

# Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Verifizierung des veränderten Wachstumsverhaltens von  
verschiedenen Brustkrebszelltypen in vitro unter  
Magnetfeldeinfluss mit verschiedenen Onkostatika  
- Vorhaben 3699S04219**

**Auftragnehmer:  
Universität Ulm, Frauenklinik**

**Rainer Girgert**

**Volker Hanf**

**Das Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit (BMU) und im Auftrag des Bundesamtes für Strahlenschutz (BfS) durchgeführt.**

Dieser Band enthält einen Ergebnisbericht eines vom Bundesamt für Strahlenschutz im Rahmen der Ressortforschung des BMU (UFOPLAN) in Auftrag gegebenen Untersuchungsvorhabens. Verantwortlich für den Inhalt sind allein die Autoren. Das BfS übernimmt keine Gewähr für die Richtigkeit, die Genauigkeit und Vollständigkeit der Angaben sowie die Beachtung privater Rechte Dritter. Der Auftraggeber behält sich alle Rechte vor. Insbesondere darf dieser Bericht nur mit seiner Zustimmung ganz oder teilweise vervielfältigt werden.

Der Bericht gibt die Auffassung und Meinung des Auftragnehmers wieder und muss nicht mit der des BfS übereinstimmen.

**BfS-RESFOR-13/09**

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:  
**urn:nbn:de:0221-2009042374**

Salzgitter, Juli 2009

**Verifizierung des veränderten Wachstumsverhaltens  
von verschiedenen Brustkrebszelltypen in vitro unter  
Magneteinfluss mit verschiedenen Onkostatika**

**Forschungsnehmer:**

**Frauenklinik der Universität Ulm**

**Verfasser:**

**PD Dr. rer.nat. Rainer Girgert**

**Prof. Dr. med. Volker Hanf**

## **Gliederung**

<b>Zusammenfassung</b>	<b>5</b>
<b>Summary</b>	<b>5</b>
<b>1. Einleitung und Zielsetzung</b>	<b>7</b>
<b>1.1 Aufgabenstellung</b>	<b>7</b>
<b>1.2 Voraussetzungen</b>	<b>7</b>
<b>1.3 Planung und Ablauf des Vorhaben</b>	<b>8</b>
<b>1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft werden konnte</b>	<b>9</b>
<b>1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen</b>	<b>9</b>
<b>1.6 Wissenschaftliche Grundlagen</b>	<b>10</b>
<b>1.6.1 Melatonin und Brustkrebs</b>	<b>12</b>
<b>1.6.2 Melatonin-Rezeptoren</b>	<b>12</b>
<b>1.6.3 Testsysteme zum Nachweis estrogenartiger Wirkungen</b>	<b>14</b>
<b>1.7 Projektzielrichtung und Strategie</b>	<b>15</b>
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
<b>2.1 Zellkulturen</b>	<b>16</b>
<b>2.1.1 Etablierte Zelllinien</b>	<b>16</b>
<b>2.1.2 Primärkulturen</b>	<b>17</b>
<b>2.1.3 Solide Primärkulturen</b>	<b>17</b>
<b>2.1.4 Zerlegung des Primärtumors in Einzelzellen</b>	<b>17</b>
<b>2.1.5 Aufbereitung von Pleurapunktaten</b>	<b>18</b>
<b>2.2. Proliferationstests („E-Screen-Assay“)</b>	<b>18</b>
<b>2.2.1 Quantitative Auswertung des E-Screen-Assays</b>	<b>20</b>
<b>2.3 RT-PCR</b>	<b>22</b>
<b>2.4 cDNA-Mikroarrays</b>	<b>23</b>

<b>3.</b>	<b>Erzielte Ergebnisse</b>	<b>24</b>
<b>3.1</b>	<b>Entwicklung der Expositions-Kammern</b>	<b>24</b>
<b>3.1.1.</b>	<b>Konstruktive Festlegung der magnetischen Expositionsbedingungen</b>	<b>24</b>
<b>3.1.2.</b>	<b>Gewährleistung optimaler Zellkulturbedingungen - CO<sub>2</sub>-Konzentration</b>	<b>30</b>
<b>3.2</b>	<b>Verwendetes Zellmaterial</b>	<b>32</b>
<b>3.2.1</b>	<b>Charakterisierung der verwendeten Brustkrebszelllinien</b>	<b>33</b>
	<b>Expression der Estrogenrezeptoren und der Melatoninrezeptoren</b>	<b>33</b>
<b>3.2.2</b>	<b>Charakterisierung der verschiedenen MCF-7 Zellen und der EFM-19 Zellen bezüglich ihrer Hemmbarkeit mit Melatonin</b>	<b>35</b>
	<b>MCF-7</b>	<b>35</b>
	<b>EFM-19</b>	<b>37</b>
<b>3.3</b>	<b>Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen</b>	<b>38</b>
<b>3.3.1</b>	<b>Entwicklung eines sensitiveren Assays zum Nachweis der Melatonin-Wirkung</b>	<b>38</b>
<b>3.3.2</b>	<b>Melatoninwirkung auf die Proliferation von fünf Brustkrebszelllinien</b>	<b>40</b>
<b>3.4</b>	<b>Proliferationshemmender Effekt von Tamoxifen auf MCF-7 Zelllinien</b>	<b>44</b>
<b>3.5</b>	<b>Primärkulturen</b>	<b>46</b>
<b>3.5.1</b>	<b>Mechanische Dissoziation der Gewebestücke</b>	<b>46</b>
<b>3.5.2</b>	<b>Enzymatische Dissoziation der Gewebestücke</b>	<b>47</b>
<b>3.5.3</b>	<b>Charakterisierung der Primärkulturen</b>	<b>47</b>
<b>3.5.4</b>	<b>Anreicherungs- und Selektionsverfahren</b>	<b>48</b>
<b>3.5.5</b>	<b>Gewinnung von Zellen aus Pleurapunktaten und Ascitesflüssigkeit</b>	<b>49</b>
<b>3.5.6</b>	<b>Anreicherung durch Magnetseparation</b>	<b>50</b>
<b>3.5.7</b>	<b>Anreicherung in Agarkulturen</b>	<b>50</b>
<b>3.6</b>	<b>Einfluss des Magnetfeldes auf die Melatonin-Wirkung in Brustkrebszelllinien</b>	<b>52</b>

<b>3.7</b>	<b>Einfluss des Magnetfeldes auf die Tamoxifen-Wirkung in Brustkrebszelllinien</b>	<b>56</b>
<b>3.8</b>	<b>Genexpression nach Magnetfeldeinwirkung</b>	<b>60</b>
<b>3.8.1</b>	<b>RT-PCR</b>	<b>60</b>
<b>3.8.2</b>	<b>cDNA-Mikro-Arrays</b>	<b>61</b>
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Onkostatische Wirkung von Melatonin</b>	<b>62</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Nachweis der onkostatischen Wirkung von Melatonin in verschiedenen MCF-7 Zellklonen</b>	<b>64</b>
<b>4.2</b>	<b>Einfluss verschiedener Magnetfeldstärken auf die Melatoninwirkung</b>	<b>65</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Vergleich der Versuchsergebnisse mit den von Liburdy et al. erzielten Werten</b>	<b>66</b>
<b>4.3</b>	<b>Einfluss verschiedener Magnetfeldstärken auf die Tamoxifenwirkung</b>	<b>66</b>
<b>4.4</b>	<b>Mögliche Erklärungen für den Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Tamoxifenwirkung</b>	<b>67</b>
<b>4.5</b>	<b>Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen</b>	<b>72</b>
<b>4.6</b>	<b>Schlussfolgerungen und Ausblick</b>	<b>76</b>
<b>5.</b>	<b>Literatur</b>	<b>79</b>
<b>5.1.</b>	<b>Veröffentlichungen aus dem Projekt</b>	<b>88</b>
<b>6.</b>	<b>Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen</b>	<b>90</b>

## Zusammenfassung

In diesem Projekt sollten die von Liburdy et al. (1993; 1997) publizierten Ergebnisse über eine Abschwächung der anti-proliferativen Wirkung des Zirbeldrüsenhormons Melatonin und des anti-östrogen wirksamen Krebsmedikaments Tamoxifen auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Felder überprüft werden. Zur Exposition der Zellen in kontrollierten und sehr homogenen Magnetfeldern wurden eigens neuartige Magnetfeld-Inkubatoren konstruiert. Die Ermittlung der östrogen-abhängigen Zellvermehrung aller untersuchten Zelllinien, inklusive der von Liburdy et al. verwandten MCF-7 Zelllinie, ergab in Gegenwart von  $10^{-9}$  M und  $5 \times 10^{-9}$  M Melatonin eine reduzierte proliferative Aktivität. Wurden diese Proliferationsuntersuchungen bei Magnetfeldern von 1,2  $\mu$ T, 10  $\mu$ T oder 100  $\mu$ T Flussdichte durchgeführt, war der antiproliferative Effekt des Melatonins deutlich abgeschwächt. In ähnlicher Weise wurde die Hemmung des Zellwachstums durch Tamoxifen bei 1,2  $\mu$ T am deutlichsten reduziert. Zwischen den verschiedenen Zelllinien wurden erhebliche Empfindlichkeitsunterschiede gegenüber Melatonin, Tamoxifen und einer Magnetfeldexposition beobachtet. Zusammenfassend konnten die Ergebnisse der Untersuchung von Liburdy et al. bestätigt werden. Darüber hinaus wurde für die Magnetfeldwirkung ein sog. Fenstereffekt beobachtet, bei dem die Wirkung bis zu einer Feldstärke von 1,2  $\mu$ T zunimmt und bei höherer Feldstärke wieder schwächer wird.

## Summary

It was the objective of this project to verify the results by Liburdy et al. (1993, 1997) on the modulation of oncostatic effects of the pineal gland hormone melatonin and the anti-estrogenic anti-cancer drug tamoxifen by low-frequency electromagnetic fields in human breast cancer cells. In order to reproducibly expose cancer cells to highly homogeneous magnetic fields of defined intensity it was necessary to design and construct novel exposure-incubators. All cell lines under investigation including the one used by Liburdy et al. (MCF-7) showed a fractional suppression of the estrogen-driven proliferative response in the presence of melatonin at  $10^{-9}$  M und  $5 \times 10^{-9}$  M. When these growth experiments were performed at magnetic field intensities of 1.2  $\mu$ T, 10  $\mu$ T or 100  $\mu$ T, the inhibitory effect of melatonin was clearly reduced. Similarly, the anti-estrogenic growth inhibition by tamoxifen was most strongly reduced at 1.2  $\mu$ T. Notable differences were observed between the various cell lines tested with respect to their sensitivities towards melatonin, tamoxifen or magnetic fields. In summary, the results of Liburdy et al. were principally confirmed. In ad-

dition, for magnetic field activities a so called window effect was observed, resulting in increasing biological activity up to a field strength of 1.2  $\mu\text{T}$  and weaning at higher magnetic field intensities.

## **1. Einleitung und Zielsetzung**

### **1.1 Aufgabenstellung**

In dem genannten Projekt sollten die von Liburdy et al. (1992) und Harland und Liburdy (1997) veröffentlichten Ergebnisse über eine Beeinflussung der onkostatischen Wirkung von Melatonin und Tamoxifen auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Wechselfelder bestätigt oder widerlegt werden. In diesen Publikationen berichteten die Autoren, dass das Wachstum von Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7 durch  $10^{-9}$ M Melatonin nach 7 Tagen um 18 % reduziert war. Wurden die gleichen Zellen in einem Magnetfeld von  $1,2 \mu\text{T}$  inkubiert, wurde die wachstumshemmende Wirkung des Melatonins auf die Brustkrebszellen aufgehoben, und die Zellen wuchsen genauso schnell wie Zellen, die ohne Melatonin kultiviert wurden. Das Magnetfeld wurde durch Helmholtz-Spulen erzeugt, die einen Durchmesser von 35 cm besaßen und mit 60 Hz Wechselstrom betrieben wurden (Liburdy et al., 1992). In der gleichen Apparatur wurden auch Untersuchungen zur Hemmwirkung des Antiöstrogens Tamoxifen durchgeführt. In Abwesenheit eines künstlichen Magnetwechselfeldes wurde bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M Tamoxifen eine Wachstumshemmung von 35 % erreicht. Wurde der gleiche Versuch in einem Magnetfeld von  $1,2 \mu\text{T}$  durchgeführt, war der wachstumshemmende Effekt von  $10^{-6}$ M Tamoxifen auf 10% reduziert (Harland und Liburdy, 1997).

Die Untersuchungen sollten sowohl mit der von Liburdy verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7 als auch mit Primärkulturen aus Brustkrebsgewebe unter sehr genau definierten und präzise kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Die Exposition sollte dazu in einem sehr homogenen Magnetfeld bei den 5 verschiedenen Feldstärken von  $0 \mu\text{T}$ ,  $0,2 \mu\text{T}$ ,  $1,2 \mu\text{T}$ ,  $10 \mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$  unter ständiger Kontrolle der magnetischen Flussdichte und der Temperatur erfolgen.

Zu diesem Zweck sollten die verwendeten Brustkrebszelllinien ausführlich in Bezug auf die molekularbiologischen Eigenschaften, die deren Wachstumsverhalten regulieren und die Expression der verschiedenen Rezeptoren hin untersucht werden, die die Proliferationsinhibition durch Melatonin und Tamoxifen vermitteln.

### **1.2 Voraussetzungen**

In der Universitäts-Frauenklinik Ulm bestehen langjährige Erfahrungen im Umgang mit Brustkrebszelllinien und deren molekularbiologischer Charakterisierung. Im durchführenden Labor ist seit Langem ein Proliferationsassay etabliert, mit dem das Wachstum von

Brustkrebszellen unter dem Einfluss verschiedener hormonartiger Umweltfaktoren gemessen werden kann (sog. „E-Screen-Assay“) (Körner et al., 1999).

Zur Etablierung von Primärkulturen stehen regelmäßig Tumorproben zur Verfügung, die im Rahmen üblicher therapeutischer Maßnahmen in der Frauenklinik operativ entfernt werden.

Die Universität Ulm besitzt eine elektronische Entwicklungsabteilung, die im Auftrag von Mitgliedern der Universität neue elektrische und elektronische Geräte entwickelt und konstruiert.

### **1.3 Planung und Ablauf des Vorhabens**

Zunächst mussten die Magnetfeld-Inkubatoren, in denen die Brustkrebszellen inkubiert und exponiert werden sollten, entwickelt und konstruiert werden. Dies geschah in Zusammenarbeit mit dem Institut für Physik der Universität. Um die Vorgaben der Leistungsbeschreibung hinsichtlich der Expositionsbedingungen zu erfüllen, musste vom ursprünglichen Plan einer wassermanteltemperierten Plexiglasapparatur im Zentrum zweier Helmholtzspulen abgewichen werden. Es musste eine völlig neue Expositions-kammer entwickelt werden. In intensiver Zusammenarbeit mit dem Leiter der elektronischen Entwicklungsabteilung der Universität Ulm, Dipl. Ing. H. Schimming, wurde die Konzeptionsplanung betrieben. In der späteren Detailerarbeitung zeigten sich Probleme, die mit einem beträchtlichen und in diesem Maße in keiner Weise voraussehbaren Zeitaufwand gelöst werden mussten.

Parallel zur Entwicklungs- und Fertigungsarbeit wurden über 100 Primärkulturen von Mammakarzinomen unter den verschiedensten Kulturbedingungen angelegt und deren Wachstumsverhalten beobachtet. Des Weiteren wurde in dieser Zeit das Wachstum verschiedener etablierter Brustkrebszelllinien auf die Hemmbarkeit durch Melatonin und Tamoxifen hin untersucht. Unsere Bemühungen, die von Liburdy et al. für seine Versuche verwendeten MCF-7 Zellen zu erhalten, blieben trotz mehrfacher Versuche bei verschiedenen Stellen erfolglos.

Es wurden außerdem umfangreiche Untersuchungen durchgeführt mit dem Ziel, einen proliferationshemmenden Effekt von Melatonin auf verschiedene Brustkrebszelllinien nachzuweisen. Schließlich gelang es, durch Erfassung von Dosis-Wirkungskurven ein neues hochsensitives Verfahren zu entwickeln, mit dem selbst sehr schwache Effekte von

Melatonin auf das Wachstum der Brustkrebszelllinien nachgewiesen und quantifiziert werden konnten (Girgert et al. 2003).

Da zur Erfüllung der extrem hohen Anforderungen an die Feldhomogenität die Entwicklung und Konstruktion der Magnetfeldinkubatoren, wie dargelegt, einen sehr hohen Zeitaufwand erforderte, stand erst zwei Jahre nach Beginn des Projektes der erste Magnetfeld-Inkubator für Untersuchungen des Magnetfeldeinflusses zur Verfügung. Ein zweiter Inkubator, in dem auch das Umgebungsfeld abgeschirmt werden konnte, wurde nach weiteren drei Monaten fertiggestellt.

In den Magnetfeld-Inkubatoren wurden dann etablierte Zelllinien und eine Primärkultur mit Melatonin sowie Tamoxifen bei fünf verschiedenen Feldstärken behandelt.

Zum Abschluss der Untersuchungen wurden noch Messungen zur veränderten Genexpression nach Magnetfeldexposition mittels cDNA-Mikro-Array begonnen.

#### **1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft werden konnte**

Die bis zu Beginn des Projektes existierenden und in der Literatur beschriebenen Apparaturen, die zuvor von anderen Gruppen zur Magnetfeld-Exposition benutzt wurden, konnten weder den Anforderungen an eine hohe Feldhomogenität noch an eine ausreichende Dokumentation der Stabilität des Magnetfeldes und der Temperatur genügen. Eine dahingehend geeignete Apparatur bestand zu Beginn des Projektes daher noch nicht, an deren Entwicklung angeknüpft werden konnte. Es war deshalb unumgänglich, völlig neuartige Inkubatoren zu entwickeln und zu erstellen, die die notwendigen Anforderungen erfüllten.

#### **1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen**

##### **Abteilung Angewandte Physik der Universität Ulm (Dr. Walter Dollhopf)**

Beratung bei der Planung der Inkubatoren und der ursprünglichen Expositionseinrichtung. Da nach späterer Erhöhung der Anforderungen an die Homogenität der Felder durch das BFS ein deutlich komplexerer Versuchsaufbau erforderlich wurde, stellte Dr. Dollhopf die Verbindung zu Herrn Dipl.Ing. Schimming her.

##### **Elektronische Entwicklungswerkstatt der Universität Ulm (Leiter: H. Schimming):**

Entwicklung und Erstellung der Magnetfeldinkubatoren und der Sensorik für die Messung und Regelung der Feldstärke, der Temperatur und der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator.

**Endokrinologisch-onkologisches Labor der Frauenklinik (Prof. R. Zeillinger):**

Verschiedene Brustkrebszelllinien, Mitbenutzung der Geräte für molekularbiologische Untersuchungen.

**Pathologisches und Zytologisches Labor der Frauenklinik (Fr. Dr. K. Koretz):**

Zur Verfügungstellung von Tumorpräparaten aus Mammakarzinomen für die Primärkultur.

**Dr. Steven Hill, Tulane University, New Orleans, USA:**

Überlassung einer Brustkrebszelllinie, in die das Gen für den Melatoninrezeptor Mt1 transfiziert worden war.

**PD Dr. W. Körner, Bayrisches Landesamt für Umweltschutz, Augsburg:**

Beratung bei der Auswertung der Proliferationsmessungen und Bereitstellung eines VBA-Auswertungsprogramms (EXCEL) für die Berechnung der EC50-Werte von Estradiol in Gegenwart von Melatonin, das von Dr. Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg entwickelt wurde.

**Arbeitsgruppe Experimentelle Anästhesie der Univ.-Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin:**

Eichung der Messung des CO<sub>2</sub>-Gehalts im Inkubator

**Prof. Gress, Innere Medizin der Universitätsklinik Ulm:**

Beratung und Mitbenutzung der Geräte für die Durchführung der cDNA-Mikro-Arrays

**PD Dr. Chr. Bartsch, Neuroendokrinologisches Labor der Univ.-Frauenklinik Tübingen:**

Suche nach Melatonin-responsiven Mammakarzinomzelllinien, gemeinsame Entwicklung eines neuen sensitiven Nachweisverfahrens (Girgert et al., 2003)

**1.6 Wissenschaftliche Grundlagen**

Die Auswirkungen von elektromagnetischen Feldern auf die menschliche Gesundheit werden in der Öffentlichkeit und in der Wissenschaft häufig und kontrovers diskutiert. Es gibt einige epidemiologische Untersuchungen, die darauf hinweisen, dass es in der Nähe von Hochspannungsleitungen zu einer leichten Erhöhung der Zahl maligner Erkrankungen in der Bevölkerung kommt. Andere Untersuchungen konnten dagegen einen signifikanten negativen Effekt der elektromagnetischen Felder nicht zeigen. Eine signifikant positive Assoziation wurde zwischen dem Auftreten von Leukämien bei Kindern und ihrer Exposition

mit niederfrequenten Magnetfeldern bei Nacht beobachtet (Schüz et al. 2001). Ahlbom et al. (2000) verglichen die Daten von mehr als 3000 Kindern mit Leukämie mit den Daten von 10000 gesunden Kontrollen und fanden eine Erhöhung des relativen Risikos um den Faktor 2 bei den Kindern, die in ihrer Umgebung einem magnetischen Feld ausgesetzt waren, das größer  $0,4 \mu\text{T}$  war. Im Gegensatz dazu beobachteten Linet et al. (1997) in einer Bevölkerung, die einem magnetischen Feld größer  $0,2 \mu\text{T}$  ausgesetzt war, keine Erhöhung des Risikos für Leukämien bei Kindern.

Bei Frauen vor der Menopause war das Risiko an Brustkrebs zu erkranken größer, wenn sie in einer Umgebung lebten, in der die magnetische Flussdichten über  $0,2 \mu\text{T}$  angenommen werden mussten (Wertheimer et al., 1982; Feychting et al., 1998). Bei anderen epidemiologischen Studien, die in Finnland und Taiwan durchgeführt wurden, fand man dagegen kein erhöhtes Risiko in der Bevölkerung, die in 100-500 m Abstand von Überlandleitungen lebten und dort Feldern ausgesetzt waren, die größer als  $0,01 \mu\text{T}$  waren (Verkasalo et al., 1996; Li et al., 1997). Eine aktuelle Übersicht zum Thema Elektromagnetische Feldeinwirkung und Brustkrebs findet sich bei Hanf (2002).

Da die Quantenenergie bei niederfrequenten Magnetfeldern viel zu gering ist, um genetische Defekte, wie DNA-Strangbrüche, zu induzieren, wurden andere Erklärungsmöglichkeiten für das Phänomen der Beeinflussung maligner Erkrankungen gesucht. Für eine solche Erklärung, die sogen. „Melatonin-Hypothese“, gibt es bereits eine Vielzahl experimenteller Hinweise. Melatonin ist ein Hormon der Zirbeldrüse, das ausschließlich während der nächtlichen Dunkelphase synthetisiert und ausgeschüttet wird. Ein ausgeprägter circadianer Rhythmus in der Melatoninbiosynthese wird durch Licht, das auf die Retina des Auges fällt, über Nervenverbindungen zur Zirbeldrüse feingesteuert. Es gibt experimentelle Hinweise dafür, dass die Zirbeldrüse auch empfindlich auf elektromagnetische Felder im nicht-sichtbaren Spektrum reagiert und diese elektromagnetische Strahlung ähnlich wie Licht die Ausschüttung von Melatonin verhindern kann (Baldwin et al., 1998).

Melatonin besitzt in verschiedenen in-vitro- und in-vivo-Systemen eine onkostatistische Wirkung, die die Bildung von Tumoren verhindert oder deren Wachstumsgeschwindigkeit reduziert. Dieser Effekt kommt unter anderem durch einen immunstimulatorischen Melatonin-effekt zustande. Es konnte gezeigt werden, dass Melatonin die Ausschüttung der Interleukine IL2 und IL6 aus mononukleären Zellen stimuliert (Garcia-Maurino et al., 1998).

### **1.6.1. Melatonin und Brustkrebs**

Die Rolle von Melatonin bei der Entstehung von Brustkrebs ist experimentell vielfach belegt worden. Bei Ratten, denen die Zirbeldrüse entfernt wurde und die deshalb kein Melatonin produzieren können, war die Inzidenz von Mammakarzinomen deutlich erhöht. Wurden diesen Ratten physiologische Gaben an Melatonin verabreicht, sank die Brustkrebsrate wieder auf das Normalniveau (Shah et al. 1984). Durch Gabe des Karzinogens DMBA kann bei Ratten Brustkrebs chemisch induziert werden. Wird Ratten zusätzlich zum DMBA Melatonin verabreicht, wird die Entstehung der Brusttumore verlangsamt und die Zahl der entstehenden Brusttumore reduziert (Tamarkin et al., 1981). Der Mechanismus, der diesem Phänomen zugrunde liegt, beruht möglicherweise auf der Tatsache, dass Melatonin die Ausschüttung des  $17\beta$ -Estradiol aus den Ovarien hemmt. Estradiol ist das wichtigste weibliche Geschlechtshormon, das neben vielen physiologischen Funktionen auch die Proliferation von responsiven Brustkrebszellen stimuliert.

Von einigen Autoren konnte an Brustkrebszelllinien in-vitro gezeigt werden, dass Melatonin auf zellulärer Ebene das Wachstum der Brustkrebszellen direkt hemmt (Hill et al., 1988; Cos et al., 1991). Andere Wissenschaftler waren dagegen nicht in der Lage, diese Beobachtungen zu reproduzieren, obwohl sie nominell die gleiche Zelllinie für ihre Versuche verwendeten wie Hill und Cos (Baldwin et al., 1998; Panzer et al., 1998).

Die meisten Versuche wurden mit der weitverbreiteten Brustkrebszelllinie MCF-7 durchgeführt. Diese Zelllinie wurde 1973 von Soule et al. etabliert und wurde seither in vielen verschiedenen Laboratorien weiterkultiviert. Es ist anzunehmen, dass die unterschiedlichen Kulturbedingungen, die in den verschiedenen Laboratorien verwendet wurden, zur Selektion verschiedener Subklone der ursprünglichen MCF-7 Zelllinie geführt haben, die heute ganz unterschiedliche biologische Eigenschaften aufweisen. In einer vergleichenden Studie haben Ram et al. (1998) MCF-7-Zellen aus drei verschiedenen Laboratorien auf ihr Ansprechen auf Melatonin hin untersucht und deutliche Unterschiede festgestellt.

### **1.6.2. Melatonin-Rezeptoren**

Für die Wirkung des Melatonins auf zellulärer Ebene sind verschiedene Rezeptoren verantwortlich. Diese Rezeptoren sind entweder in der Zellmembran lokalisiert oder sie befinden sich im Zellkern, wo sie als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren wirken. Die drei verschiedenen membranständigen Rezeptoren Mt1, Mt2 und Mt3 sind an G-Proteine gekoppelt, die die Aktivität der Adenylat-Cyclase hemmen (Reppert et al., 1995).

Sowohl der Mt1-Rezeptor als auch der nukleäre RZR $\alpha$ -Rezeptor wurden in zwei verschiedenen Arbeitsgruppen in MCF-7 Zellen nachgewiesen (Ram et al., 1998; Song et al., 1997). Es war bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welcher der beiden Rezeptoren für die antiproliferative Wirkung des Melatonins in Brustkrebszellen verantwortlich ist. Offensichtlich ist die antiproliferative Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen auch von den Estrogenrezeptoren abhängig. In Brustkrebszellen, die keine Estrogenrezeptoren exprimieren, konnte keine antiproliferative Wirkung des Melatonins festgestellt werden (Hill et al., 1988). Es ist jedoch bis heute noch nicht gelungen, die Stelle in den Signalkaskaden der Estrogen- und Melatoninrezeptoren zu identifizieren, an der die Wechselwirkung dieser beiden Signalwege stattfindet. Außerdem ist nicht eindeutig geklärt, ob der Estrogenrezeptor  $\alpha$  oder der Estrogenrezeptor  $\beta$  oder beide Rezeptoren an der antiproliferativen Wirkung des Melatonins beteiligt sind.

Ob elektromagnetische Felder auch direkt die Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen beeinflussen können, wurde von Liburdy et al. (1992) untersucht. In dieser Publikation beschreibt der Autor, dass das Wachstum von MCF-7 -Brustkrebszellen durch  $10^{-9}$ M Melatonin nach 7 Tagen um 18 % reduziert war. Wurden die gleichen Zellen in einem Magnetfeld von 1,2  $\mu$ T inkubiert, wurde die wachstumshemmende Wirkung des Melatonins auf die Brustkrebszellen aufgehoben, und die Zellen wuchsen genauso schnell, wie Zellen, die ohne Melatonin kultiviert worden waren. Das Magnetfeld wurde durch Helmholtz-Spulen erzeugt, die einen Durchmesser von 35 cm besaßen und mit 60 Hz Wechselstrom betrieben wurden (Liburdy et al., 1992).

In der gleichen Apparatur wurden auch Untersuchungen zur Hemmwirkung des Antiöstrogens Tamoxifen durchgeführt. In Abwesenheit eines künstlichen magnetischen Wechselfeldes wurde bei einer Konzentration von  $10^{-6}$ M Tamoxifen eine Wachstumshemmung von 35 % erreicht. Wurde der gleiche Versuch in einem Magnetfeld von 1,2  $\mu$ T durchgeführt, war der wachstumshemmende Effekt von  $10^{-6}$ M Tamoxifen auf 10% reduziert (Harland und Liburdy, 1997).

Liburdy et al. (1992) haben die Messungen des Zellwachstums in serumhaltigem Medium durchgeführt, dessen Estradiol-Gehalt weder quantifiziert noch kontrolliert wurde. Da das Wachstum der verwendeten Estrogenrezeptor-positiven Brustkrebszelllinie MCF-7 deutlich vom Estradiol-Gehalt des Kulturmediums abhängig ist und Melatonin das Ansprechen der Zellen auf Estradiol beeinflusst, haben wir für die Untersuchung der Melatoninwirkung und

der Tamoxifenwirkung ein Testsystem verwendet, dass zum empfindlichen Nachweis der Estrogenwirkung verwendet wird.

### 1.6.3. Testsysteme zum Nachweis estrogenartiger Wirkungen

Der Einsatz von *in vitro* Methoden zum Nachweis estrogenen Aktivitäten ist relativ neu. Erst die zufällige Entdeckung der estrogenen Wirkung von p-Nonylphenol mit der menschlichen estrogen-sensitiven Brustkrebszelllinie MCF-7 durch Soto et al. (1991) hat auf diesem Gebiet nennenswerte Forschungsaktivitäten ausgelöst. Zur einfachen Bestimmung rezeptorvermittelter estrogenen Wirkungen wurden in den letzten Jahren mehrere *in vitro* Testsysteme entwickelt und angewandt. Einen aktuellen Überblick gibt Tab. 1.

Rekombinante Reporter-Gen-Assays, bei denen die transkriptionale Aktivierung eines Indikator- oder "Reporter-Gen" (z.B. Luciferase oder  $\beta$ -Galaktosidase), welches unter der Kontrolle des estrogenresponsiven Elements (ERE) steht, gemessen wird, zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und durch einen ausgeprägten relativen Effekt verglichen mit der estrogenfreien Kontrolle aus. Allerdings sind Reporter-Gen-Assays mit Hefezellen deutlich unempfindlicher als entsprechende Assays mit humanen Zelllinien. Reporter-Gen-Assays mit menschlichen Zelllinien erreichen in etwa die Empfindlichkeit des Proliferations-tests mit humanen MCF-7-Brustkrebszellen (E-Screen-Assay).

Die empfindlichsten derzeit angewandten *in vitro* Screeningsysteme zum Nachweis estrogenen Wirkungen sind verglichen mit den physiologischen Serumkonzentrationen von  $17\beta$ -Estradiol (E2) bei der Frau sehr empfindlich. So sind mit dem E-Screen-Assay bereits E2-Konzentrationen von  $10^{-12}$  mol/L (0,27 ng/L) nachweisbar.

Durch gleichzeitige Testung zusammen mit  $17\beta$ -Estradiol ist mit dem E-Screen-Assay auch der Nachweis einer antiestrogenen Wirkung einer Testsubstanz möglich. Daher eignet sich der E-Screen-Assay auch für die Quantifizierung der Tamoxifenwirkung und ihrer Beeinflussung durch elektromagnetische Felder.

**Tabelle 1: Vergleich von *in vitro* Assays zum Nachweis rezeptorvermittelter (anti)estrogener Wirkungen**

System	Endpunkt	EC <sub>50</sub> für E2 (nmol/L)	EC <sub>100</sub> für E2 (nmol/L)	Relativer Effekt vs. Kontrolle	Bemerkungen/ Lite- ratur
Bindung an rekombinanten ER	≥H-E2- Verdrängung	ca. 1	100		Keine Unterscheidung Agonist/ Antagonist
E-Screen (ER-positive Brustkrebszellen)	Zellproliferation	0,005-0,01	0,1	3-8	Einfach
Transkriptionale Aktivierung des ER in Säugerzelllinien <sup>1</sup>	Aktivität eines Reportergens (lacZ, luc)	0,02 0,05 0,005 0,006	1 0,1 0,05 0,03	40-50 40-50* 3,5 100	Zacharewski (1995) <sup>1</sup> Klotz et al. (1996) <sup>1</sup> Demirpence (1993) <sup>2</sup> Legler et al. (1999) <sup>2</sup>
Transkriptionale Aktivierung in Hefe-Zellen	Aktivität eines Reportergens	0,1 0,07	10 0,4	100	Klotz et al. 1996 Routledge & Sumpster (1996) Einfach u. schnell
Forellenhepatozyten	Induktion der Vitellogeninsynthese	100	1000	4-7	Pelissero et al. (1993); hohe metabolische Kapazität

<sup>1</sup> transiente Transfektion; <sup>2</sup> stabile Transfektion

\* in 35mm-Schalen; in 96-well-Platten nur 3- bis 4fache Erhöhung  
(Darstellung nach Körner, 1999)

## 1.7 Projektzielrichtung und Strategie

In diesem Forschungsprojekt sollten die von Liburdy et al. (1992) und Harland und Liburdy (1997) veröffentlichten Ergebnisse über eine Beeinflussung der onkostatistischen Wirkung von Melatonin und Tamoxifen auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Felder überprüft und ggf. bestätigt oder widerlegt werden.

Die geförderten Untersuchungen sollten sowohl mit der von Liburdy verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7 als auch mit Primärkulturen aus Brustkrebsgewebe unter sehr präzise kontrollierten Bedingungen durchgeführt werden. Die Exposition sollte in einem sehr homogenen Magnetfeld bei den 5 verschiedenen Feldstärken von 0 µT, 0,2 µT, 1,2 µT, 10

$\mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$  unter einem Höchstmaß an Kontrolle über die Parameter der magnetischen Flussdichte und der Temperatur erfolgen.

Zu diesem Zweck mussten die verwendeten Brustkrebszelllinien und die Zellen der neu angelegten Primärkulturen ausführlich auf die molekularbiologischen Eigenschaften mit Bedeutung für deren Wachstumsverhaltens hin untersucht werden. Dazu gehörte insbesondere auch der Nachweis der Expression verschiedener für die Hemmung durch Melatonin und Tamoxifen verantwortlicher Rezeptoren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Zellkulturen**

#### **2.1.1. Etablierte Zelllinien**

Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden im Labor für experimentelle Umweltmedizin der Univ.-Frauenklinik Ulm statt. Alle Zellen wurden außerhalb der Expositions- und Kontrollversuche zur Magnetfeldexposition in handelsüblichen Gewebekulturinkubatoren gehalten (Firma Juoan, München), die mittels Wechselstrom beheizt ( $37^{\circ}\text{C}$ , 100% rel. Luftfeuchte) und mit Hilfe einer Magnetventilsteuerung mit 5%  $\text{CO}_2$  versorgt werden. Soweit nicht ausdrücklich anders angegeben, kam als Kulturmedium Dulbecco's modifiziertes MEM (Biochrom, Berlin) zum Einsatz, das mit 5 % Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2,5  $\mu\text{g/ml}$  Amphotericin B und einer 1:100 Verdünnung der nicht-essentiellen Aminosäuren der Fa. Biochrom supplementiert wurde.

Brustkrebszellen der Zelllinie MCF-7 aus vier verschiedenen Laboratorien wurden bei den Untersuchungen eingesetzt. Die MCF-7 Zellen wurden zum Einen von der ATCC, Manassas, USA bezogen, eine Zelllinie stammte aus dem Pool des endokrinologisch-onkologischen Labor der Frauenklinik Ulm, eine Zelllinie wurde von Prof. Robert Zeillinger aus Wien zur Verfügung gestellt und der Zellklon MCF-7(p181), mit dem ein Großteil der Untersuchungen durchgeführt wurde, stammte aus dem Labor von Dr. Körner, Augsburg, und war seit langer Zeit in unserem Labor zum Nachweis estrogenartiger Wirkungen bei umweltrelevanten Chemikalien mittels des sog. „E-Screen-Assays“ im Einsatz.

Die Brustkrebszelllinien EFM-19 und MDA-MB-361 wurde von der ATCC bezogen, die Ovarialkarzinomzelllinie OvCa wurde von PD. Dr. V. Möbus an der Universitätsfrauenklinik Ulm etabliert. Die mit dem Gen für den membranständigen Melatoninrezeptor Mel1a transfizierten MCF-7 Zellen wurden von Prof. Steven Hill von der Tulane-University in New

Orleans zur Verfügung gestellt. Diese Zellen mussten regelmäßig für 14 Tagen mit dem Antibiotikum Zeocin (Invitrogen, Karlsruhe) selektioniert werden.

### **2.1.2. Primärkulturen**

Zur Anlage von Primärkulturen von Brusttumoren standen sowohl operativ entfernte Primärtumore als auch Pleurapunktate zur Verfügung, die unterschiedlich aufgearbeitet werden mussten, bevor sie in Kultur genommen werden konnten.

### **2.1.3. Solide Primärkulturen**

Primärtumore, die im Rahmen der therapeutischen Behandlung von Brustkrebspatientinnen operativ entfernt wurden, wurden im Pathologischen Labor der Universitätsfrauenklinik Ulm routinemäßig für diagnostische Zwecke aufbereitet. Durch die diensthabende Pathologin wurde ein charakteristisches Stück des Resttumors, das für die pathologischen Untersuchungen nicht mehr benötigt wurde, für die Anlage der Primärkulturen zur Verfügung gestellt.

### **2.1.4. Zerlegung des Primärtumors in Einzelzellen**

Die soliden Tumore bestehen nicht nur aus Brustkrebszellen, sondern auch aus Bindegewebe, das neben der Extrazellulärmatrix auch Fibroblasten und Lymphozyten als zelluläre Bestandteile enthält. Für das Anlegen von Primärkulturen muss der Tumor in Einzelzellen zerlegt werden. Dies kann enzymatisch oder mechanisch geschehen.

Bei der enzymatischen Zerlegung wird der Tumor mit einem Skalpell in wenige Millimeter große Stücke geschnitten und diese Stücke bei 37 °C über Nacht in einer Lösung von Collagenase (10 mg/ml) inkubiert. Durch diesen Verdau der Extrazellulärmatrix werden die Brustkrebszellen als Einzelzellen aus den Tumorstückchen freigesetzt. Die Zellen werden bei 400 g abzentrifugiert, die Collagenase-Lösung abgesaugt, die Zellen in 10 ml Medium gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml Medium aufgenommen und die Zellen in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt.

Bei der mechanischen Zerlegung wird der Tumor ebenfalls mit einem Skalpell in wenige Millimeter große Stücke geschnitten. Diese Tumorstücke werden anschließend mit dem Kolben einer 5 ml-Einmalspritze durch ein Metallsieb mit 200 µm Maschenweite gerieben. Der Zellbrei, der aus dem Sieb tropft, wird in 5 ml Medium aufgefangen. Die Zellen werden

bei 400 g abzentrifugiert und in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt.

### **2.1.5. Aufbereitung von Pleurapunktaten**

500 ml Pleurapunktat, das Intensivpatienten zur Entlastung entnommen wurde, werden in zehn 50 ml Zentrifugenröhrchen bei 400 g abzentrifugiert. Alle Zellpellets werden in 10 ml Medium aufgenommen und in eine 75 cm<sup>2</sup>-Kulturflasche überführt.

Das Zellgemisch wird nach der Aufbereitung in CMRL-Medium aufgenommen, das 0,1 % Kälberserum enthält. Die unerwünschten Begleitzellen (Fibroblasten oder Mesothelzellen) adhären schneller am Boden der Kulturflasche als die Brustkrebszellen. Der Überstand der Kultur, der mehr Tumorzellen enthält, wird nach 4-6 Stunden abgenommen, die Zellen zentrifugiert und in 5 % FCS weiterkultiviert.

Die Kulturen werden bei Erreichen der Konfluenz nicht sofort geteilt, sondern mehrere Wochen in Konfluenz gehalten. Durch diese Maßnahme fehlt den Fibroblasten und Mesothelzellen der Teilungsanreiz, da diese nicht-transformierten Zellen noch der natürlichen Kontaktinhibition unterliegen. Im Verlauf mehrerer Wochen beginnen sich die Begleitzellen zunehmend von Boden der Kulturflasche abzulösen und es werden in einigen Kulturen kleine Kolonien von Tumorzellen sichtbar. Bei ausreichender Größe werden diese Kolonien selektiv mit einem Zellschaber beim Trypsinieren abgelöst und von den Fibroblasten getrennt in einer neuen Flasche weiterkultiviert.

Bei der Anlage der Primärkulturen mit dieser Methode blieb es trotz der oben beschriebenen Optimierung schwierig, die unerwünschten Begleitzellen (Fibroblasten und Mesothelzellen) aus den Primärkulturen zu eliminieren. Es wurden eine Reihe verschiedener Anreicherungs- und Selektionsverfahren miteinander verglichen.

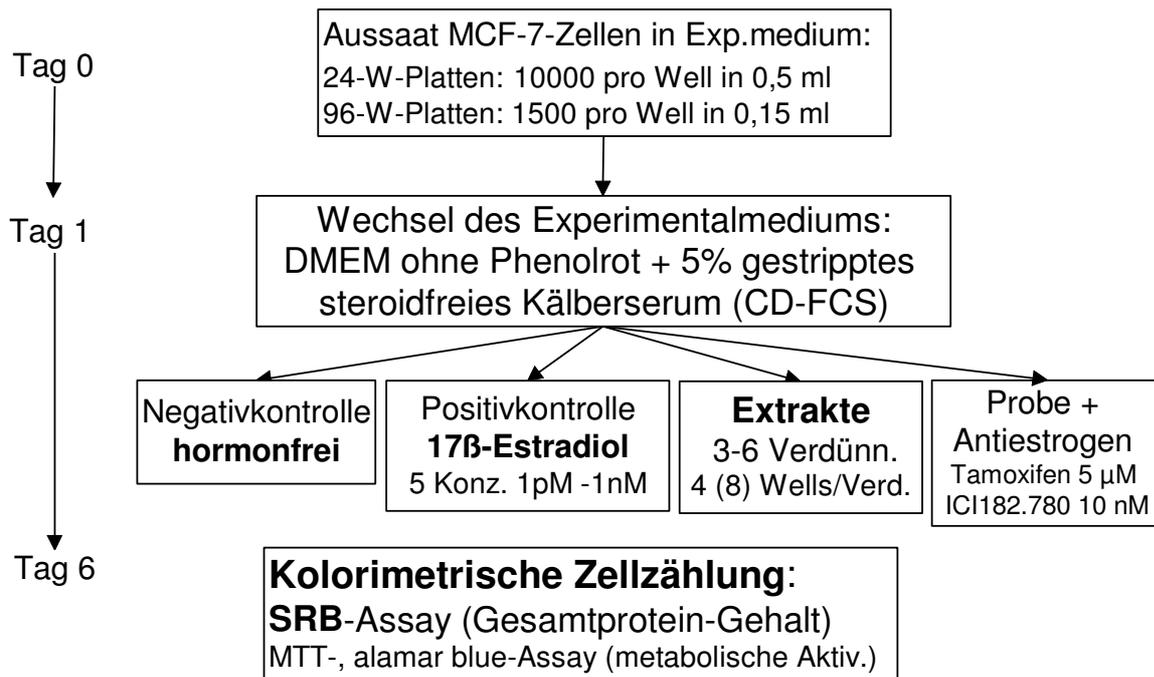
Da sich jede einzelne dieser Methoden als logische Konsequenz aus den Ergebnissen der vorangegangenen entwickelt hat, werden diese Verfahren unter 3.5 ausführlich dargestellt.

## **2.2. Proliferationstests („E-Screen-Assay“)**

Der Proliferationstest wurde in einer modifizierten Form nach der Vorschrift von Körner et al. (1999) durchgeführt. Da das in der Zellkultur eingesetzte Kälberserum variable Mengen Estradiol enthält und in den Proliferationstests die Proliferationssteigerung durch Estradiol unter kontrollierten Bedingungen gemessen werden sollte, mussten zunächst alle natürli-

chen Estrogene aus dem Kälberserum entfernt werden. Dies wurde durch Adsorption an Aktivkohle und Dextran erreicht. Die Aktivkohlebehandlung des Kälberserum wurde nach der Vorschrift von Stanley et al. (1977) durchgeführt.

Das prinzipielle Protokoll für den E-Screen-Assay ist in Abb. 1 schematisch dargestellt. Modifikationen, die sich gegenüber diesem von Körner (1999) beschriebenen Verfahren ergeben haben, sind im Text weiter unten dargestellt.



**Abb. 1: Schema für die Durchführung des modifizierten E-Screen-Assays mit MCF-7-Zellen (Darstellung nach Körner 1999)**

Experimentalmedium = phenolrotfreies DME-Medium mit 5 % CD-FCS. CD-FCS ist fetales Kälberserum, welches nach Stanley et al. (1977) mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich 17β-Estradiol zu entfernen.

Diese einfache Erweiterung des ursprünglichen E-Screen-Assays liefert einen zusätzlichen relevanten Beweis, dass die beobachtete Zellproliferation durch Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor ausgelöst wird. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen und angewandten Testverfahren wird dies in der Regel nicht durchgeführt. In den Versuchen in diesem Projekt diente die Kobehandlung mit einem Antiestrogen zur Kontrolle des Erfolges der Strippingmaßnahmen bei der Herstellung von estrogendepletiertem fetalem Kälberserum.

Gegenüber der von Soto et al. (1992) beschriebenen Originalmethode wurden einige Vereinfachungen eingeführt, die insgesamt zu einer Standardisierung des Testsystems beitragen:

An Stelle von Humanserum wird kommerziell erhältlich fetales Kälberserum (FCS) verwendet, was durch die Möglichkeit der Reservierung einer größeren Menge von einer bestimmten Charge eine Standardisierung des Testsystems bedeutet.

Als Alternative zur direkten Zellzählung werden Endpunkte gewählt, die einfach und schnell kolorimetrisch zu bestimmen sind, und für die über einen weiten Bereich direkte Proportionalität zwischen Extinktion und Zellzahl besteht (s. Abb. 2). In vielen Untersuchungen wird die Sulforhodamin B-Färbung angewandt, eine empfindliche Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes (Skehan et al. 1990).

Der Assay wurde statt in 24-Well-Platten in 96-Well-Platten durchgeführt, ohne dass sich Empfindlichkeit und Genauigkeit verschlechtern. Diese Miniaturisierung bedeutet eine erhebliche Ersparnis an Zeit und Materialien.

### 2.2.1. Quantitative Auswertung des E-Screen-Assays

Basisendpunkt des Tests ist die Zellzahl relativ zur hormonfreien Kontrolle.

Als **Proliferationseffekt (PE)** wird das Verhältnis der höchsten Zellzahl, die mit E2 bzw. mit der Testsubstanz erreichbar ist, zu derjenigen der Negativkontrolle bezeichnet:

$$\text{PE} = \text{Zellzahl max. (Substanz)} / \text{Zellzahl (Negativkontrolle)}$$

Die estrogenen Aktivität einer Testsubstanz wird quantitativ ermittelt durch die Bestimmung:

a) der **relativen estrogenen Wirkungsstärke**: des **relativen Proliferationseffekts (RPE)**

$$\text{RPE} = [\text{PE-1 (Testsubstanz)} / \text{PE-1 (E2)}] \cdot 100\%$$

Der RPE vergleicht die maximale durch E2 induzierbare Proliferation mit der maximalen durch die Testsubstanz induzierbare. So werden vollständiger Agonist (RPE = 80 - 100%) von partiellen (RPE = 25 - 80%) und schwachen Agonisten (RPE = 10 - 25%) unterschieden. Ein RPE < 10% gilt als nicht mehr nachweisbar (Sonnenschein & Soto 1998).

b) der **relativen estrogenen Potenz**: des **Estradiol-Äquivalenzfaktors (EEF)**

$$\text{EEF} = \text{EC}_{50} (\text{E2}) / \text{EC}_{50} (\text{Substanz})$$

Der Estradiol-Äquivalenzfaktor (EEF) gibt die estrogene Potenz einer Testsubstanz relativ zu 17 $\beta$ -Estradiol an. Der EEF ist der Quotient aus den halbmaximal wirksamen Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) von 17 $\beta$ -Estradiol und der Testsubstanz.

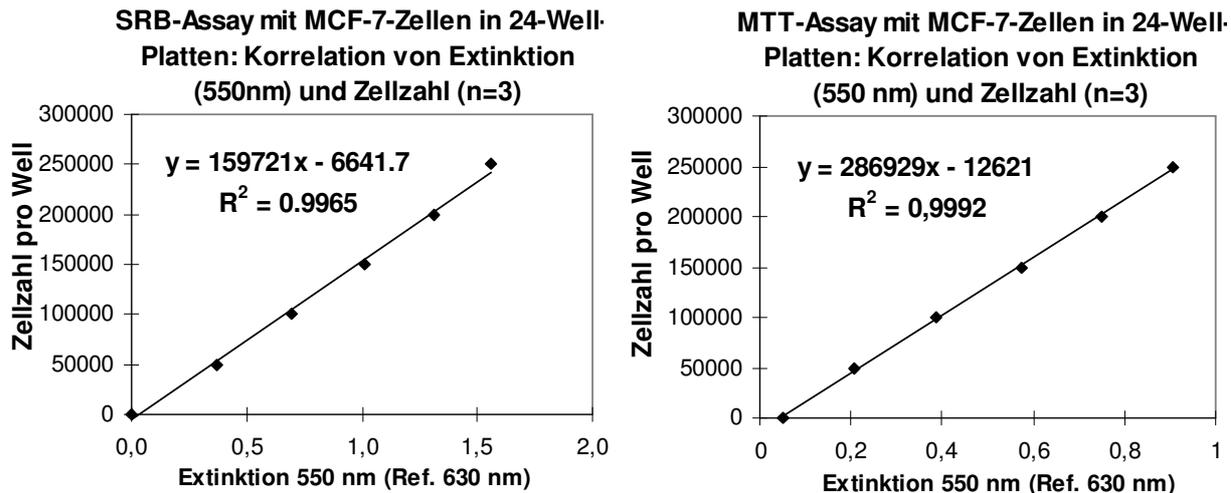
Das Experimentalmedium (EM), das für die Proliferationsmessungen verwendet wurde, hatte die gleiche Zusammensetzung wie das Kulturmedium (KM), außer dass das Kälberserum (FCS) durch das mit Aktivkohle/Dextran behandelte („gestrippte“) Kälberserum (CD-FCS) ersetzt wurde.

In Abwandlung der Methode von Körner (1999) (vergl. Abb.1) wurden 750 Zellen in 100  $\mu$ l Experimentalmedium in die Kulturfächer einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und 24 Stunden Zeit zur Adhäsion gelassen. Anschließend wurden in jedes Kulturfach entweder 50  $\mu$ l Experimentalmedium (Kontrolle) oder 50  $\mu$ l einer 17- $\beta$ -Estradiol-Lösung gegeben (Endkonzentration von  $10^{-12}$  –  $10^{-10}$  M). Für jede Konzentration wurden sechs Replikate angesetzt. Um den Effekt von Melatonin auf das Wachstum der Brustkrebszellen zu untersuchen, wurde in parallelen Serien der Estradiolkonzentrationen 50  $\mu$ l einer Melatoninlösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration von Melatonin entweder  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M oder  $10^{-8}$  M betrug.

Im Kontrollexperiment wurden anstelle der Melatoninlösung 50  $\mu$ l Experimentalmedium hinzugefügt.

Die Zellen wurden 4 Tage bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Zellzahl durch eine kolorimetrische Methode mit Alamar blue quantifiziert. Alamar blue ist ein wasserlöslicher blauer Farbstoff, die durch die mitochondrialen Reduktasen von lebenden Zellen zu einem roten Farbstoff reduziert wird, der in einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 570 nm versus 630 nm gemessen werden kann.

Wie von Körner (1999) gezeigt, besteht eine lineare Beziehung zwischen der mitochondrialen Aktivität, die mittels kolorimetrischem Test (hier MTT-Assay, siehe Abb.2) gemessen wird und der Zellzahl im E-screen-Assay. Dieselbe Beziehung besteht bei der Verwendung des Alamar-Blue-Farbstoffs, der von uns angewandt wurde, weil der von den lebenden Zellen erzeugte Farbstoff in wässrigen Medien löslich ist, und ohne weitere Aufbereitung gemessen werden kann.



**Abb. 2: Korrelation der Zahl an MCF-7-Zellen mit der Extinktion bei 550 nm**

(Referenz: 630 nm) von SRB- und MTT-Assay. Der Farbstoff wurde aus den in 24-Well-Platten angefärbten Zellen mit je 500 $\mu$ l 10 mM Trispuffer (SRB-Assay) bzw. 500  $\mu$ l DMSO (MTT-Assay) pro Well gelöst und je dreifach ( $\hat{a}$  100  $\mu$ l) in 96-Well-Platten am Mikroplatten-Photometer gemessen. (Darstellung nach Körner 1999)

Die Proliferationstests wurden mit jeder Zelllinie mindestens dreimal wiederholt mit Sechsfachbestimmung bei jeder einzelnen Estradiolkonzentration. Von den sechs Replikaten wurden jeweils der Mittelwert und die Standardabweichung berechnet.

Der Proliferationseffekt (PE) für jede Estradiolkonzentration wurde bestimmt, indem die durchschnittliche optische Dichte (OD) bei einer gegebenen Estradiolkonzentration durch die OD der negativen Kontrolle, die kein Estradiol enthielt, geteilt wurde. Dies entspricht im Endeffekt der zellzahlbasierten Definition von Körner (s.o).

Dosis-Wirkungskurven für die Wirkung des 17- $\beta$ -Estradiols auf das Wachstum der Brustkrebszellen wurden bei jeder eingesetzten Melatoninkonzentration erstellt, indem die mittlere relative Proliferation ( $RPE = PE - 1$  bei der Testkonzentration /  $PE - 1$  bei der maximalen Konzentration) gegen die Konzentration des Estradiols im halb-logarithmischen Maßstab aufgetragen wurde. Die  $EC_{50}$ -Werte für die halbmaximale Wachstumsstimulation wurden aus diesen Dosis-Wirkungskurven mittels eines VBA-Programms für EXCEL5 berechnet, das von Dr. Josef Greve vom Fraunhofer-Institut in Schmallenberg geschrieben wurde.

### 2.3. RT-PCR

Die Expression der Estrogen- und der Melatoninrezeptoren wurde durch RT-PCR bestimmt.

RNA von unbehandelten Zellen oder von Zellen, die im Magnetfeld exponiert waren, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

200 ng RNA wurden mit der Superscript reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) bei 42 °C für 50 min in cDNA umgeschrieben. 5 µl der cDNA-Probe wurde mit 1 U Taq-Polymerase mit 200 nM der für die Gene der Rezeptoren spezifischen Primer amplifiziert. Für ER $\alpha$  wurde die Amplifikation mit 35 Zyklen durchgeführt, für ER $\beta$ , RZR $\alpha$  und  $\beta$ 2-Mikroglobulin wurden 40 Zyklen verwendet und die mt1 cDNA wurde mit 44 Zyklen amplifiziert.

Die PCR-Produkte wurde in einem 2%igen Agarosegel (Typ IV) in 0,5x TBE-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt und in dem Gel mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht und quantifiziert.

#### **2.4. cDNA-Mikroarrays**

Mit dem Atlas Cancer Array 1.2 kann gleichzeitig die Expression von 1176 krebsrelevanten Genen in einer RNA-Probe bestimmt werden. Zur Untersuchung der veränderten Genexpression nach Exposition von Brustkrebszellen mit Magnetfeldern wurden zwei 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen mit MCF-7 Zellen für 48 Stunden oder 96 Stunden mit 1,2 µT in den Magnetfeldinkubatoren exponiert. Die RNA von unbehandelten Zellen oder von Zellen, die mit Magnetfeld exponiert waren, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

50 µg der Eluats aus den Trennsäulen des RNeasy-Kits, das neben der mRNA und der ribosomalen RNA noch Verunreinigungen durch zelluläre DNA enthält, wurden mit 5 Einheiten DNaseI für 30 min. bei 37°C behandelt. Nach diesem DNase-Verdau wurde die RNA durch eine Chloroform-Phenol-Extraktion gereinigt. Zu diesem Zweck wurden die 100µl RNA-Lösung aus dem DNase-Verdau mit 250 µl Chloroform-Phenol-Gemisch (Rotiphenol, Fa. Roth, Karlsruhe) 1 min. gemischt und im Anschluss die wässrige Phase und die Chloroform-Phase durch Zentrifugation getrennt. Aus der wässrigen Phase wurde die RNA durch Ethanol gefällt, zentrifugiert und getrocknet. Die gereinigte RNA wurde in 50 ml Rnase-freiem Wasser aufgelöst und für die reverse Transkription verwendet.

10-25 µg RNA wurden mit der Superscript reversen Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) in Gegenwart von OligodT-Primern und 20 µCi <sup>33</sup>P-ATP bei 37 °C für 2 Stunden entsprechend der Vorschrift der Fa. Clontech (Heidelberg) in cDNA umgeschrieben.

Die cDNA wurde bei 50°C 16 Stunden mit der Membran des cDNA-Arrays hybridisiert. Anschließend wurde die Membran zweimal bei Raumtemperatur mit 2xSSC und zweimal bei 68°C mit 0,5xSSC gewaschen. Anschließend wurde ein Phospho-Imager (Molecular Dynamics) 4-7 Tage mit der Membran exponiert. Zur Auswertung wurden die Signale auf dem Phospho-Imager eingescannt und ausgewertet.

### **3. Erzielte Ergebnisse**

#### **3.1. Entwicklung der Expositions-Kammern**

##### **3.1.1. Konstruktive Festlegung der magnetischen Expositionsbedingungen**

Der von Liburdy et al. (1997) verwendete Versuchsaufbau hat folgende schwerwiegende Nachteile:

- a) Die verwendeten Helmholtzspulen haben die Abmessungen 35x35 cm<sup>2</sup>. Somit haben sie nur einen kleinen Bereich, eine Fläche in der Mitte der Anordnung von max. 5x5 cm<sup>2</sup>, in dem eine gute räumliche Homogenität des Magnetfeldes erreicht wird. In diesem Bereich entstehen Abweichungen der erzeugten Magnetfeldstärke von bis zu 30%, die zur Peripherie der Spulen hin sogar noch größer werden. Um einen guten homogenen Bereich z.B. von 45x45 cm<sup>2</sup> in einer Merrittspule zu erreichen, wären Spulengrößen von 2x2 m<sup>2</sup> erforderlich, wie dies auch dem Artikel von Kirschvink (1992) zu entnehmen ist. Dieser zeigt numerische Berechnungen zu Magnetfeldverteilungen von verschiedenen Anordnungen von Helmholtzspulen.
- b) Von Liburdy wurde in seiner Versuchsanordnung kein geeigneter Abstand zum Rand der Spulen eingehalten, sondern fast die gesamte Fläche in der Mitte innerhalb der Spulenanordnung mit Zellkulturen besetzt. Am Rand sind alle Anforderungen an ein homogenes Magnetfeld jedoch nicht mehr gegeben.
- c) Die Versuche von Liburdy wurden in einem gewöhnlichen Zellinkubator durchgeführt. Solche Zellinkubatoren erzeugen bei Betrieb starke und inhomogene Magnetfelder, die Liburdy durch eine  $\mu$ -Metall-Abschirmung abgeschwächt hat. Es gibt allerdings keine Aussage über die Güte der verwendeten Abschirmung mit  $\mu$ -Metall gegenüber diesen von dem Inkubator erzeugten Feldern. Der Autor macht nur eine Angabe darüber, dass statische Magnetfelder von außen (vermutlich das Erdmagnetfeld) um den Wert von 0,1 $\mu$ T im Inneren der Kammer reduziert wurden.

d) Sämtliche von Liburdy et al. angeführten Berechnungen sind als Näherungen nur dann geeignet, wenn die in seiner Apparatur erzeugten Magnetfelder eine sehr gute räumliche Homogenität besitzen. Diese Voraussetzung war aber bei der in der Publikation gezeigten Versuchsanordnung keineswegs erfüllt.

Erste eigene Versuche, mit Helmholtz-Spulen das benötigte Magnetfeld zu erzeugen, haben nicht zu der geforderten räumlichen Homogenität des Magnetfeldes geführt. Es war daher unumgänglich, ganz neuartige Inkubatoren für die Magnetfelderzeugung zu konstruieren, die ein äußerst homogenes Magnetfeld generieren.

Endprodukt einer präzisen Entwicklungsarbeit war ein Inkubator, der aus einer waagrecht angeordneten 75 cm langen, speziell für diesen Zweck hergestellten Kupferröhre besteht, deren Verhältnis Länge zu Radius 5/1 beträgt. Der Expositionsraum befindet sich bei diesen neu entworfenen Inkubatoren innerhalb dieser waagrecht angeordneten, langen Zylinderspule.

Durch die Verwendung dieser langen Zylinderspule anstelle der Helmholtz-Spulen war bei annähernd gleichem Homogenfeldraum eine Verringerung des Apparaturvolumens um mehr als einen Faktor 10 möglich. Daher können diese Expositions-kammern, zur Schwächung der Umgebungsfelder, mit  $\mu$ -Metall umgeben werden.

Die Spule zur Erzeugung des Magnetfeldes entsteht durch eine dicht anliegende Wicklung von Kupferdrähten auf dem Kupferzylinder. Diese lange Zylinderspule ist viel kompakter als Helmholtzspulen und zudem ist das Magnetfeld im Zentrum der Spule homogener.

Trotz der vergleichsweise besseren Feldgenerierung können am Rand der Zylinderspule leichte Inhomogenitäten des Magnetfeldes auftreten, die durch die Zylinderwandung und die Spule selbst entstehen. Daher befinden sich die Zellkulturplatten auf einem speziellen Halteschlitten in einem ausreichenden Abstand von der Zylinderwand, so dass konstruktiv eine sehr gute räumliche Magnetfeldhomogenität im Lagerungsbereich der Zellkulturplatten gewährleistet ist. Der zur Erzeugung des zeitlich veränderlichen Magnetfeldes benötigte Wechselstrom wird zum Zwecke der jederzeitigen Reproduzierbarkeit mittels Sinusgeneratoren auf genaue Sinusform gebracht. Bei Bedarf können weitere harmonische Oberschwingungen dazugegeben werden, um reale Stromnetze zu simulieren. Ebenfalls wurde die Möglichkeit vorgesehen, ein zeitlich konstantes Magnetfeld mittels einer Gleichstromquelle zu überlagern, um das im Inneren des Inkubators partiell abgeschirmte Erdmagnetfeld (s.u.) nachzustellen.

Die folgenden Abbildungen zeigen die Ergebnisse der Magnetfeldmessungen im Inneren einer langen Spule, wie sie für die späteren Expositionsversuche verwendet wurde. Der jeweilige Versuchsaufbau ist der in den folgenden Abbildungen rechts oben jeweils eingefügten Skizze zu entnehmen. Bei der einen gezeigten Feldmessung (Abb.3) wurde die Homogenität des Magnetfeldes in einer langen Zylinderspule bestimmt. Zu diesem Zweck wurde ein mit einer Spule umwickeltes PVC-Rohr verwendet. Die Stärke des Magnetfeldes wurde in der Rohrmitte und am inneren Rohrrand entlang der Längsausdehnung der Spule an verschiedenen Stellen gemessen. Durch diese Messung wurde die Abhängigkeit der Feldhomogenität von der Spulengeometrie ermittelt. Man erkennt deutlich den Abfall der Magnetfeldstärke in x-Richtung zu den Enden der Spule hin. Jedoch ist im Inneren der Spule ein Bereich mit einer Länge von ca. 30cm zu erkennen, in dem das Feld nach Außen hin nur um 5% nachlässt. Dieser konstruktiv nur schwer zu erreichende Wert war vom BfS vorgegeben worden. Nur in diesem zentralen Bereich homogener Feldverteilung werden bei den Expositionsversuchen die Zellkulturplatten untergebracht.

Da die Spule bei dem fertigen Inkubator für die Expositionsversuche beidseitig verschlossen werden muss, wurden Feldmessungen mit Endkappen aus Aluminium durchgeführt. Der Einfluss einer Aluminiumplatte, die zum Verschluss der Spule verwendet wurde, auf das Magnetfeld ist in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt. Sie wurde für die Messung einmal 20 mm weiter innerhalb der Wicklung (Abb.4) und einmal am Ende der Spulenwicklung (Abb.5) angebracht. Gemessen wurde die Magnetfeldstärke in x-Richtung im Inneren des Zylinders. Die gute Homogenität im Bereich der späteren Zellkulturen bleibt bei jeder gewählten Position der Alu-Platte erhalten.

Selbstverständlich wird bei der Aufstellung der Geräte auf eine Umgebung mit geringen elektromagnetischen Störfeldern geachtet.

## Feldmessung PVC-Rohr 180 mm

	y= 90mm (Rohrmitte)	y= 20mm (Rohrtrand)
x/mm	Usonde/mV	Usonde/mV
0	2,934	2,933
20	3,584	4,067
40	4,141	4,598
60	4,572	4,894
80	4,915	5,158
100	5,167	5,367
120	5,357	5,487
140	5,483	5,587
160	5,587	5,659
180	5,654	5,730
200	5,689	5,723
220	5,724	5,772
240	5,733	5,774
260	5,722	5,766
280	5,707	5,736
300	5,675	5,720
320	5,625	5,670
340	5,565	5,610
360	5,496	5,553
380	5,392	5,489
400	5,238	5,409
420	5,038	5,271
440	4,721	5,038
460	4,323	4,676
480	3,755	4,069

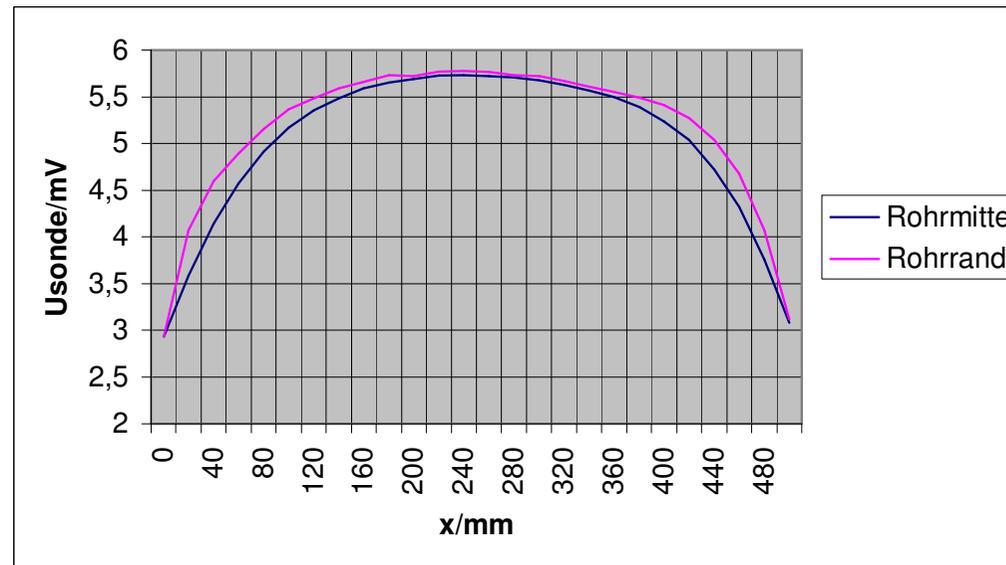
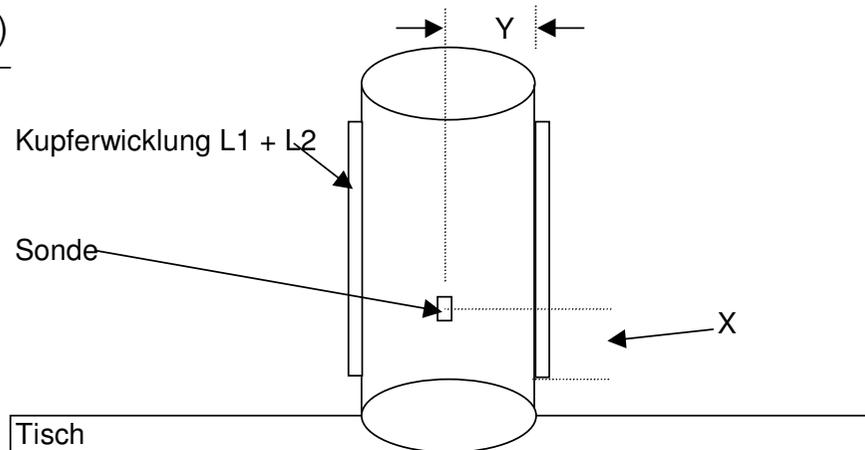


Abbildung 3

## Feldmessung PVC-Rohr 180 mm, mit / ohne Aludeckel einseitig

	y= 90mm (ohne Aluplatte)	y= 90mm (mit Aluplatte)
x/mm	Usonde/mV	Usonde/mV
0	56,02	
20	68,36	
40	78,61	76,670
60	87,02	86,610
80	93,49	93,870
100	98,48	99,060
120	101,94	102,810
140	104,51	105,790
160	106,33	107,740
180	107,71	109,120
200	108,47	110,050
220	108,95	110,620
240	109,12	110,830
260	108,96	110,720
280	108,61	110,420
300	108,03	109,810
320	107,03	108,820
340	105,89	107,710
360	104,31	106,140
380	102,12	104,260
400	99,67	101,440
420	95,44	97,560
440	90,01	91,690
460	82,11	84,050
480	72,11	74,210
500	59,35	61,450

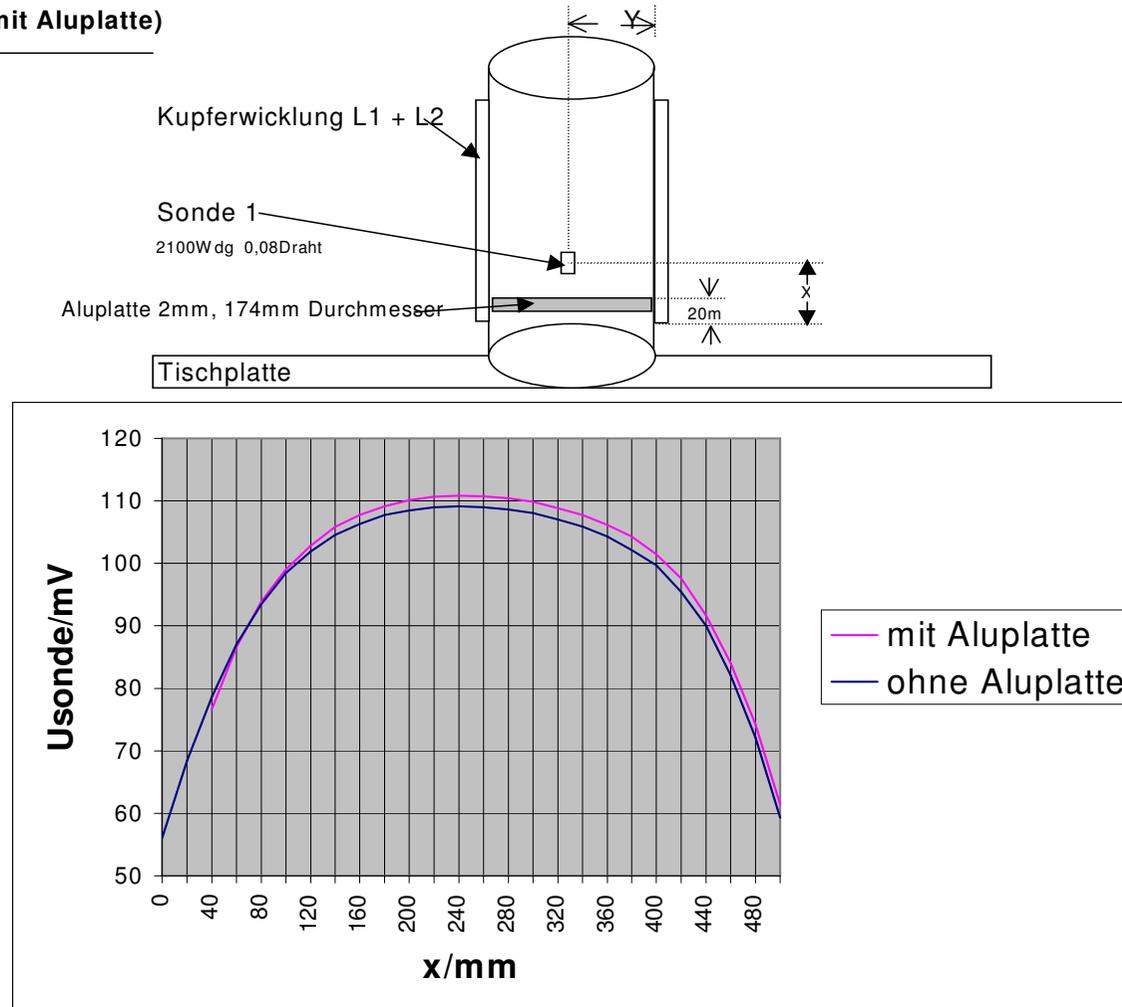


Abbildung 4

## Feldmessung PVC-Rohr 180 mm, mit / ohne Aludeckel einseitig

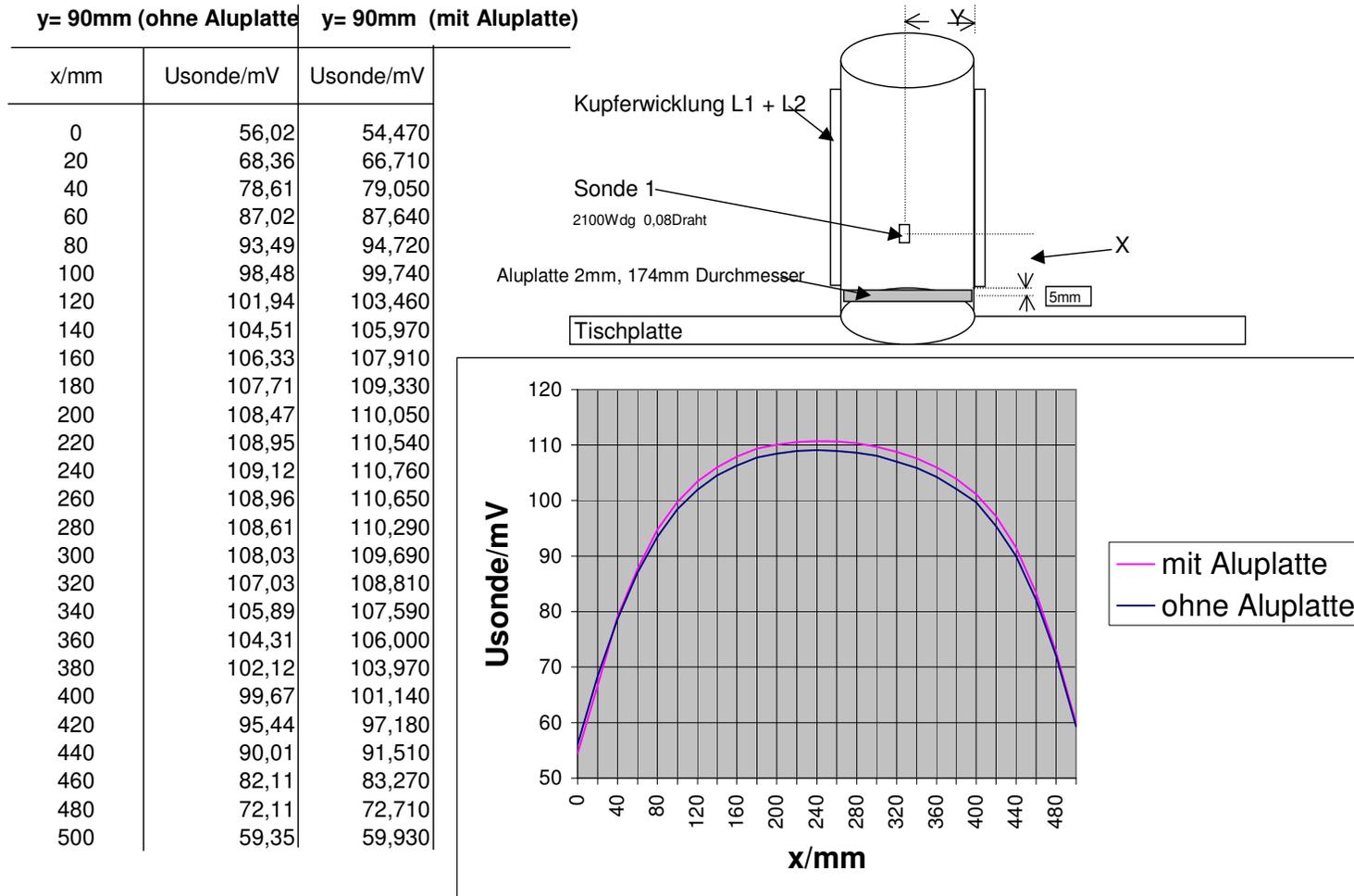


Abbildung 5

Als gut geeignetes Zylindermaterial hat sich Kupfer erwiesen. Obwohl in diesem Zylinder durch das angelegte Magnetfeld ein Strom induziert wird, wurde im Bereich der Zellkulturen keine gravierende Störung des magnetischen Wechselfeldes gemessen.

Der Innenraum des Kupferzylinders wird mittels einer zusätzlichen, außen aufgebracht, stromdurchflossenen, bifilar gewickelten Spule auf einer Temperatur von 37°C gehalten. Diese bifiläre Heizwicklung wird in entgegengesetzter Richtung mit Gleichstrom durchgeflossen, so dass durch den Heizstrom kein zusätzliches magnetisches Gleichfeld im Inkubator erzeugt wird.

Die ganze Apparatur ist mit Styrodur gegen Wärmeverluste isoliert. Die räumliche Temperaturabweichung beträgt während der Nachheizphasen nur  $\pm 0,2^\circ\text{C}$ .

Diese Art der Heizung hat, nach genauen Messungen, keinen störenden Einfluss auf die räumliche Homogenität des Magnetfelds im Bereich der Zellkulturen.

Von der Rückseite her wurden in die Kammer Sensoren für die Magnetfeldstärke und die Temperatur eingeführt, deren Signale auf einer Registriersoftware der Firma BMC Messsysteme (Maisach) festgehalten werden. Diese Software, bestehend aus der Mess- und Steuerungskarte PC20 und der Nextview- Software wurde so konfiguriert, dass Abweichungen vom Normwert in Dauer und Größe analysiert werden können.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die vorliegende Konstruktionsweise exakt reproduzierbare Expositionsbedingungen liefert.

### **3.1.2. Gewährleistung optimaler Zellkulturbedingungen - CO<sub>2</sub>-Konzentration**

Eine konstante CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubationsraum, die für einen stabilen pH-Wert des Zellkulturmediums verantwortlich ist, sollte, dem ursprünglichen Konzept folgend, der Einfachheit halber durch eine langsame Durchströmung mit einem 5 % CO<sub>2</sub>-Luftgemisch gewährleistet werden.

Die Feuchtigkeitssättigung der Luft wird durch eine wassergefüllte Bodenwanne im Zylinder sichergestellt.

Die ersten Messungen des Wachstums von Brustkrebszellen in diesem mit dem 5 % CO<sub>2</sub>-Gemisch durchströmten Inkubator zeigten jedoch, dass die Zellen unter den genannten Bedingungen nicht überlebten. Um eventuelle zytotoxische Komponenten im syntheti-

schen Luftgemisch auszuschließen, wurden Gasanalysen durch die Fa. Messer-Griesheim veranlasst, die aber keine Normabweichungen aufdeckten.

Zur Ermittlung der Ursache für dieses unerwartete Absterben der Zellen wurden des Weiteren wiederholt kontinuierliche Messungen des CO<sub>2</sub>-Gehalts und des pH-Wertes im Kulturmedium durchgeführt. Obwohl der Inkubator ständig mit ca. 15 – 20 l/ pro Stunde 5% CO<sub>2</sub> – Luftgemisch durchströmt wurde, wurden im Inneren des Inkubators nur 3,3 % CO<sub>2</sub> gemessen. Dieses Phänomen wurde allerdings nur beobachtet, wenn sich im Inkubator eine Schale mit ca. 100 ml Wasser befand, die zur Erzeugung der notwendigen Wasserdampfsättigung diente. Nach Entfernen der Wasserschale und Trocknen des Inkubators wurde durch das Durchströmen des Inkubators mit 20 l/ Stunde mit 5 % CO<sub>2</sub> nach 60 Minuten eine CO<sub>2</sub>-Konzentration von 5% im Inkubator erreicht. Die gemeinsame Ursachenuche mit dem physikochemischen Labor der Fa. Messer-Griesheim ergab, dass es sich bei der im Inkubator vorliegenden Anordnung um ein 2 Phasen/4 Komponenten Gleichgewicht handelt, dessen Verhalten sich nicht vorausberechnen lässt und stattdessen empirisch ermittelt werden muss. Der CO<sub>2</sub>-Gehalt der Gasphase wird hauptsächlich vom Wasserdampf, der einen Teil des CO<sub>2</sub> aus der Gasphase verdrängt und vom Eintritt des CO<sub>2</sub> in die flüssige Phase durch Lösung im Wasserreservoir (Schale) beeinflusst.

Die Absenkung der CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator von 5 % auf 3,3 % bewirkte, dass sich in dem Kulturmedium ein pH-Wert zwischen 8,4 bis 8,8 einstellte. Dieser basische pH-Wert des Kulturmediums war letztendlich die Ursache für das Absterben der Zellen im Inkubator.

Wird statt des 5 % CO<sub>2</sub>-Gemisches ein 10 % CO<sub>2</sub>-Gemisch durch den Inkubator geleitet, erreicht die CO<sub>2</sub>-Konzentration im Inkubator nach Einstellung des Gleichgewichtszustandes einen Wert zwischen 8,3 % und 8,9 %. Bei dieser CO<sub>2</sub>-Konzentration wurde im Kulturmedium ein pH-Wert zwischen 7,4 und 7,6 erreicht. Dieser pH-Wert entspricht annähernd dem für das Kulturmedium geforderten Wert. Bei einer Durchflutung des Inkubators mit dem 10 % CO<sub>2</sub>-Gemisch überlebten die Brustkrebszellen in dem Magnetinkubator und proliferierten normal. Bei weiteren Zellkulturversuchen in dem Magnetinkubator wurde als nächstes ein 7,5 %iges CO<sub>2</sub>-Gemisch verwendet. Unter diesen Bedingungen gelang es, noch näher an den Sollwert von 5% CO<sub>2</sub> im Wasserdampf-gesättigten Inkubatorinnenraum heranzukommen.

Das ständige Durchströmen des Inkubators verbrauchte allerdings erhebliche Mengen des CO<sub>2</sub>-Gemischs. Um die durch diesen hohen CO<sub>2</sub> -Verbrauch bedingten hohen Be-

triebskosten zu vermeiden, wurde in die Inkubatoren nachträglich einen CO<sub>2</sub>-Sensor eingebaut und eine externe CO<sub>2</sub>-Regelung konstruiert, die in ausreichender Entfernung vom Inkubator aufgestellt werden konnte, um eine Störung der Feldhomogenität durch das verwendete Magnetventil zu vermeiden. Mit dieser CO<sub>2</sub>-Regelung kann ein CO<sub>2</sub>-Gehalt der Atmosphäre im Inkubator von 5 % genau eingehalten werden, unerwünschte pH-Schwankungen in der Initialphase der Gaseinleitung werden vermieden und letztlich wird der CO<sub>2</sub>-Verbrauch auf ein Minimum reduziert.

Leider ergaben sich nach dem Einbau der CO<sub>2</sub>-Regelung wiederholt Funktionsdefekte, die eine mehrfache zeitraubende Auswechslung der Sensoren unter Garantiebedingungen erforderlich machten.

### **3.2. Verwendetes Zellmaterial**

Entsprechend dem Arbeitsplan waren für die Expositionsversuche in den oben beschriebenen Magnetfeld-Inkubatoren sowohl etablierte Brustkrebszelllinien als auch aus frischem Tumormaterial gewonnene Primärkulturen vorgesehen. Bei den etablierten Zelllinien wurde großer Wert darauf gelegt, möglichst die identischen MCF-7 Zellen zu verwenden, die auch Liburdy et al. (1992) und Harland und Liburdy, (1997) für ihre Versuche benutzt haben. Dies war schon deshalb erstrebenswert, weil in der Literatur die Melatoninresponsivität der MCF-7 Zellen kontrovers diskutiert wird. So wurde in einer vergleichenden Studie von Ram et al. (2002) festgestellt, dass MCF-7 Zellen, die in verschiedenen Arbeitsgruppen über viele Jahre kultiviert wurden, sich in ihrem Ansprechen auf Melatonin deutlich unterschieden.

Um die Ergebnisse der Erstbeschreibung der Phänomene des Magnetfeldeinflusses auf die Wachstumshemmung von Brustkrebszellen durch Melatonin wiederholen zu können (Liburdy et al., 1992), haben wir uns bemüht, die Original-MCF-7-Zellen des Autors zu erhalten, mit denen er die Versuche zur Hemmung der antiproliferativen Melatoninwirkung durch elektromagnetische Felder durchgeführt hat. Die langwierigen intensiven Bemühungen führten aber nicht zum Erfolg.

Erfolgreicher waren unsere Bemühungen, von Dr. Steven Hill aus New Orleans MCF-7 Zellen zu bekommen, die mit dem mt-1 Gen transfiziert waren, das für den membranständigen Melatoninrezeptor Mel1a codiert. Wir haben diese Zellen, wie von Dr. Hill empfohlen, unter dem Selektionsdruck des Antibiotikums Zeocin kultiviert, um zu verhindern,

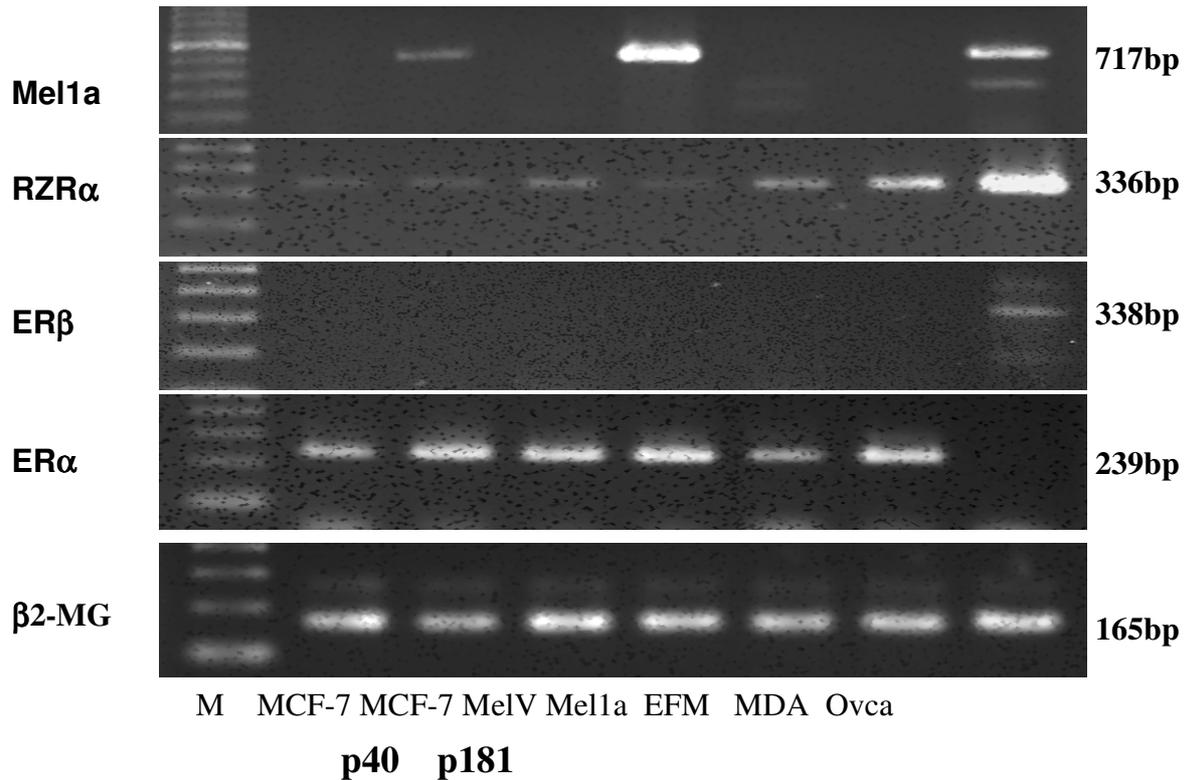
dass die nicht-transfizierten Mutterzellen die transfizierten Zellen überwachsen. Mit diesen Zellen konnten dann erfolgreich Versuche durchgeführt werden.

### **3.2.1. Charakterisierung der verwendeten Brustkrebszelllinien**

Nachdem die Bemühungen, die von Liburdy et al. verwendeten Originalzellen zu erhalten, erfolglos blieben, haben wir aus dem Zellpool der Universitätsfrauenklinik Ulm fünf MCF-7 Zellklone verschiedener Herkunft, die sich in ihrer Passagezahl deutlich unterscheiden, so wie zwei weitere Estrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinien EFM-19 und MDA-MB-361, auf ihre Eigenschaften bezüglich ihrer Expression der Estrogenrezeptoren und ihrer Proliferationshemmbarkeit durch Melatonin und Tamoxifen untersucht. Dabei kam der in unserem Labor etablierte "E-Screen Assay" zur Anwendung (Körner et al., 1999).

#### **Expression der Estrogenrezeptoren und der Melatoninrezeptoren**

Die aufgeführten Brustkrebszelllinien wurden molekularbiologisch auf die Expression der Rezeptoren untersucht, die bei der Melatoninwirkung eine Rolle spielen können, um die Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber Melatonin zu erklären.



**Abb.6: Expression der beiden Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie der Melatonin- Rezeptoren Mel 1a und RZR $\alpha$ .**

RT-PCR Produkte aus 6 Brustkrebszelllinien und einem Ovarialkarzinom.

Durch RT-PCR wurde die Expression der Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie des membranständigen Melatoninrezeptors Mel1a und des nukleären Rezeptors RZR $\alpha$  in den sieben Zelllinien gemessen.

Außer in EFM-19 wurde in allen Brustkrebszelllinien der ER $\alpha$  etwa gleich stark exprimiert. Keine der Brustkrebszelllinien exprimierte den ER $\beta$ . Als Positivkontrolle für die Amplifikation der ER $\beta$ -mRNA wurde eine Ovarialcarcinom-Zelllinie OvCa mitgeführt, die das erwartete PCR-Produkt bei 338 bp zeigte. Nur in der transfizierten Zelllinie MCF-7Mel1a konnte ein deutliches Signal für den Rezeptor Mel 1a nachgewiesen werden. In der Zelllinie MCF-7 p181 und in dem Ovarialkarzinom war das Mel1a Signal nur sehr schwach. In den anderen Brustkrebszelllinien war eine Expression der Mel 1a mRNA nicht nachweisbar. Der nukleäre Rezeptor RZR $\alpha$  wurde in allen Zelllinien unterschiedlich stark exprimiert. Bei

den Brustkrebszelllinien war die Expression am stärksten in den Zelllinien EFM-19 und MDA-MB-361.

### **3.2.2. Charakterisierung der verschiedenen MCF-7 Zellen und der EFM-19 Zellen bezüglich ihrer Hemmbarkeit mit Melatonin**

Unsere Schwierigkeiten, MCF-7 Zellen ausfindig zu machen, deren Proliferation mit Melatonin hemmbar ist, lässt den Schluss zu, dass das Phänomen der Hemmbarkeit von Brustkrebszellen durch Melatonin entweder verhältnismäßig selten auftritt, oder dass die Brustkrebszellen, die als permanente Zelllinien im Labor kultiviert werden, im Laufe der Zeit nach vielen Passagen ihre Fähigkeit verloren haben, auf Melatonin zu reagieren.

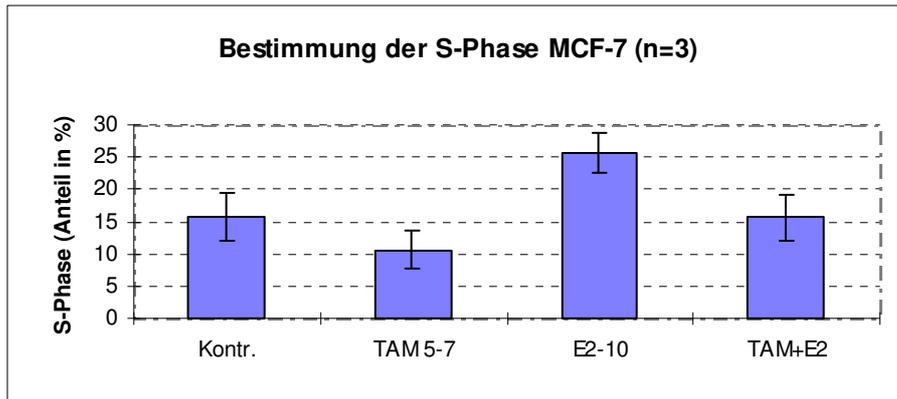
Die verschiedenen MCF-7 und EFM-19 Zellen, die für die Untersuchung der proliferationsinhibierenden Wirkung von Melatonin und Tamoxifen herangezogen wurden, weisen unterschiedliche Charakteristika auf (dies gilt insbesondere für verschiedene MCF-7 Subklone). Sie mussten daher zunächst ausführlich biologisch charakterisiert werden.

#### **MCF-7**

Für die Untersuchungen standen vier verschiedene Subklone der MCF-7 Zelllinie zur Verfügung, welche aus unterschiedlichen Labors bezogen wurden, und stark voneinander abweichende Passagenzahlen aufwiesen. Diese wurden charakterisiert und miteinander verglichen.

Durch Proliferationsassays („E-Screen-Assay“) mit Estradiol  $10^{-10}$  M konnte gezeigt werden, dass alle vorhandenen Subklone der Zelllinie MCF-7 empfindlich auf Estradiol reagieren. Nach siebentägiger Inkubation mit Estradiol  $10^{-10}$  M wurde eine 3- bis 10-fache Erhöhung der Zellzahl gegenüber der hormonfreien Kontrolle gemessen.

Parallel zu den Proliferationsassays wurde der Einfluss von Estradiol  $10^{-10}$  M auf den Zellzyklus der MCF-7 Zellen untersucht. Für die Bestimmung der S-Phase wird das Chromatin der Zellen mit Propidiumjodid angefärbt, und anschließend am FACS-Gerät der DNA-Gehalt jeder einzelnen Zelle vermessen.

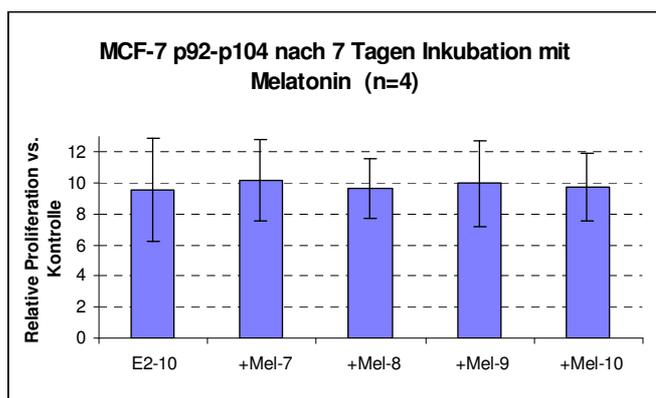


**Abb.7: Bestimmung der S-Phase in MCF-7 Zellen nach Estradiolstimulation**

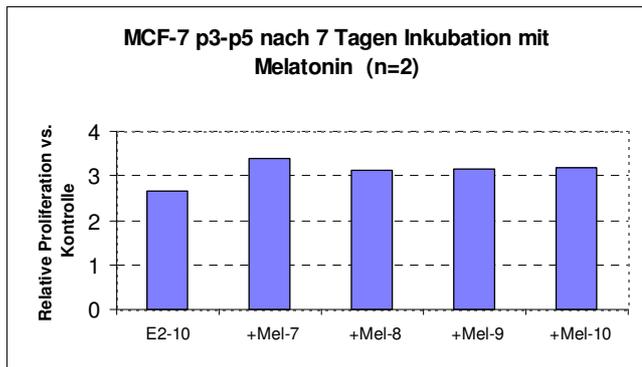
Den Erwartungen entsprechend wurde durch Estradiol der Anteil der Zellen, der sich in der S-Phase befinden, erhöht.

Durch Ko-inkubation mit  $5 \times 10^{-7}$  M Tamoxifen konnte der Anteil der Zellen, die sich in der S-Phase befinden, wieder auf den Wert der Kontrolle abgesenkt werden. Dies belegt den bekannten Umstand, dass die Erhöhung des S-Phase Anteils durch Estradiol tatsächlich Estrogenrezeptor-abhängig ist.

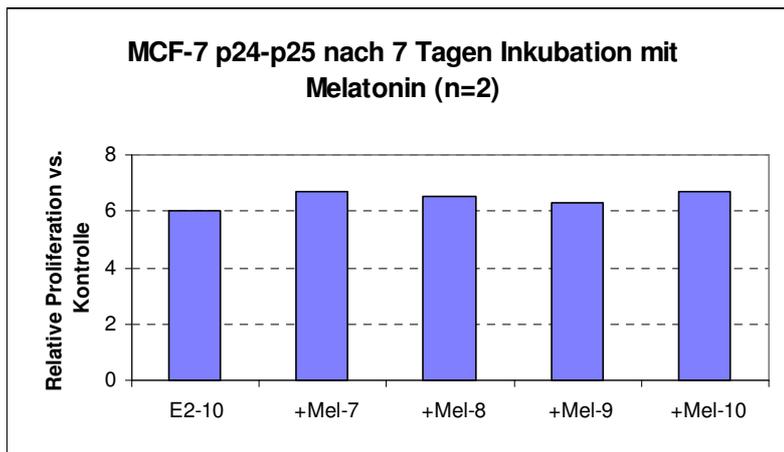
Zur Bestimmung der Proliferationshemmung durch Melatonin wurden die vier MCF-7 Zellstämme mit ansteigenden Konzentrationen von Melatonin ( $10^{-10}$  M,  $10^{-9}$  M,  $10^{-8}$  M,  $10^{-7}$  M) zusammen mit  $10^{-10}$  M E2 über einen Zeitraum von 7 Tagen ko-inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels dem MTT-, und dem SRB-Assay (Abb. 8 bis Abb. 10).



**Abb. 8: Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p92 bis p104 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin (+Mel)  $10^{-7}$  M- $10^{-10}$  M gegenüber der hormonfreien Kontrolle (=1). SRB-Assay.**



**Abb. 9: Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p3 bis p5 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin (+Mel)  $10^{-7}$  M- $10^{-10}$  M gegenüber der hormonfreien Kontrolle (=1). SRB-Assay.**



**Abb. 10: Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p24 bis p25 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin (+Mel)  $10^{-7}$  M- $10^{-10}$  M gegenüber der hormonfreien Kontrolle (=1). SRB-Assay.**

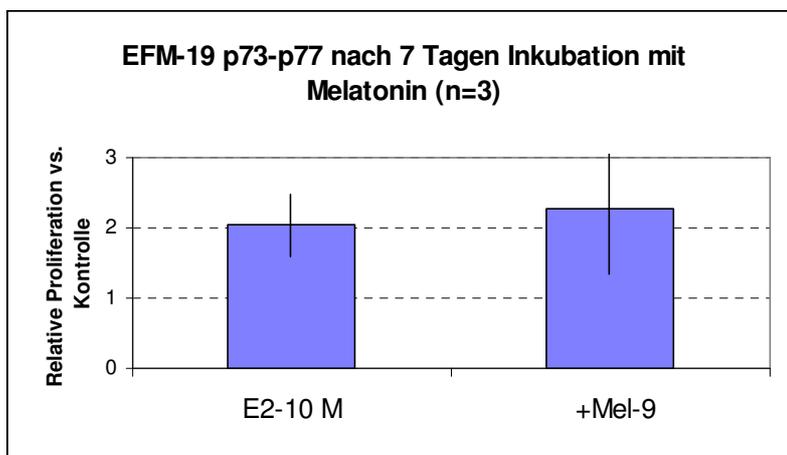
Ergebnis: Mit dieser Versuchsanordnung hat Melatonin bei keiner der drei unterschiedlichen MCF-7 Zellstämme zu einer signifikanten Inhibierung der Proliferation nach Koinkubation mit  $10^{-10}$  M E2 geführt.

Unter den vorhandenen MCF-7-Zellen konnte mit dem zur Verfügung stehenden Testverfahren kein Subklon ermittelt werden, der eindeutig durch Melatonin inhibiert wird. Nur in einzelnen Experimenten wurde eine geringfügige Hemmung durch Melatonin beobachtet.

## EFM-19

Diese Estrogenrezeptor positive Zelllinie wurde jeweils parallel mit den MCF-7 Zellen untersucht. Der relative Proliferationseffekt nach siebentägiger Inkubation mit  $10^{-10}$  M E2 ist bei den EFM-19 Zellen kleiner, als bei den MCF-7 Zellen. Er beträgt nur ca. 2 gegenüber der hormonfreien Kontrolle.

Die Ko-inkubation mit Melatonin  $10^{-9}$  M führt auch hier nicht zur Inhibierung der Proliferation (n=3).



**Abb. 11: Relativer Proliferationseffekt der EFM-19 Zellen der Passagen p73 bis p77 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin (+Mel)  $10^{-9}$  M gegenüber der hormonfreien Kontrolle (=1). MTT-Assay.**

Neben den verschiedenen MCF-7 Klonen wurden noch weitere Brustkrebs-Zelllinien auf ihre Hemmbarkeit durch Melatonin untersucht. Auch die Zelllinien MDA-MB-361 und EFM-19 reagierten nicht auf Melatonin.

Aus diesem Grunde musste das verwendete Nachweisverfahren modifiziert werden.

### 3.3. Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen

#### 3.3.1. Entwicklung eines sensitiveren Assays zum Nachweis der Melatonin-Wirkung

Bei den vielen Versuchen mit verschiedenen Zellklonen der Zelllinie MCF-7 wurde, wie oben dargestellt, nur vereinzelt eine geringfügige Hemmung des Wachstums durch Mela-

tonin beobachtet, die jedoch nur im Bereich der statistischen Streuung lag. Es wurden deshalb weitere Versuche unternommen, die Diskriminationsfähigkeit des Tests zu erhöhen.

Bei den in 3.2.1 beschriebenen Versuchen wurde die Hemmung der Proliferation durch Melatonin dem klassischen Protokoll zur Ermittlung einer Dosis-Wirkungsbeziehung folgend, bestimmt, indem versucht wurde, die Proliferation, die bei einer konstanten maximal wirksamen Konzentration von Estradiol ( $10^{-10}$  M) erreicht wird, mit verschiedenen Melatonin-Konzentrationen zu hemmen. Die dabei gemessenen Effekte waren jedoch so gering und z.T. widersprüchlich, dass sie nicht von der üblichen statistischen Streuung unterschieden werden konnten.

Um die statistische Streuung bei diesen Versuchen herauszumitteln, wurden zur Optimierung des Testverfahrens Dosis-Wirkungskurven bei 6 verschiedenen Konzentrationen von Estradiol zwischen  $5 \times 10^{-13}$  M und  $10^{-10}$  M in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener konstanter Melatonin-Konzentrationen aufgenommen. Mit diesem Vorgehen wurde es möglich, die modulierende Wirkung des Melatonins in Form einer Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve und mit ihr der halbmaximalen Effektkonzentration ( $EC_{50}$ ) des Estradiols nachzuweisen, wie aus dem Vergleich der Abb.12 und Abb. 13 zu ersehen ist.

Bei diesen Versuchen wurden lediglich 750 MCF-7 Zellen in jedes einzelne Kulturfach von 96-well Mikrotiterplatten ausgesät. Das sind weniger Zellen, als dies bei E-Screen Untersuchungen bisher üblich war. Bei höheren Zelldichten waren die Zellen nach 4 Tagen Kultur bereits zu dicht gewachsen und befanden sich deshalb nicht mehr in der exponentiellen Wachstumsphase, was zu einer Verzerrung der zu messenden Effekte führt.

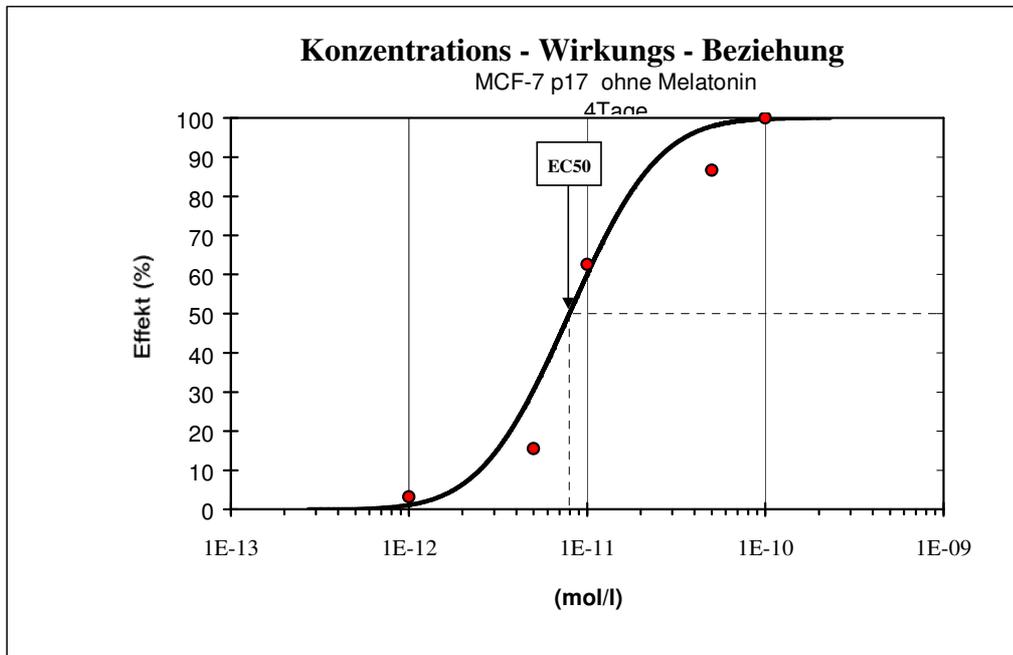
Diese 750 Zellen pro Fach wurden mit verschiedenen Estradiol-Konzentrationen kultiviert und die Zellzahl nach 4 Tagen mit einem kolorimetrischen Test quantifiziert. Parallel wurde die gleiche Testreihe in der Gegenwart von  $10^{-9}$ M und  $10^{-8}$ M Melatonin kultiviert. Mit steigender Estradiol-Konzentration (x-Achse) nimmt die nach 4 Tagen Kultur erreichte Zellzahl in den Fächern der Mikrotiter-Platte zu. Die maximale Proliferationsrate wurde bei  $10^{-10}$ M erreicht.

Die erreichte Zellzahl wird in einer Dosis-Wirkungskurve gegen die eingesetzte Estradiol-Konzentration halblogarithmisch graphisch aufgetragen.

Für die Erstellung der Dosis-Wirkungskurven wurde eine auf Excel-Makros basierende Software benutzt, die von Dr. Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie entwickelt wurde.

Mit diesem Programm lässt sich die  $EC_{50}$  der Estradiol-Wirkung berechnen.

Abb.12 zeigt eine Dosis-Wirkungskurve von Estradiol mit MCF-7 Zellen in Abwesenheit von Melatonin.



**Abb.12: Dosis-Wirkungskurve von Estradiol mit MCF-7 Zellen ohne Melatonin**

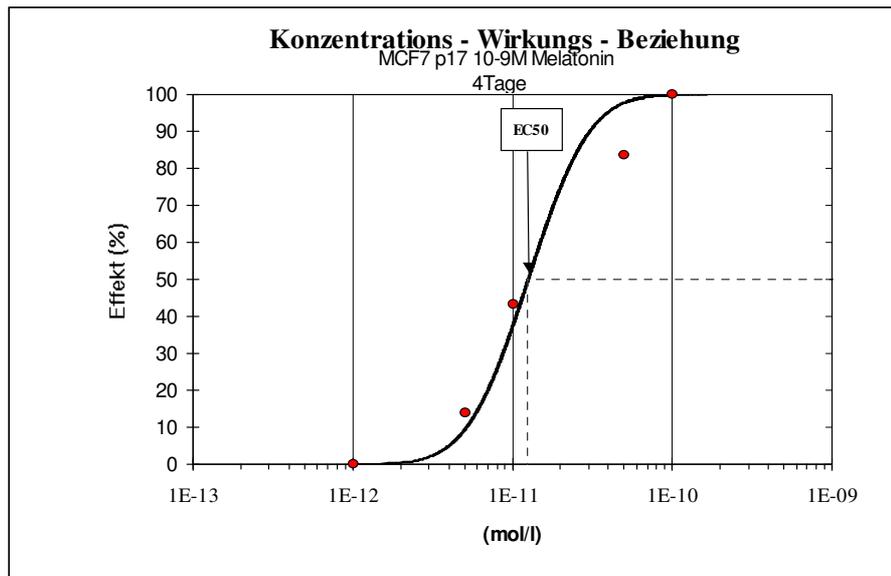
Exemplarisches Ergebnis eines Einzelversuchs  
Kolorimetrische Bestimmung der Zellzahl mit Alamar-Blue in Mikrotiterplatten.  
Pro Konzentration 6-fach Bestimmung.

Mit steigender Konzentration Estradiol (x-Achse) nimmt die nach 4 Tagen Kultur erreichte Zellzahl zu. Eine maximale Proliferation wurde bei  $10^{-10}$ M erreicht.

Die  $EC_{50}$  wurde mit dem Excel-Makro berechnet.

**$EC_{50} = 7,9 \times 10^{-12}$  M (ohne Melatonin)**

In Abbildung 13 ist die Dosis-Wirkungskurve in Anwesenheit von  $10^{-9}$  M Melatonin dargestellt.



**Abb.13: Dosis-Wirkungskurve von Estradiol mit MCF-7 Zellen bei  $10^{-9}$  M Melatonin**

Exemplarisches Ergebnis eines Einzelversuchs

Kolorimetrische Bestimmung der Zellzahl mit Alamar-Blue in Mikrotiterplatten.  
Pro Konzentration 6-fach Bestimmung.

**$EC_{50} = 1,25 \times 10^{-11}$  M ( $10^{-9}$  M Melatonin)**

Ein Vergleich der beiden  $EC_{50}$ -Werte zeigt, dass die  $EC_{50}$  in Gegenwart von  $10^{-9}$  M Melatonin von  $7,9 \times 10^{-12}$  auf  $1,25 \times 10^{-11}$  ansteigt. Das bedeutet, dass eine 50 %ige Proliferationssteigerung durch Estradiol in Gegenwart von  $10^{-9}$  M Melatonin erst bei einer 58 % höheren Estradiol-Konzentration erreicht wird. Diese erforderliche Konzentrationserhöhung zur Erreichung eines äquipotenten Effektes ist mit einer antiestrogenen Wirkung von Melatonin erklärbar.

### 3.3.2. Melatoninwirkung auf die Proliferation von fünf Brustkrebszelllinien

Für die inhibierende Wirkung von Melatonin auf die Proliferation von Brustkrebszellen müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein.

a) Die Zellen müssen ER-positiv sein (Cos et al. 1991).

Diese Voraussetzung ist mit den MCF-7, den MDA-MB-361 und den EFM-19 Zellen gegeben.

b) Melatonin kann nur dann seine Wirkung entfalten, wenn es an einen spezifischen Rezeptor bindet. Es besteht bislang noch keine Einigkeit darüber, ob der für Melatonin spezifische Rezeptor in der Zellmembran liegt, oder aber im Zellkern lokalisiert ist. Der in der Zellmembran befindliche Mel1a Rezeptor wurde in den benutzten MCF-7 Zellen mittels RT-PCR nur in den Mel1a transfizierten MCF-7 Zellen nachgewiesen. Manche Autoren nehmen jedoch an, dass der nukleäre RZR-Rezeptor für die inhibierende Wirkung von Melatonin verantwortlich ist (Carlberg et al. 1995).

Dosis-Wirkungskurven, wie in 3.3.1 beschrieben, wurden mit fünf verschiedenen Brustkrebszelllinien bei  $10^{-9}$  M,  $5 \times 10^{-9}$  M und bei  $10^{-8}$  M Melatonin aufgenommen. Aus diesen Dosis-Wirkungskurven wurde die  $EC_{50}$  von Estradiol bei den verschiedenen Melatonin-Konzentrationen in den jeweiligen Zelllinien ermittelt (Tabelle 2).

Bei allen Zelllinien außer den Zelllinien EFM-19 und MDA-MB-361 steigt die  $EC_{50}$  bei  $5 \times 10^{-9}$  M Melatonin gegenüber der Kultur ohne Melatonin am stärksten an. Bei den Zelllinien EFM-19 und MDA-MB-361 wird die höchste  $EC_{50}$  bereits bei  $10^{-9}$  M Melatonin erreicht.

Bei den meisten Zelllinien (MCF-7 p40, EFM19 und MDA-MB-361) wird in Gegenwart von Melatonin etwa eine doppelt so hohe Konzentration Estradiol benötigt, um die halbmaximale Wachstumssteigerung zu erreichen.

Bei den MCF-7 p40-Zellen nimmt mit  $10^{-8}$  M Melatonin die  $EC_{50}$  Verschiebung wieder ab.

Bei den MCF-7 Mel1a Zellen, die mit dem Melatoninrezeptor transfiziert sind, fällt dieser Rückgang der  $EC_{50}$  Verschiebung bei  $10^{-8}$  M Melatonin nicht so deutlich aus.

Diese Versuche bestätigen eindrucksvoll die bereits häufiger beschriebene Beobachtung, dass die Melatoninwirkung auf Zellen bei  $10^{-9}$  M -  $5 \times 10^{-9}$  M ein Optimum hat und bei höheren Konzentrationen wieder abnimmt (Rato et al., 1999).

**Tabelle 2: Einfluss von Melatonin auf die EC<sub>50</sub> von Estradiol in verschiedenen Brustkrebszelllinien**

Zelllinie	ohne Melatonin	10 <sup>-9</sup> M Melatonin	5x10 <sup>-9</sup> M Melatonin	10 <sup>-8</sup> M Melatonin
MCF-7 p40	1,9x10 <sup>-12</sup>	1,4x10 <sup>-12</sup>	3,6x10 <sup>-12</sup>	1,0x10 <sup>-12</sup>
MCF-7 p 181	3,0x10 <sup>-12</sup>	2,3x10 <sup>-12</sup>	3,9x10 <sup>-12</sup>	n.d.
MCF-7 Mel1a	2,2x10 <sup>-12</sup>	2,2x10 <sup>-12</sup>	3,1x10 <sup>-12</sup>	2,5x10 <sup>-12</sup>
EFM-19	4,1x10 <sup>-12</sup>	5,1x10 <sup>-12</sup>	4,0x10 <sup>-12</sup>	n.d.
MDA-MB-361	1,3x10 <sup>-13</sup>	6,0x10 <sup>-12</sup>	3,7x10 <sup>-12</sup>	n.d.

**Die EC<sub>50</sub>-Werte von je 2-5 Dosis-Wirkungskurven wurden mit dem Excel-Makro von Dr. Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmalenberg ermittelt und die Mittelwerte berechnet.**

MCF-7 p40 = MCF-7 aus dem Endokrinologisch- Onkologischen Labor der Frauenklinik Ulm

MCF-7 p181 = MCF-7 von Dr. W. Körner, Landesamt für Umweltschutz, Augsburg

MCF-7Mel1a = MCF-7 mit dem Melatoninrezeptor Mel 1a transfiziert, von Dr. Steven Hill, New Orleans

EFM-9 und MDA-MB-361= weitere Estrogenrezeptor-positive Brustkrebszellen

Das Phänomen der mit höheren Konzentrationen wieder nachlassenden Hemmwirkung von Melatonin auf die Proliferationssteigerung durch Estradiol könnte darauf beruhen, dass in den Zellen ein weiterer Rezeptor für Melatonin exprimiert wird, der die entgegengesetzte Wirkung zum Mel1a-Rezeptor auslöst und eine geringere Affinität zum Melatonin besitzt. Deshalb wird dieser Rezeptor mit seinem entgegengesetzten Effekt erst bei höheren Melatonin-Konzentrationen wirksam. Ein solcher zweiter Rezeptor ist der RZR $\alpha$ -Rezeptor im Zellkern, der tatsächlich eine geringere Affinität zu Melatonin besitzt (Baldwin und Barrett, 1998). Sowohl die MCF-7 p181 als auch die MCF-7 Mel1a-Zellen exprimieren den Mel1a/Mt1-Rezeptor. Die Mel1a-Zellen mehr als die p181-Zellen. In den Mel1a Zellen ist die EC50-Verschiebung deshalb deutlicher als in den p181 Zellen. Die Mel1a-Zellen exprimieren weniger RZR $\alpha$  als die p181 Zellen, deshalb ist der Rückgang der Verschiebung bei den Mel1a-Zellen schwächer als bei den p181-Zellen. Diese Reaktionen würden der o.g. Hypothese entsprechen.

Die antiproliferative Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen wird in der Literatur kontrovers diskutiert, weil sie von einigen Arbeitsgruppen nicht verifiziert werden konnte. Für

diese unterschiedlichen Reaktionen der Brustkrebszellen werden verschiedene Parameter verantwortlich gemacht. Die Melatoninwirkung wird unseren eigenen Erfahrungen nach von differenten experimentellen Parametern z.B. der Serumcharge, der Zelldichte und besonders vom verwendeten Zellklon beeinflusst.

Es konnte auch noch nicht eindeutig geklärt werden, über welchen Mechanismus Melatonin die Signaltransduktion von Estradiol beeinflusst und welcher Rezeptor letztendlich für diese Wirkung verantwortlich ist. Da die antiproliferative Wirkung von Melatonin auf Estrogenrezeptor-positive Brustkrebszelllinien beschränkt ist, wird von vielen Autoren vermutet, dass Melatonin über seine Rezeptoren die Effizienz der von den Estrogenrezeptoren ausgelösten Genexpression hemmt. Nicht bekannt ist bisher die Stelle im Signaltransduktionsweg, wo dieser Cross-talk zwischen beiden Signaltransduktionswegen stattfindet.

Aus der großen Zahl von MCF-7 Zellklonen aus verschiedenen Laboratorien, die uns zur Verfügung gestellt wurden, haben wir zwei Zellklone für die Versuche in den Magnetfeld-Inkubatoren ausgewählt, bei denen sich die Melatonineffekte nachweisen ließen.

Interessant für die Aufklärung der Wirkung von Magnetfeldern auf Brustkrebszellen war auch die Frage, ob die Melatonin-Responsivität der Brustkrebszellen eine Eigenschaft ist, die bereits im Primärtumor vorhanden ist, oder ob die Brustkrebszellen diese Empfindlichkeit erst im Laufe des langjährigen Wachstums in der Zellkultur erworben haben. Um diese Fragestellung zu überprüfen, wurden auch Untersuchungen an Primärkulturen durchgeführt (s. 3.5.).

### **3.4. Proliferationshemmender Effekt von Tamoxifen auf MCF-7 Zelllinien**

Den Effekt des Antiöstrogens Tamoxifen, das therapeutisch bei der Behandlung von Brustkrebs mit immenser Bedeutung eingesetzt wird, nachzuweisen, bereitete experimentell erwartungsgemäß keine besonderen Schwierigkeiten. Im Konzentrationsbereich zwischen  $10^{-7}$  M und  $5 \times 10^{-6}$  M konnten mit dem E-screen-Assay gut reproduzierbare Hemmkinetiken erstellt werden und mit dem Excel-Makro die  $IC_{50}$ , die **Inhibitor-Dosis**, die die Proliferation um 50% senkt, ermittelt werden.

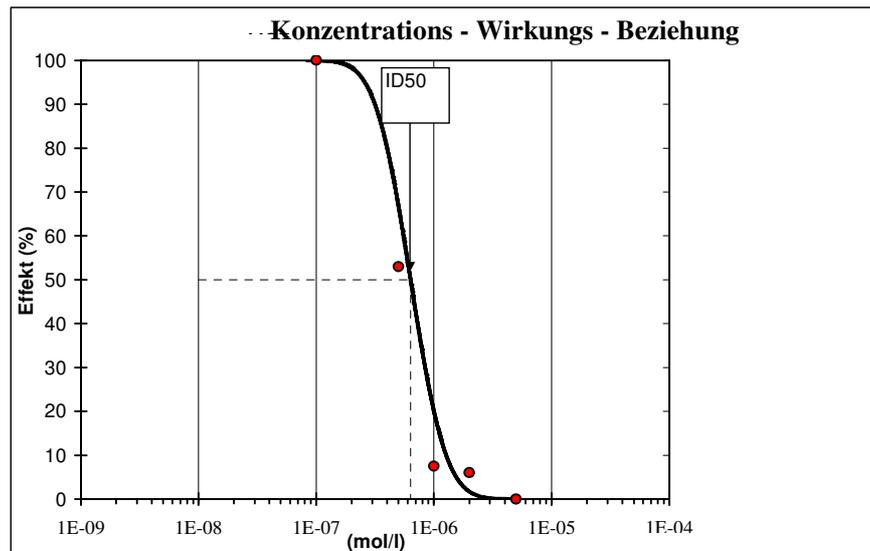
Abbildung 14 zeigt eine typische Hemmkinetik von Tamoxifen mit MCF-7 Zellen.

Da bei diesen Versuchen die antiöstrogene Wirkung des Tamoxifens gemessen werden sollte, wurde nicht wie bei den E-screen-Versuchen zur Melatoninwirkung gestripptes Se-

rum für die Herstellung des Experimentalmediums verwendet, sondern Experimentalmedium, das 10 % FCS enthält. Die in diesem FCS enthaltene Estradiol-Konzentration reichte aus, um das Wachstum der Brustkrebszellen nahezu maximal zu stimulieren (siehe unten!). In 10 % FCS wurde mit den MCF-7-p 181 Zellen für Tamoxifen eine

$$IC_{50} = 6,3 \times 10^{-7} \text{ M}$$

bestimmt.



#### Abb.14: Hemmkinetik von Tamoxifen in MCF-7 Zellen

MCF-7 Zellen wurden 7 Tage mit 10 % Kälberserum (FCS) in Gegenwart verschiedener Konzentrationen Tamoxifen kultiviert und anschließend die Zellzahl kolorimetrisch mit Alamar-blue bestimmt und mit der erreichten Zellzahl in Abwesenheit von Tamoxifen (=100%) ins Verhältnis gesetzt.

Die Konzentration, bei der Tamoxifen das Wachstum der Brustkrebszellen um 50% hemmt ( $IC_{50}$ ) ist abhängig vom Estradiolgehalt des eingesetzten Kälberserums. Um besser reproduzierbare Ergebnisse zu erhalten, wurde dem FCS-Medium eine konstante Menge Estradiol zugesetzt („Spiking“). Bei  $10^{-11}$  M Estradiol wurde in den MCF-7 Zellen eine

$$IC_{50} = 7,2 \times 10^{-7} \text{ M}$$

gemessen.

Dass sich die  $IC_{50}$  durch die Zugabe von  $10^{-11}$  M Estradiol nochmals etwas zur höheren Konzentration verschiebt, zeigt, dass die im Serum befindlichen Estrogene noch nicht zu einer Sättigung des Estrogenrezeptorsystems geführt haben.

Leider haben es Liburdy et al. in ihrer Arbeit zur Magnetfeldwirkung auf den onkostatischen Effekt von Tamoxifen versäumt, den Einfluss von Estradiol auf die Wirkung von Tamoxifen zu berücksichtigen. Um die Ergebnisse dieser Versuchsreihe mit den Ergebnissen von Liburdy et al. vergleichen zu können, wurden parallele Untersuchungen in 10 % Serum (10%FCS-Medium) alleine und in Gegenwart von konstantem Estradiol (10%FCS-Medium+E2) durchgeführt.

Ein Vergleich der erzielten Hemmeffekte ohne Magnetfeld mit denen von Liburdy zeigt, dass Tamoxifen bei beiden Untersuchungen eine ähnlich starke Hemmung des Wachstums bewirkte (Harland und Liburdy, 1997). Während Liburdy bei  $10^{-6}$  M Tamoxifen eine Hemmung des Wachstums um 68 % erzielte, wurden von uns mit den oben beschriebenen Zellen bei derselben Konzentration vergleichbare Effekte von bis zu 74 % erzielt.

### **3.5. Primärkulturen**

Aus Tumormaterial von 105 Brustkrebspatienten und 14 Patienten, die an anderen gynäkologischen Tumoren operiert worden waren, wurden nach Aufklärung und Einholung einer Übereignungszusage Zellen in Kultur genommen. Bei den Brustkrebspatientinnen wurden die Zellen zunächst aus den Primärtumoren, später aus Pleurapunktaten gewonnen.

Die Dissoziation des Gewebes in Einzelzellen wurde mechanisch oder enzymatisch bewerkstelligt.

#### **3.5.1. Mechanische Dissoziation der Gewebestücke**

Unter sterilen Bedingungen werden die Tumoren vom Operateur in toto entnommen und steril dem Pathologen zugeführt, der ein repräsentatives Gewebestück zur weiteren Bearbeitung im Labor entnimmt. Für die Untersuchungen im Rahmen des Vorhabens wurde ein Gewebestückchen zunächst in einer Petrischale mit einem Skalpell weiter zerkleinert und anschließend durch ein Drahtnetz gedrückt. Danach wurde die Zellsuspension pelletiert, in Kulturmedium aufgenommen, und nach Überführen in Zellkulturflaschen im Inkubator bei  $37^{\circ}\text{C}$ , 5%  $\text{CO}_2$  und gesättigter Luftfeuchte kultiviert.

Die mechanische Dissoziation der erhaltenen Mammatumore führte in den meisten Fällen zu unbefriedigenden Ergebnissen. Nach ca. 2 Wochen waren meist nur noch die langgezogenen Fibroblasten in der Kulturflasche vorhanden.

### **3.5.2. Enzymatische Dissoziation der Gewebestücke**

In Anlehnung an eine Methode von Speirs et al. (1998) wurden die mit dem Skalpell zerschnittenen Mammakarzinomstücke 24 Stunden bei 37°C mit Kollagenase III behandelt. Nach dieser enzymatischen Behandlung wurde die Zellsuspension in drei Fraktionen aufgeteilt. Durch unterschiedliche Dichtegradientenzentrifugation wurden die organoiden Teile, welche größere, nicht enzymatisch dissoziierte Fragmente des Tumors enthalten, von den epithelialen Zellen (den eigentlichen Tumorzellen), und den kleineren Stromazellen abgetrennt. Die drei Fraktionen wurden nach Aufnahme in speziell zusammengesetzte Kulturmedien (Speirs et al. 1998) im konventionellen Inkubator kultiviert.

Sämtliche Primärkulturen wurden wöchentlich 2- bis 3-mal unter dem Mikroskop beurteilt. Je nach Konfluenzzustand der Zellkulturen wurde alle 3 bis 4 Tage ein Mediumswechsel vorgenommen.

### **3.5.3. Charakterisierung der Primärkulturen**

Der Anteil an Tumorzellen in diesen Präparationen ist zu Beginn der Kultur sehr gering. Nachdem die Zellen einer Primärkultur in zwei 75 cm<sup>2</sup> Flaschen ein konfluentes Wachstum erreicht hatten, wurden sie mit Trypsin/EDTA abgelöst und mittels FACS-Analyse charakterisiert. Die Markierung erfolgte mit einem anti-Cytokeratin Antikörper und mit einem anti-Fibroblasten Antikörper, wobei ersterer Tumorzellen, und letzterer Fibroblasten erkennt.

In den Primärkulturen fanden sich ca. 10% Cytokeratin-positive Zellen. Das bedeutet, dass zu diesem Zeitpunkt in der Primärkultur 10% Tumorzellen und 90% Fibroblasten enthalten waren.

Die Primärkulturen wachsen sehr langsam und verdoppeln sich etwa alle 1-2 Wochen. Die Beobachtungen der Primärkulturen stimmen annähernd mit den Angaben von Speirs et al (1998) überein, wonach die Verdopplungszeit ca. 3-6 Tage beträgt. Die genaue Verdopplungszeit der angelegten Primärkulturen wurde jedoch nicht ermittelt, da das primäre Ziel eine Vermehrung der angewachsenen Zellen war. (Durch das Ablösen der Zellen für

die Zellzählung durch Trypsinierung wird das Zellwachstum negativ beeinflusst und die Vitalität der gesamten Primärkultur beeinträchtigt.)

Die meisten Zellen der angelegten Primärkulturen sind entweder primär nicht angewachsen, oder bereits nach kurzer Zeit (ca. 5-7 Tagen) abgestorben. Beobachtet wurde auch, dass sich in allen drei Gewebefractionen die Fibroblasten stark vermehrten, und die wenigen epithelialen Tumorzellen überwucherten, was ebenfalls zum Absterben der Tumorzellen führte.

Die Kontamination der Zellkultur mit unerwünschten Begleitzellen erwies sich als Hauptproblem beim Anlegen der Primärkulturen. Bei den Zellkulturen aus Primärtumoren sind dies in erster Linie Fibroblasten, bei Pleurapunktaten sind es Fibroblasten, Mesothelzellen und Lymphozyten.

#### **3.5.4. Anreicherungs- und Selektionsverfahren**

Es wurden verschiedene Methoden verglichen, die epithelialen Tumorzellen in der Primärkultur anzureichern. Dabei wurde versucht, durch selektive Kulturbedingungen den Anteil der Tumorzellen in den Primärkulturen zu erhöhen. Mit den verschiedenen Präparationen wurden jeweils 2 unterschiedliche Kulturbedingungen miteinander verglichen.

Ursprünglich wurde für die Primärkulturen ein Protokoll verwendet, mit dem erfolgreich Ovarialkarzinome in Kultur gebracht und Zelllinien angelegt werden konnten. Es wurde CMRL 1066 Medium verwendet, das mit 15 % Kälberserum (FCS) angereichert war (Möbus et al., 1992).

In Parallelkulturen wurden die Zellen entweder in CMRL 1066 (15 % FCS) ohne Estradiol und in CMRL/15% FCS mit  $10^{-10}$  M Estradiol kultiviert. Der Zusatz von Estradiol sollte den Tumorzellen einen Wachstumsvorteil gegenüber den Fibroblasten und Mesothelzellen verschaffen. Unerwarteterweise bewirkte der Zusatz von Estradiol zum Kulturmedium selbst nach mehreren Wochen keine sichtbare Anreicherung der Tumorzellen, dies galt auch für immunhistologisch Estrogenrezeptor-positive Tumore.

Des Weiteren wurden Kulturen mit 15 % Kälberserum (FCS) und Kulturen mit 5 % FCS verglichen, da bekannt ist, dass eine hohe Konzentration Kälberserum auch das Wachstum der Fibroblasten unterstützt. Der Einsatz von 5 % Kälberserum brachte zwar keinen Vorteil gegenüber 15 % FCS, jedoch wuchsen die Zellen in dem FCS-ärmeren Medium gleich gut, so dass bei den weiteren Versuchen zur Kostenersparnis mit 5 % FCS gearbeitet wurde.

Es wurde auch ein Vergleich zwischen der Kultur in CMRL-Medium und einem Medium (ECGM) der Fa. Promocell durchgeführt, das ausdrücklich für die Kultur epithelialer Zellen entwickelt wurde. Dieses Spezialmedium erwies sich jedoch auch nicht als besser geeignet, um die Brustkrebszellen anzureichern.

### 3.5.5. Gewinnung von Zellen aus Pleurapunktaten und Ascitesflüssigkeit

Am erfolgreichsten erwies sich folgendes Vorgehen:

Die Zellen der mechanisch zerlegten Primärtumore bzw. die abzentrifugierten Zellen der Pleurapunktate oder des Ascites aus dem Bauchraum von Brustkrebspatientinnen wurden in CMRL-Medium aufgenommen, das nur 0,1 % Kälberserum enthält. Ein Vergleich mit 5 % FCS zeigte, dass bei 0,1 % FCS die unerwünschten Begleitzellen (Fibroblasten oder Mesothelzellen) schneller am Boden der Kulturflasche adhären als bei 5 % FCS. Nachdem ein Teil der Begleitzellen angewachsen war, wurde der Überstand der Kultur, der mehr Tumorzellen enthielt, nach 4-6 Stunden abgenommen, die Zellen zentrifugiert und in 5 % FCS weiterkultiviert. Diese Vorgehensweise führte in vielen Fällen zu einer Anreicherung der Tumorzellen.

Es erwies sich weiterhin als vorteilhaft, die Kulturen bei Erreichen der Konfluenz nicht zu teilen, sondern mehrere Wochen in Konfluenz zu halten. Durch diese Maßnahme fehlt den Fibroblasten und Mesothelzellen der Teilungsanreiz, da diese nicht-transformierten Zellen noch der natürlichen Kontaktinhibition unterliegen. Im Verlauf mehrerer Wochen begannen sich die Begleitzellen zunehmend von Boden der Kulturflasche abzulösen und es wurden in einigen Kulturen kleine Kolonien von Tumorzellen sichtbar. Bei ausreichender Größe konnten diese Kolonien selektiv, mechanisch (cell-scraper) beim Trypsinieren abgelöst werden und von den Fibroblasten getrennt in einer neuen Flasche weiterkultiviert werden.

Mit dieser Methode ist es gelungen, aus einer Primärkultur eine neue Brustkrebszelllinie („MCU1“) zu etablieren. Diese Zelllinie wächst noch sehr langsam (Verdopplungszeit ca. 3 Wochen). Weitere 2-3 Primärkulturen, die nach der optimierten Methode angelegt wurden, geben ebenfalls noch Hoffnung, zu weiteren Zelllinien heranzuwachsen.

Neben der Anreicherung der Tumorzellen durch **selektive Adhäsion**, wie sie oben beschrieben wurde, wurden für die Primärkulturen noch andere Anreicherungsverfahren getestet.

### 3.5.6. Anreicherung durch Magnetseparation

Die Firmen Dynal und Miltenyi bieten mikroskopisch kleine Magnetpartikel an, an die anti-IgG-Antikörper gekoppelt sind. Belädt man Zellen mit Primärantikörpern, die gegen ein Oberflächenantigen gerichtet sind, so binden die Magnetpartikel an diese Zellen. Im Magnetfeld eines Permanentmagneten lassen sich die Antikörper-beladenen Zellen dann von den nicht markierten Zellen trennen. Die markierten Zellen werden im Magnetfeld abgeschieden, während die nicht-markierten Zellen in Suspension bleiben und abgesaugt werden können.

Es wurde sowohl eine Positivanreicherung der Brustkrebszellen mit einem Antikörper gegen das Antigen EMA (epithelial membrane antigen) als auch eine Negativanreicherung mit einem Antikörper gegen Fibroblasten (AS02, Dianova) durchgeführt. Bei der Positivanreicherung werden die Tumorzellen im Magnetfeld abgeschieden und der Überstand mit den Fibroblasten verworfen, bei der Negativanreicherung werden die Fibroblasten an die Magnetpartikel gebunden und abgeschieden und die Tumorzellen im Überstand weiterkultiviert.

Mit beiden Vorgehensweisen konnte eine primäre Anreicherung der Tumorzellen erreicht werden, jedoch waren die gewonnenen Tumorzellen nach der Trennung immer noch so stark mit Begleitzellen kontaminiert, dass diese nach einiger Zeit die Tumorzellen wieder überwucherten. Deshalb bot die Magnetfeldanreicherung letztendlich keinen nutzbaren Vorteil.

### 3.5.7. Anreicherung in Agarkulturen

Eine andere Methode, den Tumorzellen einen nutzbaren Wachstumsvorteil gegenüber den Fibroblasten und Mesothelzellen zu verschaffen, beruht auf dem Phänomen, dass transformierte Zellen (Tumorzellen) nicht darauf angewiesen sind, an einer Plastikoberfläche anzuwachsen (Substrat-unabhängiges Wachstum). Fibroblasten, Mesothelzellen und auch alle Zellen anderer nicht-Tumorgewebe (außer Lymphozyten) müssen an einem Substrat (Plastikboden der Kulturflaschen) adhärieren, um sich teilen zu können. Ohne diese Adhärenz gehen diese Zellen nach einiger Zeit in Apoptose, genauer gesagt in „Anoikis“.

Sät man nun Zellen in 0,3 %igen Agar aus, sind die Zellen daran gehindert, am Plastik zu adhäreren. Die Tumorzellen teilen sich in diesem Agarmedium weiter und bilden kleine makroskopisch sichtbare Kolonien, während die Fibroblasten idealerweise absterben.

Nach 2-3 Wochen wurden diese Kolonien mit einer Kanüle „gepickt“ und in einem kleinen Volumen Kulturmedium weiterkultiviert.

50.000 Zellen der Primärkulturen wurden in 1,5 ml 0,3 %igem Agar ausgesät und 3 Wochen kultiviert. Nur in wenigen dieser Kulturen konnten 3-5 Kolonien gefunden und „gepickt“ werden. Man kann jedoch davon ausgehen, dass die Primärkulturen doch mehr als nur  $(5/50.000) = 0,01 \%$  Tumorzellen enthielten. Von hochmalignen etablierten Zelllinien ist bekannt, dass ca. 10-60 % der Tumorzellen, also nicht alle, in der Lage sind, in Agar Kolonien zu bilden. Diese Klonogenität ist bei weniger entarteten Zellen, wie sie frisch aus einem Tumor gewonnen werden, sicher 1-2 Zehnerpotenzen niedriger.

In Zytozentrifugenpräparaten von frischen Primärkulturen wurden durch immunhistochemische Färbung mit dem EMA-Antikörper etwa 0,1 bis 5 % der Zellen angefärbt.

Die gepickten Kolonien waren jedoch leider trotzdem noch mit Fibroblasten kontaminiert, so dass letztendlich auch mit der Agarmethode keine reinen Tumorzell-Kulturen gewonnen werden konnten.

Nach unserer Erfahrung mit Primärkulturen lässt sich inzwischen eindeutig feststellen, dass Primärkulturen aus Pleurapunktaten und Ascites sich besser in Kultur bringen lassen, als Primärkulturen aus soliden Tumoren. Kulturen aus soliden Tumoren wuchsen entweder erst gar nicht an oder waren bereits nach wenigen Wochen von Fibroblasten total überwuchert.

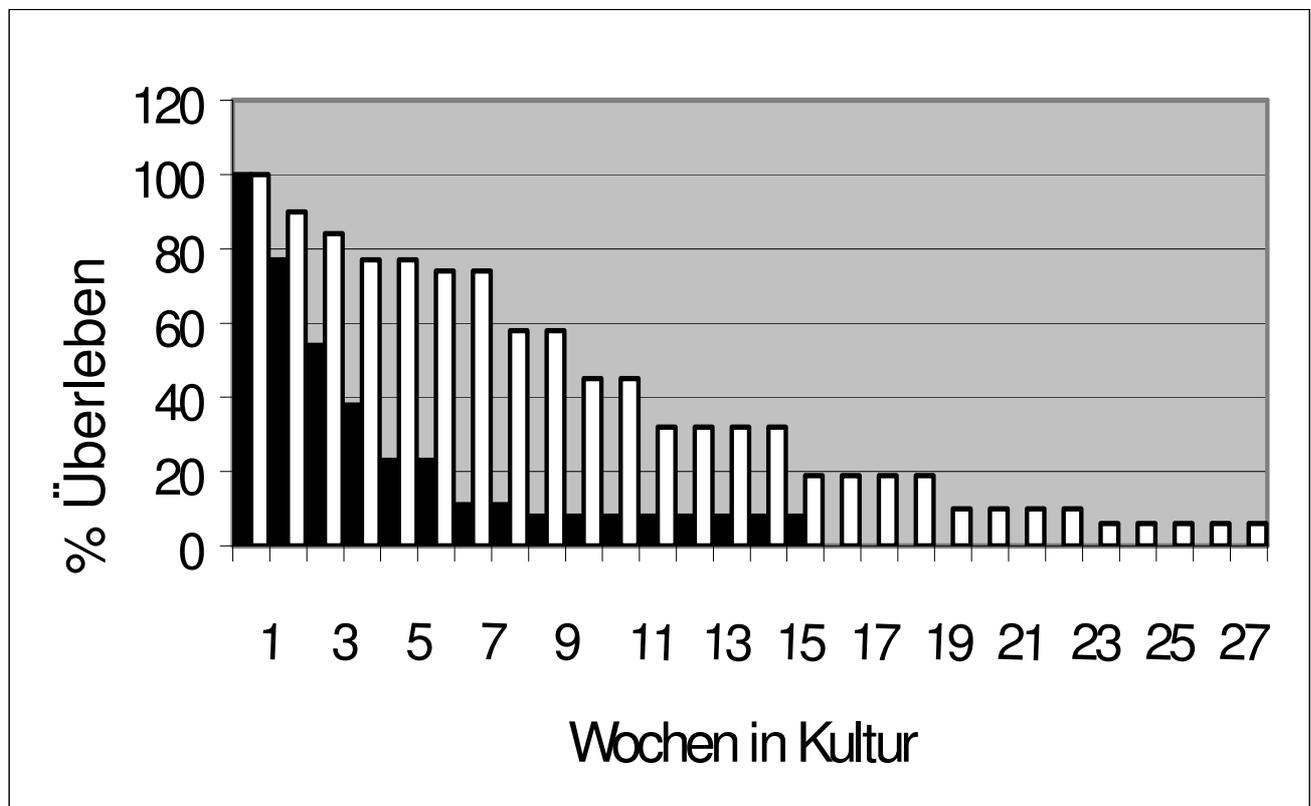
In Tabelle 3 sind die Einzelergebnisse aller Versuche, Primärkulturen aus Tumormaterial anzulegen, aufgelistet.

**Tabelle 3: Liste der Tumorarten, aus denen Primärkulturen angelegt wurden**

<b>Tumorart</b>	<b>Anzahl der Primärkulturen</b>
<b>Brustkrebs</b>	<b>105</b>
<b>Primärtumore</b>	<b>74</b>
<b>Pleurapunktate</b>	<b>31</b>
<b>Endometrium</b>	<b>4</b>
<b>Corpus</b>	<b>4</b>
<b>Ovarial</b>	<b>6</b>

Die Lebensdauer der 57 Primärkulturen, die innerhalb eines Jahres angelegt wurden, ist in Abb. 15 in Form eines Kaplan-Meier Diagramms dargestellt, das üblicherweise dazu verwendet wird, Unterschiede im Therapieerfolg von Krebsbehandlungen darzustellen. In

diesem Diagramm sind die Unterschiede zwischen der Primärkultur aus soliden Tumoren (helle Balken) und Pleurapunktaten (dunkle Balken) deutlich zu erkennen. Während bei den soliden Tumoren die Hälfte der Kulturen bereits nach 3 Wochen eingestellt werden musste, konnten 50% der Kulturen aus Pleura länger als 9 Wochen kultiviert werden. Nur eine Kultur aus soliden Tumoren hielt länger als 9 Wochen und wurde erst nach 15 Wochen eingestellt. Zwei der Kulturen aus Pleura hielten länger als ein halbes Jahr, eine davon ist die neu etablierte Zelllinie MCU1. Die Zelllinie MCU-1 wächst noch sehr langsam (Verdopplungszeit = 18 Tage), konnte aber bereits bis zur 22. Passage weiterkultiviert werden.



**Abb. 15: Kaplan-Meier Diagramm der Lebensdauer von Primärkulturen von Mammakarzinomen**

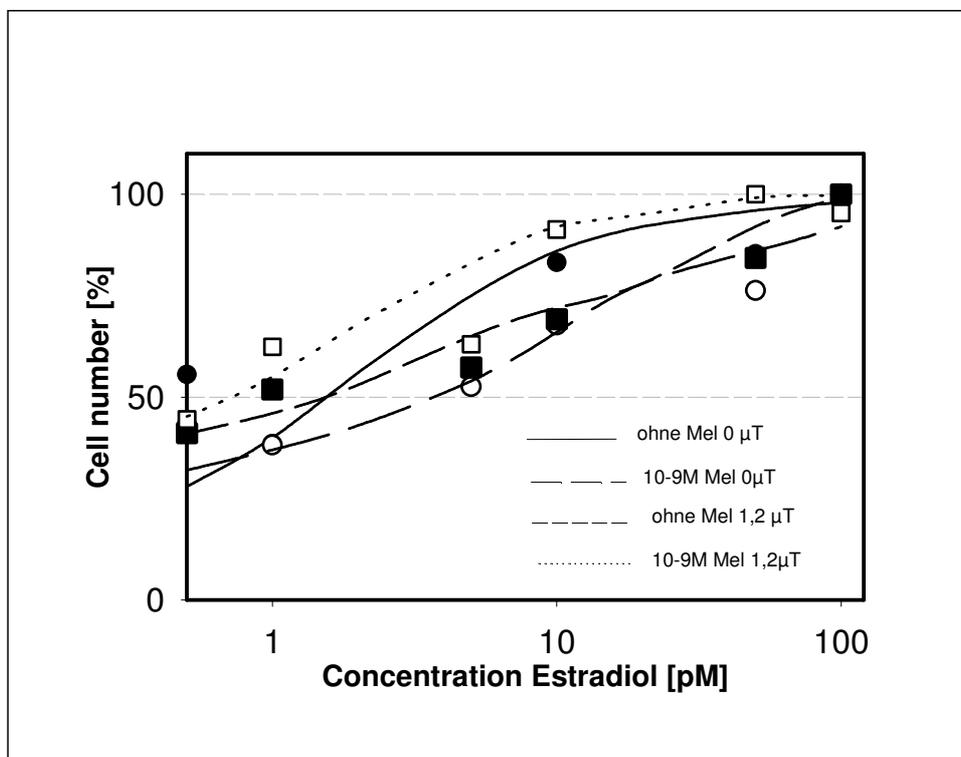
Das Überleben der Primärkulturen ist in Abhängigkeit der Zeit für solide Tumoren (schwarze Balken) und Pleurapunktate (weiße Balken) dargestellt.

### 3.6. Einfluss des Magnetfeldes auf die Melatonin-Wirkung in Brustkrebszelllinien

Eines der Hauptziele des Projektes war es, die Angaben von Liburdy und Mitarbeitern zu überprüfen, d.h. wenn möglich zu bestätigen oder zu widerlegen, dass niederfrequente

Magnetfelder die antiproliferative Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen reduzieren. Nachdem es durch die o.g. technischen Veränderungen (Girgert et al, 2003) möglich wurde, auch sehr schwache Melatoninwirkungen in den verwendeten Brustkrebszellen nachzuweisen und zu quantifizieren, wurden die Untersuchungen zum Einfluss von Melatonin auf die von Estradiol stimulierte Proliferation der Brustkrebszellen, die in 3.3 beschrieben sind, in den speziell für dieses Projekt konstruierten Magnetfeld-Inkubatoren bei verschiedenen Feldstärken wiederholt. Die Messungen wurden mit drei verschiedenen Brustkrebszelllinien durchgeführt, dem MCF-7 Subklon p181, den mit Mel1a transfizierten MCF-7 Zellen und der primären Zelllinie MCU-1.

Unter Bedingungen, unter denen auch die Magnetfelder der Laborumgebung abgeschirmt waren („0  $\mu\text{T}$ “), wurde bei den Zelllinien MCF-7 (p181) und MCF-7Mel1a bei  $10^{-9}$  M Melatonin die in Kap. 3.3 beschriebene Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Estradiol beobachtet. Bei 1,2  $\mu\text{T}$  kam es dagegen bei beiden Zelllinien zu einer leichten Linksverschiebung der Dosiswirkungskurve, wie in Abb. 16 für die Zelllinie MCF-7 (p181) gezeigt. Die Messungen unterlagen allerdings derart starken experimentellen Schwankungen, dass die Ergebnisse, die auf einer dreifachen Wiederholung der Versuche



**Abb. 16:** Einfluss eines Magnetwechselfeldes von 1,2  $\mu\text{T}$  auf die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Estradiol durch Melatonin in MCF-7 (p181) Zellen

beruhen, nicht als statistisch signifikant angesehen werden können.

Bei  $5 \times 10^{-9}$  M Melatonin ist bei den p181-Zellen im abgeschirmten Inkubator kein Effekt von Melatonin zu beobachten oder höchstens eine leichte Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve, die jedoch im Bereich der statistischen Streuung liegt. Bei  $1,2 \mu\text{T}$  tritt wie bei  $10^{-9}$  M eine Linksverschiebung auf, die bei  $10 \mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$  nicht zu beobachten war.

Die Ergebnisse der  $EC_{50}$  Berechnungen aller Expositionsversuche mit den beiden MCF-7 Zelllinien (MCF-7 p181 und MCF-7Mel1a) bei  $1,2 \mu\text{T}$ ,  $10 \mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$  sind in Tabelle 4 zusammengefasst:

Entsprechend der Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve von Estradiol durch Melatonin sind die  $EC_{50}$ -Werte von Estradiol in den abgeschirmten Kulturen in Gegenwart von  $10^{-9}$  M Melatonin erhöht. Diese Erhöhung der  $EC_{50}$  ist in den MCF-7 Mel1a Zellen bei  $10^{-9}$  M Melatonin stärker ausgeprägt als bei  $5 \times 10^{-9}$  M Melatonin.

Bei einer Magnetfeldstärke von  $1,2 \mu\text{T}$  beobachtet man den gegenteiligen Effekt von Melatonin. Bei  $1,2 \mu\text{T}$  ist die  $EC_{50}$  von Estradiol bei  $10^{-9}$  M Melatonin sogar erniedrigt.

Bei höheren Feldstärken wie  $10 \mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$  steigt die  $EC_{50}$  von Estradiol durch Melatonineinfluss wieder an.

Die in Tabelle 4 angegebenen Werte sind Mittelwerte aus drei bis fünf unabhängigen Versuchen, die bei jeder Versuchsbedingung (Feldstärke und Melatoninkonzentration) durchgeführt wurden. Die Werte der Einzelmessungen unterlagen sehr starken Schwankungen, so dass die Unterschiede leider bei keiner Versuchsbedingung statistisch signifikant waren. In jedem Einzelversuch wurde jedoch die gleiche Tendenz der Wirkung beobachtet. Dies drückt sich beispielsweise dadurch aus, dass durch  $1,2 \mu\text{T}$  beständig eine Erniedrigung der  $EC_{50}$  Werte von Estradiol durch Melatonin bewirkt wurde, die in allen Versuchen beobachtet werden konnte, lediglich in von Experiment zu Experiment unterschiedlicher Stärke.

Ähnliche Expositionsversuch wie mit den beiden MCF-7 Zelllinien (MCF-7 p181 und MCF-7Mel1a) wurden auch mit den aus einer Primärkultur gewonnenen MCU-1 Zellen durchgeführt. Die Ergebnisse der Magnetfeldwirkung auf die Verschiebung der  $EC_{50}$  Werte von Estradiol durch Melatonin sind in Tabelle 5 aufgelistet.

**Tabelle 4: Einfluss der verschiedenen Magnetfeldstärken auf die Verschiebung der EC<sub>50</sub> Werte von Estradiol durch Melatonin in zwei Brustkrebszelllinien**

	MCF-7 p181 Melatonin			MCF-7 Mel 1a Melatonin		
	ohne	10 <sup>-9</sup> M	5x10 <sup>-9</sup> M	ohne	10 <sup>-9</sup> M	5x10 <sup>-9</sup> M
abgeschirmt Umgebungsfeld ca. 0,2 µT*	1,3x10 <sup>-12</sup>	1,9x10 <sup>-12</sup>	1,1x10 <sup>-12</sup>	0,3x10 <sup>-12</sup>	7,7x10 <sup>-12</sup>	4,2x10 <sup>-12</sup>
	n.d.	n.d.	n.d.	2,2x10 <sup>-12</sup>	2,2x10 <sup>-12</sup>	3,1x10 <sup>-12</sup>
1,2 µT	1,5x10 <sup>-12</sup>	0,8x10 <sup>-12</sup>	0,9x10 <sup>-12</sup>	1,7x10 <sup>-12</sup>	1,3x10 <sup>-12</sup>	1,3x10 <sup>-12</sup>
10 µT	1,7x10 <sup>-12</sup>	2,5x10 <sup>-12</sup>	1,9x10 <sup>-12</sup>	1,9x10 <sup>-12</sup>	2,6x10 <sup>-12</sup>	2,6x10 <sup>-12</sup>
100 µT	0,2x10 <sup>-12</sup>	1,2x10 <sup>-12</sup>	1,5x10 <sup>-12</sup>	6,9x10 <sup>-12</sup>	4,8x10 <sup>-12</sup>	1,1x10 <sup>-12</sup>

\* Exposition im Inkubator ohne Felderzeugung und ohne mu-Metall-Abschirmung, nur dem Umgebungsfeld des Labors von ca. 0,2 µT ausgesetzt

Die MCU-1 Zellen reagieren nur sehr schwach auf die Stimulation mit Estradiol, es wurden ca. 7,7x10<sup>-12</sup> M Estradiol benötigt, um eine halbmaximale Wachstumsstimulation zu erreichen. Bei 10<sup>-10</sup>M Estradiol wurde nur eine maximale Erhöhung der relativen Proliferation um den Faktor 2,4 erreicht. Dadurch wurde eine Auswertung der Verschiebung der EC<sub>50</sub> Werte erschwert und noch anfälliger gegen experimentelle Schwankungen.

Die Ergebnisse in Tabelle 5 zeigen, dass 10<sup>-9</sup> M Melatonin die EC<sub>50</sub> Werte von Estradiol auch in Abwesenheit eines Magnetfeldes erniedrigt. Die verschiedenen Magnetfelder verringern die EC<sub>50</sub> Werte von Estradiol sogar noch weiter.

Bei der geringen relativen Proliferation der MCU-1 Zellen wirken sich die statistischen Schwankungen der Messwerte jedoch noch stärker aus, so dass auch bei den MCU-1 Zellen die Effekte nicht als statistisch signifikant angesehen werden können.

**Tabelle 5: Einfluss der Magnetfeldexposition auf die Wirkung von Melatonin auf die primäre Brustkrebszelllinie MCU 1**

	MCU-1		
	EC <sub>50</sub> Werte von Estradiol in Gegenwart von Melatonin		
	ohne	10 <sup>-9</sup> M	5x10 <sup>-9</sup> M
abgeschirmt	7,7x10 <sup>-12</sup>	4,4x10 <sup>-12</sup>	2,6x10 <sup>-12</sup>
Umgebungsfeld ca. 0,2 µT*	7,6x10 <sup>-12</sup>	3,5x10 <sup>-12</sup>	5,8x10 <sup>-13</sup>
1,2 µT	7,0x10 <sup>-12</sup>	2,0x10 <sup>-12</sup>	2,8x10 <sup>-13</sup>
10 µT	n.d.	n.d.	n.d.
100 µT	1,1x10 <sup>-12</sup>	8,6x10 <sup>-13</sup>	1,9x10 <sup>-12</sup>

\* Exposition im Inkubator ohne Felderzeugung und ohne mu-Metall-Abschirmung, nur dem Umgebungsfeld des Labors von ca. 0,2 µT ausgesetzt

### 3.7. Einfluss des Magnetfeldes auf die Tamoxifen-Wirkung in Brustkrebszelllinien

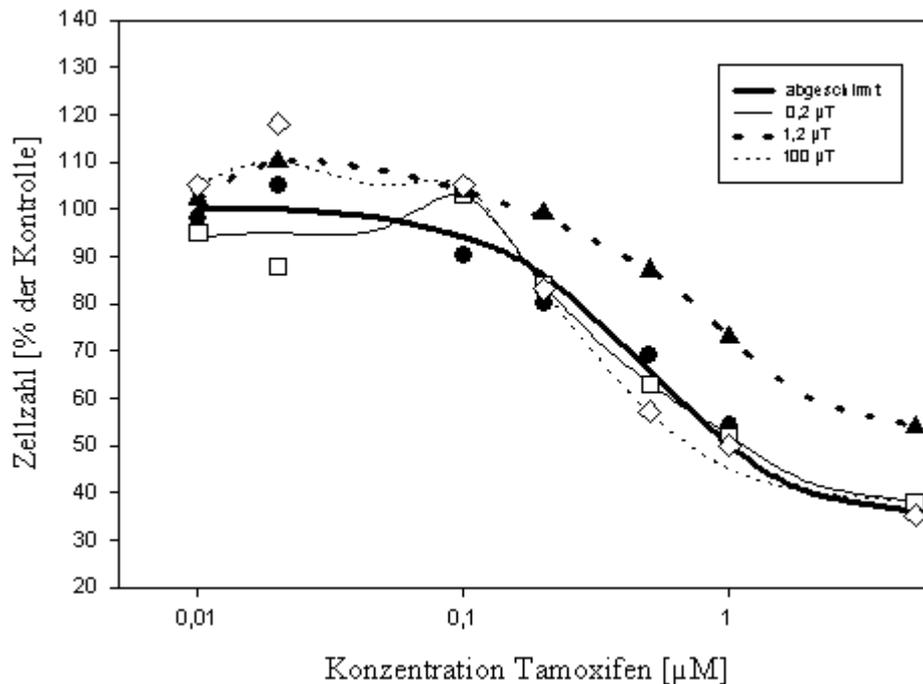
Dosis-Wirkungskurven von Tamoxifen wurden bei zwei Subklonen der Brustkrebszelllinie MCF-7 (p40 und p181) in einem Konzentrationsbereich zwischen 1x10<sup>-8</sup> M und 5x10<sup>-6</sup> M bei verschiedenen Magnetfeldstärken ermittelt. Die Dosis-Wirkungskurven von Tamoxifen unterscheiden sich in den beiden Subklonen deutlich (Abb. 17 und Abb. 18).

Bei dem Subklon p40 beobachtet man einen deutlichen hemmenden Effekt von Tamoxifen auf das Wachstum der Brustkrebszellen bei Konzentrationen oberhalb 10<sup>-7</sup> M.

In Abwesenheit von elektromagnetischen Feldern, wenn die Zellkulturplatten durch einen mu-Metall-Mantel abgeschirmt sind, wurde eine 50%ige Hemmung des Zellwachstums bei einer Tamoxifenkonzentration von 1,3x10<sup>-6</sup> M erreicht.

Wenn die Kulturplatten im Inkubator nicht abgeschirmt wurden, waren die Brustkrebszellen dem im Labor vorhandenen Umgebungsfeld ausgesetzt. Dieses Umgebungsfeld, mit einem Feldstärkemessgerät gemessen, betrug ca. 0,2 µT. Bei Tamoxifenkonzentrationen größer 10<sup>-7</sup> M verlief die Dosis-Wirkungskurve ähnlich wie in den abgeschirmten Kultu-

ren. Bei  $10^{-7}$  M wurde jedoch ein leichter Anstieg der Zellzahl um durchschnittlich 8% beobachtet, der auf die bekannte, teilweise proliferative Wirkung von Tamoxifen zurückzuführen ist.



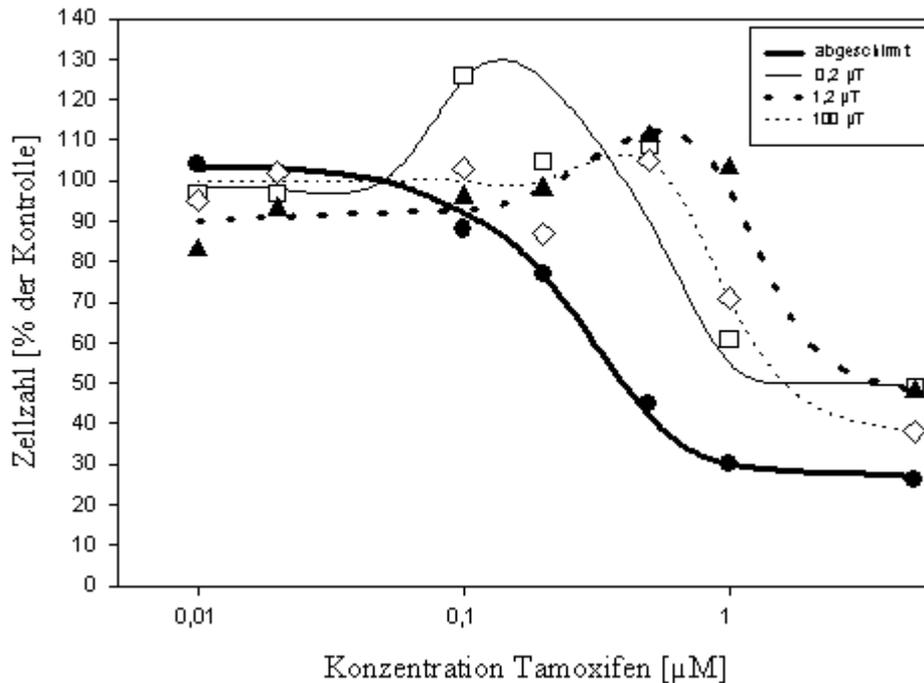
**Abb. 17: Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen mit dem Subklon p40 der Brustkrebszelllinie MCF-7 bei verschiedenen magnetischen Feldstärken**

Bei  $1,2 \mu\text{T}$  wird bei Konzentrationen unter  $10^{-7}$  M ein leichter proliferativer Effekt von Tamoxifen beobachtet und die Dosis-Wirkungskurve ist nach rechts, zu höheren Konzentrationen verschoben, wodurch erst bei einer Tamoxifenkonzentration von  $2,9 \times 10^{-6}$  M eine 50% ige Hemmung des Zellwachstums erreicht wird (gegenüber  $1,3 \times 10^{-6}$  M im abgeschirmten Feld). Bei der deutlich höheren Feldstärke von  $100 \mu\text{T}$  wurde diese Verschiebung der Dosiswirkungskurve nicht beobachtet und die  $\text{IC}_{50}$ , bei der die Hemmung des Wachstums 50 % beträgt, liegt bei  $1,0 \times 10^{-6}$  M, ähnlich dem Wert, der in den abgeschirmten Kulturplatten gemessen wurde.

Die Veränderungen der Zellzahl durch die Magnetfeldwirkung war in den MCF-7 p40 Zellen bei den einzelnen Tamoxifenkonzentrationen nur sehr gering und die Schwankungen der Messwerte zwischen den einzelnen Versuchen lagen bei den meisten Konzentrationen in der gleichen Größenordnung, so dass nach dreifacher Wiederholung der Messun-

gen die Unterschiede zwischen den verschiedenen Feldstärken bei den meisten Konzentrationen nicht signifikant waren. Lediglich bei der Tamoxifenkonzentration von  $2 \times 10^{-7}$  M wurde bei den Feldstärken 1,2  $\mu$ T und 10  $\mu$ T ein Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  erreicht.

Bei dem Subklon p181 waren die jeweiligen Effekte des Magnetfeldes auf die Tamoxifenwirkung deutlicher zu beobachten (Abb.18)



**Abb. 18: Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen mit dem Subklon p181 der brustkrebszelllinie MCF-7 bei verschiedenen magnetischen Feldstärken**

In Abwesenheit von elektromagnetischen Feldern, wenn die Kulturplatten durch Metallfolie abgeschirmt waren, zeigte die Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen einen ähnlich sigmoiden Verlauf, wie er bei dem Subklon p40 gemessen wurde. Die  $IC_{50}$  wurde mit  $6,8 \times 10^{-7}$  M bestimmt, das ist etwa die Hälfte des Wertes, der bei dem Subklon p40 ermittelt wurde.

Bereits im Umgebungsfeld von 0,2  $\mu$ T kam es bei Konzentrationen um  $10^{-7}$  M zu einer deutlich ausgeprägten proliferativen Wirkung von Tamoxifen auf die Brustkrebszellen. Bei  $10^{-7}$  M Tamoxifen stieg die Zellzahl im Durchschnitt um 26 % an. Die Dosis-Wirkungs-

kurve wurde deutlich zu höheren Konzentrationen verschoben. Die IC<sub>50</sub> von Tamoxifen betrug bei 0,2 µT  $2,2 \times 10^{-6}$  M (gegenüber  $6,8 \times 10^{-7}$  M im abgeschirmten Feld).

Bei 1,2 µT war die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve noch deutlicher zu beobachten und die IC<sub>50</sub> bei 1,2 µT lag bei  $3,9 \times 10^{-6}$  M Tamoxifen. Bei 10 µT und 100 µT fiel die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve dagegen wieder schwächer aus.

In den MCF-7 p181 Zellen waren bei den einzelnen Tamoxifenkonzentrationen die Veränderungen der Zellzahl durch die Magnetfeldwirkung wesentlich deutlicher als bei den MCF-7 p40 Zellen. Nach dreifacher Wiederholung der Messungen waren die Unterschiede bei 0,2 µT und 1,2 µT bei den Konzentrationen  $5 \times 10^{-7}$  M,  $10^{-6}$  M und  $5 \times 10^{-6}$  M signifikant ( $p < 0,05$ ) gegenüber den abgeschirmten Kulturen verändert. Bei 10 µT und 100 µT waren die Unterschiede nach drei Messungen bei  $5 \times 10^{-7}$  M und  $10^{-6}$  M fast signifikant mit p-Werten zwischen 0,07 und 0,13.

Die Ergebnisse der IC<sub>50</sub>-Bestimmungen aus den Dosiswirkungskurven von Tamoxifen bei den verschiedenen Feldstärken sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

Im Magnetfeld steigt die IC<sub>50</sub> von Tamoxifen in beiden Subklonen der Brustkrebszelllinie MCF-7 bis zu einer Feldstärke von 1,2 µT kontinuierlich an und fällt bei noch höheren Feldstärken bis maximal 100 µT wieder ab. Die Magnetfeldwirkung auf die Hemmung des Wachstums durch Tamoxifen zeigt einen sogenannten „Fenstereffekt“. Ein solcher Fenstereffekt der Magnetfeldwirkung wurde von verschiedenen Autoren auch für andere biologische Parameter beschrieben.

Der möglicherweise interessanteste Aspekt dieser Verschiebung der Dosis-Wirkungsbeziehung unter Magnetfeldeinfluss betrifft den partiellen Estrogenagonismus von Tamoxifen. In beiden untersuchten Klonen, besonders augenfällig aber im Klon p 181, kommt es, wie oben dargestellt, bei niedrigen Tamoxifenkonzentrationen ( $10^{-7}$  M) unter Einwirkung eines schwachen Umgebungsfeldes von ca. 0,2 µT zu einer deutlichen Proliferationsinduktion. Bei höheren Tamoxifenkonzentrationen überwiegt erwartungsgemäß der inhibitorische Effekt, mit einem Maximum bei ca.  $10^{-6}$  M. Unter Einwirkung des von verschiedenen Autoren als besonders wirksam beschriebenen, allerdings noch immer schwachen, Magnetwechselfeldes von 1,2 µT kommt es durch die Rechtsverschiebung der Dosiswirkungskurve zu dem Resultat, dass bei der im Umgebungsfeld maximal inhibitorisch wirksamen Tamoxifenkonzentration von  $10^{-6}$  M eine maximale Zellproliferation in-

duziert wird. Bemerkenswerterweise liegt unter Tamoxifentherapie die Serumkonzentration der Patienten in dieser Größenordnung.

**Tabelle 6: Einfluss der verschiedenen magnetischen Feldstärken auf die Hemmkonstante  $IC_{50}$  von Tamoxifen in den beiden Subklonen der Zelllinie MCF-7**

Magn. Feldstärke	$IC_{50}$ MCF-7 p40	$IC_{50}$ MCF-7 p181
abgeschirmt	$1,4 \times 10^{-6}$ M	$6,8 \times 10^{-7}$ M
0,2 $\mu$ T Umgebung	$1,6 \times 10^{-6}$ M	$1,9 \times 10^{-6}$ M
1,2 $\mu$ T	$2,3 \times 10^{-6}$ M	$3,9 \times 10^{-6}$ M
10 $\mu$ T	$2,3 \times 10^{-6}$ M	$3,7 \times 10^{-6}$ M
100 $\mu$ T	$0,9 \times 10^{-6}$ M	$3,1 \times 10^{-6}$ M

Die  $IC_{50}$ -Werte von Dosis-Wirkungskurven aus mindestens drei unabhängigen Versuchen wurden mit den Excel-Makro von Dr. J. Greve ermittelt.

MCF-7 p40 = MCF-7 aus dem Endokrinologisch- Onkologischen Labor (EOL) der Universitäts-Frauenklinik Ulm

MCF-7 p181 = MCF-7 von Dr. W. Körner, Landesamt für Umweltschutz, Augsburg

### 3.8. Genexpression nach Magnetfeldeinwirkung

Die Ermittlung von Dosis-Wirkungskurven zur Bestimmung des Einflusses von Magnetfeldern auf die Wirkung von Tamoxifen in Brustkrebszellen eröffnet die Möglichkeit, Rückschlüsse auf den zugrunde liegenden Mechanismus abzuleiten.

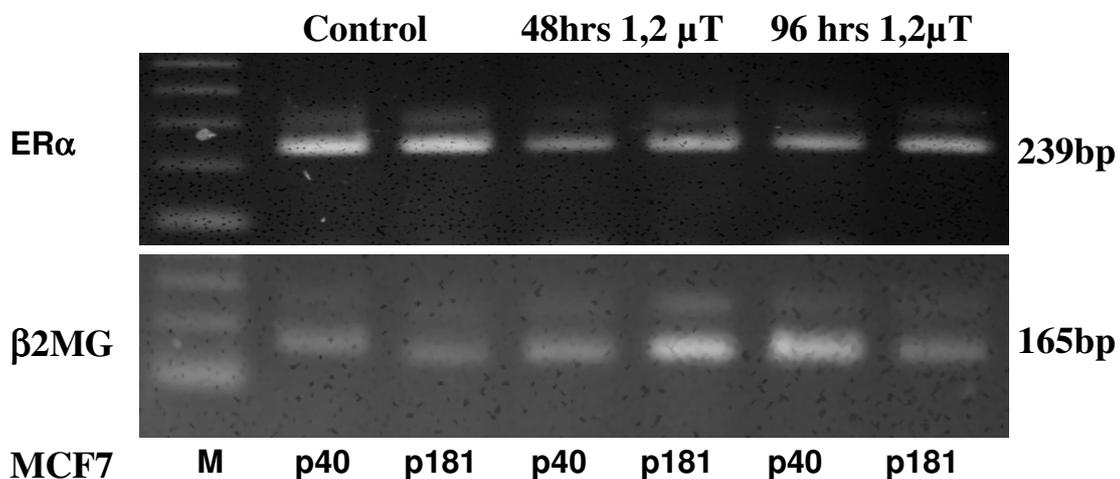
Daher wurden Zellen der beiden untersuchten Klone p40 und p181 der Brustkrebszelllinie MCF-7 nach Exposition durch ein magnetisches Wechselfeld auf Veränderungen der Genexpression hin untersucht, um den zugrunde liegenden molekularen Mechanismus für die unterschiedliche Empfindlichkeit gegenüber den angewendeten Onkostatika aufklären zu können.

#### 3.8.1. RT-PCR

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression der mRNA des Estrogenrezeptors,  $ER\alpha$  nach Magnetfeldexposition untersucht. Die beiden MCF-7 Subklone (p40 und p181) wurden 48 Stunden und 96 Stunden mit 1,2  $\mu$ T exponiert. Aus den exponierten Zellen und aus Kontrollzellen, die in einem Parallelinkubator ohne angelegtes Magnetfeld im Umgebungsfeld inkubiert wurden, wurde die RNA isoliert und mit der RNA eine RT-PCR mit  $ER\alpha$ -

spezifischen Primern durchgeführt. Als interne Kontrolle für die PCR-Reaktion wurde in Parallelansätze die Amplifikation der mRNA von  $\beta$ 2-Mikroglobulin durchgeführt. Die PCR der ER $\alpha$ -mRNA ergab das aus dem Abstand der beiden Primer erwartete Produkt mit der Länge von 239 bp.

In beiden Zelllinien war nach 48 h Exposition mit 1,2  $\mu$ T eine deutliche Abnahme der ER $\alpha$ -Expression zu beobachten, die auch nach 96 Std weiter bestand (Abb. 19). Eine entsprechende Abnahme konnte bei  $\beta$ 2-Mikroglobulin nicht beobachtet werden, was als Indiz dafür gewertet wird, dass es sich nicht um einem inkubationsbedingten allgemein zytodegenerativen Effekt handeln dürfte.



**Abb. 19: RT-PCR Produkte der mRNA für den Estrogenrezeptor ER $\alpha$  in den beiden Subklonen der Brustkrebszelllinien MCF-7 (P40 und p181) nach 48 Stunden und 96 Stunden Exposition mit 1,2  $\mu$ T**

### 3.8.2. cDNA-Mikro-Arrays

Um einen generelleren Überblick über die Veränderungen der Genexpression nach Magnetfeldexposition zu gewinnen, wurde die mRNA der behandelten Zellen auch mit dem Atlas Human Cancer Microarray 1.2 (Clontech) untersucht, auf dem sich cDNAs von 1176 krebisrelevanten Genen befinden.

Es erwies sich, dass für die Markierung der cDNA mit  $^{33}$ P eine sehr potente Reverse Transkriptase benötigt wird, um einen ausreichenden Einbau an Radioaktivität in die cDNA zu erhalten. Die von der Fa. Clontech im Atlas-Mikroarray mitgelieferte Reverse Transkriptase hatte eine zu geringe Aktivität. Mit der Superskript Reversen Transkriptase von Invitrogen wurde aus der gleichen Menge mRNA ein Vielfaches an cDNA gewonnen.

Da die Probenaufnahme in den Magnetfeldinkubatoren für Mikrotiterplatten ausgelegt war, konnten in den Magnetfeldinkubatoren nur zwei Zellkulturflaschen gleichzeitig exponiert werden. Deshalb konnte aus den exponierten Zellen keine ausreichende Menge RNA isoliert werden, um erfolgreich einen Mikroarray durchführen zu können. Für eine ausreichende Menge RNA hätte also die RNA aus mehreren Expositionen gepoolt werden müssen. Die Mikroarray-Versuche konnten wegen der beschriebenen experimentellen Probleme im Förderungszeitraum nicht mehr abgeschlossen werden.

## **4. Diskussion**

### **4.1. Onkostatistische Wirkung von Melatonin**

Die antiestrogene Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert. Während einigen Autoren zeigen konnten, das Melatonin das Wachstum der Brustkrebszellen direkt hemmt (Hill et al., 1988; Cos et al., 1991), waren andere Wissenschaftler nicht in der Lage, diese Beobachtungen zu bestätigen, obwohl sie nominell die gleiche Zelllinie für ihre Versuche verwendeten (Baldwin et al., 1998; Panzer et al., 1998).

Die meisten Versuche zur Melatoninwirkung wurden mit der Zelllinie MCF-7 durchgeführt. In den hier beschriebenen Versuchen wurden sowohl MCF-7 Zellen aus verschiedenen Laboratorien als auch die Brustkrebszelllinien EFM-19 und MDA-MB-361 verwendet. Da die MCF-7 Zellen in den verschiedenen Laboratorien unter verschiedenen Kulturbedingungen verwendet wurden, ist es wahrscheinlich zur Selektion verschiedener Subklone der MCF-7 Zelllinie gekommen, die bezüglich ihres Ansprechens auf Melatonin ganz unterschiedliche Eigenschaften haben. Dies wurde auch von Ram et al. (1998) in einer vergleichenden Studie an drei aus verschiedenen Laboratorien stammenden MCF-7 Zelllinien gezeigt.

Um eine für die Durchführung der Versuche zur Melatoninwirkung und zur Beeinflussung durch Magnetfelder geeignete Brustkrebszelllinie zu finden, wurden die oben aufgezählten Zelllinien zunächst ausführlich auf ihre proliferativen Eigenschaften, ihre Expression der beiden Estrogenrezeptoren ER $\alpha$  und ER $\beta$  sowie der Melatoninrezeptoren Mel 1a und RZR $\alpha$  untersucht. Der Estrogenrezeptor ER $\alpha$  wurde in allen untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen, während der Östrogenrezeptor ER $\beta$  in keiner der untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden konnte.

Für die Wirkung des Melatonins auf zellulärer Ebene sind verschiedene Rezeptoren verantwortlich. Diese Rezeptoren sind entweder in der Zellmembran lokalisiert oder sie befinden sich im Zellkern, wo sie wie ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren wirken. Während in den hier beschriebenen Untersuchungen der membranständige Rezeptor Mt1 nur in den MCF-7 Zellen nachgewiesen werden konnte, die mit dem mt1-Gen transfiziert waren, wurde der nukleäre Rezeptor RZR $\alpha$  in allen Zelllinien nachgewiesen. Er wurde in den Zelllinien EFM-19 und MDA-MB-361 am stärksten exprimiert. Anderen Arbeitsgruppen gelang es dagegen, sowohl den Mt1-Rezeptor als auch den nukleären RZR $\alpha$ -Rezeptor in den von ihnen untersuchten MCF-7 Zellen nachzuweisen (Ram et al., 1998; Song et al., 1997).

Es war bisher jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welcher der beiden Rezeptoren für die antiproliferative Wirkung des Melatonins in Brustkrebszellen verantwortlich ist.

Die Tatsache, dass in den hier beschriebenen Versuchen, wenn auch unter Schwierigkeiten und den beschriebenen experimentellen Modifikationen, eine antiproliferative Wirkung von Melatonin auf die Brustkrebszellen nachweisbar war, obwohl die Zellen keinen detektierbaren membranständigen Rezeptor exprimieren, der nukleäre Rezeptor dagegen in allen Zelllinien präsent war, deutet sehr stark darauf hin, dass der nukleäre Rezeptor RZR $\alpha$  für die antiproliferative Wirkung verantwortlich ist. Dieser Befund stimmt mit einem Bericht überein, der zeigte, dass bei Colonkarzinomzellen der RZR $\alpha$  für die antiproliferative Wirkung von Melatonin verantwortlich ist (Winczyk et al., 2002).

Die antiproliferative Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen ist auch von der Expression von Estrogenrezeptoren abhängig. In Brustkrebszellen, die keine Estrogenrezeptoren exprimieren, konnte keine antiproliferative Wirkung des Melatonin festgestellt werden (Hill et al., 1988). Die hier beschriebenen Untersuchungen haben eindeutig geklärt, dass alleine der Estrogenrezeptor  $\alpha$  an der antiproliferativen Wirkung des Melatonins beteiligt ist. Der Estrogenrezeptor  $\beta$  konnte in keiner der Melatonin-empfindlichen Brustkrebszellen nachgewiesen werden.

Die Stelle in den Signalkaskaden der Estrogen- und Melatoninrezeptoren, an der die Wechselwirkung („Crosstalk“) dieser beiden Signalwege stattfindet, konnte bisher jedoch noch nicht eindeutig ermittelt werden.

#### **4.1.1 Nachweis der onkostatischen Wirkung von Melatonin in verschiedenen MCF-7 Zellklonen**

In der Literatur besteht keine Einigkeit über die onkostatische Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen, insbesondere auf die Zelllinie MCF-7. Nicht wenige Wissenschaftler waren außer Stande, eine onkostatische Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen nachzuweisen (Baldwin et al., 1998; Panzer et al., 1998). In verschiedenen MCF-7 Zelllinien wurde tatsächlich eine unterschiedliche Empfindlichkeit von MCF-7 Zellen aus verschiedenen Quellen gezeigt (Ram et al., 1998).

Auch bei den hier beschriebenen Versuchen war es zunächst nicht möglich, die Melatoninwirkung auf verschiedene MCF-7 Zellen nachzuweisen (s. Abb.8 bis Abb.10). Erst durch eine veränderte Detektionsstrategie wurde es möglich, bei den verwendeten MCF-7 Zellen eine Wirkung des Melatonins nachzuweisen. Es wurden Dosis-Wirkungskurven von Estradiol in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener Melatoninkonzentrationen verglichen. Melatonin führte bei den Dosis-Wirkungskurven zu einer Rechtsverschiebung der Kurven. Dieses Phänomen hat zur Folge, dass in Gegenwart von Melatonin höhere Estradiolkonzentrationen notwendig waren, um in MCF-7 Zellen den gleichen proliferativen Effekt zu erzielen, wie in Abwesenheit von Melatonin (vergl. Tab. 2 und Tab.4). Bei der neu etablierten Zelllinie MCU1 war dies nicht der Fall (Tab.5). Bei einer gegebenen Estradiolkonzentration war das Wachstum der MCF-7 Zellen in Gegenwart von Melatonin geringer, d.h. Melatonin wirkt auf die Brustkrebszellen antiproliferativ/antiestrogen-artig. Dieser Effekt war bei mittleren Estradiolkonzentrationen (Konz:  $10^{-11}$  Mol/l) am stärksten. Bei einer Sättigung der Estrogenrezeptoren, wie sie bei ca.  $10^{-10}$ M Estradiol auftritt, war ein Unterschied zwischen dem Wachstum ohne Melatonin und dem Wachstum mit Melatonin nicht mehr zu beobachten.

Ob eine Melatoninwirkung auf Brustkrebszellen nachweisbar ist oder nicht, hängt also auch von der Estradiolkonzentration im Medium ab. Es ist also durchaus denkbar, dass die Autoren, die einen antiproliferativen Effekt von Melatonin auf die Brustkrebszellen nachweisen konnten (Hill et al., 1988; Cos et al., 1991), weniger Estradiol im Medium vorhielten, als die Autoren, denen der Nachweis der antiproliferativen Wirkung misslang (Baldwin et al., 1998; Panzer et al., 1998). Der Estrogengehalt des Kälberserums, das für die Kulturmedien verwendet wird, unterliegt Chargen-abhängig gewissen Schwankungen. Des Weiteren ist die Melatoninwirkung auf Brustkrebszellen auch abhängig von der Zelldichte, mit der die Zellen in die Tests ausgesät werden (S. Hill, Tulane-University, New

Orleans, persönliche Mitteilung). Deshalb erwies es sich bei den beschriebenen Untersuchungen auch als vorteilhaft, die Zellzahl im Test von 1500 Zellen/well auf 750 Zellen/well zu reduzieren (Girgert et al., 2003). Mit dem etablierten Testsystem ließen sich schließlich auch die Einflüsse von Magnetfeldern auf die Melatoninwirkung nachweisen.

Die Beobachtung, dass es äußerst schwierig ist, MCF-7 Subklone zu identifizieren, deren Proliferation mit Melatonin hemmbar ist, lässt u.a. den Schluss zu, dass die Hemmbarkeit von Brustkrebszellen durch Melatonin verhältnismäßig selten auftritt, und dass die Brustkrebszellen, die als permanente Zelllinien im Labor kultiviert wurden, im Laufe der Zeit nach vielen Passagen ihre Fähigkeit verlieren, auf Melatonin zu reagieren. Die in diesem Projekt aus einer Primärkultur etablierte Zelllinie MCU-1 zeigt in den ersten 15 Passagen noch eine Hemmbarkeit durch Melatonin (s. Tabelle 5).

#### **4.2. Einfluss verschiedener Magnetfeldstärken auf die Melatoninwirkung**

Die Abb.16 und die Tabellen 4 und 5 zeigen, dass insbesondere eine magnetische Flussdichte von 1,2  $\mu\text{T}$  die antiproliferative Wirkung von Melatonin aufheben kann. Bei höheren Feldstärken, wie 10  $\mu\text{T}$  und 100  $\mu\text{T}$  war dieser Effekt nicht mehr oder nicht mehr so stark zu beobachten. Dieses Phänomen, dass Magnetfelder bei einer bestimmten Stärke einen maximalen Effekt zeigen, und bei weiterer Erhöhung der Feldstärke dieser Effekt wieder abnimmt, wird als Fenstereffekt bezeichnet und wurde auch bei der Untersuchung anderer Effekte beschrieben (Litovitz et al., 1992). Experimentell wurde eine besonders starke Erhöhung der Expression des Histons 2B in HL-60 Zellen nach Exposition mit 10  $\mu\text{T}$  beobachtet, die bei 100 $\mu\text{T}$  wieder abnahm (Goodman et al., 1991). Bei 1  $\mu\text{T}$  wurde nach 48 Stunden Exposition mit 16,7 Hz eine besonders häufig auftretende Fehlbildung bei Hühnerembryonen beschrieben (Juutilainen et al., 1986).

Leider unterlagen die Werte der Einzelmessungen des Magnetfeldeffekts auf die Melatoninwirkung sehr starken Schwankungen, so dass die gepoolten Ergebnisse/Unterschiede bei keiner Versuchsbedingung statistisch signifikant waren. In jedem Einzelversuch wurde jedoch die gleiche Tendenz der Wirkung des Magnetfeldes beobachtet.

Die hemmende Wirkung niederfrequenter Magnetfelder auf die Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen wurde in der Zwischenzeit auch durch zwei weitere Publikationen bestätigt (Ishido et al., 2001; Blackman et al., 2001). Das Wachstum von MCF-7-Zellen wurde durch Melatonin um 16,7 % gehemmt, wurden die Zellen einem Magnetfeld von 1,2  $\mu\text{T}$  ausgesetzt, wuchsen die Zellen genauso schnell wie in der unbehandelten Kontrolle

(Blackman et al., 2001). Bei Liburdy et al. (1993) wurde das Wachstum durch Melatonin um 18 % gehemmt und die Hemmung durch 1,2  $\mu$ T vollständig aufgehoben (Liburdy et al., 1993).

#### **4.2.1. Vergleich der Versuchsergebnisse mit den von Liburdy et al. erzielten Werten**

Die Dosis-Wirkungskurven von Estradiol in Gegenwart von Melatonin (s. Abb. 13) zeigen eindeutig, dass die durch Melatonin bewirkte Hemmung der Zellproliferation in den MCF-7-Zellen vom Estrogengehalt des Mediums abhängig ist, in dem die Zellen kultiviert werden.

Während bei  $10^{-10}$  M Estradiol kein Unterschied zwischen der Kultur mit Melatonin und der ohne Melatonin zu beobachten ist, wird die Proliferation der MCF-7 Zellen durch  $10^{-9}$  M Melatonin bei  $10^{-11}$  M Estradiol, der Konzentration, bei der der Melatonineffekt am größten ist, um durchschnittlich 14 % gehemmt.

Liburdy erreichte mit  $10^{-9}$  M Melatonin eine Wachstumshemmung von 18%. Bei 1,2  $\mu$ T Magnetfeldeinwirkung hat Liburdy diese Wachstumshemmung durch Melatonin nicht mehr beobachtet. Bei unseren Messungen kam es bei  $10^{-11}$  M Estradiol bei 1,2  $\mu$ T aufgrund der beobachteten Linksverschiebung der Dosis-Wirkungskurve sogar zu einer Proliferationssteigerung (+23 %) durch  $10^{-9}$  M Melatonin. Allerdings sind diese Werte wegen der großen Schwankungen zwischen den drei Einzelmessungen statistisch nicht signifikant.

#### **4.3. Einfluss verschiedener Magnetfeldstärken auf die Tamoxifenwirkung**

Bei den Versuchen mit Tamoxifen fällt zunächst der Unterschied in der Empfindlichkeit der verwendeten Zellen gegenüber der antiestrogenen Wirkung von Tamoxifen auf (vergleiche Abb.17 und Abb. 18). Während Liburdy bei 0,2  $\mu$ T mit  $10^{-7}$  M Tamoxifen bereits eine Wachstumshemmung von 40 % und bei 1,2  $\mu$ T von 17 % beobachtete, war bei unseren Versuchen bei dieser Tamoxifenkonzentration je nach verwendetem Zellklon der MCF-7-Zellen noch eine Wachstumsstimulation um 3 % (p40) bzw. 26 % (p181) zu beobachten.

Bei  $10^{-6}$  M Tamoxifen war das Wachstum bei den Versuchen von Liburdy bei 0,2  $\mu$ T um ca. 70 % gehemmt, bei unseren Versuchen betrug die Hemmung bei 0,2  $\mu$ T 48 % (p40)

bzw. 39 % (p181). Bei 1,2  $\mu\text{T}$  beobachtete Liburdy ebenfalls eine Hemmung um 70 %, während in unseren Versuchen in den p40-Zellen eine 27 %ige Hemmung gemessen wurde und in den p181-Zellen bei 1,2  $\mu\text{T}$  sogar eine um 3 % erhöhte Zellzahl ermittelt wurde.

Zusammenfassend zeigen die MCF-7-Zellen aufgrund von nicht näher definierten Unterschieden zwischen den verwendeten Zellklonen eine sehr unterschiedliche Hemmbarkeit durch Tamoxifen, was den Vergleich zwischen den Ergebnissen der einzelnen Arbeitsgruppen erschwert. Prinzipiell konnten wir einen Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Tamoxifenwirkung bestätigen.

Aus klinischer Sicht ist auf jeden Fall die Tatsache sehr beachtenswert, dass gerade bei der Konzentration, die bei der Behandlung von Brustkrebspatientinnen im Serum erreicht wird ( $10^{-6}$  M), die Tamoxifenwirkung durch Magnetfelder  $>0,2 \mu\text{T}$  abgeschwächt, bzw. die Dosiswirkungskurve derart nach rechts verschoben wird, dass anstatt einer Proliferationsinhibition in diesem Konzentrationsbereich eine maximale estrogenartige Proliferationssteigerung beobachtet wird. Sollte dieser Effekt auch in vivo auftreten, könnte dies u.U. bei Einwirkung von alltäglichen Umgebungsfeldern zu einer Abschwächung oder Verzögerung des Therapieerfolges führen.

#### **4.4. Mögliche Erklärungen für den Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Tamoxifenwirkung**

Von einer *direkten* hormonartigen Wirkung einer Substanz spricht man allgemein, wenn diese mit dem entsprechenden endogenen Hormonrezeptor in Wechselwirkung tritt und

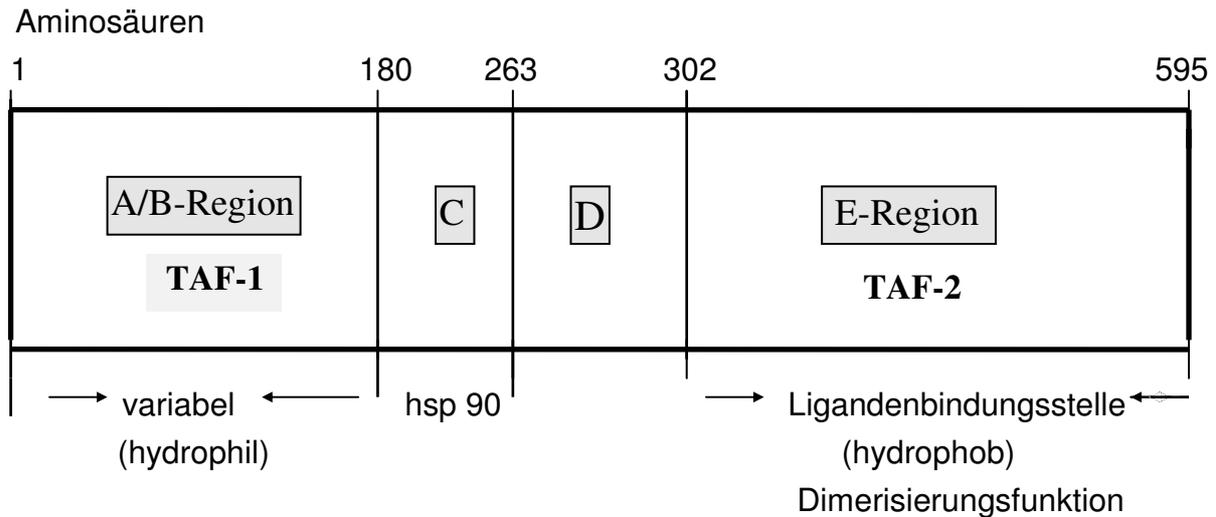
- a) nach Aktivierung des Rezeptors die Wirkung des endogenen Hormons in den Zellen der Zielgewebe simuliert (agonistische Wirkung), oder
- b) durch die Inaktivierung des Rezeptors eine Bindung des Hormons verhindert und folglich antagonistisch wirkt. Eine Bindung an den Rezeptor mit relativ hoher Affinität aber geringer intrinsischer Aktivität kann in Gegenwart stärker intrinsisch wirksamer Liganden zu einem kompetitiven Antagonismus führen.

Der Primäreffekt der Estrogene ist die Stimulation der mitotischen Aktivität in Geweben des weiblichen Genitaltraktes.

Die Primärwirkung der Estrogene wird durch Bindung an den spezifischen Estrogenrezeptor (ER) ausgelöst, der zur konservierten Familie der Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren gehört. Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren kommen im gesamten Reich der Wirbeltiere vor. Der humane ER ist ein nukleäres 66 kDa-Protein, welches als ein hormonaktivierter Transkriptionsfaktor fungiert (Abb. 20). Die DNA-bindende Region (C-Region) des Estrogenrezeptors ist bei den verschiedenen Arten hoch konserviert, während die Länge der N-terminalen Region (A/B-Region) relativ variabel ist.

c) Die Aktivierung des Estrogenrezeptors ist nach heutigem Kenntnisstand eine Folge der durch die Ligandenbindung induzierten Änderungen in der Struktur des Rezeptors (Kumar & Chambon 1988; Tsai et al. 1988). Freies, extrazelluläres  $17\beta$ -Estradiol überwindet aufgrund seiner Lipophilie leicht die Zell- und Kernmembran und führt nach Bindung an den ER und Abspaltung des assoziierten 90 kDa Hitzeschock-Proteins (Hsp 90) zur Dimerisierung des Rezeptors. Dieser aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex bindet mit hoher Affinität an eine gut definierte DNA-Sequenz von 13 Basenpaaren, das estrogenresponsive Element (ERE) (Evans 1988; Kumar & Chambon 1988; Beato et al. 1995). Die enhancerähnlichen ERE-Sequenzen sind nahe bei oder innerhalb von estrogenabhängigen Genen lokalisiert (Beato 1991). Nach Bindung an das ERE aktiviert der ER die Transkription der entsprechenden Gene, was nach noch nicht geklärten Mechanismen zur Stimulation der Zellproliferation führt (Dubik & Shiu 1988; Weisz & Bresciani 1988). Ein direkter Zusammenhang von ER-vermittelter Gentranskription und estradiolvermittelter Zellproliferation wird durch *in vivo* und *in vitro* Studien mit Antiöstrogenen nahegelegt (DeFriend et al. 1994). Antiöstrogene unterdrücken die Expression von estrogen-regulierten Genen und reduzieren die Proliferation von ER-positiven Brustzellen, während  $17\beta$ -Estradiol ein Mitogen für das Brustepithel ist (Dubik & Shiu 1988; Weisz & Bresciani 1988; DeFriend et al. 1994).

Nach diesem bekannten Wirkungsmechanismus ist eine breitere "moderne" Definition der estrogenen Wirkung einer Substanz die *Stimulation der Expression eines Reportergens, dessen Expression unter der Kontrolle des estrogenresponsiven Elements (ERE) steht*.



**Abb. 20: Schematische Darstellung der Sequenz des humanen Estrogenrezeptors alpha.**

Durch Deletionsanalysen konnte gezeigt werden, dass die A/B-Domäne trotz ihrer starken interspeziesvariablen für die volle Aktivität des ER verantwortlich ist, was darauf hinweist, dass diese Domäne ein Potential zur transkriptionalen Aktivierung besitzt (Kumar et al. 1987). Während diese Aktivierungsfunktion (TAF-1) konstitutiv wirksam ist, scheint die Aktivierungsfunktion TAF-2, die in der Ligandenbindungsdomäne lokalisiert ist, von Konformationsänderungen abzuhängen, die durch die Bindung des Hormons induziert werden (Webster et al. 1988). Die Aktivität von TAF-1 und TAF-2 hängt stark vom Promotor-Kontext und vom Zelltyp ab, der für Cotransfektionsstudien verwendet wird (Tora et al. 1989; Bocquel et al. 1989).

Vor einiger Zeit wurden bei Mensch und Ratte eine zweite Form des ER entdeckt, die als beta-Form bezeichnet wird (Kuiper et al. 1996). Der ER $\beta$  ist mit 55 kDa kleiner als der ursprünglich entdeckte Estrogenrezeptor ER alpha und hat eine völlig andere N-terminale Domäne. Während im humanen Brust- und Endometriumsgewebe kein ER $\beta$  gefunden wurde, kommt in den Granulosazellen ausschließlich die beta-Form vor. In den Ovarien und der Lunge kommen alpha- und beta-Form in etwa gleicher Menge vor.

Das Medikament Tamoxifen, das routinemäßig in der Krebstherapie gegen estrogenabhängige Tumore eingesetzt wird, gehört zur Gruppe der Estrogenantagonisten. Sein Wirkort ist der Estrogenrezeptor in den Tumorzellen (Osborne, 1998). Bei den Estrogenantagonisten unterscheidet man eine Gruppe der vollständigen Antagonisten von einer Gruppe von partiellen Antagonisten. Die Wirkung der partiellen Antagonisten ist stark von den zellulären Eigenschaften der Tumorzellen abhängig, auf die das Medikament

einwirkt (Berry et al., 1990; Shang et al., 2002). Die partiellen Antagonisten wirken bei niedrigen Konzentrationen auf bestimmte Zellen antiproliferativ, während sie auf andere Zellen zunächst proliferationssteigernd wirken. Tamoxifen zählt zu diesen partiellen Antagonisten.

Die effiziente Bildung von Heterodimeren aus alpha- und beta-Form wurde nachgewiesen und könnte mit der unterschiedlichen Wirkung des Estrogen-Antagonisten Tamoxifen im Brustgewebe im Vergleich zu anderen Zielgeweben im Zusammenhang stehen.

Brustkrebszellen, die Estrogenrezeptoren exprimieren, sprechen normalerweise auf die antiproliferative Wirkung von Tamoxifen an. Nach längerer Behandlung der Brusttumore entwickelt jedoch ein Grossteil der behandelten Tumoren eine Resistenz gegen Tamoxifen. Diese Tumore beginnen dann sogar trotz Tamoxifenbehandlung wieder schneller zu wachsen und die weitere Behandlung mit Tamoxifen führt zu keinem weiteren Heilungserfolg (Horwitz, 1995).

Das Verhalten der Brustkrebszellen, die in unseren Versuchen mit Magnetfeldern behandelt wurden, ähnelt sehr dem Verhalten der Zellen von Brusttumoren, die eine Tamoxifen-Resistenz entwickelt haben. Bei niedriger Konzentration, unter  $10^{-6}$ M wirkt Tamoxifen bei Behandlung mit  $0,2 \mu\text{T}$  und  $1,2 \mu\text{T}$  proliferationssteigernd im Vergleich zur Inkubation ohne einwirkende Magnetfelder (s. Abb.17 und Abb.18).

Bei der klinischen Entstehung der Tamoxifen-Resistenz wurden in den resistenten Tumoren Veränderungen in der Genexpression verschiedener Kofaktoren der Estrogenrezeptoren beobachtet (Graham et al., 2000).

In den letzten Jahren wurden mehrere Proteine identifiziert (SRC-1; TIF2/GRIP1; SMRT, N-CoR), welche mit der TAF-2 von verschiedenen Steroidrezeptoren in einer hormonregulierten Weise interagieren und somit deren Transkriptionsaktivität stimulieren (Oñate et al. 1995; Voegel et al. 1996; Hong et al. 1996). Diese Proteine werden deshalb als Steroidrezeptor-Coaktivatoren bezeichnet. Diese Kofaktoren sind Bestandteil des Transkriptionskomplexes, der sich an den estrogenabhängig exprimierten Genen bildet, wenn der Estrogenrezeptor an den Promoter dieser Gene gebunden wird. Diese Kofaktoren vermitteln zwischen dem Estrogenrezeptor und der RNA-Polymerase, die die Gene abliest (Govind et al., 2001).

Bei diesen Kofaktoren werden grundsätzlich Faktoren unterschieden, die die Expression der Gene fördern (Koaktivatoren) und Faktoren, die die Expression der Gene hemmen (Korepressoren). Bei der Entstehung der Tamoxifen-Resistenz nach längerer klinischer

Behandlung mit Tamoxifen ist das Verhältnis zwischen Koaktivatoren und Korepressoren zu Gunsten der Koaktivatoren verschoben (Murphy et al., 2002). Bei einem Übergewicht an Koaktivatoren wirkt Tamoxifen dann unerwünschterweise proliferationssteigernd.

Es ist durchaus denkbar, dass niederfrequente Magnetfelder das Gleichgewicht zwischen Koaktivatoren und Korepressoren zugunsten der Expression der Koaktivatoren verschiebt und Tamoxifen deshalb in den mit Magnetwechselfeldern exponierten Zellen stärker proliferativ wirkt als in den Zellen, die nicht diesem Magnetfeld ausgesetzt waren.

Der Einfluss der Exposition von Brustkrebszellen mit Magnetwechselfeldern auf die Expression verschiedener Gene wurde deshalb in den beiden MCF-7 Zellklonen, die sich in ihrem Verhalten im Magnetfeld unterscheiden untersucht (Klone p40 und p181).

Mittels RT-PCR wurde erstmalig gezeigt, dass die Expression des Estrogenrezeptors  $\alpha$  nach 48 Stunden Behandlung der MCF-7 Zellen mit 1,2  $\mu\text{T}$  abnimmt und dieser Effekt auch nach einer Exposition von 96 Stunden noch nachweisbar war. In Anbetracht der Tatsache, dass im Magnetfeld die Proliferation der Brustkrebszellen in Gegenwart niedriger Konzentrationen von Tamoxifen sogar ansteigt, würde man eigentlich eher eine Erhöhung der Expression der Estrogenrezeptoren erwarten. Um der beobachteten Herunterregulierung der Estrogenrezeptor-Expression entgegenzuwirken, muss daher die Expression der Estrogenrezeptor-Koaktivatoren besonders deutlich ansteigen, damit das Tamoxifen dennoch proliferativ wirken kann.

Um die vermutliche Rolle der Koaktivatoren bei der Induktion der Tamoxifen-Resistenz durch elektromagnetische Wechselfelder aufzuklären, sind daher dringend weitere Untersuchungen zur Expression der Koaktivatoren und Korepressoren in Brustkrebszellen, die mit elektromagnetischen Feldern exponiert wurden, angezeigt.

Die Untersuchungen, die mit dem Atlas-Cancer Microarray durchgeführt wurden, haben wegen der in 3.8 beschriebenen experimentellen Schwierigkeiten einerseits kein greifbares Ergebnis erbracht, auf der anderen Seite hat sich dieser Microarray zur Klärung der Frage nach der Tamoxifen-Resistenz als nicht geeignet erwiesen: Obwohl auf diesem Micro-Array 1176 verschiedene krebsrelevante Gene untersucht werden können, sind die Gene für die Koaktivatoren und Korepressoren der Estrogenrezeptoren nicht unter den Genen, die mit diesem Micro-Array nachgewiesen werden können.

Es bleibt jedoch weiterhin die sehr interessante Fragestellung bestehen, den Ursachen der erworbenen Tamoxifen-Resistenz nachzugehen, die durch unsere Versuche nachweislich durch die Exposition mit Magnetwechselfeldern induziert wird.

#### 4.5. Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Zum Thema der biologischen Wirkung von elektromagnetischen Feldern sind im Förderungszeitraum von 2000 bis 2003 ist eine größere Anzahl von Untersuchungen in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht worden. Es können grundsätzlich drei verschiedene Ebenen unterschieden werden, auf denen solche Untersuchungen durchgeführt wurden. Auf dem Gebiet der Epidemiologie werden in erster Linie statistische Zusammenhänge zwischen der Häufigkeit des Auftretens von gesundheitlichen Beschwerden in Abhängigkeit von der Exposition mit elektromagnetischen Feldern untersucht. Bei den labor-experimentellen Arbeiten kann zwischen Untersuchungen über die Induktion bzw. Promotion von Tumoren in Versuchstieren durch elektromagnetische Felder sowie Veränderungen im Proliferationsverhalten von Zellen in der Zellkultur und Untersuchungen zum zellulären Mechanismus, z.B. Veränderungen in der Genexpression, unterschieden werden.

Die verschiedenen epidemiologischen Untersuchungen zeigen auch weiterhin teilweise widersprüchliche Ergebnisse, was darauf hinweist, dass die Effekte, falls überhaupt vorhanden, sehr schwach sind, so dass sie möglicherweise in den statistischen Schwankungen verschwinden.

Tumorarten, die bei diesen epidemiologischen Untersuchungen besondere Beachtung finden, sind das Mammakarzinom und Leukämien. Während eine Studie in Norwegen ein erhöhtes Brustkrebsrisiko bei Frauen ergab, die in der Nähe von Hochspannungsleitungen leben (Kliukiene et al., 2004), konnte bei einer Untersuchung von 813 Frauen im Alter von 20 – 74 Jahren in Amerika kein Zusammenhang zwischen der Höhe der nächtlichen Exposition mit Magnetfeldern und dem Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, festgestellt werden (Davis et al, 2002). Bei der Induktion von Leukämien konnte bei Erwachsenen keine signifikante Assoziation zwischen der Erkrankung und der Exposition mit elektromagnetischen Feldern, die stärker als  $0,1 \mu\text{T}$  waren, nachgewiesen werden (Hocking, 2004; Tynes et al. 2003). Bei kindlichen Leukämien sieht die Situation etwas anders aus. In einem von Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit geförderten Projekt (StSch4118) konnte gezeigt werden, dass bei häuslichen Expositionen mit Magnetfeldern über  $0,4 \mu\text{T}$  bei Kindern ein leicht erhöhtes Risiko für eine Leukämieer-

krankung besteht. Magnetfelder dieser Stärke wurden allerdings nur in 1,4 % aller untersuchten Wohnungen gemessen. Auf Grund ihrer Untersuchungen schätzten die Autoren, dass etwa 1 % aller Leukämien bei Kindern möglicherweise der Exposition durch elektromagnetische Felder zuzuschreiben sind (Schüz und Michaelis, 2000).

Neben der Exposition mit elektromagnetischen Feldern, die von elektrischen Leitungen ausgehen, wurde bei einigen Untersuchungen zur Entstehung von Brustkrebs durch elektromagnetische Felder ein besonderes Augenmerk auf die Verwendung von elektrischen Heizdecken gelegt, bei denen aufgrund der unmittelbaren Nähe der Feldquelle die Exposition besonders stark ist. Ein epidemiologischer Vergleich von Heizdeckennutzerinnen mit Nichtnutzerinnen ergab zwar bei postmenopausalen Frauen eine Odd-ratio von 1,2, diese wurde jedoch nicht als signifikant erachtet (Kabat et al., 2003). In einem Editorial der Zeitschrift *Epidemiology* wurden jedoch einige Schwächen dieser Studie diskutiert. Das Design der Studie war demnach nicht kompatibel mit der zugrunde liegenden Hypothese und die Beobachtungen waren im Grenzbereich der erwarteten Effekte (Kundi, 2004). Bei einer Untersuchung unter Afro-amerikanischen Frauen wurde jedoch bei einer Verwendung von Heizdecken länger als 10 Jahre eine Odd-ratio von 4,9 erreicht. (Zhu et al., 2003).

In einem Rattenmodell wurde bevorzugt der Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Induktion von Brustkrebs durch das Karzinogen 7,12 Dimethyl-Benz[a]-Anthracen (DMBA) untersucht. Auch bei diesen Untersuchungen werden widersprüchliche Ergebnisse berichtet. Während bei den meisten Untersuchungen die Häufigkeit des Auftretens von Brusttumoren in Ratten, die mit DMBA behandelt wurden, bei Magnetfeldexposition erhöht war (Fedrowitz et al., 2002), wurde bei Untersuchungen von Anderson keine kokarzinogene Wirkung von elektromagnetischen Feldern beobachtet (Anderson et al., 1999). Diese Widersprüche konnten teilweise durch Unterschiede in der genetischen Ausstattung der verschiedenen verwendeten Rattenstämme erklärt werden. Bei dem Rattenstamm, bei dem die karzinogene Wirkung von DMBA durch Magnetfelder nicht erhöht werden konnte, zeigten die Ratten schon bei der alleinigen Anwendung von DMBA ein stärkeres Wachstum der Tumore als bei dem Rattenstamm, bei dem die DMBA-Wirkung durch Magnetfelder verstärkt wurde (Fedrowitz et al., 2004).

Zur Magnetfeldwirkung auf Brustkrebszellen wurden auch von anderen Arbeitsgruppen in den letzten Jahren Untersuchungen durchgeführt und veröffentlicht. Zwei Publikationen berichteten über eine Wiederholung der Versuche von Liburdy zur Hemmung der Melato-

ninwirkung auf Brustkrebszellen durch elektromagnetische Felder von 1,2  $\mu\text{T}$  (Ishido et al., 2001; Blackman et al. 2001). Beide Autoren benutzten die originalen MCF-7 Zellen, die ihnen von Dr. Liburdy zur Verfügung gestellt wurden und beide konnten die Effekte bestätigen.

Am häufigsten wurden in den letzten Jahren Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit Veränderungen der Genexpression im Magnetfeld beschäftigten. Lacy-Hulbert et al. (1998) geben einen ausführlichen Überblick über die Gene, deren Expression von elektromagnetischen Feldern beeinflusst sein können. Es gibt mehrere Arbeiten, die sich mit der Beeinflussung des intrazellulären Calcium-Transports befassen. 100  $\mu\text{T}$  eines 50 Hz Wechselfeldes bewirkten in der Leukämiezelllinie Jurkat eine Erhöhung des cytosolischen Ca-Spiegels um 200-400 %. Das Calcium wird dabei aus intrazellulären Calcium-Speichern freigesetzt, denn parallel zum Anstieg des cytosolischen Calciums wurde auch ein 15-20-facher Anstieg des second messengers Inositoltriphosphat gemessen, der für die Öffnung der Calciumkanäle in den intrazellulären Calcium-Speichern verantwortlich ist (Lindström et al., 1993). Für die Fragestellung, ob elektromagnetische Felder in der Lage sind, die Entstehung von Tumoren zu begünstigen, sind die Gene von besonderem Interesse, die an der Regulation der Zellteilung beteiligt sind. Die meisten Untersuchungen befassten sich mit der Expression des c-myc- oder des hsp70-Gens und wurden mit der Leukämiezelllinie HL60 durchgeführt. Während ein Teil der Autoren Veränderungen der Expression feststellte, konnten andere diese Beobachtungen nicht bestätigen. Während Goodman et al (1992) über eine Erhöhung der c-myc Expression in HL-60 Zellen nach Exposition mit niederfrequenten Magnetfeldern berichteten, konnte eine Wiederholung der Experimente diesen Einfluss auf die c-myc-Expression nicht bestätigen (Owen et al., 1998, Loberg, 1999). Ein weiteres für die Zellteilung wichtiges Gen ist die Ornithindecaboxylase (ODC), ein Enzym, das für die Entwindung der DNA vor der Replikation wichtig ist. In den Leukämiezelllinien Jurkat und CEM-CM3 und in einer Fibroblastenzelllinie wurde eine Erhöhung der ODC-Aktivität durch 5  $\mu\text{T}$  eines 60 Hz Wechselfeldes beobachtet (Valtersson et al., 1997; Mullins et al, 1999). Boorman et al konnten den EMF-Effekt auf die ODC-Aktivität dagegen nicht bestätigen (Boorman et al., 2000). Ein weiteres Gen, dessen Expression mit dem Wachstum von Zellen assoziiert ist, ist das growth-associated protein 43 (GAP-43). In Gliomazellen stieg die GAP-43 Expression innerhalb von 10 Stunden durch die Exposition der Zellen mit 5 mT (50Hz) auf einen Maximalwert an, und kehrte trotz weiterer Exposition im Magnetfeld nach 24 Stunden wieder auf den Normalwert ab (Ding et al., 2002). Diese Beobachtung zeigt, dass es sehr wichtig ist, den richti-

gen Zeitpunkt für die Messung eines Parameters zu finden, um die maximale Wirkung zu erfassen. Diese Tatsache könnte auch eine Ursache für die widersprüchlichen Beobachtungen sein, die des Öfteren bei den Untersuchungen zur Magnetfeldwirkung beschrieben werden. Als ein Mechanismus zur veränderten Genexpression nach Magnetfeldexposition wurden Veränderungen des DNA-Bindungsverhaltens des Transkriptionsfaktors CREB (cAMP-response Element binding Protein) durch einen Gel-shift –Assay beobachtet. Bei 100  $\mu$ T wurde in HL-60 Zellen nach einer Stunde eine deutlich stärkere Bindung des CREB-Proteins an den Promoter cAMP-abhängiger Gene gemessen (Zhou et al., 2002). Die Expression des Hitzeschock-Proteins HSP70 wurde ebenfalls häufig in verschiedenen biologischen Systemen nach Exposition mit elektromagnetischen Wechselfeldern untersucht. Das Hitzeschock-Protein gilt als ein wichtiger Parameter, der auf zellulären Stress hinweist. In Hühnerembryonen war die Expression der HSP-70 RNA nach vier Tagen Exposition im Magnetfeld um 27 % gegenüber den Kontrollembryonen reduziert (Di-Carlo, 2002). In Zellen, die mit einem Cholinacetyltransferase-Gen (CAT-Assay) transfiziert waren, dessen Expression von einem HSP-Promoter gesteuert war, war die Enzymaktivität nach Magnetfeldbehandlung um das 2,3-fache erhöht (Lin, et al., 1998). In anderen zellulären Systemen konnten solche Einflüsse von Magnetfeldern auf die HSP-70 Expression nicht nachgewiesen werden (Morehouse, 2000; Shi, 2003).

Die Arbeitsgruppe von R. Goodman, von der in den 90er Jahren viele Untersuchungen zur Genregulation durch elektromagnetische Felder veröffentlicht wurden, hat sogar ein elektromagnetisches response Element definiert, das Teil des Promoters der Gene ist, die durch elektromagnetische Felder reguliert werden. Die Sequenz dieses „elektromagnetischen response Elements“ wird als nCTCTn angegeben und kommt im Promoter des c-myc Gens achtmal vor, im Promoter des Hitzeschock-Proteins dreimal (Lin et al., 2001). Die Entfernung dieser drei nCTCTn-Sequenzen aus dem Promoter des Hitzeschock-Proteins verhindert, dass die HL-60 Zellen auf elektromagnetische Felder mit der Expression von HSP70 reagieren.

Untersuchungen zur Genexpression nach Magnetfeldexposition in Brustkrebszellen sind bisher nicht veröffentlicht worden.

#### 4.6. Schlussfolgerungen und Ausblick

Mit der Konstruktion der für dieses Projekt hergestellten speziellen Inkubatoren konnten Expositionsbedingungen erzeugt werden, die in Bezug auf die Stabilität und Homogenität des erzeugten Feldes von keinem anderen in der Literatur beschriebenen Versuchsaufbau erreicht wurden. Es ist daher sehr wünschenswert, diese Inkubatoren für weitere Untersuchungen zur Wirkung von Magnetfeldern auf Zellkulturen zu verwenden. Von besonderem Interesse sind dabei weiterführende Untersuchungen zur Beeinflussung der Genexpression durch die erzeugten elektromagnetischen Felder als Ursache für das beobachtete veränderte Wachstumsverhalten der Brustkrebszellen. Letztendlich ist es von großer Bedeutung, den zellulären Mechanismus aufzuklären, über den die Interaktion der elektromagnetischen Felder mit den verschiedensten biologischen Systeme stattfindet. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Feldwirkung liefert die Grundlage für eventuell notwendige Schutzmaßnahmen. In der wissenschaftlichen Literatur wurde eine Vielzahl an Beobachtungen beschrieben, die eine Veränderung der Genexpression durch elektromagnetischen Felder in unterschiedlichen Zellsysteme zeigten (Mevissen et al., 1995; Mullins et al., 1999, DiCarlo et al., 2002). Auf der anderen Seite gibt es eine etwa gleich große Zahl an Berichten, die einen solchen Einfluß der Magnetfelder nicht bestätigen konnten (Loberg et al., 1999, Boorman et al., 2000, Morehouse et al., 2000). Dieser Widerspruch in den Ergebnissen ist einerseits darauf zurückzuführen, dass die Untersuchungen mit unterschiedlichen Zelllinien durchgeführt würden, als weitere Ursache können unterschiedliche Kulturbedingungen bei den Untersuchungen angesehen werden. Bisher hat der Einfluss der in herkömmlichen Zellkulturinkubatoren vorhandenen Magnetfelder auf die kultivierten Zellen keine Beachtung gefunden. Eigene Messungen in Inkubatoren verschiedener Hersteller haben deutliche Unterschiede bei der Stärke des permanent vorhandenen magnetischen Wechselfeldes ergeben. Die gemessenen Feldstärken reichen von  $0,1 \mu\text{T}$  bis  $> 2 \mu\text{T}$ . Es gibt in der klinischen Anwendung eine Reihe von Methoden, bei denen Gewebe unter realen Bedingungen eine gewisse Zeit in handelsüblichen Inkubatoren inkubiert und später einer Person/einem Patienten retransplantiert werden. Zu diesen medizinischen Anwendungen gehören die in-vitro-Kultur von Stammzellen, die zur Knochenmarkstransplantation bei Leukämiepatienten eingesetzt werden, in-vitro-Chemotherapien von Knochenmarksstammzellen, die zur autologen Transplantation verwendet werden und in neuerer Zeit auch Zellen, die in der Immun- und Genthera-

pie bei soliden und hämatologischen Systemerkrankungen zur Anwendung kommen. Auch bei der künstlichen Befruchtung werden die Oozyten eine Zeit lang in gängigen Zellkulturinkubatoren kultiviert, bevor sie den Müttern eingepflanzt werden. Entsprechende Untersuchungen werden derzeit in Zusammenarbeit mit der Abteilung für in-vitro Fertilisation in unserer Arbeitsgruppe vorbereitet.

Sollten sich unter den routinemäßigen Inkubationsbedingungen relevante Genmodulationen nachweisen lassen, wäre die Konstruktion und Herstellung von Abschirmeinrichtungen gegenüber magnetischen Wechselfeldern oder die Neuentwicklung neuer feldarmer Inkubatoren für derartige Gewebebehandlungen eine kommerziell verwertbare Anwendung der hier gewonnenen Erkenntnisse. Aufgrund der genannten Vielzahl der möglichen Anwendungsbereiche und der weit verbreiteten Anwendung der jeweiligen Technologien wäre von einem sehr großen Nach- oder Umrüstungsbedarf in den verschiedenen Laboratorien auszugehen.

Die Ergebnisse, die bei unseren Versuchen mit **Melatonin** ermittelt wurden, weisen auf ein prinzipiell ähnliches Verhalten der Brustkrebszellen hin, wie es von Liburdy et al. beschrieben wurde. Eine eindeutige Aussage lässt sich jedoch aus den Melatoninversuchen leider nicht ableiten, weil die Schwankungen der Messwerte zwischen den mehrfach wiederholten Versuchen so groß waren, dass die Effekte nicht als statistisch signifikant angesehen werden können.

Auffallend ist jedoch, dass die von uns beobachteten Effekte, wie auch zuvor von Liburdy beschrieben, nur bei einer Expositionsfeldstärke von  $1,2 \mu\text{T}$  deutlich in Erscheinung traten. Die weiterführenden Untersuchungen der Effekte bei  $10 \mu\text{T}$  und  $100 \mu\text{T}$ , die bisher von keinem anderen Autor beschrieben wurden, haben ergeben, dass die Beeinflussung der Melatoninwirkung durch elektromagnetische Felder im Bereich von etwa  $1 \mu\text{T}$  ein Maximum besitzt und bei höheren Feldstärken wieder schwächer wird. Der Nachweis dieses Wirkungsfensters könnte eine Erklärung dafür sein, warum manche Arbeitsgruppen die Effekte nicht nachweisen konnten, wenn die effektiven Expositionsbedingungen von denen Liburdy's abwichen. Ein ähnlicher Fenstereffekt der Magnetfeldwirkung wurde auch bei der Expression von Histon m-RNA in HL-60 Zellen, bei Veränderungen der Entwicklung von Hühnerembryonen und beim Knochenwachstum beobachtet (Litovitz et al. 1992). Unsere Beobachtung eines Fenstereffekts bei der Wirkung von Magnetfeldern auf das Wachstum von Brustkrebszellen ist eine neue Erkenntnis, die bisher in der Literatur nicht beschrieben wurde.

Die Komplexität der Dosis-Wirkungsbeziehungen macht des weiteren die Risikoabschätzung elektromagnetischer Feldeinwirkungen schwierig, weil negative Beobachtungen bei beruflich Exponierten an Arbeitsplätzen mit hoher Flussdichte nicht notwendigerweise den Schluss zulassen, dass deutlich niedrigere Expositionen auch unbedenklich sein müssen.

Die Ergebnisse, die bei den Versuchen mit **Tamoxifen** ermittelt wurden, zeigen in ihrer Wiederholbarkeit eindeutig, dass elektromagnetische Felder mit der antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen interferieren. Dies ist grundlagenwissenschaftlich höchst interessant und wird das Gebiet der kommenden funktionsaufklärenden Forschung unserer Arbeitsgruppe sein. Die im Magnetfeld beobachteten Effekte besitzen große Ähnlichkeit mit dem Phänomen der Resistenzbildung von Mammakarzinomen unter Tamoxifenbehandlung, das nach Tamoxifendauertherapie bei einem großen Teil der behandelten Patientinnen mit metastasierten Mammakarzinomen beobachtet wird. Auch in diesem Zusammenhang kann das von uns entwickelte Expositionssystem zur Funktionsaufklärung genutzt werden, ein Ansatz, den wir in einem Nachfolgeprojekt verfolgen wollen.

## 5. Literatur

Ahlbom A, Day N, Feychting M, Roman E, Skinner J, Dockerty J, Linet M, McBride, M Michaelis J, Olsen JH, Tynes T, Verkasalo PK. (2000)  
A pooled analysis of magnetic fields and childhood leukaemia.  
Br. J. Cancer 83, 692-698

Anderson LE, Boorman GA, Morris JE, Sasser LB. et al. (1999)  
Effect of 13 week magnetic field exposures on DMBA-initiated mammary gland carcinomas in female Sprague-Dawley rats.  
Carcinogenesis 20, 1615-1620

Baldwin WS, und Barrett JC. (1998)  
Melatonin: Receptor-mediated events that may effect breast and other steroid hormone-dependent cancers.  
Mol.Carcinogen. 21, 149-155

Baldwin WS, Travlos GS, Risinger JI, Barrett JC. (1998)  
Melatonin does not inhibit estradiol stimulated proliferation in MCF-7 and BG-1 cells  
Carcinogenesis 19: 1895-1900.

Beato M. (1991)  
Transcriptional control by nuclear receptors. [review].  
FASEB J. 5, 2044-2051.

Beato M, Herrlich P, Schuetz G. (1995)  
Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot.  
Cell 83, 851-857.

Berry M, Metzger D, Chambon P. (1990)  
Role of the two activating domains of the estrogen receptor in the cell-type and promoter-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen.  
EMBO J. 9, 2811-2818

Blackman CF, Benane SG, House DE. (2001)  
The influence of 1.2  $\mu$ T, 60Hz magnetic fields on Melatonin and Tamoxifen-induced inhibition of MCF-7 cell growth.  
Bioelectromagnetics 22,122-128

Blask DE, Pelletier DB, Hill SM, Lemus-Wilson A, Grosso DS, Wilson ST, et al. (1991)  
Pineal melatonin inhibition of tumor promotion in the N-nitroso-N-methylurea model of mammary carcinogenesis: potential involvement of antiestrogenic mechanisms in vivo.  
J Cancer Res Clin Oncol 117: 526-532.

Boorman GA, Owen RD, Lotz WG, Galvin MJ Jr. (2000)  
Evaluation of in vitro effects of 50 and 60 Hz magnetic fields in regional EMF exposure facilities.  
Radiat. Res. 153, 648-657

- Bocquel MT, Kumar V, Stricker P, Chambon P, Gronemeyer H. (1989)  
The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific.  
Nucl. Acids Res. 17, 2581-2595
- Carlberg C, Wiesenberg I. (1995)  
The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship.  
J. Pineal Res. 18, 171-178
- Cohen M, Lippman M, Chabner B. (1978)  
Role of pineal gland in aetiology and treatment of breast cancer.  
Lancet 2, 814-816
- Cos S, Blask DE, Lemus-Wilson A, Hill AB. (1991)  
Effects of melatonin on the cell cycles kinetics and „estrogen-rescue“ of MCF-7 human breast cancer cells in culture.  
J. Pineal Res. 10, 36-42
- Davis S, Mirick D.K, Stevens RG. (2002)  
Residential magnetic fields and the risk of breast cancer.  
Am. J. Epidemiol. 155, 446-454
- DeFriend DJ, Howell A, Nicholson RI, Anderson E, Dowsett M, Mansel RE, Blamey RW, Bundred NJ, Robertson J.F, Saunders C et al. (1994)  
Investigation of a pure new antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer.  
Cancer Res. 54, 408-414
- DiCarlo A, White N, Guo F, Garrett P, Litovitz T. (2002)  
Chronic electromagnetic field exposure decreases HSP70 levels and lowers cytoprotection.  
J. Cell. Biochem. 84, 447-454
- Ding GR, Nakahara T, Miyakoshi J. (2002)  
Exposure to power frequency magnetic fields and X-rays induces GAP-43 gene expression in human glioma MO54 cells.  
Bioelectromagnetics 23, 586-591
- Dubik D & Shiu RP. (1988)  
Transcriptional regulation of c-myc oncogene expression by estrogen in hormone-responsive human breast cancer cells.  
J. Biol. Chem. 263, 12705-12708
- Evans RM. (1988)  
The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. [review].  
Science 240, 889-895

- Fedrowitz M, Westermann J, Löscher, W. (2002)  
Magnetic field exposure increases cell proliferation but does not affect melatonin level in the mammary gland of female Sprague-Dawley rats.  
Cancer Res. 62, 1356-1363
- Fedrowitz M, Kamino K, Löscher W. (2004)  
Significant differences in the effects of electromagnetic field exposure on 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary carcinogenesis in two substrains of Sprague-Dawley rats.  
Cancer Res. 64, 243-251
- Feychting M, Forssen U, Rutqvist, LE, Ahlbom A. (1998)  
Magnetic fields and breast cancer in Swedish adults residing near high-voltage power lines.  
Epidemiology. 9, 392-397
- Garcia-Maurino S, Gonzalez-Haba MG, Calvo JR, Goberna R, Guerrero JM. (1998) Involvement of nuclear binding sites for melatonin in the regulation of IL-2 and IL-6 production by human blood mononuclear cells.  
J Neuroimmunol 92, 76-84
- Girgert R, Schuller W, Körner W, Hanf V. (2002)  
Sensitive Assay for the interaction of melatonin and estradiol in MCF-7 cells  
Neuroendocr. Lett. 23 Suppl.2, 100-101
- Girgert, R, Bartsch C, Hill SM, Hanf V, Kreienberg R. (2003)  
Tracking the elusive antineoplastic effect of melatonin: A new methodological approach  
Neuroendocrin. Letters 24 , 433-437
- Goodman R, Wei LX, Xu JC, Henderson A. (1991)  
Exposure of human cells to electromagnetic fields: The amplitude affects the level of RNA transcripts.  
Biochim. Biophys. Acta 1009, 216-224
- Goodman R, Wei LX, Bumann J, Henderson A. (1992)  
Exposure to electric and magnetic (EM) fields increases transcripts in HL-60 cells: does adaptation to EM fields occur?  
Bioelectrochem. Bioenerget. 29, 185-192
- Govind AP, Thampan RV. (2001)  
Proteins interacting with the mammalian estrogen receptor: Proposal for an integrated model for estrogen receptor mediated regulation of transcription.  
J. Cell. Biochem. 80, 571-579
- Graham JD, Bain DL, Richer JK, Jackson TA, Tung L, Horwitz KB. (2000)  
Nuclear receptor conformation, coregulators and tamoxifen-resistant breast cancer.  
Steroids 65, 579-584
- Hanf V. (2002)  
Elektromagnetische Feldeinwirkung und Brustkrebs- Eine Bestandsaufnahme  
Geburtshilfe und Frauenheilkunde 62, 22-29

- Harland JD, und Liburdy RP. (1997)  
Environmental magnetic fields inhibit the antiproliferative action of Tamoxifen and melatonin in a human breast cancer cell line.  
Bioelectromagnetics 18, 555-562
- Hill SM, Blask DE. (1988)  
Effects of the pineal hormone melatonin on the proliferation and morphological characteristics of human breast cancer cells (MCF-7) in culture.  
Cancer Res. 48, 6121-6126
- Hocking B. (2004)  
Magnetic fields and leukemia.  
N. Engl. J. Med. 351: 102
- Hong H, Kohli K, Trivedi A, Johnson DL, Stallcup MR. (1996)  
GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors.  
PNAS 93, 4948-4952
- Horwitz KB. (1995)  
When tamoxifen turns bad.  
Endocrinology 136: 821-823
- Ishido M, Nitta H, Kabuto M. (2001)  
Magnetic fields (MF) of 50 Hz at 1.2  $\mu$ T as well as 100  $\mu$ T cause uncoupling of inhibitory pathways of adenylyl cyclase mediated by melatonin 1a receptor in MF-sensitive MCF-7 cells.  
Carcinogenesis 22, 1043-1048
- Juutilainen J, Saali K. (1986)  
Development of chick embryos in 1 Hz to 1kHz magnetic fields.  
Radiat. Environ Biophys. 25, 135-140
- Kabat GC, O'Leary ES, Schoenfeld ER, Greene JM. et al. (2003)  
Electric blanket use and breast cancer on Long Island.  
Epidemiology 14, 514-520
- Kirschvink JL. (1992)  
Uniform magnetic fields and double wrapped coil systems: Improved techniques for the design of bioelectromagnetic experiments,  
Bioelectromagnetics, 13, 401-411
- Kliukiene, J.; Tynes, T.; Andersen, A. (2004)  
Residential and occupational exposures to 50 Hz magnetic fields and breast cancer in women: a population-based study.  
Am. J. Epidemiol. 159: 852-861

Körner W, Hanf V, Schuller W, Bartsch H, Zwirner M, Hagenmaier, H. (1998)  
Validation and application of a rapid in vitro assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic chemicals.  
*Chemosphere* 37, 2395–2407

Körner W, Hanf V, Schuller W, Kempfer C, Metzger J, Hagenmaier H. (1999)  
Development of a sensitive E-screen-assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents.  
*Sci. Tot. Environ.* 225, 33-48

Körner W. (2000)  
Nachweis von estrogen- und androgenartig wirkenden Substanzen in der Umwelt durch Kombination von chemischer und biologischer Analytik.  
Habilitationsschrift der Fakultät Chemie der Universität Tübingen

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

Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin JR, Chambon P. (1987)  
Functional domains of the human estrogen receptor.  
*Cell* 51, 941-951

Kumar V & Chambon P. (1988)  
The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer.  
*Cell* 55, 145-156

Kundi M. (2004)  
Electric blanket use and breast cancer.  
*Epidemiology* 15, 376-377

Lacy-Hulbert A, Metcalfe JC, Hesketh R. (1998)  
Biological responses to electromagnetic fields.  
*FASEB J.* 12, 395-420

L'Hermite-Baleriaux M, de Launoit Y. (1992)  
Is melatonin really an in vitro inhibitor of human breast cancer cell proliferation?  
*In Vitro Cell Dev. Biol.* 28A, 583-584

Li CY, Theriault G, Lin RS. (1997)  
Residential exposure to 60-Hertz magnetic fields and adult cancers in Taiwan.  
*Epidemiology.* 8, 25-30

Liburdy RP, Sloma TR, Sokolic R, Yaswen P. (1993)  
ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's oncostatic action on ER+ breast cancer cell proliferation.  
*J. Pineal Res.* 14, 89-97

- Liburdy RP, Harland JD. (1997)  
Environmental Magnetic Fields inhibit the antiproliferative action of Tamoxifen and Melatonin in a Human Breast cancer cell line.  
Bioelectromagnetics 18, 555-562
- Lin H, Blank M, Rossol-Haseroth K, Goodman R. (2001)  
Regulating genes with electromagnetic response elements  
Cell. Biochem. 81, 143-148
- Lindström E, Lindström P, Berglund A, Mild KH, Lundgren E. (1993)  
Intracellular calcium oscillations induced in a T-cell line by weak 50 Hz magnetic field.  
J. Cell. Physiol. 156, 395-398
- Linnet MS, Hatch EE, Kleinerman RA, Robison LL, Kaune WT, Friedman DR, Severson RK, Haines CM, Hartsock CT, Niwa S, Wacholder S, Tarone RE. (1997)  
Residential exposure to magnetic fields and acute lymphoblastic leukemia in children.  
N. Engl. J. Med. 337, 1-7
- Litovitz TA, Montrose CJ, Wang W. (1992)  
Dose-response implications of the transient nature of electromagnetic field induced bioeffects.  
Bioelectromagnetics Suppl 1, 237-246
- Loberg LI, Gauger JR, Buthod JL, Engdahl WR, McCormick DL. (1999)  
Gene expression in human breast epithelial cells exposed to 60 Hz magnetic fields.  
Carcinogenesis 20, 1633-1636
- Löscher W, Mevissen M, Lerchl A. (1998)  
Exposure of female rats to a 100 $\mu$ T 50Hz magnetic field does not induce consistent changes in nocturnal levels of melatonin  
Radiat. Res. 150, 557-567
- Mevissen M, Kietzmann M, Löscher W. (1995)  
In vivo exposure of rats to a weak alternating magnetic field increases ornithine decarboxylase activity in the mammary gland by a similar extent as the carcinogen DMBA.  
Cancer Lett. 90, 207-214
- Möbus V, Gerharz CD, Press U, Moll R. et al. (1992)  
Morphological, immunological and biochemical characterization of 6 newly established human ovarian carcinoma cell lines.  
Int. J. Cancer 52, 76-84
- Moretti RM, Montagnani-Marelli M, Maggi R, Dondi D, Motta M, Limonta P. (2000)  
Antiproliferative action of melatonin on human prostate cancer LNCaP cells.  
Oncology reports 7: 347-351
- Morehouse CA, Owen RD. (2000)  
Exposure of Daudi cells to low-frequency magnetic fields does not elevate MYC steady-state mRNA levels.  
Radiat. Res. 153(5 Pt 2): 663-669

- Morehouse CA, Owen RD. (2000)  
Exposure to low-frequency electromagnetic fields does not alter HSP70 expression or HSF-HSE binding in HL60 cells.  
Radiat. Res. 153, 658-662
- Mullins JM, Penafiel LM, Juutilainen J, Litovitz TA. (1999)  
Dose-response of electromagnetic field-enhanced ornithine decarboxylase activity.  
Bioelectrochem-Bioenerg. 48, 193-199
- Murphy LC, Leygue E, Niu Y, Snell L, Ho SM, Watson PH. (2002)  
Relationship of coregulators and estrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in breast cancer.  
Brit. J. Cancer 87, 1411-1416
- Onate SA, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. (1995)  
Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily.  
Science 270, 1354-1357
- Osborne CK. (1998)  
Tamoxifen in the treatment of breast cancer.  
N. Engl. J. Med. 339, 1609-1618
- Owen RD. (1998)  
MYC mRNA abundance is unchanged in subcultures of HL60 cells exposed to power-line frequency magnetic fields.  
Radiat-Res. 150, 23-30
- Panzer A, Lottering ML, Bianchi P, Glencross DK, Stark JH, Seegers JC. (1998)  
Melatonin has no effect on the growth, morphology or cell cycle of human breast cancer (MCF-7), cervical cancer (HeLa), osteosarcoma (MG-63) or lymphoblastoid (TK6) cells.  
Cancer Lett. 122, 17-23
- Papazisis KT, Kouretas D, Geromichalos GD, Sivridis E, Tsekrelis OK, Dimitriadis KA. (1998)  
Effects of melatonin on proliferation of cancer cell lines.  
J. Pineal Res. 25, 211-218
- Ram PT, Kiefer T, Silverman M, Song Y, Brown GM, Hill SM. (1998)  
Estrogen receptor transactivation in MCF-7 breast cancer cells by melatonin and growth factors.  
Mol. Cell. Endocrinol. 141, 53-64
- Ram PT, Yuan L, Dai J, Kiefer T, Klotz DM, Spriggs LL, et al. (2000)  
Differential responsiveness of MCF-7 human breast cancer cell line stocks to the pineal hormone, melatonin.  
J. Pineal Res. 28, 210-218.
- Rato AG, Pedrero JG, Martinez MA. et al. (1999)

Melatonin blocks the activation of estrogen receptor for DNA binding.  
FASEB J. 13, 857-868.

Reppert SM, Weaver DR. (1995)  
Melatonin madness.  
Cell 83, 1059-1062.

Schüz J, Grigat JP, Brinkmann K, Michaelis J. (2001)  
Residential magnetic fields as a risk factor for childhood acute leukaemia: results from a German population-based case-control study.  
Int. J. Cancer 91, 728-735

Schüz J, Michaelis J. (2000)  
Epidemiologische Studie zur Assoziation von Leukämieerkrankungen bei Kindern und häuslicher Magnetfeldexposition. Abschlußbericht der EMF-II-Studie gefördert durch das Bundesministerium für Umwelt, Naturschutz und Reaktorsicherheit StSch4118

Shah PN, Mhatre MC, Kothari LS. (1984)  
Effect of melatonin on mammary carcinogenesis in intact and pinealectomized rats in varying photoperiods.  
Cancer Res. 44, 3403-3407.

Shang Y, Brown M. (2002)  
Molecular determinants for the tissue specificity of SERMs.  
Science 295, 2465-2468

Song Y, Chan CW, Brown GM, Pang SF, Silverman M. (1997)  
Studies of the renal action of melatonin: evidence that the effects are mediated by 37 kDa receptors of the Mel1a subtype localized primarily to the basolateral membrane of the proximal tubule.  
FASEB J. 11, 93-100

Soule HD, Vazquez J, Long A, Albert S, Brennan M. (1973)  
A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma.  
J. Natl. Cancer Inst. 51, 1409-1416

Speirs V, Green AR, Walton DS, Kerin MJ, Fox JN, Carleton PJ, Desai SB, Atkin SL. (1998)  
Short-term primary culture of epithelial cells derived from human breast tumours.  
Br. J. Cancer 78, 1421-1429

Stanley ER, Palmer RE, Sohn U. (1977)  
Development of methods for the quantitative in vitro analysis of androgen-dependent and autonomous Shionogi carcinoma 115 cells.  
Cell 10, 35-44

Stevens RG, Davis S. (1996)  
The melatonin hypothesis: electric power and breast cancer.  
Environ. Health Perspect. 104, Suppl. 1135-1140

- Svedenstal BM, Johanson KJ, Mattsson MO, Paulsson LE. (1999)  
DNA damage, cell kinetics and ODC activities studied in CBA mice exposed to electro-magnetic fields generated by transmission lines.  
*In Vivo* 13, 507-513
- Tamarkin L, Cohen M, Roselle D, Reichert C, Lippman M, Chabner B. Melatonin inhibition and pinealectomy enhancement of 7,12-dimethylbenz(a)anthracene-induced mammary tumors in the rat.  
*Cancer Res* 1981; 41: 4432-4436.
- Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P. (1989)  
The human estrogen receptor has two independent nonacidic activation functions.  
*Cell* 59, 477-487.
- Tsai SY, Carlstedt-Duke J, Weigel NL, Dahlman K, Gustafsson JA, Tsai MJ, O'Malley BW. (1988)  
Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation.  
*Cell* 55, 361-369.
- Tynes T, Haldorsen T. (2003)  
Residential and occupational exposure to 50 Hz magnetic fields and hematological cancers in Norway.  
*Cancer Causes Control* 14: 715-720
- Valtersson U, Hansson-Mild K, Mattsson MO. (1997)  
Effects on ornithine decarboxylase activity and polyamine levels are different in Jukat and CEM-CM3 cells after 50 Hz magnetic field exposure.  
*Bioelectrochem. Bioenerget.* 43, 169-172
- Verkasalo PK, Pukkala E, Kaprio J, Heikkila KV, Koskenvuo M. (1996)  
Magnetic fields of high voltage power lines and risk of cancer in Finnish adults: nationwide cohort study.  
*BMJ.* 313, 1047-1051
- Voegel JJ, Heine MJ, Zechel C, Chambon P, Gronemeyer H. (1996)  
TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors.  
*EMBO J.* 15, 3667-3675
- Webster NJG, Green S, Jin JR, Chambon P. (1988)  
The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible activation function.  
*Cell* 54, 199-207
- Weisz A. & Bresciani F. (1988)  
Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus.  
*Mol. Endocrinol.* 2, 816-824

- Wertheimer N, Leeper E. (1982)  
Adult cancer related to electrical wires near the home.  
Int. J. Epidemiol. 11, 345-355
- Wiesenberg I, Missbach M, Kahlen JP, Schrader M, Carlberg C. (1995)  
Transcriptional activation of the nuclear receptor RZR alpha by the pineal gland hormone melatonin and identification of CGP 52608 as a synthetic ligand.  
Nucleic Acids Res. 23, 327-333
- Winczyk K, Pawlikowski M, Guerrero JM, Karasek M. (2002)  
Possible involvement of the nuclear RZR/ROR-alpha receptor in the antitumor action of melatonin on murine Colon 38 cancer.  
Tumor Biology 23 Suppl 1, 55-60
- Yuan L, Collins AR, Dai J, Dubocovich ML, Hill SM. (2002)  
MT(1) melatonin receptor overexpression enhances the growth suppressive effect of melatonin in human breast cancer cells.  
Mol. Cell. Endocrinol. 192 147-156
- Zhou J, Yao G, Zhang J, Chang Z. (2002)  
CREB DNA binding activation by a 50 Hz magnetic field in HL 60 cells is dependent on extra- and intracellular Ca(2+) but not PKA, PKC, ERK or p38 MAPK.  
BBRC 296: 1013-1018
- Zhu K, Hunter S, Payne-Wilks K, Roland CL, Forbes DS. (2003)  
Use of electric bedding devices and risk of breast cancer in african-american women.  
Am. J. Epidemiol. 158: 798-806

### **5.1. Veröffentlichungen aus dem Projekt**

- Hanf, V., Girgert, R., Kreienberg, R.  
Erzeugen Magnetfelder Mammakarzinome? – Hinweise aus der Epidemiologie und zellbiologische Untersuchungsstrategien  
Gynäkol. Geburtshilfliche Rundsch. 41 S. 105 (2001)
- Girgert, R.; Schuller, W.; Körner, W.; Hanf, V.  
Sensitive Assay for the interaction of melatonin and estradiol in MCF-7 cells  
Neuroendocr. Lett. 23 Suppl.2 S.100-101 (2002)
- Girgert, R.; Schimming, H.; Hanf, V.; Kreienberg, R.  
Enhancement of the agonist action of tamoxifen on breast cancer cells by electromagnetic fields.  
AEK Symposium, Würzburg (2003)
- Hanf, V., Schimming, H., Kreienberg, R., Girgert, R.  
Elektromagnetische Wechselfelder modulieren die Tamoxifenwirkung auf MCF-7-Zellen  
Geburtsh. Frauenheilk. 63 S.898 (2003)

Girgert, R.; Bartsch, C.; Hill, S.M.; Hanf, V.; Kreienberg, R.  
Tracking the elusive antineoplastic effect of melatonin: A new methodological approach  
Neuroendocrin. Letters 24 S.433-437 (2003)

Hanf, V., Schimming, H., Kreienberg, R., Girgert, R.  
Antiproliferative activity of tamoxifen on MCF-7 breast cancer cells is modulated by weak  
electromagnetic field exposure  
Eur. J. Cancer Suppl. 2, S.109 (2004)

Girgert, R.; Schlaier, M.; Schimming, H.; Hanf, V.  
Enhancement of the agonist action of tamoxifen on breast cancer cells by electromagnetic  
fields  
Manuskript in Vorbereitung

## 6. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

### Tabellen:

**Tabelle 1:** Vergleich von *in vitro* Assays zum Nachweis rezeptorvermittelter (anti)estrogener Wirkungen

**Tabelle 2:** Einfluss von Melatonin auf die  $EC_{50}$  von Estradiol in verschiedenen Brustkrebszelllinien

**Tabelle 3:** Liste der Tumorarten, aus denen Primärkulturen angelegt wurden

**Tabelle 4:** Einfluss der verschiedenen Magnetfeldstärken auf die Verschiebung der  $EC_{50}$  Werte von Estradiol durch Melatonin in zwei Brustkrebszelllinien

**Tabelle 5:** Einfluss der Magnetfeldexposition auf die Wirkung von Melatonin auf die primäre Brustkrebszelllinie MCU 1

**Tabelle 6:** Einfluss der verschiedenen magnetischen Feldstärken auf die Hemmkonstante  $IC_{50}$  von Tamoxifen in den beiden Subklonen der Zelllinie MCF-7

### Abbildungen:

**Abb. 1:** Schema für die Durchführung des modifizierten E-Screen-Assays mit MCF-7-Zellen (Darstellung nach Körner 1999)

**Abb. 2:** Korrelation der Zahl an MCF-7-Zellen mit der Extinktion bei 550 nm

**Abb. 3:** Feldmessung PVC-Rohr 180 mm

**Abb. 4:** Feldmessung PVC-Rohr 180 mm, mit/ohne Aludeckel einseitig

**Abb. 5:** Feldmessung PVC-Rohr 180 mm, mit/ohne Aludeckel einseitig

**Abb.6:** Expression der beiden Estrogenrezeptoren  $ER\alpha$  und  $ER\beta$  sowie der Melatonin- Rezeptoren Mel 1a und  $RZR\alpha$ .

**Abb.7:** Bestimmung der S-Phase in MCF-7 Zellen nach Estradiolstimulation

**Abb. 8:** Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p92 bis p104 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol ( $E_2$ )  $10^{-10}$  M plus Melatonin (+Mel)

- Abb. 9:** Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p3 bis p5 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin
- Abb. 10:** Relativer Proliferationseffekt der MCF-7 Zellen der Passagen p24 bis p25 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin
- Abb. 11:** Relativer Proliferationseffekt der EFM-19 Zellen der Passagen p73 bis p77 nach 7 Tagen Inkubation mit Estradiol (E2)  $10^{-10}$  M plus Melatonin
- Abb.12:** Dosis-Wirkungskurve von Estradiol mit MCF-7 Zellen ohne Melatonin
- Abb.13:** Dosis-Wirkungskurve von Estradiol mit MCF-7 Zellen bei  $10^{-9}$  M Melatonin
- Abb.14:** Hemmkinetik von Tamoxifen in MCF-7 Zellen
- Abb. 15:** Kaplan-Meier Diagramm der Lebensdauer von Primärkulturen von Mammakarzinomen
- Abb. 16:** Einfluss eines Magnetwechselfeldes von  $1,2 \mu\text{T}$  auf die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Estradiol durch Melatonin in MCF-7 (p181) Zellen
- Abb. 17:** Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen mit dem Subklon p40 der Brustkrebszelllinie MCF-7 bei verschiedenen magnetischen Feldstärken
- Abb. 18:** Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen mit dem Subklon p181 der Brustkrebszelllinie MCF-7 bei verschiedenen magnetischen Feldstärken
- Abb. 19:** RT-PCR Produkte der mRNA für den Estrogenrezeptor  $\text{ER}\alpha$  in den beiden Subklonen der Brustkrebszelllinien MCF-7 (P40 und p181) nach 48 Stunden und 96 Stunden Exposition mit  $1,2 \mu\text{T}$
- Abb. 20:** Schematische Darstellung der Sequenz des humanen Estrogenrezeptors alpha

# | Verantwortung für Mensch und Umwelt |

**Kontakt:**

Bundesamt für Strahlenschutz

Postfach 10 01 49

38201 Salzgitter

Telefon: + 49 30 18333 - 0

Telefax: + 49 30 18333 - 1885

Internet: [www.bfs.de](http://www.bfs.de)

E-Mail: [ePost@bfs.de](mailto:ePost@bfs.de)

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



**Bundesamt für Strahlenschutz**