

Reorganisation von Adherens Junctions als Endpunkt zur Identifizierung östrogenen Substanzen

Marja Kornhuber, Saskia Klutzny, Sebastian Dunst, Michael Oelgeschläger, Gilbert Schönfelder

Die Vermeidung unerwünschter gesundheitlicher Auswirkungen, die durch die Existenz hormonähnlich wirkender Substanzen (sogenannte Endokrine Disruptoren (ED)) in der Umwelt, in Lebensmitteln oder Konsumgütern verursacht werden können, ist von großer Bedeutung. Deshalb unterliegt die Herstellung und Vermarktung von EDs weltweit spezifischen und restriktiven Vorschriften. Die Identifizierung und Charakterisierung von EDs, wie beispielsweise von östrogenartig wirkenden Substanzen, erfordert derzeit häufig noch die Nutzung von Versuchstieren, da die meisten verfügbaren alternativen Testmethoden nur bestimmte mechanistische Ereignisse endokriner Aktivität abbilden.

Aus diesem Grund ist es wichtig, neue *in-vitro* Methoden mit funktionellen Endpunkten zu entwickeln, mit denen beispielsweise der Einfluss von Chemikalien auf die hormonabhängige Tumorbildung oder -progression untersucht werden kann. In unserem Zellkulturmodell haben wir festgestellt, dass der Östrogensignalweg die Organisation von Zell-Zell-Kontakten, den sogenannten Adherens Junctions (AJ), in menschlichen Brustkrebszellen beeinflusst. Die Hemmung dieses Signalweges, beispielsweise durch Behandlung mit Antiöstrogenen, führte zu einer Änderung der Verteilung des AJ Proteins E-Cadherin in der Zellmembran sowie zu einer deutlichen Reorganisation von AJs. Das Auftreten dieses Effektes korrelierte zudem mit einer Abnahme der Zellmotilität sowie einer Zunahme der Zelladhäsion und Zellsteifheit. Da diese Parameter auch häufig mit der Entwicklung von Brustkrebs in Verbindung gebracht werden, weist die östrogenabhängige Veränderung der AJs möglicherweise auch auf eine klinische Bedeutung hin.

Basierend auf diesen Erkenntnissen haben wir einen robusten High-Content-Screening-Assay entwickelt, der unter Verwendung von AJ-Reorganisation als funktionellem Endpunkt die Identifizierung östrogenartig wirkender Chemikalien ermöglicht. In diesem Assay wird eine humane Brustkrebszelllinie zusammen mit dem Antiöstrogen Fulvestrant und verschiedenen Konzentrationen der Testsubstanz behandelt, wobei eine dosisabhängige Verhinderung der AJ-Reorganisation auf eine östrogene Aktivität der Testsubstanz hinweist. Im Rahmen der Entwicklung des Assays konnte bereits die relative Aktivität von 17 Referenzsubstanzen korrekt bestimmt werden, was die hohe Aussagekraft des gewählten Endpunkts verdeutlicht. Während der folgenden Automatisierungsphase wurde der Assay für die Anwendung im Hochdurchsatzverfahren weiter optimiert und schließlich zum Screening einer Chemikalien-Bibliothek mit 440 toxikologisch relevanten Substanzen verwendet. Dabei wurden 22

östrogenartig wirkende Chemikalien identifiziert, deren EC50-Werte sehr gut mit den Ergebnissen des „Endocrine Disruptor Screening Program“ der US-amerikanischen Umweltschutzbehörde (EPA) korrelierten. Darüber hinaus wurden 10 weitere Chemikalien identifiziert, für die bislang noch keine östrogenartige Wirkung nachgewiesen wurde.

In dieser Studie wurde somit ein neuartiger robuster und vor allem prädiktiver Screening-Assay zur Identifizierung und Charakterisierung von Chemikalien mit östrogenartiger Wirkung entwickelt, der auf einem funktionellen und möglicherweise klinisch relevanten Endpunkt beruht.