

**Einfluss des Metabolismus auf die
hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität
von endokrinen Disruptoren an
ausgewählten Beispielen**

**Vom Fachbereich Chemie
der Universität Kaiserslautern
zur Verleihung des akademischen Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“
genehmigte Dissertation
(D 386)**

**vorgelegt von
Diplom-Lebensmittelchemikerin
Anette Höll**

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 2002

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 16. Dezember 2002

Prüfungskommission:

Vorsitzender	Prof. Dr. E. Vilsmaier
1. Berichterstatter	Prof. Dr. G. Eisenbrand
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Dr. D. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Mai 2000 und Juni 2002 im Fachbereich Chemie, Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie der Universität Kaiserslautern.

Herrn Prof. Dr. G. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des Themas sowie für seine Anregungen und wohlwollende Unterstützung während der Promotionszeit.

Herrn Prof. Dr. Dr. D. Schrenk danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Bei Herrn Prof. Dr. E. Vilsmaier möchte ich mich für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes bedanken.

***In der Wissenschaft gleichen wir alle nur den Kindern,
die am Rande des Wissens hier und da einen Kiesel aufheben,
während sich der weite Ozean des Unbekannten
vor unseren Augen erstreckt.***

Sir Isaac Newton (1643 - 1727), englischer Mathematiker, Physiker und Astronom

Meinen Lieben

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN.....	4
2.1	Metabolismus.....	4
2.2	Hormonelle Signalübertragung.....	7
2.2.1	Steroidhormonrezeptoren.....	7
2.2.1.1	Estrogenrezeptoren.....	8
2.2.1.2	Androgenrezeptor.....	9
2.2.2	Mechanismus der Signalübertragung.....	9
2.3	Estrogenrezeptorliganden.....	12
2.3.1	Strukturelle Betrachtungen.....	12
2.3.2	Physiologische Estrogene.....	15
2.3.2.1	Funktion.....	15
2.3.2.2	Biosynthese.....	16
2.3.2.3	Metabolismus und hormonelle Aktivität.....	17
2.3.3	Einfluss des Metabolismus an ausgewählten Beispielen.....	19
2.3.3.1	Methoxychlor.....	19
2.3.3.2	Polychlorierte Biphenyle (PCB).....	21
2.3.3.3	Chrysen.....	22
2.3.4	Antiestrogene.....	24
2.4	Androgenrezeptorliganden.....	26
2.4.1	Androgene.....	26
2.4.1.1	Funktion.....	26
2.4.1.2	Biosynthese.....	27
2.4.1.3	Metabolismus und hormonelle Aktivität.....	27
2.4.2	Antiandrogene.....	30
2.4.2.1	Dicofol.....	32
2.4.2.2	Linuron.....	35
2.4.2.3	Strukturelle Betrachtungen.....	37

2.4.2.4	Xanthohumol	38
2.5	Testmethoden.....	41
2.5.1	<i>In vivo</i> Modelle	41
2.5.2	<i>In vitro</i> Modelle.....	42
2.5.2.1	Reportergerverfahren	43
2.5.2.1.1	MCF-7-Luc-Testsystem	45
2.5.2.1.2	Hefe-ER-Testsystem	46
2.5.2.1.3	COS-AR-Luc-Testsystem	46
2.5.2.1.4	Hefe-AR-Testsystem	47
2.5.2.2	Diskussion der Reportergerysteme.....	47
2.5.2.3	Auswerteverfahren	51
2.5.2.4	Weiterentwicklung der etablierten Reportergerysteme hinsichtlich metabolischer Kompetenz	54
3	PROBLEMSTELLUNG	56
4	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	58
4.1	Dicofol und seine Umwandlungsprodukte.....	58
4.1.1	Untersuchungen zum Abbau von Dicofol.....	58
4.1.1.1	Methodenentwicklung zur chromatographischen Trennung von Dicofol und seinen Degradationsprodukten	58
4.1.1.2	Charakterisierung des kommerziell erhältlichen Dicofol	58
4.1.1.3	Herstellung der Lebermikrosomen	62
4.1.1.4	<i>In vitro</i> Untersuchungen zum Metabolismus von Dicofol.....	63
4.1.1.5	<i>In vitro</i> Untersuchungen zum Metabolismus von DCBP	67
4.1.1.6	Inkubation von Dicofol in alkalischen Lösungen	69
4.1.1.7	Chloroformbestimmung durch Headspace GC beim Dicofolabbau unter alkalischen Bedingungen.....	70
4.1.1.8	Abbau von Dicofol in den Inkubationsmedien der Transaktivierungssysteme.....	76
4.1.1.9	Bestrahlung mit UV-Licht.....	79
4.1.2	Untersuchungen auf endokrine Aktivität	80
4.1.2.1	Validierung der verwendeten Testsysteme	80

4.1.2.1.1	MCF-7-Luc-Testsystem	80
4.1.2.1.2	Hefe-ER-Testsystem	81
4.1.2.1.3	COS-AR-Luc-Testsystem	83
4.1.2.1.4	Hefe-AR-Testsystem	84
4.1.2.2	Untersuchung auf estrogenen Aktivität.....	85
4.1.2.2.1	Dicofol.....	85
4.1.2.2.2	DCBP und DCBH	89
4.1.2.3	Untersuchung auf androgene und antiandrogene Aktivität.....	91
4.1.2.3.1	DCBP.....	91
4.1.2.3.2	Dicofol und DCBH	93
4.1.3	Zusammenfassung und Diskussion	97
4.1.3.1	Abbau von Dicofol	97
4.1.3.2	Analytik von Dicofol	98
4.1.3.3	Verhalten der o,p'-Isomere.....	99
4.1.3.4	Dicofolbelastung der Bevölkerung über die Nahrung	99
4.1.3.5	Belastung der Umwelt	101
4.1.3.6	Endokrine Aktivität.....	101
4.2	Untersuchung von Linuron und einigen Metaboliten auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität	102
4.2.1	Linuron.....	104
4.2.2	Linuron M2.....	107
4.2.3	Linuron M1	109
4.2.4	3,4-Dichloranilin	112
4.2.5	Zusammenfassung und Diskussion	115
4.3	Untersuchung von Xanthohumol auf hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität	116
4.3.1	Bestimmung der Cytotoxizität von Xanthohumol unter Inkubationsbedingungen in MCF-7-Luc-Zellen	116
4.3.2	Untersuchung auf estrogenen bzw. antiestrogenen Aktivität	118
4.3.3	Untersuchung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität.....	121
4.3.4	Zusammenfassung und Diskussion	125
4.4	Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur antiandrogenen Aktivität	126

5	ZUSAMMENFASSUNG	131
6	MATERIAL UND METHODEN.....	134
6.1	Zellkultur.....	134
6.2	Trypanblauausschluss	137
6.3	Sulforhodamin B-Test.....	137
6.4	Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen.....	138
6.5	Reportergensysteme	139
6.5.1	Elektroporation.....	139
6.5.2	Luciferase-Reportergenassay	140
6.5.3	Hefe-Reportergentestsysteme	142
6.6	Amplifikation von Plasmiden	144
6.6.1	Anlegen eines Glycerolstocks	144
6.6.2	Herstellung kompetenter <i>Escherichia coli</i> und Transformation	144
6.6.3	Minipräparation von Plasmiden.....	146
6.6.4	Maxipräparation von Plasmiden.....	147
6.6.5	Restriktionsverdau	149
6.6.6	Gelelektrophorese.....	149
6.6.7	Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren	151
6.7	Lebermikrosomen.....	151
6.7.1	Herstellung von Schweine- und Rinderlebermikrosomen	151
6.7.2	Herstellung von Rattenlebermikrosomen (induziert)	152
6.7.3	Bestimmung des Proteingehalts von Lebermikrosomen	152
6.7.4	Bestimmung des Cytochrom P450- und Cytochrom b ₅ -Gehalts in Lebermikrosomen	153
6.7.5	Inkubation der Mikrosomen mit Dicofol bzw. DCBP.....	155
6.8	UV-Bestrahlung von Dicofol.....	157
6.9	Umwandlung von Dicofol in Gegenwart unterschiedlicher Hydroxidionenkonzentration.....	157

6.10	Untersuchung der Umwandlung von Dicofol in CDFKS- und Hefemedium.....	158
6.11	HPLC-Analyse	158
6.12	Headspace-GC zur Chloroformbestimmung.....	160
6.12.1	Fehlerfortpflanzung	161
7	LITERATUR.....	165
8	ANHANG	181
8.1	Nachweisgrenzen der HPLC-UV-Methode	181
8.2	Inkubation von Lebermikrosomen mit Dicofol	182
8.2.1	Berechnung der Aktivierungsenergie	183
8.3	Inkubation von Lebermikrosomen mit DCBP	184
8.4	Umwandlung von Dicofol in Gegenwart von Hydroxidionen	185
8.5	Chloroformbestimmung Headspace-GC.....	186
8.5.1	Stabilität von Chloroform in alkalischer Lösung	186
8.5.2	Standardadditionsverfahren zur Bestimmung von Chloroform.....	187
8.6	Inkubation von CDFKS- bzw. Hefewachstums-Medium mit Dicofol ..	187
8.7	UV-Bestrahlung von Dicofol.....	189
8.8	Ergebnisse des Hefe-ER-Testsystems	190
8.9	Ergebnisse des Hefe-AR-Testsystems.....	193
8.10	Ergebnisse des MCF-7-Luc-Testsystems	202
8.11	Ergebnisse des COS-AR-Luc-Testsystems	205

Glossar

ADI	Acceptable Daily Intake (Duldbare Tägliche Aufnahme)
AF	Aktivierungsfunktion
AhR	Aryl Hydrocarbon Receptor
AR	Androgenrezeptor
ARA ₇₀	AR-assoziiertes Protein 70
ATP	Adenosintriphosphat
BBP	Butylbenzylphthalat
BCA	Bicinchonic-Acid
BHA	t-Butylhydroxyanisol
BgVV	Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin
bp	Basenpaare
CCLTOP	Catalogue of Cell Lines in Toxicology and Pharmacology
CDFKS	Charcoal Dextran FKS
cDNA	komplementäre DNA
CoA	Coenzym A
d	Duplett
Da	Dalton
DAPI	4',6-Diamin-2'-phenylindol-dihydrochlorid
DBD	DNA Bindende Domäne
DCA	3,4-Dichloranilin
DCBH	4,4'-Dichlorbenzhydrol
DCBP	4,4'-Dichlorbenzophenon
DDA	2,2-Bis-(p-chlorphenyl)-essigsäure
DDD	1,1-Dichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethan
DDE	1,1-Dichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethen
DDT	1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethan
DEAE-Dextran	Diethylaminoethyl-dextran
DES	Diethylstilbestrol
DHT	5 α -Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dicofol	1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethan-2-ol
DTA	Duldbare Tägliche Aufnahme
E ₂	17 β -Estradiol
EC ₅₀	Konzentration bei der 50% der maximalen Wirkung erreicht ist
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EDSTAC	Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
ER	Estrogenrezeptor
ERE	Estrogen Responsives Element
FDA	Food and Drug Administration
FKS	Fötales Kälber Serum
GRIP1	Glucocorticoidrezeptor-interagierendes Protein 1
HBD	Hormon Bindende Domäne

GLOSSAR

HPLC	Hochdruckflüssigkeitschromatographie
HPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HRE	Hormon Responsives Element
Hsp	heat shock protein
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
kb	Kilobasen
Linuron	N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methyl-N'-methoxyharnstoff
Linuron M1	N-3,4-Dichlorphenyl-harnstoff
Linuron M2	N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methyl-harnstoff
log P _{ow}	Oktanol-Wasser-Koeffizient
Luc	Luciferase
m	Multipllett
MMTV	Mouse Mammary Tumor Virus
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
NOAEL	non observed adverse effect level
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development
PAK	Polyzyklische aromatische Kohlenwasserstoffe
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCB	Polychlorierte Biphenyle
pK _s	Säurekonstante
PSA	Prostate Specific Antigen
RBA	relative Bindungsaffinität
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Singulett
SERM	Selective Estrogen Receptor Modulator
SRC1	Steroidrezeptorkoaktivator 1
SRE	Steroidhormon Responsives Element
SV 40	Simian Virus 40
TAF	Transcription Activation Function
TCA	Trichloressigsäure
TCDD	2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]dioxin
tk	Thymidinkinase
TRIS	Trishydroxymethylaminomethan
TRPM-2	Testosterone-Repressed Prostatic Message 2
UV	Ultraviolett
VIT-A2	Vitellogenin A2
WHO	World Health Organization

1 Einleitung

Die in den vergangenen Jahrzehnten beobachteten Veränderungen der Population einiger Wildtierarten durch Exposition mit Xenobiotika, wurde mit Störungen der hormonellen Homöostase der betroffenen Spezies in Zusammenhang gebracht. Eine der bekanntesten ökotoxikologischen Beobachtungen ist die Abnahme der Alligatorpopulation im Lake Apopka, Florida USA. 1980 kam es durch einen Chemieunfall zu einem hohen Eintrag an 1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethanol (Dicofol) und 1,1,1-Trichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethan (DDT). In den folgenden 10 Jahren wurde eine drastische Abnahme der Alligatorpopulation beobachtet [Guillette et al., 1994]. Bis zu 80% der untersuchten männlichen Alligatoren waren in Folge einer starken Reduktion der Penisgröße unfruchtbar. Viele der ausgewachsenen Tiere wiesen Merkmale des anderen Geschlechts auf. Zusätzlich dazu waren ca. 75% der untersuchten Alligatoreier abgestorben. Im Serum männlicher Alligatoren war der Testosteronspiegel deutlich reduziert, der Estrogenspiegel war bei weiblichen Alligatoren erhöht [Guillette, 1996]. Bei Untersuchung der Alligatoren stellte man 1,6 – 8,5 mg/kg 1,1-Dichlor-2,2-bis-(p-chlorphenyl)-ethen (DDE) im Körperfett und 0,013 – 0,17 mg/kg DDE in der Leber fest. Für den Rückgang der Alligatorpopulation wurde das damals schon als schwaches Estrogen bekannte DDT verantwortlich gemacht. Später erkannte man zusätzlich noch die starke antiandrogene Aktivität von DDE.

Weitere ökotoxikologische Beobachtungen sind beispielsweise die Verweiblichung von männlichen Fischen in Kläranlagenvorflutern durch Alkylphenole [Nimrod & Benson, 1996], die Vermännlichung von weiblichen, marinen Schnecken durch Tributylzinn [Bryan et al., 1986], die Abnahme der baltischen Seehundpopulation durch Polychlorierte Biphenyle [Helle, 1980] oder die Abnahme der Population verschiedener Seevögel durch DDT [Fry et al., 1987].

Als Ursachen werden eine verringerte Fertilität, ein verändertes Brutverhalten, eine verringerte Lebenserwartung der Nachkommen, ein verändertes Sexualverhalten, sowie strukturelle Missbildungen der Geschlechtsorgane der Individuen diskutiert. Betroffen sind vor allem im Wasser lebende Arten, die ihre gesamte Entwicklung im Wasser durchlaufen, in engem Kontakt mit ihrem kontaminierten Lebensraum stehen und deren Nahrung hauptsächlich aquatischen Ursprungs ist.

In der Literatur hat sich für Verbindungen, die die hormonelle Homöostase exponierter Organismen stören, der Begriff „endokrine Disruptoren“ bzw. „endokrine Modulatoren“ eingebürgert, der von der „Organization for Economic Cooperation and Development“ (OECD) wie folgt definiert wird: „Ein endokriner Disruptor ist eine Substanz oder ein Substanzgemisch, das Funktionen des endokrinen Systems derart verändert, dass daraus schädliche Wirkungen auf die Gesundheit eines unversehrten Organismus oder dessen Nachkommenschaft resultieren“ [OECD, 1996]. Die Mechanismen für eine Schädigung des hormonellen Systems sind vielfältig. Endokrine Disruptoren können an Steroidhormonrezeptoren binden und so Veränderungen in der Genexpression hervorrufen, die Biosynthese und/oder den Abbau physiologischer Hormone verändern, sowie auch Einfluss auf die Bioverfügbarkeit der Hormone nehmen.

Verbindungen mit potentieller hormoneller bzw. antihormoneller Aktivität werden anhand von Strukturbetrachtungen ausgewählt und dann in geeigneten *in vitro* Testsystemen untersucht. Ein Nachteil solcher Testsysteme ist, dass Einflüsse wie Resorption, Metabolismus, Verteilung und Eliminierung nicht in das Testergebnis einfließen. Daraus resultieren z.T. widersprüchliche endokrine Aktivitäten in *in vivo* und *in vitro* Untersuchungen hinsichtlich ihrer Wirkungsstärke aber auch bezogen auf ihre biologischen Effekte. In der Literatur sind beispielsweise *in vitro* Hinweise auf estrogenische Aktivität einiger Phthalatester wie z.B. Butylbenzylphthalat (BBP, Abbildung 2.7) beschrieben [Zacharewski et al., 1998; Harris et al., 1997], die *in vivo* nicht bestätigt wurden [Milligan et al., 1998; Zacharewski et al., 1998]. Diese Diskrepanz liegt an der schnellen metabolischen Inaktivierung von BBP hinsichtlich estrogenischer Aktivität [Harris et al., 1997]. Die metabolische Aktivierung einer Substanz zum Steroidhormonrezeptorliganden wurde ebenfalls beschrieben. Therapeutisch ausgenutzt wird die Hydroxylierung des Chemotherapeutikums Flutamid, dessen Metabolit Hydroxyflutamid (Abbildung 2.17) ein potentes Antiandrogen ist [Shet et al., 1997].

Die gängigen *in vitro* Testsysteme sind in der Regel nicht bzw. nur bedingt in der Lage, eine Testsubstanz zu metabolisieren. Das „Endocrine Disruptor Screening Testing and Advisory Committee“ (EDSTAC) empfiehlt daher in seinem Abschlussbericht ein aufwendiges Testprogramm, das sich aus verschiedenen *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen zusammensetzt [EDSTAC, 1998]. Zunächst werden mit Hilfe von Strukturbetrachtungen potentielle endokrine Disruptoren ausgewählt und auf ihre Fä-

higkeit untersucht, an Steroidhormonrezeptoren zu binden. Bei diesen Untersuchungen sollen die Testsubstanzen bereits mit einem metabolisierenden System wie z.B. S9-Mix behandelt werden. Anschließend wird die transkriptionsaktivierende Potenz der Testsubstanzen *in vitro* untersucht. Zusätzlich kommen etablierte *in vivo* Untersuchungsverfahren zum Einsatz, bei denen möglicherweise schädigende Effekte auf das endokrine System eines intakten Organismus beobachtet werden können. Diese aufwendige Testbatterie könnte durch die Entwicklung eines geeigneten *in vitro* Tests, der zusätzlich zur transkriptionsaktivierenden Potenz auch Einflüsse des Metabolismus untersucht, möglicherweise vereinfacht werden.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Metabolismus

Biotransformation bzw. Metabolismus spielt im lebenden Organismus eine zentrale Rolle. Sollen unerwünschte Stoffe ausgeschieden werden, müssen sie in eine wasserlösliche und damit leicht eliminierbare Form überführt werden. In der Regel werden diese Verbindungen durch sogenannte Phase I Enzyme mit funktionellen Gruppen versehen, die dann im Anschluss mit großen hydrophilen Molekülen, wie aktivierter Glucuronsäure oder aktiviertem Sulfat durch Phase II Enzyme, konjugiert werden. Die Superfamilie der Cytochrom P450 (CYP) Monooxygenasen ist die wichtigste Gruppe der Phase I Enzyme. CYP Monooxygenasen zeichnen sich durch ihre große Vielfalt an Reaktionsmöglichkeiten, langsamen Umsatzraten und geringe Substratspezifität aus. Sie sind in der Lage, molekularen Sauerstoff so zu aktivieren, dass ein Sauerstoffatom in den Fremdstoff eingebaut, das andere zu Wasser reduziert wird. CYP Enzyme kommen in praktisch allen Organen vor. Die enzymatischen Aktivitäten verschiedener Zellen können aber sehr unterschiedlich sein. [Guengerich, 1995]

CYP-Isoenzyme enthalten als prosthetische Gruppe ein Häm B, dessen Stickstoffatome die vier äquatorialen Koordinationsstellen des oktaedrischen Eisenkomplexes besetzen. Während die fünfte axiale Position durch die SH-Gruppe eines Cystein belegt ist, wird die sechste Koordinationsstelle variabel besetzt. Im substratgebundenen Zustand ist an dieser Stelle der für die Monooxygenierung benötigte Sauerstoff gebunden.

In Abbildung 2.1 wird vereinfacht der Reaktionszyklus dargestellt, durch den ein Substrat oxidiert wird. Nach Anlagerung des Substrats RH (1), wird von der NADPH-Cytochrom P450 Reduktase ein Elektron übertragen (2), und das zentrale dreiwertige Eisen reduziert. An dieses zweiwertige Eisen bindet der molekulare Sauerstoff mit hoher Affinität (3). Dieser Komplex erhält nun erneut ein Elektron von der Reduktase (4). Unter Verbrauch zweier Protonen wird nach Disproportionierung Wasser abgespalten (5). Das am Enzym verbleibende Sauerstoffatom wird in das Substrat eingebaut (6 + 7). Nach Abdissoziation des oxidierten Substrats (8) steht das Enzym für einen neuen Zyklus zur Verfügung. [Guengerich, 1995]

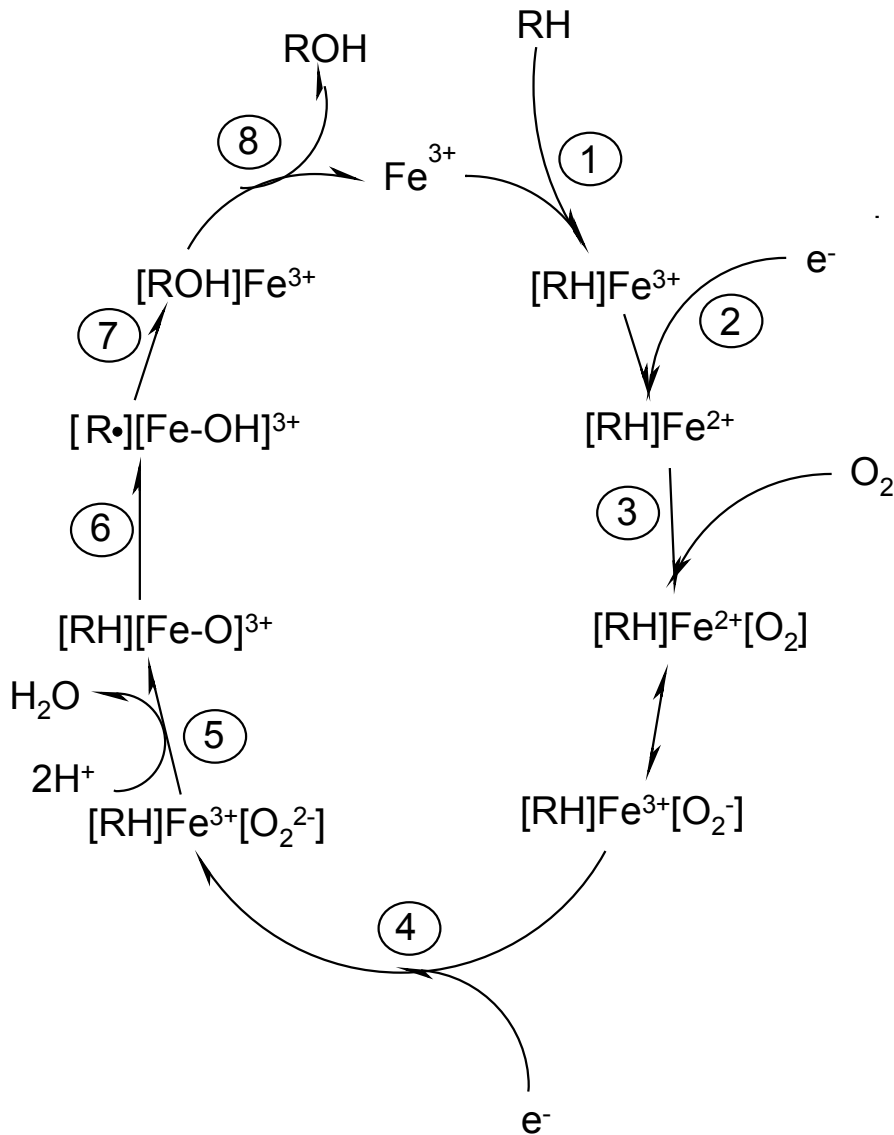


Abbildung 2.1 Mechanismus der CYP katalysierten Monooxygenierung [Eisenbrand & Metzler, 2001; modifiziert]

Die Einteilung der CYP Enzyme in Familien erfolgt entsprechend ihrer Aminosäuresequenz. CYP Enzyme einer Familie stimmen zu über 40% in der Aminosäuresequenz überein und werden mit arabischen Ziffern bezeichnet (Abbildung 2.2). Jede Familie wird in sogenannte Unterfamilien gegliedert, deren Mitglieder zu mehr als 55% in der Aminosäuresequenz übereinstimmen. Sie werden mit Buchstaben bezeichnet. Zur Kennzeichnung von Isoenzymen (Übereinstimmung > 97%) wird wiederum eine arabische Ziffer verwandt. Die für den Fremdstoffmetabolismus zuständigen CYP gehören beim Menschen zu den Familien 1 bis 3. In Tabelle 2.1 sind zusammenfassend die humanen CYP Familien und ihre Funktion im Stoffwechsel dargestellt.

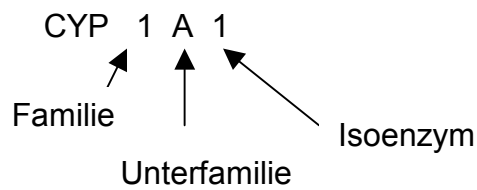


Abbildung 2.2 Nomenklatur der CYP Enzyme [Guengerich, 1995]

Tabelle 2.1 CYP Familien und ihre Funktion [Rendic & Di Carlo, 1997; Guengerich, 1995]

CYP Familie	Hauptfunktion
CYP 1	Metabolismus von Xenobiotika
CYP 2	Metabolismus von Xenobiotika Arachidonsäurestoffwechsel
CYP 3	Metabolismus von Xenobiotika Steroidhydroxylierung an C2, C6, C15, C16
CYP 4	Fettsäurehydroxylierung
CYP 5	Thromboxan A ₂ Synthese
CYP 7	Gallensäuresynthese Steroidhydroxylierung am C7
CYP 8	Prostacyclinsynthese
CYP 11	Pregnenolon-, Cortison- und Aldosteronsynthese Steroidhydroxylierung am C20, C22, C11, C18
CYP 17	Steroidhydroxylierung am C17 C17, 20 Lyasespaltung
CYP 19	Aromatisierung von Androgenen zu Estrogenen
CYP 21	Synthese von Gluco- und Mineralcorticoiden Steroidhydroxylierung am C21
CYP 24	Inaktivierung von Vitamin D ₃ Steroidhydroxylierung am C24
CYP 27	Gallensäuresynthese Steroidhydroxylierung am C27
CYP 51	Cholesterinsynthese Lanosterol-14 α -Demethylierung

2.2 Hormonelle Signalübertragung

2.2.1 Steroidhormonrezeptoren

Die Steroidhormonrezeptoren (Estrogen-, Progesteron-, Androgen-, Mineralcorticoid- und Glucocorticoidrezeptor) zählen neben Retinolsäure-, Vitamin D₃- und Thyroidrezeptoren zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren. Des Weiteren werden auch sogenannte „Orphan-Rezeptoren“, deren Liganden bisher noch nicht identifiziert wurden, zu dieser Superfamilie gerechnet. Alle nukleären Rezeptoren zeichnen sich durch eine hohe Homologie bezüglich der Aminosäuresequenz aus. Insgesamt können 5 funktionelle Domänen unterschieden werden: die A/B- oder Modulator-Region, die C- oder DNA-bindende Domäne (DBD), die D-Region, die E- oder Ligand-bindende Domäne (LBD) und schließlich die F-Region (Abbildung 2.3). [Mangelsdorf et al., 1995]

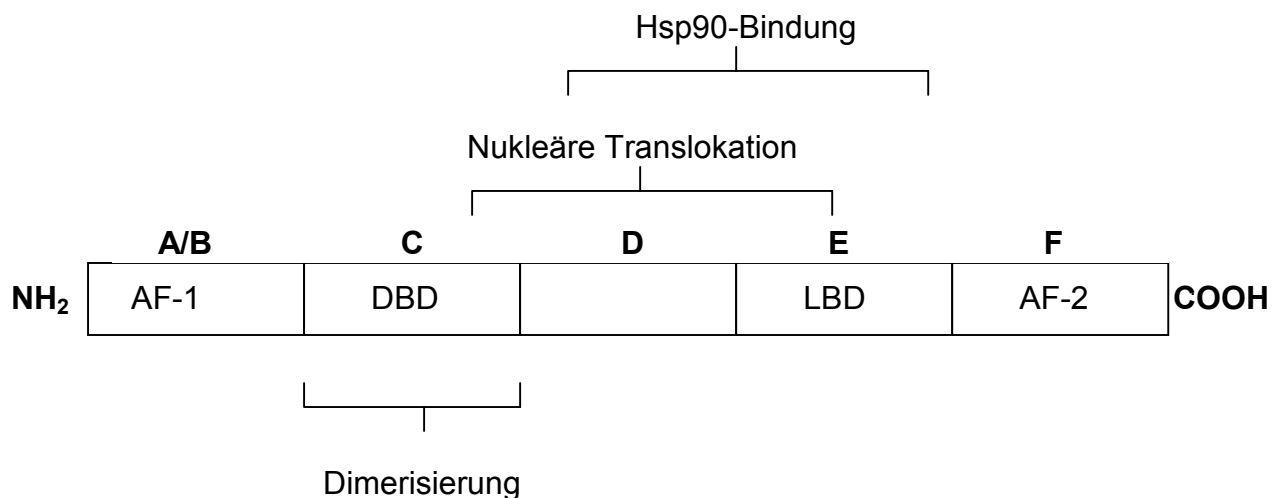


Abbildung 2.3 Schematische Darstellung eines Steroidhormonrezeptors [Grone-meyer, 1992; modifiziert]

In der A/B-Domäne liegt die konstitutive Transaktivierungsfunktion AF-1, die durch Wechselwirkungen mit Komponenten des Transkriptionsapparates die Aktivierung von Zielgenen vermittelt [Tsai & O'Malley, 1994]. Die Bindung an die DNA sowie z.T. die Dimerisierung des Rezeptors findet an der hochkonservierten DBD statt. Die DBD enthält eine 70 - 80 Aminosäuren lange Region, die besonders reich an konservier-

ten Cysteinen ist. Diese formen durch tetraedrische Koordination von zweiwertigen Zinkionen zwei Zinkfinger. Der N-terminale Zinkfinger ist für die Positionierung der Erkennungshelix des Rezeptors in der DNA verantwortlich. Die im N-terminalen Zinkfinger liegende sogenannte P-Box, die aus drei hochkonservierten Aminosäureresten besteht, sorgt für die Erkennung des richtigen „Responsiven Elements“ der DNA. Anhand der P-Box des N-terminalen Zinkfingers kann man die nukleären Rezeptoren in verschiedene Unterfamilien einteilen: Zur Glucocorticoid-Familie gehören auch Androgen-, Progesteron- und Mineralcorticoidrezeptoren. Vitamin D₃-, Thyroid- und Retinolsäurerezeptoren gehören zur Estrogenrezeptorfamilie. Der C-terminale Zinkfinger ist für die Interaktion mit dem Zuckerphosphat-Rückgrat der DNA und für die Dimerisierung verantwortlich. [Slater et al., 1994; Tsai & O'Malley, 1994]

Über die D-Region wird zum einen die Konformation des Rezeptors, und zum anderen die nukleäre Translokation kontrolliert. Des Weiteren besitzt die D-Domäne eine Transaktivierungsfunktion.

Die Ligandbindung erfolgt über die LBD. Zusätzlich liegt hier eine weitere Transaktivierungsfunktion (AF-2) vor, die durch Hormonbindung aktiviert wird. Weitere Funktionen dieser Region sind Dimerisierung, nukleäre Translokation und Wechselwirkungen mit Hilfsproteinen wie Heat-Shock-Protein (hsp) 90. [Mangelsdorf et al., 1995; White & Parker, 1998]

2.2.1.1 Estrogenrezeptoren

Der Estrogenrezeptor (ER) wurde von Green et al. (1986) aus humanem Uterusgewebe kloniert. 1996 entdeckten Kuiper et al. (1996) einen zweiten Estrogenrezeptor, der ER β genannt wurde. Der bis 1996 einzige bekannte ER wurde in ER α umbenannt. Beide Estrogenrezeptoren sind sich in ihrer Aminosäuresequenz, insbesondere in LBD (>95%) und DBD (ca. 60%), sehr homolog [Kuiper et al., 1996]. Aufgrund der unterschiedlichen Genloci von ER α (14q22-24) und ER β (6q25) kann ausgeschlossen werden, dass es sich um unterschiedliche Splicevarianten handelt [Enmark et al., 1997]. ER α besteht aus 595 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 65kDa [Green et al., 1986]. Im Gegensatz dazu ist ER β mit einer Länge von 485 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 54,2 kDa deutlich kürzer [Kuiper et al., 1996].

Die ER-Isoformen zeigen ein unterschiedliches Expressionsmuster: In Ovar und Uterus der Ratte wurde für beide ER-Isoformen eine hohe Expression festgestellt. Die höchste ER β -Expression wurde in Ovar und Prostata beobachtet. Testes, Uterus, Blase und Lunge zeigten eine moderate ER β -Expression. In Hypophyse, Nebenhoden und Thymus wurde nur wenig ER β mRNA nachgewiesen. ER α wird im Gegensatz zu ER β in Organen wie Nebenhoden, Testes, Hypophyse, Uterus, Niere und Nebenniere in hohem Maße exprimiert. [Kuiper et al., 1997]

2.2.1.2 Androgenrezeptor

Das Gen des Androgenrezeptors (AR) ist beim Menschen auf dem X-Chromosom (Xq11 - q13) lokalisiert, was zur Folge hat, dass bei männlichen Individuen Mutationen dieses Gens nicht durch ein zweites Allel kompensiert werden können [Prins, 2000; Sack et al., 2001]. Das Protein besteht aus 910 bis 919 Aminosäuren mit einem vom Phosphorylierungsgrad abhängigen Molekulargewicht (110 und 114 kDa) [Prins, 2000]. Der AR wurde in Testes, in der Prostata, in der Epidermis der Vorhaut, im Brustgewebe, in Schweiß- und anderen apokrinen Drüsen sowie in der Leber nachgewiesen [de Winter, 1991]. Ein zweiter AR bei Regenbogenforelle und japanischem Aal wurde 1999 entdeckt. Die Eigenschaften und Funktion sind im Einzelnen noch zu charakterisieren [Ikeuchi et al., 1999; Takeo et al., 1999].

2.2.2 Mechanismus der Signalübertragung

In inaktiver Form, das heißt ohne Bindung an einen Liganden, liegen die Steroidhormonrezeptoren in einem Proteinkomplex vor, deren einzelne Bestandteile noch nicht vollständig charakterisiert sind. Dieser Proteinkomplex besteht aus dem Rezeptor und den Heat-Shock-Proteinen hsp 90, hsp 70, hsp 59 und p23. Die Hilfsproteine sind für die korrekte Faltung der Ligandbindungstasche verantwortlich und blockieren die Bindung des nicht aktivierten Rezeptors an die DNA. [Beato et al., 1996]

Nach Diffusion der Steroidhormone in die Zelle, können sie an ihren Rezeptor binden. Dies geschieht je nach der Lokalisation des Rezeptors im Cytoplasma oder im Kern. Der Androgenrezeptor liegt in Abwesenheit seines Liganden im Cytoplasma

vor. Die ER-Isoformen sind lose an Kernstrukturen assoziiert. Die Bindung des Hormons führt zu einer Konformationsänderung des Rezeptors. Der Rezeptor wird phosphoryliert und die hsp 90 dissoziieren ab. Nach der nun folgenden Dimerisierung werden die Rezeptordimere gegebenenfalls in den Kern transferiert [Gronemeyer, 1992; Slater et al., 1994].

An den „Steroidhormone Responsive Elements“ (SRE) findet die Wechselwirkung zwischen aktiviertem Rezeptor und DNA statt. Bei den SRE handelt es sich um palindromische Sequenzen, die in der Regel durch drei nicht konservierte Basen voneinander getrennt sind (Abbildung 2.4). Ebenso wie die Rezeptoren können die SRE in zwei Gruppen eingeteilt werden: zum einen die „Hormone Responsive Element“ (HRE)-Gruppe, an die Androgen-, Glucocorticoid-, Mineralcorticoid- und Progesteronrezeptoren binden können, und die „Estrogen Responsive Element“ (ERE)-Gruppe, die von Estrogen-, Retinolsäure-, Vitamin D₃- und Thyroidrezeptoren erkannt wird. [Gronemeyer, 1992; Slater et al., 1994].



Abbildung 2.4 SREs der Steroidhormonrezeptoren [Slater et al., 1994]

Nach Interaktion der Rezeptordimere mit der DNA, kommt es zur Wechselwirkung mit im Einzelnen noch nicht näher charakterisierten Adapterproteinen/Koaktivatoren, die den Kontakt zum basalen Transkriptionsapparat herstellen. Es handelt sich dabei teilweise um Transkriptionsfaktoren. Nach Anlagerung der RNA-Polymerase II an die TATA-Box, kann das Gen transkribiert werden (Abbildung 2.5). [McDonnell et al., 1995; Beato et al., 1996]

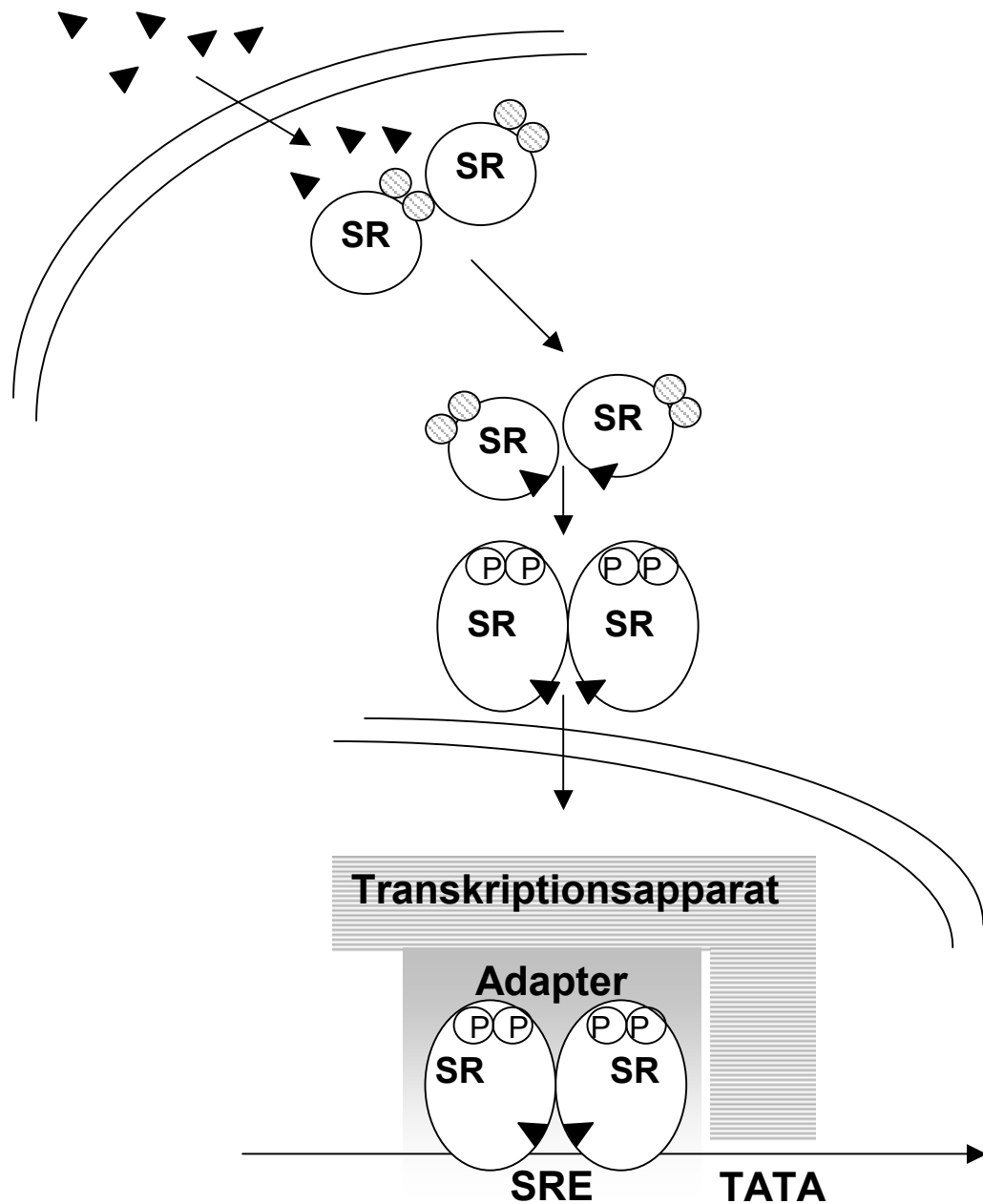


Abbildung 2.5 Mechanismus der Aktivierung eines Steroidhormonrezeptors (SR) durch seinen Liganden: Diffusion des Liganden durch die Zellmembran, Bindung an seinen Rezeptor, Konformationsänderung, Abdissoziation der Begleitproteine, Dimerisierung, Phosphorylierung, Translokation in den Nukleus und Wechselwirkung mit einem „Responsiven Element“ der DNA sowie Anlagerung des Transkriptionsapparats [Giangrande & McDonnell, 1999; modifiziert]

Bei der Abschaltung der Steroidhormonrezeptor-vermittelten Transkription scheinen wiederum Hilfsproteine wie p23 und hsp 90 eine entscheidende Rolle zu spielen. Freeman und Yamanoto (2002) zeigten, dass p23 und hsp 90 die Bindung der Re-

zeptordimere an die entsprechenden SREs reduzieren. Die Autoren vermuten, dass diese Proteine in der Lage sind, den transkriptionsregulierenden Komplex aus Rezeptordimer und basalem Transkriptionsapparat aufzulösen und so die Transkription des Zielgens beenden.

2.3 Estrogenrezeptorliganden

2.3.1 Strukturelle Betrachtungen

Anhand der kristallographischen Untersuchungen der ligandgebundenen ER-Isoformen [Brzozowski et al., 1997; Pike et al., 1999] wurden folgende Strukturmerkmale für einen potentiellen ER-Liganden abgeleitet: Ein potentieller ER-Ligand hat ein phenolartiges aromatisches System (z.B. eine phenolische OH-Gruppe oder einen chlorierten Aromaten). Diese OH-Gruppe (vergleichbar mit der OH-Gruppe in 3-Position von Estradiol (E₂), Abbildung 2.6) tritt mit den Aminosäuren Glutamat³⁵³ und Arginin³⁹⁴ (im Fall des humanen ER α) der Ligandbindungstasche über Wasserstoffbrücken in Wechselwirkung. Ein weiterer Wasserstoff-Donor (vergleichbar mit der 17 β -OH Position von E₂) tritt mit einem der beiden Stickstoffe des Imidazolrests der Aminosäure Histidin⁵²⁴ ebenfalls über eine Wasserstoffbrücke in Wechselwirkung. Da beide Stickstoffe des Imidazolrests zu einer Interaktion fähig sind, führt dies zu einer gewissen Flexibilität der Bindungstasche bezüglich eines Liganden. Der Abstand zwischen den beiden OH-Gruppen sollte zwischen 92 und 123 nm liegen. Gefördert wird die Bindung einer Substanz zusätzlich durch ein hydrophobes Zentrum. Es tritt mit dem Aromaten des Phenylalanins⁴⁰⁴ in Kontakt. [Tanenbaum et al., 1998; Fang et al., 2001]

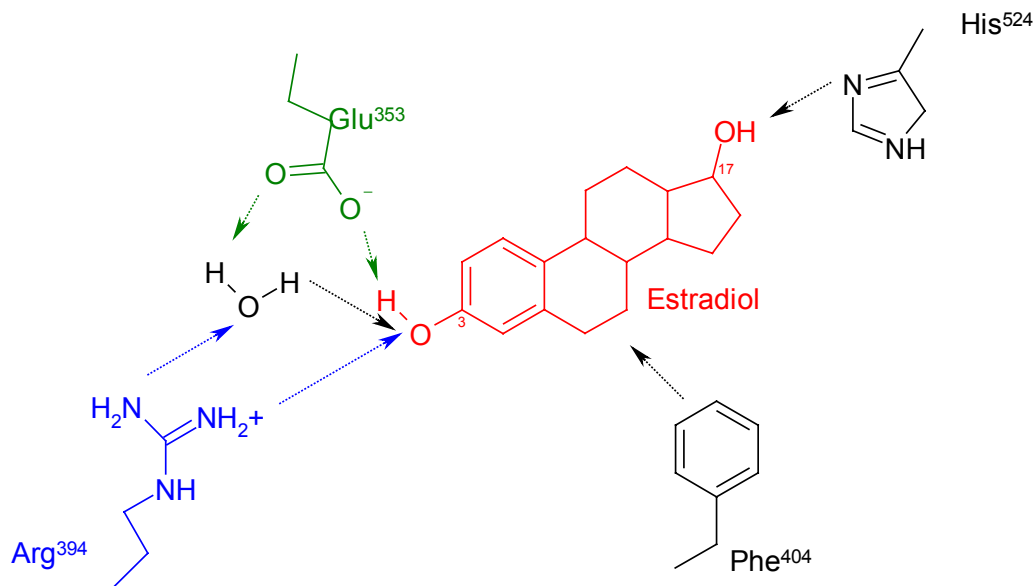
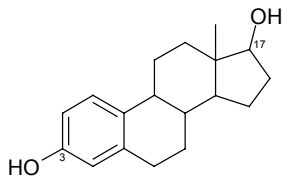


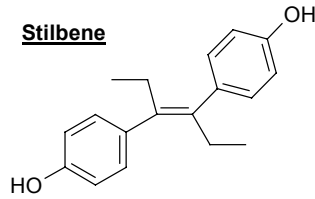
Abbildung 2.6 Position von Estradiol in der Ligandbindungstasche des humanen ER α . Die 3-OH-Gruppe von E₂ tritt mit Glu³⁵³, Arg³⁹⁴ und einem Molekül Wasser in Wechselwirkung, die 17 β -OH-Gruppe interagiert mit einem Stickstoff des Imidazols von His⁵²⁴. Phe⁴⁰⁴ bildet hydrophobe Wechselwirkungen mit dem hydrophoben Zentrum von E₂ aus. [Fang et al., 2001]

Fast alle bisher identifizierten Estrogenrezeptorliganden zeigen mindestens eine der beschriebenen strukturellen Voraussetzungen, nämlich eine phenolische OH-Gruppe bzw. ein phenolartiges aromatisches System (Abbildung 2.7). Man kann die ER-Liganden in verschiedene Substanzgruppen einteilen: Steroide, Substanzen mit einer stilbenartigen Struktur, Triphenylethene, Diphenylmethane und deren Analoga, Phytoestrogene, Polychlorierte Biphenyle (PCB), Phenole und eine gemischte Gruppe mit unterschiedlichen Vertretern. In Abbildung 2.7 sind die Strukturen der wichtigsten Vertreter der Substanzgruppen dargestellt.

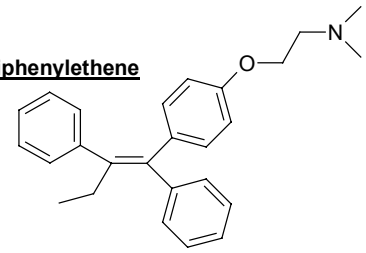
Steroide und stilbenartige Substanzen wie Diethylstilbestrol (DES) binden mit der größten Affinität an ER α . Es folgen in abnehmender Bindungsstärke Phytoestrogene, Diphenylmethane, PCB und Phenole.

Steroide

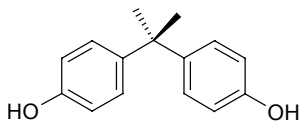
Estradiol

Stilbene

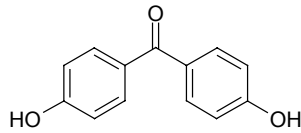
Diethylstilbestrol

Triphenylethene

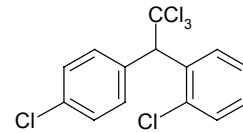
Tamoxifen

Diphenylmethane und Analoga

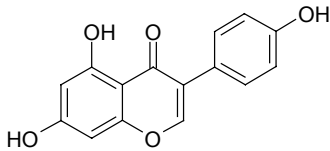
Bisphenol A



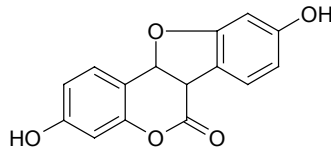
Dihydroxybenzophenon



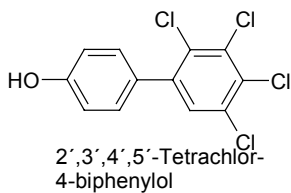
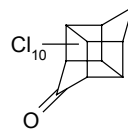
o,p'-DDT

Phytoestrogene

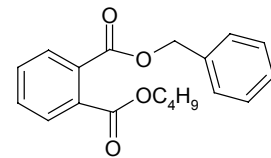
Genistein



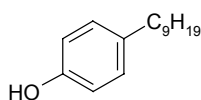
Coumestrol

Polychlorierte Biphenyle2',3',4',5'-Tetrachlor-
4-biphenylol**gemischte Gruppe**

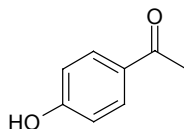
Kepone



Butylbenzylphthalat

Phenole

Nonylphenol



Methylparaben

Abbildung 2.7 Strukturformeln einiger Estrogenrezeptorliganden
[Strukturformeln aus Fang et al., 2001]

2.3.2 Physiologische Estrogene

2.3.2.1 Funktion

In den klassischen Zielorganen der Estrogene Ovar, Uterus, Vagina, Zervix und Mamma stimulieren Estrogene die Zellproliferation, beeinflussen die Apoptose sowie u.a. die Progesteronrezeptorsynthese. Im Ovar fördert E_2 die Follikel- und Eireifung. Die Uterusschleimhaut wird durch E_2 zur Proliferation angeregt. In der Vagina kommt es durch die Einwirkung von E_2 zur Verdickung der Schleimhaut und zu einer vermehrten Abstoßung glykogenhaltiger Epithelzellen. Aus dem Glykogen wird durch Laktobazillen Milchsäure gebildet, was zu einer Absenkung des pH-Werts in der Scheide und damit zu einer Verringerung der Infektionsgefahr führt. Estrogene fördern die Bildung des zervikalen Schleimpfropfs, der eine wesentliche Barriere für das Eindringen von Spermien darstellt. Gemeinsam mit den gonadotropen Hormonen Follitropin, Lutropin und Prolactin steuern Estrogene den weiblichen Sexualzyklus. Sie sind außerdem zur normalen Entwicklung der Geschlechtsmerkmale nötig. Des Weiteren sorgen Estrogene für eine Erhöhung der Knochenstabilität, was möglicherweise durch eine estrogen-vermittelte Hemmung der Interleukinsynthese in ER-exprimierenden Osteoblasten hervorgerufen wird [Diel & Michna, 1996]. Interleukine sind Stimulatoren des Knochenabbaus. Der Schutz vor kardiovaskulären Erkrankungen durch Estrogene wird wahrscheinlich durch eine Vielzahl von Wirkungen hervorgerufen: Estrogene hemmen die Expression der induzierbaren NO-Synthase oder Cyclooxygenase II [Diel et al., 1996], die an inflammatorischen Prozessen beteiligt sind. Sie hemmen zusätzlich das Wachstum und die Migration der die Gefäße auskleidenden glatten Muskulatur [Hodges et al., 1999] und sorgen für eine Erniedrigung des Serumcholesterinspiegels.

2.3.2.2 Biosynthese

Die Biosynthese der Steroidhormone (Abbildung 2.8) geht vom Cholesterin aus. Der erste Schritt besteht in der Entfernung einer C₆-Einheit aus der Seitenkette des Cholesterins, wobei Pregnenolon entsteht. Die Seitenkette wird zuerst am C₂₀, dann am C₂₂ hydroxyliert; daran schließt sich die Spaltung der Bindung zwischen diesen beiden C-Atomen an (CYP 11).

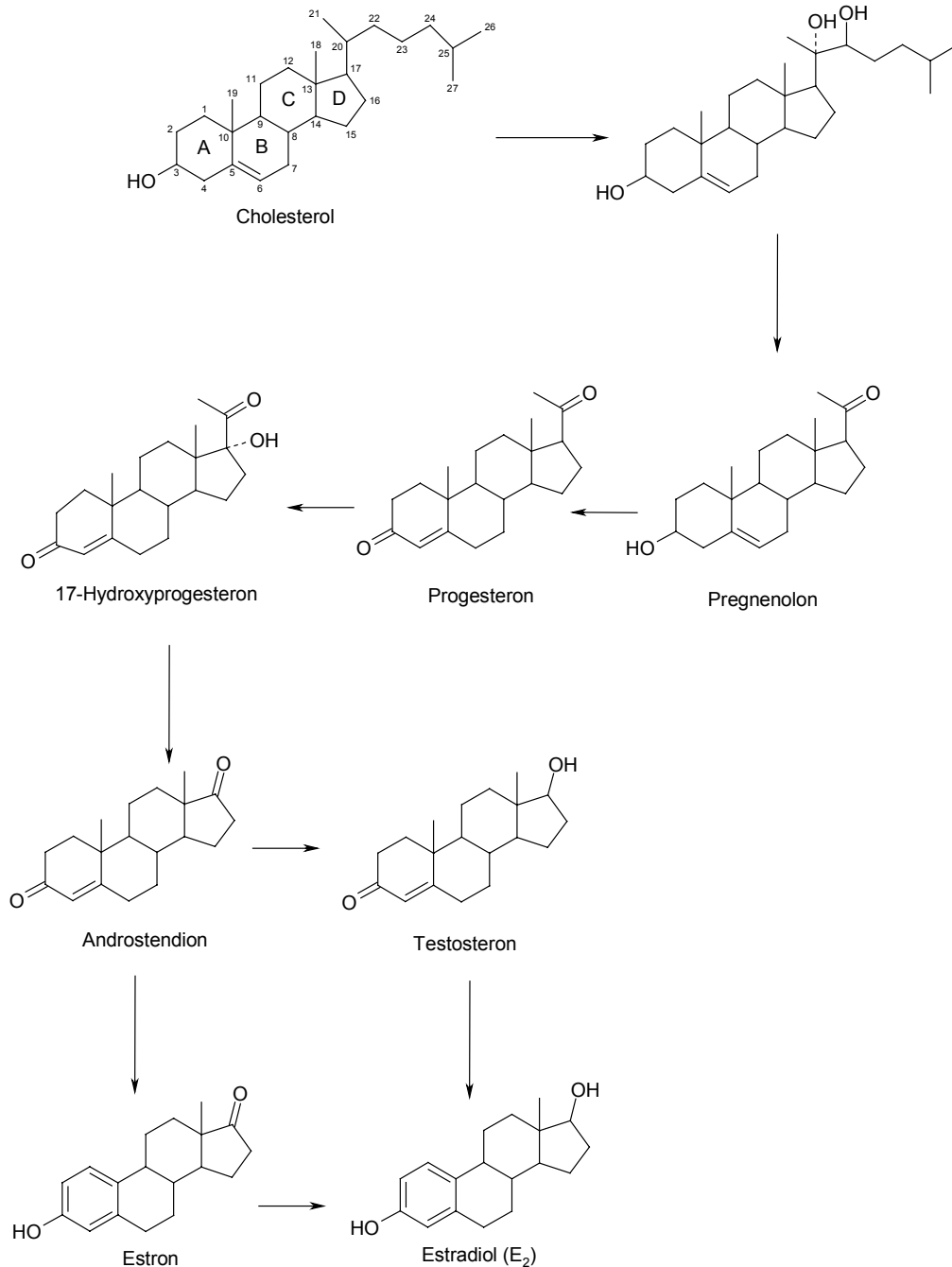


Abbildung 2.8 Biosynthese der Steroidhormone Estradiol und Testosteron [Stryer, 1996; modifiziert]

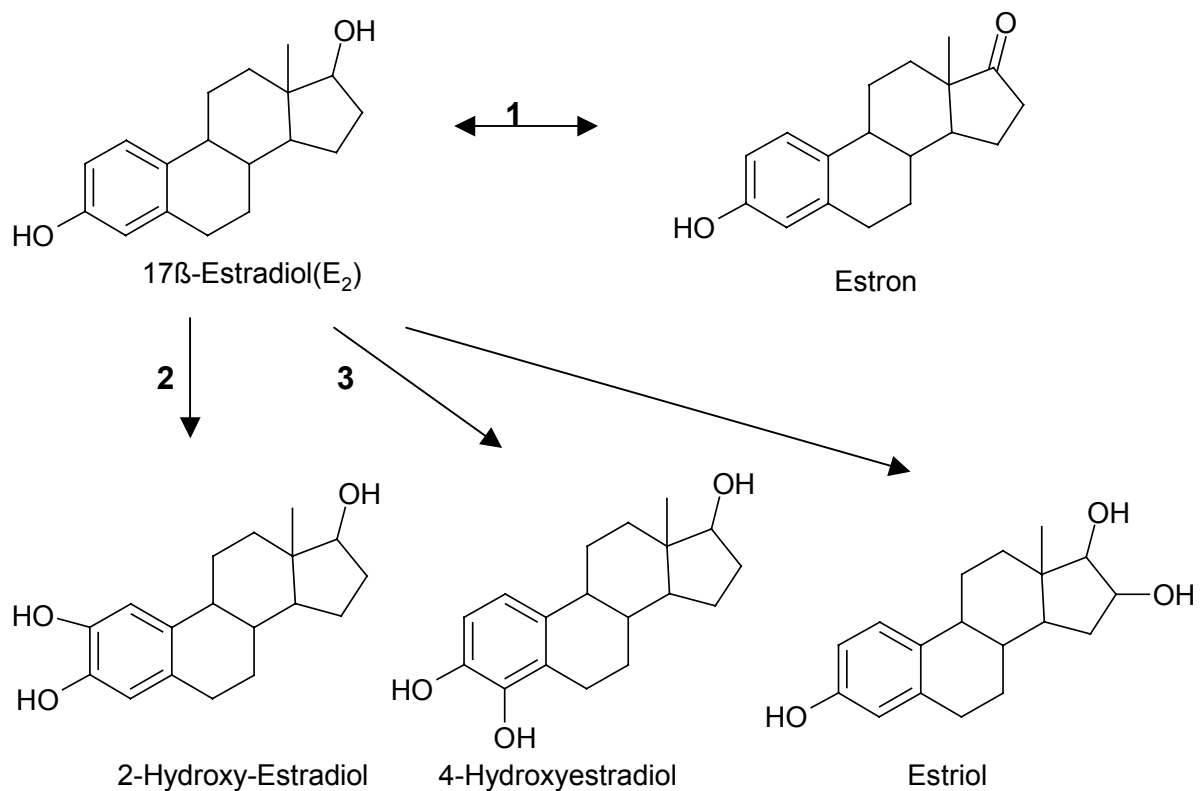
Aus Pregnenolon entsteht durch Oxidation der 3-Hydroxylgruppe zur Ketofunktion und Isomerisierung der Doppelbindung Progesteron. Daraus wird durch Hydroxylierung am C-17 (CYP 17) und Abspaltung einer Seitenkette Androsten-3,17-dion synthetisiert, aus dem nach der Reduktion von Position 17 Testosteron entsteht. Die Aromatase (CYP 19) entfernt die C-19-Methylgruppe und aromatisiert den A-Ring, wodurch 17 β -Estradiol (E₂) entsteht [Stryer, 1996].

2.3.2.3 Metabolismus und hormonelle Aktivität

E₂ wird durch Sulfatierung in Position 3 inaktiviert. Es kann aber auch in Position 17 zum Estron oxidiert werden, das immer noch signifikante estrogenische Aktivität zeigt [Kuiper et al., 1997; Sohoni & Sumpter, 1998]. Estron wird ebenfalls durch Sulfatierung in Position 3 inaktiviert.

Der Metabolismus von E₂ findet sowohl in der Leber, als auch in extrahepatischen Geweben statt. Hepatisch wird E₂ hauptsächlich durch CYP 1A2 und der 3A-Familie zu 2-Hydroxy-E₂ umgesetzt (Abbildung 2.9), das im Serum in der Regel in Position 3 methoxyliert, glucuronidiert oder sulfatiert vorliegt. 2-Hydroxy-E₂ wird auch in geringen Mengen extrahepatisch in Uterus, Mamma, Plazenta, Niere und Gehirn gebildet. Wie sich in Versuchen zur Proliferationsstimulation estrogenabhängiger Zelllinien [Gupta et al., 1998] und in Transkriptionsaktivierungsexperimenten mit ER α transfizierten Hefezellen [Elsby et al., 2000] zeigte, besitzt 2-Hydroxy-E₂ nur noch schwach estrogenische Aktivität. Zurückgeführt werden kann dies vermutlich auf die geringe Bindungsaffinität von 2-Hydroxy-E₂ an ER α bzw. ER β [Kuiper et al., 1997]. In hohen Konzentrationen wurde die durch 1 nM E₂ induzierte Proliferation von MCF-7-Zellen durch Koinkubation mit 2-Hydroxy-E₂ gehemmt [Gupta et al., 1998].

Als Nebenweg des hepatischen E₂-Metabolismus gilt die Hydroxylierung in Position 4 (Abbildung 2.9). Extrahepatisch wird die Metabolisierung von E₂ zu 4-Hydroxy-E₂ durch CYP 1B1 als Hauptweg bestritten. 4-Hydroxy-E₂ hat ähnliche Bindungseigenschaften an ER α und ER β wie 2-Hydroxy-E₂ [Kuiper et al., 1997], dissoziiert jedoch vom ER α schlechter ab als E₂, was zu einer längeren, andauernden Aktivierung des ER führt. *In vivo* wurde zwar eine Erhöhung des Uterusgewichts nach Verabreichung von 4-Hydroxy-E₂ beobachtet, insgesamt war es aber geringer estrogen aktiv als E₂.



- 1 17β-Hydroxysteroid-Dehydrogenase
 2 CYP 1A2,3A-Familie
 3 CYP 1B1, 3A-Familie

Abbildung 2.9 Metabolismus von E₂ [Liehr, 2001; modifiziert]

Die Catecholestrogene 2- und 4-Hydroxy-E₂ sind redoxaktiv und werden in die entsprechenden Chinone überführt. Im Zuge dieser Reaktion kommt es zur Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies. In Übereinstimmung mit diesen Beobachtungen wurden durch reaktive Sauerstoffspezies verursachte Einzelstrangbrüche oder auch oxidierte DNA-Basen wie z.B. 8-Oxoguanin nachgewiesen [Liehr, 2001]. Darüber hinaus sind beide Chinonestrogene in der Lage, an die DNA zu binden [Yagi et al., 2001]. Untersuchungen zeigten, dass das 3,4-Chinon instabile DNA-Addukte bildet, wodurch es zu potentiell mutagenen apurinischen Stellen kommt. Die durch das 2,3-Chinon gebildeten DNA-Addukte sind stabiler und können durch die Reparatursysteme der Zelle eliminiert werden. Die Beobachtung einer stärkeren kanzerogenen Wirkung von 4-

Hydroxy-E₂ im Vergleich zu 2-Hydroxy-E₂ in Hamster und Mäusemodellen stimmt damit überein. Darüber hinaus gehört 2-Hydroxy-E₂ zu den potentesten endogenen Antiangiogenesefaktoren [Zhu & Conney, 1998].

Neben Hydroxylierungen in den Positionen 2 und 4 kann E₂ auch an den Positionen 6, 7, 15 α und 16 α hydroxyliert werden. 6- oder 7-hydroxylierte Metabolite zeigen keine estrogenen Aktivität *in vitro* und nur äußerst schwache estrogenen Aktivität *in vivo*. Die Hydroxylierung in Position 15 α läuft vor allem während der Schwangerschaft vermutlich in der fötalen Plazenta ab. 15 α -Hydroxy-E₂ ist nicht bzw. nur äußerst schwach estrogen aktiv. Wahrscheinlich schützt die schnelle 15 α -Hydroxylierung das Ungeborene vor zu hohen endogenen E₂-Konzentrationen, wie sie während der Schwangerschaft auftreten [Zhu & Conney, 1998]. 16 α -Hydroxy-E₂ oder Estriol (Abbildung 2.9) bindet mit geringer Affinität an ER α bzw. ER β [Kuiper et al., 1997]. In Transaktivierungsexperimenten zeigte Estriol eine mit E₂ vergleichbare estrogenen Potenz [Gupta et al., 1998]. Estriol wird als 16-Glucuronid ausgeschieden [Zhu & Conney, 1998].

2.3.3 Einfluss des Metabolismus an ausgewählten Beispielen

2.3.3.1 Methoxychlor

Das Insektizid Methoxychlor wurde als Ersatz für DDT entwickelt und zeichnet sich bei gleichem Wirkungsspektrum vor allem durch seine wesentlich schnellere Abbaubarkeit aus. Primärer Angriffspunkt für die metabolisierenden Enzyme stellen die beiden Methoxygruppen in *para*-Stellung dar (Abbildung 2.10), die durch CYP-Isoenzyme schnell hydroxyliert und in Form von Formaldehyd abgespalten werden können. Aus Methoxychlor entstehen dadurch mono- bzw. dihydroxylierte Phenole, die aufgrund ihrer phenolischen Struktur estrogenen Aktivität erwarten lassen. Reduktive Dehalogenierung führt zu substituierten Ethenderivaten, die möglicherweise aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit zu DDE antiandrogen aktiv sind [Kupfer & Bulger 1987].

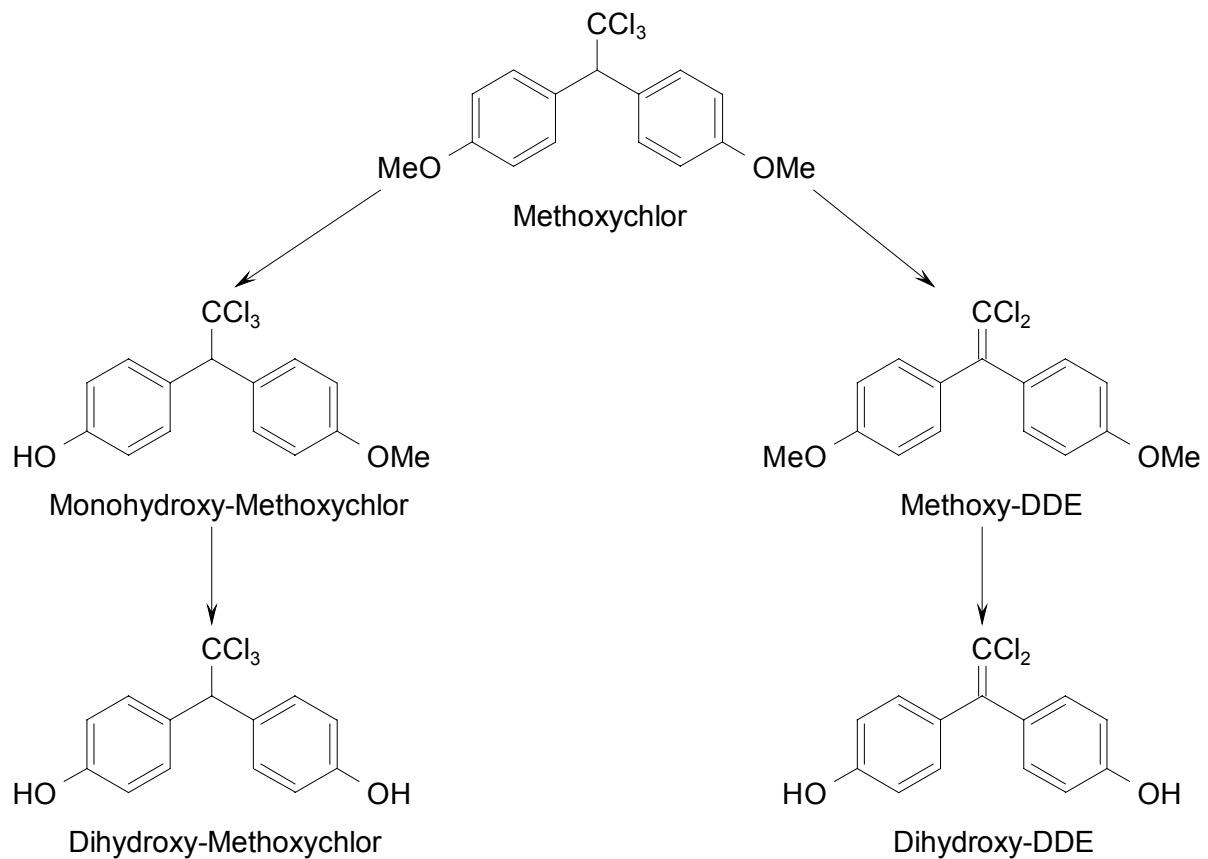


Abbildung 2.10 Metabolismus von Methoxychlor [Kupfer & Bulger 1987, modifiziert]

Nach Exposition von ovariectomierten Spargue-Dawley-CD-Ratten mit reinem Methoxychlor (>99,9%) zeigte sich nur eine geringe Zunahme des Uterusgewichts. Technisches Methoxychlor (95%) mit Dihydroxy-Methoxychlor als Hauptkontaminante war deutlich stärker estrogen aktiv [Bulger et al., 1978].

Methoxychlor ist nicht in der Lage, an die ER-Isoformen der Ratte zu binden. Die Metaboliten Dihydroxy- und Monohydroxy-Methoxychlor zeigten dagegen deutliche Verdrängung von radioaktiv markiertem E₂ [Kupfer & Bulger 1987].

Methoxychlor ist *in vitro* im Hefe-ER α -Reportersystem (vgl. 2.5.2.1.2) im Vergleich zum physiologischen Hormon E₂ nur sehr schwach estrogen aktiv und kann nur eine halbmaximale Reporterogenaktivität induzieren. Dihydroxy-Methoxychlor ist stärker estrogen aktiv (EC₅₀ 0,13 μ M) und erzeugt wie E₂ maximale Reportergeninduktion [Elsby et al., 2000].

Gaido et al. (1999) beobachteten in Transaktivierungsexperimenten eine unterschiedliche Wirkung von Dihydroxy-Methoxychlor auf ER α bzw. ER β : Dihydroxy-Methoxychlor wirkt agonistisch auf ER α . Im Gegensatz dazu wurde antagonistische Aktivität auf ER β beobachtet. Dihydroxy-Methoxychlor ist darüber hinaus auch anti-androgen aktiv [Maness et al., 1998; Gray et al., 1999a].

Insgesamt zeigt sich, dass Methoxychlor selbst nicht bzw. nur gering estrogen aktiv ist und durch Demethylierung zu einem Agonist für ER α und einem Antagonist für ER β und den Androgenrezeptor aktiviert wird. Dieses Beispiel verdeutlicht die wesentliche Rolle des Metabolismus potentieller endokriner Disruptoren und die Notwendigkeit, entsprechende Testansätze zu entwickeln.

2.3.3.2 Polychlorierte Biphenyle (PCB)

Polychlorierte Biphenyle (PCB, Abbildung 2.11) wurden in großen Mengen hergestellt. Sie eignen sich aufgrund ihrer chemischen und thermischen Stabilität und ihren hohen Dielektrizitätskonstanten hervorragend für elektrische Transformatoren und Kondensatoren, als Weichmacher für Kunststoffe und als Hydraulikflüssigkeiten. Es sind 209 Kongenere bekannt, die mittlerweile ubiquitär verteilt sind. PCB sind je nach Substitutionsmuster unterschiedlich persistent. Insbesondere para-ständige Chlorsubstituenten behindern die metabolische Hydroxylierung und damit die Eliminierung der Substanzen.

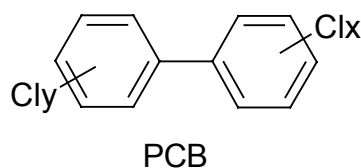


Abbildung 2.11 Polychlorierte Biphenyle [nach Eisenbrand & Metzler, 2001]

PCB induzieren CYP 1A-Enzyme, was zu einem erhöhten Abbau von Steroidhormonen führt. Darüber hinaus stehen sie in Verdacht, estrogene Aktivität zu besitzen. Die Gabe von 10 mg/kg 2,2',6,6'-Tetrachlorbiphenyl (i.p.) an juvenile Sprague-Dawley-Ratten führte zu einer signifikanten Erhöhung des Uterusgewichts im Vergleich zur Negativkontrolle [Arcaro et al., 1999].

Auch in *in vitro* Untersuchungen wurde schwache estrogene Aktivität der PCB Kongenere (2,2',3,4',5,6,6'-Heptachlorbiphenyl und 2,2',4,6,6'-Pentachlorbiphenyl) festgestellt. Ihre p-hydroxylierten Metabolite waren wesentlich stärker estrogen aktiv [Andersson et al., 1999].

Pang et al. (1999) untersuchten die Wirkung verschiedener PCB-Kongenere auf die Induktion von CYP 1A1 und CYP 1B1 in MCF-7-Zellen. Durch 3,4,4',5-Tetrachlorbiphenyl und 3,3',4,4',5-Pentachlorbiphenyl wurde dabei die Metabolisierung von E₂ in behandelten MCF-7-Zellen signifikant erhöht. PCB könnten daher möglicherweise in MCF-7-Zellen ihre Metabolisierung selbst induzieren und in para-Position hydroxyliert und damit zu Estrogenen aktiviert werden.

2.3.3.3 Chrysen

Chrysen (Abbildung 2.12), ein polycyclischer Kohlenwasserstoff (PAK), entsteht bei unvollständigen Verbrennungsprozessen. Es zeigte sich, dass unter den zahlreichen metabolischen Oxidationsreaktionen vor allem die Epoxidierung an der sogenannten „Bay-Region“ (Abbildung 2.12) zur metabolischen Aktivierung führen. Aus diesen Epoxiden kann nicht-enzymatisch das korrespondierende Phenol entstehen. Durch die Epoxidhydrolase werden sie in Dihydrodiole umgesetzt, die ihrerseits erneut epoxidiert werden können. Die entstandenen Diolepoxide können durch die Epoxidhydrolase nur noch unzureichend entgiftet werden und sind in der Lage, kovalent an die DNA zu binden [Nesnow et al., 1998].

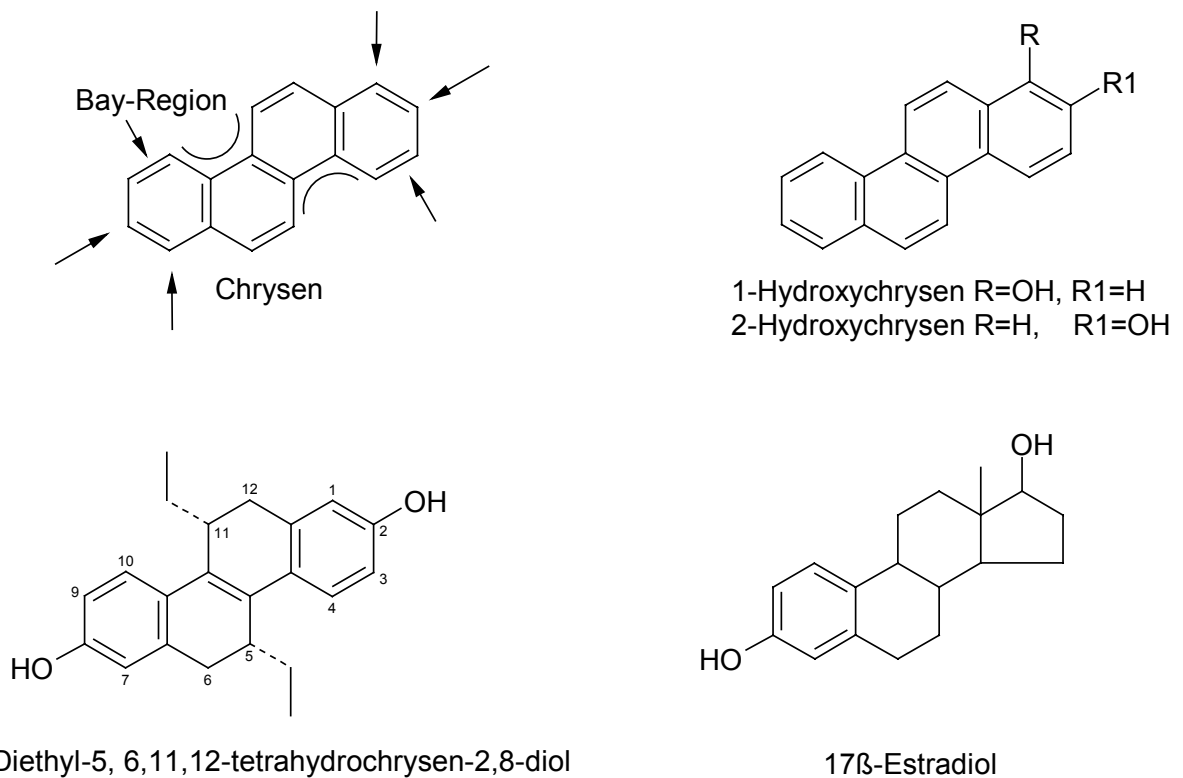


Abbildung 2.12 Strukturformeln von Chrysen, einiger Chrysenmetabolite und 5,11-Diethyl-5,6,11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol. Zum strukturellen Vergleich ist Estradiol dargestellt.

Chrysen ist in transfizierten MCF-7-Zellen schwach estrogen aktiv [Clemons et al., 1998]. Wahrscheinlich spielt auch hier der Metabolismus eine entscheidende Rolle, da Chrysen keine phenolische OH-Gruppe besitzt und so nicht in der Lage sein sollte, an ER-Isoformen zu binden. Untersuchungen von Boyiri et al. (2002) zeigten, dass MCF-7-Zellen in der Lage sind, 6-Nitro-Chrysen in 1,2-Dihydroxy-6-aminochrysen umzusetzen. Es besteht also die Möglichkeit, dass Chrysen durch MCF-7-Zellen in 1,2-Dihydroxychrysen umgewandelt werden könnte. Dieser Metabolit trägt wie fast alle estrogen aktiven Substanzen phenolische OH-Gruppen, so dass die beobachtete estrogene Aktivität von Chrysen möglicherweise auf eine entsprechende Metabolisierung durch MCF-7-Zellen zurückgeführt werden kann.

Untersuchungen von Vinggaard et al. (2000) ergaben antiandrogene Aktivität von Chrysen (IC_{50} 10,3 μ M) in transfizierten CHO-Zellen. Dies könnte eventuell an einer induzierenden Wirkung von Chrysen auf CYP-Isoenzyme liegen, wodurch das zu antagonisierende physiologische Hormon abgebaut wird und so nicht mehr für die Transkriptionsaktivierung zur Verfügung steht.

Nach Entdeckung des zweiten Estrogenrezeptors (ER β) durch Kuiper et al. (1996) und seiner im Vergleich zum bekannten ER α unterschiedlichen Gewebeverteilung (vgl. 2.2.1.1), ist man auf der Suche nach selektiven Liganden der ER-Isoformen α und β . Man hofft dadurch, Chemotherapeutika zu entwickeln, die das Wachstum von Mammatumoren hemmen und gleichzeitig nicht zu einer Proliferationsstimulation anderer estrogenabhängiger Gewebe wie dem Uterus führen, einer nachteiligen Eigenschaft des gängigen Antiestrogens Tamoxifen (vgl. 2.3.4). Mit der Entwicklung des Chrysenderivats 5,11-Cis-diethyl-5,6-11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol (Abbildung 2.12) durch Shiau et al. (2002), scheinen in dieser Hinsicht Fortschritte erzielt worden zu sein. Der in dieser Arbeitsgruppe synthetisierte Chrysenabkömmling ist ein spezifischer Agonist für ER α und ein vollständiger Antagonist für ER β . 5,11-Cis-diethyl-5,6-11,12-tetrahydrochrysen-2,8-diol könnte als Ausgangspunkt für die Entwicklung weiterer Chemotherapeutika dienen, die über eine spezifische Aktivierung bzw. Hemmung einer der beiden ER-Isoformen wirken.

Bei diesen Therapieansätzen sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass Chrysen *in vivo* kanzerogen ist und als planare Substanz CYP-Isoenzyme induzieren kann [Clemons et al., 1998], was zu einem schnelleren Abbau der endogenen Hormone führen könnte.

2.3.4 Antiestrogene

Unter Antiestrogenen versteht man Substanzen, die die Wirkung estrogen aktiver Verbindungen in den Zielgeweben ganz oder teilweise hemmen. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Therapie von estrogenabhängigen Mammakarzinomen. Man kann zwei Typen von Antiestrogenen unterscheiden: komplette Antiestrogene (Typ II) wie ICI 164384 und ICI 182780 (Abbildung 2.13) und Antiestrogene mit partiellen agonistischen sowie antagonistischen Effekten (Typ I). Substanzen, die in die Estrogensynthese eingreifen, wie z.B. Aromatasehemmer, werden ebenfalls zu den Antiestrogenen gezählt. Typ I Antiestrogene werden auch als „Selective Estrogen Receptor Modulator“ (SERM) bezeichnet, da sie auf verschiedene Organe estrogene, aber auch antiestrogene Wirkung haben können.

Ein idealer SERM sollte folgende Eigenschaften haben: Er wirkt auf Mamma und Uterus als potentes Antiestrogen und verhindert so die Proliferation dieser Gewebe. Gleichzeitig sollten sie erwünschte estrogene Eigenschaften, wie z.B. Erhöhung der

Knochenstabilität oder eine protektive Wirkung auf das kardiovaskuläre System aufweisen (vgl. 2.3.2).

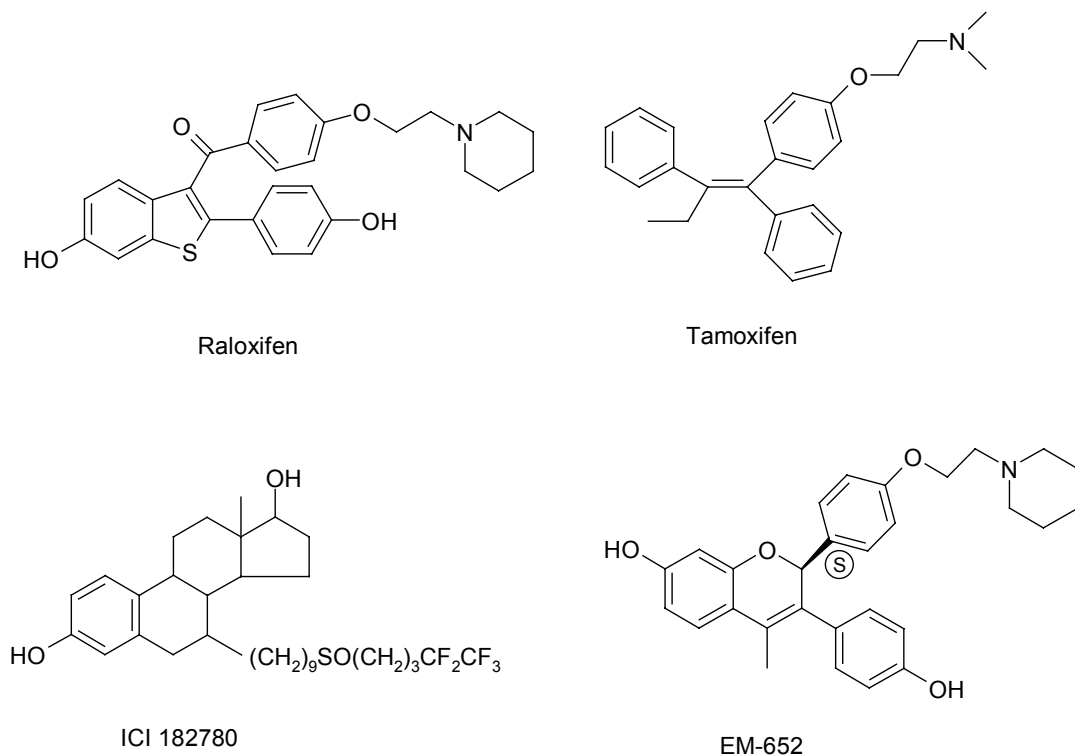


Abbildung 2.13 Strukturformeln einiger Antiestrogene [Andersen et al., 1999]

Ein SERM der ersten Generation, Tamoxifen (Abbildung 2.13), ist ein potentes Antiestrogen der Mamma, wirkt aber gleichzeitig ebenfalls estrogen auf den Uterus, wodurch das Risiko von Endometriumkarzinomen erhöht wird. Zusätzlich wurden in der Rattenleber DNA-Addukte nachgewiesen [Phillips, 2001]. Ob allerdings die erhöhte Inzidenz an Endometriumkarzinomen auf die estrogenen Effekte von Tamoxifen oder auf seine Genotoxizität zurückzuführen ist, ist nicht abschließend geklärt.

Das Benzothiophen Raloxifen (Abbildung 2.13) gilt als SERM der zweiten Generation, da es im Gegensatz zu Tamoxifen partiell agonistisch/antagonistisch auf den Uterus wirkt [Pike et al., 1999]. Mittlerweile ist ein SERM der dritten Generation in der wissenschaftlichen Diskussion (EM-652, Abbildung 2.13), der sowohl auf Mamma als auch auf den Uterus antiestrogen wirkt [Labrie et al., 1999; Gutman et al., 2002].

Die Mechanismen, die der gewebespezifischen Wirkung der SERMs zu Grunde liegen, sind bisher nicht eindeutig geklärt. Möglicherweise spielen dabei mehrere Fakto-

ren eine Rolle, wie z.B. unterschiedliche Effekte der Liganden auf die Transaktivierungsdomäne der ER-Isoformen, Rezeptor-gebundene Koaktivatoren oder auch Zell- und Promotorstruktur [White & Parker, 1998].

Agonisten wie E_2 oder DES verstärken die transkriptionelle Aktivität der ligandabhängigen Aktivierungsfunktion II (AF-II) der ER-Isoformen. Die transkriptionelle Aktivität von AF-II wird durch Typ I und II Antiöstrogene vollständig gehemmt. Dies ist darin begründet, dass die Bindung eines Agonisten die „Agonistposition“ der sogenannten Helix 12 stabilisiert, einer Proteinkonformation, die die Interaktion mit Koaktivatoren erlaubt. Die Bindung eines Antagonisten dagegen führt nicht zu dieser „aktivierenden Position“ der Helix 12 [Brzozowski et al., 1997]. Genistein (Abbildung 2.7) induziert bei $ER\alpha$ die typische „Agonistposition“ der Helix 12. Im Gegensatz dazu nimmt die Helix 12 im $ER\beta$ -Genistein-Komplex die „Antagonistenposition“ ein [Pike et al., 1999]. Gewebespezifische agonistische bzw. antagonistische Eigenschaften könnten demnach auf der unterschiedlichen Gewebeverteilung der beiden ER-Isoformen und auf einer spezifischen Wirkung einer Substanz gegenüber den ER-Isoformen liegen.

Zusätzlich binden ER nicht ausschließlich an EREs, sondern z.B. auch an die „activator protein 1 site“, der Bindungsstelle für den Fos-Jun Transkriptionsfaktor. Wird $ER\alpha$ durch einen Agonisten aktiviert, ist er in der Lage, die Transkription über diese DNA-Bindungsstelle zu aktivieren. Ein von E_2 oder DES belegter $ER\beta$ ist hierzu nicht in der Lage [Gustafsson, 1998].

2.4 Androgenrezeptorliganden

2.4.1 Androgene

2.4.1.1 Funktion

Androgene bewirken die Ausprägung der männlichen sekundären Geschlechtsmerkmale (Behaarungstyp, Körperbau, Kehlkopfgröße, Talgdrüsenaktivität u.a.), regulieren die Spermato- und die Spermiogenese in den Hodenkanälchen sowie Wachstum und Funktion von Genitalien, Prostata und Samenbläschen. Auch die Geschlechtsdifferenzierung wird durch Androgene gesteuert. Nach Festlegung des ge-

netischen Geschlechts, bilden sich die geschlechtsspezifischen Gonaden aus. Die weitere somatische Geschlechtsentwicklung und -differenzierung wird durch Androgene gesteuert und verläuft in Abwesenheit von ihnen zum weiblichen Phänotyp. Androgene wirken anabol, was u.a. zu der stärker entwickelten Muskulatur des Mannes führt. Neben den physiologischen Androgenen wie z.B. Testosteron (Abbildung 2.14) existieren eine Reihe synthetischer Androgene wie die Steroidabkömmlinge Methyltrienolon (R1881, Abbildung 2.14) und Miboleron, sowie in 17-Position methylierte oder an 17 β -Position veresterte Derivate [Murad & Haynes, 1985].

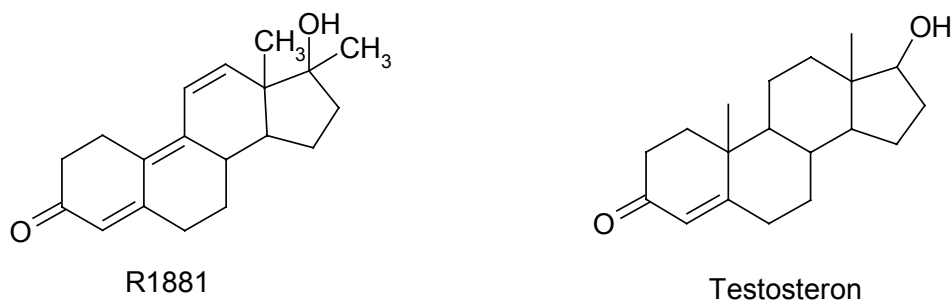


Abbildung 2.14 Strukturformel von Androgenen [Murad & Haynes, 1985]

2.4.1.2 Biosynthese

Die Synthese der Androgene erfolgt in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens, sowie in den Nebennieren und im Ovar, ausgehend von Cholesterin, Pregnenolon bzw. Progesteron über Dehydroepiandrosteron bzw. Androsten-3,17-dion zum Testosteron (Abbildung 2.14). Testosteron wird in den Zielgeweben von der 5 α -Reduktase zu 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) dem physiologisch aktivsten Androgen umgesetzt. [Stryer, 1996]

2.4.1.3 Metabolismus und hormonelle Aktivität

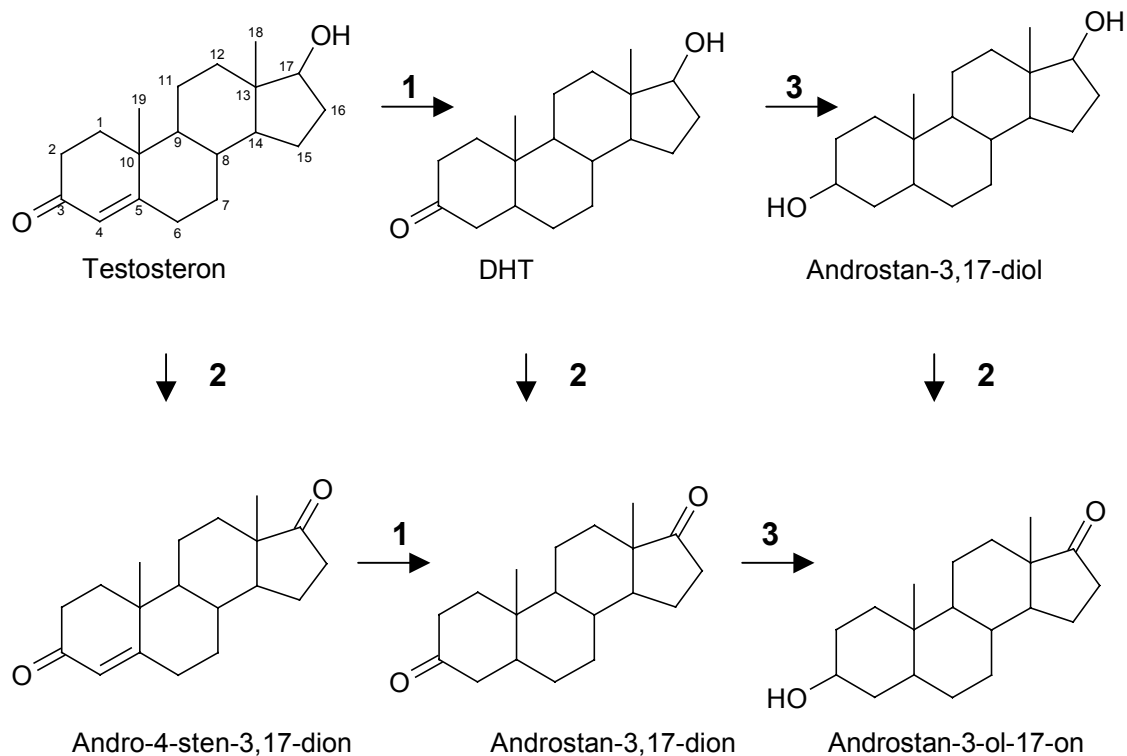
Der Abbau und damit auch die Inaktivierung von DHT erfolgt durch Oxidationen bzw. Reduktionen an den Positionen 3 bzw. 17 zu Androsteron, Androstan-3,17-dion oder Androstan-3,17-diol (Abbildung 2.15), die nicht mehr bzw. nur noch gering androgen

aktiv sind. Sie werden mit aktivierter Glucuronsäure in Position 3 konjugiert und ausgeschieden. [Murad & Haynes, 1985]

Testosteron kann auch in Position 4 zu 4-Hydroxytestosteron hydroxyliert werden, das im Vergleich zu DHT mit verringerter Affinität (Faktor 4) an den Androgenrezeptor bindet [Davies et al., 1992]. 4-Hydroxytestosteron kann zu 4-Hydroxyandrostendion oxidiert werden, das eine stark hemmende Wirkung auf die Aromatase hat [Brodie, 1991].

Testosteron kann nicht nur zu DHT sondern auch zum physiologisch inaktiven 5 β -Dihydrotestosteron reduziert werden, aus dem dann nach 3-Ketoreduktion und 17-Oxidation Etiocholan-3 α -ol-17-on entsteht, das ebenfalls in 3-Position glucuronidiert und ausgeschieden wird [Murad & Haynes, 1985].

Testosteron selbst wird als Glucuronid ausgeschieden. Es kann aber auch durch die Aromatase zu E₂, dem physiologisch aktivsten Estrogen umgesetzt werden. Die Vorstufe des Testosterons, Androst-4-en-3,17-dion, wird durch die Aromatase zu Estron umgesetzt, aus dem seinerseits E₂ gebildet werden kann. [Stryer, 1996]



- 1 5 α -Reduktase
- 2 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
- 3 3 α -Hydroxysteroid-Oxidoreduktase

Abbildung 2.15 Metabolismus von Testosteron [Forth et al., 2001; modifiziert]

Welche Aminosäuren der Ligandbindungstasche des humanen Androgenrezeptors mit dem physiologischen Liganden DHT in Wechselwirkung treten, ist durch kristallographische Untersuchungen festgestellt worden (Abbildung 2.16). Die Ketofunktion in Position 3 von DHT tritt mit den Aminosäuren Glutamin⁷¹¹ und Arginin⁷⁵² vermutlich über Wasserstoffbrücken in Kontakt. Position 18 scheint mit Threonin⁸⁷⁷, Position 19 mit Methionin⁷⁴⁵ zu interagieren. Die Hydroxyfunktion in Position 17 steht in Wechselwirkung mit Asparagin⁷⁰⁵ und Threonin⁸⁷⁷ [Sack et al., 2001]. Da die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen der Ligandbindungstasche und dem physiologischen Liganden DHT nicht ausgesprochen spezifisch sind, zeigt der Androgenrezeptor eine

gewisse Crossreaktivität mit anderen Steroidhormonen wie E_2 oder Progesteron, die in einer 100-fach höheren Konzentration etwa 10% der Aktivierung von DHT vermitteln können [Roy et al., 2001].

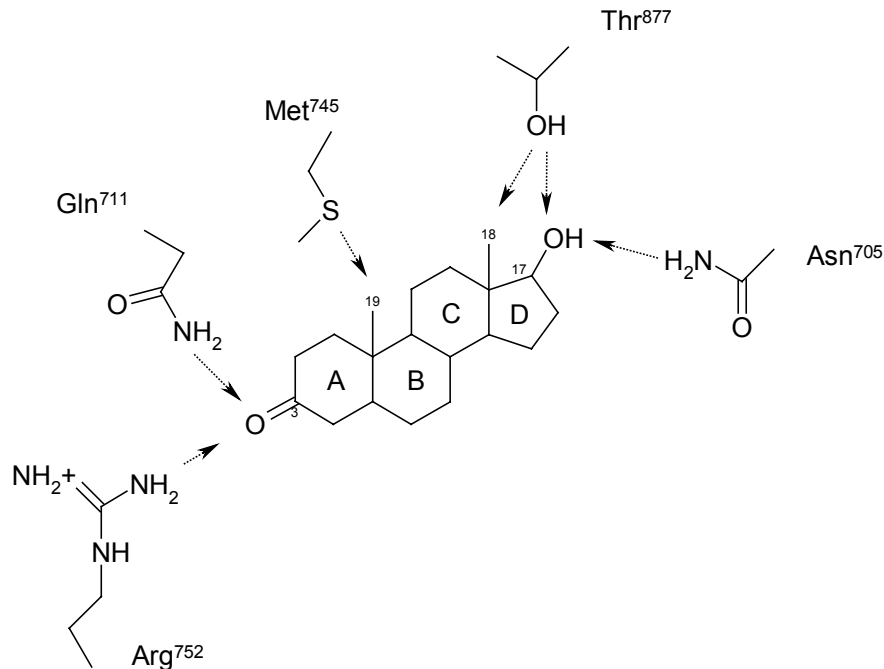


Abbildung 2.16 Darstellung der Ligandbindungstasche des Androgenrezeptors in Wechselwirkung mit dem physiologischen Liganden DHT [nach Sack et al., 2001]

2.4.2 Antiandrogene

Antiandrogene konkurrieren kompetitiv mit dem physiologischen Hormon DHT um den Androgenrezeptor. Sie binden zwar an den Androgenrezeptor, können aber keine Bindung an die DNA vermitteln und auch keine Transkriptionsaktivierung auslösen [Kelce et al., 1996].

Bei der Behandlung von hormonabhängigem Prostatakrebs haben sich vor allem die Antiandrogene Flutamid und Cyproteronacetat (Abbildung 2.17) bewährt. Cyproteronacetat ist ein steroidaler Vertreter der Antiandrogene mit partiellen agonistischen, sowie gestagenen Eigenschaften. Zu den nichtsteroidalen Antiandrogenen gehört neben Bicalutamid (Casodex®) auch Flutamid, das *in vitro* nur schwach antiandrogen aktiv ist. Der Hauptmetabolit im Blutplasma, Hydroxyflutamid, zeigt dagegen *in vitro* starke antiandrogene Aktivität und äußert in hohen Dosen auch schwache an-

drogene Eigenschaften [Wong et al., 1995]. Untersuchungen mit rekombinanten CYP-Isoenzymen ergaben, dass CYP 1A2 für die Bildung von Hydroxyflutamid verantwortlich ist [Shet et al., 1997]. *In vivo* führt die Verabreichung von Flutamid zur Reduktion von Prostata und Samenblasengewicht [Kelce et al., 1997].

Weitere bekannte Antiandrogene sind die Vinclozolin Metabolite M1 und M2 (Abbildung 2.17). Das Carboximidfungizid Vinclozolin ist *in vitro* nicht antiandrogen aktiv [Wong et al., 1995], führt aber *in vivo* z.B. zu einer Beeinträchtigung der sexuellen Differenzierung männlicher Nachkommen [Gray et al., 1994] und einer Veränderung in der Expression androgenabhängiger Gene [Kelce et al., 1996].

Als etabliertes Antiandrogen ist auch DDE (Abbildung 2.17), ein Metabolit von DDT, zu nennen. DDE bindet den Androgenrezeptor *in vitro* und hemmt in Koinkubationsexperimenten die Transkription DHT-induzierbarer Gene. Auch *in vivo* beeinflusst DDE die Expression androgenabhängiger Gene in antiandrogener Weise. Männliche Nachkommen von Ratten, die mit 100 mg/kg Körpergewicht DDE behandelt wurden, zeigten Veränderungen der Geschlechtsorgane wie z.B. erniedrigte Prostatagewichte [Gray et al., 1999]. Besonders interessant an dieser Verbindung ist, dass eine nicht bzw. nur schwach estrogen aktive Substanz (DDT) zu einer stark antiandrogen aktiven Verbindung (DDE) aktiviert wird.

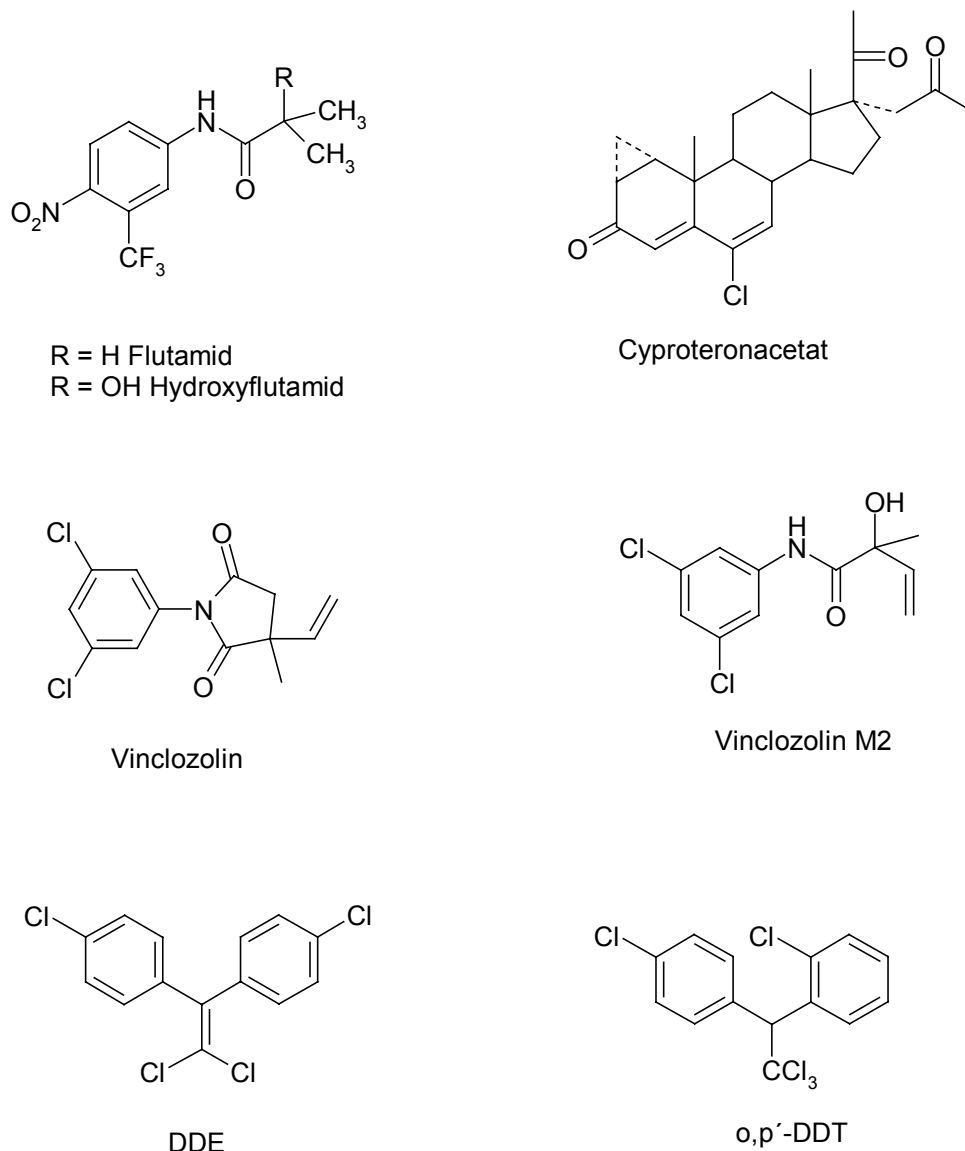


Abbildung 2.17 Strukturformeln von bekannten Antiandrogenen und des Estrogenrezeptorliganden o,p'-DDT [Kelce et al., 1996]

2.4.2.1 Dicofol

Das nicht systemische Kontaktakarizid Dicofol (Kelthane, Abbildung 2.18) wird hauptsächlich zum Schutz von Baumwolle, Zitrusfrüchten und Erdbeeren vor Spinnmilben eingesetzt [IARC Monograph 1983]. 50% der ausgebrachten Gesamtmenge entfallen auf Baumwolle, 30% auf Zitrusfrüchte. 80% des Dicofols liegt in einer Formulierung p,p'-substituiert, die restlichen 20% o,p'-substituiert vor [EPA RED, 1998].

Swiss-Webster-Mäuse metabolisieren Dicofol (30 mg/kg Körpergewicht) nach i.p. Gabe zu Dechloridicofol (Abbildung 2.18), Dichlorbenzophenon (DCBP) und Dichlorbenzhydrol (DCBH). Berichte über DDE als Metabolit von Dicofol sind wahrscheinlich auf eine Verunreinigung mit α -Chlordicofol zurückzuführen, das *in vitro* durch Rattenlebermikrosomen zu DDE umgesetzt wurde [Brown & Casida, 1987].

Nach einmaliger, oraler Gabe von 50 mg/kg Körpergewicht Dicofol an Sprague-Dawley-Ratten wurde im Fäzes Dechloridicofol, DCBH und am Aromaten hydroxyliertes DCBP bzw. DCBH nachgewiesen. Zusätzlich zu Dechloridicofol, DCBH und DCBP wurde im Urin Dichlorbenzilsäure und p-Chlorbenzoesäure in Form von Glycinkonjugaten detektiert. [EPA RED, 1998]

DCBP wird *in vitro* durch Rattenlebermikrosomen zu DCBH reduziert [Yoneyama & Matsumura, 1981], das schnell wieder zu DCBP reoxidiert werden kann [Knowles & Ahmad, 1971].

Weitere Quellen für DCBP sind DDT, sowie die Akarizide Chlorbenzilat und Chlorpropylat. DDT kann *in vivo* durch Oxidation am zentralen C-Atom in Dicofol überführt werden (Abbildung 2.18). Regenbogenforellen metabolisierten DDE zu DCBP [Menzie, 1980]. Die Akarizide Chlorbenzilat und Chlorpropylat (Abbildung 2.18) wurden *in vitro* durch nicht-induzierte Rattenlebermikrosomen zu DCBP und DCBH umgesetzt [Knowles & Ahmad, 1971].

In der Literatur sind Hinweise auf einen nicht-enzymatischen Abbau von Dicofol zu DCBP vorhanden. Es werden alkali-induzierte [Walsh & Hites, 1979; Reeve et al., 1980; Nome et al., 1981] bzw. UV-Licht-induzierte [Chen et al., 1984; Brown et al., 1986] Prozesse diskutiert.

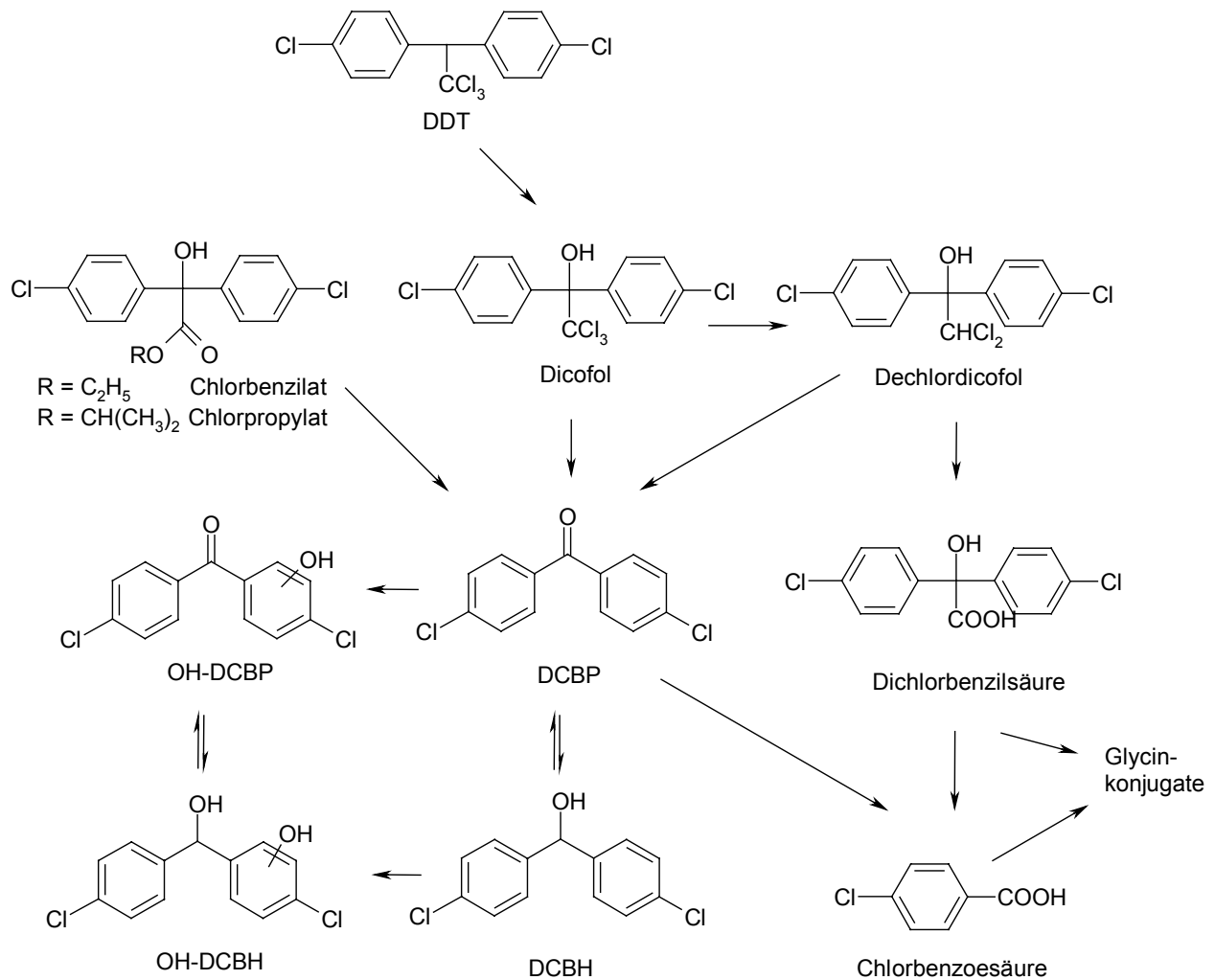


Abbildung 2.18 Metabolismus von Dicofol [Brown & Casida, 1987; modifiziert]

Nach Hinweisen aus der Literatur ist Dicofol schwach estrogen aktiv. *In vitro* bindet Dicofol sehr schwach an den ER des amerikanischen Alligators [Vonier et al., 1996]. Im „E-Screen-Assay“ (vgl. 2.5.2) in estrogenabhängig wachsenden MCF-7-Zellen wurde ein schwach wachstumsfördernder Effekt beobachtet [Du & Xu, 2001], der durch Untersuchungen von Vinggaard et al. (1999) allerdings nicht bestätigt wurde. In ER α -exprimierenden Hefezellen wurde schwache estrogen Aktivität von Dicofol festgestellt.

In vivo sind Hinweise auf potentielle hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität von o,p'-Dicofol vorhanden. Die Exposition von amerikanischen Turmfalken (*Falco sparverius*) mit 20 mg/kg KG über zwei Generationen führte u.a. zur Reduktion des Aufzuchtserfolgs und Testesabnormalitäten (verlängerter Testes, helles durchschein-

des Gewebe) bei männlichen Nachkommen bzw. abnormaler Ovarmorphologie bei weiblichen Nachkommen [MacLellan et al., 1996 und 1997].

Das Umwandlungsprodukt von Dicofol DCBP zeigte *in vitro* antiandrogenes Potential. Die durch 100 nM DHT-induzierte Reporterogenaktivität wurde durch 10 µM DCBP in Transaktivierungsexperimenten um 40% gehemmt. [Guth, 2000]

Diese Daten legen den Schluss nahe, dass der Rückgang der Alligatorpopulation im Lake Apopka (vgl. Kapitel 1) nach Kontamination mit Dicofol und DDT nicht ausschließlich durch schwache estrogene Effekte von o,p'-DDT bzw. starke antiandrogene Effekte von DDE verursacht wurde. Die möglicherweise leicht estrogene Aktivität von Dicofol bzw. das antiandrogene Potential von DCBP müssen ebenfalls in Betracht gezogen werden. Der Hersteller von Dicofol, die Rohm & Haas Company, sieht aber trotz oben genannter Daten Dicofol bzw. sein Umwandlungsprodukt DCBP nicht als Ursache für die beobachtete Abnahme des Alligatorbestandes im Lake Apopka an [EPA RED, 1998].

2.4.2.2 Linuron

Linuron (N-(3,4-Dichlorphenyl)-N'-methoxy-N'-methyl-harnstoff, Abbildung 2.19) wird als Herbizid im Getreide und Gemüseanbau eingesetzt. *In vitro* und *in vivo* Untersuchungen ergaben antiandrogene Aktivität von Linuron.

Sowohl Linuron als auch seine Metabolite N-(3,4-Dichlorphenyl)-N'-methyl-harnstoff (Linuron M2), N-(3,4-Dichlorphenyl)-harnstoff (Linuron M1), 3,4-Dichloranilin (DCA) und 3,4-Dichloranilinacetanilid (Abbildung 2.19) binden mit geringer Affinität an den AR verschiedener Spezies [Cook et al., 1993; Lambright et al., 2000; Bauer et al., 1998]. In transienten Transaktivierungsassays wurde eine Reduktion der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität durch Linuron um 50-60% beobachtet [Lambright et al., 2000; Guth 2000].

In vivo Versuche mit adulten und juvenilen, männlichen Ratten, die mit 200 mg/kg Linuron behandelt wurden, führten nach zwei Wochen zu einer Abnahme des Gewichts der Geschlechtsorgane. Die Spiegel an Testosteron, E₂ und Luteinisierendem Hormon waren dabei, vermutlich aufgrund der fehlenden negativen Rückkopplung, erhöht [Cook et al., 1993]. Ähnliche Resultate wurden von anderen Arbeitsgruppen erhalten [Lambright et al., 2000; Gray et al., 1999], wobei auch bei den männlichen

Nachkommen reduzierte Gewichte der Geschlechtsorgane festgestellt wurden. Zusätzlich kam es zu einer im Vergleich zur Negativkontrolle veränderten Expression androgenabhängiger Gene [Gray et al., 1999; Lambright et al., 2000].

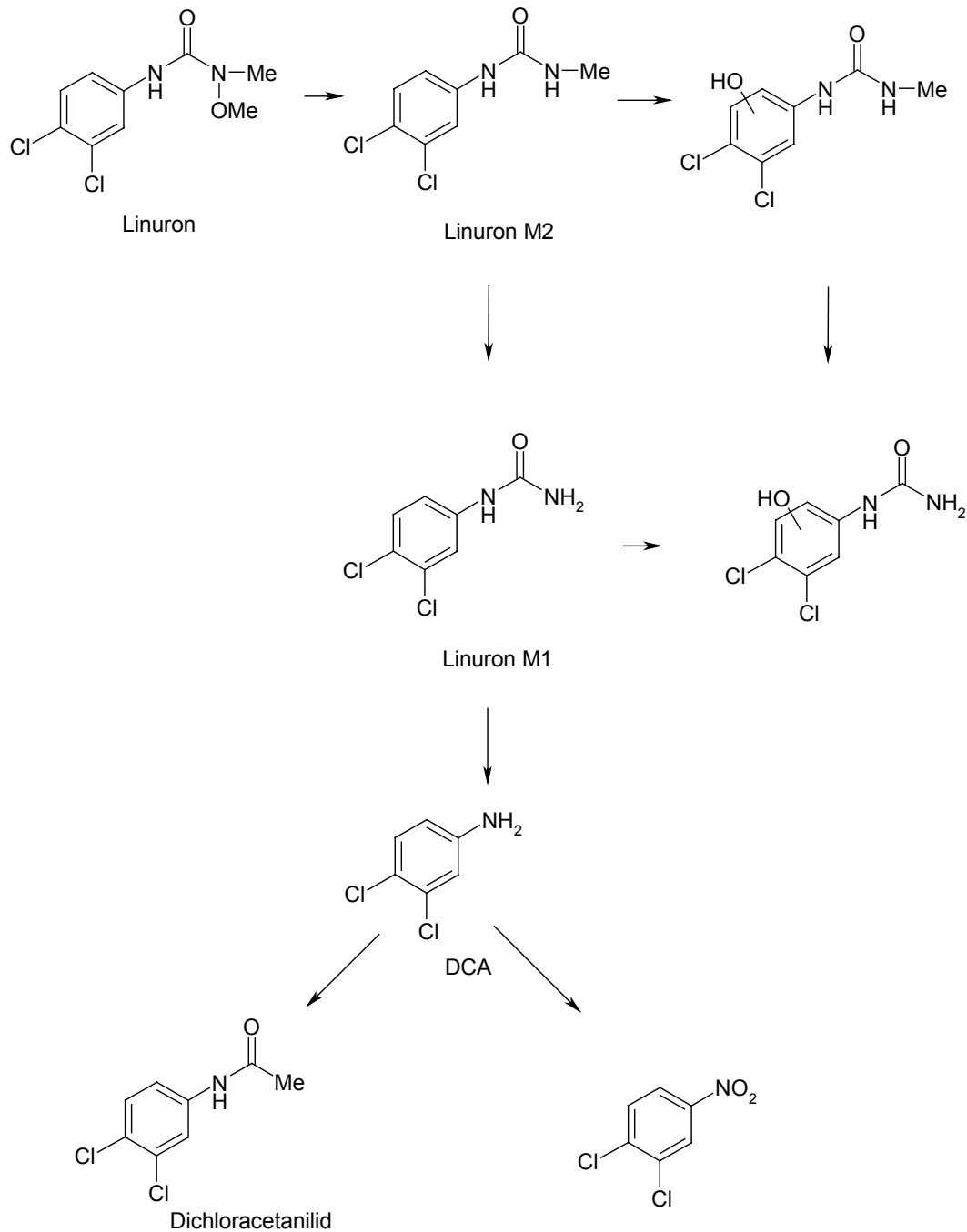
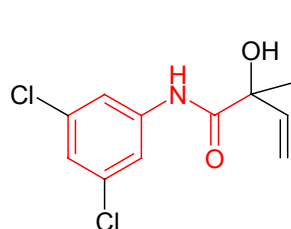


Abbildung 2.19 Metabolismus von Linuron [Kearny & Kaufman, 1975; modifiziert]

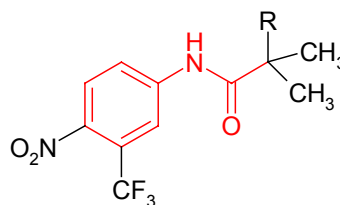
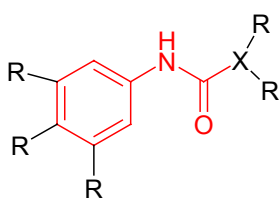
2.4.2.3 Strukturelle Betrachtungen

Unter Berücksichtigung der bekannten Antiandrogene Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2 ließen sich anhand von „molecular-modelling“-Verfahren Strukturmerkmale für potentiell antiandrogene Substanzen ableiten [Mußler, 1999]. Hydroxyflutamid und Vinclozolin M2 sind Carbonsäureanilide. Dieses Strukturelement findet man auch bei Phenylharnstoffherbiziden (Abbildung 2.20).

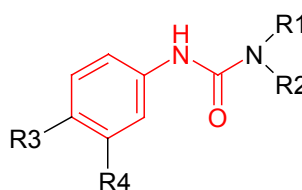
Untersuchungen von Guth (2000) zeigten, dass Vertreter der Phenylharnstoffherbizide wie Linuron, Diuron, Fluometuron und Metobromuron unabhängig vom Substitutionsmuster am Phenylring *in vitro* antiandrogen aktiv sind. Nicht-N'-substituierter Phenylharnstoff ist im Gegensatz zu den N'-substituierten Phenylharnstoffen nicht antiandrogen aktiv.



Vinclozolin M2

R = H Flutamid
R = OH Hydroxyflutamid

Carbonsäureanilide X = C oder N



R1	R2	R3	R4	
OCH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Linuron
CH ₃	CH ₃	Cl	Cl	Diuron
CH ₃	CH ₃	H	CF ₃	Fluometuron
OCH ₃	CH ₃	Br	H	Metobromuron
H	H	H	H	Phenylharnstoff

Abbildung 2.20 Strukturmerkmal Carbonsäureanilid (rot markiert) antiandrogen aktiver Substanzen [Mußler, 1999; Guth, 2000; modifiziert]

Vergleicht man die Strukturen des etablierten Antiandrogens DDE mit denen einiger Benzophenone wie des Antiandrogens Dihydroxybenzophenon [Guth, 2000], kann man ebenfalls ein gemeinsames Strukturmerkmal erkennen (Abbildung 2.21). Beide Verbindungen sind am zentralen C-Atom sp^2 -hybridisiert. In direkter Nachbarschaft zu diesem C-Atom befinden sich zwei Phenylreste. Unterschiede liegen in der Keto-funktion des Benzophenons im Vergleich zur Dichlorethenbindung des DDEs. Mit Hilfe dieser Strukturmerkmale wurde von Mußler (1999) ein zweites Strukturelement für antiandrogen aktive Substanzen, die Diarylketonstruktur, abgeleitet.

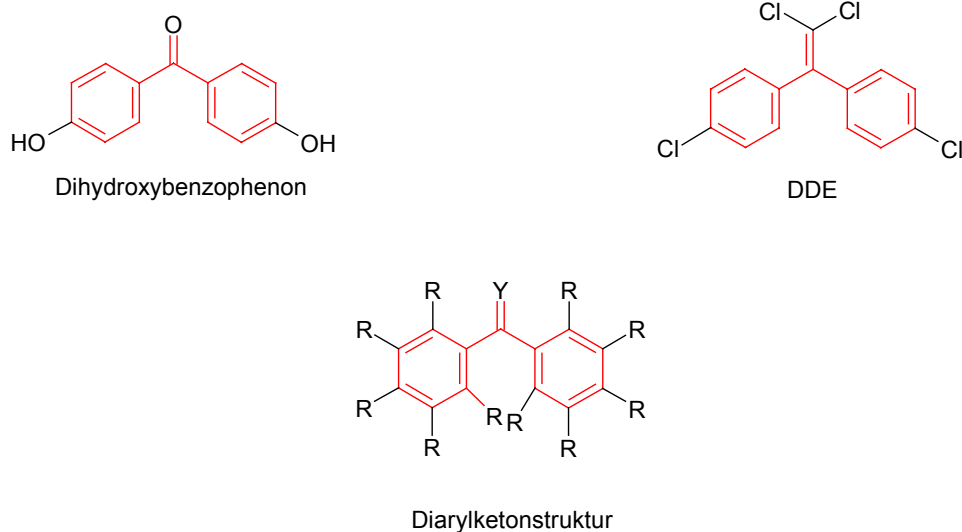


Abbildung 2.21 Strukturmerkmal Diarylketon (rot markiert) [Mußler, 1999; Guth, 2000; modifiziert]

2.4.2.4 Xanthohumol

Das prenylierte Chalcon Xanthohumol (Abbildung 2.22) ist das Hauptchalcon des Hopfens (*Humulus lupulus*). Es rückte aufgrund potentieller chemopräventiver Eigenschaften in das Interesse von Wissenschaft und Öffentlichkeit. Xanthohumol kann *in vitro* die Aktivierung von Prokarzinogenen durch Hemmung von CYP-Isoenzymen verringern [Miranda et al., 2000; Henderson et al., 2000] und induziert die Bildung der Chinonreduktase in Hepa 1c1c7-Zellen [Miranda et al., 2000a]. Xanthohumol ist in der Lage, das Zellwachstum von Krebszelllinien im mikromolaren Bereich zu hemmen [Miranda et al., 1999]. Als Chalcon zeichnet sich Xanthohumol darüber hin-

aus durch seine antioxidativen Eigenschaften aus [Miranda et al., 2000b]. Zu den intrinsischen protektiven Effekten von Xanthohumol, liegen in der Literatur auch Hinweise auf eine Hemmung von Effluxpumpen vor [Conseil et al., 2000]. Wie die Autoren zeigten, sind einige prenylierte Flavonoide wie 6-Prenylchrysin oder 8-Prenylgalangin in der Lage, ABC-Transporter zu hemmen. Xanthohumol könnte also auch den Export von Stoffen wie Chemotherapeutika aus Tumorzellen hemmen.

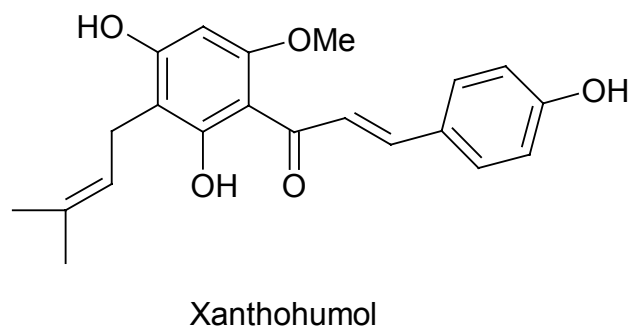


Abbildung 2.22 Strukturformel von Xanthohumol [Miranda et al., 1999]

Die estrogene Aktivität der weiblichen Hopfenblüten, die beim Bierbrauen als geschmacksgebende Komponente zum Einsatz kommen, ist seit langem bekannt. Verantwortlich hierfür ist wahrscheinlich 8-Prenylnaringenin (Abbildung 2.23), ein Flavanon, das stärker estrogen aktiv zu sein scheint, als die seit langem bekannten Phytoestrogene Genistein oder Coumestrol [Milligan et al., 1999 und 2000]. Vergleicht man die relativen Bindungsaffinitäten (RBA) von Naringenin und 8-Prenylnaringenin (Abbildung 2.23) an die Estrogenrezeptoren der Ratte, erhält man deutliche Unterschiede in der Affinität: Naringenin (RBA 0,0075, [Fang et al., 2001]) bindet mit geringerer Affinität an die Estrogenrezeptoren als 8-Prenylnaringenin (RBA 0,023, [Milligan et al., 1999]). Der Prenylrest hat demnach einen entscheidenden Einfluss auf die estrogene Aktivität von Flavonoiden, da die Affinität für den Estrogenrezeptor signifikant erhöht wird.

Trotz struktureller Ähnlichkeit zu dem als estrogen aktiv geltenden Chalcon Licochalcon A [Rafi et al., 2000] zeigte Xanthohumol keine estrogenen [Milligan et al., 1999 und 2000], allerdings ausgeprägte antiestrogene Eigenschaften [Gerhäuser et al., 2002].

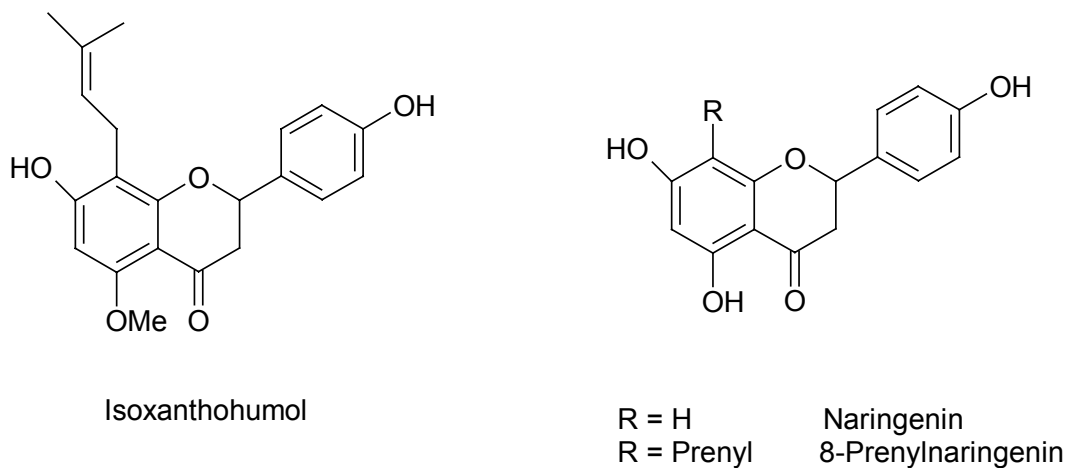


Abbildung 2.23 Strukturformeln von Isoxanthohumol und 8-Prenylnaringenin [Miranda et al., 2000]

Xanthohumol wird beim Brauprozess zu Isoxanthohumol, einem prenyliertem Flavanon, umgesetzt [Stevens et al., 1999a], das sich nur durch eine Methoxygruppe in Position 5 von 8-Prenylnaringenin (Abbildung 2.23) unterscheidet. Diese Methoxygruppe könnte leicht durch CYP-Isoenzyme entfernt werden. Aus Isoxanthohumol, das keine Affinität zu den ER-Isoformen zeigte und im Hefe-Testsystem nicht estrogen aktiv ist [Milligan et al., 2000], entstünde so 8-Prenylnaringenin.

Es sollte untersucht werden, ob das potentielle krebsspräventive Xanthohumol nicht auch *in vivo* über Isoxanthohumol zu 8-Prenylnaringenin umgesetzt wird und so eine intrinsische estrogen Aktivität äußert.

Die Chalconstruktur von Xanthohumol lässt sich zusammengesetzt aus dem Strukturelement eines Benzophenons (blaue Markierung in Abbildung 2.24) und eines Stilbens (rote Markierung) vorstellen. Bei Vergleich der Chalconstruktur mit der Diarylketonstruktur, sind Ähnlichkeiten zu erkennen: Beide Substanzen tragen in direkter Nachbarschaft zum sp^2 -hybridisierten, zentralen C-Atom eine Phenylgruppe (Abbildung 2.24). Durch die Einführung einer Vinylgruppe, wird der zweite Phenylrest vom zentralen C-Atom entfernt und das Molekül insgesamt vergrößert. Wie die Diarylketone ist das Molekül planar. Möglicherweise ließe sich das Diarylketonmerkmal für potentielle antiandrogene Aktivität auf die Gruppe der Chalcone erweitern.

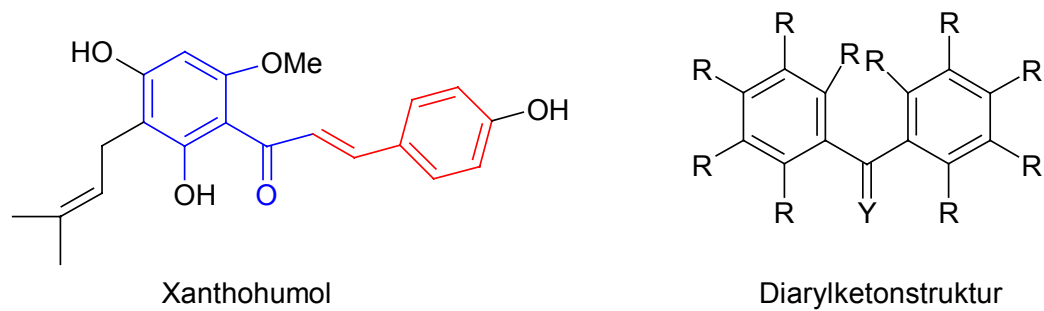


Abbildung 2.24 Darstellung von Xanthohumol. Blau markiert ist das Strukturelement eines Benzophenons, das eines Stilbens ist rot markiert. Zum Vergleich ist die Diarylketonstruktur dargestellt.

2.5 Testmethoden

2.5.1 *In vivo* Modelle

Eine der am häufigsten genutzten *in vivo* Untersuchungen zur Bestimmung des estrogenen Potentials einer Substanz ist der uterotrophe Assay, bei dem die Zunahme des Uterusgewichts untersucht wird. Als eindeutigster Test zur Bestimmung der estrogenen Aktivität gilt bei Nagern jedoch die Untersuchung der vaginalen Verhornung. [Zacharewski, 1998]

Die Bestimmung androgener bzw. antiandrogener Potenz *in vivo* erfolgt über das Gewicht androgen-abhängiger Organe wie Hoden, Nebenhoden, Samenblase und Prostata. [Ashby & Lefevre 2000]

Der Einfluss von hormonell bzw. antihormonell aktiven Verbindungen auf Geschlechtsdifferenzierung und Entwicklung kann in Mehrgenerationenstudien untersucht werden.

Der Vorteil der vorgestellten *in vivo* Systeme ist, dass Parameter wie Metabolismus, Pharmakokinetik und Wechselwirkungen der Substanzen mit Plasmaproteinen, die die Aufnahme der Testsubstanz in die Zellen beeinflussen, mitberücksichtigt werden. Die Nachteile liegen im hohen Zeit- und Arbeitsaufwand.

2.5.2 *In vitro* Modelle

Relative Bindungsaffinität (RBA)

In Bindungsstudien mit Zell- oder Kernextrakten relevanter Zelllinien oder mit rekombinanten Steroidhormonrezeptoren kann die relative Bindungsaffinität von Testsubstanzen an Steroidhormonrezeptoren, sowie die Verdrängung des natürlichen Liganden aus seiner spezifischen Bindung untersucht werden [Korenman, 1970]. Der resultierende RBA-Wert drückt lediglich die Affinität der Testsubstanz zum Rezeptor, nicht aber das Potential der Rezeptoraktivierung oder –hemmung aus. Es ist daher nicht möglich, eine Testsubstanz als Agonisten oder Antagonisten zu identifizieren.

Band-Shift-Untersuchungen

Beim Band-Shift-Assay wird die Bindung von Rezeptordimeren des Zelllysats an ^{32}P oder Digoxigenin-markierte SREs untersucht. Da die Rezeptordimere nur nach vorangegangener Aktivierung in der Lage sind, an diese DNA-Sequenzen zu binden, gibt diese Untersuchungsmethode auch Aufschluss über das Aktivierungspotential der Testsubstanz. [Garner & Revzin 1986; Ramanujam et al., 1990; Ikeda & Oda, 1993]

E-Screen-Assay

Beim E-Screen-Assay wird untersucht, ob die Testsubstanz die Proliferation estrogenabhängig wachsender Zelllinien, wie z.B. MCF-7-Zellen, stimuliert. Endpunkt der Untersuchung ist die Messung des Lebend-Proteingehalts der inkubierten Zellen im Vergleich zur Negativ- und Positivkontrolle. [Soto & Sonnenschein, 1995]

Ein Nachteil dieser Untersuchungsmethode ist, dass eine Stimulation der Zellteilung nicht unbedingt auf Wechselwirkungen mit den ER-Isoformen basieren muss. Die Testsubstanzen könnten auch über andere Signaltransduktionswege und somit ER-unabhängig die Zellteilung beeinflussen. Ein Beispiel für ER-unabhängige Beeinflussung der Proliferation ist der bei dem schwachen Estrogen DDT beobachtete Proliferationsstimulus in der ER-negativen Zelllinie MCF-10A [Shen et al., 1997].

Induktion hormonell abhängiger Genexpression

Als Maß für die hormonelle Aktivität von Testsubstanzen kann auch der Einfluss auf die hormonabhängige Genexpression untersucht werden. Als Beispiel sei das pS2-Gen genannt, das estrogenabhängig exprimiert wird. Die Genprodukte können mit den verschiedensten molekularbiologischen und biochemischen Methoden (RT-PCR, ELISA oder Western-Blot u.a.) nachgewiesen werden. Es ist allerdings auch möglich, transgene Ansätze mit Hilfe eines Reporter-genverfahrens durchzuführen.

2.5.2.1 Reporter-genverfahren

Unter Reporter-genen versteht man Gene, die in der Wirtszelle endogen nicht vorkommen und deren Genprodukte nach einem Gentransfer durch einfache und spezifische Reaktionen nachweisbar sind. Zum Erreichen ihrer vollen Aktivität sollten die Expressionsprodukte keiner posttranslationalen Modifikation bedürfen und eine hohe Stabilität aufweisen. Die Reporter-gensequenzen werden in Vektorplasmide kloniert, mit denen sie in verschiedenste Zelllinien eingeschleust werden können. Vor der kodierenden Sequenz liegt ein Promotor, welcher die Expression des Reporter-gens kontrolliert. Mit Hilfe von Reporter-genen können unbekannte Sequenzen auf regulatorische Aktivität untersucht, Einblicke in Signaltransduktionswege gewonnen oder Substanzen auf ihre transkriptionelle Potenz untersucht werden. [Alam & Cook, 1990] Gängige Reporter-gene sind die Leuchtkäfer-Luciferase (*Luc*), bakterielle Luciferase, β -Galactosidase (*lacZ*), Aequorin („Green Fluorescence Protein“), sekretierbare placentare alkalische Phosphatase und mit geringerer Bedeutung Chloramphenicolacetyltransferase [Alam & Cook, 1990].

Im Folgenden soll auf die in dieser Arbeit verwendeten Reporter-gene und Testsysteme näher eingegangen werden.

Luciferasen

Es konnten bisher sieben pro- und eukaryontische Luciferasegene isoliert und sequenziert werden. Die Leuchtkäfer-Luciferase mit einem Molekulargewicht von 62 kDa von *Photinus pyralis* enthält weder prosthetische Gruppen noch Metallionen oder Disulfidbrücken und muss somit nicht posttranslational modifiziert werden. Die En-

zymaktivität der Luciferase wird durch die Umsetzung von Luciferin zu Oxyluciferin bestimmt (Reaktionsmechanismus Abbildung 2.25). Hierbei wird zunächst in einer ATP- und magnesiumabhängigen Reaktion aus Luciferin eine Acyl-AMP-Zwischenstufe gebildet, die dann in Gegenwart von molekularem Sauerstoff oxidiert und zum angeregten Oxyluciferin decarboxyliert. Beim Rückfall der angeregten Elektronen in den Grundzustand werden Photonen emittiert. [Alam & Cook, 1990; Bronstein et al., 1994; Hartmann, 1991]

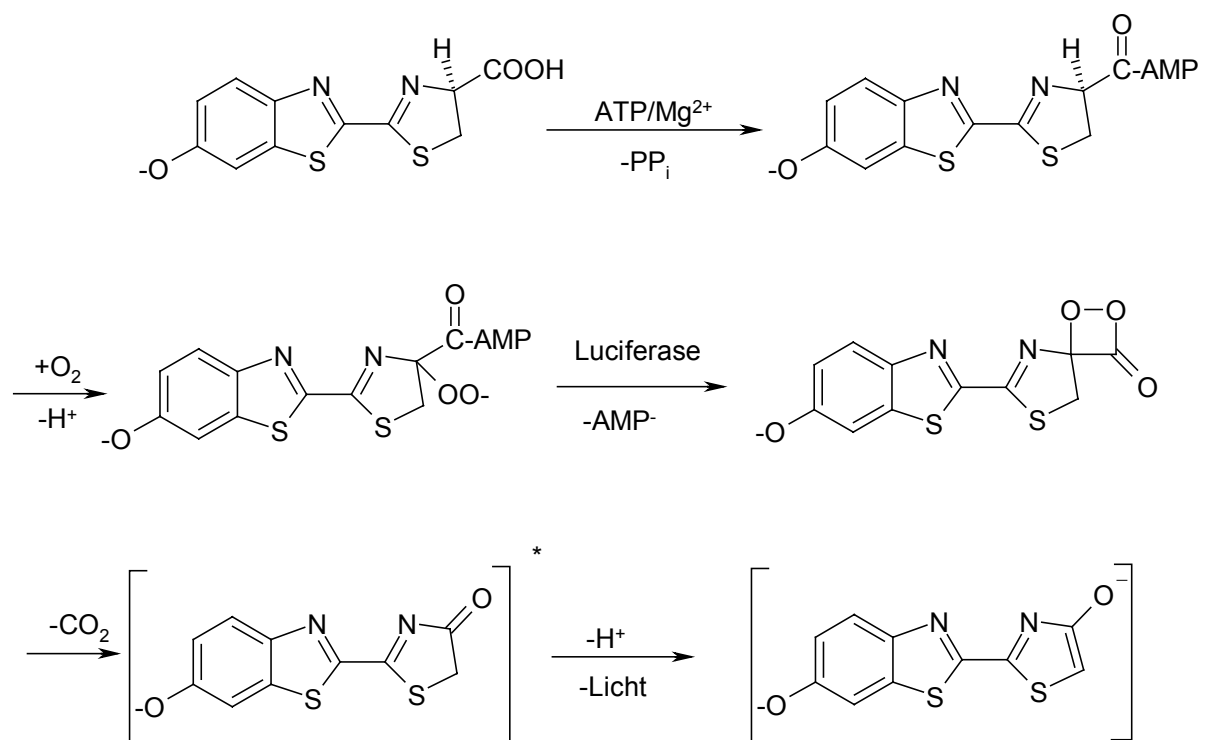


Abbildung 2.25 Reaktionsmechanismus der Leuchtkäfer Luciferase [Hartman, 1991; modifiziert]

β -Galactosidase

β -Galactosidasen katalysieren die Hydrolyse von β -Galactosiden, wie beispielsweise Lactose. Als Reporter gen wird das *lacZ*-Gen von *Escherichia coli* verwendet und häufig als internes Kontrollgen zum Abgleich unterschiedlicher Transfektions-effizienzen eingesetzt. Um die transfizierte β -Galactosidase von endogener β -Galactosidase zu unterscheiden, werden die unterschiedlichen pH-Optima der Enzyme ausgenutzt.

Eukaryontische β -Galactosidasen arbeiten bei einem leicht sauren pH-Wert, bakterielle β -Galactosidasen dagegen bei pH 8 [Alam & Cook, 1990].

Die Enzymaktivität der β -Galactosidase kann photometrisch oder luminometrisch nachgewiesen werden. Beim photometrischen Verfahren wird gelbes Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid zu rotem Chlorphenolrot umgesetzt. Die gebildete Menge an Chlorphenolrot wird dann bei 540 nm gemessen. Im Gegensatz zum photometrischen Verfahren, dessen Nachweisgrenze bei ca. einer Milliarde Moleküle liegt, können mit der Lumineszenzreaktion noch zehntausend Moleküle nachgewiesen werden. Das Substrat (GalactonTM), ein β -D-Galactopyranosid-verknüpftes 1,2-Dioxetan, wird vom Enzym β -Galactosidase zu einem Dioxetan-Anion umgesetzt, das Photonen emittiert [Clontech, 1999].

2.5.2.1.1 MCF-7-Luc-Testsystem

MCF-7-Luc-Zellen (MVLN-Zellen) entstanden durch stabile Transfektion der Mammarkarzinomzelllinie MCF-7, die endogen beide ER-Isoformen exprimiert, mit dem Plasmid pVITtk-Luc. pVITtk-Luc codiert für das Reporter-gen *Luc*, vor das der Vitellogenin A2 (VIT-A2)-Promotor des afrikanischen Krallenfroschs (*Xenopus laevis*) geschaltet ist. An diesen Promotor ist ein Signalverstärker, der Promotor des Thymidinkinasegens (*tk*) des Herpes Simplex-Virus, gekoppelt. [Pons et al., 1990]

Vitellogenin, das in der Leber von Amphibien und eierlegenden Vertebraten synthetisiert wird, ist die Vorstufe der Eidotterproteine Lipovitellin, Phosvitin und Phosphette I und II. Vitellogenin wird estrogenabhängig in den Hepatozyten geschlechtsreifer Weibchen gebildet, während bei Männchen nur äußerst geringe Mengen bzw. kein Vitellogenin synthetisiert wird [Wahli et al., 1981; Klein-Hitpass et al., 1986; Gerber-Huber et al., 1987]. Der VIT-A2-Promotor enthält zusätzlich zu einem perfekten und einem imperfekten ERE [Klein-Hitpass et al., 1988] einen hormonunabhängigen Aktivator, der die transkriptionelle Aktivität der EREs zusätzlich verstärkt [Döbbeling et al., 1988]. Nach Aktivierung der ER-Isoformen kommt es zur Bildung der Luciferase, deren Aktivität luminometrisch bestimmt werden kann.

2.5.2.1.2 Hefe-ER-Testsystem

Die zur Untersuchung auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität geeigneten Hefezellen wurden von der Firma Glaxo (Großbritannien) entwickelt. Da die Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) endogen keine Estrogenrezeptoren enthält, wurde das Gen des humanen ER α stabil in das Genom der Hefe integriert. Die Hefezellen wurden zusätzlich mit einem Reporter-genplasmid, das für das Reporter-gen *lacZ* codiert, kotransfiziert. *LacZ* wird unter der Kontrolle eines ERE exprimiert [Routledge & Sumpter, 1996]. Nach Aktivierung des humanen ER α kommt es zur Expression des Reporter-gens *lacZ*. Das Protein β -Galactosidase wird ins Medium abgegeben und setzt das Substrat Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid zu Chlorphenolrot um, das photometrisch bestimmt wird. [Routledge & Sumpter, 1996]

2.5.2.1.3 COS-AR-Luc-Testsystem

COS-7-Zellen entstanden durch Transfektion von Nierenzellen der grünen Meerkatze *Cercopithecus aethiops* (CV-1-Zellen) mit Mutanten des Simian Virus 40 (SV40). COS-7-Zellen sind nicht mehr viral, produzieren aber noch das T-Antigen des SV40-Virus. Dadurch amplifizieren COS-7-Zellen Plasmide mit einem SV40-Promotor in so hoher Kopienzahl ($> 10^5$ Kopien), dass sie diese Masse an extrachromosomaler DNA ca. 72h nach erfolgter Transfektion nicht mehr tolerieren können und absterben. Wegen der hohen Amplifikationsrate eignet sich diese Zelllinie besonders zur transienten Transfektion. [Gluzman et al., 1981; Sambrook et al., 1989]

COS-7-Zellen, die endogen keine Steroidhormonrezeptoren enthalten [Couette et al., 1994], werden zur Untersuchung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität mit einem Androgenrezeptorexpressionsplasmid (pSG5-hAR) transfiziert. Zusätzlich werden das Reporter-genplasmid pMAMneoLuc und das Kontrollplasmid pSV β , das konstitutiv das β -Galactosidase-Gen exprimiert, kotransfiziert. [Guth, 2000]

pMAMneoLuc codiert für das Reporter-gen *Luc*, das unter der Kontrolle des „Mouse Mammary Tumor Virus-Promotors“ (MMTV-Promotor) steht. Der zu den Retroviren gehörende MMTV verursacht Mammakarzinome in der Maus. Der MMTV-Promotor gehört zu den am besten untersuchten hormonregulierten Promotoren. Der Promotor enthält vier HREs, an die neben AR auch andere Steroidhormonrezeptoren wie Pro-

gesteron- oder Glucocorticoidrezeptor binden können. Des Weiteren kann der Promotor auch durch andere Transkriptionsfaktoren wie z.B. „Nuclear Factor I“ reguliert werden. [Günzburg & Salomons, 1992]

Nach Aktivierung des humanen AR kommt es zur hormonabhängigen Expression des Reportergens *Luc*. Die Enzymaktivität wird luminometrisch bestimmt. Die gemessene Luciferaseaktivität wird durch die Aktivität der konstitutiv gebildeten β -Galactosidase (Kontrolle der Transfektionseffizienz) korrigiert. [Guth, 2000]

2.5.2.1.4 Hefe-AR-Testsystem

Hefe-AR-Zellen wurden von der Firma Glaxo (Großbritannien) entwickelt. Hefe-AR-Zellen (*Saccharomyces cerevisiae* Stamm PGKhAR) synthetisieren konstitutiv den humanen AR. Zusätzlich wurden die Hefe-Zellen mit einem Reportergenplasmid kotransfiziert. Das Reportergen *lacZ*, das für das Enzym β -Galactosidase kodiert, wird unter Kontrolle eines HRE exprimiert. Nach Aktivierung des AR durch einen Liganden kommt es zur Transkription und Expression des *lacZ*-Gens. Die β -Galactosidaseaktivität wird photometrisch vermessen. [Sohoni & Sumpter, 1998]

2.5.2.2 Diskussion der Reportergensysteme

Beim Hefe-ER-System wurden Hefezellen, die normalerweise keinen ER exprimieren mit dem Gen des humanen ER α stabil transfiziert, so dass gezielt ER α -vermittelte Prozesse untersucht werden können. Es handelt sich dabei um ein artifizielles System, bei dem möglicherweise entscheidende Regionen des Rezeptors in einer veränderten Faltung vorliegen [Metzger et al., 1995]. Benötigte Kofaktoren wie Hitzeschockproteine oder Transkriptionsfaktoren könnten im Vergleich zu anderen Eukaryonten in unterschiedlicher Form vorkommen. Darüber hinaus besitzen Hefen statt einer Zellmembran als äußerste Schicht eine Zellwand mit hohem Gehalt an β -1,6-Glucan und Chitin [Schlegel, 1992]. Durch die dadurch bedingte oftmals erschwerte Aufnahme von Substanzen, müssen Hefezellen z.T. mit wesentlich höheren Konzentrationen behandelt werden als Säugerzellen. Manche Substanzen sind für Hefezellen sehr toxisch [Andersen et al., 1999]. All diese Faktoren führen möglicherweise zu unterschiedlichen Untersuchungsergebnissen bezogen auf hormonelle bzw. antihor-

monelle Aktivität. Das Isoflavon Daidzein ist beispielsweise in MCF-7-Luc-Zellen estrogen aktiv [Mußler, 1999]. In Hefe-ER-Zellen wurde dagegen keine estrogen Aktivität festgestellt [De Boever et al., 2001]. Die Unterscheidung zwischen Agonisten und Antagonisten ist mit dem Hefe-ER-System nicht immer möglich [Andersen et al., 1999].

Im Gegensatz zu Hefe-Zellen bilden MCF-7-Luc-Zellen endogen beide ER-Isoformen und alle zur Transkriptionsaktivierung notwendigen Kofaktoren. Darüber hinaus können die ER-Isoformen miteinander in Wechselwirkung treten, wie es der natürlichen Situation entspricht. Mechanistische Studien über einen einzelnen ER sind deshalb aber nicht möglich.

MCF-7-Luc-Zellen enthalten den vollständigen Promotor des Vitellogenin-A2-(VIT-A2)-Gens des afrikanischen Krallenfroschs *Xenopus laevis* [Pons et al., 1990]. Im Gegensatz dazu wird zur Reportergenexpression im Hefe-ER-System nur ein synthetischer Promotor eingesetzt [Routledge & Sumpter 1996]. Der Wildtyppromotor hat gegenüber einem synthetischen Promotor mehrere Vorteile: Zum einen ist ein ERE, das von seiner natürlichen DNA-Sequenz umgeben ist, wesentlich stärker transkriptionell aktiv als nur ein einzelnes ERE [Klein-Hitpass et al., 1988]. Zum anderen sind beim VIT-A2-Promotor zusätzlich zu der perfekten ERE-Sequenz noch ein imperfektes ERE und ein weiteres die Transkription verstärkendes Element vorhanden [Döbeling et al., 1988]. Dadurch wird die Aktivität der beiden EREs verstärkt. Darüber hinaus erlaubt ein Wildtyppromotor nur eine „natürliche“ Interaktion mit einem Rezeptordimer und ist daher als der spezifischere Promotor anzusehen.

Die metabolische Kompetenz von MCF-7-Zellen war Gegenstand zahlreicher Untersuchungen (Tabelle 2.2). Es wurden konstitutiv synthetisierte CYP-Enzyme nachgewiesen [Pasanen et al., 1988; Christou et al., 1994; Spink et al., 1990]. Die metabolische Aktivität von CYP-Enzymen in MCF-7-Zellen ist durch 2,3,7,8-Tetrachlor-dibenzo[1,4]dioxin (TCDD) [Christou et al., 1994; Spink et al., 1990; Moore et al., 1993], Methylcholanthren oder Benzanthracen [Chaloupka et al., 1992] induzierbar. Die Induktion durch TCDD, Methylcholanthren und Benzanthracen deutet auf die Induktion der CYP 1A-Familie und CYP 1B1 über den „Aryl Hydrocarbon Receptor“ (AhR) hin [Waxman, 1999]. Inwieweit der Abkömmling MCF-7-Luc metabolische Aktivität besitzt, ist bisher nicht untersucht worden.

Tabelle 2.2 Metabolische Kompetenz von MCF-7-Zellen

Enzym	Substrat/Nachweismethode	Literatur
Carbonylreduktase	Daunorubicin/ Northern-Blot	Akman et al., 1990
Katalase	Wasserstoffperoxid/ Northern-Blot	Akman et al., 1990
NADPH(Chinon)Reduktase	Dichlorphenolinophenol	Smitskamp-Wilms et al., 1994
	Menadion/Northern-Blot	Akman et al., 1990
GSH-Peroxidase	t-Butylhydroperoxid/ Northern-Blot	Akman et al., 1990
GSH-Reduktase	NADPH	Hosking et al., 1990
GSH-Transferase α	Western-Blot	Lewis et al., 1989
GSH-Transferase μ	Western-Blot	Lewis et al., 1989
CYP	Benzo[a]pyren-7,8-diol	Pasanen et al., 1988
	Dimethylantracen	Christou et al., 1994
	Estradiol ¹⁾	Spink et al., 1990
	Western-Blot ²⁾	
CYP 1A1	Ethoxyresorufin/ Western-Blot ¹⁾²⁾	Moore et al., 1993 Chaloupka et al., 1992
Sulfotransferasen I-IV	2-Hydroxynaphthol	Cowan et al., 1986
Superoxiddismutasen	Northern-Blot	Akman et al., 1990
Thioesterase	Western-Blot	Smith et al., 1984
UDP-Glucuronosyl-Transferase	Methylumbelliferon	Ivy et al., 1988
	Nitrophenol	Cowan et al., 1986

¹⁾ Aktivität durch 2,3,7,8-Tetrachlordibenzo[1,4]dioxin (TCDD) induzierbar

²⁾ Aktivität durch Methylcholanthren und Benzantracen induzierbar

Auch Hefezellen sind in der Lage, eine Reihe von Xenobiotika CYP-abhängig umzusetzen [Kärenlampi et al., 1980 & 1982; Miller et al., 1986]. Die wichtigste CYP-katalysierte Reaktion in Hefen ist die 14 α -Demethylierung von Lanosterol [Yoshida & Aoyama, 1984]. Die metabolische Kompetenz des verwendeten Hefestamms wurde bisher jedoch nicht untersucht.

Das „Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee“ (EDSTAC) empfiehlt in seinem Abschlussbericht MCF-7-Luc-Zellen für das Screening auf estrogene Aktivität *in vitro* [EDSTAC, 1998].

Die Unterschiede der Reportergerätesysteme zur Untersuchung auf hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität sind in Tabelle 2.3 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 2.3 Gegenüberstellung der Säugerzell- und Hefezelltestsysteme

	MCF-7-Luc (stabil)	Hefe-ER (stabil)	COS-AR-Luc (transient)	Hefe-AR (stabil)
Zelltyp	human	Hefezellen	<i>Cercopithecus aethiops</i>	Hefezellen
Rezeptor- ausstattung	Zellmembran endogen beide ER-Isoformen	Zellwand humaner ER α , transfiziert	Zellmembran humaner AR transfiziert	Zellwand humaner AR transfiziert
Transkriptions- apparat	vollständig	Hefe- Transkriptions- apparat	evtl. nicht vollständig	Hefe- Transkriptions- apparat
Promotor	VIT-A2- Promotor	synthetisches ERE	MMTV- Promotor	synthetisches HRE
Reportergen	<i>Luc</i>	<i>lacZ</i>	<i>Luc</i>	<i>lacZ</i>
Metabolische Kompetenz	wahrscheinlich vorhanden	wahrscheinlich vorhanden	kaum unter- sucht	wahrscheinlich vorhanden

Die Testsysteme COS-AR-Luc und Hefe-AR sind beide mit dem Gen des humanen AR transfiziert, so dass der AR als einziger Steroidhormonrezeptor gebildet wird. Störungen durch andere nukleäre Rezeptoren, die an dasselbe HRE binden, können damit ausgeschlossen werden. Der humane AR liegt in beiden Testsystemen allerdings nicht im natürlichen Kontext vor. Die verwendeten COS-7-Zellen sollten als Säugerzelllinie aber über die nötigen Koaktivatoren und Transkriptionsfaktoren verfügen, so dass es nicht zu einer Veränderung der AR-vermittelten Transkriptionsaktivierung kommen sollte. Einige der für die Transkriptionsaktivierung durch DHT nötigen Faktoren wie der Steroidkoaktivator 1 (SRC1), das AR-assoziierte Protein 70

(ARA₇₀) oder das Glucocorticoidrezeptor-interagierende Protein 1 (GRIP1) wurden kürzlich auch in Hefezellen nachgewiesen [Rana et al., 1998]. Da die an der AR-vermittelte Transkriptionsaktivierung beteiligten Kofaktoren noch nicht vollständig identifiziert wurden, könnten entscheidende Proteine in Hefe- und COS-AR-Luc-Zellen fehlen.

Die metabolische Kompetenz der COS-7-Zellen bzw. ihrer Vorläuferzelllinie CV-1 ist kaum charakterisiert. Die Ausstattung des verwendeten Hefestamms mit metabolisierenden Enzymen ist ebenfalls noch nicht untersucht worden. Im COS-AR-Luc-System wird mit dem MMTV-Promotor ein vollständiger, gut charakterisierter Promotor verwendet. Beim Hefe-AR-System wird die Expression des Reportergens lediglich von einem einzelnen HRE kontrolliert.

2.5.2.3 Auswerteverfahren

Die Auswertung der Transaktivierungsexperimente erfolgte mit Hilfe der von Mußler (1999) erarbeiteten und diskutierten Ansätze. Der für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen typische sigmoidale Kurvenverlauf (Abbildung 2.26) wird mathematisch durch die sogenannte logistische Gleichung (Gleichung 2.1) beschrieben.

$$Y = \frac{A1 - A2}{1 + \left(\frac{X}{X_0}\right)^p} + A2 \quad \text{Gleichung 2.1}$$

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

p: Exponent; Steigung im Wendepunkt

x₀: x-Wert bei 50% Aktivierung, Wendepunkt der Kurve = „effective concentration“
EC₅₀

Das untere Plateau A1 beschreibt den Konzentrationsbereich, bei dem noch keine Reporterantwort vorliegt. Das obere Plateau A2 stellt den Zustand dar, bei dem alle vorhandenen Rezeptoren vollständig aktiviert sind und weitere Substanzgabe die Transkriptionsrate nicht erhöhen kann. Der x₀-Wert beschreibt im Falle einer ago-

nistischen Aktivität die Konzentration, bei der eine halbmaximale Wirkung erreicht wird (EC_{50} -Wert).

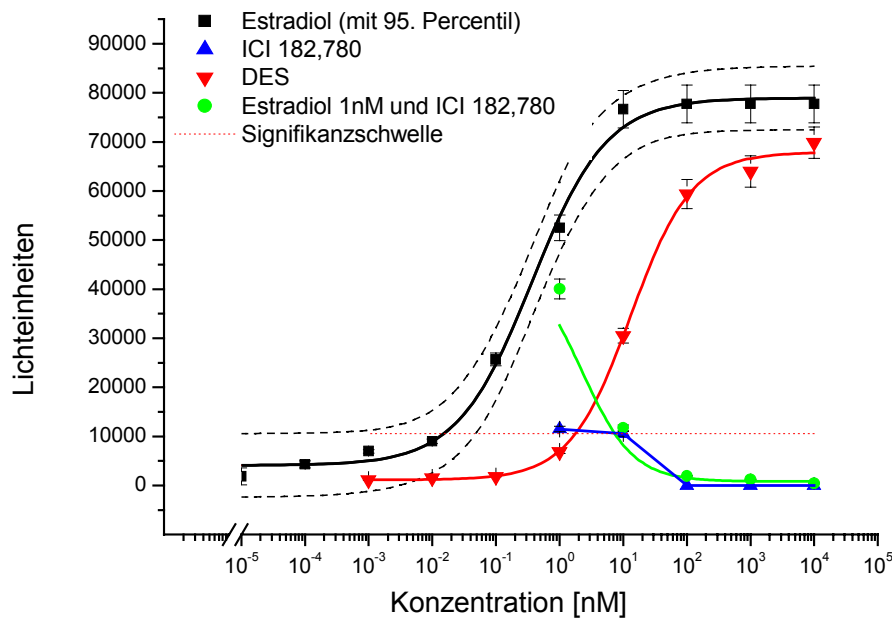


Abbildung 2.26 Auswerteverfahren: sigmoidale Regression der Daten des physiologischen Liganden E_2 (inklusive 95. Perzentil) im Testsystem MCF-7-Luc. Die durch E_2 induzierte Luciferaseaktivität wird konzentrationsabhängig durch das Antiestrogen ICI 182780 gehemmt. Zusätzlich ist die Signifikanzschwelle („benchmark“) für agonistische Aktivität angegeben, die durch das potente Estrogen DES überschritten wird [Mußler, 1999].

Beim sog. „benchmark-Verfahren“ wird zur Auswertung agonistischer Aktivität eine Signifikanzschwelle („benchmark“) eingeführt. Sie ergibt sich aus dem oberen 95. Perzentil des unteren Plateaus A1 (Abbildung 2.26). Verbindungen, deren induzierte Reporterogenaktivität (inkl. Standardabweichung) die Signifikanzschwelle überschreitet, können als agonistisch aktiv bezeichnet werden [Mußler, 1999].

Bei der Untersuchung auf antagonistische Aktivität muss eine durch ein physiologisches Hormon induzierte Reporterogenaktivität durch die Testsubstanz gehemmt werden. Hierzu werden die Testsysteme mit einer zu hemmenden Positivkonzentration und unterschiedlichen Konzentrationen der Testsubstanz kokubiert. Die zu hem-

mende Hormonkonzentration sollte im submaximalen Dosis-Wirkungsverlauf, also am Übergang zwischen linearem Bereich der Kurve und dem oberen Plateau A2 liegen. Zu hohe Hemmkonzentrationen könnten Antagonistenkonzentrationen erfordern, die über der Löslichkeitsgrenze der Testverbindung liegen würden. Bei einer zu niedrigen zu hemmenden Konzentration kann keine Dosis-Wirkungsbeziehung für die Testsubstanz erarbeitet werden, da bereits geringe Antagonistenkonzentrationen eine vollständige Hemmwirkung zeigen können. Mit einer submaximalen Reporter-geninduktion lässt sich zumindest teilweise eine Dosis-Wirkungsbeziehung erarbeiten.

Zur Auswertung antagonistischer Aktivität wurde wie bei agonistischer Aktivität eine Signifikanzschwelle eingeführt. Sie ergibt sich bei Untersuchung auf antagonistische Aktivität aus dem unteren 95. Perzentil der zu hemmenden physiologischen Hormonkonzentration (Abbildung 2.27). Verbindungen, deren antagonistische Aktivität (inkl. Standardabweichung) diese Signifikanzschwelle unterschreitet, können als antagonistisch aktiv angesehen werden.

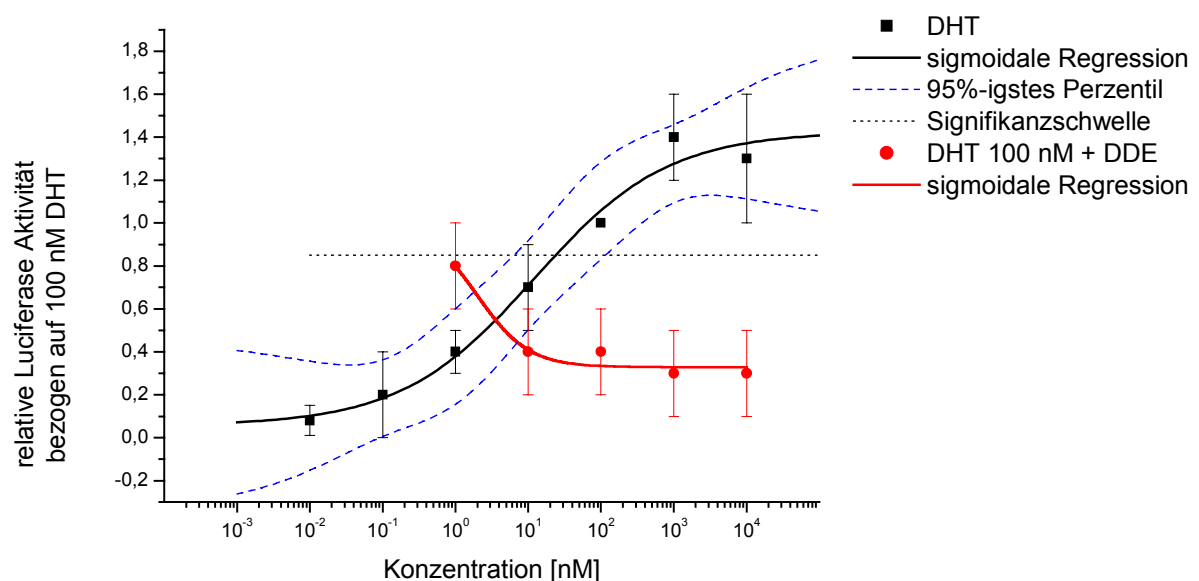


Abbildung 2.27 Auswerteverfahren: sigmoidale Regression der Daten des physiologischen Liganden DHT im Testsystem COS-AR-Luc (inklusive 95. Perzentil). Angabe der Signifikanzschwelle für antagonistische Aktivität, die bei Koinkubation von 100 nM DHT mit dem Antiandrogen DDE deutlich unterschritten wird.

2.5.2.4 Weiterentwicklung der etablierten Reportergensysteme hinsichtlich metabolischer Kompetenz

Ein großer Nachteil der *in vitro* „Screening-Systeme“ ist das Fehlen, bzw. das im Vergleich zur *in vivo* Situation stark herabgesetzte Vorhandensein metabolischer Kompetenz. Während in MCF-7-Zellen noch CYP-Aktivität nachweisbar ist, ist dies für COS-7-Zellen nicht bekannt. In *Saccharomyces cerevisiae* konnte als Hauptenzym CYP 51 nachgewiesen werden [Yoshida & Aoyama, 1984].

Es sind verschiedene Versuchsansätze zur Erhöhung der metabolischen Kompetenz von *in vitro* Testansätzen denkbar. Bereits vom EDSTAC vorgeschlagen ist die Vorinkubation der Testsubstanzen mit S9-Mix bzw. Mikrosomen und Untersuchung des Inkubats in einem geeigneten Testsystem [EDSTAC, 1998]. Anschließend wird die ermittelte endokrine Aktivität des Inkubats mit der Aktivität der Ausgangssubstanz verglichen. Als Resultat erhält man eine Verstärkung oder Abschwächung des Effekts der Ausgangssubstanz. Dieses Verfahren wurde zur Bestimmung der endokrinen Aktivität von Methoxychlor und einiger Metabolite bereits angewandt [Bulger et al., 1978; Elsby et al., 2000].

Zur Umgehung des zeitaufwendigen Zweistufenansatzes könnten die bereits bestehenden Testsysteme zusätzlich mit für CYP Monooxygenasen kodierenden Plasmiden kotransfiziert werden. Hierzu muss aber bekannt sein, welches der CYP-Isoenzyme für die Metabolisierung der jeweiligen Testsubstanz verantwortlich ist. Nachteilig bei einer Mehrfachtransfektion ist die rückläufige Transfektionseffizienz bei steigender Plasmidzahl mit der Folge einer möglicherweise unzureichenden Expressionsrate des metabolisierenden Enzyms. Stabil mit CYP-Isoenzymen transfizierte Hamsterlungenfibroblasten (V79 Zellen) enthalten endogen ER α [Kong et al., 2000] und müssten lediglich mit einem entsprechenden Reporter gen kotransfiziert werden. Eine weitere Möglichkeit ist die Verwendung primärer Hepatozyten, die Steroidhormonrezeptoren wie die ER-Isoformen [Kuiper et al., 1997], AR [de Winter, 1991] sowie Progesteron- und Glucocorticoidrezeptor enthalten. In den letzten Jahren hat sich die Transfektionstechnik soweit weiterentwickelt, dass auch empfindliche primäre Zellen mit hoher Effizienz transfiziert werden können. Eleganter ist aber die Nutzung eines endogenen Reporters, der über ELISA-Technik einfach und schnell nachgewiesen und quantifiziert werden kann.

Zusätzlich müssen die gebildeten Metabolite identifiziert und quantifiziert werden, da so zum einen die Metabolisierungsrate überprüft werden kann. Zum anderen kann die Kenntnis über das Ausmaß an Metabolisierung möglicherweise auch Hinweise auf die Verbindung liefern, die für die beobachtete endokrine Aktivität verantwortlich ist.

3 Problemstellung

Das Kontaktakarizid Dicofol geriet 1980 in den Blickpunkt der Öffentlichkeit als bei einem Unfall große Mengen von mit DDT verunreinigtem Dicofol in den Lake Apopka, Florida (USA), gelangten. Einige Jahre später beobachtete man eine Abnahme der Alligatorpopulation [Guillette et al., 1994]. Hierfür wurde das damals schon als schwach estrogen aktiv bekannte o,p'-DDT verantwortlich gemacht. Später erkannte man in dem DDT Metaboliten DDE ein starkes Antiandrogen, welches zusätzliche Störungen der hormonellen Homöostase verursacht [Kelce et al., 1995]. Dicofol, die Hauptkontaminante, wurde indes nicht weiter beachtet. Durch Untersuchungen von Guth (2000) ergaben sich neue Anhaltspunkte für eine endokrine Aktivität von Dicofol. Dichlorbenzophenon (DCBP), ein Abbauprodukt von Dicofol, wurde in verschiedenen Reportergensystemen als Antiandrogen erkannt. Daraus ergibt sich die Hypothese, dass nicht nur DDT und DDE, sondern auch DCBP bzw. Dicofol für die beobachteten Störungen des hormonellen Systems verantwortlich sein können.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte zunächst der Metabolismus von Dicofol *in vitro* quantitativ beschrieben werden. Es sollte vor allem untersucht werden, ob Dicofol durch metabolische Prozesse oder evtl. unter Lichteinfluss bzw. durch alkalische Katalyse im alkalischen Medium zu DCBP abgebaut wird [EPA RED, 1998]. Im Hinblick auf die potentielle endokrine Aktivität sollten Dicofol, DCBP und Dichlorbenzhydrol (DCBH) in verschiedenen Testsystemen auf endokrine Aktivität untersucht werden.

Des Weiteren sollte in verschiedenen Testsystemen untersucht werden, welchen Einfluss der Metabolismus auf die hormonelle Aktivität des Antiandrogens Linuron [Lambricht et al., 2000] haben könnte. Schon Guth (2000) hatte festgestellt, dass nicht-N'-substituierter Phenylharnstoff keine antiandrogene Aktivität zeigt. Im Zuge einer desalkylierenden Metabolisierung von Linuron sollte es also zu einer Inaktivierung der Substanz hinsichtlich antiandrogener Aktivität kommen. Linuron und seine Hauptmetaboliten sollten deshalb auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität untersucht werden.

Ein Strukturmerkmal, das auf antiandrogene Aktivität hindeutet, ist die Struktur eines Benzophenons (vgl. 2.4.2.3). Das prenylierte Chalcon Xanthohumol ist ein Naturstoff, der Strukturelemente eines Benzophenons und eines Stilbens vereint (vgl. Abbildung

2.24). Erste Berichte lassen vermuten, dass es sich bei Xanthohumol um eine Substanz mit potenter antiestrogener Wirkung handelt [Gerhäuser et al., 2002]. Die strukturelle Nähe zu antiandrogen aktiven Benzophenonen legte zusätzlich die Untersuchung auf antiandrogene Aktivität nahe.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Dicofol und seine Umwandlungsprodukte

4.1.1 Untersuchungen zum Abbau von Dicofol

4.1.1.1 Methodenentwicklung zur chromatographischen Trennung von Dicofol und seinen Degradationsprodukten

Für die Analytik von Dicofol wurde ein in der Literatur für technisches Dicofol beschriebenes, chromatographisches Trennverfahren auf der Basis einer Umkehrphasen-HPLC mit UV-Detektor weiter entwickelt [Rothman, 1980]. Mit einem Acetonitril/Wasser-Gemisch (60/40) wurde eine bessere Trennleistung und eine wesentliche Verkürzung der Analysenzeit erreicht. Dicofol und seine Zerfallsprodukte eluieren dabei in der Reihenfolge DCBH, DCBP und Dicofol. Aufgrund seiner strukturellen Ähnlichkeit zu DCBP wurde Oxybenzon (Abbildung 4.1) als interner Standard zur Kompensation von Fehlern bei Extraktion und Probenaufarbeitung zugesetzt. Mit Hilfe dieses Verfahrens wurden auch für Dicofol zufriedenstellende Wiederfindungen erreicht.

4.1.1.2 Charakterisierung des kommerziell erhältlichen Dicofol

Dicofol wird großtechnisch durch Chlorierung von DDT am zentralen C-Atom und einer anschließenden Hydrolyse hergestellt. Da Verunreinigungen im kommerziell erhältlichen Dicofol später die Untersuchungen zur endokrinen Aktivität stören könnten, wurde insbesondere auf eine Kontamination mit DDT, DDE und DCBP geprüft. In einem typischen Analysengang eluiert der interne Standard Oxybenzon (A) bei 3,4 min, das Abbauprodukt DCBP (B) bei 6,7 min und Dicofol (C) bei 11,75 min. Ein Signal im Chromatogramm (X) bei 7,5 min (Abbildung 4.1) ließ zunächst vermuten, es handle sich aufgrund fast identischer Retentionszeiten um das Abbauprodukt DCBP. Durch Standardadditionsanalyse mit DCBP konnte dies jedoch widerlegt werden, da DCBP (B) früher als die unbekannte Kontaminante (X) eluiert (Abbildung 4.1).

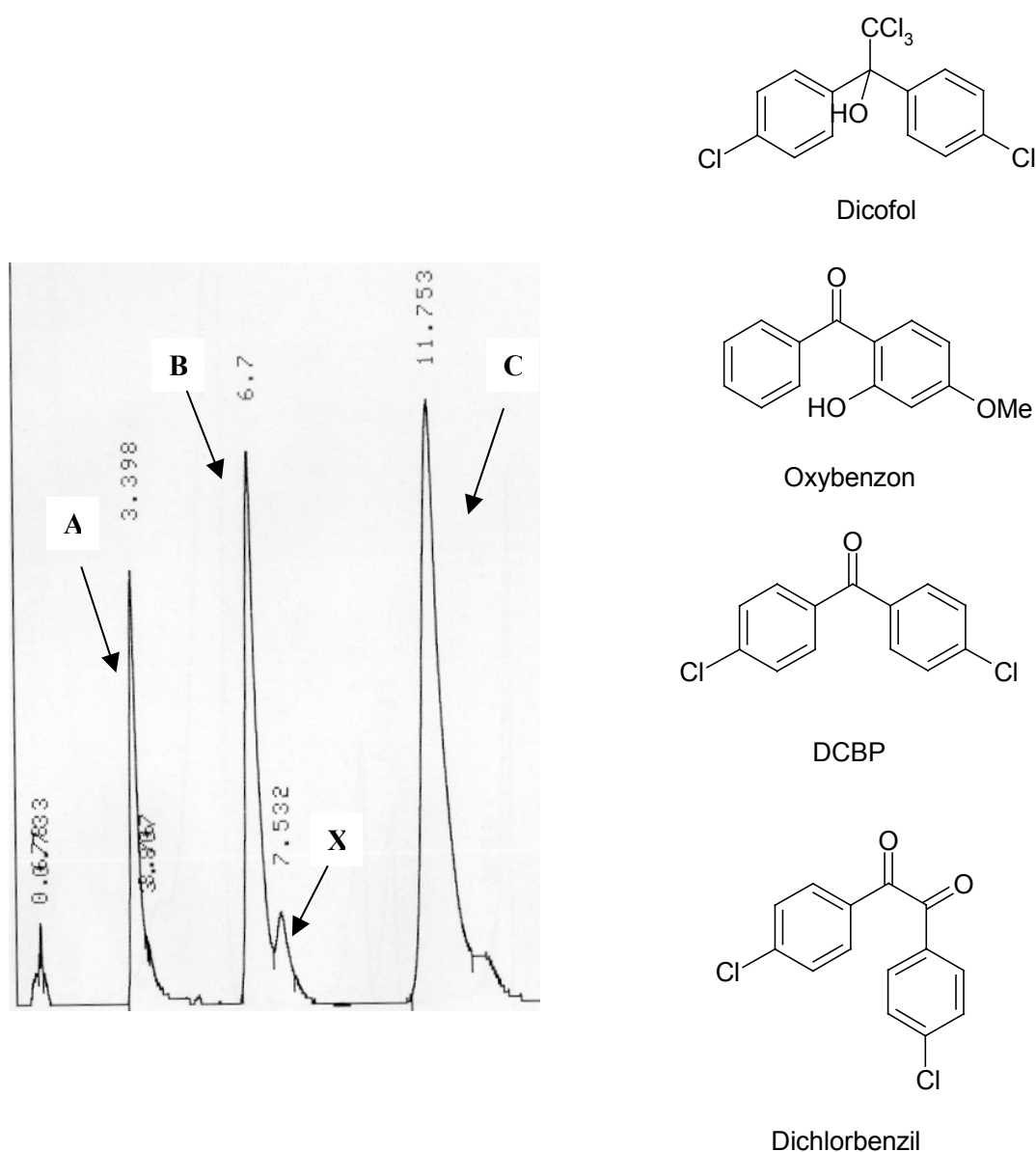


Abbildung 4.1 Chromatographische Trennung von Dicofol und seinen Degradationsprodukten mittels RP-HPLC und UV-Detektion nach Standardadditionsanalyse

A: Oxybenzon (interner Standard)

B: DCBP

X: Kontaminante (evtl. p,p'-Dichlorbenzil)

C: Dicofol

Es sind deutlich zwei unterschiedliche Signale für DCBP und die Kontaminante zu erkennen.

Aufgrund der unvollständigen Trennung von DCBP, sollte die Substanz ähnliche physikalische, chemische und strukturelle Eigenschaften wie DCBP aufweisen. Nach Rothman (1980) könnte es sich bei der Substanz um p,p'-Dichlorbenzil (Abbildung 4.1) handeln. Diese Vermutung wurde durch eine $^1\text{H-NMR}$ Untersuchung des kom-

merziell erhältlichen Dicofols in deuteriertem Chloroform bestätigt. Die Resonanz bei $\delta = 3,45$ ppm konnte dem alkoholischen Proton von Dicofol zugeordnet werden. Die Multipletts bei $\delta = 7,24$ ppm und $\delta = 7,58$ ppm entsprechen den aromatischen Protonen des Dicofols [Keith et al., 1969]. Die in der Vergrößerung zu erkennenden Resonanzen bei $\delta = 7,49$ ppm und $\delta = 7,91$ ppm stimmen mit den von Okimoto et al. (1996) bestimmten Resonanzen von p,p'-Dichlorbenzil überein (Abbildung 4.2; Tabelle 4.1).

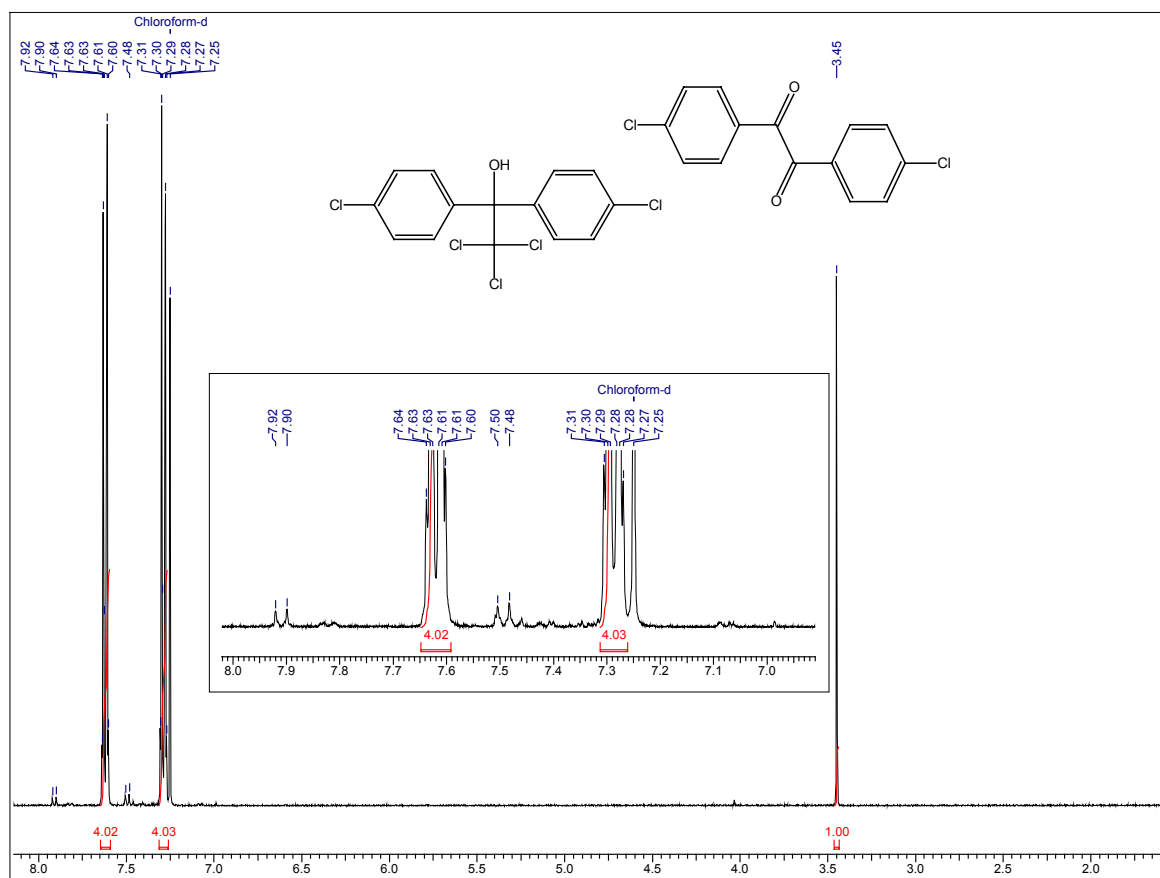


Abbildung 4.2 $^1\text{H-NMR}$ -Spektrum von Dicofol
Die Resonanzen von p,p'-Dichlorbenzil sind vergrößert dargestellt.

Tabelle 4.1 Vergleich der gemessenen $^1\text{H-NMR}$ Resonanzen mit Literaturdaten

	Literatur	Eigene Daten
Dicofol	$\delta = 3,52 \text{ ppm}^1$ (s)	$\delta = 3,45 \text{ ppm}$ (s)
	$\delta = 7,24 \text{ ppm}^1$ (m)	$\delta = 7,29 \text{ ppm}$ (m)
	$\delta = 7,58 \text{ ppm}^1$ (m)	$\delta = 7,62 \text{ ppm}$ (m)
p,p'-Dichlorbenzil	$\delta = 7,43 \text{ ppm}^2$ (d)	$\delta = 7,49 \text{ ppm}$ (d)
	$\delta = 7,92 \text{ ppm}^2$ (d)	$\delta = 7,91 \text{ ppm}$ (d)

¹ Keith et al., 1969² Okimoto et al., 1996

Es blieb nun zu klären, ob Dichlorbenzil möglicherweise bei den nachfolgenden Lebermikrosomeninkubationen durch Bildung von DCBP zu Verfälschungen der Ergebnisse führen könnte. Im stark alkalischen Milieu lagern Benzile zu Benzilsäuren um (Benzilsäureumlagerung) [Becker et al., 1990], aus der durch Decarboxylierung DCBP entstehen könnte (Abbildung 4.3).

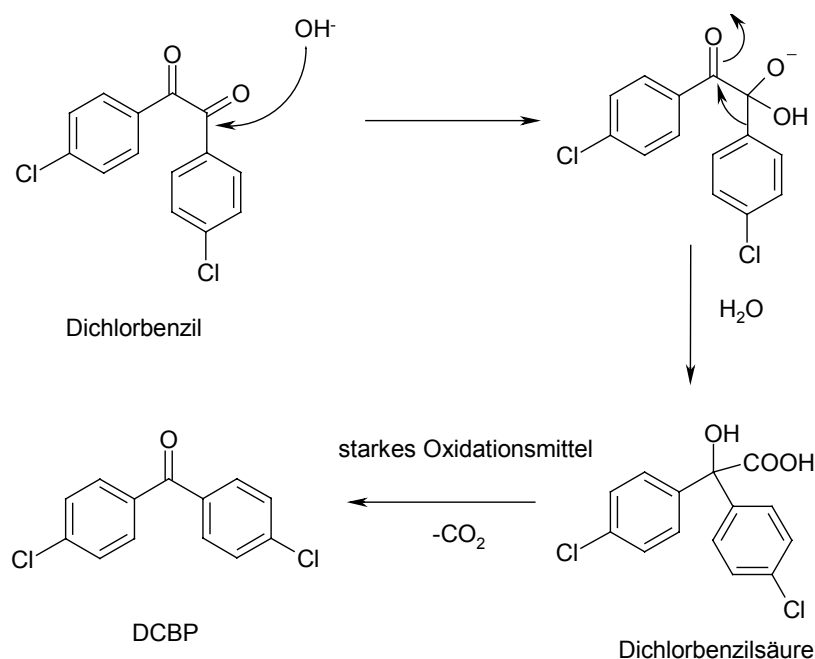


Abbildung 4.3 Reaktionsmechanismus zur Entstehung von DCBP aus p,p'-Dichlorbenzil

Die Bildung von DCBP aus p,p'-Dichlorbenzil scheint jedoch unter den äußerst milden Bedingungen des Lebermikrosomeninkubationsversuchs (K_2HPO_4/KH_2PO_4 -Puffer; pH 7,4; 37°C) nicht wahrscheinlich, da die Reaktionssequenz, ausgehend von p,p'-Dichlorbenzilsäure zu DCBP starke Oxidationsmittel wie Ce^{4+} [Hanna & Sarac, 1977] oder Chromsäure [Montagne, 1902] erfordert. In der Literatur wurden keine Hinweise auf eine enzymatische Umsetzung von p,p'-Dichlorbenzilsäure in DCBP gefunden. Eine Verringerung des p,p'-Dichlorbenzilsignals wurde in orientierenden Versuchen nicht beobachtet. Andere Kontaminanten, wie DDE oder die o,p'-Isomere der oben genannten Verbindungen, wurden nicht detektiert, weshalb auf die Aufreinigung des kommerziell erhältlichen Dicofols verzichtet wurde.

4.1.1.3 Herstellung der Lebermikrosomen

Die Herstellung der Mikrosomen aus Rinder-, Schweine- oder mit aroclor-induzierter Rattenleber wurde wie unter 6.7.1 beschrieben durchgeführt. Es wurden die in Tabelle 4.2 aufgeführten Protein-, CYP- und Cytochrom b_5 -Gehalte bestimmt. Erwartungsgemäß weisen induzierte Rattenlebermikrosomen den höchsten CYP-Gehalt auf. Da die verwendeten Mikrosomen bei unabhängigen, parallelen Metabolisierungsstudien gute metabolische Aktivität gezeigt hatten [Schmitt, 2001], wurde auf die erneute Prüfung metabolischer Aktivität verzichtet.

Tabelle 4.2 Charakterisierung der hergestellten Lebermikrosomen

Spezies	Proteingehalt [mg/ml Suspension]	Cytochrom P 450 [nmol/mg Protein]	Cytochrom b_5 [nmol/mg Protein]
Rind	54	0,85	0,85
Schwein	37	0,84	0,78
Ratte (aroclor-induziert)	25	1,21	0,98

4.1.1.4 *In vitro* Untersuchungen zum Metabolismus von Dicofol

In orientierenden Versuchen wurden Rinderlebermikrosomen mit 400 µg Dicofol 2 h bei 37°C im Dunkeln inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend mit eisgekühltem Aceton (0,5 ml) gestoppt, die Analyten mit Essigester extrahiert, der Extrakt zur Trockne im Stickstoffstrom eingengt und der HPLC-Analyse zugeführt.

Auch in der Blindprobe (durch Erhitzen inaktivierte Mikrosomen) war Bildung von DCBP zu beobachten, was auf Artefaktbildung während der Aufarbeitung und/oder auf einen nicht-enzymkatalysierten Zerfall von Dicofol hinwies. Allerdings wurde auch in einer Aufarbeitungskontrolle, bei der Dicofol erst nach dem Abstoppen der Inkubation zugesetzt worden war, DCBP nachgewiesen. Im Folgenden wurde deshalb die Inkubationsreaktion mit 1 ml essigsauerm (10%) Aceton abgestoppt und die Analyten ebenfalls in essigsauerm (10%) Methanol aufgenommen. Diese Aufarbeitungsvariante war für die Untersuchungen zum Metabolismus von Dicofol geeignet, da nun kein DCBP in den Aufarbeitungskontrollen nachzuweisen war.

Obwohl in den mitgeführten Aufarbeitungskontrollen mit anschließender saurer Aufarbeitung keine DCBP-Bildung nachzuweisen war, wurden in den Blindproben und in mikrosomenfreien Inkubationsansätzen immer etwa die gleichen DCBP-Konzentrationen nachgewiesen wie in den Proben mit aktiven Mikrosomen (Abbildung 4.4). Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Bildung von DCBP um eine CYP-abhängige Reaktion handelt, wurde der Versuch mit aroclor-induzierten Rattenlebermikrosomen wiederholt. Aufgrund des höheren CYP-Gehalts sollte im Falle einer CYP-abhängigen DCBP-Bildung entsprechend mehr DCBP gebildet werden. Es wurde jedoch keine Erhöhung der DCBP Entwicklung durch aroclor-induzierte Rattenlebermikrosomen festgestellt (Abbildung 4.4). Darüber hinaus wurde auch bei Verwendung hitzeinaktivierter, aroclor-induzierter Rattenlebermikrosomen DCBP-Bildung festgestellt.

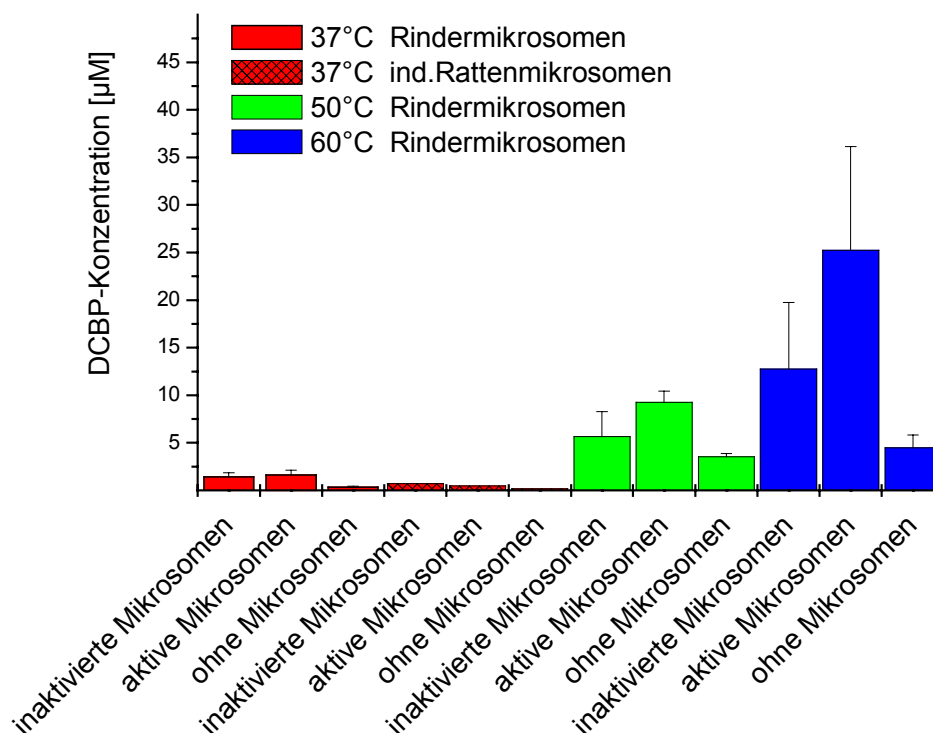


Abbildung 4.4 Entstandenes DCBP nach Inkubation von Lebermikrosomen mit Dicofol

Durch Erhöhung der Inkubationstemperatur auf 50°C bzw. auf 60°C denaturiert das für die Katalyse benötigte Protein. Daher sollte bei einer enzymatischen Reaktion keine Erhöhung der gebildeten DCBP-Menge beobachtet werden, während bei nicht-enzymatischer Reaktion die DCBP-Entwicklung erhöht sein sollte. In Abbildung 4.4 ist deutlich eine verstärkte DCBP-Bildung bei erhöhter Reaktionstemperatur zu erkennen, weshalb von einer nicht-enzymkatalysierten Reaktion auszugehen ist.

Parallel dazu wurden die Dicofolgehalte der Inkubationsansätze gemessen (Abbildung 4.5). Die deutliche Abnahme der Dicofol-Konzentration bei 50°C bzw. 60°C und die gleichzeitige verstärkte DCBP-Bildung belegen die enzymunabhängige Umwandlung von Dicofol zu DCBP.

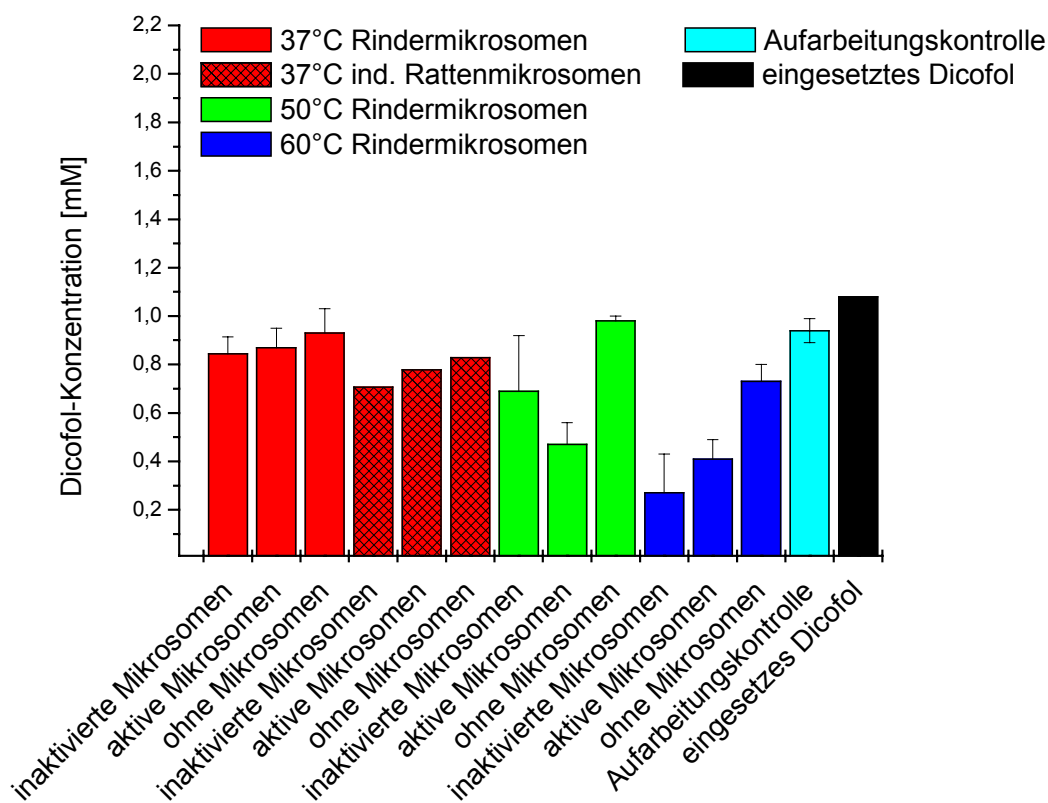


Abbildung 4.5 Abnahme der Dicofof-Konzentration nach Inkubation von Dicofof mit Lebermikrosomen

Bestimmung der Aktivierungsenergie

Nach Untersuchungen von Nome et al. (1981) beträgt die Aktivierungsenergie der Degradation von Dicofof in Wasser 60,3 kJ/mol. Stimmt nun die Aktivierungsenergie in Gegenwart metabolisch aktiver Enzyme mit der Aktivierungsenergie in Gegenwart von Wasser überein, kann von einer enzymunabhängigen Reaktion ausgegangen werden.

Zur Bestimmung der Aktivierungsenergie der Umsetzung von Dicofof zu DCBP wurde eine Reaktion erster Ordnung angenommen [Nome et al., 1981]. Aus der Geschwindigkeitsgleichung einer Reaktion erster Ordnung (Gleichung 4.1) erhält man nach unbestimmter Integration die Geschwindigkeitskonstante k der Reaktion (Gleichung 4.2) mit der Reaktionsdauer (t) und Anfangs- ($[Dicofof]_0$) sowie Endkonzentration ($[Dicofof]_t$) der Ausgangssubstanz. [Wedler, 1997]

$$\frac{\partial[\text{Dicofol}]}{\partial t} = -k[\text{Dicofol}] \quad \text{Gleichung 4.1}$$

$$k = \frac{1}{t} \ln \frac{[\text{Dicofol}]_0}{[\text{Dicofol}]_t} \quad \text{Gleichung 4.2}$$

$$\ln k = \frac{-E_A}{RT} + \ln A \quad \text{Gleichung 4.3}$$

Die Geschwindigkeitskonstante k einer Reaktion hängt nach Arrhenius von der Reaktionstemperatur T ab. Trägt man die Reaktionskonstanten k (Logarithmus naturalis) der jeweiligen Reaktionstemperatur T gegen den Kehrwert der Reaktionstemperatur ($1/T$) auf, erhält man eine Gerade (Gleichung 4.3, Abbildung 4.6). Diese Gerade ist durch den Ordinatenabschnitt $\ln A$ und durch die Steigung $-E_A/R$ (mit R der allgemeinen Gaskonstanten und E_A der Aktivierungsenergie) charakterisiert. [Wedler, 1997]

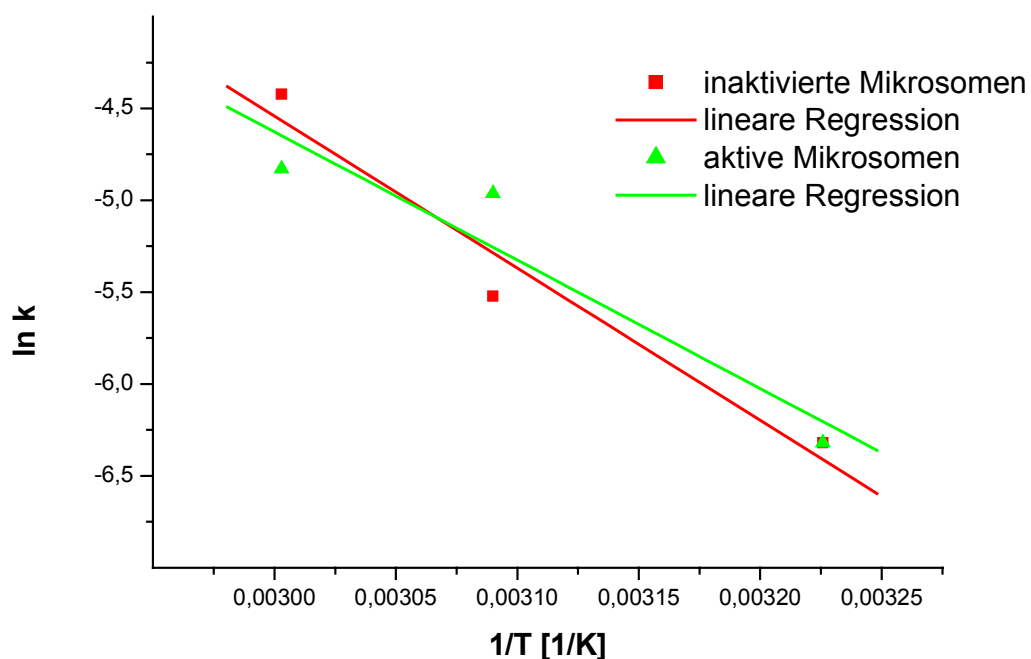


Abbildung 4.6 Berechnung der Aktivierungsenergie nach Arrhenius

Die Berechnung der Aktivierungsenergie aus den Steigungen ergab $63,5 \pm 5,4$ kJ/mol in Gegenwart metabolisch aktiver Enzyme. Damit stimmt die in der vorliegenden Arbeit berechnete Aktivierungsenergie mit den Literaturdaten überein [Nome et al., 1981]. Die fast identischen Aktivierungsenergien sind ein weiterer deutlicher Hinweis für einen nicht-enzymatischen Prozess des Dicofolabbaus. Bei einer enzymatisch-beschleunigten Reaktion hätte die Aktivierungsenergie in Gegenwart von Mikrosomen wesentlich geringer ausfallen müssen.

4.1.1.5 *In vitro* Untersuchungen zum Metabolismus von DCBP

DCBP wurde mit Rinder-, Schweine- und mit Aroclor induzierten Rattenlebermikrosomen bei 37°C, 2 h behandelt. Bei Inkubation von hitzeinaktivierten Mikrosomen mit DCBP wurde erwartungsgemäß keine Umsetzung beobachtet. Dagegen wurde DCBP durch aktive Mikrosomen schnell und annähernd vollständig zu DCBH reduziert (Abbildung 4.7 und Abbildung 4.8).

Da bei Inkubation von Mikrosomen mit DCBP auch unter anaeroben Bedingungen in Gegenwart von Kohlenstoffmonoxid die Reduktion von DCBP zu DCBH beobachtet wurde [Yoneyama & Matsumara, 1981], ist die enzymatische Reduktion von DCBP zu DCBH vermutlich nicht von CYP-Isoenzymen katalysiert. Die Reduktion könnte auch durch andere Enzyme, wie beispielsweise Cytochrom P450 Reduktase oder Alkoholdehydrogenase katalysiert worden sein.

DCBP wird wahrscheinlich auch im Körper schnell zu DCBH reduziert, das als Glucuronsäure- oder Sulfatkonjugat ausgeschieden werden könnte, falls die Reoxidation zu DCBP nicht der bevorzugte Prozess ist.

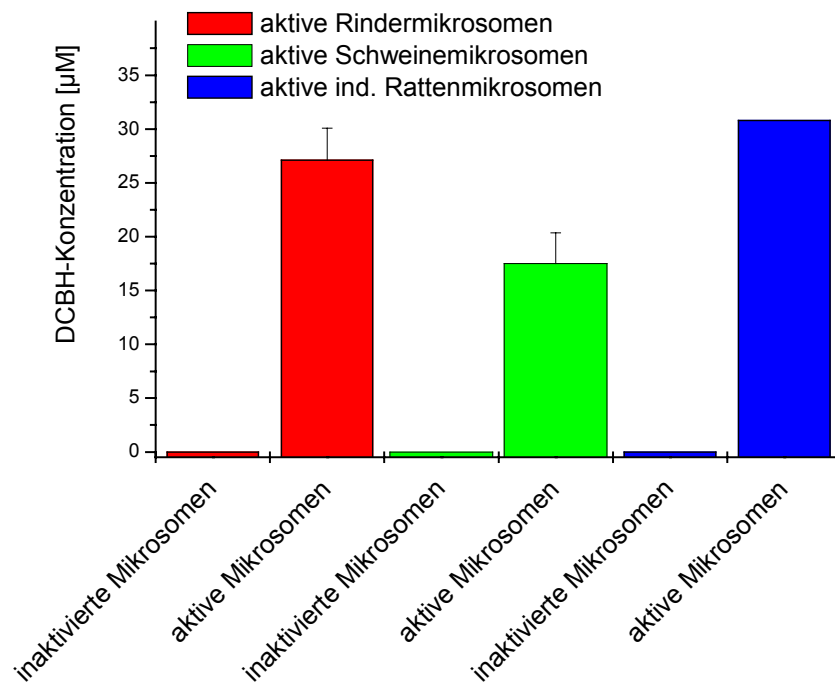


Abbildung 4.7 DCBH-Bildung durch Inkubation von Lebermikrosomeninkubation mit DCBP

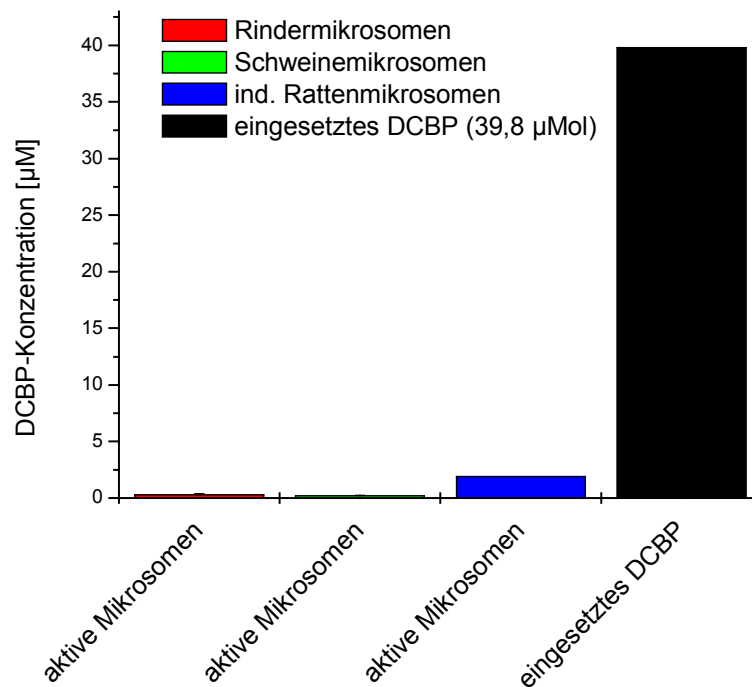


Abbildung 4.8 DCBP-Konzentration nach Inkubation von DCBP mit Lebermikrosomen

4.1.1.6 Inkubation von Dicofol in alkalischen Lösungen

In der Literatur sind Hinweise auf eine alkaliinduzierte Umsetzung von Dicofol zu DCBP vorhanden [Walsh & Hites 1979]. Aus den beschriebenen Literaturdaten geht jedoch nicht hervor, ob eine geeignete Aufarbeitung vor der Analyse durchgeführt wurde. Dies erscheint aber nach den Untersuchungen dieser Arbeit unumgänglich (vgl. 4.1.1.4), weshalb die Untersuchungen wiederholt wurden. Dicofol wurde bei 20°C im Dunkeln in methanolischen NaOH-Lösungen unterschiedlicher Konzentration (10 mM, 1 mM, 0,1 mM) behandelt.

In einer 10 mM methanolischen NaOH-Lösung ist die Umsetzung von Dicofol zu DCBP schon innerhalb von 2 Minuten fast vollständig abgelaufen. Im Gegensatz dazu verläuft die Reaktion in Gegenwart von 0,1 mM NaOH deutlich langsamer (Abbildung 4.9 und Abbildung 4.10). In 10%-iger methanolischer Essigsäurelösung und reinem Methanol wurde keine DCBP-Bildung beobachtet. Die Resultate der Untersuchungen dieser Arbeit zeigen eine direkte Abhängigkeit der Umsatzrate von der NaOH-Konzentration. Die Umwandlung von Dicofol zu DCBP erfolgt somit umso schneller, je höher die Hydroxidionenkonzentration ist.

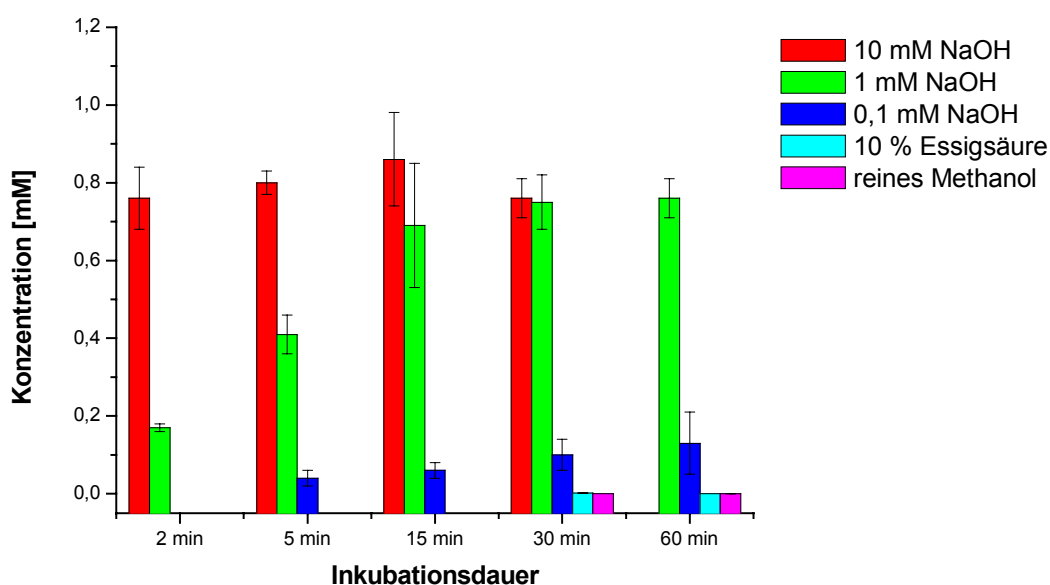


Abbildung 4.9 Entstandenes DCBP nach Inkubation von Dicofol mit methanolischen NaOH-Lösungen

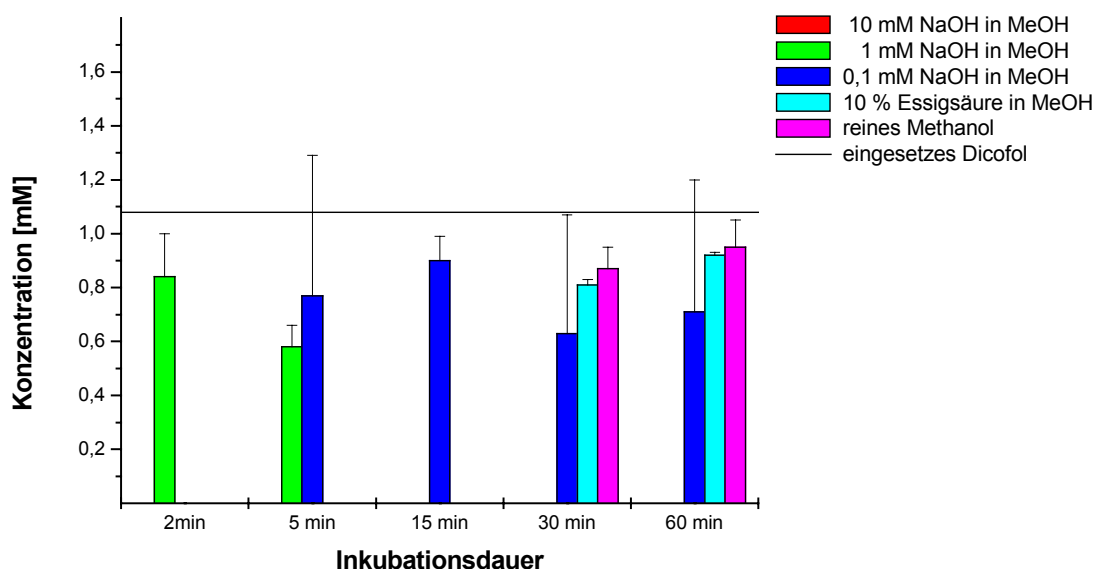


Abbildung 4.10 Dicofolkonzentration nach Inkubation von Dicofol mit methanolischen NaOH-Lösungen

4.1.1.7 Chloroformbestimmung durch Headspace GC beim Dicofolabbau unter alkalischen Bedingungen

Mögliche Reaktionsmechanismen der Umsetzung von Dicofol zu DCBP

Die Säurekonstanten (pK_S) der aliphatischen Alkoholfunktion von Trichlorcarbinolen wie z.B. Dicofol liegen zwischen 11,8 und 12,2 [Reeve et al., 1980]. Unter alkalischen Bedingungen ist deshalb für die Reaktion von Dicofol zu DCBP als einleitender Schritt die Deprotonierung von Dicofol anzunehmen (Abbildung 4.11).

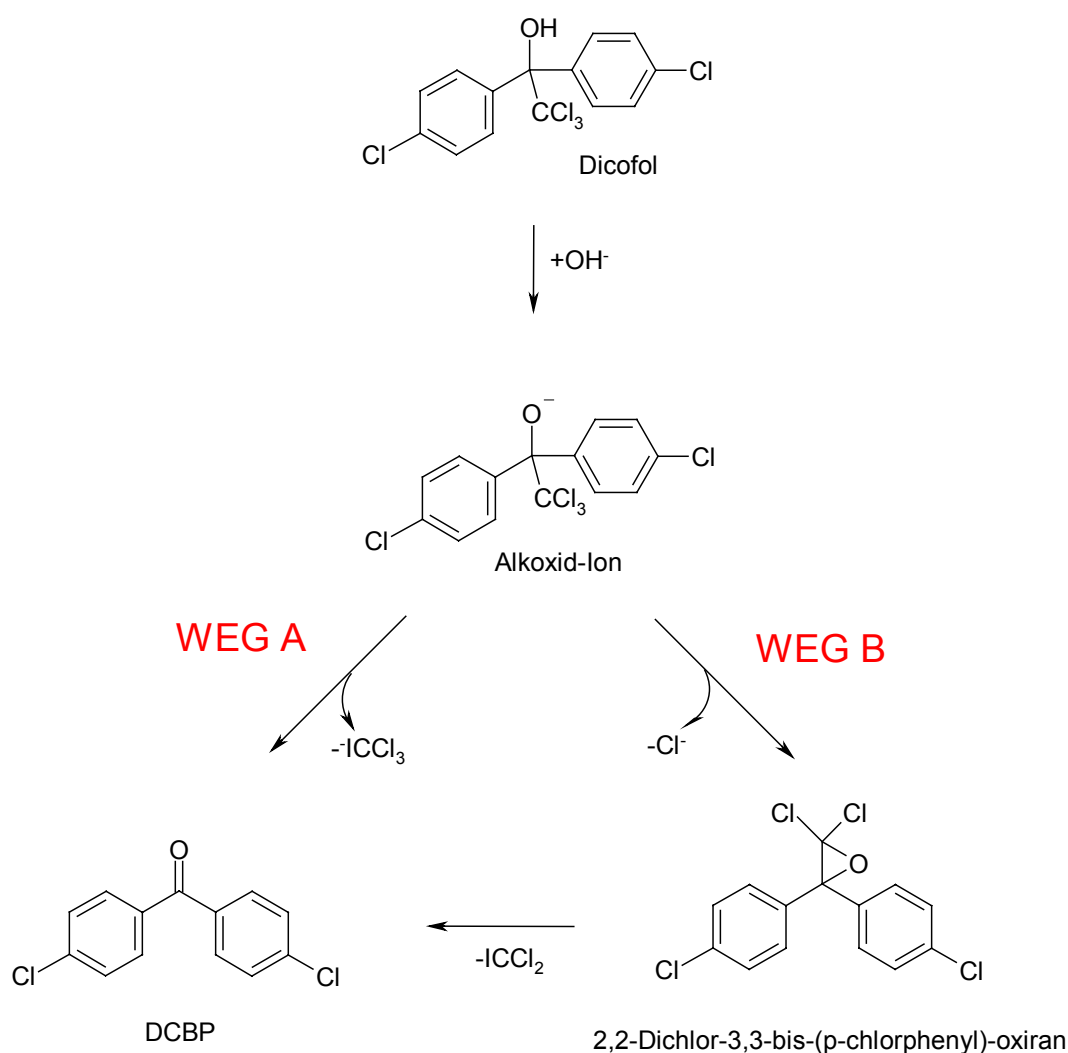


Abbildung 4.11 Mögliche Reaktionsmechanismen der alkaliinduzierten Umwandlung von Dicofol in DCBP [Nome et al., 1981; Reeve et al., 1980; modifiziert]

Ausgehend vom Alkoxid-Ion können zwei Mechanismen angenommen werden. Die Reaktion könnte unter Eliminierung eines Trichlormethylanions (Weg A in Abbildung 4.11) zu DCBP verlaufen [Nome et al., 1981]. Dieser Reaktionsmechanismus ähnelt der basenkatalysierten Zersetzung von Cyanhydrinen. Da der pK_S -Wert des Trichlormethylanions wesentlich höher ist, als der der Cyanide, wird spontan Chloroform gebildet und die Reaktion auf die Seite der Produkte geschoben [Nome et al., 1981]. Verläuft die Reaktion nach Weg B (Abbildung 4.11), kommt es unter intramolekularer

Eliminierung eines Chloridions zur Bildung des 2,2-Dichlor-3,3-bis-(p-chlorphenyl)-oxirans, aus dem dann nach Dichlorcarbenabspaltung DCBP entsteht [Reeve et al., 1980]. Ein nukleophiler Angriff der im Reaktionsgemisch vorhandenen Hydroxidionen am intermediär entstandenen Epoxid scheint aufgrund der großen, sterisch behindernden Substituenten wenig wahrscheinlich.

Welchen Einfluss Chlor- bzw. Phenylsubstituenten auf die Reaktivität bzw. Stabilität des hypothetischen Epoxids haben könnten, soll im Folgenden diskutiert werden.

Chlorierte Ethene werden durch CYP-Monooxygenasen zu den entsprechenden Epoxiden metabolisiert. Aus Chlorethen (Vinylchlorid) entsteht dabei im Zuge der Metabolisierung 2-Chloroxiran, aus 1,1-Dichlorethen (Vinylidenchlorid) 2,2-Dichloroxiran (Abbildung 4.12).

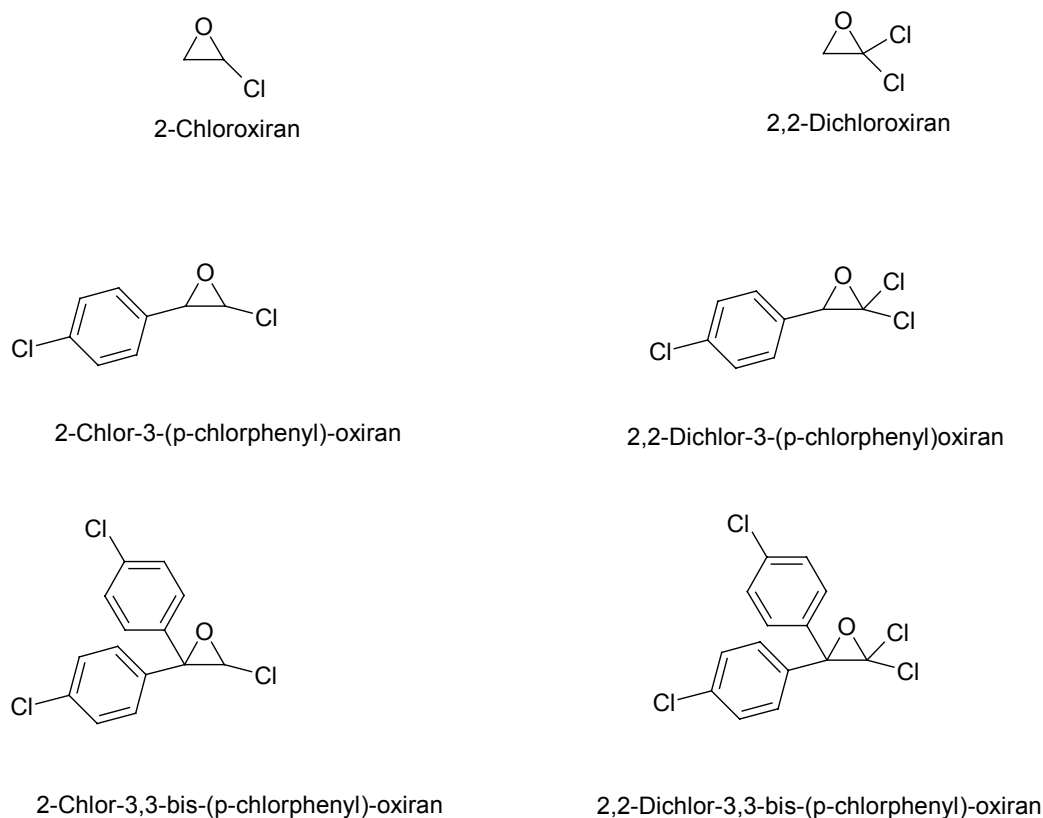


Abbildung 4.12 Strukturformeln von Epoxiden

2,2-Dichloroxiran konnte im Gegensatz zu 2-Chloroxiran nicht isoliert werden [Bolt et al., 1982]. Die Einführung eines zweiten Chlorsubstituenten in 2-Position führt demnach zu einer Erhöhung der Reaktivität bzw. zu einer Erniedrigung der Stabilität des Epoxids. Chlorethen bzw. sein Metabolit 2-Chloroxiran induziert wesentlich mehr DNA-Schäden als 1,1-Dichlorethen bzw. sein Metabolit 2,2-Dichloroxiran, da 2-Chloroxiran reaktiv genug ist, um an die DNA-Basen zu binden, aber auch gleichzeitig stabil genug ist, um vom Cytosol in den Kern gelangen zu können. Es bindet nicht sofort an die im Cytosol zahlreich vorhandenen Proteine. 2,2-Dichloroxiran dagegen scheint aufgrund der beiden Chlorsubstituenten wesentlich weniger stabil zu sein und sollte sehr rasch im Cytosol reagieren. Die höhere Reaktivität von 2,2-Dichloroxiran spiegelt sich in der geringeren Inzidenz an präneoplastischen Foci in der Leber wieder [Bolt et al., 1982].

Ein Phenylsubstituent in 3-Position hat einen stabilisierenden Einfluss auf Monochloroxiran. Die E,Z-Isomere von 2-Chlor-3-(p-chlorphenyl)-oxiran (Abbildung 4.12) wurden synthetisiert und charakterisiert [Kirrmann & Nouri-Bimorgh, 1968; McDonald & Cousins, 1980]. 2-Chlor-3,3-bis-(p-chlorphenyl)-oxiran (Abbildung 4.12), mit einem zweiten Phenylrest in 3-Position, wurde ebenfalls hergestellt und war im Ames-Test positiv [Gold et al., 1981]. Im Gegensatz dazu führt ein weiterer Chlorsubstituent in 2-Position (2,2-Dichlor-3-(p-chlorphenyl)-oxiran, Abbildung 4.12) nicht zu einem isolierbaren Epoxid [Gukasyan et al., 1989].

Legt man die dargestellte hohe Reaktivität bzw. die geringe Stabilität von Epoxiden mit zwei sterisch großen, elektronenziehenden Chlorsubstituenten in 2-Position zu Grunde, ist das postulierte Epoxid (2,2-Dichlor-3,3-bis-(p-chlorphenyl)-oxiran) wahrscheinlich extrem instabil und nicht nachweisbar bzw. eine Bildung über Reaktionsweg B nicht sehr wahrscheinlich.

Orientierende Versuche zur Chloroformbestimmung durch Headspace-GC

Um Hinweise auf einen der beiden Reaktionsmechanismen zu erhalten, sollte das freigesetzte Chloroform nach Reaktionsmechanismus A (Abbildung 4.11) aus dem Reaktionsansatz durch Headspace-GC bestimmt werden. Hierzu muss sichergestellt sein, dass zum einen Chloroform im Reaktionsgemisch stabil ist und zum anderen die Reaktion zum Zeitpunkt der Analyse vollständig abgelaufen ist. In einer 1 mM

methanolischen NaOH-Lösung ist die Reaktion von Dicofol zu DCBP bei 20°C nach 20 min fast vollständig abgelaufen (vgl. 4.1.1.6). Die Headspace-GC Untersuchungen wurden daher nach einer Inkubationszeit von 20 min bei 85°C durchgeführt.

In orientierenden Versuchen wurde zunächst die Stabilität von Chloroform in 1mM methanolischer NaOH untersucht. Zu 2 ml Lösungsmittel (reines Methanol oder 1mM methanolische NaOH) wurden unterschiedliche Mengen an Chloroform gegeben. Nach dem Verschließen der Flaschen wurden diese 20 min bei 85°C äquilibriert und anschließend analysiert. In diesen Ansätzen wurden parallel Nachweis- (1 μmol) und Bestimmungsgrenze (6 μmol) des Analyten Chloroform bestimmt. Im Anschluss wurden die Peakflächen der Chloroformsignale in Methanol und in 1 mM methanolischer NaOH verglichen. Wie in Abbildung 4.13 zu erkennen ist, wurden keine Unterschiede hinsichtlich der Signalfächen der Chloroformsignale in MeOH und 1 mM methanolischer NaOH festgestellt. Lineare Regressionen ergaben annähernd identische Geraden. Es ist daher davon auszugehen, dass Chloroform in 1 mM methanolischer NaOH wahrscheinlich über die gewählte Reaktionszeit stabil ist.

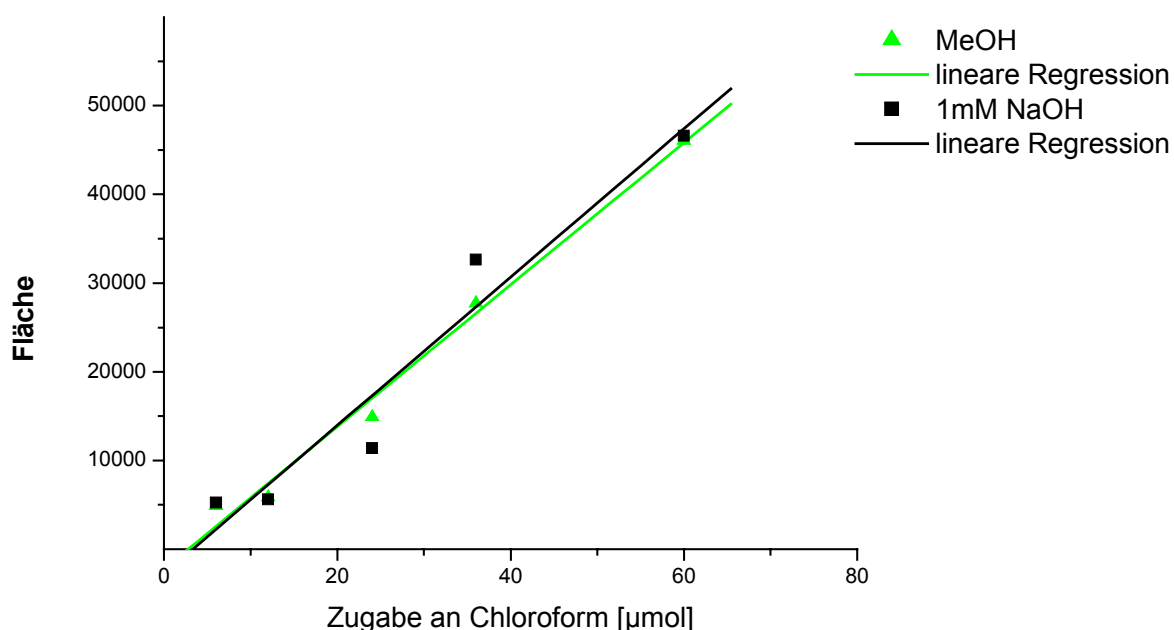


Abbildung 4.13 Stabilität von Chloroform in 1mM methanolischer NaOH
Nachweisgrenze (1 μmol Chloroform) und Bestimmungsgrenze (6 μmol Chloroform)

Der Nachweis des bei der alkali-induzierten Degradation von Dicofol gebildeten Chloroforms wurde mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens durchgeführt, da bei einer eingesetzten Menge von $1,1 \mu\text{mol}$ Dicofol in der Nähe der Nachweisgrenze gemessen wurde. Mit dem Standardadditionsverfahren können auch Analytenkonzentrationen unterhalb der Bestimmungsgrenze quantifiziert werden. Die Probe wird allein und nach Zugabe unterschiedlicher Analytenkonzentrationen gemessen und die erhaltenen Signale einer linearen Regression unterworfen [Matissek et al., 1992]. Der Schnittpunkt der erhaltenen Geraden mit der Abszisse entspricht dabei der Analytenkonzentration in der Probe (Abbildung 4.14). In ersten Messungen wurden mit diesem Verfahren $1,16 \pm 0,13 \mu\text{mol}$ bzw. $0,8 \pm 0,03 \mu\text{mol}$ Chloroform nachgewiesen. Bei der Umwandlung von Dicofol in DCBP scheint annähernd äquimolar Chloroform zu entstehen, was für den dargestellten Reaktionsmechanismus A spricht (Abbildung 4.11).

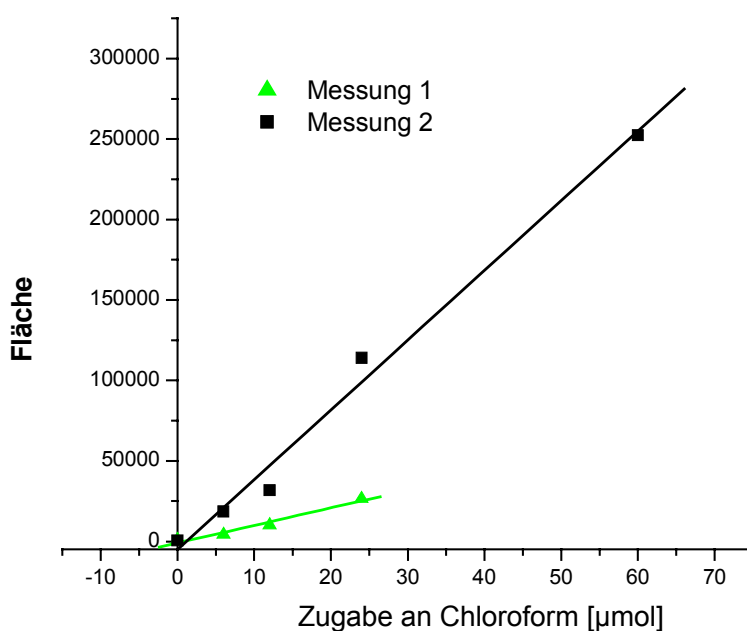


Abbildung 4.14 Quantifizierung von Chloroform bei der alkalischen Inkubation von Dicofol mit Hilfe des Standardadditionsverfahrens

Da neben DCBP Chloroform als zweites Reaktionsprodukt bei der alkali-induzierten Umsetzung von Dicofol nachgewiesen wurde, muss bei einer Exposition mit Dicofol

zusätzlich noch die durch Chloroform hervorgerufene Toxizität in Betracht gezogen werden.

Chloroform kann bei hoher oder chronischer Exposition zu Leber- und Nierenschäden führen. Für diese Schädigung wird die metabolische Aktivierung zu Phosgen verantwortlich gemacht, das durch Salzsäureabspaltung aus dem primär gebildeten Hydroxylierungsprodukt Trichlormethanol entsteht. Chloroform ist zwar im Ames-Test nicht mutagen, verursacht jedoch im Langzeit-Kanzerogenitätstest in hoher Dosierung Nieren- und Lebertumoren. Die kanzerogene Wirkung wird als Folge einer regenerativen Zellteilung infolge der cytotoxischen Wirkung angesehen und beruht vermutlich nicht auf einer direkten DNA-Schädigung. [Eisenbrand & Metzler, 2001]

Dicofol war sowohl im Ames-Test (5 – 5000 µg/Platte) als auch im Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HPRT)-Test (3 – 20 µg/ml) mit und ohne metabolische Aktivierung nicht mutagen. 478 mg/kg Dicofol induzierten *in vivo* keine klastogenen Schäden der Chromosomen von Knochenmarkzellen. Dicofol (39,6 und 79,2 mg/kg/Tag über 45 Wochen) führte bei männlichen B6C3F1-Mäusen zu einer erhöhten Inzidenz an hepatozellulären Adenomen und Karzinomen. [EPA RED, 1998]

4.1.1.8 Abbau von Dicofol in den Inkubationsmedien der Transaktivierungssysteme

In Anbetracht der gewonnenen Erkenntnisse zur abiotischen Abbaubarkeit von Dicofol unter dem Einfluss von Hydroxidionen (4.1.1.6), scheint eine Umwandlung von Dicofol in DCBP im Inkubationsmedium (CDFKS-Medium, vgl. 6.1) der zur Untersuchung hormoneller bzw. antihormoneller Aktivität eingesetzten Testsysteme in Säugerzellen wahrscheinlich. Das eingesetzte CDFKS-Medium mit einem pH-Wert von 7,4 enthält 3,7 g/L NaHCO₃ [Gibco, 2001]. Im Medium der Hefetestsysteme (pH 7,1) [Routledge & Sumpter, 1996] sollte keine bzw. nur geringe Degradation von Dicofol zu DCBP zu beobachten sein.

Dicofol wurde in beiden Medien 2 h und 24 h bei 37°C inkubiert. Es wurde wie bei allen anderen Experimenten zur Umwandlung von Dicofol eine Aufarbeitungskontrolle mitgeführt. Erwartungsgemäß wurde keine Umwandlung von Dicofol zu DCBP im

Hefemedium beobachtet (Abbildung 4.15). Im Gegensatz dazu sind bereits nach 2 h Inkubation im CDFKS-Medium 5,6% und nach 24 h 14,5% des eingesetzten Dicofol zu DCBP umgesetzt.

Wie Guth (2000) bereits feststellte, ist 1 μM DCBP bereits gering antiandrogen aktiv. Bei Inkubation von COS-AR-Luc-Zellen mit 10 μM Dicofol ist nach den vorliegenden Ergebnissen nach 24 h also eine zur Feststellung antiandrogener Aktivität ausreichende DCBP-Konzentration (ca. 1,5 μM) im Inkubationsmedium vorhanden.

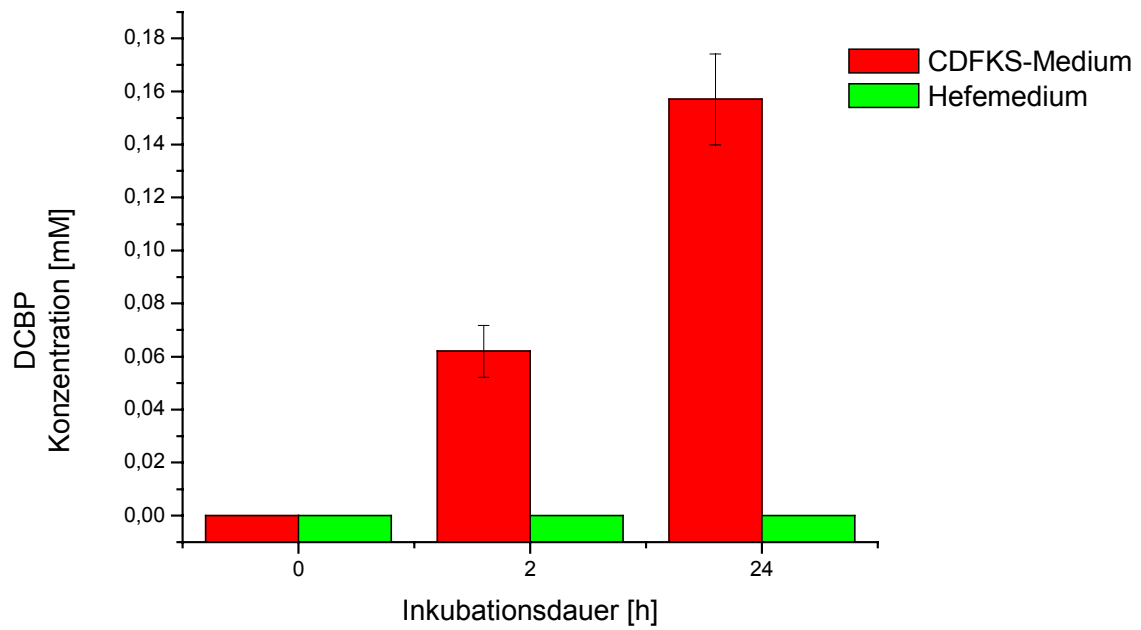


Abbildung 4.15 Entstehung von DCBP aus Dicofol unter Inkubationsbedingungen in den Medien der Transaktivierungssysteme

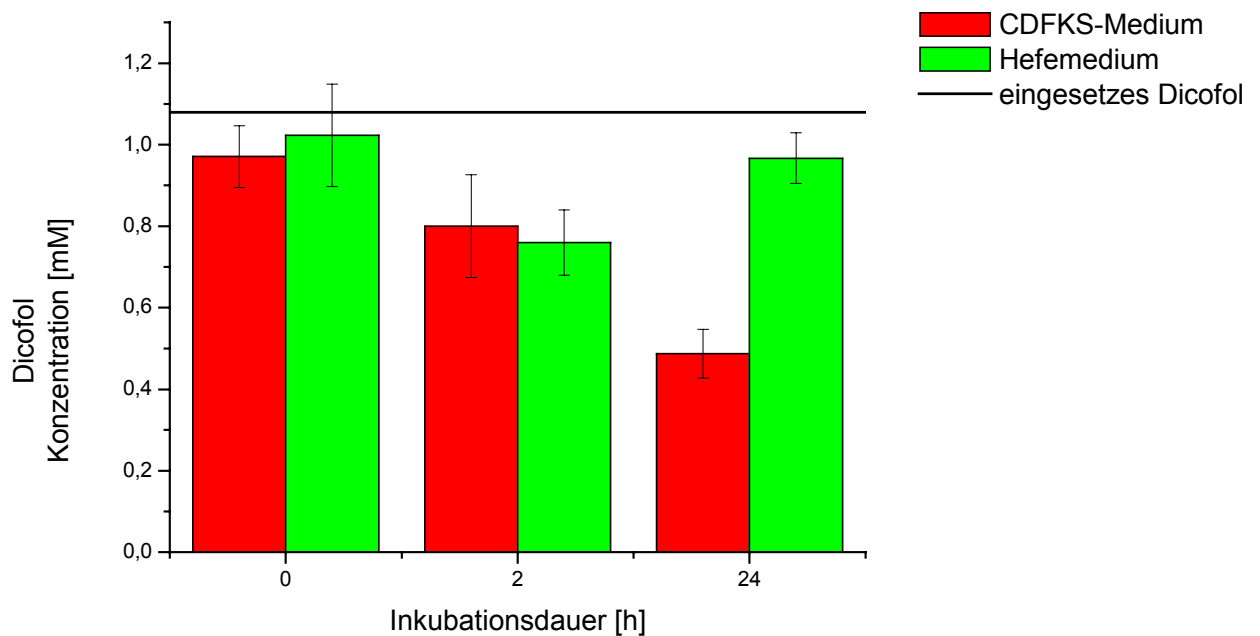


Abbildung 4.16 Abnahme von Dicofol unter Inkubationsbedingungen in den Medien der Transaktivierungssysteme

4.1.1.9 Bestrahlung mit UV-Licht

Aufschluss über die UV-Licht induzierte, abiotische Abbaubarkeit sollte durch die Bestrahlung von Dicofol mit UV-Licht gewonnen werden. Hierzu wurde Dicofol in unterschiedlich polaren Lösemitteln mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm und mit unterschiedlichen Strahlungsdosen ($0,25 \text{ J/cm}^2$, $0,5 \text{ J/cm}^2$, $0,75 \text{ J/cm}^2$) bestrahlt. Zur Simulation einer lipophilen Phase wurde n-Hexan gewählt. Aufschluss über die abiotische Abbaubarkeit im polaren, wässrigen Medium sollte durch Bestrahlung in Methanol bzw. in einem Methanol/Wasser Gemisch gewonnen werden.

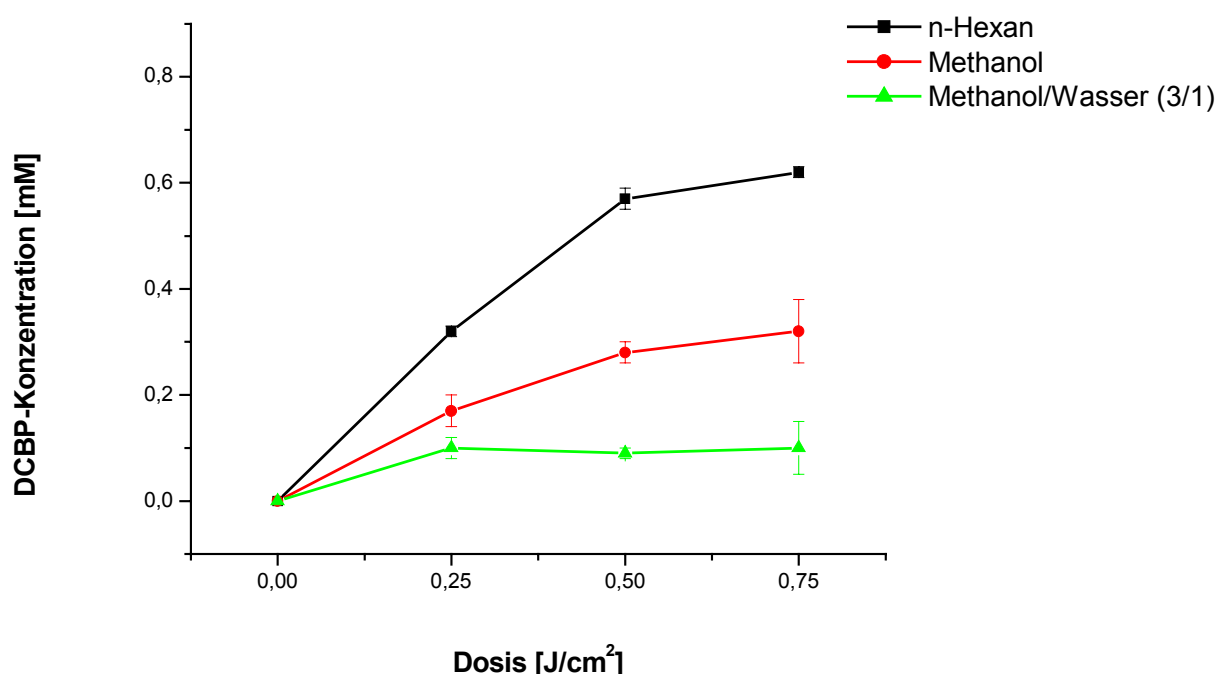


Abbildung 4.17 Entstandenes DCBP nach UV-Bestrahlung von Dicofol

Die Entstehung von DCBP aus Dicofol unter Einfluss von UV-Licht nimmt mit steigender Behandlungsdauer bzw. Strahlungsdosis zu und erfolgt umso schneller je unpolarer das Lösemittel ist (Abbildung 4.17). Dies spricht für eine schnelle Degradation von Dicofol in unpolarer Umgebung, wie beispielsweise auf dem wachsartigen Überzug von Blatt- und Fruchtoberflächen. Langsamer erfolgt der UV-induzierte Ab-

bau in polarer Umgebung, wie z.B. in Wasser. Wahrscheinlich überwiegt in Wasser bei entsprechendem pH-Wert eher die durch Hydroxidionen induzierte Umwandlung.

4.1.2 Untersuchungen auf endokrine Aktivität

4.1.2.1 Validierung der verwendeten Testsysteme

Zur Untersuchung der estrogenen bzw. antiestrogenen Aktivität der Testverbindungen standen MCF-7-Luc-Zellen (vgl. 2.5.2.1.1) und Hefe-ER-Zellen (vgl. 2.5.2.1.2) zur Verfügung. Zur Untersuchung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität wurden COS-AR-Luc-Zellen (vgl. 2.5.2.1.3) und Hefe-AR-Zellen (vgl. 2.5.2.1.4) eingesetzt.

Vor Einsatz der Testsysteme musste überprüft werden, ob bei der Verwendung der Testsysteme in dieser Arbeit Abweichungen zu historischen Kontrollen auftraten. Hierzu wurden die Testsysteme mit den physiologischen Hormonen 17- β -Estradiol (E_2) und 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) validiert.

4.1.2.1.1 MCF-7-Luc-Testsystem

Die Inkubation von MCF-7-Luc-Zellen mit dem physiologischen Hormon E_2 (0,1 – 100 nM) zeigte die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung. Bei halblogarithmischer Auftragung ergibt sich der für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen typische sigmoidale Kurvenverlauf (Abbildung 4.18). Eine Konzentration bis zu ca. 0,5 nM E_2 erzeugt keine bzw. nur äußerst geringe Luciferaseaktivität (unteres Plateau A1). Der Sättigungsbereich (oberes Plateau A2) beginnt bei einer E_2 Konzentration von 100 nM. Der EC_{50} liegt im Bereich von 3 nM E_2 , was mit früheren Daten überein stimmt [Mußler 1999]. Die durch 100 nM E_2 induzierte Luciferaseaktivität wurde durch das reine Antiestrogen ICI 182780 (1 μ M) vollständig gehemmt (Abbildung 4.18). Das Testsystem MCF-7-Luc ist somit valide und kann zur Prüfung von estrogenen und antiestrogenen Aktivität eingesetzt werden. Zur Prüfung auf antiestrogene Aktivität wurde 10 nM E_2 als zu hemmende Konzentration festgelegt (vgl. 2.5.2.3).

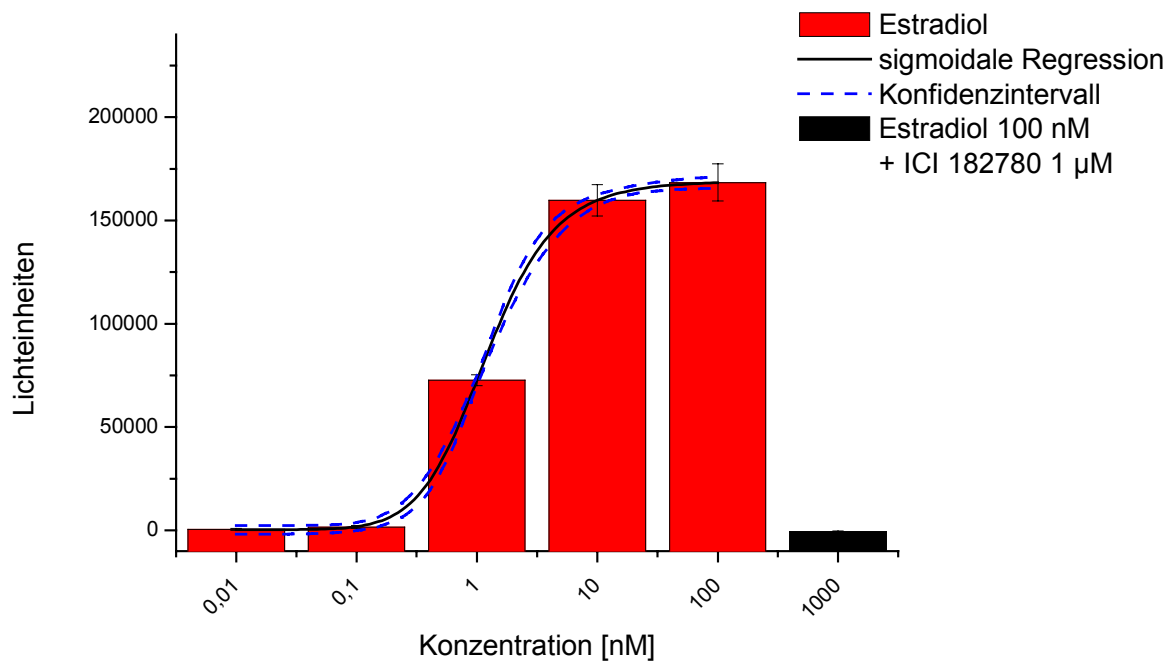


Abbildung 4.18 Validierung des MCF-7-Luc-Testsystems zur Bestimmung estrogener bzw. antiestrogenen Aktivität durch das physiologische Hormon E_2 und das Antiestrogen ICI 182780

4.1.2.1.2 Hefe-ER-Testsystem

Die stabil transfizierten Hefezellen zeigten eine durch E_2 (50 pM – 50 nM) konzentrationsabhängig induzierbare β -Galactosidaseaktivität (Abbildung 4.19). Nach halb-logarithmischer Auftragung wurde der erwartete sigmoidale Kurvenverlauf erhalten (oberes Plateau A2 ab 50 nM E_2 , unteres Plateau A1 unter 0,01 nM, EC_{50} 0,2 nM). Diese Daten sind mit denen der Literatur vergleichbar [Miller et al., 2001]. Zur Bestimmung von antiestrogenen Aktivität wurde 10 nM E_2 als zu hemmende Agonisten-Konzentration gewählt.

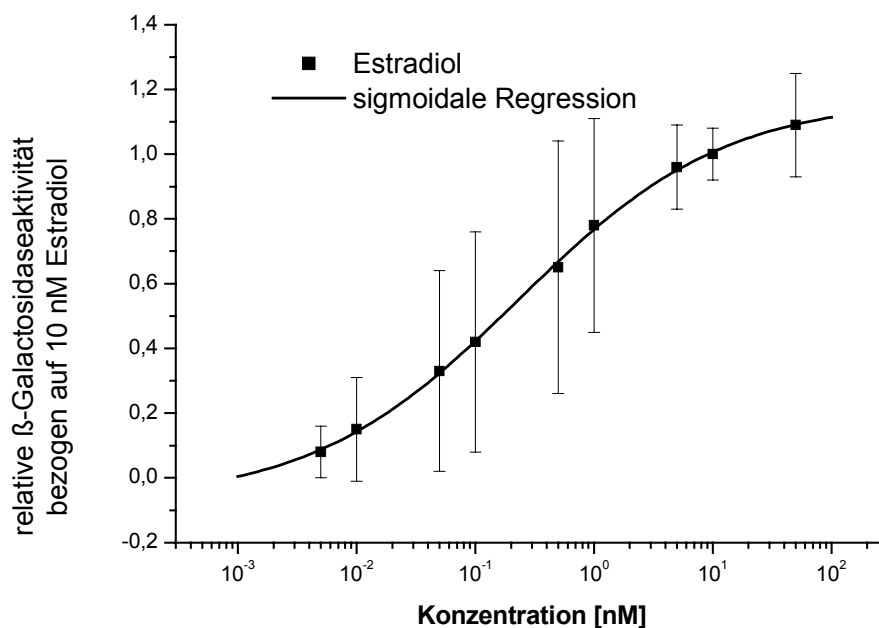


Abbildung 4.19 Induktion von β -Galactosidaseaktivität durch E_2 in Hefe-ER-Zellen

Beim Vergleich von MCF-7-Luc-System und Hefe-ER-System fällt beim Hefe-ER-System eine flachere Dosis-Wirkungsbeziehung auf. Die Steigung p der Dosis-Wirkungsbeziehung im Wendepunkt ist ein Maß für die Spezifität und Sensivität der Ligand-Rezeptor-Beziehung im jeweiligen Testsystem. Je größer die Steigung im Wendepunkt ist, desto besser spricht das Testsystem auf die Gabe des physiologischen Hormons E_2 an. MCF-7-Luc-Zellen ($p = 1,2$; Hefe-ER-Zellen $p = 0,5$) reagieren daher sensibler als Hefe-ER-Zellen auf agonistisch aktive Substanzen.

Vergleicht man die EC_{50} -Werte der beiden Testsysteme (Hefe-ER und MCF-7-Luc), fällt ein um ungefähr eine Potenz geringerer EC_{50} -Wert im Hefe-ER-System auf. Bei niedrigeren E_2 Konzentrationen wird in Hefe-ER-Zellen bereits estrogene Aktivität messbar. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass der Promotor im Hefe-ER-System kein vollständiger, sondern ein artifizieller Promotor ist, wodurch es zu einer unspezifischen Transkription des Reportergens kommen könnte. Zusätzlich sind noch die bereits unter 2.5.2.2 diskutierten Parameter wie die unterschiedliche ER-Ausstattung, sowie der unterschiedliche Zellkontext (Hefezellen versus humane Zellen) zu berücksichtigen. Die Aussagekraft des Hefe-ER-Testsystems im Vergleich zum MCF-7-Luc-Testsystem ist daher wahrscheinlich eingeschränkt.

4.1.2.1.3 COS-AR-Luc-Testsystem

Nach Inkubation von transient transfizierten COS-7-Zellen mit dem physiologischen Hormon DHT (0,01 nM – 10 μ M) zeigte sich eine konzentrationsabhängige Induktion der Luciferaseaktivität (Abbildung 4.20). Der sigmoidale Kurvenverlauf ist folgendermaßen charakterisiert: oberes Plateau A2 ab 1 μ M DHT, unteres Plateau A1 0,01 – 0,1 nM DHT, EC₅₀ 12 nM. Zur Untersuchung auf antiandrogene Aktivität wurden 100 nM DHT als zu hemmende Agonisten-Konzentration verwendet. Die durch 100 nM DHT induzierbare Luciferaseaktivität wurde durch das etablierte Antiandrogen DDE [Kelce et al., 1995] dosisabhängig gehemmt (Abbildung 4.20). Diese Daten stimmen mit früheren Messungen überein [Guth, 2000]. Das transiente Transaktivierungssystem COS-AR-Luc ist valide und kann zur Prüfung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität eingesetzt werden.

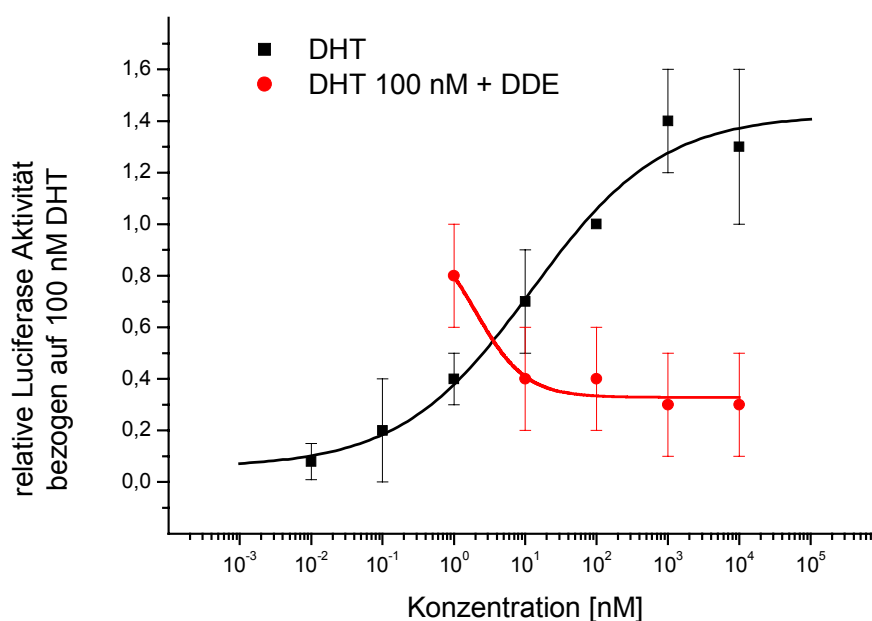


Abbildung 4.20 Validierung des COS-AR-Luc-Systems durch das physiologische Hormon DHT und das etablierte Antiandrogen DDE

4.1.2.1.4 Hefe-AR-Testsystem

In Hefe-AR-Zellen ergab sich nach Inkubation mit 0,01 nM – 1 μ M DHT ein sigmoidaler Dosis-Wirkungsverlauf der β -Galactosidase-Induktion (Abbildung 4.21). Der EC_{50} -Wert liegt bei 8 nM DHT, das obere Plateau A2 beginnt bei 0,5 μ M DHT. Das untere Plateau A1 liegt unterhalb von 0,5 nM DHT. Die Ergebnisse dieser Arbeit weichen von den Literaturdaten deutlich ab. Sohoni & Sumpter (1998) stellten in geringen Konzentrationen (0,1 nM DHT) keine β -Galactosidaseaktivität fest. Eine maximale Reportergergenaktivitat wurde bei Inkubation mit Konzentrationen über 50 nM DHT erreicht. Der EC_{50} -Wert lag bei 0,5 – 1 nM DHT. In der vorliegenden Arbeit sind EC_{50} -Wert und der Beginn des oberen Plateaus A2 um ca. eine Größenordnung zu höheren Konzentrationen verschoben. Dies könnte daran liegen, dass in der Literatur nicht 48 h, sondern lediglich 24 h [Sohoni & Sumpter, 1998] inkubiert wurde. Für die Testung auf antiandrogene Aktivität wurde die zu hemmende DHT-Konzentration auf 50 nM festgelegt. Die durch 50 nM DHT-induzierte β -Galactosidaseaktivität wurde durch das etablierte Antiandrogen DDE [Kelce et al., 1995] konzentrationsabhängig gehemmt (Abbildung 4.21).

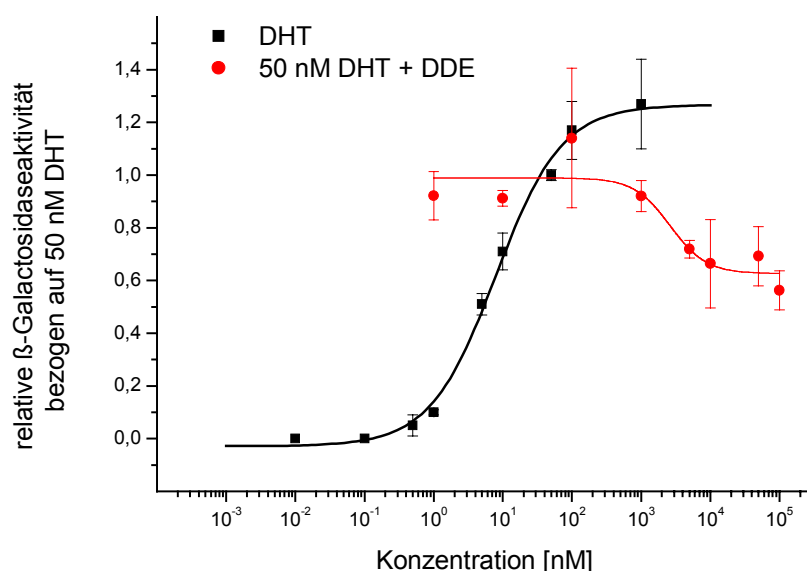


Abbildung 4.21 Validierung des Hefe-AR Transaktivierungssystems mit dem physiologischen Hormon DHT und dem etablierten Antiandrogen DDE

Aus den sigmoidalen Kurvenanpassungen der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität wurden in COS-AR-Luc-Zellen und Hefe-AR-Zellen vergleichbare EC_{50} -Werte erhalten. Die Steigungen in den Wendepunkten der Dosis-Wirkungsbeziehungen sind ebenfalls vergleichbar (Hefe-AR $p = 1,6$; COS-AR-Luc $p = 1,2$). Es fällt aber auf, dass DDE im COS-AR-Luc-System (30% Restaktivität bei 10 μM DDE) wesentlich stärker antiandrogen wirkt als im Hefe-System (80% Restaktivität bei 10 μM DDE). Zudem wird eine Hemmung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität erst bei einer um eine Größenordnung höheren Konzentration erreicht. Die Reaktion auf eine antiandrogen aktive Substanz scheint in Hefe-AR-Zellen also weniger ausgeprägt zu sein. Mögliche Ursachen werden im Kapitel 4.4 diskutiert.

4.1.2.2 Untersuchung auf estrogene Aktivität

4.1.2.2.1 Dicofol

In der Literatur sind Hinweise auf hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität von Dicofol vorhanden. Weibliche Wistarratten, die 40 - 50 mg/kg Körpergewicht technisches Dicofol über 30 Tage erhielten, zeigten eine Verlängerung der Estrusdauer, Abnahme der Estruszyklen und Reduktion der Zahl an gesunden Follikeln [Jadatmkunti & Kaliwal 1999]. Eine Kontamination des verwendeten Dicofols mit DDT, DDE und/oder DCBP wird von den Autoren nicht ausdrücklich ausgeschlossen. Es war daher zu vermuten, dass die beobachteten Effekte unter Umständen auf Kontaminanten wie DDT, DDE sowie DCBP beruhten. Nach der Behandlung weiblicher, amerikanischer Turmfalken (*Falco sparverius*) mit 20 mg/kg Körpergewicht *o,p'*-Dicofol (99,9%) wurden Gonadenabnormalitäten bei männlichen sowie atypische Ovarienmorphologie bei weiblichen Embryonen festgestellt [MacLellan et al., 1996] .

In vitro sind ebenfalls Hinweise auf estrogene Aktivität von Dicofol beschrieben. Die Untersuchung von Dicofol (50 – 100 μM) in Hefe-ER-Zellen ergab nur schwache estrogene Aktivität [Vinggaard et al., 1999]. Im Wachstumstest in MCF-7-Zellen („E-Screen-Assay“) wurden widersprüchliche Ergebnisse festgestellt. Bei Verwendung von technischem Dicofol (20%-ige Emulsion) wurde eine leichte Wachstums-

stimulation beobachtet [Du & Xu 2001]. Die Inkubation von MCF-7-Zellen mit reinem Dicofol führte im Gegensatz dazu zu keiner Wachstumsstimulation [Vinggaard et al., 1999]. Die Untersuchungen von Vinggaard et al. (1999) stimmen mit der äußerst geringen Affinität von Dicofol für den ER des amerikanischen Alligators [Vonier et al., 1996] überein.

In der vorliegenden Arbeit wurde Dicofol (96%) in MCF-7-Luc-Zellen und in Hefe-ER-Zellen auf estrogene Aktivität untersucht. Durch keine der eingesetzten Dicofolkonzentrationen (1 nM – 10 µM) wurde ausreichend Luciferaseaktivität induziert, um die Signifikanzschwelle für estrogene Aktivität zu überschreiten. Dicofol ist daher in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-Luc nicht estrogen aktiv (Abbildung 4.22).

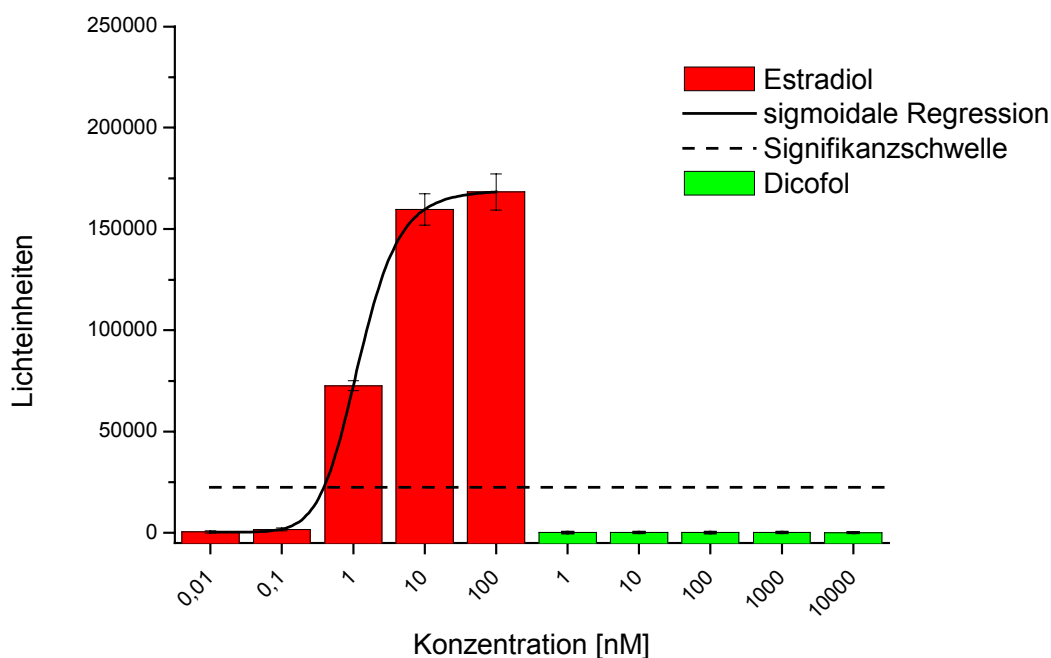


Abbildung 4.22 Untersuchung von Dicofol auf estrogene Aktivität in MCF-7-Luc-Zellen

Widersprüchliche Ergebnisse erhielt man bei der Untersuchung von Dicofol in Hefe-ER-Zellen. Hohe Dicofolkonzentrationen (10 – 100 µM) zeigten mit E₂ vergleichbare estrogene Eigenschaften (Abbildung 4.23). Zu berücksichtigen ist jedoch, dass Dicofolkonzentrationen über 10 µM toxisch für Hefezellen sind [Vinggaard et al., 1999]. Bei der Auswertung wurden die gemessenen Chlorphenolrot-Extinktionen bei 540 nm

gegen die optische Dichte bei 620 nm korrigiert. Da jedoch bei hoher Toxizität einer Substanz nur noch wenige Zellen in der Suspension vorhanden sind, wodurch die optische Dichte wesentlich geringer ist, kann durch dieses Verfahren ein möglicherweise falsch positives Ergebnis erzeugt werden.

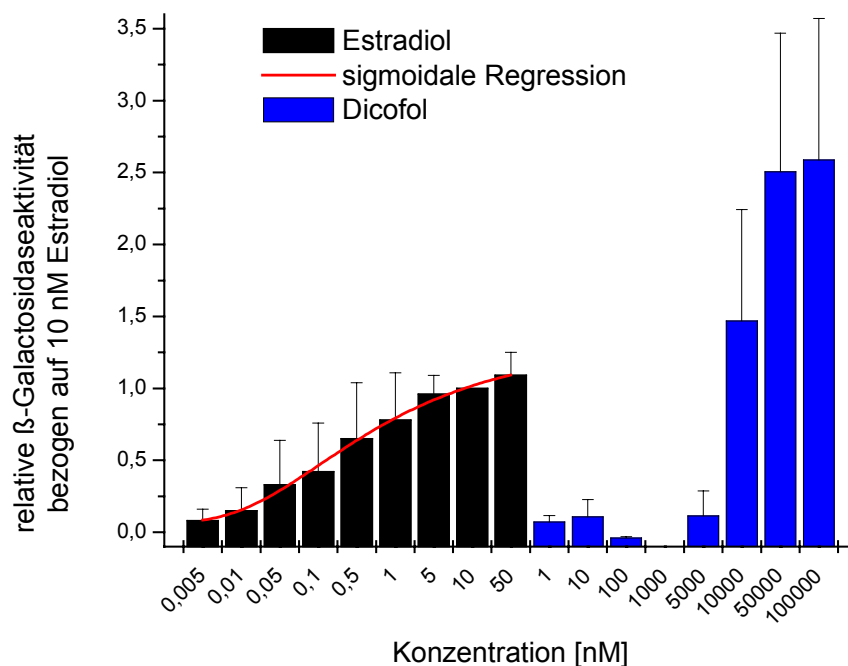


Abbildung 4.23 Untersuchung von Dicofof auf estrogene Aktivität im Hefe-ER-System mit Korrektur durch die optische Dichte

In Abbildung 4.24 sind die Daten zum Vergleich ohne Korrektur gegen die optische Dichte dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die gemessenen Extinktionen bei 540 nm in den toxischen Konzentrationen deutlich unterhalb der durch die niedrigste E_2 Konzentration (0,5 pM) induzierten β -Galactosidaseaktivität liegen. Bei stark toxischen Substanzen wie Dicofof sind die Grenzen des Hefe Testsystems erreicht. Das Testsystem ist für diese Fragestellung nicht geeignet. Es kann lediglich die Aussage liefern, dass Dicofof in niedrigen Konzentrationen ($< 5 \mu\text{M}$) nicht toxisch und auch nicht estrogen aktiv ist.

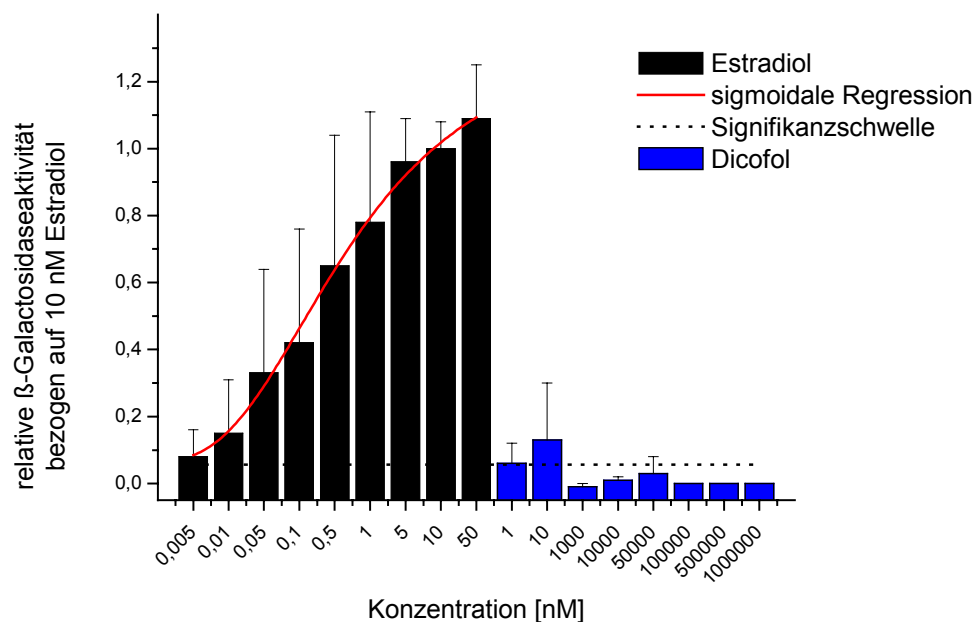


Abbildung 4.24 Untersuchung von Dicofof auf estrogene Aktivität im Hefe-ER-System ohne Korrektur durch die optischen Dichte

Um auch relativ hefetoxische Verbindungen mit diesem Testsystem untersuchen zu können, sollte das System weiterentwickelt werden. Die Messung der optischen Dichte bei 620 nm ist ein relativ unspezifischer Parameter, da nicht nur lebende Zellen, sondern auch alle anderen Trübstoffe, wie beispielsweise Zellfragmente, mit erfasst werden. Diese Bestandteile könnten aus der zu vermessenden Suspension durch eine entsprechende Dichtezentrifugation entfernt werden, womit eine spezifischere Aussage in Bezug auf die Lebendzellzahl erhalten werden könnte. Dies hätte jedoch eine noch niedrigere Extinktion bei einer Wellenlänge von 620 nm zur Folge, wodurch die korrigierten Werte noch stärkere estrogene Aktivität vortäuschen würden.

Möglicherweise ist der MMT-Test zur Bestimmung der Lebendzellzahl geeignet. Beim MTT-Test wird das schwach gelbe 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium Salz (MTT) in die Zellen aufgenommen. Sein Tetrazoliumring wird durch Dehydrogenasen aktiver Mitochondrien reduktiv aufgebrochen, wobei ein alkohollösliches, dunkelblaues Formazan entsteht. Nach Lyse der Zellen wird das Formazan photometrisch vermessen [Lindl & Bauer, 1987]. Diese schnell durchzuführende Methode ist sowohl für Suspensionskulturen als auch für Monolayerkulturen geeignet.

4.1.2.2.2 DCBP und DCBH

Keine der durch DCBP und DCBH induzierten Luciferaseaktivitäten konnte die Signifikanzschwelle für estrogen Aktivität übersteigen. DCBP und DCBH sind daher in MCF-7-Luc-Zellen nicht estrogen aktiv (Abbildung 4.25).

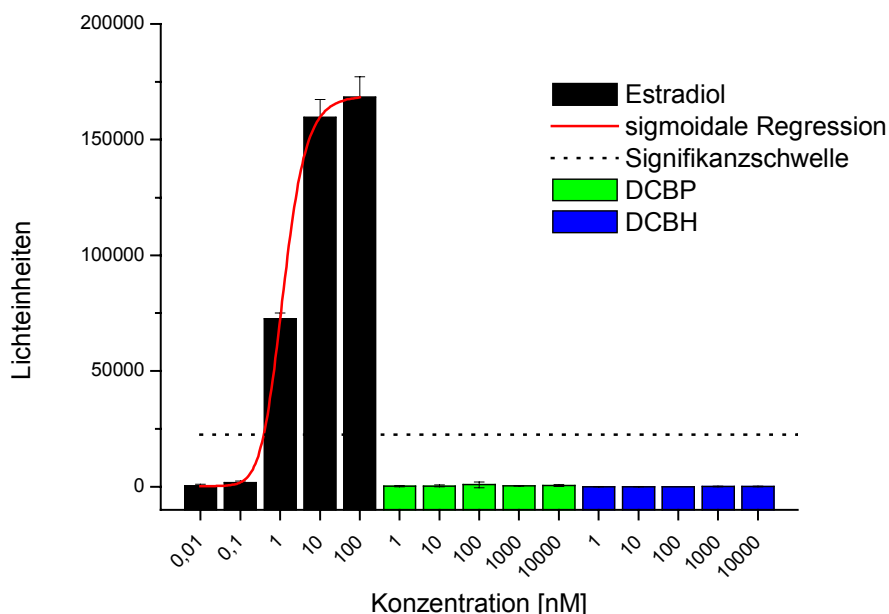


Abbildung 4.25 Untersuchung von DCBP und DCBH auf estrogen Aktivität in MCF-7-Luc-Zellen

DCBP ist auch in Hefe-ER-Zellen nicht estrogen aktiv (Abbildung 4.26). DCBH ist wie Dicofol in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (5 – 100 μM) für die verwendeten Hefezellen stark toxisch, so dass ebenfalls estrogen Aktivität von DCBH vorgetauscht wird (Abbildung 4.26). Die Extinktionen ohne Korrektur durch die optische Dichte liegen deutlich unterhalb der durch E_2 (5 μM) induzierten β -Galactosidaseaktivität (Abbildung 4.27). Es ist lediglich die Aussage möglich, dass DCBH-Konzentrationen unter 5 μM für die verwendeten Hefezellen nicht toxisch und auch nicht estrogen aktiv sind. Das Hefe-ER-Testsystem ist für die Untersuchung hoher DCBH-Konzentrationen auf estrogen Aktivität nicht geeignet.

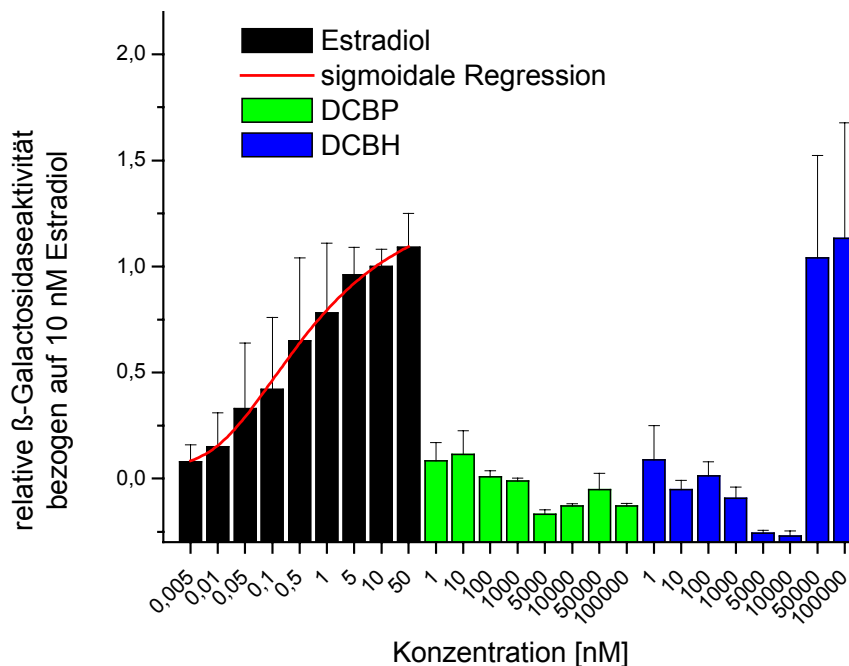


Abbildung 4.26 Untersuchung von DCBP und DCBH auf estrogene Aktivität in Hefe-ER-Zellen mit Korrektur gegen die optische Dichte

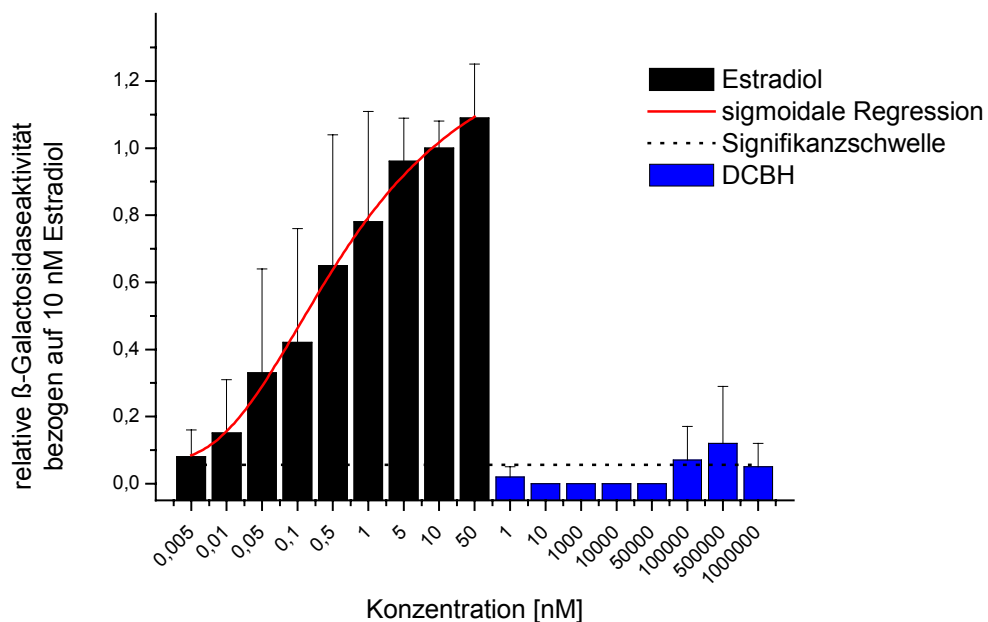


Abbildung 4.27 Untersuchung von DCBH auf estrogene Aktivität in Hefe-ER-Zellen ohne Korrektur gegen die optische Dichte

4.1.2.3 Untersuchung auf androgene und antiandrogene Aktivität

4.1.2.3.1 DCBP

Guth (2000) hatte antiandrogene Aktivität des Dicofol-Degradationsprodukts DCBP festgestellt. In transient transfizierten COS-7-Zellen wurde dabei die durch 100 nM DHT-induzierte Luciferaseaktivität durch DCBP konzentrationsabhängig auf maximal 60 % Restaktivität gehemmt. DCBP konnte des Weiteren die durch 1 nM DHT-induzierte Bildung des androgen abhängig exprimierten „Prostate Specific Antigen“ (PSA) in der Mammakarzinomzelllinie T47D hemmen. Das antiandrogene Potential von DCBP wurde durch Untersuchungen von Böhm (2002) bestätigt. Das „Testosterone Repressed Prostate Message 2“ (TRPM-2) Protein wird durch DHT gegenläufig reguliert. In Anwesenheit von DHT wird keine TRPM-2 mRNA gebildet. Eine Unterdrückung der androgenen Aktivität von DHT durch ein Antiandrogen führt zur Erhöhung des TRPM-2 mRNA Levels. Dieser Effekt wurde bei Koinkubation von DHT und DCBP beobachtet.

In der vorliegenden Arbeit wurde das androgene bzw. antiandrogene Potential von DCBP in Hefe-AR-Zellen untersucht. Im stabil transfizierten Hefe-AR-Transaktivierungssystem wurde die durch 50 nM DHT-induzierte β -Galactosidaseaktivität von der höchsten eingesetzten DCBP-Konzentration (5 - 100 μ M) um ca. 10 % gehemmt (Abbildung 4.28).

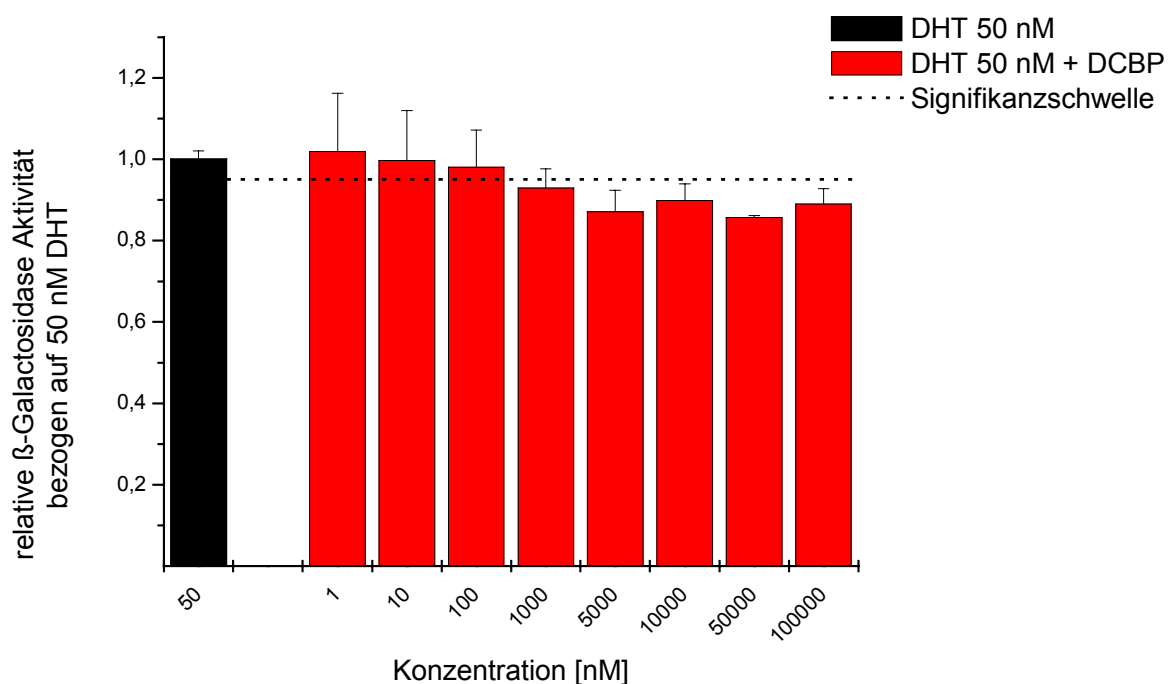


Abbildung 4.28 Untersuchung von DCBP auf antiandrogene Aktivität in Hefe-AR-Zellen

Die Verringerung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität durch DCBP fällt in diesem Testsystem deutlich geringer als im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc aus. Wie bei der Validierung des Testsystems mit DDE war eine um eine Größenordnung höhere Konzentration des Antiandrogens (im Vergleich zum COS-AR-Luc-System) nötig, um eine hemmende Wirkung auf die Reportergen-Induktion zu erzielen. Mögliche Ursachen hierfür werden in Kapitel 4.4 diskutiert.

In Hefe-AR-Zellen wurde antiandrogenes, nicht aber androgenes Potential von DCBP festgestellt (Abbildung 4.29). Keine der durch DCBP induzierten β -Galactosidaseaktivitäten war in der Lage, die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität zu übersteigen.

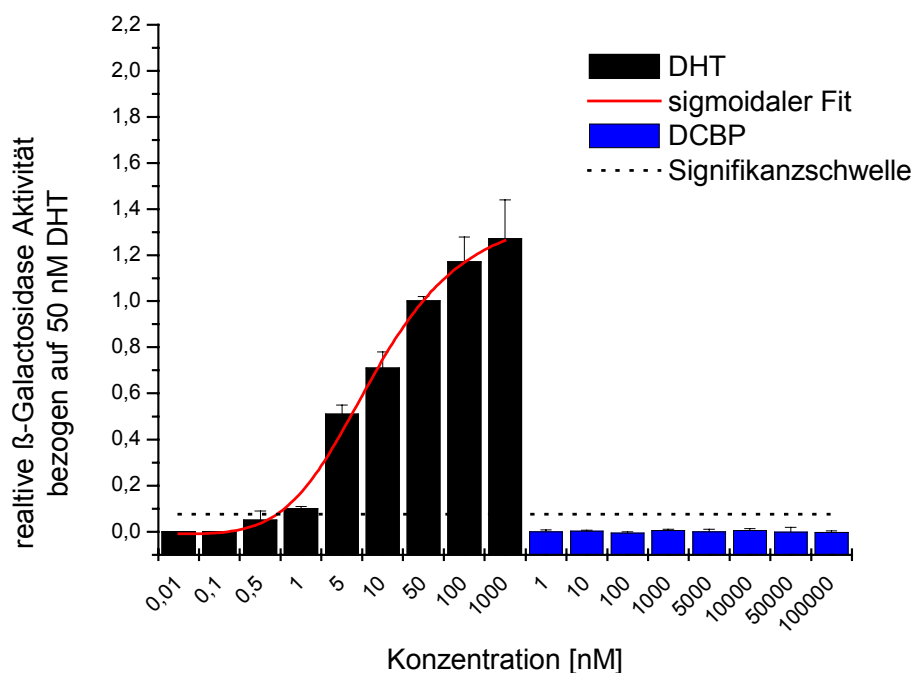


Abbildung 4.29 Untersuchung von DCBP auf androgene Aktivität im Hefe-AR-System mit Korrektur durch die optische Dichte

4.1.2.3.2 Dicofol und DCBH

Im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc wurde die durch 100 nM DHT-induzierte Luciferaseaktivität von keiner der eingesetzten Dicofolkonzentrationen (10 nM – 10 μ M) gehemmt (Abbildung 4.30). Insgesamt fällt die hohe Schwankungsbreite der Daten auf, die möglicherweise auf die Umwandlung von Dicofol im Inkubationsmedium (vgl. 4.1.1.8) zurückgeführt werden kann.

Nach Inkubation der transient transfizierten COS-7-Zellen mit DCBH in Koinkubation mit 100 nM DHT zeigte die höchste eingesetzte DCBH-Konzentration (10 μ M) eine Hemmung der durch 100 nM DHT-induzierten Luciferaseaktivität um ca. 50% (Abbildung 4.30). Möglicherweise wird DCBH während der Inkubation zu DCBP oxidiert. Ob COS-7-Zellen über entsprechende Enzyme verfügen oder ob DCBH durch Luftsauerstoff oxidiert werden kann, ist bisher nicht abschließend geklärt.

Die Frage nach einer möglichen antiandrogenen Aktivität von Dicofol bzw. DCBH ist mit diesen Untersuchungsergebnissen nicht zu beantworten.

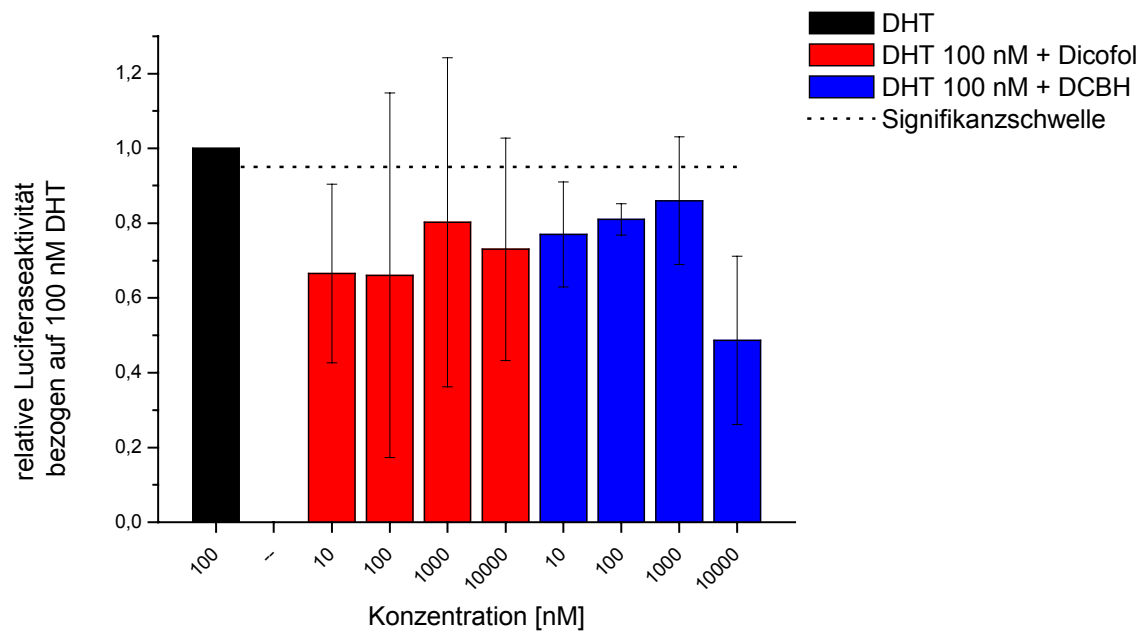


Abbildung 4.30 Untersuchung von Dicofol und DCBH auf antiandrogene Aktivität in COS-AR-Luc-Zellen

Dicofol und DCBH sind im COS-AR-Luc-System nicht androgen aktiv (Abbildung 4.31), da die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität nicht überschritten wird.

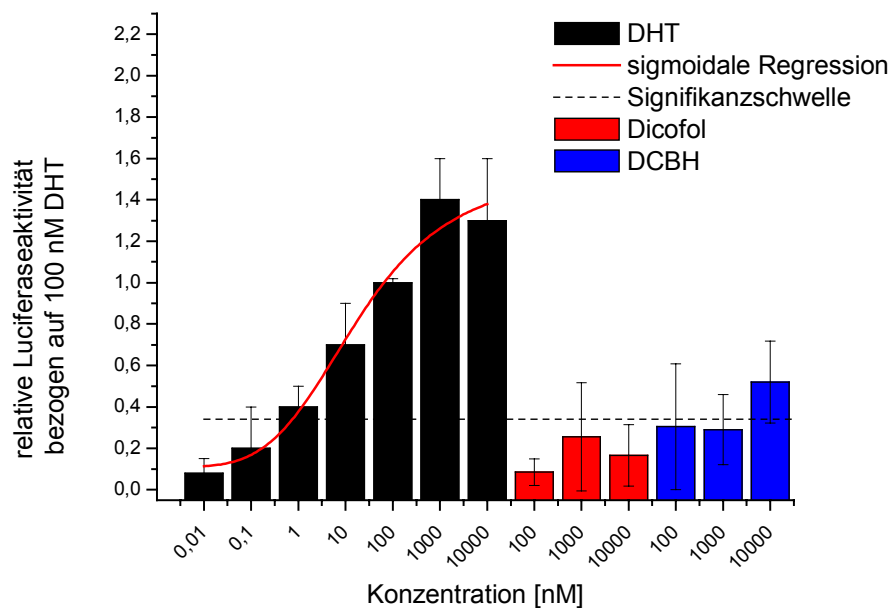


Abbildung 4.31 Untersuchung von Dicofol und DCBH auf androgene Aktivität in COS-AR-Luc-Zellen

Dicofol und DCBH sind für die verwendeten Hefe-AR-Zellen ausgesprochen toxisch. Die gemessenen optischen Dichten der Proben nach Inkubation mit 1 – 100 μM DCBH bzw. Dicofol waren im Vergleich zu den optischen Dichten der anderen Proben wesentlich geringer. In Abbildung 4.32 sind die Reportergenaktivitäten bei der Untersuchung auf antiandrogene Aktivität mit Korrektur gegen die optische Dichte, in Abbildung 4.33 ohne Korrektur gegen die optische Dichte dargestellt.

In Abbildung 4.34 und in Abbildung 4.35 sind die erhaltenen β -Galactosidaseaktivitäten bei der Untersuchung von Dicofol und DCBH auf androgene Aktivität aufgetragen. Wie in Abbildung 4.34 zu erkennen ist, wird beim Standardverfahren mit Korrektur gegen die optische Dichte die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität überschritten. Bei Auswertung der gemessenen Daten ohne Korrektur gegen die optische Dichte ergeben sich Reportergenaktivitäten, die die Signifikanzschwelle nicht überschreiten (Abbildung 4.35).

Im Hefe-AR-Testsystem zeigen Dicofol und DCBH in Konzentrationen unterhalb von 1 μM eine tolerierbare Toxizität und sind weder androgen noch antiandrogen aktiv.

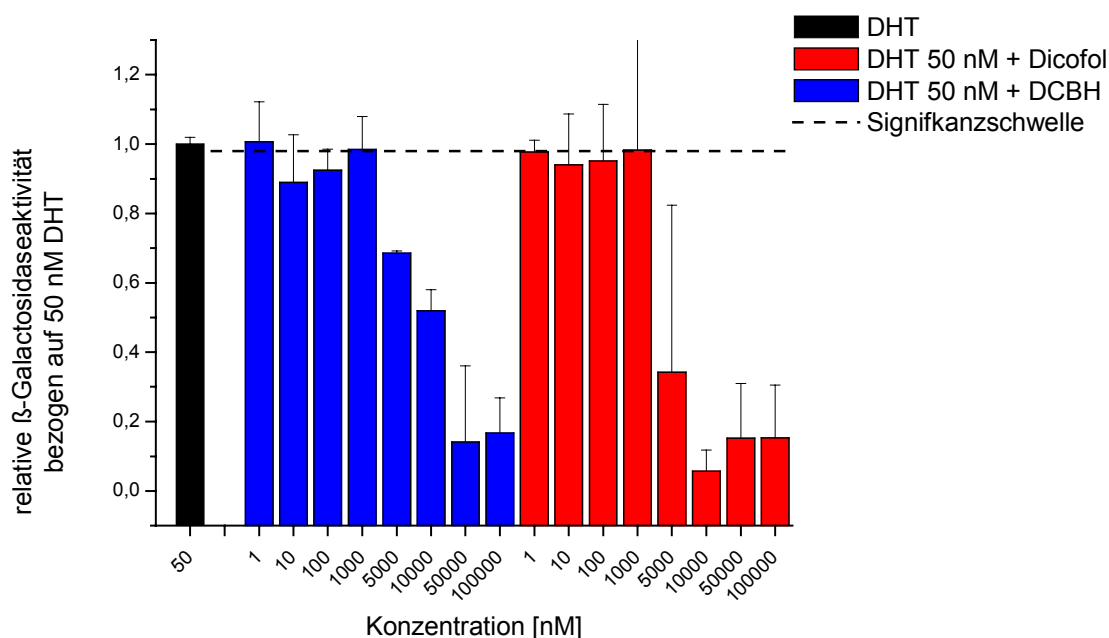


Abbildung 4.32 Untersuchung von DCBH und Dicofol auf antiandrogene Aktivität im Hefe-AR-Zellen mit Korrektur durch die optische Dichte

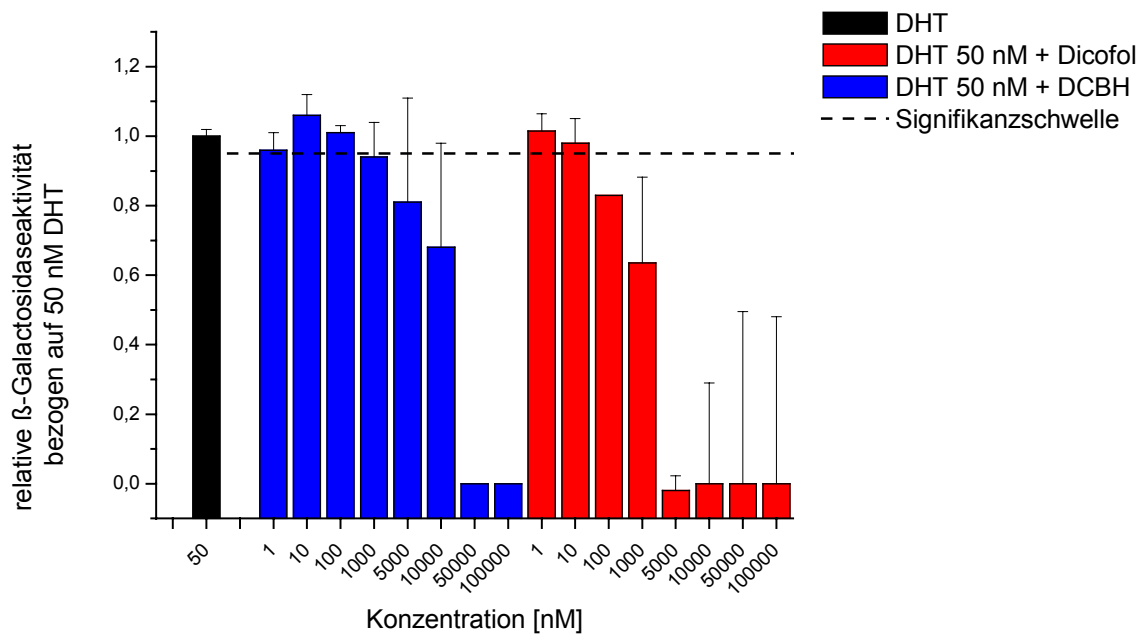


Abbildung 4.33 Untersuchung von DCBH und Dicofol auf antiandrogene Aktivität in Hefe-AR-Zellen unter Verzicht der Korrektur der Extinktion bei 540 nm durch die optische Dichte

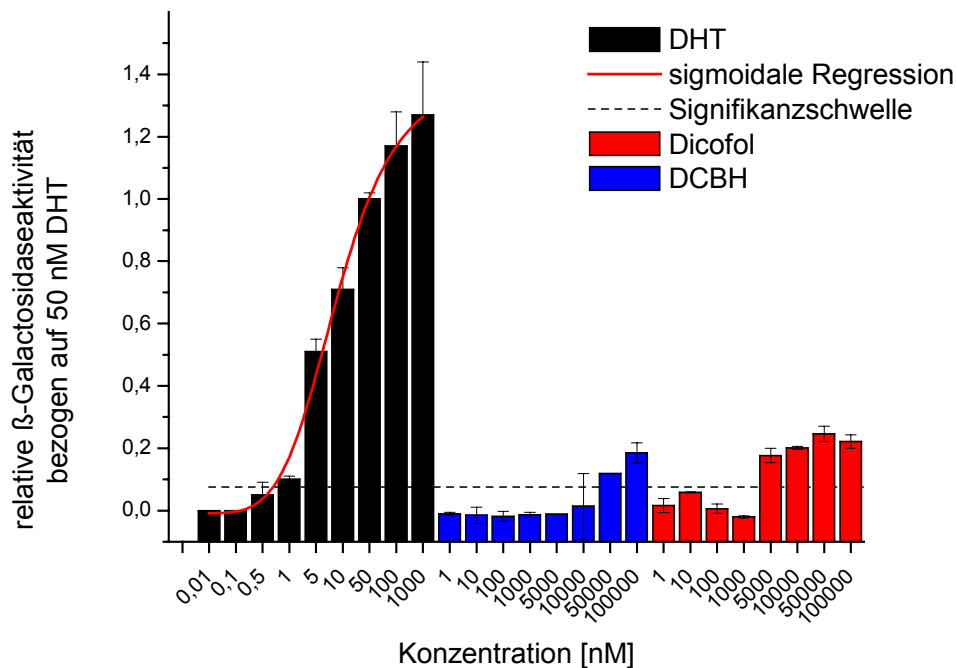


Abbildung 4.34 Untersuchung von DCBH und Dicofol auf androgene Aktivität im Hefe-AR-Testsystem mit Korrektur durch die optische Dichte

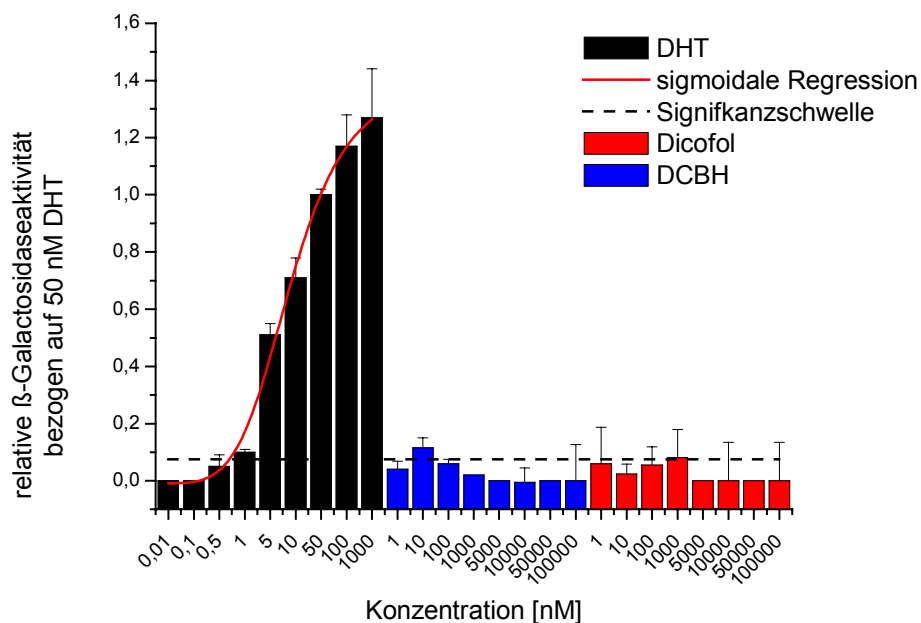


Abbildung 4.35 Untersuchung von DCBH und Dicofol auf androgene Aktivität im Hefe-AR-Testsystem unter Verzicht der Korrektur durch die optische Dichte

4.1.3 Zusammenfassung und Diskussion

4.1.3.1 Abbau von Dicofol

In der Literatur wurden *in vivo* folgende Metabolite von Dicofol beschrieben: DCBP, DCBH, sowie Dechloridicofol [Brown & Casida 1987] und Chlorbenzoesäure [EPA RED, 1998] (vgl. 2.4.2.1). In dieser Arbeit wurde festgestellt, dass Dicofol nicht metabolisch, sondern UV- und/oder alkali-induziert zu DCBP umgesetzt wird. Andere Abbauprodukte wurden bei der Inkubation von Lebermikrosomen nicht nachgewiesen. Die Metabolisierungsexperimente mit Mikrosomen sind hauptsächlich für die Untersuchung CYP-abhängiger Abbauege geeignet. Nicht erfasst werden beispielsweise Glutathion-abhängige reduktive Dehalogenierungen, wie sie für die Dechlorierung von DDT zu 1,1-Dichlor-2,2-bis(p-chlorphenyl)ethan (DDD) beschrieben wurde [Kelner et al., 1986]. Dieser Metabolismusweg könnte auch bei der Reaktion von Dicofol zu Dechloridicofol eine Rolle spielen. In Mikrosomen sind zwar Glutathiontransferasen, nicht aber deren Kosubstrat Glutathion vorhanden, so dass möglicherweise aus diesem Grund kein Dechloridicofol nachgewiesen wurde.

Eine ähnliche nicht-enzymatische Reaktion wie die Degradation von Dicofol zu DCBP findet eventuell auch bei anderen DDT-ähnlichen Verbindungen statt. Das als antiandrogen aktiv erkannte Dihydroxybenzophenon [Guth, 2000] wurde als Metabolit von Methoxychlor beschrieben [US-Department for health and human services, 2002]. Der Abbaumechanismus von Methoxychlor zu Dihydroxybenzophenon ist noch nicht abschließend geklärt. Legt man die Erkenntnisse des nicht-enzymatischen Abbaus von Dicofol zu DCBP zu Grunde, müsste Methoxychlor am zentralen C-Atom hydroxyliert werden. Diese Reaktion ist allerdings bisher in der Literatur nicht beschrieben worden. Sie sollte jedoch möglich sein, da auch DDT am zentralen C-Atom hydroxyliert werden kann [Menzie, 1980].

Die Entstehung von antiandrogen aktiven, substituierten Benzophenonen im Zuge der Metabolisierung von Pestiziden des DDT-Typs, ist eine bisher nicht in Betracht gezogene Gefährdungsmöglichkeit hinsichtlich einer Störung des Hormonhaushalts und sollte weiter untersucht werden.

4.1.3.2 Analytik von Dicofol

Dicofol ist durch seine im Vergleich zu DDT hohen Wasserlöslichkeit im Oberflächengewässer gelöst und nicht an Sedimente gebunden [Domagalski, 1996]. Diese Eigenschaft macht Dicofol schnell durch Hydrolyse oder UV-Licht abbaubar. Über die Abbaubarkeit des Degradationsproduktes DCBP liegen bisher keine Untersuchungen vor.

Die in der vorliegenden Arbeit festgestellte Instabilität von Dicofol erschwert eine analytische Bestimmung mittels instrumenteller Analytik. Eine gaschromatographische Untersuchung birgt den Nachteil, dass Dicofol auf der Säule durch die hohen Temperaturen bei der Analyse zu DCBP zersetzt wird [DFG, 1991] und als Summenparameter DCBP quantifiziert wird. Zur Sicherstellung einer vollständigen Umsetzung wird eine Verlängerung des Analysengangs empfohlen [DFG, 1991]. Eine Umsetzung von Dicofol zu DCBP könnte bereits während der Probenvorbereitung durch eine leicht alkalische Behandlung geschehen, da sich Dicofol unter alkalischen Bedingungen vollständig zu DCBP umsetzt [Reeve et al., 1980; Nome et al., 1981]. Eventuell sollte auf eine HPLC-Trennung mit saurer Probenvorbereitung unter Licht-

ausschluss zurückgegriffen werden, da unter diesen Bedingungen kein Abbau von Dicofol in DCBP zu erwarten ist.

4.1.3.3 Verhalten der o,p'-Isomere

In der vorliegenden Arbeit wurden nur die p,p'-Isomere von Dicofol bzw. DCBP und DCBH, nicht aber die o,p'-Isomere untersucht. o,p'-Dicofol wird *in vivo* wesentlich schneller abgebaut als p,p'-Dicofol. Die UV-Licht- oder alkaliinduzierte Degradation von o,p'-Dicofol zum entsprechenden Benzophenon läuft ebenfalls deutlich schneller ab. Die Halbwertszeit des o,p'-Isomers bei pH 9 ist mit 9 min um ca. zwei Drittel niedriger als die von p,p'-Dicofol mit 26 min [EPA RED, 1998]. o,p'-DCBP könnte ebenfalls ein antiandrogenes Potential besitzen und sollte darauf untersucht werden. Aus diesen Untersuchungen könnte möglicherweise ein interessanter Rückschluss auf die Auswirkungen unterschiedlicher Substitutionsmuster auf die antiandrogene Aktivität der Diarylketonstruktur gezogen werden.

4.1.3.4 Dicofolbelastung der Bevölkerung über die Nahrung

Zwischen 1987 und 1996 wurden in den USA pro Jahr ca. 390 Tonnen Dicofol ausgebracht [Pesticides Trust, 1999]. In Deutschland darf Dicofol nicht verwendet werden, wenn der Gehalt an Dicofol in der Formulierung kleiner als 780 g/kg oder die Kontamination der Formulierung mit DDT größer als 1 g/kg ist [PflanzenschutzanwendungsVO]. Fleischerzeugnisse dürfen in der Bundesrepublik einen Dicofolgehalt von 0,5 mg/kg Fett aufweisen. Zitrusfrüchte, Bananen und Erdbeeren dürfen maximal 2 mg/kg Dicofol, Baumwollsaaten 0,1 mg/kg Dicofol und Steinobst 0,02 mg/kg Dicofol enthalten. Die „Duldbare tägliche Aufnahme“ („Acceptable Daily Intake“ (ADI)) wurde von der „World Health Organization“ (WHO) aufgrund der Neurotoxizitätsdaten von Dicofol festgelegt. Der ADI-Wert liegt bei 2 µg/kg Körpergewicht Dicofol [RückstandshöchstmengenVO]. Diese Substanzmenge führt bei lebenslanger, täglicher Aufnahme nicht zu einer Schädigung exponierter Personen.

Lebensmittelmonitoring-Untersuchungen zeigten, dass 4% der untersuchten Proben (n = 5520) mit Dicofol belastet waren, wobei 0,1% die zulässigen Höchstmen-

gen/Grenzwerte überschritten [Lebensmittelmonitoring, 2000]. Ein anderes Ergebnis wurde bei einer Stichprobe erhalten, die im Auftrag des Wochenmagazins „Stern“ durchgeführt wurde: Von 20 Erdbeerstichproben waren 30% belastet. Die zulässigen Höchstmengen wurden aber nicht überschritten [Güntheroth, 2001].

Zitrusfrüchte gehören zu den Pflanzen, die nach Baumwolle am häufigsten mit Dicofofol behandelt werden [EPA RED, 1998]. Zitrusöle werden u.a. in Kosmetika oder Tees als geruchsgebende Note eingesetzt. In Italien wurden die Dicofofolgehalte von Zitrusöl zwischen 1991 und 1996 untersucht. Wurden 1991 noch im Mittel 2,26 ppm Dicofofol bzw. 1,72 ppm DCBP nachgewiesen, nahm die Kontamination bis 1996 stetig auf 0,23 ppm Dicofofol bzw. 0,16 ppm DCBP ab. Ähnliche Ergebnisse wurden bei der Untersuchung von Orangen- und Mandarinenöl erhalten [Saitta et al., 2000].

Die „United States Environmental Protection Agency“ (EPA) hat eine Belastung der US-Bevölkerung berechnet: Erwachsene nehmen 0,076 µg/kg/Tag Dicofofol zu sich, gestillte Kleinkinder 0,13 µg/kg/Tag Dicofofol, Kinder im Alter von 1 - 6 Jahren 0,15 µg/kg/Tag Dicofofol und Kinder zwischen 6 und 14 Jahren 0,1 µg/kg/Tag Dicofofol [EPA RED, 1998].

Das Risiko einer Schädigung durch die Aufnahme mit Dicofofol belasteter Lebensmittel wird von der EPA als äußerst gering eingeschätzt, da auch die Personen mit der höchsten täglichen Aufnahme (Kinder im Alter von 1 – 6 Jahren) deutlich unterhalb des ADI-Werts bleiben. Bei dieser Risikoabschätzung blieben jedoch die möglichen hormonellen bzw. antihormonellen Eigenschaften von Dicofofol bzw. DCBP unberücksichtigt.

DCBP ist unter Berücksichtigung der Untersuchungen von Guth (2000), Böhm (2002) und den Erkenntnissen aus der vorliegenden Arbeit diejenige Substanz, die für eine mögliche Schädigung der hormonellen Homöostase nach Dicofofolexposition verantwortlich zu machen ist. Insgesamt ist die Datenlage über die Belastung von Lebensmitteln mit DCBP unzureichend. Zusätzlich liegen keine *in vivo* Untersuchungen zur estrogenen bzw. antiandrogenen Aktivität von DCBP vor. Die hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität von o,p'-Dicofofol (0; 5; 20 mg/kg Körpergewicht) wurde an amerikanischen Turmfalken (*Falco sparverius*) untersucht [MacLellan et al., 1996 und 1997]. Die Weibchen der 20 mg/kg Dosisgruppe zeigten eine abnorme Ovarmorphologie. In der F1-Generation wurde bereits in der 5 mg/kg Dosisgruppe Störungen in der Testesentwicklung festgestellt. Da bei der Untersuchung von MacLellan et al. (1996 und 1997) keine Dosierung getestet wurde, die nicht zu einer Schädigung der

exponierten Falken führte, und da sonst keine Untersuchungen zur hormonellen Aktivität von Dicofol bzw. DCBP vorliegen, ist eine Risikoabschätzung nicht möglich.

4.1.3.5 Belastung der Umwelt

In Fischen (*Mugil* spp.) wurden im Mittelmeer (Castellon, Spanien) im Mittel 1,3 µg/g Frischgewicht Dicofol in den Eingeweiden nachgewiesen. In Wasserproben aus dem Mittelmeer wurden 221 ng/L Dicofol gefunden [Barbera et al., 1986]. Spanische Fledermäuse (*Pipistrellus pipistrellus*) waren mit DCBP (0,012 ppm Fett) belastet [Guillen et al., 1994]. Es scheint insbesondere saisonbedingt zu hohen Dicofolbelastungen (max. 2,5 µg/L) zu kommen [Domagalski, 1996].

Dicofol ist für aquatische Organismen hochtoxisch (z.B. Regenbogenforelle LC₅₀ 0,124 ppm). Eine Gefährdung von aquatischer Organismen, die mit Dicofol in Kontakt kommen, ist insbesondere aufgrund der hohen saisonalen Belastungen durch Feldabläufe (0,55 – 2,2 ppm) [EPA RED, 1998] nicht auszuschließen. Terrestrische Organismen zeigen eine höhere Toleranz gegenüber Dicofol (Wühlmaus LC₅₀ 1000 ppm). Dennoch ist auch hier eine Gefährdung durch hohe Dicofolkonzentrationen im Boden bzw. in ihrer Hauptnahrung Gras (100 – 700 ppm) nicht auszuschließen.

Dass die Exposition mit Dicofol bzw. dem Abbauprodukt DCBP zu Störungen in der Population exponierter Tierarten führen kann, wurde bereits am Lake Apopka beschrieben. Die Zulassung von Dicofol als Pflanzenschutzmittel sollte daher überprüft werden. Möglicherweise lässt sich das Risiko für Wildtiere durch eine Einschränkung der ausgebrachten Dicofolmenge reduzieren.

4.1.3.6 Endokrine Aktivität

Dicofol, DCBH und DCBP sind im stabil transfizierten Testsystem MCF-7-Luc nicht estrogen und im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc nicht androgen aktiv. Die Inkubation von Dicofol führte im Testsystem COS-AR-Luc zu einer leichten Hemmung der durch DHT-induzierten Luciferaseaktivität, was aber auf eine Umsetzung zu DCBP zurückzuführen sein dürfte. Die antiandrogene Aktivität von DCBH

könnte durch Oxidation zu DCBP verursacht worden sein. DCBP ist in Hefe-AR-Zellen schwach antiandrogen aktiv.

Beide Hefe-Testsysteme reagieren auf eine Behandlung mit den Alkoholen Dicofol und DCBH mit Anzeichen einer erheblichen cytotoxischen Wirkung. Die Hefe-Systeme sind daher für die Untersuchung hoher Konzentrationen dieser Substanzen nicht geeignet. Konzentrationen unter 1 μM Dicofol bzw. DCBH sind im Hefe-ER-System nicht estrogen und im Hefe-AR-System weder androgen noch antiandrogen aktiv.

Möglicherweise schädigende Wirkungen von Dicofol auf die hormonelle Homöostase von exponierten Organismen werden nach den vorliegenden Ergebnissen durch DCBP verursacht. Im Hinblick auf die Kontamination des Lake Apopka mit technischem Dicofol scheint der Rückgang der Alligatorpopulation nicht ausschließlich durch o,p'-DDT und DDE verursacht zu sein. Dicofol bzw. das Abbauprodukt DCBP haben einen entscheidenden Beitrag geleistet. Der See gilt zwar heute als nicht belastetes Gewässer, DDT und DDE, sowie Dicofol ($\log P_{\text{OW}}$ 4,28) und DCBP ($\log P_{\text{OW}}$ 4,44) reichern sich jedoch im Körperfett an, so dass die Substanzen auch noch lange nach einer Exposition remobilisiert werden [RAIS, 2001].

4.2 Untersuchung von Linuron und einigen Metaboliten auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Linuron (N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methyl-N'-methoxy-harnstoff) wird als systemisch wirksames Herbizid zur Kontrolle von Wildkräutern eingesetzt. Sowohl *in vivo* [Gray et al., 1999] als auch *in vitro* ist Linuron antiandrogen aktiv [Lambright et al., 2000; Cook et al. 1993, Bauer et al., 1998].

Über die antiandrogene Wirkung von Linuronmetaboliten ist bisher wenig bekannt. 3,4-Dichloracetanilid, 3,4-Dichloranilin (DCA) und N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methyl-harnstoff (Linuron M2) binden mit geringer Affinität an den AR [Cook et al., 1993]. Bisher wurden Linuronmetabolite nur in Affinitätsstudien und nicht in den wesentlich aussagekräftigeren Transaktivierungsexperimenten untersucht.

Wie bereits Guth (2000) festgestellt hatte, besitzen N'-substituierte Phenylharnstoffe antiandrogenes Potential. Nicht-N'-substituierter Phenylharnstoff ist dagegen nicht

antiandrogen aktiv. Die beiden N'-substituierten Phenylharnstoffe Linuron und Linuron M2 (Abbildung 4.36) sollten auf Grundlage dieser Überlegungen antiandrogen aktiv sein. Der nicht-N'-substituierte Metabolit Linuron M1 (N-3,4-Dichlorphenylharnstoff, Abbildung 4.36) und DCA (ohne Phenylharnstoffstruktur) sollten dagegen keine antiandrogene Aktivität zeigen. Insgesamt wird also eine Inaktivierung von Linuron im Sinne endokriner Aktivität im Zuge der Metabolisierung vorausgesagt.

Linuron und die drei Hauptmetabolite Linuron M2, Linuron M1 und DCA wurden im Säugerzellsystem COS-AR-Luc und im Hefezellsystem auf androgene und antiandrogene Aktivität untersucht.

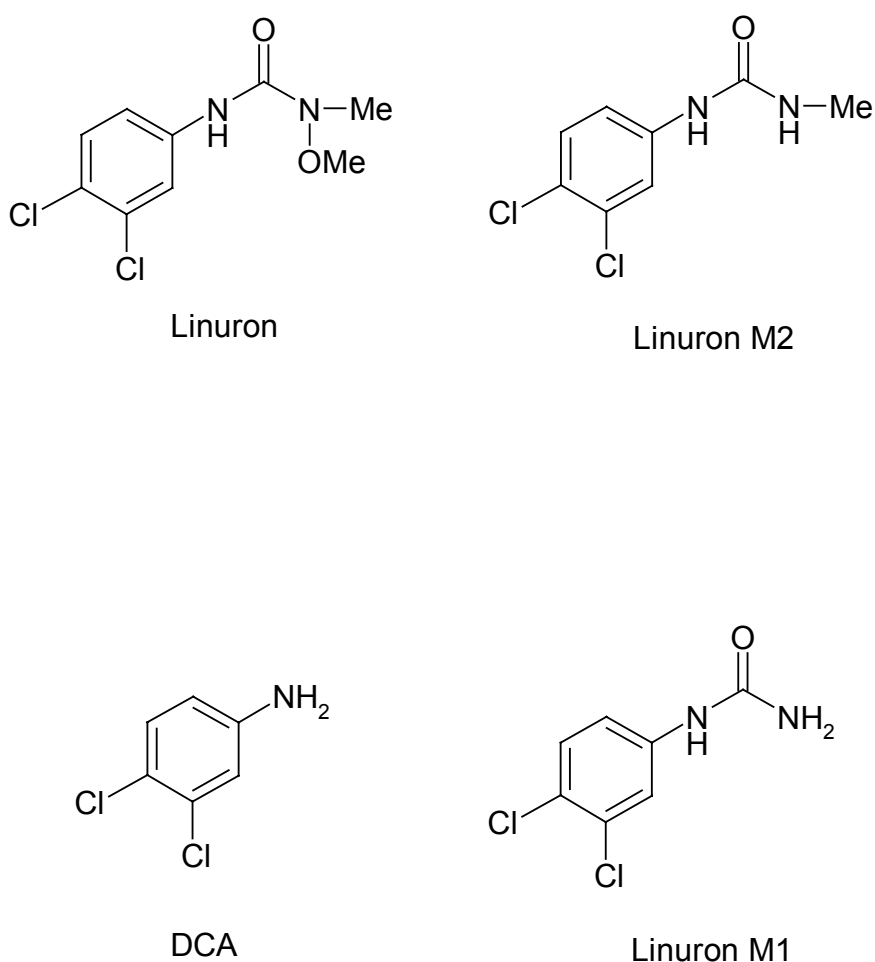


Abbildung 4.36 Strukturformeln der untersuchten Linuronmetabolite [Kearny & Kaufman, 1975]

4.2.1 Linuron

Die durch 100 nM DHT-induzierte Luciferaseaktivität wurde im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc durch 1 μ M und 10 μ M Linuron um 40 % gehemmt (Abbildung 4.37). Niedrigere Konzentrationen waren nicht bzw. nur schwach antiandrogen aktiv.

Im stabil transfizierten Hefe-AR-System wurde bereits durch 0,1 μ M Linuron eine schwache Hemmwirkung auf die durch 50 nM DHT-induzierte Reporterexpression beobachtet. Durch 50 – 100 μ M Linuron wurde die durch 50 nM DHT-induzierte Reporterexpression auf 60% Restaktivität gehemmt (Abbildung 4.38).

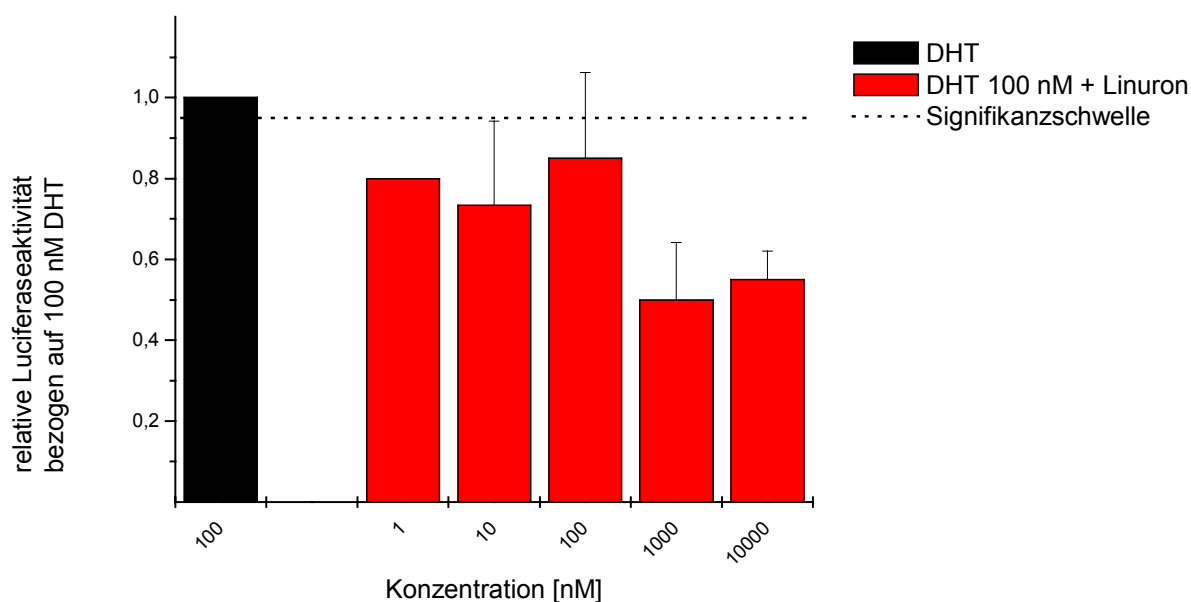


Abbildung 4.37 Untersuchung von Linuron auf antiandrogene Aktivität im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc

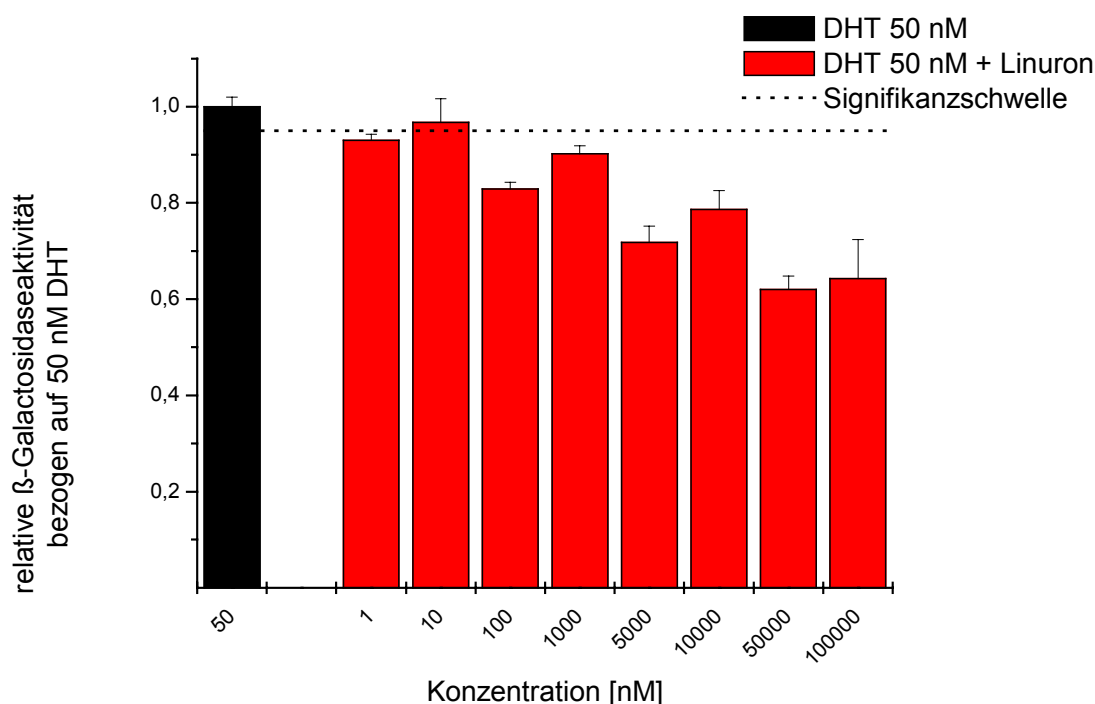


Abbildung 4.38 Untersuchung von Linuron auf antiandrogene Aktivität in Hefe-AR-Zellen

In beiden Testsystemen wurde eine dosisabhängige Reduktion der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität auf ca. 60% Restaktivität beobachtet. Im Hefe-AR-System waren hierzu höhere Konzentrationen als im transienten Transaktivierungssystem in Säugerzellen nötig (vgl. Diskussion in Kapitel 4.4). Eine erste Hemmwirkung wurde aber im Vergleich zum transienten Reportergensystem COS-AR-Luc bereits bei niedrigeren Linuronkonzentrationen (0,1 μ M) erzielt.

In beiden Testsystemen (COS-AR-Luc-Zellen und Hefe-AR-Zellen) wurde keine androgene Aktivität von Linuron beobachtet (Abbildung 4.38 und Abbildung 4.39). Die durch die Testsubstanz induzierten Reportergenaktivitäten waren nicht in der Lage, die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität zu überschreiten.

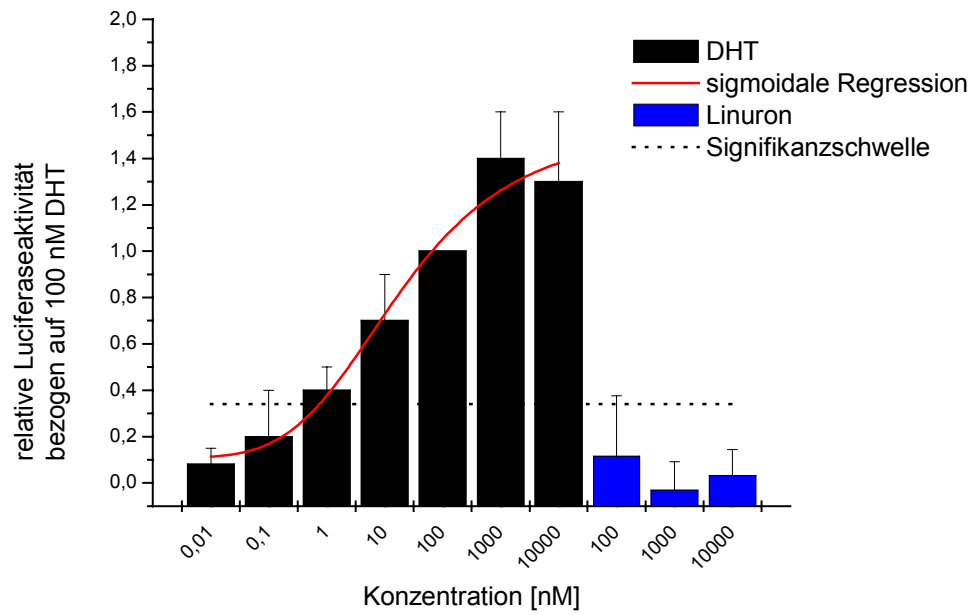


Abbildung 4.39 Untersuchung von Linuron auf androgene Aktivität im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc

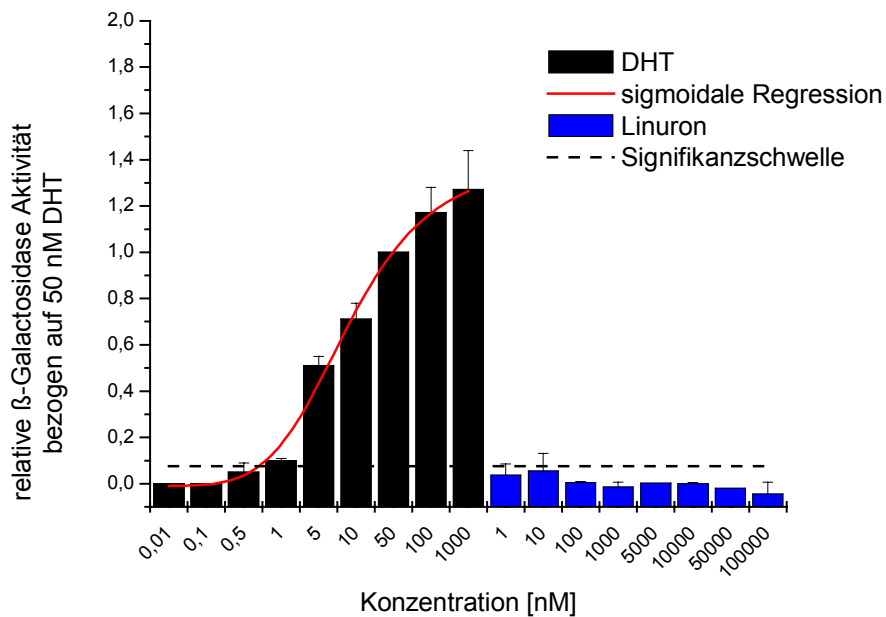


Abbildung 4.40 Untersuchung von Linuron auf androgene Aktivität in Hefe-AR-Zellen

4.2.2 Linuron M2

Die Untersuchung von Linuron M2 in transient transfizierten COS-7-Zellen ergab eine dosisunabhängige Reduktion der durch 100 nM DHT-induzierten Reporterogenaktivität um ca. 30% (Abbildung 4.41).

Im stabil transfizierten Hefe-AR-System wurde eine konzentrationsabhängige Hemmung der durch 50 nM DHT-induzierten Reporterogenaktivität um max. 40% beobachtet (Abbildung 4.42).

Beide Testsysteme zeigten übereinstimmend antiandrogene Aktivität von Linuron M2. Im Hefe-AR-System wurde die stärkere maximale Hemmung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität beobachtet. Insgesamt scheint Linuron M2 im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc stärker antiandrogen aktiv zu sein, da bereits durch niedrigere Konzentrationen die durch DHT-induzierte Reporterogenaktivität gehemmt wurde.

Linuron M2 ist weder in COS-AR-Luc-Zellen noch in Hefe-AR-Zellen androgen aktiv (Abbildung 4.43 und Abbildung 4.44).

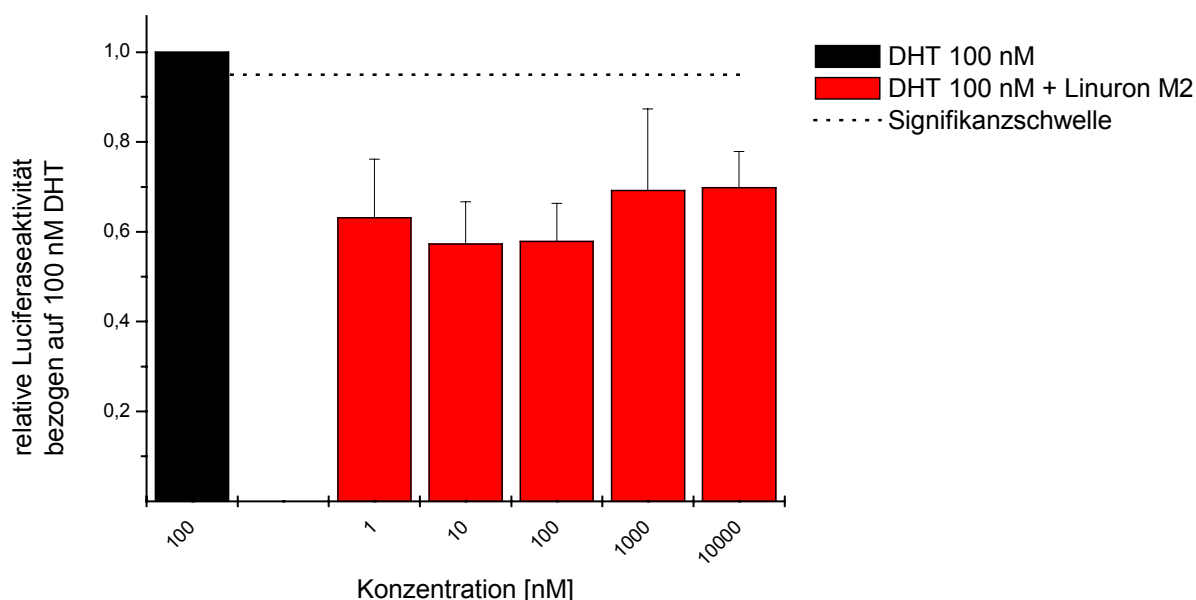


Abbildung 4.41 Antiandrogene Aktivität von Linuron M2 im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc

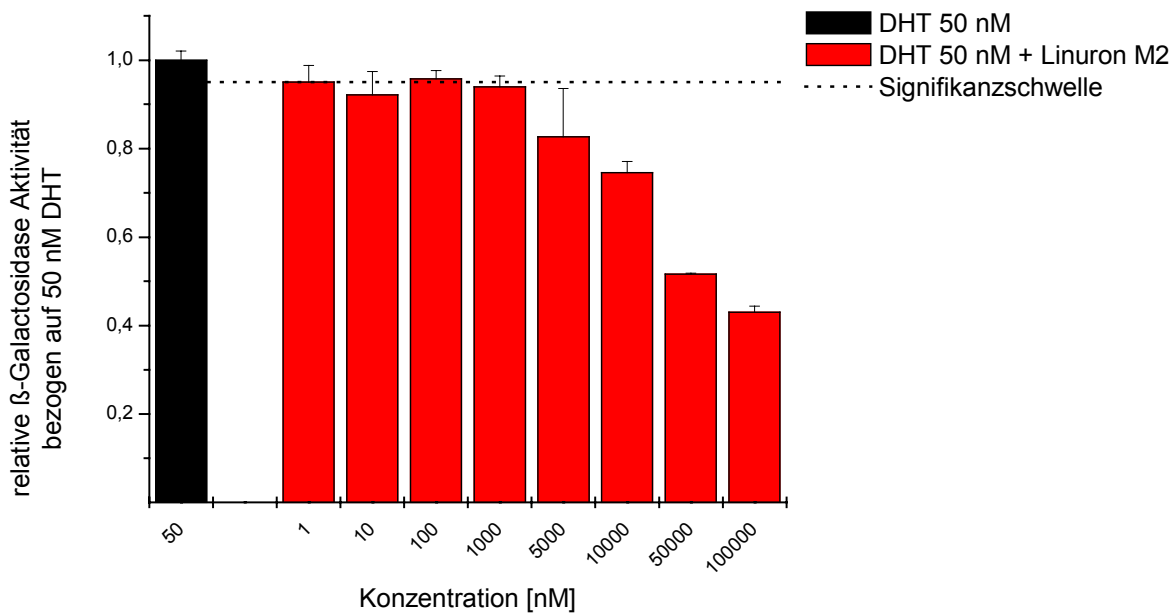


Abbildung 4.42 Untersuchung von Linuron M2 auf antiandrogene Aktivität in Hefe-AR-Zellen

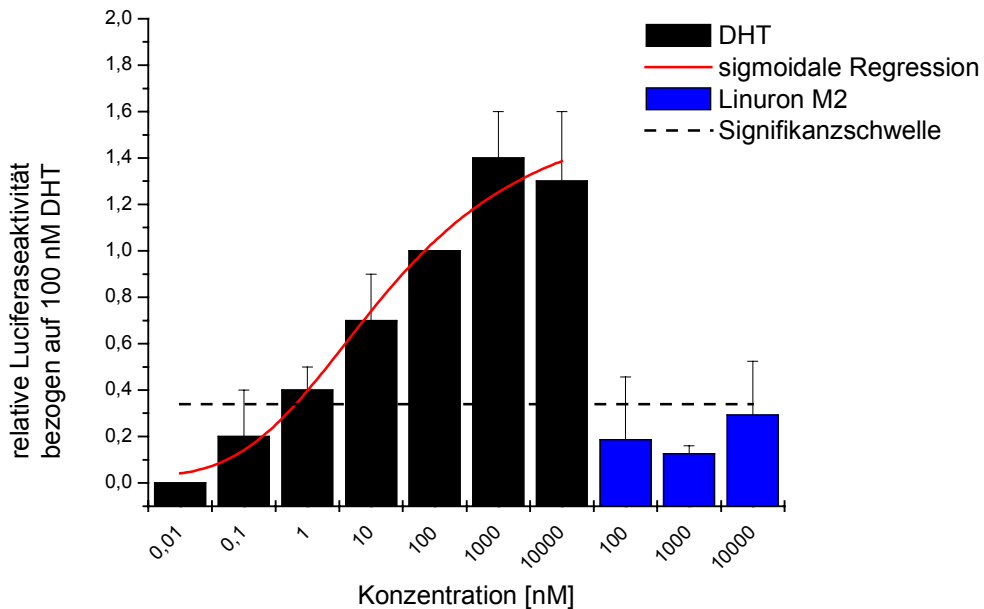


Abbildung 4.43 Untersuchung von Linuron M2 auf androgene Aktivität in COS-AR-Luc-Zellen

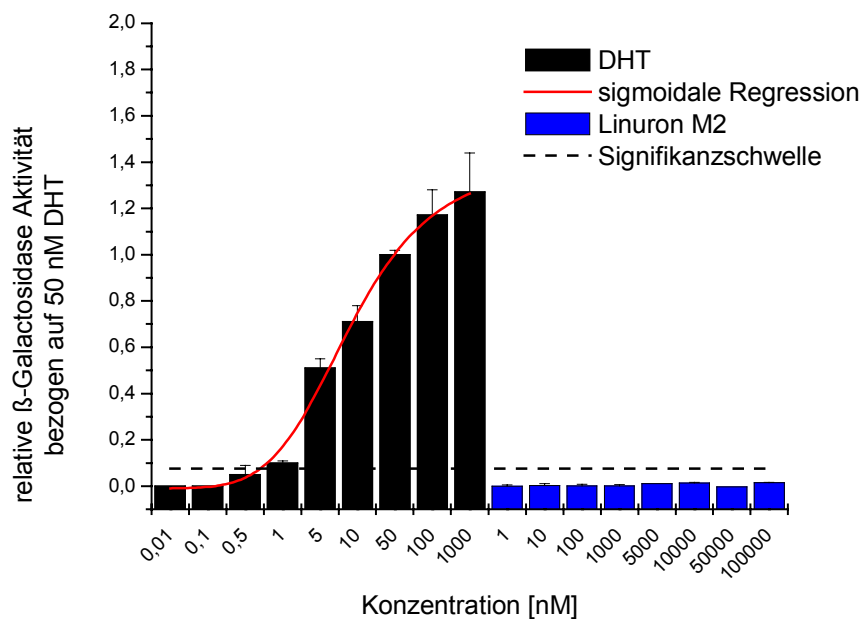


Abbildung 4.44 Untersuchung von Linuron M2 auf androgene Aktivität im Hefe-AR-Transaktivierungssystem

4.2.3 Linuron M1

Die mittleren eingesetzten Linuron M1-Konzentrationen (100 nM und 1 μ M) führten im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc zu einer schwachen Reduktion der durch DHT-induzierten Luciferaseaktivität. Eine Konzentration von 10 μ M Linuron M1 zeigte keine antiandrogene Aktivität (Abbildung 4.45). Aufgrund der fehlenden Dosisabhängigkeit, wird davon ausgegangen, dass Linuron M1 im transienten Transaktivierungssystem nicht antiandrogen aktiv ist. Nach Inkubation von Hefe-AR-Zellen mit Linuron M1 zeigte sich keine Reduktion der durch DHT-induzierten β -Galactosidaseaktivität (Abbildung 4.46).

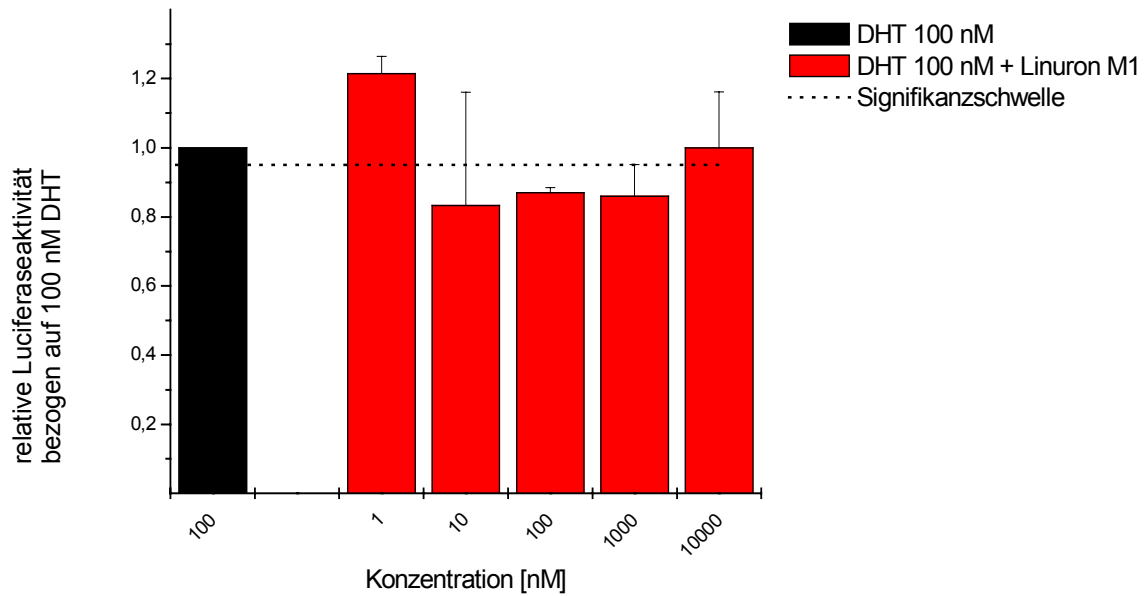


Abbildung 4.45 Untersuchung von Linuron M1 auf antiandrogene Aktivität in COS-AR-Luc-Zellen

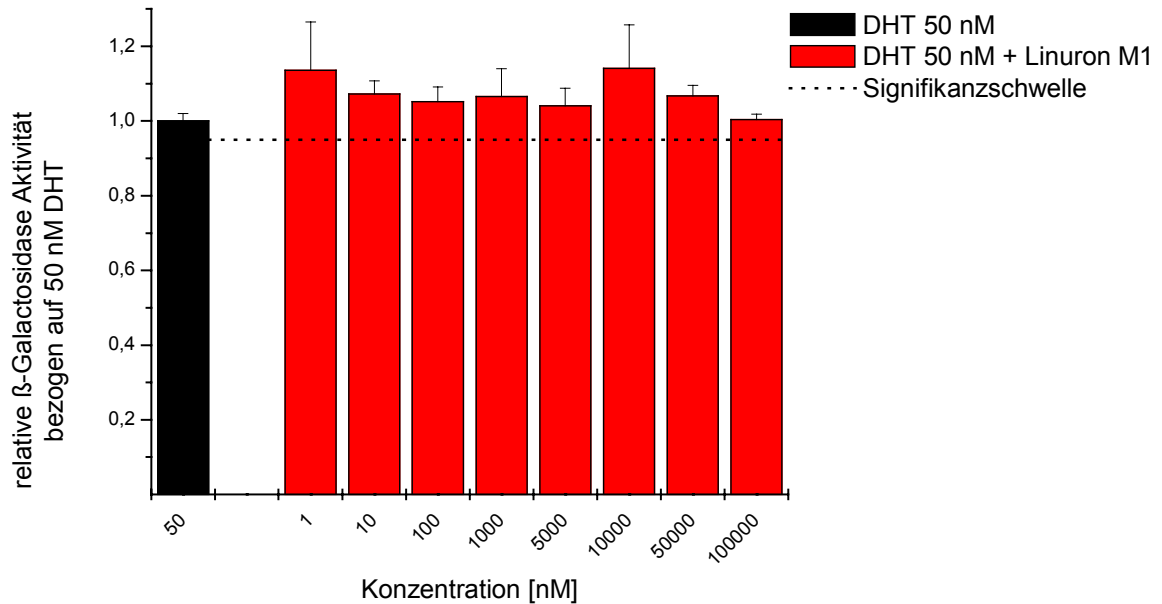


Abbildung 4.46 Untersuchung von Linuron M1 auf antiandrogene Aktivität in Hefe-AR-Zellen

Weder in transient transfizierten COS-AR-Luc-Zellen (Abbildung 4.47), noch in stabil transfizierten Hefe-AR-Zellen (Abbildung 4.48) wurde eine Überschreitung der Signifikanzschwelle für androgene Aktivität durch die durch Linuron M1 induzierten Reporteraktivitäten beobachtet.

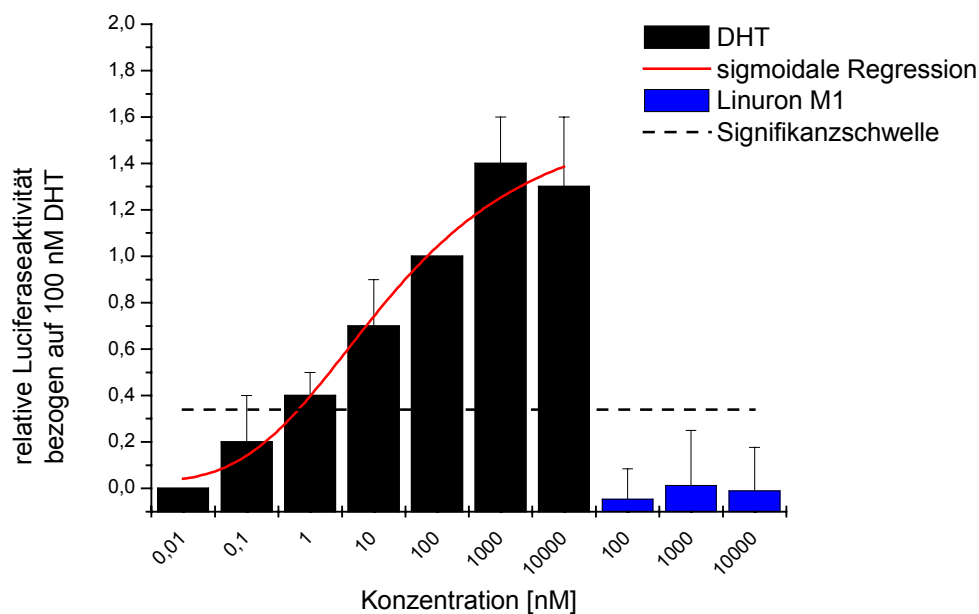


Abbildung 4.47 Untersuchung von Linuron M1 auf androgene Aktivität im COS-AR-Luc-System

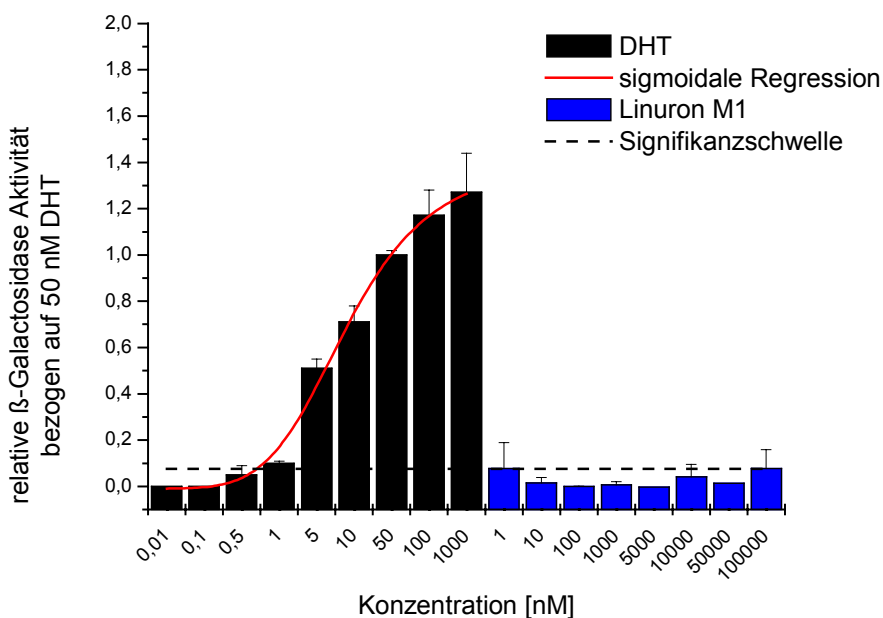


Abbildung 4.48 Untersuchung von Linuron M1 auf androgene Aktivität im Hefe-AR-System

4.2.4 3,4-Dichloranilin

Die durch 100 nM DHT-induzierte Reporterogenaktivität wurde durch DCA (10 nM) im transienten Transaktivierungssystem gehemmt. Bei höheren Konzentrationen nahm die antiandrogene Aktivität wieder ab (Abbildung 4.49). Da DCA nur in niedrigen Konzentrationen eine Hemmung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität zeigte, scheint DCA transienten Transaktivierungssystem keine spezifische antiandrogene Aktivität aufzuweisen.

Die Hemmung der durch 50 nM DHT-induzierten Reporterogenaktivität im Hefe-AR-Testsystem um 30 – 40 % wird durch toxische Wirkung der beiden Konzentrationen (50 – 100µM) hervorgerufen (Abbildung 4.50). Die gemessene optische Dichte war bei diesen Konzentrationen stark reduziert, so dass keine Aussage über eine antiandrogene Wirkung diesen Testkonzentrationen getroffen werden kann. Niedrige Konzentrationen waren nicht antiandrogen aktiv.

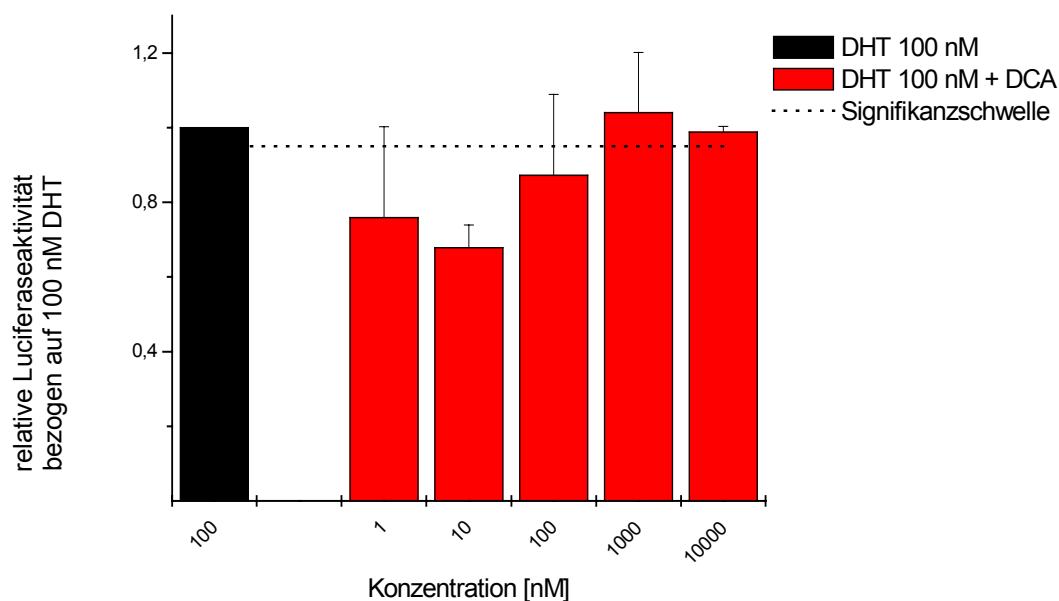


Abbildung 4.49 Untersuchung von DCA im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc auf antiandrogene Aktivität

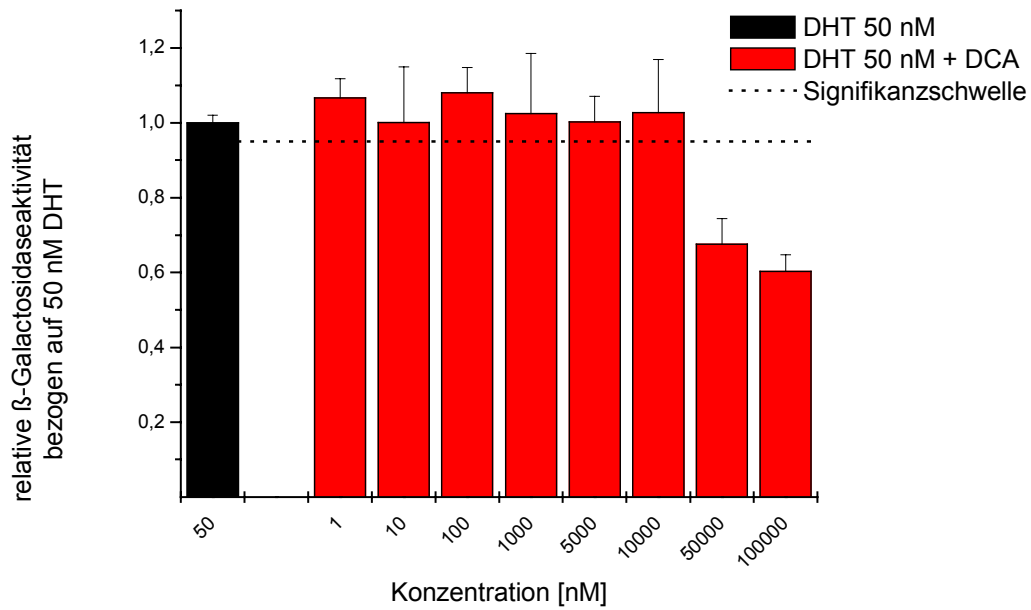


Abbildung 4.50 Untersuchung von DCA auf antiandrogene Aktivität im Hefe-AR-Transaktivierungssystem

Keine der eingesetzten DCA-Konzentrationen zeigte in einem der beiden Testsysteme COS-AR-Luc oder Hefe-AR androgene Aktivität (Abbildung 4.51 und Abbildung 4.52), da die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität nicht überschritten wurde.

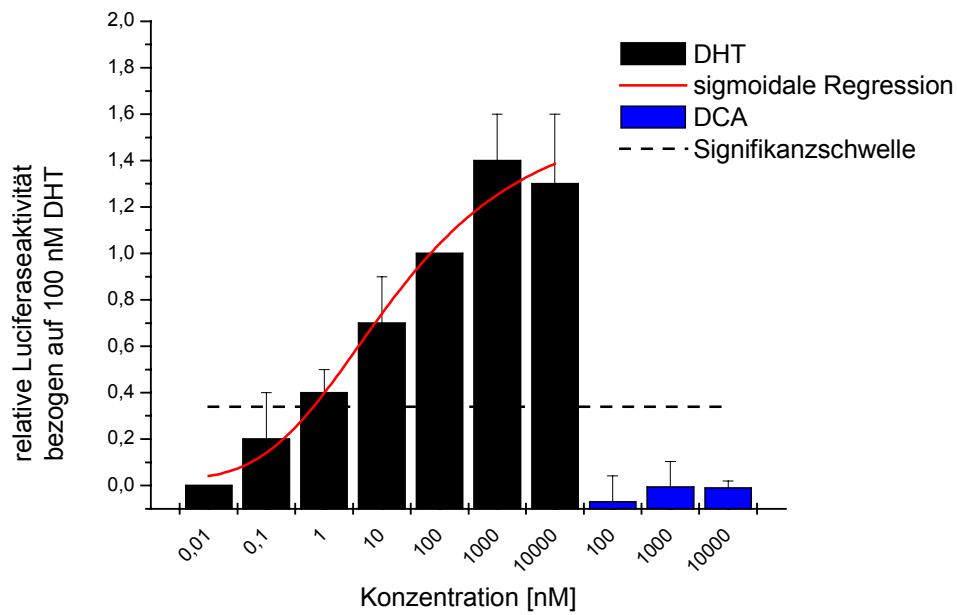


Abbildung 4.51 Untersuchung von DCA auf androgene Aktivität im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc

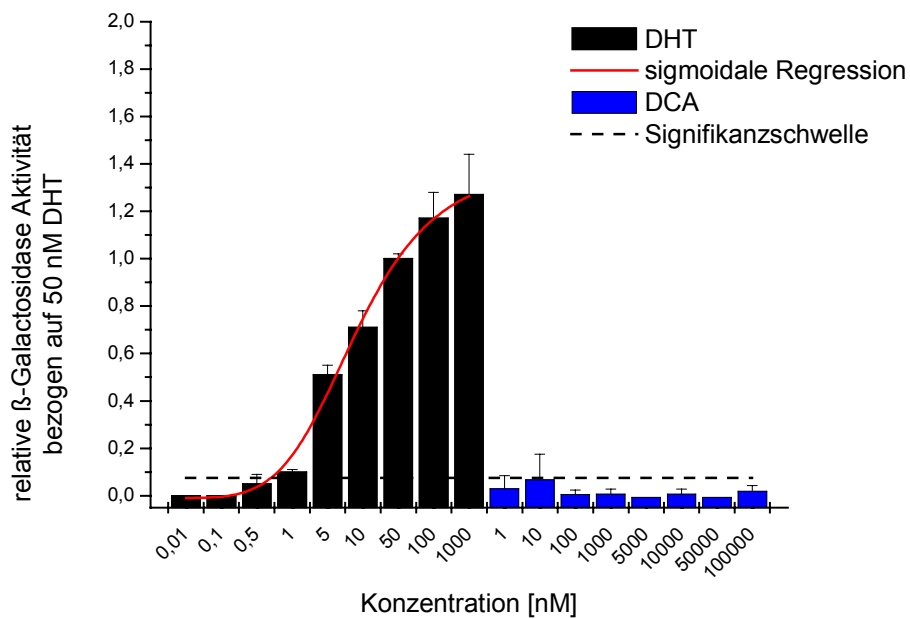


Abbildung 4.52 Untersuchung von DCA auf androgene Aktivität im Hefe-AR-Transaktivierungssystem

4.2.5 Zusammenfassung und Diskussion

Linuron und die untersuchten Metabolite Linuron M2, Linuron M1 und DCA zeigten in keinem der eingesetzten Transaktivierungsexperimente androgene Aktivität. Linuron M1 und DCA waren in allen eingesetzten Konzentrationen nicht in der Lage, eine dosisabhängige Reduktion der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität zu erzeugen und sind daher nicht als antiandrogen aktiv anzusehen.

Linuron und Linuron M2 zeigten jedoch in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (1 – 10 μM im COS-AR-Luc-System bzw. 1 – 100 μM im Hefe-AR-System) antiandrogenes Potential, da die durch DHT-induzierte Reporterogenaktivität dosisabhängig um maximal ca. 40 - 50% gehemmt wurde.

Die Hypothese einer Entgiftung hinsichtlich antiandrogener Aktivität von Linuron durch Abspaltung der N'-Substituenten am Harnstoff bzw. durch Auflösung der Harnstoffstruktur wurde bestätigt. Eine Gefährdung exponierter Organismen mit Linuron kann aufgrund der antiandrogenen Aktivität des primär entstehenden Metaboliten Linuron M2 nicht ausgeschlossen werden. Linuron gilt des Weiteren als relativ persistent (Halbwertszeit 150 Tage) und konnte im Grundwasser nachgewiesen werden [EXTOXNET, 1996].

Das Bundesinstitut für gesundheitlichen Verbraucherschutz und Veterinärmedizin (BgVV) hat 1996 eine duldbare tägliche Aufnahme (DTA) für Linuron von 9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Körpergewicht festgelegt. In Deutschland darf die Belastung mit Phenylharnstoffherbiziden bei Steinobst 1 mg/kg, bei Sellerie und Petersilie 0,5 mg/kg, bei Karotten 0,2 mg/kg und bei Bohnen 0,1 mg/kg (Summe berechnet als DCA) nicht überschreiten [RückstandshöchstmengenVO]. In einer Studie der „Food and Drug Administration“ (FDA) zwischen 1986 und 1991 wurden folgende Belastungen durch Lebensmittel mit Linuron festgestellt: Säuglinge (6-11 Monate) 1,8 ng/kg Körpergewicht und Tag, Jugendliche (14-16 Jahre) und Erwachsene 0,7 ng/kg Körpergewicht und Tag [Gunderson, 1995]. Insgesamt scheint die Belastung mit Linuron über Lebensmittel gering zu sein. Aufgrund hoher Toxizität insbesondere gegenüber aquatischen Organismen [EPA RED 1995] hat Schweden den Gebrauch von Linuron als Pflanzenschutzmittel verboten. Dies erscheint auch im Hinblick auf eine antiandrogene Aktivität sinnvoll.

4.3 Untersuchung von Xanthohumol auf hormonelle bzw. anti-hormonelle Aktivität

Xanthohumol, das prenylierte Hauptflavonoid des Hopfens (*Humulus lupulus*), geriet aufgrund seiner potentiellen chemopräventiven Eigenschaften in das öffentliche Interesse. Es liegen erste Berichte vor, die potente antiestrogene Aktivität vermuten lassen [Gerhäuser et al., 2002]. Aufgrund struktureller Ähnlichkeiten zu etablierten Antiandrogenen wie DDE [Kelce et al., 1995] sollte Xanthohumol auch auf antiandrogene Aktivität untersucht werden (vgl. 2.4.2.4).

4.3.1 Bestimmung der Cytotoxizität von Xanthohumol unter Inkubationsbedingungen in MCF-7-Luc-Zellen

Auf eine 24-stündige Inkubation mit Xanthohumol in serumfreien Medium reagierten die MCF-7-Luc-Zellen in der höchsten eingesetzten Konzentration (10 μM) mit Anzeichen erheblicher Toxizität. Um Xanthohumol auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität in diesem Testsystem untersuchen zu können, wurde darauf hin in CDFKS-Medium (vgl. 6.1) und nicht wie im Standardverfahren in serumfreiem Medium inkubiert. Bei der Inkubation in CDFKS-Medium besteht jedoch die Möglichkeit, dass Xanthohumol an die im Medium enthaltenen Proteine bindet, wodurch es zu einer niedrigeren tatsächlichen Xanthohumolkonzentration im Medium kommen könnte.

Um Cytotoxizität unter den veränderten Inkubationsbedingungen auszuschließen, wurde parallel der Trypanblautest und der Sulforhodamin B (SRB)-Test unter identischen Inkubationsbedingungen durchgeführt.

Trypanblautest

Nach 24 h Inkubation in CDFKS-Medium wurde mit dem Trypanblautest (Endpunkt: Membranintegrität) in der höchsten eingesetzten Konzentration (10 μM) eine Viabilität von 84 % im Vergleich zur Kontrolle bei gleichbleibender Zellzahl festgestellt. Nach erfolgtem Mediumwechsel und 24 h Nachinkubation in substanzfreiem CDFKS-Medium erholten sich die Zellen (Abbildung 4.53).

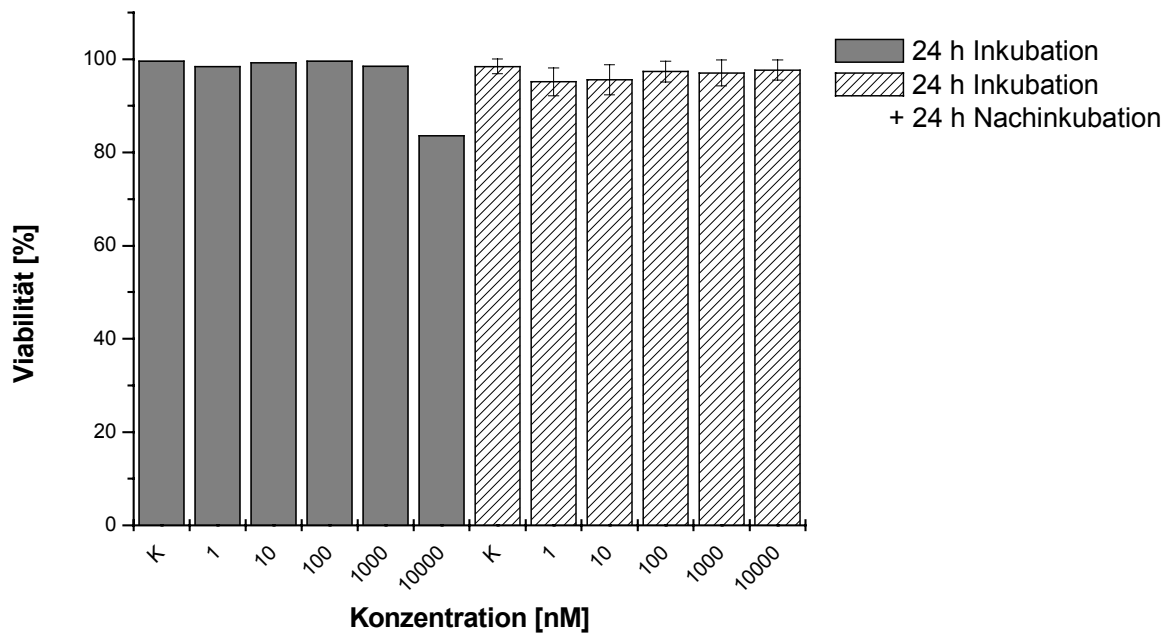


Abbildung 4.53 Bestimmung der Cytotoxizität von Xanthohumol mit dem Trypanblautest

SRB-Test

Bei Bestimmung der Cytotoxizität mit dem SRB-Test (Endpunkt: Bestimmung des Lebendproteins als Maß für die Zellzahl) wurde nach 24 h keine Abnahme des Lebendproteins festgestellt. Nach 24 h Nachinkubation in substanzfreiem CDFKS-Medium wurde dagegen eine 15%-ige Abnahme des Lebendproteins beobachtet (Abbildung 4.54).

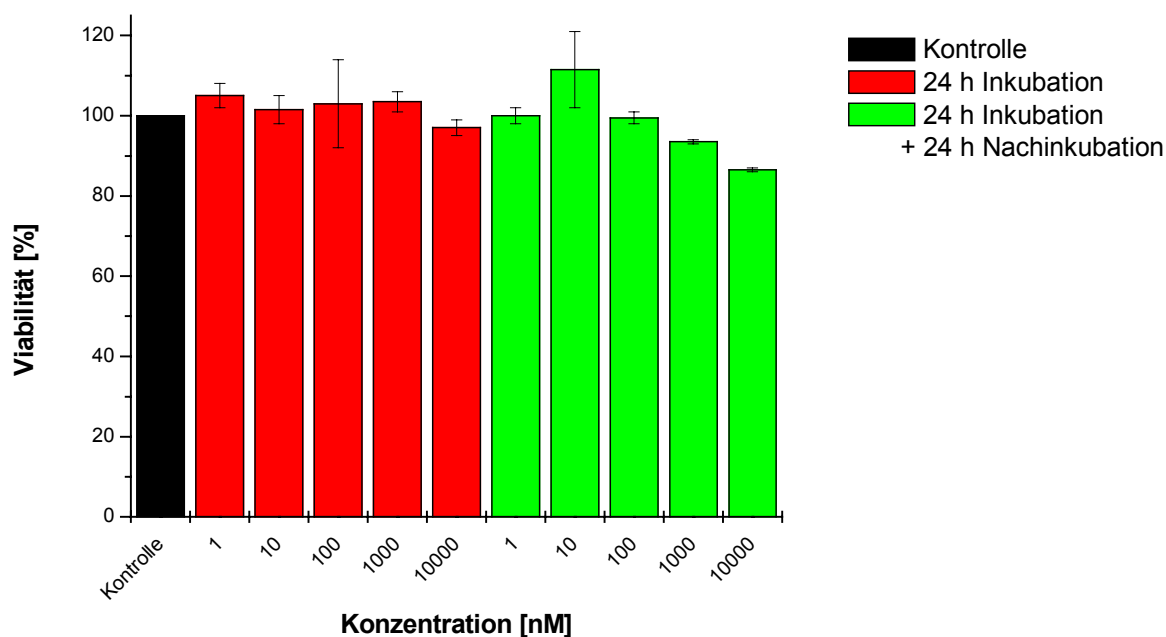


Abbildung 4.54 Bestimmung der Cytotoxizität von Xanthohumol mit dem SRB-Test

Die geringe Toxizität von Xanthohumol auf die verwendeten MCF-7-Luc-Zellen macht die Untersuchung auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität möglich. Bei einem positiven Signal muss die Toxizität jedoch berücksichtigt werden.

4.3.2 Untersuchung auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität

Keine der eingesetzten Xanthohumolkonzentrationen (1 nM – 10 μ M) induzierte in MCF-7-Luc-Zellen ausreichend Luciferaseaktivität, um die Signifikanzschwelle für estrogene Aktivität zu übersteigen (Abbildung 4.55). Xanthohumol ist in MCF-7-Luc-Zellen nicht estrogen aktiv. Wie in Abbildung 4.56 zu erkennen ist, ist Xanthohumol auch im stabilen Transaktivierungssystem in Hefe-ER-Zellen nicht estrogen aktiv.

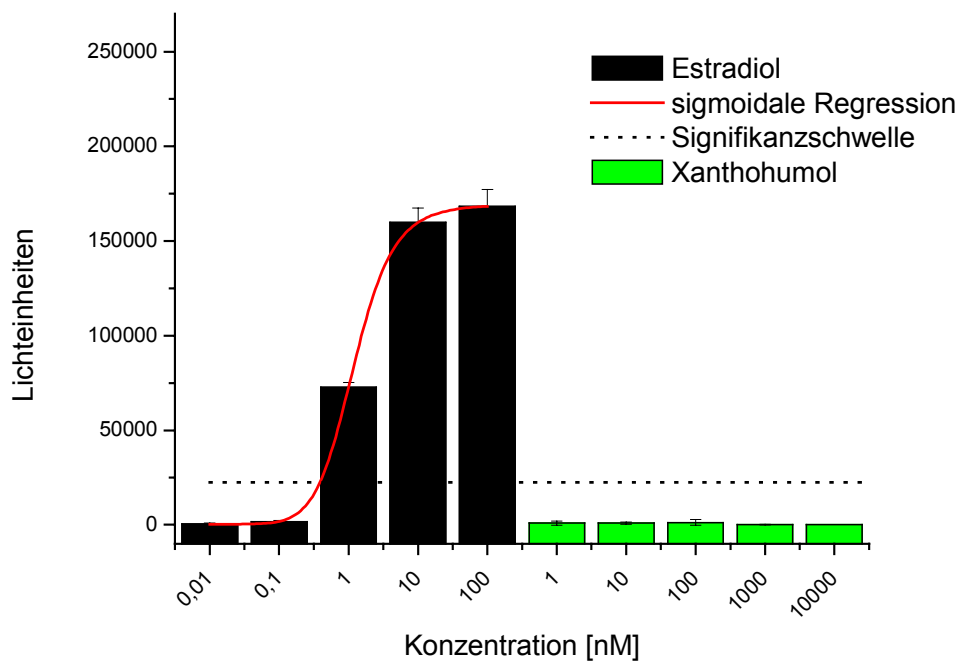


Abbildung 4.55 Untersuchung der estrogenen Aktivität von Xanthohumol in MCF-7-Luc-Zellen

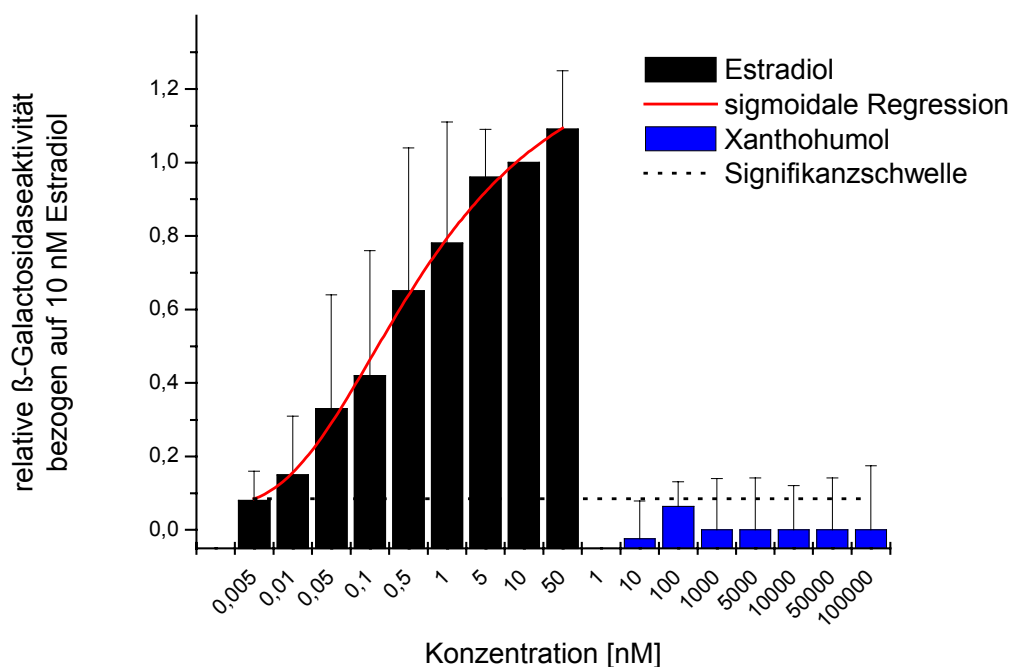


Abbildung 4.56 Untersuchung von Xanthohumol auf estrogenen Aktivität in Hefe-ER-Zellen

Die durch 10 nM E₂ induzierte Luciferaseaktivität wurde in MCF-7-Luc-Zellen durch die höchste eingesetzte Xanthohumolkonzentration (10 µM) um ca. 50% gehemmt (Abbildung 4.57). Die beobachtete Hemmung der Luciferaseinduktion von 50% ist größer als die beobachtete Reduktion der Viabilität (15%). Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass die beobachtete antiestrogene Aktivität zumindest partiell durch cytotoxische Effekte hervorgerufen wurde. In diesem Fall stößt das MCF-7-Luc-Testsystem an seine Grenzen. Zur Absicherung der Ergebnisse sollten deshalb weitere Untersuchungen im Hefe-ER-Testsystem durchgeführt werden.

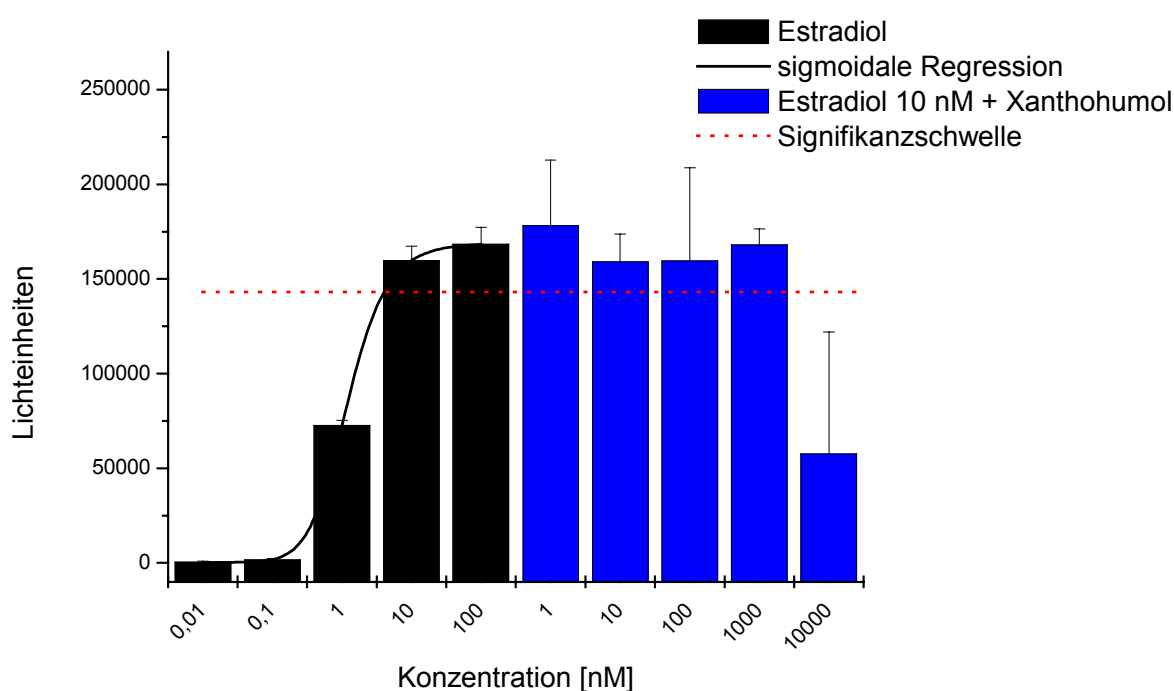


Abbildung 4.57 Untersuchung der antiestrogenen Aktivität von Xanthohumol in MCF-7-Luc-Zellen

Durch Xanthohumol wurde die durch 10 nM E₂ induzierte β -Galactosidaseaktivität in Hefe-ER-Zellen konzentrationsabhängig auf maximal 30% Restaktivität gehemmt (Abbildung 4.58). Bereits 1 µM Xanthohumol zeigte signifikante antiestrogene Aktivität. Keine der eingesetzten Xanthohumolkonzentrationen (1 nM – 100 µM) führte zu einer Reduktion der optischen Dichte.

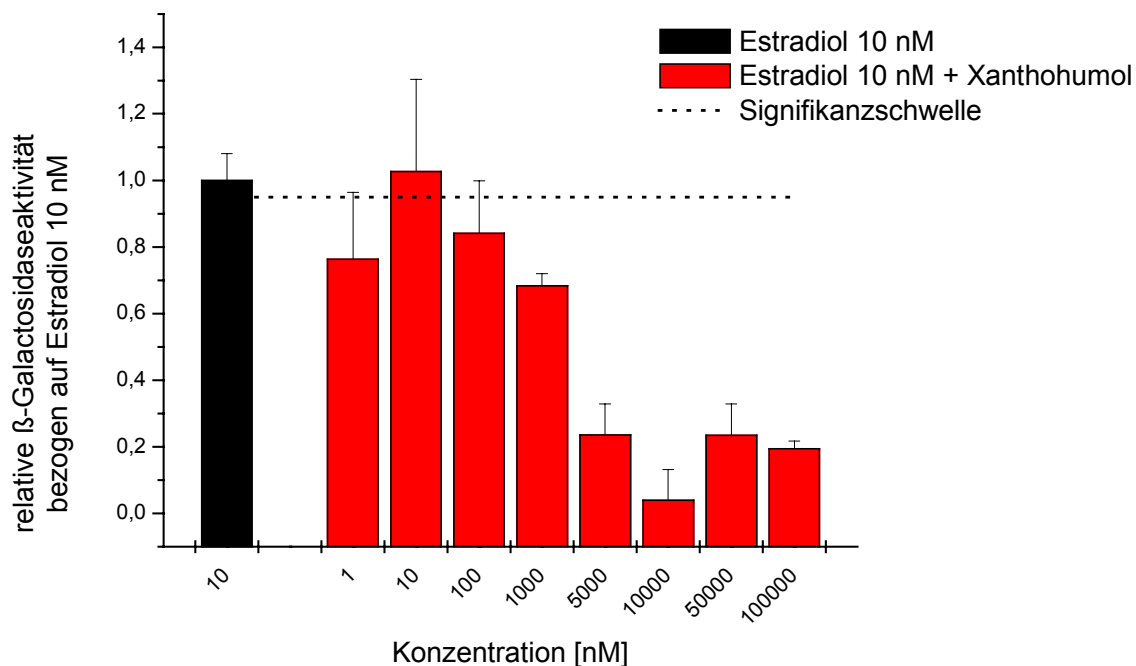


Abbildung 4.58 Untersuchung von Xanthohumol auf antiestrogene Aktivität im Hefe-ER-System

Insgesamt stimmen die Ergebnisse dieser Arbeit mit denen der Literatur überein: Xanthohumol zeigt kein estrogenes [Milligan et al., 1999 & 2000], aber ein starkes antiestrogenes Potential [Gerhäuser et al., 2002].

4.3.3 Untersuchung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Zur Untersuchung auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität wurden die Testsysteme COS-AR-Luc und Hefe-AR mit Xanthohumol behandelt. Im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc wurde die durch 100 nM DHT-induzierte Luciferaseaktivität von den höchsten eingesetzten Xanthohumolkonzentrationen (1 – 10 μ M) auf maximal 60% Restaktivität reduziert (Abbildung 4.59).

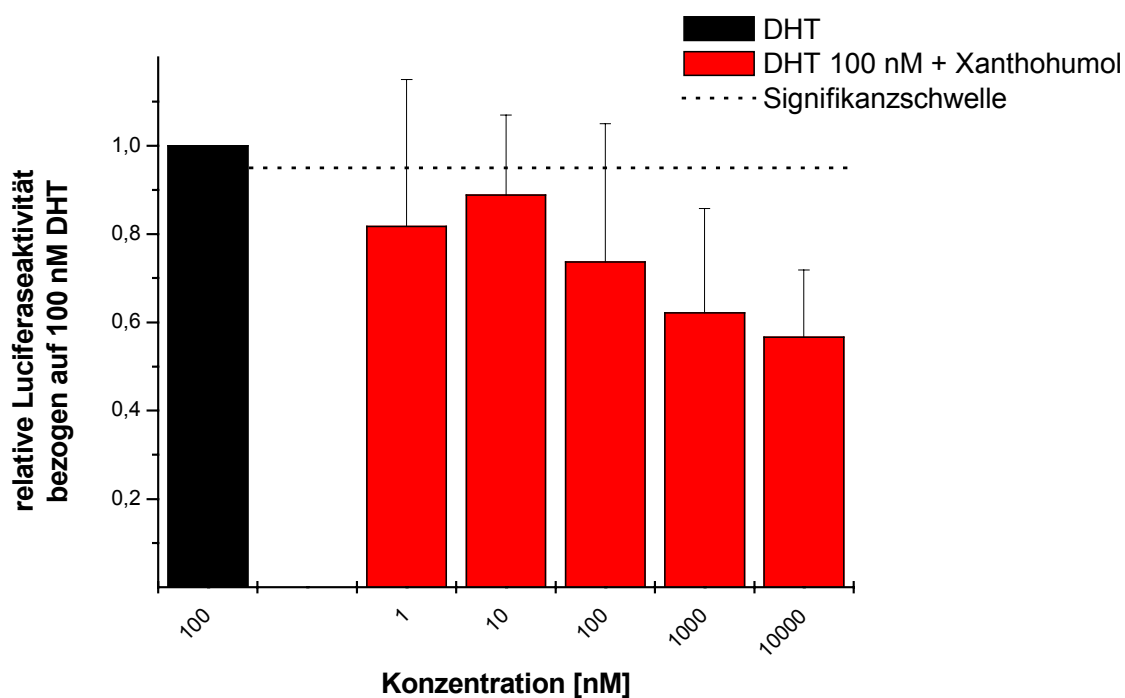


Abbildung 4.59 Untersuchung von Xanthohumol auf antiandrogene Aktivität in COS-AR-Luc-Zellen

Im stabil transfizierten Hefe-AR-Testsystem wurde die durch 50 nM DHT-induzierte Reporterogenaktivität durch Xanthohumol (50 – 100 μ M) ebenfalls auf ca. 60% Restaktivität gehemmt (Abbildung 4.60). Insgesamt zeigt Xanthohumol in beiden Testsystemen vergleichbare antiandrogene Eigenschaften. Im stabil transfizierten Transaktivierungssystem waren für eine vergleichbare Wirkungsstärke höhere Xanthohumolkonzentrationen nötig. Mögliche Ursachen werden in Kapitel 4.4 diskutiert.

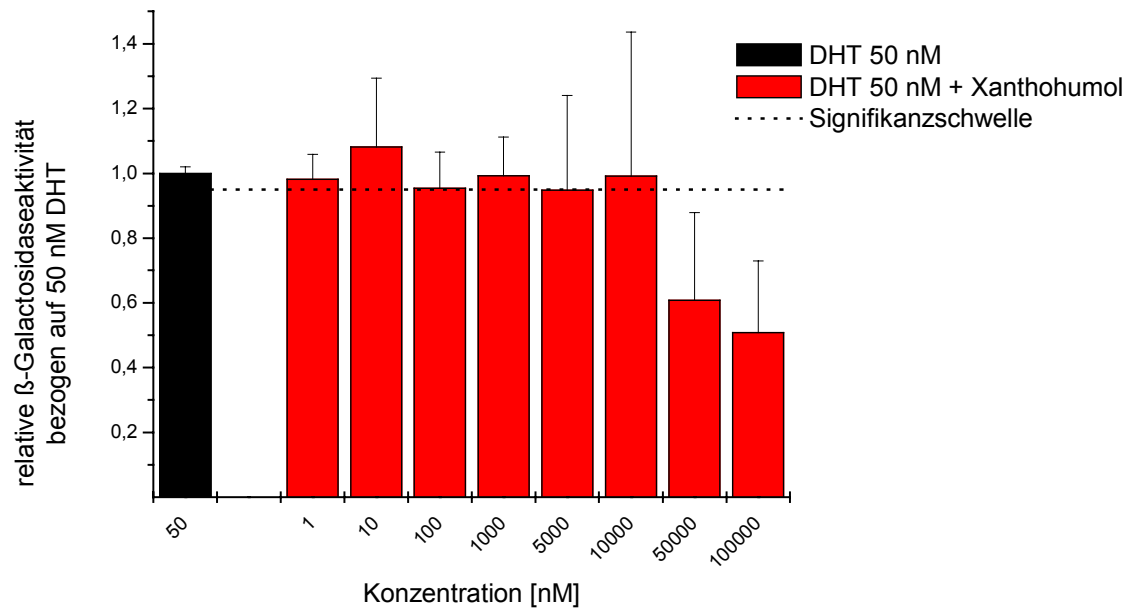


Abbildung 4.60 Untersuchung von Xanthohumol auf antiandrogene Aktivität im Hefe-AR-System

10 μ M Xanthohumol induzierte eine vergleichbare Luciferaseaktivität in COS-AR-Luc-Zellen wie 0,1 nM DHT (Abbildung 4.61). Es wurde keine androgene Aktivität von Xanthohumol festgestellt. Auch im stabil transfizierten Hefe-AR-Testsystem induzierte keine der eingesetzten Xanthohumolkonzentrationen (1 nM – 100 μ M) ausreichend β -Galactosidaseaktivität, um die Signifikanzschwelle für androgene Aktivität zu überschreiten (Abbildung 4.62).

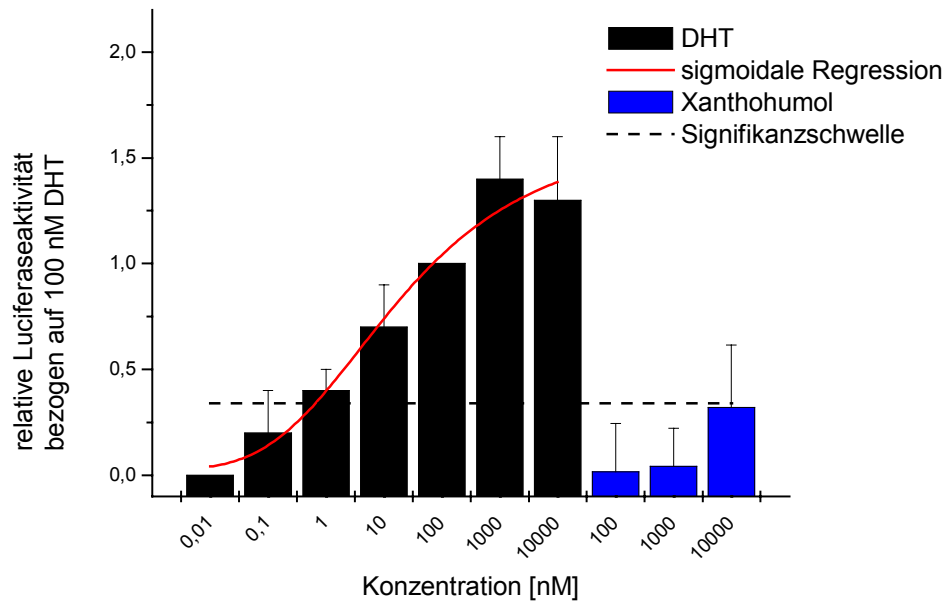


Abbildung 4.61 Untersuchung von Xanthohumol in COS-AR-Luc-Zellen auf androgene Aktivität

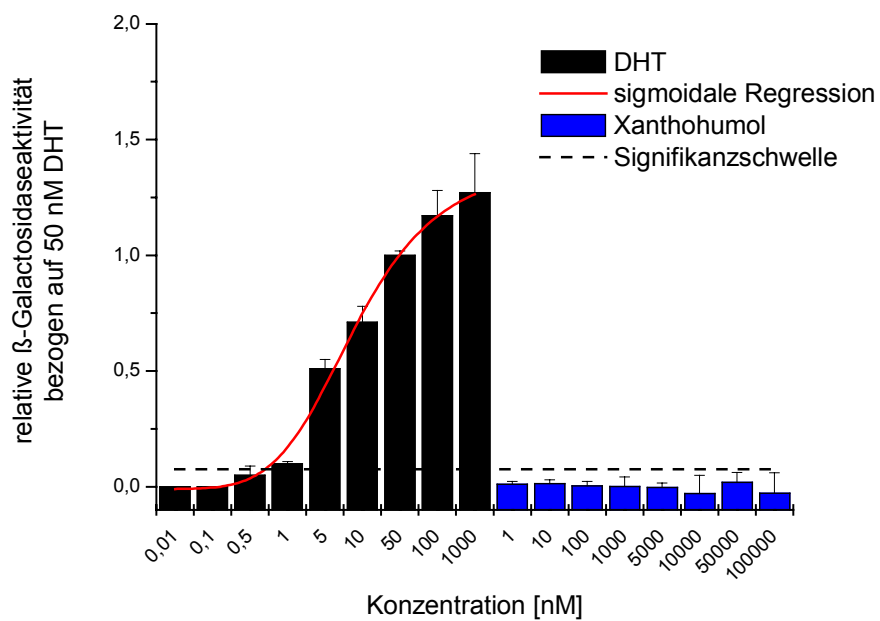


Abbildung 4.62 Untersuchung von Xanthohumol im Hefe-AR-System auf androgene Aktivität

4.3.4 Zusammenfassung und Diskussion

Hopfenprodukte sind in letzter Zeit aufgrund der potentiellen chemopräventiven Eigenschaften in das öffentliche Interesse gerückt (vgl. 2.4.2.4). In Bier wurden zwischen 2 µg/L und 0,69 mg/L Xanthohumol nachgewiesen [Stevens et al., 1999]. Unter Berücksichtigung des Konsums von durchschnittlich 0,5 L Bier pro Tag werden zwischen 1 µg und 0,35 mg Xanthohumol aufgenommen. Der natürliche Xanthohumolgehalt von Hopfenprodukten beträgt ca. 0,2 – 1,1%, kann aber durch Extraktion mit superkritischem CO₂ auf ca. 10% erhöht werden [Biendl et al., 2001].

Auf dem Markt werden zahlreiche Hopfenprodukte als Nahrungsergänzungsmittel oder funktionelle Lebensmittel angeboten. Ihr Xanthohumolgehalt kann um ein Vielfaches höher sein als der in Hopfen oder Bier. In einem Produkt wurden 321 mg/kg Xanthohumol nachgewiesen, was unter Berücksichtigung der vom Hersteller empfohlenen Dosierung zu einer täglichen Aufnahme von 3,2 – 4,8 mg führt [Coldham & Sauer 2001], einem Vielfachen der möglichen Aufnahme durch Bier.

Die möglichen erhöhten Aufnahmen an Xanthohumol durch Nahrungsergänzungsmittel erscheinen im Hinblick auf die in dieser Arbeit festgestellten antiestrogenen und antiandrogenen Eigenschaften bedenklich. Es ist weiterhin zu berücksichtigen, dass Xanthohumol im Körper eventuell zu 8-Prenylnaringenin, einem potenten Estrogen, umgesetzt werden könnte [Stevens et al., 1999a]. Die Aufnahme von Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin könnte möglicherweise insbesondere bei noch in der Entwicklungsphase befindlichen Personen zu Störungen der hormonellen Homöostase führen. Endokrine Aktivität sowie Toxikokinetik und Metabolismus der Hopfenflavonoide Xanthohumol und 8-Prenylnaringenin bedürfen deshalb weiterer Untersuchungen, um eine fundierte Risiko/Nutzen-Bewertung zu ermöglichen.

Xanthohumol und die Substanzgruppe substituierter Benzophenone sind antiandrogen aktiv. Wie in der vorliegenden Untersuchung festgestellt wurde, hat die Vergrößerung des Abstandes zwischen der Ketofunktion des Benzophenons und dem zweiten Phenylrest durch die Einführung einer Vinylbindung keinen Einfluss auf eine antiandrogene Aktivität. Die Diarylketonstruktur könnte also durch die Substanzgruppe der Chalcone erweitert werden. Diese in der vorliegenden Arbeit erhaltenen ersten Hinweise sollten durch die Untersuchung geeigneter Chalcone weiter geprüft werden.

4.4 Diskussion der Ergebnisse aus den Untersuchungen zur antiandrogenen Aktivität

In Gesamtgraphiken sollen die Ergebnisse der Untersuchungen auf antiandrogene Aktivität auf einen Blick dargestellt werden (Abbildung 4.63 und Abbildung 4.64). Auf die Angabe der Fehler wurde in diesem Fall zu Gunsten einer besseren Übersichtlichkeit verzichtet.

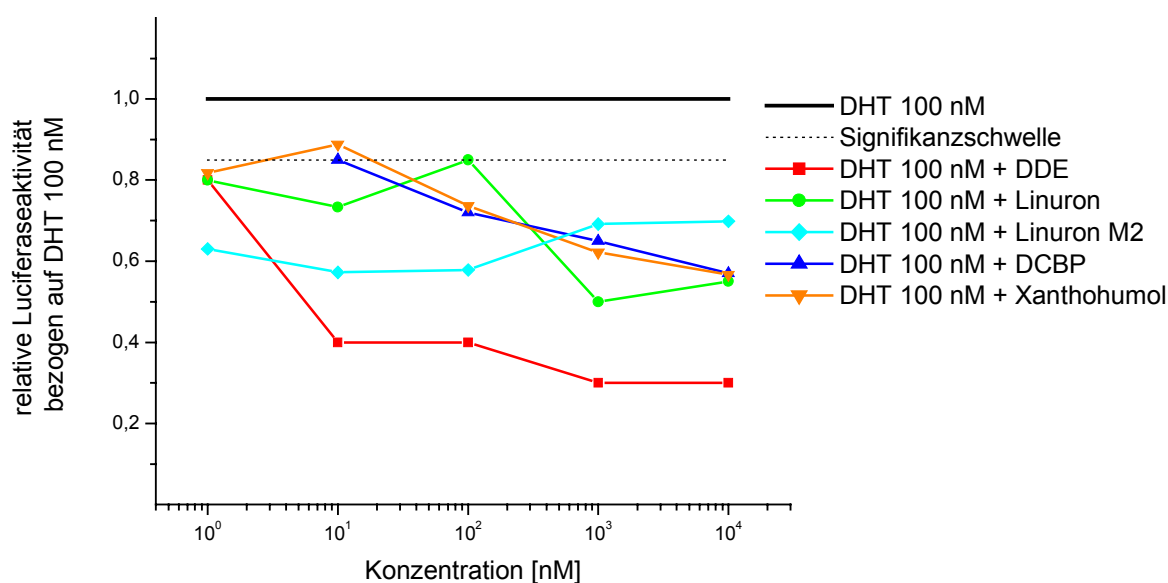


Abbildung 4.63 Antiandrogene Aktivität von DDE, DCBP, Linuron, Linuron M2 und Xanthohumol im Überblick im transienten Transaktivierungssystem

Im transienten Transaktivierungssystem COS-AR-Luc (Abbildung 4.63) ist DDE mit Abstand am stärksten antiandrogen aktiv. Bereits bei 10 nM DDE wurde eine Hemmung von 60% beobachtet, die bei 1 μ M und 10 μ M weiter auf 70% anstieg. Die Hemmung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität durch Linuron, Xanthohumol und DCBP¹ betrug maximal 40%. Eine erste Verringerung der durch DHT-induzierten Luciferaseaktivität wurde bei 100 nM Xanthohumol bzw. DCBP beobachtet.

¹ DCBP Daten wurden von Guth (2000) übernommen

Eine schwache Reduktion der Reporterogenaktivität wurde durch 10 nM Linuron verursacht, die zunächst wieder abnahm und bei 1 und 10 μM auf 40% anstieg. Durch Linuron M2 wurde die durch DHT-induzierte Luciferaseaktivität konzentrationsunabhängig um 30 – 40% gehemmt.

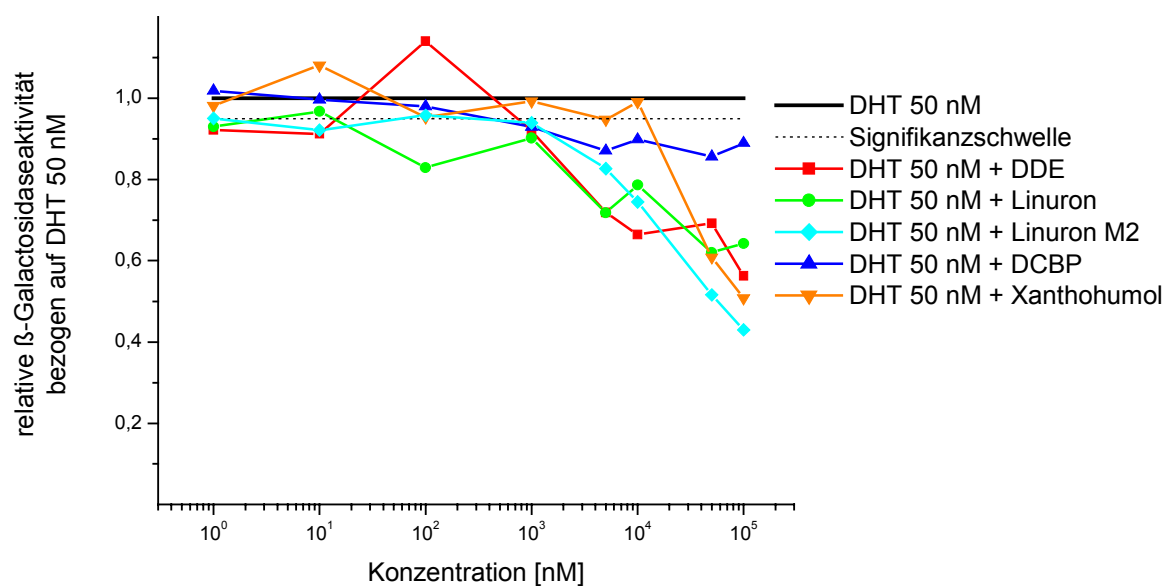


Abbildung 4.64 Antiandrogene Aktivität von DDE, DCBP, Linuron, Linuron M2 und Xanthohumol im Überblick im stabil transfizierten Hefe-System

Die Datenlage des stabil transfizierten Hefe-AR-Systems ist in sich gesehen homogener als beim transienten Transaktivierungssystem. Die durch den physiologischen Liganden induzierte Reporterogenaktivität wurde durch Linuron M2 auf 42%, durch Xanthohumol auf 50%, durch DDE und Linuron auf 55% sowie durch DCBP auf 85% Restaktivität gehemmt (Abbildung 4.64). Alle untersuchten Substanzen mit der Ausnahme von Linuron zeigten eine Hemmung der durch DHT-induzierten Luciferaseaktivität bei einer Konzentration von 1 μM (Linuron 0,1 μM). Auffällig dabei ist, dass im Hefe-AR-Testsystem bei allen untersuchten Substanzen für vergleichbare maximale Wirkstärken immer eine um ungefähr eine Größenordnung höhere Konzentration nötig war. Bei Linuron M2 ist diese Differenz sogar noch größer. Die durch DCBP-induzierte Hemmung war auch in den höchsten eingesetzten Konzentrationen (10 –

100 μM) wesentlich geringer (15%) als im transienten Transaktivierungssystem (maximale Hemmung um 40%).

Hefe-AR-Zellen reagieren nach den vorliegenden Ergebnissen auf antiandrogen aktive Substanzen wesentlich weniger sensitiv, da für vergleichbare Wirkungsstärken im Hefe-AR-System mit wesentlich höheren Testsubstanz-Konzentrationen inkubiert werden musste. Im Gegensatz dazu wurde nach Inkubation der Testsysteme mit dem physiologischen Hormon DHT vergleichbare EC_{50} -Werte aus den sigmoidalen Kurvenverläufen errechnet (COS-AR-Luc: $\text{EC}_{50} = 12 \text{ nM}$, Hefe-AR: $\text{EC}_{50} = 8 \text{ nM}$). Beide Testsysteme reagieren auf den hormonellen Stimulus in vergleichbarer Weise, obwohl unterschiedliche Promotoren (MMTV-Promotor versus HRE) und unterschiedliche Reportergene verwendet wurden. Auch der unterschiedliche Zellkontext und die damit möglicherweise, verbundenen unterschiedlichen Ko- und Transkriptionsfaktoren (vgl. 2.5.2.2) scheinen keinen Einfluss auf die DHT-vermittelte Transkriptionsaktivierung zu haben. Möglicherweise ist aber eine unterschiedliche Kofaktorausstattung der Hefezellen im Vergleich zu COS-7-Zellen der entscheidende Faktor für die geringere Effektivität von Antiandrogenen in Hefezellen. In Säugerzellen könnte ein antiandrogene Aktivität-vermittelnder Kofaktor existieren, der in Hefezellen nicht bzw. in nicht ausreichenden Mengen vorkommt. Dies könnte zu der beobachteten geringeren Sensitivität der Hefezellen auf antiandrogen aktive Substanzen im Vergleich zu COS-AR-Luc-Zellen führen.

Inwieweit eine unterschiedliche metabolische Kompetenz von COS-7-Zellen und Hefezellen vorliegt, ist gegenwärtig nicht geklärt.

Möglicherweise liegt die schwächere Reaktion der Hefezellen auf antiandrogen aktive Substanzen in der unterschiedlichen Zellwand bzw. Zellmembran der Zellen begründet: Als Säugerzellen haben COS-7-Zellen eine Zellmembran aus einer Doppellipidschicht. Bei den Hefe-Zellen finden sich zusätzlich noch andere Stoffe wie 1,6- β -Glucan und Chitin in der Zellwand. Standards und Testsubstanzen müssen also beim Hefesystem eine dichtere Barriere überwinden, um in die Hefezelle zu gelangen. Dies könnte möglicherweise zu einer unterschiedlichen Konzentration von Standards und Testsubstanzen in Hefe-AR-Zellen im Vergleich zu COS-AR-Luc-Zellen führen. Dies sollte sich in unterschiedlichen Charakteristika der DHT-Dosis-Wirkungskurven äußern. Es wurden jedoch nur geringfügige Unterschiede der beiden Testsysteme hinsichtlich der durch DHT-induzierten Reportergensynthese beobachtet. DHT könnte durch aktiven Transport von den Hefezellen aufgenommen werden und so die Bar-

riere besser überwinden als die Testsubstanzen. Dies würde zu einer höheren intrazellulären DHT-Konzentration in der Hefezelle im Vergleich zur Testsubstanz führen, was sich in der im Vergleich zum COS-AR-Luc-System geringeren Sensivität äußern könnte. Ebenso ist eine aktive Erniedrigung der Testsubstanzkonzentration in den Hefe-Zellen durch Effluxpumpen ebenfalls denkbar, was wiederum zu einer Verschiebung des Verhältnisses von Standard- und Testsubstanzkonzentration führen würde. In Hefen konnte ein Netzwerk dieser Pumpen, die beispielsweise auch Harnstoffherbizide und Flavonoide über die Membran aus den Zellen transportieren, nachgewiesen und charakterisiert werden [Kolaczowski et al., 1998]. Der in dieser Arbeit verwendete Hefe-AR-Stamm ist auf Effluxpumpen bisher noch nicht untersucht worden. In COS-7-Zellen konnten das „multidrug resistance gene 1“ und P-Glycoprotein auf mRNA- bzw. Proteinebene nachgewiesen werden [Höllt et al., 1992]. Insgesamt ist die Zelllinie COS-7 bzw. ihr Vorläufer CV-1 hinsichtlich einer Ausstattung mit Effluxpumpen wesentlich weniger untersucht als *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme.

Ob die geringere Sensivität des Hefe-AR-Systems im Vergleich zum COS-AR-Luc-System bezogen auf die Detektion antiandrogener Aktivität auf einer unterschiedlichen Aufnahme bzw. einem unterschiedlichen Export des Standards im Vergleich zu den Testsubstanzen zurückzuführen ist, bleibt ungeklärt bis die intrazellulären DHT- und Standardkonzentrationen in beiden Testsystemen bestimmt wurden.

Zusammenfassend liegen die Vorteile des Säugerzellsystems COS-AR-Luc im Vergleich zum Hefe-AR-System darin, dass

- a) Hefezellen auf einige der Testsubstanzen mit Anzeichen von erheblicher Toxizität reagieren.
- b) beim Säugerzellsystem ein Wildtyppromotor eingesetzt wird, der für eine spezifischere Reaktion des Testsystems auf das physiologische Hormon DHT ermöglichen sollte.
- c) zur Antagonisierung der durch DHT-induzierten Reporterogenaktivität im Hefe-AR-System wesentlich höhere Konzentrationen an Testsubstanz nötig waren, um eine vergleichbare Hemmung der Reportergeninduktion zu erreichen. Das Hefe-AR-System könnte daher möglicherweise falsch negative Ergebnisse hinsichtlich antiandrogener Aktivität der Testsubstanz liefern.

Die verwendeten Testsysteme sollten nicht nur auf ihre metabolische Kompetenz (Phase I und II Metabolismus), sondern auch auf funktionelle Effluxpumpen (sog. Phase III Metabolismus) untersucht und charakterisiert werden.

5 Zusammenfassung

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Umwandlung des Akarizids Dicofol zu Dichlorbenzophenon (DCBP). Literaturhinweise führten zu dem begründeten Verdacht, dass keine metabolische Transformation, sondern ein UV-Licht- bzw. alkali-induzierter Zerfall der Substanz stattfindet. Diese Hypothese wurde durch Inkubation von aktiven und inaktivierten Lebermikrosomen mit Dicofol bestätigt. Sowohl in Gegenwart aktiver und inaktiver Mikrosomen, als auch in Ansätzen ohne Mikrosomen wurden nahezu vergleichbare Mengen an gebildetem DCBP beobachtet. Eine Erhöhung der Inkubationstemperatur führte anschließend zu einer Verstärkung der DCBP-Bildung. Die in dieser Arbeit bestimmte Aktivierungsenergie der Degradation von Dicofol zu DCBP in Gegenwart aktiver Mikrosomen stimmt mit der Aktivierungsenergie derselben Reaktion in wässriger Umgebung überein. Der Abbau von Dicofol zu DCBP ist wahrscheinlich auch im Organismus ein nicht-enzymatisch katalysierter Prozess.

Im Anschluss wurde die UV-Licht-induzierte Reaktion von Dicofol zu DCBP untersucht. Es wurde festgestellt, dass mit steigender Strahlungsdosis eine Verstärkung der DCBP-Bildung einhergeht, die in unpolaren Lösungsmitteln deutlich ausgeprägter ist als in polaren Lösungsmitteln. Es ist daher davon auszugehen, dass auch auf der wachsartigen, lipophilen Oberfläche von Zitrusfrüchten eine Umsetzung von Dicofol zu DCBP stattfindet. Die Abbaubarkeit von Dicofol in wässrigen Medien wurde durch Inkubation von Dicofol in methanolischen Lösungen unterschiedlichen Hydroxidionkonzentrationen untersucht. Die Umsatzrate der Degradation stieg dabei mit zunehmender Hydroxidionkonzentration und zunehmender Inkubationsdauer an. Die alkali-induzierte Reaktion wird wahrscheinlich durch Deprotonierung von Dicofol eingeleitet. Im Anschluss werden in der Literatur als mögliche Reaktionsmechanismen entweder eine Eliminierung von Chloroform unter DCBP-Bildung oder die Bildung eines 2,2-Dichlor-3,3-bis-(p-chlorphenyl)-oxirans diskutiert, aus dem DCBP und Dichlorcarben entstehen. In orientierenden Versuchen wurde Chloroform durch Headspace-GC annähernd äquimolar zur eingesetzten Dicofolmenge nachgewiesen, was auf ersteren Reaktionsmechanismus hindeutet.

Bei der Untersuchung von Dicofol, DCBP und DCBH auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität im Hefe-AR-Testsystem wurde nur DCBP eindeutig als antiandrogen aktiv erkannt. Die eingesetzten Hefezellen reagierten mit Anzeichen erheblicher To-

xizität auf hohe Dicofol- bzw. DCBH-Konzentrationen, was eine Beurteilung ihrer antiandrogene Aktivität in diesem Testsystem erschwert. Die beobachtete antiandrogene Aktivität von Dicofol im transienten Transaktivierungssystem (COS-AR-Luc) beruht wahrscheinlich zum größten Teil auf der alkali-induzierten Degradation von Dicofol zu DCBP im Inkubationsmedium. Die antiandrogene Aktivität von DCBH könnte auf die Oxidation von DCBH zu DCBP durch Luftsauerstoff oder auf enzymatische Katalyse zurückgeführt werden. Dicofol, DCBP und DCBH zeigten in der Mammakarzinomzelllinie MCF-7-Luc keine estrogene Aktivität. Auch Hefe-ER-Zellen reagierten auf die Exposition mit Dicofol und DCBH mit Anzeichen starker Toxizität. Die dargestellten Ergebnisse lassen den Schluss zu, dass die Reduktion der Alligatorpopulation des Lake Apopka nach Kontamination mit Dicofol und DDT nicht ausschließlich auf estrogene Aktivität von DDT bzw. antiandrogene Aktivität von DDE zurückzuführen ist. Das aus Dicofol gebildete DCBP könnte einen wesentlichen Beitrag geleistet haben.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einfluss des Metabolismus auf die antiandrogene Aktivität des Phenylharnstoffherbizids Linuron (N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methoxy-N'-methyl-harnstoff). Linuron wird durch Abspaltung der N'-Substituenten und Auflösung der Harnstoffstruktur zu 3,4-Dichloranilin (DCA) abgebaut. Die Linuronmetabolite N-3,4-Dichlorphenyl-harnstoff (Linuron M1) und DCA waren in den eingesetzten Testsystemen weder androgen noch antiandrogen aktiv. Linuron und der primäre gebildete Metabolit N-3,4-Dichlorphenyl-N'-methyl-harnstoff (Linuron M2) zeigten keine androgene, aber antiandrogene Aktivität. Der Metabolit Linuron M2 zeigte im stabil transfizierten Hefe-AR-System mit Linuron vergleichbare Aktivität, schien aber im COS-AR-Luc-System etwas stärker antiandrogen aktiv zu sein. Im Zuge des metabolischen Abbaus von Linuron kommt es zu einer Inaktivierung hinsichtlich antiandrogener Aktivität. Da die Metabolisierung insgesamt jedoch langsam abläuft und der primär gebildete Metabolit Linuron M2 starke antiandrogene Aktivität zeigt, kann aufgrund der vorliegenden Daten eine Gefährdung exponierter Organismen nicht ausgeschlossen werden.

Des Weiteren sollte die endokrine Aktivität von Xanthohumol, dem prenylierten Hauptchalcon des Hopfens, untersucht werden. Xanthohumol zeigte keine estrogenen aber starke antiestrogenen Aktivität im Hefe-ER-System. Es wurde keine androgenen, aber antiandrogenen Aktivität in den Testsystemen COS-AR-Luc und Hefe-AR beobachtet.

Der Einsatz von Hopfen als Nahrungsergänzungsmittel sollte insbesondere wegen möglicher hoher Exposition mit Xanthohumol und dem potenten Estrogen 8-Prenylnaringenin kritisch auf potentielle endokrine Effekte *in vivo* überprüft werden. Mit der Untersuchung von Xanthohumol sollte auch festgestellt werden, ob die Einführung einer Vinylbindung zwischen Ketofunktion und Phenylrest in die Diarylketonstruktur Einfluss auf die antiandrogenen Aktivität hat. Legt man die vorliegenden Ergebnisse zu Grunde, hat diese Strukturänderung keinen Einfluss. Dies sollte aber in nachfolgenden Untersuchungen mit geeigneten Substanzen weiter geprüft werden.

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur

Kultivierungsbedingungen

Adhärenz wachsende Zellen werden unter sterilen Bedingungen bei 37°C, 5% (V/V) Kohlenstoffdioxid und 90% Luftfeuchtigkeit in Petrischalen oder Kulturflaschen in serumhaltigem Medium kultiviert. Zum Schutz vor Prokaryonten wird eine Penicillin-Streptomycin-Lösung zugesetzt. [Lindl & Bauer, 1987]

Medienwechsel

Zur Versorgung der Zellen mit Nährstoffen und zur Entfernung von Stoffwechselprodukten wird alle 3 bis 4 Tage ein Medienwechsel durchgeführt. Als Indikator dient dem Medium zugesetztes Phenolrot, dessen Farbumschlag von rot nach gelb eine Übersäuerung durch Stoffwechselprodukte anzeigt. Nach Entfernen des alten Mediums wird mit PBS gewaschen und neues Medium zugegeben. [Lindl & Bauer, 1987]

Passagieren von Zellen

Wenn die Kulturflaschen zu 70% konfluent bewachsen sind, muss ein Teil der Zellen in eine neue Flasche überführt werden. Hierzu wird das Medium entfernt und zweimal mit PBS gespült. Anschließend wird etwas Trypsin-Lösung auf die Zellen gegeben und kurze Zeit im Brutschrank inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Zur Inaktivierung des Trypsins wird serumhaltiges Medium zugesetzt. Anschließend werden die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen in eine Pipette vereinzelt und ein Teil der Zellsuspension in eine neue mediumhaltige Flasche eingesät. [Lindl & Bauer, 1987]

Auszählen von Zellen

Abtrysinierte und vereinzelt Zellen werden in eine Neubauer-Zählkammer gegeben und unter dem Mikroskop ausgezählt. Ein Feld der Zählkammer entspricht 0,1 µl Volumen der Zellsuspension. [Lindl & Bauer, 1987]

Einfrieren von Zellen

1 ml abtrypsinierter und vereinzelter Zellen wird in einem Kryoröhrchen mit 100 µl DMSO versetzt und zunächst bei -20°C und dann bei -70°C bzw. zur längeren Lagerung in flüssigem Stickstoff gelagert. [Lindl & Bauer, 1987]

Auftauen von Zellen

Die eingefrorenen Zellen werden im Wasserbad möglichst schnell aufgetaut und anschließend in ein mit Medium befülltes Röhrchen überführt. Die erhaltene Suspension wird bei 4°C , 1500 U/min 5 min zur Abtrennung des cytotoxischen DMSO zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Zellen mit serumhaltigem Medium resuspendiert und in eine mit Medium befüllte Kulturflasche überführt. [Lindl & Bauer, 1987]

Lösungen und Materialien

FKS (Gibco)	Fötale Kälberserum
CD (Charcoal Dextran) FKS	50 ml einer sterilen Lösung aus 0,5% Norrit A und 0,05% Dextran in 0,14 M NaCl werden in 500 ml FKS gegeben, 45 min im Wasserbad bei 52°C inkubiert und zweimal bei 800g 20 min zentrifugiert. Der Überstand wird bei -20°C gelagert.
Penicillin-Streptomycin-Lösung (Gibco)	10 000 I.E./ml Penicillin und 10 000 I.E./ml Streptomycin
L-Glutamin (Gibco)	200 mM L-Glutamin

PBS	5 g NaCl 0,72 g Na ₂ HPO ₄ 0,25 g KCl 0,125 g KH ₂ PO ₄ pH 7,3 auf 500 ml mit bidest. Wasser aufgefüllt und steril autoklaviert
Trypsin-Lösung	125 mg Trypsin (Serva) 62,5 mg EDTA auf 250 ml mit PBS aufgefüllt, über Nacht gekühlt rühren und durch 0,2 µm Sterilfilter filtrieren
DMSO (Fluka)	Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie

Kulturmedien für die Zelllinien MCF-7-Luc und COS-7

serumhaltig

- CDFKS-Medium:
Dulbecco's DMEM (Gibco) ohne Phenolrot und L-Glutamin
500 ml Kulturmedium, 50 ml CDFKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 4 ml L-Glutamin
- FKS-Medium:
RPMI 1640 (Gibco) mit Phenolrot und L-Glutamin
500 ml Kulturmedium, 50 ml FKS, 5 ml Penicillin/Streptomycin

serumfrei

- Dulbecco's DMEM (Gibco) ohne Phenolrot und L-Glutamin
500 ml Kulturmedium, 5 ml Penicillin/Streptomycin, 4 ml L-Glutamin

6.2 Trypanblauausschluss

Mit Substanz behandelte Zellen werden abtrypsiniert, vereinzelt und mit Trypanblaulösung gemischt. Intakte Zellen zeigen unter dem Mikroskop gelbliche, Zellen mit geschädigter Zellmembran blaue Färbung. [Lindl & Bauer, 1987]

Lösungen und Materialien

Trypanblaulösung	0,4 g Trypanblau (Serva)
	0,81 g NaCl
	0,06 g KH_2PO_4
	in 100 ml bidest. Wasser pH 7,2

6.3 Sulforhodamin B-Test

1 Mio. MCF-7-Luc-Zellen werden in Petrischalen (Durchmesser 6 cm) ausgesät, 2 Tage kultiviert und anschließend inkubiert. Nach erfolgter Inkubation werden die Zellen durch 4°C kalte TCA-Lösung (10% Endkonzentration) 60 min bei 4°C an die Petrischalenoberfläche fixiert und die Zellproteine ausgefällt. Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit kaltem Leitungswasser werden die Petrischalen an der Luft getrocknet. Die Petrischalen werden mit 1 ml SRB-Lösung angefärbt. Nach 30 min wird der überschüssige Farbstoff abgegossen und die Platten solange mit 1%-iger Essigsäure gewaschen bis kein Farbstoff mehr an das Waschwasser abgegeben wird. Der proteingebundene Farbstoff wird nach erneutem Trocknen in 4°C kaltem Tris-Puffer (pH 10,5) solubilisiert und innerhalb von 15 min bei 564 nm photometrisch vermessen. Überschreiten die gemessenen Extinktionen einen Wert von 1,2, wird entsprechend mit Tris-Puffer verdünnt bis die gemessenen Extinktionen im linearen Bereich des Photometers liegen. Die erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und somit der Lebenszellzahl proportional. [Skehan et al., 1990]

Lösungen und Materialien

50%-ige Trichloressigsäurelösung (Acros)

SRB-Lösung 0,4 % SRB (Sigma) in 1%-iger Essigsäure (aus Eisessig, Roth)

Tris-Base (Roche) 10 mM, pH 10,5

Halbmikroeinwegküvetten (Fischer)

UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)

6.4 Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen

Zellen werden auf einem Objektträger bis zu einer Konfluenz von 50 – 70 % kultiviert. Anschließend wird der Objektträger in –20°C kaltes Methanol gestellt und 15 min fixiert. Nachdem der Objektträger vollständig getrocknet ist, werden 40 µl 4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid-Lösung aufgetropft und mit einem Deckglas belegt. Nach Abdichtung mit handelsüblichem Nagellack wird unter dem Fluoreszenzmikroskop mit 340/380 Anregungsfilter und LP 430 Sperrfilter untersucht. Kontaminierte Zellen zeigen fluoreszierende Punkte im Cytoplasma. Zur Entfernung der Mycoplasmen werden die Zellen eine Woche mit „Mycoplasma Remove Agent“ 100 µg/ml behandelt und erneut auf Mycoplasmen überprüft.

Lösungen und Materialien

4',6-Diamidin-2-phenylindoldihydrochlorid (Roche)

Mycoplasma Remove Agent (ICN Biochemicals)

Enthält 50 µg/ml 4-Oxo-chinolin-3-carboxysäuren-Derivate

Fluoreszenzmikroskop (Zeiss Axioskop)

6.5 Reportergensysteme

6.5.1 Elektroporation

In Flaschen kultivierte COS-7-Zellen werden abtrypsiniert, in ein steriles 15 ml Röhrchen gegeben, vereinzelt und ausgezählt. Die Zellsuspension wird 2×5 min bei 1500 U/min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wird abpipettiert, die Zellen in eiskaltem PBS aufgenommen (3-4 Mio. Zellen in 500 μl PBS) und in eine Elektroporationsküvette überführt. Nach Zugabe der Plasmide (je 10 μg pSG5-hAR, pMAMneoLuc und pSV β) werden die Küvetten zum Mischen aufgetippt und 10 min auf Eis inkubiert. [Guth, 2000; Invitrogen, 1996]

Nach erfolgter Elektroporation wird erneut 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend werden die Zellen in FKS-Medium überführt und ausgesät.

Lösungen und Materialien

Elektroporationsküvetten (Invitrogen) 0,4 cm; einzeln verpackt

Elektroporator II (Invitrogen)

Geräteeinstellungen

Spannung: 330 V

Stromstärke: 25m A

Leistung: 25 W

Elektrische Feldstärke: 500 μF

Widerstand: $R = \infty$

Ladezeit

3 Minuten

Zentrifuge

Megafuge (Heraeus)

6.5.2 Luciferase-Reportergenassay

Inkubation

MCF-7-Luc-Zellen werden in CDFKS-Medium ausgesät und 48 h kultiviert. Anschließend wird das Medium abgesaugt, die Zellen mit PBS gespült und mit den zu untersuchenden Substanzen in serumfreiem Medium oder CDFKS-Medium in Gegenwart von 0,1% DMSO als Lösungsvermittler inkubiert. Nach 24 h Inkubation wird das Medium abgenommen und die Zellen 24 h in CDFKS-Medium nachinkubiert. Danach erfolgt die Aufarbeitung der Zellen.

COS-AR-Luc-Zellen werden nach der Elektroporation 17 h kultiviert. Die Inkubation mit den zu untersuchenden Substanzen erfolgt in CDFKS-Medium in Gegenwart von 0,1% DMSO als Lösevermittler. Im Folgenden wird analog zu den MCF-7-Luc-Zellen vorgegangen.

Herstellung der Zellextrakte

Nach insgesamt 48 h Inkubation wird zur Aufarbeitung das Medium abgesaugt, zweimal mit PBS gespült und anschließend die Zellen mit Lysepuffer lysiert (150 – 250 μ l). Nach 20 min Inkubation werden die Zellen abgeschabt und die Suspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach zweiminütiger Zentrifugation bei 13000 U/min, 4°C wird der Überstand, der die Luciferase und die β -Galactosidase enthält, in ein weiteres 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. [Promega, 1996]

Messung der Luciferaseaktivität

60 μ l des Überstandes werden in eine 96-Lochtiterplatte gegeben. Hierzu erfolgt die Zugabe des Luciferase-Substrats (180 μ l) automatisch durch die Luminometerpumpe. Die Messung der emittierten Lichtsignale wird bei 50 Messintervallen mit einer Gesamtmesszeit von 250 sec/Loch durchgeführt.

Lösungen und Materialien

Lyse-Puffer 5x (Promega)

125 mM Tris-Phosphat pH 7,8
10 mM Dithiotreitol
10 mM 1,2-Diaminocyclohexan-N,N,N',N'-
tetraessigsäure
10% Glycerin
1% Triton X-100

Luciferase Assay Puffer (Promega)

20 mM Tricine
1,07 mM $(\text{MgCO}_3)_4\text{Mg}(\text{OH})_2 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
2,67 mM MgSO_4
0,1 mM EDTA
33,3 mM DTT
270 μM Coenzym A
470 μM Luciferin
530 μM ATP
pH 7,8

Luciferase Assay Substrat (Promega)

Luminometer Lumistar (BMG)

Weiße 96-Lochtiterplatten (Nunc) Maxisorp 96

Messung der β -Galactosidaseaktivität

30 μl des Überstandes werden mit 200 μl β -Galactosidase-Puffer in 96-Lochtiterplatten versetzt. Nach 60 min Inkubation erfolgt die Messung der emittierten Lichtsignale bei 25 Messintervallen mit einer Gesamtmesszeit von 125 sec/Loch innerhalb von 60 min automatisch im Luminometer. [Clontech, 1999]

Lösungen und Materialien

Reaction Buffer (Clontech)

Substrate (Clontech)

Keine weiteren Angaben seitens des Herstellers.

Luminometer Lumistar (BMG)

Weißer 96-Lochtiterteller (Nunc) Maxisorp 96

6.5.3 Hefe-Reportergentestsysteme

Zunächst wird ein Glycerolstock der stabil transfizierten Hefen 24 h in 52 ml Wachstumsmedium bei 30°C unter Schütteln angezogen. Am nächsten Tag werden für die Testkultur 0,5 ml der Übernachtskultur mit einer optischen Dichte von 1 entnommen und in 52 ml Wachstumsmedium mit 0,5 ml CPRG-Lösung überführt (Testkultur). In die Löcher einer 96-Lochplatte werden die in Ethanol gelösten Testsubstanzen bzw. Standards pipettiert. Nach Abdampfen des Ethanols werden 200 µl der oben hergestellten Testkultur in die Löcher gegeben. Nach 48 h Inkubation bei 30°C unter Schütteln wird die Färbung der Zellsuspensionen bei 540 nm und die optische Dichte bei 620 nm im Photometer bestimmt. Durch Abgleich der Extinktion bei 540 nm mit der optischen Dichte bei 620 nm wird die relative β -Galactosidaseaktivität bestimmt. [Sohoni & Sumpter, 1998; Routledge & Sumpter, 1996]

Lösungen und Materialien

Minimalmedium	KH ₂ PO ₄	13,61 g
	(NH ₄) ₂ SO ₄	1,98 g
	KOH	4,2 g
	MgSO ₄ (0,235 g MgSO ₄ × H ₂ O)	0,2 g
	Fe ₂ (SO ₄) ₃ -Lösung (40 mg/ml)	1 ml
	L-Leucin	50 mg

L-Histidin	50 mg
Adenin	50 mg
L-Arginin-HCl	20 mg
L-Methionin	20 mg
L-Tyrosin	30 mg
L-Isoleucin	30 mg
L-Lysin-HCl	30 mg
L-Phenylalanin	25 mg
L-Glutaminsäure	100 mg
L-Valin	150 mg
L-Serin	375 mg

Mit bidest. Wasser auf 1L auffüllen und steril filtrieren (0,2 µm Filter). Bei 4°C lagern.

Wachstumsmedium

45 ml Minimalmedium

5 ml Glucoselösung (20%-ig) sterilfiltriert (0,2 µm Filter)

0,5 ml Vitamin-Lösung Thiamin 8 mg

 Inositol 40 mg

 Pyridoxin 8 mg

 Pantothensäure 8 mg

 Biotin-Lösung (20 mg/L) 20 ml

In 200ml bidest. Wasser lösen und steril filtrieren
(0,2 µm Filter).

125 µl CuSO₄-Lösung (20 mM) steril filtriert (0,2 µm Filter)

1,25 ml Asparaginsäure (4 mg/ml) steril filtriert (0,2 µm Filter)

0,4 ml L-Threonin (24 mg/ml) steril filtriert (0,2 µm Filter)

Testmedium

52 ml Wachstumsmedium

0,5 ml CPRG-Lösung (10 mg/ml) von Roche steril filtriert (0,2 µm Filter)

Alle Chemikalien in Zellkulturqualität von Merck, Sigma oder Fluka

Photometer: Lambda 340 Microplate Reader (MWG Biotech)

96-Lochplatten: transparent (Greiner, Nunc)

Anlegen eines Hefe-Glycerolstocks

Eine Übernachtskultur wird in ein steriles 50 ml Röhrchen überführt und 5 min bei 1200 U/min bei 4°C zentrifugiert. Nach Abgießen des Medium bis auf 5 ml wird das Pellet vereinzelt. Zu 850 µl Hefesuspension werden mit 150 µl Glycerol gemischt und bei –80°C gelagert (10-fach konzentrierte Hefe mit einer optischen Dichte von 1).

6.6 Amplifikation von Plasmiden

6.6.1 Anlegen eines Glycerolstocks

Von einer Prokaryontenkultur werden 850 µl Zellsuspension in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Hierzu werden 150 µl 86%-ige Glycerollösung gegeben, gut gemischt und auf Eis gestellt. Die Lagerung kann bei –20°C oder –80°C erfolgen.

Lösungen und Materialien

Glycerollösung 86% steril

6.6.2 Herstellung kompetenter *Escherichia coli* und Transformation

Zunächst wird aus einem *Escherichia coli*-Glycerolstock eine Übernachtskultur angelegt. Hierzu werden in ein steriles Reagenzglas 5 ml LB-Medium gegeben und mit 10-20 µl des Glycerolstock angeimpft. Es wird über Nacht bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Von der Übernachtskultur werden 300 µl entnommen und in 30 ml LB-Medium gegeben. Anschließend wird bei 37°C 2,5 h inkubiert. Die Bakteriensuspension wird bei 4°C, 5000 U/min für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Pellet in 12,5 ml kalter, steriler 50 mM CaCl₂ Lösung resuspendiert und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation bei 4°C, 5000 U/min 10 min wird der Überstand verworfen und das Pellet in 2,5ml kalter, steriler 50mM CaCl₂ Lö-

sung aufgenommen. Die Zellen sind nun kompetent und können sofort zur Transformation eingesetzt werden.

In sterile 1,5 ml Reaktionsgefäße gibt man 200 µl kompetente Bakterien und 1,5 µg Plasmid. Eine Negativkontrolle wird ebenfalls mitgeführt. Die Eppendorfreaktionsgefäße werden 30 min auf Eis gestellt. Anschließend werden die Bakterien für 2 min einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt und danach 5 min auf Eis gestellt. Zu dieser Bakteriensuspension wird nun 1 ml LB-Medium gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Die nun transformierten Bakterien werden auf ampicillinfreie LB-Agar-Platten und auf LB-Agar-Platten, die 20 µg bis 50 µg Ampicillin enthalten, ausplattiert. Die Agarplatten werden bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. [Sambrook et al., 1989]

Lösungen und Materialien

LB-Medium 10 g Casein-Pepton (Gibco)
 5 g Bacto-Yeast (Gibco)
 10 g NaCl (Roth)
 auf 1L mit bidest. Wasser aufgefüllt und steril autoklaviert

LB-Agar 10 g Casein-Pepton (Gibco)
 5 g Bacto-Yeast (Gibco)
 10 g NaCl (Roth)
 20 g Agar-Agar (Gibco)
 auf 1L mit bidest. Wasser aufgefüllt und steril autoklaviert

Ampicillin 20 mg/ml Ampicillin (Sigma)

50 mM CaCl₂ Lösung, steril

6.6.3 Minipräparation von Plasmiden

Von den ampicillinhaltigen LB-Agar-Platten werden mit einer sterilen Pipette Kolonien gepickt und in ampicillinhaltigem LB-Medium über Nacht bei 37°C inkubiert. Von dieser Übernachtskultur wird ein Glycerolstock angelegt. Vom Rest der Bakteriensuspension werden 1,5 ml in 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und bei 4°C und 13000 U/min 30 sec abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet in 100 µl Lösung 1 resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 werden die 1,5 ml Reaktionsgefäße sofort für 5 min auf Eis gestellt. Anschließend werden 150 µl vorgekühlter Lösung 3 zugegeben und erneut für 5 min auf Eis gestellt. Der entstandene Niederschlag wird bei 13000 U/min 10 min zentrifugiert. Der plasmidhaltige Überstand wird in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäße gegeben und mit 800 µl absolutem Ethanol versetzt. Die Plasmid-DNA wird mindestens 1 h bei -20°C gefällt und anschließend bei 13000 U/min 10 min zentrifugiert. Das Pellet wird mit 100 µl 70%-igem gekühltem Ethanol gewaschen und bei 13000 U/min 5 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wird nun im Vakuum getrocknet und in 30 µl TE-Puffer gelöst. [Sambrook et al., 1989; Bertram & Gassen, 1991]

Lösungen und Materialien

Lösung 1	1,66 ml 0,3 M Glucose 0,25 ml 1 M Tris HCl pH 8,0 0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 mit sterilem bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und steril autoklaviert
Lösung 2	0,2 ml 10 M NaOH 1 ml 10% SDS mit sterilem bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und steril autoklaviert

Lösung 3	6 ml 5 M Kalium-Acetat 1,15 ml Eisessig mit sterilem bidest. Wasser auf 10 ml aufgefüllt und steril autoklaviert
TE-Puffer (steril)	10 mM Tris 1 mM EDTA pH 8,0 oder pH 8,6

6.6.4 Maxipräparation von Plasmiden

Als Starterkultur legt man vom bereits transformierten Glycerolstock eine Übernachtkultur in LB-Medium/Ampicillin an und inkubiert ca. 8 h bei 37°C im Schüttelinkubator. Anschließend wird die Starterkultur 1/500 bzw. 1/1000 in ca. 250 ml LB-Medium/Ampicillin verdünnt und 12-16 h bei 37°C im Schüttelinkubator inkubiert. Die Kultur wird dann bei 6000 U/min, Raumtemperatur 15 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wird in 10 ml Puffer E1 vollständig resuspendiert. Nach Zugabe von 10 ml Puffer E2 inkubiert man 5 min bei Raumtemperatur. Anschließend werden 10 ml Puffer E3 zugegeben und sofort bei Raumtemperatur für 10 min zentrifugiert (15000 U/min). Der plasmidhaltige Überstand wird in ein 50 ml Röhrchen überführt, bei Bedarf nochmals zentrifugiert und auf die bereits mit 30 ml Puffer E4 äquilibrierte Säule gegeben. Die Säule wird zweimal mit je 30 ml Puffer E5 gewaschen und das Plasmid durch Zugabe von 15 ml Puffer E6 eluiert. Zur Plasmidfällung werden 10,5 ml Isopropanol zum Eluat gegeben und bei 4°C, 30 min (15000 U/min) zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, das Pellet nach Zugabe von 5 ml 70%igem Ethanol gewaschen und im Vakuum getrocknet. Das Plasmid wird in 100-150 µl sterilem TE-Puffer aufgenommen. [Life Technologies, 1998]

Lösungen und Materialien

Concert™ High Purity Plasmid Purification Systems (Life Technologies)

Puffer E1 (Zellsuspensionspuffer)	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA
RNaseA	20 mg/ml in Puffer E1
Puffer E2 (Zelllyselösung)	200 mM NaOH 1% SDS
Puffer E3 (Neutralisationspuffer)	3,1 M Kaliumacetat, pH 5,5
Puffer E4 (Äquilibrierungspuffer)	600 mM NaCl 100 mM Natrium-Acetat (pH 5,0) 0,15% Triton X-100 (v/v)
Puffer E5 (Waschpuffer)	800 mM NaCl 100 mM Natrium-Acetat (pH 5,0)
Puffer E6 (Elutionspuffer)	1,25 M NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8,5)
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1 mM EDTA

Isopropanol p.A.

Zentrifugenröhrchen 250ml, 50ml (Nalgene)

Zentrifuge J2-21 (Beckman)

6.6.5 Restriktionsverdau

Zum Restriktionsverdau werden Restriktionsenzym(e), zu schneidende DNA und Restriktionspuffer in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß pipettiert und bei 37°C 2-4 h inkubiert. Falls nötig können die Enzyme durch Erhitzen auf 65°C 10 min inaktiviert und die Ansätze bei -20°C gelagert werden.

Lösungen und Materialien

Restriktionsenzyme:

Bgl II (Pharmacia Biotech)	8 000 units/ml
EcoR I (Pharmacia Biotech)	20 000 units/ml
Hind III (Pharmacia Biotech)	10 000 units/ml
Kpn I (Pharmacia Biotech)	8 000 units/ml
Xba I (Pharmacia Biotech)	12 000 units/ml

10 x Assay Buffer (Pharmacia Biotech)	100 mM Tris-Acetat pH 7,5
	100 mM Magnesiumacetat
	500 mM Kaliumacetat

6.6.6 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung, ob es sich bei den geschnittenen Plasmiden um die gewünschten handelt, werden die Proben im Agarosegel aufgetrennt, mit Ethidiumbromid gefärbt und im UV-Licht detektiert.

Herstellung des Agarosegels

Zur Herstellung des Agarosegels wird eine entsprechende Menge Agarose mit 1×TAE-Puffer versetzt, unter Rühren aufgekocht und anschließend in die Gelkammer gegossen. Die Polymerisation erfolgt durch Abkühlen innerhalb von 45 min.

Proben und Marker werden vor dem Gellauf mit Ladepuffer versetzt und in die Taschen des Gels pipettiert. Das Gel wird mit 1×TAE-Puffer überschichtet und die Pro-

ben bei konstanter Spannung aufgetrennt. Anschließend wird das Gel im Ethidiumbromidbad gefärbt, mit Wasser gespült und die Banden im UV-Licht mit Hilfe des Lumi-Imagers detektiert.

Lösungen und Materialien

50×TAE-Puffer	242 g Tris 57,1 ml Essigsäure 100 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 auf 1 L mit bidest. Wasser aufgefüllt
Ladepuffer	0,2% Bromphenolblau 60% Glycerin 60 mM EDTA
Größenmarker	λ -DNA/Hind III geschnitten (MBI-Fermentas) Gene Ruler 100 bp ladder plus (MBI Fermentas)
Ethidiumbromidbad	2,5 μ g Ethidiumbromid/ml
Agarosegelkammern	SubCell BioRad
Power Station	Power Pac 300 BioRad, Electrophoresis Power Supply EPS 3500 Pharmacia
Lumi-Imager	Böhringer Mannheim

6.6.7 Photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von Nukleinsäuren kann durch die Bestimmung der UV-Extinktion bei 260 nm bestimmt werden. Dabei entspricht

$$1A_{260} = 50 \mu\text{g/ml doppelsträngiger DNA}$$

$$40 \mu\text{g/ml einzelsträngiger RNA}$$

Der gemessene Extinktionsunterschied gegen Wasser muss mindestens 0,15 betragen. [Gassen et al., 1994]

Lösungen und Materialien

Quarz Halbmikro-Küvetten (Merck)

UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)

6.7 Lebermikrosomen

6.7.1 Herstellung von Schweine- und Rinderlebermikrosomen

Alle Arbeitsschritte erfolgen unter Eiskühlung!

Schweine- bzw. Rinderleber wird direkt nach der Schlachtung mit eisgekühltem MIC-I-Puffer überschichtet und gekühlt weiterverarbeitet.

Ca. 150 g Leber werden mit der 1,5-fachen Gewichtsmenge an gekühltem MIC-I-Puffer eingewogen und mit einer Schere möglichst fein zerkleinert. Jeweils 20 ml dieser Suspension werden im Zellhomogenisator drei bis viermal gepottert und in einem Becherglas gesammelt und anschließend fraktioniert zentrifugiert. Die erste Zentrifugation dient zur Gewinnung der S9-Fraktion durch Abtrennung von Geweberesten, Zellkernen und Mitochondrien. Hierzu wird jeweils 10 min bei $100 \times g$, $300 \times g$ und schließlich bei $9000 \times g$ und einer Temperatur von 4°C zentrifugiert. Die als Überstand erhaltene S9-Fraktion wird abdekantiert und getrennt gesammelt. Anschließend wird die S9-Fraktion bei $100000 \times g$ 1 h zur Gewinnung der Mikrosomen zentri-

fugiert. Vom Überstand wird im Wasserstrahlvakuum mit einer Pasteurpipette vorsichtig das Fett abgesaugt und das Cytosol abdekantiert. Die Mikrosomen werden mit eisgekühltem MIC-II-Puffer überschichtet und durch vorsichtiges Schütteln resuspendiert und so vom Glykogen abgetrennt. Die Mikrosomenfraktion wird im Handpotter homogenisiert und zur Reinigung erneut 1 h bei $100000 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Mikrosomen mit MIC-II-Puffer vorsichtig resuspendiert (0,5 ml MIC-II-Puffer pro g eingesetzte Leber). Die Mikrosomen werden zu 0,5 ml Aliquoten bei -80°C im Biofreezer eingefroren. [Baum, 1999]

Lösungen und Materialien

MIC-I-Puffer 85,58 g/l Saccharose (0,25 M)
 2,05 g/l EDTA-Dinatriumsalz (5,5M)
 2,42 g/l Tris (0,02 M)
 mit HCl auf pH 7,5 einstellen und kühl lagern

MIC-II-Puffer 893 mg/100ml KCl (0,15 M)
 605 mg/100 ml Tris (0,05 M)
 mit HCl auf pH 7,4 einstellen und kühl lagern

Ultrazentrifuge Centrikon O-2055 Kontron

6.7.2 Herstellung von Rattenlebermikrosomen (induziert)

Die Induktion zur Erhöhung des CYP-Gehalts in der Mikrosomenfraktion erfolgte 1996. Es wurde eine eingefrorene S9-Fraktion wie oben beschrieben weiter aufgearbeitet.

6.7.3 Bestimmung des Proteingehalts von Lebermikrosomen

Der Proteingehalt der Lebermikrosomen wird nach der Methode von Pierce bestimmt [Baum, 1999]. Hierzu werden jeweils 50 μl BSA-Standards (0,05 bis 2 mg/ml Protein) und Lebermikrosomen mit 1 ml BCA-Reagenz besetzt, gut durchmischt und 30 min bei 37°C inkubiert. Nach Abkühlen auf Raumtemperatur werden alle Lösungen spekt-

ralphotometrisch bei 562 nm vermessen. Anhand der Extinktionen der Standards wird durch lineare Regression eine Eichreihe erstellt, die die Ermittlung des Proteingehalts der Lebermikrosomen ermöglicht. [Uptima, 2000]

Lösungen und Materialien

Proteinstandard BSA (Sigma)

BCA-Reagenz A Natriumcarbonat
 Natriumbikarbonat
 Natriumtartrat 0,2 N NaOH

BCA-Reagenz B 4%-ige Kupfersulfatlösung

BCA-Reagenz Reagenz A/Reagenz B (50/1)

Keine weiteren Angaben seitens des Herstellers.

Halbmikro-Küvetten (Fischer)

UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)

6.7.4 Bestimmung des Cytochrom P450- und Cytochrom b₅-Gehalts in Lebermikrosomen

Cytochrom b₅-Bestimmung

Die mikrosomalen Cytochromgehalte werden differenzphotometrisch ermittelt. Hierzu werden in Proben- und Vergleichsküvette je 2,5 ml einer Lebermikrosomensuspension mit einem Proteingehalt von 1 mg/ml Protein gegeben und die Grundlinie zwischen 390 nm und 500 nm bestimmt. Nach Zugabe einiger Körnchen NADH in die Probenküvette zur Reduktion des vorhandenen Cytochrom b₅, weist das resultierende Spektrum ein scharfes Signal bei 424 nm auf. Die Berechnung des Cytochrom b₅-Gehalts erfolgt nach Gleichung 6.1 [Baum, 1999].

$$c(\text{Cytochrom } b_s) = \frac{E_{424 \text{ nm}} - E_{450 \text{ nm}} \times 9,53}{\text{Proteinkonzentration}} \quad [\text{nmol/mg Protein}] \quad \text{Gleichung 6.1}$$

Cytochrom P450-Bestimmung

Da NADH Cytochrom P450 im Gegensatz zu Cytochrom b_5 sehr langsam reduziert und Cytochrom b_5 kein Kohlenmonoxid bindet, kann noch in derselben Probenküvette der Cytochrom P450-Gehalt bestimmt werden. Hierzu werden in beide Küvetten einige Körnchen Natriumdithionit gegeben und in die Probenküvette 1 min Kohlenstoffmonoxid eingeleitet. Das resultierende Spektrum zeigt ein starkes Signal bei 450 nm, eine Schulter bei 424 nm und einen starken Abfall bei 410 nm auf. Der Cytochrom P 450 –Gehalt wird nach Gleichung 6.2 berechnet. [Baum, 1999]

$$c(\text{Cytochrom P 450}) = \frac{E_{424 \text{ nm}} - E_{450 \text{ nm}} \times 10,989}{\text{Proteinkonzentration}} \quad [\text{nmol/mg Protein}] \quad \text{Gleichung 6.2}$$

Lösungen und Materialien

MIC-II-Puffer 893 mg/100ml KCl (0,15 M)
 605 mg/100 ml Tris (0,05 M)
 mit HCl auf pH 7,4 einstellen und kühl lagern

NADH Sigma
 Na₂S₂O₄ Fluka

Quarzküvetten (Merck)

UV-Spectrophotometer Carry 1 Bio UV-visible spectrophotometer (Varian)

6.7.5 Inkubation der Mikrosomen mit Dicofol bzw. DCBP

Die Inkubation der Mikrosomen mit den Testsubstanzen Dicofol bzw. DCBP wird mit einem Gesamtvolumen von 500 µl bei 37°C, 50°C oder 60°C, in Dunkelheit und maximaler Schüttelgeschwindigkeit im Thermomixer durchgeführt.

Die Blindprobe enthält durch 5 minütiges Kochen in Phosphatpuffer inaktivierte Mikrosomen. Bei der Aufarbeitungskontrolle wird erst nach Abstoppen der Reaktion Dicofol bzw. DCBP zugegeben.

In jedem Ansatz sind Mikrosomensuspension, MgCl₂, NADPH- generierendes System, H₂O bidest., Phosphatpuffer (pH 7,4), 400 µg Dicofol bzw. 10 µg DCBP enthalten. In Tabelle 6.1 ist das Pipettierschema wiedergegeben.

Tabelle 6.1 Pipettierschema

	Endkonzentration	Blindprobe [µl]	Aufarbeitungskontrolle [µl]	Positivprobe [µl]
Phosphatpuffer pH 7,4		50	50	50
H ₂ O bidest		Ergänzen bis 500 µl Gesamtvolumen		
Mikrosomensuspension	1 mg Protein	20 – 40 abhängig von Proteingehalt der Mikrosomensuspension		
MgCl ₂ (0,3 M)	3 mM	5	5	5
NADP ⁺ (0,05 M)	1 mM	10	10	10
Glucose-6-Phosphat (0,05 M)	5 mM	5	5	5
Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (50 units/ml)	0,5 units	10	10	10
Dicofol (40 mg/ml)	400 µg	10	10	10
DCBP (1 mg/ml)	10 µg	10	10	10

Nach 2 h Inkubation wird der Reaktionsansatz mit 1 ml eisgekühltem Aceton, das 10% Essigsäure enthält, abgestoppt und der interne Standard (20 µg Oxybenzon im Fall des Dicofolmetabolismus bzw. 10 µg Dimethoxybenzophenon im Fall von DCBP-

Studien) zugegeben. Das denaturierte Protein wird durch Zentrifugation (1 min, 13000 U/min, 4°C) abgetrennt. Die Ausgangssubstanz und die Reaktionsprodukte im Überstand werden 3 Mal mit 1 ml Essigester extrahiert, die organischen Phasen vereinigt und das Lösemittel im Stickstoffstrom entfernt. Anschließend werden die Ansätze in 1ml Methanol, das 10% Essigsäure enthält, aufgenommen und der HPLC-Analyse zugeführt.

Lösungen und Materialien

NADPH-generierendes System

NADP⁺ (Sigma) 1 mM

Glucose-6-Phosphat (Fluka) 5 mM

Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (Sigma) 0,5 units

Phosphatpuffer pH 7,4 0,5 M K₂HPO₄-Trihydrat
mit 0,5 M KH₂PO₄ auf pH 7,4 titriert

MgCl₂-Lösung 0,3 M

Dicofol (Riedel-de-Haen)

DCBP (Fluka)

Oxybenzon (Sigma)

Dimethoxybenzophenon (Fluka)

Methanol p.a. (Merck)

Essigester p.a. (Baker)

Essigsäure p.a. (Roth)

Zentrifugen (Megafuge und Biofuge fresco, Heraeus)

6.8 UV-Bestrahlung von Dicofol

Dicofol (400 µg/ml), gelöst in dem Lösemittel n-Hexan, Methanol oder Methanol/Wasser 3/1, wird in Petrischalen ohne Deckel mit UV-Licht (254 nm) verschiedener Intensitäten bestrahlt (0,25; 0,5 und 0,75J/cm²). Nach Zugabe von 20 µg Oxybenzon als internem Standard wird die Lösung in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und das Lösemittel in einer Vakuumzentrifuge entfernt. Die Analyten werden in 1 ml Methanol (pH5) aufgenommen und der HPLC-Analyse zugeführt. Es wird eine Aufarbeitungskontrolle mitgeführt, bei der erst nach erfolgter Bestrahlung Dicofol zugesetzt wird.

Lösungen und Materialien

n-Hexan uvasol (Merck)

MeOH p.a (Merck)

Essigsäure p.a (Roth)

Petrischalen Ø 3,5 cm (costar)

UV-Bestrahlungslampe (Fluo-Link FLX 2011, Seriennummer 961191, Biometra)

Vakuum-Zentrifuge (Kontron)

6.9 Umwandlung von Dicofol in Gegenwart unterschiedlicher Hydroxidionenkonzentration

200 µg Dicofol/ml Lösemittel (methanolische Lösungen von NaOH unterschiedlicher Konzentration) werden bei 25°C, im Dunkeln zwischen 1 min und 3 h inkubiert, die Reaktion durch Zugabe von 500 µl eisgekühltem Aceton (pH 5) abgestoppt und 20 µg Oxybenzon als interner Standard zugegeben. Das Lösemittel wird in der Vakuumzentrifuge entfernt, die Reaktionsprodukte in MeOH (pH 5) aufgenommen und der

HPLC-Analyse zugeführt. Es wird eine Aufarbeitungskontrolle, bei der Dicofol erst nach Abstoppen der Reaktion zugesetzt wird, mitgeführt.

Lösungen und Materialien

Natriumhydroxid p.a (Roth)

Methanol p.a. (Merck)

Vakuum-Zentrifuge (Kontron)

Thermomixer 5436 (Eppendorf)

6.10 Untersuchung der Umwandlung von Dicofol in CDFKS- und Hefemedium

400 µg Dicofol wurden in 10 ml CDFKS- bzw. Hefetestmedium bei 37°C 2 h, 24h bzw. 48 h im Dunkeln bei 37°C bzw. 30°C inkubiert. Die Inkubation wird durch Zugabe von 1 ml essigsauerm Aceton gestoppt. Nach Zugabe des internen Standards Oxybenzon (20 µg) erfolgte die Aufarbeitung analog zur Aufarbeitung der Lebermikrosomeninkubationen. Die Analyten werden der HPLC-Analyse zugeführt.

6.11 HPLC-Analyse

Über eine 20 µl-Injektionsschleife werden die zu analysierenden methanolischen Lösungen auf die HPLC gegeben. Die Trennung erfolgt mittels Reversed-Phase-HPLC auf einer RP-18e-Säule. Als Fließmittel dient ein Acetonitril-Wasser-Gemisch. Die Detektion erfolgt durch einen programmierbaren UV-Detektor. Zur Identifikation dient der Vergleich mit der Retentionszeiten der Probe mit denen des Standards.

Tabelle 6.2 UV-Detektor-Programm bei Dicofol- Inkubationen

Zeit [min]	Wellenlänge λ [nm]	Range
0 – 3,5 min	285 nm	1
3,5 – 9,5 min	255 nm	0,01 – 2
9,5 – 20 min	229 nm	1 – 4

Fließgeschwindigkeit: 1,7 ml/min

Tabelle 6.3 UV-Detektor-Programm bei DCBP- Inkubation

Zeit [min]	Wellenlänge λ [nm]	Range
0 – 5,5 min	293 nm	1
5,5 - 12 min	229 nm	0,01 – 0,5
12 – 20 min	229 nm	0,01 – 0,05

Fließgeschwindigkeit: 1,0 ml/min

Berechnung über den internen Standard

$$c[\text{Substanz}] = \frac{c[\text{interner Standard}] \times \text{Fläche} [\text{Substanz}]}{\text{Fläche} [\text{interner Standard}]} \times k \quad \text{Gleichung 6.3}$$

$$k = \frac{c[\text{Teststandard}] \times \text{Fläche} [\text{interner Standard}]}{c[\text{interner standard}] \times \text{Fläche} [\text{Teststandard}]} \quad \text{Gleichung 6.4}$$

Lösungen und Materialien

HPLC-Säule	RP-18e-Säule 4 μ , 15 cm (Merck) mit RP-18e-Vorsäule
HPLC-Pumpe	L 6200 Intelligent Pump (Merck)
UV-Detektor	LCD 501 (Gamma Analysen Technik GmbH)
Integrator	C – R3A (Shimadzu)
Acetonitril p.a.	(Merck)
Fließmittel	Acetonitril/Wasser (10% Essigsäure) = 60/40

6.12 Headspace-GC zur Chloroformbestimmung

Zur Bestimmung der Stabilität von Chloroform in alkalischer Methanollösung werden zu 2 ml Methanol bzw. 1 mM methanolischer NaOH in 22 ml „Headspace-vials“ unterschiedliche Mengen an Chloroform gegeben. Die „Headspace-vials“ werden sofort verschlossen. Nach 20 minütiger Inkubation im Probengeberofen bei 85°C erfolgt die Injektion automatisch durch den Probengeber. Chloroform wurde über die Retentionszeit (10.5 min) bestimmt. Die Bestimmung der Stabilität erfolgte über Vergleich der Flächen der Chloroformpeaks und über lineare Regression.

Zur Quantifizierung der Chloroformmenge, die bei der Umwandlung von Dicofol in alkalischer Lösung entsteht, wurde mit Hilfe des Standardadditionsverfahren [Matissek et al., 1992] bestimmt. Der Schnittpunkt der errechneten Geraden nach linearer Regression mit der Abszisse entspricht der Analytenkonzentration der Probe.

Zu 2 ml 1 mM methanolischer NaOH werden 400 μ g (1,1 μ mol) Dicofol gegeben. Zwei Flaschen werden sofort verschlossen. Bei den anderen Flaschen werden zuvor unterschiedliche Mengen an Chloroform zugegeben und die Flaschen anschließend der Headspace-GC zugeführt.

Geräte

Gas Chromatograph Varian Gaschromatograph 3700 mit FID Detektor

Temperaturprogramm

Starttemperatur	55°C (1 min)
Temperatursteigerung	12°C/min
Endtemperatur	190°C (0 min)

Attenuation 4

Säule Duroplast 5 (Chrompad)

Trägergas N₂

Autosampler Perkin Elmer Headspace Sampler HS 40

Ofentemperatur	85°C
Druckaufbauzeit	3 min
Injektionszeit	1 min
Nadeltemperatur	100 °C
Überführungstemperatur	120 °C

Interface Perkin Elmer

Auswertesoftware Turbochrom 4 Navigator

Headspace vials Perkin Elmer (22 ml)

Verschlüsse Perkin Elmer PTFE Silicon white B 400 0022

6.12.1 Fehlerfortpflanzung

Nach linearer Regression der Flächen erhält man eine Gerade, die der Gleichung 6.5 entspricht. Zur Berechnung des Schnittpunkts der Abszisse erhält man nach Umformen von Gleichung 6.5 eine von der Steigung B und dem Ordinatenabschnitt A ab-

hängige Funktion $F(A,B)$ (Gleichung 6.6). Zur Berechnung des Fehlers des Abszissenabschnitts wird diese Funktion nach beiden Variablen differenziert (Gleichung 6.7), wobei sd_A bzw. sd_B die Standardabweichungen von A und B sind. Nach Einsetzen der Variablen kann der Fehler des Abszissenabschnitts berechnet werden.

$$y = Bx + A \quad \text{Gleichung 6.5}$$

$$x = \frac{-A}{B} = F(A,B) \quad \text{Gleichung 6.6}$$

$$\Delta_x = \left[\left(\frac{\partial F}{\partial A} \right)^2 sd_A^2 + \left(\frac{\partial F}{\partial B} \right)^2 sd_B^2 \right]^{1/2} = \left[\left(\frac{sd_A}{B} \right)^2 + \left(\frac{A sd_B}{B^2} \right)^2 \right]^{1/2} \quad \text{Gleichung 6.7}$$

Allgemein verwendete Geräte

Analysewaage (AE Mettler)

Biofreezer (Heraeus)

Biofuge fresco (Heraeus)

Brutschrank Cytoperm 8088 (Heraeus)

Brutschrank Köttermann 2737

Elektrophorese (Mini Protean II und CubCell Biorad)

Grobwaage (Sartorius)

Minifuge T (Heraeus)

pH Meter (pH 521 WTW)

Pipettierhilfe (Roth)

Powersupply (Power Pac 300 Biorad, Electrophoresis Power Supply EPS 3500

Pharmacia)

Rotationsverdampfer Rotavapor R 110 (Bühl)

Schüttelinkubator

Sterile Werkbank (Lamin-Air HLB 2472 BS und HBB 2448 Heraeus)
Thermomixer 5436 (Eppendorf)
Trockenschrank (Mettler)
Umkehrmikroskop (Zeiss)
UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)
Vakuumsaugpumpe
Varioklav Dampfsterilisator (H+P Labortechnik)
Vortex (Genie Bender, Hobein)
Zentrifugen (Beckman Mode J2-21, Heraeus Megafuge, Heraeus Minifuge fresco)

Allgemein verwendete Materialien

1,5ml Reaktionsgefäße (Greiner)
15ml und 50ml Röhrchen (Greiner)
96-Lochplatten weiß (Nunc), transparent (Nunc, Greiner)
Cryotubes (Greiner)
Kulturflaschen (Greiner)
Neubauerzählkammer (Roth)
Petrischalen 6cm (Nunc, Greiner)
Pipettenspitzen (Greiner, Sarstedt)
Sterile Einwegspritzen und Kanülen (Braun)
Zellschaber steril (Greiner)

Verwendete Chemikalien

Acetonitril p.a. (Merck)
Agarose (Serva, Gibco, Biozym)
Chlorphenolrot- β -D-galactopyranosid (Roche Mannheim)
DCA (Riedel-de-Haen)
DCBH (Sigma)
DCBP (Fluka)
Dextran (Sigma)
4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI) (Roche Mannheim)
Dicofol (Riedel-de-Haen)

Dimethoxybenzophenon (Fluka)
DMSO für die Spektroskopie (Fluka)
Ethylen-diamin-tetraessigsäure (Roth)
Ethanol p.A. (Roth)
Ethidiumbromid (Sigma)
Glycerin (Riedel-de-Haen)
Linuron (Riedel-de-Haen)
Linuron M2 (Dr. Ehrenstorf GmbH, Augsburg)
Linuron M1 (Dr. Ehrenstorf GmbH, Augsburg)
Magnesiumchlorid-hexahydrat (Riedel-de-Haen)
Methanol p.a. (Merck)
Natriumhydrogencarbonat (Gibco)
Norrit A (Serva)
Sulforhodamin B (Sigma)
Trishydroxymethylaminomethan, Tris (Roche Mannheim)
Xanthohumol (Prof. Dr. Becker Saarbrücken)

7 Literatur

Akman SA, Forrest G, Chu FF, Esworthy RS, Doroshow JH (1990): Antioxidant and xenobiotic-metabolizing enzyme gene expression in doxorubicin-resistant MCF-7 breast cancer cells, *Cancer Research* **50**: 1397-1402.

Alam J, Cook J (1990): Reporter Genes: Application to the study of mammalian gene transcription, *Analytical Biochemistry* **188**: 245-254.

Andersen H, Andersson A, Arnold S, Autrup H, Barfoed M, Beresford N, Bjerregaard P, Christiansen L, Gissel B, Hummel R, Jorgensen E, Korsgaard B, Le Guevel R, Leffers H, McLachlan J, Moller A, Nielsen J, Sonnenschein N, Soto A, Sumpter J, Thorpe S, Grandjean P (1999): Comparison of Short-Term Estrogenicity Tests for Identification of Hormone Disrupting Chemicals, *Environmental Health Perspectives* **107** (Suppl 1): 89-108.

Andersson PL, Blom A, Johannisson A, Pesonen M, Tysklind M, Berg AH, Olsson PE, Norrgren L (1999): Assessment of PCBs and Hydroxylated PCBs as Potential Xenoestrogens: *In Vitro* Studies Based on MCF-7 Cell Proliferation and Induction of Vitellogenin in Primary Culture of Rainbow Trout Hepatocytes, *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **37**: 145-150.

Arcaro KF, Yi L, Seegal RF, Vakharia DD, Yang Y, Spink DC, Brosch K, Gierthy JF (1999): 2,2',6,6'-Tetrachlorobiphenyl Is Estrogenic *In Vitro* and *In Vivo*, *Journal of Cellular Biochemistry* **72**: 94-102.

Ashby J, Lefevre PA (2000): The Peripubertal Male Rat Assay as an Alternative to the Hershberger Castrated Male Rat Assay for the Detection of Antiandrogens, Oestrogens and Metabolic Modulators, *Journal of Applied Toxicology* **20**: 35-47.

Barbera JC, Lopez FJ, Hernandez F, Medina J, Pastor A (1986): Gas Chromatographic Determination of Organochlorine Pesticides; Contamination of Dicofol, Fenson, and Tetradifon in Fish and Natural Waters of a Wet Area Beside the Mediterranean Sea, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **36**: 211-218.

Bauer ERS, Meyer HHD, Stahlschmidt-Allner P, Sauerwein H (1998): Application of an androgen receptor assay for the characterization of the androgenic or antiandrogenic activity of various phenyl urea herbicides and their derivatives, *The Analyst* **123**: 2485-2487.

Baum M (1999): Unterschiedliche Biotransformation von polycyclischen aromatischen Kohlenwasserstoffen bei Tier und Mensch als Basis für verschiedene biologische Wirksamkeit, Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Beato M, Chavez S, Truss M (1996): Transcriptional regulation by steroid hormones, *Steroids* **61**: 240-251.

- Becker H, Domschke G, Fanghänel E, Fischer M, Gewalt K, Mayer R, Pavel D, Schmidt H, Schwetlick K (1990): Organikum, 18., berichtigte Auflage, Deutscher Verlag der Wissenschaften.
- Bertram S, Gassen HG (Hrsg.) (1991): Gentechnische Methoden, Gustav Fischer Verlag
- Biendl M, Eggers R, Czerwonatis N, Mitter W (2001): Studies on the production of a Xanthohumol-enriched hops product, *Cerveza y Malta* **38** (150): 25-29.
- Böhm S (2002): Etablierung von *In-vitro* Methoden zur Bestimmung des endokrinen Potentials von Fremdstoffen; Dissertation, Universität Kaiserslautern.
- Bolt HM, Laib RJ, Filser JG (1982): Reactive Metabolites and Carcinogenicity of Halogenated Ethylene's, *Biochemical Pharmacology* **31** (1): 1-4.
- Boyiri T, Leszczynska J, Desai D, Amin S, Nixon DW, El-Bayoumy K (2002): Metabolism and DNA binding of the environmental pollutant 6-nitrochrysene in primary culture of human breast cells and in cultured MCF-10A, MCF-7 and MDA-MB-435s cell lines, *International Journal of Cancer* **100** (4): 395-400.
- Bronstein I, Fortin J, Stanley P, Stewart G, Lricka L (1994): Chemoluminescent and Bioluminescent Reporter Gene Assay, *Analytical Biochemistry* **219**: 169-181.
- Brown MA, Ruzo LO, Casida JE (1986): Photochemical Conversion of a Dicofol Impurity, α -Chloro-DDT, to DDE, *Bull Environ Contam Toxicol* **37**: 791-796.
- Brown MA, Casida JE (1987): Metabolism of a Dicofol impurity α -chloro-DDT, but not Dicofol or Dechlorodicofol, to DDE in mice and a liver microsomal system, *Xenobiotica* **17** (10): 1169-1174.
- Brozowski AM, Pike ACW, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engström O, Öhman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997): Molecular basis of agonism and antagonism of the oestrogen receptor, *Nature* **389**: 753-758.
- Bryan GW, Gibbs PE, Hummerstone LG, Burt GR (1986): The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south - west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints, *J Mar Biol Ass UK* **66**: 611 – 640.
- Bulger WH, Mucitelli R, Kupfer D (1978): Studies of the *in vivo* and *in vitro* estrogenic activities of methoxychlor and its metabolites. Role of hepatic monooxygenase in methoxychlor activation, *Biochem Pharmacol* **27**: 2417-2423.
- Chaloupka K, Krisham V, Safe S (1992): Polynuclear aromatic hydrocarbon carcinogens as antiestrogens in human breast cancer cells: role of the Ah Receptor, *Carcinogenesis* **13**: 2233-2239.
- Chen ZM, Zabik MJ, Leavitt RA (1984): Comparative Study of Thin Film Photodegradative Rates for 36 Pesticides, *Ind Eng Chem Prod Res Dev* **23**: 5-11.

Christou M, Savas Ü, Spink DC, Gierthy JF, Jefcoate CR (1994): Co-expression of human CYP 1A1 and a homologue of Cytochrom P450-EF in response to 2,3,7,8-tetrachloro-dibenzo-p-dioxin in the human mammary carcinoma-derived MCF-7 cells, *Carcinogenesis* **15**: 725-732.

Clemons JH, Allan LM, Marvin CH, Wu Z, Mccarry BE, Bryan DW, Zacharewski TR (1998): Evidence of Estrogen- and TCDD-Like Activities in Crude and Fractionated Extracts of PM₁₀ Air Particulate Material Using *in Vitro* Gene Expression Assays, *Environ Sci Technol* **32**: 1853-1860.

Clontech (1999): Luminescent β -Gal User Manual, Clontech.

Coldham NG, Sauer MJ (2001): Identification, quantification and biological activity of phytoestrogens in a dietary supplement for breast enhancement, *Food Chem Tox* **39**: 1211-1224.

Conseil G, Decottignies A, Jault JM, Comte G, Barron D, Goffeau A, Di Pietro A (2000): Prenyl-flavonoids as potent inhibitors of the Pdr5p multidrug ABC transporter from *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochemistry* **39** (23): 6910-6917.

Cook JC, Mullin LS, Frame SR, Biegel LB (1993): Investigation of a Mechanism for Leydig Cell Tumorigenesis by Linuron in Rats, *Toxicology and Applied Pharmacology* **119**: 195-204.

Couette B, Le Ricousse S, Fortin D, Rafestin-Obelin ME, Richard-Foy H (1994): The establishment of the long terminal repeat of the mouse mammary tumor virus into CV-1 cells allows a functional analysis of steroid receptors, *Biochem Biophys Acta* **1219** (3): 607-612.

Cowan KH, Batist G, Tupule A, Sinha BK, Myers CE (1986): Similar biochemical changes associated with multidrug resistance in human breast cancer cells and carcinogen-induced resistance to xenobiotics in rats, *Proc Natl Acad Sci* **83**: 9328-9332.

Davies JH, Shearer RJ, Rowlands MG, Poon GK, Houghton J, Jarman M, Dowsell M (1992): Effects of 4-Hydroxyandrost-4-ene-3,17-dione and its metabolites on 5-alpha-reductase activity and the androgen receptor, *Journal of enzyme inhibition* **6** (2): 141-147.

De Boever P, Demare W, Vanderperren E, Cooreman K, Bossier P, Verstraete W (2001): Optimization of a Yeast Estrogen Screen and its Applicability to Study the Release of Estrogenic Isoflavones from a Soy germ Powder, *Environ Health Perspect* **109**: 691-697.

DFG (1991): Rückstandsanalytik von Pflanzenschutzmitteln, Mitteilung VI der Senatskommission für Pflanzenschutz-, Pflanzenbehandlungs- und Vorratsschutzmittel, Methodensammlung der Arbeitsgruppe "Analytik", 11. Lieferung, Verlag VCH.

Diel P, Michna H (1996): Biochemistry and Physiology of Steroid Hormonal Action, In: Deutsche Forschungsgemeinschaft, Hormonally Active Agents in Food, Symposium, Wiley-VCH, 21-37.

Diel P, Hegele-Hartung C, Burton G, Kauser K, Fritzemeier KH (1996): Tissue specific effects of estrogens on expression of Cox II, iNOS and Il-6 mRNA in V. cava and uterus of ovex rats, *Endocrinol Diabetes* **104**: 171.

Döbbeling U, Roß K, Klein-Hitpass L, Morley C, Wagner U, Ryffel G (1988): A cell-specific activator in the *Xenopus* A2 vitellogenin gene: promotor elements functioning with rat liver nuclear extracts, *The EMBO Journal* **7** (8): 2495-2501.

Domagalski J (1996): Occurrence of Dicofol in the San Joaquin River, California, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **57**: 284-291.

Du K, Xu X (2001): Dicofol Stimulation of Cell Proliferation, *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **67**: 795-799.

EDSTAC Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee Final Report (1998); <http://www.epa.gov/scipoly/oscpendo/history/finalrpt.htm> (November 2002)

Eisenbrand G, Metzler M (2001): *Toxikologie für Naturwissenschaftler und Mediziner, Korrigierter Nachdruck*, Georg Thieme Verlag

Elsby R, Maggs JL, Ashby J, Paton D, Sumpter JP, Park BK (2000): Assessment of the Effects of Metabolism on the Estrogenic Activity of Xenoestrogens: A Two-Stage Approach Coupling Human Liver Microsomes and a Yeast Estrogenicity Assay, *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **296** (2): 329-337.

Enmark E, Markku PH, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997): Human estrogen receptor β -gene structure, chromosomal localization, and expression pattern, *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* **82**: 4258-4265.

EPA RED (1995): Linuron, Reregistration Eligibility Decision, United States Environmental Protection Agency, EPA 738-F95-003.

EPA RED (1998): Dicofol, Reregistration Eligibility Decision, United States Environmental Protection Agency, EPA 783-R-98-018.

EXTOXNET (1996): Extension Toxicology Network, Pesticide Information Profiles, Linuron, Stand Juni 1996, <http://ace.ace.orst.edu/info/extoxnet/pips/linuron.htm> (Stand August 2002)

Fang H, Tong W, Shi LM, Blair R, Perkins R, Branham W, Hass BS, Xie Q, Dial SL, Moland CL, Sheehan DM (2001): Structure-Activity Relationships for a Large Diverse Set of Natural, Synthetic, and Environmental Estrogens, *Chemical Research in Toxicology* **14**: 280-294.

Freeman BC, Yamamoto KR (2002): Disassembly of Transcriptional Regulatory Complexes by Molecular Chaperones, *Science* **296**: 2232-2235.

Fry DM, Toone CK, Speich SM, Peard RJ (1987): Sex ratio skew and breeding patterns of gulls: Demographic and toxicological considerations, *Stud Avian Biol* **10**: 26-43.

Forth W, Henschler D, Rummel W, Förstermann U, Starke K (Hrsg.) (2001): Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie, 8., völlig neu bearbeitete Auflage, Urban und Fischer Verlag

Gaido KW, Leonard LS, Maness SC, Hall JM, McDonnell DP, Saville B, Safe S (1999): Differential interaction of the methoxychlor metabolite 2,2-bis-(p-chlorophenyl)-1,1,1-trichlorethane with estrogen receptor alpha and beta, *Endocrinology* **140**: 5746-5753.

Garner MM, Revzin A (1986): The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid-protein interactions, *TIBS* **11**: 395-396.

Gassen HG, Sachse GE, Schulte A (Hrsg.) (1994): Grundlagen und Anwendungen der Polymerase-Kettenreaktion, Gustav Fischer Verlag

Gerber-Huber S, Nardelli D, Haeflinger J, Cooper D, Givel F, Germond J, Engerl J, Green N, Wahli W (1987): Precursor-product relationship between vitellogenin and yolk protein as derived from the complete sequence of a *Xenopus* vitellogenin gene, *Nucleic Acid Research* **15** (12): 4737-4760.

Gerhäuser C, Alt A, Heiss E, Gamal-Eldeen A, Klimo K, Knauff J, Neumann I, Scherf HR, Frank N, Bartsch H, Becker H (2002): Cancer Chemopreventive Activity of Xanthohumol, a Natural Product Derived from Hop, *Molecular Cancer Therapeutics* **1**: 959-969.

Giangrande P, Mc Donnell D (1999): A and B Isoforms of the Human Progesterone Receptor: Two Functionally Different Transcription Factors Encoded by a Single Gene, *Recent Progress in Hormone Research* **54**: 291-314.

Gibco (2001): Catalogue of Media for mammalian cell culture

Glaab V, Collins AR, Eisenbrand G, Janzowski C (2001): DNA damaging potential and glutathione depletion of 2-cyclohexen-1-one in mammalian cells, compared to food relevant 2-alkenals, *Mutation Research* **497**: 185-197.

Gluzman Y (1981): SV 40-transformed simian cells support the replication of early SV 40 mutants, *Cell* **23**: 175-182.

Gold B, Leuschen T, Brunk G, Gingell R (1981): Metabolism of a DDT Metabolite via a Chloroepoxide, *Chem Biol Interact* **35** (2): 159-176.

Gray L Jr., Ostby JS, Kelce WR (1994): Developmental Effects of an Environmental Antiandrogen: The Fungicide Vinclozolin Alters Sex Differentiation of the Male Rat, *Toxicology and Applied Pharmacology* **129**: 46-52.

Gray L Jr., Wolf C, Lambright C, Mann P, Price M, Cooper RL, Ostby J (1999): Administration of potentially antiandrogenic pesticides (procymidone, linuron, iprodione, chlozolinate, p,p'-DDE, and ketoconazole) and toxic substances (dibutyl- and diethylhexyl phthalate, PCB 169, and ethane dimethane sulphonate) during sexual differentiation produces diverse profiles of reproductive malformations in the male rat, *Toxicology and Industrial Health* **15**: 94-118.

Gray L Jr., Ostby J, Cooper RL, Kelce WR (1999a): The estrogenic and antiandrogenic pesticide methoxychlor alters the reproductive tract and behavior without affecting pituitary size or LH and prolactin secretion in male rats, *Toxicol Ind Health* **15**: 37-47.

Green S, Walter P, Kumar V, Krust A, Bornet JM, Agros P, Chambon P (1986): Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb A, *Nature* **320**: 134-139.

Gronemeyer H (1992): Control of transcription activation by steroid hormone receptors, *FASEB J* **6**: 2524-2529.

Guengerich FP (1995): Human cytochrome P450 enzymes, In: *Cytochrome P450 – Structure, Mechanism and Biochemistry*, Ortiz de Montellano (ed.): 2nd edition, Plenum Press, New York, 473-535.

Güntheroth H (2001): *Chemie-Beeren*, Stern Magazin **20**.

Günzburg W, Salomons B (1992): Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus, *Biochemical Journal* **283**: 625-632.

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

Guillette LJ (1996): Endocrine Disrupting Contaminants and Alligator Embryos: A Lesson from Wildlife? In: *Deutsche Forschungsgemeinschaft, Hormonally Active Agents in Food*, Symposium, Wiley-VCH, 72-88.

Guillen A, Ibanez C, Perez JL, Hernandez LM, Gonzalez MJ, Fernandez MA, Fernandez R (1994): Organochlorine Residues in Spanish Common Pipistrelle Bats (*Pipistrellus pipistrellus*), *Bull Environ Contam Toxicol* **52**: 231-237.

Gukasyan AO, Galstyan L, Gychov MG, Avetisyan AA (1989): Studies on trihalomethyl carbinols. V. Synthesis of functionally substituted 3- and 4-penten-4-ols, *Zh Org Khim* **25**: 1716-1722.

Gunderson EL (1995): FDA Total Diet Study, July 1986 – April 1991, Dietary Intakes of Pesticides, Selected Elements, and Other Chemicals, *JAOAC* **78** (6): 1353-1363.

Gupta M, McDougal A, Safe S (1998): Estrogenic and antiestrogenic activities of 16-alpha- and 2-hydroxy metabolites of 17-beta-estradiol in MCF-7 and T47D human breast cancer cells, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **67** (5-6): 413-419.

Gustafsson JA (1998): Therapeutical potential of selective estrogen receptor modulators, *Current Opinion in Chemical Biology* **2**: 508-511.

Guth S (2000): Etablierung von *in vitro* Testsystemen zur Erfassung androgener/antiandrogener Wirkungen und rechnergestützte Identifizierung hormonell relevanter Strukturelemente, Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Gutman M, Couillard S, Roy J, Labrie F, Candas B, Labrie C (2002): Comparison of the Effects of EM-652 (SCH57068), Tamoxifen, Toremifen, Droloxifene, Idoxifene, GW-5638 and Raloxifene on the Growth of Human ZR-75-1 Breast Tumors in Nude Mice, *Int J Cancer* **99**: 273-278.

Hanna SB, Sarac SA (1977): Metall-ion oxidative decarboxylations. 10. Substituent effects in the cerium(IV)-benzilic acids reactions, *J Org Chem* **42**: 2069-2073.

Harris CA, Henttu P, Parker MG, Sumpter JP (1997): The estrogenic activity of phthalate esters in vitro, *Environ Health Perspect* **105** (8): 802-811.

Hartmann A (1991): Luciferase als Reporter gen der genetischen Regulation, *BioTec Biotechnologie* **5**, Sonderdruck.

Helle E (1980): Lowered reproductive capacity in female ringed seals (*Phoca hispida*) in the Bothnian Bay, northern Baltic Sea, with special reference to uterine occlusions, *Ann Zool Fenn* **17**:147-158.

Henderson MC, Miranda CL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR (2000): *In vitro* inhibition of human P450 enzymes by prenylated flavonoids from hops, *Humulus lupulus*, *Xenobiotica* **30**: 235-251.

Höllt V, Kouba M, Dietel M, Vogt G (1992): Stereoisomers of calcium antagonists which differ markedly in their potencies as calcium blockers are equally effective in modulating drug transport by P-glycoprotein, *Biochemical pharmacology* **43** (12): 2601-2608.

Hodges YK, Richer JK, Horwitz KB, Horwitz LD (1999): Variant Estrogen and Progesterone Receptor Message in Human Vascular Smooth Muscle, *Circulation* **99**: 2688-2693.

Hosking LK, Whelan RDH, Shellard SA, Bedford P, Hill BT (1990): An evaluation of the role of glutathione and its associated enzymes in the expression of differential sensitivities to antitumour agents shown by a range of human tumour cell lines, *Biochem Pharmacol* **40**: 1833-1842.

IARC Monograph (1983): IARC Monograph on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to human **30**: 87-101.

Ikeda S, Oda T (1993): Nonisotopic Gel-Mobility Shift Assay Using Chemoluminescent Detection System, *Biotechniques* **14** (6): 878-880.

Ikeuchi T, Todo T, Kobayashi T, Nagahama Y (1999): cDNA Cloning of a Novel Androgen Receptor Subtype, *J Biol Chem* **274** (36): 25205-25209.

Invitrogen (1996): Electroporator II Manual, Version 3.1; Invitrogen.

Ivy SP, Tuluple A, Fairchild CR, Averbuch SD, Myers CD, Nebert DW, Baird WM, Cowan DH (1988): Altered regulation of P450 1A1 expression in a multidrug-resistant MCF-7 human breast cancer cell line, *J Biol Chem* **263**: 19119-19125.

Jadarmkunti UC, Kaliwal BB (1999): Effect of dicofol formulation on estrous cycle and follicular dynamics in albino rats, *Journal of Basic & Clinical Physiology & Pharmacology* **10** (4): 305-314.

Kärenlampi SO, Marin E, Hänninen OOP (1980): Occurrence of cytochrome P-450 in yeasts, *J Gen Microbiol* **120**: 1805-1827.

Kärenlampi SO, Marin E, Hänninen OOP (1982): Growth and cytochrome P-450 in yeast subjected to various foreign chemicals, *Arch Environ Contam Toxicol* **11**: 693-698.

Kearny PC, Kaufman DD (Hrsg.) (1975): *Herbicides: Chemistry, Degradation and Mode of Action*, Volume 1, Marcel Dekker Inc., New York

Keith LH, Alford AL, Garrison AW (1969): The High Resolution NMR Spectra of Pesticides. II. The DDE-Type Compounds, *JAOAC* **52** (5): 1074-1092.

Kelce WR, Stone CS, Laws SC, Gray LE, Kemppainen JA, Wilson EM (1995): Persistent DDT metabolite, p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist, *Nature* **375**: 584-585.

Kelce WR, Gray LE, Wong CI, Wilson EM (1996): Developmental Effects and Molecular Mechanisms of Environmental Antiandrogens, In: *Deutsche Forschungsgemeinschaft, Hormonally Active Agents in Food, Symposium*, Wiley-VCH, 28-141.

Kelce WR, Lambright CR, Gray LE Jr., Roberts KP (1997): Vinclozolin and p,p'-DDE Alter Androgen-Dependent Gene Expression: *In vivo* Confirmation of an Androgen Receptor-Mediated Mechanism, *Toxicology and Applied Pharmacology* **142**: 192-200.

Kelner MJ, McLenithan JC, Anders MW (1986): Thiol Stimulation of the Cytochrome P-450-dependent reduction of 1,1,1-trichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDT) to 1,1-dichloro-2,2-bis(p-chlorophenyl)ethane (DDD), *Biochemical Pharmacology* **35** (11): 1805-1807.

Kirmann A, Nouri-Bimorghi R (1968): Les proprietes des chloroepoxydes, *Bulletin de la Societe Chimiques de France* **8**: 3213-3220.

Klein-Hitpass L, Schorpp M, Wagner U, Ryffel G (1986): An estrogen-responsive element derived from the 5'-flanking region of the *Xenopus vitellogenin A2* gene functions in transfected human cells, *Cell* **7** (7): 1053-1061.

Klein-Hitpass L, Ryffel GU, Heitlinger E, Cato A (1988): A 13bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor; *Nucleic Acids Research* **16** (2): 647-663.

Knowles CO, Ahmad S (1971): Comparative metabolism of chlorobenzilate, chloropropylate, and bromopropylate acaricides by rat hepatic enzymes, *Can J Physiol Pharmacol* **49**: 590-597.

Kong LY, Szaniszló P, Albrecht T, Liehr JG (2000): Frequency and molecular analysis of hprt mutations induced by estradiol in Chinese hamster V 79 cells, *International Journal of Oncology* **17** (6): 1141-1149.

Korenman SG (1970): Relation Between Estrogen Inhibitory Activity and Binding to Cytosol of Rabbit and Human Uterus, *Endocrinology* **87**: 1119-1123.

Kolaczkowski M, Kolaczowska A, Luczynski J, Witek S, Goffeau A (1998): *In vivo* characterization of the drug resistance profile of the major ABC transporters and other components of the yeast pleiotropic drug resistance network, *Microbiol drug resistance* **4** (3): 143-158.

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

Kuiper G, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β , *Endocrinology* **138**: 863-870.

Kupfer D, Bulger WH (1987): Metabolic activation of pesticides with proestrogenic activity, *Federation Proceedings* **46**: 1864-1869.

Labrie F, Labrie C, Belanger A, Simard J, Gauthier S, Luu-The V, Merand Y, Giguere V, Candas B, Luo S, Martel C, Singh SM, Fournier M, Coquet A, Richard V, Charbonneau R, Charpenet G, Tremblay A, Tremblay G, Cusan L, Veilleux R (1999): EM-652 (SCH 57068), a third generation SERM acting as pure antiestrogen in the mammary gland and endometrium, *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology* **69** (1-6): 51-84.

Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE Jr. (2000): Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Linuron: An Antiandrogenic Herbicide that Produces Reproductive Malformations in Male Rat, *Toxicological Sciences* **56**: 389-399.

Lebensmittelmonitoring BgVV (2000):
wysiwyg://100/http://grisdb.dimdi.de/sessuion/2001040509330200154/15docs.htm
(Stand Mai 2001)

Lewis AD, Forrester LM, Hayes JD, Wareing DJ, Carmichael J, Harris AL, Mooghen M, Wolf CR (1989): Glutathione S-transferase isoenzymes in human tumours and tumour derived cell lines, *Br J Cancer* **60**: 327-331.

Liehr JG (2001): Genotoxicity of the steroidal oestrogens oestrone and oestradiol: possible mechanism of uterine and mammary cancer development, *Hum Reprod Update* **7**(3): 273-281.

Life Technologies (1998): Concert™ High purity Plasmid Purification Systems User Manual.

Lindl T, Bauer J (1987): Zell- und Gewebekultur, Gustav Fischer Verlag

MacLellan KNM, Bird DM, Fry DM, Cowles JL (1996): Reproductive and Morphological Effects of o,p'-Dicofol on Two Generations of Captive American Kestrels, *Arch Environ Contam Toxicol* **30**: 364-372.

MacLellan KNM, Bird DM, Shutt LJ, Fry DM (1997): Behavior of Captive American Kestrels Hatched from o,p'-Dicofol Exposed Females, *Arch Environ Contam Toxicol* **32**: 411-415.

Maness SC, McDonnell DP, Gaido KW (1998): Inhibition of receptor-dependent transcriptional activity by DDT isomers and methoxychlor in HepG2 human hepatoma cells, *Toxicol Appl Pharmacol* **151**: 135-142.

Mangelsdorf D, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans R (1995): The Nuclear Receptor Superfamily: The Second Decade, *Cell* **83**: 835-839.

Matissek R, Schnepel FM, Steiner G (1992): Lebensmittelanalytik, 2.Auflage, Springer Verlag

McDonald RN, Cousins RC (1980): Molecular Rearrangements. 13. Kinetics and Mechanism of Rearrangements of Some Ring-Substituted α -Chlorostyrene Oxides and trans- β -Chlorostyrene Oxides, *J Org Chem* **45**: 2976-2984.

McDonnell D, Dana S, Hoener P, Lieberman B, Imhof M, Stein R (1995): Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor, *Annals New York Academy of Sciences* **761**: 121-137.

Menzie CM (1980): Metabolism of Pesticides. Update III, Special Scientific Report-Wildlife No. 232, Washington DC: US Department of the Interior, Fish and Wildlife Service: 216-223.

Metzger D, Ali S, Bornert JM, Chambon P (1995): Characterization of the amino-terminal activation function of the human estrogen receptor in animal and yeast cells, *The Journal of biological Chemistry* **270** (16): 9535-9542.

Miller D, Wheals BB, Beresford N, Sumpter JP (2001): Estrogenic Activity of Phenolic Additives Determined by an *In Vitro* Yeast Bioassay, *Environ Health Perspect* **109**: 133-138.

Miller SC, Bottema CD, Stathis PA, Tokes LG, Feldman D (1986): Unexpected presence of estrogen in culture medium supplements: Subsequent metabolism by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Endocrinology* **119**: 1362-1369.

Milligan SR, Balasubramanian AV, Kalita JC (1998): Relative potency of xenobiotic estrogens in acute in vivo mammalian assay, *Environ Health Perspect* **106** (1): 23-26.

Milligan SR, Kalita JC, Heyerick A, Rong H, de Cooman L, de Keukeleire D (1999): Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus lupulus* L.) and beer, *J Clin Endocrin Metab* **83** (6): 2249-2252.

Milligan SR, Kalita JC, Pocock V, van de Kauter V, Stevens JF, Deinzer ML, Rong H, de Keukeleire D (2000): The endocrine activities of 8-prenylnaringenin and related hop flavonoids, *J Clin Endocrin Metab* **85** (12): 4912-4915.

Miranda CL, Stevens JF, Helmrich A, Henderson MC, Rodriguez RJ, Yang YH, Deinzer ML, Barnes DW, Buhler DR (1999): Antiproliferative and Cytotoxic Effects of Prenylated Flavonoids from Hops (*Humulus lupulus*) in Human Cancer Cell Lines, *Food Chem Tox* **37**: 271-285.

Miranda CL, Yang YH, Henderson MC, Stevens JF, Santana-Rios G, Deinzer ML, Buhler DR (2000): Prenylflavonoids from hops inhibit the metabolic activation of the carcinogenic heterocyclic amine 2-amino-3-methylimidazo[4,5-F]quinoline mediated by cDNA-expressed human CYP 1A2, *Drug Metab Dispos* **28**: 1297-1302.

Miranda CL, Aponso GL, Stevens JF, Deinzer ML, Buhler DR (2000a): Prenylated chalcones and flavanones as inducers of quinone reductase in mouse Hepa 1c1c7 cells, *Cancer Lett* **149**: 21-29.

Miranda CL, Stevens JF, Ivanov V, McCall M, Frei B, Deinzer L, Buhler DR (2000b): Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones *in vitro*, *J Agric Food Chem* **48**: 3876-3884.

Montagne MPJ (1902): Sur les transpositions atomique intramoleculaire I. Transposition atomique intramoleculaire chez les diketones aromatiques, *Recl Trav Chim Pays-Bas* **21**: 5-30.

Moore M, Narasimhan TR, Steinberg MA, Wang X, Safe S (1993): Potention of CYP 1A1 gene expression in MCF-7 human breast cancer cells cotreated with 2,3,7,8,-tetrachlorodibenzo-p-dioxin and 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate, *Arch Biochem Biophys* **305**: 483-488.

Murad F, Haynes D Jr. (1985): Androgens In: Goodman and Gilman's (Hrsg.) *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, p 1440 – 1448, 7th edition, Macmillan Publishing Company; New York.

Mußler B (1999): Etablierung von *in vitro* Methoden zur Erfassung von endokrinen Disruptoren, Dissertation, Universität Kaiserslautern.

Nesnow S, Mass MJ, Ross JA, Galati AJ, Lambert GR, Gennings C, Carter WH, Stoner GD (1998): Lung tumorigenic interactions in strain A/J mice of five environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ Health Perspect* **106** (Suppl. 6): 1337-1346.

Nimrod A, Benson W (1996): Environmental Estrogenic Affects of Alkylphenol Ethoxylate, *Critical Reviews in Toxicology*, **26** (3): 335-364.

Nome F, Erbs W, Correia VR (1981): Kinetic and Thermodynamic Study of the Base-Catalyzed Oxidative Cleavage of 1,1-Bis(p-chlorophenyl)-2,2,2-trichloroethanol, *J Org Chem* **46**: 3802-3804.

OECD (1996): European Workshop on the impact of endocrine disruptors on human health and wildlife, Report of Proceedings 2-4 December, Weybridge United Kingdom:

Okimoto M, Itoh T, Chiba T (1996): Cathodic Reduction of Benzoyl Cyanides, *J Org Chem* **61**: 4835-4837.

Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE (1999): The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist *in vivo* and *in vitro*, *Tox Ind Health* **15**: 80-93.

Pang S, Cao JQ, Katz BH, Hayes CL, Sutter TR, Spink DC (1999): Inductive and inhibitory effects of non-ortho-substituted polychlorinated biphenyls on estrogen metabolism and human cytochromes P450 1A1 and 1B1, *Biochemical Pharmacology* **58** (1): 29-38.

Pasanen M, Stacey S, Lykkesfeldt A, Briand P, Hines R, Autrup H (1988): Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression in human breast tumor cell lines, *Chem Biol Interactions* **66**: 223-232.

Pesticides Trust (1999): Fact Sheet Dicofol, *Pesticide News* **43**.

PflanzenschutzanwendungsVO (2000): Beck'sche Textsammlung, Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Stand: 31.3.2000.

Phillips DH (2001): Understanding the genotoxicity of tamoxifen?, *Carcinogenesis* **22** (6): 839-849.

Pike A, Brzozowski A, Hubbard R, Bonn T, Thorsell A, Engström O, Ljunggren J, Gustafsson JA, Carlquist M (1999): Structure of the ligand-binding domain of estrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist, *The EMBO Journal* **18** (17): 4608-4618.

Pons M, Gagne D, Nicolas JC, Mehtali M (1990): A cellular model of response of estrogens: A Bioluminescent Test to Characterize (Anti)Estrogen Molecules, *BioTechniques* **9**: 450-459.

Prins GS (2000): Molecular Biology of the Androgen Receptor, *Mayo Clin Proc* **75** (suppl): S32-35.

Promega (1996): Technical Bulletin; Promega.

Rafi MM, Rosen RT, Vassil A, Ho C, Zhang H, Ghai G, Lambert G, Dipaola RS (2000): Modulation of bcl-2 and Cytotoxicity by Licochalcone-A, a Novel Estrogenic Flavonoid, *Anticancer Research* **20**: 2653-2658.

RAIS (2001): Risk Assessment Information System, http://risk.lsd.ornl.gov/cgi-bin/tox/Tox_9801 (Stand April 2001).

Ramanujam P, Fogerty S, Heiser W, Jolly J (1990): Fast Gel Electrophoresis to Analyze DNA-Protein Interactions, *BioTechniques* **8** (5): 556-563.

Rana S, Bisht D, Chakraborti PK (1998): Activation of rat androgen receptor by androgenic ligands in unaffected by antiandrogens in *Saccharomyces cerevisiae*, *Gene* **209**: 247-254.

Reeve W, McKee JR, Brown R, Lakshmanan S, McKee GA (1980): Studies of the rearrangement of (trichloromethyl)carbinols to α -chloroacetic acids, *Can J Chem* **58**: 485-493.

Rendic S, Di Carlo FJ (1997): Human cytochrome P450 enzymes: A status report summarizing their reactions, substrates, inducers and inhibitors, *Drugs metabolism reviews* **29**: 413-580.

Rothman AM (1980): High Performance Liquid Chromatographic Analysis of Dicofol Acaricide, *JAOAC* **63** (6): 1296-1299.

Routledge EJ, Sumpter JP (1996): Estrogenic Activity of Surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen, *Environmental Toxicology and Chemistry* **15** (3): 241-248.

Roy AK, Tyagi RK, Song CS, Lavrovsky Y, Ahn SC, OH, T, Chatterjee B (2001): Androgen Receptor: Structural Domains and Functional Dynamics after Ligand-Receptor Interaction, In: *Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs)* edited by Anthony M, Dunn BK, Sherman S, *Annals New York Academy of Sciences* **949**: 44-57.

RückstandshöchstmengenVO (1999): Beck'sche Textsammlung, Lebensmittel- und Bedarfsgegenständegesetz, Stand: 11.2.1999.

Sack JS, Kish KF, Wang C, Attar RM, Kiefer SE, An Y, Wu GY, Scheffler JE, Salvati ME, Krystek SR, Weinmann R, Einspahr HM (2001): Crystallographic structures of the ligand-binding domains of the androgen receptor and its T877A mutant complexed with the natural agonist dihydrotestosterone, *PNAS* **98** (9): 4904-4909.

Saitta M, Di Bella G, Salvo F, Lo Curto S, Dugo G (2000): Organochlorine Pesticide Residues in Italian Citrus Essential Oils, 1997-1996, *J Agric Food Chem* **48**: 797-801.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989): *Molecular Cloning, Second Edition*, Cold Spring Harbor Laboratory Press

Schlegel H (1992): Allgemeine Mikrobiologie, 7. überarbeitete Auflage, Thieme Verlag

Schmitt S (2001): Metabolismus indigoider Bisindole, neuartige Hemmstoffe cyclinabhängiger Kinasen, Diplomarbeit, Universität Kaiserslautern.

Shen K, Nowak RF (1997): DDT stimulates c-erbB2, c-met, and STATS tyrosine phosphorylation, Grb-Sos association, MAPK phosphorylation and proliferation of human breast epithelial cells, *Biochem Biophys Res Commun* **231**: 17-21.

Shet MS, McPhaul M, Fisher CW, Stallings NR, Estabrook RW (1997): Metabolism of the Antiandrogenic Drug Flutamide by Human CYP 1A2, *Drug Metabolism and Disposition* **25** (11): 1298-1303.

Shiau AK, Barstad D, Radek JT, Meyers MJ, Nettles KW, Katzenellenbogen BS, Katzenellenbogen JA, Agard DA, Greene GL (2002): Structural Characterization of a subtype-selective ligand reveals a novel mode of estrogen receptor antagonism, *Nature structural biology* **9** (5): 359-364.

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Mnks A, McMahon J, Vistica D, Warren JF, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening, *Journal of the National Cancer Institute* **872**: 1107-1112.

Slater E, Hesse H, Beato M (1994): Regulation of Transcription by Steroid Hormones, *Annals New York Academy of Sciences* **733**: 103-112.

Smith S, Pasco D, Oawlak J, Thomson BJ, Stampfer M, Nandi S (1984): Thioesterase II, a new marker enzyme for human cells of breast epithelial origin, *J Natl. Cancer Inst* **73**: 323-329.

Smitskamp-Wilms E, Peters GJ, Pinedo HM, van Ark-Otte J, Giaccone G (1994): Chemosensitivity to the indoloquinone E09 is correlated with DT-diaphorase activity and its gene expression, *Biochem Pharmacol* **47**: 1325-1332.

Sohoni P, Sumpter JP (1998): Several environmental oestrogens are also antiandrogens, *Journal of Endocrinology* **158**: 327-339.

Soto AM, Sonnenschein C (1995): The E-Screen Assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants, *Environ Health Perspect* **103**: 113-122.

Spink DC, Lincoln II DW, Dickerman HW, Gierthy JF (1990): 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes an extensive alteration of 17 β -estradiol metabolism in MCF-7 breast tumor cells, *Pro Natl Acad Sci* **87**: 6971-6921.

Stryer L (1996): Biochemie, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag.

Stevens JF, Taylor AW, Deinzer ML (1999): Quantitative analysis of xanthohumol and related prenylflavonoids in hops and beer by liquid chromatography-tandem mass spectrometry, *Journal of Chromatography A* **832**: 97-107.

Stevens JF, Taylor AW, Clawson JE, Deinzer ML (1999a): Fate of Xanthohumol and Related Prenylflavonoids from Hops to Beer, *J Agric Food Chem* **47**: 2421-2428.

Takeo J, Yamashita S (1999): Two Distinct Isoforms of cDNA Encoding Rainbow Trout Androgen Receptors, *J Biol Chem* **274** (9): 5674-5680.

Tanenbaum DM, Wang Y, Williams SP, Sigler PB (1998): Crystallographic comparison of the estrogen and progesterone receptor's ligand binding domains, *Proc Natl Acad Sci* **95**: 5998-6003.

Tsai M, O'Malley BW (1994): Molecular Mechanisms of action of Steroid/Thyroid receptor superfamily members, *Annu Rev Biochem* **63**: 451-486.

Uptima (2000): BC Assay: Protein quantification kit, Assay procedures.

US-Department of health and human services (2002): Toxicological profile for methoxychlor, <http://www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp47.pdf>. (Stand Juli 2002)

Vinggaard AM, Breinholt V, Larsen JC (1999): Screening of selected pesticides for oestrogen receptor activation *in vitro*, *Food Additives and Contaminants* **16** (12): 533-542.

Vinggaard AM, Hnida C, Larsen JC (2000): Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons affect androgen receptor activation *in vitro*, *Toxicology* **145** (2-3): 173-183.

Vonier PM, Crain DA, McLachlan JA, Guillette LJ Jr., Arnold SF (1996): Interaction of Environmental Chemicals with the Estrogen and Progesterone Receptors from the Oviduct of the American Alligator, *Environmental Health Perspectives* **104** (12): 1318-1322.

Wahli W, Dawid I, Ryffel G, Weber R (1981): Vitellogenesis and the Vitellogenine Gene Family, *Science* **212**: 298-304.

Walsh PR, Hites RA (1979): Dicofol Solubility and Hydrolysis in Water, *Bull Environ Contam Toxicol* **22**: 305-311.

Waxman DJ (1999). P450 Induction by Structurally Diverse Xenochemicals: Central Role of Nuclear Receptors CAR, PXR, and PPAR, *Archives of Biochemistry and Biophysics* **369** (1): 11-23.

Wedler G (1997): *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*, 4., völlig überarbeitete und erweiterte Auflage, Wiley-VCH

White R, Parker MG (1998): Molecular mechanisms of steroid hormone action, *Endocrine-Related Cancer* **5**: 1-14.

de Winter R (1991): Androgen receptor expression in human tissues: an immunohistochemical study, *J Histochem Cytochem* **39**: 927-936.

Wong C, Kelce WR, Sar M, Wilson EM (1995): Androgen Receptor Antagonist *versus* Agonist Activities of the Fungicide Vinclozolin Relative to Hydroxyflutamid, J Biol Chem **270** (34): 19998-20003.

Yagi E, Barrett JC, Tsutsui T (2001): The ability of four catechol estrogens of 17beta-estradiol and estrone to induce DNA adducts in Syrian hamster embryo fibroblasts, Carcinogenesis **22** (9): 1505-1509.

Yoneyama K, Matsumara F (1981): Reductive Metabolism of Heptachlor, Parathion, 4,4'-Dichlorobenzophenone, and Carbophenothion by Rat Liver Systems, Pesticide Biochemistry and Physiology **15**: 213-221.

Yoshida Y, Aoyama Y (1984): Yeast cytochrome P-450 catalyzing lanosterol 14 α -demethylation I. Purification and spectral properties, J Biol Chem **259**: 1655-1660.

Zacharewski T (1998): Identification and Assessment of Endocrine Disruptors: Limitations of *in Vivo* and *in Vitro* Assays, Environ Health Perspect **106** (Suppl 2): 577-582.

Zacharewski TR, Meek MD, Clemons JH, Wu ZF, Fielden MR, Matthews JB (1998): Examination of the *in vitro* and *in vivo* estrogenic activities of eight commercial phthalate esters, Toxicol Sci **46** (2): 282-293.

Zhu BT, Conney AH (1998): Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives, Carcinogenesis **19** (1): 1 - 27.

8 Anhang

8.1 Nachweisgrenzen der HPLC-UV-Methode

DCBP [µg/ml]	Peakfläche			Mittelwert ± Standardabweichung	Lineare Regression
4	99765	75335	77439	87198 ± 12595	y = 22421x - 1438 R = 0,990
2	51311	42223	38660	43951 ± 533	
1		20517	19678	19884 ± 559	
0,8	9029			9029	
0,4		6556	6466	6733 ± 1146	
0,2	2220	3585	3898	3677 ± 881	
0,1		1133	1300	1217 ± 118	
0,04	333	404		369 ± 36	

DCBH [µg/ml]	Mittelwert ± range			Lineare Regression
1	19185	25802	22494 ± 4679	y = 21975x - 191 R = 0,998
0,4	8678	8394	8536 ± 201	
0,2	4127	6971	5549 ± 2011	
0,1	2223	2902	2563 ± 480	
0,05	1111	1461	1286 ± 175	
0,02	281	374	328 ± 47	

Nachweisgrenze

DCBP: 0,04 µg/ml entspricht 1,6 µM

DCBH: 0,02 µg/ml entspricht 0,08 µM

8.2 Inkubation von Lebermikrosomen mit Dicofof

	Rindermikrosomen										Induzierte Rattenmikrosomen			
	37°C				50°C				60°C				37°C	
	DCBP [µM]	Dicofof [mM]	DCBP [µM]	Dicofof [mM]	DCBP [µM]	Dicofof [mM]	DCBP [µM]	Dicofof [mM]	DCBP [µM]	Dicofof [mM]	DCBP [mM]	Dicofof [mM]		
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	2,0	0,85	3,3	0,53	21	0,23	2	0,80						
	2,1	0,75	6,1	0,47	39	0,34	2	0,80						
	1,6	0,79	2,1	0,99	6	0,68	-	-						
	<1,6	1,01	-	-	-	-	-	-						
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	1,8	0,95	5,1	0,49	6	0,11	2,2	0,62						
	1,9	0,83	7,2	0,48	23	0,36	1,9	0,76						
	1,0	0,90	2,0	-	3	-	-	-						
	<1,6	0,91	-	-	-	-	-	-						
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	1,9	0,81	2,0	0,77	6	0,20								
	2,0	0,94	1,6	0,37	9	0,42								
	-	0,98	1,6	0,98	5	0,70								
	<1,6	0,95	-	-	-	-								
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	1,8	0,77	5,3	0,98	19	0,53								
	2,2	0,96	3,2	0,58	29	0,53								
	-	1,04	2,0	0,96	-	0,80								
	<1,6	0,88	-	-	-	-								

Mittelwerte \pm Standardabweichung	Rindermikrosomen			Induzierte Rattenmikrosomen
	37°C	50°C	60°C	
inaktivierte Mikrosomen	DCBP [μ M]	DCBP [μ M]	DCBP [μ M]	37°C DCBP [μ M]
aktive Mikrosomen	1,9 \pm 0,08	3,9 \pm 1,4	13 \pm 8	2,1 \pm 0,2
ohne Mikrosomen	2,1 \pm 0,11	4,5 \pm 2,2	25 \pm 13	2,1 \pm 0,1
Aufarbeitungskontrolle	1,6 <1,6	2,1 \pm 0,1 -	5 \pm 2 -	- -
inaktivierte Mikrosomen	Dicofof [mM]	Dicofof [mM]	Dicofof [mM]	Dicofof [mM]
aktive Mikrosomen	0,84 \pm 0,08	0,70 \pm 0,23	0,30 \pm 0,19	0,71 \pm 0,13
ohne Mikrosomen	0,87 \pm 0,10	0,47 \pm 0,09	0,41 \pm 0,09	0,78 \pm 0,03
Aufarbeitungskontrolle	0,93 \pm 0,11 0,94 \pm 0,07	0,98 \pm 0,02	0,73 \pm 0,07	0,83 \pm 0,13

8.2.1 Berechnung der Aktivierungsenergie

Reaktionskonstante k [1/min]	Temperatur [°C]		c(Dicofof) ₀ [mM]	Zeit [min]	Ink
	37°C	50°C			
0,0021	inaktivierte Mikrosomen	0,84	1,08	120	-6,2
0,0018	37°C aktive Mikrosomen	0,87	1,08	120	-6,3
0,0012	37°C ohne Mikrosomen	0,93	1,08	120	-6,7
0,0037	50°C inaktivierte Mikrosomen	0,69	1,08	120	-5,6
0,0069	50°C aktive Mikrosomen	0,47	1,08	120	-5,0
0,0008	50°C ohne Mikrosomen	0,98	1,08	120	-7,1
0,0116	60°C inaktivierte Mikrosomen	0,27	1,08	120	-4,5
0,0081	60°C aktive Mikrosomen	0,41	1,08	120	-4,8
0,0033	60°C ohne Mikrosomen	0,73	1,08	120	-5,7

8.3 Inkubation von Lebermikrosomen mit DCBP

	Rindermikrosomen		Schweinemikrosomen		Induzierte Rattenmikrosomen	
	DCBH [mM]	DCBP [mM]	DCBH [mM]	DCBP [mM]	DCBH [mM]	DCBP [mM]
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	N.N.	0,0094	N.N.	0,0082	N.N.	0,049
	0,024	0,0003	0,015	0,0003	0,31	0,002
	N.N.	0,02100	N.N.	0,0267		
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	N.N.	0,0042	N.N.	0,0115		
	0,027	0,0002	0,019	0,0001		
	N.N.	0,0133	N.N.	0,251		
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	N.N.	0,0081	N.N.	0,0115		
	0,030	0,0003	0,21	0,0002		
	N.N.	0,0175	N.N.	0,0167		
	N.N.	0,0307	N.N.			
Mittelwert ± Standardabweichung						
	Rindermikrosomen		Schweinemikrosomen		Induzierte Rattenmikrosomen	
	DCBH [mM]	DCBP [mM]	DCBH [mM]	DCBP [mM]	DCBH [mM]	DCBP [mM]
inaktivierte Mikrosomen aktive Mikrosomen ohne Mikrosomen Aufarbeitungskontrolle	N.N.	0,0073 ± 0,003	N.N.	0,009 ± 0,002	N.N.	0,049
	0,027 ± 0,003	0,0003 ± 0,00005	0,018 ± 0,003	0,0002 ± 0,0001	0,31	0,002
	N.N.	0,0173 ± 0,004	N.N.	0,0187 ± 0,0094		
	N.N.	0,032 ± 0,0002				

Mittelwerte \pm Standardabweichungen

Zeit [min]	10 mM NaOH		1 mM NaOH		0,1 mM NaOH		MeOH	10% Essigsäure
	DCBP [mM]	Dicofol [mM]	DCBP [mM]	Dicofol [mM]	DCBP [mM]	Dicofol [mM]	Dicofol [mM]	Dicofol [mM]
1	0,72 \pm 0,05	0,41 \pm 0,13						
2	0,76 \pm 0,08		0,17 \pm 0,01	0,84 \pm 0,16				
5	0,80 \pm 0,03		0,41 \pm 0,05	0,58 \pm 0,08	0,04 \pm 0,02	0,77 \pm 0,52		
10			0,57 \pm 0,06	0,31 \pm 0,05	0,06 \pm 0,02	0,90 \pm 0,09		
15	0,86 \pm 0,12		0,69 \pm 0,16					
20			0,73 \pm 0,05		0,10 \pm 0,04	0,63 \pm 0,44	0,87 \pm 0,08	0,81 \pm 0,02
30	0,76 \pm 0,05		0,75 \pm 0,07		0,11 \pm 0,06	0,70 \pm 0,49		
45					0,13 \pm 0,08	0,71 \pm 0,49	0,95 \pm 0,10	0,92 \pm 0,01
60			0,76 \pm 0,05					

8.5 Chloroformbestimmung Headspace-GC

8.5.1 Stabilität von Chloroform in alkalischer Lösung

	1mM NaOH	MeOH
1 μ mol		
6 μ mol	5272	4871
12 μ mol	5603	5830
24 μ mol	11394	14894
36 μ mol	32651	27743
60 μ mol	46589	46058

¹⁾peak nicht integriert aber vorhanden

Lineare Regressionen

$$y = 800x - 2215 \quad R = 0,994$$

$$y = 836x - 2780 \quad R = 0,972$$

8.5.2 Standardadditionsverfahren zur Bestimmung von Chloroform

Datum	Zugabe an CHCl_3 [μmol]	Mittelwert \pm range	Lineare Regression	Fehlerfortpflanzung
07.06.02	0	1057	$y = 1089x + 957$ $R = 0,98$ $\Rightarrow x = 0,8 \mu\text{mol} \pm 0,03$	$A = 957 \pm 1883$ $B = 1089 \pm 136$ $\Delta_x = 0,03$
	6	4259		
	12	10062		
	24	26530		
06.06.02	0	492	$y = 4335x + 5037$ $R^2 = 0,994$ $\Rightarrow x = 1,16 \mu\text{mol} \pm 0,13$	$A = 5037 \pm 8005$ $B = 4335 \pm 271$ $\Delta_x = 0,13$
	6	18477		
	12	31669		
	24	113961		
	60	252408		

8.6 Inkubation von CDFKS- bzw. Hefewachstums-Medium mit Dicofof

	CDFKS-Medium		Mittelwert \pm Standardabweichung	
	DCBP [μM]	Dicofof [mM]	DCBP [μM]	Dicofof [mM]
Aufarbeitungskontrolle	<0,16	1,046	<0,16	0,97 \pm 0,08
	<0,16	0,971		
	<0,16	0,894		
2h-Inkubation	6,9	0,901	6,2 \pm 1	0,80 \pm 0,13
	5,8	0,915		
	4,9	0,710		
	7,1	0,673		
24h-Inkubation	169	0,415	157 \pm 20	0,49 \pm 0,06
	133	0,467		
	169	0,513		
	156	0,554		

	Hefe-Medium		Mittelwert ± Standardabweichung	Mittelwert ± Standardabweichung
	DCBP [μ M]	Dicofof [mM]	DCBP [μ M]	Dicofof [mM]
Aufarbeitungskontrolle	<0,16	0,904	< 0,16	1,02 ± 0,13
	<0,16	1,154		
	<0,16	1,011		
2h-Inkubation	<0,16	0,832	< 0,16	0,76 ± 0,08
	<0,16	0,774		
	<0,16	0,790		
	<0,16	0,646		
24h-Inkubation	<0,16	0,979	< 0,16	0,97 ± 0,06
	<0,16	0,900		
	<0,16	1,023		
48h- Inkubation	<0,16	0,708	< 0,16	0,71

8.7 UV-Bestrahlung von Dicofof

Lösemittel	Energie [J/cm ²]	DCBP [mM]			
		5.07.01	4.07.01	3.07.01	9.07.01
Methanol	0,25	0,22	0,19	0,15	0,15
	0,5		0,31	0,27	0,28
	0,75	0,37	0,33	0,27	0,38
Methanol/Wasser		50701	40701	30701	90701
	0,25	0,10	0,11		0,07
	0,5	0,09	0,09		0,08
Hexan		310501	10601	70601	
	0,25	0,33	0,33	0,32	
	0,5		0,55	0,62	
Hexan	0,75		0,58	0,63	
		Dicofof [mM]			
Methanol		5.07.01	4.07.01	3.07.01	9.07.01
	0,25		0,90	0,86	0,77
	0,5		0,68	0,71	0,72
Methanol/Wasser	0,75	0,53	0,50	0,44	0,60
		50701	40701	30701	90701
	0,25	0,81	0,98		0,67
Hexan	0,5		0,45		0,50
	0,75	0,33	0,46		0,27
		310501	10601	70601	
Hexan	0,25		0,95	0,94	
	0,5	0,63	0,75	0,78	
	0,75	0,36	0,43	0,62	
		Mittelwert ± Standardabweichung			
		0,18 ± 0,04			
		0,29 ± 0,02			
		0,34 ± 0,05			
		0,10 ± 0,02			
		0,09 ± 0,01			
		0,10 ± 0,05			
		0,33 ± 0,01			
		0,58 ± 0,05			
		0,61 ± 0,04			
		Mittelwert ± Standardabweichung			
		0,84 ± 0,07			
		0,70 ± 0,02			
		0,52 ± 0,07			
		0,82 ± 0,16			
		0,52 ± 0,08			
		0,35 ± 0,09			
		0,94 ± 0,01			
		0,47 ± 0,13			
		0,72 ± 0,08			

8.8 Ergebnisse des Hefe-ER-Testsystems

Eichkurve

E_2 Konzentration [nM]	bezogen auf E_2 10 nM													Mittelwerte \pm Standardabweichung
50	0,99	1,09	1,14	0,98	1,02	1,42	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,09 \pm 0,16
10	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00 \pm 0,08 ¹⁾
5	0,95	0,75	0,73	0,99	1,01	1,02	1,11	1,03	1,03	1,03	0,74	0,59	0,59	0,96 \pm 0,13
1	0,37	0,32	0,78	0,93	0,91	1,37	1,15	0,74	0,74	0,74	0,53	0,64	0,64	0,78 \pm 0,33
0,5	0,24	0,25	0,42	0,88	0,80	1,30	1,17	0,53	0,53	0,53	0,19	0,19	0,19	0,65 \pm 0,39
0,1	0,05	0,18	0,47	0,64	0,54	1,00	0,89	0,16	0,16	0,16	-0,06	-0,06	-0,06	0,42 \pm 0,34
0,05	0,02	0,21	0,38	0,51	0,36	0,84	0,68	0,02	0,02	0,02	0,19	0,19	0,19	0,33 \pm 0,31
0,01	0,01	0,16	0,48	0,20	0,11	0,33	0,19	0,02	0,02	0,02	0,07	0,07	0,07	0,15 \pm 0,16
0,005	0,00	0,15	0,20	0,09	0,02	0,16	0,07	0,02	0,02	0,02	0,07	0,07	0,07	0,08 \pm 0,08

¹⁾ Abweichung vom Mittelwert der jeweiligen Messreihe

Untersuchung von Dicofof auf estrogene Aktivität

Konzentration [nM]														Mittelwert \pm Standardabweichung
100000	2,56	0,90	4,30	0,90	0,90	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	4,30	2,60 \pm 1,0*
50000	2,49	0,85	4,18	0,85	0,85	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18	4,18	1,50 \pm 1,0*
10000	0,87	0,53	3,01	0,53	0,53	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	3,01	1,50 \pm 0,8*
5000	0,47	-0,05	-0,07	-0,05	-0,05	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	-0,07	0,10 \pm 0,02*
1000	-0,23	-0,14	-0,19	-0,14	-0,14	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,19	-0,20 \pm 0,03
100	-0,05	-0,05	-0,02	-0,05	-0,05	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	-0,02	0,00 \pm 0,01
10	0,35	-0,03	0,00	-0,03	-0,03	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,10 \pm 0,10
1	0,16	0,05	0,01	0,05	0,05	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,01	0,10 \pm 0,04

* toxische Konzentration

Untersuchung von DCBP auf estrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
100000	-0,12	-0,15	-0,12	-0,13 ± 0,01
50000	0,10	-0,11	-0,14	-0,05 ± 0,08
10000	-0,11	-0,15	-0,13	-0,13 ± 0,01
5000	-0,21	-0,14	-0,16	-0,17 ± 0,01
1000	-0,03	0,01	-0,02	0,01 ± 0,01
100	0,06	-0,03	-0,01	0,00 ± 0,03
10	0,34	0,00	0,01	0,12 ± 0,11
1	0,26	0,00	0,00	0,08 ± 0,09

Untersuchung von DCBH auf estrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
100000	0,75	0,45	2,21	1,13 ± 0,54*
50000	1,91	0,24	0,98	1,04 ± 0,40*
10000	-0,30	-0,22	-0,30	-0,27 ± 0,02*
5000	-0,26	-0,23	-0,28	-0,26 ± 0,10*
1000	0,00	-0,11	-0,18	-0,09 ± 0,05
100	0,13	0,02	-0,11	0,01 ± 0,07
10	-0,07	0,03	-0,12	-0,05 ± 0,04
1	0,41	-0,04	-0,10	0,09 ± 0,16

* toxische Konzentration

Untersuchung von Xanthohumol auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert ± Standardabweichung			
Estrogene Aktivität				
100000	-0,52	-0,16	0,08	-0,20 ± 0,17
50000	-0,50	-0,19	-0,01	-0,23 ± 0,14
10000	-0,51	-0,19	-0,12	-0,28 ± 0,12
5000	-0,61	-0,16	-0,21	-0,33 ± 0,14
1000	-0,45	0,00	-0,07	-0,17 ± 0,14
100	-0,07	0,12	0,15	0,06 ± 0,07
10	-0,23	0,10	0,06	-0,02 ± 0,10
1	-0,27	0,06	-0,02	-0,08 ± 0,10
Antiestrogene Aktivität				
E ₂ 10/100000	-0,41	0,17	0,22	0,20 ± 0,02
E ₂ 10/50000	0,41	0,20	0,09	0,24 ± 0,09
E ₂ 10/10000	-0,12	0,20	0,03	0,04 ± 0,10
E ₂ 10/5000	1,39	0,33	0,14	0,24 ± 0,09
E ₂ 10/1000	0,65	0,64	0,76	0,68 ± 0,04
E ₂ 10/100	0,99	0,53	1,00	0,84 ± 0,16
E ₂ 10/10	1,02	0,55	1,51	1,03 ± 0,28
E ₂ 10/1		0,56	0,96	0,77 ± 0,20

8.9 Ergebnisse des Hefe-AR-Testsystems

Eichkurve DHT

DHT Konzentration [nM]	bezogen auf DHT 50 nM										Mittelwert \pm Standardabweichung	
1000	1,5	1,4	1,2	1,4	1,2	1,2	1,2	1,2	1,0	1,2	1	1,27 \pm 0,17
100	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,17 \pm 0,02 ¹⁾
50	1,01	1,0	1,02	0,9	1	1	1	1	1	1	1	1,00 \pm 0,02
10	0,8	0,8	0,7	0,6	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,71 \pm 0,07
5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,51 \pm 0,04
1	0,1	0,13	0,08	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,1	0,10 \pm 0,01
0,5	0,05	0,02	0,01	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,05 \pm 0,04
0,1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0,01	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

¹⁾ Abweichung vom Mittelwert der jeweiligen Messreihe

Untersuchung von DDE auf antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert \pm Standardabweichung	
Antiandrogene Aktivität		
DHT 50 /100000	0,62	0,51
DHT 50/50000	0,61	0,77
DHT 50/10000	0,78	0,55
DHT 50/5000	0,74	0,70
DHT 50/1000	0,96	0,88
DHT 50/100	1,33	0,95
DHT 50/10	0,89	0,93
DHT 50/1	0,86	0,99
		0,56 \pm 0,07
		0,69 \pm 0,11
		0,66 \pm 0,17
		0,72 \pm 0,03
		0,92 \pm 0,06
		1,14 \pm 0,27
		0,91 \pm 0,03
		0,92 \pm 0,09

Untersuchung von Dicofof auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]					Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität					
100000	0,21	0,24			0,22 ± 0,02*
50000	0,23	0,27			0,25 ± 0,02*
10000	0,20	0,20			0,20 ± 0,00*
5000	0,19	0,16			0,18 ± 0,02*
1000	-0,02	-0,02			-0,02 ± 0,00
100	0,00	0,02			0,01 ± 0,01
10	0,06	0,06			0,06 ± 0,00
1	0,00	0,03			0,02 ± 0,02
Antiandrogene Aktivität					
DHT 50 /100000	0,00	0,30		0,17	0,15 ± 0,15*
DHT 50/50000	-0,02	0,29		0,19	0,15 ± 0,16*
DHT 50/10000	0,01	1,01		0,10	0,06 ± 0,06*
DHT 50/5000	0,00			0,68	0,34 ± 0,48*
DHT 50/1000	0,45	1,29		1,21	0,98 ± 0,47
DHT 50/100	0,77	1,00		1,08	0,95 ± 0,16
DHT 50/10	0,89	1,11		0,83	0,94 ± 0,15
DHT 50/1	0,96	1,02		0,96	0,98 ± 0,03

* toxische Konzentration

Untersuchung von DCBP auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]					Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität					
100000	-0,006	0,002			-0,002 ± 0,006
50000	0,013	-0,016			-0,002 ± 0,020
10000	0,011	0,001			0,010 ± 0,007
5000	0,008	-0,008			0,000 ± 0,010
1000	0,009	0,001			0,005 ± 0,006
100	-0,002	-0,009			-0,006 ± 0,005
10	0,006	0,000			0,003 ± 0,004
1	0,006	-0,007			0,001 ± 0,009
Antiandrogene Aktivität					
DHT 50 /100000	0,89	0,85	0,93		0,89 ± 0,04
DHT 50/50000	0,86	0,85			0,86 ± 0,01
DHT 5010000	0,86	0,89	0,94		0,90 ± 0,04
DHT 50/5000	0,83	0,85	0,93		0,87 ± 0,05
DHT 50/1000	0,96	0,95	0,88		0,93 ± 0,05
DHT 50/100	0,93	0,93	1,09		0,98 ± 0,09
DHT 50/10	0,93	0,92	1,14		1,00 ± 0,12
DHT 50/1	0,90	0,98	1,18		1,02 ± 0,14

Untersuchung von DCBH auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]					Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität					
100000	0,208	0,162			0,19 ± 0,03*
50000	0,118				0,118
10000	0,087	-0,061			0,01 ± 0,1*
5000	-0,012				-0,012
1000	-0,009	-0,020			-0,02 ± 0,008
100	-0,008	-0,030			-0,02 ± 0,02
10	0,003	-0,034			-0,02 ± 0,03
1	-0,008	-0,014			-0,01 ± 0,004
Antiandrogene Aktivität					
DHT 50/100000	0,24	0,10		0,24	0,2 ± 0,1*
DHT 50/50000	0,30	-0,01		0,13	0,1 ± 0,2*
DHT 50/10000	0,56	0,58		0,20	0,5 ± 0,1*
DHT 50/5000	0,68	0,69		0,43	0,7 ± 0,1*
DHT 50/1000	1,05	0,92		0,74	1,0 ± 0,1
DHT 50/100	0,97	0,88		0,92	0,9 ± 0,1
DHT 50/10	0,99	0,79		0,90	0,9 ± 0,1
DHT 50/1	1,09	0,93		0,88	1,0 ± 0,1

* toxische Konzentration

Untersuchung von Xanthohumol auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität				
100000	0,05	-0,13	-0,01	-0,03 ± 0,09
50000	0,05		-0,01	0,02 ± 0,04
10000	0,04	-0,11	-0,02	-0,03 ± 0,08
5000	0,01		-0,02	-0,004 ± 0,02
1000	0,003	-0,03		-0,004 ± 0,04
100	0,03	-0,01	-0,003	0,004 ± 0,02
10	0,03	0,01	-0,003	0,01 ± 0,02
1	0,02	0,02	-0,003	0,01 ± 0,01
Antiandrogene Aktivität				
DHT 50 /100000	0,67	0,40	0,72	0,51 ± 0,22
DHT 50/50000	0,43	0,81	0,87	0,61 ± 0,27
DHT 50/10000	0,95	1,27	0,82	0,99 ± 0,45
DHT 50/5000	0,81	1,24	0,87	0,95 ± 0,29
DHT 50/1000	0,98	0,95	1,04	0,99 ± 0,12
DHT 50/100	1,04	0,78	0,99	0,95 ± 0,11
DHT 50/10	1,04	0,97	1,42	1,08 ± 0,21
DHT 50/1	1,04	0,85	0,99	0,98 ± 0,08

Untersuchung von Linuron auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität				
100000	-0,009	-0,079	-0,04 ± 0,05	
50000	-0,019		-0,019	
10000	0,003	-0,004	-0,0004 ± 0,005	
5000	0,002		0,002	
1000	-0,029	0,000	-0,01 ± 0,02	
100	0,001	0,008	0,005 ± 0,005	
10	0,000	0,109	0,06 ± 0,07	
1	0,001	0,071	0,04 ± 0,05	
Antiandrogene Aktivität				
DHT 50/100000	0,59	0,70	0,64 ± 0,08	
DHT 50/50000	0,60	0,64	0,62 ± 0,03	
DHT 50/10000	0,76	0,81	0,79 ± 0,04	
DHT 50/5000	0,74	0,69	0,72 ± 0,03	
DHT 50/1000	0,91	0,89	0,90 ± 0,02	
DHT 50/100	0,84	0,82	0,83 ± 0,01	
DHT 50/10	0,93	1,00	0,91 ± 0,05	
DHT 50/1	0,94	0,92	0,73 ± 0,01	

Untersuchung von Linuron M2 auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität				
100000	0,016	0,013	0,015 ± 0,002	
50000		-0,003	-0,003	
10000	0,015	0,011	0,013 ± 0,003	
5000		0,011	0,011	
1000	0,004	-0,003	0,001 ± 0,005	
100	0,006	-0,003	0,002 ± 0,006	
10	0,008	-0,004	0,002 ± 0,01	
1	0,003	-0,004	-0,001 ± 0,005	
Antiandrogene Aktivität				
DHT 50 /100000	0,44	0,42	0,43 ± 0,01	
DHT 50/50000	0,51	0,52	0,52 ± 0,00	
DHT 5010000	0,73	0,76	0,75 ± 0,03	
DHT 50/5000	0,75	0,90	0,83 ± 0,11	
DHT 50/1000	0,92	0,96	0,94 ± 0,02	
DHT 50/100	0,95	0,97	0,96 ± 0,02	
DHT 50/10	0,88	0,96	0,92 ± 0,05	
DHT 50/1	0,92	0,98	0,95 ± 0,04	

Untersuchung von Linuron M1 auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität				
100000	0,13	0,02		0,08 ± 0,08
50000		0,02		0,013
10000	0,08	0,003		0,04 ± 0,05
5000		-0,002		-0,002
1000	0,02	-0,002		0,008 ± 0,01
100	0,001	-0,001		0 ± 0,001
10	0,03	-0,002		0,02 ± 0,02
1	0,16	-0,003		0,08 ± 0,11
Antiandrogene Aktivität				
DHT 50 /100000	0,99	1,01	1,01	1,00 ± 0,01
DHT 50/50000	1,05	1,05	1,10	1,07 ± 0,03
DHT 50/10000	0,22	1,01	1,19	1,14 ± 0,12
DHT 50/5000	1,03	1,00	1,09	1,04 ± 0,05
DHT 50/1000	1,06	1,00	1,14	1,07 ± 0,08
DHT 50/100	1,05	1,01	1,09	1,05 ± 0,04
DHT 50/10	1,11	1,06	1,04	1,07 ± 0,04
DHT 50/1	1,28	1,08	1,04	1,14 ± 0,13

Untersuchung von DCA auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Androgene Aktivität				
100000	0,001	0,04		0,02 ± 0,03*
50000	-0,007			-0,007*
10000	-0,007	0,02		0,008 ± 0,02
5000	-0,007			-0,007
1000	-0,008	0,02		-0,007 ± 0,02
100	-0,008	0,02		0,006 ± 0,02
10	-0,009	0,14		0,07 ± 0,11
1	-0,010	0,07		0,03 ± 0,06
Antiandrogene Aktivität				
DHT 50 /100000	0,57	0,63		0,60 ± 0,04*
DHT 50/50000	0,63	0,72		0,68 ± 0,07*
DHT 50/10000	0,93	1,13		1,03 ± 0,14
DHT 50/5000	1,05	0,95		1,00 ± 0,07
DHT 50/1000	0,91	1,14		1,02 ± 0,16
DHT 50/100	1,03	1,13		1,08 ± 0,07
DHT 50/10	0,90	1,11		1,00 ± 0,15
DHT 50/1	1,03	1,10		1,07 ± 0,05

* toxische Konzentration

8.10 Ergebnisse des MCF-7-Luc-Testsystems

Konsensuskurve

Konzentration [nM]	Lichteinheiten	Hemmung mit ICI 182 780 [1 μ M]
0,01	409 \pm 500	
0,1	1667 \pm 750	
1	72630 \pm 2564	
10	159685 \pm 7689	
100	168322 \pm 8957	-569 \pm 233

Untersuchung von Dicofol auf estrogenere Aktivität

Konzentration [nM]			Mittelwert \pm Standardabweichung
10000	89	133	120 \pm 189
1000	14	271	100 \pm 153
100	0	316	105 \pm 182
10	23	277	95 \pm 153
1	0	339	74 \pm 68
		0	
		0	
		0	
		22	

Untersuchung von DCBP auf estrogenere Aktivität

Konzentration [nM]			Mittelwert \pm Standardabweichung
10000	113	520	475 \pm 341
1000	417	340	363 \pm 47
100	123	0	787 \pm 258
10	36	0	261 \pm 421
1	53	451	252 \pm 281
		792	
		332	
		2238	
		746	

Untersuchung von DCBH auf estrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
10000	0	38	200	79 ± 106
1000	0	142	173	105 ± 92
100	0	0	0	0
10	135	0	0	45 ± 78
1	121	0	0	40 ± 70

Untersuchung von Xanthohumol auf estrogene bzw. antiestrogene Aktivität

Konzentration [nM]				Mittelwert ± Standardabweichung
Estrogene Aktivität				
10000	0	0	0	0
1000	0	204	0	68 ± 118
100	473	236	3138	1282 ± 1611
10	683	1632	433	916 ± 633
1	2145	370	0	838 ± 1147
Antiestrogene Aktivität				
E ₂ 10/10000	4041	93963	2381	57576 ± 64473*
E ₂ 10/1000	159154	169082	14388	168053 ± 8532
E ₂ 10/100	134647	220080	107779	159608 ± 49100
E ₂ 10/10	164074	175482	156085	159026 ± 14714
E ₂ 10/1	225956	167982	175394	178142 ± 34715

* toxische Konzentrationen

Cytotoxizitätstests

SRB-Test	Relative Zellzahl [%]					
	24h		48h		Mittelwert ± range	
Konzentration [nM]	Mittelwert ± Range		Mittelwert ± Range		Mittelwert ± range	
1	102	108	102	98	100 ± 2	
10	105	98	102	121	112 ± 10	
100	92	114	101	98	100 ± 2	
1000	106	101	93	994	94 ± 1	
10000	99	95	86	87	87 ± 1	
Trypanblautest	Viabilität [%]					
Konzentration [nM]	24h		48h		Mittelwert ± range	
Kontrolle	100				98 ± 2	
1	98		97	99	95 ± 3	
10	99		93	95	96 ± 3	
100	100		94	94	97 ± 2	
1000	99		95	98	97 ± 3	
10000	84		94	98	98 ± 2	
			95	98		

8.11 Ergebnisse des COS-AR-Luc-Testsystems

Eichkurve DHT

Konzentration [nM]											Mittelwert ± Standardabweichung	
10000												1,3 ± 0,3
1000	1,8	1	1,1	1,3	1,2	1,4	1,4	1,2	1,1	1,5		1,4 ± 0,2
100	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
10	0,5	0,3	0,7	0,2	0,4	0,4	0,7	0,5	0,8	0,4	0,7	0,7 ± 0,2
1	0,1	0,5	0,3	0,2	0,5	0,3	0,3	0,6	0,4	0,2	-0,1	0,4 ± 0,1
0,1	0,1	0,2	0,3	0,3	0,2	0,1	0,2	0,1	0,3	0,2	0,1	0,2 ± 0,2
0,01					0,1	0	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0,1 ± 0,0

Untersuchung von Dicofol auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]											Mittelwert ± Standardabweichung	
Androgene Aktivität												
10000	0,27	0,06										0,2 ± 0,2
1000	0,44	0,07										0,3 ± 0,3
100	0,13	0,04										0,09 ± 0,06
Antiandrogene Aktivität												
DHT 100/10000	1,0	1,2	0,4	0,4	0,4	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7	0,7 ± 0,3
DHT 100/1000	1,0	0,7	0,6	0,6	0,4	1,5	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8	0,8 ± 0,4
DHT 100/100	1,4	0,3	0,2	0,2	0,5	0,4	1,2	1,2	1,2	1,2	1,2	0,7 ± 0,5
DHT 100/10	1,0	0,7	0,3	0,3	0,6	0,9	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,7 ± 0,2
DHT 100/1	1,5	0,3	0,3	0,3	0,7	0,5	0,6	0,6	0,6	0,6	0,6	0,5 ± 0,2

Untersuchung von DCBH auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert ± Standardabweichung	
Androgene Aktivität		
10000	0,38	0,66
1000	0,17	0,41
100	0,09	0,52
Antiandrogene Aktivität		
DHT 100/10000	0,68	0,24
DHT 100/1000	0,81	1,05
DHT 100/100	0,84	0,78
DHT 100/10	0,83	0,61
DHT 100/1	0,81	0,63
		0,54
		0,72
		0,8 ± 0,04
		0,8 ± 0,1
		0,7 ± 0,2

Untersuchung von Xanthohumol auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert ± Standardabweichung	
Androgene Aktivität		
10000	-0,003	0,41
1000	-0,047	0,25
100	-0,227	0,22
Antiandrogene Aktivität		
DHT 100/10000	0,32	0,72
DHT 100/1000	0,78	0,94
DHT 100/100	1,18	0,91
DHT 100/10	1,16	0,99
DHT 100/1	1,41	0,63
		0,54
		0,59
		0,61
		0,75
		0,71
		0,63
		0,62
		0,41
		0,36
		0,79
		0,72
		0,62
		0,57 ± 0,15
		0,62 ± 0,24
		0,74 ± 0,31
		0,89 ± 0,18
		0,82 ± 0,33

Untersuchung von Linuron auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert \pm Standardabweichung			
Androgene Aktivität				
10000	0,2	-0,07	0,02	0,2 \pm 0,3
1000	0,1	-0,05	-0,14	-0,03 \pm 0,1
100	0,3	-0,07		0,03 \pm 0,1
Antiandrogene Aktivität				
DHT 100/10000	0,5	0,6	0,8	0,6 \pm 0,1
DHT 100/1000	0,4	1,2	0,6	0,5 \pm 0,1
DHT 100/100	0,3	1,0	0,7	0,9 \pm 0,2
DHT 100/10	0,8	0,9	0,5	0,7 \pm 0,2
DHT 100/1		0,8	0,8	0,8 \pm 0,0

Untersuchung von Linuron M2 auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert \pm Standardabweichung			
Androgene Aktivität				
10000	0,03	0,39	0,46	0,3 \pm 0,2
1000	0,15	0,10		0,1 \pm 0,04
100	0,10	-0,03	0,49	0,2 \pm 0,3
Antiandrogene Aktivität				
DHT 100/10000	0,6	0,7	0,8	0,7 \pm 0,1
DHT 100/1000	0,8	0,5	0,8	0,7 + 0,2
DHT 100/100	0,6	0,5	0,7	0,6 \pm 0,1
DHT 100/10	0,5	0,6	0,7	0,6 \pm 0,1
DHT 100/1	0,5	0,6	0,8	0,6 \pm 0,1

Untersuchung von Linuron M1 auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert \pm Standardabweichung	
Androgene Aktivität		
10000	-0,18	0,19
1000	-0,07	0,28
100	-0,06	0,09
Antiandrogene Aktivität		
DHT 100/10000	0,9	1,0
DHT 100/1000	1,0	0,8
DHT 100/100	0,9	0,9
DHT 100/10	1,1	1,0
DHT 100/1	1,2	1,2

Untersuchung von DCA auf androgene bzw. antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Mittelwert \pm Standardabweichung	
Androgene Aktivität		
10000	-0,04	-0,01
1000	-0,11	-0,02
100	-0,19	-0,05
Antiandrogene Aktivität		
DHT 100/10000	0,9	1,0
DHT 100/1000	1,1	0,9
DHT 100/100	0,9	0,6
DHT 100/10	0,7	0,6
DHT 100/1	0,7	0,6

Untersuchung von DDE auf antiandrogene Aktivität

Konzentration [nM]	Antiandrogene Aktivität				Mittelwert ± Standardabweichung
DHT 100/10000	0,0	0,1	0,5	0,4	0,3 ± 0,2
DHT 100/1000	0,0	0,3	0,6	0,3	0,3 ± 0,2
DHT 100/100	0,04	0,3	0,3	0,7	0,4 ± 0,2
DHT 100/10	0,0	0,8	0,3	0,4	0,4 ± 0,2
DHT 100/1	0,59		1,0	1,0	0,8 ± 0,2

Veröffentlichungen

Daniela Seng, Anette Höll, Bernd Mußler und Gerhard Eisenbrand

Wechselwirkungen von östrogenaktiven Chemikalien und Phytoöstrogenen mit den Östrogenrezeptoren alpha und beta
42. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz
13. – 15. März 2001

Anette Höll, Sabine Guth und Gerhard Eisenbrand

Identification of the androgenic/antiandrogenic potential of linuron and its metabolites
43. Frühjahrstagung der DGPT in Mainz
12. - 14. März 2002

Anette Höll, Sabine Guth und Gerhard Eisenbrand

Investigation of the antiandrogenic potential of xanthohumol, the major prenylated flavonoid of *Humulus lupulus*
DFG-Symposium Senate Commission on Food Safety: "Functional Food: Safety Aspects"
Karlsruhe, Federal Research Centre for Nutrition, May 5th till 7th, 2002

Dank

Mein Dank gilt allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dem Land Rheinland-Pfalz für die Gewährung des Landesgraduierten-Stipendiums zur Zwecke der Promotion.

Prof. Dr. Becker, Universität Saarbrücken, der mir Xanthohumol zur Untersuchung auf hormonelle und antihormonelle Aktivität zur Verfügung stellte.

Bei Prof. Vollmer und Prof. Sumpter möchte ich mich für die transfizierten Hefezellen bedanken.

Dr. Dirk Kohlmüller Konderklinik Heidelberg, der es mir ermöglichte die Headspace-GC Messungen in seinem Kartoffelkeller durchzuführen. Ich danke ihm und seinen Mitarbeitern für die herzliche Aufnahme und Integration in ihre Arbeitsgruppe.

Ich möchte den Mitgliedern des Arbeitskreises Schrenk für die Unterstützung bei diversen Problemchen und Problemen, sowie für die Nutzung ihrer UV-Lampe danken

Dr. C. Janzowski für ihr offenes Ohr und die Verbreitung eines guten Arbeitsklimas.

Bei Dr. Evelyn Kim möchte ich mich für die Herberge und Stadtführungen in Heidelberg während meines Aufenthalts bedanken.

Ingrid Hemm und Heike Syring, den unschlagbaren Sekretärinnen, danke ich für ihre Seelsorge und Hilfsbereitschaft im Sekretariat.

Rainer Scheuermann für seine stetig gute Laune im Labor und Kaffeezimmer, für die Einführung des Carombretts, die Adventskalender und für die vielen Grillabende auf dem Grundstück am See.

Aribert Vetter, der alle defekten Geräte, insbesondere den Lumistar Computer, trotz Unkenrufen immer wieder zum Laufen brachte.

Dem Forschungspraktikanten und Diplomanden Ralph Tomsitz danke ich für die Mitarbeit bei der Betreuung des Blockpraktikums im Rahmen seiner Diplomarbeit.

Sandra Schäfer danke ich für die hervorragende Zusammenarbeit im Labor und die großen Portionen Nervennahrung, die sie sich vom Munde absparte.

Dr. Bernd Mußler möchte ich für seine Hilfsbereitschaft bei diversen schriftstellerischen Tätigkeiten und die Vermittlung eines etwas anderen Blickwinkels auch aus Ludwigshafen und dem fernen Basel danken.

Dr. Daniela Seng danke ich für die perfekte Einführung in die praktischen Arbeiten und die außerordentliche Betreuung während meines Forschungspraktikums.

Des weiteren möchte ich Dr. Sabine Guth, Dr. Sonja Böhm und Christine Knerr für die Zusammenarbeit danken.

Dr. Monika Kemeny, Michael Habermeyer, Sandra Vatter, Melanie Kern, Dr. Gudrun Pahlke, Dr. Sandra Jakobs und Dr. Matthias Baum für gute Zusammenarbeit im Bau 56.

Frankie Hippe für die Hilfe bei Mikrosomenpräparation und Betreuung des entsprechenden Blockpraktikums.

Dr. Karl-Heinz Merz für die Hilfe bei Problemen mit verschiedensten Strukturformeln.

Den Bewohnern des roten Wohnheims, die am Wochenende bei uns zum Essen weilten.

Bei Dr. Sandra Jakobs und Dr. Sabine Guth möchte ich mich für die kritische Durchsicht des Manuskripts bedanken. Mein Dank gilt allen, die die Arbeit ein erstes, zweites oder drittes Mal gelesen haben.

Insbesondere geht mein Dank an Hennie Kamp und Christoph Müller für ihre Freundschaft, für gemeinsame Feiern, Feste, Abendessen, Toxkursaufenthalte und vieles mehr.

Hennie, danke dass Du mich immer wieder, wenn es nötig war aufgebaut hast, für Dein offenes Ohr bei jeglichen Problemen, für die Gespräche und Diskussionen zu später Stunde.

Christoph, behalte Deine ausgeglichene Art, Deine Ruhe, Deine Fähigkeit mit mir lange zu telefonieren und Dir meine Probleme anzuhören. Danke für sofortige Reparaturen des Lumistar.

Silke Kamp und Vera Müller-Ruprecht für ihre Kochkünste, die ich in Dansenberg genießen durfte, für Eure Freundschaft und die gemeinsamen Aufenthalte im Warmfreibad.

Meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Pateneltern, die mir während meines Studiums und der Promotion eine Oase bei meinen Besuchen geschaffen haben.

Helwig, der meine Anfälle mit Gleichmut ertragen hat, und mich in Krisen beruhigte.

Zum Schluss möchte ich mich bei allen bedanken, die ich vergessen habe.

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name: Anette Höll
Adresse: Steinstr. 41
67657 Kaiserslautern
Geburtsdatum: 28.06.1976
Geburtsort: Köln
Familienstand: ledig
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1982 – 1983 Karlschule Tuttlingen
1983 – 1986 Schrotenschule Tuttlingen
1986 – 1995 Immanuel-Kant-Gymnasium Tuttlingen mit Abitur

Hochschulbildung

10/1995 – 09/1999 Studium der Lebensmittelchemie an der Universität Kaiserslautern
10/1999 – 03/2000 Diplomarbeit an der Universität Kaiserslautern bei Prof. Dr. G. Eisenbrand

Promotion

05/2000 – heute Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie, Fachbereich Chemie, Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand
Thema: Einfluss des Metabolismus auf die hormonelle bzw. antihormonelle Aktivität von endokrinen Disruptoren an ausgewählten Beispielen