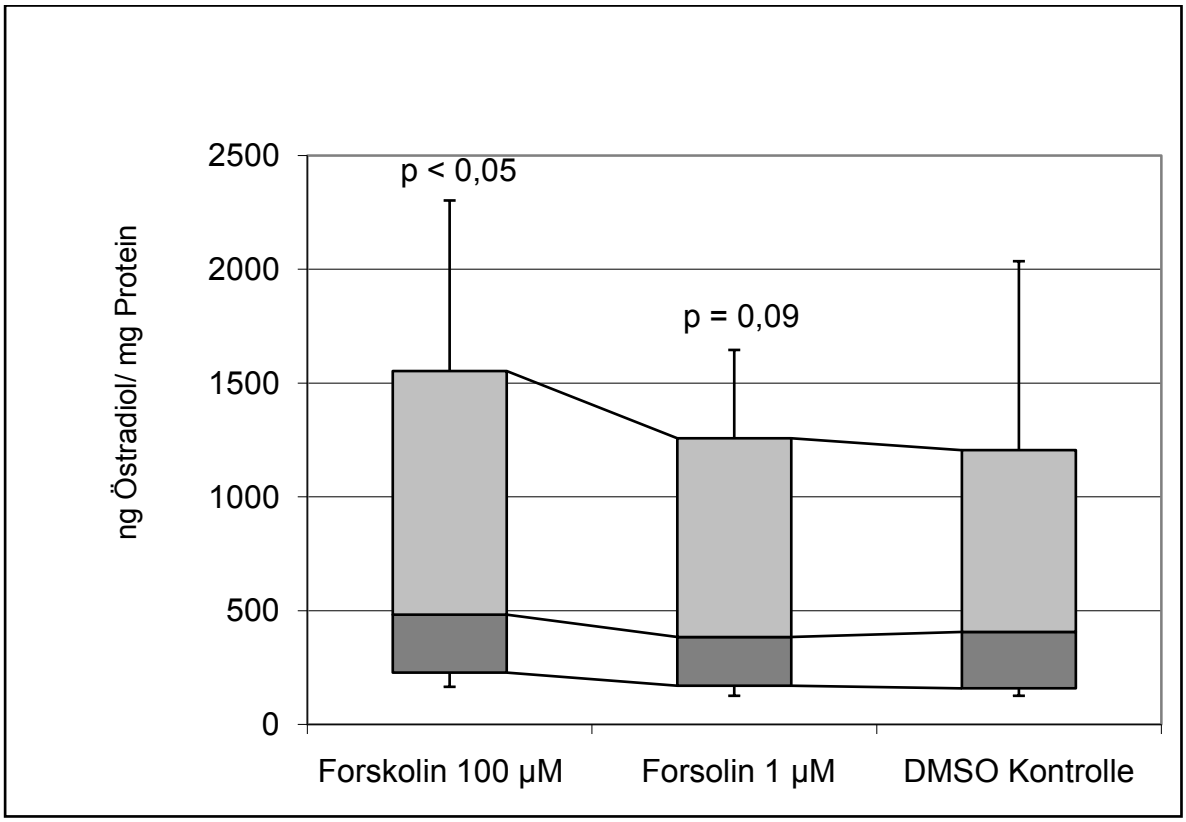

Abbildung 10: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen Forskolin-Konzentrationen.

Die signifikante Erhöhung ($p < 0,05$, Wilcoxon-Test) der Östradiolkonzentration bei Zugabe von 100 µM Forskolin im Vergleich zur DMSO-Kontrolle ist als Artefakt zu werten, da diese Konzentration zytotoxisch wirkt und damit die sezernierte Östradiolmenge auf eine geringere Menge Gesamtprotein bezogen wird. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von Forskolin auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwiesen sich 100 µM Forskolin deutlich zytotoxisch (Tabelle 7).

Tabelle 7: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 100 µM und 1 µM Forskolin im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

Forskolinkonzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
Forskolin 100 µM	75%
Forskolin 1 µM	106%
DMSO-Kontrolle	100%

4.3.3 Effekte des Proteinkinase-C-Inhibitors H7 auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.2.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind der Tabelle 8 und der Abbildung 11 zu entnehmen. Die Östradiolkonzentration ist bei einer Konzentration von 50 µM H7 gegenüber der DMSO-Kontrolle signifikant erniedrigt, allerdings ist bei dieser Konzentration auch die Zellvitalität deutlich reduziert, wie in Tabelle 9 gezeigt. Bei der niedrigeren Konzentration von 20 µM H7 ist die Zellvitalität dagegen unbeeinflusst, die Östradiolkonzentration aber ebenso signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt, wie in Tabelle 8 und Abbildung 11 gezeigt (Wilcoxon-Test, $p < 0,01$).

Tabelle 8: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen H7-Konzentrationen. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen. Es finden sich erniedrigte Östradiolkonzentration in den Zellüberständen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand		
50 µM H7	20 µM H7	DMSO-Kontrolle
7,10	10,50	18,05
6,40	9,30	21,50
6,60	9,85	17,85
18,35	27,30	42,75
7,25	8,25	13,90
7,57	8,67	14,05
12,25	13,65	19,70
11,55	13,90	32,30
12,05	11,10	19,70
10,30	7,90	15,30

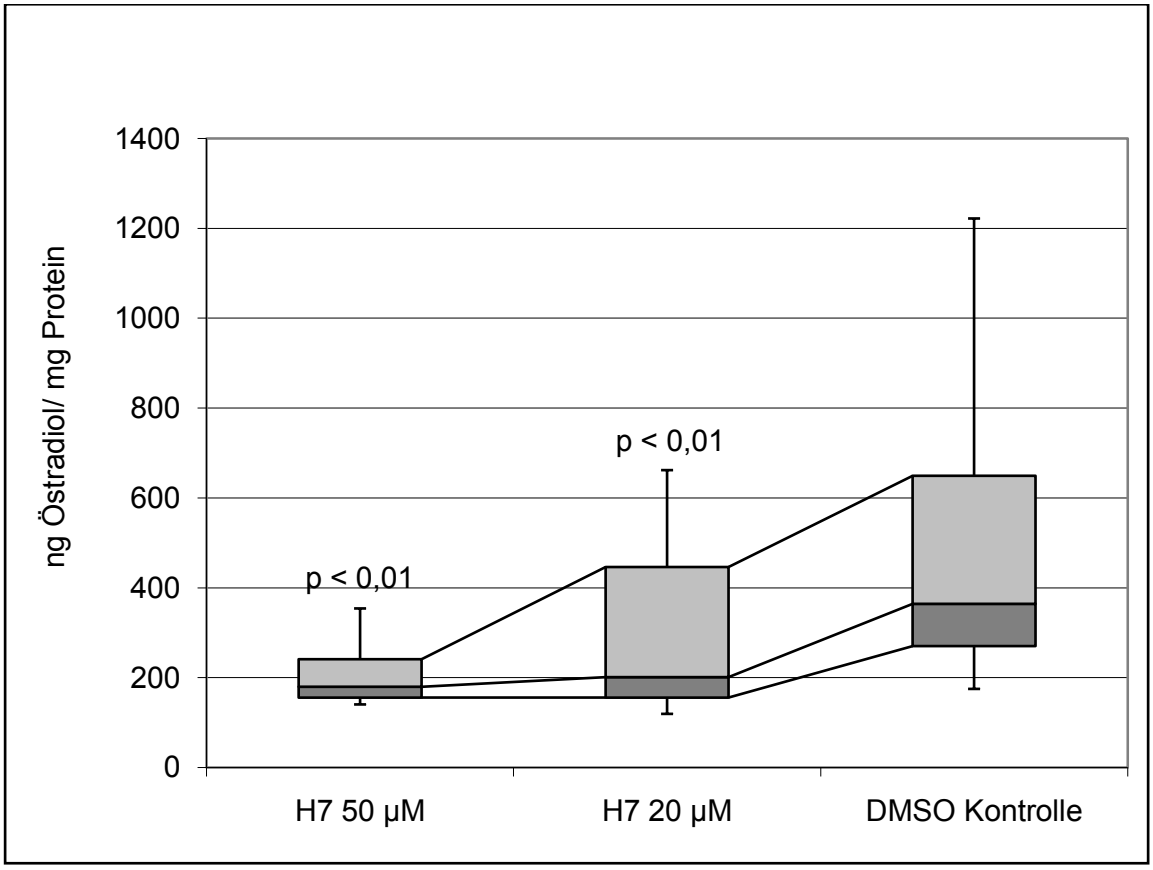

Abbildung 11: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen H7-Konzentrationen.

Man sieht eine signifikant erniedrigte Östradiolkonzentration im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unter Einfluss von H7 mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,01$, Wilcoxon-Test. Dabei wirken 50 µM zytotoxisch. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von H7 auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwies sich die Konzentration von 50 µM H7 deutlich zytotoxisch (Tabelle 9).

Tabelle 9: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 50 µM und 20 µM H7 im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

H7-Konzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
H7 50 µM	73%
H7 20 µM	99%
DMSO-Kontrolle	100%

4.3.4 Effekte des Aromatase-Induktors PDA auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.4 beschrieben. Die Ergebnisse sind der Tabelle 10 und der Abbildung 12 zu entnehmen. Die Östradiolkonzentration war nach Zugabe von beiden PDA-Konzentrationen im Vergleich zur DMSO-Kontrolle signifikant erniedrigt, $p< 0,001$, Wilcoxon-Test. Dabei war die Erniedrigung nach 1 µM PDA weitaus deutlicher als nach 10 µM. Die Zellvitalität wird durch PDA nicht beeinflusst.

Tabelle 10: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen PDA-Konzentrationen.

Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen. Es finden sich erniedrigte Östradiolkonzentrationen im Zellüberstand im Vergleich zur DMSO-Kontrolle.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand		
PDA 10 µM	PDA 1 µM	DMSO-Kontrolle
22,50	18,45	47,20
30,45	24,90	57,90
33,05	22,15	72,40
27,75	19,30	41,60
11,60	13,95	15,50
14,65	13,80	29,00
15,95	14,25	20,90
13,00	13,10	27,05
10,30	9,60	14,10
11,45	10,90	15,25

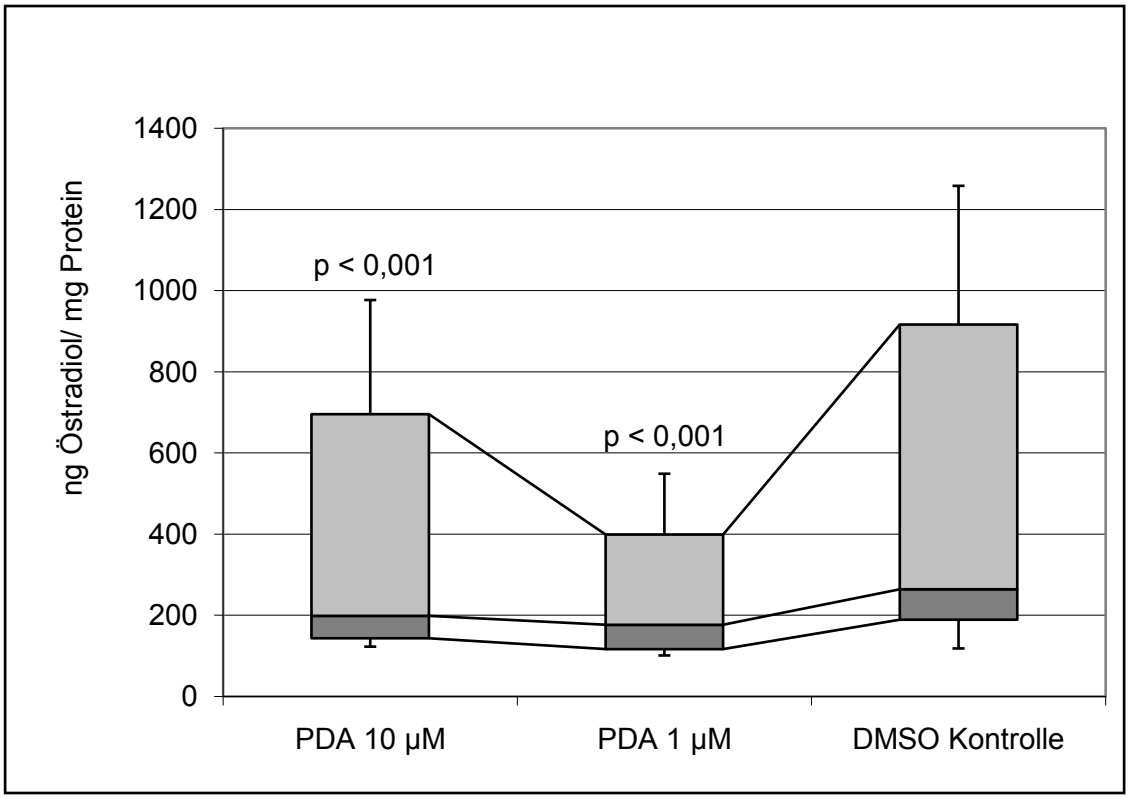

Abbildung 12: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen PDA-Konzentrationen.

Man sieht eine signifikant erniedrigte Östradiolkonzentration der Konzentrationen 10 µM und 1 µM im Vergleich zur DMSO-Kontrolle unter Einfluss von PDA mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,001$, Wilcoxon-Test. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von PDA auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwies sich keine der eingesetzten Konzentrationen als zytotoxisch (s. Tabelle 11).

Tabelle 11: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 10 µM und 1 µM PDA im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

Phorbolkonzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
PDA 10 µM	93%
PDA 1 µM	97%
DMSO-Kontrolle	100%

4.3.5 Effekte des Proteinkinase-C-Aktivators PMA auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.4 beschrieben. Es wurden 10 Wiederholungsversuche von je 4 Einzelmessungen durchgeführt. Die Ergebnisse sind der Tabelle 12 und der Abbildung 13 zu entnehmen.

Die Östradiolkonzentration war nach Zugabe von den verschiedenen PMA-Konzentrationen im Vergleich zur Kontrolle in den Zellüberständen erniedrigt. Bezogen auf den Proteingehalt ergab sich lediglich bei einer PMA-Konzentration von 100 nM eine signifikante Verminderung der Östradiolkonzentration, $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Die Zellvitalität wird durch PMA nicht verändert, wie in Tabelle 13 abgebildet.

Tabelle 12: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen PMA -Konzentrationen.

Es finden sich erniedrigte Östradiolkonzentrationen im Zellüberstand im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand			
PMA10 µM	PMA 100 nM	PMA 1 nM	DMSO-Kontrolle
26,70	20,20	23,80	36,30
24,65	26,05	32,45	53,10
19,85	18,00	20,95	28,00
8,05	8,55	13,80	31,20
15,45	13,20	9,43	10,75
13,05	12,95	13,15	23,90
12,45	12,35	17,00	27,05
12,25	12,45	13,95	14,10
11,65	12,50	12,00	15,25
9,35	9,20	11,15	10,55

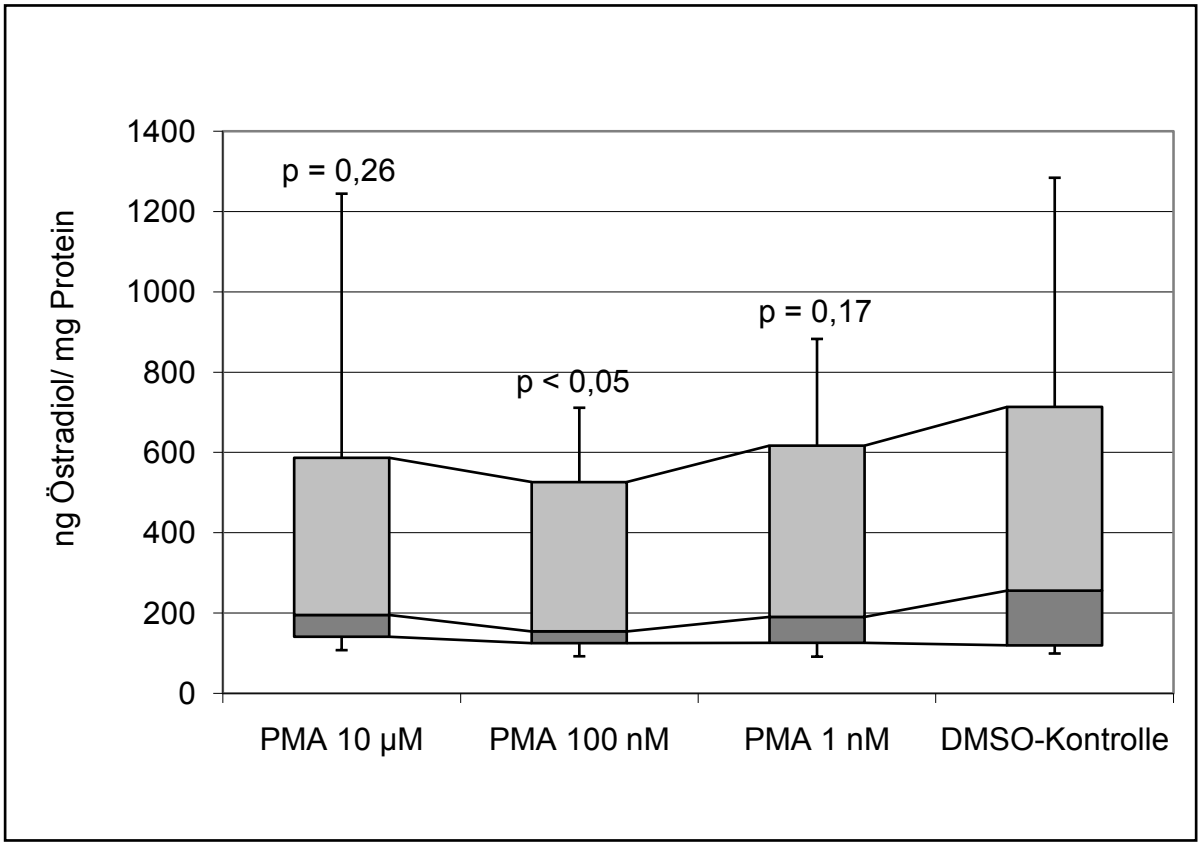

Abbildung 13: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen PMA-Konzentrationen.

Man findet eine erniedrigte Östradiolkonzentration bei Zugabe aller Konzentrationen von PMA im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, signifikant erniedrigt ist nur die Zugabe von 100 nM mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von PMA auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwies sich keine der eingesetzten Konzentrationen als zytotoxisch (Tabelle 13).

Tabelle 13: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 10 µM, 100 nM und 1 nM PMA im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

Phorbolkonzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
PMA 10 µM	102%
PMA 100 nM	105%
PMA 1 nM	105%
DMSO-Kontrolle	100%

4.4 Effekte von PCB 126 auf die Östradiolsekretion der R2C-Zellen

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind der Tabelle 14 und der Abbildung 9 zu entnehmen. Sowohl im Überstand als auch auf Protein bezogen ergab sich eine Erhöhung der Östradiolwerte bei allen PCB-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle, wie in Tabelle 14 und Abbildung 14 gezeigt. Die Zellvitalität wird durch PCB nicht beeinflusst.

Tabelle 14: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen PCB-Konzentrationen. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen. Es findet sich eine Erhöhung der gemessenen Östradiolwerte im Zellüberstand bei allen PCB-Konzentrationen gegenüber der Kontrolle.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand			
PCB 4 µg	PCB 2 µg	PCB 1 µg	DMSO-Kontrolle
17,45	20,60	21,05	15,85
20,60	24,55	22,55	26,45
21,35	14,05	16,30	14,00
16,65	15,50	14,00	13,10
16,25	14,05	15,60	12,70
18,05	15,40	16,75	15,55
42,70	45,85	71,15	33,25
35,70	26,20	21,25	21,10
31,70	22,85	20,45	18,50
24,45	22,10	21,35	20,95

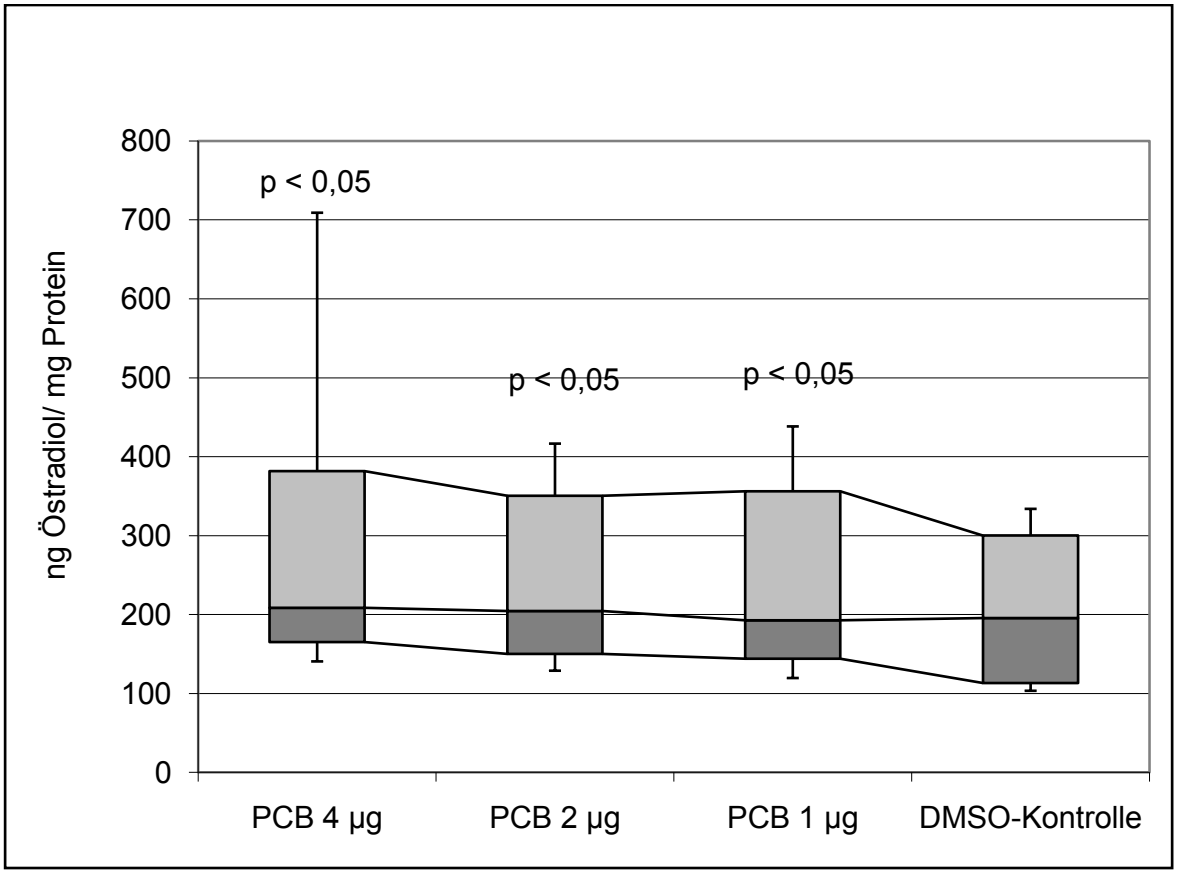

Abbildung 14: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen PCB-126-Konzentrationen.

Man findet signifikant erhöhte Östradiolwerte bei allen PCB-Konzentrationen gegenüber der DMSO-Kontrolle mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von PCB auf die Zellvitalität bestimmt. Dabei erwies sich keine der Konzentrationen als zytotoxisch (Tabelle 15).

Tabelle 15: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 4 µM, 2 µM und 1 µM PCB 126 im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

PCB-Konzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
PCB 4 µg	103%
PCB 2 µg	104%
PCB 1 µg	104%
Toluol/DMSO-Kontrolle	100%

4.5 Effekte von TCPM auf die Östradiolsekretion

Das methodische Vorgehen wurde unter 3.6 beschrieben. Die Ergebnisse sind der Tabelle 16 und der Abbildung 15 zu entnehmen. Nahezu sämtliche getestete TCPM-Konzentrationen führten zu einer Verminderung der Östradiolsekretion im Vergleich zur DMSO-Kontrolle. Signifikant vermindert sind dabei aber lediglich die Konzentrationen 50 µM und 100 nM, $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Dabei ist erwies sich allerdings 50 µM als leicht zytotoxisch ist.

Tabelle 16: Östradiolkonzentration in ng/ml/Well nach Zugabe der verschiedenen TCPM-Konzentrationen. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 10 Wiederholungsversuche aus 4 Einzelmessungen.

Östradiolkonzentration (ng/ml) im Zellüberstand					
TCPM 100 µM	TCPM 50 µM	TCPM 10 µM	TCPM 1 µM	TCPM 100 nM	DMSO-Kontrolle
4,89	20,25	22,90	20,55	21,05	54,25
10,90	32,70	34,60	34,90	37,15	61,80
10,20	29,80	66,50	68,75	59,70	68,45
7,80	20,85	29,80	34,65	36,40	42,35
5,10	32,10	46,05	48,95	45,80	63,15
7,25	9,60	17,15	13,60	16,50	12,75
9,90	10,55	12,95	12,30	12,20	13,80
6,05	7,25	10,15	10,35	11,05	12,65
43,10	15,95	57,80	29,90	53,40	19,80
7,15	13,30	16,60	16,15	16,05	16,50

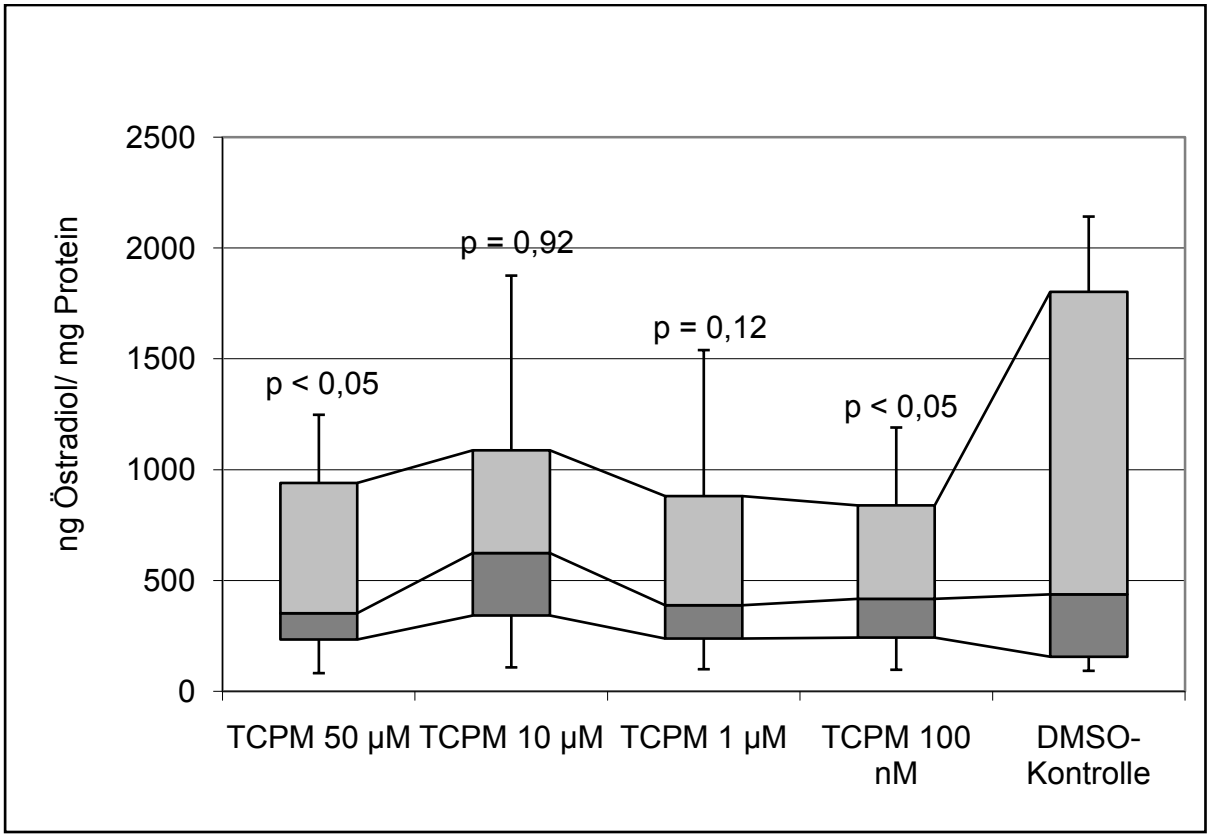

Abbildung 15: Östradiolkonzentration pro mg Protein nach Inkubation mit verschiedenen TCPM-Konzentrationen.

Man sieht erniedrigte Östradiolwerte gegenüber der DMSO-Kontrolle bei den Konzentrationen 50 µM und 100 nM mit einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, Wilcoxon-Test. Dabei wirken 50 µM zytotoxisch. Aufgrund seiner massiven Zytotoxizität wurde die Konzentration von 100 µM in dieser Graphik nicht aufgezeichnet. Dargestellt sind die jeweiligen Mediane der 4 Einzelmessungen in 10 Wiederholungsexperimenten und die Quantile 10%, 25%, 75% und 90%.

Es wurde die Auswirkung von TCPM auf die Zellvitalität bestimmt. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Zytotoxizität (Tabelle 17). Dabei erwiesen sich 100 µM TCPM als so stark zytotoxisch, dass in weiteren Versuchen auf diese Konzentration verzichtet wurde.

Tabelle 17: Relative Zellvitalität in Prozent nach Inkubation mit 100 µM, 50 µM, 10 µM, 1 µM und 100 nM TCPM im Vergleich zur Äthanolkontrolle (= 100%).

TCPM-Konzentration	Relative Zellvitalität in Prozent
TCPM 100 µM	8%
TCPM 50 µM	83%
TCPM 10 µM	101%
TCPM 1 µM	105%
TCPM 100 nM	101%
DMSO-Kontrolle	100%

5 Diskussion

5.1 Allgemeine Betrachtungen

Prinzipiell sind verschiedene in vivo und in vitro Organ- und Zellsysteme zur Untersuchung von Partialfunktionen der Steroidsynthese denkbar.

In vivo:
- Tiermodell
- Mensch: Messung von Hormonkonzentrationen im Blut mit und ohne Stimulation

Im Tiermodell gesammelte Daten geben Hinweise auf mögliche grundsätzliche Abläufe und kommen der menschlichen Situation, insbesondere bei Tierexperimenten mit Affen, am nächsten. Übertragen auf die Testesfunktion bestehen allerdings deutliche Speziesunterschiede, was die Interpretation der gesammelten Daten erschwert und die Übertragbarkeit auf die humane Situation limitiert. Bei fremdstoffinduzierten Effekten ergeben sich zusätzlich Interpretationsschwierigkeiten der Ergebnisse, da die Verteilung und Metabolisierung der Fremdstoffe im Gesamtorganismus oft unzureichend bekannt ist. Daher ist die tatsächlich im Zielorgan ankommende Menge der zu untersuchenden Substanz oft nicht genau bekannt. Ebenso gehen viele Kofaktoren mit ein (Lebensgewohnheiten, Umgebung, Stress, Temperatur, Anzahl, Nahrung, Nikotin-, oder Alkoholabusus) so dass beide in vivo Modelle schwierig reproduzierbar sind.

Hieraus ergibt sich die Notwendigkeit, bei einigen Fragestellungen auf Testsysteme zurückzugreifen, die den Gesamtorganismus ausklammern. Zudem ist eine isolierte Untersuchung an menschlichen Organen nicht möglich und ethisch keinesfalls vertretbar.

In vitro:
- Organperfusion
- Primäre Zellkultur
- Zellkultur von maligne entarteten permanenten Zellen

Der Vorteil von in vitro Untersuchungen liegt darin, dass mit einfachen überschaubaren Komponenten und wenig Variablen, Fragestellungen einfacher angehbar sind. Die Primärkulturen sind einfach zu kultivieren und unbegrenzt verfügbar. Randbedingungen (Temperatur, Nährstoffe, Fremdstoffe, Anzahl) lassen sich beliebig einstellen und die Ergebnisse sind besser reproduzierbar. Der Gesamtorganismus und eventuelle systemische Wirkungen werden dabei

ausgeschaltet. Die Anzahl an erforderlichen Tierversuchen kann hierbei auf ein Minimum reduziert werden.
Nachteil der so gewonnenen Ergebnisse ist die nicht direkte Übertragbarkeit auf den Menschen. Eventuelle Interaktionen zwischen verschiedenen Geweben oder Organen werden in vitro nicht erfasst. Ebenso können komplexe toxische und chronische Wirkungen nicht beurteilt werden. Die Ergebnisse bedürfen in der Regel einer Verifizierung im Tierexperiment.

5.2 Diskussion von Material und Methoden

5.2.1 Medienkontamination mit DMSO

Die Steroidhormone werden ausgehend vom Cholesterin in den Leydigzellen gebildet. Das Cholesterin wird unter anderem aus intrazellulären Lipidtröpfchen freigesetzt. Von daher wurde zur Kultivierung der Zellen ein serumhaltiges Medium gewählt, welches die Grundlage für die Steroidsynthese bildete.
Als Lösungsvermittler kamen neben Äthanol 0,1 Vol.% DMSO 0,1 Vol.% zum Einsatz. Insbesondere die Fremdstoffe PCB 126 und TCPM waren schlecht wasserlöslich und mussten daher mittels geeigneten Lösungsvermittlers in das wässerige Medium eingebracht werden. Stocco et al. (1995) untersuchten die Effekte von verschiedenen DMSO-Konzentrationen auf die immortalisierten MA-10-Zellen der Maus und die R2C-Leydig-Zellen der Ratte. Dabei wurde die Progesteronsekretion der MA-10 Zellen unter Inkubation mit 2% DMSO gehemmt, wohingegen die Proteinsynthese unbeeinflusst blieb. Die Progesteronsekretion der R2C-Zelle blieb bis zu einer DMSO-Konzentration von 5% unbeeinflusst. Eine Abnahme der Proteinsynthese zeigte sich bei DMSO-Konzentrationen größer 5%. In der vorliegenden Arbeit wurde maximal 0,1 Vol.% DMSO eingesetzt, so dass ein negativer Einfluss auf die Zellvitalität und die Hormonsekretion ausgeschlossen werden konnte.

5.2.2 Beurteilung der Zellvitalität in vitro

Proteinbestimmung

Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde nach der Methode von Lowry (1951) durchgeführt. Der Methode liegt die Bildung eines Kupfer-Protein-Komplexes in alkalischer Lösung zugrunde. Dieser Komplex reagiert mit einem Folin-Reagenz unter Bildung von Farbkomplexen, deren Intensität direkt proportional zur Proteinkonzentration ist. Die jeweiligen Konzentrationen können photometrisch bei 750 nm bestimmt werden.

Im Prinzip werden mit den Proteinbestimmungsmethoden die Peptidbindungen quantifiziert. Unter einer Peptidbindung wird die Verknüpfung von Aminosäuren eines Proteins verstanden. Zum besseren Vergleich der Ergebnisse wurden die jeweiligen ermittelten Hormonwerte auf die Proteinmenge, und damit auf lebende, intakte Zellen bezogen.

MTT-Assay

Dieses Verfahren erlaubt die quantitative Erfassung der Zytotoxizität, Proliferation oder Aktivierung der Zellen. MTT, ein gelber Farbstoff, wird von den Zellen aufgenommen und zu einem blauen Formazanprodukt umgewandelt. Dieser Prozess benötigt die Aktivität von mitochondrialen Dehydrogenasen und findet ausschließlich in lebenden Zellen statt. Die Ausbeute an blauem Farbstoff, die auf photometrischem Wege bestimmt wird, ist ein direktes Maß für die Vitalität der untersuchten Zellpopulation. Somit ist der Gehalt an Farbstoff auch direkt proportional zur Zellzahl und Zahl der Mitochondrien. Mit diesem Test kann selbst eine geringe Anzahl lebender Zellen erfasst werden. Der Hauptvorteil dieses Farbtestes ist die Schnelligkeit, die Präzision und das Fehlen von Radioaktivität (Mosman, 1983).

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Untersuchung der Sekretionseigenschaften der R2C-Zellen in vitro im Vergleich zur Leydigzelle in vivo

Das P450-abhängige Cholesterin-Side-Chain-Cleavage-Enzymsystem ($P450_{scc}$) katalysiert die Konversion von Cholesterin zu Pregnenolon und lässt sich in den

Geweben mit Steroidsynthese nachweisen (Payne et al., 1996). Pregnenolon wird speziesspezifisch durch die CYP450$_{17\alpha}$ zu 17α-Hydroxypregnenolon umgewandelt. Die P450$_{17\alpha}$ lässt sich bei der Ratte (Voutilainen et al., 1986; Nishihara et al., 1988) und in der Maus (Perkins et al., 1988) nicht nachweisen. Wie bereits in der Einleitung beschrieben, gibt es zwei Wege der Steroidsynthese. Der Δ^5-Weg benötigt die P450$_{17\alpha}$ zur Pregnenolonsynthese und wird hauptsächlich beim Menschen gefunden. Der Δ^4-Weg, welcher bei Mäusen und Ratten gefunden wurde, benötigt zunächst die 3β-HSD zur Konversion von Pregnenolon zu Progesteron und die P450$_{17\alpha}$ zur Konversion von Progesteron zu 17α-Hydroxyprogesteron.

Um die Komplexität dieser zellulären Prozesse in vitro zu untersuchen wurden bisher verschiedene Tumorzelllinien benutzt. Die MA-10 Zelllinie ist die am besten charakterisierte. Sie besitzt LH/hCG-Rezeptoren und reagiert auf Hormonstimulation mit einem Anstieg des cAMP, Aktivierung der Proteinkinase A (PKA), und darauffolgender Steroidhormonsynthese und –sekretion (Freeman, 1987). In dieser Zelllinie wurde auch erstmals ein Cholesterol-bindendes Protein entdeckt. Dieses sogenannte StAR (steroidogenic acute regulatory protein) vereinfacht den Transport des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran (Christenson et al., 2000; Stocco, 2001). Die MA-10 Zelllinie zeigt zahlreiche Merkmale der normalen Leydigzelle, bis auf ein Fehlen der P450$_{17\alpha}$ und der entsprechende mRNA (Payne et al., 1992), wie lange angenommen wurde. Somit wurde erklärt, warum das Progesteron eines der Hauptsekretionsprodukte dieser Zellen war. Payne et al. (1999) zeigten allerdings, dass die Zellen Testosteron produzieren und diese durch cAMP-Zugabe gesteigert werden kann. Ebenso konnte eine Konversion von angebotenem Testosteron zu Dihydrotestosteron durch die 5α-Reduktase gezeigt werden.

Die R2C-Zelllinie hingegen ist noch nicht so gut charakterisiert. Sie produziert unter basalen Bedingungen, im Gegensatz zu den MA-10 Zellen, ohne jegliche Stimulation große Mengen Progesteron und auch Östradiol (Freeman, 1987). Die Steroidsynthese kann durch hCG, LH oder cAMP nicht weiter stimuliert werden (Shin et al., 1968; West et al., 1991). Vermutlich liegt eine inaktive Form oder gar ein Verlust der P450$_{17\alpha}$ vor. Jedoch wird vermutet, dass die cAMP-Aktivierung intakt ist, da die Zugabe von cAMP-Analoga zum Anstieg der Proteinkinase A, nicht jedoch zur Steigerung der Steroidsekretion führt (Freeman, 1987).

Leydigtumorzellen nutzen eine Fülle freien Cholesterols, welches hauptsächlich von der Plasmamembran stammt, und Cholesterolester als Substrat für die Steroidhormonsynthese (Freeman 1987). Die R2C-Zellen haben eine vierfach höhere Ansammlung von freiem Cholesterol in den Mitochondrien als die MA-10-Zellen. Die R2C-Zelle hat eine hohe Kapazität extrazelluläre Cholesterolester aufzunehmen, diese in freies Cholesterol zu konvertieren und zur inneren Mitochondrienmembran zu transportieren (Rao et al., 2003). Ursächlich hierfür könnte das StAR sein, welches bei der R2C-Zelle in großen Mengen vorkommt und für den Transport des Cholesterols von der äußeren zur inneren Mitochondrienmembran verantwortlich ist (Stocco et al., 1991). Somit kann die Zelle wahrscheinlich auch ohne Stimulation und in serumfreiem Medium ihre Hormonsekretion aufrechterhalten. Auch in der vorliegenden Arbeit konnte bestätigt werden, dass die Sekretion von Progesteron und auch Östradiol mindestens über einen Zeitraum von 24 Stunden ohne Stimulation und unter serumfreien Bedingungen aufrechterhalten werden kann (Tabelle 1, Seite 36).

Nach dieser Bestätigung der basalen Steroidsekretion wurden der R2C-Zelle zunächst verschiedene C19- und C21-Steroidpräkursoren angeboten um deren Enzymsystem weiter zu charakterisieren. Nach Zugabe von Pregnenolon, 17α-Hydroxypregnenolon, Progesteron, und 17α-Hydroxyprogesteron (C21-Steroiden) fanden sich keine Veränderungen der Östradiolkonzentrationen. Somit werden die C21-Vorstufen nicht zu Östradiol umgewandelt. Wie bereits in der Literatur beschrieben (Payne et al., 1996), konnte auch in unseren Untersuchungen die Tatsache bestätigt werden, dass Progesteron das Hauptsekretionsprodukt der R2C-Zellen darstellt und dieses auch nicht weiter umgesetzt werden kann. Hieraus lässt sich schließen, dass die Zellen, wie bereits bekannt, keine aktive $P450_{17\alpha}$ aufweisen oder diese zumindest funktionsunfähig ist.

Nach Zugabe von DHEA und DHEAS zeigt sich eine leichte Erhöhung der Östradiolkonzentration. Somit kann davon ausgegangen werden, dass die R2C-Zellen eine 3β-HSD- und 17β-HSD-Aktivität aufweisen. Testosteron, welches normalerweise in humanen Leydigzellen synthetisiert wird, wird nur in geringen Mengen gebildet.

Bei Inkubation der Zellen mit Androstendion und Testosteron ließ sich ein starker Anstieg der Östradiolsekretion verzeichnen. Somit kann die bereits bekannte

Aromataseaktivität auch hier bestätigt werden (Lephart et al., 1990). Shin et al. (1968) berichteten ebenfalls, dass die R2C Leydigzellen Östrogen synthetisiert, wenn ihr Androstendion angeboten wurde. Doody et al. (1990) konnten dieses Ergebnis bestätigen und stellten fest, dass die Aromatase-Aktivität der R2C Zellen mit jener in menschlichen Chorioncarzinom-Zelllinien vergleichbar ist.

5.3.2 Östradiolsekretion der R2C-Zellen unter dem Einfluss verschiedener Stimulatoren und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen

Ausgelöst wird die Steroidsynthese in humanen Zellen durch die Bindung von LH an den LH-Rezeptor mit nachfolgender Stimulierung der Adenylatcyclase. Aus ATP entsteht cAMP, welches seinerseits die Proteinkinase A aktiviert. Diese Aktivierung führt zur Phosphorylierung nachgeordneter Proteine, welche für die Bereitstellung des freien Cholesterols zuständig sind. Die Proteinkinase A kontrolliert so den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt der Steroidsynthese, den Transport des Cholesterols zur inneren Mitochondrienmembran. Demgegenüber steht die Proteinkinase C, welche die Steroidsynthese negativ reguliert.

In dieser Versuchsreihe wurden der R2C-Zelle verschiedene Enzyminduktoren bzw. -inhibitoren angeboten. Tabelle 18 zeigt nochmals eine Zusammenfassung aller verwendeter Substanzen und die jeweilig signifikante Östradiolantwort sowie die Zellvitalität.

Tabelle 18: Übersichtstabelle der verwendeten Stimulatoren und Inhibitoren. ↓: Signifikant erniedrigte Östradiolkonzentration auf Protein bezogen. ↑: Signifikant erhöhte Östradiolkonzentration auf Protein bezogen. (↓): Leicht erniedrigte Zellvitalität. — : Keine Veränderung gegenüber der Kontrolle.

	Östradiolsekretion/Protein	Zellvitalität
4-OHA		
100 µM	↓	(↓)
1 µM	↓	—
10 nM	↓	—
Forskolin		
100 µM	↑	↓
1 µM	—	—
H7		
50 µM	↓	↓
20 µM	↓	—
PDA		
10 µM	↓	(↓)
1 µM	↓	—
PMA		
10 µM	—	—
100 nM	↓	—
1 nM	—	—

Bei Zugabe des Aromataseinhibitors **4-Hydroxyandrostendion (4-OHA)** zeigte sich eine dosisabhängige Reduktion der Östradiolsynthese, wie es bereits auch von Doody et al. (1990) beschrieben wurde. Die P450-abhängige Aromatase wandelt Androstendion in Östradiol um. Eine Inhibierung der Aromatase resultiert in einer Blockade der Östradiolsynthese, was auch in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte. Somit kann mit diesem experimentellen Aufbau das Vorliegen einer aktiven Aromatase in den R2C-Zellen bestätigt werden. Allerdings muss dabei beachtet

werden, dass in der gesamten Arbeit nicht direkt die Aromataseaktivität gemessen wurde, sondern die Östradiolsekretion als indirekter Hinweis darauf.

Forskolin hatte in nicht toxischen Konzentrationen keinen Einfluss auf die Östradiolsynthese der R2C-Zellen. Insbesondere ließ sich die Östradiolsynthese nicht stimulieren. Die Stimulation mit 100 µM Forskolin stellte sich als zytotoxisch heraus. Dennoch zeigte sich in den Ergebnissen eine Erhöhung der Östradiolkonzentration, bezieht man die Hormonmenge auf Protein. Dies ist allerdings als Artefakt zu werten, da die sezernierte Östradiolmenge auf eine niedrige Gesamtproteinmenge bezogen wurde. Vermutlich wirkt Forskolin nur langsam zytotoxisch, so dass zunächst noch viele lebende Zellen vorhanden sind die Östradiol bilden können. Diese sterben im Laufe der Tage durch die zytotoxische Konzentration ab. Übrig bleibt die sezernierte Östradiolmenge und eine reduzierte Anzahl lebender Zellen.
Die meisten Eigenschaften des Forskolins sind auf die schnelle und reversible Aktivierung der Adenylatcyclase zurückzuführen (Metzger et al., 1981; Seamon et al., 1981). Forskolin ist ein Proteinkinase-A Aktivator und ein Adenylatcyclase-Aktivator. Die Adenylatcyclase wandelt ATP in cAMP um. Das cAMP aktiviert wiederum die Proteinkinase A und diese phosphoryliert verschiedene intrazelluläre Proteine, die für eine Veränderungen der Rezeptorfunktion (Cao et al., 1994; Kai et al., 1994) und Genexpression verantwortlich sind (Riabowol et al., 1988).
Wie bereits beschrieben lässt sich die Steroidsynthese in den R2C-Zellen durch cAMP nicht weiter stimulieren, was unsere Untersuchungen bestätigten.

Bei Inkubation der Zellen mit dem Proteinkinase-C-Inhibitor **H7** fand sich eine erniedrigte Östradiolkonzentration gegenüber der Kontrolle. Dabei wirkten 50 µM H7 zytotoxisch. Im Gegensatz zu Forskolin scheint H7 sehr schnell zytotoxisch zu wirken, da sowohl die Östradiol-, als auch die Proteinmenge stark reduziert waren.
In der Literatur ist eine Hemmung der Proteinkinase C durch H7 beschrieben. Cooke et al. (1989) berichteten, dass sowohl Stimulation als auch Inhibition der Proteinkinase C zu einer Hemmung der Adenylatcyclaseaktivität führen.
H7 inhibiert auch die Phosphorylierung der mRNA des StAR (Kanzaki et al., 1999). Dies führt durch Blockierung des Cholesteroltransportes zur inneren

Mitochondrienmembran zu einer Reduktion der Östradiolsynthese. Da jedoch C19-Steroide in den R2C-Zellen nicht nennenswert umgesetzt werden können, bleibt der Mechanismus der Östradiolreduktion weiter unklar.

Die Östradiolkonzentration war nach Zugabe von **Phorbol-12,13-Diacetat (PDA)** deutlich erniedrigt. Bei Inkubation mit dem Aromatase-Induktor PDA, dessen Effekt wahrscheinlich über die cAMP-abhängige Proteinkinase C vermittelt wird, ist bei MCF7-Brusttumor-Zellen ein Anstieg der Östradiolkonzentration beschrieben (Ryde et al., 1992). In neueren Studien wurde PDA allerdings auch als Proteinkinase-C-Aktivator bezeichnet (Sarria et al., 2000; Fedorova et al., 2002). Scheinbar wirkt PDA in den R2C-Zellen in den eingesetzten Konzentrationen nicht als Aromatase-Induktor. Denkbar wäre eher eine Wirkung als Proteinkinase-C-Aktivator, was eine Hemmung der Östradiolsynthese erklären würde.

Unter Inkubation mit **Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)** fand sich eine erniedrigte Östradiolsynthese. PMA ist ein Proteinkinase-C-Aktivator der Steroidsynthese. Bei der calzium- und phospholipidabhängigen Proteinkinase C wurde von einigen Autoren ein hemmender Effekt auf die Steroidsynthese beschrieben (Papadopoulos et al., 1985; Lopez-Ruiz et al., 1992). In Ratten- und Mäuse-Leydigzellen inhibiert PMA via Proteinkinase C die Testosteronproduktion durch Veränderung der Adenylatcyclaseaktivität und Hemmung des Cholesterol-Transportes zur inneren Mitochondrienmembran (Papadopoulos et al., 1985).
Eine Reduktion der Steroidsynthese durch Stimulation mit PMA konnte in unseren Untersuchungen bestätigt werden, somit scheint die Proteinkinase C in den R2C-Zellen vorhanden zu sein.
Heneweer et al. (2004) berichteten über eine Induktion der Aromataseaktivität von R2C-Zellen nach Inkubation mit PMA. Allerdings ist bekannt, dass längere Inkubation mit PMA eine Abnahme der Proteinkinase C (Down-Regulation) zur Folge hat (Young et al., 1987; Huang et al., 1989). Durch Wegfall der hemmenden Wirkung der Proteinkinase C wäre dies erklärlich, und in unseren Versuchen durch eventuell längere Inkubationszeiten mit PMA in weiteren Arbeiten zu verifizieren.

Zusammenfassend kann in dieser Arbeit das Vorliegen einer P450-abhängige Aromatase gezeigt und bestätigt werden. Die R2C-Zellen sind ein geeignetes In-vitro-Modell zur Untersuchung von Fremdstoffen, welche die Aromatase-Aktivität beeinflussen. Eine Stimulierbarkeit des cAMP konnte nicht gefunden werden, möglicherweise spielt die Proteinkinase C eine Rolle in den R2C-Zellen.

5.4 Effekte von verschiedenen Chlororganika auf die Östradiolsekretion und die Partialfunktion der R2C-Zellen

5.4.1 PCB-Konzentrationen im menschlichen Organismus

Obwohl die Anwendung der PCB in "offenen Systemen" bereits seit 1978 verboten ist, lassen sie sich nach wie vor in zahlreichen menschlichen Geweben nachweisen. Sie finden sich unter anderem in Muttermilch, Serum, Follikelflüssigkeit, Seminalplasma, Fettgewebe und Nabelschnurblut (Ahlborg et al., 1992; Popp et al., 1993). Die Hauptexpositionsquelle für den "Normalbürger" stellt die Nahrungsaufnahme dar. In Industrieländern wurde 1987 von einer durchschnittlichen täglichen Aufnahme von 4,9 - 8,7 µg pro Person und Tag ausgegangen, wobei die Tendenz deutlich rückläufig ist (Kimbrough, 1995; Behnisch et al., 1997). Die durchschnittlichen Gesamt-PCB-Konzentrationen in der Muttermilch wurden zwischen 1995 und 1997 mit 0,5 mg/kg angegeben. In den letzten 12 Jahren ist diese Belastung um 60% zurückgegangen. (Heinzow et al., 1998). Lackmann et al. (2004) zeigte, dass gestillte Kinder eine signifikant höhere Serumkonzentration an PCB aufwiesen als Flaschenkindern. Dabei haben Frauen, welche mehr als 100 g Fisch oder mehr als 700 g Fleisch pro Woche essen, höhere PCB-Konzentrationen. Die höchste Konzentration an PCB wurde bei in der Stadt lebenden Fischessern gefunden (Rozati et al., 2002).

Derzeit wird von einer Gesamt-PCB Hintergrundbelastung von 2-7 ppb (ng/ml) im Serum bei Erwachsenen ausgegangen (Kimbrough, 1995).

Hochbelastete Bevölkerungsgruppen, z.B. Yucheng-Opfer, hatten 1 Jahr nach dem Unfall Konzentrationen von 99 +/- 163 ng/ml (Masuda et al., 1986). Somit liegen die PCB-Konzentrationen in der vorliegenden Arbeit max. um den Faktor 1000 höher bei nicht Exponierten und um den Faktor 10 höher als bei Exponierten.

5.4.2 Effekte von PCB auf Enzymsysteme im männlichen Reproduktionstrakt

Die non-coplanaren PCB vermitteln Effekte auf die Reproduktion sehr wahrscheinlich über eine Bindung an den Östrogenrezeptor (ER) (Koga et al., 1998), wohingegen die Hauptwirkung der coplanaren PCB hauptsächlich über den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt wird. Neben den Rezeptor vermittelten Wirkungen sind aber auch direkte Wirkungen auf Enzymsysteme beziehungsweise Modulationen auf transkriptionaler und posttranskriptionaler Ebene möglich (Drenth et al., 1998; Portigal et al., 2002).

Reproduktionstoxikologische Wirkungen konnten in zahlreichen Tierstudien belegt werden. Nach PCB-Exposition fanden sich Zyklusabnormitäten (Affen, Ratten, Mäusen) (Örberg et al., 1973; Müller et al., 1977; Brezner et al., 1984), erniedrigte Konzeptionsraten (Affen, Schweine, Mäuse) (Allen et al., 1974; Earl et al., 1974; Merson et al., 1976) sowie erhöhte Abortraten (Affe, Kaninchen, Meerschweinchen) (Ahlborg et al., 1992). Störungen der endokrinen Regulation beinhalteten veränderte Kortisol-, Östrogen- und Progesteron-Spiegel. Eindeutige teratogene Effekte bei Fehlen mütterlicher Toxizität sind lediglich bei der Maus gezeigt worden und umfassen die Induktion von Hydronephrosen und Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalten (Ahlborg et al., 1992). PCB induzieren den P450 Enzymkomplex in der Leber, durch welchen toxische Substanzen metabolisiert werden (Yoshimura et al., 1979). Auch bei der Steroidsynthese konnte eine Induktion des Cytochrom-P450-Systems durch PCB und somit eine Metabolisierung der Steroidhormone beschrieben werden (Nowicki et al., 1972; Conney et al., 1973).

Dies scheint jedoch nicht der einzige Weg zu sein wie PCB die Steroidhormone beeinflusst. Einige Studien belegen, dass PCB direkt die Steroidsynthese in den Gonaden angreifen (Freeman et al., 1977; Fuller et al., 1980; Andric et al., 2000). Des weiteren hat sich gezeigt, dass das 2, 3, 7, 8-TCDD (=“Seveso-Dioxin“) eine Abnahme des Testosteron und Dihydrotestosteron verursacht (Moore et al., 1985; Lai et al., 2005). Tofilon et al. (1982) erklärten die Abnahme der Androgenkonzentration mit einer Abnahme des Cytochrom-P450-Enzymkomplexes, welcher unerlässlich für die Androgenbiosynthese ist. Bei infertilen Männern wurden PCB im Samenplasma gefunden, in der Kontrollgruppe waren PCB nicht nachweisbar. Diese infertilen Männer hatten ein erniedrigtes Ejakulationsvolumen,

niedrige Spermienanzahl, verringerte Motilität und veränderte Morphologie der Spermien. Dallinga et al. (2002) fanden bei Männern mit normaler Samenqualität eine Korrelation zwischen erhöhter PCB-Konzentration und erniedrigter Spermienanzahl.

Umweltbedingte PCB-Exposition kann sich möglicherweise auf die sexuelle Entwicklung auswirken und auf lange Sicht die menschliche Reproduktion beeinträchtigen (Den Hond et al., 2002). Die Blutserumkonzentration von PCB 138, 153 und 180 und die Entwicklung der männlichen und weiblichen Pubertät wurde bei Jugendlichen beobachtet. Bei den Jugendlichen, die in der Nähe einer Müllverbrennungsanlage wohnten, fand sich eine Verdopplung der PCB-Konzentration im Blut. Bei dieser Gruppe setzte die Pubertät später ein als bei der Kontrollgruppe.

Mocarelli et al. (2000) untersuchte das Verhältnis der Geschlechter der Nachkommen Seveso-exponierter Eltern. Das Geschlechterverhältnis von Jungen zu Mädchen bei der Geburt ist normalerweise 106:100. Bei Seveso-exponierten Vätern werden mehr Mädchen geboren, das Geschlechterverhältnis beträgt 77:100.

Das zunehmende Auftreten von hormonabhängigen Tumoren, inklusive Tumore der Brust, Prostata und Hoden signalisiert eine ansteigende Inzidenz männlicher Reproduktionsstörungen. Diese sollte uns auf die mögliche Assoziation zwischen endokrinen Disruptoren und den allgemein bekannten reproduktiven Problemen hinweisen. In Dänemark beispielsweise werden 5% aller Kinder nach assistierter Reproduktion geboren. 1% aller, meist junger, Männer entwickeln einen Hodentumor (Andersen et al., 2000). Es existieren Hinweise, dass Hypospadie, Maldescensus Testis, schlechte Samenqualität und Hodentumore Symptome eines zugrundeliegenden „testicular dysgenesis syndrome“ (testikulären Entartungssyndroms) sind, welches durch ungünstige Umwelteffekte entsteht (Skakkebaek, 2002). Nach experimentellen und epidemiologischen Studien ist das testikuläre Entartungssyndrom das Ergebnis einer Unterbrechung der fetalen Programmierung und gonadalen Entwicklung während des fetalen Lebens (Skakkebaek, 2002). Eine kontinuierliche PCB-Exposition säugender Ratten resultiert beispielsweise in einer reduzierten Testosteronsekretion bei den männlichen Nachkommen (Kim et al., 2001; Kaya et al., 2002). Bei humanen

Chorionkarzinomzellen führte PCB 126 zu einer Verminderung der Aromataseaktivität (Drenth et al., 1998).
PCB reduzieren nachweislich die testikuläre Androgensynthese der Ratte indem sie die 3β-Hydroxysteroiddehydrogenase, 17α-Hydroxylase und 17β-Hydroxysteroid-dehydrogenase inhibieren (Andric et al., 2000).
Die Coplanaren/non-ortho-substituierten PCB, wozu auch das in dieser Arbeit verwendete PCB 126 zählt, entfalten eine Reihe dioxinartiger Wirkungen (Safe, 1984). Diese umfassen Immun-, Hepato- und Neurotoxizität, Karzinogenese, dermale Läsionen, Auswirkung auf die endokrine Homöostase, Induktion bestimmter Fremdstoff-metabolisierender Enzyme (z.B. Cytochrom-P-450 abhängige Isoenzyme) sowie die Beeinträchtigung der Reproduktion.
Einige PCB-Verbindungen besitzen endokrine Aktivität. Während non-ortho substituierte PCB (dioxinähnliche PCB) anti-östrogen wirken, haben andere (mono-ortho und di-ortho substituierte PCB) schwache östrogenartige Wirkung. Die Effekte der non-coplanaren PCB-Verbindungen werden hauptsächlich über eine spezifische Bindung an den Östrogen-Rezeptor (ER) vermittelt (Koga et al., 1998). Die Hauptwirkung der coplanaren PCB wird hingegen hauptsächlich über den Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (AhR) vermittelt.
Einer der am besten verstandenen biochemischen Effekte der dioxin-ähnlichen Verbindungen ist sicherlich die Induktion verschiedener Cytochrom P450 Enzyme (CYP). Zu der Superfamilie der P450 Cytochrome zählen zahlreiche Isoformen, von denen einige am Fremdstoffmetabolismus (z.B. CYP1A1 und CYP1A2) und andere beispielsweise am Steroidmetabolismus (z.B. CYP11A1 und CYP19) beteiligt sind. Die beiden Isoenzyme CYP1A1 und CYP1A2 werden u.a. durch polyzyklischen Aromaten, PCDD/PCDF und PCB induziert.
Die CYP1A1 Genexpression wird über den AhR vermittelt. Dieser Ah-Rezeptor vermittelte die Induktion der CYP1A1 und ist ein sehr sensibler biochemischer Marker für dioxin-ähnliche Verbindungen, insbesondere werden die dioxinartigen Effekte der PCB durch Bindung an den AhR vermittelt. Die physiologische Funktion des AhR konnte bisher noch nicht vollständig geklärt und ein endogener Ligand bisher noch nicht identifiziert werden. Dennoch ist der AhR ubiquitär im Säugetierorganismus nachweisbar. Selbst in humanen Spermien lässt sich AhR-mRNA nachweisen (Khorram et al., 2004).

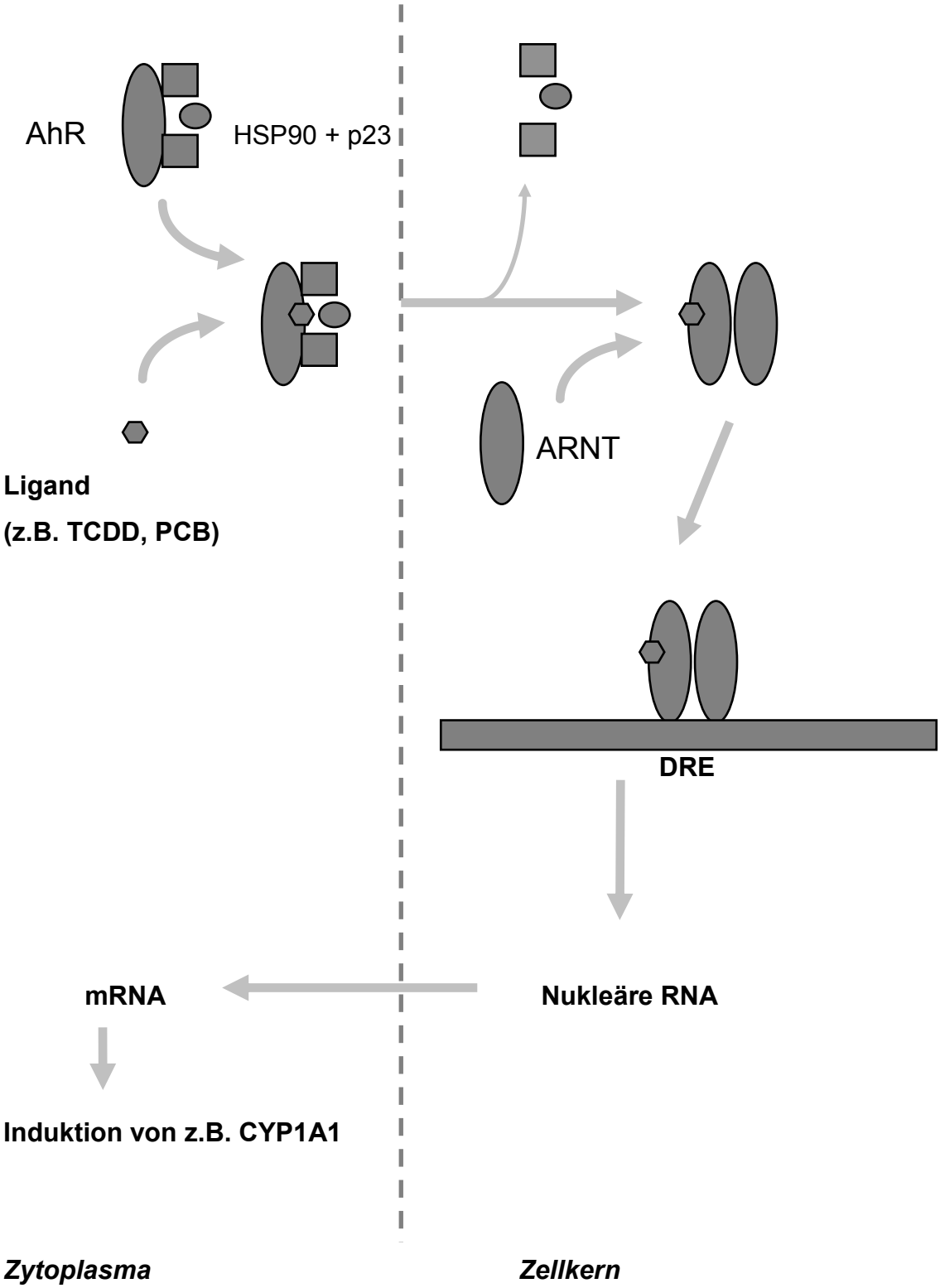

Abbildung 16: Molekulare Wechselwirkung von "dioxinartigen" PCB mit dem Dioxin-Ah-Rezeptor

AhR: Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor, HSP90: Heat-shock-protein 90, p23: Co-Protein ARNT: Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, DRE: Dioxin-responsive Elemente, RNA: Ribonukleinsäure, mRNA: Messenger-RNA, CYP1A1: Cytochrom P450 1A1 Enzym

Wie in Abbildung 16 ersichtlich wird davon ausgegangen, dass ein Ligand (z.B. dioxinartiges PCB oder TCDD) an den zytosolischen Ah-Rezeptor (AhR) bindet. Dieser besteht aus einem basischen Helix-Loop-Helix/Per-ARNT-Sim (bHLH/PAS) Protein, dem ein molekulares Begleitprotein HSP 90 (Heat-shock-protein 90) angelagert ist. Das HSP90 wiederum wird von dem Co-Protein p23 begleitet (Petrulis et al., 2002). Bindet der Ligand an den Rezeptor, kommt es unter Abspaltung des HSP90/p23 zu dessen Umwandlung in einen nucleären Transkriptionsfaktor-Komplex, der ein spezifisches bHLH/PAS Partnerprotein (=ARNT (Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator) -Protein) enthält (Coumailleau et al., 1995). Der Ligand-Rezeptor-ARNT-Komplex gelangt in den Zellkern, wo er sich an Dioxin-responsive Elemente (DRE) oder Xenobiotic-responsive Elemente (XRE) der DNA "upstream" vom Strukturgen bindet. Dies führt im Folgenden dazu, dass die Transkription des Strukturgens in die entsprechende Messenger-RNA (m-RNA) anläuft (Denison et al., 1988). Gemäß der m-RNA erfolgt die Synthese eines Genprodukts (z.B. eines Enzyms). Zu den Enzymsystemen, die durch dioxinartige Fremdstoffe induziert werden, gehört beispielsweise das CYP1A1 (Goeptar et al., 1995).
Neben den Rezeptor vermittelten Effekten sind auch direkte Wirkungen auf Enzymsysteme möglich (Drenth et al., 1998; Portigal et al., 2002; Endo et al., 2003). Zahlreiche tierexperimentelle Untersuchungen belegen die negativen Einflüsse der PCB auf die männliche Fertilität in vivo und in vitro in Abhängigkeit von Expositionszeitpunkt, -dauer und -dosis (Popp et al., 1993; Raychoudhury et al., 2000; Fielden et al., 2001; Kim et al., 2001). Die Datenlage hinsichtlich humaner Wirkung auf die Fertilität ist lückenhaft, besonders gegenüber chronischer Exposition bei niedrigen PCB-Konzentrationen.

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich nach Inkubation der R2C-Zellen mit PCB 126 eine Erhöhung der Östradiolkonzentration bei allen drei getesteten Konzentrationen

ohne Effekte auf die Zellvitalität. Aus unseren Untersuchungen könnte abgeleitet werden, dass das PCB 126 via Ah-Rezeptor die P450-Aromatase induziert. Denkbar wäre aber auch eine AhR-unabhängige Modulation der Aromatase, wie es in der Arbeit von Endo et al. (2003) bei humanen Prostatazellen und in der Arbeit von Bruss (1999) bei humanen Chorionkarzinom-Zellen berichtet wurde. Die Inhibierung der CYP450arom.-Aktivität ist dabei mit hoher Wahrscheinlichkeit das Resultat einer direkten Interaktion des PCB mit dem Enzym. Diese Meinung wird auch von Woodhouse et al. (2004) vertreten. Sie untersuchten den Einfluss von PCB 28 und PCB 105 auf die humane Aromataseaktivität. Es zeigte sich bei den eingesetzten Konzentrationen von 1,5 und 15 µM PCB 28 und 15 µM PCB 105 eine Reduktion der Aromataseaktivität. Enzymkinetische Untersuchungen führen zu dem Schluss, dass die Aromatase durch die PCB-Verbindungen kompetitiv gehemmt wird.

Da in meiner Arbeit die Östradiolsynthese als indirekter Hinweis auf die Aromataseaktivität bestimmt wurde, wären diese Hypothesen am ehesten in weiteren Arbeiten mit Hilfe eines Aromataseassays zu untersuchen.

Wie sich jedoch die Wirkungen von PCB auf die Aromataseaktivität in vivo verhält ist bisher nicht bekannt. Denkbar wären allerdings weitreichende Folgen, da Östrogene nicht nur wie oben beschrieben die Spermatogenese beeinflussen, sondern auch eine Rolle bei der sexuellen Determinierung des Gehirns spielen (Hutchison et al., 1999).

5.4.3 TCPM

In der vorliegenden Arbeit sollte TCPM und dessen mögliche Effekte auf die Steroidsynthese untersucht werden. Nach Inkubation der R2C-Zellen mit niedrigen TCPM-Konzentrationen fanden sich erniedrigte Östradiolwerte, und bei höheren TCPM-Konzentrationen eine dosisabhängige Zytotoxizität. Insgesamt waren die Ergebnisse jedoch sehr inhomogen. Die Zytotoxizität zeigte sich bei den Konzentrationen 100 µM und 50 µM. Bei Untersuchungen an MCF-7-Mammakarzinomzellen zeigte sich bei 10 µM starke Zytotoxizität (Körner et al., 2004). Somit weisen die R2C-Zellen der Ratte gegenüber TCPM eine ähnliche Empfindlichkeit wie die humanen Mammakarzinomzellen MCF-7 auf. Foster et al. (1999) hingegen beobachtete keinen zytotoxischen Effekt bei MCF-Zellen nach Inkubation von bis zu 100 µM.

Das DDT, welches als die Ausgangssubstanz des TCPM angesehen wird, scheint die gleichen Einflüsse wie das TCPM auf Zellen des Reproduktionstraktes zu haben (Pohland et al., 2003). Cummings et al. (2004) fanden eine Wirkung des DDT unter anderem auf den Ah-Rezeptor. TCPM bindet an den Androgenrezeptor, wohingegen eine Bindung an den ER in vitro fehlt (Foster et a., 1999). Ob die Aromatase-Inhibition beim TCPM auch via AhR, Androgenrezeptor, oder auf direktem Wege vollzogen wird, muss noch in weiteren Versuchen geklärt werden. Schrader et al. (2002) zeigten einen antiandrogenen Effekt in vitro, sodass TCPM möglicherweise eine potentiell toxische und endokrin aktive Substanz darstellt. Sicher ist, dass das TCPM ubiquitär in der Umwelt vorkommt. Ein Effekt auf die Steroidhormonsynthese, bzw. auf die Östradiolsynthese, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, somit kann auch hier ein negativer Einfluss auf die Fertilität nicht ausgeschlossen werden. Weitere systematische Untersuchungen sind erforderlich um eine Risikoabschätzung für den Menschen zu betreiben, und Einflüsse auf die Fertilität feststellen zu können.

6 Zusammenfassung

Seit einigen Jahren besteht ein vermehrtes Interesse an den Effekten endokrin aktiver Umweltchemikalien, d.h. Umweltchemikalien mit hormonähnlichen Wirkungen, auf die männliche Fertilität. Über eine zunehmende Zahl an Entwicklungsstörungen der männlichen Geschlechtsorgane beim Menschen und in der Tierwelt, sowie eine Abnahme der Spermienqualität fertiler Männer in den vergangenen 50 Jahren wurde vielfach berichtet. In diesem Zusammenhang sind chlorierte Kohlenwasserstoffe, wie beispielsweise polychlorierte Biphenyle, aufgrund ihrer chemischen Stabilität, ihrer Persistenz, ihrer langen Halbwertszeit und ihrer Bioakkumulation von großem Interesse. Obwohl sie seit Ende der siebziger Jahre verboten sind, werden sie auch heute noch bei Verbrennungsvorgängen freigesetzt. Diese Stoffe können auf verschiedenen Wegen in das Hormonsystem, speziell in das Wirkungsgefüge der Steroidhormone, eingreifen und so einen negativen Einfluss auf die Fertilität des Mannes bewirken.

In der vorliegenden Arbeit sollten, unter Verzicht auf Tierexperimente, die Effekte von zwei chlorierten Kohlenwasserstoffen (PCB 126 und TCPM) auf die Östrogensynthese der Leydigzelle am Beispiel der malignen transformierten, immortalisierten R2C-Leydigzelllinie der Ratte untersucht werden. Zunächst wurde die Eignung der R2C-Zellen als In-vitro-Modell für Partialfunktionen der Steroidhormonsynthese überprüft. Diese Zellen produzieren in vitro ohne Stimulation Progesteron und Östrogen als Hauptsekretionsprodukt. Auch in dieser Arbeit konnte bestätigt werden, dass die R2C-Zellen ihre Hormonsekretion über 24 Stunden unter serumfreien Bedingungen aufrechterhalten können.

Des Weiteren wurde der Einfluss verschiedener Stimulatoren und Inhibitoren von Signaltransduktionswegen auf die Zelllinie untersucht. Dazu wurden die Zellen mit verschiedenen Konzentrationen von 4-OHA (Aromataseinhibitor), Forskolin (Adenylatcyclaseaktivator), H7 (Proteinkinase-C-Inhibitor), PDA (Aromataseinduktor) und PMA (Proteinkinase-C-Aktivator) inkubiert. Besonders auffällig war eine massive Reduktion der Östradiolkonzentration nach Inkubation mit 4-OHA, was mit einer Inhibierung der Aromatase in den R2C-Zellen erklärt werden könnte. Von daher scheint die P450-Aromatase in den R2C-Zellen von besonderem Interesse. Forskolin hatte keinen Effekt und bestätigt die bereits bekannte These, dass die Zellen sich

durch cAMP nicht weiter stimulieren lassen. H7 führt zu einer Reduktion der Östradiolkonzentration, der Mechanismus bleibt aber weiter unklar. Sowohl PDA als auch PMA führten ebenfalls zu einer Reduktion der Östradiolkonzentration, was hier mit einer vorhandenen Proteinkinase C erklärt werden könnte. Somit konnte bestätigt werden, dass die R2C-Zelle sich nicht durch cAMP stimulieren lässt. Ebenso scheint die Proteinkinase C in den Zellen vorhanden zu sein, da durch ihre Aktivierung eine Östradiolreduktion beobachtet werden konnte.
Zu den Hauptversuchen zählte die Inkubation der R2C-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des coplanaren PCB 126. Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Östradiolsekretion. PCB 126 führt in Konzentrationen, die ungefähr um den Faktor 1000 höher liegen als die derzeitige Hintergrundbelastung, zu einer Erhöhung der Östradiolsekretion bei fehlender Zytotoxizität. Inwieweit hierbei der Ah-Rezeptor eine Rolle spielt, oder PCB 126 direkt die P450-Aromatase moduliert, kann nicht abschließend geklärt werden. Dies gilt es in weiteren Experimenten zu untersuchen.
Als weitere chlororganische Substanz wurde das TCPM gewählt. TCPM kommt ubiquitär in der Umwelt vor, ist aber weit weniger gut untersucht. Bei der Inkubation mit TCPM zeigten sich bei subtoxischen Konzentrationen erniedrigte Östradiolwerte, ebenso wie bei zytotoxischen, höheren TCPM-Konzentrationen. Die beobachtete Zytotoxizität ist dosisabhängig. Inwieweit auch hier die Aromatase involviert ist oder das TCPM direkt in die Hormonsekretion eingreift bleibt noch weiter zu klären.

Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass unter bestimmten Bedingungen eine Beeinflussung der Leydigzellfunktion durch subtoxische PCB- und TCPM-Konzentrationen denkbar ist und zu einer veränderten endokrinen Homöostase führen kann. Die R2C-Zelllinie scheint geeignet zur Untersuchungen von Effekten exogener Störfaktoren (z.B. endokrin aktive Umweltchemikalien) auf die Östradiolsekretion und letztlich auf die P450-Aromatase.
In vivo besteht eine Exposition gegenüber verschiedenen PCB-Verbindungen und anderen persistenten Chemikalien. Über additive oder synergistische Effekte bestehen nach wie vor Unsicherheiten. Da nicht wenige der persistenten halogenierten Kohlenwasserstoffverbindungen als hormonale Dysregulationsfaktoren („Endokrine Disruptoren“) wirken, sind negative Einflüsse auf den

Steroidmetabolismus und somit auf die Fertilität des Mannes nicht ausgeschlossen. Eine direkte Übertragung der in vitro Untersuchungsergebnisse auf die in vivo Situation ist nur bedingt möglich. Dennoch kann eine Beeinträchtigung der Fertilität in vivo bei chronischer Langzeitexposition besonders in vulnerablen Phasen (Embryonal/Fetalzeit, Postpartalzeit, Pubertät) nicht vollständig ausgeschlossen werden. Daher ist aus der Sicht des vorbeugenden Gesundheitsschutzes eine weitere Expositionsbegrenzung gegenüber diesen Substanzgruppen notwendig.

7 Summary

In the past years there has been increased interest in assessing the relationship between impaired male fertility and environmental chemicals. There have been many reports about an increased number of reproductive dysfunctions in male animals and humans and a decrease in sperm quality in the past 50 years. Due to their chemical stability, their persistence, their long life time and their bioaccumulation in the food chain chlorinated hydrocarbons, such as polychlorinated biphenyls, are of special interest. Despite their interdiction at the end of the seventies, they are released from garbage incinerations until this day. These substances may interfere with the hormone system, especially with effects on steroid hormones. Eventually they may interfere even with male fertility.

In the experiments presented the effects of two different chlorinated hydrocarbons (PCB 126 and TCPM) have been evaluated. Without testing animals we used the malignant, immortalised R2C-leydig cell line of the rat. First we examined the suitability of R2C cells as an in vitro model for steroid hormone secretion. Progesterone and estrogen are the main secretion products. The cells are able to maintain their hormone production for more than 24 hours under serum free conditions. Afterwards, we investigated the influence of enzymeinhibitors and -inductors on R2C-cells. For this purpose the cells have been incubated with different concentrations of 4-OHA (aromataseinhibitor), Forscolin (adenylatcyclaseactivator), H7 (proteinkinase-C-inhibitor), PDA (aromataseinductor) and PMA (proteinkinase-C-activator) for some days. We found a significant decrease in estradiol production after incubation with 4-OHA. So an inhibition of the aromatase could be shown in these cells and seems to be a matter of particular interest. Forskolin had no effect and confirmed the thesis, that the R2C-cells could not been stimulated by cAMP. H7 led to a reduction of estradiol concentration, but the mechanism of it remains unclear. Both, PDA and PMA, led to a reduction of estradiol concentration, which could be explained with a present proteinkinase C in these cells.

Then we incubated the R2C-cells with the coplanar PCB 126 and TCPM. After PCB incubation the estradiol secretion has been increased, without affecting the cell vitality. Up to now it is not clear, whether PCBs links to the Ah receptor or direct affects enzyme function. Another chlororganic substance we tested has been the

TCPM. TCPM has been found in the environment like PCBs, but is still not well characterized.

After TCPM incubation with low concentrations we found decreased estradiol concentration, but cytotoxicity with higher concentrations. Still it is not clear, if it acts via aromatase or could direct affect the hormones. All these results lead to the hypothesis, that PCB and TCPM could influence the Leydig cell function and on this way could even influence fertility. The R2C-cell line seems to be suitable for investigations on exogenous chemicals on aromatase activity. In vivo there is a human exposition to many persistent chemicals like PCBs. It is uncertain, if there are synergistic effects in the environment. Though many persistent hydrocarbons act as endocrine disruptors they have negative influences on steroid metabolism and possibly even on fertility. A direct transfer from in vitro to in vivo seems to be difficult, but we suppose, that they act in a similar manner even under in vivo conditions.

8 Literaturverzeichnis

Adami H, Bergström R, Möhner M (1994) Testicular cancer in nine northern European countries. Int J Cancer 59: 33-38.

Ahlborg UG, Hanberg A, Kenne K (1992) Risk assessment of polychlorinated biphenyls. Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet, Stockholm, Schweden.

Ahlborg UG, Becking BC, Birnbaum LS, Brouwer A, Derks HJGM, Feeley M, Golor G, Hanberg A, Larsen JC, Liem AKD, Safe SH, Schlatter C, Waern F, Younes M, Yrjänheikki E (1994) Toxic equivalency factors for dioxin-like PCBs. Chemosphere 28: 1049-1067.

Akingbemi BT, Hardy MP (2001) Oestrogenic and antioestrogenic chemicals in the environment: effects on male reproductive health. Ann Med 33: 391-403.

Allen JR, Barsotti DA, Lambrecht LK, van Miller JP (1979) Reproductive effects of halogenated aromatic hydrocarbons on nonhuman primates. Ann NY Acad Sci 320: 419-425.

Allen JR, Carstens LA, Barsotti DA (1974) Residual effects of short-term, low-level exposure of nonhuman primates to polychlorinated biphenyls. Toxicol Appl Pharmacol 30: 440-451.

Andersen AG, Carlsen TK (2000) High frequency of sub-optimal semen quality in an unselected population of young man. Hum Reprod 15: 366-372.

Ando M, Saito H, Wakisaka I (1985) Transfer of polychlorinated biphenyls (PCB) to newborn infants through placenta and mothers milk. Arch Enviro Contam Tox 14: 51-54.

Andric SA, Kostic TS, Stojilkovic SS, Kovacevic RZ (2000) Inhibition of rat testicular androgenesis by a polychlorinated biphenyl mixture aroclor 1248. Biol Reprod 62: 1882-1888.

Auger J, Kunstmann J, Czyglik F, Jouannet P (1995) Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. New Engl J Med 332: 281-285.

Ascoli M (1981) Characterization of several clonal lines of cultured Leydig tumor cells: gonadotropin receptors and steroidogenic responses. Endocrinology 108: 88-95.

Ascoli M (1981) Regulation of gonadotropin receptors and responses in a clonal strain of Leydig tumor cells by epidermal growth factor. J Biol Chem 256: 179-189.

Ascoli M, Hoelscher SR (1996) Immortalized Leydig cell lines as models for studying Leydig cell physiology. The Leydig Cell. In: Payne AH, Hardy MP, Russell LD, eds. The Leydig cell. Vienna, IL: Cache River Press; 523–534

Aquila S, Sisci D, Gentile M, Carpino A, Middea E, Catalano S, Rago V, Ando S (2003) Towards a physiological role for cytochrom P450 aromatase in ejaculated human sperm. Hum Reprod 18: 1650-1659.

Awoniyi CA, Santulli RL, Sprando RL, Ewing LL, Zirkin BR (1989) Restoration of advances spermatogenic cells in the experimentally regressed rat testis: qualitative relationship to testosterone concentration within the testis. Endocrinology 124: 1217-1223.

Behnisch P, Engelhart A, Apfelbach R, Hagenmaier H (1997) Occurrence of non-ortho, mono-ortho and di-ortho substituted PCB congeners in polecats, stone martens and badgers from the state of Baden-Wurttemberg, Germany. Chemosphere 34: 2293-2300.

Beier HM (1988) Umweltbelastung und Fortpflanzung. Sexualmedizin 8: 315-316.

Beyeler M, Häberle M, Hohl M (2002) Vergleich der Schwangerschaftsrate nach in vitro-Fertilisation und intrazytoplasmatischer Spermieninjektion zwischen dem Embryotransfer an Tag 2 und Tag 5 (Blastozystentransfer) – Eine kontrollierte matched-pair-Analyse. J Fertil Reprod 12: 11–19.

Biessmann A (1982) Effects of PCBs on gonades, sex hormone balance and reproductive processes of Japanese quail Coturnix coturnix japonica after ingestion during sexual maturation. Environ Pollut 27: 15-30.

Bitman J, Cecil HC (1970) Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. J Agr Food Chem 18: 1108-1112.

Boersma ER, Lanting CI (2000) Environmental exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) and dioxins. Consequences for longterm neurological and cognitive development of the child lactation. Adv Exp Med Biol 478: 271-287.

Boyd GS, McNamara B, Suckling KE, Tocher DR (1983) Cholesterol metabolism in the adrenal cortex. J Steroid Biochem 19: 1017-1027.

Brezner E, Terkel J, Perry AS (1984) The effect of aroclor 1254 (PCB) on the physiology of reproduction in the female rat—I. Comp Biochem Physiol C 77: 65-70.

Bridges JW (1993) Present understanding of human health risk from polychlorinated biphenyls (PCB's), 81-96, in PCB's in the environment today, SCS Publications, Londsdale Press Ltd, London.

Brown JF (1994) Determination of PCB metabolic, excretion and accumulation rates for use as indicators of biological response and relative risk. Environ Sci Technol 28: 2295-2305.

Bruhn T, Gülden M, Ludewig S, Seibert H (1999) Einstufung von Schadstoffen als endokrin wirksame Substanzen. UBA-Text 65/99. Forschungsbericht 297 61 001/08. Umweltbundesamt, Berlin.

Bruss W (1999) Humane Chorionkarzinom-Zellen als Modell früher Trophoblastzell-funktion und deren Beeinflussung durch persistente Halogenorganika. Med. Dissertation, Universität Tübingen

Buser HR (1995) DDT, a potential source of environmental tris(4-chloro-phenyl)methanol. Environ Sci Technol 29: 2133-2139.

Cao L, Zlock DW, Gardner DG (1994) Differential regulation of natriuretic peptide receptor activity in vascular cells. Hypertension 24: 329-338.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992) Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Br Med J 305: 609-613.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1993) Decline in semen quality from 1930 to 1991. Ugeskr Laeger 155: 2530-2535.

Carpenter DO (1998) Polychlorinated biphenyls and human health. Int J Occup Med Environ Health 11: 291-303.

Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J (1999) Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. Int J Androlog 22: 211-223.

Carreau S, Bourguiba S, Lambard S, Galeraud-Denis I, Genissel C, Bilinska B, Benahmed M, Levallet J. (2001) Aromatase expression in male germ cells. J Steroid Biochem Mol Biol 79: 203-208.

Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, Bilinski B, Bourguiba S (2003) Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. Reprod Biol Endocrinol 1: 35.

Catt KJ, Tsuruhara T, Mendelson C, Ketelslegers J-M, Dufau ML (1974) Gonadotropin binding and activation of the interstitial cells of the testis. Curr Top Mol Endocrinol 1: 1-30.

Chilvers C, Pike MC, Forman D (1984) Apparent doubling of frequency of undescended testis in England and Wales in 1962-81. Lancet 330-332.

Christenson LK, Strauss III JF (2000) Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and the intramitochondrial translocation of cholesterol. Biochim Biophys Acta 1529: 175-187.

Coffey DS (1988) Androgen action and the sex accessory tissue. In: The Physiology of Reproduction. (Knobil E, Neill JD, Ewing LL, Greenwald GS, Markert CL and Pfaff DW, Eds), Raven Press, New York, pp. 1081-1119.

Conney AH, Levin W, Jacobson M, Kuntzman R (1973) Effects of drugs and environmental chemicals on steroid metabolism. Clin Pharmacol Ther 14: 727-741.

Conley A, Hinshelwood M (2001) Mammalian aromatases. Reproduction 121: 685-695.

Cook JC, Klinefelter GR, Hardisty JF, Sharpe RM, Foster PMD (1999) Rodent Leydig cell tumorigenesis: a review of the physiology, pathology, mechanisms, and relevance to humans. Crit Rev Toxicol 29: 169-261.

Cooke BA, Lindh LM, Janszen FHA, Van Driel JJA, Bakker CP, Van der Plank MPI, Van der Molen HJ (1979) A Leydig cell tumor. A model for the study of lutropin action. Biochim Biophys Acta 583: 320-331.

Cooke BA, Platts EA, Abayasekera RE, Rose MP (1989) Mechanisms of hormone-induced desensitisation of adenylat cyclase. Biochem Soc Trans 17: 633-635.

Cooke BA (1999) Signal transduction involving cyclic AMP-dependent and cyclic AMP-independent mechanisms in the control of steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol 151: 25-35.

Corbin JD, Lincoln TM (1978) Comparison of cAMP and cGMP-dependent protein kinases. Adv Cyclic Nucleotide Res 9: 159-170.

Coumailleau P, Poellinger L, Gustafsson JA, Whitelaw ML (1995) Definition of a minimal domain of the dioxin receptor that is associated with Hsp90 and maintains wild type ligand binding affinity and specificity. J Biol Chem 270: 25291-25300.

Cummings AM, Kavlock RJ (2004) Function of sexual glands and mechanism of sex differentiation. J Toxicol Sci 29: 167-178

Cuzin F, Rassoulzadegan M (1998) Cell culture systems for the analysis of the male germinal differentiation. Adv Exp Med Biol 444: 51-56.

Dallinga JW, Moonen EJ, Dumoulin EJ, Evers JC, Geraedts JP, Keinjans JC (2002) Decreased human semen quality and organchlorine compounds in blood. Hum Reprod 17: 1973-1979.

De Boer J, Wester PG, Evers EHG (1994) Tris(4-chlorophenyl)methanol and tris(4-chlorophenyl)methane in marine mammals and fish from the North Sea and Dutch Wadden Sea. Organohalogen Compounds 20: 191-194.

De Boer J, Wester PG, Evers EHG, Brinkman UAT (1996) Determination of tris(4-chlorophenyl)methanol and tris(4-chlorophenyl)methane in fish, marine mammals and sediment. Environ Pollut 93: 39-47.

De Boer J (1997) Environmental distribution and toxicity of tris(4-chlorophenyl)methanol and tris(4-chlorophenyl)methane. Rev Environ Contam Toxicol 150: 95-106.

Den Hond E, Roels HA, Hoppenbrouwers K, Nawrot T, Thijs L, Vandermeulen C, Winneke G, Vanderschueren D, Staessen JA (2002) Sexual maturation in

relation to polychlorinated aromatic hydrocarbons: Sharpe and Skakkebaek's hypothesis revisted. Environ Health Perpect 110: 771-776.

Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr (1988) The DNA recognition site for the dioxin-Ah receptor complex. Nucleotide sequence and functional analysis. J Biol Chem 263: 17221-17224.

Denison MS, Fisher JM, Whitlock JP Jr (1988) Inducible, receptor-dependent protein-DNA interactions at a dioxin-responsive transcriptional enhancer. Proc Natl Acad Sci USA 85: 2528-2532.

Deutsche Forschungsgemeinschaft (1988) Polychlorierte Biphenyle – Bestandsaufnahme über Analytik, Vorkommen, Kinetik und Toxikologie. Mitteilung XIII der Senatskommission zur Prüfung von Rückständen in Lebensmitteln. Verlag Chemie, Weinheim.

Doody KM, Murry BA, Mason JI (1990) The use of rat Leydig tumor (R2C) and human hepatoma (HEPG2) cells to evaluate potential inhibitors of rat and human steroid aromatase. J Enzyme Inhibition 4: 153-158.

Drenth HJ, Bouwman CA, Seinen W, Van den Berg M (1998) Effects of some persitent halogenated environmental contaminants on aromatase (CYP19) activity in the human choriocarcinoma cell line JEG-3. Toxicol Appl Pharmacol 48: 50-55.

Dunson DB, Baird DD, Colombo B (2004) Increased Infertility With Age in Men and Women. Amer J Obst Gyn 103: 51-56.

Durkee TJ, Mueller M, Zinaman M (1998) Identification of estrogen receptor protein and messenger ribonucleic acid in human spermatozoa. Amer J Obst Gyn 178: 1288-1295.

Earl FL, Couvillion JL, van Loon EJ (1974) The reproductive effect of PCB 1254 in beagle dogs and miniature swine. Toxicol Appl Pharmacol 29: 104.

Endo F, Monsees TK, Akaza H, Schill WB, Pflieger-Bruss S (2003) Effects of single non-ortho, mono-ortho, and di-ortho chlorinated biphenyls on cell functions and proliferation of the human prostatic carcinoma cell line, LNCaP. Reprod Toxicol 17: 229-236.

Fedorova OV, Dorofeeva NA, Lopatin DA, Lakatta EG, Bagrov AY (2002) Phorbol diacetate potentiates na(+)-k(+) ATPase inhibition by a putative endogenous ligand, marinobufagenin. Hypertension 39: 298-302.

Feldman HA, Longcope C, Derby CA, Johannes CB, Araujo AB, Coviello AD, Bremmer WJ, McKinlay JB (2002) Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. Clin Endocrinol Metab 87: 589-598.

Fielden MR, Halgren RG, Tashiro CH, Yeo BR, Chittim B, Chou K, Zacharewski TR (2001) Effects of gestational and lactational exposure to Aroclor 1242 on sperm quality and in vitro fertility in early adult and middle-aged mice. Reprod Toxicol 15: 281-292.

Fisher JS (2004) Are all EDC effects mediated via steroid hormone receptors? Toxicology 205: 33-41.

Foster WG, Desaulniers D, Leingartner K, Wade MG, Poon R, Chu I (1999) Reproductive effects of tris(4-chorophenyl)methanol in the rat. Chemosphere 39: 709-724.

Freeman DA (1987) Constitutive steroidogenesis in the R2C Leydig tumor cell line is maintained by the adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-independent production of a cycloheximide-sensitive factor that enhances mitochodrial pregnenolone synthesis. Endocrinology 120: 124-132.

Freeman HC, Sangalang GB (1977) A study of the effects of methyl mercury, cadmium, arsenic, selenium and a PCB (Aroclor 1254) on adrenal and testicular steroidogenesis in vitro, by the Gray Seal Halichoerus Grypus. Arch Environ Contam Toxicol 5: 369-383.

Fuller GB, Knauf V, Müller W, Hobson WC (1980) PCB augments LH-induced progesterone synthesis. Bull Environ Contam Toxicol 25: 65-68.

Giwercman A, Carlsen E, Keidung N, Skakkebaek NE (1993) Evidence for increasing incidence of abnormalities of the human testis: a review. Environ Health Perspec Suppl 2: 65-71.

Goeptar AR, Scheerens H, Vermeulen NP (1995) Oxygen and xenobiotic reductase activities of cytochrome P450. Crit Rev Toxicol 25: 25-65.

Golden RJ, Noller KL, Titus-Ernstoff L, Kaufmann RH, Mittendorf R, Stillmann R, Reese RA (1998) Environmental endocrine modulators and human health: an assessment of the biological evidence. Crit Rev Toxicol 28: 109-227.

Guillette LJ Jr, Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994) Devlopmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. Environ Health Perspect 102: 680-688.

Habenicht UF (1998) Estrogens for men: Good or bad news. The Aging Male 1: 73-79.

Hagenmaier H, Krauss P, Lindig C (1995) Herkunft und Verbleib von Dioxinen, Furanen und PCB in Baden-Würtemberg. Abschlussbericht zum Forschungsvorhaben Nr. U 44-90.09. Umweltministerium Baden-Würtemberg, Stuttgart.

Hammer M, Petersson F (1986) Testosterone production in vitro in human testicular tissue. Andrologia 18: 196-200.

Hansson V, Jahnsen T, Purvis K, Andersen D, Birnbaumer L (1980) LH/hCG responsive adenylyl cyclase in rat testis and testes from testicular feminized male rats and mice: desensation by homologous hormone. Int J Androl 3: 703-712.

Heinzow B, Schade G (1998) Organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in human milk of mothers living in northern Germany: current extent of contamination, time trend from 1986 to 1997 and factors that influence the levels of contamination. Sci Total Environ 215: 31-39.

Heneweer M, van den Berg M, Sanderson JT (2004) A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as in vitro screening tools for effects on aromatase. Toxicol Lett 146: 183-194.

Herrmann BL, Saller B, Janssen OE, Gocke P, Bockisch A, Sperling H, Mann C, Broecker M (2002) Impact of estrogen replacement therapy in a male with congenital aromatase deficiency caused by a novel mutation in the CYP19 gene J Clin Endocrinol Metab 87: 5476-5484.

Hess RA (2000) Oestrogen in fluid transport in efferent ducts of the male reproductive tract. Rev Reprod 5: 84-92.

Hess RA (2003) Estrogen in the adult male reproductive tract: a review. Reprod Biol Endocrinol 1: 52.

Huang KP, Huang FL, Nakabayashi H, Yoshida Y (1989) Expression and function of protein kinase C isoenzymes. Acta Endocrinol 121: 307-316.

Hutchison JB, Wozniak A, Beyer C, Karolczak M, Hutchison RE (1999) Steroid metabolising enzymes in the determination of brain gender. J Steroid Biochem Mol Biol 69: 85-96.

Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J (1996) Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. Brit Med J 312: 467-471.

Jarman WM, Simon M, Norstrom RJ, Bruns AS, Bacon CA, Simaret BRT, Riseborough RW (1992) Global distribution of tris(4-chlorophenyl)methanol in high trophic level birds and mammals. Environ Sci Technol 26: 1770-1774.

Jensen S (1966) Report of a new chemical hazard. New Scientist 32: 612.

Jockenhövel F, Lehnert H (2004) Östrogene für den Mann- sinnvoll oder gefährlicher Unfug? Deutsches Ärzteblatt 101: 578-582.

Kai H, Griendling KK, Lassegue B, Ollerenshaw JD, Runge MS, Alexander RW (1994) Agonist-induced phosphorylation of the vascular type 1 angiotensin II receptor. Hypertension 24: 523-527.

Kanzaki M, Morris PL (1999) Growth hormone regulates steroidogenic acute regulatory protein expression and steroidogenesis in leydig cell progenitors Endocrinology 140: 1681-1686.

Kashimoto T, Miyata H, Fukushima S, Kunita N, Ohi G, Tung T-C (1985) PCBs, PCQs and PCDFs in blood of Yusho and Yu-Cheng patients. Environ Health Perspect 59: 73-78.

Kaya H, Hany J, Fastabend A, Roth-Harer A, Winneke G, Lilienthal H (2002) Effects of maternal exposure to a reconstituted mixture of polychlorinated biphenyls on

sex-dependent behaviors and steroid hormone concentrations in rats: dose-response relationship. Toxicol Appl Pharmacol 178: 71-81.

Kelloff GJ, Lubet RA, Lieberman R, Eisenhauer K, Steele VE, Crowell JA, Hawk ET, Boone CW, Sigman CC (1998) Aromatase inhibitors as potential cancer chemopreventives. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 7: 65-78.

Khorram O, Garthwaite M, Jones J, Golos T (2004) Expression of Aryl Hydrocarbon Receptor (AHR) and Aryl Hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator (ARNT) mRNA expression in human spermatozoa. Med Sci Monit Epub 10: 135-138.

Kim IS, Ariyaratne HB, Chamindrani Mendis-Handagama SM (2001) Effects of continous and intermittent exposure of lactating mothers to aroclor 1242 on testicular steroidogenic function in the adult male offspring. Tissue Cell 33: 169-177.

Kimbrough RD (1995) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and human health: an update. Crit Rev Toxicol 25: 133-163.

Koga N, Kikuichi N, Kanamaru T, Kuroki H, Matsusue K, Ishida C, Ariyoshi N, Oguri K, Yoshimura H (1998) Metabolism of 2,3',4',5-tetrachlorobiphenyl by cytochrome P450 from rats, guinea pigs and hamsters. Chemosphere 37: 1895-1904.

Körner W, Vinggaard AM, Térouanne B, Ma R, Wieloch C, Schlumpf M, Sultan C, Soto AM (2004) Interlaboratory comparison of four in vitro assays for assessing androgenic and antiandrogenic activity of environmental chemicals. Environ Health Perspect 112: 695–702.

Lackmann GM, Schaller KH, Angerer J (2004) Organochlorine compounds in breast-fed vs. bottle-fed infants: preliminary results at six weeks of age. Sci Total Environ 329: 289-293.

Lai KP, Wong MH, Wong CK (2005) Inhibition of CYP450scc expression in dioxin-exposed rat Leydig cells. J Endocrinol 185: 519-527.

Lambard S, Galeraud-Denis I, Saunders PT, Carreau S (2004) Human immature germ cells and ejaculated spermatozoa contain aromatase and oestrogen receptors. J Mol Endocrinol 32: 279-89.

Larebeke van N, Hens L, Schepens P, Covaci A, Baeyens J, Everaert K, Bernheim JL, Vlietinck R, De Poorter G (2001) The Belgian PCB and dioxin incident of January-June 1999: exposure data and potential impact on health. Environ Health Perspect 109: 265-273.

Lascombe I, Beffa D, Ruegg U, Tarradellas J, Wahli W (2000) Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. Environ Health Perspect 108: 621-629.

Lee KH, Hess RA, Bahr J, Lubahn DB, Taylor J, Bunick D (2000) Estrogen receptor α has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. Biol Reprod 63: 1873-1880.

Lephart ED, Peterson KG, Noble JF, George FW, McPhaul ML (1990) The structure of cDNA clones encoding the aromatase P-450 isolated from a rat Leydig cell tumor line demonstrates differential processing of aromatase mRNA in rat ovary ans a neoplastic cell line. Mol Cell Endocrinol 70: 31-40.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J Biol Chem 193: 265-267.

Lopez-Ruiz MP, Choi MSK, Rose MP, West AP, Cooke BA (1992) Direct effect of arachidonic acid on protein kinase C and LH-stimulated steroidogenesis in rat Leydig cells; evidence for tonic inhibitory control of steroidogenesis by protein kinase C. Endocrinology 130: 1122-1130.

Luconi M, Forti G, Baldi E (2002) Genomic and nongenomic effects of estrogens: molecular mechanisms of action and clinical implications for male reproduction. J Steroid Biochem Mol Biol 80: 369-381.

Masuda Y, Kuroki H, Haraguchi K (1986) PCDFs and related compounds in humans from Yusho and Yu-Cheng incidents. Chemosphere 15: 1621-1628.

Medlock KL, Branham WS, Sheehan DM (1992) Long-term effects of postnatal exposure to diethylstilbestrol on uterine estrogen receptor and growth. J Steroid Biochem Mol Biol 42: 23-28.

Merson MH, Kirkpatrick RL (1976) Reproductive performance of captive whitefooted mice fed a PCB. Bull Environ Contamin Toxicol 16: 392-398.

Metzger H, Lindner E (1981) The positive inotropic-acting forskolin, a potent adenylate cyclase activator. Arzneim.-Forschung 31: 1248-1250.

Minh TB, Watanabe M, Tanabe S, Yamada T, Hata J, Watanabe S (2001) Specific accumulation and elimination kinetics of tris(4-chlorophenyl)methane, Tris(4-chlorophenyl)methanol, and other persistent organochlorines in humans from Japan. Environ Health Perspect 109: 927-935.

Mocarelli P, Gerthoux PN, Ferrari E, Patterson DG, Kieszak SM, Brambilla P, Vincoli N, Signorini S, Tramacere P, Carreri V, Sampson EJ, Turner WE, Needham LL (2000) Paternal Concentrations of dioxine and sex ratio of offspring. Lancet 355: 1858-1863.

Moore RW, Potter CL, Theobald HM, Robinson JA, Peterson RE (1985) Androgenic deficiency in male rats treated with 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. Toxicol Appl Pharmacol 79: 99-111.

Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods 65: 55-63.

Müller WF, Hobson W, Fuller GB, Knauf W, Coulston F, Korte F (1977) Endocrine effects of chlorinated hydrocarbons in rhesus monkey. Ecotoxicol Environ Safety 2: 161-172.

NATO (1988) International toxicity equivalent factors (TEFs) method of risk assessment for complex mixtures of dioxins and related compounds. Report No 176 North Atlantic Treaty Organization.

Nishihara M, Winters CA, Buczko E, Waterman MR, Dufau ML (1988) Hormonal regulation of rat Leydig cell cytochrome $P450_{17\alpha}$ mRNA levels and characterization of a partial length rat $P450_{17\alpha}$ cDNA. Biochem Biophys Res Commun 154: 151-158.

Nowicki HG, Norman AW (1972) Enhanced hepatic metabolism of testosterone, 4-androstene-3,17-dione, and estradiol-17β in chickens pretreated with DDT of PCB. Steroids 19: 85-99.

O'Donnell L, Robertson KM, Jones ME, Simpson ER (2001) Estrogen and spermatogenesis. Endocr Rev 22: 289-318.

Ogawa S, Lubahn DB, Korach KS, Pfaff DW (1997) Behavioural effects of oestrogen receptor gene disruption in male mice. Proc Natl Acad Sci USA 94: 1476-1481.

Örberg J, Kihlström JE (1973) Effects of long-term feeding of polychlorinated biphenyls on the length of the oestrous cycle and on the frequency of implanted ovar in the mouse. Environ Res 6: 176-179.

Papadopoulos V, Carreau S, Drosdowsky MA (1985) Effects of phorbol ester and phospholipase C on LH-stimulated steroidogenesis in purified rat Leydig cells. FEBS Letters 188: 321-326.

Payne AH, Perkins LM, Georgiou M, Quinn PG (1987) Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular Estradiol. Steroids 50: 437-448.

Payne AH, Youngblood GL, Burgos-Trinidad M, Hammond SH (1992) Hormonal regulation of steroidogenic enzyme gene expression in Leydig cells. J Steroid Biochem Mol Biol 43: 895-906.

Payne AH, Hardy MP, Russell LD (1996) The Leydig Cell. Vienna, IL: Cache River Press.

Payne AH, Teixeira J, Fynn-Thompson E, Donahoe PK (1999) Müllerina-inhibiting substance regulates androgen synthesis at the transcriptional level. Endocrinology 140: 4732-4738.

Pentikainen V, Erkkila V, Suomalainen L, Parvinen M, Dunkel L (2000) Estradiol acts as a germ cell survival factor in the human testis. J Clin Endocrinol Metab 85: 2057-2067.

Perkins LM, Hall PF, Payne AH (1988) Testosteron-enhanced oxygen-mediated degradation of $P450_{17\alpha}$ in mouse Leydig cell cultures. Endocrinology 122: 2257-2264.

Petrulis JR, Perdew GH (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. Chem Biol Interact 141: 25-40.

Pierik FH, Burdorf A, Deddens JA, Juttmann RE, Weber RF (2004) Maternal and paternal risk factors for cryptorchidism and hypospadias: a case-control study in newborn boys. Environ Health Perspect 112: 1570-1576.

Pohland R, Tiemann U (2003) Forskolin-induced cyclic AMP signaling in single adherent bovine oviductal cells: effect of dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT) and tris(4-chlorophenyl)methanol (TCPM). Toxicol In Vitro 17: 375-383.

Poon R, Lecavalier P, Bergman A, Yagminas A, Chu I, Valli VE (1997) Effects of tris(chlorophenyl)methanol (TCPM) on the rat following short-term oral exposure. Chemosphere 34: 1-12.

Popp W, Vahrnholz C, Kraus R, Norpoth K (1993) Polychlorierte Biphenyle (PCBs) und Reproduktionsstörungen. Zentralbl Hyg Umweltmed 193: 528-556.

Portigal CL, Cowell SP, Fedoruk MN, Butler CM, Rennic PS, Nelson CC (2002) Polychlorinated biphenyls interfere with androgen-induced transcriptional activation and hormone binding. Toxicol Appl Pharmacol 179: 185-194.

Rahman MS, Montanarella L, Johansson B, Larsen B (1993) Trace levels of tris(4-chlorophenyl)methanol and –methane in human milk. Chemosphere 27: 1487-1497.

Rao RM, Jo Y, Leers-Sucheta S, Bose HS, Miller WL, Azhar S, Stocco DM (2003) Differential regulation of steroid hormone biosynthesis in R2C and MA-10 Leydig tumor cells: role of SR-B1-mediated selective cholesteryl ester transport. Biol Reprod 68: 114-121.

Raychoudhury SS, Flowers AF, Millette CF, Finlay MF (2000) Toxic effects of polychlorinated biphenyls on cultured rat Sertoli cells. J Androl 21: 964-973.

Rebois RV (1982) Establishment of gonadotropin-responsive murine Leydig tumor cell line. J Cell Biol 94: 70-76.

Rehder H, Sanchioni L, Cefis F, Gropp A (1978) Pathologisch-embryologische Untersuchungen an Abortusfällen im Zusammenhang mit dem Seveso-Unglück. Schweiz Med Wochenschr 108: 1617-1625.

Riabowol KT, Fink JS, Gilman MZ, Walsh DA, Goodman RH, Feramisco JR (1988) The catalytic subunit of cAMP-dependent protein kinase induces expression of genes containing cAMP-responsive enhancer element. Nature 336: 83-86.

Robertson KM, O'Donnell L, Jones MEE, Meachem SJ, Boon WC, Fisher CR, Graves KH, McLachlan RI, Simpson ER (1999) Impairment of spermatogenesis in mice lacking a functional aromatase (cyp 19) gene. Proc Natl Acad Sci, USA 96: 7986-7991.

Robertson KM, Simpson ER, Lacham-Kaplan O, Jones ME (2001) Characterisation of the fertility of male aromatase knockout mice. J Androl 22: 825-830.

Rogan WJ, Gladen BC, Hsu CC, Chen YC, Ko HC (1990) Yucheng: studies in children. Organohalogen Compounds, Vol 1 Dioxin '90-EPRI-Seminar: Toxicology, Environment, Food, Exposure Risk. Bayreuth: Ecoinforma Press pp. 301-304.

Rommerts FFG, Cooke BA, van der Kemp JWCM, van der Molen HJ (1973) Effects of luteinizing hormone on 3'5'-cyclic AMP and testosterone production in isolated interstitial tissues of rat testis. FEBS Lett 33: 114-118.

Rommerts FFG, van Lindh MJA, Hegge HH, van der Molen HJ (1982) The effects of short-term culture and perfusion on LH-dependent steroidogenesis in isolated rat Leydig cells. J Reprod Fertil 65: 289-297.

Rommerts FFG, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ (1982) Development and cellular localisation of rat testicular aromatase activity. J Reprod Fertl 65: 281-288.

Rozati R, Reddy PP, Reddanna P, Mujtaba R (2002) Role of environmental estrogens in the deterioration of male factor fertility. Fertl Steril 78: 1187-1194.

Ryde CM, Nicholls JE, Dowsett M (1992) Steroid and growth factor modulation of aromatase activity in MCF7 and T47D breast carcinoma cell lines. Cancer Res 52: 1411-1415.

Sachs BD, Meisel RL (1988) The physiology of male sexual behavior. The Physiology of Reproduction, Raven Press 1393-1485.

Safe S (1984) Polychlorinated biphenyls (PCBs) and polybrominated biphenyls (PBBs): Biochemistry, toxicology and mechanism of action. Crit Rev Toxicol 13: 319-395.

Safe S, Astroff B, Harris M, Zacharewski T, Dickerson R, Romkes M, Biegel L (1991) 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and related comounds as antiestrogens: characterization and mechanism of action. Pharmacol Toxicol 69: 400-409.

Safe S (1994) Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. Crit Rev Toxicol 24: 87-149.

Sager DB (1983) Effects of postnatal exposure to polychlorinated biphenyls on adult male reproductive function. Environ Res 31: 76-94.

Sarria B, Pedros C, Galan G, Cortijo J, Morcillo EJ (2000) Effects of phorbol 12,13-diacetate on human isolated bronchus. Eur J Pharmacol 399: 65-73.

Schrader TJ, Cooke GM (2002) Interaction between tris(4-chlorophenyl)methanol and the human androgen receptor in vitro. Toxicol Lett 136: 19-24.

Seamon KB, Daly JW (1981) Forskolin: A unique diterpene activator of cyclic AMP-generating systems. J Cyclic Nucleotide Res 7: 201-224.

Seshagiri PB (2001) Molecular insights into the causes of male infertility. J Biosci 26: 429-435

Sharpe RM, Skakkebaek NE (1993) Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? Lancet 341: 1392-1395.

Sharpe RM (1995) Another DDT connection. Nature 375: 538-539.

Sharpe RM (1998) The roles of oestrogen in the male. Trends Endocrinol Metab 9: 371-377.

Sharpe RM, Rivas A, Walker M, McKinell C (2003) Effect of neonatal treatment of rats with potent or weak (environmental) oestrogens, or with a GnRH antagonist, on Leydig cell development and function through puberty into adulthood. Int J Androl 26: 26-36.

Shetty G, Krishnamurthy H, Bhatnagar S, Moudgal RN (1998) Effect of estrogen deprivation on the male reproductive physiology of male and female primates. J Steroid Biochem Mol Biol 61: 26-30.

Shin Y, Yasumura Y, Sato G.H (1968) Studies on interstitial cells in tissue culture: Steroid biosynthesis by a clonal line of rat testicular interstitial cells. Endocrinology 82: 614-616.

Simpson ER (1979) Cholesterol side-chain cleavage, cytochrom P450, and the control of steroidogenesis. Mol Cell Endocrinol 13: 213-227.

Simpson ER, Davis SR (2000) Another role highlighted for estrogens in the male: sexual behavior. Proc Natl Acad Sci USA 97: 14038-14040.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Jorgensen N, Carlsen E, Petersen PM, Giwercman A, Andersen AG, Jensen TK, Andersson AM, Muller J (1998) Germ cell cancer and disorders of spermatogenesis: an environmental connection? APMIS 106: 3-11.

Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E,Main KM (2001) Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. Hum Reprod 16: 972-978.

Skakkebaek NE (2002) Endocrine disruptors and testicular dysgenesis syndrome. Horm Res 2: 43.

Smith EP, Boyd J, Graeme RF, Frank GR, Takahashi H, Cohen RM, Specker B, Williams TC, Lubhan DB, Korach KS (1994) Estrogen resistance caused by a mutation in the estrogen-receptor gene in a man. New Engl J Med 331: 1056-1061.

Sohoni P, Sumpter JP (1998) Several environmental oestrogens are also atni-androgens. J Endocrinol 158: 327-339.

Steele G, Stehr-Green P, Welty E (1986) Estimates of the biologic half-life of polychlorinated biphenyls in human serum. N Engl J Med 314: 926-927.

Stocco DM, Chen W (1991) Presence of identical mitochondrial proteins in unstimulated constitutive steroid-producing R2C rat Leydig tumor and stimulated nonconstitutive steroid-producing MA-10 mouse Leydig tumor cells. Endocrinology 128: 1918-1926.

Stocco DM, King S, Clark BJ (1995) Differential effects of dimethylsulfoxid on steroidogenesis in mouse MA-10 and rat R2C Leydig tumor cells. Endocrinology 136: 2993-2999.

Stocco DM, King S, Clark BJ (1996) Regulation of the acute production of steroids in steroiedogenic cells. Endocr Rev 17: 221-244.

Stocco DM (2001) Tracking the role of a StAR in the sky of the new millennium. Mol Endocrinol 15: 1245-1254.

Swan JL, Elkin EP, Fenster L (1997) Have sperm densities declinded? A reanalysis of global trend data. Environ Health Perspect 105: 1228-1232.

Thierfelder W, Mehnert WH, Laußmann D, Arndt D, Reineke HH (1995) Der Einfluß umweltrelevanter östrogener oder östrogenartiger Substanzen auf das Reproduktionssystem. Bundesgesundheitsblatt 38: 337-341

Toda K, Okada T, Takeda K, Akira S, Saibara T, Shiraishi M, Onishi S, Shizuta Y (2001) Oestrogen at the neonatal stage is critical for the reproductive ability of male mice as revealed by supplementation with 17β-oestradiol to aromatase gene (Cyp 19) knockout mice. J Endocrinol 168: 455-463.

Tofilon PJ, Piper WN (1982) 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin-mediated depression of rat testicular heme synthesis and microsomal cytochrome P-450. Biochem Pharmacol 31: 3663-3666.

Toppari J, Skakkebaek NE (1998) Sexual differentiation and environmental endocrine disruptors. Baillieres Clin Endocrinol Metabol 12: 143-156.

Toppari J, Kaleva M, Virtanen HE (2001) Trends in the incidence of cryptorchidism and hypospadias, and methodological limitations of registry-based data. Hum Reprod Update 7: 282-286.

Toppari J, Haavisto AM, Alanen M (2002) Changes in male reproductive helath and effects of endocrine disruptors in Scandinavian countries. Cad Saude Publica 18: 413-420.

Turner KJ, Morley M, Atanassova N, Swanston ID, Sharpe RM (2000) Effect of chronic administration of an aromatase inhibitor to adult male rats on pituitary and testicular function and fertility. J Endocrinol 164: 225-238.

Voutilainen R, Miller WL (1986) Developmental expression of genes for the steroidogenic enzymes P450scc (20,22-desmolase), P450c17 (17α-

hydroxylase/17,20-lyase) and P450c21 (21-hydroxylase) in the human fetus. J Clin Endocrinol Metab 63: 1145-1150.

Walker W, Riseborough RW, Jarman WM, Lappe BW, Lappe JA, Tefft JA, de Long RL (1989) Identification of tris(chlorophenylmethanol) in blubber of harbour seals from Puget Sound. Chemosphere 18: 1799-1804.

West AP, Cooke BA (1991) Regulation of the truncation of luteinizing hormone receptors at the plasma membrane is different in rat and mouse Leydig cells. Endocrinology 128: 363-370.

Woodhouse AJ, Cooke GM (2004) Suppression of aromatase activity in vitro by PCBs 28 and 105 and Aroclor 1221. Toxicol Lett 152: 91-100.

Yoshimura H, Yamamoto H (1979) A novel route of excretion of 2,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in rats. Bull Environ Contam Toxicol 13: 681-688.

Young S, Parker PI, Ullrich A, Stabel S (1987) Down-regulation of protein kinase C is due to an increased rate of degradation. Biochem J 244: 775-779.

Zook DR, Buser HR, Bergqvist PA, Rappe C, Olsson A (1992) Detection of tris(4-chlorophenyl)methanol in ringed seal (Phoca hispida) from the Baltic Sea. Ambio 21: 557-560.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Steroidhormonsyntheseweg der Leydigzellen..... 7
Abbildung 2: Allgemeine Strukturformel PCB..... 13
Abbildung 3: Strukturformel PCB 126..... 14
Abbildung 4: Strukturformel TCPM..... 17
Abbildung 5: Strukturformel DDT..... 17
Abbildung 6: Wachstumskurve der R2C-Zellen..... 34
Abbildung 7: MTT-Assay..... 35
Abbildung 8: Östradiolsekretion nach Zugabe von Steroidpräkursoren..... 38
Abbildung 9: Östradiolsekretion nach Inkubation mit 4-OHA..... 40
Abbildung 10: Östradiolsekretion nach Inkubation mit Forskolin..... 43
Abbildung 11: Östradiolsekretion nach Inkubation mit H7..... 46
Abbildung 12: Östradiolsekretion nach Inkubation mit PDA..... 49
Abbildung 13: Östradiolsekretion nach Inkubation mit PMA..... 52
Abbildung 14: Östradiolsekretion nach Inkubation mit PCB..... 55
Abbildung 15: Östradiolsekretion nach Inkubation mit TCPM..... 58
Abbildung 16: Wechselwirkung PCB mit Ah-Rezeptor..... 73

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Basale Östradiol-, Progesteron- und Testosteronkonzentration..... 36
Tabelle 2: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener C-21-Vorstufen..... 36
Tabelle 3: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener C-19-Vorstufen..... 37
Tabelle 4: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener 4-OHA-Konzentrationen..... 39
Tabelle 5: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit 4-OHA..... 41
Tabelle 6: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener Forskolin-Konzentrationen..... 42
Tabelle 7: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit Forskolin..... 44
Tabelle 8: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener H7-Konzentrationen..... 45
Tabelle 9: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit H7..... 47
Tabelle 10: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener PDA-Konzentrationen..... 48
Tabelle 11: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit PDA..... 50
Tabelle 12: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener PMA-Konzentrationen..... 51
Tabelle 13: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit PMA..... 53
Tabelle 14: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener PCB-Konzentrationen..... 54
Tabelle 15: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit PCB..... 56
Tabelle 16: Östradiolkonzentrationen nach Zugabe verschiedener TCPM-Konzentrationen..... 57
Tabelle 17: Relative Zellvitalität nach Inkubation mit TCPM..... 59
Tabelle 18: Übersichtstabelle Stimulatoren und Inhibitoren..... 66

11 Abkürzungen

Abb	Abbildung(en)
Ah-Rezeptor	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor (Dioxin-Rezeptor)
ArKO	Aromatase-knockout Maus
ARNT	Aryl-Hydrocarbon-Rezeptor-Nuclear-Translocator
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
Aqua dest.	Aqua destillata (einfach destilliert)
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
bzw.	beziehungsweise
cAMP	cyclisches Adenosin-3',5'-monophosphat
CYPIA1	Cytochrom P450 IA1
DDT	Dichlor-diphenyl-trichloräthan
DES	Diethylstilbestrol
DHEA	Dihydroepiandrosteron
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure(-acid)
DRE	Dioxin-Responsive-Element
EIA	Enzyme Immunoassay
E1	Östron
E2	Östradiol
ER	Estrogenrezeptor
ERαKO	ERα knockout Maus
Et al.	et alii (und andere)
FCS	Fetal calf serum (Fetales Kälberserum)
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GnRH	Gonadotropin-Releasinghormon
H7	(1-(5-isquinolinylsulfonyl)-2 methyl-piperazin (Proteinkinase C-Inhibitor)
HCG	Humanes Choriongonadotropin
HS	Horse Serum (Pferdeserum)

HSP90	Heat-shock-protein 90
3β-HSD	3β-Hydroxysteroiddehydrogenase
17β-HSD	17β-Hydroxysteroiddehydrogenase
KM	Kulturmedium
l	Liter
LDL	low density lipoprotein
LH	Luteinisierendes Hormon
M	Mol
mg	Milligramm (10^{-3} g)
Min	Minuten
ml	Milliliter
mmol	Millimol
µg	Mikrogramm (10^{-6} g)
µl	Mikroliter (10^{-6} l)
µM	Mikromol (10^{-6} Mol)
mRNA	messenger Ribonucleinacid (Boten Ribonukleinsäure)
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium-bromid
ng	Nanogramm (10^{-9} g)
nm	Nanometer
nM	Nanomol
4-OHA	4-Hydroxyandrostendion (Aromatase-Inhibitor)
P450scc	Cytochrom P450-abhängige Cholesterin- Side-Chain-Cleavage-Enzymsystem
P45017α	Cytochrom P450-abhängige 17α- Hydroxylase/$C_{17,20}$-Lyase
PBS	Phosphate bufferd saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PCB 126	3,3´',4,4',5-Pentachlorobiphenyl
PCDD	Polychlorierte Dibenzo-p-dioxine
PDA	Phorbol-12,13-diacetat (Aromatase-Inductor)
PKA	Proteinkinase A

PKC	Proteinkinase C
PMA	Phorbol 12-myristate 13-acetat (Proteinkinase C-Aktivator)
ppb	Parts per billion (ng/g)
Prog.	Progesteron
Prom.	Promotorregion
SM	serumfreies Medium
StAR	steroidogenic acute regulatory protein
TCPM	Tris(4-chlorophenyl)methanol
ZNS	zentrales Nervensystem

12 Erklärung

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbstständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

13 Lebenslauf

Zur Person

Cornelia Elisabeth Droste
Angermunder Str. 82a
40489 Düsseldorf
geboren am 13.10.1970 in Wesel

Schulausbildung

08/1977 – 07/1981	Leegmeer Grundschule Emmerich
09/1981 – 05/1990	Hansa-Gymnasium Emmerich

Freiwilliges Soziales Jahr

09/1990 – 09/1991	Innere Abteilung des Evangelischen Waldkrankenhauses, Bonn, Bad Godesberg

Berufsausbildung

09/1991 – 03/1992	Aushilfstätigkeit als Pflegehelferin im Neurologischen Rehabilitationszentrum Bonn, Bad Godesberg
04/1992 – 04/1993	Ausbildung zur Krankenschwester an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

Hochschulausbildung

03/1993	Studium der Humanmedizin an der Justus-Liebig Universität Gießen
03/1995	Ärztliche Vorprüfung
03/1996	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09/1996 – 09/1997	Auslandsjahr an der Universität Bologna/Italien
03/1999	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/1999 – 09/2000	Praktisches Jahr in den Abteilungen - Inneren Medizin, Kreiskrankenhaus Lich - Chirurgie, Concord Hospital, Sydney/Australien - Chirurgie, Kreiskrankenhaus Lich

	- Anästhesie, Kantonsspital Liestal/Schweiz
12/2000	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Facharztausbildung

1/2001 – 6/2002	ÄiP im Institut für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Ev. Krankenhaus Mülheim
7/2002 – 5/2007	Assistenzärztin im Institut für Anästhesiologie, operative Intensivmedizin und Schmerztherapie, Ev. Krankenhaus Mülheim
3/07	Facharztprüfung zur Fachärztin für Anästhesiologie
Seit 5/07	Fachärztin im Evangelischen Krankenhaus Oberhausen

14 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der andrologischen Forschungsabteilung des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen.
Ich danke besonders Herrn Prof. Dr. Dr. W.-B. Schill, ehemaliger Direktor des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität, Gießen, für die Überlassung des Themas, die Betreuung sowie die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, der Arbeitsmaterialien und der Geräte.
Ich danke allen Mitarbeitern im andrologischen Forschungslabor für ihre Hilfe, Unterstützung und die kollegiale Arbeitsatmosphäre.
Herrn Dr. R.-H. Bödeker und Herrn W. Pabst vom Institut für Medizinische Statistik der Universität Gießen danke ich für ihre freundliche Beratung im Rahmen der statistischen Auswertung.
Für die intensive Betreuung während der Experimente sowie für kritische Anregungen und Ratschläge beim Verfassen dieser Arbeit bin ich Frau Dr. Sybille Pflieger-Bruss zu großem Dank verpflichtet.