

Ressortforschungsberichte zur kerntechnischen Sicherheit und zum Strahlenschutz

**Untersuchung des Wirkungsmechanismus für die Veränderung
des Wachstums von Brustkrebszellen unter dem Einfluss von
Onkostatika und niederfrequenten Magnetfeldern
- Vorhaben 3604S04461**

**Auftragnehmer:
Universität Göttingen - Frauenklinik**

**R. Girgert
C. Gründker
V. 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-71/12

Bitte beziehen Sie sich beim Zitieren dieses Dokumentes immer auf folgende URN:
urn:nbn:de: 0221-201210119823

Salzgitter, Oktober 2012

Gliederung	3
Zusammenfassung	7
Summary	7
1. Einleitung und Zielsetzung	8
1.1. Aufgabenstellung	8
1.2. Voraussetzungen	8
1.3. Planung und Ablauf des Vorhaben	9
1.4. Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft werden konnte	9
1.5. Zusammenarbeit mit anderen Stellen	10
1.6. Wissenschaftliche Grundlagen	10
1.6.1. Rolle der Koaktivatoren und Korepressoren der Östrogenrezeptoren bei der Wirkung von Tamoxifen	12
1.6.2. Metastasierung und Brustkrebs	12
1.6.3. Intrazelluläre Signaltransduktion	14
1.6.4. Melatonin und Brustkrebs	15
1.6.4.1. Melatonin-Rezeptoren	15
1.7. Projektzielrichtung und Strategie	16
2. Material und Methoden	17
2.1. Magnetfeldkammern zur Exposition der Brustkrebszellen	17
2.2. Zellkulturen	18
2.3. Genexpressionsanalysen	19
2.3.1. RNA-Isolierung aus exponierten Brustkrebszellen	19
2.3.2. cDNA-Mikroarrays	19
2.3.2.1. Bestimmung der Expression krebsrelevanter Gene auf Atlas TM human cancer-Mikroarrays	19
2.3.2.2. Themenspezifische Mikroarrays	20
2.3.3. RT-PCR	20
2.3.4. Western-Blots	22
2.4. Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay	23
2.5. Proliferationstests („E-Screen-Assay“)	24

2.5.1.	Proliferationsmessung bei Behandlung mit Melatonin	24
2.5.2	Quantitative Auswertung des E-Screen-Assays	25
3.	Erzielte Ergebnisse	26
3.1.	Genexpressionsanalysen	26
3.1.1.	Ergebnisse des Atlas-Mikroarrays	26
3.1.1.1.	Atlas-Mikroarray mit den MCF-7 p40 Zellen	27
3.1.1.2.	Atlas-Mikroarray mit den MCF-7 p181 Zellen	30
3.1.2.	Themenspezifische Mikroarrays	34
3.1.2.1.	Brustkrebs und Östrogenrezeptor-Signaltransduktions- Array	34
3.1.2.2.	Extrazellulärmatrix und Metastasierungs-Array	37
3.1.2.3.	Mikro-Array für Kofaktoren der nukleären Rezeptoren	38
3.2	Verifizierung der Genexpressionsänderungen der Rezeptoren und Kofaktoren	40
3.2.1	RT-PCR	40
3.2.1.1	Verifizierung der Genexpression von Genen des Brustkrebs- und Östrogenrezeptor-Arrays	40
3.2.1.2	Verifizierung der Genexpression von Genen des Kofakto- ren-Arrays	42
3.2.1.3	Veränderungen der Expression der Kofaktoren nach Exposition bei 100 μ T	44
3.2.2	Verifizierung der veränderten Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren auf Proteinebene	45
3.2.3	Auswirkungen der Expressionsveränderungen auf die Tamoxifenwirkung	47
3.3	Verifizierung der Veränderung Metastase-assoziiertes Gene durch RT-PCR	47
3.3.1	Expression der Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems nach Magnetfeldexposition	48
3.3.2	Expression der Metastase-Suppressor-Gene nach Magnetfeldexposition	50

3.4	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die intrazelluläre Signaltransduktion in Brustkrebszellen	52
3.5	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen	60
3.5.1	Charakterisierung der verschiedenen Brustkrebszelllinien bezüglich ihrer Hemmbarkeit mit Melatonin	60
3.5.1.1	Expression der Östrogenrezeptoren und der Melatoninrezeptoren	60
3.5.1.2	Einfluss der Exposition mit elektromagnetischen Feldern auf die Expression der Melatonin-Rezeptoren MT1 und RZR α	62
3.5.2	Veränderungen der Expression Melatonin-abhängiger Gene im Magnetfeld	64
3.5.2.1	Expression der Gene p53, p21waf, BRCA1 und c-myc nach Stimulation von Brustkrebszellen mit Melatonin unter Magnetfeldeinfluss	64
3.5.2.2	Gel-Shift Untersuchungen nach Stimulation mit Melatonin	66
3.5.3	Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen	69
3.6	Proliferationshemmender Effekt von 4-Hydroxy-Tamoxifen auf MCF-7 Zelllinien	70
3.6.1	Einfluss des Magnetfeldes auf die Wirkung von 4-Hydroxy-Tamoxifen in Brustkrebszelllinien	72
3.7	Einfluss des Magnetfeldes auf die Wirkung von Faslodex in Brustkrebszelllinien	73
4.	Diskussion	74
4.1	Auswirkungen der Veränderungen der Expression der Kofaktoren durch elektromagnetischen Felder auf die Tamoxifenwirkung	76

4.2	Erhöhung der Metastasierungsfähigkeit von Brustkrebszellen durch Exposition mit elektromagnetischen Feldern	77
4.3	Einfluss elektromagnetischer Felder auf die intrazelluläre-Signaltransduktion	80
4.4	Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Melatonin-Wirkung	81
4.5	Veränderung der Wirkung von Antiöstrogenen auf Brustkrebszellen im Magnetfeld	85
4.6	Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen	88
4.7	Schlussfolgerungen und Ausblick	91
5.	Literatur	92
	5.1. Veröffentlichungen aus dem Projekt	101
6.	Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen	103

Zusammenfassung

In diesem Projekt sollte der molekulare Mechanismus untersucht werden, der für die Abschwächung der antiproliferativen Wirkung des antiöstrogen wirkenden Krebsmedikaments Tamoxifen und des Zirbeldrüsenhormons Melatonin auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Felder verantwortlich ist. Zur Exposition der Zellen in kontrollierten und sehr homogenen Magnetfeldern wurden eigens neuartige Magnetfeldinkubatoren konstruiert.

In den mit 1,2 μT exponierten MCF-7p40 Zellen wurden auf Mikroarrays 20 Gene als mindestens zweifach erhöht exprimiert nachgewiesen, in den MCF-7p181 Zellen 61 Gene. 16 Gene waren in den MCF-7 p40 Zellen schwächer exprimiert, in den p181 Zellen 41 Gene. Von den besonders interessanten Genen konnte durch RT-PCR und Western-Blot die verstärkte Expression der Koaktivatoren, AIB1 und SRC-1, und des Urokinase-Plasminogen-Aktivators und des Plasminogenaktivator-Inhibitors bestätigt werden. Die Korepressoren N-Cor und SMRT und verschiedene Metastase-Suppressorgene waren in den exponierten Zellen schwächer exprimiert. Untersuchungen zur Signaltransduktion zeigten, dass nur die MAP-Kinase Erk1 nach einer Stunde im Magnetfeld stärker aktiviert war, die Stress-aktivierten MAP-Kinasen, junK und p38, wurden durch das Magnetfeld nicht aktiviert oder sogar leicht abgeschwächt.

Die Versuche zur Melatoninwirkung im Magnetfeld zeigten, dass sich die Expression der beiden Melatoninrezeptoren, MT1 und RZR α , bei 1,2 μT nur unwesentlich verändert. Bei den Targetgenen des Melatonins wurde die Expression der Tumorsuppressorgene p53 und p21waf im Magnetfeld verringert, während die Abschwächung der Expression von BRCA1 und c-myc durch Melatonin im Magnetfeld geringer ausfiel.

Summary

In the present project we investigated the molecular mechanism of the decreased antiproliferative effect of the antiestrogenic drug Tamoxifen and the pineal gland hormone Melatonin on breast cancer cells in the presence of low-frequency electromagnetic fields. New unique incubators were developed for the exposure of the cells to controlled, highly homogenous magnetic fields. MCF-7 p40 cells exposed to 1.2 μT expressed 20 genes more than two times stronger than control cells, MCF-7p181 cells 61 genes. 16 genes were expressed weaker in MCF-7p40 cells, 41 genes in MCF-7p181. The increased expression of the particularly interesting coactivators, AIB1 and SRC-1, and of urokinase plasminogen activator and plasminogen-activator inhibitor was confirmed using RT-PCR and Western blot. The corepressors, N-Cor and SMRT, and various metastasis-suppressor genes were expressed lower in the exposed cells. Investigations of signal transduction revealed only MAP-kinase Erk1 being more strongly activated after one hour exposure to the magnetic field, while stress-activated MAP-kinases, junK and p38, were not activated by the magnetic field or even slightly deactivated.

Experiments on Melatonin action in the magnetic field showed that expression of the two Melatonin receptors, MT1 and RZR α , was only marginally altered at 1,2 μT . Of the target genes of Melatonin expression of tumorsuppressors p53 and p21waf was decreased in the magnetic field whereas the decrease in expression of BRCA1 and c-myc by Melatonin was less strong in the magnetic field.

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Aufgabenstellung

In dem genannten Projekt sollte der Mechanismus der Abschwächung der antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und Melatonin auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Wechselfelder näher untersucht werden. In dem Vorläuferprojekt StSch4219 konnte gezeigt werden, dass die Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen im Magnetfeld zu höheren Konzentrationen verschoben wird, so dass im Magnetfeld höhere Konzentration Tamoxifen benötigt wurden, um den gleichen antiproliferativen Effekt zu erreichen, wie bei der feldfreien Behandlung. Der Effekt der elektromagnetischen Felder war bei 1,2 μT am größten und nahm bei höheren Feldstärken (10 μT und 100 μT) wieder ab. Dieses Verhalten der Brustkrebszellen gegenüber Tamoxifen hat große Ähnlichkeit zu dem in der Klinik beobachteten Phänomen der Tamoxifen-Resistenz.

Die Exposition der Brustkrebszellen für die Untersuchung der Genexpression sollte in einem sehr homogenen Magnetfeld bei den 5 verschiedenen Feldstärken von 0 μT , 0,1 μT , 1,2 μT , 10 μT und 100 μT unter ständiger Kontrolle der magnetischen Flussdichte und der Temperatur erfolgen.

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

1.2 Voraussetzungen

In der Universitäts-Frauenklinik Göttingen 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).

Auch die Durchführung von RT-PCR, Western-Blots, c-DNA-Mikroarrays und des E-lektrophoretischen **Mobilitätsshift-Assays** (EMSA) sind in diesen Labor möglich.

1.3 Planung und Ablauf des Vorhaben

Die Konstruktion der Magnetfeldinkubatoren, in denen die Brustkrebszellen inkubiert und exponiert werden sollten, sind in intensiver Zusammenarbeit mit dem Leiter der elektronischen Entwicklungsabteilung der Universität Ulm, Dipl. Ing. H. Schimming, entwickelt und konstruiert worden.

Es sind außerdem umfangreiche Untersuchungen mit dem Ziel durchgeführt worden, einen proliferationshemmenden Effekt von Melatonin auf verschiedene Brustkrebszelllinien nachzuweisen. Durch Erfassung von Dosis-Wirkungskurven gelang es, ein neues hochsensitives Verfahren zu entwickeln, mit dem selbst die sehr schwachen Effekte von Melatonin auf das Wachstum der Brustkrebszelllinien nachgewiesen und quantifiziert werden konnten.

1.4 Wissenschaftlicher und technischer Stand, an den angeknüpft werden konnte

Bereits für das Vorläuferprojekt StSch4219 waren zwei Inkubatoren zur Exposition der Brustkrebszellen konstruiert worden, die aus einer waagrecht angeordneten 75 cm langen, Kupferröhre bestehen, 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 von Helmholtz-Spulen war bei annähernd gleichem Homogenfeldraum eine Verringerung des Apparaturvolumens um mehr als einen Faktor 10 möglich. Daher konnte eine weitere Expositions-kammern, zur Schwächung der Umgebungsfelder, mit μ -Metall umgeben werden.

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

Die Zellkulturplatten befinden sich auf einem speziellen Halteschlitten. Der zur Erzeugung des Magnetfeldes benötigte Wechselstrom wird mittels Sinusgeneratoren erzeugt. In dem abgeschirmten Inkubator wurde das im Inneren des Inkubators abgeschwächte Erdmagnetfeld durch ein konstantes Magnetfeld mittels einer Gleichstromquelle substituiert.

Um den Einfluss des Magnetfeldes auf die Wirkung weiterer Onkostatika auf die Proliferation der Brustkrebszellen zu untersuchen, konnte eine Methode zur Bestimmung

der Dosiswirkungskurven verwendet werden, die bereits in dem Vorläuferprojekt entwickelt wurde. Der Nachweis der differentiellen Expression von Genen in exponierten Zellen durch Hybridisierung radioaktiv markierter cDNA mit Mikroarrays war nicht möglich, deshalb wurde in diesem Projekt der Nachweis der cDNA auf die empfindlichere Chemolumineszenz erfolgreich umgestellt.

1.5 Zusammenarbeit mit anderen Stellen

Elektronische Entwicklungswerkstatt der Universität Ulm (Leiter: H. Schimming): Die Universität Ulm besitzt eine elektronische Entwicklungsabteilung, die im Auftrag von Mitgliedern der Universität neue elektrische und elektronische Geräte entwickelt und konstruiert.

Entwicklung und Erstellung der Magnetfeldinkubatoren und der Sensorik für die Messung und Regelung der Feldstärke, der Temperatur und der CO₂-Konzentration im Inkubator.

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, Bayerisches Landesamt für Umweltschutz, Augsburg

Beratung bei der Auswertung der Proliferationsmessungen und Bereitstellung eines VBA-Auswertungsprogramms (EXCEL) für die Berechnung der EC₅₀-Werte von Tamoxifen, 4-Hydroxy-Tamoxifen, Raloxifen und von Estradiol in Gegenwart von Melatonin. Dieses Programm wurde von Dr. Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg entwickelt.

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 jedoch zwischen dem Auftreten von Leukämien bei Kindern und ihrer Exposition mit niederfrequenten Magnetfeldern bei Nacht beo-

bachtet (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. Bei Frauen vor der Menopause war das Risiko an Brustkrebs zu erkranken größer, wenn sie in einer Umgebung lebten, in der magnetische Flussdichten von über $0,2 \mu\text{T}$ angenommen werden mussten (Wertheimer et al., 1982; Feychting et al., 1998). Bei epidemiologischen Studien aus Finnland und Taiwan wurde in der Bevölkerung dagegen kein erhöhtes Risiko in der Nähe von Überlandleitungen gefunden (Verkasalo et al., 1996; Li et al., 1997). Eine aktuelle Übersicht zum Thema „Elektromagnetische Feldwirkung 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.

In Ratten, die 24 Stunden einem 60 Hz Wechselfeld von $10\mu\text{T}$ ausgesetzt waren, wurde ein signifikanter Anstieg von Einzel- und Doppelstrangbrüchen in der DNA von Gehirnzellen beobachtet. Dieser Effekt wurde auf die Entstehung von Sauerstoffradikalen in den Zellen zurückgeführt, denn nach Behandlung der exponierten Ratten mit einer Radikalfängersubstanz konnte die Zahl der Strangbrüche in den exponierten Ratten reduziert werden (Lai und Singh, 2004). Eine weitere Möglichkeit der Interaktion der Wechselfelder mit den Zellen könnten Verschiebungen von Ca-Ionen über die Zellmembran durch Ionenkanäle sein, die zu einer erhöhte Ca-Konzentration in den Zellen führen, durch die verschiedene Signaltransduktionskaskaden ausgelöst werden können (Yost und Liburdy, 1992)

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).

1.6.1 Rolle der Koaktivatoren und Korepressoren der Östrogenrezeptoren bei der Wirkung von Tamoxifen

Nach Bindung von Östradiol an den Östrogenrezeptor transloziert der Östrogenrezeptor in den Zellkern und bindet dort an bestimmte DNA-Sequenzen im Promotor der östrogenabhängigen Gene. Damit die RNA-Polymerase im Bereich dieser Gene aktiviert werden kann und die Gene abliest und in mRNA umschreibt, müssen an der Östradiol-Östrogenrezeptor-Komplex eine Reihe weitere Proteine binden, die den Transkriptionsapparat aufbauen und die RNA-Polymerase aktivieren. Zu diesen Proteinen gehören auch verschiedene Koaktivatoren, wie z. B. das Protein des Gens amplified in breast cancer (AIB1) oder der Steroidrezeptor-Koaktivator (SRC-1) (Govind und Thampan, 2001).

Die proliferationshemmende Wirkung verschiedener therapeutisch eingesetzter Anti-östrogene, wie z.B. Tamoxifen, kommt dadurch zustande, dass das Tamoxifen anstelle von Östradiol an den Östrogenrezeptor bindet und dadurch die Struktur des Rezeptors so verändert, dass anstelle der Koaktivatoren andere Proteine an den Rezeptor binden, die aufgrund ihrer Funktion Korepressoren genannt werden. Zu diesen Korepressoren gehören die Proteine N-CoR (nukleärer Korepressor) und der silencing mediator of thyroid receptor (SMRT) und verschiedene Histondeacetylasen (HDAC's). Die Bindung der Korepressoren verhindert die Transkription der Gene und die Aktivierung der RNA-Polymerase (Graham et al., 2000).

In klinischen Proben von Tamoxifen-resistenten Brusttumoren wurde festgestellt, dass in den resistenten Tumoren im Vergleich zu den nicht-resistenten Tumoren die Expression der Koaktivatoren erhöht ist und die Expression der Korepressoren geringer ist als in den nicht-resistenten Tumoren (Griault et al., 2003). Nachdem in dem Vorläuferprojekt StSch4219 festgestellt wurde, dass elektromagnetische Felder in exponierten Brustkrebszellen ein Phänomen auslösen können, dass im Wachstumsverhalten der Zellen große Ähnlichkeit mit der Resistenz gegenüber Tamoxifen hat, war es eine wichtige Fragestellung, ob es in den exponierten Brustkrebszellen auch zu einer Verschiebung des Verhältnisses zwischen Koaktivatoren und Korepressoren kommt.

1.6.2 Metastasierung und Brustkrebs

Die Standardtherapie bei Brustkrebs besteht darin, dass zunächst sofern möglich der Primärtumor komplett entfernt wird. Zum Zeitpunkt der operativen Entfernung des Primärtumors ist es jedoch nicht möglich, mit Sicherheit zu beurteilen, ob der Primär-

tumor bereits metastasierende Zellen in entfernt liegende Gewebe abgesondert hat. Aus diesem Grund werden die meisten Patientinnen im Anschluss an die Operation mit einem Antiöstrogen behandelt, das das Wachstum dieser metastasierten Tumorzellen unterdrücken soll. Trotz dieser Behandlung kommt es in einer Vielzahl von Fällen zur Ausbildung von Metastasen. Letztendlich sind es die Metastasen der Brusttumore, die mit der Zeit die lebenswichtigen Organe zerstören und damit den Tod von Brustkrebspatientinnen verursachen. Es muss daher eines der wichtigsten Bestrebungen in der Therapie der Brustkrebspatientinnen sein, eine solche Metastasenbildung zu verhindern. Dies ist vor allen Dingen deshalb sehr schwierig, weil die Metastasierung bei Brustkrebs sehr früh einsetzt. Es ist eine wichtige Aufgabe die Mechanismen zu untersuchen, die zu einer Metastasierung führen.

Bekannt ist, dass wenn ein Tumor eine gewisse Größe erreicht hat (2mm), neue Blutgefäße in den Tumor einwachsen müssen, damit die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen für die Tumorzellen gewährleistet ist. Zu diesem Zweck sind die Tumorzellen in der Lage Wachstumsfaktoren, wie z.B. VEGF und Trombospondin zu produzieren, die neue Blutgefäße induzieren und anlocken.

Um Metastasen bilden zu können, müssen einzelne Tumorzellen über diese neu gebildeten Gefäße den Tumor verlassen und über die Blutbahn an entfernte Orte transportiert werden, wo die Zellen weiter wachsen und damit eine Metastase entsteht.

Es ist nicht genau bekannt, in welcher Phase der Tumorentwicklung einzelne Zellen sich dahingehend verändern, dass sie die Fähigkeit bekommen, den Primärtumor zu verlassen. Es gibt jedoch bereits viele Erkenntnisse darüber, welche Fähigkeiten eine Tumorzellen erlangen muss, damit sie den Primärtumor verlassen kann und über die Blutbahn an den Metastasierungsort zu kommen.

Zunächst muss sich die Expression einiger Oberflächenrezeptoren verändern, mit denen die Zelle mit ihren Nachbarzellen verbunden ist oder mit denen die Zelle an der Extrazellulärmatrix verankert ist. In metastasierenden Zellen ist die Expression verschiedener Integrine und Cadherine herunterreguliert. Die Tumorzelle muss eine Reihe von Proteasen sezernieren, mit denen die Extrazellulärmatrix abgedaut wird, damit der Weg für die Zelle in Richtung Blutgefäße frei wird. Zu diesen Proteasen zählen in erster Linie die Matrixmetalloproteasen von denen inzwischen über 24 verschiedene bekannt sind (MMP1-MMP24). Zu dem Plasminogen-Aktivator-System gehören der Urokinase-Plasminogenaktivator und der Gewebe-Plasminogen-Aktivator. Außerdem

gibt es Cystatine, Kallikreine, Cathepsine und viele mehr, die bei dem Prozess der Verdauung der Extrazellulärmatrix eine Rolle spielen. Der Verdauungsprozess wird durch eine Reihe von Inhibitoren reguliert, zu denen die beiden Plasminogen-Aktivator-Inhibitoren, PAI-1 und PAI-2, und die Tissue-Inhibitoren der Metalloproteasen, TIMP-1 bis TIMP-4 gehören.

Der ganze Metastasierungsprozess unterliegt wiederum der Kontrolle durch so genannte Metastase-Suppressorgene, die eine Metastasierung der Tumorzellen verhindern, so lange sie in den Zellen exprimiert werden. Geht ein solches Metastase-Suppressor-Gen in der Zelle verloren oder ist es durch Mutation verändert, erlangt die Zelle die Fähigkeit zu metastasieren. Bekannte Metastase-Suppressorgene sind Kiss-1, Kangai, und die nm23-Proteine 1-4.

Klinisch interessant ist die Klärung der Frage, ob elektromagnetische Felder auch in der Lage sind, die Expression dieser Metastase-assoziierten Gene zu verändern und damit eine Metastasierung der Tumorzellen im frühen Stadium der Tumorentstehung zu begünstigen.

1.6.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

Vollständig unbekannt ist bisher, über welchen molekularen Mechanismus elektromagnetische Felder auf zellulärer Ebene wirken. Es gibt vereinzelt Hypothesen, dass die elektromagnetischen Felder an der Zellmembran mit Ionen in Wechselwirkung treten. Von besonderem Interesse sind hier Ca-Ionen, die möglicherweise durch die Feldeinwirkung durch Ionenkanäle in die Zelle hineintransportiert werden. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca-Konzentration kann dann im Zytosol verschiedene Signaltransduktionsprozesse auslösen. Auf der Endstrecke der intrazellulären Signaltransduktion wird die Expression von Genen in der Regel durch verschiedene Kinasen reguliert, die in der Lage sind Transkriptionsfaktoren zu phosphorylieren und damit zu aktivieren. Die meisten Erkenntnisse bestehen in diesem Zusammenhang über die verschiedenen Mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAP-Kinasen). MAP-Kinasen sind zytosolische Kinasen, die in Targetproteinen entweder Tyrosinreste, Serinreste oder Threoninreste phosphorylieren, wodurch sich die Konformation dieser Proteine verändert und diese Proteine in ihre aktivierte Form übergehen. Die bekanntesten MAP-Kinasen sind die extrazellulär-regulierten Kinasen, Erk1 und Erk2, die jun-Kinase, junK, und die Stress-aktivierte Proteinkinase (SAPK oder p38). Die Stress-aktivierten Proteinkinasen, junK und p38, sind für das Projekt von besonderem Interesse, da die-

se Kinasen von einer Vielzahl physikalischer Stressfaktoren aktiviert werden können, wie z.B. UV-Strahlung, Hyperthermie, Scherstress, Hyper- oder Hypoosmolarität. Da elektromagnetische auch eine Form von physikalischem Stress für die Zelle bedeuten können, sind die Kinasen für das Projekt von besonderem Interesse.

1.6.4 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). Von einigen Autoren konnte an Brustkrebszelllinien gezeigt werden, dass Melatonin das Wachstum der Brustkrebszellen direkt hemmt (Hill et al., 1988; Cos et al., 1991).

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. Durch unterschiedliche Kulturbedingungen (z.B. unterschiedliche Serumzusammensetzung) in den verschiedenen Laboratorien sind aus diesen MCF-7-Zellen im Laufe der Zeit Zelllinien entstanden, die sich partiell in bestimmten Eigenschaften unterscheiden (Osborne et al., 1987; Nugoli et al.; 2003). Ein auffälliges Beispiel sind auch die beiden MCF-7-Klone MCF-7 p40 und MCF-7 p181, die bei den meisten Versuchen dieses Projektes verwendet wurden. Wie wir im Vorgängerprojekt StSch4219 feststellen konnten, sind diese beiden Klone unterschiedlich empfindlich gegenüber elektromagnetischen Feldern (Girgert et al., 2005).

1.6.4.1 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 α -Rezeptor wurden bisher nur in MCF-7 Zellen nachgewiesen (Ram et al., 1998; Song et al., 1997). Es ist jedoch bisher noch nicht eindeutig geklärt worden, 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 Östrogenrezeptoren abhängig. In Brustkrebszellen, die keine Östrogenrezeptoren exprimieren, konnte keine antiproliferative Wirkung des Melatonin festgestellt werden (Hill et al., 1988). Es ist jedoch bis heute noch nicht gelungen, die Stelle in den Signalkaskaden der Östrogen- und Melatoninrezeptoren zu identifizieren, an der die Wechselwirkung dieser beiden Signalwege stattfindet.

Ob elektromagnetische Felder auch direkt die Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen beeinflussen können, wurde von Liburdy et al. (1993) 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 ist. Werden die gleichen Zellen in einem Magnetfeld von 1,2 μ T inkubiert, wird die wachstumshemmende Wirkung des Melatonins auf die Brustkrebszellen aufgehoben, und die Zellen wachsen genauso schnell, wie Zellen, die ohne Melatonin kultiviert werden.

Wir haben für die Untersuchung der Melatoninwirkung und der Tamoxifenwirkung ein Testsystem verwendet, das zum empfindlichen Nachweis der Östrogenwirkung verwendet werden kann (Girgert et al., 2003).

1.7 Projektzielrichtung und Strategie

In diesem Forschungsprojekt sollte der Mechanismus der Beeinflussung der onkostatistischen Wirkung von Melatonin und Tamoxifen auf Brustkrebszellen durch niederfrequente elektromagnetische Felder molekularbiologisch näher untersucht werden.

Die geförderten Untersuchungen sollten sowohl mit der häufig verwendeten Brustkrebszelllinie MCF-7, als auch mit weiteren etablierten Brustkrebszelllinien durchgeführt werden. Die Exposition sollte in einem sehr homogenen Magnetfeld bei den 5 verschiedenen Feldstärken von 0 μ T, 0,2 μ T, 1,2 μ T, 10 μ T und 100 μ T unter einem Höchstmaß an Kontrolle der magnetischen Flussdichte erfolgen.

Die verwendeten Brustkrebszelllinien mussten ausführlich auf die molekularbiologischen Eigenschaften mit Bedeutung für deren Wachstumsverhaltens hin untersucht werden. Dazu gehörte insbesondere auch der Nachweis der Expression verschiede-

ner für die Hemmung durch Melatonin und Tamoxifen verantwortlicher Rezeptoren und Kofaktoren.

2. Material und Methoden

2.1 Magnetfeldkammern zur Exposition der Brustkrebszellen

Das Produkt einer präzisen Entwicklungsarbeit in der wissenschaftlichen Werkstatt der Universität Ulm 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.

Die Spule zur Erzeugung des Magnetfeldes entsteht durch eine dicht anliegende Wicklung von Kupferdrähten auf dem Kupferzylinder. Die Zellkulturplatten befinden sich auf einem speziellen Halteschlitten aus Teflon, so dass eine sehr gute räumliche Magnetfeldhomogenität im Lagerungsbereich der Zellkulturplatten gewährleistet ist. Der zur Erzeugung des zeitlich veränderlichen Magnetfeldes benötigte Wechselstrom wird mittels Sinusgeneratoren erzeugt. Ebenfalls wurde die Möglichkeit vorgesehen, ein zeitlich konstantes Magnetfeld mittels einer Gleichstromquelle zu überlagern, um im Inneren des μ -Metall geschirmten Inkubators für die sham-Exposition, das partiell abgeschirmte Erdmagnetfeld zu substituieren. Im Inneren der Spule gibt es einen Bereich mit einer Länge von ca. 30cm, in dem das Feld nach außen hin nur um max. 5% nachlässt.

Selbstverständlich wurde bei der Aufstellung der Geräte auf eine Umgebung mit möglichst geringen elektromagnetischen Störfeldern geachtet (im Durchschnitt $<40\text{nT}$).

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 durchflossen, so dass durch den Heizstrom kein zusätzliches magnetisches Gleichfeld im Inkubator erzeugt wird. Von der Rückseite her sind in die Kammern Sensoren für die Magnetfeldstärke und die Temperatur eingeführt, die über einen elektronischen Feedback-Mechanismus diese Parameter konstant halten. Die Signale dieser

Sensoren werden auf einer Registrierungssoftware der Firma BMC Messsysteme (Maihach) verfolgt und abgespeichert.

Eine konstante CO₂-Konzentration im Inkubationsraum wurde durch einen CO₂-Sensor erreicht, der eine externe CO₂-Regelung steuert. Mit dieser CO₂-Regelung kann ein CO₂-Gehalt der Atmosphäre im Inkubator von 5 % genau eingehalten werden. Die Feuchtigkeitssättigung der Luft wird durch eine wassergefüllte Bodenwanne im Zylinder sichergestellt.

Für die Kontrollversuche (sham-Expositionen) bei 0 μ T wurde ein Inkubator komplett mit einem 1,5 mm starken μ -Metall-Zylinder umgeben.

2.2 Zellkulturen

Sämtliche Zellkulturarbeiten fanden im Labor für Molekulare Gynäkologie der Univ.-Frauenklinik Göttingen statt. Alle Zellen wurden außerhalb der Expositions- und Kontrollversuche in handelsüblichen Gewebekulturinkubatoren gehalten (Firma Heraeus, Hanau). Als Kulturmedium wurde Dulbecco's modifiziertes MEM (Biochrom, Berlin) verwendet, das mit 5 % Kälberserum, 2 mM Glutamin, 50 U/ml Penicillin/Streptomycin, 2,5 μ g/ml Amphotericin B und einer 1:100 Verdünnung der nicht-essentiellen Aminosäuren der Fa. Biochrom supplementiert wurde.

Die MCF-7 Zellen stammten ursprünglich von der ATCC, Manassas, USA. Die MCF-7 (p40) Zellen waren aus dem endokrinologisch-onkologischen Labor der Frauenklinik Ulm und der Zellklon MCF-7(p181) stammte aus dem Labor von Dr. Körner, Augsburg. Die Brustkrebszelllinien HCC70, MDA-MB-435, MDA-MB-453, wurden ebenfalls von der ATCC bezogen.

Die Brustkrebszelllinie MCU-1 ist während des Vorgängerprojekts StSch4219 an der Universitätsfrauenklinik Ulm neu aus einer Primärkultur des Pleurapunktats einer Brustkrebspatientin etabliert worden. Sie wurde in den durchgeführten Versuchen in den Passagen 18-25 eingesetzt.

Die mit dem Gen für den membranständigen Melatoninrezeptor Mel1a transfizierten MCF-7 Zellen (MCF-7Mel1a) 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.

2.3 Genexpressionsanalysen

2.3.1 *RNA-Isolierung aus exponierten Brustkrebszellen*

Zur Untersuchung der veränderten Genexpression nach Exposition von Brustkrebszellen mit Magnetfeldern wurden 3×10^5 Zellen der MCF-7 Zelllinien p40 und p181 für 48 Stunden in den Magnetfeldinkubatoren mit $1,2 \mu\text{T}$ exponiert. Die Expression der verschiedenen Gene in den exponierten Zellen wurde mit der Expression in den gleichen Zellen verglichen, die stattdessen für 48 Stunden in einem abgeschirmten Inkubator ohne künstliches Magnetfeld kultiviert wurden. Die RNA von unbehandelten Zellen oder von Zellen, die mit Magnetfeld exponiert waren, wurde mit dem RNeasy-Kit (Qiagen, Hilden) isoliert.

2.3.2 *cDNA-Mikroarrays*

2.3.2.1 *Bestimmung der Expression krebsrelevanter Gene auf den AtlasTM human cancer-Mikroarrays*

Auf dem Atlas-Mikroarray sind cDNA's von 1176 krebsrelevanten Genen in 6 Blöcken à 14 x14 Genen aufgetragen, an die die markierte cDNA aus den RNA-Proben bindet.

Zellen von zwei Klonen der Brustkrebszelllinie MCF-7 (p40 und p181) wurden in den Magnetfeldinkubatoren für 48 Stunden mit $1,2 \mu\text{T}$ exponiert. Als Kontrolle wurden parallel die gleichen Zellen in einem baugleichen Inkubator kultiviert, der zur Abschirmung von Umgebungsfeldern von einem μ -Metall-Container umschlossen war. Aus den Zellen wurde die RNA mittels des RNeasy-Kits der Fa. Qiagen isoliert. Gleiche Mengen RNA ($6 \mu\text{g}$) wurden in Gegenwart von Biotin-markiertem UTP in cDNA umgeschrieben. Die Biotin-markierte cDNA wurde bei 60°C mit den Membranen verschiedener Mikroarrays über Nacht hybridisiert. Anschließend wurden die Membranen zweimal bei Raumtemperatur mit $2 \times \text{SSC}$ und zweimal bei 68°C mit $0,5 \times \text{SSC}$ gewaschen.

Die gebundene cDNA wurde durch eine Chemolumineszenz-Reaktion mit alkalischer Phosphatase, die an Streptavidin gebunden war, auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht und die Stärke der Filmschwärzung densitometrisch quantifiziert.

Die Detektion der Hybridisierungssignale durch Chemolumineszenz ist wesentlich empfindlicher als die Detektion mit ^{33}P -markierter cDNA.

2.3.2.2 Themenspezifische Mikroarrays

Neben dem AtlasTM human cancer Array (s.2.3.2.1) waren noch verschiedene weitere Gen-Arrays von Interesse auf denen jeweils 112 Gene zu einem bestimmten Thema repräsentiert sind. Diese Arrays sind wesentlich einfacher zu handhaben, da sie nur 3x4 cm groß sind und sich in der Hybridisierungsröhre nicht so aufwölben, wie es die viel größeren Atlas-Arrays tun. Aus diesem Grund waren diese Arrays auch bei allen Versuchen vollständig auswertbar.

Die Markierung und Detektion der cDNA wurde wie bei den Atlas-Arrays mit Biotin-UTP und Chemolumineszenz durchgeführt.

Auf dem Brustkrebs- und Östrogenrezeptor-signalling Array der Fa. Superarray waren in erster Linie eine Reihe von Genen repräsentiert, deren Expression von Östradiol induziert wird, wie z.B. pS2, Cathepsine, Kallikreine etc.

Der nuclear receptor and cofactor Array enthielt viele nukleäre Rezeptoren, wie die Östrogenrezeptoren und die Östrogenrezeptor-related Rezeptoren, die Retinoic Acid Rezeptoren und weitere Steroidrezeptoren. Außerdem sehr wichtig für dieses Projekt, waren die gängigen Koaktivatoren und Korepressoren der nukleären Rezeptoren auf diesem Array repräsentiert.

Der Extrazellulärmatrix und Metastasierungs-Array repräsentierte viele Integrine, Komponenten der Extrazellulärmatrix und viele Proteasen, die die Extrazellulärmatrix abbauen, wie z.B. die Matrixmetalloproteasen.

2.3.3 RT-PCR

Die Expressionsänderungen der verschiedenen Gene, die in diesem Projekt untersucht wurden, wurde durch RT-PCR verifiziert und quantifiziert.

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 wurden durch 1 U Taq-Polymerase mit 200 nM spezifischen Primer amplifiziert.

SRC-1:	primer A: primer B:	GATATAGACACAAGCTGCAA, ATAGCGTAGGAGCTGATGGT
AIB1:	primer A: primer B:	TCACTGAGATCCTCCATGAG GGCATCTGTAAGCCTTGGTT
N-Cor:	primer A: primer B:	TGCCACTGTATAACCAGCCA TGCTCAGAGAGCCCATCAAT
SMRT:	primer A: primer B:	CACGAGGTGTCAGAGATCAT GTCGTCTGTCTTCTCCTTGA
L7:	primer A: primer B:	AGATGTACAGAACTGAAATTC ATTTACCAAGAGATCGAGCAA
uPA:	primer A: primer B:	TAGATAAGTCAAAAACCTGC CCTGCAGTAATTATGTTTCC
tPA:	primer A: primer B:	TTGCTGGGAAGTGCTGTGAA CAGGATCATGGAATTCCACG
uPAR:	primer A: primer B:	ATGCAGTGTAAGACCAACG CTCACAGCTCATGTCTGATG
HDAC1:	primer A: primer B:	CCAATGAAGCCTCACCGAAT CACCAGTAGACAACCTGACAG
HDAC 7:	primer A: primer B:	AAGCTAGCGGAGGTGATTCT AGAGTGATTGCGGGCAGCAA
MTA1:	primer A: primer B:	CAAATCAGCGTCAACAACG GTCGTGTGCAGATAGAAAGC
Kangai:	primer A: primer B:	TCTTCTTTATCCTGGGCGCA AATGAGCTCAGTCACGATGC
NM23-H1:	primer A: primer B:	AGTTCAAACCTAAGCAGC AGATCTTCGGAAGCTTGCAT
NM23-H2:	primer A: primer B:	AGATCATCAAGCGCTTCGAG AGACCCAGTCATGAGCACAA
NM23-H4:	primer A: primer B:	TCATCCGCTACATGAGCTCT GGTACAGAAAGGCACTGAAG
TIMP1:	primer A: primer B:	CCAAGTTCGTGGGGACAC TGCAGTTTTCCAGCAATGAG

TIMP2:	primer A:	AGAAGAACATCAACGGGCAC
	primer B:	CTTGGAGGCTTTTTTTGCAG
KISS-1:	primer A:	ACCTGGCTCTTCTCACCAAG
	primer B:	TAGCAGCTGGCTTCCTCTC
Mt1:	primer A:	TCCTCATCTTCACCATCGTG
	primer B:	AAGGTGCACGAGTAGATCCT
RZR α :	primer A:	ACTTCCCCAACTGTGTCCAT
	primer B:	GGCACGGCACATTCTGATAA
p21waf:	primerA:	TGAGCGATGGAACCTTCGACT
	primerB:	GCTTCCTCTTGGAGAAGATC
c-myc	primer A:	GAACTTACAACACCCGAGCA
	primerB:	TCTTCCAGATGTCCTCGCTG
BRCA1:	primerA:	GGAGTTGATCAAGGAACCTG
	primer B::	ACGGTTTCTGTAGCCCATAC

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer

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

2.3.4 Western-Blots

6×10^5 Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 p181 wurden in 6-Loch-Platten für 24 Stunden und 48 Stunden mit 1,2 μ T exponiert. Die exponierten Zellen und die nicht exponierten Kontrollzellen wurden mit 1mM EDTA in PBS abgelöst und bei 400 g zentrifugiert. Die Proteine wurden aus dem Zellpellet mit 150 μ l Lysepuffer (Cell-lytic M) extrahiert und die nicht-löslichen Bestandteile bei 13000 g abzentrifugiert. Von dem Überstand wurde mit der Methode nach Bradford der Proteingehalt ermittelt. Jeweils 100 μ g des Proteinextraktes wurden 5 Minuten mit Laemmli-Puffer auf 95 °C erhitzt und auf Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden anschließend eine Stunde lang bei 100 V auf eine PVDF-Membran geblottet und die Proteine mit spezifischen Antikörpern auf den Western Blots detektiert.

2.4. Elektrophoretischer Mobilitätsshift-Assay

Der Elektrophoretische Mobilitätsshift-Assay dient dem Nachweis der Bindung nukleärer Proteine an die DNA im Promoter von interessanten Genen. In diesem Projekt sollte er für den Nachweis der Aktivierung des membranständigen Melatoninrezeptors eingesetzt werden.

Nach Bindung des Melatonins an den Rezeptor wird letztendlich das cAMP-Responsive-Element (CRE) bindende Protein (CREB) phosphoryliert und bindet an Promotersequenzen, die ein CRE enthalten. Promoteranalysen haben ergeben, dass der Promoter der Tumorsuppressorgens BRCA-1 ein CRE enthält. Das BRCA-1 Protein ist bei familiär gehäuft auftretendem Brustkrebs mutiert und bei vielen sporadisch auftretenden Brusttumoren herunterreguliert.

Brustkrebszellen werden 12 Stunden mit 10^{-11} M Östradiol und anschließend 2 Stunden mit 10^{-9} M Melatonin stimuliert. Aus den Zellen werden die nukleären Proteine nach einer Vorschrift von Maniatis isoliert. 50 µg dieser nukleären Proteine werden in entsprechenden Puffern aus dem Light-shift-Kit der Fa. Pierce mit einem Oligonukleotid inkubiert, das das CRE aus dem BRCA-1 Gen enthält.

Sequenz des Oligonukleotids mit dem CRE aus BRCA-1:

Sense-Oligo: CTTTCCTTTTACGTCATCCGGGGGC

Anti-Sense: GCCCCCGGATGACGTAAAAGGAAAG

Die Oligonukleotide sind an den Enden mit Biotin markiert und wurden vor dem Einsatz gemischt und 5 Minuten bei 50°C annealt.

Die nukleären Proteine binden 30 Minuten lang bei Raumtemperatur an die Oligonukleotide und danach wird das Gemisch auf einem nativen 7,5%igen Acrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt und im Anschluss auf eine Nylonmembran geblottet.

Der Nachweis der Biotin-markierten Oligonukleotide auf der Nylonmembran erfolgt mit Peroxidase-markiertem Streptavidin und Chemolumineszenz.

2.5 Proliferationstests („E-Screen-Assay“)

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.

Der Proliferationstest wurde, wie in Girgert et al. (2005) beschrieben, durchgeführt.

In 96-Well-Platten werden 500 Zellen pro well in 100 µl Experimentalmedium* ausgesät und 24 Stunden anwachsen gelassen.

* Experimentalmedium = phenolrotfreies DME-Medium mit 5 % FCS.

Steigende Konzentrationen der eingesetzten Hemmstoffe (4-Hydroxy-Tamoxifen, Faslodex, Raloxifen) werden jeweils in 100 µl Experimentalmedium zu den Zellen hingeggeben. Die Zellen werden 7 Tage in den Magnetfeldinkubatoren bei 37 °C bei den verschiedenen Magnetfeldstärken exponiert. Am Tag der Auswertung werden in jedes well 20 µl Alamar blue-Lösung zugegeben und die Zellen weitere 4 Stunden bei 37 °C kultiviert. Alamar blue ist ein nicht toxischer, blauer Farbstoff, der von den Mitochondrien der lebenden Zellen in einen roten Farbstoff umgewandelt wird. Die Menge des entstehenden roten Farbstoffes ist der Zahl der vorhandenen Zellen proportional. Nach den 4 Stunden wird die Konzentration des entstandenen roten Farbstoffes bei 570 nm gegen eine Referenz bei 630 nm gemessen.

2.5.1 Proliferationsmessung bei Behandlung mit Melatonin

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

CD-FCS ist fetales Kälberserum, welches nach Stanley et al. (1977) mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich 17β-Östradiol zu entfernen.

750 Zellen wurden in 100 µl Experimentalmedium in die Kulturfächer einer 96-well-Mikrotiterplatte pipettiert und 24 Stunden Zeit zur Adhäsion gelassen. Anschließend wurden in jedes Kulturfach entweder 50 µl Experimentalmedium (Kontrolle) oder 50 µl einer 17-β-Östradiol-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 Östradiolkonzentrationen 50 µl einer Melatoninlösung hinzugefügt, so dass die Endkonzentration von Melatonin entweder 10^{-9} M oder 5×10^{-9} M betrug. Im Kontroll-experiment wurden anstelle der Melatoninlösung 50 µl Experimentalmedium hinzugefügt.

Die Zellen wurden 7 Tage bei 37°C , 5 % CO_2 in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre kultiviert. Am Ende der Inkubationszeit wurde die Zellzahl durch die oben beschriebene kolorimetrische Methode mit Alamar blue quantifiziert.

Dosis-Wirkungskurven wurden bei 6 verschiedenen Konzentrationen von Östradiol zwischen 5×10^{-13} M und 10^{-10} M in Abwesenheit und in Gegenwart verschiedener konstanter Melatonin-Konzentrationen aufgenommen.

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.

Mit diesem Programm läßt sich die EC_{50} der Estradiol-Wirkung im Gegenwart von Melatonin berechnen.

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

Der Proliferationseffekt (PE) für jede Östradiolkonzentration wurde bestimmt, indem die durchschnittliche optische Dichte (OD) bei einer gegebenen Östradiolkonzentration durch die OD der negativen Kontrolle, die kein Östradiol enthielt, geteilt wurde.

Dosis-Wirkungskurven für die Wirkung des $17\text{-}\beta\text{-Östradiols}$ auf das Wachstum der Brustkrebszellen wurden bei jeder eingesetzten Melatoninkonzentration erstellt, indem die mittlere relative Proliferation ($\text{RPE} = \text{PE}-1$ bei der Testkonzentration/ $\text{PE}-1$ bei der

maximalen Konzentration) gegen die Konzentration des Östradiols 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.

3. Erzielte Ergebnisse

3.1 Genexpressionsanalysen

Eines der Hauptziele des Förderprojekts StSch4461 war die Wirkung elektromagnetischer Felder auf die Genexpression in den exponierten Brustkrebszellen zu untersuchen.

Um sich zunächst einen Überblick zu verschaffen, welche Gene in den Brustkrebszellen durch die Behandlung mit Magnetfeldern differentiell exprimiert werden, wurde die RNA der Zellen zunächst mit verschiedenen Mikroarrays untersucht. Mikroarrays sind Membranen, auf die cDNAs einer Vielzahl von Genen aufgetragen wurde, die mit der cDNA der untersuchten Probe hybridisiert wird.

3.1.1 Ergebnisse des Atlas-Mikroarrays

Die Handhabung der 12x8 cm großen Membranen gestaltet sich bei der Hybridisierung leider schwierig, weshalb bei manchen Hybridisierungen nicht alle Bereiche der Mikroarrays auswertbar waren.

Auf dem Atlas-Mikroarrays sind cDNA's von 1176 krebsrelevanten Genen in 6 Blöcken à 14 x14 Genen aufgetragen, an die die markierte cDNA aus den RNA-Proben bindet.

Von jeder der beiden Zelllinien (MCF-7 p40 und MCF-7 p181) wurden RNA-Proben aus zwei unabhängigen Expositionen auf Unterschiede in der Genexpression untersucht und ausgewertet. Gene, bei denen das Hybridisierungssignal in der exponierten Proben mehr als doppelt so hoch war wie in der Kontrollprobe, wurden als hochreguliert eingestuft. Gene, deren Hybridisierungssignal weniger als 50 % der Kontrollprobe ergab, wurden als herunterreguliert gewertet. Um Artefakten vorzubeugen, die durch eine zu schwache Detektion an manchen Stellen der Membran zustande gekommen sind, wurden Messwerte, bei denen die normalisierte relative Expression kleiner als

10% des Durchschnittswertes war, aus der abschließenden Auswertung ausgeschlossen.

3.1.1.1 Atlas-Array mit den MCF-7 p40-Zellen

Bei den MCF-7 p40-Zellen war bei 89 Genen der Mittelwert der relativen Expression >2,0. Von diesen war jedoch nur bei 20 Genen die relative Expression bei beiden Expositionen >2,0 (Tabelle 2).

histone deacetylase 3	15,5 ± 20,0
Cockayne syndrome 1	14,9 ± 18,5
mitogen-activated protein kinase 8	7,9 ± 8,7
cyclin-dependent kinase 3	6,3 ± 5,4
interleukin 15 receptor, alpha	6,1 ± 5,6
v-myc oncogene, neuroblastoma derived	4,4 ± 2,1
ets variant gene 6 (TEL oncogene)	4,0 ± 4,2
T-cell, immune regulator 1, H+ transport 3	3,5 ± 2,8
serine threonine kinase 39 (STE20/SPS1)	3,4 ± 4,7
immunoglobulin heavy constant gamma 3	3,1 ± 2,6
mitogen-activated kinase kinase kinase 8	3,0 ± 1,4
v-raf oncogene homolog B1	2,9 ± 2,0
prefoldin 5	2,8 ± 0,8
granulysin	2,8 ± 1,7
transforming growth factor, beta 3	2,7 ± 2,2
casein kinase 1, gamma 2	2,6 ± 1,8
serine protease inhibitor, Kunitz type, 2	2,5 ± 1,3
growth factor receptor-bound protein 2	2,1 ± 0,2
cyclin E1	2,0 ± 0,3
ATP synthase, mitochondrial F0	2,0 ± 0,6

Tabelle 2: Erhöhung der Expression in den exponierten p40 Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Unter diesen hochregulierten Genen sind mehrere Gene, die an der Genregulation beteiligt sind und mehrere Transkriptionsfaktoren.

Die Histondeacetylase 3 (HDAC3) war bei beiden exponierten RNA-Proben durchschnittlich um den Faktor 15 stärker exprimiert, die Expression einer anderen Histondeacetylase (HDAC1) war nur nach einer Exposition der MCF-7 p40 Zellen erhöht und wurde daher nicht in Tabelle 2 aufgenommen. Diese Histondeacetylasen, verhindern die Expression anderer Gene, indem sie Acetylreste von Histonen abspalten und die Kondensierung der DNA ermöglichen. Das N-myc-Gen ist ein Transkriptionsfaktor aus der Familie myc-Onkogene, das die Expression verschiedener proliferationssteigernder Gene induziert. Als weitere Onkogene waren das tel-Onkogen und das raf1B Onkogen stärker exprimiert.

Von den Wachstumsfaktoren und Rezeptoren waren in den mit 1,2 μ T exponierten Zellen TGF beta 3 und der Rezeptor für Interleukin 15 deutlich stärker exprimiert. Der epidermal growth factor war nur nach einer Exposition stärker exprimiert, bei der zweiten Exposition war das Signal der Kontrolle zu schwach, so das der epidermal growth factor nicht in die Tabelle 2 aufgenommen wurde. Vom epidermal growth factor und von TGF beta 3 ist bekannt, dass sie bei Tumoren, wie dem Brustkrebs, eine proliferationssteigernde Rolle besitzen.

An intrazellulären Signaltransduktionselementen waren die MAP-Kinase-Kinase-Kinase 8 und die MAP-Kinase 8, die auch als „Stress-aktivierte Proteinkinase“ bekannt ist, verstärkt exprimiert. Von den Genen, die den Zellzyklus regulieren, waren die Cyclin-abhängige Kinase 3 und das Cyclin E1 in den Magnetfeld-exponierten p40-Zellen stärker exprimiert. Als weitere Kinase war die Expression der Caseinkinase 1 gamma erhöht.

In den exponierten Zellen waren auch viele Gene verstärkt exprimiert, die mit der **Metastasierung** von Tumorzellen in Zusammenhang stehen. Der **Serinprotease Inhibitor 2**, der die Ausbreitung der Tumorzellen in das umgebende Gewebe reguliert, war um den Faktor 2,5 verstärkt exprimiert.

Bei 160 Genen war die Expression herunterreguliert (relative Expression <0,5), davon war bei 16 Genen die Expression in den mit 1,2 μ T behandelten Zellen bei beiden Expositionen reduziert (Tabelle 3).

insulin-like growth factor binding protein 6	0,5 ± 0,2
interleukin 1 receptor accessory protein	0,5 ± 0,14
cyclin-dependent kinase 5	0,45 ± 0,05
microtubule-associated protein, RP/EB family	0,4 ± 0,07
interleukin 2	0,4 ± 0,08
cyclin D1	0,36 ± 0,35
CD5 antigen	0,36 ± 0,03
thyrotropin-releasing hormone receptor	0,35 ± 0,07
insulin-like growth factor binding protein 5	0,35 ± 0,15
adrenergic, beta, receptor kinase 1	0,34 ± 0,14
cyclin G2	0,24 ± 0,15
interferon, gamma-inducible protein 30	0,22 ± 0,17
v-raf-1 oncogene homolog 1	0,22 ± 0,05
interleukin 7	0,2 ± 0,0
platelet-derived growth factor receptor, alpha	0,2 ± 0,06
wingless-type MMTV integration site 2B	0,09 ± 0,04

Tabelle 3: Abnahme der Expression in den exponierten p40-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Unter den herunterregulierten Genen waren auch einige Wachstumsfaktoren und Rezeptoren. Der PDGF-Rezeptor alpha ist an der Regulation des Zellwachstums vieler verschiedener Gewebe beteiligt. Der Rezeptor des Thyrotropin releasing Hormons wird in erster Linie auf Zellen der Schilddrüse exprimiert. Während der Rezeptor für Interleukin 15 in den feldexponierten Zellen hochreguliert war, waren zwei Interleukine, das Interleukin 2 und das Interleukin 7, so wie das Interleukin 1 Rezeptor accessory Protein in den Magnetfeld-behandelten Zellen schwächer exprimiert. Das IGF-Bindungsprotein 5 und das IGF-Bindungsprotein 6 haben eine Reservoirfunktion für die Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren IGF-I und IGF-II. Sie schützen diese IGF's vor dem proteolytischen Abbau und stellen die Wachstumsfaktoren den Zellen zur Verfügung. Die an die Extrazellulärmatrix gebundenen IGF-Bindungsproteine erleichtern auch die **Migration** der Zellen.

Die an der Zellzyklusregulation beteiligten Cycline D1 und G2 und Cyclin-abhängige Kinase 5 waren in den behandelten p40 Zellen schwächer exprimiert, während die Cyclin-abhängige Kinase 3 hochreguliert war (s. Tabelle2).

3.1.1.2 *Atlas-Array mit den MCF-7 p181-Zellen*

Bei den MCF-7 p181-Zellen war bei 201 Genen der Mittelwert der relativen Expression >2,0. Von diesen war bei 61 Genen die relative Expression sogar bei beiden Expositionen erhöht (Tabelle 4).

v-myb myeloblastosis viral oncogene	11,6 ± 13,3
v-ral simian leukemia viral oncogene B	9,7 ± 11
hepatoma-derived growth factor	8,9 ± 4,3
insulin induced gene 1	8,7 ± 6,1
FOS-like antigen 2	7,2 ± 10,1
insulin-like growth factor binding protein 5	6,5 ± 6,4
protein phosphatase 2, regulatory subunit B	5,9 ± 5,4
leucyl/cystinyl aminopeptidase	5,8 ± 1,8
villin 2 (ezrin)	5,7 ± 3,2
STAT 5B	5,5 ± 2,2
ligase IV, DNA, ATP-dependent	5,0 ± 0,1
cyclin-dependent kinase 7	5,0 ± 1,2
high-mobility group nucleosomal binding 2	4,8 ± 0,9
suppression of tumorigenicity 5	4,8 ± 5,3
protein phosphatase 1D delta isoform	4,7 ± 0,4
fibroblast growth factor receptor 4	4,6 ± 4,4
dual specificity phosphatase 8	4,4 ± 4,4
matrix metalloproteinase 3	4,2 ± 1,4
core promoter element binding protein	4,1 ± 3,3
ribosomal protein S6 kinase	4,0 ± 4,2
microtubule affinity-regulating kinase 2	4,0 ± 0,3
splicing factor, arginine/serine-rich 7	4,0 ± 1,0
thrombospondin 2	4,0 ± 3,3
interferon induced transmembrane protein 2	3,8 ± 1,4

G protein-coupled receptor kinase 6	3,7 ± 3,2
xanthine dehydrogenase	3,7 ± 0,3
high-mobility group box 2	3,7 ± 3,3
manic fringe homolog	3,4 ± 0,6
FOS-like antigen 1	3,4 ± 3,2
hepatocyte growth factor-kinase substrate	3,4 ± 0,1
retinoic acid receptor, alpha	3,3 ± 0,2
protein phosphatase, EF domain 2	3,3 ± 2,9
RAN binding protein 2	3,3 ± 2,7
LDL receptor associated protein 1	3,1 ± 2,3
plasminogen activator, tissue	3,1 ± 2,5
suppression of tumorigenicity 13	2,9 ± 2,6
splicing factor, arginine/serine-rich 8	2,9 ± 1,3
caspase 9, apoptosis-related cysteine protease	2,9 ± 0,1
CD59 antigen	2,9 ± 2,5
cyclin-dependent kinase inhibitor 2D inhibits CDK4	2,9 ± 0,6
NIMA -related kinase 3	2,6 ± 0,2
cancer/testis antigen 1	2,6 ± 1,0
interleukin 4	2,6 ± 1,8
DNA-ligase I, ATP-dependent	2,6 ± 1,3
interleukin 13 receptor, alpha 2	2,6 ± 1,8
mitogen-activated protein kinase 3	2,5 ± 1,7
interleukin 15 receptor, alpha	2,5 ± 0,7
primase, polypeptide 1	2,5 ± 1,5
SH3-domain binding protein 2	2,4 ± 1,5
Gardner-Rasheed feline sarcoma viral (v-fgr)	2,4 ± 0,4
wingless-type MMTV integration site family 5A	2,3 ± 1,5
cadherin 2, type 1, N-cadherin	2,3 ± 1,5
pM5 protein	2,3 ± 0,4
mutL homolog 1, colon cancer, nonpolyposis 2	2,2 ± 0,2
macrophage migration inhibitory factor	2,2 ± 0,5
vaccinia related kinase 2	2,1 ± 0,6

thyroid autoantigen (Ku antigen)	2,1 ± 1,1
v-src sarcoma viral oncogene	2,1 ± 0,3
MCM2 minichromosome maintenance def. 2	2,0 ± 0,1
T cell receptor alpha variable 14	2,0 ± 0,5
caspase 7, apoptosis-related cysteine protease	2,0 ± 0,2

Tabelle 4: Erhöhung der Expression in den exponierten p181-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Zu den verstärkt exprimierten Genen gehören die Wachstumsfaktoren Hepatoma-derived growth factor und das Interleukin 4 und die Rezeptoren für FGF4, Retinsäure, Interleukin 13 und Interleukin 15. An Signaltransduktionselementen waren das myb-Onkogen, das ral-Onkogen und das src-Onkogen, STAT 5B und die MAP-Kinase 3 in den Magnetfeld-behandelten Zellen stärker exprimiert. Als Gene, die mit der Metastasierung von Tumorzellen in Zusammenhang stehen, waren der Gewebe-Plasminogenaktivator, tPA, die Matrixmetalloproteinase 3 und der Zelloberflächenrezeptor N-Cadherin in ihrer Expression erhöht.

Bei 160 Genen war die Expression in den exponierten p181 Zellen herunterreguliert (relative Expression <0,5). Davon war in den mit 1,2 µT behandelten Zellen bei 41 Genen die durchschnittliche normalisierte Expression beider Versuche <0,5.

Cockayne syndrome 1	0,5 ± 0,2
CDC42 binding protein kinase alpha	0,5 ± 0,04
cyclin G2	0,5 ± 0,6
ret proto-oncogene	0,5 ± 0,5
alpha-2-macroglobulin	0,5 ± 0,01
epidermal growth factor receptor (v-erb)	0,5 ± 0,2
procollagen (type III) N-endopeptidase	0,5 ± 0,02
mitogen-activated protein kinase kinase 7	0,5 ± 0,6
cyclin H	0,5 ± 0,3
patched homolog	0,5 ± 0,6
prohibitin	0,4 ± 0,4

myeloid cell leukemia seq. 1 (BCL2-related)	0,4 ± 0,1
disintegrin and metalloproteinase domain 9	0,4 ± 0,4
abl-interactor 2	0,4 ± 0,2
mitogen-activated protein kinase kinase 6	0,4 ± 0,4
protocadherin gamma	0,4 ± 0,25
CASP2 and RIPK1 domain adaptor	0,4 ± 0,16
proliferating cell nuclear antigen	0,4 ± 0,3
BCL2-like 2	0,4 ± 0,02
NF kappa light gene enhancer in B-cells 2	0,4 ± 0,02
mitogen-activated protein kinase 8	0,3 ± 0,3
ribosomal protein S6 kinase, polypeptide 3	0,3 ± 0,1
myosin, light polypeptide kinase	0,3 ± 0,03
death associated protein 3	0,3 ± 0,2
death-associated protein C05b	0,3 ± 0,05
B-cell CLL/lymphoma 2	0,3 ± 0,16
transforming growth factor, beta 1	0,3 ± 0,2
26 serine protease	0,3 ± 0,13
T-cell, immune regulator 1	0,3 ± 0,1
kangai 1 (suppression of tumorigenicity 6)	0,3 ± 0,05
tumor necrosis factor receptor member 10a	0,2 ± 0,1
protein kinase, cAMP-dependent type I alpha	0,2 ± 0,1
serine hydroxymethyltransferase 1	0,2 ± 0,1
bone morphogenetic protein 6	0,2 ± 0,03
adaptor protein pleckstrin homology ad sh2	0,2 ± 0,08
CD27-binding (Siva) protein	0,2 ± 0,2
transforming growth factor, alpha	0,2 ± 0,15
hemopoietic cell kinase	0,2 ± 0,12
MAP-kinase activating death domain	0,2 ± 0,07
tumor necrosis factor receptor member 1A	0,13 ± 0,07
CDC37 cell division cycle 37	0,13 ± 0,02

Tabelle 5: Verringerung der Expression in den exponierten p181-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Schwächer exprimiert waren die Wachstumsfaktoren $TGF\alpha$ und $TGF\beta_1$, so wie der Rezeptor für den epidermalen Wachstumsfaktor. Bei den Signaltransduktions-elementen war die Expression der MAP-Kinase 8 und der MAP-Kinase-Kinasen 6 und 7 in den exponierten Zellen reduziert, so wie das ret-Onkogen.

Von den Metastase-assoziierten Genen waren die Disintegrin-und Metalloproteinase 9 und das Metastase-Suppressorgen Kangai in den p181 Zellen herunterreguliert. Das Metastase-Suppressorgen ist in diesem Zusammenhang besonders interessant, weil es sich hier um einen negativen Regulator des Metastasierungsprozesses handelt. Fällt es aus, neigen die Tumorzellen stärker dazu, Metastasen zu bilden.

3.1.2 Themenspezifische Mikroarrays

Zusätzlich zu dem Atlas-Mikroarray wurden weitere themenspezifische Mikroarrays, deren Gene auf dem Atlas-Mikroarray nicht repräsentiert waren, mit cDNA aus der RNA der behandelten Zellen hybridisiert. Dabei waren vor allen Dingen Arrays interessant, die sich mit Brustkrebs und den Östrogenrezeptoren befassten, weil Veränderungen in der Expression dieser Gene Hinweise auf die abgeschwächte Reaktion der Brustkrebszellen auf Tamoxifen im Magnetfeld geben können. Des weiteren wurde Mikroarrays eingesetzt, auf denen speziell Gene repräsentiert waren, die mit der Extrazellulärmatrix und der Metastasierung in Verbindung stehen und Arrays, die etwas über die Expression von nukleären Rezeptoren und ihre Kofaktoren aussagen können.

3.1.2.1 Brustkrebs und Östrogenrezeptor Signaltransduktions-Array

Auf dem Brustkrebs und Östrogenrezeptor Signaltransduktions-Array der Fa. Superarray befinden sich cDNAs von 112 Genen, die mit Brustkrebs oder der Signaltransduktion der Östrogenrezeptoren im Zusammenhang stehen. Mit verschiedenen RNAs aus exponierten Brustkrebszellen wurde dieser Gen-Array dreimal durchgeführt.

Von den 112 Genen, die auf dem Array waren, gaben bei der Zelllinie MCF-7 p40 nach der Hybridisierung 41 Gene sichtbare Signale. Von diesen waren in den p40-Zellen nach 2 Tagen Exposition mit 1,2 μ T vier Gene verstärkt exprimiert. Die Topoisomerase 2a, die bei der Replikation der DNA eine Rolle spielt, war in zwei Versuchen stärker exprimiert und in einem Versuch herunterreguliert. Die Protease Cathepsin D, der kationische Aminosäuren-Transporter CD98 und der für die Angiogenese wichtige

Wachstumsfaktor VEGF waren nur in einem der drei Versuche hochreguliert. 10 Gene wurden in den p40 Zellen herunterreguliert. Folgende Gene waren in allen drei Versuchen mit den p40 Zellen herunterreguliert. Der Rezeptor ErbB2, ist in höher malignen Brustkrebszellen verstärkt exprimiert, meistens liegt in diesen Tumoren eine Genamplifikation des ErbB2 Gens vor, das heißt, dass die Zelle mehr als zwei Kopien des Gens enthält. Von ErbB2 ausgehend wird der Östrogenrezeptor über den MAP-Kinase-Weg zusätzlich aktiviert.

Das Cyclin E1 ist an der Regulation des Zellzyklus beteiligt und wird in proliferierenden Zellen stärker exprimiert. Das Cytochrom c-Oxidase assembly Protein, Cox 17, ist ein mitochondriales Protein, das beim Energiestoffwechsel der Zellen eine Rolle spielt und das für die Anreicherung von Cu-Ionen in Mitochondrien notwendig ist. Die Protease Kallikrein 5, könnte bei der Metastasierung der Tumorzellen eine Rolle spielen. Das Keratin B6 ist ein Bestandteil des Zytoskeletts und das Rho-Protein, RAC2, ist an der Organisation des Zytoskeletts beteiligt. Der Nerve growth factor beta ist ein für Brustkrebszellen untypisches Protein, es hat normalerweise die Funktion, die Differenzierung von Nervenzellen zu steuern.

Zwei Gene waren nur in jeweils einem Versuch herunterreguliert. Das Cyclin A2, das wie das Cyclin E1 an der Zellzyklusregulation beteiligt ist und der Proliferationsmarker Ki67, der in allen Zellen exprimiert wird, die sich teilen.

Mit RNA aus der Zelllinie MCF-7 p181 entstanden bei 40 Genen nach der Hybridierung mit dem Östrogenrezeptor-Array sichtbare Signale. 17 Gene waren in den mit 1,2 µT behandelten p181-Zellen verstärkt exprimiert.

Bei allen drei Versuchen verstärkt exprimiert waren die Gene: **Kallikrein 5**, eine Serin-Protease, die durch Östrogen und Progesterin hochreguliert wird. Das Substrat einer Protein-Kinase C (MACMARCKS), das bei der **Zellmigration** eine Rolle spielen soll und ein **Serinprotease Inhibitor, PAI-1**. Die anderen Gene waren nur in 2 von 3 Versuchen verstärkt exprimiert.

Unter diesen waren die Gene für Cyclin E1, das jedoch in den exponierten p40 Zellen schwächer exprimiert war, das E-Cadherin, ein Rezeptor für die Extrazellulärmatrix und Claudin 7, ein Protein aus tight junctions, die besonders feste Verbindungen zwischen benachbarten Zellen herstellen. Die Protease Cathepsin D ist eine vom Östrogenrezeptor regulierte Protease. GATA-3 ist ein Transkriptionsfaktor, der mit der Östrogenrezeptor abhängigen Genregulation assoziiert ist.

GNAS, ein Guaninnukleotid-bindendes Protein, ist Bestandteil einiger heterotrimerer G-Proteine, die an der Signaltransduktion verschiedener Rezeptoren beteiligt sind. Es ist daher für die Untersuchung der Effekte der Magnetfelder auf die Signaltransduktion des membranständigen Melatoninrezeptors MT1 von Interesse.

Das heat shock Protein 28, wird bei zellulärem Stress, wie z.B. bei Hyperthermie, gebildet und besitzt eine Schutzfunktion für zytosolische Proteine.

Nur nach einer Exposition erhöht und bei zwei Exposition unverändert waren die Gene für Cyclin A1, für p21waf und das Cytochrom c oxidase assembly Protein, Cox 17, das bei den p40 Zellen jedoch schwächer exprimiert wurde. Die Protease Cathepsin B und der Wachstumsfaktorrezeptor ErbB2, der bei Brustkrebs mit einem schlechten prognostischen Verlauf verbunden ist, waren nur in einer RNA aus exponierten p181-Zellen verstärkt exprimiert. Die Integrine alpha 6 und beta 4, die auf Zellen als Rezeptoren für die Extrazellulärmatrix dienen, waren ebenfalls nur in einem Versuch stärker exprimiert. Die Thrombospondine 1 und 2 und VEGF, die bei der Neoangiogenese und damit bei der Blut- und Sauerstoffversorgung der Tumore eine Rolle spielen, waren ebenfalls nur in einer RNA-Probe erhöht. In einem Versuch erhöht und in den beiden anderen Versuchen unverändert war auch ein Inhibitor der DNA-Bindung über dessen Funktion nichts näheres bekannt ist.

In einzelnen Versuchen hochreguliert und anderen herunterreguliert waren Cyclin D1 und die Topoisomerase 2a, die bei der Regulation des Zellzyklus und der Replikation wichtig sind und das pS2-Gen, ein Gen für ein Oberflächenprotein, von dem schon lange bekannt ist, dass seine Expression durch Östrogen reguliert wird.

Bei den Versuchen mit dem Brustkrebs- und Signaltransduktion der Östrogenrezeptoren-Gen-Array waren auffällig viele Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Zelllinien zu beobachten. Dies ist ein weiterer Beleg für die Vermutung, dass sich die Zelllinie MCF-7 durch die unterschiedlichen Kulturbedingungen in den Herkunftslabors zu zwei unabhängigen Zelllinien entwickelt hat, die sich im Magnetfeld unterschiedlich verhalten.

So werden bei den p181 Zellen mehr und auch andere Gene hochreguliert als in den p40 Zellen. Bei den p40 Zellen werden mehr Gene herunter- als hochreguliert. Insgesamt ist auf dem Brustkrebs-Array eine sehr heterogene Gruppe von Genen repräsentiert, so dass nur einzelne Gene, die verändert exprimiert waren, von Interesse sind. Dies sind vor allen Dingen die Gene, die für Proteasen codieren, weil auch hier wieder

ein Zusammenhang zur Metastasierung hergestellt werden kann und Gene, die mit der Signaltransduktion in Verbindung stehen. Bei den p181 Zellen sind das die Gene GATA-3 und GNAS, die Untereinheit eines heterotrimeren G-Proteins. Dieses Protein könnte auch für die Fragestellungen interessant sein, die mit dem Einfluss der Magnetfelder auf die Melatoninwirkung zu tun haben. Der membranständige Melatoninrezeptor MT1 gibt bekanntlich seine Signale über ein heterotrimeres G-Protein an die Adenylatcyclase weiter. Die Veränderung der Expression dieser Gene wurde deshalb nach unterschiedlicher Einwirkdauer des Magnetfeldes durch RT-PCR näher untersucht (s. 3.2.1.1).

3.1.2.2 Extrazellulärmatrix und Metastasierungs-Array

Da auf dem Atlas-Mikroarray und dem Brustkrebs- und Östrogenrezeptor-Signaltransduktions-Array einige Proteasen und Rezeptoren für die Extrazellulärmatrix in ihrer Expression verändert waren, wurde mit der RNA aus Zellen, die 48 Stunden mit 1,2 μT behandelt wurden, auch ein Array für Gene der Extrazellulärmatrix und für Adhäsion durchgeführt. Auf dem Östrogenrezeptor-Array gab es deutliche Hinweise darauf, dass Metastasierungs-spezifische Gene im Magnetfeld angeschaltet werden.

Auf diesem Extrazellulärmatrix-Array waren eine Reihe weiterer **Gene, die die Metastasierung begünstigen**, hochreguliert.

In der Zelllinie MCF-7 p181 waren nach 48 Stunden Exposition mit 1,2 μT von den 112 Genen, die auf dem Array repräsentiert waren, die Signale von 24 Genen nachweisbar. Davon waren 9 Gene stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. Zu diesen Genen gehören, die beiden Integrine beta 5 und beta 7. Integrine sind Rezeptoren auf der Zelloberfläche, die Verbindungen zwischen benachbarten Zellen herstellen und für die Bindung an die Extrazellulärmatrix verantwortlich sind. Das Laminin ist ein Bestandteil der Extrazellulärmatrix, der an bestimmte Integrine bindet. Die drei Matrixmetalloproteinasen, MMP17, MMP 24 und MMP26, sowie das Cystatin C, eine weitere Protease, waren in den exponierten Zellen ebenfalls stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. Andererseits war auch der Gewebeinhibitor der Matrixmetalloproteinase MMP 1, TIMP-1, hochreguliert. TIMP-1 dient der lokalen Feinregulation der Proteasen, z.B. bei der Migration durch die Extrazellulärmatrix. Der Angiogenesefaktor Thrombospondin 2 war ebenfalls in den exponierten Zellen stärker exprimiert. In soliden Tumoren sorgt die Angiogenese durch Bildung neuer Blutgefäße für die Versorgung des Tumorgewebes und ermöglicht die Abwanderung von Tumorzellen zu entfernten Me-

tastasierungsorten. Dieser Vorgang kann jedoch in der Zellkultur nicht stattfinden. Offenbar wird jedoch das Genprogramm für die Metastasierung durch die elektromagnetischen Felder angeschaltet.

Das einzige Gen des Metastasierungsarrays, das im Magnetfeld herunterreguliert war, war die Disintegrin-ähnliche Matrixmetalloproteinase vom Reprolysinotyp, ADAMTS-1.

Mit diesem Ergebnis erhärtet sich der Verdacht, dass elektromagnetische Felder auch die Metastasierung der Brusttumore begünstigen.

3.1.2.3 Mikro-Array für Kofaktoren der nukleären Rezeptoren

Ende 2005 hat die Fa. Superarray einen für die Fragestellung der Induktion der Tamoxifen-Resistenz interessanten Gen-Array auf den Markt gebracht, auf dem die cDNAs für Cofaktoren der nukleären Rezeptoren repräsentiert sind. Dieser Array ermöglicht es, alle für die Tamoxifenresistenz wichtigen Gene der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren gleichzeitig auf ihre Expression zu untersuchen.

Mit diesem Array wurden Hybridisierungen mit je drei RNAs aus MCF-7 p40- und MCF-7 p181-Zellen durchgeführt.

In den p40 Zellen waren 4 Gene auf diesem Array hochreguliert. Der Östrogen-related Rezeptor alpha, so wie zwei an der Transkriptionskontrolle der Östrogenrezeptoren beteiligten Kofaktoren, das CREB-Bindungsprotein und die Histondeacetylase 6. Diese beiden Proteine dienen der Auflockerung der Nukleosomenstruktur im Zellkern, wodurch die Transkription der östrogenabhängigen Gene erleichtert wird. Des Weiteren war das ribosomale Protein S27a in seiner Expression erhöht.

Die Rezeptor-interacting Serin-Threoninkinase 3, das sine oculis Homeoboxhomolog 3 und das Thyroidhormon Rezeptor assoziierte Protein 6 waren nur bei einem der drei Versuche in ihrer Expression erhöht.

Herunterreguliert waren in den p40 Zellen insgesamt 23 Gene. Bei allen Hybridisierungen herunterreguliert waren der Östrogen-related Rezeptor gamma, die Histondeacetylase 7A, die Untereinheit 6 eines Cofaktors für den Transkriptionsfaktor Sp1, das Heat shock Protein1 beta, das HIV-1 Tat interacting Protein und das Gen Metastasis associated 1, das ebenfalls zu den Koaktivatoren der Östrogenrezeptoren gezählt wird.

Die Rezeptoren Glukokortikoid-Rezeptor, Retinoic acid Rezeptor gamma, Retinoid X Rezeptor alpha (RXRA), der Thyroidrezeptor beta und der nukleäre Rezeptor Subfamilie 2 Gruppe I Mitglied 3, CAR/TR2-11, waren nur bei einer der drei Hybridisierungen in den p40 Zellen schwächer exprimiert. Bei den eigentlichen **Koaktivatoren** der nukleären Rezeptoren waren die MYST Histonacetyltransferase 4, der nukleäre Rezeptor Koaktivator 2 (SRC-2), der Koaktivator 6 (RAP250) und der PPAR gamma Koaktivator 1 schwächer exprimiert. Bei den **Korepressoren** waren der silencing mediator of retinoid and thyroid receptor (SMRT), der Liganden abhängige Korepressor, Lcor und das nukleäre Rezeptor interacting Protein, RIP140 in den mit 1,2 μ T exponierten p40 Zellen herunterreguliert. Des weiteren waren die ATPase 5 der 26 S Untereinheit des Proteasom-Komplexes, das SKI interacting Protein, die Thyroid-Rezeptor assoziierten Proteine 1 und 4, und der Mediator für die RNA-Polymerase II in ihrer Expression abgeschwächt.

In den MCF-7 p181 Zellen waren 14 Gene nach Exposition mit 1,2 μ T hochreguliert. Bei allen drei Hybridisierungen erhöht waren, das CREB-Bindungsprotein, der Östrogenrezeptor beta und die RXR-Rezeptoren, beta und gamma.

Das DNA-Methyltransferase 1 assoziierte Protein, der Östrogenrezeptor alpha, die Histondeacetylase 2, der Hepatozyten Nuklearfaktor 4 gamma, der nukleäre Rezeptorkoaktivator 1 (SRC-1), zwei Koaktivatoren des PPAR-Rezeptors gamma (1 und 1 beta), der Retinoic acid Rezeptor alpha, das sine oculis Homeoboxhomolog 3 und das Thyroidrezeptor assoziierte Protein 3 waren nur bei zwei der drei Versuche in den behandelten p181-Zellen stärker exprimiert.

20 Gene des Cofaktoren-Arrays waren in den exponierten p181 Zellen herunterreguliert. Bei allen drei Hybridisierungen waren die Korepressoren 1 und 2 der nukleären Rezeptoren (**N-Cor**, **SMRT**), das Gen Metastasis associated 1, die Histondeacetylase 7A, der Hepatozyten Nuklearfaktor 4 alpha, das Nuklearrezeptor Koaktivator 6 interagierende Protein, und der Peroxisomen proliferativ aktivierte Rezeptor delta schwächer exprimiert. Der Liganden-abhängige Korepressor (L-Cor), und 12 verschiedene nukleäre Rezeptoren der Subfamilien 0, 1, 2, 5 und 6 waren in zwei von drei Versuchen herunterreguliert.

Bei dem Kofaktoren-Mikroarray waren in beiden Zelllinien mehr Gene herunterreguliert als hochreguliert. Aber auch hier waren bei den p40 Zellen mehr Gene herunterreguliert.

liert als in den p181 Zellen und in den p181 Zellen mehr Gene hochreguliert als in den p40 Zellen.

Der Korepressor SMRT und das CREB-Bindungsprotein waren in beiden Zelllinien herunterreguliert, der Korepressor N-Cor nur in den exponierten p181-Zellen.

Das CREB-Bindungsprotein ist auch für die Fragestellung der im Magnetfeld verringerten Melatoninwirkung von Interesse, da der membranständige Melatoninrezeptor MT1 über cAMP die Transkription von Genen am cAMP-response Element reguliert. CREB ist bei der Signaltransduktion des Melatonins das Äquivalent zum Östrogenrezeptor. Das CREB-Bindungsprotein bindet sowohl an den ligandenbesetzten Östrogenrezeptor als auch an das cAMP-abhängig phosphorylierte CREB und aktiviert in beiden Fällen die Transkription der cAMP-abhängigen und der östrogenabhängigen Gene.

Aus der Gruppe der Gene, die auf dem Kofaktor-Array differentiell exprimiert waren, wurde die Expression der beiden Koaktivatoren, SRC-1 und AIB1, und der beiden Korepressoren, N-Cor und SMRT, durch RT-PCR verifiziert (s.3.2.1.2).

3.2 Verifizierung der Genexpressionsänderungen der Rezeptoren und Kofaktoren

3.2.1 RT-PCR

Bei den durchgeführten Microarray-Versuchen war die Expression einer erheblichen Zahl von Genen nach 48 Stunden bei 1,2 μ T erhöht oder erniedrigt. Von einer Auswahl dieser Gene wurde die Expression nach Exposition mit verschiedenen Magnetfeldstärken nach verschiedenen langen Expositionszeiträumen bestimmt.

3.2.1.1 Verifizierung der Genexpression von Genen des Brustkrebs-Arrays

Die Expression einiger Gene, die einen direkten Bezug zur Signaltransduktion der Östrogenrezeptoren haben und auf dem Brustkrebs-Array auffällig stark in ihrer Expression verändert waren, wurde durch RT-PCR verifiziert und quantifiziert. Von den Genen, die auf dem Brustkrebs- und Östrogenrezeptor-Signaltransduktion-Array verstärkt exprimiert erschienen, wurde von GATA-3, GNAS und Claudin 7 die RT-PCR mit RNA aus Zellen durchgeführt, die entweder 24 Stunden, 48 Stunden oder 96 Stunden mit 1,2 μ T behandelt waren. Die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der RT-PCR-Produkte für beide Zelllinien sind in den Tabellen 6 und 7 zusammengefasst.

Gen	24 Std. 1,2 μ T	48 Std. 1,2 μ T	96 Std. 1,2 μ T
GATA-3	2,0 \pm 0,3 (p<0,05)	1,8 \pm 1,8	1,0 \pm 0,3
GNAS	1,0 \pm 0,4	1,8 \pm 1,6	2,9 \pm 1,8 (p=0,13)
Claudin 7	1,2 \pm 0,2	1,2 \pm 0,4	1,0 \pm 0,3

Tabelle 6: Veränderung der Expression einiger ausgewählter Gene des Brustkrebs-Arrays in der Zelllinie MCF-7 p40

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Gene in den exponierten Zellen verändert hat.

In den MCF-7 p40 Zellen war die Expression von GATA-3 nach 24 Stunden auf den 2-fachen Wert der Kontrolle erhöht und blieb auch bis 48 Stunden auf diesem erhöhten Niveau. Nach 96 Stunden fiel die Expression von GATA-3 wieder zurück auf den Wert, der in den Kontrollzellen gemessen wurde.

Die Expression der Untereinheit der heterotrimeren G-Proteine (GNAS) stieg erst nach 48 Stunden in den mit 1,2 μ T behandelten Zellen an und steigerte sich bei Behandlung für 96 Stunden weiter bis auf den dreifachen Wert der Kontrolle.

Die Expression des Gens Claudin-7, die zumindest in einem Mikroarray Experiment sehr stark erhöht war, stieg nach 24 Stunden im Durchschnitt nur um 20 % an. Bei dem Experiment, bei dem ein besonders starker Anstieg der Claudin-7 Expression auf dem Mikroarray beobachtet wurde, waren die Zellen in einer höheren Zelldichte ausgesät worden. Eine höhere Zelldichte begünstigt möglicherweise die Induktion der Claudin-7 Expression durch elektromagnetische Felder.

Gen	24 Std. 1,2 μ T	48 Std. 1,2 μ T	96 Std. 1,2 μ T
GATA-3	1,2 \pm 0,04 (p<0,05)	1,3 \pm 0,4 (p=0,08)	1,2 \pm 0,7 (p=0,08)
GNAS	1,1 \pm 0,05	1,2 \pm 0,4	1,8 \pm 1,6

Claudin 7	0,9 ± 0,06 (p=0,08)	1,2 ± 0,6	1,3 ± 0,3 (p=0,07)
------------------	--------------------------------------	------------------	-------------------------------------

Tabelle 7: Veränderung der Expression der ausgewählten Gene des Brustkrebs-Arrays in der Zelllinie MCF-7 p181

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Gene in den exponierten Zellen verändert hat.

Bei den MCF-7 p181 Zellen waren die Expressionsveränderungen der drei untersuchten Gene nicht so deutlich ausgeprägt, wie bei den p40 Zellen. GATA-3 wurde nach 48 Stunden am stärksten hochreguliert, wenn auch nur um 30 % über das Niveau der Kontrollzellen. Die Induktion der GNAS-Expression und der Claudin-7 Expression erreichte erst nach 96 Stunden ihr Maximum mit 80 % über der Kontrolle für GNAS und einer 30 %igen Steigerung für Claudin-7.

Trotz der sehr geringen Expressionsänderungen waren in den p181 Zellen einige Veränderungen bereits nach drei unabhängigen Expositionen statistisch signifikant.

Bei einem Vergleich der Reaktion der beiden Zelllinien zeigt sich deutlich, dass die drei untersuchten Gene GATA-3, GNAS und Claudin-7 in den MCF-7 p40 Zellen stärker auf das Magnetfeld reagieren als in den MCF-7 p181 Zellen.

3.2.1.2 Verifizierung der Genexpression von Genen des Kofaktoren-Arrays

Die für die Entstehung der Tamoxifenresistenz im Magnetfeld wichtigen Gene der Östrogenrezeptor-Koregulatoren SRC-1, AIB-1, NCor und SMRT wurden ebenfalls per RT-PCR quantifiziert. Die Zellen der Zelllinien MCF-7 p40 und p181 wurden für 24 Stunden, 48 Stunden oder 96 Stunden mit 1,2 μ T behandelt und die RNA auf die Expression der Kofaktoren untersucht. Die Expression der RNA wurde mit der Expression in den Zellen verglichen, die für den gleichen Zeitraum im abgeschirmten Inkubator kultiviert wurden.

Der Koaktivator SRC-1 war nur in den p181 Zellen nach 48 Stunden Exposition mit 1,2 μ T erhöht. Der Koaktivator der Östrogenrezeptoren, AIB-1, war in beiden Zellklonen bereits nach 24 Stunden signifikant erhöht.

Die Expression des Korepressors, N-Cor, fiel in den MCF-7 p40-Zellen nach 48 Stunden Exposition mit 1,2 μ T um 30 % ab, in den p181 Zellen dauerte es nur 24 Stunden bis die Expression von N-Cor um 30 % abnahm.

Der Korepressor SMRT war in beiden Zellklonen nach 48 Stunden schwächer exprimiert (Tabelle 8 und Tabelle 9).

Gen	24 Std. 1,2 μ T	48 Std. 1,2 μ T	96 Std. 1,2 μ T
SRC-1	0,7 \pm 0,1	1,0 \pm 0,3	0,8 \pm 0,4
AIB-1	1,6 \pm 0,2	0,8 \pm 0,5 (p<0,01)	0,8 \pm 0,4
N-Cor	1,0 \pm 0,3	0,7 \pm 0,1 (p<0,001)	1,0 \pm 0,4
SMRT	1,5 \pm 0,7	0,7 \pm 0,3 (p=0,06)	0,7 \pm 0,4

Tabelle 8: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p40

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Gene in den exponierten Zellen verändert hat.

Gen	24 Std. 1,2 μ T	48 Std. 1,2 μ T	96 Std. 1,2 μ T
SRC-1	1,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,8	1,5 \pm 0,7
AIB-1	2,0 \pm 1,2	1,3 \pm 0,6	1,1 \pm 0,2
N-Cor	0,8 \pm 0,1 (p=0,06)	1,3 \pm 0,6	1,2 \pm 0,4
SMRT	1,3 \pm 0,4	0,7 \pm 0,3 (p=0,06)	0,8 \pm 0,1 (p<0,001)

Tabelle 9: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p181 nach Behandlung mit 1,2 μ T

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Genen in den exponierten Zellen verändert hat.

Die Signifikanzanalyse der Expressionsdaten mit dem Students t-Test zeigte bereits nach dreifacher Wiederholung der Expositionsexperimente bei 3 Bedingungen ein Signifikanz-Niveau von $p < 0,05$ und bei 3 weiteren Bedingungen wurde eine signifikante Veränderung fast erreicht.

3.2.1.3 Veränderung der Genexpression der Kofaktoren nach Exposition der Brustkrebszellen bei 100 μ T

Nachdem gezeigt werden konnte, dass die Genexpression der Kofaktoren SRC-1, AIB-1, N-Cor und SMRT nach Behandlung der Brustkrebszellen mit 1,2 μ T verändert ist, wurde die Veränderung der Expression dieser Gene auch nach Behandlung der Zellen mit 100 μ T untersucht. Bei der Ermittlung der Dosis-Wirkungskurven von Tamoxifen im Magnetfeld hatte sich im Vorläuferprojekt StSch4219 gezeigt, dass überraschenderweise die Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen bei der höheren Feldstärke von 100 μ T weniger stark zu höheren Konzentrationen verschoben wird, als bei der geringeren Feldstärke von 1,2 μ T (Fenster effekt). Ein ähnlicher Fenster effekt wurde auch bei der Exposition anderer biologischer Systeme beobachtet (Litovitz et al., 1992).

Die RNA der mit 100 μ T behandelten Zellen von beiden Zelllinien wurde nach drei unabhängigen Expositionen durch RT-PCR untersucht. Insgesamt zeigte sich, dass die Behandlung mit 100 μ T schwächere Effekte auf die Expression der Kofaktoren zeigt, als die Behandlung mit 1,2 μ T (Vergleich Tabelle 8 mit Tabelle 10 und Tabelle 9 mit Tabelle 11).

Die Zelllinie p40 reagiert auf 100 μ T sehr schwach oder sogar gar nicht. Die Unterschiede in der Expression zwischen behandelten Zellen und Kontrollzellen sind so gering, dass bei keiner der Expositionsbedingungen ein Signifikanzniveau erreicht wurde. In der Zelllinie p181 steigt die Expression von SRC-1 nach Behandlung mit 100 μ T erst später an als bei 1,2 μ T und der Anstieg fällt schwächer aus. Die Expression von AIB-1 steigt nach 24 Stunden weniger stark an als bei 1,2 μ T. Die Expression von N-Cor sinkt nach 24 Stunden bei 100 μ T gar nicht und die Expression von SMRT verringert sich bei 100 μ T erst nach 96 Stunden statt nach 48 Stunden, wie bei der Exposition mit 1,2 μ T beobachtet.

Gen	24 Std. 100 μ T	48 Std. 100 μ T	96 Std. 100 μ T
SRC-1	0,9 \pm 0,1	1,0 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2
AIB-1	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,0	1,1 \pm 0,05
N-Cor	0,9 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	1,0 \pm 0,1
SMRT	1,2 \pm 0,2	0,6 \pm 0,2	0,9 \pm 0,2

Tabelle 10: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogen-Rezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p40 nach Behandlung mit 100 μ T

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Gene in den exponierten Zellen verändert hat.

Gen	24 Std. 100 μ T	48 Std. 100 μ T	96 Std. 100 μ T
SRC-1	1,2 \pm 0,1	1,0 \pm 0,0	1,5 \pm 0,5
AIB-1	1,4 \pm 0,6	1,0 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
N-Cor	1,1 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,8 \pm 0,9
SMRT	1,1 \pm 0,0	1,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,1

Tabelle 11: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogen-Rezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p181 nach Behandlung mit 100 μ T

Mittelwert und Standardabweichung des Faktors, um den sich die Expression der Gene in den exponierten Zellen verändert hat.

3.2.2 *Verifizierung der veränderten Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren auf Proteinebene*

Die Expressionsveränderung im Magnetfeld war bei den meisten Kofaktoren auf der mRNA-Ebene zahlenmäßig so gering, dass diese Veränderungen auch auf Proteinebene überprüft wurden. MCF-7 p181-Zellen wurden 24 Stunden und 48 Stunden mit 1,2 μ T exponiert, die Proteine aus den Zellen auf Polyacrylamidgelen aufgetrennt, auf PVDF Membran geblottet und mit Antikörpern gegen die Kofaktoren detektiert. Abb. 1 zeigt je einen repräsentativen Western-Blot für SRC-1, AIB1 und N-Cor. Auch auf Proteinebene sieht man deutlich, dass die Expression der beiden Koaktivatoren, SRC-1 und AIB1 nach 24 Stunden im Magnetfeld deutlich zunimmt. Nach 48 Stunden ist die Erhöhung des SRC-1- und des AIB1-Gehalts nicht mehr so deutlich, die Expression nimmt nach 24 Stunden langsam wieder ab. Auf Proteinebene verhält sich die Expres-

sion der Koaktivatoren damit ähnlich wie auf der mRNA-Ebene (s. Tabelle 9). Der Nachweis von N-Cor auf dem Western-Blot war etwas schwieriger, aber nach ausreichend langer Exposition des Röntgenfilms waren unter dem starken unspezifischen Hintergrund schwache Banden des N-Cor-Proteins zu erkennen. Der N-Cor-Proteingehalt nimmt nach 24 Stunden leicht ab und nach 48 Stunden noch etwas stärker. Die Expression von SMRT-Protein war so gering, dass auf den Western-Blots keine Signale sichtbar wurden (Abb. 1).

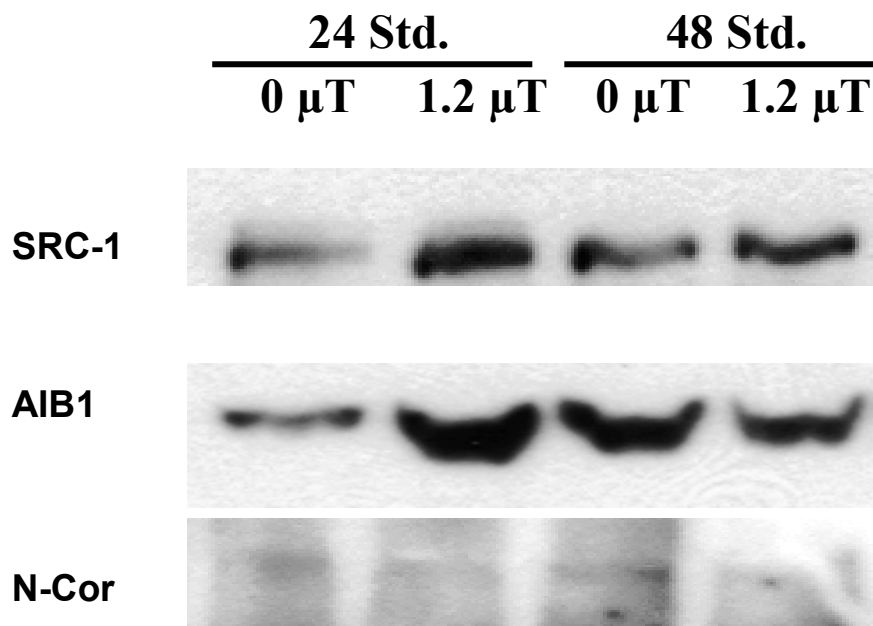


Abb. 1: Western Blots der Kofaktoren SRC-1, AIB1 und N-Cor in den MCF-7 p181 Zellen nach Exposition mit 1,2 μ T

Die Proteinbanden der Proteine wurden densitometrisch ausgewertet und die Mittelwerte der Expressionsveränderung aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten in Tabelle 12 aufgelistet.

Protein	Exposition	Veränderung relativ zur Kontrolle	
		24 Std.	48 Std..
SRC-1		3.0 ± 1.2	1.2 ± 0.03
AIB1		1.6 ± 1.3	1.0 ± 0.2
N-Cor		1.6 ± 1.0	0.3 ± 0.2

Tabelle 12: Relative Veränderung der Proteinexpression der Kofaktoren SRC-1, AIB1 und N-Cor durch Exposition mit 1,2 μ T.
Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten.

3.2.3 Auswirkungen der Expressionsveränderungen auf die Tamoxifenwirkung

Die Veränderungen der Genexpression der Kofaktoren haben bei allen untersuchten Kofaktoren die gleiche Wirkung auf das Zellwachstum zur Folge. Die Koaktivatoren nehmen in ihrer Expression zu, wodurch die agonistische Wirkung von Tamoxifen verstärkt wird und die Expression der Korepressoren nimmt im Magnetfeld ab, wodurch die antagonistische Wirkung von Tamoxifen abgeschwächt wird. Beide Effekte führen zu einer schwächeren antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und einer stärkeren wachstumsfördernden Wirkung, so wie sie sowohl in der klinischen Situation beobachtet wird, als auch wie sie sich auf den Verlauf der Dosis-Wirkungskurven im Magnetfeld ausgewirkt hat.

3.3 Verifizierung der Expressionsänderung Metastase-assoziiierter Gene durch RT-PCR

In den Tabellen 2 und 4 sind nur die Gene des Atlas-Mikroarrays erfasst, deren Expression im Magnetfeld bei 1,2 μ T nach 48 Stunden im Durchschnitt auf mehr als den doppelten Wert erhöht war und in den Tabellen 3 und 5 sind die Gene aufgelistet, bei denen die Expression im Magnetfeld im Durchschnitt auf weniger als die Hälfte der Expression in den Kontrollzellen reduziert war.

Die Analyse der Veränderung aller Gene auf dem Mikroarray ergab, dass unter den Genen, deren Expression um weniger als den Faktor 2 verändert waren, noch viele

Gene waren, die mit der Entstehung von Metastasen zusammenhängen, und die in ihrer Expression leicht ($<2,0$ oder $>0,5$) verändert waren.

Neben der Matrixmetalloproteinase MMP3, die in den MCF-7 p181 Zellen deutlich erhöht war, waren in den Magnetfeld-behandelten Zellen noch die Matrixmetalloproteinase MMP8, MMP12 und MMP14 etwas stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. In den p40 Zellen war von diesen Proteasen nur die MMP3 leicht erhöht und zusätzlich die MMP1. Dagegen waren die MMP's 12 und 14 in den p40 Zellen herunterreguliert und die MMP 9 in beiden exponierten Zelllinien schwächer exprimiert.

Während der Gewebefibrinolyse-Aktivator, tPA, in den p181 Zellen hochreguliert war, waren in den p40 Zellen vom Plasminogen-Aktivator-System sowohl der Gewebefibrinolyse-Aktivator als auch der Urokinase-Plasminogenaktivator schwächer exprimiert. Der Serinprotease Inhibitor 2, der die Ausbreitung der Tumorzellen in das umgebende Gewebe reguliert, war in den p40 Zellen um den Faktor >2 verstärkt exprimiert. Die Gewebefibrinolyse-Inhibitoren der Matrixmetalloproteinase TIMP 1 und TIMP 2 waren in der Zelllinie p181 nach Magnetfeldexposition etwas stärker exprimiert und in der Zelllinie p40 schwächer exprimiert. Des Weiteren waren die Metastase-Suppressor-Gene Kiss-1, Kangai-1, und nm23-H1 und nm23-H4 in beiden Zelllinien schwächer exprimiert. Diese Metastase-Suppressor-Gene verhindern in Tumorzellen die Metastasenbildung. In metastasierten Tumorzellen ist ihre Expression daher abgeschwächt.

Da die Metastase-Suppressor-Gene und die Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems sehr bedeutend für das Metastasierungsgeschehen bei Brusttumoren sind, wurde die Expression dieser Gene durch RT-PCR verifiziert und quantifiziert (Abb.2 und Abb.3).

3.3.1 Expression der Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems nach Magnetfeldexposition

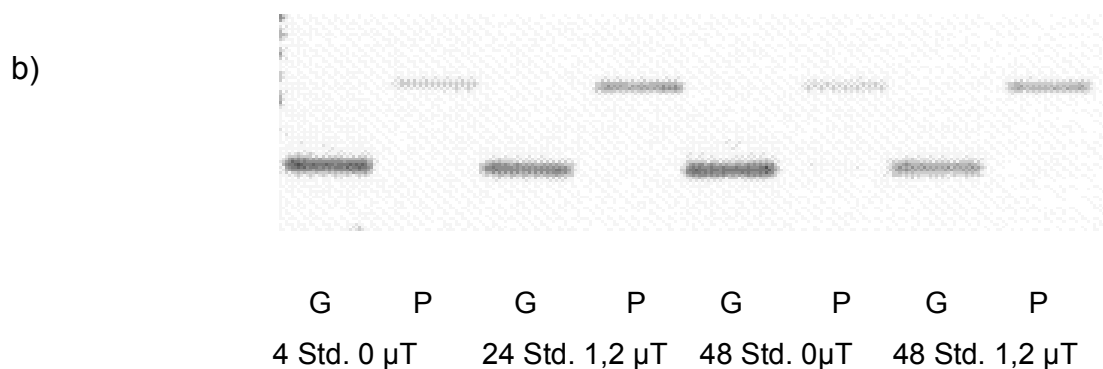
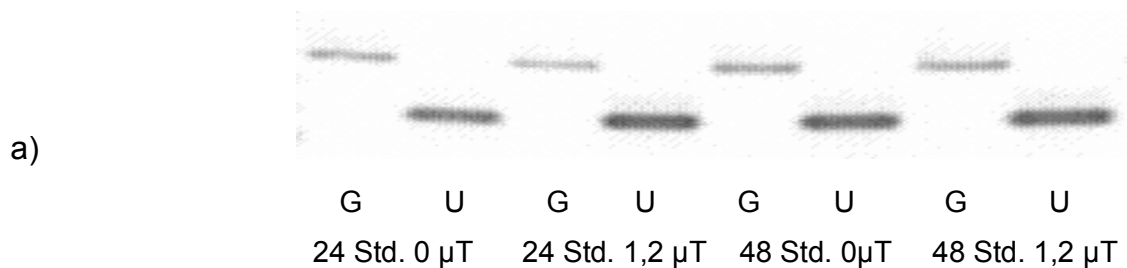
Aus MCF-7 Brustkrebszellen, die 24 Stunden oder 48 Stunden mit $1,2 \mu\text{T}$ behandelt wurden, wurde die RNA isoliert und die Expression der Gene uPA (U), PAI-1 (P), des uPA-Rezeptors, uPAR (UR), und tPA (T) durch RT-PCR untersucht. Für uPA musste die cDNA mit 33 Zyklen amplifiziert werden, für PAI-1 und uPAR waren 32 Zyklen notwendig und die cDNA von tPA ergab erst nach 36 Amplifikationszyklen ein nachweisbares PCR-Produkt.

Zum Nachweis, dass in allen amplifizierten Proben gleich viel RNA eingesetzt wurde, ist jeweils links von der jeweiligen Probe das dazugehörige Amplifikationsprodukt des house-keeping Gens GAPDH (G) aufgetragen. Abb. 2 zeigt die PCR-Produkte dieser Gene nach 24 Stunden und 48 Stunden Exposition in repräsentativen Agarosegelen.

Die PCR-Produkte der Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems in der Abb. 2 wurden densitometrisch ausgewertet und quantifiziert.

Der Urokinase-Plasminogen-Aktivator, uPA, wird in den p40 Zellen nach 24 Stunden etwa 2,9-mal so stark exprimiert wie in den Kontrollzellen. Nach 48 Stunden ist die Steigerung der Expression nicht mehr ganz so stark (2,4-fach) und fällt nach 96 Stunden auf 1,3-fach ab, eine verstärkte Expression ist aber noch vorhanden. In den p181 Zellen ist der Anstieg der uPA-Expression in den ersten 48 Stunden nicht ganz so stark wie in den p40 Zellen, erreicht jedoch nach 96 Stunden den 2,6-fachen Wert der Kontrolle.

Die Expressionserhöhung des Plasminogen-Aktivator-Inhibitors PAI-1 ist nach 24 Stunden und 48 Stunden im Durchschnitt 1,5-fach, in der Zelllinie p40 nach 48 Stunden sogar 3,5-fach (s. Tabelle 13).



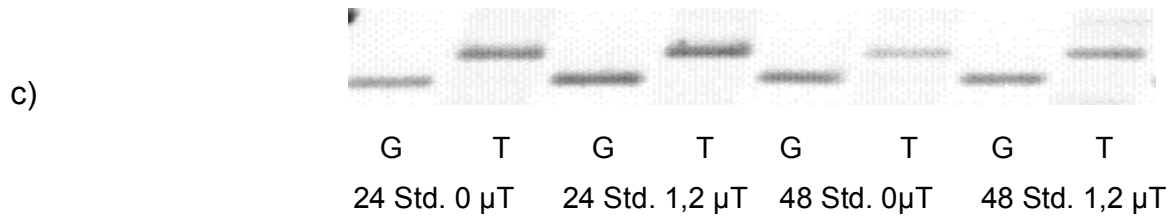


Abb. 2: Einfluss des Magnetfeldes auf die Expression des Plasminogen-Aktivator-Systems (G : house-keeping Gen GAPDH)
 a) Urokinase-Plasminogen-Aktivator (U)
 b) Plasminogen-Aktivator-Inhibitors (P)
 c) tissue-Plasminogen-Aktivator (T)

Tabelle 13: Densitometrische Quantifizierung der Expression der Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems nach Exposition mit 1,2 μT

Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten.

Gen	MCF-7 p40			MCF-7 p181		
	24h 1,2 μT	48h 1,2 μT	96h 1,2 μT	24h 1,2 μT	48h 1,2 μT	96h 1,2 μT
uPA	2,9	2,4±2,7	1,3±0,7	2,6	2,1±1,4	2,6±2,1
PAI-1	1,2	3,6±3,7	2,3±1,1	1,4	1,6±1,1	2,0±1,1
uPAR	0,6±0,3	0,9±0,3	1,4±1,0	0,9±0,1	0,9±0,2	0,9±0,1
tPA	1,0±0,2	1,0±0,2	0,9±0,3	1,3±0,5	1,0±0,3	0,7±0,1

3.3.2 *Expression der Metastase-Suppressor-Gene nach Magnetfeldexposition*

Die Analyse der Expression der Metastase-Suppressor-Gene in den Zellen der Zelllinie MCF-7 p181 mittels PCR ergab, dass nur das Metastase-Suppressor-Gen Kiss-1 im Magnetfeld deutlich in seiner Expression herunterreguliert wird. Kangai-1 veränderte sich im Magnetfeld gar nicht und die Gene nm23-H1 und nm23-H2 wurden nur geringfügig um 10-30% schwächer exprimiert (Abb. 3; Tabelle 14).

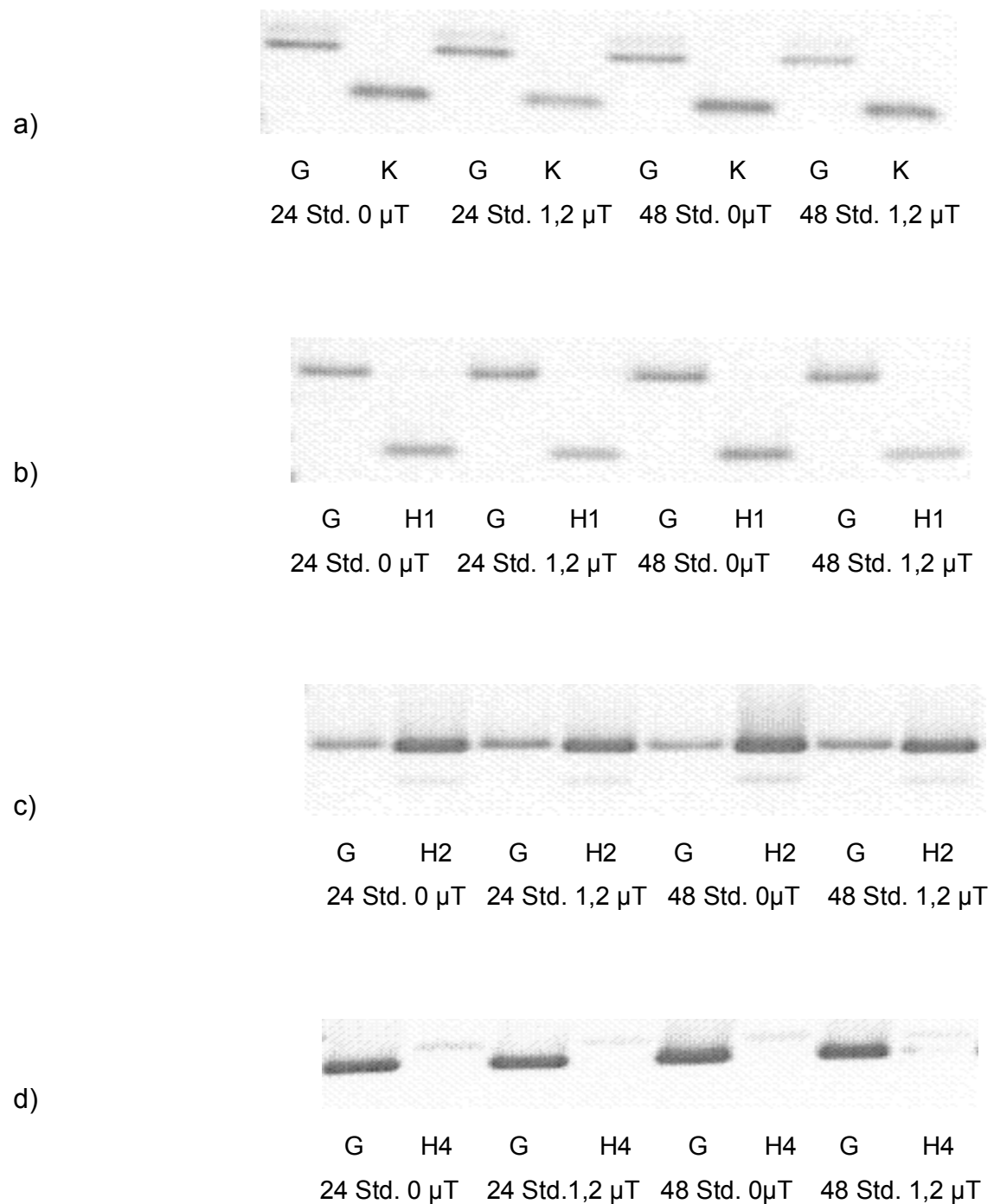


Abb. 3: Einfluss des Magnetfeldes auf die Expression von Metastase-Suppressorgen in den MCF-7 p181-Zellen (G : house-keeping Gen GAPDH)

a) Metastase-Suppressorgen Kiss-1

b) Metastase-Suppressorgen Nm23-H1

c) Metastase-Suppressorgen Nm23-H2

d) Metastase-Suppressorgen Nm23-H4

Die PCR-Produkte der Metastase-Suppressorgene wurden densitometrisch ausgewertet und die Expressionsänderungen nach der Exposition der MCF-7 Zellen mit 1,2 μ T in Tabelle 14 aufgelistet. Die Veränderungen sind bei den meisten untersuchten Genen nur geringfügig. Bei nm23-H1 war die Veränderung nach 48 Stunden in den p181 Zellen jedoch trotzdem signifikant und in den p40 Zellen bei den Genen nm23-H2 und nm23-H4 nach 24 Stunden.

Tabelle 14: Densitometrische Quantifizierung der Expression der Metastase-Suppressorgene nach Exposition mit 1,2 μ T

Mittelwert und Standardabweichung aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten.

Gen	MCF-7 p40			MCF-7 p181		
	24h 1,2 μ T	48h 1,2 μ T	96h 1,2 μ T	24h 1,2 μ T	48h 1,2 μ T	96h 1,2 μ T
Kiss-1		1,1 \pm 0,4	1,0 \pm 0,5		1,1 \pm 0,4	1,4 \pm 0,2
Kangai	1,0	1,3		1,4	0,9	2,0
nm23-H1	1,0 \pm 0,2	1,0 \pm 0,3	1,6 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	0,8 \pm 0,1	0,8 \pm 0,3
nm23-H2	0,9 \pm 0,04	0,7	0,9 \pm 0,4	1,1 \pm 0,3	0,9 \pm 0,4	0,9 \pm 0,1
nm23-H4	0,8 \pm 0,1	0,9 \pm 0,01	1,1 \pm 0,4	0,9 \pm 0,2	1,1 \pm 0,2	0,8 \pm 0,3

3.4 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die intrazelluläre Signaltransduktion in Brustkrebszellen

Die Ergebnisse in 3.1 bis 3.3 haben deutlich gezeigt, dass die Expression einer ganzen Reihe von Genen, insb. Kofaktoren der nukleären Rezeptoren und Gene, die bei der Metastasierung eine Rolle spielen, durch Exposition der Brustkrebszellen mit 1,2 μ T verändert wird. Es ist verständlicherweise von sehr großem Interesse, die Signaltransduktionswege zu ermitteln, über die die elektromagnetischen Felder die Genexpression in den Brustkrebszellen beeinflussen. Dieses Wissen über die Signaltransduktionswege würde es ermöglichen, durch spezifische Hemmstoffe die veränderte Genexpression zu verhindern und so z.B. die Induktion der Tamoxifenresistenz oder die Bereitschaft der Brustkrebszellen zu metastasieren, abzuschwächen.

Wie bereits in der Einleitung (1.6.3) dargestellt, war es wichtig, die Aktivierung der verschiedenen MAP-Kinasen (Erk1/2, junK und p38) in den exponierten Zellen zu untersuchen. Es konnte erwartet werden, dass zumindest die so genannten Stress-aktivierten Proteinkinasen in den exponierten Zellen ein höhere Aktivität zeigen.

MCF-7 Zellen wurden für 30 Minuten und 60 Minuten einem elektromagnetischen Feld von 1,2 μ T ausgesetzt. Aus exponierten Zellen und Kontrollzellen wurden die Proteine isoliert und von jeder Proteinprobe 100 μ g Protein auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 150 V im Gel aufgetrennt. Nach dem Blotten auf eine PVDF-Membran wurden die MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 auf den Membranen mit Antikörpern gegen die inaktive, nicht-phosphorylierte und gegen die aktivierte, phosphorylierte Form der MAP-Kinasen nachgewiesen und densitometrisch quantifiziert.

Abb. 4 zeigt einen repräsentativen Western-Blot, der mit einem anti-Erk1/2 Antikörper detektiert wurde.

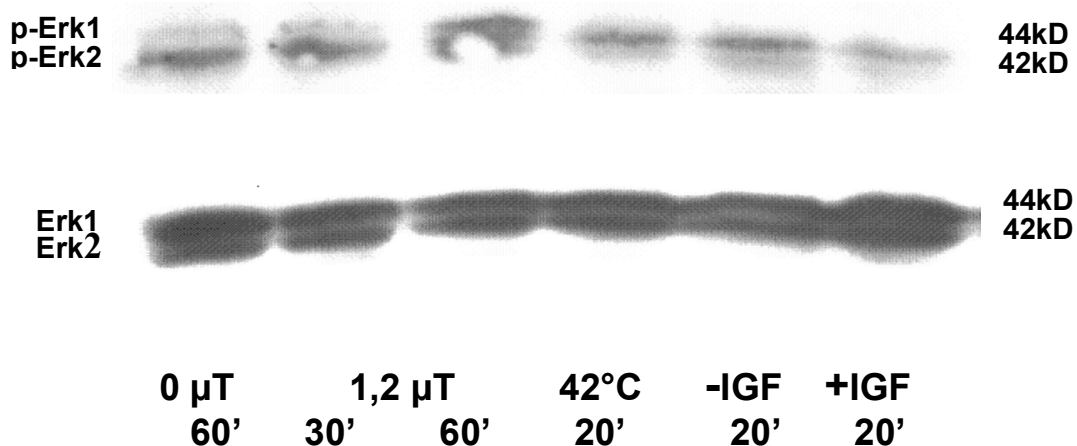


Abb. 4: Detektion der MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

In der oberen Hälfte der Abb.4 ist nur der phosphorylierte, aktivierte Anteil der MAP-Kinasen, Erk1 und Erk 2, nachgewiesen, in der unteren Hälfte der Abb.4 ist auf einem parallel durchgeführten, zweiten Western-Blot mit den gleichen Proteinproben die Gesamtmenge der MAP-Kinasen, Erk1 und Erk2, durch einen spezifischen Antikörper gegen die nicht-phosphorylierte Form nachgewiesen.

Die Antikörper erkennen sowohl die MAP-Kinase Erk1 als auch die MAP-Kinase Erk2. Beide Kinasen unterscheiden sich leicht durch ihr Molekulargewicht. Erk1 hat eine Größe von 44 kD, Erk2 hat eine Größe von 42 kD. In den verschiedenen Spuren sind nacheinander von links nach rechts folgende Proteinproben aufgetragen: 1. aus MCF-7 Zellen, die 60 Minuten bei 0 μ T in einem feldfreien Inkubator inkubiert wurden (Kontrolle). 2. aus Zellen, die 30 Minuten bei 1,2 μ T inkubiert wurden. 3. aus Zellen, die 60 Minuten bei 1,2 μ T inkubiert wurden. In der 4. Spur auf den Western-Blots sind Proteine von Zellen, die 20 Minuten bei 42°C inkubiert wurden. Diese Probe dient als positive Kontrolle für die Stress-aktivierten Proteinkinasen, da diese in der Regel durch Hyperthermie aktiviert werden. Als positive Kontrolle für die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 wurde der Phosphorylierungsgrad dieser beiden Kinasen in Zellen verglichen, die 20 Minuten mit IGF-1 stimuliert waren (Spur 5 und Spur 6).

Der Western-Blot, der mit einem Antikörper gegen die nicht-aktivierte Form der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 detektiert wurde, zeigt, dass sich in allen aufgetragenen Proben annähernd gleich viel Protein befunden hat (Abb.4 untere Hälfte).

Auf dem Western-Blot, der mit einem Antikörper gegen die aktivierten, phosphorylierten Formen der MAP-Kinasen, Erk1 und Erk 2, detektiert wurde, sieht man deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Proteinproben. Die Signale bei 44 kD, die der aktivierten MAP-Kinase Erk1 entsprechen, zeigen, dass der Aktivierungsgrad von Erk1 nach einer Stunde Exposition der MCF-7 Zellen mit 1,2 μ T deutlich zunimmt (obere Bande der Doppelbande in Spur3). In der Probe, bei der die MCF-7 Zellen mit 42 °C behandelt wurden, die als positive Kontrolle für die Stress-aktivierten Proteinkinasen dient, wurde ebenfalls ein verstärktes Signal für die aktivierte Form von Erk1 beobachtet (Spur 4). Durch Behandlung der Zellen mit IGF-1 verändert sich die Aktivität von Erk1 fast nicht.

Bei der MAP-Kinase Erk 2 (untere Bande der Doppelbande) nimmt der Aktivierungsgrad der Kinase nach Magnetfeldexposition eher ab. In den nicht-exponierten Zellen wird zunächst ein verhältnismäßig starkes Signal der phosphorylierten Erk2 (42 kD) beobachtet (Spur1), das Signal wird mit zunehmender Exposition bei 1,2 μ T etwas schwächer (Spur 2 und Spur 3, untere Bande).

Die Signale der einzelnen Banden wurden densitometrisch quantifiziert und miteinander verglichen. Abb. 5 zeigt die Mittelwerte der densitometrischen Auswertung von fünf

verschiedenen, unabhängigen Expositionsversuchen für die MAP-Kinase Erk1. Die Werte für die MAP-Kinase Erk2 sind in Abb. 6 dargestellt.

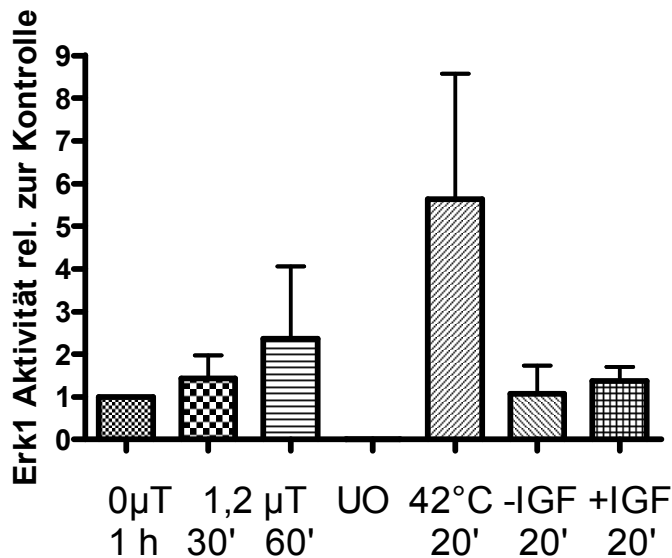


Abb. 5: Erk-1 Aktivität nach Magnetfeldexposition

Die Signale der phosphorylierten Erk1 wurden zu den Signalen der nicht-phosphorylierten Kinase ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Expositionsexperimenten sind zusammengefasst.

Die Erk1-Aktivität steigt im Durchschnitt bei einer Exposition der MCF-7 Zellen mit 1,2 µT kontinuierlich innerhalb einer Stunde auf den 2,4-fachen Wert der Kontrollzellen an, die parallel 60 Minuten bei 0µT inkubiert wurden. Durch Behandlung der Zellen mit Hyperthermie bei 42°C für 20 Minuten steigt die Aktivität von Erk1 sogar im Durchschnitt um den Faktor 5,6 an.

Die Aktivität von Erk2 fällt im Magnetfeld dagegen innerhalb einer Stunde kontinuierlich leicht ab. Nach 60 Minuten beträgt die Erk2-Aktivität im Durchschnitt nur noch 56 % der Aktivität, die in den Kontrollzellen gemessen wurde. Erk2 lässt sich ebenfalls durch Hyperthermie aktivieren, wenn auch nicht so stark wie Erk1 (1,7-fach). Sehr deutlich wird Erk2 jedoch in der positiven Kontrolle nach Stimulation mit IGF-1 aktiviert (2,6-fach) (Abb.6).

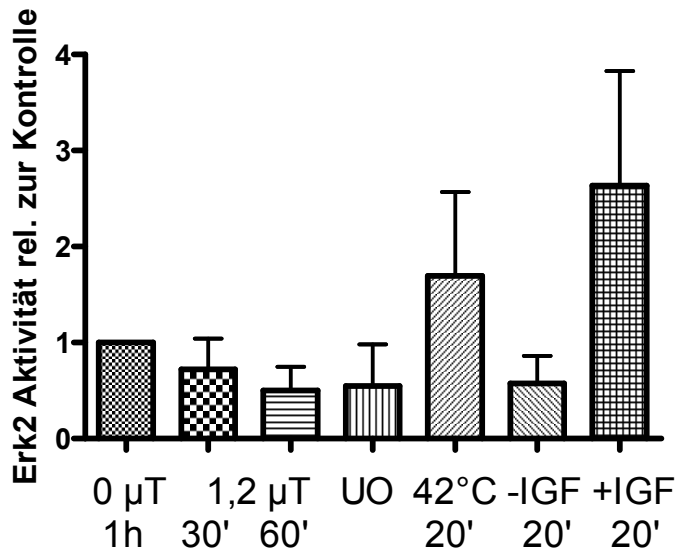


Abb. 6: Erk-2 Aktivität nach Magnetfeldexposition

Die Signale der phosphorylierten Erk2 wurden zu den Signalen der nicht-phosphorylierten Kinase ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Expositionsexperimenten sind zusammengefasst.

Desweiteren wurde auf die gleiche Weise wie bei Erk1 und Erk2 die Veränderung der Aktivität der Stress-aktivierten Kinase, jun-Kinase, auf Western-Blots untersucht.

Abb.7 zeigt exemplarisch Western-Blots, die mit Antikörpern gegen die jun-Kinase und parallel auf einem zweiten Western-Blot gegen die aktivierte, phosphorylierte Form der jun-Kinase (p-junk) detektiert wurden.

Die obere Hälfte von Abb. 7 zeigt den Anteil an aktivierter Kinase bei den verschiedenen Bedingungen, die untere Hälfte die Gesamtmenge an jun-Kinase Protein in den aufgetragenen Proben. Zur Bestimmung der Veränderung des Aktivierungsgrades wurden die Signale von p-junk auf die Stärke der Signale von junk (gesamt) bezogen.

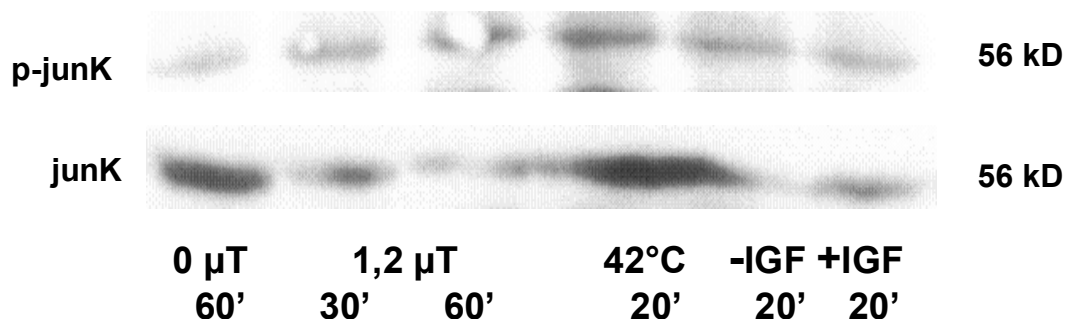


Abb. 7: Detektion der Stress-aktivierten Kinase junK auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

Die Aktivität der jun-Kinase ändert sich durch die Behandlung der MCF-7 Zellen mit einem Magnetfeld von 1,2 μT fast nicht. Nach 30 Minuten bei 1,2 μT wird nur eine vorübergehende Absenkung der junK-Aktivität beobachtet. Alleine die positive Kontrolle für die Aktivierung der jun-Kinase, die Inkubation der Zellen für 20 Minuten bei 42°C, führt zu einem deutlichen Anstieg der phosphorylierten Form der jun-Kinase auf das 2,9-fache über der unbehandelten Kontrolle (Spur 4). Diese Veränderung der jun-Kinase-Aktivität zeigt deutlich, dass die jun-Kinase tatsächlich auf einen physikalischen Stress, hier die Temperaturerhöhung, reagiert.

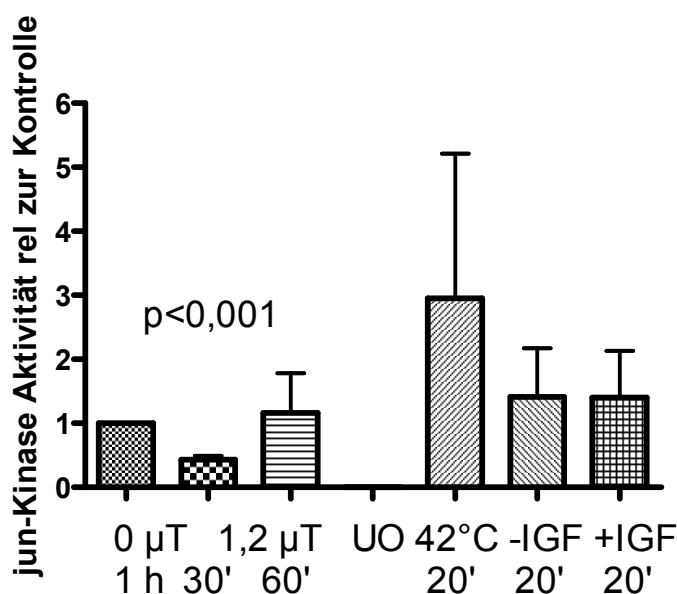


Abb. 8: Jun-Kinase Aktivität nach Magnetfeldexposition

Die Signale der phosphorylierten jun-Kinase wurden zu den Signalen der nicht-phosphorylierten Kinase (junK) ins Verhältnis gesetzt. Die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Expositionsexperimenten sind zusammengefasst.

Die jun-Kinase-Aktivität fällt nach 30 Minuten im Magnetfeld zunächst auf 43 % der Kontrolle ab und steigt nach einer Stunde bei 1,2 μT wieder etwa auf den Wert der Kontrolle an. Nur bei der Hyperthermiebehandlung der Zellen kommt es zu einem deutlichen Anstieg der jun-Kinase Aktivität auf den 3-fachen Wert der Kontrolle. Die Behandlung der Zellen mit IGF-1 führt zu keiner Erhöhung der Aktivität.

Als weitere Stress-aktivierte Proteinkinase wurde die Aktivierung der Proteinkinase p38 in den Magnetfeld-behandelten MCF-7 Zellen auf Western-Blots untersucht. In Abb.9 sind exemplarisch die Ergebnisse eines Western-Blots dargestellt. Die obere

Hälfte der Abb. 9 zeigt die Signale, die mit einem Antikörper gegen die phosphorylierte Form der Proteinkinase p38 detektiert wurden. Die untere Hälfte zeigt die Menge des insgesamt in den Proteinproben enthaltenen p38-Proteins an. Diese bleibt in allen behandelten Proben annähernd gleich.

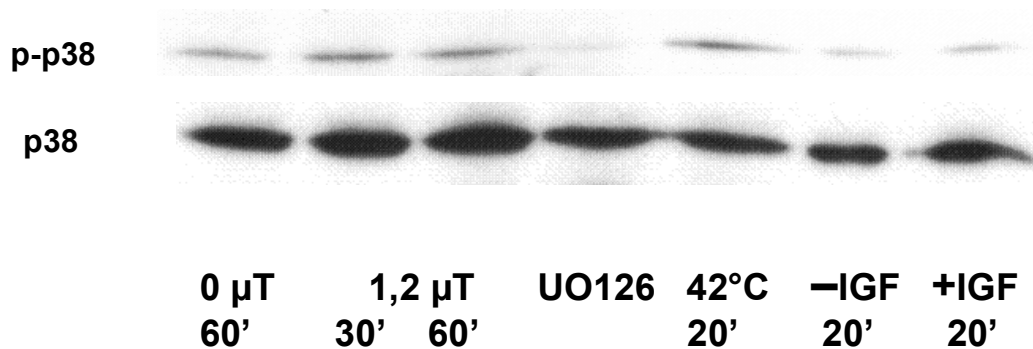


Abb. 9: Detektion der Stress-aktivierten Kinase p38 auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

Die Aktivität der p38 Proteinkinase verändert sich durch die Behandlung der MFC-7 Zellen mit 1,2 μT innerhalb einer Stunde überhaupt nicht (Spur 2 und Spur 3). Auch eine Stimulation der Zellen mit IGF-1 hat keinen Einfluss auf die Aktivität von p38. In Spur 4 ist auf diesem Western-Blot zusätzlich eine Proteinprobe von Zellen hinzugefügt, die mit dem Hemmstoff der übergeordneten Kinase MEK1 behandelt worden sind (UO126). In diesen Zellen wird die Aktivität der p38-Kinase im Durchschnitt auf 23% der Kontrolle reduziert.

Lediglich in der positiven Kontrolle zeigt die Behandlung der Zellen für 20 Minuten mit Hyperthermie (42°C) einen deutlichen Anstieg der p38-Aktivität auf das 2,6 fache des Kontrollwertes (Abb. 10).

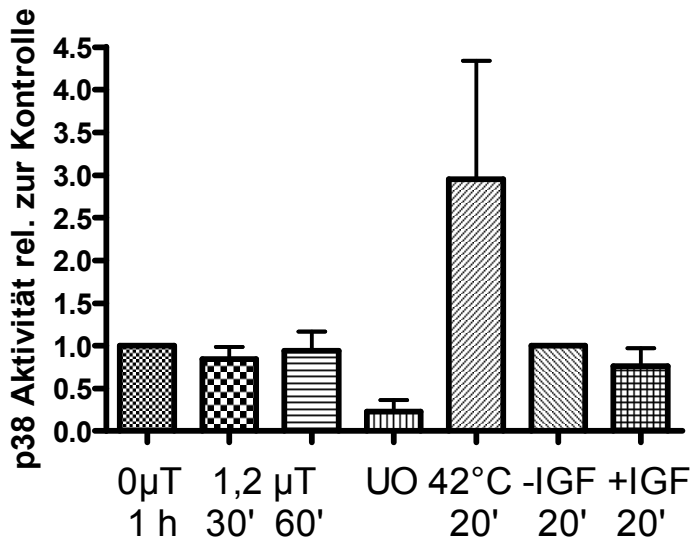


Abb. 10: p38-Aktivität nach Magnetfeldexposition

Die Ergebnisse der Western-Blots zeigen deutlich, dass durch die Behandlung der MCF-7 Brustkrebszellen mit einem Magnetfeld von 1,2 µT **nur** die Aktivität der **MAP-Kinase Erk1** nach 60 Minuten **ansteigt**. Die Aktivität der anderen Kinasen bleibt von den Magnetfeldern entweder unbeeinflusst oder wird bei der MAP-Kinase Erk2 nach 60 Minuten und bei der jun-Kinase nach 30 Minuten möglicherweise nur leicht gesenkt.

Obwohl die Einzelergebnisse der Western-Blots sehr starken experimentellen Schwankungen unterlagen, war die Absenkung der Erk-2 Aktivität durch 60 Minuten Behandlung der Zellen mit 1,2 µT nach fünf unabhängigen Expositionsexperimenten bereits signifikant. Bei der Erhöhung der Erk1 Aktivität nach 60 Minuten wurde das Signifikanzniveau jedoch nicht erreicht ($p=0,3$). Bei der jun-Kinase war die Absenkung der Aktivität nach 30 Minuten auf 43 % des Kontrollwertes sogar höchstsignifikant ($p<0,001$).

Die gleichen Western-Blot Untersuchungen wurden zum Teil auch mit dem Klon p40 der Brustkrebszelllinie MCF-7 durchgeführt (hier nicht gezeigt). In den Western-Blots, die mit den Antikörpern gegen die MAP-Kinasen durchgeführt wurden, zeigte sich, dass die p40-Zellen deutlich weniger Erk-2 Protein enthalten als die p181 Zellen, so dass eine Auswertung der Western-Blots in den meisten Fällen nicht möglich war.

Dies ist ein weiterer deutlicher Hinweis darauf, dass sich die beiden Klone der MCF-7 Zelllinie auch in ihren molekularen Eigenschaften unterscheiden.

3.5 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen

3.5.1 Charakterisierung der verschiedenen Brustkrebszelllinien bezüglich ihrer Hemmbarkeit mit Melatonin

Im Vorgängerprojekt StSch4219 wurde festgestellt, dass es schwierig ist, MCF-7 Zellen ausfindig zu machen, deren Proliferation mit Melatonin hemmbar ist. Diese Beobachtung 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 Zellen der verschiedenen Brustkrebszelllinien, MCU-1, MCF-7p181, MCF-7 (Mel1a), HCC70 und MDA-MB-435, die für die Untersuchung der proliferationsinhibierenden Wirkung von Melatonin und Tamoxifen herangezogen wurden, weisen unterschiedliche Charakteristika auf. Sie wurden daher zunächst ausführlich auf ihre Expression der Östrogenrezeptoren und der Melatoninrezeptoren, MT1 und RZR α , charakterisiert.

Als Positivkontrolle zur Untersuchung der Melatoninwirkung über den membranständigen Rezeptor wurde bei Dr. Steven Hill aus New Orleans eine MCF-7 Zelllinie beschafft, die mit dem mt-1 Gen transfiziert war, das für den membranständigen Melatoninrezeptor Mel1a codiert. Diese Zellen wurden, 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.

3.5.1.1 Expression der Östrogenrezeptoren und der Melatoninrezeptoren

Die in 3.5.1 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.

Von der mRNA der Brustkrebszelllinien MCU-1, MCF-7p181, MCF7/Mel1a, HCC70, MDA-MB-435 und MDA-MB-453 wurde mittels RT-PCR die Expression des Östrogenrezeptors, ER α , des membranständigen Melatoninrezeptors, Mt1, und des nukleären Melatoninrezeptors RZR α analysiert (Abb.11).

Die RT-PCR zeigt, dass die Zelllinie MDA-MB-453 keinerlei ER α exprimiert und die Zelllinie MDA-MB-435 nur Spuren des Östrogenrezeptors enthält. Obwohl die mRNA der Zelllinien MCU-1, MCF-7 p181 und MCF-7Mel1a nur mit 8 Zyklen weniger amplifiziert wurde als die beiden anderen Zelllinien (27 Zyklen statt 35 Zyklen), sieht man bei diesen Zelllinien deutliche Signale für den ER α . Die MCF-7 p181 Zellen enthalten die höchste Anzahl an ER α -Transkripten, die MCU-1 Zellen etwas weniger und die MCF-7Mel1a Zellen exprimieren von diesen drei Zelllinien am wenigsten ER α (Abb. 11, oben).

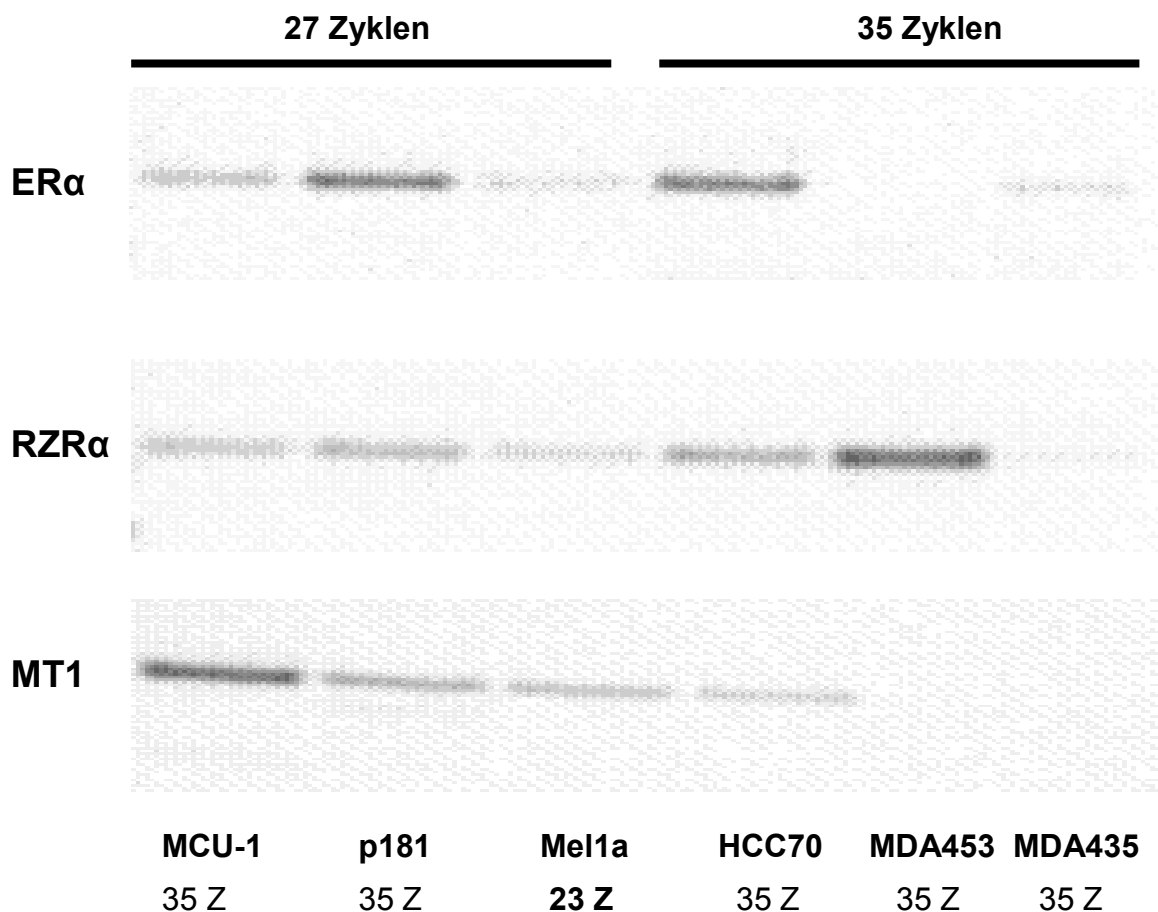


Abb. 11: Expression der Rezeptoren für Östradiol (ER α) und des nukleären Rezeptors (RZR α) und des membranständigen Rezeptors (MT1) für Melatonin in den sechs untersuchten Brustkrebszelllinien

ER α wurde in den Zelllinien MCU, MCF-7 p181 und MCF-7Mel1a mit 27 Zyklen amplifiziert, in den Zelllinien HCC70, MDA-MB-453 und MDA-MB-435 mit 35 Zyklen. RZR α wurde in allen 6 Zelllinien mit 31 Zyklen amplifiziert und MT1 wurde in der Zelllinie MCF-7Mel1a mit 23 Zyklen und in den anderen Zelllinien mit 35 Zyklen amplifiziert.

Den nukleären Melatoninrezeptor, RZR α , exprimierten alle untersuchten Brustkrebszellen. Von den sechs in Abb. 11 dargestellten Brustkrebszelllinien enthielt die Zelllinie

MDA-MB-435 die wenigsten Transkripte für RZR α und die Zelllinie MDA-MB-453 exprimierte RZR α etwas stärker als die anderen Zelllinien (Abb. 11, Mitte).

Die Darstellung der Expression des membranständigen Melatoninrezeptors MT1 in den verschiedenen Brustkrebszelllinien gestaltete sich etwas schwierig, da die Expressionsunterschiede von MT1 in den Zelllinien extrem hoch war. Insbesondere die Zelllinie MCF-7Mel1a, in die das Gen für MT1 hineintransfiziert war, enthielt verständlicherweise große Mengen des MT1-Transkriptes. Hier genügten 23 Amplifikationszyklen der PCR, um ein deutlich sichtbares PCR-Produkt zu erzeugen (Abb. 11, unten, Spur 3). Die cDNA der andere Brustkrebszelllinien musste dagegen mit 35 Zyklen amplifiziert werden, damit das PCR-Produkt auf den Gelen sichtbar wurde. Von den anderen untersuchten Zelllinien enthielt die Zelllinie MCU-1 die höchste Menge an MT1-Transkript, gefolgt von der Zelllinie MCF-7-p181 und der Zelllinie HCC70. In den Zelllinien MDA-MB-453 und MDA-MB-435 war selbst nach einer PCR mit 35 Zyklen noch kein PCR-Produkt von MT1 nachweisbar.

3.5.1.2 Einfluss der Exposition mit elektromagnetischen Feldern auf die Expression der Melatonin-Rezeptoren MT1 und RZR α

Die sechs untersuchten Brustkrebszelllinien wurden für 24 Stunden oder 48 Stunden einem elektromagnetischen Feld von 1,2 μ T ausgesetzt, um zu untersuchen, ob sich die Expression der Melatoninrezeptoren, RZR α und MT1, durch die Exposition mit dem Magnetfeld verändert.

Die Expression des nukleären Melatoninrezeptor, RZR α , veränderte sich in allen untersuchten Zelllinien durch die Magnetfeldexposition gar nicht oder nur sehr geringfügig (Tab. 15). In den HCC70-Zellen und den MDA-MB-435 Zellen wurde nach 24 Stunden nur ein leichter Anstieg um etwa 20 % ermittelt. In den anderen Zelllinien wies der Wert der Expression nach Exposition mit 1,2 μ T nur um etwa 10 % nach oben oder unten vom Kontrollwert ab.

Die Expression des membranständigen Melatoninrezeptors MT1 stieg in den Zelllinien MCU-1 und MCF-7-p181 nach 24 Stunden kurzfristig um 30-36% an und in den HCC70-Zellen erst nach 48 Stunden um 40 %. In den transfizierten MCF-7Mel1a Zellen veränderte sich die MT1-Expression nicht nachweislich (Tab. 15). Diese Beobachtung lässt sich daraus erklären, dass in dem Vektor, mit dem das mt1-Gen in die Brustkrebszellen transfiziert wurde, keine Promoterelemente enthalten sind, die auf zelluläre Veränderungen reagieren könnten.

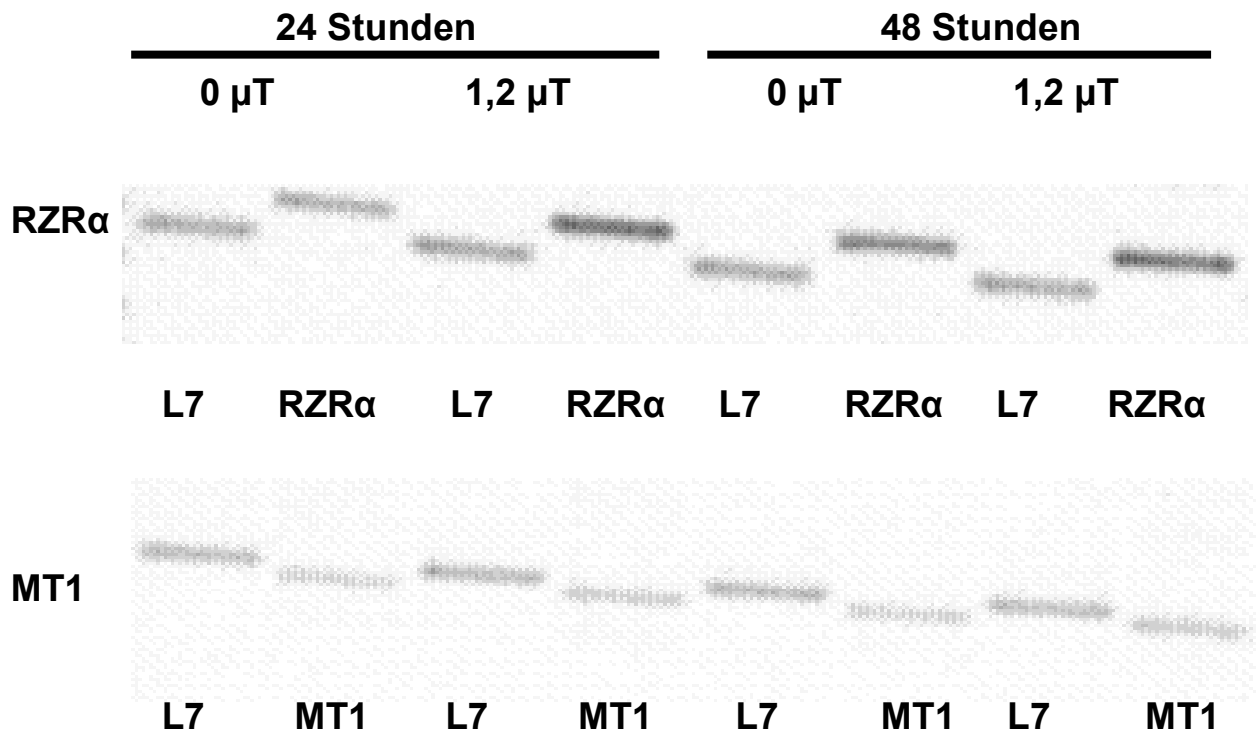


Abb. 12: Veränderung der Expression des nukleären Rezeptors RZRα und des membranständigen Rezeptors MT1 für Melatonin im Magnetfeld

Exemplarische Darstellung der RT-PCR-Produkte von RZRα und MT1 in der Zelllinie MCU-1

Die PCR-Produkte von RZRα und MT1 wurden nach Behandlung der Brustkrebszelllinien mit dem Magnetfeld densitometrisch quantifiziert und mit der Expression des stabil exprimierten house-keeping-Gens, L7, normalisiert. Die Veränderungen der Expression in allen untersuchten Zelllinien nach Exposition bei 1,2 μT für 24 Stunden und 48 Stunden sind in Tabelle 15 aufgelistet.

Tabelle 15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR Produkte von RZR α und MT1 in den sechs Brustkrebszelllinien nach Exposition mit 1,2 μ T

Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Expositionsexperimenten

Zelllinie	RZR α		MT1	
	24 Std 1,2 μ T	48 Std 1,2 μ T	24 Std 1,2 μ T	48 Std 1,2 μ T
MCF-7 p181	1,05 \pm 0,18	1,14 \pm 0,07	1,36 \pm 0,33	1,3 \pm 0,33
MCF-7Mel1a	1,15 \pm 0,14	1,01 \pm 0,19	0,97 \pm 0,11	1,19 \pm 0,23
MCU-1	1,1 \pm 0,15	1,09 \pm 0,14	1,31 \pm 0,11	1,01 \pm 0,33
HCC70	1,24 \pm 0,26	0,74 \pm 0,09	1,15 \pm 0,34	1,4 \pm 0,54
MDA-MB-453	1,04 \pm 0,23	1,02 \pm 0,09	Expression zu schwach	
MDA-MB-435	1,21 \pm 0,21	0,65 \pm 0,39	Expression zu schwach	

3.5.2 *Veränderungen der Expression Melatonin-abhängiger Gene im Magnetfeld*

In der Literatur ist beschrieben worden, dass die Expression des Tumorsuppressorgens p53 und des Zellzyklusregulator p21waf durch Melatoninbehandlung in Zellen ansteigt. Desweiteren ist bekannt, dass sich im Promoter des Brustkrebs-suppressorgens BRCA1 ein cAMP-responsives Element (CRE) befindet, das über den membranständigen Melatoninrezeptor MT1 möglicherweise in seiner Aktivierung abgeschwächt werden kann.

3.5.2.1 *Expression der Gene p53, p21waf, BRCA1 und c-myc nach Stimulation von Brustkrebszellen mit Melatonin unter Magnetfeldeinfluss*

Die Zellen der Zelllinien MCU-1 und MCF-7Mel1a wurden für 6 Stunden mit 10^{-11} M Östradiol (E2) stimuliert und anschließend weitere 2 Stunden mit 10^{-9} M Melatonin. Die Stimulation wurde zum einen in Abwesenheit eines Magnetfeldes (0 μ T) und zum anderen während der Exposition mit einem magnetischen Wechselfeld von 1,2 μ T durchgeführt. Mit der RNA der Zellen aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten wurde die RT-PCR für die Gene p53, p21waf, BRCA1 und c-myc durchgeführt. In Tabelle 16 sind die Mittelwerte der Veränderungen der Expression dieser Gene aufgelistet.

Tabelle 16: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Melatonin-regulierten Genen in der Zelllinie MCU-1

Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten

MCU-1	0 μ T		1,2 μ T	
	E2	E2+ Mel	E2	E2+ Mel
p53	1,25 \pm 1,0	1,22 \pm 1,15	1,23 \pm 0,46	0,77 \pm 0,06
p21waf	1,04 \pm 0,37	0,82 \pm 0,57	1,16 \pm 0,61	0,66 \pm 0,23
BRCA1	2,25 \pm 1,26	1,45 \pm 0,77	1,59 \pm 0,96	1,82 \pm 2,24
c-myc	3,89 \pm 3,29	2,55 \pm 2,13	2,07 \pm 2,28	3,07 \pm 2,02

Ohne Magnetfeld wurde das Tumorsuppressorgen p53 in den MCU-1-Zellen nach Stimulation mit Östradiol nur wenig stärker exprimiert. Die anschließende Behandlung mit Melatonin veränderte die Expression von p53 nicht weiter. In einem Magnetfeld von 1,2 μ T wurde die Expression von p53 jedoch durch Melatonin gesenkt. Die p21waf-Expression verändert sich durch Behandlung mit Östradiol nicht, Melatonin führt möglicherweise zu einer leichten Senkung der Expression, die im Magnetfeld sogar auf 34 % ansteigt. Die BRCA-1 Expression hat sich nach Östradiolbehandlung mehr als verdoppelt. Im Magnetfeld fällt dieser Anstieg nicht so deutlich aus. Melatonin schwächt die Induktion der BRCA-1 Expression durch Östradiol etwas ab. Die Untersuchung der c-myc Expression bestätigt deutlich ihre Induzierbarkeit durch Östradiol, dieser wirkt Melatonin nur in Abwesenheit eines Magnetfeldes entgegen.

Da die Expression von c-myc nachweislich die Proliferation von Tumorzellen verstärkt, ist die Abschwächung der c-myc Expression durch Melatonin eindeutig als einer der molekularen Mechanismen der antiproliferativen Wirkung von Melatonin identifiziert. Die Verhinderung der Absenkung der c-myc-Expression durch Melatonin im Magnetfeld ist ein eindeutiger Nachweis dafür, dass ein Magnetfeld von 1,2 μ T die antiproliferative Wirkung von Melatonin abschwächt.

Die Zellen der MCF-7 Zelllinie, MCF-7Mel1a, die mit dem Rezeptor MT1 transfiziert ist, verhalten sich nach der Östradiolstimulation und der Melatoninbehandlung etwas anders, als die Zellen der Zelllinie MCU-1 (Tabelle 17). Die Expression von p53 kann durch Östradiol nicht stimuliert werden und Melatonin senkt die p53 Expression in Abwesenheit eines Magnetfeldes noch weiter auf weniger als die Hälfte ab. Dagegen

wird die p53-Expression im Magnetfeld sogar durch Melatonin induziert. Während sich die p21waf-Expression ohne Magnetfeld kaum verändert, fällt die Induktion von p21waf durch Melatonin im Magnetfeld sogar sehr deutlich aus. Die Expression von BRCA-1 verändert sich weder durch Östradiol noch durch Melatonin. Nur im Magnetfeld konnte eine leichte Erhöhung der BRCA-1 Expression durch Melatonin beobachtet werden. Die Stimulation von c-myc durch Östradiol fällt in den MCF-7Mel1a-Zellen schwächer aus als in den MCU-1-Zellen. Ein leichter Hinweis darauf, dass die antiproliferative und antiöstrogene Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen durch den membranständigen Melatoninrezeptor vermittelt wird.

Tabelle 17: Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Melatonin-regulierten Genen in der Zelllinie MCF-7Mel1a

Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Expositionsexperimenten

MCF-7Mel1a	0 μ T		1,2 μ T	
	E2	E2+ Mel	E2	E2+ Mel
p53	0,6 \pm 0,16	0,48 \pm 0,13	1,22 \pm 0,17	1,82 \pm 1,74
p21waf	1,2 \pm 0,46	0,98 \pm 0,13	1,15 \pm 0,03	2,39 \pm 0,38
BRCA1	0,94 \pm 0,21	1,03 \pm 0,57	1,15 \pm 0,07	1,4 \pm 1,02
c-myc	1,65 \pm 1,17	1,67 \pm 1,09	2,63 \pm 1,72	3,33 \pm 2,68

3.5.2.2 Gel-Shift Untersuchungen nach Stimulation mit Melatonin

Die Wirkung von Melatonin wird auf zellulärer Ebene über zwei sehr unterschiedliche Rezeptoren vermittelt. Der nukleäre Rezeptor, RZR α , ist ein ligandenabhängiger Transkriptionsfaktor, der nach Bindung des Melatonins die Genexpression von Melatonin-abhängigen Genen unmittelbar auslöst. Der membranständige Rezeptor, MT1, ist ein heterotrimeres G-Protein. Durch Bindung von Melatonin an MT1, wird ein inhibitorisches Gi-Protein aktiviert, das in Folge die Adenylatzyklase hemmt, wodurch die Aktivität der cAMP-abhängigen Proteinkinase A (PKA) abnimmt. Dies führt dazu, dass das cAMP-responsive Element bindende Protein (CREB) weniger stark phosphoryliert wird und dadurch in geringerem Maße an cAMP-responsive Elemente (CRE) in den Promotoren von Genen gebunden wird, wo es die Expression der Gene stimulieren kann. Nur das phosphorylierte CREB-Protein bindet an das CRE der c-AMP-abhängigen Gene.

Die Menge des phosphorylierten CREB-Proteins in einer Zelle, z.B. nach Stimulation mit Melatonin kann mit Hilfe eines Elektrophoretischen Mobilitäts-Shift Assays (EMSA) ermittelt werden. Zu diesem Zweck werden aus den stimulierten Zellen die Kernproteine isoliert und mit einem Oligonukleotid inkubiert, das ein CRE enthält. Wir haben zur Untersuchung der CREB-Bindung ein Oligonukleotid aus dem Promoter des Brustkrebs-Suppressorgens BRCA1 ausgewählt, das ein CRE enthält.

Je mehr phosphoryliertes CREB in den Kernproteinen enthalten ist, desto mehr Oligonukleotide werden an diese CREB-Proteine gebunden. Trennt man das Gemisch aus Oligonukleotiden und nukleären Proteine in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch auf, so wandern die Oligonukleotide, die ein Kernprotein gebunden haben, langsamer durch das Gel, als die freien Oligos (= Gel-Shift).

Abb. 13 zeigt ein typisches Gel eines solchen Mobilität-Shift-Assays.

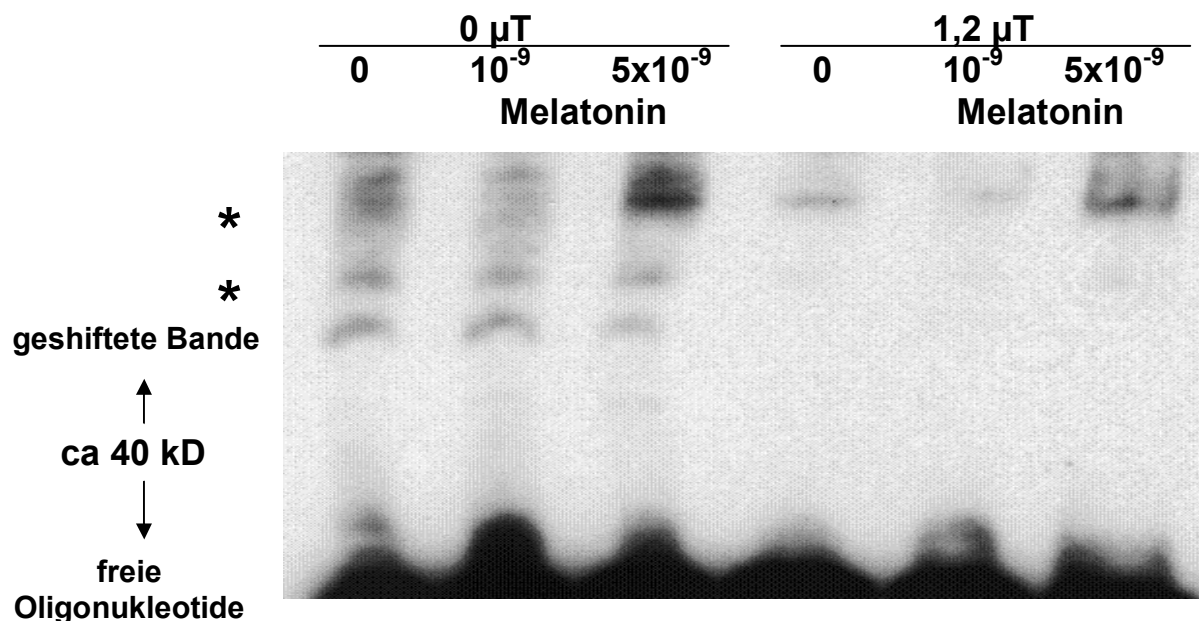


Abb. 13: Repräsentatives Ergebnis eines Gel-Shift-Experiments mit den MCF-7Mel1a Zellen

Die Zellen der Zelllinie MCF-7Mel1a wurden 48 Stunden in serumfreiem Medium (0) bei 0 μT bzw. 1,2 μT kultiviert und im Anschluss 2 Stunden mit 10^{-9} M oder 5×10^{-9} M Melatonin stimuliert. Die nukleären Proteine aus den Zellen wurden mit einem markierten Oligonukleotid inkubiert, dessen Nukleotidsequenz einem Teil des Promoters des BRCA1 Gens entspricht, der ein cAMP-responsives Element enthält. Das Gemisch

wurde elektrophoretisch aufgetrennt und die Oligonukletide mit einer Chemolumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Das Gel zeigt drei verschiedene Banden von geschifteten Oligonukleotiden. Die unteren Banden entsprechen den Oligonukleotiden, die durch die Bindung des CREB-Proteins verschoben sind, da der Molekulargewichtsunterschied zwischen den freien Oligonukleotiden und den geschifteten Oligonukleotiden ca 40 kD beträgt. Dieser Unterschied entspricht dem Molekulargewicht des CREB-Proteins von 44 kD. Die beiden anderen geschifteten Banden sind durch die Bindung anderer unbekannter Proteine entstanden, die sich in der Fraktion der isolierten Kernproteine befinden. Möglicherweise handelt es sich auch um CRE-CREB-Komplexe, an die noch weitere Proteine gebunden haben.

Es ist deutlich zu sehen, dass in den bei 1,2 μ T exponierten Zellen die geschifteten Banden fast nicht nachweisbar sind. Das elektromagnetische Feld verhindert offensichtlich die Aktivierung des CREB-Proteins auch unabhängig von der Melatoninstimulation fast vollständig. Die Adenylatzyklase oder die Proteinkinase A werden im Magnetfeld möglicherweise über einen anderen unbekanntem Signalweg gehemmt, der unabhängig vom membranständigen Rezeptor MT1 ist.

Die Banden des CREB-Proteins wurden bei den verschiedenen Bedingungen densitometrisch ausgewertet. In den MCF-7Mel1a Zellen, die keinem Magnetfeld ausgesetzt waren, nahm die Bindung des CREB-Proteins nach Stimulation mit 10^{-9} M Melatonin im Durchschnitt leicht um 12 % zu. Die Stimulation mit 5×10^{-9} M Melatonin führte allerdings zu einer deutlichen Abnahme der CREB-Bindung um durchschnittlich 82%. Die Messwerte unterliegen jedoch starken Schwankungen, so dass die Effekte nach drei unabhängigen Expositionsexperimenten nicht signifikant waren. Auch die kaum sichtbaren Banden im EMSA-Test der Proteine aus den MCF-7Mel1a Zellen, die 48 Stunden mit 1,2 μ T behandelt waren, konnten densitometrisch ausgewertet werden. Bei 1,2 μ T war die basal sehr niedrige Bindung des CREB-Proteins nach Behandlung mit 10^{-9} M Melatonin sogar auf den doppelten Wert angestiegen, blieb allerdings weit unterhalb der Bindung, die in den feldfreien Zellen gefunden wurde. In den feldfrei behandelten MCF-7p181-Zellen war die, durch das CREB-Protein geschiftete, Bande wesentlich schwächer als in den MCF-7Mel1a Zellen (hier nicht gezeigt). Diese Beobachtung korreliert mit dem geringeren Gehalt an membranständigem Melatoninrezeptor MT1 in den MCF-7p181 Zellen (s. Abb.11). Die Behandlung der Zellen mit 10^{-9} M Mela-

tonin führt zu einem deutlicheren Anstieg (3,8-fach) der CREB-Bindung als in den MCF-7Mel1a Zellen. Nach Stimulation der MCF-7p181 Zellen mit 5×10^{-9} M Melatonin ist die CREB-Bindung dagegen im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle nur um 20 % erhöht.

Im Magnetfeld ist die basale CREB-Bindung in den MCF-7p181 Zellen, ähnlich wie bei den MCF-7Mel1a Zellen, wesentlich schwächer. Die Stimulation mit 10^{-9} M Melatonin führt im Magnetfeld allerdings zu einer 20-fachen Steigerung der CREB-Bindung. Auch bei den MCF-7p181 Zellen waren die Schwankungen zwischen den Einzelversuchen sehr hoch, so dass die Unterschiede nach drei unabhängigen Expositionsexperimenten nicht signifikant waren. Die nach der Grundhypothese erwartete Abschwächung der CREB-Bindung nach Melatoninstimulation konnte nur in Abwesenheit eines Magnetfeldes bei den MCF-7Mel1a Zellen beobachtet werden, die viel MT1 exprimieren.

3.5.3 Bestimmung der antiproliferativen Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen

Eine antiproliferative Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen kann mit dem E-Screen-Assay nur ermittelt werden, wenn die betreffende Zelllinie auch den Östrogenrezeptor, ER α , exprimiert, da der Test auf dem Phänomen beruht, dass Melatonin die Brustkrebszellen weniger empfindlich für die proliferationssteigernde Wirkung von Östradiol macht. Da außer den bereits im Vorläuferprojekt untersuchten Zelllinien MCF-7p181 und MCF-7Mel1a nur die neu etablierte Zelllinie MCU-1 nachweislich ER α exprimiert, konnte nur in dieser weiteren Zelllinie der Einfluss des elektromagnetischen Feldes auf die antiproliferative Wirkung des Melatonins untersucht werden.

Mit den MCU-1 Zellen wurden Dosis-Wirkungskurven von Östradiol in Gegenwart von Melatonin ermittelt und die EC₅₀ von Östradiol unter Einfluss von Melatonin bei verschiedenen Magnetfeldstärken berechnet (Tabelle 18).

Tabelle 18: Veränderung der EC₅₀-Werte von Östradiol durch Melatonin in der Brustkrebszelllinie MCU-1 bei verschiedenen Magnetfeldstärken

Die EC₅₀-Werte von je 5 Dosis-Wirkungskurven wurden mit dem Excel-Makro von Dr. Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg ermittelt und die Mittelwerte berechnet.

MCU-1	0 µT	0,1 µT	1,2 µT
Ohne Melatonin	$1,2 \times 10^{-11}$	$7,1 \times 10^{-12}$	$6,0 \times 10^{-12}$
10^{-9} M Melatonin	$8,8 \times 10^{-12}$	$4,4 \times 10^{-12}$	$3,6 \times 10^{-12}$
5×10^{-9} M Melatonin	$1,1 \times 10^{-11}$	$4,0 \times 10^{-12}$	$1,2 \times 10^{-11}$

Anders als bei den beiden Brustkrebszelllinien MCF-7p181 und MCF-7Mel1a, die im Vorgängerprojekt StSch4219 untersucht wurden, erhöht 10^{-9} M Melatonin bei der feldfreien Stimulation die EC₅₀ von Östradiol nicht, sondern senkt sie in den MCU-1 Zellen leicht ab. Bei 1,2 µT wird die Östradiol-Wirkung erst bei 5×10^{-9} M Melatonin deutlich abgeschwächt, bei niedrigeren Feldstärken reagieren die MCU-1 Zellen durch Melatonin empfindlicher auf die Wachstumsstimulation durch Östradiol. Die primäre Zelllinie verhält sich im Magnetfeld anders als die seit langer Zeit etablierten und kultivierten Zelllinien MCF-7p181 und MCF7Mel1a.

3.6 Proliferationshemmender Effekt von 4-Hydroxy-Tamoxifen auf MCF-7 Zelllinien

Der Einfluss elektromagnetischer Felder auf die Effizienz des Antiöstrogens Tamoxifen, das therapeutisch bei der Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird, wurde bereits im Vorläuferprojekt StSch4219 bei den Magnetfeldstärken 0 µT, 0,1 µT, 1,2 µT, 10 µT und 100 µT in den beiden Zellklonen p40 und p181 der MCF-7-Brustkrebszelllinie MCF-7 untersucht.

Bevor Tamoxifen hemmend auf das Wachstum der Brustkrebszellen wirken kann, muss es durch intrazelluläre Hydroxylasen an der Position 4 der Tamoxifenstruktur hydroxyliert werden.

Deshalb wurden die gleichen Untersuchungen mit dem aktiven Metaboliten 4-Hydroxy-Tamoxifen wiederholt. Zu diesem Zweck wurden mit dem E-screen-Assay Hemmkinetiken von 4-Hydroxy-Tamoxifen im Konzentrationsbereich zwischen 2×10^{-7} M und

5×10^{-5} M erstellt und mit dem Excel-Makro die IC_{50} , die Inhibitor-Dosis, die die Proliferation um 50% senkt, ermittelt.

Abbildung 14 zeigt eine typische Hemmkinetik von 4-Hydroxy-Tamoxifen mit MCF-7p181 Zellen.

In beiden Subklonen der Zelllinie MCF-7 beobachtet man bei Konzentrationen oberhalb 10^{-6} M einen deutlichen hemmenden Effekt von 4-Hydroxy-Tamoxifen auf das Wachstum der Brustkrebszellen. Unterhalb von 10^{-6} M besitzt 4-Hydroxy-Tamoxifen sogar einen leichten proliferativen Effekt (leichter Anstieg der Zellzahl bis 10^{-6} M), ähnlich, wie er auch mit Tamoxifen beobachtet wurde.

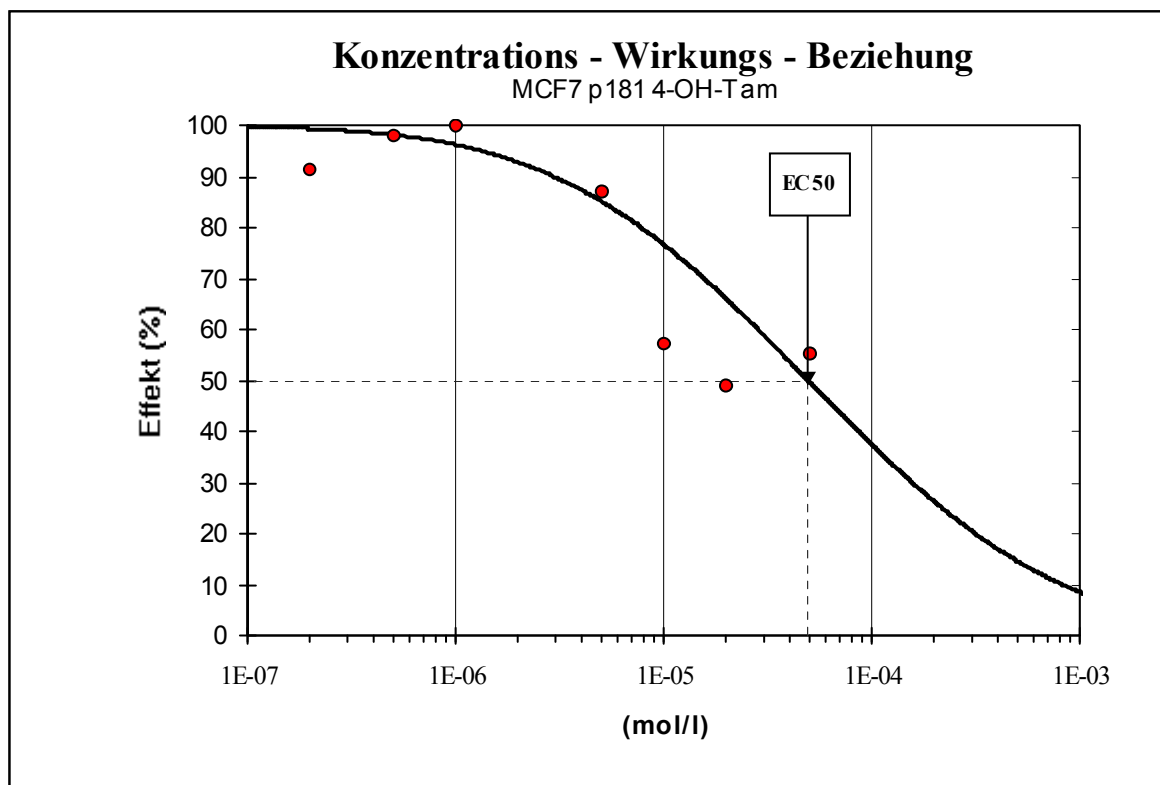


Abb.14: Hemmkinetik von 4-Hydroxy-Tamoxifen in MCF-7p181-Zellen

3.6.1 Einfluss des Magnetfeldes auf die Wirkung von 4-Hydroxy-Tamoxifen in Brustkrebszelllinien

Mit den beiden Subklonen der Brustkrebszelllinie MCF-7 (p40 und p181) wurden die Hemmversuche mit 4-Hydroxy-Tamoxifen im Konzentrationsbereich zwischen 2×10^{-7} M und 5×10^{-5} M bei 0,1 μ T, 1,2 μ T, 10 μ T und 100 μ T durchgeführt. Bei den verschiedenen Feldstärken wurden mindestens vier unabhängige Versuche durchgeführt und die IC_{50} in den exponierten Zellen mit der IC_{50} im abgeschirmten Inkubator verglichen. Die Zellzahl, die bei einer bestimmten Konzentration 4-Hydroxy-Tamoxifen erreicht wurde, wurde mit der Zellzahl, die in Abwesenheit von 4-Hydroxy-Tamoxifen erreicht wurde, ins Verhältnis gesetzt, um den Hemmeffekt bei der jeweiligen Konzentration zu bestimmen. Zur Erzeugung der Dosiswirkungskurven wurden die Mittelwerte der Hemmeffekte bei den verschiedenen Konzentrationen gegen die Hemmstoffkonzentration aufgetragen. Bei jeder untersuchten Feldstärke wurde aus den Mittelwerten eine Dosiswirkungskurve erstellt, aus der die IC_{50} bei der jeweiligen Feldstärke errechnet wurde.

Die zusammenfassende Auswertung der Ergebnisse zeigt die Tabelle 19.

Tabelle 19: IC_{50} von 4-Hydroxytamoxifen in MCF-7 Zellen unter Magnetfeldexposition

Feldstärke	MCF-7 p40	MCF-7 p181
0 μ T	$2,05 \times 10^{-4}$ M	$1,0 \times 10^{-4}$ M
0,1 μ T	$1,7 \times 10^{-4}$ M	$2,3 \times 10^{-4}$ M
1,2 μ T	$1,3 \times 10^{-4}$ M	$0,7 \times 10^{-4}$ M
10 μ T	$1,1 \times 10^{-4}$ M	$3,7 \times 10^{-4}$ M
100 μ T	$1,1 \times 10^{-4}$ M	$0,9 \times 10^{-4}$ M

Die Dosis-Wirkungskurven von 4-Hydroxy-Tamoxifen unterscheiden sich in den beiden Subklonen deutlich.

Die IC_{50} im feldfreien Inkubator variierte in den p40 Zellen um den Wert

$2,05 \pm 1,8 \times 10^{-4}$ M, in den p181 Zellen betrug der Mittelwert bei 0 μ T $1,0 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ M. In den MCF-7 p40 Zellen nahm die IC_{50} von 4-Hydroxy-Tamoxifen mit steigender Feld-

stärke kontinuierlich von $1,7 \times 10^{-4} \text{M}$ bei $0,1 \mu\text{T}$ auf $1,1 \times 10^{-4} \text{M}$ bei $100 \mu\text{T}$ ab (Linksverschiebung).

In den MCF-7 p181 Zellen variierte der Einfluss des Magnetfeldes auf die IC_{50} von 4-Hydroxy-Tamoxifen stärker (Rechtsverschiebung bei $0,1 \mu\text{T}$ und $100 \mu\text{T}$). Bei $0,1 \mu\text{T}$ steigt die IC_{50} auf mehr als das Doppelte der Kontrolle an, bei $1,2 \mu\text{T}$ liegt die IC_{50} leicht unterhalb der Kontrolle, bei $10 \mu\text{T}$ ist die IC_{50} sogar auf fast das vierfache der Kontrolle erhöht und bei $100 \mu\text{T}$ erreicht die Hemmwirkung von 4-Hydroxy-Tamoxifen wieder den Wert, der auch bei der feldfreien Hemmung ermittelt wurde.

3.7 Einfluss des Magnetfeldes auf die Wirkung von Faslodex in Brustkrebszelllinien

Als weiterer antiöstrogener Wirkstoff wurde der Einfluss der Magnetfelder auf die Wirkung des kompletten Östrogenrezeptorantagonisten, ICI-182,780, auch Faslodex genannt, untersucht. ICI-182,780 hat einen Wirkungsmechanismus, der sich vom Wirkungsmechanismus des Tamoxifens unterscheidet.

Die Dosiswirkungskurven von ICI-182,780 wurden auf die gleiche Weise ermittelt, wie bei den Versuchen zum 4-Hydroxy-Tamoxifen beschrieben. Beim ICI-182,780 wurden die Messung nur in einem niedrigeren Konzentrationsbereich durchgeführt, da seine Hemmwirkung stärker ist, als die des 4-Hydroxy-Tamoxifen. Die eingesetzten Konzentrationen von ICI-182,780 lagen zwischen $2 \times 10^{-9} \text{M}$ und $5 \times 10^{-7} \text{M}$.

Im feldfreien Inkubator beträgt die IC_{50} von ICI-182,780 in den MCF-7 p40 Zellen $5,0 \pm 2,5 \times 10^{-7} \text{M}$ und fällt bei $0,1 \mu\text{T}$ zunächst auf $1,4 \times 10^{-7}$ ab. Bei den höheren Feldstärken steigt die IC_{50} wieder an. In den MCF-7 p181 Zellen beträgt die IC_{50} von ICI-182,780 bei $0 \mu\text{T}$ $2,0 \times 10^{-7} \text{M}$, sie fällt bei $0,1 \mu\text{T}$ ebenfalls auf $1,3 \times 10^{-7}$ ab und steigt bei $100 \mu\text{T}$ wieder auf das 1,3-fache des Wertes der feldfreien Kontrolle (Tabelle 20).

Tabelle 20: IC₅₀ von ICI-182,780 in MCF-7 Zellen unter Magnetfeldexposition

Feldstärke	MCF-7 p40	MCF-7 p181
0 μT	$5,0 \times 10^{-7} \text{M}$	$2,0 \times 10^{-7} \text{M}$
0,1 μT	$1,4 \times 10^{-7} \text{M}$	$1,3 \times 10^{-7} \text{M}$
1,2 μT	$8,3 \times 10^{-7} \text{M}$	$2,1 \times 10^{-7} \text{M}$
10 μT	$5,2 \times 10^{-7} \text{M}$	$1,6 \times 10^{-7} \text{M}$
100 μT	$10 \times 10^{-7} \text{M}$	$2,6 \times 10^{-7} \text{M}$

Während sich bei den p40 Zellen die ICI-182,780 Wirkung bei 0,1 μT und 100 μT deutlich von der Wirkung in feldfreier Umgebung unterscheidet, liegen die Veränderungen durch das Magnetfeld bei den p181 Zellen im Bereich der Standardabweichungen, die bei den Kontrollzellen ermittelt wurden. Schwache Felder von 0,1 μT erhöhen die Wirkung von ICI-182,780 auf die p40 Zellen leicht, während die Wirkung von ICI-182,780 durch starke Felder bei 100 μT abgeschwächt wird.

Die Effekte der elektromagnetischen Felder auf die Brustkrebszellen sind bei 4-Hydroxytamoxifen und ICI-182,780 jedoch nicht so deutlich, wie sie im Vorläuferprojekt für Tamoxifen beobachtet wurden. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkung von ICI-182,780 offensichtlich nicht vom Mengenverhältnis der vorhandenen Koaktivatoren und Korepressoren abhängig ist. Für Wirkung von ICI-182,780 ist, wie in der Literatur beschrieben, ein anderer Mechanismus verantwortlich. ICI-182,780 bewirkt einen schnelleren Abbau der Östrogenrezeptoren durch das Proteasom-System der Zellen. Dieses Proteasom-System wird offensichtlich von elektromagnetischen Feldern nicht beeinflusst.

4. Diskussion

Ausgangspunkt der in diesem Bericht vorgestellten Untersuchungen war das Phänomen, dass die antiproliferativ auf Brustkrebszellen wirkenden Substanzen Tamoxifen und Melatonin im elektromagnetischen Feld in ihrer Wirkung abgeschwächt werden (Liburdy et al., 1993; Harland und Liburdy, 1997; Blackman et al., 2001; Ishido, 2001; Girgert et al., 2005).

In dem Vorgängerprojekt StSch4219 konnten wir nachweisen, dass die Abschwächung der antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und Melatonin durch eine Verschiebung der Dosiswirkungskurven der beiden Substanzen zu höheren Konzentrationen zustande kommt, mit der Folge, dass ihre antiproliferative Wirkung bei einer definierten Konzentration schwächer wird. Beim Tamoxifen entspricht diese Abschwächung der Tamoxifenwirkung dem klinischen Bild der häufig nach längerer Tamoxifenbehandlung beobachteten Tamoxifenresistenz.

Ziel des vorliegenden Projektes war es deshalb, den Mechanismus näher aufzuklären, der dieser Veränderung in der Empfindlichkeit der Brustkrebszellen gegenüber Tamoxifen zugrunde liegt. Zu diesem Zweck wurden die mit elektromagnetischen Feldern exponierten Brustkrebszellen auf Veränderungen in der Genexpression und der intrazellulären Signaltransduktion untersucht.

Zunächst haben wir uns einen Überblick darüber verschafft, welche krebsrelevanten Gene in den Brustkrebszellen nach Exposition mit einem elektromagnetischen Feld verändert exprimiert sind. Für diese Untersuchung wurde ein cDNA-Mikroarray verwendet, auf dem 1196 verschiedene, krebsrelevante Gene repräsentiert sind. Unter der von vielen Autoren bei der Interpretation von Mikroarray Daten angewendeten Vorgabe, ein Gen erst als verändert exprimiert anzusehen, wenn die Expression in den behandelten Zellen sich von der Expression in den Kontrollzellen um mindestens den Faktor 2 unterscheidet, wurde in den exponierten MCF-7 p40-Zellen die Expression von 20 Genen hochreguliert und von 16 Genen herunterreguliert. In der Zelllinie MCF-7p181, die nach den Beobachtungen aus dem Vorläuferprojekt empfindlicher und stärker auf elektromagnetische Felder reagiert hat, waren nach Exposition mit 1,2 μT sogar 61 Gene verstärkt exprimiert und 41 Gene schwächer exprimiert als in den Kontrollzellen.

Die betroffenen Gene, gehörten zu sehr unterschiedlichen funktionellen Gruppen.

Besonders interessant im Zusammenhang mit der Induktion einer Tamoxifenresistenz war die Tatsache, dass eine Reihe von Kofaktoren der nukleären Rezeptoren in den exponierten Brustkrebszellen differentiell exprimiert waren. Diese Veränderung der Genexpression wurde im Anschluss noch näher mit Hilfe eines themenspezifischen Mikroarrays für Kofaktoren, durch RT-PCR und auf Western-Blots untersucht.

In den exponierten Zellen war auch eine große Zahl von Wachstumsfaktoren und Rezeptoren verändert exprimiert. Aus klinischer Sicht war vor allen Dingen bedeutend,

dass verschiedene Gene, die mit der **Entstehung von Metastasen** in Zusammenhang stehen, nach Magnetfeldexposition verändert exprimiert waren. Die Entstehung von Metastasen ist bei Brustkrebs, wie auch bei anderen soliden Tumoren ein ernstes Problem, weil es die Heilung der Patienten erheblich erschwert. Solange ein Tumor auf den primären Entstehungsort beschränkt ist, lässt er sich relativ sicher durch chirurgische Maßnahmen entfernen. Ist ein Tumor erst einmal metastasiert, muss bei den Patienten eine systemische Therapie mit Zytostatika oder bei Östrogenrezeptor-positiven Tumoren mit Antiöstrogenen durchgeführt werden, die nur begrenzt zum Erfolg führt. Die Metastasen sind bei fast allen Tumorerkrankungen die ultimative Ursache für einen gravierenderen Krankheitsverlauf und eine höhere Sterblichkeit.

4.1 Auswirkungen der Veränderungen der Expression der Kofaktoren durch elektromagnetische Felder auf die Tamoxifenwirkung

Die Ergebnisse der Genexpressionsuntersuchungen in den Magnetfeld-exponierten Brustkrebszellen haben eindeutig gezeigt, dass die beiden Koaktivatoren AIB1 und SRC-1 durch das Magnetfeld verstärkt exprimiert werden und die beiden Korepressoren N-CoR und SMRT nach der Exposition schwächer exprimiert werden. Diese Veränderungen wurden mit drei unabhängigen Methoden bestätigt, auf Mikroarrays (s.3.1.1), durch RT-PCR (s.3.2.1.2) und auf Proteinebene durch Western-Blots (s.3.2.2). Die Untersuchung des zeitlichen Verlaufs der Expressionsveränderung hat in den meisten Fällen gezeigt, dass die Veränderung nur vorübergehend in den ersten 24-48 Stunden auftritt. Dieses Phänomen beobachtet man auch bei anderen Stimulationen von Zellen, z.B. mit Wachstumsfaktoren. Nach der Induktion der Genexpression werden in der Regel in der Zelle auch kompensatorische Mechanismen angestoßen, die verhindern sollen, dass eine Reaktion auf den Stimulus sich endlos weiterentwickelt. Im Falle der Exposition der Bevölkerung mit elektromagnetischen Feldern muss man allerdings davon ausgehen, dass die Menschen sich im Alltag durch eine Umgebung bewegen, in der sie ständig sich durch Felder unterschiedlicher Stärke bewegen, so dass die Induktion der beobachteten Genexpression immer wieder von Neuem angestoßen wird.

Die Veränderungen der Genexpression der Kofaktoren haben bei allen untersuchten Kofaktoren die gleiche Wirkung auf das Zellwachstum zur Folge. Die Koaktivatoren nehmen in ihrer Expression zu, wodurch die agonistische Wirkung von Tamoxifen verstärkt wird und die Expression der Korepressoren nimmt im Magnetfeld ab, wodurch

die antagonistische Wirkung von Tamoxifen abgeschwächt wird. Beide Effekte führen zu einer schwächeren antiproliferativen Wirkung von Tamoxifen und einer stärkeren wachstumsfördernden Wirkung, so wie sie auch in der klinischen Situation beobachtet wird.

Ähnliche Veränderungen in der Genexpression wurden auch in Tumorproben von Patientinnen gefunden, die nach längerer Tamoxifentherapie eine Resistenz gegen das Therapeutikum entwickelt haben (Lavinsky et al., 1998; Kurebayashi et al., 2000; Osborne et al., 2003; Fleming et al., 2004). In 92 % der Brusttumore, die trotz Tamoxifentherapie weiterwachsen, wurde eine höhere Expression des Koaktivators SRC-1 nachgewiesen (Fleming et al., 2004). Patientinnen, deren Tumore den Koaktivator AIB1 stark exprimierten, besaßen eine schlechtere Überlebenswahrscheinlichkeit als Patientinnen mit schwacher AIB1-Expression (Osborne et al., 2003). In Brusttumoren, die auf die Expression des Korepressors N-Cor untersucht wurden, wurden bei Patientinnen, die keinen Rückfall erlitten, höhere Werte bei der N-Cor-Expression gefunden (Kurebayashi et al., 2000).

Die antiöstrogene Wirkung von Tamoxifen kommt dadurch zustande, dass der Östrogenrezeptor, wenn er Tamoxifen gebunden hat, Korepressoren zu den Promotoren der östrogenabhängigen Gene rekrutiert. Durch die Histondeacetylase-Aktivität der Korepressoren wird die DNA dieser Gene weniger zugänglich für die RNA-Polymerase und die Gene werden weniger stark abgelesen. Überwiegen jedoch die Koaktivatoren, dann verdrängen diese die Korepressoren von den Östrogenrezeptoren und durch ihre Histonacetyltransferase-Aktivität werden die Gene für die Transkription zugänglicher und daher stärker abgelesen. Als Folge proliferieren die Brustkrebszellen trotz der Anwesenheit von Tamoxifen (Xu et al., 1999).

Die auffallende Ähnlichkeit des Expressionsmusters der Kofaktoren in den Magnetfeld-exponierten Brustkrebszellen mit der Expression in den Tamoxifen-resistenten Tumoren der Patientinnen ist ein deutlicher Hinweis darauf, dass elektromagnetische Felder einen Beitrag zur Entstehung der Tamoxifenresistenz bei der klinischen Behandlung leisten können.

4.2 Erhöhung der Metastasierungsfähigkeit von Brustkrebszellen durch Exposition mit elektromagnetischen Feldern

Die Entstehung von Metastasen ist ein sehr komplexer Prozess, der aus mehreren Schritten besteht. Um sich aus dem Verband der Zellen im Primärtumor herauszulö-

sen, muss zunächst die Bindung der Zellen an ihre Nachbarzellen und an die Extrazellulärmatrix gelockert werden. Dies geschieht vor allen Dingen durch eine verminderte Expression von Adhäsionsfaktoren, wie Integrine und Cadherine. Eine Vielzahl verschiedener Proteasen muss die Extrazellulärmatrix abbauen, damit die Tumorzellen zu den Blutgefäßen gelangen können, über die sie zu den Zielgeweben gelangen können. In den Zielgeweben angekommen, müssen die Tumorzellen sich wieder verankern und dort weiterwachsen.

Die Mikroarray-Ergebnisse haben gezeigt, dass die Expression einiger Integrine und Cadherine in den Magnetfeld-exponierten Zellen herunterreguliert werden. Einige Matrixmetalloproteasen und Gene des Plasminogenaktivator-Systems waren in den exponierten Zellen stärker exprimiert als in den Kontrollzellen. Durch diese Veränderungen sind die Brustkrebszellen potentiell in der Lage Metastasen zu bilden.

Die verstärkte Expression des Urokinase-Plasminogenaktivators, uPA, und des Plasminogenaktivator-Inhibitors-1 konnte durch RT-PCR bestätigt werden. Dagegen blieb die Expression des Gewebe-Plasminogenaktivators und des Rezeptors für uPA nahezu unverändert.

uPA aktiviert einerseits Plasminogen zu Plasmin, durch proteolytische Spaltung kann uPA jedoch auch Matrixmetalloproteasen (MMP's) aktivieren. Obwohl die Aktivität von MMP's durch Gewebeinhibitoren der Metalloproteasen (TIMP's) gehemmt werden kann, ist eine erhöhte Expression des Inhibitors TIMP-1 bei Mammakarzinompatientinnen mit einer schlechteren Überlebenswahrscheinlichkeit verbunden. Diese Beobachtung wird auf Eigenschaften von TIMP-1 zurückgeführt, die über die Hemmung der MMP's hinausgehen, z.B. Stimulation des Tumorwachstums und Hemmung der Apoptose (Schrohl et al., 2004).

Bei der Untersuchung von Mammakarzinomen wurde eine Korrelation zwischen erhöhter uPA- und PAI-Expression und einer geringeren Überlebenswahrscheinlichkeit der betroffenen Patientinnen festgestellt. Zur Zeit wird in einer multizentrischen Studie untersucht, ob Patientinnen mit geringer uPA- und PAI-Expression eine intensive Chemotherapie erspart bleiben kann (Harbeck und Thomssen, 2003). Eine stärkere Expression von uPA und PAI-1 war auch mit einem schwächeren Ansprechen der Tumore auf Tamoxifen assoziiert, mit der Folge einer schlechteren Prognose für die jeweiligen Patientinnen (Foekens et al., 1995).

Der gesamte Metastasierungsprozess wird von einer Reihe von Genen kontrolliert, die als Metastasen-Suppressorgene bezeichnet werden (zur Übersicht: Steeg et al., 2003). Wenn diese Gene in Tumorzellen deletiert sind, oder ihre Expression herunterreguliert ist, zeigen diese Zellen im Mausmodell ein verstärktes Metastasierungsverhalten. Die Metastasen-Suppressorgene gehören sehr unterschiedlichen Proteinfamilien an. Die nm23-Proteine sind Proteine, mit Nukleosiddiphosphat-Kinaseaktivität. Die Transfektion der stark metastasierenden Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 mit dem Gen Nm23-H1 unterdrückt die Metastasierung in einem Mausmodell deutlich (Leone et al., 1993). KISS-1 ist ein Protein, das von den Tumorzellen sezerniert wird und für das Zellen einen Rezeptor (GPR-54) besitzen, der zu den G-Protein-bindenden Rezeptoren gehört. Auch die Transfektion mit KISS-1 unterdrückte die Metastasierung von Mammakarzinomzellen (Lee und Welch, 1997). Der Metastasen-Suppressor Kangai (Kai1/CD82) ist ein Membranprotein der Tetraspanin-Familie, dessen Verlust das metastatische Potential von Mammakarzinomzellen erhöht (Yang et al., 1997). Auf welchem Weg diese Proteine die Metastasenbildung verhindern, ist bisher noch weitestgehend unbekannt.

Die nm23-Proteine beeinflussen auch die Genexpression, da sie unter anderem an den Promoter des c-myc-Gens binden und dieses Gen transaktivieren (Berberich und Postel, 1995). Desweiteren wurde beobachtet, dass die nm23-Proteine mit den nukleären Rezeptoren ROR α und RZR β interagieren, die nach Bindung ihres Liganden als Transkriptionsfaktoren wirken (Paravicini et al., 1996). In der stark metastasierenden Mammakarzinomzelllinie MDA-MB-435 wurde gezeigt, dass durch Transfektion mit einem nm23-tragenden Vektor die Proteasen MMP-1 und Cathepsin, so wie das Integrin α 1 hochreguliert werden, während die Integrine α 8 und α 9, so wie der transforming growth factor β 2 und sein Rezeptor herunterreguliert waren (Zhao et al., 2004). Durch Transfektion der Zelllinie HT1080 mit einem KISS-1 Expressionsvektor, konnte gezeigt werden, dass die Bindung von NF κ B an den MMP9-Promoter verhindert wird, wodurch die Expression dieser Matrixmetalloprotease verringert wird (Yan et al., 2001). Ein Mechanismus, über den das Metastasen-Suppressorgen Kangai (CD82) die Metastasenbildung reduziert, ist die Inaktivierung des Urokinase-Plasminogenaktivators, uPA. Kai1/CD82 bindet auf der Zellmembran an den uPA-Rezeptor und konzentriert ihn zusammen mit dem Integrin α 5 β 1 in den fokalen Adhäsionspunkte, wodurch die Aktivierung von uPA verhindert wird (Bass et al., 2005).

Nicht alle Metastase-Suppressorgene, die sich bei der Mikroarray-Untersuchung als herunterreguliert zeigten, waren auch bei der Verifizierung durch RT-PCR herunterreguliert. Mit der RT-PCR konnte jedoch bestätigt werden, dass die Metastase-Suppressorgene, Kiss-1 deutlich und nm23-H1 und nm23-H4 leicht in ihrer Expression abgeschwächt waren.

Die Ergebnisse deuten insgesamt darauf hin, dass die Exposition mit elektromagnetischen Feldern eine Metastasenbildung bei Brustkrebs begünstigen kann.

4.3 Einfluss elektromagnetischer Felder auf die intrazelluläre Signaltransduktion

Nachdem die Untersuchungen zur Genexpression auf Mikroarrays und durch RT-PCR gezeigt haben, dass in den Magnetfeld-exponierten Zellen Veränderungen nachweisbar sind, stellt sich die Frage, wie diese Veränderungen der Genexpression reguliert werden. Nach einem äußeren Reiz auf eine Zelle, werden je nach der Qualität des Reizes unterschiedliche Signaltransduktionswege aktiviert, die letzten Endes die Expression bestimmter Gene induzieren oder hemmen.

So werden etwa nach Wachstumsfaktorstimulation von Zellen verschiedene Signaltransduktionswege aktiviert, u.a. der Ras-Raf-MAP-Kinase-Signalweg. Hier wird das Signal durch Phosphorylierung einer Kaskade von Kinasen von einer Kinase zur nächsten weitergegeben und dabei verstärkt. Die Kinasen am Ende dieser Kaskaden, z.B. Erk1/2 oder junK, aktivieren durch Phosphorylierung Transkriptionsfaktoren, die die Ablesung bestimmter Gene, z.B. c-myc oder CyclinD1 aktivieren oder auch hemmen können. Als Folge proliferiert die Zelle stärker.

Die Untersuchungen in 3.1 bis 3.3 haben gezeigt, dass nach Magnetfeldexposition einige Koaktivatoren stärker abgelesen werden, einige Korepressoren gehemmt werden, uPA und PAI stärker und einige Metastase-Suppressoren schwächer exprimiert werden.

Bei der Exposition der Brustkrebszellen mit elektromagnetischen Feldern entspricht das Magnetfeld dem Reiz, der auf die Zelle einwirkt. Bei den elektromagnetischen Feldern ist bisher völlig unbekannt, wie das magnetische Feld von Zellen wahrgenommen wird, d.h. welche Struktur in den Zellen der Sensor ist. Es gibt Vermutungen, dass es Ionenkanäle in der Zellmembran sein könnten, durch die Ladungen in Form von Ionen durch die Wirkung des Magnetfeldes in die Zelle transportiert werden. In

Lymphozyten wurde ein Anstieg des intrazellulären Kalziumgehalts während der Exposition mit einem elektromagnetischen Wechselfeld beschrieben (Yost und Liburdy, 1992; Lindström et al., 1993).

In den Versuchen zur Signaltransduktion in den Magnetfeld-behandelten Zellen wurde zunächst die Aktivität der Mitogen-aktivierten Proteinkinasen untersucht, die in der Regel aktiviert sind, wenn es zu einer Erhöhung der Genexpression kommt. Obwohl die beiden Kinasen, junK und p38, in der Literatur häufig als Stress-aktivierte Proteinkinasen bezeichnet werden, wurde bei diesen beiden Kinasen keine Aktivierung in den Brustkrebszellen nach Behandlung mit Magnetfeld beobachtet. Stattdessen war die Aktivität der junK und der Kinase p38 nach 30 Minuten sogar vorübergehend gehemmt. Andere physikalische Stressreize, wie z.B. UV-Strahlung, Röntgenstrahlung oder auch Hyperthermie führen in vielen Fällen zu einer Aktivierung von junK oder p38. Tatsächlich war in den mitgeführten Positivkontrollen (20', 42°C) auch eine Aktivierung von junK und p38 nachweisbar, womit gezeigt werden konnte, dass das Nachweissystem funktioniert.

Die einzige untersuchte MAP-Kinase, deren Aktivität in den Brustkrebszellen durch Magnetfelder aktiviert wurde, war die MAP-Kinase Erk1. Die MAP-Kinase Erk 2 war dagegen nach 30 Minuten Behandlung mit 1,2 μ T vorübergehend um ca 50 % deaktiviert. Durch Wachstumsfaktoren werden die beiden MAP-Kinasen meistens parallel aktiviert. Auf dem Ras-Raf-MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg, werden Erk1/2 meistens durch die übergeordnete Kinase MEK1 aktiviert. Die Vorbehandlung der Brustkrebszellen mit einem MEK1-Inhibitor konnte jedoch nicht die Aktivierung der Erk1 durch das Magnetfeld verhindern, so dass die Aktivierung von Erk1 über eine andere Kinase erfolgt sein muss. Auch die Hemmung der Kinase src vor der Magnetfeldexposition konnte die Aktivierung von Erk1 nicht verhindern. Bisher ist es nicht gelungen, die Kinase zu identifizieren, die nach Magnetfeldexposition zu der Erhöhung der Erk1-Aktivität führt.

4.4 Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Melatoninwirkung

Neben dem Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Genen, die für die Tamoxifenwirkung und das Äuslösen von Metastasen wichtig sind, wurden auch Veränderungen untersucht, die die onkostatische Wirkung des Zirbeldrüsenhormons Melatonin beeinflussen können. Es gibt Berichte, dass elektromagnetische Felder die antiöstrogene Wirkung von Melatonin in Brustkrebszellen verhindern können

(Liburdy et al, 1993; Ishido, 2001). In dem Vorläuferprojekt war es uns gelungen, die Beobachtung mit einem sensiblen Testsystem zu bestätigen (Girgert et al., 2003). In den Versuchen von Kap. 3.5 sollte der molekulare Mechanismus dieses Verhaltens der Brustkrebszellen im Magnetfeld näher untersucht werden.

Die antiöstrogene Wirkung von Melatonin auf Brustkrebszellen wird seit langer Zeit kontrovers diskutiert. Während einigen Autoren zeigen konnten, dass 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).

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

a) Die Zellen müssen den Östrogenrezeptor α exprimieren (Cos et al. 1991).

Diese Voraussetzung ist bei den MCF-7 p181-Zellen, den MCF-7Mel1a-Zellen, den MCU-1-Zellen und den HCC70- Zellen gegeben. Die Zelllinien MDA-MB-435 und MDA-MB-453 exprimierten keinen oder nur verschwindend geringe Mengen $ER\alpha$, so dass diese Zelllinien nicht für die Untersuchung der Melatoninwirkung in Frage kamen. Während der Östrogenrezeptor $ER\alpha$ in den meisten untersuchten Brustkrebszelllinien nachgewiesen werden konnte, war der Östrogenrezeptor $ER\beta$ in keiner der untersuchten Brustkrebszelllinien nachweisbar (Girgert et al., 2003).

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 die anti-östrogene Wirkung verantwortliche Melatoninrezeptor in der Zellmembran liegt, oder aber im Zellkern lokalisiert ist. Für die Wirkung des Melatonins auf zellulärer Ebene sind verschiedene Rezeptoren verantwortlich. Diese Rezeptoren sind entweder in der Zellmembran lokalisiert (MT1) oder sie befinden sich im Zellkern ($RZR\alpha$), wo sie als ligandenabhängige Transkriptionsfaktoren wirken. Andere Arbeitsgruppen haben bisher nur in der Brustkrebszelllinie MCF-7 sowohl den Mt1-Rezeptor als auch den nukleären $RZR\alpha$ -Rezeptor nachweisen können (Ram et al., 1998; Song et al., 1997).

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

nomzellen wurde gezeigt, dass der nukleäre Rezeptor RZR α für die antiproliferative Wirkung von Melatonin verantwortlich ist (Winczyk et al., 2002).

Der in der Zellmembran befindliche Mel1a Rezeptor wurde mittels RT-PCR nur in den Mel1a transfizierten MCF-7 Zellen und in Spuren in der Zelllinie MCU-1 nachgewiesen, die neu aus einer Primärkultur eines Brusttumors etabliert wurde. Manche Autoren nehmen jedoch an, dass der nukleäre RZR-Rezeptor für die inhibierende Wirkung von Melatonin verantwortlich ist (Carlberg et al. 1995). RZR α konnte am deutlichsten in den MDA-MB-453 Zellen nachgewiesen werden, die allerdings kein ER α exprimierten, so dass sie für die Untersuchung der antiöstrogenen Wirkung von Melatonin nicht in Frage kamen. Die Zelllinien MCF-7p181, HCC70, MCU-1 und MCF-7Mel1a exprimierten nur 5-10 mal weniger RZR α als die MDA-MB-453 Zellen.

Die Abnahme der Empfindlichkeit der Brustkrebszellen gegenüber Melatonin im Magnetfeld liegt nicht in einer Abnahme dieser Rezeptoren begründet. Die Versuche in 3.5.1.2 haben eindeutig gezeigt, dass sich die Expression von MT1 und RZR α im Magnetfeld nur geringfügig verändert.

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

Um die Frage näher zu klären, welcher Melatoninrezeptor für die antiöstrogene Wirkung des Melatonins in Brustkrebszellen verantwortlich ist, wurde in Kap. 3.5.2 der Einfluss der beiden Melatoninrezeptoren auf die Expression verschiedener Targetgene des Östrogenrezeptors untersucht. Ein Vergleich der beiden Zelllinien MCU-1, die mehr den nukleären Rezeptor RZR α exprimiert, mit der Zelllinie MCF-7Mel1a, die mehr MT1 exprimiert, sollte dieser Klärung dienen.

Aus der Literatur ist bekannt, dass in Brustkrebszellen die Expression des Tumorsuppressorgens p53, des Zellzyklusregulator p21^{waf} und des Protoonkogens c-myc durch Östradiol induziert wird (Weisz und Bresciani, 1988; Dubik und Shiu, 1988). Widersprüchliche Berichte gibt es über den Einfluss von Melatonin auf die Expression

von p53 und p21waf. Mediavilla et al. (1999) berichteten, dass p53 und p21waf durch Melatonin induziert wird, während Cini et al. auf Mikroarrays eine Unterdrückung der Expression von p53 durch Melatonin beobachteten (Cini et al., 2005). Bei der Suche nach einem Gen, das vom membranständigen Melatoninrezeptor reguliert wird, stellte sich heraus, dass der Promoter des Tumorsuppressorgens BRCA1, ein cAMP-responsives Element enthält. Dieses Gen ist für gynäkologische Onkologen besonders interessant, weil bei Frauen, die in ihrem Erbgut eine Mutation des BRCA-1 Gens tragen, häufiger und früher ein Brusttumor entsteht. Außerdem wird in den meisten sporadisch auftretenden Brusttumoren eine reduzierte Expression des BRCA1 Gens beobachtet (Wilson et al., 1999).

In den MCU-1 Zellen, die mehr nukleären RZR α enthalten, veränderte sich die durch Östradiol induzierte Expression von p53 durch Melatonin nicht. Die Expression von p21waf, BRCA1 und c-myc wurde durch Melatonin um 20-30% reduziert. In den MCF-7Mel1a Zellen, die mehr MT1 enthielten, änderte sich die Expression von BRCA1 und c-myc durch Melatonin nicht, während die Expression von p53 und p21waf nach Melatoninbehandlung geringer war. Diese Beobachtungen lassen vermuten, dass BRCA1 und c-myc zumindest überwiegend über RZR α durch Melatonin reguliert werden, p53 eher über den Einfluss von MT1 in den Zellen herunterreguliert wird.

In den Zellen, die mit einem elektromagnetischen Feld von 1,2 μ T exponiert waren, fällt zunächst auf, dass schon die Wirkung von Östradiol auf die Expression von p53, BRCA1 und c-myc durch das Magnetfeld beeinflusst wird. Während die Expression von p53 in den MCF-7Mel1a Zellen ohne Magnetfeld durch Behandlung mit 10^{-11} M Östradiol abnimmt, nimmt sie bei 1,2 μ T zu. Die Expression von c-myc wird im Magnetfeld durch Östradiol stärker induziert. In den MCU-1 Zellen, die weniger MT1 enthalten, dafür aber mehr RZR α , fällt die Induktion der BRCA-1- und c-myc-Expression durch Östradiol im Magnetfeld schwächer aus.

Die Wirkung von Melatonin wird lediglich bei der Expression von p53 im Magnetfeld umgekehrt. In den MCU-1 Zellen nimmt die Expression von p53 im Magnetfeld nach Melatoninbehandlung im Vergleich zu den Zellen ohne Magnetfeld ab. In den MCF-7Mel1a Zellen führt die Behandlung mit Melatonin in Abwesenheit des Magnetfeldes zu einer Abnahme der p53 Expression, während im Magnetfeld die Expression von p53 durch Melatonin zunimmt. Die Expression von BRCA-1 und c-myc steigt im Magnetfeld nach Melatoninstimulation in beiden Zelllinien stärker an als ohne Magnetfeld.

Die Unterschiede in der Reaktion der beiden Brustkrebszelllinien auf die Stimulation mit Melatonin, deuten daraufhin, dass p53 und p21waf eher über den membranständigen Rezeptor reguliert werden und BRCA-1 und c-myc durch den nukleären RZR α . Es wäre hochinteressant, diesen Unterschied in Zukunft noch weiter zu analysieren und auf seine allgemeine Gültigkeit zu überprüfen, denn durch die Unterscheidung, welcher Rezeptor welche Funktion vermittelt, sollte auch der Mechanismus der Wirkung der elektromagnetischen Felder auf den onkostatistischen Effekt von Melatonin aufzuklären sein.

Bei der Untersuchung des Einflusses der elektromagnetischen Felder auf Brustkrebszellen sollte auch die Beobachtung stärkere Beachtung finden, dass EMF bereits die Wirkung von Östradiol auf die Genexpression beeinflusst.

4.5 Veränderung der Wirkung von Antiöstrogenen auf Brustkrebszellen im Magnetfeld

Die Wirkung der Östrogene wird durch Bindung an den spezifischen Östrogenrezeptor (ER) ausgelöst, der zur konservierten Familie der Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren gehört. Der humane ER ist ein nukleäres 66 kDa-Protein, welches als ein hormonaktivierter Transkriptionsfaktor fungiert.

Die Aktivierung des Östrogenrezeptors ist nach heutigem Kenntnisstand eine Folge der durch die Ligandenbindung induzierten Änderungen in der Struktur des Rezeptors (Kumar & Chambon 1988; Tsai et al. 1988). Nach Bindung von Östradiol an den ER und Abspaltung des assoziierten 90 kDa Hitzeschock-Proteins (Hsp 90) kommt es zur Dimerisierung des Rezeptors. Dieser aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex bindet mit hoher Affinität an eine gut definierte DNA-Sequenz von 13 Basenpaaren, das Östrogen-responsive Element (ERE) (Evans 1988; Kumar & Chambon 1988; Beato et al. 1995). Die enhancerähnlichen ERE-Sequenzen sind nahe bei oder innerhalb von Östrogen-abhängigen Genen lokalisiert (Beato 1991). Nach Bindung an das ERE aktiviert der ER die Transkription der entsprechenden Gene, was durch noch nicht vollständig geklärte Mechanismen zur Stimulation der Zellproliferation führt (Dubik & Shiu 1988; Weisz & Bresciani 1988). Ein direkter Zusammenhang von ER-vermittelter Gentranskription und Östradiol-vermittelter Zellproliferation wird durch in vivo und in vitro Studien mit Antiöstrogenen nahegelegt (DeFriend et al. 1994). Antiöstrogene unterdrücken die Expression von Östrogen-regulierten Genen und reduzieren die Prolife-

ration von ER-positiven Brustzellen, während 17β -Östradiol ein Mitogen für das Brustepithel ist (Dubik & Shiu 1988; Weisz & Bresciani 1988; DeFriend et al. 1994).

Das Medikament Tamoxifen, das routinemäßig in der Krebstherapie gegen Östrogen-abhängige Tumore eingesetzt wird, gehört zur Gruppe der Östrogenantagonisten. Sein Wirkort ist der Östrogenrezeptor in den Tumorzellen (Osborne, 1998). Bei den Östrogenantagonisten unterscheidet man die Gruppe der vollständigen Antagonisten von einer Gruppe von partiellen Antagonisten. Tamoxifen zählt zu diesen 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.

Brustkrebszellen, die Östrogenrezeptoren 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).

Bei den Versuchen mit 4-Hydroxy-Tamoxifen fällt zunächst ein Unterschied in der Empfindlichkeit der verwendeten Zellen gegenüber der antiöstrogenen Wirkung von Tamoxifen auf. Bei der feldfreien Behandlung der MCF-7 Zellen wurde mit den p40 Zellen mit Tamoxifen bereits bei $1,4 \times 10^{-6} \text{M}$ eine 50%ige Hemmung des Wachstums erreicht (s. Girgert et al., 2005), für 4-Hydroxy-Tamoxifen wurde eine Konzentration von $2 \times 10^{-4} \text{M}$ für die gleiche Hemmung benötigt (s. Tabelle 19). Bei den p181 Zellen waren es 10^{-4}M statt $6,8 \times 10^{-7} \text{M}$ (s. Girgert et al., 2005). Da 4-Hydroxy-Tamoxifen der eigentlich aktive Metabolit von Tamoxifen ist, erscheint diese Beobachtung zunächst paradox, sie lässt sich allerdings durch die Tatsache erklären, dass 4-Hydroxy-Tamoxifen durch die zusätzliche Hydroxylgruppe hydrophiler ist und deshalb schlechter die Zellmembran überwinden kann, um an seinen Wirkort im Zellkern zu kommen. Bei 4-Hydroxy-Tamoxifen ist auch die Verschiebung der Dosis-Wirkungskurve durch das Magnetfeld nicht so stark ausgeprägt, wie sie beim Tamoxifen beobachtet wurde. Bei den p40 Zellen kommt es im Magnetfeld zu keiner Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve oder möglicherweise sogar zu einer leichten Linksverschiebung. Bei

den MCF-7 p181 Zellen ist die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve bei 4-Hydroxy-Tamoxifen wesentlich geringer als bei Tamoxifen und sie tritt nur bei 0,1 μT und 10 μT auf, während sie mit Tamoxifen bei 1,2 μT ihr Maximum hat (Girgert et al., 2005). Ein solcher Fenstereffekt ist bei der Wirkung elektromagnetischer Felder auf verschiedene, biologische Systeme häufig beobachtet worden (Litovitz et al., 1992).

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 verschiedenen Arbeitsgruppen erschwert. Prinzipiell konnten wir einen Einfluss der elektromagnetischen Felder auf die Tamoxifenwirkung bestätigen und durch Genexpressionsanalysen den zugrunde liegenden Mechanismus zu einem großen Teil aufklären.

Letzendlich bewirken, wie durch die Ergebnisse in Kap. 3.1 und 3.2 gezeigt, die niederfrequenten elektromagnetischen Felder zumindest eine verstärkte Expression der Koaktivatoren der Östrogenrezeptoren, wodurch partielle Östrogenrezeptorantagonisten eher proliferativ als antiproliferativ wirken. Diese Veränderung ist in Folge die Ursache für die Rechtsverschiebung der Dosis-Wirkungskurve von Tamoxifen.

Der veränderten Genexpression müssen auch Veränderungen in der Signaltransduktion zugrunde liegen, die die Genexpression steuern. Es konnte zwar eindeutig nachgewiesen werden, dass die MAP-Kinase Erk1 durch die elektromagnetischen Felder aktiviert wird, jedoch konnten die weiter stromaufwärts liegenden Signaltransduktionselemente noch nicht identifiziert werden.

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 $>0,1 \mu\text{T}$ abgeschwächt, bzw. die Dosiswirkungskurve derart nach rechts verschoben wird, dass anstatt einer Proliferationsinhibition in diesem Konzentrationsbereich eine maximale östrogenartige Proliferationssteigerung beobachtet wird. Dieser Effekt war bei 4-Hydroxy-Tamoxifen und ICI-182,780 nicht so stark ausgeprägt. ICI-182,780 besitzt jedoch auch einen völlig anderen Wirkmechanismus, es bewirkt einen schnelleren Abbau der Östrogenrezeptoren durch das Proteasom-System der Zellen. Dieses Proteasom-System wird offensichtlich von elektromagnetischen Feldern nicht beeinflusst.

Sollte die beobachteten Effekte auch in vivo auftreten, könnte dies u.U. bei Einwirkung von alltäglichen Umgebungsfeldern zu einer Abschwächung oder Verzögerung des Therapieerfolges führen.

Eine völlig neue Erkenntnis aus den Ergebnissen dieses Projektes ist die Tatsache, dass elektromagnetische Felder in Brustkrebszellen durch Veränderung der Genexpression einen Phänotyp auslösen können, der stärker zur **Metastasierung** führt. Da die Metastasierung der Brusttumore in starkem Maße für die Sterblichkeit der Brustkrebspatientinnen verantwortlich ist, sollte dieser Beobachtung in Zukunft eine stärkere Aufmerksamkeit und Forschungstätigkeit gewidmet werden.

4.6 Fortschritte auf dem Gebiet bei anderen Stellen

Zum Thema der biologischen Wirkung von elektromagnetischen Feldern sind im Förderungszeitraum von 2004 bis 2007 eine größere Anzahl von Untersuchungen in wissenschaftlichen Zeitschriften veröffentlicht worden. Auf dem Gebiet der Epidemiologie werden in erster Linie statistische Zusammenhänge zwischen der Häufigkeit des Auftretens von gesundheitlichen Beschwerden in Abhängigkeit und der Exposition mit elektromagnetischen Feldern untersucht.

Unter den Frauen, die täglich mehr als drei Stunden mit elektrischen Geräten arbeiten war die Häufigkeit von invasiven duktalem Mammakarzinomen signifikant höher als bei Frauen, die selten Elektrogeräte benutzten (Beniashvili et al., 2005). Beim Vergleich der elektromagnetischen Exposition von Frauen, die an Brustkrebs litten, mit zufällig ausgewählten gleichaltrigen Frauen, zeigte sich in einer amerikanischen Studie, dass Frauen, die an ihrem Arbeitsplatz lange, hohen Feldern ausgesetzt sind, das Risiko an Brustkrebs zu erkranken, leicht erhöht ist (Odd-Ratio: 1,16) (McElroy et al., 2007). In bestimmten Berufsgruppen war die Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken besonders deutlich erhöht. Bei Labortechnikern war die Odd-Ratio=9,9, bei Telefonoperatoren OR=4,6, bei der Lederverarbeitung OR=3,2 und bei Glassherstellern OD=2,1 (Gardner et al., 2002). Postmenopausale Frauen, die elektromagnetischen Feldern $>0,5 \mu\text{T}$ ausgesetzt waren, hatten eine um 13 % höhere Wahrscheinlichkeit an Brustkrebs zu erkranken, als Frauen, deren Exposition $<0,2\mu\text{T}$ war (Labreche et al., 2003; Kliukiene et al., 2004; Peplonska et al., 2007). Im Gegensatz dazu konnte in zwei schwedischen Untersuchungen kein statistischer Zusammenhang gefunden werden (Forssen et al., 2005; Feychting et al., 2006).

Bei den laborexperimentellen 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.

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. Bei einem 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 in früheren Untersuchungen die DMBA-Wirkung durch Magnetfelder verstärkt wurde (Fedrowitz et al., 2004). Inzwischen konnte ein neuer Rattenstamm identifiziert werden, der empfindlich auf elektromagnetische Felder reagiert. In Fischer 344 Ratten, die mit DMBA behandelt wurden, erhöhte sich die Inzidenz von Brusttumoren in einem Magnetfeld von 100 μ T nach 26 Wochen um 45 % (Fedrowitz et al., 2008).

Am häufigsten wurden in den letzten Jahren Untersuchungen veröffentlicht, die sich mit Veränderungen der Genexpression im Magnetfeld beschäftigten. Während der Laufzeit dieses Projekts erschien eine weitere Arbeit, die sich mit der Veränderung der Genexpression in der Brustkrebszelllinie MCF-7 durch elektromagnetische Felder beschäftigte. Durch 2-D-Elektrophorese von Proteinen aus MCF-7 Zellen, die 24 Stunden mit 0,4 μ T exponiert waren, wurden 19 Proteine nachgewiesen, die nur in den exponierten Zellen exprimiert wurden, 19 andere Proteine, die in den Kontrollzellen vorhanden waren, lagen in den exponierten Zellen unter der Nachweisgrenze. Bei sechs Proteinen waren die Veränderungen statistisch signifikant. Drei dieser Proteine konnten durch Massenspektroskopie identifiziert werden, die regulatorische Untereinheit eines RNA-bindenden Proteins, der Precursor der Typ 7 beta Untereinheit des Proteasomkomplexes und das translational kontrollierte Tumorprotein (Li et al., 2005). In Gliomazellen, die drei Stunden mit 1,2 μ T exponiert waren, war die Expression des Kalzium-bindenden Proteins P22, des Keratin 18 und der Creatinkinase B erhöht und die Expression von sieben anderen Proteinen reduziert, darunter das p59 Protein, das für den intrazellulären Transport von Steriodrezeptoren notwendig ist (Kanitz et al., 2007).

An menschlichen mesenchymalen Stammzellen, die fünfmal im Abstand von 12 Stunden für 8 Minuten einem gepulsten elektromagnetischen Feld ausgesetzt waren, konnte bei einer begrenzten Zahl von metabolischen Genen und Genen der Zellmatrix eine Veränderung der Genexpression nachgewiesen werden. Ein Anstieg krebsverwandter Gene wurde nach der Exposition nicht gefunden (Walther et al., 2007).

In Osteoblasten von Ratten, die einem gepulsten Magnetfeld ausgesetzt waren, konnte die Induktion der alkalischen Phosphatase durch das bone morphogenic Protein-2 (BMP-2) durch die Magnetfeldwirkung verstärkt werden (Selvamurugan et al., 2007). In Endothelzellen, die mit 10-30 μ T exponiert waren, konnten zwar in Einzelexperimenten Gene mittels Mikroarray identifiziert werden, deren Expression verändert war, doch keines dieser Gene war in Wiederholungsexperimenten in gleicher Weise verändert (Henderson et al., 2006). In neuronal differenzierten, embryonalen Stammzellen der Maus war die Expression der Apoptose-assoziierten Gene bcl-2 und GADD45 nach Exposition mit Magnetfeldern verändert (Nikolova et al., 2005).

Untersuchungen zur veränderten Signaltransduktion in Zellen, die mit einem Magnetfeld vom 100 μ T exponiert waren, zeigten in Leukämiezellen (HL60) und Brustkrebszellen (MCF-7) eine Erhöhung der MAP-Kinase Aktivität (Nie et al., 2003). In dieser Arbeit wurde nicht zwischen Erk1 und Erk2 unterschieden. In Kap. 3.4 konnten wir zeigen, dass in MCF-7 Zellen nur Erk1 verstärkt phosphoryliert wird.

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 μ 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). In menschlichen Monozyten, die über Nacht mit 1 mT exponiert waren, war die induzierbare Stickstoffoxidsynthase (iNOS) auf RNA und Proteinebene herunterreguliert und das Monozyten chemotaktische Protein-1 (MCP-1) hochreguliert (Reale et al., 2006).

Über Veränderungen der Fähigkeit von Tumorzellen zu metastasieren, die durch elektromagnetische Felder ausgelöst werden, gibt es bisher nur wenige Berichte. An Spheroïden der Osteosarcoma-Zelllinie MG-63 konnte gezeigt werden, dass das invasive Potential der Tumorzellen durch Exposition der Spheroïde mit 1mT eines 50 Hz Wechselfeldes erhöht wird. In den exponierten Zellen war die Expression der ECM-

Komponente Fibronectin und des Oberflächenrezeptors CD44 verändert (Santini et al., 2006).

Die zahlreichen wissenschaftlichen Arbeiten zeigen deutlich, dass elektromagnetische Felder in verschiedenen Geweben Veränderungen der Genexpression und der Signaltransduktion hervorrufen können. Das Forschungsgebiet der biologischen Einflüsse von elektromagnetischen Feldern bleibt damit von großem Interesse, sowohl was die Mechanismen betrifft, als auch die Auswirkungen auf den menschlichen Körper.

4.7 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Untersuchungen zur Beeinflussung der Genexpression durch elektromagnetische Felder haben gezeigt, dass eine ansehnliche Zahl von Genen beeinflusst wird, die als Ursache für ein verändertes Wachstumsverhalten der Brustkrebszellen im Magnetfeld verantwortlich sein können. Es ist nachvollziehbar, dass die erhöhte Expression der Koaktivatoren und die Abschwächung der Korepressoren die Effizienz der antiöstrogenen Krebsmedikamente reduziert, was im Extremfall zu einer Resistenz führen würde, ähnlich der im klinischen Alltag beobachteten Tamoxifenresistenz. Ein weiterer klinisch interessanter Aspekt der Genexpressionsmessungen im Magnetfeld ist die veränderte Expression einer Vielzahl von Genen, die für die Metastasenbildung notwendig sind. Die Entstehung von Metastasen ist bei den meisten Tumoren die Hauptursache für die Sterblichkeit der Patienten und trägt sehr stark zur Schwere der Erkrankung bei. Dieser neue Aspekt der Feldwirkung auf Brustkrebszellen sollte in Zukunft unbedingt weiterverfolgt werden. Die Aufklärung des molekularen Mechanismus der Feldwirkung könnte die Grundlage für eventuell notwendige Schutzmaßnahmen liefern.

Mit den in diesem Projekt verwendeten 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. Diese Inkubatoren sollen für weitere Untersuchungen zur Wirkung von Magnetfeldern auf Zellkulturen verwendet 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

μT bis $> 2 \mu\text{T}$. Da unter den routinemäßigen Inkubationsbedingungen relevante Genmodulationen nachgewiesen werden konnten, wäre die Konstruktion und Herstellung von Abschirmeinrichtungen gegenüber magnetischen Wechselfeldern oder die Neuentwicklung neuer feldarmer Inkubatoren für Gewebebehandlungen eine kommerziell verwertbare Anwendung der hier gewonnenen Erkenntnisse. Zur Vermeidung von durch elektromagnetische Felder ausgelösten Artefakten kann von einem sehr großen Nach- oder Umrüstungsbedarf in verschiedenen Laboratorien ausgegangen werden.

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

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.

Bass R, Werner F, Odintsova E, Sugiura T, Berditchevski F, Ellis V. (2005)
Regulation of urokinase receptor proteolytic function by the tetraspanin CD82.
J. Biol. Chem. 280, 14811-14818

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.

Beniashvili D, Avinoach I, Baazov D, Zusman I. (2005)
Household electromagnetic fields and breast cancer in elderly women.
In vivo 19, 563-566.

Berberich SJ und Postel EH. (1995)
PuF/NM23-H2/NDPK-B transactivates a human c-myc promoter-CAT gene via a functional nuclease hypersensitive element.
Oncogene 10, 2343-2347

- 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 μ T, 60Hz magnetic fields on Melatonin and Tamoxifen-induced inhibition of MCF-7 cell growth.
Bioelectromagnetics 22,122-128
- Carlberg C, Wiesenberg I. (1995)
The orphan receptor family RZR/ROR, melatonin and 5-lipoxygenase: An unexpected relationship.
J. Pineal Res. 18, 171-178
- Cini G, Neri B, Pacini A, Cesati V, Sassoli C, Quattrone S, D'Apolito M, Fazio A, Scapagnini G, Provenzani A, Quattrone A. (2005)
Antiproliferative activity of melatonin by transcriptional inhibition of cyclin D1 expression: a molecular basis for melatonin-induced oncostatic effects.
J. Pineal Res. 39,12-20
- 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
- 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
- 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, 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
- Fedrowitz M, Löscher W. (2008)
Exposure of Fischer 344 rats to a weak power frequency magnetic field facilitates mammary tumorigenesis in the DMBA model of breast cancer.
Carcinogenesis 29, 186-193

- Feychting M, Forssen U. (2006)
Electromagnetic fields and female breast cancer.
Cancer Causes Control 17, 553-558
- Fleming FJ, Hill AD, McDermott EW, O'Higgins NJ, Young LS. (2004)
Differential recruitment of coregulator proteins steroid receptor coactivator-1 and silencing mediator for retinoid and thyroid receptors to the estrogen receptor-estrogen response element by beta-estradiol and 4-hydroxytamoxifen in human breast cancer.
J. Clin. Endocrinol. Metab. 89, 375-383
- Foekens JA, Peters HA, Look MP, Portengen H, Schmitt M, Kramer MD, et al. (2000)
The urokinase system of plasminogen activation and prognosis in 2780 breast cancer patients.
Cancer Res. 60, 636-643
- Forssen UM, Rutqvist LE, Ahlbom A, Feychting M. (2005)
Occupational magnetic fields and female breast cancer: A case-control study using Swedish population registers and new exposure data.
Am. J. Epidemiol. 161, 251-259
- Gardner KM, Shu XO, Jin F, Dai Q, Ruan Z, Thompson SJ, Hussey JR, Gao YT, Zheng W. (2002)
Occupations and breast cancer risk among Chinese women in urban Shanghai.
Am. J. Ind. Med. 42, 296-308
- Girault I, Lerebours F, Amarir S, Tozlu S, Tubiana-Hulin M, Lidereau R et al. (2003)
Expression analysis of estrogen receptor alpha coregulators in breast carcinoma: evidence that NCOR1 expression is predictive of the response to tamoxifen
Clin. Cancer Res. 9, 1259-1266
- 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
- Girgert R, Schimming H, Körner W, Gründker C, Hanf V. (2005)
Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by ELF electromagnetic fields.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 336, 1144-1149
- 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

Harbeck N, Kates RE, Schmitt M, Gauger K, Kiechle M, Jänicke F, et al. (2004)

Urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor type 1 predict disease outcome and therapy response in primary breast cancer.
Clin. Breast Cancer 5, 348-352

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

Henderson B, Kind M, Boeck G, Helmberg A, Wick G. (2006)

Gene expression profiling of human endothelial cells exposed to 50-Hz magnetic fields fails to produce regulated candidate genes.
Cell Stress Chaperones 11, 227-232

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

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 μ T as well as 100 μ T cause uncoupling of inhibitory pathways of adenylyl cyclase mediated by melatonin 1a receptor in MF-sensitive MCF-7 cells.
Carcinogenesis 22, 1043-1048

Kanitz MH, Witzmann FA, Lotz WG, Conover D, Savage RE. (2007)

Investigation of protein expression in magnetic field-treated human glioma cells.
Bioelectromagnetics 28, 546-552

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, Kempter 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

Kumar V & Chambon P. (1988)

The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer.
Cell 55, 145-156

Kurebayashi J, Otsuki T, Kunisue H, Tanaka K, Yamamoto S, Sonoo H. (2000)
Expression levels of estrogen receptor-alpha, estrogen receptor-beta, coactivators,
and corepressors in breast cancer.
Clin. Cancer Res. 6, 512-518

Labreche F, Goldberg MS, Valois M-F, Nadon L, Richardson L, Lakhani R, Latreille B.
(2003)
Occupational exposures to extremely low frequency magnetic fields and postmeno-
pausal breast cancer.
Am. J. Ind. Med. 44, 643-652

Lai H und Singh NP. (2004)
Magnetic-field-induced DNA strand breaks in brain cells of the rat.
Environ Health Perspect. 112, 687-694

Lavinsky RM, Jepsen K, Heinzl T, Torchia J, Mullen TM, Schiff R et al. (1998)
Diverse signaling pathways modulate nuclear receptor recruitment of N-CoR and
SMRT complexes.
Proc. Natl. Acad. Sci. 95, 2920-2925

Lee JH und Welch DR. (1997)
Suppression of metastasis in human breast carcinoma MDA-MB-435 cells after trans-
fection with the metastasis suppressor gene, KiSS-1.
Cancer Res. 57. 2384-2387

Leone A, Flatow U, vanHoutte K, Steeg PS. (1993)
Transfection of human nm23-H1 into the human MDA-MB-435 breast carcinoma cell
line: effects on tumor metastatic potential, colonization and enzymatic activity.
Oncogene 8, 2325-2333

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

Li H, Zeng Q, Weng Y, Jiang H, Xu Z. (2005)
Effects of ELF magnetic fields on protein expression profile of human breast cancer
cell MCF-7.
Sci. China C. Life Sci. 48 506-514

Liburdy RP, Sloma TR, Sokolic R, Yaswen P. (1993)
ELF magnetic fields, breast cancer, and melatonin: 60 Hz fields block melatonin's on-
costatic 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

Lindstöm 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

Litovitz TA, Montrose CJ, Wang W. (1992)
Dose-response implications of the transient nature of electromagnetic field induced bioeffects.
Bioelectromagnetics Suppl 1, 237-246

McElroy JA, Egan KM, Titus-Ernstoff L, Anderson HA, Trentham-Dietz A, Hampton JM, Newcomb PA. (2007)
Occupational exposure to electromagnetic field and breast cancer risk in a large, population-based, case-control study in the United States.
J. Occup. Environ Med. 49, 266-274

Mediavilla MD, Cos S, Sánchez-Barceló EJ. (1999)
Melatonin increases p53 and p21WAF1 expression in MCF-7 human breast cancer cells in vitro.
Life Sci. 65, 415-420

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

Nie K, Henderson A. (2003)
MAP kinase activation in cells exposed to a 60 Hz electromagnetic field.
J. Cell Biochem. 90, 1197-1206

Nikolova T, Czyz J, Rolletschek A, Blyszczuk P, Fuchs J, Jovtchev G, Schuderer J, Kuster N, Wobus AM. (2005)
Electromagnetic fields affect transcript levels of apoptosis-related genes in embryonic stem cell-derived neural progenitor cells.
FASEB J. 19, 1686-1688

Nugoli M, Chuchana P, Vendrell J, Orsetti B, Ursule L, Nguyen C, et al. (2003)
Genetic variability in MCF-7 sublines: evidence of rapid genomic and RNA expression profile modifications.
BMC Cancer 3, 13-19

Osborne CK, Hobbs K, Trent JM. (1987)
Biological differences among MCF-7 human breast cancer cell lines from different laboratories.
Breast Cancer Res. Treat. 9, 111-121.

Osborne CK. (1998)
Tamoxifen in the treatment of breast cancer.
N. Engl. J. Med. 339, 1609-1618

Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, Chamness GC, Hilsenbeck SG, Fuqua SA et al. (2003)

Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer.

J. Natl. Cancer Inst. 95, 353-361

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

Paravicini G, Steinmayr M, André E, Becker-André M. (1996)

The metastasis suppressor candidate nucleotide diphosphate kinase nm23 specifically interacts with members of the ROR/RZR nuclear orphan receptor subfamily. Biochem. Biophys. Res. Comm. 227, 82-87

Peplonska B, Stewart P, Szeszenia-Dabrowska N, Rusiecki J, Garcia-Closas M, Lisowska J, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Gromiec J, Brzeznicki S, Brinton LA, Blair A. (2007)

Occupation and breast cancer risk in polish women: A population based case-control study.

Am. J. Ind. Med. 50, 97-111

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

Reale M, DeLutiis MA, Patruno A, Speranza L, Felaco M, Grilli A, Macri MA, Comani S, Conti P, DiLuzio S. (2006)

Modulation of MCP-1 and iNOS by 50-Hz sinusoidal electromagnetic field.

Nitric Oxide 15, 50-57

Reppert SM, Weaver DR. (1995)

Melatonin madness.

Cell 83, 1059-1062.

Santini MT, Rainaldi G, Ferrante A, Indovina P, Donelli G, Indovina PL. (2006)

A 50 Hz sinusoidal magnetic field does not damage MG-63 three-dimensional tumor spheroids but induces changes in their invasive properties.

Bioelectromagnetics. 27, 132-141

Schrohl AS, Holten-Andersen MN, Peters HA, Look MP, Meijer-vanGelder ME, Klijn JGM, Brünneer N, Foekens JA. (2004)

Tumor tissue levels of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 as a prognostic marker in primary breast cancer.

Clin. Cancer Res. 10, 2289-2298

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

Selvamurugan N, Kwok S, Vasilov A, Jefcoat SC, Partridge NC. (2007)
Effects of BMP-2 and pulsed electromagnetic field (PEMF) on rat primary osteoblastic cell proliferation and gene expression.
J. Orthop. Res. 25 1213-1220

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

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

Steeg PS. (2006)
Tumor metastasis: mechanistic insights and clinical challenges.
Nat. Med. 12, 895-904.

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.

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

Walther M, Mayer F, Kafka W, Schütze N. (2007)
Effects of weak, low-frequency pulsed electromagnetic fields (BEMER type) on gene expression of human mesenchymal stem cells and chondrocytes: an in vitro study.

Electromagn. Biol. Med. 26, 179-190

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

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

Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. (1999)
Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function.
Curr.Opin.Genet.Dev. 9,140-147

Yan C, Wang H, Boyd DD. (2001)
Kiss-1 represses 92-kDA Type IV collagenase expression by down-regulating NF- κ B binding to the promoter as a consequence of I- κ B α -induced block of p65/p50 nuclear translocation.
J. Biol. Chem. 276, 1164-1172

Yang X, Wei LL, Tang C, Slack R, Mueller S, Lippman ME. (2001)
Overexpression of KAI1 suppresses in vitro invasiveness and in vivo metastasis in breast cancer cells.
Cancer Res. 61, 5284-5288

Yost MG und Liburdy RP. (1992)
Time-varying and static magnetic fields act in combination to alter calcium signal transduction in the lymphocyte.
FEBS Lett. 296, 117-122

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

Zhao H, Jhanwar-Uniyal M, Datta PK, Yemul S, Khitrow G, Kuperschmidt I, Pasinetti GM, Ray T, Athwal RS, Achary MP. (2004)
Expression profile of genes associated with antimetastatic gene: nm23-mediated metastasis inhibition in breast carcinoma cells.
Int. J. Cancer 109, 65-70

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

5.1 Veröffentlichungen aus dem Projekt

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V.
Exposure of MCF-7 breast cancer cells to electromagnetic fields upregulates the plasminogen-activator system.
Manuskript zur Veröffentlichung eingereicht

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V. (2008)
Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by electromagnetic fields depends on altered expression of estrogen receptor cofactors
Bioelectromagnetics 29 169-176 (2008)

Girgert R., Hanf V., Emons G., Gründker C. (2007)
Effect of electromagnetic fields on the activity of MAP-Kinase in breast cancer cells
Geburtsh. Frauenheilk. 67 913

Girgert R., Emons G., Hanf V., Gründker C. (2007)
GnRH agonist Triptorelin reverts increased expression of the cofactors AIB1 and SRC-1 in breast cancer cells.
Exp. Clin. Endocrin. Diabetes 115 Suppl.1, S74-S75

Girgert R., Gründker C., Hanf V., Emons G. (2006)
Niederfrequente Magnetfelder verändern das Expressionsmuster von Metastase-assoziierten Genen in Brustkrebszellen.
Geburtsh. Frauenheilk. 66 Suppl.1 50

Girgert R., Schimming H., Körner W., Gründker C., Hanf V. (2005)
Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by ELF electromagnetic fields
Biochem. Biophys. Res. Commun. 336 1144-1149

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V. (2005)
Differential gene expression in breast cancer cells exposed to low-frequency magnetic fields.
Zentralblatt Gynäkologie 127, 257

Nicht veröffentlichte Vorträge

Girgert R., Gründker C., Hanf V., Emons G. (2007)
Niederfrequente Magnetfelder verändern das Expressionsmuster von Metastase-assoziierten Genen in Brustkrebszellen.
2. Wissenschaftliches Symposium der Kommission translationale Forschung, Bergisch-Gladbach

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V. (2006)
Induction of tamoxifen resistance in breast cancer cells by electromagnetic fields depends on altered expression of estrogen receptor cofactors.
23. Jahrestagung der Bioelektromagnetischen Gesellschaft, Cancun, Mexiko

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V. (2006)

Die Exposition von Brustkrebszellen mit elektromagnetischen Feldern verändert die Genexpression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren

27. Deutscher Krebskongress, Berlin

Girgert R., Gründker C., Emons G., Hanf V. (2005)

Differential gene expression in breast cancer cells exposed to lowfrequency magnetic fields.

Wissenschaftliches Symposium der Kommission translationale Forschung, Heidelberg

6. Verzeichnis der Tabellen und Abbildungen

Tabellen:

Tabelle 1: Liste der verwendeten Primer

Tabelle 2: Erhöhung der Expression in den exponierten p40 Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Tabelle 3: Abnahme der Expression in den exponierten p40-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Tabelle 4: Erhöhung der Expression in den exponierten p181-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Tabelle 5: Verringerung der Expression in den exponierten p181-Zellen relativ zur Expression in den nicht-exponierten Zellen

Tabelle 6: Veränderung der Expression einiger ausgewählter Gene des Brustkrebs-Arrays in der Zelllinie MCF-7 p40

Tabelle 7: Veränderung der Expression der ausgewählten Gene des Brustkrebs-Arrays in der Zelllinie MCF-7 p181

Tabelle 8: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p40

Tabelle 9: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p181 nach Behandlung mit 1,2 μ T

Tabelle 10: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p40 nach Behandlung mit 100 μ T

Tabelle 11: Veränderung der Expression der Kofaktoren der Östrogenrezeptoren in der Zelllinie MCF-7 p181 nach Behandlung mit 100 μ T

Tabelle 12: Relative Veränderung der Proteinexpression der Kofaktoren SRC-1, AIB1 und N-CoR durch Exposition mit 1,2 μ T.

Tabelle 13: Densitometrische Quantifizierung der Expression der Gene des Plasminogen-Aktivator-Systems nach Exposition mit 1,2 μ T

Tabelle 14: Densitometrische Quantifizierung der Expression der Metastase-Suppressorgene nach Exposition mit 1,2 μ T

Tabelle 15: Densitometrische Auswertung der RT-PCR Produkte von RZR α und MT1 in den sechs Brustkrebszelllinien nach Exposition mit 1,2 μ T für 24 Stunden und 48 Stunden

Tabelle 16 : Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Melatonin-regulierten Genen in der Zelllinie MCU-1

Tabelle 17 : Einfluss von elektromagnetischen Feldern auf die Expression von Melatonin-regulierten Genen in der Zelllinie MCF-7Mel1a

Tabelle 18: Veränderung der EC₅₀-Werte von Östradiol durch Melatonin in der Brustkrebszelllinie MCU-1 bei verschiedenen Magnetfeldstärken

Tabelle 19: IC₅₀ von 4-Hydroxytamoxifen in MCF-7 Zellen unter Magnetfeldexposition

Tabelle 20: IC₅₀ von ICI-182,780 in MCF-7 Zellen unter Magnetfeldexposition

Abbildungen:

Abb. 1: Western Blots der Kofaktoren SRC-1, AIB1 und N-Cor in den MCF-7 p181 Zellen nach Exposition mit 1,2 μ T

Abb. 2: Einfluss des Magnetfeldes auf die Expression des Plasminogen-Aktivator-System

Abb. 3: Einfluss des Magnetfeldes auf die Expression vom Metastase-Suppressorgenen in den MCF-7 p181-Zellen

Abb. 4: Detektion der MAP-Kinasen Erk-1 und Erk-2 auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

Abb. 5: Erk-1 Aktivität nach Magnetfeldexposition

Abb. 6: Erk-2 Aktivität nach Magnetfeldexposition

Abb. 7: Detektion der Stress-aktivierten Kinase junK auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

Abb. 8: Jun-Kinase Aktivität nach Magnetfeldexposition

Abb. 9: Detektion der Stress-aktivierten Kinase p38 auf Western-Blots nach Magnetfeldexposition

Abb. 10: p38-Aktivität nach Magnetfeldexposition

Abb. 11: Expression der Rezeptoren für Östradiol (ER α) und des nukleären Rezeptors (RZR α) und des membranständigen Rezeptors (MT1) für Melatonin in den sechs untersuchten Brustkrebszelllinien

Abb. 12: Veränderung der Expression des nukleären Rezeptors RZR α und des membranständigen Rezeptors MT1 für Melatonin im Magnetfeld

Abb. 13: Repräsentatives Ergebnis eines Gel-Shift-Experiments mit den MCF-7Me1a Zellen

Abb. 14: Hemmkinetik von 4-Hydroxy-Tamoxifen in MCF-7p181-Zellen

| 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

E-Mail: ePost@bfs.de

Gedruckt auf Recyclingpapier aus 100 % Altpapier.



Bundesamt für Strahlenschutz