

Diplomarbeit

**Xenoöstrogenexposition: ein neuer Faktor der
Pathogenese des Mammakarzinoms?**

eingereicht von

Adele Maria Mayr

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Universitätsklinik für Gynäkologie und Geburtshilfe

unter der Anleitung von

ao. Univ.-Prof. Dr. Olaf Reich

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 04.10.2018

Adele Maria Mayr eh

Danksagungen

Ich möchte mich an dieser Stelle zuerst bei ao. Univ.-Prof. Dr. Olaf Reich für die hervorragende fachliche Betreuung bedanken, die trotz seines überfüllten Terminkalenders stattgefunden und mir die Erstellung dieser Diplomarbeit sehr erleichtert hat.

Außerdem möchte ich mich bei meinen Eltern Margarete und Hans für die finanzielle und emotionale Unterstützung während des Studiums bedanken und bei allen, die sich bereit erklärt haben, diese Arbeit Korrektur zu lesen und mir durch ihr Feedback weitergeholfen haben, insbesondere bei Maria Anna Smolle und Lara Sabrina Bieler.

Zusammenfassung

Xenoöstrogene sind anthropogene, chemische Verbindungen mit östrogenartiger Wirkung. Sie können über verschiedene Mechanismen auf das humane endokrine System einwirken. Oft treten Wechselwirkungen der Stoffe mit körpereigenen Hormonrezeptoren auf. Der Einfluss von Xenoöstrogenen auf die Pathogenese des Mammakarzinoms ist unklar.

Methodik: Durchgeführt wurde ein systematischer Review publizierter Arbeiten zu Xenoöstrogenen und Mammakarzinom in PubMed mit dem Ziel, die derzeitige Evidenz zu diesem Thema darzustellen und Schlussfolgerungen für die Forschung zu ziehen.

Ergebnisse: Die derzeitige Evidenz zeigt: (i) Xenoöstrogene können, aber müssen nicht an Östrogenrezeptoren der weiblichen Brust binden, um eine östrogenartige Wirkung in dieser auszuüben. Sie können unter anderem zu einer ligand-unabhängigen Aktivierung des Östrogenrezeptors führen, den Östrogenmetabolismus beeinflussen, aber auch Östrogenrezeptor unabhängig wirken. Einige nehmen auch Einfluss auf den Progesteron-, den Androgen- und den Aryl hydrocarbon Rezeptor bzw. Rezeptorpathway. (ii) Wirkungen von Xenoöstrogenen auf die weibliche Brustdrüse könnten vom Zeitpunkt der Exposition abhängig sein. Vor allem während der pränatalen und peripubertären Mammogenese kann es zu einer durch Xenoöstrogene modifizierten Störung der normalen Brustentwicklung kommen, was später die Suszeptibilität gegenüber anderen Karzinogenen („second-hit“) verändern könnte. (iii) Durch die Umwelt kommt es nicht zur Exposition von Menschen mit einzelnen Xenoöstrogenen, sondern zur Exposition mit komplexen Gemischen aus verschiedenen Chemikalien. Wenig beforscht sind Wechselwirkungen von verschiedenen Xenoöstrogenen in Gemischen und wie bzw. ob sie die mamäre Karzinogenese beeinflussen. Binäre Gemische scheinen größtenteils additiv in vitro zu wirken. Bereits geringe Veränderungen in der Zusammensetzung von Gemischen können zu veränderten Effekten der jeweiligen Mischung führen.

Schlussfolgerung: Es gibt wissenschaftliche Evidenz, dass Exposition mit Xenoöstrogenen ein Faktor in der Pathogenese des Mammakarzinoms ist. Im Detail besteht jedoch nachhaltiger Forschungsbedarf. Geeignete Forschungsansätze mit Berücksichtigung zeitlicher und anderer Ko-Faktoren der Wirkung von Xenoöstrogenen auf die weibliche Brustdrüse, könnten zu neuen Erkenntnissen der Bedeutung dieser potentiellen exogenen Karzinogene führen. Themen zukünftiger Forschung sind unter anderem der Expositionszeitpunkt und die potentiellen Zeitfenster der erhöhten Suszeptibilität gegenüber Xenoöstrogenen in der Brustentwicklung. Des Weiteren die Interaktionen verschiedener Rezeptorpathways, über die Xenoöstrogene einzeln und in Gemischen agonistisch bzw.

antagonistisch wirken. Sowie der Einfluss dieser Interaktionen auf die Pathogenese des Mammakarzinoms.

Abstract

Xenoestrogens are anthropogenic compounds with estrogen-like effects. They influence the human endocrine system through different mechanisms and often interact with endogenous hormone receptors. It is unclear whether xenoestrogens influence the pathogenesis of breast cancer.

Methods: A systematic review of papers published on the subject of xenoestrogens and breast cancer was conducted on PubMed, with the goal to portray the current evidence in this field and to draw conclusions for further research.

Results: Current evidence shows: (i) To have an estrogen-like effect, xenoestrogens can but don't have to bind to the estrogen receptor. Among other things, they can activate the receptor through the ligand-independent pathway, influence the estrogen metabolism and can also have estrogen receptor independent effects. They can also bind or mediate effects through other receptors or receptor pathways like the androgen-, the aryl hydrocarbon-, or the progesterone receptor. (ii) The effect of xenoestrogens could depend on the timing of exposure. Especially during prenatal and peripubertal mammogenesis, a xenoestrogen-induced disruption of normal breast development could alter the breast's susceptibility towards chemical carcinogens ("second hit"). (iii) The environment does not expose humans to single xenoestrogens, but rather to complex mixtures of different chemicals. Research is still needed about how mixtures of xenoestrogens interact with each other and how or if they influence breast carcinogenesis. Binary mixtures seem to mostly exert additive estrogenic effects in vitro. Already small changes in the composition of a mixture can lead to different effects.

Conclusion: Scientific evidence shows that xenoestrogens are a factor that influences the pathogenesis of breast cancer, but further in detail research is still necessary. Dedicated research approaches that take timing of exposure and other co-factors of xenoestrogen impact on the female mammary glands into account could lead to new insights. Subjects of further research are among others timing of exposure and timeframes of heightened susceptibility towards xenoestrogens during mammogenesis. Furthermore, the interactions of different receptor pathways, which xenoestrogens alone or in mixtures influence through agonism or antagonism, and the significance of these interactions in breast cancer pathogenesis.

Inhaltsverzeichnis

Danksagungen	ii
Zusammenfassung	iii
Abstract.....	v
Inhaltsverzeichnis	vi
Abkürzungen	viii
Abbildungsverzeichnis	x
Tabellenverzeichnis	xi
1 Einleitung	1
1.1 Brustkrebs	1
1.2 Xenoöstrogene	3
1.3 Östrogen-abhängige Karzinogenese des Mammakarzinoms:.....	4
1.3.1.1 Östrogenrezeptor-abhängige Effekte.....	5
1.3.1.2 Östrogenrezeptor-unabhängige Effekte.....	9
1.4 Persistierende organische Schadstoffe	13
1.4.1 DDT und DDE.....	14
1.4.2 β -Hexachlorocyclohexan	16
1.4.3 Hexachlorbenzol	16
1.4.4 Dieldrin.....	16
1.4.5 Methoxychlor	17
1.4.6 Endosulfan	17
1.4.7 Chlordan	17
1.4.8 Polychlorierte Biphenyle	18
1.4.8.1 Aryl hydrocarbon Rezeptor	19
2 Material und Methoden	20
3 Ergebnisse – Resultate.....	22
3.1 DDT und DDE	22
3.1.1 o,p'-DDT	22
3.1.1.1 Bulletpoints:	26
3.1.2 p,p'-DDT	27
3.1.2.1 Bulletpoints	28
3.1.3 p,p'-DDE.....	28
3.1.3.1 Bulletpoints:	31
3.2 β -Hexachlorocyclohexan	32
3.2.1 Bulletpoints:	33
3.3 Dieldrin	34
3.3.1 Bulletpoints.....	35
3.4 Methoxychlor:.....	36
3.4.1 Bulletpoints.....	37
3.5 Chlordan:	37
3.5.1 Bulletpoints.....	38
3.6 Endosulfan	38
3.6.1 Bulletpoints.....	40
3.7 Hexachlorbenzol	40
3.7.1 Bulletpoints:	46
3.8 Polychlorierte Biphenyle	47
3.9 Nicht-dioxin-artige Polychlorierte Biphenyle.....	47
3.9.1.1 PCB 52 (2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl):	47

3.9.1.2	PCB 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl):.....	47
3.9.1.3	PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl):	48
3.9.1.4	PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl):	48
3.9.1.5	PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl):	50
3.9.1.6	Bulletpoints	51
3.10	Dioxin-artige Polychlorierte Biphenyle	52
3.10.1.1	PCB 77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl):	52
3.10.1.2	PCB 81 (3,4,4',5-Tetrachlorbiphenyl):.....	54
3.10.1.3	PCB 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl):.....	54
3.10.1.4	PCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl):.....	54
3.10.1.5	PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl):	56
3.10.1.6	Bulletpoints	57
3.11	Gemische.....	58
4	Diskussion	67
4.1	Östrogen-abhängige Karzinogenese des Mammakarzinoms	67
4.2	Xenoöstrogene	69
4.3	Conclusio	80
5	Literaturverzeichnis	82

Abkürzungen

7,12-Dimethylbenzo[<i>a</i>]anthracen	DMBA
Activating protein 1	AP-1
Aktivierungs-Funktion-Domäne 1	AF-1
Aktivierungs-Funktion-Domäne 2	AF-2
Aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator	ARNT
Aryl hydrocarbon Rezeptor	AhR
Breast Cancer 1	BRCA1
Breast Cancer 2	BRCA2
Catechol-O-Methyltransferase	COMT
Checkpoint kinase 2	CHEK2
Chloramphenicol-Acetyltransferase	CAT
Cyclin-dependent-Kinase 2	CDK2
Cyclooxygenase-2	COX-2
Dichlorodiphenyltrichloroethan	DDT
Dichlordiphenyldichlorethen	DDE
Dihydrotestosteron	DHT
Dioxin-responsive element	DER
DNS-bindenden-Domäne	DBD
Estrogen receptor locus 1	ESR1
Estrogen receptor locus 2	ESR2
Estrogen response Elements	ERE
Epidermal growth factor receptor	EGFR
Extracellular-signal regulated kinase 1	Erk1
Extracellular-signal regulated kinase 2	Erk2
G-protein-coupled estrogen receptor	GPER
Gap junctional intercellular communication	GJIC
Hexachlorbenzol	HCB
Human epidermal growth factor receptor 2	HER2
Human microvascular endothel cells	HMEC
Insulin-like growth factors	IGF
Insulin-like growth Factor-I Receptor	IGF-IR
Insulin receptor substrate	IRS
International Agency for Research on Cancer	IARC
Körpergewicht	KG
Mitogen-activated protein kinase	MAPK
N-Methyl-N-nitrosourea	MNU
Persistierende organische Schadstoffe	POPS
Poly-ADP-Ribose-Polymerase	PARP

Progesteronrezeptor	PR
Proteinkinase A	PKA
Reaktive Sauerstoff Spezies	ROS
Retinoblastoma protein	pRb105
Specificity protein 1	SP-1
Tumor Protein 53	TP53
Vascular Endothelial Growth Factor	VEGF
Weltgesundheitsorganisation	WHO
Östradiol	Ö ₂
Östron	Ö ₁
Östrogenrezeptor	ÖR
Östrogenrezeptor α	ÖR- α
Östrogenrezeptor β	ÖR- β

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1. Globale Inzidenzverteilung des Mammakarzinoms.	1
Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Brustkrebsinzidenz in Europa.....	2
Abb. 3. ÖR-abhängige und ÖR-unabhängige Karzinogenese von Brustkrebs.....	5
Abb. 4. Ligand-abhängige und ligand-unabhängige Aktivierung der ÖRs.....	8
Abb. 5. Metabolismus/Biotransformation von Ö ₂ und Ö ₁ :.....	11
Abb. 6. Reaktion eines Östradiol-3,4-quinons mit der DNS:.....	12
Abb. 7. DDT in der Muttermilch im weltweiten Vergleich	15
Abb. 8. AhR-Pathway.....	19
Abb. 9. p,p'-DDE beeinflusst Crosstalk zwischen zwei Hormonrezeptoren.....	29
Abb. 10. Zellzyklus Modulation durch HCB in MCF-7 Zellen:	41
Abb. 11. HCB induzierte Migration und Invasion	46

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Literaturrecherche.....	20
------------------------------------	----

1 Einleitung

1.1 Brustkrebs

25 % aller Krebserkrankungen sind Mammakarzinome. Brustkrebs ist die häufigste Krebserkrankung der Frau und die zweithäufigste Krebserkrankung überhaupt. Weltweit erkrankten 2012 geschätzt 1,7 Millionen Frauen neu an Brustkrebs und ca. 521.900 Frauen verstarben an einem Mammakarzinom. Die Inzidenzraten sind in Westeuropa, Nordeuropa, Nordamerika, Australien und Neuseeland generell hoch, während sie in Afrika und Asien größtenteils gering sind (Abb. 1) (1).

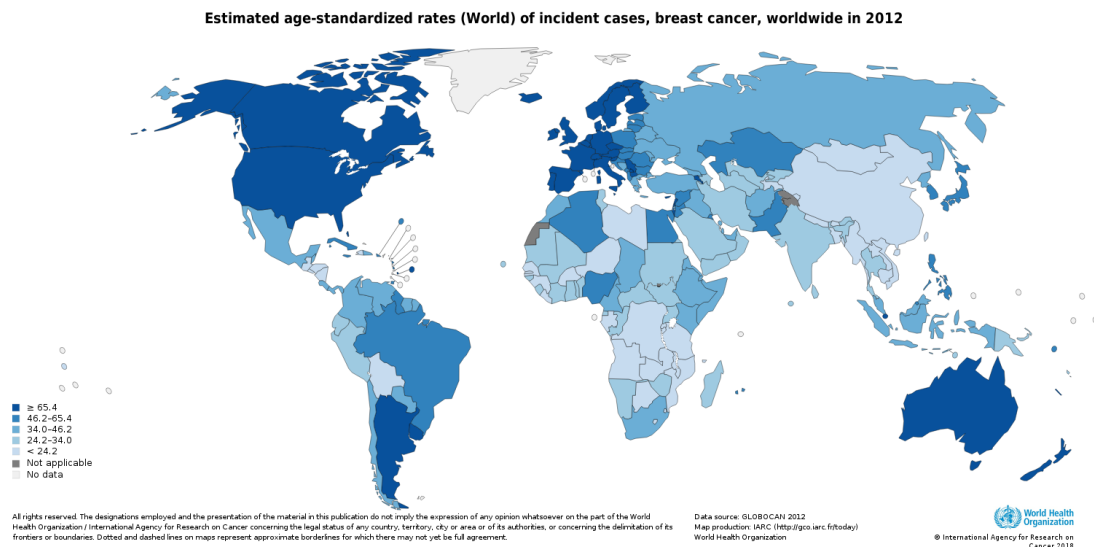


Abb. 1. Globale Inzidenzverteilung des Mammakarzinoms.

Altersstandardisierte Inzidenzraten des Mammakarzinoms im weltweiten Vergleich 2012 (2).

In den letzten 40-50 Jahren kam es zu einem Anstieg von hormonassoziierten Krebserkrankungen wie Prostata-, Hoden-, Eierstock-, Schilddrüsen- und Brustkrebs (3). Zwischen den 1970er- und den 1990er-Jahren stieg die Brustkrebsinzidenz in westlichen Nationen um ca. 30 %. Teilweise könnte dieser Anstieg durch Implementation der Mammographie als Screeningverfahren und durch die Verwendung von Hormonersatztherapien bei postmenopausalen Frauen erklärt werden (4–6). So kam es in den Vereinigten Staaten nach Reduktion der Verwendung von Hormonersatztherapien in den frühen 2000er-Jahren zu einem Abfall der Brustkrebsinzidenz (7).

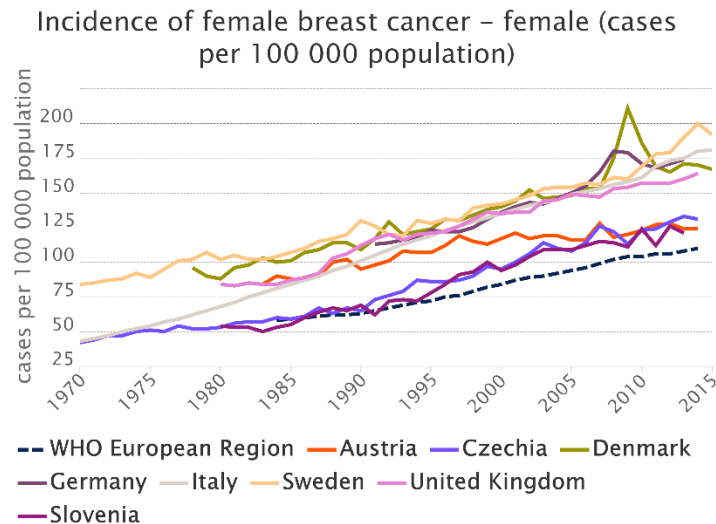


Abb. 2. Zeitlicher Verlauf der Brustkrebsinzidenz in Europa

Inzidenz von Brustkrebs von Frauen (Fälle/100.000) in den Jahren 1970 bis 2015 in verschiedenen europäischen Ländern und der europäischen Region der Weltgesundheitsorganisation (WHO) (8).

Mammakarzinome sind klonale Proliferationen, die aus Zellen mit multiplen genetischen Aberrationen entstehen. Zur Entwicklung von Brustkrebs direkt beitragende Faktoren können in die Kategorien genetisch, hormonell und umweltbedingt eingeteilt werden. 12 % aller Mammakarzinome sind hereditär und entstehen durch ein vererbtes, identifizierbares Gen oder Gene, welche die Suszeptibilität für Brustkrebs erhöhen. Am bedeutendsten sind hier Mutationen der Tumorsuppressorgene „Breast Cancer 1“ (BRCA1), „Breast Cancer 2“ (BRCA2), „Checkpoint Kinase 2“ (CHEK2) und „Tumor Protein 53“ (TP53) (9).

Der Großteil der Mammakarzinome tritt sporadisch (also zufällig) auf. Hierbei stehen alle wichtigen Risikofaktoren in Zusammenhang mit der Hormonexposition (9). Unterzieht sich eine Frau vor dem 40. Lebensjahr einer bilateralen Oophorektomie, sinkt ihr Risiko an Brustkrebs zu erkranken um 75 % (10). Mit steigenden Konzentrationen an endogenen Östrogenen im Serum steigt das Risiko postmenopausaler Frauen an einem Mammakarzinom zu erkranken (11,12). Auch eine postmenopausale Hormonersatztherapie mit östrogenhaltigen Monopräparaten und vor allem Kombinationspräparaten aus Östrogen und Progestin, führt zu einer erhöhten Brustkrebsinzidenz (5,6). Mit steigendem Body-Mass-Index steigt auch das Brustkrebsrisiko der postmenopausalen Frau. Dieser Risikoanstieg ist mit einer erhöhten Konzentration an bioverfügbarem Östradiol (Ö_2) assoziiert (13). Höhere Östrogenkonzentrationen modifizieren vermutlich auch das Brustkrebsrisiko von prämenopausalen Frauen (14,15). Sowohl eine frühe Menarche, als auch eine späte Menopause erhöhen die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken (6). Frauen, die lange stillen sowie Frauen, die früh ein Kind bekommen zeigen hingegen ein

geringeres Risiko (6,16). So weisen Nullipara im Vergleich zu einer Frau, die im Alter von 20 Jahren ihr erstes Kind bekam, zum Zeitpunkt der Menopause ein 20 % höheres Risiko ein Mammakarzinom zu entwickeln auf (6). Östrogen wirkt als Promoter des Mammakarzinoms (9).

Durch die Hormonexposition wird das Wachstum der Brust während Schwangerschaft und Pubertät stimuliert, was zu einer Zunahme von Zellen, aus denen ein Mammakarzinom entstehen könnte, führt. Auch während der Menstruationszyklen kommt es zu einer hormoninduzierten Proliferation von Brustepithelzellen, was eine Akkumulation von DNS-Schäden nach sich ziehen kann. Im zweiten Teil des Zyklus könnte es durch fehlerhafte DNS-Reparatur zur Fixierung dieser Mutationen im Genom kommen. Hormone können das Wachstum von malignen oder prämaligen Zellen stimulieren sobald diese vorhanden sind. Zudem können sie die Proliferation normaler Stromazellen fördern, die zur Tumorentwicklung beitragen bzw. diese begünstigen könnten (9).

Das Risiko könnte zudem durch Lebensstil-, Umwelt- und demographische Faktoren modifiziert werden, bis dato konnten aber keine klaren Assoziationen aufgezeigt werden (17). Neben endogenen Östrogenen und anderen etablierten Risikofaktoren könnten auch Xenoöstrogene zu den Risikofaktoren für Brustkrebs gehören (18). Davon leitet sich die Forschungsfrage dieser Diplomarbeit ab. Sind Xenoöstrogene ein Faktor in der Pathogenese des Mammakarzinoms?

1.2 Xenoöstrogene

Xenoöstrogene fallen unter den Überbegriff der endokrinen Disruptoren, für die es keine einheitliche Definition gibt (19).

- 1) Die „**U.S. Environmental Protection Agency**“ definiert endokrine Disruptoren als exogene Wirkstoffe, die mit der Synthese, der Sekretion, dem Transport, dem Metabolismus, der Bindungsaktion oder der Elimination von natürlichen/ körpereigenen, im Blut zirkulierenden Hormonen, die für Homöostase, Reproduktion und Entwicklung verantwortlich sind, interferieren (20).
- 2) Die **Europäische Union** und die **WHO** definieren endokrine Disruptoren als Substanzen oder Substanzgemische, die die Funktion(en) des Endokrinen Systems verändern und als Konsequenz gesundheitsschädliche Auswirkungen auf einen intakten Organismus, dessen Nachkommen oder (Sub)Populationen haben (3,21).

- 3) Die „**Endocrine Society**“ definiert endokrine Disruptoren als exogene Chemikalien oder Gemisch von Chemikalien, die mit jedwedem Aspekt von hormoneller Wirkung interferieren (19).

Ziel der Diplomarbeit ist es, den Erkenntnisstand zu Xenööstrogen in Verbindung mit dem Mammakarzinom darzulegen und dazugehörige Thesen zu entwickeln. Diese Arbeit wird sich mit Dichlorodiphenyltrichloroethan (DDT) (genauer: o,p'-DDT und p,p'-DDT), Dichlordiphenyldichlorethen (DDE) (genauer: p,p'-DDE), β -Hexachlorocyclohexan (β -HCH), Hexachlorbenzol (HCB), Dieldrin, Methoxychlor, Endosulfan, Chlordan und einigen Polychlorierten Biphenylen (PCB(s)) (genauer: IUPAC Nr. 28, 52, 77, 81, 101, 105, 114, 118, 123, 126, 138, 153, 156, 157, 167, 169, 180 und 189) und ihrem Einfluss auf die Pathogenese des Mammakarzinoms beschäftigen.

1.3 Östrogen-abhängige Karzinogenese des Mammakarzinoms:

Die östrogen-abhängige Karzinogenese von Brustkrebs kann in Östrogenrezeptor (ÖR)-abhängig und ÖR-unabhängig eingeteilt werden (22).

Im Körper des Menschen zirkulieren hauptsächlich Ö₂, Östron (Ö₁) und Östriol. Dabei ist Ö₂ biologisch am aktivsten. Alle drei sind Steriodhormone, die aus Cholesterol gebildet werden. Das vorherrschende Östrogen postmenopausaler Frauen ist Ö₁, das in peripheren Geweben synthetisiert wird, während bei prämenopausalen Frauen das in den Ovarien produziertes Ö₂ prädominant ist (23). Die normale Brust exprimiert wie andere humane Gewebe ÖRs, über die Ö₂ Proliferation induziert (22,24). Durch die Steigerung der Zellteilung erhöht sich gleichzeitig die Fehlerwahrscheinlichkeit bei der DNS-Replikation. Durch die reduzierte Zeit für die DNS-Reparatur könnten diese Fehler, z.B. DNS-Addukte oder Strangbrüche, als Mutationen in der DNS fixiert und an Tochterzellen weitergegeben werden. Die gesteigerte Zellteilung könnte eine Gemeinsamkeit in der Pathogenese vieler Krebsarten sein. Sie ist notwendig, um z.B. DNS-Addukte in Mutationen umzuwandeln. Die Zellteilungsrate scheint in Zusammenhang mit der Menge des nicht reparierten DNS-Schadens zu stehen (22,25). Durch die Biotransformation von Östrogenen entstehen Metaboliten und reaktive Sauerstoff-Spezies (ROS), die DNS-Schäden und Zellteilung nach sich ziehen können. So könnten ÖR-unabhängige Mechanismen zur Karzinogenese des Mammakarzinoms beitragen (22,26)

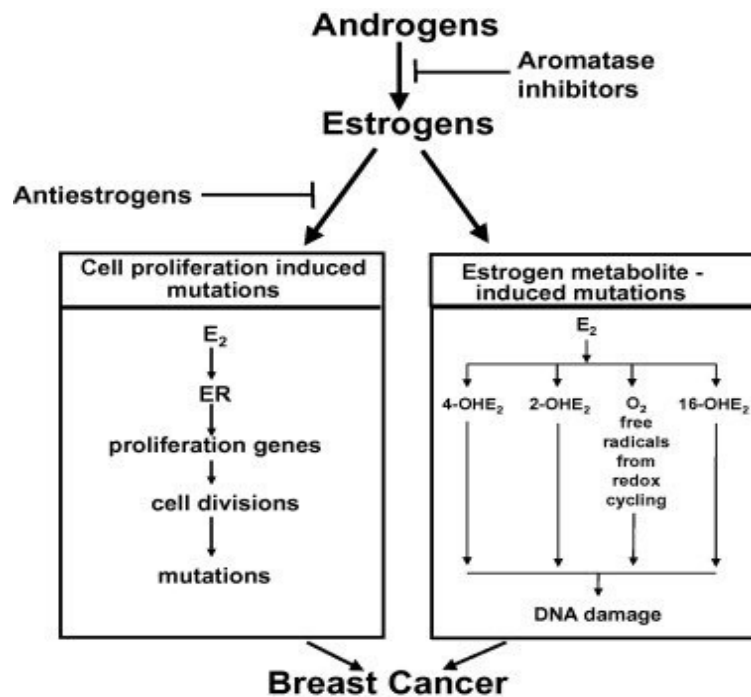


Abb. 3. ÖR-abhängige und ÖR-unabhängige Karzinogenese von Brustkrebs.

(Reproduziert von (27) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) Ein Überblick über die potentiellen Mechanismen, die zur Entstehung von Mammakarzinomen führen könnten (22).

1.3.1.1 Östrogenrezeptor-abhängige Effekte

Östrogene binden in Zielgeweben an die zwei Subtypen des Östrogenrezeptors. Sie werden Östrogenrezeptor α (ÖR- α) und Östrogenrezeptor β (ÖR- β) genannt (28,29). Das Gen „estrogen receptor locus 1“ (ESR1), das für den ÖR- α kodiert, liegt auf Chromosom 6q25.1, während der „estrogen receptor locus 2“ (ESR2) für den ÖR β auf Chromosom 14q22–24 zu finden ist. Nach der Translation sind 47 % von ÖR- β homolog zu ÖR- α konvertiert, wobei die Unterschiede je nach Domäne groß sind. 97 % der DNS-bindenden-Domäne, aber nur 59,1 % der Ligand-bindenden-Domäne sind homolog zueinander (30,31). Darauf kann die unterschiedliche Affinität verschiedener Liganden zurückgeführt werden (32). Beide Rezeptoren sind, obwohl sie Steroidrezeptoren sind, fähig Nicht-Steroide zu binden. Dies wird durch die Größe der Bindungsstelle erklärt, die ca. zweimal so groß wie O_2 selbst ist (450 \AA^3 vs. 245 \AA^3) (33). Unter anderem wird es so auch möglich Xenoöstrogene zu binden (34). O_2 bindet mit ähnlicher Affinität an beide Rezeptoren, Xeno- und Phytoöstrogene hingegen binden mit unterschiedlicher Affinität (32).

Der ÖR- α und - β gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Beide Rezeptoren bestehen aus einer multifunktionalen Ligand-bindenden-Domäne, sowie aus einer DNS-bindenden-Domäne. Diese beiden Domänen sind konserviert. Die Aktivierung der

Transkription läuft über die sogenannte Aktivierungs-Funktions-Domäne (AF). Die AF-1 ist konstitutiv aktiv, während die AF-2 ligand-abhängig aktiv ist (35).

Um die Funktion von ÖR- α und ÖR- β besser zu verstehen, wurden „knock-out“ Mäuse entwickelt. Bei ÖR- α „knock-out“ Mäusen ist die normale Brustentwicklung gestört. Ihr Ductussystem entwickelt sich nicht richtig. Die Ductale-Elongation bleibt präpubertär, es werden keine Terminal-Ductus-Lobulus-Einheiten gebildet (36). Beurteilt mittels Laktation oder Histologie konnten Krege et al. bei ÖR- β „knock-out“ Mäusen keine Störung der Brustentwicklung feststellen (37). Die Brust von ÖR- β „knock-out“ Mäusen entwickelt sich bis zur Pubertät normal. Sie scheint sich aber während der Schwangerschaft und Laktation nicht vollständig auszudifferenzieren. Augenscheinlich funktionelles und differenziertes Gewebe exprimiert den Proliferationsmarker Ki67. Das Brustgewebe von ÖR- β „knock-out“ Mäusen scheint weniger differenziert zu sein als das des Wildtyps (38).

Der ÖR- α scheint zur Karzinogenese hauptsächlich durch Stimulation der Zellteilung beizutragen (39). Bocchinfuso et al. konnten anhand von ÖR- α „knock-out“ Mäusen, die das Wnt-1 Onkogen exprimieren, zeigen, dass die Abwesenheit von ÖR- α die Tumorbildung im Brustgewebe von Mäusen verzögerte (40). ÖR- α führt durch vermehrte Expression von Cyclin D1 und MYC zu Zellproliferation (41–43). Cyclin D1 trägt zur Überwindung des G1/S Checkpoints bei. MYC führt zu Zellveränderungen, die Zellwachstum und anabolen Metabolismus in der Zelle fördern (44).

Im Gegensatz zum ÖR- α wirkt der ÖR- β antiproliferativ und pro-apoptotisch (32). Der ÖR- β hemmt die ÖR- α induzierte Zellteilung in östrogen-kompetenten Brustkrebszellen (46). In Brustkrebszellen (MCF-7) und Mammaepithelzellen (MCF-10A) führt ein „Knock-Down“ von ÖR- β zur Proliferation der Zellen (47). ÖR- β Aktivierung hemmt das Zellwachstum, reguliert die Expression von p53, führt zur Downregulation von MYC und verschiedener Gene, die an der Zellzyklus-Progression beteiligt sind (46–49).

Die Proliferation von Zellen in Folge einer Ö₂ Einwirkung könnte das Ergebnis einer Balance zwischen ÖR- α und ÖR- β sein (35). Die Effekte von Ö₂ werden durch den ÖR- α als primären Subtyp mediiert. Der ÖR- β scheint eine wichtige Rolle in der Kontrolle der mammotrophen Effekte des ÖR- α zu spielen (50).

Während der Tumorprogression des invasiven Mammakarzinoms kommt es im Vergleich zum physiologischen Brustgewebe zu einer Abnahme der ÖR- β Expression (51). Die

gesunde Brustdrüse exprimiert mehr ÖR- β als ÖR- α . Ca. 10 % der Epithelzellen exprimieren den ÖR- α und 80 % den ÖR- β . Bereits beim duktalem Carcinoma in situ (DCIS) kommt es zu einer deutlichen Zunahme der ÖR- α und Abnahme der ÖR- β Expression. Beim invasiven duktalem Karzinom sind nur noch 10 % der Zellen ÖR- β -positiv (52).

Es gibt verschiedene Wege über welche Östrogene in den Zellstoffwechsel eingreifen können (Abb. 4).

1. Ligand-abhängig

- Beim **klassischen Mechanismus** binden Liganden an ÖRs. Das Binden eines Liganden induziert ligand-spezifische Konformationsveränderungen des Proteins. Diese Ligand-Rezeptor-Komplexe dimerisieren und binden an sogenannte „Estrogen response Elements“ (ERE) in den Promotern von Zielgenen der DNS. Diese rekrutieren wiederum Ko-Aktivatoren oder Ko-Repressoren (je nach Form der Ligand-Rezeptor-Komplexe), bevor es schlussendlich zur Transkription kommt (39). Die Ligand-Rezeptor-Komplexe dimerisieren als Homodimere (ÖR- α + ÖR- α , ÖR- β + ÖR- β) oder Heterodimere (ÖR- α + ÖR- β) (53). Exprimiert eine Zelle ÖR- β und ÖR- α gleichzeitig, kommt es durch die Bildung von Heterodimeren zur Regulation von Genen, die zu einem großen Teil nicht von Homodimeren reguliert werden (54,55). Die Ligand-Rezeptor Komplexe können auch **indirekt (auch Tethering genannt) oder „Estrogen response Element“ unabhängig** an die DNS binden. Hier binden die Dimere nicht direkt an die DNS, sondern über Transkriptionsfaktoren wie „activating protein 1“ (AP-1) oder „specificity protein 1“ (SP-1). Damit können auch Gene, die kein ERE in ihrem Promoter haben, beeinflusst werden (35,39).
- **Nicht-genomische Signaltransduktion:** Die Reaktion der Zelle bei den obigen beiden Signalwegen erfolgt durch Gentranskription, also langsam. Zellen reagieren aber auch innerhalb von Minuten auf Östrogene, d.h. nicht-genomisch (39). Das könnte durch ÖR Subtypen, die an der Zellmembran bzw. im Cytoplasma liegen, geschehen, möglicherweise aber auch durch den „G-protein-coupled estrogen receptor“ (GPER) vermittelt werden (vormals G-Protein gekoppelter Rezeptor 30) (56,57). Zu den schnellen Effekten von Ö₂ über den ÖR- α gehören die Aktivierung der „endothelial nitrogen oxide synthase“ (eNOS), des „insulin-like growth factor-I receptors“ (IGF-IR), der „extracellular-signal regulated kinases“ 1 und 2 (Erk1 und

Erk2), der „mitogen-activated protein kinase“ (MAPK), der „phosphoinositide 3-kinase“ PI3K und die Translokation von ÖR- α an die Zellmembran (56,58–60).

2. Ligand-unabhängig

Durch die Aktivierung des „epidermal growth factor receptor“ (EGFR) oder des „insulin-like growth factors“ (IGF) kommt es zur Aktivierung/Phosphorylierung des ÖR ohne Liganden über den EGFR/MAPK-Pathway (61,62).

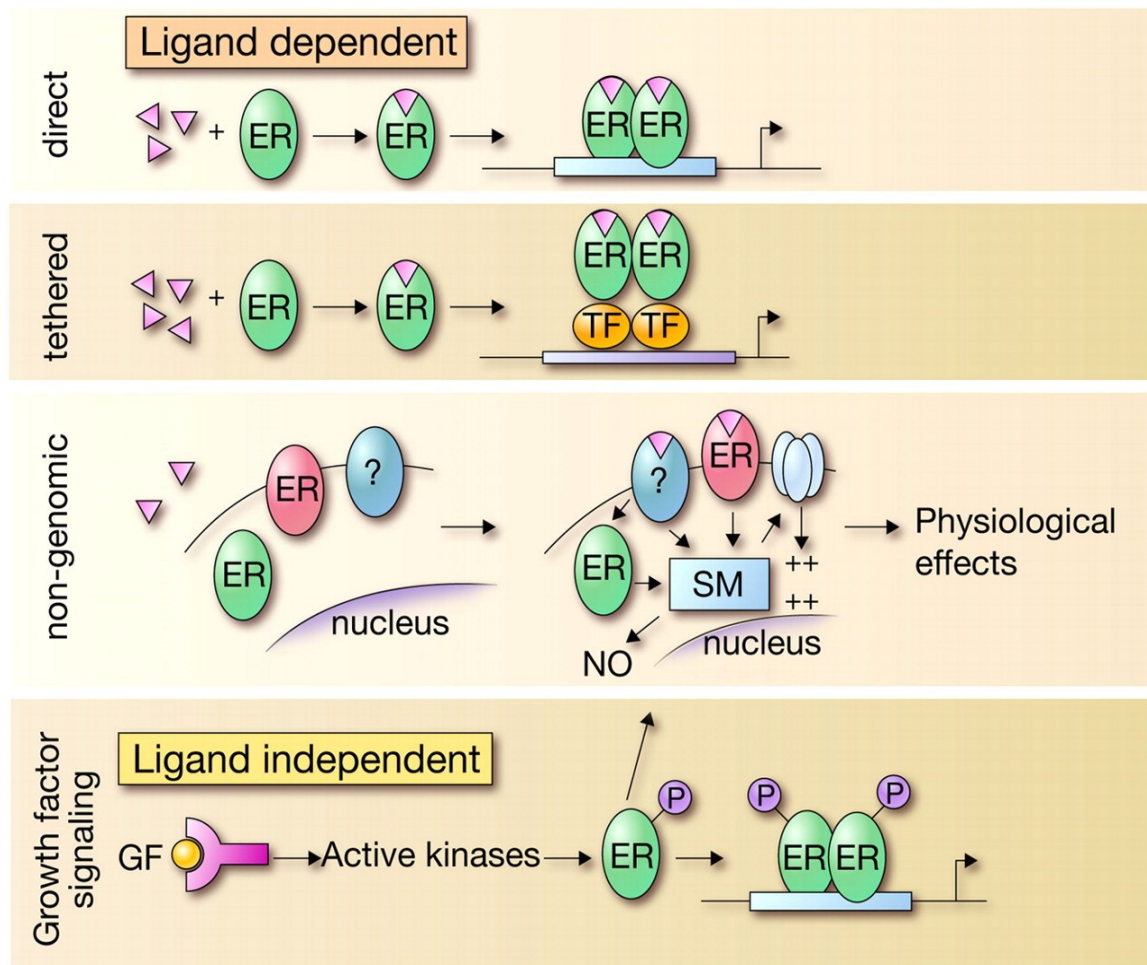


Abb. 4. Ligand-abhängige und ligand-unabhängige Aktivierung der ÖRs

(Reproduziert von (35) mit freundlicher Genehmigung von The American Physiological Society, Copyright 2007) Beim direkten oder klassischen Pathway werden Östrogenrezeptoren (hier ER) durch Liganden aktiviert und binden direkt an die DNS. Beim „tethered Pathway“ binden die ligand-aktivierten ERs über Transkriptionsfaktoren an die DNS. Es kommt also zur indirekten Bindung der DNS. Der nicht-genomische Pathway wird noch stärker als die restlichen beforscht. Dabei kommt es schlussendlich zu schnellen Veränderungen in der Zelle ohne die Gentranskription zu involvieren. Beim ligand-unabhängigen Pathway kommt es zur Phosphorylierung des ÖR durch aktivierte Kinasen und dadurch zu Dimerisierung und Transkription (35).

Neben dem ÖR- α und - β existiert noch ein dritter Rezeptor, an den Ö₂ bindet, der sogenannte „G-protein-coupled estrogen receptor“ (GPER) (63). Die schnellen nicht-genomischen Signale von Ö₂ könnten durch membranständige ÖRs oder durch den GPER vermittelt werden (56,57,64). Durch die Aktivierung des GPER kommt es zu Signaling und über eine Transaktivierung des EGFR zur Aktivierung der PI3K/Akt- und MAPK-Pathways, was schnelle nicht-genomische Effekte oder Gentranskription zur Folge haben kann. Die Regulation der Transkription durch Ö₂ könnte durch Aktivierung von ÖRs oder Transkriptionsfaktoren, die mit oder ohne Interaktion mit ÖRs an die Promoter der Zielgene binden, geschehen (57,64). Verschiedene Xenoöstrogene, u.a. mehrere DDT Metaboliten und Methoxychlor, binden an den GPER (65).

1.3.1.2 Östrogenrezeptor-unabhängige Effekte

Vermutlich werden die ÖR-unabhängigen Effekte von Östrogen in der Karzinogenese von Brustkrebs durch Östrogenmetaboliten verursacht (23). So konnte Ö₂ in benignen ÖR-negativen MCF-10F Brustzellen maligne Transformation induzieren (66). Werden ERKO/Wnt-1 Mäusen (ÖR- α „knock-out“ Mäuse, die das Wnt-1 Onkogen exprimieren) kastriert und somit das körpereigene Ö₂ reduziert, kommt es im Vergleich zu nicht kastrierten Kontrollen zu einer reduzierten Inzidenz und einer verlängerten Latenz der Tumorbildung. Nach Behandlung mit Ö₂ entsprachen Inzidenzraten denen der Kontrollen. Das zeigt, dass ÖR-unabhängige Effekte die Entstehung von Brusttumoren beeinflussen können (67,68).

Östrogene werden im Körper und im Brustgewebe in wasserlösliche Metaboliten umgewandelt, die im Urin bzw. Stuhl ausgeschieden werden. In einem ersten Schritt (Phase I der Biotransformation) kommt es zu oxidativer Metabolisierung, größtenteils Hydroxylierungen. In Phase II der Biotransformation kommt es zur Kopplung dieser Produkte der oxidativen Metabolisierung mit Glukuronsäure (Glukuronidierung), Schwefelsäure (Sulfatierung) bzw. zur O-Methylierung (26). Ö₁ und Ö₂ werden durch Phase I Enzyme der Biotransformation metabolisiert (hydroxyliert). Dazu gehören unter anderem CYP3A4, CYP1A1, CYP1B1, CYP1A2 (22,23). Drei verschiedene Pathways stehen dabei miteinander in Konkurrenz: der 2-Hydroxylierungspathway, der 4-Hydroxylierungspathway und der 16-Hydroxylierungspathway. Dabei entstehen Catecholöstrogene (2- bzw. 4-Hydroxyöstrogene) und 16 α -Hydroxyöstron (23). CYP1B1 hydroxyliert Ö₁ und Ö₂ fast ausschließlich an der 4-Position und bildet 4-Hydroxyöstron und 4-Hydroxyöstradiol.

CYP1A1 hingegen katalysiert die Bildung von 2-Hydroxyöstron und 2-Hydroxyöstradiol (69). Über die Catechol-O-Methyltransferase (COMT) werden Catecholöstrogene weiter O-methyliert. Diese O-Methylierung gehört zu den Phase II Reaktionen der Biotransformation. Die Produkte dieser Reaktion sind nicht-toxisch (70). Statt über die COMT methyliert zu werden, kann weitere oxidative Metabolisierung zur Bildung von Chinonen führen, nämlich $\ddot{O}_1(\ddot{O}_2)$ -2,3-Chinon aus dem 2-Hydroxylierungspfad und $\ddot{O}_1(\ddot{O}_2)$ -3,4-Chinon aus dem 4-Hydroxylierungspfad. Hierbei können besonders $\ddot{O}_1(\ddot{O}_2)$ -3,4-Chinone DNS-Schaden verursachen, während $\ddot{O}_1(\ddot{O}_2)$ -2,3-Chinone stabiler zu sein scheinen (Abb. 5) (22). Durch Metabolisierung von \ddot{O}_1 -3,4-Chinonen kommt es zur Bildung von ROS in menschlichen Zellen (71). Über CYP450 Reduktasen können die 2,3- bzw. 3,4-Chinone zu Semichinonen und Katohecholöstrogenen reduziert werden. Dabei könnte oxidativer DNS Schaden durch ROS und ein Redox-Zyklus entstehen. Auch dieser Mechanismus könnte zur Karzinogenese beitragen (Abb. 5) (70).

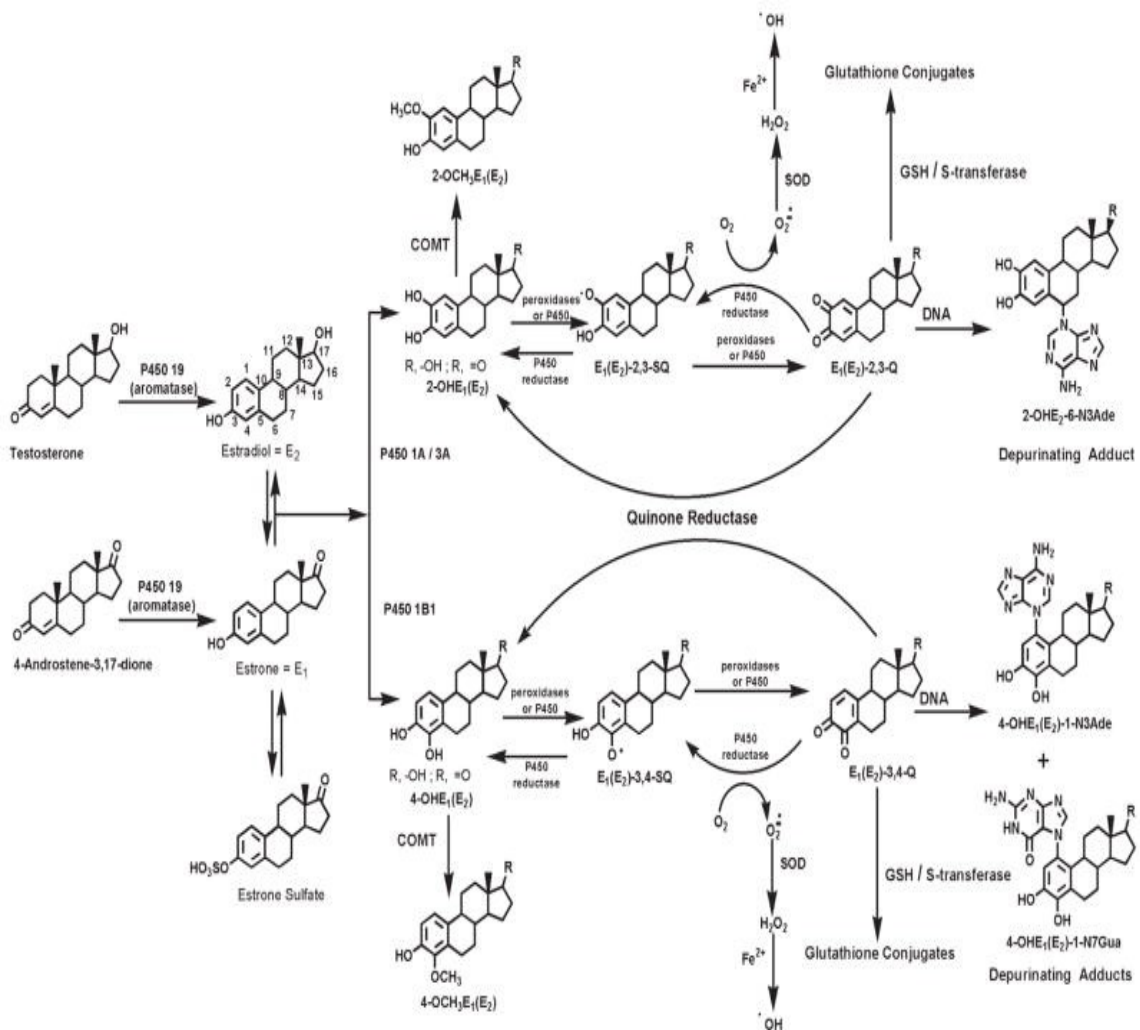


Abb. 5. Metabolismus/Biotransformation von Ö₂ und Ö₁:

(Reproduziert von (72) mit freundlicher Genehmigung von © 2007, Wiley-Liss, Inc.) Umwandlung von Östradiol (E₂) und Östron (E₁) über CYP Enzyme in Catecholöstrogene (2-OHE₁(E₂), 4-OHE₁(E₂)). Diese Catecholöstrogene können entweder über die COMT methyliert/entgiftet werden (2-OCH₃E₁(E₂) bzw. 4-OCH₃E₁(E₂)) oder durch weitere oxidative Metabolisierung in Chinone umgewandelt werden (E₁(E₂)-2,3-Q bzw. E₁(E₂)-3,4-Q). Diese Chinone können wiederum depurinierende DNS-Addukte mit Adenin und Guanin bilden. Außerdem zeigt dieses Bild deaktivierende Pathways. Die Chinone werden über die Glutathion-S-Transferase konjugiert. Die Catecholderivate werden über die COMT methyliert, wodurch sie nicht mehr in der Lage sind Schaden anzurichten. Ein Shift in dieser Balance könnte zu DNS-Schaden und damit zu Brustkrebs führen (72).

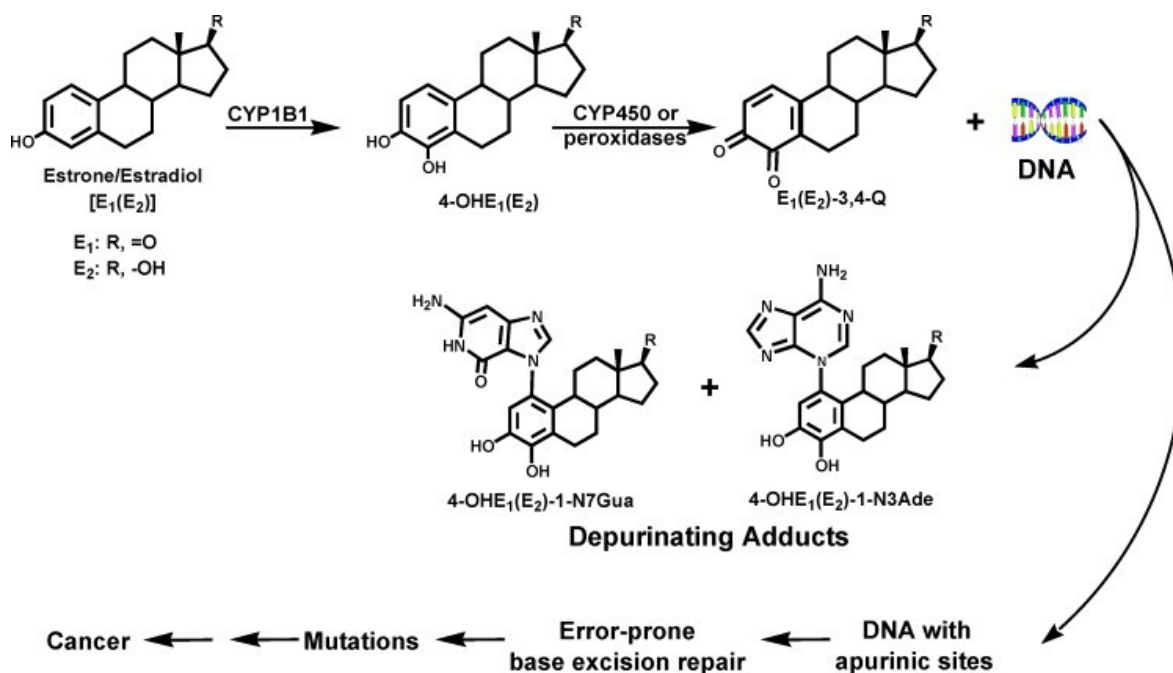


Abb. 6. Reaktion eines Östradiol-3,4-quinons mit der DNS:

(Reproduziert von (73) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) Biotransformation von Ö₁ und Ö₂ (hier E₁ und E₂) durch CYP1B1 in 4-Catecholöstrogen und anschließend in ein Ö₁(Ö₂)-3,4-Chinon (hier E₁(E₂)-3,4-Q), das mit der DNS reagiert. In Folge der Reaktion entstehen depurinierende DNS-Addukte. Es kann es zu fehlerhaftem Repair der depurinierten Stelle und in Folge dessen zu Punktmutationen kommen, die zur Entstehung eines Malignoms führen könnten (22,69).

Bei der 16α-Hydroxylierung entstehen 16α-Hydroxyöstron und 16α-Hydroxyöstradiol (74). 16α-Hydroxyöstron bindet an den ÖR (75). Behandelt man Epithelzellen der Mamma der Maus mit 16α-Hydroxyöstron, kommt es zu verankerungs-unabhängigem Wachstum und ungeplanter DNS-Synthese (76). 4-Hydroxyöstradiol und 16α-Hydroxyöstron wirken in MFC-7 Brustkrebszellen anti-apoptotisch und induzieren Proliferation (77).

Sampson et al. konnten anhand gesammelten Urins oder Serumproben von 1.298 Brustkrebsfällen und 1.524 Kontrollen prospektiv einen Zusammenhang zwischen endogenem Östrogenmetabolismus und Brustkrebsrisiko aufzeigen. Bei gegebener totaler Östrogenkonzentration waren höhere Konzentrationen an Metaboliten des 2-Hydroxylierungspaths mit einem signifikant geringeren Brustkrebsrisiko assoziiert (OR 90. vs. 10. Perzentile = 0,61; 95 % CI, 0,46-0,80, p < 0,001). War das Verhältnis der Metaboliten des 2-Hydroxylierungspaths zu Metaboliten des 16-Hydroxylierungspaths hoch, war das Brustkrebsrisiko signifikant reduziert (OR 90. vs. 10. Perzentile = 0,66, 95 % CI, 0,52-0,84, p < 0,001). Kein signifikant erhöhtes Risiko konnte für den 4-Hydroxylierungspath oder den 16-Hydroxylierungspath im Verhältnis zum totalen Östrogen ermittelt werden (78). Fuhrman et al. (277 postmenopausale

Fälle, 423 Kontrollen) konnten ein signifikant erhöhtes Brustkrebsrisiko bei erhöhten 4-Catecholöstrogenen im Verhältnis zu methylierten Catecholöstrogenen (HR = 1,38, 95 % CI, 1,08-1,77, $P_{\text{trend}} = 0,02$), objektivieren. Durch Methylierung der Catecholöstrogene des 4-Hydroxylierungspaths durch die COMT können diese nicht mehr in Chinone konvertiert werden und somit die DNS nicht mehr beschädigen. Ein erhöhtes Verhältnis von Metaboliten des 2-Hydroxylierungspaths zu Ursprungsoestrogenen (Ö_1 und Ö_2 , jeweils konjugiert und unkonjugiert) waren mit einem statistisch-signifikant verringerten Brustkrebsrisiko assoziiert (HR = 0,66, 95 % CI, 0,51-0,87, $P_{\text{trend}} = 0,003$). Diese Ergebnisse stimmen mit der Hypothese überein, dass Metaboliten (Chinone) aus dem 2-Hydroxylierungspaths weniger kanzerogen sind als Metaboliten aus dem 4-Hydroxylierungspaths. Die Ergebnisse stimmen auch mit der Hypothese überein, dass Chinone aus dem 4-Hydroxylierungspaths instabile depurinierende DNS-Addukte bilden, die zu Mutationen führen. (79). Als Ursache dafür, dass manche Frauen Brustkrebs entwickeln und andere nicht, wird eine Verlagerung der Balance des Östrogenmetabolismus oder genetische Polymorphismen in den zuständigen Enzymen vermutet (22).

Es gibt verschiedene Genotypen der COMT. Es gibt Allele, die für eine COMT mit normaler (COMTH) oder mit niedriger Aktivität (COMTL) kodieren (80). In der kaukasischen Bevölkerung zeigen 25 % ein homozygotes Genmuster für die COMTL (81). Bei postmenopausalen Frauen ist der Genotyp COMTLL (also der homozygote Genotyp) mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken assoziiert (80). Die Glutathion-S-Transferase gehört, wie auch die COMT und die Chinonreduktase, zu den Phase II Enzymen der Biotransformation. Chinone, Semichinone und Catecholöstrogene können über diese Enzyme inaktiviert werden. Dadurch kann wiederum die Bildung von DNS-Addukten und oxidativer DNS-Schaden vermieden werden (22). Die COMT kombiniert mit Glutathion-S-Transferase-Genotypen, die für eine niedrige bzw. mittlere Aktivität kodieren, führt zu einer 3-4-fachen Erhöhung des Brustkrebsrisikos. Eine erniedrigte COMT-Aktivität und/ oder eine niedrige Glutathion-S-Transferase-Aktivität könnten zu einem Shift des Östrogenmetabolismus in Richtung Chinone und damit zu DNS-Schäden führen (80).

1.4 Persistierende organische Schadstoffe

Alle in dieser Diplomarbeit behandelten Chemikalien fallen in die Gruppe der Persistierenden Organischen Schadstoffe (POPs) (82,83). Im 20. Jahrhundert wurden enorme Mengen an POPs produziert (83). So wurden z.B. seit den 1940ern weltweit

geschätzt 1,8 Millionen Tonnen DDT produziert (84). POPs wurden u.a. als Pestizide oder zur Vektorkontrolle eingesetzt. Sie können dermal und inhalativ aufgenommen werden. Hauptsächlich erfolgt die Exposition jedoch über die Nahrungsaufnahme, vor allem durch Verzehr von Fleisch, Fisch und Milchprodukten (83). Aus der chemischen und physikalischen Beschaffenheit von POPs ergeben sich vier definierende Eigenschaften: Bioakkumulation, Persistenz, Toxizität und weite Verbreitung. Es handelt sich bei POPs um lipophile organische Chemikalien, die folglich im Fettgewebe sowie entlang der Nahrungskette akkumulieren (82). Das bedeutet, dass Menschen, die oben bzw. Tiere, die weiter oben in der Nahrungskette stehen, stärker exponiert sind (83). Ihre Schwerflüchtigkeit erlaubt einen weitreichenden Transport in der Luft oder adsorbiert in Feinstaub (82). Unter anderem konnten DDT und seine Abbauprodukte in Tieren, Schnee und Mooren der Arktis und Antarktis nachgewiesen werden (84). POPs sind resistent gegenüber photolytischer, chemischer oder biologischer Degradierung. Deshalb bleiben sie oft über lange Zeiträume (häufig viele Jahre) intakt (82). Die Exposition von Kindern beginnt bereits mit der Empfängnis. Während der Schwangerschaft wird der Embryo bzw. Fetus über die Plazenta, basierend auf vergangener und derzeitiger Exposition der Mutter, exponiert. Über die Muttermilch kommt es zu postnataler Exposition. Mögliche, durch POPs verursachte Schäden an Eizellen und Spermien könnten die Gesundheit von Kindern bereits beeinflussen. Auswirkungen dieser frühen Exposition könnten nach einer Latenzzeit möglicherweise erst im Erwachsenenalter oder während der Pubertät augenscheinlich werden. Als entscheidender Faktor gilt, ob die Exposition in einem für die Entwicklung kritischen Zeitfenster stattfindet (83).

Obwohl POPs zu einer Gruppe zusammengefasst werden, hat jede einzelne Chemikalie ein eigenes Gefahrenprofil und wird deshalb individuell untersucht. Mehrere POPs sind gleichzeitig endokrine Disruptoren (82). Von den untersuchten Verbindungen gehören Dieldrin, Hexachlorbenzol, Chlordan, DDT und PCBs zum sogenannten „dreckigen Duzend“ der Stockholmer-Konvention. Die Stockholmer-Konvention ist ein internationales Abkommen zum Schutz der Umwelt und der Menschen vor POPs. Die ersten Verbote wurden 2001 beschlossen und sind 2004 in Kraft getreten. Inzwischen sind alle hier untersuchten Verbindungen Teil des Abkommens (82,83).

1.4.1 DDT und DDE

DDT wurde weltweit als Insektizid und Insektenrepellent eingesetzt. Es wurde in der Landwirtschaft, zur Vektorkontrolle (z.B. Läuse bei Typhus, Moskitos bei Malaria) und im domestischen Bereich verwendet. DDT bleibt sechs bis zwölf Monate als Pestizid/Repellent

aktiv (85). Als Insektizid verwendet wurde technisches DDT. Technisches DDT ist eine Mischung aus p,p'-DDT (60-80 %), o,p'-DDT (15-21 %), bis zu 4 % p,p'-DDD und bis zu 1,5 % 1-(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichlorethanol. Insgesamt können in technischem DDT bis zu 14 Chemikalien enthalten sein. Die insektizide Wirkung geht dabei von p,p'-DDT aus (84).

p,p'-DDE ist ein Metabolit von p,p'-DDT, welches, da es lipophiler als die restlichen Abbauprodukte ist, schlechter ausgeschieden wird (86). In den USA wurde DDT 1972 verboten (84), in Ungarn 1968 (85), in Österreich 1992 (87). In einigen Ländern wird DDT noch heute zur Vektorkontrolle eingesetzt (z.B. in Malaria-Endemiegebieten) (88). Wie oben beschrieben sind DDT, DDD und DDE fettlösliche Verbindungen. Nach der Aufnahme werden sie im Körper je nach Fettgehalt der Organe und im Fettgewebe selbst gelagert. Dabei haben die einzelnen Abbauprodukte bzw. Chemikalien ihrer Lipophilie entsprechend eine unterschiedliche Neigung sich im Fettgewebe anzuhäufen (in absteigender Reihenfolge: p,p'-DDE > p,p'-DDT > o,p'-DDT) (84). Die biologische Halbwertszeit von DDE ist mit zehn Jahren am längsten. Es folgt p,p'-DDT mit einer Halbwertszeit von fünf Jahren, während o,p'-DDT schnell ausgeschieden wird (86). DDT und seine Metaboliten treten in die Muttermilch über (89) und überwinden die Plazentaschranke (90).

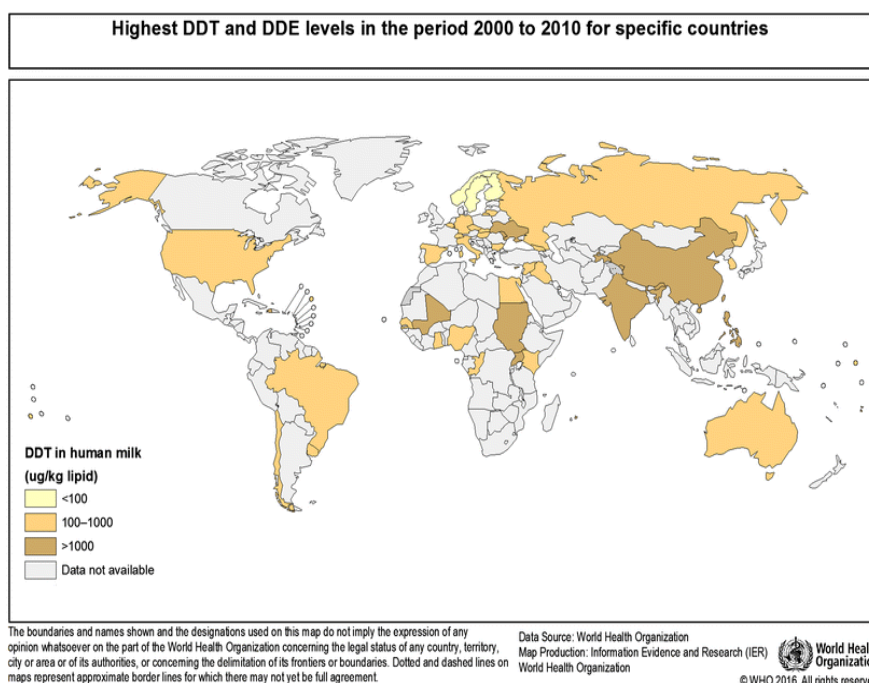


Abb. 7. DDT in der Muttermilch im weltweiten Vergleich

Hier wird die Summe aller gemessenen DDT Isomere bzw. Metaboliten dargestellt. Σ DDTs: o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDD und p,p'-DDD. In weniger industrialisierten Ländern wurden die höchsten Σ DDT Konzentrationen gemessen (89).

1.4.2 β -Hexachlorocyclohexan

HCH verfügt über insgesamt acht Isomere. Die häufigsten sind α -, β -, γ - und δ -HCH (91). Diese Isomere kommen in technischem HCH, das als Insektizid verwendet wurde, vor. Es besteht aus γ -HCH (10-15 %), α -HCH (60-70 %), β -HCH (5-12 %), δ -HCH (6-10 %) und ϵ -HCH (3-4 %) (92). Praktisch die gesamte insektizide Wirkung liegt bei γ -HCH, das auch Lindan genannt wird und von der „International Agency for Research on Cancer“ (IARC) als Gruppe 1 Karzinogen („carcinogenic to humans“) klassifiziert wird (92,93). Es wurde in Tierhaltungsbetrieben und im Obst- und Gemüseanbau eingesetzt. Die höchste Toxizität bei chronischer Exposition zeigt β -HCH, vermutlich da es akkumuliert und die längste Halbwertszeit im Körper hat (geschätzt sieben bis zehn Jahre) (92,94). Dem toxischsten β -HCH folgen α -, γ - und δ -HCH (95). Alle vier Isomere überwinden die Blut-Plazenta-Schranke und wurden in Muttermilch nachgewiesen (90,92,96).

1.4.3 Hexachlorbenzol

HCB wurde als Fungizid u.a. im Getreideanbau und in Holzschutzmitteln sowie zur Herstellung von Pyrotechnik verwendet. In den USA war es bis 1984 in Verwendung (97). In Österreich wurde es 1992 (87) und weltweit 2001 durch die Stockholmer-Konvention verboten. Heutzutage entsteht es noch in kleinen Mengen als Nebenprodukt bei der Produktion einiger chlorierter Lösungsmittel oder ist als Verunreinigung in Pestiziden, die gegenwertig verwendet werden, zu finden. Die Halbwertszeit im Boden wird auf drei bis sechs Jahre geschätzt. Hexachlorbenzol ist ebenfalls in der Lage die Plazentaschranke zu überwinden und in die Muttermilch überzugehen (97).

1.4.4 Dieldrin

Dieldrin wurde in den USA von den 1950er bis 1970er Jahre als Insektizid beim Anbau von Getreide und Baumwolle verwendet. Bis 1987 wurde es noch zur Termitenbekämpfung eingesetzt. Technisches Dieldrin enthält mindestens 85 % Dieldrin. Gleichzeitig in Verwendung war Aldrin, das in der Umwelt und in Säugetieren bereitwillig zu Dieldrin umgewandelt wird. Es ist resistenter gegenüber abiotischem Abbau und Biodegradation und dementsprechend auch persistenter als Aldrin (98). Beide Substanzen wurden in Österreich

1992 verboten (87). Dieldrin konnte im Fruchtwasser, in der Plazenta, im fetalen Blut und in der Muttermilch nachgewiesen werden (98).

1.4.5 Methoxychlor

Methoxychlor fand als Pestizid und Insektizid u.a. bei Nutztieren, Feldfrüchten und in Futtermitteln Verwendung. Es wirkt gegen eine große Bandbreite von Insekten wie z.B. Fliegen, Kakerlaken und Moskitos (99). Technisches Methoxychlor besteht zu 88-90 % aus Methoxychlor, die restlichen 10-12 % sind Reaktionsprodukte oder Isomere (100). Methoxychlor kann in vivo zu zwei Metaboliten demethyliert werden. Sowohl mono-hydroxy Methoxychlor als auch bis-hydroxy Methoxychlor interagieren mit dem Androgen- und Östrogenrezeptor (99).

1.4.6 Endosulfan

Endosulfan wurde als Akarizid und Insektizid eingesetzt. Der verbreitete Einsatz in den USA begann in den 1950ern (101). Technisches Endosulfan besteht zu 94 %, in einem Verhältnis von 7:3, aus den Isomeren Endosulfan- α und Endosulfan- β . In technischem Endosulfan und in der Umwelt findet man zudem Endosulfan-Sulfat als Reaktionsprodukt oder als Produkt der Biotransformation. 2012 wurde Endosulfan in die Stockholmer Konvention aufgenommen um seine weltweite Verwendung einzuschränken (102). Es ist wenig dazu bekannt, wie Endosulfan im Menschen metabolisiert wird (102). Endosulfan- α , - β und Metaboliten wurden in der Muttermilch, in Nabelschnurblut und Plazentagewebe nachgewiesen (103).

1.4.7 Chlordan

Chlordan ist ein chloriertes Cyclodien, das als Insektizid eingesetzt wurde. 60-85 % von technischem Chlordan besteht aus den Isomeren cis- und trans-Chlordan. Insgesamt ist das Insektizid ein Gemisch aus über 140 verwandten Verbindungen, wie z.B. Heptachlor und Nonachlor. Das Verhältnis der beiden Isomere zueinander ist vom Herstellungsprozess abhängig (104). Chlordan wurde in den USA zwischen 1948-1978 unter anderem als Insektizid im Getreideanbau, auf Grünflächen, zur Termitenkontrolle und als Holzschutzmittel eingesetzt. Bis zu den 1980ern, als die Verwendung weltweit eingeschränkt wurde, wurden jährlich 70.000 Tonnen weltweit produziert. In manchen

Ländern wird Chlordan noch heute produziert und eingesetzt (Argentinien, Singapur, Indien und China). In der Europäischen Union wurde Chlordan 1981, in den USA 1988 und in Mexiko 1998 verboten. Vor dem Verbot wurde Chlordan direkt bei der Verwendung aufgenommen, heutzutage wird es vor allem über kontaminierte Nahrungsmittel (v.a. Fleisch) und Wasser aufgenommen. In der Leber wird es über CYP 450 Enzyme metabolisiert. Der primäre Metabolit ist das toxischere Oxychlordan, das im Fett persistiert und nur sehr langsam verstoffwechselt wird. Chlordan wurde in der Muttermilch nachgewiesen und passiert die Blut-Plazenta Schranke (105).

1.4.8 Polychlorierte Biphenyle

PCBs sind aromatische Organochlorverbindungen. Es gibt je nach Anzahl und Position der Chloratome insgesamt 209 PCB Kongenere. PCBs wurden u.a. als Schmiermittel, Kühlmittel, Weichmacher, Feuerhemmer und Isoliermittel in Transformatoren, Kondensatoren und Gas-Transmissionsturbinen eingesetzt (106). PCBs wurden nicht als einzelne Kongenere, sondern in komplexen Mischungen vertrieben. Handelsnamen waren u.a. Aroclor (USA), Fenclor (IT) und Clophen (DE). Es gab verschiedene Varianten von Aroclor, die durch eine nachgestellte vierstellige Nummer beschrieben wurden. Die ersten beiden Zahlen beschrieben die Art der Mischung, die letzten beiden den geschätzten Chlorgehalt in Gewichtsprozent (107). Die kommerzielle Produktion begann in den 1920er Jahren, erreichte aber erst nach 1945 bedeutende Ausmaße. Nach einem Peak in den 1960ern-1970ern wurden in den meisten Ländern ab den frühen 1980ern keine PCB-Gemische mehr produziert. Geschätzt wurden weltweit 1-1,5 Millionen Tonnen produziert (108).

PCBs können auf mehrere Arten eingeteilt werden, eine davon ist die Einteilung in dioxin-artige und nicht-dioxin-artige Kongenere. Es gibt zwölf dioxin-artige Kongenere: 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 und 189. Dem Dioxin gemeinsam besitzen sie eine Affinität zum Aryl hydrocarbon Rezeptor (AhR). Bezogen auf die Toxizität von Dioxin wurden den zwölf Kongenere Toxische Äquivalenz Faktoren zugeteilt, wobei Dioxin die höchste Toxizität aufweist. Um die PCB-Exposition zu quantifizieren, wurde von der Stockholmer Konvention empfohlen, die Kongenere 28, 52, 101, 138, 153 und 180 (alle nicht-dioxin-artig) zu messen. Die Halbwertszeit von PCB Kongenere ist von der Anzahl ihrer Chloratome abhängig. Hochchlorierte PCBs weisen im menschlichen Körper durchschnittliche Halbwertszeiten von acht bis 15 Jahren auf, während niedrigchlorierte Kongenere eine deutlich kürzere Halbwertszeit zeigen. Auch PCBs überwinden die

Plazentaschranke und werden mit der Muttermilch ausgeschieden. Zudem besitzen Kinder geringere Konzentrationen von entgiftenden Enzymen, was in Kombination mit einer geringeren Absorptionsschwelle zu einer höheren Akkumulation von PCBs führt (108).

1.4.8.1 Aryl hydrocarbon Rezeptor

Ein entscheidender Teil der Toxizität von dioxin-artigen PCBs geht von ihrer Fähigkeit den AhR zu binden/ aktivieren aus (108). Der AhR liegt in ungebundener Form inaktiv im Zytosol vor und ist an zwei „heat shock proteins“ (HSP90), ein „small protein“ (p23), und an ein „immunophilin-like protein“ (XAP2) gebunden. Diese Proteine halten den AhR inaktiv. Ein Ligand bindet an AhR und bildet einen aktiven Komplex. Dieser gelangt in den Nukleus, wo der AhR mit dem „aromatic hydrocarbon receptor nuclear translocator“ (ARNT) heterodimerisiert. Dieses Heterodimer bindet als Transkriptionsfaktor an das „dioxin-response-element“ (DRE). Es kommt zu Veränderung der Gentranskription (109,110). CYP1A1 und CYP1B1 sind Zielgene des AhR. CYP1A1 metabolisiert Prokarzinogene, was zu Mutationen durch Bildung von DNS-Addukten führen kann (Abb. 8) (110,111). Mehrere POPs fallen in die Gruppe der dioxin-artigen Chemikalien, da sie über gemeinsame Pathways wirken (82).

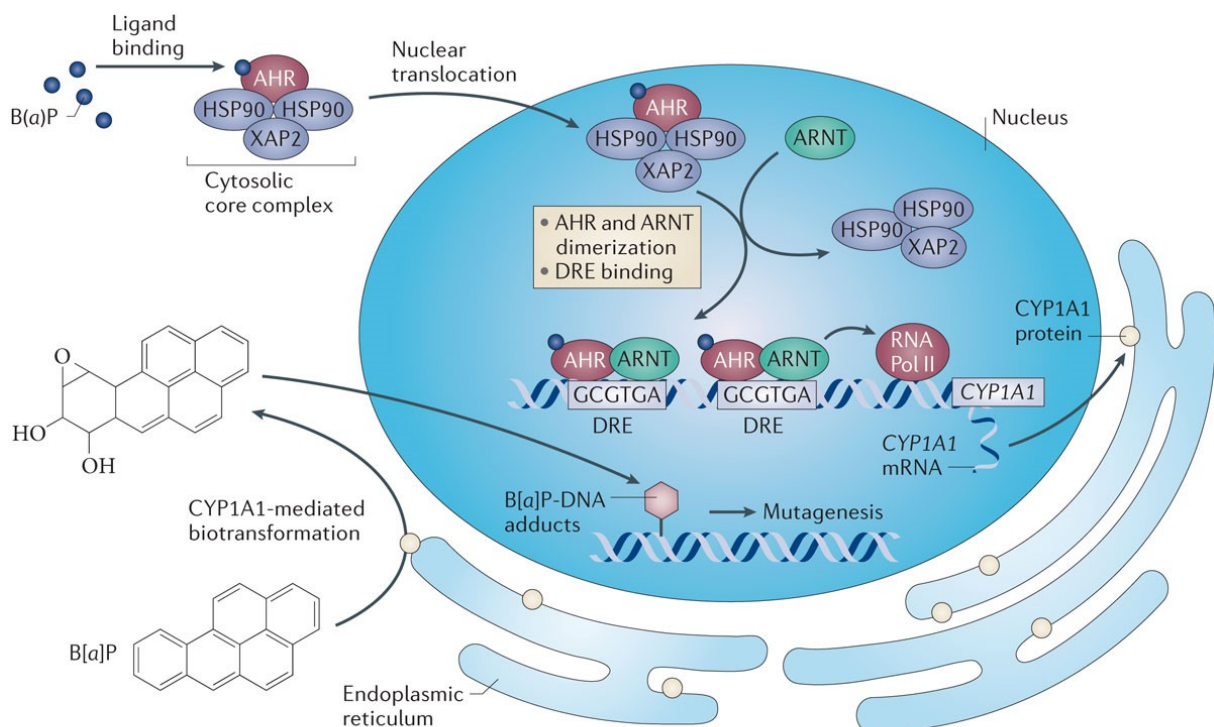


Abb. 8. AhR-Pathway

(Reproduziert mit freundlicher Genehmigung von Macmillan Publishers Ltd: Nature Reviews Cancer (110), Copyright 2014, erhältlich von: <http://www.nature.com/articles/nrc3846>.)

2 Material und Methoden

Für Einleitung und Diskussion wurden Lehrbücher aus der Bibliothek der Medizinischen Universität Graz, die toxikologischen Profile der „Agency for Toxic Substances and Disease Registry“ (ATSDR), die IARC Monographs, PubMed, UpToDate und die Website der WHO und der „endocrine society“ durchsucht.

Für den Ergebnissteil wurde eine Literaturrecherche im „PubMed“ bis einschließlich Mai 2018 durchgeführt, die in nachfolgender Tabelle dargestellt ist.

Suchbegriffe	Gesamt	Reviews
polychlorinated biphenyls and breast cancer	257	34
DDT and breast cancer	202	26
DDE and breast cancer	130	16
dieldrin and breast cancer	43	4
endosulfan and breast cancer	27	0
chlordan and breast cancer	29	4
organochlorine pesticides and breast cancer	173	30
methoxychlor and breast cancer	21	1
hexachlorobenzene and breast cancer	40	2
hexachlorocyclohexane and breast cancer	58	4
organochlorine pesticides and estrogen receptor alpha and beta	16	0
Gesamt (nach aussortieren doppelt angezeigter Papers):	557	71

Tabelle 1: Literaturrecherche

Für den Ergebnissteil wurden Zeitschriftenartikel, die die Pathogenese bzw. mechanistische Pathways beforschen, verwendet.

Ausgeschlossen wurden:

- epidemiologische Studien

- Brustkrebs beim Mann
- Reviews
- Publikationen, die nicht humane Mammakarzinom- oder Brustzellen untersuchen (ausgenommen: Transaktivierungs- oder Bindungsassays und in vivo Experimente)
- Publikationen, die nicht-humane Rezeptoren verwendet haben
- Metaboliten der einzelnen Chemikalien
- Alle PCBs mit Ausnahme von PCB Nr. 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169, 189, 28, 52, 101, 138, 153 und 180

Alle Titel wurden auf Relevanz gescreent. Wurde der Titel als relevant erachtet, dann wurde der Abstract gelesen. Wurde dieser wiederum als passend erachtet, dann wurde das Paper gelesen und relevante Teile für die Diplomarbeit verwendet.

3 Ergebnisse – Resultate

3.1 DDT und DDE

o,p'-DDT bindet in vitro an den humanen ÖR (112–116). Genauer bindet o,p'-DDT (1 μ M) im Vergleich zu Ö₂ mit einer 10.000 Mal geringeren Affinität an den ÖR (112). Lemaire et al. konnten für ein DDT-Gemisch (18 % o,p'-DDT, 75 % p,p'-DDT) und o,p'-DDT eine Transaktivierung des ÖR- α und - β objektivieren. Im Vergleich zu dem Gemisch zeigte o,p'-DDT eine potentere Transaktivierung der beiden Rezeptoren (117). Auch Kojima et al. konnten anhand eines Transaktivierungs-Assays Agonismus/ Antagonismus der Pestizide am humanen ÖR- α , - β und Androgenrezeptor (AR) aufzeigen.

„Stärke“ der Transaktivierung in jeweils absteigender Reihenfolge:

- Agonismus am ÖR- α : o,p'-DDT > p,p'-DDT > p,p'-DDE.
- Agonismus am ÖR- β : o,p'-DDT > p,p'-DDT > p,p'-DDE.
- Antagonismus am AR (antiandrogene Wirkung): o,p'-DDT > p,p'-DDE > p,p'-DDT.

p,p'-DDT und p,p'-DDE zeigen eine stärkere antiandrogene als östrogene Aktivität (118).

o,p'-DDT, p,p'-DDT und p,p'-DDE stimulieren die Proliferation der ÖR-positiven MCF-7 Brustkrebszellen dosisabhängig (119,120).

3.1.1 o,p'-DDT

o,p'-DDT konnte bereits bei Konzentrationen von 10^{-8} M eine signifikante Proliferation von östrogen-kompetenten MCF-7 Brustkrebszellen induzieren. Maximale Proliferation wurde bei Konzentrationen von 10^{-6} M o,p'-DDT gemessen. In ÖR-positiven T47-D Brustkrebszellen konnte o,p'-DDT ähnliche Resultate hervorrufen. In den ÖR-negativen MDA-MB-231, HS578T und MDA-MB468 Brustkrebszellen hingegen konnte o,p'-DDT keine Proliferation induzieren (120). Diel et al. bestimmten die Proliferation von MCF-7 Zellen unter o,p'-DDT (10^{-8} - 10^{-5} M) anhand des Prozentsatzes von Zellen in der S-Phase. Signifikant war die Zellteilung ab 10^{-7} M, maximal bei 10^{-6} M. Zugleich konnte eine signifikante Reduktion der Apoptoserate gemessen werden (121). Sowohl durch Ko-Inkubation mit Tamoxifen, als auch mit dem Antiöstrogen ICI 164,384 konnte die Proliferation von MCF-7 Zellen unter o,p'-DDT reduziert werden (119,120). Auch Pestana et al. untersuchten die Proliferation von MCF-7 Zellen unter o,p'-DDT (50-1.000 nM). Sie konnten keinen dosisabhängigen Anstieg der Proliferation messen, sondern eine dosisabhängige, signifikante U-förmige Hemmung der Proliferation. Signifikant waren die Werte bei 100, 250 und 500 nM, wobei die stärkste Hemmung bei 250 nM verzeichnet

wurde. Bei 100 und 250 nM zeigten die Zellen darüber hinaus eine verringerte Zellviabilität. Bei ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen kam es weder zu einer signifikanten Veränderung der Proliferation noch der Zellviabilität. Des Weiteren konnte o,p'-DDT bei 50 und 1.000 nM (nicht bei 100 nM) das invasive Potential von MCF-7 Zellen signifikant steigern, während es bei MDA-MB-231 Zellen in allen drei Konzentrationen zu einer signifikanten Senkung des invasiven Potentials kam. Interessant dabei ist, dass MCF-7 Zellen als ÖR-positive Adenokarzinomzellen mit geringem invasiven Potential angesehen werden, während MDA-MB-231 Zellen als ÖR-negative Adenokarzinomzellen mit hohem invasiven Potential gelten. Absolut gesehen hatten die MDA-MB-231 Zellen auch nach der Pestizid Behandlung noch ein höheres invasives Potential als MCF-7 Zellen (122). o,p'-DDT (100 nM) konnte eine TNF α -induzierte Apoptose von MCF-7 Zellen teilweise aufheben. Zudem konnte das Pestizid eine Upregulation von Bcl-2 induzieren, die durch das Antiöstrogen ICI 182,780 gehemmt werden konnte. In den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen konnte o,p'-DDT die TNF-induzierte Apoptose nicht beeinflussen. Die AutorInnen postulierten, dass für den antiapoptotischen Effekt von o,p'-DDT der ÖR benötigt wird (123).

In den ÖR-positiven MCF-7 Zellen führten 0,1-1 nM o,p'-DDT zu einer erhöhten „human epidermal growth factor receptor 2“ (HER2) Tyrosinkinaseaktivität. Die erhöhte Aktivität konnte durch Tamoxifen nicht unterdrückt werden (124). o,p'-DDT Behandlung (100 nM) führte passend dazu zu einer signifikant vermehrten Fokusbildung von MCF-7 Zellen. Durch Zugabe eines HER2 Antikörpers (9G6) konnte die Fokusbildung gehemmt werden (125). In ÖR-negativen MCF-10A Brustepithelzellen konnten 10 nM o,p'-DDT weder eine HER2, noch eine c-Met-Phosphorylierung/ Aktivierung hervorrufen (126). Die Proliferation von MCF-7 BOS Zellen, die mit einer konstanten Dosis $1,5 \times 10^{-5}$ M o,p'-DDT behandelt wurden, konnten durch einen Erk-Inhibitor (PD98059) dosisabhängig signifikant reduziert, aber nicht vollkommen aufgehalten werden (127).

In vitro Studien zeigten, dass DDT ÖR-abhängig und ÖR-unabhängig östrogene Zielgene regulieren kann. ÖR-positive MCF-7 Brustkrebszellen wurden mit Ö₂ (1 nM) oder 10 μ M o,p'-DDT behandelt. Es kam bei beiden zu einer signifikanten Upregulation von Genen, die ins Signaling beim Mammakarzinom involviert sind. Der „vascular endothelial growth factor-A“ (VEGF)-A hingegen wurde nur von o,p'-DDT signifikant upreguliert. Durch Zugabe des Antiöstrogens ICI 182,780 konnte die VEGF-A Expression nicht unterdrückt werden. Die VEGF-A Expression von o,p'-DDT scheint in MCF-7 Zellen unabhängig von ÖR- α zu sein. Es kommt zu einer vermehrten Aktivierung des Hypoxie-induzierter Faktor-1-Response-Elements, das im Promoter von VEGF-A liegt. o,p'-DDT induziert

Phosphorylierung von p38 α , woraufhin das CREB-Binding Protein (ein Ko-Aktivator) aktiviert wird, was zur vermehrten Bindung von diesem an den Hypoxie-induzierter Faktor-1 (ein Transkriptionsfaktor) führt. Das könnte der Pathway sein, über den o,p'-DDT die VEGF-A Expression reguliert. o,p'-DDT könnte fähig sein, die Genexpression in MCF-7 Zellen differentiell zu der von Ö₂ zu verändern (128). Silva et al. untersuchten, wie sich o,p'-DDT auf die Expression der östrogen-abhängigen Gene pS2, PR, ÖR, BRCA1 und CCND1 (Cyclin D1) auswirkt. o,p'-DDT 10⁻⁵ M zeigte ein ähnliches signifikantes Expressionsprofil wie es auch Ö₂ hervorrief (ÖR wurde downreguliert, alle anderen upreguliert). Durch Zugabe eines Antiöstrogens (ICI 182,780) konnte die Transkription der östrogen-abhängigen Gene fast vollständig unterdrückt werden. Das zeigt laut AutorInnen, dass ÖRs im Nukleus für die Transkription dieser Gene notwendig sind. Ö₂ kann den Src/Ras/Erk-Pathway über den nicht-genomischen/ schnellen Pathway aktivieren. Das führt schlussendlich zur Aktivierung von Erk1, Erk2 und eines nukleären ÖRs. Dieser Pathway kann auch in Abwesenheit von Ö₂ zur Aktivierung eines nukleären ÖRs führen. Um einen möglichen Einfluss dieses Pathways zu erkennen, wurde das Experiment unter Zugabe eines Erk-Kaskade Inhibitors wiederholt. Die pS2, BRCA1 und PR Expression, induziert von o,p'-DDT, wurde signifikant, aber nicht vollständig reduziert. Umgekehrt kam es zu einer signifikant verringerten Downregulation des ÖR. Die Expression von CCND1 konnte nicht beeinflusst werden. Vermutlich kam es nur zu einer teilweisen Unterdrückung, da der klassische Pathway des ÖR Signalings durch einen Erk-Inhibitor nicht gehemmt werden kann. Über diesen klassischen Pathway scheint CCND1 reguliert zu werden. o,p'-DDT scheint als ÖR Agonist sowohl zu einer ligand-anhängigen Aktivierung von ÖRs über den klassischen Pathway, als auch zu einer ligand-unabhängigen Aktivierung von ÖRs zu führen. Ein ÖR im Nukleus scheint für die Regulation der vier genannten Gene durch o,p'-DDT notwendig zu sein (127). Passend dazu konnten auch Diel et al. zeigen, dass o,p'-DDT 10⁻⁶ M eine signifikante Steigerung der PR mRNA in MCF-7 Zellen induziert. Die mRNA des AR konnte nicht beeinflusst werden (121). o,p'-DDT konnte in T-47D Zellen in den Konzentrationen 100 nM, 1 μ M und 10 μ M die durch Progesteron 1 nM induzierte Luziferaseaktivität eines Reportergens signifikant hemmen. In einem kompetitiven Bindungsassay konnte o,p'-DDT an den Progesteronrezeptor (PR) binden. Die Hemmung der Luziferaseaktivität könnte durch Antagonismus von o,p'-DDT am PR entstehen. Sie könnte aber auch durch indirekte Beeinflussung des PR entstehen z.B. durch den ÖR oder ÖR-Pathway (129).

In den Konzentrationen von 0,01, 0,1 und 1 μM führte die Behandlung mit o,p'-DDT in MCF-7 und MDA-MB-231 Brustkrebszellen zu einer signifikanten, dosisabhängigen Steigerung der mRNA und der Proteinlevels des Enzyms Aromatase. Außerdem induzierten alle Dosierungen eine signifikant gesteigerte Promoter- und Enzymaktivität. Der ÖR Antagonist ICI 182,780 konnte die Wirkung von o,p'-DDT auf die Aromatase nicht beeinflussen. Die Aromatase-Induktion korrelierte mit einer PI3/Akt und Proteinkinase A (PKA) mediierten Upregulation der Cyclooxygenase-2 (COX-2). Die Aromatase ist ein essentielles Enzym in der Biosynthese von Östrogen (130). o,p'-DDT könnte in den ÖR-positiven MCF-7 Zellen den Östrogenmetabolismus verändern. 10^{-5} M des Pestizids führte zu einer signifikanten Zunahme des genotoxischen 16α -Hydroxyöstrons und zu einer Abnahme von 2-Hydroxyöstron, das die Proliferation von Brustzellen hemmt. Damit führte es zu einer Verschiebung des Östrogenmetabolismus bzw. zu einer Veränderung der 16α -Hydroxyöstron/2-Hydroxyöstron Ratio in vitro (siehe auch Kapitel 1.3.1.2) (131). In den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen konnte o,p'-DDT 10^{-5} M keine Veränderung der C-2 oder C-16 α Hydroxylierung von Ö_2 induzieren (132).

o,p'-DDT zeigt enantioselektive Östrogenität (113). Das Enantiomer R(-)-o,p'-DDT führte in MCF-7 Brustkrebszellen ab 10^{-10} M zu einer signifikanten Proliferation und das Enantiomer S(+)-o,p'-DDT ab 10^{-7} M. Dabei konnte eine relative proliferative Effektratio von 89,4 % und 27,9 % respektive gemessen werden. Passend dazu wurden die höchsten mRNA Level des östrogen-regulierten pS2 Gens und die maximale Downregulation von ÖR- α und ÖR- β bei 10^{-6} M R(-)-o,p'-DDT mRNA und bei 10^{-5} M S(+)-o,p'-DDT gemessen. All diese Vorgänge konnten durch ICI 182,780 aufgehoben werden, was darauf hinweist, dass die enantioselektive Östrogenität von o,p'-DDT über den ÖR- α und ÖR- β mediiert werden könnte (133). R(-)-o,p'-DDT 10^{-6} M zeigte im Transwell-Invasions-Assay eine signifikant höhere Invasivität, als S(+)-o,p'-DDT 10^{-6} M. Beide Enantiomere zeigten ein signifikant höheres Invasionspotential als Kontrollen. Bei gleichen Dosierungen konnte R(-)-o,p'-DDT signifikant höhere mRNA Levels der invasions-unterstützenden Gene MMP9 und MMP2 als S(+)-o,p'-DDT induzieren (134). o,p'-DDT 10^{-5} M führte in MCF-7 Zellen zu einer ÖR- α -abhängigen Downregulation der ARNT2 in vitro (135). o,p'-DDT 10 μM induzierte eine Veränderung der Expressionsprofile von mikroRNA in MCF-7 Zellen, die teilweise gleich und teilweise differentiell zu der von Ö_2 induzierten war (136).

Sprague-Dawley-Ratten wurden vom 21. bis zum 34. Lebenstag mit 50 mg/kg Körpergewicht (KG) o,p'-DDT insgesamt acht Mal behandelt. Eine Gruppe erhielt einmalig 7,12-Dimethylbenzo[*a*]anthracen (DMBA) 40 mg/kg KG am 28. Lebenstag. Im

Brustdrüsengewebe von Ratten, die mit o,p'-DDT und DMBA behandelt wurden, kam es zu einer signifikanten Zellproliferation im Vergleich zu Kontrollen und im Vergleich zu den Ratten, die nur o,p'-DDT oder nur DMBA erhalten hatten. Gruppen, die nur DMBA oder nur o,p'-DDT erhalten hatten, zeigten im Vergleich zu Kontrollen keine signifikanten Unterschiede. In den Brustzellen aller Ratten der o,p'-DDT und/ oder DMBA Gruppe kam es auch zu einer signifikanten Zunahme von chromosomalen Aberrationen (Hyperplodie und Polyploidie) im Vergleich zu Kontrollen. Die totale Nummer an chromosomalen Aberrationen war in der DMBA+DDT Gruppe signifikant höher als in der DDT Gruppe und nicht signifikant höher als in der DMBA Gruppe. Dies könnten frühe Ereignisse in der Mammakarzinogenese von Ratten sein. Die Gruppengröße war mit fünf bis sechs Ratten jedoch klein (137).

3.1.1.1 Bulletpoints:

- o,p'-DDT bindet an den ÖR (112–116).
- o,p'-DDT stimuliert die Proliferation von MCF-7 Zellen dosisabhängig (120,127)
- o,p'-DDT stimuliert die Proliferation von östrogen-kompetenten Brustkrebszellen, die durch Antiöstrogene unterdrückt werden kann. In ÖR-negativen Brustkrebszellen induziert o,p'-DDT keine Proliferation (119–121,127).
- o,p'-DDT wirkt antiapoptotisch in MCF-7 Zellen. Auch diese Wirkung kann durch Antiöstrogene gehemmt werden (121,123).
- o,p'-DDT aktiviert den ÖR in MCF-7 Brustkrebszellen über ligand-abhängige und ligand-unabhängige Pathways und kann ÖR-abhängig und ÖR-unabhängig Zielgene regulieren (127,128).
- o,p'-DDT steigert das invasive Potential von MCF-7 Zellen (122,134).
- o,p'-DDT übt Antagonismus am PR aus (129).
- o,p'-DDT steigert ÖR-unabhängig in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen die Aromatase-mRNS-Expression und Promoteraktivität (130).
- o,p'-DDT induziert einen Anstieg des genotoxischen Östrogenmetabolits 16 α -Hydroxyöstron und führt zur Abnahme des protektiven 2-Hydroxyöstrons in MCF-7 Zellen, nicht aber in MDA-MB-231 Zellen (131,132).
- o,p'-DDT übt enantioselektive Östrogenität in MCF-7 Zellen aus und steigert die MMP9 und MMP2 mRNS Expression (133,134).
- o,p'-DDT induzierte im Rattenmodell zusammen mit einem Karzinogen chromosomale Aberrationen und Zellproliferation im Brustdrüsengewebe (137).

3.1.2 p,p'-DDT

In ÖR-negativen MCF-10A Brustepithelzellen konnten 10 nM p,p'-DDT eine signifikante Proliferation hervorrufen. Des Weiteren zeigten die Zellen eine vermehrte Phosphorylierung von HER2, c-Met, STAT1 α , MAPK und eine „growth factor receptor-bound protein 2/son of sevenless homolog 1“ (grb2/sos1) Assoziationen. Letztgenannte entsprechen downstream Events nach der Aktivierung von Rezeptortyrosinkinasen. MCF-10A Zellen sind ÖR-negativ. Ein Hinweis darauf, dass die mitogenen Effekte von p,p'-DDT möglicherweise ÖR-unabhängig sind. p,p'-DDT weist eine geringere Affinität zum ÖR als o,p'-DDT auf (126). In den ÖR-positiven MCF-7 Zellen konnte unter dem Einfluss von p,p'-DDT keine Stimulation von HER2 nachgewiesen werden (124). p,p'-DDT konnte Proliferation von MCF-7 Zellen ab 0,1 μ M induzieren ($p = 0,03$). Da das Antiöstrogen ICI 182,780 den proliferativen Effekt von p,p'-DDT aufheben konnte, könnte diese p,p'-DDT induzierte Zellteilung durch den ÖR mediiert werden. In diesem Experiment konnte p,p'-DDT potenter als o,p'-DDT Zellproliferation induzieren. p,p'-DDT konnte Chloramphenicol-Acetyltransferase (CAT)-Aktivität an einem ERE-tk-CAT Reporter gen, das in MCF-7 Zellen exprimiert wurde, effektiver als o,p'-DDT induzieren ($p = 0,0001$). p,p'-DDT zeigte signifikante Effekte ab 0,1 μ M, o,p'-DDT ab 10 μ M. Zudem induzierten beide (10 μ M) signifikant mRNS des östrogen-regulierten pS2 Gens. Trotz der potenteren Wirkung von p,p'-DDT konnte nur o,p'-DDT in einem kompetitiven Bindungsassay mit Ö₂ an den ÖR binden ($p = 0,03$) (116). p,p'-DDT induzierte Zellteilung von MCF-7 Zellen konnte durch Tamoxifen und durch das Antiöstrogen ICI 182,780 gehemmt werden (116,119). In MCF-7 Zellen kam es durch p,p'-DDT 10⁻⁵ M zu einer signifikanten ERE-Luziferaseaktivität, die durch den ÖR- α mediiert wurde. Die Konzentrationen von 10⁻⁸ bis 10⁻⁶ konnten keine Aktivität induzieren. In NIH3T3 Zellen konnte p,p'-DDT über den ÖR- α und - β eine ERE, aber keine AP-1-Luziferaseaktivität induzieren. Über AP-1 wird Signaling von Ö₂ über den ÖR- α und - β mediiert. p,p'-DDT scheint im Gegensatz zu Ö₂ nicht über den ÖR-AP-1-Pathway zu wirken (138). p,p'-DDT in den Konzentrationen 6, 13, 25, 50 und 100 μ M führt in HBEC (normale humane Brustepithelzellen) ab 50 μ M nach 90 Minuten zu einer signifikanten Hemmung der „gap junctional intercellular communication“ (GJIC). Bei 50 μ M p,p'-DDT blieb die Hemmung 24 Stunden aufrecht, zudem kam es zu einer Connexin43-Hyperphosphorylierung, aber zu keiner Veränderung der Connexin43-mRNS-Levels. Die GJIC könnte eine Rolle in der Tumorprogression spielen. Da HBEC Zellen den ÖR nicht exprimieren, könnten die Veränderungen in der GJIC über einen nicht-östrogenen Pathway

reguliert werden (139). p,p'-DDT konnte in einem kompetitiven Bindungsassay nicht an den PR binden. In T-47D Zellen wurde ein progesteron-responsiver Luziferasevektor exprimiert und mit 1 nM Progesteron und 100 nM, 1 μ M oder 10 μ M p,p'-DDT inkubiert. Alle drei Konzentrationen konnten die progesteron-induzierte Luziferaseaktivität signifikant hemmen. Diese antagonistische Funktion am PR könnte auch die östrogene Aktivität über einen PR/ER Crosstalk beeinflussen. Der Antagonismus von p,p'-DDT könnte über Pathways, die indirekt den PR beeinflussen, entstehen (129).

3.1.2.1 Bulletpoints

- p,p'-DDT hat eine geringere Affinität zum ÖR als o,p'-DDT (116).
- p,p'-DDT aktiviert HER2 in ÖR-negativen MCF-10A Brustzellen, aber nicht in ÖR-positiven MCF-7 Brustkrebszellen (124,126).
- p,p'-DDT induziert Proliferation in MCF-7 Zellen, die durch Antiöstrogene bzw. Tamoxifen gehemmt werden kann (116,119), stimuliert aber auch Zellteilung in ÖR-negativen MCF-10A Zellen über einen Pathway, der nicht mit dem ÖR assoziiert ist (126).
- p,p'-DDT hemmt die GJIC über einen nicht-östrogenen Pathway (139).
- p,p'-DDT zeigt Antagonismus am PR bindet aber nicht an den Rezeptor (129).

3.1.3 p,p'-DDE

Wie bereits oben erwähnt, zeigt p,p'-DDE antiandrogene Aktivität bzw. ist die antiandrogene Aktivität stärker ausgeprägt als die östrogene Aktivität (118). Aubé et al. untersuchten die Auswirkungen von p,p'-DDE auf CAMA-1 Brustkrebszellen. Diese Zellen exprimieren den ÖR- α und den AR. Ihr Ziel war es, zu untersuchen, wie p,p'-DDE die Östrogen-Androgen-Balance verändert. Durch Zugabe von 100 pM Ö₂ kam es wie erwartet zur Proliferation der Zellen. Durch anschließende Zugabe von Dihydrotestosteron (DHT) 100-1000 pM, kam es, ebenfalls entsprechend den Erwartungen, zu einer dosisabhängigen androgen-induzierten Hemmung der Proliferation. Wurde nun das Antiandrogen p,p'-DDE dazugegeben, stieg die Zellproliferation bereits bei 2 μ M, im Vergleich zu nur mit Ö₂ + DHT behandelten Zellen, statistisch signifikant an. Bei einer Dosissteigerung auf 5 μ M verschwand der proliferationshemmende Effekt von DHT gänzlich ($p < 0,01$). p,p'-DDE alleine konnte bei 10 μ M nur eine geringe Steigerung der Proliferation (1,3-fach; $p < 0,01$) induzieren. Die AutorInnen konnten auch zeigen, dass CAMA-1 Zellen, die mit jeweils 1 nM Ö₂ und 1 nM DHT behandelt wurden, eine Reduktion der Übertritte von G₁/G₀ zur S-Phase ($p < 0,05$) sowie der

Expression der Proteinlevels von ESR1 und CCND1 (Cyclin D1) ($p < 0,01$) im Vergleich zu isoliertem \ddot{O}_2 zeigte. Diese Reduktion konnte durch p,p'-DDE 10 μM wiederum gänzlich aufgehoben werden ($p < 0,01$ vs. $\ddot{O}_2 + \text{DHT}$). Der Östrogenpathway fördert die Zellteilung, während der Androgenpathway sie hemmt. p,p'-DDE wirkt am AR als Antagonist, wodurch die antiproliferative Wirkung von DHT über den AR-Pathway aufgehoben wird. Es kommt zu einer Cyclin D1 Steigerung, was die Rekrutierung der Zelle in die S-Phase und schlussendlich Proliferation zur Folge hat. Cyclin D1 stellt einen geschwindigkeitslimitierenden Schritt in der Proliferation von Mammakarzinomzellen dar. p,p'-DDE konnte signifikante Proliferation von MCF-7-AR1 Zellen (MCF-7 Zellen, die den AR exprimieren) ab einer Konzentration von 5 μM induzieren. In Kombination mit endogenen Hormonen (10 pM \ddot{O}_2 und 100 pM DHT) konnte p,p'-DDE bereits ab 2 μM Zellteilung hervorrufen. Ein potentieller Grund dafür könnte die höhere Affinität von p,p'-DDE für den AR als für den $\ddot{O}\text{R}-\alpha$ sein (140).

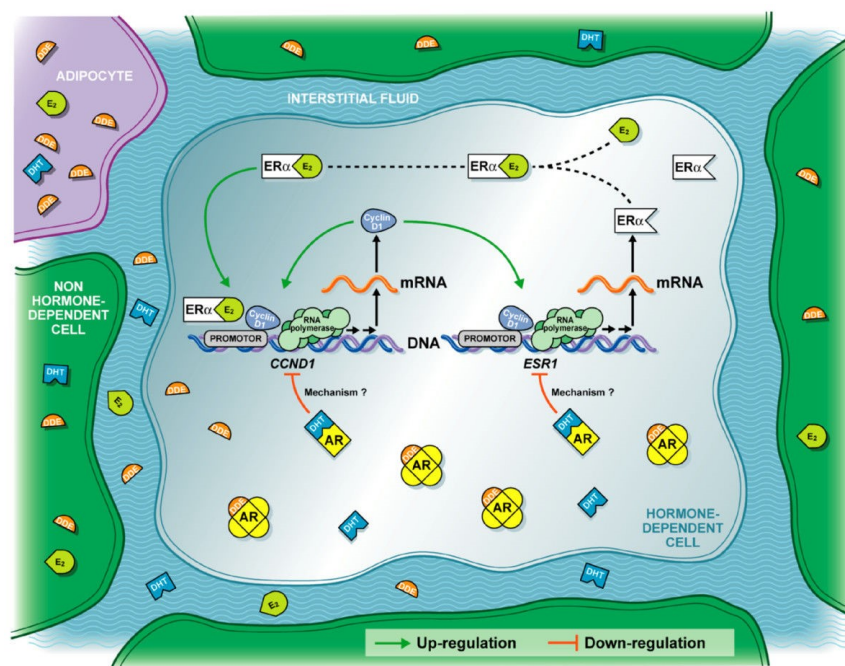


Abb. 9. p,p'-DDE beeinflusst Crosstalk zwischen zwei Hormonrezeptoren

(Reproduziert von (140) mit freundlicher Genehmigung von Aubé et al. und BioMed Central Ltd, Copyright 2008, lizenziert unter [CC BY 2.0](https://creativecommons.org/licenses/by/2.0/)) Mechanistischer Pathway über den p,p'-DDE, der die Proliferation in hormonsensitiven Zellen auslösen könnte. p,p'-DDE ist lipophil und wird in Adipozyten gelagert. Von dort aus kann es zu hormonsensitiven Zellen diffundieren, dort an den AR binden und so dessen Pathway, der sonst zu einer Hemmung der Proliferation führt, inhibieren. Es kommt zu einer Upregulation von CCND1 (Cyclin D1), das normalerweise von $\ddot{O}\text{R}-\alpha$ und dem AR-Pathway reguliert wird. Es resultiert eine Fehlregulierung des Crosstalks durch p,p'-DDE, was präkanzerösen Zellen letztendlich einen Proliferationsvorteil verschaffen könnte (140).

Durch Ko-Inkubation mit Tamoxifen (ÖR- α Antagonist) konnte die Proliferation von MCF-7 Zellen unter o,p'-DDT und p,p'-DDT, aber nicht die von p,p'-DDE induzierte Proliferation reduziert werden (119). p,p'-DDE 10^{-5} M (jedoch nicht 10^{-6} M) induziert über den ÖR- α signifikante Luziferaseaktivität am ERE und am AP-1 Element in NIH3T3 Zellen (138). Pestana et al. behandelten MCF-7 Brustkrebszellen (ÖR- α -positiv) und MDA-MB-231 Brustkrebszellen (ÖR- α -negativ) mit p,p'-DDE (50-1000 nM). Keine der Konzentrationen konnte eine signifikante Proliferation einer der beiden Zelllinien auslösen. Im Gegensatz zu den oben erwähnten Studien wurden hier jedoch geringere Konzentrationen verwendet. p,p'-DDE konnte die Zellviabilität von MDA-MB-231 Zellen nicht beeinflussen. Die von MCF-7 Zellen wurde durch die oberen Konzentrationen 500 nM und 1000 nM jedoch signifikant reduziert. 50 nM und 100 nM führten des Weiteren zu einer signifikanten Erhöhung der Invasivität von MCF-7 Zellen und zu einer signifikanten Senkung derselben bei MDA-MB-231 Zellen, 250 nM konnte in beiden Zelllinien keine Veränderung diesbezüglich auslösen (höhere Konzentrationen wurden nicht untersucht). MDA-MB-231 Zellen werden als invasiver als MCF-7 Zellen angesehen. Auch hier waren MDA-MB-231 Zellen trotz des durch die Behandlung reduzierten invasiven Potentials absolut gesehen immer noch invasiver als die MCF-7 Zellen (122).

In MCF-7 Zellen, die mit p,p'-DDE 10^{-5} M inkubiert worden waren, wurde die Expression der östrogen-abhängigen Gene pS2, PR, ÖR, BRCA1 und CCND1 (Cyclin D1) gemessen. p,p'-DDE 10^{-5} M führte zu statistisch signifikanten Veränderungen in der Genexpression. pS2, PR, BRCA1 und CCND1 wurden upreguliert, der ÖR wurde downreguliert. Diese Veränderungen waren geringer als die von o,p'-DDT induzierten. Durch Ko-Inkubation mit dem Antiöstrogen ICI 182,780 konnte die Transkription der Gene durch p,p'-DDE fast vollständig zum Stillstand gebracht werden. ÖRs im Nukleus scheinen für die Transkription dieser Gene notwendig zu sein. Der bereits oben beschriebene Src/Ras/Erk-Pathway wird von p,p'-DDE im Gegensatz zu o,p'-DDT nicht aktiviert. p,p'-DDE 10^{-5} M führte weder zu einer Src-, noch zu einer Erk1- und Erk2-Aktivierung. Passend dazu konnte ein Erk-Inhibitor weder die von p,p'-DDE induzierte Genexpression in MCF-7 Zellen, noch die Proliferation in MCF-7 BOS Zellen signifikant beeinflussen. Der Src/Erk-Pathway scheint nur wenig zur p,p'-DDE induzierten Transkription beizutragen (127). p,p'-DDE 10^{-5} M führte in MCF-7 Zellen (ÖR-positiv) zu einer signifikanten Steigerung von 16α -Hydroxyöstron und zu einer Verringerung von 2-Hydroxyöstron. Dadurch kommt in vitro es zu einer Verlagerung des Östrogenmetabolismus und der 16α -Hydroxyöstron/2-Hydroxyöstron-Ratio in Richtung des genotoxischen 16α -Hydroxyöstons (131). $10 \mu\text{M}$ p,p'-DDE führte in MCF-7 Zellen nach

zwei Stunden zu einer signifikanten Hemmung der 2-Hydroxylase-Aktivität von CYP1A1, die nach 48 Stunden nicht mehr signifikant war (141). Auch p,p'-DDE führte (wie o,p'-DDT und p,p'-DDT) in den Konzentrationen von 1 und 10 µM, nicht aber 100 nM, zu einer Hemmung der progesteron-induzierten Luziferaseaktivität eines progesteron-responsiven Luziferasereportergens in T-47D Zellen. In einem kompetitiven Bindungsassay konnte p,p'-DDE nicht an den PR binden (129).

Johnson et al. pflanzten Pellets, die p,p'-DDE abgeben, in das Brustfettgewebe von präpubertären MMTV-neu-Mäusen ein. Die AutorInnen suchten gezielt präpubertäre Mäuse aus, um zu untersuchen, wie sich die Exposition von o,p'-DDE und p,p'-DDE während der Mammogenese auf die Bildung von HER2-positiven Brusttumoren auswirkt. Die Pellets gaben insgesamt 20 µg p,p'-DDE/Maus ab. Die maximale Inzidenz an Mammakarzinomen veränderte sich im Vergleich zu Kontrollen nicht. Der Zeitpunkt des Auftretens der Mammakarzinome veränderte sich hingegen. Dieser lag ca. 1,5 Monate vor den Kontrollen (p = 0,0008). Die AutorInnen vermuten aufgrund dieser Ergebnisse, dass p,p'-DDE die Tumorgenese von Mammakarzinomen vorantreiben könnte, aber nicht verursacht. DDT Exposition erfolgt üblicherweise in Mixturen, weswegen einer Gruppe von Mäusen Pellets, die eine 2:1 Ratio von p,p'-DDE zu o,p'-DDE enthielten (insgesamt 5 µg/Pellet), eingepflanzt wurden. Ziel war es, eine eventuelle additive Wirkung auf die Tumortalenz zu zeigen. Im Vergleich zu Kontrollen kam es allerdings zu keiner Veränderung der Latenz (142).

3.1.3.1 Bulletpoints:

- p,p'-DDE stimuliert die Proliferation von MCF-7 Zellen dosisabhängig (119,127).
- p,p'-DDE zeigt eine ausgeprägte antiandrogene Aktivität, die stärker als die östrogene Aktivität ist (118).
- Das antiandrogene p,p'-DDE könnte über eine Deregulation der Crosstalks zwischen AR und ÖR-α zur Proliferation von hormonsensitiven Zellen führen (140).
- In MCF-7 Zellen führt p,p'-DDE ÖR-abhängig zur Transkription östrogenabhängiger Gene. Der Src/Ras/Erk-Pathway scheint wenig dazu beizutragen (127).
- p,p'-DDE scheint die Invasivität von MCF-7 Zellen zu steigern und die von MDA-MB-231 Zellen zu senken (122).
- p,p'-DDE steigert die 16α-Hydroxyöstron/2-Hydroxyöstron-Ratio in vitro und hemmt die 2-Hydroxylase-Aktivität von CYP1A1 (131,141).
- p,p'-DDE hemmt die progesteron-induzierte Luziferaseaktivität eines Reportergens, bindet aber nicht an den PR (129).

- In vivo könnte peripubertär verabreichtes p,p'-DDE im Rattenmodell zu einer verkürzten Latenzzeit bei Mammakarzinomen führen (142).

3.2 β -Hexachlorocyclohexan

β -HCH konnte Ö_2 in kompetitiven Bindungsassays nicht vom ÖR verdrängen (120,143). Die Verbindung führt zu einer Transaktivierung des ÖR- α und ÖR- β (118). MCF-7 Zellen proliferieren dosisabhängig durch β -HCH Behandlung (119,120). Durch Hinzufügen von β -HCH zu MCF-7 Zellen kommt es bereits bei Konzentrationen von 10^{-8} M zu einer signifikanten Proliferation. Maximale Proliferation zeigte sich bei einer Konzentration von 10^{-5} M. Behandlung von MDA-MB-231, MDA-MB-468 und HS578T Brustkrebszellen (alle ÖR-negativ) mit 10^{-5} M β -HCH führte zu keiner Proliferation. Das könnte darauf hindeuten, dass β -HCH intakte ÖRs benötigt, um die Zellproliferation zu stimulieren (120). 1 μ M β -HCH führte in MCF-7 Zellen zu einer vermehrten Expression des östrogen-regulierten pS2 Gens. Die Expression konnte durch Zugabe von ICI 164,384, einem Antiöstrogen, blockiert werden (120). Hatakeyama et al. führten mit MCF-7 Zellen und β -HCH ein Fokusassay durch. Durch Inkubation der Zellen mit 10 nM bzw. 100 nM β -HCH kam es zu Fokusbildungen ($p \leq 0,05$). Durch Zugabe von 4-Hydroxytamoxifen kam es zur vollständigen Unterdrückung der Aktivität von β -HCH ($p < 0,05$). Zugabe von 9G6, einem anti-c-Neu/erbB2-Rezeptor-Antikörper führte zu einer signifikanten Hemmung der Aktivität. Ein Erb1-Antikörper (Ab-1) konnte die Fokusbildung nicht signifikant hemmen (144). Schlüsselemente des Signalpathways von β -HCH in MCF-7 Zellen stellen der ÖR- α , MAPK und HER2 dar. MCF-7 Brustkrebszellen wurden 13 Monate lang mit 100 nM oder 1 μ M β -HCH behandelt. Nach 13 Monaten zeigten die mit 1 μ M oder 100 nM behandelten Zellen im Vergleich zu Kontrollen signifikant mehr verankerungs-unabhängiges Wachstum ($p < 0,01$). Das HER2-Level war im Vergleich zu Kontrollen bei beiden Konzentrationen 15-fach erhöht ($p < 0,01$). p42/44 MAPK (Erk1/2) und ÖR- α wurden downreguliert (jeweils $p < 0,01$). Mit 1 nM Ö_2 behandelte Zellen reagierten ähnlich, außer dass es zu keiner signifikanten Erhöhung des HER2-Levels kam (94).

β -HCH reguliert die Expression der östrogenabhängigen Gene pS2, PR, ÖR, BRCA1 und CCND1 (Cyclin D1) in MCF-7 Zellen. 10^{-5} M β -HCH zeigte ein ähnliches, signifikantes Expressionsprofil, wie es auch durch Ö_2 hervorgerufen wird (ÖR wurde downreguliert, die übrigen wurden upreguliert). Durch Ko-Inkubation mit einem Antiöstrogen (ICI 182,780) konnte die Transkription der östrogenabhängigen Gene fast vollständig unterdrückt werden.

Das zeigt, dass ÖRs im Nukleus für die Transkription dieser Gene notwendig sind. Zu den schnellen/ nicht-genomischen Reaktionen einer Zelle auf Ö₂ gehört die Aktivierung von Src, die in weiterer Folge über den Src/Ras/Erk-Pathway zur Aktivierung von Erk1 und Erk2 führt. Dieser Pathway kann auch in Abwesenheit von Ö₂ zur Aktivierung eines nukleären Östrogenrezeptors führen. β-HCH 10⁻⁵ M führte zu einer statistisch signifikanten schnellen Aktivierung/ Phosphorylierung von Src und Erk1/Erk2. Bemerkenswert dabei war, dass die Aktivierung länger als die von Ö₂ induzierte anhielt. Zur Evaluierung des Einflusses von diesem Pathway auf die Expression der oben genannten vier Gene wurde das Experiment unter Zugabe eines Inhibitors der MEK1 („Erk activating Enzyme“) wiederholt. Durch β-HCH induzierte Expression von pS2, BRCA1 und PR wurde signifikant reduziert. Umgekehrt kam es zu einer signifikant verringerten Downregulation der ÖRs. Die Expression von CCND1 konnte nicht beeinflusst werden. Die Proliferation von MCF-7 BOS Zellen, die mit einer konstanten Dosis β-HCH behandelt wurden, konnten durch den Erk-Inhibitor dosisabhängig signifikant reduziert, aber nicht vollkommen aufgehalten werden (127). MCF-10AT1 Zellen, die mit 1 μM β-HCH inkubiert wurden, zeigten eine signifikant erhöhte Expression der Proto-Onkogene HER2, Cyclin D1 und p27. Zudem zeigten sich MMP12 und MMP13, der Inflammationsmarker NFκB sowie die Zellstatusmarker IGF-1R und CK19 signifikant erhöht. MMTV-Mäuse überexprimierten HER2 und entwickelten im Alterungsprozess Brusttumore. Weibliche MMTV-Mäusen wurden ab dem Alter von sechs Wochen monatlich insgesamt viermal mit 33 mg/kg β-HCH injiziert. Im Vergleich zu den Kontrollen kam es zu einem früheren Auftreten von Tumoren (ca. acht Wochen) und zu einer erhöhten Inzidenzrate (ca. 25 %) (145).

3.2.1 Bulletpoints:

- β-HCH bindet nicht an den ÖR, zeigt aber eine Transaktivierung des ÖR-α und -β. Die östrogen-kompetenten MCF-7 Zellen proliferieren im Gegensatz zu ÖR-negativen Brustkrebszellen unter dem Einfluss von β-HCH dosisabhängig (118,120,143).
- In MCF-7 Zellen induziert β-HCH ein ähnliches Genexpressionsprofil wie Ö₂ und aktiviert den ÖR über den Src/Ras/Erk-Pathway in MCF-7 BUS Zellen (127).
- ÖR-α, MAPK und HER2 stellen Schlüsselstellen des Pathways der Chemikalie in MCF-7 Zellen dar (94).
- β-HCH induziert verankerungs-unabhängiges Wachstum (94).

- β -HCH führt in MMTV Mäusen zu einer verkürzten Tumorlatenz und einer erhöhten Inzidenzrate (145).

3.3 Dieldrin

Im E-Screen-Assay von Soto et al. zeigte Dieldrin erst ab 10 μ M östrogene Effekte im Sinne einer signifikanten Proliferation von MCF-7 Zellen. In einer Konzentration höher als 10 μ M hatte Dieldrin eine toxische Wirkung. Die östrogene Potenz des Pestizids war dabei um sechs Zehnerpotenzen geringer als die von Ö_2 und somit vergleichbar mit der Potenz von technischem DDT (146). In einem anderen Experiment konnte Dieldrin erst ab 50 μ M eine signifikante Zellteilung in MCF-7 Zellen induzieren (147). Andersen et al. konnten bereits bei einer Dosis von 5 μ M eine signifikante Proliferation von MCF-7 BUS Zellen und ÖR -Transaktivierung messen. Der maximale Effekt lag bei 25 μ M. Toxische Effekte hatte Dieldrin ab Konzentrationen über 25 μ M. Zudem zeigte sich Dieldrin als schwaches Antiandrogen mit messbaren Effekten bei 20 μ M (148). Im Transaktivierungs-Assay von Kojima et al. induzierte Dieldrin eine Transaktivierung des $\text{ÖR-}\alpha$, aber nicht des $\text{ÖR-}\beta$. Zudem konnten die AutorInnen antiandrogene Aktivität messen. Während die östrogene Aktivität im Größenbereich von p,p'-DDE zu liegen scheint, war die antiandrogene Aktivität in diesem Experiment um eine Zehnerpotenz geringer als die von p,p'-DDE (118). Im Gegensatz dazu konnten Lemaire et al. zeigen, dass Dieldrin eine schwache antiöstrogene Wirkung am $\text{ÖR-}\beta$ hat. Das Pestizid konnte in einem kompetitiven Bindungsassay bei einer Dosierung von 10 μ M (aber nicht darunter) die Bindung von Ö_2 an den $\text{ÖR-}\beta$ signifikant hemmen (117). Dieldrin konnte in einem anderen kompetitiven Bindungsassay hingegen bis 10 μ M nicht an den ÖR binden, hatte aber bei 10 μ M eine schwache östrogene Wirkung in einem Fokusassay mit MCF-7 Zellen (149). Auch in einem Bindungsassay von Ramamoorthy et al. konnte Dieldrin bis 10^{-5} M nicht an den ÖR binden und auch keine Proliferation oder CAT-Aktivität an östrogen-responsiven Plasmiden in MCF-7 Zellen auslösen (10^{-8} - 10^{-5} M). In einem Reportengen-Assay in Hefe-Zellen konnte Dieldrin ebenfalls keine ÖR -medierte β -Galactosidase-Aktivität induzieren (150). Dieldrin (1-60 μ M) konnte in T-47D Adenokarzinomzellen in einem Reporter-gen-Assay Luziferaseaktivität induzieren. 50 % der östrogenen Aktivität wurden bei 24 μ M gemessen, das Maximum lag bei 60 μ M (151). HBEC Zellen wurden mit Dieldrin (3, 6, 13, 25 und 50 μ M) für 90 min behandelt. Ab 13 μ M kam es zu einer signifikanten dosisabhängigen Hemmung der GJIC. Dieldrin 25 μ M induzierte auch nach 24 Stunden noch eine signifikante

Hemmung der GJIC. Die gleiche Konzentration induzierte eine Hyperphosphorylierung von Connexin43 und einen Verlust von Connexin43-Membranplaques. Es kam zu keiner Veränderung der Connexin43-mRNS-Level (Dieldrin 3 und 25 μM). Veränderungen der GJIC wurden mit Progression der Karzinogenese assoziiert (139). Dieldrin (5 und 10 μM , aber nicht 1 μM) steigerten die Resistenz von MDA-MB-231 Zellen gegenüber Anoikis in vitro signifikant. Anoikis ist eine Form von Apoptose, die durch unzureichende Verankerung von Zellen ausgelöst wird (152). Dieldrin 10 μM führte in MELN Zellen (stammen von MCF-7 Zellen, exprimieren den ÖR- α) zu einer signifikant erhöhten Expression des VEGFs, die durch das Antiöstrogen ICI 182,780 vollständig gehemmt werden konnte. Ein MEK-Inhibitor (Erk1/2), ein PI3-K/Akt-Inhibitor und ein p38-Kinase-Inhibitor konnten die VEGF-Induktion hemmen. Das weist darauf hin, dass die VEGF-Expression in MELN Zellen ÖR- α -abhängig ist und sie von verschiedenen Kinase-Pathways reguliert werden könnte. p38 scheint nur von Dieldrin und nicht von Ö₂ bei der VEGF-Regulation verwendet zu werden. Das könnte ein Hinweis darauf sein, dass Dieldrin und Ö₂ einerseits gemeinsame und andererseits auch verschiedene Pathways zur VEGF-Regulation in MELN Zellen verwenden. VEGF fördert die Angiogenese von Brusttumoren in vivo (153).

Sprague-Dawley-Ratten wurden mit einer einzigen Dosis 38 mg/kg Dieldrin behandelt. Es kam zu einer signifikant erhöhten Expression von CYP1A1, CYP1A2 und CYP1B1 in der Brustdrüse der Ratten ($p < 0,05$). Die Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 war mit der Bildung von 2-Catecholöstrogenen assoziiert, die von CYP1B1 mit der Bildung von 4-Catecholöstrogenen. Die Induktion von CYP1A1 und CYP1A2 war signifikant höher als die Induktion von CYP1B1. Passend dazu war die 2-Hydroxylierung signifikant höher als die 4- und die 16 α -Hydroxylierung ($p < 0,05$) (154). Die Nachkommen von FVB/N-TgMMTV-neu-Mäusen, die vor der Empfängnis fünf Tage lang mit 0,45, 2,25 oder 4,5 $\mu\text{g/g KG}$ Dieldrin täglich und während des Säugens einmal wöchentlich behandelt wurden, wurden auf die Entwicklung von Mammatumoren untersucht. Nur die höchste Dieldrin-Konzentration konnte nach 22 Wochen eine signifikant erhöhte Tumorzahl und ein signifikant erhöhtes Tumolvolumen in den Nachkommen induzieren (155).

3.3.1 Bulletpoints

- Dieldrin wirkt am ÖR- α agonistisch und am AR antiandrogen (118,148). Am ÖR- β zeigte Dieldrin in zwei verschiedenen Assays einmal eine antiöstrogene Wirkung und einmal keine Wirkung (117,118).

- Die östrogene Potenz von Dieldrin in MCF-7 Zellen ist im Vergleich zu der von Östradiol 10^6 Mal geringer (146).
- Dieldrin steigert die Anoikis-Resistenz in ÖR-negativen MDA-MB-231 Brustkrebszellen (152).
- Dieldrin induziert ÖR-abhängig VEGF in vitro. PI3-K/Akt, Erk1/2 und p38 scheinen in die Regulation von VEGF involviert zu sein. Dabei scheint Dieldrin sowohl Pathways zu aktivieren, die auch von O_2 bei der VEGF-Regulation aktiviert werden, als auch solche die nicht von O_2 aktiviert werden (153).
- Dieldrin führt in hoher Dosierungen zur Induktion von CYP1A1 und CYP1B1 in der Brustdrüse von Sprague-Dawley-Ratten (154). Die Nachkommen von Mäusen, die vor der Empfängnis und während des Säugens mit Dieldrin ($4,5 \mu\text{g/g KG}$) behandelt wurden, zeigten eine erhöhte Brusttumorinzidenz und ein erhöhtes Tumolvolumen (155).
- Dieldrin hemmt GJIC in HBEC und führt zu einem Verlust von Connexin43-Membranplaques (139).

3.4 Methoxychlor:

Methoxychlor zeigt östrogene Aktivität in MCF-7 Zellen (156–158). Sowohl in einem MCF-7-Proliferations-Assay (E-Screen) als auch in einem hefebasierten Assay zeigte sich die Östrogenität des Pestizids 10^5 Mal bzw. 10^7 Mal geringer als die von O_2 (159). In einem Transaktivierungs-Assay von Lemaire et al. wirkte Methoxychlor als Agonist am ÖR- α und als Antagonist am ÖR- β . Methoxychlor ($10 \mu\text{M}$ und $3 \mu\text{M}$, aber nicht $1 \mu\text{M}$) konnte in einem kompetitiven Bindungsassay O_2 vom ÖR- β in signifikantem Ausmaß verdrängen (117). Auch im Transaktivierungs-Assay von Kojima et al. zeigte Methoxychlor Agonismus am ÖR- α und Antagonismus am ÖR- β und am AR. Der Agonismus am ÖR- α war am stärksten ausgeprägt (118). Um pS2-mRNS in MCF-7 Zellen zu induzieren, wurden Methoxychlor-Konzentrationen benötigt, die 10^5 - 10^6 Mal höher waren als die von O_2 mit 10^{-10} M. Methoxychlor induzierte auch die Expression von $\alpha 1$ -Antichymotrypsin und unterdrückte die der Monoaminoxidase-A und des „transforming growth factor“- $\beta 3$ (TGF- $\beta 3$) (alle östrogenreguliert). Diese Effekte scheinen durch den ÖR- α induziert zu werden (160). In T-47D Brustkrebszellen konnte Methoxychlor in einem Reporteragen-Assay ab 600 nM Luziferaseaktivität induzieren. Maximale Aktivität wurde bei $30 \mu\text{M}$ gemessen (151). Methoxychlor führte bei einer Konzentration von 10^{-5} M, nicht aber bei 10^{-6} oder 10^{-7} M zu einer signifikanten Proliferation von MCF-7 Zellen. 10^{-6} M des Pestizids führten in MCF-7

Zellen zu einer signifikanten Downregulation von p21, aber keiner Upregulation von Cyclin D1. Die Proliferation und die transkriptionelle Regulation von p21 durch Methoxychlor scheint, zumindest teilweise, ÖR- α -abhängig zu sein. Die AutorInnen postulieren, dass Methoxychlor die G₁/S-Transition in vitro über ÖR- α vorantreiben könnte (161). Methoxychlor aktiviert als nicht-planares Pestdizid den ÖR- α nicht über die AF-1 und AF-2 (siehe Kapitel 1.3.1.1), sondern durch Interaktion der Aminosäuren Asp-351 und Asp-538 mit AF1. Dadurch könnte der ÖR- α eine Konformation einnehmen, die nicht der Ö₂-induzierten entspricht. Durch die unterschiedlichen Konformationen könnte es zu einer potentiell gewebe-selektiven Modulation des ÖR durch Methoxychlor kommen (157). In einem kompetitiven Bindungsassay konnte Methoxychlor bis zu einer Konzentration von 10 μ M weniger als 50 % Ö₂ vom GPER verdrängen (65).

3.4.1 Bulletpoints

- Methoxychlor übt eine östrogene Aktivität in MCF-7 Zellen aus (151,156–159).
- Methoxychlor wirkt agonistisch am ÖR- α und antagonistisch am ÖR- β (117,118).
- Methoxychlor induziert Proliferation und Downregulation von p21 in MCF-7 Zellen (161).
- Methoxychlor aktiviert den ÖR- α durch Interaktion der AF-1 mit Asp-351 und Asp-538 anstelle von AF-2. Dadurch könnte es zur Konformationsveränderung des ÖR kommen, die nicht der von Ö₂ induzierten entspricht (157).

3.5 Chlordan:

Chlordan 10 μ M führt zu einer Transaktivierung des ÖR- α und - β (117). Auch Kojima et al. konnten zeigen, dass sowohl cis- als auch trans-Chlordan den ÖR- α und - β transaktivieren. Zudem konnte ein schwacher Antagonismus am AR objektiviert werden (118). Chlordan 10⁻⁷ M konnte Proliferation von MCF-7 Zellen hervorrufen. Durch Zugabe von IGF-I konnte diese nicht weiter gesteigert werden (162). Technisches Chlordan 10 μ M hingegen konnte in MCF-7 Zellen keine Proliferation induzieren (163). Genauso wenig konnte Chlordan 100 nM eine Fokusformation von MCF-7 Zellen hervorrufen. In zellfreien Konditionen konnte Chlordan (1 und 100 nM) HER2 nicht aktivieren (125). Technisches Chlordan (10⁻⁶-10⁻⁴ M) konnte in einem hefebasierten ÖR-Transaktivierungs-Assay keine β -Galactosidase-Aktivität induzieren (150). In einem Reportergen-Assay in T-47D Zellen konnte Chlordan (1-10 μ M)

östrogene Aktivität induzieren. Maximale Luziferaseaktivität wurde bei 10 μM gemessen, 50 % bei 6,2 μM (151). Chlordan wirkt als Antagonist am $\text{ERR}\alpha$ -1. Dieser Rezeptor wird auch „Orphan“-Rezeptor genannt, da er keinen Agonisten hat. Es besteht eine hohe Sequenzhomologie zum $\text{ÖR-}\alpha$, trotzdem bindet er keine Androgene oder Östrogene. In einem $\text{ERR}\alpha$ -1-Transfektions-Experiment mit der SK-BR-3 Brustkrebszelllinie konnte Chlordan 10 μM die $\text{ERR}\alpha$ -1-induzierte CAT-Aktivität signifikant reduzieren (164).

3.5.1 Bulletpoints

- Chlordan transaktiviert den $\text{ÖR-}\alpha$ und $-\beta$ (117,118).
- Chlordan wirkt als Antagonist am $\text{ERR}\alpha$ -1 (164).
- Chlordan zeigt in einigen Experimente östrogene Aktivität (151,162), in anderen hingegen nicht (125,151,163).

3.6 Endosulfan

Endosulfan- α , $-\beta$ und technisches Endosulfan führten ab 10 μM zur Proliferation von MCF-7 Zellen (146). Auch in einem Assay von Wade et al. konnte technisches Endosulfan Zellteilung von MCF-7 Zellen bei 10 und 50 μM , aber nicht bei 2 oder 0,4 μM induzieren. Das Antiöstrogen ICI 164,384 konnte die hervorgerufene Zellteilung signifikant hemmen (147). Technisches Endosulfan führte hingegen bei Andersen et al. bereits bei 1 μM zu einer signifikanten Proliferation und ÖR -Transaktivierung in MCF-7 Zellen, mit einem Maximum bei 25 μM . Bei Ko-Inkubation mit Ö_2 potenzierte Endosulfan (im Gegensatz zu Dieldrin) die Wirkung des Hormons. Endosulfan zeigte eine schwache antiandrogene Wirkung bei 20 μM (148). Um pS2-mRNS in MCF-7 Zellen zu induzieren, wurden Konzentrationen an Endosulfan benötigt, die 10^5 - 10^6 Mal höher waren als die von Ö_2 (160). In einem Fokusassay mit MCF-7 Zellen zeigten Endosulfan- α und $-\beta$ bei 10 μM (aber nicht darunter) eine schwache östrogene Wirkung. Bei Ko-Inkubation mit Ö_2 konnten die Isomere die durch Östradiol 1 nM induzierten Fokuse nicht beeinflussen. In einem kompetitiven Bindungsassay konnten die Isomere (bis 10 μM) nicht an den ÖR binden (149). Bei Cossette et al. proliferierten MCF-7 Zellen bei einer Dosierung von 10^{-6} - 10^{-8} M Endosulfan (Isomerenverhältnis nicht angegeben). Die maximale Zellteilung lag bei 10^{-7} M. Durch Ko-Inkubation mit IGF-I kam es zu einer weiteren signifikanten Steigerung der Proliferation (162). Endosulfan 10 μM (Isomerenverhältnis nicht angegeben) induzierte eine Transaktivierung des $\text{ÖR-}\alpha$ und wirkte antagonistisch am $\text{ÖR-}\beta$. 10 μM jedoch nicht 3 oder

1 μM konnten in einem Bindungsassay die Bindung von Ö_2 an den $\text{ÖR-}\beta$ signifikant hemmen (117). In T-47D Adenokarzinomzellen konnte Endosulfan (1-10 μM) Luziferaseaktivität in einem Reporter-gen-Assay induzieren. Maximal war die ERE-Luziferaseaktivität bei 10 μM , 50 % Aktivität konnte bei 5,9 μM gemessen werden (151). In einem hefebasierten Reporter-gen-Assay konnte Endosulfan 10^{-4} M eine 2000-fache Steigerung der β -Galaktosidase-Aktivität hervorrufen (150). Endosulfan- α führt zu einer Transaktivierung des $\text{ÖR-}\alpha$ und- β und übte eine antiandrogene Wirkung aus. Dabei war die Transaktivierung $\text{ÖR-}\alpha$ um eine Zehnerpotenz stärker als die des $\text{ÖR-}\beta$ und die antiandrogene Aktivität. Endosulfan- β induzierte eine Transaktivierung des $\text{ÖR-}\beta$ und zeigte antiandrogene Aktivität, konnte aber keine Transaktivierung des $\text{ÖR-}\alpha$ hervorrufen (118).

Bradlow et al. konnten zeigen, dass Endosulfan- α und - β (jeweils 10^{-5} M) die Ratio der Östrogenmetaboliten 16α -Hydroxyöstron/ 2-Hydroxyöstron in MCF-7-Mammakarzinomzellen signifikant erhöhte. Die beiden Isomere führten zu einer Abnahme von 2-Hydroxyöstron und einer signifikanten Zunahme von 16α -Hydroxyöstron (131). Passend dazu konnten 10 μM Endosulfan- α die basale und Dioxin (TCDD)-induzierte CYP1A1-mRNS in MCF-7 und T-47D Zellen signifikant senken, ohne Einfluss auf die CYP1B1 Level zu nehmen. Außerdem kam es zu einer signifikanten Hemmung der basalen und TCDD-induzierten CYP1A1-Promoteraktivität in MCF-7 Zellen, nicht aber zu einer Hemmung der Promoteraktivität von CYP1B1. Durch Zugabe des Antiöstrogens ICI 172,780 wurde die Wirkung von Endosulfan- α größtenteils aufgehoben. Das zeigt, dass Endosulfan- α durch Hemmung der CYP1A1-Aktivität, ohne die CYP1B1 Aktivität zu beeinflussen, einen Shift im Östrogenmetabolismus verursachen könnte bzw. die CYP1A1/CYP1B1-Ratio verändern könnte (165). Wie bereits im Kapitel 1.3 beschrieben, kann der ÖR neben dem klassischen Pathway auch über andere Transkriptionsfaktoren wie SP-1 oder AP-1 zur Genexpression führen. In MCF-7 Zellen, in denen pSP1₃ und $\text{ÖR-}\alpha$ exprimiert wurde, konnte Endosulfan (Isomerenverhältnis nicht angegeben) (25, 50 und 75 μM) in allen Dosierungen eine signifikante Sp/ $\text{ÖR-}\alpha$ -Luziferaseaktivität induzieren. Statt dem Wildtyp wurden die $\text{ÖR-}\alpha$ Varianten $\text{ÖR-}\alpha\Delta\text{ZF1}$, $\text{ÖR-}\alpha\Delta\text{ZF2}$, $\text{ÖR-}\alpha(1-553)$ oder $\text{ÖR-}\alpha(1-537)$ exprimiert. Diese Varianten weisen eine Deletion des Zinkfinger 1, des Zinkfinger 2, der F-Domäne und Teile der E-Domäne mit der F-Domäne respektive auf. Endosulfan konnte bei allen eine signifikante $\text{ÖR-}\alpha$ (Variante)/Sp-Luziferaseaktivität induzieren. Interessant dabei ist, dass Ö_2 durch alle Varianten außer $\text{ÖR-}\alpha(1-537)$ eine Aktivität induzieren konnte. Dieser Rezeptorvariante fehlt die Helix-12, die für die Interaktion zwischen $\text{ÖR-}\alpha$ und Ko-Aktivatoren eine wichtige Rolle spielt. Während 4-

Hydroxytamoxifen und ICI 182,780 nur beim Wildtyp, ÖR- α (1-553) und ÖR- α (1-537), eine Luziferaseaktivität induzieren konnten. In MDA-MB-231 Zellen zeigte sich ein ähnliches Muster. Das bedeutet, dass Endosulfan, Östrogene und Antiöstrogene ÖR- α Wildtyp/SP-Interaktionen bzw. ÖR- α Varianten/SP-Interaktionen in MCF-7 und MDA-MB-231 Zellen auf unterschiedliche Weise aktivieren. Endosulfan verhält sich je nach exprimierter ÖR- α -Variante östrogen- bzw. antiöstrogen, wie auch ein SERM. Die AutorInnen postulieren, dass in diesem Fall Transaktivierungs-Assays und ÖR-Bindungsassays zur Charakterisierung der Pestizide nicht ausreichen (166).

3.6.1 Bulletpoints

- Endosulfan induziert Proliferation, pS2-Expression und Fokusbildung in MCF-7 Zellen (146–149,162).
- Endosulfan- α transaktiviert den ÖR- α und - β . Endosulfan- β transaktiviert nur den ÖR- β (118). Bei Lemaire et al. hingegen zeigt Endosulfan (Isomerenverhältnis nicht angegeben) Agonismus am ÖR- α und Antagonismus ÖR- β (117).
- Endosulfan- α und - β zeigen eine schwache antiandrogene Wirkung (118,148).
- Endosulfan- α und - β steigern die 16 α -Hydroxyöstron/ 2-Hydroxyöstron-Ratio in MCF-7 Zellen. Endosulfan- α senkt in MCF-7 Zellen die CYP1A1-mRNS und Promoteraktivität, ohne die von CYP1B1 zu beeinflussen (131,165).
- Endosulfan könnte wie ein SERM wirken (166).

3.7 Hexachlorbenzol

In den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen konnte HCB (0,005, 0,05, 0,5 und 5 μ M) keine gesteigerte Proliferation induzieren. In ÖR-positiven MCF-7 Zellen hingegen konnten 0,005 und 0,05 μ M, aber nicht die beiden höheren Dosierungen eine signifikante Proliferation induzieren. Diese HCB-induzierte Proliferation konnte durch den ÖR- α -Antagonist ICI 182,780 gänzlich unterdrückt werden. Die AutorInnen schließen daraus, dass die Proliferation von MCF-7 Zellen unter HCB nicht dosisabhängig, sondern ÖR- α -abhängig sein könnte. Zudem wurde der IGF-I-Signalpathway in MCF-7 Zellen untersucht. Die beiden geringeren Konzentrationen konnten signifikant erhöhte IGF-IR und Insulin Rezeptor (IR) Levels induzieren. Alle Dosierungen führten zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung des „Insulin receptor substrate 1“ (IRS)-1. ICI 182,780 konnte das HCB

beeinflusste IGF-I Signaling signifikant hemmen, was auf eine Aktivierung durch ÖR- α in MCF-7 Zellen hindeuten könnte. 0,005 μM HCB führte im Gegensatz zu 5 μM in MCF-7 zu einer Phosphorylierung der c-Src Kinase, des ÖR- α und zu einer Downregulation des ÖR- α . Die beiden höheren Dosierungen (0,5 und 5 μM) führten in den MCF-7 Zellen zu einer signifikant vermehrten Expression von CYP1A1 (AhR-mediert) und zu einer signifikant gesteigerten Apoptoserate (167).

HCB führte konzentrationsabhängig (0,005, 0,05, 0,5 und 5 μM) zu Zellzyklus-Veränderungen in MCF-7 Zellen. 5 μM HCB verzögerte signifikant den Eintritt der Zellen in die S-Phase (vs Kontrollen und vs 0,005 μM) und führte zu einer vermehrten Assoziation von p27 mit Cyclin E und von Cyclin E mit CDK2. Ein Hinweis darauf, dass 5 μM HCB zur vermehrten Assoziation des p27-Cyclin-E-CDK2-Proteinkomplexes, der den Zellzyklus hemmt, führen könnte. Zudem kam es zu einer Reduktion der c-Src Expression und der nukleären Lokalisation von p27. 0,005 μM HCB hingegen induzierte signifikant höhere Level an Cyclin D1. 0,005, 0,05, 0,5 μM induzierten alle eine signifikant vermehrte p27/c-Src-Interaktion und reduzierten die Lokalisation von p27 im Nukleus. Keine der getesteten Konzentrationen konnte Cyclin E oder p27 induzieren (168).

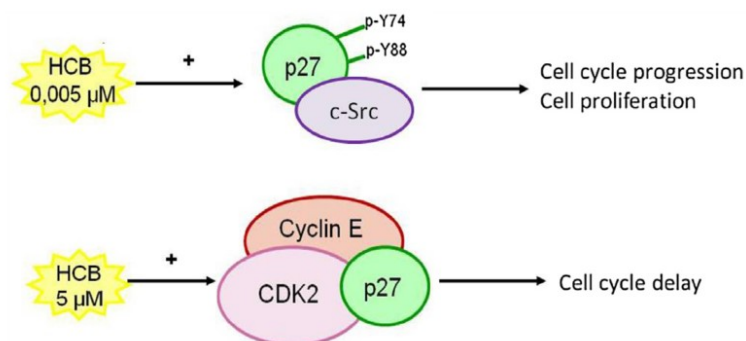


Abb. 10. Zellzyklus Modulation durch HCB in MCF-7 Zellen:

(Reproduziert von (169) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) Mögliche Pathways der HCB-induzierten Zellzyklusregulation in MCF-7 Zellen. Die c-Src-p27 Komplexbildung führt zu weniger p27 im Nukleus. Dadurch kann p27 den Cyclin-E-CDK2-Komplex nicht bzw. in geringerem Ausmaß hemmen und es zu kommt zu einer Zellzyklus-Progression (168).

HCB führte zu vermehrter Migration und Invasion in den ÖR- α -negativen MDA-MB-231 Brustkrebszellen. Die Zellen wurden mit (0,005, 0,05, 0,5 und 5 μM) HCB behandelt. Im „wound-healing“ Assay führten 0,05, 0,5 und 5 μM zu signifikant vermehrter Migration. Im Transwell-Assay induzierte nur die Konzentration 5 μM eine signifikante Migration.

Diese konnte durch Inhibitoren des AhR, c-Src und HER1 jeweils unterdrückt werden, was darauf schließen lässt, dass diese Pathways an der Migration beteiligt sein könnten. HCB induzierte c-Src-Aktivierung signifikant und dosisabhängig in allen Dosierungen. Bei 0,05, 0,5 und 5 μM HCB kam es zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der Phosphorylierung von HER1 und Erk1/2 und zu einer signifikant vermehrten Phosphorylierung der STAT5b. Durch Ko-Inkubation mit 0,5 μM HCB und dem c-Src-Inhibitor PP2 oder dem HER1-Inhibitor AG1478 konnte gezeigt werden, dass nur HER1 und nicht c-Src in die Phosphorylierung von Erk1/2 involviert sein könnte, beide aber STAT5b aktivieren. Der AhR-Inhibitor 4,7-Orthophenanthrolin konnte die Erk1/2 bei 5 μM HCB, aber nicht bei 0,05 μM signifikant hemmen. Die STAT5b-Aktivierung hingegen konnte bei 0,05 und 5 μM durch den AhR-Inhibitor gehemmt werden. Zusammengefasst zeigt das, dass HCB die HER1/Erk1/2 und c-Src/HER1/STAT5b Pathways in MDA-MB-231 Zellen über AhR-abhängige und AhR-unabhängige Wege aktiviert könnte (170).

In MDA-MB-231 Zellen kam es zu einer signifikanten Aktivierung und Sekretion der MMP9 bei 0,05, 0,5 und 5 μM HCB. Die Dosierung 5 μM HCB führte zu einer signifikanten Steigerung der mRNA von MMP9 und MMP2. Sowohl der c-Src (PP2) und der HER1 (AG1478) Inhibitor konnten bei Ko-Inkubation mit 5 μM HCB die Steigerung von intrazellulären Proteinlevels von MMP9 vollständig verhindern, aber nur der HER1 Inhibitor konnte die durch HCB induzierte Aktivierung und Sekretion hemmen. Aus diesen Ergebnissen schließen die AutorInnen, dass c-Src und HER1 an der HCB-induzierten Expression von MMP9, aber nur HER1 an der Aktivierung und Sekretion derselben beteiligt sein könnten. Durch die beiden AhR-Inhibitoren α -NF und 4,7 PHE konnte gezeigt werden, dass AhR in die durch HCB ausgelöste Expression von MMP2 sowie Sekretion und Aktivierung von MMP9 involviert sein könnte (171).

Sprague-Dawley-Ratten wurden mit N-nitroso-N-methylurea (NMU) (50 mg/kg KG im Alter von 50, 80, und 110 Tagen) und HCB (100 mg/kg KG drei Mal wöchentlich insg. 1800 mg/kg KG) ab dem 65. Lebensstag behandelt. Die Ratten der NMU+HCB Gruppe entwickelten über den Beobachtungszeitraum signifikant mehr Tumoren pro Ratte und signifikant größere Tumoren als die NMU Gruppe. Die Gruppen, die nur mit HCB behandelt wurden, entwickelten keine Tumoren. Die Tumoralenzzeit wurde durch die HCB-Applikation nicht verändert. IGF-IR spielt eine wichtige Rolle im Brustkrebstumorwachstum. IGF-IR-, IRS-I- und IR-Level sowie IRS-I-Phosphorylierung in den nur mit HCB behandelten Brustdrüsen waren im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen signifikant erhöht. In den Tumoren (NMU+HCB) hingegen führte HCB im Vergleich zu den

mit NMU behandelten Ratten zu einer signifikanten Reduktion der IGF-IR-Proteinlevel und der IRS-I-Phosphorylierung, während die IR- und IRS-I-Level nicht signifikant verändert wurden. In der NMU+HCB Gruppe verhielten sich die IGF-IR-Level gegensätzlich zur HCB Gruppe. Die AutorInnen schließen daraus, dass HCB ein Ko-Karzinogen ist und dass der IGF-IR- und/ oder der IR-Signalpathway an der Wirkung von HCB beteiligt sein könnten (172).

Zur weiteren Beforschung wurden weibliche Sprague-Dawley-Ratten wie oben beschrieben behandelt. Die Ratten wurden in vier Gruppen eingeteilt: Kontrollen, HCB, NMU und HCB+NMU. Wieder kam es in der HCB Gruppe zu keiner Tumorentwicklung, auch die Latenzzeit wurde nicht verändert. In der NMU+HCB Gruppe kam es zu einer erhöhten Tumorinzidenz. Bei der histopathologischen Untersuchung der Brustdrüsen zeigten sich in der HCB Gruppe vermehrt hyperplastische Ducti, eine erhöhte Anzahl an „terminal end buds“ (TEBs), vermehrte Proliferation der Ducti und eine erhöhte Anzahl von Nuclei im Stroma. HCB führt in der Brustdrüse zu signifikant erhöhter c-Src-Konzentration und c-Src-, ÖR- α -, Erk1/2-, STAT5b-Phosphorylierung. Außerdem zeigten sich signifikante c-Src/HER1- und c-Src/ÖR- α -Interaktionen im Vergleich zu unbehandelten Ratten. In der HCB+NMU Gruppe führte HCB zu einem erhöhten Anteil an Tumoren mit mittel- und hochgradiger Nekrose, aber auch an Tumoren mit moderater oder schlechter Differenzierung (vs. NMU), zudem waren die Tumoren von mehr Mastzellen umgeben. c-Src-Konzentration und Phosphorylierung waren in Tumoren (NMU+HCB und NMU) signifikant höher als in der unbehandelten Kontrollgruppe. In NMU+HCB Tumoren waren die Phosphorylierung von c-Src, HER1, AKT, STAT5b und die Interaktion von c-Src/HER1 im Vergleich zur NMU Gruppe signifikant erhöht. Wie bereits oben erwähnt, führte HCB zu einer signifikanten Steigerung der Phosphorylierung des ÖR- α und der ÖR- α /c-Src-Interaktion. Kurioserweise kam es in HCB+NMU Tumoren zu einer signifikanten Reduktion an phosphoryliertem ÖR- α , Erk1 und Erk2 sowie zu einer signifikanten Verringerung der ÖR- α /c-Src-Interaktion (wieder im Vergleich zur NMU Gruppe). Die AutorInnen vermuten, dass dies durch den Feedbackmechanismus entstehen könnte. Sie postulieren, dass HCB in der Brustdrüse eine östrogene Mikro-Umgebung schaffe, die über ÖR- α und Erk zu den oben beschriebenen präneoplastischen Veränderungen in der Brustdrüse führen könnte. Im Gegensatz dazu scheint HCB in der HCB+NMU Gruppe einen antiöstrogenen Effekt, der zur malignen Transformation führen könnte, auszuüben. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass HCB zu tiefgreifenden histologischen Veränderungen in der Brust führt (173).

Delisle et al. behandelten weibliche Sprague-Dawley-Ratten mit HCB 100 mg/kg an fünf

aufeinanderfolgenden Tagen oder zwei Mal pro Woche für 50 Tage. Intention der AutorInnen war sowohl akute als auch chronische Exposition zu simulieren. Nach insgesamt 50 Tagen wurden die Brustdrüsen beider Gruppen untersucht. 45 Tage nach der akuten Exposition konnten keine Veränderung der junctionalen Proteine (Connexin43, E-Cadherin, β -Catenin) und Akt- sowie p-Akt-Level objektiviert werden. Nach chronischer Exposition hingegen kam es zu einer signifikanten Zunahme der Akt-, aber nicht der p-Akt-Level sowie zu einer signifikanten Abnahme von Connexin43, nicht aber der anderen beiden Junctionalen Proteine. Die Abnahme der Connexin43-Level nach chronischer HCB Exposition in vivo zeigte keinen Zusammenhang mit p-Akt (174).

In einem MDA-MB-231 Xenograftmodell mit weiblichen „Swiss Nude Mice“ wurde der Einfluss von HCB auf MDA-MB-231 Zellen in vivo untersucht. Die Mäuse wurden mit HCB (0,3, 3 und 30 mg/kg KG) behandelt. 0,3 und 3 mg/kg führten im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikanten Steigerung des Tumorzvolumens und -gewichtes. Die Verabreichung in allen drei Konzentrationen führte zu einer signifikant vermehrten c-Src-Phosphorylierung, aber zu keiner Steigerung der totalen c-Src-Konzentration. Die Dosierungen 3 und 30 mg /kg führten zu signifikant gesteigerter Phosphorylierung von HER1 und STAT5b. Alle drei Dosierungen induzierten signifikant höhere totale HER1- und STAT5b-Level. Die Erk1/2-Phosphorylierung und die totalen nukleären Level wurden durch alle verabreichten Dosierungen signifikant erhöht. Zudem kam es bei allen Konzentrationen zu signifikant erhöhten MMP9- und MMP2-Proteinlevels. Im in vivo MDA-MB-231-Xenograftmodell entwickelten zu wenige Mäuse Metastasen für ein statistisch signifikantes Ergebnis. In weibliche BALB/c-Mäuse wurden C4-HI-Mammakarzinome transplantiert. Wie oben kam es bei (0,3 und 3 mg/kg KG) HCB zu einer signifikanten Zunahme des Tumorzvolumens und -gewichtes. Beide Konzentrationen führten im Vergleich zu Kontrollen zu einer statistisch signifikanten Erhöhung von Lungenmikrometastasen. Die geringere Dosierung (0,3 mg/kg KG) führte zudem zu einer statistisch signifikanten Erhöhung von Lebermikrometastasen. Die Dosierung 30 mg/kg KG hatte auf keine der in diesem Modell gemessenen Parameter einen Effekt. Zusammengefasst schließen die AutorInnen aus diesen Ergebnissen, dass HCB ein Risikofaktor für die Brustkrebsprogression sein könnte (171). Die gleiche Gruppe fand in einer weiteren Studie auch Hinweise darauf, dass HCB die Angiogenese im Maus-MDA-MB-231-Xenograftmodell fördern könnte. In dieser Studie wurden ebenfalls die Konzentrationen 0,3, 3 und 30 mg/kg KG (drei Mal pro Woche für vier Wochen) verwendet. Die Dosierungen 3 und 30 mg/kg führten zu einer signifikanten Induktion von Blutgefäßen. HCB induzierte in

„human microvascular endothel cells“ (HMEC) Migration über die COX-2, den AhR und VEGF-Rezeptor-2 (175).

HCB könnte über den TGF- β 1 Pathway zur HCB induzierten Migration und Invasion von MDA-MB-231 Mammakarzinomzellen beitragen (Abb. 11). Sowohl HCB 5 und 0,05 μ M, als auch TGF- β 1 führten zu einer signifikanten Abnahme von AhR-mRNS in den Zellen. Ein Inhibitor des T β RI konnte die HCB induzierte Reduktion der mRNS aufheben, was zeigt, dass dieser HCB-induzierte Vorgang TGF- β 1-abhängig sein könnte. HCB 0,005, 0,05, 0,5, und 5 μ M führten zu einer signifikanten dosisabhängigen Steigerung der TGF- β 1-Expression und aktivierten TGF- β 1 in allen Dosierungen signifikant. Zudem konnte gezeigt werden, dass die Wirkung des TGF- β 1 Smad3-abhängig und Smad3-unabhängig sein könnte. So erhöht HCB in allen vier Dosierungen signifikant und dosisabhängig die Phosphorylierung von Smad3. Es kam aber auch in den Dosierungen (0,05, 0,5 und 5 μ M) zur signifikanten Phosphorylierung von p38 und JNK, die beide zum Smad-unabhängigen Pathway gehören. Über einen AhR- und einen c-Src-Inhibitor konnte gezeigt werden, dass die Smad3-Phosphorylierung AhR- und c-Src-abhängig ist. Die Verabreichung von 0,005 μ M HCB führte zu einem signifikant schnelleren Wundverschluss im „wound healing assay“ (176)

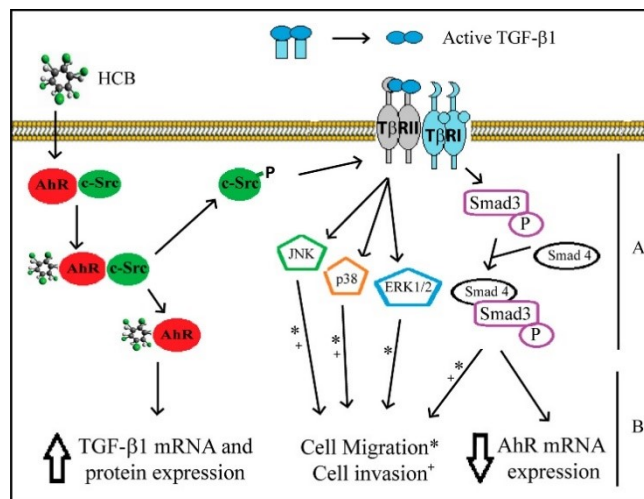


Abb. 11. HCB induzierte Migration und Invasion

(Reproduziert von (177) mit freundlicher Genehmigung von Elsevier) HCB könnte in MDA-MB-231 Zellen in vitro über den AhR und die Phosphorylierung von c-Src zur Aktivierung von Smad-abhängigen und -unabhängigen Downstream-Pathways des TGF- β 1 führen, was wiederum in Migration und Invasion dieser Zellen resultieren könnte (176).

3.7.1 Bulletpoints:

- HCB induziert ÖR- α -abhängig Proliferation und Aktivierung des IGF-I Pathway in MCF-7 Zellen (167).
- Unterschiedliche Dosierungen von HCB führt zu Aktivierung von unterschiedlichen Mechanismen in MCF-7 Zellen und dadurch zu einer differentiellen Zellzyklusregulation. In niedrigen Dosierungen scheint HCB durch Bildung des p27/Src-Komplexes eine Zellzyklus-Progression in MCF-7 Zellen zu induzieren, während es in höheren Dosierungen zu einer Verzögerung des Zellzyklus führt (168).
- In den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen steigert HCB die Migration. Dies könnte über die HER1/Erk1/2- und c-Src/HER1/STAT5b-Pathways AhR-unabhängig und -abhängig passieren (170).
- HCB steigert Expression von MMP9 und MMP2 sowie die Sekretion und Aktivierung von MMP9 in MDA-MB-231 Zellen über c-Src, Ahr und HER1 Pathways (171).
- HCB ist ein Ko-Karzinogen in Sprague-Dawley-Ratten und aktiviert sowohl IGF-IR-, als auch IR-Signalpathways (172).
- In weiblichen BALB/c-Mäusen mit C4-HI-Brustkrebs führt HCB zu

vermehrten Lungen- und Lebermikrometastasen (171).

- Im MDA-MB-231-Xenograftmausmodell führt HCB zu vermehrter Angiogenese und zu erhöhten MMP2- und MMP9-Proteinlevels (171,175).

3.8 Polychlorierte Biphenyle

Zu den PCB Kongenere die in Folge nicht erwähnt werden, konnten im Rahmen der Literaturrecherche keine Ergebnisse gefunden werden.

3.9 Nicht-dioxin-artige Polychlorierte Biphenyle

3.9.1.1 PCB 52 (2,2',5,5'-Tetrachlorobiphenyl):

PCB 52 (10^{-10} - 10^{-6} M) konnte in östrogen-kompetenten MCF-7 McGrath Zellen und ZR-75-1 Zellen keine Proliferation induzieren. 10^{-9} M der Verbindung konnten weder pS2 induzieren, noch zeigte sich eine antagonistische Wirkung in Anwesenheit von Ö₂ (178). 10 µM führten ab 24 Stunden dosis- und zeitabhängig zu einer Senkung der Zellviabilität in ÖR-negativen MDA-MB-231 und ÖR-positiven MCF-7 Zellen. 50 µM führten zu einer erhöhten Expression von p53, Caspase 8 und Caspase 9 in MCF-7 Zellen und von Caspase 8 und Caspase 9 in MDA-MB-231 Zellen. Die Senkung der Zellviabilität könnte durch caspase-abhängige Apoptose entstehen. Des Weiteren konnten nicht-zytotoxische Konzentrationen (1-10 µM) signifikant ROS und eine intrazelluläre Glutathion-Depletion in beiden Zelllinien induzieren. DNS-Strangbrüche konnten durch PCB 52 nur in MDA-MB-231 Zellen und nicht in MCF-7 Zellen induziert werden. Bei Blockade des ÖR-α in MCF-7 Zellen konnte PCB 52 eine ähnliche Menge an DNS-Strangbrüchen wie in MDA-MB-231 Zellen auslösen. Das zeigt, dass PCB 52 in den ÖR-α-negativen MDA-MB-231 Zellen, im Gegensatz zu den ÖR-α-positiven, oxidativen DNS-Schaden induzieren kann. Dieser Mechanismus könnte ÖR-α-abhängig sein (179).

3.9.1.2 PCB 101 (2,2',4,5,5'-Pentachlorobiphenyl):

MCF-7 Zellen wurden für sechs Tage mit 45 µM PCB 101 behandelt. Nach 72 Stunden wirkte die Chemikalie zytotoxisch. Zu keinem Zeitpunkt kam es zu einer signifikanten Proliferation der Zellen oder zu einer Veränderung der Expression des östrogen-regulierten Gens pS2 (180).

3.9.1.3 PCB 138 (2,2',3,4,4',5'-Hexachlorobiphenyl):

Wurden MCF-7 Zellen mit 15 μM PCB 138 sechs Tage lang behandelt, kam es zu keiner signifikanten Proliferation und zu keiner pS2-Induktion. Zytotoxizität wurde ab 48 Stunden festgestellt (180). Wurden MCF-7 Zellen mit PCB 138 (0,1 μM , 0,5 μM und 1 μM) für drei Tage behandelt, kam es hingegen im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikanten Proliferation. Wurden die Zellen mit 10 nM Ö_2 ko-inkubiert, führten nur die Dosierungen 0,5 μM und 1 μM zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation im Vergleich zu der durch Ö_2 induzierten. Als Apoptosemarker wurde die Caspase 9 Aktivität herangezogen. Diese nahm bei allen drei Konzentrationen von PCB 138 signifikant ab, bzw. nahm damit die antiapoptotische Aktivität signifikant zu. Bei Ko-Inkubation mit Ö_2 wurde die antiapoptotische Wirkung von 0,1 μM PCB 138 gänzlich aufgehoben, während die der beiden höheren Konzentrationen zwar abnahm, aber immer noch größer als die von Ö_2 alleine induzierte war ($p < 0,05$) (181).

10 nM Ö_2 führten in MCF-7 Zellen zu einer signifikanten CAT-Aktivität eines ERE-haltigen Reporterplasmids (pERE-tk-CAT). Diese Ö_2 -induzierte Aktivität konnte durch PCB 138 signifikant und dosisabhängig (3, 5, 9 μM) reduziert werden. In MCF-7 BUS Zellen führte PCB 138 (0,001, 0,01, 0,1, 1 bzw. 10 μM) zu keiner Proliferation. Bei diesen Dosierungen in Kombination mit 10 pM Ö_2 kam es nur bei 10 μM zu einer Reduktion der Ö_2 -induzierten Zellteilung. PCB 138 zeigte signifikante antiandrogene Effekte in einem Transaktivierungs-Assay am humanen AR (1, 3, 5, 9, 18 μM) in Eizellen des chinesischen Hamsters (182).

ÖR-positive MCF-7 BUS Zellen, in denen ein BRCA1-Promoter-Luziferase-Konstrukt exprimiert wurde, wurden mit PCB 138 (1 pM bis 10 μM) behandelt. 10 μM konnte die Promoteraktivität signifikant hemmen, alle geringeren Konzentrationen hatten keine Auswirkung. Im Gegensatz dazu konnten bereits 100 pM PCB 138 eine Ö_2 -induzierte Promoteraktivität signifikant hemmen. Der Tumorsuppressor BRCA1 präsentiert sich in sporadischen Mammakarzinomen ebenfalls oft downreguliert. 10 μM PCB 138 konnten auch in den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen BRCA1 downregulieren, weshalb die AutorInnen es für möglich halten, dass die Downregulation ÖR-unabhängig sein könne (183).

3.9.1.4 PCB 153 (2,2',4,4',5,5'-Hexachlorobiphenyl):

Eine signifikante Proliferation konnte durch 35 μM (sechs Tage lang) PCB 153 in MCF-7 Zellen ab 48 Stunden induziert werden. Diese konnte durch PD98059, einen Erk1/2 Inhibitor, vollständig gehemmt werden. Erk1/2 könnte durch PCB 153 aktiviert werden. Die

Verbindung konnte das östrogen-responsive pS2 nicht induzieren. Die AutorInnen postulieren, dass PCB 153 kein endokriner Disruptor in MCF-7 Zellen sei, sondern dass die Proliferation über die Erk-Aktivierung entstehe (180).

PCB 153 führte auch in den Konzentrationen 0,1, 0,5 und 1 μM zu einer signifikanten Proliferation von MCF-7 Zellen. PCB 153 konnte vor PCB 118, gefolgt von PCB 138 und schließlich PCB 180 die stärkste Zellteilung induzieren. Bei Ko-Behandlung mit $\ddot{\text{O}}_2$ 10 nM konnte nur 0,1 μM die Proliferation signifikant über die von $\ddot{\text{O}}_2$ alleine ausgelöste steigern. Darüber hinaus führte PCB 153 in allen untersuchten Dosierungen zur Abnahme der Caspase 9 Aktivität und damit zur antiapoptotischen Wirkung ($p < 0,001$). Diese Aktivität war bei gleichzeitiger Gabe von $\ddot{\text{O}}_2$ und PCB 153 bei allen Konzentrationen größer als die von $\ddot{\text{O}}_2$ alleine hervorgerufene ($p < 0,05$) (181).

PCB 153 führte zu signifikanter Bildung sowie zeit- und dosisabhängiger Steigerung von ROS in T-47D (0,1-100 μM PCB 153) und MDA-MB-231 (1-100 μM PCB 153) Brustkrebszellen. Beide Zelllinien zeigten eine Abnahme von NAD^+ und NAD(P)H . Die NAD(P)H -Abnahme konnte durch Zugabe von Poly-ADP-Ribose-Polymerase (PARP)-Inhibitoren vollständig aufgehoben werden. Deshalb vermuten die AutorInnen, dass die intrazelluläre Abnahme von NAD^+ und NAD(P)H durch die Aktivierung der PARP 1 verursacht wird. Dieses Enzym wird durch DNS-Strangbrüche aktiviert und ist an deren Reparatur beteiligt. DNS-Strangbrüche könnten wiederum durch ROS entstehen. Die Abnahme von NAD(P)H war in den ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen ausgeprägter als in den ÖR-positiven T47-D Zellen. Bei Ko-Inkubation von T-47D Zellen mit 4-Hydroxytamoxifen wurden in beiden Zelllinien ungefähr gleich hohe Konzentrationen gemessen. Der ÖR- α könnte die Zellen vor ROS, die oxidativen DNS-Schaden verursachen könnten, schützen (184).

Wie bereits bei PCB 138 beschrieben, reduzierte auch PCB 153 (3, 5, 9 μM) die östrogene CAT-Aktivität, die von 10 nM $\ddot{\text{O}}_2$ induziert wurde, signifikant und dosisabhängig. Weder 0,001, 0,01, 0,1, 1, noch 10 μM PCB 138 konnten eine Proliferation von MCF-7 BUS Zellen induzieren. Bei Ko-Inkubation mit 10 pM $\ddot{\text{O}}_2$ konnte nur 10 μM PCB 138 die induzierte Proliferation signifikant hemmen. PCB 138 (1-18 μM) zeigte keine antiandrogene Aktivität (182).

Von den geprüften Dosierungen PCB 153 (1 pM-10 μM) konnte in MCF-7 BUS Zellen nur 10 μM in An- und Abwesenheit von $\ddot{\text{O}}_2$ eine Downregulation der Luziferaseaktivität am BRCA1-Luziferase-Reportergens bewirken. Da dieser Effekt auch in einer ÖR-negativen

Brustkrebszelllinie hervorgerufen werden konnte, sollten auch Pathways ohne den ÖR in Betracht gezogen werden (183).

In MCF-10A Zellen (ÖR negativ), die fünf Tage lang mit 3 µM PCB 153 behandelt wurden, kam es im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikanten Hemmung des Zellwachstums. Am Tag drei kam es zu einer signifikanten Abnahme des Zellüberlebens. Es wurde eine signifikante 1,5-fache Erhöhung der „steady-state“-Level des Sauerstoffradikals $O_2^{\cdot-}$ gemessen, es konnte jedoch keine Zunahme der H_2O_2 -Konzentration objektiviert werden. Es kam zudem zu einer signifikanten Abnahme der intrazellulären Glutathion-Level und zu einer signifikanten Zunahme der Mangan-Superoxiddismutase-Konzentration, aber nicht der Kupfer/Zink-Superoxiddismutase-Konzentration. Dass auf $O_2^{\cdot-}$ keine erhöhten H_2O_2 -Level in den Zellen folgen, könnte darauf hinweisen, dass MCF-10A Zellen fähig sein könnten, die Sauerstoffradikale zu beseitigen. Diese zytotoxische Wirkung von PCB 153 konnte durch Antioxidantien (u.a. N-Acetylcystein) signifikant gehemmt werden, was vermuten lässt, dass die toxischen Effekte in diesen Zellen durch PCB 153-induzierten oxidativen Stress entstehen (185). 3 µM PCB 153 konnte den S-Phase-Eintritt von MCF-10A Zellen in der G_0 -Phase hemmen. Im Gegensatz zu 0,5 und 1 µM, die beide keinen Effekt hatten (186).

PCB 153 in den Dosierungen 14, 28, 56 und 70 µM konnte in HBEC nur in der höchsten Konzentration von 70 µM die GJIC nach 90 Minuten signifikant hemmen. 28 µM konnten nach sechs und zwölf Stunden die GJIC hemmen ($p < 0,05$), nach 24 Stunden war die Hemmung nicht mehr signifikant (139).

3.9.1.5 PCB 180 (2,2',3,4,4',5,5'-Heptachlorobiphenyl):

Ptak et al. konnten zeigen, dass Behandlung von MCF-7 Zellen mit 0,1, 0,5 und 1 µM PCB 180 zu einer signifikanten Steigerung der Zellteilung führt. Diese Konzentrationen von PCB 180 konnten keine signifikante Steigerung einer durch 10 nM O_2 hervorgerufenen Proliferation dieser Zellen induzieren. Darüber hinaus zeigte sich eine PCB 180-induzierte Senkung der Caspase 9 Aktivität. Diese antiapoptotische Wirkung konnte durch O_2 aufgehoben werden (181).

PCB 180 1–18 µM zeigt keine antiandrogene Aktivität am humanen AR. In MCF-7 Zellen hemmt PCB 180 in den Dosierungen 3, 5, 9 µM signifikant eine O_2 induzierte CAT-Aktivität, es wirkt also antiöstrogen. PCB 180 konnte in Dosierungen von 0,001-10 µM keine Proliferation von MCF-7 BOS Zellen hervorrufen. Es konnte aber die Proliferation dieser Zellen, die durch 10 pM O_2 ausgelöst wurde, in den Konzentrationen von 1 und 10 µM signifikant hemmen (182).

10 μM PCB 180 führten mit und ohne Ko-Inkubation mit Ö_2 (100 pM) zu einer signifikanten Reduktion der Luziferaseaktivität eines BRCA1-Reportergens. Alle anderen Konzentrationen, die untersucht wurden (1 pM-1 μM), hatten keinen Effekt. Auch in einer ÖR-negativen Brustkrebszelllinie konnte PCB 180 die Luziferaseaktivität downregulieren. Wahrscheinlich führt ein Pathway, der nicht ÖR-mediert ist, in vitro zur Downregulation von BRCA1 in Brustkrebszellen (183).

3.9.1.6 Bulletpoints

- PCB 52 und PCB 153 induzieren in nicht-zytotoxischen Konzentrationen ROS in ÖR-negativen und ÖR-positiven Brustkrebszellen. Dabei könnte der ÖR- α eine protektive Rolle spielen (179,184). PCB 52 kann in ÖR-positiven Brustkrebszellen in den Konzentrationen 0,1 nM-1 μM keine Proliferation oder Induktion des östrogen-responsiven pS2-Gens hervorrufen (178).
- PCB 138 kann in den östrogen-kompetenten MCF-7 Zellen in einer Dosierung von 15 μM keine Proliferation oder pS2-Induktion auslösen. Auch in MCF-7 BUS Zellen kann 0,001-10 μM der Verbindung keine Zellteilung hervorrufen (180,182). In einem anderen Proliferations-Assay induziert das Pestizid in den Dosierungen von 0,1-1 μM Zellteilung und wirkt antiapoptotisch (181). PCB 138 reduziert die Ö_2 -induzierte Luziferaseaktivität an einem ERE-Reportergen und am BRACA1-Promoter (182,183).
- PCB 153 hemmt die GJIC in HBEC, induziert ROS in ÖR-negativen und ÖR-positiven Brustkrebszellen, reduziert eine Ö_2 induzierte CAT Aktivität dosisabhängig und induziert keine Proliferation (0,001-10 μM) in MCF-7 BUS Zellen (139,182,185). In der Dosierung von 0,1 -1 μM hingegen induziert PCB 153 Zellteilung in MCF-7 Zellen und wirkt antiapoptotisch (181). In der Dosierung von 45 μM , kommt es zu einer Proliferation in MCF-7 Zellen, die wahrscheinlich über Erk1/2 mediiert wird (180).
- PCB 180 induziert Proliferation und wirkt antiapoptotisch in MCF-7 Zellen (181). In einem zweiten Proliferations-Assay konnte PCB 180 in MCF-7 BOS Zellen keine Zellteilung hervorrufen (182). Die Verbindung kann in An- und Abwesenheit von Ö_2 ÖR-unabhängig die Luziferaseaktivität eines BRACA1-Reportergens downregulieren (183). Zudem kann es Ö_2 -induzierte CAT-Aktivität in MCF-7 Zellen hemmen (182).

3.10 Dioxin-artige Polychlorierte Biphenyle

Krishnan et al. untersuchten die Antiöstrogenität von verschiedenen dioxin-artigen PCBs in MCF-7 Zellen, die den AhR exprimieren. Das potenteste Antiöstrogen war dabei PCB 126 > PCB 169 ≈ PCB 77 > PCB 157 ≈ PCB 105 ≈ PCB 114. Aroclor 1221, 1232, 1248, 1256 und 1260 waren bis 10^{-6} M inaktiv. PCB 126, 169 und 77 zeigten bereits bei 10 nM antiöstrogene Aktivität, die übrigen drei PCBs führten ab 100 nM zu Aktivität. Die antiöstrogene Aktivität der PCBs korreliert mit deren Affinität zum AhR (187).

3.10.1.1 PCB 77 (3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl):

Oenga et al. ko-inkubierten T-47D Zellen mit PCB 77 (100 oder 1.000 nM) und Ö_2 (1nM). Die durch Ö_2 ausgelöste Zellteilung konnte durch 1.000 nM PCB 77 signifikant gehemmt werden. Isoliertes PCB 77 zeigte keine Auswirkung auf die Zellteilung. Die AutorInnen beschreiben die Verbindung als schwaches Antiöstrogen ohne östrogene Effekte (188). PCB 77 konnte nicht an den ÖR- α binden. 1, 10, 100 und 1.000 nM der Chemikalie führten in T-47D Zellen zu einer signifikanten Hemmung der Zellteilung in An-oder Abwesenheit von 1 nM Ö_2 . In MCF-7 Zellen hemmen nur die beiden höheren Konzentrationen von PCB 77 die Proliferation und dies nur in Anwesenheit von Ö_2 . Die AutorInnen postulieren das PCB 77 als Antiöstrogen über d AhR/ÖR-Crosstalk wirken könnte (189).

Im Gegensatz zu den beiden obigen Berichten induzierte PCB 77 (10^{-11} - 10^{-6} M) eine dosisabhängige Proliferation in beiden ÖR-positiven Zellreihen (T-47D und MCF-7 McGrath) mit einem Maximum bei 10^{-9} M. Diese konnte durch das Antiöstrogen ICI 164,384 gehemmt werden. PCB 77 10^{-9} M induzierte in den ÖR-positiven MCF-7 McGrath und ZR-75-1 Brustkrebszellen im Vergleich zu Kontrollen erhöhte pS2-mRNS-Konzentration. Bei Ko-Inkubation mit Ö_2 zeigten beiden Zellreihen ähnliche pS2 Level wie die von Ö_2 induzierten. In den ÖR-negativen Brustkrebszelllinien HBL100 und MDA-MB-231 konnte PCB 77 keine Zellteilung oder Expression von pS2-mRNS hervorrufen. In T-47D Brustkrebszellen wurde ein östrogensensitives Gen (ERE-tk-CAT) eingeschleust. Es kam bei Konzentrationen von 10^{-10} - 10^{-6} M PCB 77 zu einer vermehrten CAT-Aktivität, die durch das Antiöstrogen ICI 164,384 gehemmt werden konnte. Die Genexpression durch Ö_2 10^{-7} M konnte durch eine equimolare Konzentration von PCB 77 nicht gehemmt werden. PCB 77 konnte aber in einem kompetitiven Bindungsassay Ö_2 ab einem molaren Überschuss von 700 vom ÖR verdrängen. Zudem konnte das Pestizid keine CYP1A1-mRNS in MCF-7 oder MDA-MB-231 Zellen induzieren (190).

PCB 77 5 μM induzierte in MCF-7 Zellen Luziferaseaktivität an einem transfizierten ERE, aber induzierte auch eine vermehrte Expression von CYP1A1 und Luziferaseaktivität am transfizierten AhR-responsiven DRE. Mit ein ChIP-Assay wurde die AhR responsive Promoterregion von CYP1A1 und die ÖR- α -responsive Promoterregion von pS2 untersucht. PCB 77 führte zu einer Interaktion von ÖR- α mit dem Promoter von pS2 und zugleich zu einer Interaktion von AhR/ARNT und ÖR- α mit dem Promoter von CYP1A1. PCB 77 wirkte in MCF-7 Zellen in vitro als Agonist am ÖR- α und AhR (191).

In MDA-MB-231 Zellen hatte PCB 77 1 μM keine signifikante Auswirkung auf die mRNS-Level von CYP1A1 und CYP1B1 und konnte auch an einem eingeschleusten 1B1-Promoter keine Luziferaseaktivität hervorrufen. Es konnten geringfügig, aber signifikant erhöhte Werte von 4-Methoxyöstradiol, aber nicht 2-Methoxyöstradiol gemessen werden. 4-Hydroxylierung von Östrogenen ist mit der Karzinogenese von Brustkrebs assoziiert (siehe auch Kapitel 1.3.1.2) (192)

Auch PCB 77 senkte (wie das oben erwähnte PCB 52) die Lebensdauer von MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen bei Konzentrationen über 10 μM . Das könnte wie oben beschrieben auch bei PCB 77 durch Caspase-induzierte Apoptose verursacht werden. Auch PCB 77 induzierte ROS und Glutathion-Depletion und führte in MDA-MB-231 und MCF-7 Zellen zu DNS-Strangbrüchen. In MCF-7 Zellen konnte die Verbindung nur nach Blockade des ÖR- α DNS-Schaden induzieren. Die AutorInnen postulieren, dass der ÖR- α eine protektive Rolle bei PCB induzierten DNS-Schäden in Brustkrebszellen spiele (179). In MCF-10A Brustepithelzellen führte 3 μM PCB 77 in fünf Tagen im Vergleich zu Kontrollen zu keiner signifikanten Veränderung des Zellwachstums, des Zelltodes und des Sauerstoffradikals $\text{O}_2^{\cdot-}$ (185).

PCB 77 (25mg/kg zwei Mal wöchentlich) verkleinerte das Tumolvolumen und -gewicht von DMBA (20 mg/kg) induzierten Tumoren weiblicher Sprague-Dawley-Ratten signifikant. Das Pestizid wurde verabreicht nachdem die Bildung erster Brusttumore in den Ratten beobachtet werden konnte (189). Das Karzinogen DMBA (10mg) und PCB 77 (10mg/kg) wurde weiblichen Sprague-Dawley-Ratten im Alter von 50 Tagen verabreicht. Subsequent wurden die Ratten in zwei Gruppen aufgeteilt. Eine Gruppe wurde für eine Woche mit einer höchst fetthaltigen Nahrung gefüttert, während die andere Gruppe weniger fetthaltige Nahrung erhielt. Die Nahrung enthielt zusätzlich pro Gramm Fett 500 μg PCB77. In beiden Gruppen kam es im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikanten Vermehrung von Mammakarzinomen. Es kam zu signifikant mehr Tumoren in der Gruppe der fetthaltig ernährten Ratten, verglichen mit den weniger fetthaltig ernährten Ratten (193).

3.10.1.2 PCB 81 (3,4,4',5-Tetrachlorbiphenyl):

Die Proliferation von T-47D Zellen konnte durch PCB 81 (0,1-1.000 nM) nur in Anwesenheit von 1 nM Ö₂ signifikant und dosisabhängig gehemmt werden. Die gleichen Konzentrationen PCB 81 hatten alleine keinen Einfluss auf die Zellteilung. 200 nM PCB 81 konnten eine Ö₂-induzierte Proliferation auch in ZR-75-1 Zellen hemmen (p < 0,001). Die AutorInnen vermuten, dass der AhR in die antiproliferative Wirkung des dioxin-artigen PCB 81 in diesen Zellen involviert sein könnte. (188). Spink et al. konnten zeigen, dass PCB 81 (1 µM) in MDA-MB-231 Brustkrebszellen zu einer signifikanten Vermehrung von CYP1A1-mRNS, CYP1B1-mRNS, 4-Methoxyöstradiol (9,7-fach), 2-Methoxyöstradiol (3,9-fach) und Luziferaseaktivität an einem eingeschleusten CYP1B1-Promoter führt. PCB 81 zeigte die stärkste Aktivität der untersuchten PCBs (u.a. PCB 77, 126, 169) (192).

3.10.1.3 PCB 118 (2,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl):

PCB 118 führte in MCF-7 Zellen bei einer Dosierung von 40 µM (sechs Tage lang) nur nach 48 Stunden zu einer signifikanten Proliferation und zu keiner pS2-Induktion (180). Im Gegensatz dazu proliferierten MCF-7 Zellen nach Behandlung mit Konzentrationen von 0,1, 0,5 und 1 µM PCB 118 im Vergleich zu Kontrollen signifikant. Im Gegensatz zu PCB 138 und PCB 153 konnte PCB 118 bei Zugabe von 10 nM Ö₂ die Proliferation nicht über die von Ö₂ alleine ausgelöste steigern. Darüber hinaus entfaltete PCB 118 in MCF-7 Zellen eine antiapoptotische Wirkung in Form einer signifikanten Senkung der Caspase 9-Aktivität. Diese konnte bei allen Konzentrationen durch Ko-Inkubation mit Ö₂ aufgehoben werden (181). PCB 118 bis zu 1 µM hatte in MCF-10A und MCF-7 Zellen keinen Einfluss auf CYP1A1-Aktivität und auf den Östrogenmetabolismus (2-/4-Methoxyöstrogenbildung) (194).

3.10.1.4 PCB 126 (3,3',4,4',5-Pentachlorobiphenyl):

PCB 126 (0,1-1.000 nM) führte in Dosierungen von 100 und 1.000 nM im Vergleich zu Kontrollen zu einer signifikanten Proliferation von T47-D Zellen. Bei Ko-Inkubation mit 1 nM Ö₂ führten wiederum nur 10, 100 und 1.000 nM zu einer signifikanten Hemmung der Ö₂-induzierten Proliferation. 200 nM PCB 126 führte in ZR-75-1 Tumorzellen zu einer Hemmung der durch 1 nM Ö₂ hervorgerufenen Proliferation (p < 0,001), wobei diese Hemmung bei PCB 81 stärker ausgeprägt war. Der differentiellen Wirkung von PCB 126 auf die Zellteilung könnten simultan ausgeprägte östrogene und antiöstrogene Eigenschaften dieser Verbindung zugrunde liegen (188).

PCB 126 (1, 10, 100, 1.000 nM) führte bei Ko-Inkubation mit 1 nM \ddot{O}_2 zu einer signifikanten Hemmung der Proliferation von T-47D Zellen. In MCF-7 Zellen hatte PCB 126 alleine keine Auswirkungen auf die Zellteilung. Nur die höchste Konzentration von 1.000 nM der Chemikalie konnte die \ddot{O}_2 -induzierte Proliferation signifikant hemmen. In einem kompetitiven Bindungsassay konnte PCB 126 nicht an den humanen $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ binden (189).

PCB 126 induzierte in T-47D und MDA-MB-231 Zellen zeit- und dosisabhängig ROS (0,1-100 μM bzw. 20-100 μM) und Zytotoxizität (ab 20 μM). Die AutorInnen vermuten, dass durch PCB induzierte ROS zu oxidativen DNS-Schäden führen. In beiden Zellarten kam es durch PCB 126 zu NAD(P)H und NAD^+ Reduktion, wobei PCB 126 weniger Wirkung in T47-D Zellen als in MDA-MB-231 Zellen zeigte. Die AutorInnen konnten zeigen, dass die Verringerung der NAD^+ durch Aktivierung der PARP1 entstehen könnte. Die PARP 1 wird durch DNS-Strangbrüche aktiviert und trägt zu deren Reparatur bei, wobei es zu einer Reduktion von NAD^+ kommt. Durch Ko-Inkubation mit 4-Hydroxytamoxifen konnte in T47-D Zellen verstärkte NAD(P)H-Depletion, ähnlich wie in MDA-MB-231 Zellen, objektiviert werden. Der $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ könnte die ROS Bildung und damit den oxidativen DNS-Schaden und den Zelltod in diesen Zellreihen modulieren (184).

Spink et al. behandelten MDA-MB-231 Zellen mit 1 μM PCB 126. Daraufhin kam es zu einer signifikant gesteigerten Bildung von 2- und 4-Methoxyöstradiol (6,1- bzw. 2,7-fach), von CYP1A1 und CYP1B1 mRNS und zu signifikant erhöhter Luziferaseaktivität an einem eingeschleusten CYP1B1 Promoter. CYP1B1 ist eine 4-Hydroxylase im Östrogenmetabolismus (192).

Matthews et al. behandelten T-47D Brustkrebszellen mit 1 μM PCB 126, was zu einer statistisch signifikanten Expression von CYP1A1- und CYP1B1-mRNS und zur Rekrutierung von AhR und ARNT an die jeweiligen Promoter führte. Durch Ko-Inkubation mit \ddot{O}_2 (10 nM) konnten diese Effekte nicht verstärkt werden. Der $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ wurde durch PCB 126 Behandlung signifikant und dosisabhängig zum Promoter von CYP1A1 und CYP1B1 rekrutiert. Dieser Effekt konnte durch Zugabe von \ddot{O}_2 verstärkt werden. \ddot{O}_2 alleine führte jedoch nicht zur Rekrutierung des $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ an AhR-Zielgene. AhR-Liganden aktivieren den $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ vermutlich nicht direkt (wie durch \ddot{O}_2), sondern möglicherweise über den aktivierten AhR. Ko-Behandlung der Zellen mit \ddot{O}_2 und PCB 126 führte zu einer signifikanten Reduktion der pS2-Expression und zu einer Hemmung der \ddot{O}_2 -induzierten Rekrutierung des $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ zu pS2. Diese verminderte Rekrutierung des $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ zu pS2 korrelierte mit der PCB 126-induzierten Rekrutierung des $\ddot{O}R\text{-}\alpha$ an die Promoter von CYP1A1 und CYP1B1. Das

zeigt eine antiöstrogene Aktivität von PCB 126. In einem kompetitiven Bindungssay konnte PCB 126 nicht an den ÖR- α binden. (195).

Auch Abdelrahim et al. konnten zeigen, dass PCB 126 3 μ M/l CYP1A1 induziert und den Ahr/ARNT-Komplex an den Promoter dieses Gens rekrutiert. 3 μ M/l PCB 126 konnten in MCF-7 Zellen signifikant ein transfiziertes ERE aktivieren. Dieses konnte durch das Antiörogen ICI 182,780 und durch eine „small interfering RNS“ (siRNS) für den ÖR- α signifikant gehemmt werden, nicht jedoch durch eine siRNS für den AhR. Daraus schließen die AutorInnen im Gegensatz zur oben genannten Studie, dass PCB 126 den ÖR- α direkt aktiviert und die ERE-Transaktivierung ÖR- α - und nicht AhR-abhängig war. In einem ähnlichen Experiment, in dem statt ERE ein DRE transfiziert wurde, konnte gezeigt werden, dass die Transaktivierung AhR- und nicht ÖR- α abhängig ist. Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Ergebnissen konnte PCB 126 bei Konzentrationen, die höher als 1 μ M waren, in MCF-7 Zellen an den ÖR- α binden. Zudem erhöhte PCB 126 die Assoziation des ÖR- α , aber nicht die des AhR mit dem pS2-Gen-Promoter. Auch hier induzierte PCB 126 die Rekrutierung von ÖR- α zum Promoter von CYP1A1 (196).

CYP1A1 und CYP1B1 zeigen eine 2-Hydroxylase- bzw. 4-Hydroxylase-Aktivität, die zur oxidativen Metabolisierung von Östrogenen zu 2- und 4-Hydroxyöstrogenen führt. MCF-10A Zellen sind humane Brustepithelzellen, die von fibrozystischem Brustgewebe stammen. Sie zeigen Eigenschaften von physiologischem Brustepithel. PCB 126 (10^{-11} - 10^{-6}) führte zu einer dosisabhängigen Steigerung der CYP1A1-Aktivität in MCF-7 und MCF-10A Zellen, wobei die Effekte in MCF-7 Zellen stärker ausgeprägt sind als in MCF-10A Zellen. Zudem kam es zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme der 4-/2-Methoxyöstrogen-Ratio in beiden Zellarten. Einzeln betrachtet kam es zu einer Induktion von 4-Hydroxyöstron und 4-Hydroxyöstradiol bis 10^{-8} und bei höheren Konzentrationen zu einer 2-Hydroxyöstron- und 2-Hydroxyöstradiol Induktion in MCF-7 Zellen, wobei es immer zu einem Absinken der Ratio kam. Insgesamt kam es jedoch zu einer Zunahme potentiell karzinogener Metaboliten (194).

3.10.1.5 PCB 169 (3,3',4,4',5,5'-Hexachlorbiphenyl):

Weder 100 noch 1.000 nM PCB 169 führten in T-47D Brustkrebszellen zu einer signifikanten Proliferation. Bei Ko-Behandlung mit 1 nM Ö₂ konnte die Ö₂-induzierte Zellteilung signifikant gehemmt werden (188).

In MDA-MB-231 Zellen konnte PCB 169 eine signifikante Steigerung von CYP1B1, aber nicht von CYP1A1-mRNS induzieren. Die Bildung von 2- und 4-Methoxyöstradiol wurde hingegen vollständig und signifikant unterdrückt. Es könnte sein, dass die Unterdrückung

des Östrogenmetabolismus durch eine Hemmung von CYP1B1 durch PCB 126 zustande kommt (192).

PCB 169 führt ab 5 μM in MCF-10A und ab 1 μM in MCF-7 Zellen zu einer signifikanten Induktion der CYP1A1-Aktivität. In MCF-7 Zellen kam es ab 500 nM zur Bildung von 2-Methoxyöstron und 2-Methoxyöstradiol, während es zu einer Hemmung der 4-Methoxyöstradiol und 4-Methoxyöstron Bildung kam. PCB 169 (10^{-11} - 10^{-6} M) führte in MCF-7 Zellen zu einem konzentrationsabhängigen Absinken der 4-/2-Methoxyöstrogen-Ratio. In MCF-10A Zellen kam es zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg von 2-Methoxyöstrogenen. Ab 1 nM inhibierte PCB 169 die 4-Methoxyöstrogen Bildung in MCF-10A Zellen. Es kam zu einer konzentrationsabhängigen Abnahme (10^{-11} - 10^{-6} M) der 4-/2-Methoxyöstrogen-Ratio (194). In ÖR-negativen HBEC Typ II Zellen konnte 56 μM PCB 169 die GJIC nach 24 Stunden, aber nicht zu einem früheren Zeitpunkt signifikant hemmen (139).

3.10.1.6 Bulletpoints

- PCB 77 wirkt in verschiedenen Assays östrogen und antiöstrogen in östrogen-kompetenten Brustkrebszellen (188–190). Unter anderem konnte die Chemikalie in einem Assay an den ÖR binden (190), in einem anderen nicht (189).
- PCB 77 induziert ROS in ÖR-negativen und ÖR-positiven Brustkrebszellen und tut dies möglicherweise ÖR- α -abhängig (179).
- PCB 77 fungiert in vitro als AhR-Agonist, kann aber keine CYP1A1- oder CYP1B1-mRNS in MDA-MB-231 Zellen induzieren und keine Luziferaseaktivität am CYP1B1 Promoter hervorrufen (191,192).
- In vivo reduziert PCB 77 sowohl Volumen als auch Gewicht von Karzinogen-induzierten Tumoren in Ratten, wenn es nach der Tumorentstehung verabreicht wurde (189). Gleichzeitig mit dem Karzinogen verabreicht, kommt es zu signifikant mehr Tumoren (193).
- PCB 82 kann die Ö_2 -induziert Proliferation von T-47D und von ZR-75-1 Brustkrebszellen hemmen (188). Die Verbindung induziert CYP1A1 und CYP1B1 in ÖR-negativen MDA-MB-231 Brustkrebszellen und steigert die 4-/2-Methoxyöstradiol-Ratio (192).
- PCB 118 (0,1-1 μM) induziert Proliferation von MCF-7 Zellen und wirkt antiapoptotisch, kann aber keinen Einfluss auf Östrogenmetabolismus oder CYP1A1 Aktivität in MCF-7 Zellen und in MCF-10A Zellen nehmen (180,194).

- In T-47D Brustkrebszellen induziert PCB 126 in Abwesenheit von Ö₂-Proliferation, während es in Anwesenheit von Ö₂ die von dem Hormon induzierte Zellteilung hemmt (188). Die Proliferation von MCF-7 Zellen kann nur in Anwesenheit von Ö₂ beeinflusst bzw. gehemmt werden (189).
- PCB 126 (10⁻¹¹-10⁻⁶) induziert die CYP1A1-Aktivität in MCF-10A Zellen und MCF-7 Zellen (194).
- PCB 126 rekrutiert den AhR/ARNT Komplex und den ÖR-α an den Promoter von CYP1A1. Der ÖR-α wird entweder durch direkte oder indirekte Aktivierung an den Promoter rekrutiert (195,196).
- PCB 169 hemmt die Ö₂-induzierte Zellteilung von ÖR-positiven Brustkrebszellen signifikant (188). In MDA-MB-231 Zellen kommt es zu einer Induktion von CYP1B1-, aber nicht von CYP1A1-mRNS (192). In MCF-7 und MCF-10A Zellen induziert PCB 169 CYP1A1-Aktivität und führt zu einem konzentrationsabhängigen Absinken der 4-/2-Methoxyöstrogen-Ratio (194). PCB 169 hemmt darüber hinaus die GJIC (139).

3.11 Gemische

Durch die Umwelt sind Menschen nicht einzelnen Chemikalien ausgesetzt, sondern komplexen Gemischen verschiedener Verbindungen. Verschiedene Ansätze können für Untersuchungen an Gemischen aus Xenoöstrogenen bzw. endokrinen Disruptoren verwendet werden. Beim „whole mixture approach“ wird ein Gemisch wie eine einzige Chemikalie behandelt und untersucht. Die Wirkung der einzelnen Verbindungen wird nicht gesondert analysiert. Bei dieser Art der Untersuchung kann keine Aussage darübergemacht werden, ob die einzelnen Bestandteile synergistisch, additiv oder antagonistisch miteinander wirken. Außerdem erschwert es dieser Ansatz Gemische zu vergleichen bzw. von einer Mischung auf die andere zu schließen. Bereits kleine Änderungen in der Komposition der Mischung können signifikante Veränderungen des Effektes hervorrufen. Additivität im toxikologischen Sinn beschreibt wie Chemikalien zusammenwirken, ohne sich in ihrer Wirkung gegenseitig abzuschwächen oder zu steigern. Damit ist nicht die arithmetische Summe der Wirkung der einzelnen Bestandteile gemeint (197), da diese nur für lineare Dosis-Wirkungsbeziehungen gelten kann. Ist der Effekt entsprechend dem aufgrund der Einzelkomponenten erwarteten, wirken verwendete Substanzen additiv, wird der Effekt abgeschwächt, wirken sie antagonistisch, ist er stärker als erwartet, synergistisch (119).

Soto et al. untersuchten anhand von MCF-7 Brustkrebszellen, wie sich ein Gemisch von Organochlorpestiziden auf die Proliferation der Zellen auswirkt. Jede Verbindung für sich konnte erst ab einer Dosis von 10 µM signifikante Zellteilung induzieren. Die in der Studie verwendete Mischung bestand aus Endosulfan-α, Endosulfan-β, p,p'-DDD, p,p'-DDT, p,p'-DDE, Toxaphen, Dieldrin, PCB 61, PCB 136 und Methoxychlor, jeweils in einer Dosis von 1 µM. Damit lagen die Konzentrationen der Einzelsubstanzen 10-fach unterhalb der Konzentration, die signifikante Proliferation induzieren konnte. Das Gemisch der Chemikalien hingegen führte zu einem signifikanten proliferativen Effekt (146).

ÖR-positive MCF-7 und T-47D Zellen und ÖR-negative HS578Bst Brustkrebszellen wurden mit einem Gemisch aus 15 % o,p'-DDT und 85 % p,p'-DDT behandelt. 0,3 µM dieser Mischung induzierten in den beiden ÖR-positiven Zelllinien CDK2-Aktivität, die durch ICI 182,780 gehemmt werden konnte. Kein Effekt konnte in den ÖR-negativen HS578Bst Zellen gemessen werden. Durch Zugabe von Insulin konnte die DDT-induzierte CDK2-Aktivität in MCF-7 Zellen vom 10- bis 12-fachen auf das 20- bis 25-fache im Vergleich zu Kontrollen gesteigert werden. Die gleiche Konzentration an DDT induzierte eine Phosphorylierung des „retinoblastoma proteins“ (pRb105) und eine vermehrte Synthese von Cyclin D1 in MCF-7 Zellen. CDK2, pRb105 und Cyclin D1 sind Teil der G₁/S-Phasen-Transition. DDT-Behandlung führte zu mehr MCF-7 Zellen in der S-Phase, was wiederum durch ICI 182,780 gehemmt werden konnte. Das weist darauf hin, dass der Eintritt von MCF-7 Zellen in die S-Phase durch DDT ÖR-mediiert sein könnte (198).

Zwei Mischungen aus p,p'-DDT und o,p'-DDT, in einer Dosis von jeweils 0,1 + 0,1 µM oder 1 + 1 µM, zeigten in einem Proliferations-Assay von MCF-7 Zellen eine additive Wirkung. Die Gemische induzierten in den beiden oben genannten Konzentrationen synergistisch ÖR-mediierte CAT-Aktivität. p,p'-DDT wirkte auch in Kombination mit 0,1 oder 0,01 nM Ö₂ synergistisch auf die CAT-Expression. Während beide Chemikalien alleine erst ab 10 µM signifikant pS2 induzieren konnten, konnten sie das als Gemisch bereits bei einer Konzentration von jeweils 0,1 µM (116).

o,p'-DDT, β-HCH, p,p'-DDT und p,p'-DDE (0,01-10 µM) wurden mit MCF-7 Zellen in steigenden Dosen, jeweils in den Verhältnissen 1:1:1:1 und 1:5:4:10, inkubiert. Wurde der Effekt der äquimolaren Mischung auf die potenteste Einzelkomponente o,p'-DDT bezogen, kam es bei Konzentrationen, in denen o,p'-DDT alleine keine signifikante Proliferation induzierte, zur Zellteilung. Die potenteste Einzelkomponente der zweiten Mischung, welche humanen Serumkonzentrationen entsprechen sollte, stellte p,p'-DDE dar. Bezogen auf p,p'-DDE konnte diese Mischung nur eine nicht signifikante Verstärkung des

proliferativen Effektes auslösen. Insgesamt konnte die Proliferation von MCF-7 Zellen bei beiden Gemischen unter Bezugnahme auf die Einzelkomponenten des jeweiligen Gemisches vorhergesagt werden, was auf einen additiven Effekt schließen lässt. Bezogen auf die potenteste Komponente wirkten die Mischungen synergistisch (119).

Technisches DDT, Endosulfan und Chlordan (jeweils 10 µM) führten isoliert gegeben im Vergleich zu Ö₂ 5 nM (100 %) in MCF-7 Zellen zu einer relativen Proliferation von jeweils 73 % (DDT), 77 % (Endosulfan) und 0 % (Chlordan). Eine Mischung aus technischem Endosulfan und technischem Chlordan in einer Dosis von jeweils 5 µM hatte eine relative proliferative Potenz von 94,2 %. Zusätzliche 5 µM technisches DDT führten zu einer relativen Proliferation von 125 %. Die AutorInnen sprechen hier von einem synergistischen Effekt (163).

In T-47D Zellen wurde ein ERE-haltiges-Luziferase-Reportergen exprimiert. Dieldrin, Chlordan und Endosulfan wurden in verschiedenen Kombinationen und Konzentrationen untersucht. Dieldrin und Endosulfan wirkten in den Konzentrationen von 3-6 µM synergistisch. In Dosierungen von 7-8 µM war die Wirkung additiv. Endosulfan und Chlordan 3-5 µM wirkten ebenfalls additiv. In Dosierungen von 6-8 µM lag die Wirkung unterhalb der Errechneten. o,p'-DDT 200 nM, Methoxychlor 2 µM und Chlordan, Endosulfan und Dieldrin, jeweils in einer Dosis von 4 µM, wurden mit 3 pM Ö₂ untersucht und zeigten allesamt eine additive Luziferaseaktivität (151).

Wurden MCF-7 Zellen mit Dieldrin und Toxaphen (ein POP, das in dieser Diplomarbeit nicht einzeln behandelt wird) 10⁻⁸-10⁻⁵ M als einzelne Substanzen und in Kombination behandelt, kam es in keinem der Fälle zu einer signifikanten Proliferation oder CAT-Aktivität an zwei östrogen-responsiven Konstrukten. Genauso konnte eine äquimolare Mischung der beide Pestiziden (10⁻⁵) in einem kompetitive Bindungsassay nicht an den ÖR binden (150).

Drei verschiedene Gemische von östrogenen/ xenobiotischen Chemikalien wurden anhand von MCF-7 BUS Zellen untersucht. In den verschiedenen Mischungen waren jeweils unterschiedliche Konzentrationen von β-HCH, Methoxychlor, Bisphenol A, 4-Nonylphenol, Dibutylphthalat und Octylphenol enthalten. Die totalen Konzentrationen der jeweiligen Mischung waren jeweils 5,01, 3,00 und 3,01 nM. Jede der drei wurde mindestens bis zur 3000-fachen Konzentration untersucht. Alle drei Mischungen induzierten Proliferation von MCF-7 BUS Zellen und zeigten eine additive Wirkung (158).

Auch Charles et al. konnten für Gemische (in steigenden Konzentrationen) aus o,p'-DDT (50, 250 und 500 nM), Methoxychlor (50, 250 und 500 nM) und Dieldrin (100, 500, 1000

nM) in MCF-7 Zellen anhand eines ÖR- α -Reporterassays Additivität objektivieren (199).

DDT 10^{-6} M (Isomerenverhältnis nicht angegeben) induzierte signifikante Zellteilung und signifikante Induktion von CYP1A1, CYP1B1 und AhR Transkription in MCF-7 Zellen (200).

p,p'-DDT, o,p'-DDT und Methoxychlor in einer Dosis von jeweils 1 μ M zeigten in MCF-7 BOS Zellen additive „green fluorescent protein“-Aktivität (201). Auch Zhu et al. konnten für binäre Mischungen aus Endosulfan mit Ö₂, Bisphenol A oder Genistein Additivität in MCF-7 Zellen nachweisen (202).

In einem Fokusassay mit MCF-7 Zellen wurden Endosulfan- α , - β und Dieldrin in den Konzentrationen 10^{-10} - 10^{-5} M untersucht. Die beiden erstgenannten konnten nur in der höchsten getesteten Konzentration von 10 μ M eine schwache östrogene Wirkung hervorrufen, während Dieldrin keine fokus-induzierende Wirkung zeigte. Binäre äquimolare Kombinationen (10^{-10} - 10^{-5}) wirkten additiv. Zusammen mit 1 nM Ö₂ konnte keines der Pestizide, weder singulär noch in binären Gemischen antiöstrogen auf die Ö₂-induzierten Fokuse wirken. Keines der Pestizide, egal ob isoliert oder in binären Mixturen verabreicht, konnte in einem kompetitiven Bindungsassay an den ÖR binden (149).

Aubé et al. setzten die hormonabhängigen Mammakarzinomzellen MCF-7, T-47D, CAMA-1 und nicht-hormonabhängige MDA-MB2-31 Brustkrebszellen einem Gemisch von verschiedenen Organochlorpestiziden in An- und Abwesenheit von Ö₂ aus. Die Mischungsanteile sollten in umweltrelevanten Proportionen zueinander stehen: PCBs (Aroclor 1260, Aroclor 1254, PCB 28, PCB 47, PCB 126, PCB 77), p,p'-DDE, technisches Chlordan, α -HCH, p,p'-DDT, technisches Toxaphen, Aldrin, Dieldrin, 1,2,4,5-Tetrachlorbenzol, β -HCH, p,p'-DDD, Hexachlorbenzol, Pentachlorbenzol, γ -HCH und Mirex (jeweils in den Konzentrationen von 1,16, 0,79, 0,68, 0,28, 0,25, 0,21, 0,09, 0,07, 0,05, 0,02, 0,02, 0,016, 0,01, 0,01 und 0,005 μ M). Das Gemisch wurde immer im gleichen Verhältnis, aber in verschiedenen Verdünnungen angewandt. Die oben genannten Konzentrationen entsprechen einer 100-fachen Verdünnung, darüber hinaus wurden noch die jeweils 50-, 20-, 10- und 5-fache Verdünnung untersucht. Die Mischung konnte in keiner Verdünnung eine signifikante Proliferation von T-47D und CAMA-1 Zellen induzieren. Zu signifikanter Proliferation von MCF-7 Zellen hingegen führten alle Verdünnungen, bis auf die 5-fache. In den hormonunabhängigen MDA-MB2-31 Zellen kam es verglichen mit Kontrollen zu einer linearen, dosisabhängigen Hemmung der Proliferation. Die AutorInnen schreiben das höhere proliferative Ansprechen von MCF-7 Zellen auf die Mischung, den

höheren ÖR- α -Levels zu, welche diese im Vergleich zu den beiden anderen hormonsensitiven Zelllinien exprimieren. CAMA-1 Zellen exprimieren den ÖR- α und den AR. Wurden diese Zellen mit Ö₂ und der Mixtur ko-inkubiert, kam es mit steigender Konzentration zu einer Hemmung der Proliferation (signifikant bei 20-, 10- und 5-facher Verdünnung). Zusammen mit DHT und Ö₂ induzierte die Mixtur eine signifikante Proliferation bei 50-facher Verdünnung. Diese Konzentration in Kombination mit Ö₂ konnte keine signifikante Proliferation erzielen. Die AutorInnen schließen daraus, dass dieser Effekt durch die antiandrogene Wirkung des Gemisches hervorgerufen werden könnte. Einen Anteil der Mixtur bildet das antiandrogene p,p'-DDE. Durch Blockade des AR-Pathways fällt dessen hemmende Wirkung auf den ÖR- α weg. Die Proliferation von MCF-7 Zellen führen die AutorInnen hingegen auf den Anteil der Xenoöstrogene in dem Gemisch zurück (203).

Eine Mixtur aus Toxaphen, o,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-DDT, p,p'-DDE, p,p'-Methoxychlor, Endosulfan- α und Endosulfan- β (insgesamt 12 ng/ml-12.200 ng/ml) konnte in keiner der angewandten Dosierungen eine Zellteilung in östrogen-kompetenten T-47D Zellen auslösen, wirkte aber bei Ko-Inkubation mit Ö₂ (10^{-9} M) in der höchsten Dosierung antiöstrogen (204). Eine Mischung aus Aldrin, Dieldrin, o,p'-DDE, p,p'-DDE, p,p'-DDD, o,p'-DDT und p,p'-DDT, (0,2, 0,035, 1,43, 1,08, 1,33, 0,31 bzw. 0,46 μ M) wurde mit HMEC inkubiert. Diese Konzentrationen entsprechen bei jedem Pestizid Werten, die im Serum der Bevölkerung der Kanarischen Inseln gefunden wurden. Neben diesen Konzentrationen wurden darüber hinaus jeweils die 100-, 500- und 1000-fache Konzentration untersucht. Die beiden letztgenannten zeigten zytotoxische Wirkung. Die AutorInnen argumentieren, dass durch Akkumulation im Fettgewebe die Konzentration dieser lipophilen Pestizide 100 Mal höher als im Serum geschätzt werden können. Aufgrund des hohen Fettgewebeanteils könnte die weibliche Brust deshalb höheren Konzentrationen ausgesetzt sein. Die 100-fache Konzentration (die einfache wurde nicht untersucht) führte in HMEC im Gegensatz zu Ö₂ zur erhöhten Expression von Genen der Proteinkinasen ACVRL1, KIT, ALK-1 und erbB3 (205).

Eine weitere Forschungsgruppe untersuchte *in vitro* zwei Mischungen aus Organochlorpestiziden, wie sie im Serum spanischer Frauen mit und ohne Mammakarzinom gefunden worden waren. Das Gemisch der Frauen ohne Mammakarzinom „G“ bestand aus: Aldrin, Dieldrin, Endrin, Lindan, p,p'-DDE, p,p'-DDD und p,p'-DDT (2,8, 1,2, 33,6, 3,8, 22, 4 bzw. 40 nM). Das Gemisch der Frauen mit Brustkrebs „BK“ bestand aus: Aldrin, Dieldrin, Lindan, p,p'-DDE, p,p'-DDD, p,p'-DDT (3,2, 1,9, 7,6, 20, 34,6 bzw. 9,2 nM). MCF-7 BUS Zellen wurden beiden Gemischen in steigenden Konzentrationen (x0,01, x0,1, x1, x10, x100,

x300) inkubiert. Die G-Mischung führte ab der 10-fachen Konzentration zu einer signifikanten Proliferation, die BK-Mixtur ab einer 100-fachen Dosierung. Das Antiöstrogen ICI 182,780 konnte das Zellwachstum in jeder Konzentration vollständig hemmen. Beide Mixturen induzierten Zellteilung über den ÖR- α und - β und zeigten in östrogen- und androgen-kompetenten MCF-7 AR1 Zellen (mit Ö₂ und DHT jeweils 100 pM behandelt) eine antiandrogene Wirkung. Sie konnten die durch DHT verursachte Hemmung der Proliferation aufheben, wobei die G-Mischung bereits bei geringeren Konzentrationen (x1) als die BK-Mischung (bei x10) signifikante Effekte hatte. Das BK-Gemisch konnte in Abwesenheit von Steroidhormonen in MCF-7-AR1 Zellen keine Proliferation induzieren, die G-Mischung hingegen schon. Die Proliferation des BK-Gemisches in Anwesenheit der Steroidhormone könnte hauptsächlich über einen antiandrogenen Pathway, nicht über einen östrogenen Pathway vermittelt werden. Diese Mixtur scheint eine größere Affinität zu AR als zu ÖR zu haben. Das zeigt, dass bereits geringe Veränderungen in der Zusammensetzung der Gemische bzw. der Konzentrationen einzelner Bestandteile ihre biologische Aktivität beeinflussen können (206).

In einem zweiten Experiment konnten die ForscherInnen zeigen, dass die beiden Gemische BK und G in 10-facher Konzentration die Genexpression von 80 Genen in HMEC signifikant und verschieden voneinander beeinflussen. So wurden u.a. die Tumorsuppressorgene EPHA4 und EPHB2 von der G-Mixtur sowie die Onkogene GFRA1 und BHLHB8 von der BK-Mixtur upreguliert. Beide Mixturen könnten also zur Karzinogenese des Mammakarzinoms beitragen (207).

Trächtige Sprague-Dawley-Ratten wurden mit einer Mischung aus verschiedenen Organochlorpestiziden an den Gestationstagen 9 bis 16 in der Dosierung 1 μ l/g KG behandelt. In den Brustdrüsen der weiblichen Nachkommen konnten am 200. Lebenstag keine histologischen Veränderungen objektiviert werden. Einen die Aussage der Studie limitierender Faktor stellt die Tatsache dar, dass in dieser Behandlungsgruppe nur vier weibliche Nachkommen geboren wurden. Die verwendete Mixtur bestand aus: Aldrin, p,p'-DDT, p,p'-DDE, Dieldrin, Endosulfan (30, 30, 570, 50 bzw. 50 ng), Heptachlor, Hexachlorbenzol, Hexachlorocyclohexane, Mirex, Methoxychlor, 1,2,3-Trichlorobenzene, 1,2,4-Trichlorobenzene, 1,2,3,4-Tetrachlorobenzene, Pentachlorobenzene (0,5, 0,3, 0,3, 0,8, 2, 0,77, 2,3, 0,2 bzw. 0,5 μ g), TCDD 1 ng, Arochlor 1254 1 μ g, Cadmiumchlorid 0,7 μ g und Bleichlorid 0,1 ng (208).

Neugeborene weibliche Sprague-Dawley-Ratten (durchschnittliche Gruppengröße 33) wurden an den Lebenstagen 1, 5, 10, 15 und 20 mit einer Mischung auch p,p'-DDE, p,p'-

DDT und 19 PCBs (u.a PCB 77, 126, 169, 28, 118, 156, 138, 153 und 180) behandelt. Die jeweiligen Stoffverhältnisse des Gemisches richteten sich nach den Werten der von einem Neugeborenen täglich aufgenommenen Muttermilch, die Konzentration wurde jedoch 10-, 100- und 1.000-fach erhöht (x1.000 entspricht 10.694,14 µg/kg KG). Am 21. Lebenstag erhielten die Ratten zusätzlich eine intraperitoneale Injektion von 30 mg/kg KG N-Methyl-N-nitrosourea (MNU). In der MNU + 1.000 Gruppe kann es zu einer Zunahme von Mammaläsionen (benigne und maligne) bei den erwachsenen Ratten, verglichen mit den Kontrollgruppen, die nur MNU oder nur die Mixtur (x1.000) erhalten hatten. Wurden maligne und benigne Läsionen getrennt voneinander betrachtet, kam es zu keinem signifikanten Effekt. Bei der häufigsten Läsion handelte es sich um eine benigne Hyperplasie der Zellen in den TEBs und der lobulären und alveolären Strukturen (209).

Die Forschungsgruppe untersuchte außerdem die Auswirkungen einer Mischung aus AhR-Agonisten (ebenfalls Muttermilch nachempfunden) auf die Brustdrüse. Die verwendete Mischung enthielt die dioxin-artigen PCBs 77, 126, 169, sieben polychlorierte Dibenzofurane und acht polychlorierte Dibenzodioxine. Wieder wurden Gruppen von Sprague-Dawley-Ratten in den ersten 24 Lebenstagen (siehe oben) mit Substanzen verschiedener Konzentrationen (x1, x10, x100, x1.000) behandelt. Am 50. Lebenstag wurde die Mammaläsion-Entwicklung mit MNU initiiert. Die Gruppe, die die 1000-fachen Konzentration (ohne NMU) erhielt, zeigte im Alter von 32 Wochen einen signifikanten Anstieg an benignen Läsionen der Brustdrüse. Darüber hinaus fand sich in den NMU Gruppen kein signifikanten Effekt auf die Brustmorphologie und die Entwicklung von Brustläsionen (210).

Singulär verabreicht konnten Dieldrin (3 µM), p,p'-DDT (6 µM), PCB 153 (14 µM) und 2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl (8 µM) nach 90 Minuten die GJIC in HBEC nicht hemmen. Gemische aus p,p'-DDT+PCB 153 und Dieldrin+PCB 153 hingegen konnten eine signifikante Inhibierung der GJIC in HBEC induzieren. Weitere untersuchte Mixturen, die zu keinem signifikanten Ergebnis führten, waren: Dieldrin+2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl, Dieldrin+PCB 128, p,p'-DDT+2,2',4,4',5,5'-Hexabromobiphenyl und p,p'-DDT +PCB 128. Passend zur Reduktion der GJIC konnten beide Gemische die Level an phosphoryliertem Connexin43 senken, aber nicht die Konzentration von Connexin43-mRNS beeinflussen (139).

Aroclore stellen kommerzielle Gemische aus verschiedenen PCB-Kongeneren dar (siehe Kapitel 1.4.8). Aroclor 1221, 1232, 1248, 1256 und 1260 zeigten bis zu einer Konzentration

von 10^{-6} M weder eine östrogene, noch eine antiöstrogene Aktivität in MCF-7 Zellen. Untersucht wurde die Wirkung auf Ö₂-induzierte Sekretion von Procathepsin D (187).

10 µM Aroclor 1221 oder 1254 hingegen induzierten in einem anderen Experiment eine signifikante Zellteilung in MCF-7 Zellen. Eine Kombination der beiden Mischungen (jeweils beide in den Konzentrationen 0,1, 1 oder 10 µM) konnte aber keine signifikante Zellteilung bewirken. Wurde ein ERE-tk-CAT-Reportergen in MCF-7 Zellen exprimiert, konnten weder Aroclor 1221 noch Aroclor 1254 in den Dosierungen von 1 oder 10 µM eine signifikante CAT-Aktivität induzieren. In einem kompetitiven Bindungsassay konnte Aroclor 1221 minimal mit Ö₂ um den ÖR konkurrieren, Aroclor 1254 hingegen nicht (116). PCB101 (0,47-30 µM), PCB118 (0,23-15 µM), PCB138 (0,23-15 µM), und PCB153 (0,55-35 µM) wurden als Mixtur in verschiedenen Konzentrationen für sechs Tage mit MCF-7 Zellen inkubiert. Alle Konzentrationen führten zu einer signifikanten Hemmung der Zellteilung. Die höheren Konzentrationen zeigten nach 72 Stunden bzw. sechs Tagen zytotoxische Effekte. Keines der Gemische konnte die pS2-Expression beeinflussen. Die AutorInnen schreiben den antiproliferativen Effekt einer induzierten Apoptose zu (180).

3 µM Aroclor 1254 induzierte in MCF-10A Brustzellen eine signifikante Hemmung der Proliferation (Tag 5 vs. Tag 1). Ab Tag zwei kam es zu Zytotoxizität ($p < 0,001$). Die Behandlung induzierte eine signifikante Steigerung der intrazellulären und mitochondrialen O₂⁻-Konzentration, aber nicht der H₂O₂-Level. Zudem induzierte Aroclor 1254 eine signifikante Steigerung der Mangan-Superoxiddismutase-Aktivität und eine signifikante Abnahme der intrazellulären Glutathion-Konzentration. Durch Antioxidantien konnte die zytotoxische Wirkung des Pestizids aufgehoben werden, was auf eine Aroclor 1254-induzierte Zytotoxizität, die durch oxidativen Stress mediiert wird, schließen lässt (185).

In einer weiteren Studie der AutorInnen wurden MCF-10A Zellen in der G₀-Phase untersucht. Durch Inkubation mit Aroclor 1254 (3 µM) konnte der Eintritt dieser Zellen in die S-Phase im Vergleich zu Kontrollen signifikant gehemmt werden. Die beiden geringeren Konzentrationen 0,5 und 1 µM zeigten keine signifikanten Effekte (186).

Mit einer äquimolaren Mixtur bestehend aus PCB 28, PCB 52, PCB 101, PCB 138, PCB 153, PCB 180 und PCB 209 wurden ÖR-negative MDA-MB-231 und ÖR-positive MCF-7 Brustkrebszellen behandelt. Anhand eines Transwell-Migrations-Assays konnte gezeigt werden, dass 30 nM dieser Mischung für 24 Stunden die Migration in beiden Zellenarten um das ca. zehnfache steigerte. Der ÖR und der AhR scheinen für die PCB-induzierte Migration nicht von Nöten zu sein. PCBs steigern intrazelluläre ROS, darüber kommt es zu einer Aktivierung der Rho-assoziierten Kinasen 1 und 2. Folge ist die Phosphorylierung der

leichten Ketten von Myosin, was die Motilität dieser Zellen steigert und neben anderen möglichen Mechanismen zur Tumorprogression führen könnte. Bei 60 nM kam es aufgrund der Zytotoxizität zu keinem signifikanten Effekt. In vivo konnten 3 nM/kg der PCB Mischung in (NOD/SCID) Mäusen nach vier Wochen eine vermehrte Metastasierung von MDA-MB-231 Zellen in Leber, Lungen und Knochen induzieren. Limitierend ist hierbei allerdings, dass beide Gruppen aus nur jeweils vier Mäusen bestanden (211).

4 Diskussion

4.1 Östrogen-abhängige Karzinogenese des Mammakarzinoms

Ö₂ induziert Proliferation über den ÖR. Durch die Steigerung der Zellteilung nimmt gleichzeitig die Fehlerwahrscheinlichkeit während der DNS-Replikation zu. Durch weniger Zeit für die Reparatur von DNS-Schäden, wie z.B. DNS-Addukte oder DNS-Brüche, könnten diese als Mutationen fixiert und somit an Tochterzellen weitergegeben werden. Gesteigerte Zellteilung könnte eine Gemeinsamkeit in der Pathogenese vieler Krebsarten ausmachen. Die Zellteilungsrate könnte im Zusammenhang mit der Anzahl der nicht reparierten DNS-Schäden stehen (22,25).

Das menschliche Brustgewebe exprimiert sowohl den ÖR- α , als auch den ÖR- β (52). An diese Rezeptoren binden Ö₂, Ö₁ und Östriol mit hoher Affinität, wobei Ö₂ der potenteste Agonist ist (35). Die beiden ÖRs regulieren sowohl gemeinsame als auch verschiedene Gene und können dieselben Gene auf unterschiedliche Art und Weise regulieren (212).

Der ÖR- β wirkt pro-apoptotisch und antiproliferativ (32). Der ÖR- α stimuliert Zellteilung und trägt so maßgeblich zur Karzinogenese bei (39). In ÖR- α positiven Brustkrebszellen hemmt der ÖR- β die ÖR- α -induzierte Zellteilung (46). Der primäre Subtyp, der die Effekte von Ö₂ mediiert, ist der ÖR- α . Der ÖR- β scheint die mammatrophe Wirkung des ÖR- α zu kontrollieren (50).

Die ÖR- β Expression nimmt während des Fortschreitens des Mammakarzinoms im Vergleich zu gesundem Brustgewebe ab (51). Während 80 % der Epithelzellen einer gesunden Brust ÖR- β exprimieren, sinkt der Anteil beim invasiven duktalem Karzinom auf nur 10 % (52). Die Expression von ÖR- α und - β ist gewebeabhängig. Je nach Entwicklungsstadium kommt es in der Brustdrüse der Ratte zu Schwankungen der Expression des ÖR- α , aber nicht des ÖR- β . Dies führt zur Zeit der Pubertät und Schwangerschaft zu einer Abnahme, während der Laktation zu einer Zunahme und anschließend wieder zu einer Abnahme der Expression des ÖR- α (213).

Östrogene können über verschiedene Wege Einfluss auf eine Zelle nehmen. Beim klassischen Mechanismus kommt es nach dem Binden von Liganden an ÖRs zur Dimerisierung von zwei Rezeptoren, die schlussendlich an EREs in der DNS binden. Die Rezeptordimere können auch über Transkriptionsfaktoren wie AP-1 oder Sp-1 an die DNS binden und beeinflussen so Gene, die kein ERE im Promoter haben. Dieser Vorgang wird

„tethering“ genannt (35,39). Die Rezeptoren können bei der Dimerisierung Homo- und Heterodimere bilden. ÖR- α gepaart mit ÖR- α sowie ÖR- β gepaart mit ÖR- β bezeichnet man als Homodimere, ÖR- α gepaart mit ÖR- β bilden Heterodimere. Heterodimere regulieren Gene, die zu einem Großteil nicht von Homodimeren reguliert werden (53–55). Nach Behandlung mit Östrogen kommt es in Zellen innerhalb von drei bis 15 Minuten zu sogenannten schnellen bzw. nicht-genomischen Effekten (39). Diese werden möglicherweise durch membranständige ÖRs oder durch den G-protein-coupled estrogen receptor (GPER) vermittelt (56,63). Es kommt zur Aktivierung von PI3K, Src, MAPK, eNOS, erb-B2, caveolin 1, EGFR, IGF-IR und G-Protein, welche durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren auch zur Gentranskription führen können (39). ÖRs können jedoch auch ligand-unabhängig über die Aktivierung von IGF oder EGFR Transkription bewirken (61,62).

Im Rahmen der Biotransformation werden Östrogene in wasserlösliche Metaboliten umgewandelt, die über Harn oder Stuhl ausgeschieden werden (26). Vermutlich tragen diese Metaboliten zur ÖR-unabhängigen Karzinogenese von Brustkrebs bei (23). CYP1A1 und CYP1B1 hydroxylieren Ö₂ und Ö₁ in Phase I der Biotransformation. Mehrere Pathways des Östrogenmetabolismus konkurrieren miteinander: der 4-Hydroxylierungspatway (hauptsächlich über CYP1B1), der 2-Hydroxylierungspatway (hauptsächlich über CYP1A1) und der 16-Hydroxylierungspatway (22,69). So entstehen Catecholöstrogene (2- bzw. 4-Hydroxyöstrogene) und 16 α -Hydroxyöstron. Diese werden entweder über die COMT in Phase II der Biotransformation methyliert, wobei nicht-gentoxischen Methylöstrogene entstehen, oder sie werden weiter zu 2,3- bzw. 3,4-Chinonen metabolisiert (214). Diese Chinone bilden DNS-Addukte. Während die 2,3-Chinone, die aus dem 2-Hydroxylierungspatway stammen, stabile DNS-Addukte bilden, bilden 3,4-Chinone instabile DNS-Addukte, die DNS-Schaden verursachen können (215,216). Die depurinierenden Addukte, welche von den jeweiligen Chinonen gebildet wurden, korrelieren mit der Karzinogenität des jeweiligen Catecholöstrogens (216). Ein Shift in der Balance zwischen Methylierung (und somit Entgiftung durch die COMT) und der Bildung von Chinonen könnte zur Induktion von DNS-Schaden führen (70).

4.2 Xenoöstrogene

Am besten wurde die Wirkung von Xenoöstrogenen in den östrogen-kompetenten MCF-7 Mammakarzinomzellen untersucht (94,116,121,123,168,183). Die Evidenz zeigt, dass alle untersuchten Xenoöstrogene mit Ausnahme von PCBs in vitro eine östrogene Aktivität bzw. Proliferation induzieren, die um Größenordnungen geringer als die von Ö₂ ist (117,118,120,146,167). Dioxin-artige und nicht-dioxin-artige PCBs wurden in vitro einerseits als östrogen, andererseits als antiöstrogen klassifiziert (181,182,187–191,195,196).

Dank der großen Ligand-bindenden-Domäne der ÖRs, die etwa doppelt so groß wie die von Ö₂ ist (33), binden einige, aber nicht alle Xenoöstrogene an den ÖR- α und/ oder ÖR- β (34,113,117,217–219). So führt β -HCH, ohne Bindung, zur Transaktivierung des ÖRs, über einen ligand-unabhängigen Pathway (118,120,144). Die untersuchten Xenoöstrogene binden/aktivieren nicht einfach den ÖR und wirken auf gleiche, aber eben schwächere Art und Weise wie endogene Östrogene, sondern sie entfalten je nach Chemikalie unterschiedliche Wirkungen und zeigen darüber hinaus ÖR-unabhängige Effekte (126–128,130,138,153,205,220). o,p'-DDT z.B. führt in MCF-7 Zellen sowohl zur Expression von Genen, die von Ö₂ upreguliert werden, als auch von solchen, die nicht durch Ö₂ induziert werden (128). Xenoöstrogene zeigen auch in ÖR-negativen Zellen Wirkung (126,130,139,152,167,170). Bereits einzelne DDT-Isomere bzw. -Metaboliten wirken sich in vitro sehr unterschiedlich aus. So induziert p,p'-DDT Proliferation, HER2 und Erk1/2 Aktivierung in ÖR-negativen Brustzellen, während o,p'-DDT dazu nicht fähig ist (120,122,126). In ÖR-positiven Zellen konnte p,p'-DDT keine HER2-Aktivierung herbeiführen, o,p'-DDT hingegen schon (124). o,p'-DDT aktiviert den Src/Ras/Erk-Pathway in MCF-7 Zellen, p,p'-DDE besitzt diese Eigenschaft nicht (127).

Xenoöstrogene aktivieren Kinase-Pathways. Das kann in ÖR-abhängigem schnellen/nicht genomischen Signaling, aber auch in ÖR-unabhängigem Signaling resultieren (126–128,130,153,220).

- Dieldrin induziert Erk1/2, p38 und den PI3-K/Akt-Signalpathway in MELN (153).
- β -HCH aktiviert erbB2, Erk1/2 und den Src/Ras/Erk-Pathway in MCF-7 Zellen (124,125,127,221).
- Endosulfan aktiviert Erk1/2 und PI3-K in MCF-7 Zellen (220).
- p,p'-DDT aktiviert HER2, Erk1/2, c-met in ÖR-negativen MCF-10A Zellen (126).

- o,p'-DDT induziert Phosphorylierung von Akt, PKA, HER2, den MAPKs Erk1/2, JNK und p38 α sowie Aktivierung des Src/Ras/Erk-Pathways in MCF-7 Zellen (124,127,128,130).
- HCB aktiviert den IGF-I-Pathway in MCF-7 Zellen sowie AhR-abhängig und -unabhängig die HER1/Erk1/2- und c-Src/HER1/STAT5b-Pathways in MDA-MB-231 Zellen. Zudem induziert HCB Smad3, JNK und p38 Phosphorylierung in MDA-MB-231 Zellen (167,170,175).

Einige der untersuchten Xenoöstrogene fallen neben ihrer östrogenen Wirkung durch eine Affinität zu anderen Rezeptoren auf (118,148). HCB wirkt als schwacher Agonist am AhR (222), p,p'-DDE wirkt antagonistisch am AR und Chlordan ist ein Antagonist des ERR α -1 (118,140,164,223). Auch Dieldrin, Methoxychlor, o,p'-DDT, p,p'-DDT, Endosulfan, HCB und Chlordan wirken antagonistisch am AR (118,224,225). o,p'-DDT, p,p'-DDE und p,p'-DDT wirken antagonistisch am PR in ÖR-positiven Brustkrebszellen und in einem hefebasierten Assay. Aber nur o,p'-DDT bindet an den Rezeptor (129,225). Dioxin-artige PCBs binden an den AhR und induzieren CYP1A1 und CYP1B1 (108,191,192,195,196,226). Die anhaltende Aktivierung des AhRs stellt eines der Schlüsselemente in der Karzinogenese dieser Verbindungen dar. Es kommt zur Hemmung der interzellulären Kommunikation und Adhäsion, zur Induktion von Proliferation, Zellzyklus-Deregulation und zu erhöhter Invasivität und Plastizität. Schlussendliche Konsequenz ist auch die Induktion von CYP1-Enzymen. Diese Kongenere wirken aber nicht nur dioxin-artig über den AhR, sondern zeigen auch AhR-unabhängige Wirkungen über andere Pathways (108).

Zu einigen Wirkungen von Xenoöstrogenen besteht noch Forschungsbedarf. Die bereits vorhandene Evidenz soll nun in Folge dargelegt werden. Bezüglich der Bewertung der Evidenz muss erwähnt werden, dass Studien zu bestimmten Substanzen oft nur aus bestimmten einzelnen Institutionen vorliegen und die Ergebnisse nicht durch andere, von der primären Institution unabhängige Zentren überprüft wurden. HCB z.B. wurde größtenteils von einer einzelnen Institution beforscht (167,168,170–173,176), Gleiches gilt für β -HCH (94,124,125,144,221).

Der ÖR- β wurde 1996 entdeckt, Jahrzehnte nach Entdeckung des ÖR- α (28,29). Das bedeutet, dass in Experimenten, die davor durchgeführt worden waren, nicht zwischen den beiden Subtypen unterschieden wurde (100,115).

Wie bereits erwähnt zeigen Xenoöstrogene und Ö₂ in vitro einerseits die gleichen, andererseits aber auch unterschiedliche Wirkungen in Brustkrebszellen (127,128,130,136,138,164,166). Nachdem ein Ligand an die Ligand-bindenden-Domäne eines ÖRs gebunden hat, kommt es zu einer Konformationsveränderung, welche zu einem transkriptionskompetenten Rezeptor führt (33,35). Die Liganden induzieren für sie spezifische Konformationsveränderungen, die die Exposition von einmaligen Oberflächen für die Interaktion mit Ko-Regulatoren nach sich ziehen und so ihre intrinsische Aktivität regulieren können (35,227,228). Verbindungen, die als Xenoöstrogene z.B. durch ein Proliferations-Assay klassifiziert wurden, üben diese östrogen-artige Wirkung nicht zwingend durch die gleiche ÖR-Konformation aus (157). Östrogen-artige Verbindungen unterscheiden sich in ihrer Fähigkeit schnelles/ nicht-genomisches und genomisches Signaling zu induzieren und sind in der Lage einen der beiden Wege oder beide Wege unabhängig voneinander hervorzurufen (127). Die Aktivierung von schnellem, ÖR-abhängigen Signaling könnte abhängig von der Struktur von Xenoöstrogenen sein. Dies kann Hemmung oder Aktivierung von Kinasen zur Folge haben (220).

Wie bereits erwähnt, zeigen mehrere der untersuchten Chemikalien eine antiandrogene Wirkung (118,224). Der Androgen-Pathway hemmt das Zellwachstum östrogen-kompetenter Brustkrebszellen. Durch die Blockade dieses Pathways durch p,p'-DDE könnte es zur Progression von Mammakarzinomen kommen (140). Wie andere Xenoöstrogene alleine und in Gemischen, die ebenfalls antiandrogen wirken, den Crosstalk zwischen ÖR und AR beeinflussen, muss jedoch noch beforscht werden.

ÖR- α und PR-positive Mammakarzinome zeigen ein besseres Outcome als ÖR- α -positive und PR-negative Mammakarzinome (229). In Anwesenheit von agonistischen Liganden (Östrogen und Progesteron) interagiert der PR mit dem ÖR- α . Das führt zu einzigartiger Genexpression, die mit gutem klinischem Outcome beim Mammakarzinom assoziiert ist. Der PR hemmt die ÖR- α -induzierte Proliferation im östrogenen Milieu (230). Hypothetisch könnten Chemikalien, die eine antagonistische Wirkung am PR zeigen (wie sie durch o,p'-DDT, p,p'-DDT und p,p'-DDE ausgeübt wird (129)), zur Progression von Brustkrebs beitragen. Insbesondere, wenn die Chemikalien auch eine agonistische Wirkung am ÖR- α ausüben.

Methoxychlor wirkt antagonistisch am ÖR- β , Dieldrin und Endosulfan möglicherweise ebenfalls (117,118). Der ÖR- α ist in der hormonabhängigen Tumorprogression mit der

Entwicklung von Malignität, Inflammation und anomaler Proliferation assoziiert. Der ÖR- β zeigt anti-invasive und anti-migratorische Eigenschaften. Zudem scheint der ÖR- β der ÖR- α -induzierten Proliferation durch Modulation der ÖR-induzierten Genexpression entgegenzuwirken (39). Deshalb könnte ein Pestizid, das agonistisch am ÖR- α und antagonistisch am ÖR- β wirkt, potentiell schädlicher sein als ein reiner ÖR- α -Agonist (117). Der ERR α -1 stellt einen „orphan“-Rezeptor, der im menschlichen Brustgewebe exprimiert wird, dar. Chlordan wirkt an diesem Rezeptor als Antagonist. Trotz einer hohen Sequenzhomologie mit dem ÖR- α binden weder Östrogene, noch Androgene an diesen Rezeptor (164). EER α -1 kann mit dem ÖR- α interagieren und als Monomer an EREs in der DNS binden (231). Möglicherweise könnte Chlordan über eine Reduktion der ERR α -1-Aktivität zu einer Unterdrückung der Aromatase-Expression führen und so die Östrogenbiosynthese beeinflussen (164,232). Wie sich der Crosstalk zwischen den verschiedenen Rezeptoren, an die die jeweiligen Verbindungen binden bzw. die transaktiviert werden, auf die Pathogenese des Mammakarzinoms auswirkt, ist Bestandteil weiterführender zukünftiger Studien.

PCB 138, 153 und 180 (nicht-dioxin-artig) wirken in MCF-7 Zellen östrogen, proliferativ und antiapoptotisch (181). In MCF-7 BUS Zellen wirken sie sowohl östrogen, als auch antiöstrogen (182). Auch PCB77 und PCB 126 (dioxin-artig) wurden in vitro nicht nur als östrogen, sondern auch als antiöstrogen klassifiziert (187–191,195,196). Durch das Abziehen des ÖR- α von seinen eigentlichen (östrogenen) Zielpromotern könnte ein Teil der antiöstrogenen Wirkung von dioxin-artigen PCBs entstehen (111). PCB 77 und PCB 126 induzieren eine Translokation des AhR/ARNT-Komplexes zum Promoter von CYP1A1. Zusätzlich kommt es zu einer Rekrutierung des ÖR- α an diesen Promoter. Ob diese Rekrutierung über den AhR oder durch direkte Aktivierung des ÖR- α durch PCBs geschieht, blieb aufgrund bisher widersprüchlicher Ergebnisse noch ungeklärt (191,195,196). PCB 77 zeigte in vivo eine antiöstrogene Wirkung im Sinne einer Abnahme von Tumolvolumen und -gewicht DMBA-induzierter Brusttumoren (189). Wurden PCB 77 und DMBA gleichzeitig verabreicht, kam es zur signifikanten gesteigerten Inzidenz von Mammatumoren allgemein und zu mehr Brusttumoren mit invasiven Eigenschaften. Möglicherweise kommt es durch PCB 77 zur Induktion von CYP1A1 und so zur Bildung der eigentlich kanzerogenen Metaboliten von DMBA (193).

Beeinträchtigte Apoptose stellt einen entscheidenden Faktor in der Malignomentwicklung dar (233). o,p'-DDT hemmt die Apoptose in MCF-7 Zellen und steigert ÖR-abhängig die BCL-2-Expression (121,123). Die BCL-2-Familie wirkt anti-apoptotisch und reguliert den intrinsischen Apoptose-Pathway zusammen mit pro-apoptotischen Gegenspielern. Eine Überexpression des anti-apoptotischen BCL-2 könnte onkogen sein (233,234). Zudem konnte o,p'-DDT auch die TNF- α induzierte Apoptose hemmen (123). Über die TNF-Familie wird der extrinsische Pathway der Apoptose reguliert (233). In ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen konnte o,p'-DDT die Apoptose nicht hemmen (123). Dieldrin hingegen bewirkte in ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen mehr Widerstandsfähigkeit gegenüber Anoikis. Durch Steigerung der Überlebensfähigkeit von Brustkrebszellen könnte Dieldrin zur Pathogenese von Brustkrebs beitragen (152). Dieldrin war in epidemiologischen Studien zweier dänischer Gruppen mit einem erhöhten Risiko an Brustkrebs zu erkranken und mit erhöhter Mortalität assoziiert (235–237). Des Weiteren war die Wahrscheinlichkeit bei hohen Dieldrin Konzentrationen ein ÖR-negatives Mammakarzinom zu entwickeln erhöht (238).

Einige der untersuchten Xenoöstrogene können *in vitro* in den Östrogenmetabolismus und in die Östrogenbiosynthese eingreifen (130,131,141). o,p'-DDT induziert Aromatase-Expression in ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen sowie ÖR-positiven MCF-7 Brustkrebszellen und greift so *in vitro* auch in die Biosynthese von Östrogen ein (130). Endosulfan- α , Dieldrin und Chlordan senken die CYP1A1 Aktivität *in vitro* (165). Dadurch könnte es zu einer Verschiebung des CYP1A1/CYP1B1-Verhältnisses und zu einem Shift im Östrogenmetabolismus zu genotoxischeren Metaboliten kommen. CYP1A1 trägt in der Biotransformation von Östrogenen hauptsächlich zum 2-Hydroxylierungspfad bei, der zu weniger genotoxischen Metaboliten als der 4-Hydroxylierungspfad führt, zu dem CYP1B1 hauptsächlich beiträgt (22,69,165,216). Endosulfan- α und - β , p,p'-DDE und o,p'-DDT steigern passend dazu die 16 α -Hydroxyöstron/2-Hydroxyöstron-Ratio in MCF-7 Zellen (131). 16 α -Hydroxyöstron wirkt *in vitro* proliferativ, antiapoptotisch und genotoxisch (76,77).

o,p'-DDT verändert wie auch Ö₂ das Expressionsprofil von Mikro-RNS in MCF-7 Zellen. Auch hier glich die Expression teilweise der von Ö₂ induzierten, teilweise unterschieden sie sich (136). Mikro-RNS kodiert nicht für Proteine, sondern reguliert die Translation verschiedener Ziel-mRNS in Proteine. Posttranskriptionales Gen-Silencing ist einer der

maßgeblichen Mechanismen der Regulation der Genexpression. Mikro-RNS kontrollieren die Differenzierung, das Überleben und das Wachstum von Zellen und spielen dementsprechend auch eine Rolle in der Karzinogenese. Eine veränderte Mikro-RNS-Expression wurde in vielen Krebsarten identifiziert. So kann die Über- bzw. Unterexpression von Mikro-RNS zu einer vermehrten Translation von onkogenen mRNS oder zur verminderten Translation von tumorsuppressiver mRNS führen (44). Durch eine Veränderung des Expressionprofils von Mikro-RNS könnten Xenoöstrogene zur Karzinogenese beitragen (136).

Eine Vielzahl biologischer Prozesse wird durch ROS reguliert. Auch in der Entstehung von Krebs könnten diese hochreaktiven Moleküle und Ionen eine Rolle spielen. Tumorenstehung und -progression könnten aufgrund von molekularen Veränderungen, welche ROS induzieren, entstehen. ROS-Level zeigen sich in Tumorzellen erhöht (239). Die dioxin-artigen PCBs 126 und 77 sowie die nicht-dioxin-artigen PCBs 52 und 153 induzieren ROS und DNS-Schäden in ÖR-positiven und -negativen Brustkrebszellen. Dabei scheint der ÖR- α protektiv zu wirken (179,184). Die kommerzielle PCB-Mischung Aroclor 1254 steigert die $O_2^{\cdot-}$ -Konzentration in MCF-10A Brustzellen (185). Ein Gemisch aus sieben nicht-dioxin-artigen PCBs erhöht die Motilität in MCF-7 Zellen (nicht metastasierend) und MDA-MB-231 Zellen (metastasierend) durch Induktion von ROS, was zu einer Aktivierung der Rho-assoziierten Kinase führt. Diese Effekte sind AhR- und ÖR-unabhängig (211). Die Kanzerogenität von PCBs darf nicht alleine den dioxin-artigen PCBs zugeschrieben werden. Nicht-dioxin-artige Kongenere wirken über multiple AhR-unabhängige Pathways. So induzieren sie ROS, unterdrücken Bestandteile von tight-, gap- und adherens- Junctions, was wiederum alles zur Promotion und Progression von Tumoren beitragen könnte. Elektrophile Spezies entstehen durch metabolische Aktivierung von PCB-Kongenere mit bis zu vier Chloratomen. Diese resultieren in einer Steigerung von DNS-Addukten (108).

Xenoöstrogene könnten auch Einfluss auf die Angiogenese nehmen. Die Angiogenese ist eine Neovaskularisierung, die es einem Tumor ermöglicht, ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt zu werden sowie CO_2 und Abfallstoffe in die Blutbahn abzugeben. In der Tumorprogression wird meist ein sogenannter „Angiogenic-Switch“, der zur Vaskularisierung von Tumorgewebe führt, aktiviert. Zu den Faktoren, die die Angiogenese regulieren, gehören sowohl hemmende als auch fördernde. VEGF-A sendet über Oberflächenrezeptoren stimulierende Signale an Endothelzellen und fördert so die

Angiogenese. VEGF kann über Signaling von Onkogenen und durch Hypoxie upreguliert werden (234). o,p'-DDT steigert die Expression von VEGF-A in MCF-7 Zellen ÖR-unabhängig (128). Dieldrin steigert die Expression von VEGF ÖR- α -abhängig. Verschiedene Kinasen scheinen in die Dieldrin-induzierte VEGF-Expression involviert zu sein: Erk1/2, p38 und der PI3-K/Akt-Signalpathway. Dabei scheint p38 nur in den von Dieldrin induzierten Signalpathway involviert zu sein, nicht in den von Ö₂ (153). HCB fördert im Maus-MDA-MB-231-Xenograftmodel die Angiogenese und VEGF Expression. HCB steigert die VEGF-Sekretion und VEGFR2-Proteinlevel und induziert Migration und Tubulogenese über AhR, COX-2 und VEGFR2-Pathways in humanen Endothelzellen (HMEC1) (175). In der Extrazellulärmatrix können latente Formen von VEGF-Liganden gelagert werden, die durch Degradation der Extrazellulärmatrix, durch Matrix-degradierende Proteasen wie MMP9 frei werden (234). o,p'-DDT steigert die Genexpression von MMP9 und MMP2 in MCF-7 Zellen (134). β -HCH steigert MMP12- und MMP13-mRNS in MCF-10AT1 Zellen (145). HCB induziert Aktivierung und Sekretion der MMP9 und eine Steigerung der mRNS von MMP9 und MMP2 in ÖR-negativen MDA-MB-231 Zellen (170,171).

Im Zuge der malignen Progression epithelialer Karzinome kommt es zu lokaler Invasion und Metastasierung. Dabei entstehen Veränderungen der Verankerung von Zellen untereinander, der Extrazellulärmatrix und der Zellform. Die "epithelial-to-mesenchymal transition", ein Prozess, der zur Wundheilung und embryonalen Morphogenese von Zellen genutzt wird, wird zweckentfremdet und gibt epithelialen Tumorzellen die Fähigkeit zur Invasion und Metastasierung (234). o,p'-DDT steigert ÖR-abhängig das invasive Potential von MCF-7 Zellen. Dies steht in Zusammenhang mit einer Expressionssteigerung der invasivitäts-unterstützenden Proteine MMP9 und MMP2. Die verminderte Zell-Zell-Adhäsion ist assoziiert mit der o,p'-DDT-induzierten Downregulation der E-Cadherin- und β -Catenin-Genexpression (134). E-Cadherin ist ein Schlüsselenzym der Zell-Zell-Adhäsion. Dieses Enzym bildet Adherens Junctions und nimmt im Laufe der malignen Progression von Karzinomen ab (234). Dieldrin, p,p'-DDT und PCB 153 hemmen die GJIC in ÖR-negativen HBEC. Dieldrin und p,p'-DDT induzieren eine Connexin43-Hyperphosphorylierung und Dieldrin induziert zusätzlich einen Verlust von Connexin43-Membranplaques. Auch Gemische aus p,p'-DDT und PCB 153 bzw. Dieldrin und PCB 153 konnten die GJIC in HBEC hemmen (139). Chronische HCB-Exposition führt in vivo zu Connexin43-Downregulation in der Brustdrüse von Ratten (174). In der weiblichen Brust werden

Connexin26 und Connexin43 exprimiert. In frühen Stadien des Mammakarzinoms und in fortgeschrittenen primären Tumoren sind die Connexine oft downreguliert oder nicht zu klar erkennbaren Gap Junctions formiert. Das könnte die Invasion und Intravasion von Tumorzellen erleichtern (240). Auch Pestana et al. konnten eine gesteigerte Invasivität nach o,p'-DDT-Behandlung in MCF-7 Zellen beobachten, jedoch eine gesenkte in MDA-MB-231 Zellen (122). MCF-7 Zellen, die langfristig mit β -HCH behandelt wurden, zeigten vermehrt verankerungs-unabhängiges Wachstum (94). In MCF-10AT1 Zellen, die mit β -HCH inkubiert wurden, kam es zur vermehrten Expression von MMP12- und MMP13-mRNS (145). HCB induziert vermehrte Migration und Invasion in MDA-MB-231 Zellen unter Beteiligung der AhR-, c-Src- und HER1-Pathways. Zudem kommt es zu Aktivierung und Sekretion der MMP9 und zu einer Steigerung der mRNS von MMP9 und MMP2 (170,171). Im Rattenmodell ist HCB ein Ko-Karzinogen und induziert Metastasierung (171–173). Der „transforming growth factor- β “ (TGF- β) wirkt antiproliferativ. Bei Krebs im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einer Veränderung im Signaling. Statt antiproliferativ zu wirken, aktiviert TGF- β die „epithelial-to-mesenchymal transition“. Ein Zellprogramm, das in Krebszellen Eigenschaften induziert, die mit hochgradiger Malignität assoziiert sind (234). HCB steigert TGF- β 1-Proteinlevel und Aktivierung und moduliert die Interaktionen zwischen AhR und TGF- β 1, was zu einem invasiven Phänotyp von MDA-MB-231 Brustkrebszellen führt (176). Sieben nicht-dioxin-artige PCBs konnten im in vivo MDA-MB-231-Maus-Modell die Metastasierung in Knochen, Lunge und Leber steigern. In vitro konnten sie die Motilität von MCF-7 Zellen steigern (211).

Die IARC klassifiziert Endosulfan nicht und Methoxychlor als „not classifiable as to its carcinogenicity to humans“. β -HCH, HCB und Chlordan werden als „possibly carcinogenic to humans“, Dieldrin und DDT als „probably carcinogenic to humans“, und „dioxin-artige“ PCBs als „carcinogenic to humans“ in Bezug auf maligne Melanome eingestuft. Sowohl bei Dieldrin, als auch bei dioxin-artigen PCBs besteht eine positive Assoziation mit Brustkrebs (86,93,108). Bezüglich DDT und dem Mammakarzinom schreibt die IARC, dass seit 1993 über 40 Studien und vier Metaanalysen durchgeführt worden seien, um eine mögliche Assoziation zwischen p,p'-DDE und/ oder p,p'-DDT und dem Mammakarzinom aufzuzeigen. Größtenteils ist dies nicht gelungen, was von Metaanalysen bestätigt wird. Von Interesse bleibt das Alter zum Zeitpunkt der Exposition in Relation zum Brustkrebsrisiko (86). Dieser Zeitfaktor könnte von entscheidender Bedeutung für die Karzinogenese des Mammakarzinoms sein (86,241,242). Zu diesem Thema besteht noch viel

Forschungsbedarf. Es gibt jedoch bereits in vivo Evidenz. So zeigten sich in den Brustdrüsen von Sprague-Dawley-Ratten, die peripubertär o,p'-DDT erhielten, am 35. Lebenstag vermehrt chromosomale Aberrationen und Proliferation (137). Zu dieser Zeit ist die Morphogenese der Brust in vollem Gange. Hochproliferative Strukturen, die „Terminal End Buds“ genannt werden und von denen die Brustentwicklung in der Pubertät ausgeht, sind bereits vorhanden. Die Empfindlichkeit gegenüber chemischen Karzinogenen ist zu diesem Zeitpunkt erhöht (243,244). Johnson et al. pflanzten präpubertären MMTV-neu-Mäusen Pellets, welche p,p'-DDE abgeben, in die Brustdrüse ein. Es kam zu einer signifikanten Verringerung der Latenzzeit von HER2-positiven Brusttumoren (142). MMTV-Mäuse, die bis zur Entwöhnung mit 4,5 µg/g KG Dieldrin gefüttert wurden, zeigten nach Wochen eine signifikant erhöhte Tumorinzidenz und ein signifikant erhöhtes Tumolvolumen (155). Ratten, die in Utero, ab dem 14. Gestationstag mit täglich Dieldrin 15 µM behandelt wurden, zeigten am 18. Gestationstag ein verzögertes Brustwachstum und unterentwickelte alveoläre Strukturen (245). Die epitheliale Brustknospe bildet sich bei Mäusen in Utero am 12. bis 14. Gestationstag. Sie beginnt als Reaktion auf Signale des umliegenden Fettgewebes primäre Ducti zu formen. Diese Ducti wachsen dann in den Fettkörper ein. Durch Einflussnahme auf diesen Prozess könnte es zu Veränderungen im zeitlichen Ablauf der Brustentwicklung oder der alveolären Strukturen kommen (243).

Bei der histopathologischen Untersuchung der Brustdrüsen von weiblichen Sprague-Dawley-Ratten, die ab dem 65. Lebenstag mit HCB behandelt wurden, zeigten sich am 150. Lebenstag vermehrt hyperplastische Ducti, eine erhöhte Anzahl an „Terminal End Buds“, vermehrte Proliferation der Ducti und eine erhöhte Anzahl von Nuclei im Stroma (173). In der peripubertären Phase treten bei Ratten hochproliferative Strukturen in der Brustdrüse auf, die „Terminal End Buds“ genannt werden. Im Laufe der Differenzierung zur reifen Brust verschwinden diese wieder. Sie entwickeln sich zu terminalen Ducti und Alveolarknospen weiter. In weiblichen Sprague-Dawley-Ratten kommt es am 21. postnatalen Tag zu einer maximalen Dichte an „Terminal End Buds“, daraufhin bis zum 63. Lebenstag zu einer steilen Abnahme und bis zum 84. Tag nochmals zu einer langsamen Abnahme. „Terminal End Buds“ sind empfindlich gegenüber chemischen Karzinogenen. Ist die Brust während der Zeitspanne, in der „Terminal End Buds“ präsent sind, chemischen Karzinogenen ausgesetzt, ist dies mit einer erhöhten Tumoranzahl pro tumortragender Ratte assoziiert (244). HCB führt in Ratten zu einer erhöhten Anzahl an „Terminal End Buds“ am 150. Lebenstag (173). Potentiell könnte jede Chemikalie, die die Anwesenheit von „Terminal End Buds“ in der Brustdrüse verlängert oder deren Differenzierung verlangsamt,

Einfluss auf die Empfindlichkeit der Brust gegenüber Karzinogenen nehmen (243). PCBs wurden in der Muttermilch gefunden und überwinden die Blutplazentaschranke. Geringere Konzentrationen an entgiftenden Enzymen führen in Kombination mit niedrigen Aufnahmebarrieren in der Lunge, der Haut und gastrointestinal zu einer verstärkten Akkumulation von PCBs in Kindern (108). So hatte PCB 126 auf Sprague-Dawley-Ratten, die intrauterin und während dem Säugen mit der Chemikalie behandelt wurden, je nach Dosierung unterschiedliche Auswirkungen. In der höchsten Dosierung (7,5 µg/kg KG) reduzierte es die Mammatumorzinzidenz signifikant, während es bei 250 ng/kg KG zu einem erhöhten Tumorgewicht und zu einem erhöhten Proliferationsindex der Tumoren kam (246). Passend dazu konnte gezeigt werden, dass 7,5 µg/kg KG PCB 126 nach 30 Tagen zu einer reduzierten Anzahl an „Terminal End Buds“ in der Brustdrüse von Ratten führt, die sich nach 50 Tagen zwar nicht mehr signifikant von denen der Kontrollen unterschied, aber einen geringeren Proliferationsindex hatte. Bei 250 ng/kg KG hingegen zeigte sich am 50. Lebensstag eine signifikant erhöhte Anzahl an „Terminal End Buds“ und ein signifikant erhöhter Proliferationsindex. Dadurch könnten Ratten, die mit der höheren Dosis behandelt wurden, im Gegensatz zur geringeren Dosierung geschützt vor einem Karzinogen sein (247). Verschiedene Gemische aus endokrinen Disruptoren, mit denen Ratten in Utero und/oder während dem Säugen behandelt wurden, hatten keinen Effekt auf spätere durch Karzinogene induzierte Tumoren (208–210).

Auch zwei epidemiologische Studien konnten einen möglichen Zusammenhang zwischen Expositionszeitpunkt und Brustkrebs aufzeigen. Cohn et al. konnten DDT-Exposition in frühen Lebensjahren mit Krebserkrankungen in zwei Generationen in Verbindung bringen (248,249). Sie untersuchten das Serum von Frauen, denen von 1959 bis 1967 nach Geburt eines Kindes in den USA im Rahmen der Child Health and Development Studies (CHDS) Blut abgenommen worden war. In diesem Zeitraum hatte die Verwendung von DDT in den USA ihr Maximum erreicht. 129 Frauen, die vor dem 50. Lebensjahr invasiven oder nichtinvasiven Brustkrebs entwickelten, wurden in die Nested-Case-Control-Studie eingeschlossen und gematcht. Das Serum wurde auf p,p'-DDT, o,p'-DDT und p,p'-DDE untersucht. DDT wurde ab 1945 in den USA vermehrt verwendet. Frauen, die 1945 jünger als 14 Jahre alt waren und deren p,p'-DDT-Werte in der oberen Terzile lagen, hatten ein signifikant erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken (OR = 5,4 CI, 1,7-17,1, $p < 0,01$). o,p'-DDT hingegen war mit einem signifikant verringerten Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken assoziiert (3. vs 1. Tertile :OR = 0,3 CI,0,1-0,7, $p < 0,00$).

p,p'-DDE-Serumkonzentrationen waren nicht mit Brustkrebs assoziiert. Frauen, die erst nach dem 14. Lebensjahr mit p,p'-DDT in Kontakt gekommen waren, also welche 1931 oder später geboren wurden, wiesen kein erhöhtes Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken auf (248).

Die Töchter der oben genannten Kohorte wurden, in einer zweiten Studie, in Abhängigkeit der maternalen p,p'-DDT-, o,p'-DDT- und p,p'-DDE-Konzentrationen, bezüglich des Risikos ein Mammakarzinom zu entwickeln untersucht. Aus einer Kohorte von 9300 Töchtern wurden 118, die bis zum Alter von 52 Jahren mit invasivem oder nicht-invasivem Brustkrebs diagnostiziert worden waren, in eine Nested-Case-Control Studie eingeschlossen. Hohe mütterliche o,p'-DDT Werte nach der Geburt (4. Quartil) waren mit einem 3,7-fach erhöhten Risiko an einem Mammakarzinom zu erkranken assoziiert (OR = 3,7, CI, 1,5-9,0 $p < 0,004$). Diese Werte waren unabhängig von der mütterlichen Brustkrebsanamnese. Mütterliche p,p'-DDT und p,p'-DDE Werte waren nicht mit einem Mammakarzinom der Töchter assoziiert. Des Weiteren waren erhöhte Serum o,p'-DDT-Level mit einem fortgeschrittenen Stadium bei Diagnose (OR (4. vs 1. quartile) = 4,6; 95 % CI 1,3-16,6) und mit HER2-Expression assoziiert (OR (4. vs 1. Quartile) = 4,6, 95 % CI, 1,1-19,7). Limitierend dabei ist, dass 16 Mammakarzinome HER2-positiv und 22 in einem fortgeschrittenen Stadium waren (249). Möglich wäre hier auch eine Verkürzung der Latenz wie bei Johnson et al. im Rattenmodell (142).

Wie bereits erwähnt sind Menschen und Tiere durch die Umwelt nicht einzelnen Substanzen, sondern komplexen Gemischen an Xenooestrogenen ausgesetzt (108,197).

Es gibt Evidenz, wie sich diese Gemische als Gesamtheit auf die Karzinogenese des Mammakarzinoms auswirken, es besteht jedoch noch nachhaltiger Forschungsbedarf. Größtenteils zeigten die Mischungen additive Wirkungen in Proliferations-Assays oder Transaktivierungs-Assays (116,119,151,158,199,202). Eindeutig seltener wurde von synergistischen Wirkungen berichtet (116,163). Gemische, die mit dem „whole mixture approach“ untersucht wurden, zeigten neben östrogenen Wirkung auch antiandrogene Wirkung. Auffallend ist, dass bereits kleine Veränderungen in der Zusammensetzung einer Mischung oder der Konzentrationen einzelner Bestandteile zu einer Veränderungen der Wirkung führen können (203,206,207).

4.3 Conclusio

Auf Grundlage der durchgeführten Arbeit und in Bezug auf die Forschungsfrage der Diplomarbeit werden folgende Thesen (zu beweisende Behauptungen) aufgestellt:

- Xenoöstrogene beeinflussen die Pathogenese des Mammakarzinoms.
- Es gibt Zeitfenster erhöhter Suszeptibilität gegenüber Xenoöstrogenen. Diese Zeitfenster sind: Intrauterine Phase, Peripubertät und Schwangerschaft.
- Pathogene Substanzen sind o,p-DDT, p,p-DDT, p,p-DDE, HCB, Dieldrin, β -HCH und dioxin-artige PCBs.

Weiterer Forschungsbedarf besteht zu folgenden Fragestellungen:

- Mit Blick auf deren Pathogenität weiter zu beforschende Substanzen sind: Chlordan, Endosulfan, Methoxychlor und nicht-dioxin-artigen PCBs in vitro und in vivo.
- Überprüfung der Ergebnisse einzelner Studien, die bisher nur durch ein Zentrum erbracht wurden durch weitere unabhängige Institutionen, mit besonderem Augenmerk auf HCB und β -HCH.
- Wie verändern Xenoöstrogene einzeln und als Gemische in umweltrelevanten Konzentrationen die Mammogenese?
- Wie wirken sich Agonismus und Antagonismus von Xenoöstrogenen alleine und in Mixturen an verschiedenen Rezeptoren (AR, PR, ÖR, AhR) auf die Pathogenese des Mammakarzinoms aus? Wie beeinflussen sich diese Rezeptorpathways gegenseitig?
- Gibt es Assoziationen zwischen Exposition mit Xenoöstrogenen und Mammakarzinomrezidiv bzw. der Prognose der Erkrankung?
- Wie wirken sich Xenoöstrogene singularär und in Gemischen auf Invasion, Migration, Metastasierung und Angiogenese in vivo und in vitro aus?
- Wie sehen mechanistischen Pathways von Xenoöstrogenen einzeln und als Gemische in vitro und in vivo aus? Welche Rolle spielen dabei der ÖR- α , - β und der GPER?
- Welche Konformationsveränderungen induzieren Xenoöstrogene am ÖR- α und - β und wie wirken sich diese auf das Transkriptionsverhalten aus? Xenoöstrogene als SERMs?

- Wie interagieren Xenoöstrogene einzeln und als Gemische mit endogenen Hormonen?
- Wie beeinflussen Xenoöstrogen einzeln und als Gemische den Östrogenmetabolismus?
- Wie induzieren Xenoöstrogene einzeln und als Gemische ROS? Wirkt der ÖR- α dabei protektiv?
- Wie verändern Xenoöstrogene einzeln und als Gemische die Mikro-RNS Expression?

5 Literaturverzeichnis

1. Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2015 Mar;65(2):87–108. Available from: <http://doi.wiley.com/10.3322/caac.21262>
2. M. Ervik, F. Lam, J. Ferlay, L. Mery, I. Soerjomataram FB. *Cancer Today*. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer. *Cancer Today*. [Internet]. 2016 [cited 2017 Jan 4]. Available from: <http://gco.iarc.fr/today>
3. World Health Organization, United Nations Environment Programme, Inter-Organization Programme for the Sound Management of Chemicals, Bergman Å, Heindel JJ, Jobling S, et al. State of the science of endocrine disrupting chemicals, 2012 [Internet]. Bergman Å, Heindel J, Jobling S, Kidd K, Zoeller RT, editors. World Health Organization; 2013. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/78101>
4. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *Int J Epidemiol*. 2005 Apr;34(2):405–12.
5. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002 Jul 17;288(3):321–33.
6. Colditz GA, Rosner B. Cumulative risk of breast cancer to age 70 years according to risk factor status: data from the Nurses’ Health Study. *Am J Epidemiol*. 2000 Nov 15;152(10):950–64.
7. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, Berg CD, Chlebowski RT, Feuer EJ, et al. The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med*. 2007 Apr 19;356(16):1670–4.
8. WHO Regional Office for Europe. “Incidence of female breast cancer.” *European Health for All explorer*. [Internet]. [cited 2018 Sep 7]. Available from: <https://gateway.euro.who.int/en/hfa-explorer/>
9. Lester SC. The breast. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, editors. *Robbins and Cotran pathologic basis of disease professional edition*. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015. p. 1043–71.
10. Feinleib M. Breast cancer and artificial menopause: a cohort study. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 1968 Aug;41(2):315–29. Available from:

- <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/41.2.315>
11. The Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2002 Apr 17;94(8):606–16. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/94.8.606>
 12. Lippman ME, Krueger KA, Eckert S, Sashegyi A, Walls EL, Jamal S, et al. Indicators of lifetime estrogen exposure: effect on breast cancer incidence and interaction with raloxifene therapy in the multiple outcomes of raloxifene evaluation study participants. *J Clin Oncol* [Internet]. 2001 Jun 15;19(12):3111–6. Available from: <http://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2001.19.12.3111>
 13. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Body mass index, serum sex hormones, and breast cancer risk in postmenopausal women. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2003 Aug 20;95(16):1218–26. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djg022>
 14. Eliassen AH, Missmer SA, Tworoger SS, Spiegelman D, Barbieri RL, Dowsett M, et al. Endogenous steroid hormone concentrations and risk of breast cancer among premenopausal women. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Oct 4;98(19):1406–15.
 15. Fortner RT, Eliassen AH, Spiegelman D, Willett WC, Barbieri RL, Hankinson SE. Premenopausal endogenous steroid hormones and breast cancer risk: results from the Nurses' Health Study II. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2013 Mar 6;15(2):R19. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr3394>
 16. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Breast cancer and breastfeeding: collaborative reanalysis of individual data from 47 epidemiological studies in 30 countries, including 50 302 women with breast cancer and 96 973 women without the disease. *Lancet*. 2002 Jul 20;360(9328):187–95.
 17. Chen W. Factors that modify breast cancer risk in women [Internet]. UpToDate. [cited 2018 May 30]. Available from: [https://www.uptodate.com/contents/factors-that-modify-breast-cancer-risk-in-women?search=Factors that modify breast cancer risk in women&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1](https://www.uptodate.com/contents/factors-that-modify-breast-cancer-risk-in-women?search=Factors%20that%20modify%20breast%20cancer%20risk%20in%20women&source=search_result&selectedTitle=1~150&usage_type=default&display_rank=1)
 18. Davis DL, Bradlow HL, Wolff M, Woodruff T, Hoel DG, Anton-Culver H. Medical

- hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ Health Perspect.* 1993 Oct;101(5):372–7.
19. Zoeller RT, Brown TR, Doan LL, Gore AC, Skakkebaek NE, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals and public health protection: a statement of principles from the Endocrine Society. *Endocrinology* [Internet]. 2012 Sep;153(9):4097–110. Available from: <https://academic.oup.com/endo/article-lookup/doi/10.1210/en.2012-1422>
 20. Diamanti-Kandarakis E, Bourguignon J-P, Giudice LC, Hauser R, Prins GS, Soto AM, et al. Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr Rev* [Internet]. 2009 Jun;30(4):293–342. Available from: <https://doi.org/10.1210/er.2009-0002>
 21. What are endocrine disruptors - Environment - European Commission [Internet]. [cited 2017 Feb 23]. Available from: http://ec.europa.eu/environment/chemicals/endocrine/definitions/endodis_en.htm
 22. Yue W, Yager JD, Wang J-P, Jupe ER, Santen RJ. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* [Internet]. 2013 Feb;78(2):161–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.steroids.2012.11.001>
 23. Samavat H, Kurzer MS. Estrogen metabolism and breast cancer. *Cancer Lett* [Internet]. 2015 Jan 28;356(2):231–43. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304383514002365>
 24. Speirs V, Skliris GP, Burdall SE, Carder PJ. Distinct expression patterns of ER alpha and ER beta in normal human mammary gland. *J Clin Pathol* [Internet]. 2002;55(5):371–4. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11986344> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1769648>
 25. Preston-Martin S, Pike MC, Ross RK, Jones PA, Henderson BE. Increased cell division as a cause of human cancer. *Cancer Res.* 1990 Dec 1;50(23):7415–21.
 26. Yager JD, Davidson NE. Estrogen carcinogenesis in breast cancer. *N Engl J Med* [Internet]. 2006 Jan 19;354(3):270–82. Available from: <http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMra050776>
 27. Reprinted from *Steroids*, 78/2, Yue W, Yager JD, Wang J-P, Jupe ER, et al. Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis, 161-170, Copyright 2012, with permission from Elsevier.
 28. Jensen E. On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med.* 1962;6:47–59.

29. Kuiper GGJM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-Å. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Jun 11;93(12):5925–30.
30. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4258–65.
31. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*. 1993 Jul;17(1):263–5.
32. Kuiper GGJM, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology*. 1997 Mar;138(3):863–70.
33. Brzozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, et al. Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* [Internet]. 1997 Oct 16;389(6652):753–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/39645>
34. Bolger R, Wiese TE, Ervin K, Nestich S, Checovich W. Rapid screening of environmental chemicals for estrogen receptor binding capacity. *Environ Health Perspect*. 1998 Sep;106(9):551–7.
35. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, et al. Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *Physiol Rev* [Internet]. 2007 Jul;87(3):905–31. Available from: <https://doi.org/10.1152/physrev.00026.2006>
36. Korach KS, Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Kimbro KS, et al. Estrogen receptor gene disruption: molecular characterization and experimental and clinical phenotypes. *Recent Prog Horm Res*. 1996;51:159–88.
37. Kregge JH, Hodgin JB, Couse JF, Enmark E, Warner M, Mahler JF, et al. Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor β . *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1998 Dec 22;95(26):15677–82. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.95.26.15677>
38. Förster C, Mäkelä S, Wärrä A, Kietz S, Becker D, Hulténby K, et al. Involvement of estrogen receptor beta in terminal differentiation of mammary gland epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 2002 Nov 26;99(24):15578–83. Available from: <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.192561299>
39. Thomas C, Gustafsson J-Å. The different roles of ER subtypes in cancer biology

- and therapy. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2011 Jul 22;11(8):597–608. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3093>
40. Bocchini WP, Hively WP, Couse JF, Varmus HE, Korach KS. A mouse mammary tumor virus-Wnt-1 transgene induces mammary gland hyperplasia and tumorigenesis in mice lacking estrogen receptor- α . *Cancer Res*. 1999 Apr 15;59(8):1869–76.
 41. Dubik D, Shiu RP. Mechanism of estrogen activation of c-myc oncogene expression. *Oncogene*. 1992 Aug;7(8):1587–94.
 42. Castro-Rivera E, Samudio I, Safe S. Estrogen regulation of cyclin D1 gene expression in ZR-75 breast cancer cells involves multiple enhancer elements. *J Biol Chem* [Internet]. 2001 Aug 17;276(33):30853–61. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.M103339200>
 43. Zwijnen RML, Wientjens E, Klompaker R, Van der Sman J, Bernards R, Michalides RJAM. CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1. *Cell*. 1997;88(3):405–15.
 44. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease professional edition. 9th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2015.
 45. Huang B, Warner M, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol Cell Endocrinol*. 2015 Dec 15;418 Pt 3:240–4.
 46. Lin C-Y, Ström A, Li Kong S, Kietz S, Thomsen JS, Tee JB, et al. Inhibitory effects of estrogen receptor beta on specific hormone-responsive gene expression and association with disease outcome in primary breast cancer. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2007 Dec 10;9(2):R25. Available from: <https://doi.org/10.1186/bcr1667>
 47. Treeck O, Lattrich C, Springwald A, Ortmann O. Estrogen receptor beta exerts growth-inhibitory effects on human mammary epithelial cells. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2010 Apr;120(3):557–65. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-009-0413-2>
 48. Williams C, Edvardsson K, Lewandowski SA, Ström A, Gustafsson J-Å. A genome-wide study of the repressive effects of estrogen receptor beta on estrogen receptor alpha signaling in breast cancer cells. *Oncogene* [Internet]. 2008 Feb 7;27(7):1019–32. Available from: <http://www.nature.com/articles/1210712>
 49. Ström A, Hartman J, Foster JS, Kietz S, Wimalasena J, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor inhibits 17 β -estradiol-stimulated proliferation of the breast cancer cell line T47D. *Proc Natl Acad Sci* [Internet]. 2004 Feb 10;101(6):1566–71. Available from:

- <http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0308319100>
50. Nilsson S, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors: therapies targeted to receptor subtypes. *Clin Pharmacol Ther* [Internet]. 2011 Jan;89(1):44–55. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/clpt.2010.226>
 51. Rody A, Holtrich U, Solbach C, Kourtis K, von Minckwitz G, Engels K, et al. Methylation of estrogen receptor β promoter correlates with loss of ER- β expression in mammary carcinoma and is an early indication marker in premalignant lesions. *Endocr Relat Cancer*. 2005 Dec;12(4):903–16.
 52. Huang B, Omoto Y, Iwase H, Yamashita H, Toyama T, Coombes RC, et al. Differential expression of estrogen receptor α , β 1, and β 2 in lobular and ductal breast cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(5):1933–8.
 53. Cowley SM, Hoare S, Mosselman S, Parker MG. Estrogen receptors α and β form heterodimers on DNA. *J Biol Chem* [Internet]. 1997 Aug 8;272(32):19858–62. Available from: <http://www.jbc.org/lookup/doi/10.1074/jbc.272.32.19858>
 54. Monroe DG, Secreto FJ, Subramaniam M, Getz BJ, Khosla S, Spelsberg TC. Estrogen receptor α and β heterodimers exert unique effects on estrogen- and tamoxifen-dependent gene expression in human U2OS osteosarcoma cells. *Mol Endocrinol*. 2005 Jun;19(6):1555–68.
 55. Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor β acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* [Internet]. 2000 Oct 12;19(43):4970–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/1203828>
 56. Song RX-D, McPherson RA, Adam L, Bao Y, Shupnik M, Kumar R, et al. Linkage of rapid estrogen action to MAPK activation by ER α -Shc association and Shc pathway activation. *Mol Endocrinol*. 2002 Jan;16(1):116–27.
 57. Prossnitz ER, Barton M. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2011 Aug 16;7(12):715–26. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2011.122>
 58. Chambliss KL, Yuhanna IS, Mineo C, Liu P, German Z, Sherman TS, et al. Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res*. 2000 Nov 24;87(11):e44–52.
 59. Kahlert S, Nuedling S, van Eickels M, Vetter H, Meyer R, Grohé C. Estrogen receptor α rapidly activates the IGF-1 receptor pathway. *J Biol Chem*. 2000;275(24):18447–53.
 60. Simoncini T, Hafezi-Moghadam A, Brazil DP, Ley K, Chin WW, Liao JK.

- Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* [Internet]. 2000 Sep 28;407(6803):538–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/35035131>
61. Britton DJ, Hutcheson IR, Knowlden JM, Barrow D, Giles M, McClelland RA, et al. Bidirectional cross talk between ER α and EGFR signalling pathways regulates tamoxifen-resistant growth. *Breast Cancer Res Treat* [Internet]. 2006 Mar;96(2):131–46. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10549-005-9070-2>
 62. Kato S, Endoh H, Masuhiro Y, Kitamoto T, Uchiyama S, Sasaki H, et al. Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*. 1995 Dec 1;270(5241):1491–4.
 63. Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G Protein-Coupled Receptor Homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* [Internet]. 2000;14(10):1649–60. Available from: <https://doi.org/10.1210/mend.14.10.0532>
 64. Prossnitz ER, Arterburn JB. International union of basic and clinical pharmacology. XC VII. G protein-coupled estrogen receptor and its pharmacologic modulators. *Pharmacol Rev* [Internet]. 2015 Jul;67(3):505–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1124/pr.114.009712>
 65. Thomas P, Dong J. Binding and activation of the seven-transmembrane estrogen receptor GPR30 by environmental estrogens: a potential novel mechanism of endocrine disruption. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Dec;102(1–5):175–9.
 66. Russo J, Fernandez S V., Russo PA, Fernbaugh R, Sheriff FS, Lareef HM, et al. 17-Beta-estradiol induces transformation and tumorigenesis in human breast epithelial cells. *FASEB J*. 2006 Aug;20(10):1622–34.
 67. Santen RJ, Yue W, Wang J-P. Estrogen metabolites and breast cancer. *Steroids* [Internet]. 2015 Jul;99(Part A):61–6. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.003>
 68. Yue W, Wang J-P, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, et al. Effects of estrogen on breast cancer development: role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer* [Internet]. 2010 Oct 15;127(8):1748–57. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ijc.25207>
 69. Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the

- etiology and prevention of human cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* [Internet]. 2011 Jul;125(3–5):169–80. Available from:
<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960076011000513>
70. Lavigne JA, Goodman JE, Fonong T, Odwin S, He P, Roberts DW, et al. The effects of catechol-o-methyltransferase inhibition on estrogen metabolite and oxidative DNA damage levels in estradiol-treated MCF-7 cells. *Cancer Res*. 2001 Oct 15;61(20):7488–94.
 71. Nutter LM, Wu Y-Y, Ngo EO, Sierra EE, Gutierrez PL, Abul-Hajj YJ. An o-quinone form of estrogen produces free radicals in human breast cancer cells: correlation with DNA damage. *Chem Res Toxicol*. 1994;7(1):23–8.
 72. Gaikwad NW, Yang L, Muti P, Meza JL, Pruthi S, Ingle JN, et al. The molecular etiology of breast cancer: evidence from biomarkers of risk. *Int J cancer* [Internet]. 2008 May 1;122(9):1949–57. Available from: <https://doi.org/10.1002/ijc.23329>
 73. Reprinted from *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 125/3-5, Cavalieri EL, Rogan EG. Unbalanced metabolism of endogenous estrogens in the etiology and prevention of human cancer, 169-180, Copyright 2011, with permission from Elsevier.
 74. Zhu BT, Conney AH. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives. *Carcinogenesis* [Internet]. 1998 Jan;19(1):1–27. Available from: <https://academic.oup.com/carcin/article-lookup/doi/10.1093/carcin/19.1.1>
 75. Swaneck GE, Fishman J. Covalent binding of the endogenous estrogen 16 α -hydroxyestrone to estradiol receptor in human breast cancer cells: characterization and intranuclear localization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1988 Nov;85(21):7831–5.
 76. Telang NT, Suto A, Wong GY, Osborne MP, Bradlow HL. Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J Natl Cancer Inst*. 1992 Apr 15;84(8):634–8.
 77. Seeger H, Wallwiener D, Kraemer E, Mueck AO. Comparison of possible carcinogenic estradiol metabolites: Effects on proliferation, apoptosis and metastasis of human breast cancer cells. *Maturitas*. 2006 Apr 20;54(1):72–7.
 78. Sampson JN, Falk RT, Schairer C, Moore SC, Fuhrman BJ, Dallal CM, et al. Association of estrogen metabolism with breast cancer risk in different cohorts of postmenopausal women. *Cancer Res* [Internet]. 2017 Feb 15;77(4):918–25. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-16-1717>

79. Fuhrman BJ, Schairer C, Gail MH, Boyd-Morin J, Xu X, Sue LY, et al. Estrogen metabolism and risk of breast cancer in postmenopausal women. *JNCI J Natl Cancer Inst* [Internet]. 2012 Feb 22;104(4):326–39. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article-lookup/doi/10.1093/jnci/djr531>
80. Lavigne JA, Helzlsouer KJ, Huang H-Y, Strickland PT, Bell DA, Selmin O, et al. An association between the allele coding for a low activity variant of catechol-o-methyltransferase and the risk for breast cancer. *Cancer Res*. 1997 Dec 15;57(24):5493–7.
81. Scanlon PD, Raymond FA, Weinshilboum RM. Catechol-O-methyltransferase: Thermolabile enzyme in erythrocytes of subjects homozygous for allele for low activity. *Science*. 1979 Jan 5;203(4375):63–5.
82. Fitzgerald L, Wikoff D. Persistent organic pollutants. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. 2014. p. 820–5.
83. World Health Organisation. Persistent organic pollutants: impact on child health [Internet]. Geneva: World Health Organization; 2010. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/44525>
84. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for DDT, DDE, and DDD. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2002.
85. Burr S. DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane). In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 1141–3.
86. International Agency for Research on Cancer (IARC). DDT, lindane, and 2,4-D. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 113. [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2017. Available from: <https://monographs.iarc.fr/monographs-and-supplements-available-online/>
87. RIS - Verbot bestimmter gefährlicher Stoffe in Pflanzenschutzmitteln - Bundesrecht konsolidiert, Fassung vom 11.01.2018 [Internet]. Available from: <https://www.ris.bka.gv.at/GeltendeFassung.wxe?Abfrage=Bundesnormen&Gesetzesnummer=10010688&ShowPrintPreview=True>
88. World Health Organisation. Global Malaria Programme. The use of DDT in malaria vector control: WHO position statement. [Internet]. Geneva: World Health Organisation.; 2011. Available from: <http://www.who.int/iris/handle/10665/69945>
89. van den Berg M, Kypke K, Kotz A, Tritscher A, Lee SY, Magulova K, et al.

- WHO/UNEP global surveys of PCDDs, PCDFs, PCBs and DDTs in human milk and benefit–risk evaluation of breastfeeding. *Arch Toxicol* [Internet]. 2017;91(1):83–96. Available from: <https://doi.org/10.1007/s00204-016-1802-z>
90. Waliszewski SM, Aguirre AA, Infanzon RM, Siliceo J. Partitioning coefficients of organochlorine pesticides between mother blood serum and umbilical blood serum. *Bull Environ Contam Toxicol*. 2000;65(3):293–9.
 91. Chen L. Hexachlorocyclohexanes including lindane. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 874–6.
 92. Siddiqui MKJ, Srivastava S, Srivastava SP, Mehrotra PK, Mathur N, Tandon I. Persistent chlorinated pesticides and intra-uterine foetal growth retardation: a possible association. *Int Arch Occup Environ Health*. 2003 Feb;76(1):75–80.
 93. International Agency for Research on Cancer (IARC). Agents classified by the IARC monographs, Volumes 1 – 122 [Internet]. IARC Monographs. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2018 [cited 2018 Sep 13]. Available from: <https://monographs.iarc.fr/list-of-classifications-volumes/>
 94. Zou E, Matsumura F. Long-term exposure to β -hexachlorocyclohexane (β -HCH) promotes transformation and invasiveness of MCF-7 human breast cancer cells. *Biochem Pharmacol*. 2003 Sep 1;66(5):831–40.
 95. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for hexachlorocyclohexane. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service.; 2005.
 96. Schoula R, Hajšlová J, Bencko V, Poustka J, Holadová K, Vizek V. Occurrence of persistent organochlorine contaminants in human milk collected in several regions of Czech republic. *Chemosphere*. 1996 Oct;33(8):1485–94.
 97. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for hexachlorobenzene. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2013.
 98. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for aldrin/dieldrin. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2002.
 99. Chen G. Methoxychlor. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 254–5.
 100. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for methoxychlor. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services,

- Public Health Service.; 2002.
101. Singh P, Volger B, Gordon E. Endosulfan. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 341–3.
 102. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for endosulfan*. (draft for public comment). Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2013.
 103. Cerrillo I, Granada A, López-Espinosa M-J, Olmos B, Jiménez M, Caño A, et al. Endosulfan and its metabolites in fertile women, placenta, cord blood, and human milk. *Environ Res* [Internet]. 2005 Jun;98(2):233–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2004.08.008>
 104. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). *Toxicological profile for chlordane*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2018.
 105. Koshlukova S, Reed N. Chlordane. In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 841–5.
 106. Stohs S. Polychlorinated biphenyls (PCBs). In: Wexler P, editor. *Encyclopedia of toxicology*. 3rd ed. Academic Press; 2014. p. 1035–7.
 107. Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ASTDR). *Toxicological profile for polychlorinated biphenyls (PCBs)*. Atlanta, GA: U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service; 2000.
 108. International Agency for Research on Cancer. *Polychlorinated and polybrominated biphenyls*. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, Volume 107. [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2015. Available from: <https://monographs.iarc.fr/monographs-and-supplements-available-online/>
 109. Jenkins S, Rowell C, Wang J, Lamartiniere CA. Prenatal TCDD exposure predisposes for mammary cancer in rats. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2007;23(3):391–6. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0890623806002668>
 110. Murray IA, Patterson AD, Perdew GH. Aryl hydrocarbon receptor ligands in cancer: friend and foe. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2014 Dec;14(12):801–14. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc3846>
 111. Matthews J, Gustafsson J-Å. Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nucl Recept Signal* [Internet]. 2006;4:e016. Available from:

<https://www.nursa.org/NRS/nrs04016.pdf>

112. Zava DT, Blen M, Duwe G. Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture. *Environ Health Perspect*. 1997 Apr;105(Supplement 3):637–45.
113. Lascombe I, Beffa D, Rüegg U, Tarradellas J, Wahli W. Estrogenic activity assessment of environmental chemicals using in vitro assays: identification of two new estrogenic compounds. *Environ Health Perspect*. 2000 Jul;108(7):621–9.
114. Klotz DM, Beckman BS, Hill SM, McLachlan JA, Walters MR, Arnold SF. Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays. *Environ Health Perspect*. 1996 Oct;104(10):1084–9.
115. Kupfer D, Bulger WH. Interaction of o,p'-DDT with the estrogen-binding protein (EBP) in human mammary and uterine tumors. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*. 1977 Mar;16(3):451–62.
116. Shekhar PVM, Werdell J, Basrur VS. Environmental estrogen stimulation of growth and estrogen receptor function in preneoplastic and cancerous human breast cell lines. *J Natl Cancer Inst*. 1997 Dec 3;89(23):1774–82.
117. Lemaire G, Mnif W, Mauvais P, Balaguer P, Rahmani R. Activation of α - and β -estrogen receptors by persistent pesticides in reporter cell lines. *Life Sci*. 2006 Aug 15;79(12):1160–9.
118. Kojima H, Katsura E, Takeuchi S, Niiyama K, Kobayashi K. Screening for estrogen and androgen receptor activities in 200 pesticides by in vitro reporter gene assays using chinese hamster ovary cells. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2004 Dec 3;112(5):524–31. Available from: <http://www.ehponline.org/ambra-doi-resolver/10.1289/ehp.6649>
119. Payne J, Scholze M, Kortenkamp A. Mixtures of four organochlorines enhance human breast cancer cell proliferation. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2001 Apr;109(4):391–7. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.01109391>
120. Steinmetz R, Young PCM, Caperell-Grant A, Gize EA, Madhukar B V., Ben-Jonathan N, et al. Novel estrogenic action of the pesticide residue β -hexachlorocyclohexane in human breast cancer cells. *Cancer Res*. 1996 Dec 1;56(23):5403–9.
121. Diel P, Olf S, Schmidt S, Michna H. Effects of the environmental estrogens bisphenol A, o,p'-DDT, p-tert-octylphenol and coumestrol on apoptosis induction,

- cell proliferation and the expression of estrogen sensitive molecular parameters in the human breast cancer cell line MCF-7. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002 Jan;80(1):61–70.
122. Pestana D, Teixeira D, Faria A, Domingues V, Monteiro R, Calhau C. Effects of environmental organochlorine pesticides on human breast cancer: putative involvement on invasive cell ability. *Environ Toxicol* [Internet]. 2015 Feb;30(2):168–76. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/tox.21882>
 123. Burow ME, Tang Y, Collins-Burow BM, Krajewski S, Reed JC, McLachlan J a, et al. Effects of environmental estrogens on tumor necrosis factor alpha-mediated apoptosis in MCF-7 cells. *Carcinogenesis*. 1999 Nov;20(11):2057–61.
 124. Enan E, Matsumura F. Activation of c-Neu tyrosine kinase by o,p'-DDT and beta-HCH in cell-free and intact cell preparations from MCF-7 human breast cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol*. 1998;12(2):83–92.
 125. Hatakeyama M, Matsumura F. Correlation between the activation of Neu tyrosine kinase and promotion of foci formation induced by selected organochlorine compounds in the MCF-7 model system. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999;13(6):296–302.
 126. Shen K, Novak RF. DDT stimulates c-erbB2, c-met, and STATS tyrosine phosphorylation, Grb2-Sos association, MAPK phosphorylation, and proliferation of human breast epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997 Feb 3;231(1):17–21.
 127. Silva E, Kabil A, Kortenkamp A. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways - Distinct effect profiles of environmental estrogens. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2010 Feb 1;245(2):160–70. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.taap.2010.02.015>
 128. Bratton MR, Frigo DE, Segar HC, Nephew KP, McLachlan JA, Wiese TE, et al. The organochlorine o,p'-DDT plays a role in coactivator-mediated MAPK crosstalk in MCF-7 breast cancer cells. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2012 Sep;120(9):1291–6. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.1104296>
 129. Klotz DM, Ladlie BL, Vonier PM, McLachlan JA, Arnold SF. o,p'-DDT and its metabolites inhibit progesterone-dependent responses in yeast and human cells. *Mol Cell Endocrinol*. 1997 Apr 25;129(1):63–71.
 130. Han EH, Kim HG, Hwang YP, Choi JH, Im JH, Park B, et al. The role of

- cyclooxygenase-2-dependent signaling via cyclic AMP response element activation on aromatase up-regulation by o,p'-DDT in human breast cancer cells. *Toxicol Lett* [Internet]. 2010 Oct 20;198(3):331–41. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2010.07.015>
131. Bradlow HL, Davis DL, Lin G, Sepkovic D, Tiwari R. Effects of pesticides on the ratio of 16 α /2-hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1995 Oct;103(Suppl 7):147–50. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1518879&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
 132. Bradlow HL, Davis D, Sepkovic DW, Tiwari R, Osborne MP. Role of the estrogen receptor in the action of organochlorine pesticides on estrogen metabolism in human breast cancer cell lines. *Sci Total Environ* [Internet]. 1997 Dec 3;208(1–2):9–14. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9496644>
 133. Wang L, Zhou S, Lin K, Zhao M, Liu W, Gan J. Enantioselective estrogenicity of o,p'-dichlorodiphenyltrichloroethane in the MCF-7 human breast carcinoma cell line. *Environ Toxicol Chem* [Internet]. 2009 Jan;28(1):1–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1897/08-055.1>
 134. He X, Dong X, Zou D, Yu Y, Fang Q, Zhang Q, et al. Enantioselective effects of o,p'-DDT on cell invasion and adhesion of breast cancer cells: chirality in cancer development. *Environ Sci Technol* [Internet]. 2015 Aug 18;49(16):10028–37. Available from: <http://pubs.acs.org/doi/10.1021/acs.est.5b02147>
 135. Qin X-Y, Zaha H, Nagano R, Yoshinaga J, Yonemoto J, Sone H. Xenoestrogens down-regulate aryl-hydrocarbon receptor nuclear translocator 2 mRNA expression in human breast cancer cells via an estrogen receptor alpha-dependent mechanism. *Toxicol Lett* [Internet]. 2011 Oct 10;206(2):152–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2011.07.007>
 136. Tilghman SL, Bratton MR, Segar HC, Martin EC, Rhodes L V., Li M, et al. Endocrine disruptor regulation of microRNA expression in breast carcinoma cells. *PLoS One* [Internet]. 2012;7(3):e32754. Available from: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032754>
 137. Uppala PT, Roy SK, Tousson A, Barnes S, Uppala GR, Eastmond DA. Induction of cell proliferation, micronuclei and hyperdiploidy/polyploidy in the mammary cells of DDT- and DMBA-treated pubertal rats. *Environ Mol Mutagen.* 2005 Jul;46(1):43–52.

138. Fujimoto N, Honda H, Kitamura S. Effects of environmental estrogenic chemicals on AP1 mediated transcription with estrogen receptors α and β . *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2004 Jan;88(1):53–9.
139. Kang K-S, Wilson MR, Hayashi T, Chang C-C, Trosko JE. Inhibition of gap junctional intercellular communication in normal human breast epithelial cells after treatment with pesticides, PCBs, and PBBs, alone or in mixtures. *Environ Health Perspect*. 1996 Feb;104(2):192–200.
140. Aubé M, Larochelle C, Ayotte P. 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethylene (p,p'-DDE) disrupts the estrogen-androgen balance regulating the growth of hormone-dependent breast cancer cells. *Breast cancer Res [Internet]*. 2008 Feb 14;10(1):R16. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1862>
141. McDougal A, Wilson C, Safe S. Induction of estradiol 2-hydroxylase activity in MCF-7 human breast cancer cells by pesticides and carcinogens. *Environ Toxicol Pharmacol*. 1997 Jul;3(3):195–9.
142. Johnson NA, Ho A, Cline JM, Hughes CL, Foster WG, Davis VL. Accelerated mammary tumor onset in a Her2/neu mouse model exposed to DDT metabolites locally delivered to the mammary gland. *Environ Health Perspect [Internet]*. 2012 Apr;120(8):1170–6. Available from: <http://ehp.niehs.nih.gov/1104327>
143. Coosen R, van Velsen FL. Effects of the beta-isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1989 Nov;101(2):310–8.
144. Hatakeyama M, Zou E, Matsumura F. Comparison of the characteristic of estrogenic action patterns of β -HCH and heregulin β 1 in MCF-7 Human breast cancer cells. *J Biochem Mol Toxicol [Internet]*. 2002;16(5):209–19. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jbt.10047>
145. Wong PS, Matsumura F. Promotion of breast cancer by β -Hexachlorocyclohexane in MCF10AT1 cells and MMTV-neu mice. *BMC Cancer [Internet]*. 2007 Jul 17;7(130). Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2407/7/130>
146. Soto AM, Chung KL, Sonnenschein C. The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ Health Perspect*. 1994 Apr;102(4):380–3.
147. Wade MG, Desaulniers D, Leingartner K, Foster WG. Interactions between endosulfan and dieldrin on estrogen-mediated processes in vitro and in vivo. *Reprod*

- Toxicol. 1997;11(6):791–8.
148. Andersen HR, Vinggaard AM, Rasmussen TH, Gjermansen IM, Bonefeld-Jørgensen EC. Effects of currently used pesticides in assays for estrogenicity, androgenicity, and aromatase activity in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002 Feb 15;179(1):1–12.
 149. Arcaro KF, Vakharia DD, Yang Y, Gierthy JF. Lack of synergy by mixtures of weakly estrogenic hydroxylated polychlorinated biphenyls and pesticides. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1998 Aug;106(Supplement 4):1041–6. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC1533323>
 150. Ramamoorthy K, Wang F, Chen I, Norris JD, McDonnell DP, Leonard LS, et al. Estrogenic activity of a dieldrin/toxaphene mixture in the mouse uterus, MCF-7 human breast cancer cells, and yeast-based estrogen receptor assays: no apparent synergism. *Endocrinology*. 1997 Apr;138(4):1520–7.
 151. Legler J, van den Brink CE, Brouwer A, Murk AJ, van der Saag PT, Vethaak AD, et al. Development of a stably transfected estrogen receptor-mediated luciferase reporter gene assay in the human T47D breast cancer cell line. *Toxicol Sci* [Internet]. 1999 Mar;48(1):55–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10330684>
 152. Cameron HL, Foster WG. Dieldrin promotes resistance to anoikis in breast cancer cells in vitro. *Reprod Toxicol* [Internet]. 2008 Feb;25(2):256–62. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2007.11.013>
 153. Buteau-Lozano H, Velasco G, Cristofari M, Balaguer P, Perrot-Appianat M. Xenoestrogens modulate vascular endothelial growth factor secretion in breast cancer cells through an estrogen receptor-dependent mechanism. *J Endocrinol* [Internet]. 2008 Feb;196(2):399–412. Available from: <https://doi.org/10.1677/JOE-07-0198>
 154. Badawi AF, Cavalieri EL, Rogan EG. Effect of chlorinated hydrocarbons on expression of cytochrome P450 1A1, 1A2 and 1B1 and 2- and 4-hydroxylation of 17 β -estradiol in female Sprague–Dawley rats. *Carcinogenesis*. 2000;21(8):1593–9.
 155. Cameron HL, Foster WG. Developmental and lactational exposure to dieldrin alters mammary tumorigenesis in Her2/neu transgenic mice. Aziz SA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2009 Jan;4(1):e4303. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0004303>
 156. Terasaka S, Aita Y, Inoue A, Hayashi S, Nishigaki M, Aoyagi K, et al. Using a

- customized DNA microarray for expression profiling of the estrogen-responsive genes to evaluate estrogen activity among natural estrogens and industrial chemicals. *Environ Health Perspect.* 2004 May;112(7):773–81.
157. Bentrem D, Fox JE, Pearce ST, Liu H, Pappas S, Kupfer D, et al. Distinct molecular conformations of the estrogen receptor α complex exploited by environmental estrogens. *Cancer Res.* 2003 Nov 1;63(21):7490–6.
 158. van Meeuwen JA, ter Burg W, Piersma AH, van den Berg M, Sanderson JT. Mixture effects of estrogenic compounds on proliferation and pS2 expression of MCF-7 human breast cancer cells. *Food Chem Toxicol.* 2007 Nov;45(11):2319–30.
 159. Folmar LC, Hemmer MJ, Denslow ND, Kroll K, Chen J, Cheek A, et al. A comparison of the estrogenic potencies of estradiol, ethynylestradiol, diethylstilbestrol, nonylphenol and methoxychlor in vivo and in vitro. *Aquat Toxicol.* 2002 Oct 2;60(1–2):101–10.
 160. Jørgensen M, Vendelbo B, Skakkebæk NE, Leffers H. Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes. *Environ Health Perspect.* 2000 May;108(5):403–12.
 161. Lee H-R, Hwang K-A, Park M-A, Yi B-R, Jeung E-B, Choi K-C. Treatment with bisphenol A and methoxychlor results in the growth of human breast cancer cells and alteration of the expression of cell cycle-related genes, cyclin D1 and p21, via an estrogen receptor-dependent signaling pathway. *Int J Mol Med.* 2012 May;29(5):883–90.
 162. Cossette LJ, Gaumond I, Martinoli M-G. Combined effect of xenoestrogens and growth factors in two estrogen-responsive cell lines. *Endocrine.* 2002 Aug;18(3):303–8.
 163. Verma SP, Salamone E, Goldin B. Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cells induced by estrogenic pesticides. *Biochem Biophys Res Commun.* 1997 Apr 28;233(3):692–6.
 164. Yang C, Chen S. Two organochlorine pesticides, toxaphene and chlordane, are antagonists for estrogen-related receptor alpha-1 orphan receptor. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4519–24.
 165. Coumoul X, Diry M, Robillot C, Barouki R. Differential regulation of cytochrome P450 1A1 and 1B1 by a combination of dioxin and pesticides in the breast tumor cell line MCF-7. *Cancer Res [Internet].* 2001 May 15;61(10):3942–8. Available

- from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11358810>
166. Wu F, Khan S, Wu Q, Barhoumi R, Burghardt R, Safe S. Ligand structure-dependent activation of estrogen receptor alpha/Sp by estrogens and xenoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2008 May;110(1–2):104–15.
 167. García MA, Peña D, Álvarez L, Cocca C, Pontillo C, Bergoc R, et al. Hexachlorobenzene induces cell proliferation and IGF-I signaling pathway in an estrogen receptor α -dependent manner in MCF-7 breast cancer cell line. *Toxicol Lett* [Internet]. 2010 Feb 1;192(2):195–205. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.10.026>
 168. Ventura C, Núñez M, Gaido V, Pontillo C, Miret N, Randi A, et al. Hexachlorobenzene alters cell cycle by regulating p27-cyclin E-CDK2 and c-Src-p27 protein complexes. *Toxicol Lett* [Internet]. 2017 Mar 15;270:72–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.013>
 169. Reprinted from *Toxicology letters*, 270, Ventura C, Núñez M, Gaido V, Pontillo C, et al. Hexachlorobenzene alters cell cycle by regulating p27-cyclin E-CDK2 and c-Src-p27 protein complexes, 72-79, Copyright 2017, with permission from Elsevier. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.02.013>
 170. Pontillo CA, García MA, Peña D, Cocca C, Chiappini F, Alvarez L, et al. Activation of c-Src/HER1/STAT5b and HER1/ERK1/2 signaling pathways and cell migration by hexachlorobenzene in MDA-MB-231 human breast cancer cell line. *Toxicol Sci* [Internet]. 2011 Apr;120(2):284–96. Available from: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfq390>
 171. Pontillo CA, Rojas P, Chiappini F, Sequeira G, Cocca C, Crocci M, et al. Action of hexachlorobenzene on tumor growth and metastasis in different experimental models. *Toxicol Appl Pharmacol* [Internet]. 2013 May 1;268(3):331–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.taap.2013.02.007>
 172. Randi AS, Cocca C, Carbone V, Nuñez M, Croci M, Gutiérrez A, et al. Hexachlorobenzene is a tumor co-carcinogen and induces alterations in insulin-growth factors signaling pathway in the rat mammary gland. *Toxicol Sci* [Internet]. 2006 Jan;89(1):83–92. Available from: <https://doi.org/10.1093/toxsci/kfj023>
 173. Peña D, Pontillo C, García MA, Cocca C, Alvarez L, Chiappini F, et al. Alterations in c-Src/HER1 and estrogen receptor α signaling pathways in mammary gland and tumors of hexachlorobenzene-treated rats. *Toxicology* [Internet]. 2012 Mar 11;293(1–3):68–77. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2011.12.012>

174. Delisle A, Ferraris E, Plante I. Chronic exposure to hexachlorobenzene results in down-regulation of connexin43 in the breast. *Environ Res* [Internet]. 2015 Nov;143(Pt A):229–40. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.envres.2015.10.020>
175. Pontillo C, Español A, Chiappini F, Miret N, Cocca C, Alvarez L, et al. Hexachlorobenzene promotes angiogenesis in vivo, in a breast cancer model and neovasculogenesis in vitro, in the human microvascular endothelial cell line HMEC-1. *Toxicol Lett* [Internet]. 2015 Nov 19;239(1):53–64. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2015.09.001>
176. Miret N, Pontillo C, Ventura C, Carozzo A, Chiappini F, Kleiman de Pisarev D, et al. Hexachlorobenzene modulates the crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and transforming growth factor- β 1 signaling, enhancing human breast cancer cell migration and invasion. *Toxicology* [Internet]. 2016 Jul 29;366–367:20–31. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.08.007>
177. Reprinted from *Toxicology*, 366-367, Miret N, Pontillo C, Ventura C, Carozzo A, et al. Hexachlorobenzene modulates the crosstalk between the aryl hydrocarbon receptor and transforming growth factor- β 1 signaling, enhancing human breast cancer cell migration and invasion, 20-31, Copyright 2016, with permission from Elsevier.
178. Nesaretnam K, Darbre P. 3,5,3',5'-Tetrachlorobiphenyl is a weak oestrogen agonist in vitro and in vivo. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1997 Aug;62(5–6):409–18.
179. Lin C-H, Huang C-L, Chuang M-C, Wang Y-J, Chen D-R, Chen S-T, et al. Protective role of estrogen receptor-alpha on lower chlorinated PCB congener-induced DNA damage and repair in human tumoral breast cells. *Toxicol Lett* [Internet]. 2009 Jul 10;188(1):11–9. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.02.009>
180. Radice S, Chiesara E, Fucile S, Marabini L. Different effects of PCB101, PCB118, PCB138 and PCB153 alone or mixed in MCF-7 breast cancer cells. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2008 Jul;46(7):2561–7. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.04.012>
181. Ptak A, Mazur K, Gregoraszczyk EL. Comparison of combinatory effects of PCBs (118, 138, 153 and 180) with 17 β -estradiol on proliferation and apoptosis in MCF-7 breast cancer cells. *Toxicol Ind Health* [Internet]. 2011 May;27(4):315–21. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0748233710387003>

182. Bonefeld-Jørgensen EC, Andersen HR, Rasmussen TH, Vinggaard AM. Effect of highly bioaccumulated polychlorinated biphenyl congeners on estrogen and androgen receptor activity. *Toxicology*. 2001 Feb 14;158(3):141–53.
183. Rattenborg T, Gjermansen I, Bonefeld-Jørgensen EC. Inhibition of E2-induced expression of BRCA1 by persistent organochlorines. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2002 Dec 1;4(6):R12. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr461>
184. Lin C-H, Lin P-H. Induction of ROS formation, poly(ADP-ribose) polymerase-1 activation, and cell death by PCB126 and PCB153 in human T47D and MDA-MB-231 breast cancer cells. *Chem Biol Interact*. 2006 Aug 25;162(2):181–94.
185. Zhu Y, Kalen AL, Li L, Lehmler H-J, Robertson LW, Goswami PC, et al. Polychlorinated-biphenyl-induced oxidative stress and cytotoxicity can be mitigated by antioxidants after exposure. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2009 Dec 15;47(12):1762–71. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2009.09.024>
186. Chaudhuri L, Sarsour EH, Kalen AL, Aykin-Burns N, Spitz DR, Goswami PC. Polychlorinated biphenyl induced ROS signaling delays the entry of quiescent human breast epithelial cells into the proliferative cycle. *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2010 Jul 1;49(1):40–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2010.03.012>
187. Krishnan V, Safe S. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans (PCDFs) as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: quantitative structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1993 May;120(1):55–61.
188. Oenga GN, Spink DC, Carpenter DO. TCDD and PCBs inhibit breast cancer cell proliferation in vitro. *Toxicol Vitro*. 2004 Dec;18(6):811–9.
189. Ramamoorthy K, Gupta MS, Sun G, McDougal A, Safe SH. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl exhibits antiestrogenic and antitumorigenic activity in the rodent uterus and mammary cells and in human breast cancer cells. *Carcinogenesis*. 1999 Jan;20(1):115–23.
190. Nesaretnam K, Corcoran D, Dils RR, Darbre P. 3,4,3',4'-Tetrachlorobiphenyl acts as an estrogen in vitro and in vivo. *Mol Endocrinol*. 1996 Aug;10(8):923–36.
191. Liu S, Abdelrahim M, Khan S, Ariazi E, Jordan VC, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer

- cells. *Biol Chem*. 2006 Sep;387(9):1209–13.
192. Spink BC, Pang S, Pentecost BT, Spink DC. Induction of cytochrome P450 1B1 in MDA-MB-231 human breast cancer cells by non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls. *Toxicol Vitro*. 2002 Dec;16(6):695–704.
193. Nesaretnam K, Hales E, Sohail M, Krausz T, Darbre P. 3,3',4,4'-Tetrachlorobiphenyl (TCB) can Enhance DMBA-induced Mammary Carcinogenesis in the Rat. *Eur J Cancer*. 1998;34(3):389–93.
194. van Duursen MBM, Sanderson JT, van der Bruggen M, van der Linden J, van den Berg M. Effects of several dioxin-like compounds on estrogen metabolism in the malignant MCF-7 and nontumorigenic MCF-10A human mammary epithelial cell lines. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2003 Aug 1;190(3):241–50.
195. Matthews J, Wihlén B, Heldring N, MacPherson L, Helguero L, Treuter E, et al. Coplanar 3,3',4,4',5-pentachlorinated biphenyl and non-coplanar 2,2',4,6,6'-pentachlorinated biphenyl differentially induce recruitment of oestrogen receptor α to aryl hydrocarbon receptor target genes. *Biochem J* [Internet]. 2007 Sep 1;406(2):343–53. Available from: <http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20070585>
196. Abdelrahim M, Ariazi E, Kim K, Khan S, Barhoumi R, Burghardt R, et al. 3-Methylcholanthrene and other aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor α . *Cancer Res* [Internet]. 2006 Feb 15;66(4):2459–67. Available from: <http://cancerres.aacrjournals.org/lookup/doi/10.1158/0008-5472.CAN-05-3132>
197. Kortenkamp A. Ten years of mixing cocktails: a review of combination effects of endocrine-disrupting chemicals. *Environ Health Perspect* [Internet]. 2007 Jun 8;115(Suppl 1):98–105. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2174407/>
198. Dees C, Askari M, Foster JS, Ahamed S, Wimalasena J. DDT mimicks estradiol stimulation of breast cancer cells to enter the cell cycle. *Mol Carcinog*. 1997 Feb;18(2):107–14.
199. Charles GD, Gennings C, Zacharewski TR, Gollapudi BB, Carney EW. Assessment of interactions of diverse ternary mixtures in an estrogen receptor- α reporter assay. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2002 Apr 1;180(1):11–21.
200. Ociepa-Zawal M, Rubiś B, Laciński M, Trzeciak WH. The effect of indole-3-carbinol on the expression of CYP1A1, CYP1B1 and AhR genes and proliferation

- of MCF-7 cells. *Acta Biochim Pol.* 2007;54(1):113–7.
201. Xu H, Kraus WL, Shuler ML. Development of a stable dual cell-line GFP expression system to study estrogenic endocrine disruptors. *Biotechnol Bioeng* [Internet]. 2008 Dec 15;101(6):1276–87. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18980187>
202. Zhu Z, Edwards RJ, Boobis AR. Proteomic analysis of human breast cell lines using SELDI-TOF MS shows that mixtures of estrogenic compounds exhibit simple similar action (concentration additivity). *Toxicol Lett.* 2008 Sep 26;181(2):93–103.
203. Aubé M, Larochelle C, Ayotte P. Differential effects of a complex organochlorine mixture on the proliferation of breast cancer cell lines. *Environ Res* [Internet]. 2011 Apr;111(3):337–47. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21295777>
204. Gaido K, Dohme L, Wang F, Chen I, Blankvoort B, Ramamoorthy K, et al. Comparative estrogenic activity of wine extracts and organochlorine pesticide residues in food. *Environ Health Perspect.* 1998 Dec;106(Supplement 6):1347–51.
205. Valerón PF, Pestano JJ, Luzardo OP, Zumbado ML, Almeida M, Boada LD. Differential effects exerted on human mammary epithelial cells by environmentally relevant organochlorine pesticides either individually or in combination. *Chem Biol Interact* [Internet]. 2009 Aug 14;180(3):485–91. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19422813>
206. Rivero J, Luzardo OP, Henríquez-Hernández LA, Machín RP, Pestano J, Zumbado M, et al. In vitro evaluation of oestrogenic/androgenic activity of the serum organochlorine pesticide mixtures previously described in a breast cancer case–control study. *Sci Total Environ* [Internet]. 2015 Dec 15;537:197–202. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2015.08.016>
207. Rivero J, Henríquez-Hernández LA, Luzardo OP, Pestano J, Zumbado M, Boada LD, et al. Differential gene expression pattern in human mammary epithelial cells induced by realistic organochlorine mixtures described in healthy women and in women diagnosed with breast cancer. *Toxicol Lett* [Internet]. 2016 Mar 30;246:42–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.02.003>
208. Foster WG, Younglai E V., Boutross-Tadross O, Hughes CL, Wade MG. Mammary gland morphology in Sprague-Dawley rats following treatment with an organochlorine mixture in utero and neonatal genistein. *Toxicol Sci.* 2004 Jan;77(1):91–100.

209. Desaulniers D, Leingartner K, Russo J, Perkins G, Chittim BG, Archer MC, et al. Modulatory effects of neonatal exposure to TCDD, or a mixture of PCBs, p,p'-DDT, and p-p'-DDE, on methylnitrosourea-induced mammary tumor development in the rat. *Environ Health Perspect*. 2001 Jul;109(7):739–47.
210. Desaulniers D, Leingartner K, Musicki B, Cole J, Li M, Charbonneau M, et al. Lack of effects of postnatal exposure to a mixture of aryl hydrocarbon-receptor agonists on the development of methylnitrosourea-induced mammary tumors in Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Environ Heal - Part A*. 2004 Sep 24;67(18):1457–75.
211. Liu S, Li S, Du Y. Polychlorinated Biphenyls (PCBs) Enhance Metastatic Properties of Breast Cancer Cells by Activating Rho-Associated Kinase (ROCK). Aziz SA, editor. *PLoS One* [Internet]. 2010 Jun 23;5(6):e11272. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0011272>
212. Fox EM, Davis RJ, Shupnik MA. ER β in Breast Cancer--Onlooker, Passive Player, or Active Protector? *Steroids*. 2008;73(11):1039–51.
213. Saji S, Jensen E V, Nilsson S, Rylander T, Warner M, Gustafsson J-Å. Estrogen receptors α and β in the rodent mammary gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jan 4;97(1):337–42.
214. Crooke PS, Justenhoven C, Brauch H, and for the GENICA Consortium, Dawling S, Roodi N, et al. Estrogen metabolism and exposure in a genotypic-phenotypic model for breast cancer risk prediction. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* [Internet]. 2011 Jul;20(7):1502–15. Available from: <http://cebp.aacrjournals.org/cgi/doi/10.1158/1055-9965.EPI-11-0060>
215. Cavalieri EL, Rogan EG, Chakravarti D. Initiation of cancer and other diseases by catechol ortho-quinones: a unifying mechanism. *Cell Mol Life Sci*. 2002 Apr;59(4):665–81.
216. Zahid M, Kohli E, Saeed M, Rogan E, Cavalieri E. The Greater Reactivity of Estradiol-3,4-quinone vs Estradiol-2,3-quinone with DNA in the Formation of Depurinating Adducts: Implications for Tumor-Initiating Activity. *Chem Res Toxicol*. 2006 Jan;19(1):164–72.
217. Paech K, Webb P, Kuiper GGJM, Nilsson S, Gustafsson J-Å, Kushner PJ, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science*. 1997 Sep 5;277(5331):1508–10.
218. Kuiper GGJM, Lemmen JG, Carlsson B, Corton JC, Safe SH, van der Saag PT, et al. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor β .

- Endocrinology. 1998 Oct;139(10):4252–63.
219. Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL, Fernandez MF, Olea N, Serrano FO. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1995 Oct;103(Supplement 7):113–22. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.95103s7113>
220. Li X, Zhang S, Safe S. Activation of kinase pathways in MCF-7 cells by 17 β -estradiol and structurally diverse estrogenic compounds. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2006 Feb;98(2–3):122–32.
221. Hatakeyama M, Tessier DM, Dunlap DY, Zou EM, Matsumura F. Estrogenic action of β -HCH through activation of c-Neu in MCF-7 breast carcinoma cells. *Environ Toxicol Pharmacol*. 2002 Jan;11(1):27–38.
222. Hahn ME, Goldstein JA, Linko P, Gasiewicz TA. Interaction of hexachlorobenzene with the receptor for 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in vitro and in vivo. Evidence that hexachlorobenzene is a weak Ah receptor agonist. *Arch Biochem Biophys*. 1989 Apr;270(1):344–55.
223. Kelce WR, Stone CR, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM. Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist. *Nature* [Internet]. 1995 Jun 15;375(6532):581–5. Available from: <http://www.nature.com/doi/10.1038/375581a0>
224. Lemaire G, Terouanne B, Mauvais P, Michel S, Rahmani R. Effect of organochlorine pesticides on human androgen receptor activation in vitro. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2004 Apr 15;196(2):235–46.
225. Li J, Li N, Ma M, Giesy JP, Wang Z. In vitro profiling of the endocrine disrupting potency of organochlorine pesticides. *Toxicol Lett*. 2008 Dec 15;183(1–3):65–71.
226. Van Den Berg M, Birnbaum L, Bosveld ATC, Brunström B, Cook P, Feeley M, et al. Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife. *Environ Health Perspect*. 1998 Dec;106(12):775–92.
227. Paige LA, Christensen DJ, Grøn H, Norris JD, Gottlin EB, Padilla KM, et al. Estrogen receptor (ER) modulators each induce distinct conformational changes in ER α and ER β . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Mar 30;96(7):3999–4004.
228. McDonnell DP, Clemm DL, Hermann T, Goldman ME, Pike JW. Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens. *Mol Endocrinol*. 1995 Jun;9(6):659–69.

229. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* [Internet]. 2010 May 25;7(5):e1000279. Available from: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.1000279>
230. Mohammed H, Russell IA, Stark R, Rueda OM, Hickey TE, Tarulli GA, et al. Progesterone receptor modulates ER α action in breast cancer. *Nature* [Internet]. 2015 Jul 16;523(7560):313–7. Available from: <http://www.nature.com/articles/nature14583>
231. Johnston SD, Liu X, Zuo F, Eisenbraun TL, Wiley SR, Kraus RJ, et al. Estrogen-related receptor α 1 functionally binds as a monomer to extended half-site sequences including ones contained within estrogen-response elements. *Mol Endocrinol*. 1997 Mar;11(3):342–52.
232. Chen S, Zhou D, Yang C, Okubo T, Kinoshita Y, Yu B, et al. Modulation of aromatase expression in human breast tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2001 Dec;79(1–5):35–40.
233. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* [Internet]. 2007 Feb 26;26(9):1324–37. Available from: <http://www.nature.com/articles/1210220>
234. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* [Internet]. 2011 Mar 4;144(5):646–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
235. Høyer AP, Jørgensen T, Brock JW, Grandjean P. Organochlorine exposure and breast cancer survival. *J Clin Epidemiol* [Internet]. 2000 Mar 1;53(3):323–30. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0895-4356\(99\)00165-1%0A](https://doi.org/10.1016/S0895-4356(99)00165-1%0A)
236. Roswall N, Sørensen M, Tjønneland A, Raaschou-Nielsen O. Organochlorine concentrations in adipose tissue and survival in postmenopausal, Danish breast cancer patients. *Environ Res* [Internet]. 2018 May;163:237–48. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.02.003>
237. Høyer AP, Grandjean P, Jørgensen T, Brock JW, Hartvig HB. Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* [Internet]. 1998 Dec 5;352(9143):1816–20. Available from: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(98\)04504-8%0A](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(98)04504-8%0A)
238. Høyer AP, Jørgensen T, Rank F, Grandjean P. Organochlorine exposures influence

- on breast cancer risk and survival according to estrogen receptor status: a Danish cohort-nested case-control study. *BMC Cancer* [Internet]. 2001;1:8. Available from: <http://bmccancer.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2407-1-8>
239. Galadari S, Rahman A, Pallichankandy S, Thayyullathil F. Reactive oxygen species and cancer paradox: to promote or to suppress? *Free Radic Biol Med* [Internet]. 2017 Mar;104:144–64. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.01.004>
240. Naus CC, Laird DW. Implications and challenges of connexin connections to cancer. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2010 Jun;10(6):435–41. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrc2841>
241. Soto AM, Sonnenschein C. DDT, endocrine disruption and breast cancer. *Nat Rev Endocrinol* [Internet]. 2015 Sep;11(9):507–8. Available from: <http://www.nature.com/articles/nrendo.2015.125>
242. Macon, Madisa & Fenton S. Endocrine disruptors and the Breast: early life effects and later life disease. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2013;18(1): 43–61.
243. Fenton SE. Endocrine-disrupting compounds and mammary gland development: Early exposure and later life consequences. *Endocrinology*. 2006;147(6):18–24.
244. Russo IH, Russo J. Developmental stage of the rat mammary gland as determinant of its susceptibility to 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *J Natl Cancer Inst*. 1978 Dec;61(6):1439–49.
245. Tarraf C, El-Sabban M, Bassam R, Beyrouthy M, Chamoun J, Talhouk R. Functional consequence of exposure to dieldrin on mammary development and function. *Food Addit Contam*. 2003 Sep;20(9):819–28.
246. Muto T, Wakui S, Imano N, Nakaaki K, Hano H, Furusato M, et al. In-utero and lactational exposure of 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl modulate dimethylbenz[a]anthracene-induced rat mammary carcinogenesis. *J Toxicol Pathol* [Internet]. 2001;14(3):213–24. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.JSTAGE/tox/14.213?from=CrossRef>
247. Muto T, Wakui S, Imano N, Nakaaki K, Takahashi H, Hano H, et al. Mammary gland differentiation in female rats after prenatal exposure to 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl. *Toxicology* [Internet]. 2002 Aug 15;177(2–3):197–205. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12135623>
248. Cohn BA, Wolff MS, Cirillo PM, Sholtz RI. DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environ Health Perspect*

[Internet]. 2007 Oct;115(10):1406–14. Available from:

<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC2022666>

249. Cohn BA, La Merrill M, Krigbaum NY, Yeh G, Park J-S, Zimmermann L, et al. DDT exposure in utero and breast cancer. *J Clin Endocrinol Metab* [Internet]. 2015 Aug;100(8):2865–72. Available from: <https://academic.oup.com/jcem/article-lookup/doi/10.1210/jc.2015-1841>

