

**Etablierung von *in vitro* Methoden
zur Erfassung von endokrinen Disruptoren**

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

vorgelegt von
Dipl.-Lebensmittelchemiker
Bernd Mußler

Betreuer: Prof. Dr. G. Eisenbrand

Kaiserslautern 1999

Tag der wissenschaftlichen Aussprache: 05. März 1999

Prüfungskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Wortmann

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Eisenbrand

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dr. Schrenk

Die vorliegende Arbeit entstand zwischen Januar 1993 und Dezember 1998
im Fachbereich Chemie der Universität Kaiserslautern

Herrn Prof. Dr. Eisenbrand danke ich für die Überlassung des interessanten
Themas, sowie für seine wohlwollende Unterstützung und ständige
Diskussionsbereitschaft während meiner Promotion.

Herrn Prof. Dr. Dr. Schrenk danke ich für die Übernahme des Koreferates.

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Beobachtungen an Wildtierpopulationen	1
1.2	Epidemiologische Beobachtungen	4
2	Wissenschaftlicher Kenntnisstand zum Verhalten von endokrinen Disruptoren und möglicher Gefährdungssituationen für den Menschen	8
2.1	Definition endokriner Disruptoren	8
2.2	Kenntnislücken und Bewertungsprobleme	8
2.3	Forschungsbedarf	10
2.4	Potentielle endokrine Disruptoren	12
2.4.1	Alkylphenole bzw. Alkylphenoethoxylate (z. B. Nonylphenol, Octylphenol)	13
2.4.2	Bisphenol A ähnliche Diphenylalkane	14
2.4.3	Phthalate	15
2.4.4	Pflanzenschutzmittel	17
2.4.5	Antiandrogen aktive Verbindungen	18
2.4.6	Phyto- und Mykoestrogene	19
2.4.7	Natürliche und synthetische weibliche Sexualhormone	22
2.5	Versuche zur Systematisierung der Strukturheterogenität von endokrinen Disruptoren	24
2.6	Molecular Modeling	25
2.6.1	Kraftfeldmethoden	26
2.6.2	Konformationsanalyse	29
2.6.3	Pharmakophorhypothese	30
2.6.4	Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR)	32
2.6.5	Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)	33
2.7	Pharmakologischer Hintergrund	37
2.7.1	Pharmakologie des endokrinen Systems	37
2.7.2	Regulationsmechanismen	39
2.7.3	Regelkreis mit negative-feedback am Beispiel GnRH - LH - Testosteron	39
2.7.4	Hypothalamische Freisetzungs- und Hemm-Hormone	40
2.7.5	Hormone des Hypophysenvorderlappens (Gonadotropine)	40
2.8	Sexualhormone	41

2.8.1	Biosynthese der Steroide	41
2.8.1.1	Androgene	43
2.8.1.2	Estrogene	43
2.8.1.3	Gestagene	44
2.9	Estrogenmetabolismus	44
2.9.1	Beeinflussung des metabolischen Abbaus von Estrogenen durch exogene Liganden	47
2.10	Blutplasmaproteine und ihr Einfluß auf das estrogene Potential von Hormonen	49
2.11	Steroidhormonrezeptoren	55
2.11.1	Hormonbindende Domäne (HBD, Region E)	56
2.11.2	DNA-bindende Domäne (DBD, Region C)	57
2.11.3	Genaktivierende Domäne (Region A/B)	58
2.11.4	Heatshockproteine und ihr Einfluß auf die Funktion von Steroidhormonrezeptoren	58
2.11.5	Lokalisierung der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle	60
2.11.6	Steroidhormonrezeptor kontrollierte Zielgene	61
2.11.6.1	Responsive Element (RE)	61
2.11.6.2	Interaktion des Glucocorticoidrezeptors mit der Long-Terminal-Repeat-Sequenz des Mouse Mammary Tumor Virus	62
2.12	Mechanismus der Transkriptionsaktivierung	67
2.12.1	Zelluläre Mechanismen und ligandspezifische Einflüsse auf die molekularen Mechanismen der Funktion von Estrogenrezeptoren	69
2.12.2	Struktur und Funktion von Cofaktoren während des Transkriptionsprozesses	70
2.13	Zelllinien	72
2.13.1	COS-7 Zelllinie	72
2.13.2	MFM-223 Zelllinie	72
2.13.3	MCF-7 Zelllinie	73
2.13.4	MCF-7-Luciferase (MVLN-C15)	73
2.13.5	LeC9/CAT-Zelllinie	74

3	Problemstellung	75
4	Ergebnisse und Diskussion	77
4.1	Kultur und Therapieansätze von primären menschlichen Prostatakarzinomxenografts auf der Nacktmaus	77
4.1.1	Ansätze zum verbesserten und stabileren Wachstum der humanen Xenografts auf der Nacktmaus	78
4.2	Etablierte <i>in vitro</i> Testsysteme	82
4.2.1	E-Screen -Assay	82
4.2.2	Reportergene	84
4.2.2.1	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)	85
4.2.2.1.1	Prinzip des LeC9-CAT-Zellsystems	86
4.2.2.1.2	Nachweismethoden	88
4.2.2.2	Luciferase (Luc)	89
4.2.2.2.1	Prinzip des MCF-7-Luc-Systems	89
4.2.2.2.2	Nachweismethode	90
4.2.3	Band-Shift-Assay (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay)	92
4.2.3.1	Diskussion des Band-Shift-Verfahrens	94
4.3	Prüfstrategie zur Identifizierung und Charakterisierung endokriner Disruptoren	95
4.4	Validierung des Transaktivierungsassays	97
4.4.1	Validierung des Estradiolantagonismus durch ICI 182 780	98
4.4.2	Validierung des Estradiolantagonismus durch Tamoxifen	99
4.5	Auswertelgorithmen zur verbesserten relativen Einordnung der estrogen aktiven Xenobiotika	101
4.6	Phyto- und Mykoestrogene	114
4.6.1	Bestimmung der Reportergeninduktion durch Phytoestrogene	114
4.6.2	Bestimmung des endokrinen Potentials von Pflanzenextrakten	121
4.6.3	Bestimmung der Reportergeninduktion durch Zearalenon	122
4.7	Alkylphenolanaloga	125
4.8	Verbindungen mit Strukturhomologien zu Alkylphenolen	131
4.9	Styrol und Methoxystyrol	135
4.9.1	Vergleich der meßbaren estrogen agonistischen Aktivität im Reportergenassay und dem Wachstumsassay	137
4.10	Weitere Analoga zu Alkylphenolen	139

4.11	Stilbene	141
4.11.1	Prüfung von Stilbenderivaten natürlichen Ursprungs	141
4.11.2	Weitere Verbindungen mit Stilbenteilstrukturen	145
4.11.3	Unterschiede in der Charakteristik der Induktion des zellulären Endpunktes bei Resveratrol	149
4.12	Bisphenole	150
4.13	Benzophenone	159
4.14	Antiandrogen-aktives Dicarboximid-Fungizid Vinclozolin	164
4.15	Phenylharnstoffderivate	166
4.16	Widersprüchliche endokrine Aktivität in <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> Untersuchungen	170
4.17	Erarbeitung von strukturellen Eigenschaften möglicher Androgenrezeptorantagonisten	176
4.18	Diskussion der erarbeiteten Ergebnisse und des derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstandes über endokrine Disruptoren	184
4.19	Versuch eines "risk assessment" für verschiedene endokrine Disruptoren	191
5.	Zusammenfassung	199
6	Material und Methoden	202
6.1	Zellkultur	202
6.2	Isolierung von Kernproteinen	206
6.3	Band-Shift	208
6.4	3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin-11-ddUTP	212
6.5	BCA-Protein-Assay	215
6.6	CAT-ELISA-Assay	216
6.7	Luciferase-Assay	219
6.8	E-Screen-Assay (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay)	221
6.9	Transformation prokaryontischer Zellen	222
6.10	Transformation von kompetenten E. coli-Zellen	225

6.11	Isolierung von Plasmiden	227
6.12	Transfektion eukaryontischer Zellen	230
6.13	Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen	233
7	Literatur	234

1 Einleitung

Im Laufe der letzten Jahre ergaben wissenschaftliche Beobachtungen, daß verschiedene anthropogene Umweltkontaminanten, auch als endokrin wirksame Substanzen oder „endocrine disruptors“ bezeichnet, einen negativen Effekt auf das Reproduktionsvermögen von wildlebenden Tierpopulationen haben können. Für eine Reihe von Umweltkontaminanten, zuerst hauptsächlich in aquatischen Systemen beschrieben, wird vor allem eine estrogene Wirkung auf den Organismus diskutiert. In einigen Wildtierspezies, wie Alligatoren (Guillette, 1994), Seevögeln (Fry, 1981), Fischen (Jobling, 1993) und Mollusken (Bryan, 1986) wurde das Auftreten von strukturellen Geburtsfehlern der primären Geschlechtsorgane, Verhaltensanomalien beispielsweise während der Brutpflege und eine Verschiebung des Geschlechtergleichgewichtes bereits beschrieben.

1.1 Beobachtungen an Wildtierpopulationen

Veränderungen der hormonellen Homöostase in Wildtieren können sich durch eine Verweiblichung der Organismen, eine herabgesetzte Fertilität, ein verändertes Brutverhalten, eine geringere Lebenserwartung der Nachkommenschaft, in verändertem Sexualverhalten und veränderten Hormonkonzentrationen im Blut äußern (Colborn, 1992; Colborn, 1993).

Erste Hinweise auf schädigende Einflüsse von Chemikalien auf die strukturelle und funktionelle Entwicklung von hormonell kontrolliertem Gewebe ergaben sich bereits in den frühen 80er Jahren durch Beobachtungen mariner Schnecken (Smith, 1981; Bryan, 1986). Die schädigenden Einflüsse können teilweise zur Imposex- und Intersexentwicklung der Schnecken führen (Vermännlichung weiblicher Vorderkiemerschnecken; Mathiessen und Gibbs, 1998). Als Ursache gelten organische Tributylzinn-Verbindungen. Tributylzinn ist das "antifowling" Agens in Schiffs- und Bootsfarben, die zum Schutz vor Verrotten der Holzteile durch den Angriff mariner Kleinorganismen mit Tributylzinn enthaltenden Anstrichen geschützt werden. Bereits die geringe Konzentration von 1 ng/l führt bei Meeresschnecken zu

diesen beschriebenen Effekten. Obwohl seit 1991 ein Verbot des Einsatzes von Tributylzinn bei Booten mit einer Länge < 25 m besteht, zeigen viele untersuchte Meeresgebiete, besonders Küstenstreifen mit hoher Industrialisierung und erheblichem Schiffsverkehr einen durchschnittlichen Gehalt von 6-8 ng/l Tributylzinn (Fox, 1991).

In der Literatur finden sich weitere Hinweise darauf, daß Organochlorverbindungen mögliche Estrogenrezeptorliganden darstellen (Colborn, 1995). Diese Berichte beruhen ursprünglich auf Beobachtungen wie z. B. am Lake Apopka in Florida, in den als Folge eines Chemieunfalls Anfang der 80er Jahre sehr hohe Gehalte an DDT und Dicofol eingetragen wurden.

In diesem speziellen Fall, aber auch in stark mit Schadstoffen belasteten Gewässern, den großen Seen in den USA, wurden negative Effekte auf das Reproduktionsvermögen von Wildtieren, das Aufzuchtverhalten sowie Verschiebungen der Geschlechterverhältnisse bei Vögeln und Fischen beobachtet, gleichzeitig wurden hohe Gewebespiegel an verschiedenen Organochlorverbindungen gemessen.

Im Lake Apopka wurden vermehrt Veränderungen der primären Geschlechtsorgane bei Alligatoren beobachtet, die einen erheblichen negativen Einfluß auf die Reproduktionsfähigkeit der Population zeigten (Guillette, 1994). Es konnten pathophysiologische Einflüsse auf den gesamten Organismus der hauptsächlich betroffenen Alligatoren festgestellt werden; dabei zeigten sich sowohl strukturelle als auch funktionelle Schäden vor allem der primären Geschlechtsorgane (Guillette, 1995). Die vorliegenden Daten lassen vermuten, daß eine frühe Einflußnahme bereits *in ovo* vorliegt. Untersuchungen der Environmental Protection Agency (EPA) der USA ergaben für 1994, also 14 Jahre nach dem Unfall, Konzentrationen von 1,6 - 8,5 mg/kg p,p'-DDE im Körperfett und 0,013 - 0,17 mg/kg p,p'-DDE in der Leber junger Alligatoren (Guillette, 1995; Miljobericht, 1995).

An Fischen aus Gewässern in der Nähe der Abläufe von Papierfabriken (Howell, 1989) wurden Abwasser induzierte Verweiblichungseffekte beobachtet. Die Belastung der Abwässer durch Ligninbegleitstoffe mit möglicher hormoneller Wirkung wie Stigmastanol, Sitosterol sowie Lignane werden hierfür verantwortlich gemacht (Howell, 1989; McLatchy, 1995).

Von Jobling und Sumpter (1993) wurde die Induktion der Vitellogeninsynthese in männlichen Fischen in Gewässern unterhalb kommunaler Kläranlagenzuläufen beschrieben.

Vitellogenin ist ein Protein, das physiologisch nur in der Leber oder im Ovar weiblicher Fische unter Estrogenkontrolle gebildet wird. Männliche Tiere bilden Vitellogenin nach Estrogenexposition. Die Bildung von Vitellogenin in männlichen Fischen kann somit als Bioindikator für eine umweltrelevante estrogene Aktivität herangezogen werden. *In vitro* Untersuchungen an Forellenhepatozyten ergaben eine Dosis-Wirkungsbeziehung zwischen Estrogenkonzentration und Vitellogeninbildung. Mit Hilfe dieses *in vitro* Systems konnten die Autoren zeigen, daß hauptsächlich Metabolite von Alkylphenoethoxylaten (s. u.), das sind Hauptbestandteile von Detergentien, hierfür verantwortlich waren. Zusätzlich wurden von den Autoren reporter-gen-exprimierende Zellmodelle eingesetzt, womit die Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Fischexperimente verifiziert werden konnten.

1.2 Epidemiologische Beobachtungen

Gegenwärtig ist nicht auszuschließen, daß die Exposition gegenüber endokrinen Disruptoren auch beim Menschen zu Störungen der hormonellen Regulation und damit zu gesundheitlichen Schädigungen oder Verhaltensanomalien führen kann (UBA, 1995). In diesem Zusammenhang werden Ergebnisse einer Reihe epidemiologischer Studien diskutiert. So zeigte eine Metanalyse von Carlsen, 1992, von Studien mit mehr als 35 000 Männern, teilweise eine Beeinträchtigung der männlichen Fertilität als Folge einer Reduktion der Spermienzahl und -qualität. Allerdings sind diese Untersuchungen wegen der Unzulänglichkeit der verwendeten Methoden stark kritisiert worden. Weitere Autoren konnten den Trend der herabgesetzten Spermienzahl und -qualität bestätigen (Auger, 1994; Swan, 1997). MacLeod und Wang, 1979, konnten dagegen keine Abnahme der Spermienzahl seit 1951 feststellen. Die Relevanz der Spermienzahl und -qualität als Indikator für eine mögliche Einflußnahme von endokrinen Disruptoren auf die menschliche Gesundheit bleibt umstritten. Neben den analytisch-methodischen Problemen ergeben sich zusätzlich mathematisch-statistische Schwierigkeiten, die auf Basis gleicher experimenteller Daten zu einem gegensätzlichen Ergebnis der epidemiologischen Studien führen können (Swan, 1997).

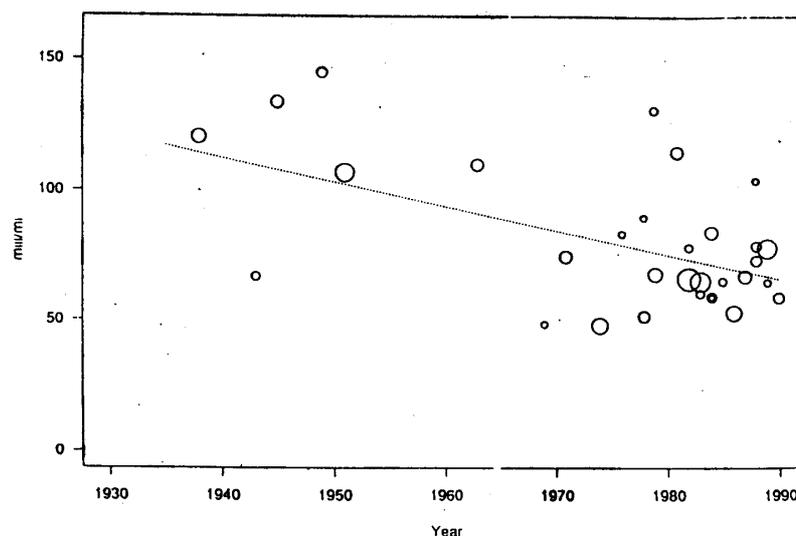


Abb. 1-1: Graphische Darstellung beobachteter Spermienzahlen bei gesunden Männern über die letzten Jahrzehnte (Miljøprojekt Nr.290,1995)

Eindeutig belegt ist jedoch eine deutliche Zunahme der Inzidenz von Hodentumoren vor allem bei jungen Männern (Miljøprojekt Nr. 290, 1995). Ob Hinweise auf erhöhtes Auftreten von Entwicklungsstörungen wie Hypospadiе (offene Harnleiter; WHO,1991) und Kryptorchismus (Hodenhochstand; Campbell, 1987) mit einer möglichen (eventuellen frühkindlichen oder in utero) Exposition durch hormonell aktive Stoffe in einen Zusammenhang gebracht werden können, bleibt gegenwärtig offen.

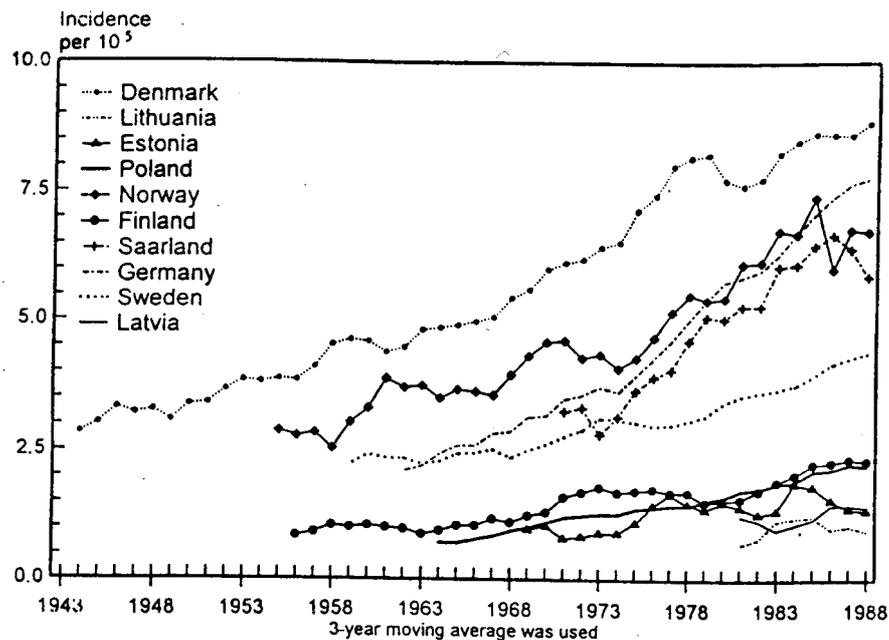


Abb. 1-2: Graphische Darstellung der Hodenkrebsinzidenzen bei Männern im Alter von 25 - 40 Jahren im Verlauf der letzten Jahrzehnte (Adami, 1994)

Verschiedene Autoren diskutieren einen indirekten Zusammenhang zwischen der Exposition des Menschen gegenüber Organochlorpestiziden, mit dem Hauptaugenmerk auf DDT und seinen Metaboliten, und dem erhöhten Risiko, an malignem Brustkrebs zu erkranken. Davis und Bradlow, 1995, machen vor allem den Einfluß der Organochlorverbindungen auf das Verhältnis 16- α -Hydroxyestron (potentiell aktiverer Metabolit) zu 2-Hydroxyestron (potentiell weniger aktiver Metabolit) im Organismus, was zu einem stärkeren estrogenen Potential der endogen zirkulierenden Estrogene und damit zu erhöhten mitogenen Stimuli

möglicher maligner Brustzellen führen könnte, für die geringe Zunahme der Brustkrebsinziden in westlichen Ländern verantwortlich.

Auf den ersten Blick unterstützen ältere epidemiologische Studien diese Hypothese (Kohlmeyer, 1997). Retrospektive Fall-Kontroll Studien zeigen tatsächlich eine positive Korrelation zwischen Organochlorpestizidexposition und der Brustkrebserkrankung (Falck, 1992, Wolff, 1993; Dewailly, 1994). Hauptkritikpunkt an diesen Studien ist, neben offenen methodischen Fragen, die geringe untersuchte Fallzahl (35-229 Fälle/Studie).

Neuere Untersuchungen mit höheren Fallzahlen (300-606 Fälle/Studie) und einer Studienbegleitung bis zu 14 Jahren vor der Brustkrebsdiagnose können die oben aufgeführten Ergebnisse nicht bestätigen. (Krieger, 1994; Sutherland, 1996). Krieger, 1994, konnte jedoch bei weißen Amerikanerinnen und Afroamerikanerinnen durchaus eine positive Korrelation zwischen DDE-Serumspiegel und erhöhtem Brustkrebsrisiko nachweisen, während erhöhte DDE Gehalte bei Asiatinnen anscheinend protektiv wirkten.

Zum jetzigen Zeitpunkt scheint ein Zusammenhang zwischen Pestizidexposition und der Entwicklung von Brustkrebs aufgrund der vorliegenden Daten nicht gegeben. (Kohlmeyer, 1997).

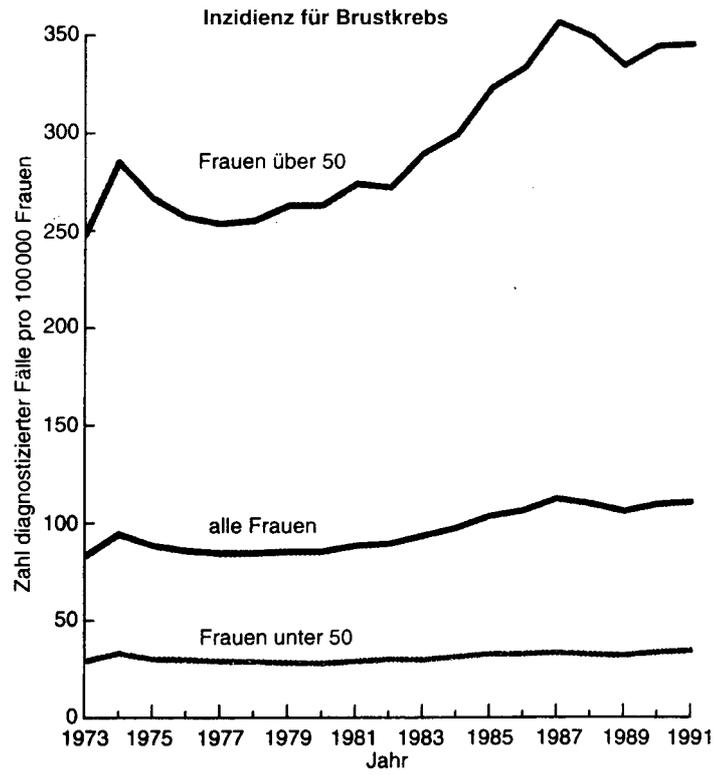


Abb. 1-3: Entwicklung der Brustkrebsinzidenzen bei Frauen in den USA in den letzten Jahren (Davis, 1995)

2 Wissenschaftlicher Kenntnisstand zum Verhalten von endokrinen Disruptoren und möglicher Gefährdungssituationen für den Menschen

Auf Basis der Epidemiologie und den Beobachtungen an Wildtierpopulationen ergeben sich vielfältige Fragen zur Risikoabschätzung möglicher endokriner Disruptoren.

2.1 Definition endokriner Disruptoren

Nach einer Definition der US-Umweltschutzbehörde (EPA) sind endokrine Disruptoren exogene Agenzien, die Bildung, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Aktivität oder Elimination endogener, natürlicher Hormone, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase und der Regulation von Entwicklungsprozessen verantwortlich sind, nachteilig beeinflussen.

2.2 Kenntnislücken und Bewertungsprobleme

Schädigende Wirkungen von endokrinen Disruptoren können möglicherweise vielfältige pathologische Situationen induzieren. Die Bewertung eines möglichen schädigenden Potentials hormonell aktiver Verbindungen wird durch die Komplexität der molekularen Wirk- und Regulationsmechanismen erschwert. Viele gegenwärtig diskutierte Befunde beruhen auf *in vitro* Versuchen. Die Aussagekraft dieser Tests für die komplexe physiologische Situation ist jedoch nicht ausreichend abgesichert. Es fehlen standardisierte und validierte Testmethoden, die vor allem hinsichtlich der Korrelation mit der *in vivo* Situation verlässlich sind.

Die etablierten toxikologischen *in vivo* Untersuchungen sind zwar entsprechend validiert und standardisiert, erfassen aber möglicherweise nicht alle Aspekte hormoneller Wirkungen. Besonders wird diskutiert, ob mögliche Wirkungen von endokrinen Disruptoren während bestimmter Zeitabschnitte der prä- und postnatalen

Entwicklung empfindlich genug mit den etablierten toxikologischen *in vivo* Untersuchungen erfaßt werden können. Weitere Kenntnislücken bestehen aber auch hinsichtlich zeitlich weitreichender Differenzierungs- und Regelprozesse, deren Prägung beispielsweise während der frühkindlichen Entwicklung abläuft, deren Folgen jedoch erst im Erwachsenenalter feststellbar sind.

Das pharmakokinetische Verhalten einschließlich der Plasmaproteinbindung ist für viele hormonell aktive Stoffe nicht ausreichend untersucht. Weiterhin mangelt es an geeigneten und sensitiven Biomarkern, die auch für einen klinischen Einsatz denkbar wären.

Effekte von endokrinen Disruptoren auf Enzyme, die für die Biogenese und Biotransformation von Hormonen, aber auch von Fremdstoffen eine Rolle spielen, sind bislang nur punktuell untersucht.

Nachdem *in vitro* nicht reproduzierbare synergistische Wirkungen von endokrinen Disruptoren für viel Aufmerksamkeit gesorgt hatten, bleibt die Frage nach additiven oder synergistischen Effekte solcher Verbindungen *in vivo* weiterhin ungeklärt. Bislang vorliegende Ergebnisse sind teilweise widersprüchlich.

Für eine wissenschaftliche Risikoabschätzung muß außer additiven, überadditiven oder auch antagonistischen Effekten verschiedener Kombinationen unterschiedlicher Liganden auch berücksichtigt werden, daß solche Wirkungen auch qualitativ unterschiedlich ausfallen können, je nach Konzentration und Mengenverhältnis der Einzelkomponenten.

So besteht außerdem die Möglichkeit, daß derselbe Ligand je nach Gewebe unterschiedliche Rezeptoren bzw. akzessorische, transkriptionsrelevante Proteine und als Folge daraus unterschiedliche Gene aktiviert.

Prädiktive Aussagen über das Verhalten eines Stoffes aufgrund von Struktur-Wirkungsbeziehungen können bisher kaum aufgestellt werden. Bereits kleine Veränderungen am Molekül können erhebliche Änderungen in der Wirkcharakteristik sowohl rezeptorvermittelter als auch nicht-rezeptorvermittelter Vorgänge bewirken. Daher ist gegenwärtig nur eine Fall-zu-Fall-Prüfung der Einzelsubstanzen durchführbar.

Einen Ansatz zur Systematisierung und zur Identifikation endokriner Disruptoren bieten molecular modeling Verfahren, die das Erarbeiten von Strukturanforderungen ermöglichen. Durch Kombination von Berechnungen von Moleküleigenschaften und der mathematischen Beschreibung der Wirkcharakteristik kann eine Verifikation oder

Falsifikation einer Struktur-Wirkungsanalogie bereits am theoretischen Modell der neu identifizierten Einzelverbindung mittels linearer Regression erfolgen. Zusätzlich bieten molecular modeling Verfahren nach der Ermittlung einer "Leitstruktur" die Möglichkeit, mittels einer strukturelementgeleiteten Datenbanksuche Verbindungen, die bislang nicht als hormonell / antihormonell aktive Verbindungen bekannt sind, als solche zu identifizieren.

Neben weitgehend stofflich begründeten Problemen ergeben sich vielfältige Fragen zu bislang unzureichend verstandenen pathophysiologischen Vorgängen, die mit den möglichen Wirkungen von endokrinen Disruptoren in Zusammenhang gebracht werden. So ist die Ätiologie etwaig verminderter Spermienzahlen, eines vermehrt auftretenden Kryptorchismus oder die erhöhte Inzidenz von Prostata- und Hodenkarzinomen noch weitgehend ungeklärt.

Schließlich fehlen für viele Stoffe Kenntnisse und ausreichend Daten zu möglichen Eintragungspfaden sowie Expositionssituationen des Menschen durch Lebensmittel oder "life style".

2.3 Forschungsbedarf

Neben dieser allgemeinen Nennung von Kenntnislücken werden von nationalen und internationalen Expertengremien konkrete Forschungsaktivitäten gefordert, die das wissenschaftliche Verständnis möglicher schädigender Effekte von endokrinen Disruptoren verbessern sollen. Forschungsbedarf wird vor allem in den Bereichen der Methodik, dem detaillierten Verständnis molekularer Mechanismen, der Expositionserfassung, der Epidemiologie und den verschiedensten Bereichen der Toxikologie (z.B. Reproduktions- oder Entwicklungstoxikologie, etc.) gesehen.

Einen wesentlichen Schwerpunkt soll auch die Etablierung und Validierung sensitiver funktioneller *in vitro* - Systeme zur Detektion einer hormonellen Aktivität einnehmen (OECD, 1996; UBA, 1995; DFG, 1998). Hierzu sollen Untersuchungen zu molekularen Wirkqualitäten durch Erfassung der Beeinflussung der Expression und Funktion hormonabhängiger Promotoren beitragen. Mit standardisierten *in vitro* Verfahren sollen Dosis-Wirkungsbeziehungen und die Quantifizierung der Wirkung im Vergleich zum physiologischen Hormon erarbeitet werden.

In weiteren Untersuchungen sollen eventuelle Kombinationseffekte wie additive, überadditive oder gar synergistische, aber auch antagonistische Wirkungen detailliert untersucht werden.

Die in der vorliegenden Arbeit etablierten Transaktivierungs- und Proliferationsassays können hier einen Beitrag leisten.

Auf Basis dieser Daten müssen *in vivo* Untersuchungen das hormonelle Potential relevanter Verbindungen verifizieren, wobei gegebenenfalls neue oder modifizierte Versuchsanordnungen und Prüfstrategien für einen zuverlässigen Nachweis eventueller hormoneller Wirkungen von Stoffen etabliert werden müssen.

Das Spektrum an potentiellen Wirkungen von endokrinen Disruptoren in verschiedenen Spezies und beim Menschen kann aufgrund spezies-, geschlechts-, aber auch gewebs- und speziesspezifischer Wirkungen außerordentlich vielfältig sein. Ein weiterer, möglicherweise besonders für den Menschen relevanter Gesichtspunkt ist die Wirkung der endokrinen Disruptoren in sogenannten kritischen Zeitfenstern der Individualentwicklung. So werden Einflüsse dieser Xenobiotika während der pränatalen und perinatalen Gewebedifferenzierung als potentielle Ursache z. B. für Funktionsstörungen der primären Geschlechtsorgane, für neuroendokrine Effekte bis hin zu Verhaltensstörungen diskutiert, die sich dann möglicherweise erst nach Jahren im erwachsenen Organismus manifestieren können (UBA, 1997; Mylchreest, 1998; Nagel, 1997).

Für die Exposition des Menschen können Lebensmittel, Bedarfsgegenstände und Trinkwasser als die wesentlichen Eintragspfade endokriner Disruptoren angesehen werden (DFG, 1998). Für Verbindungen mit hormonellem Potential, bei denen die bisherige Datenlage für eine Risikobewertung oder Expositionsabschätzung nicht ausreicht, sollen umfassende Untersuchungen die Expositionssituation näher aufklären.

Auch die quantitative Erfassung des Zusammenhangs zwischen Expositionskonzentration und der jeweiligen Dosis in den entsprechenden Zielgeweben sollte angestrebt werden. Dies umfaßt verschiedene, allgemein in der Toxikologie zu berücksichtigende Bereiche wie Pharmakokinetik, Metabolismus, etc., aber auch die für endokrine Disruptoren spezifischen Fragestellungen wie die Plasmaproteinbindung, die u. a. die Bioverfügbarkeit solcher Stoffe besonders stark beeinflußt.

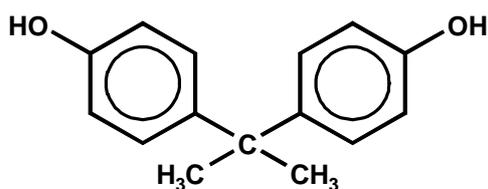
Besonders sensible Gruppen wie Kleinkinder oder Personen mit endokrinabhängigen Krankheiten sollten entsprechend intensiv untersucht werden. Weitere wichtige Forderungen zur Behebung von Kenntnis- und Wissenslücken zur Frage der Wirkungen von endokrinen Disruptoren sind von eher allgemeiner Natur. Diese erfordern erhebliche Anstrengungen in unterschiedlichen wissenschaftlichen Disziplinen wie der Entwicklungsbiologie oder der medizinischen Krebsforschung, so daß mit dem Fortschreiten des Wissens in diesen Gebieten auch neue Erkenntnisse zu Wirkungsmechanismen endokriner Disruptoren zu erwarten sind.

2.4 Potentielle endokrine Disruptoren

In der Literatur finden sich Listen und Verzeichnisse mit teilweise mehreren hundert Einzelverbindungen, die als "endocrine disruptors" bezeichnet werden (Gülden, 1997). Umweltschutzgruppen fordern teilweise, die Prüfung von 30 000 - 70 000 Verbindungen auf mögliche endokrine Effekte (WWF, 1997). Diese Forderungen entbehren einer wissenschaftlichen Grundlage.

Trotzdem erscheint eine umfassende Prüfung für einige Substanzklassen wissenschaftlich begründet und für eine Risikobewertung notwendig.

Einführend sollen Verbindungsklassen vorgestellt werden, die im Verdacht stehen, das menschliche und tierische Endokrinium negativ zu beeinflussen. Einige dieser Verbindungen wurden in dieser Arbeit zur Validierung der neu etablierten Testsysteme eingesetzt. Ausgehend von diesen mehr oder weniger bekannten endokrinen Disruptoren wurde versucht, weitere Strukturanaloga mit möglicherweise ähnlichem Wirkprofil zu ermitteln.



Bisphenol A

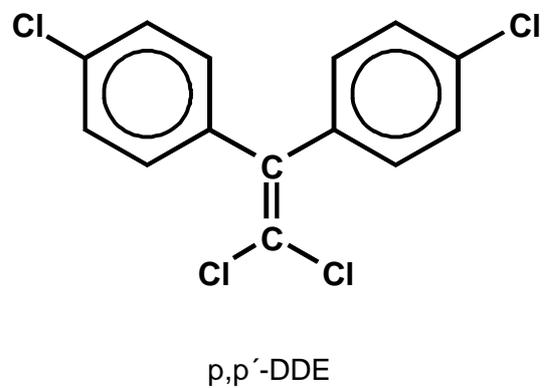
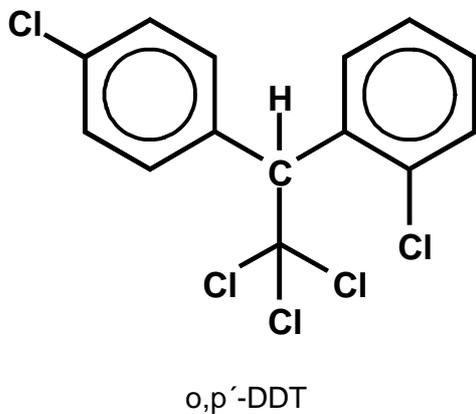
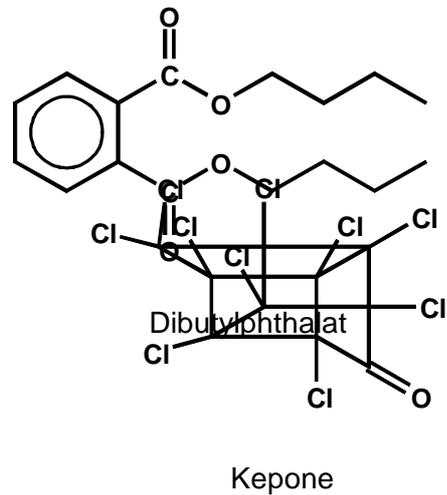
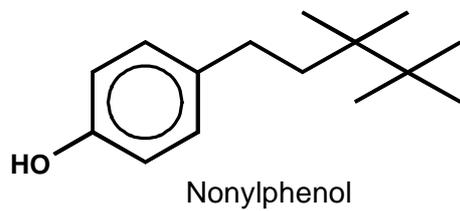


Abb. 2-1: Potentielle endokrine Disruptoren

2.4.1 Alkylphenole bzw. Alkylphenoethoxylate (z. B. Nonylphenol, Octylphenol)

Für Nonylphenol- und Octylphenolisomere, die exemplarisch als Vertreter der Alkylphenoethoxylate (Detergentien) untersucht wurden, ist eine endokrine Wirkung bereits nachgewiesen (Jobling, 1993).

Ursprünglich vermutete man, daß Rückstände oraler Kontrazeptiva, hauptsächlich Ethinylestradiol, für estrogene Wirkungen in Abwässern verantwortlich sein könnten. Parallel durchgeführte Arbeiten von Soto et al., 1991, ließen erkennen, daß

beispielsweise Alkylphenole durchaus für solche estrogenen Wirkungen in Frage kommen könnten.

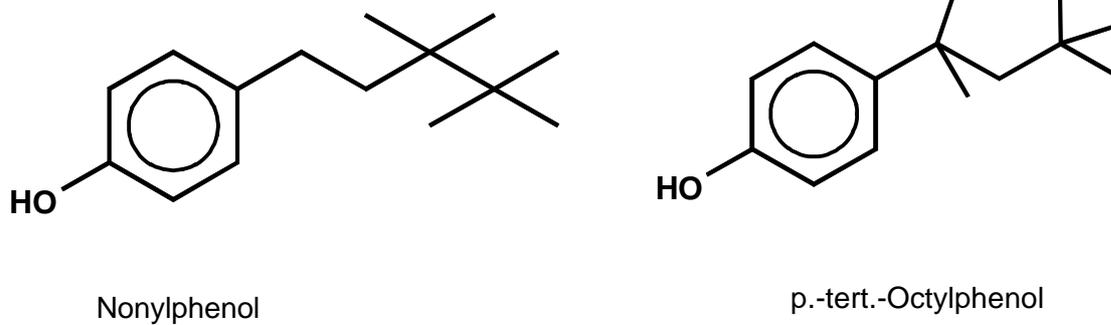
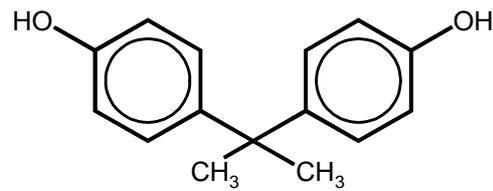


Abb. 2-2: Struktur von Nonylphenol und p.-tert.-Octylphenol

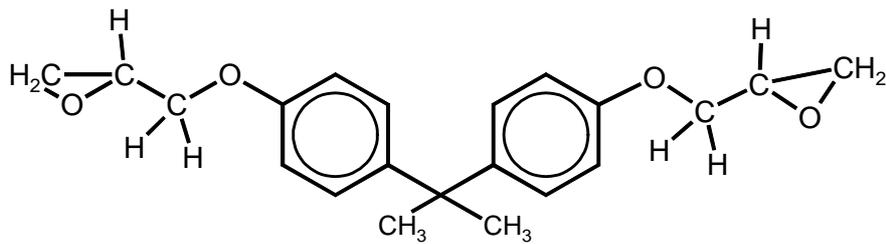
2.4.2 Bisphenol A und verwandte Diphenylalkane

Bisphenol A wird zur Herstellung von Polycarbonaten, Epoxy- und Phenolharzen, Polyester und Polyacrylaten eingesetzt.

Allein für die Herstellung von Polycarbonaten werden jährlich weltweit ca. 700 000 t Bisphenol A hergestellt. Neben Polycarbonaten bieten Epoxyharze, die durch eine Reaktion von Bisphenol A und Epichlorhydrin produziert werden, ausgezeichnete Eigenschaften für einen breiten technischen Einsatz. Sie sind transparent, behalten ihre Form über einen hohen Temperaturbereich (auch für sterilisierbare Materialien) und zeigen eine hohe mechanische Widerstandsfähigkeit. Solche auf Bisphenol A - epoxy-Derivate basierende Beschichtungen werden unter anderem für die Innenlackierung von Konservendosen und anderen Gefäßen, die mit Lebensmitteln in Kontakt kommen, eingesetzt. Außerdem werden solche Epoxyharze für Zahnfüllmaterialien und als Additive zu weiteren Kunststoffmaterialien benutzt.



Bisphenol A



BADGE

Abb. 2-3: Bisphenol A und Bisphenol A-Diglycidylether

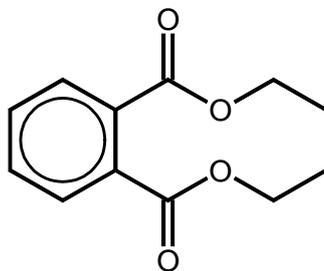
2.4.3 Phthalate

Phthalate könnten durch ihren ubiquitären Einsatz, ihr Vorkommen vor allem in Kunststoffen und ihre humantoxikologische Relevanz eine bedeutende Verbindungsklasse mit endokrinem Potential darstellen. Das Haupteinsatzgebiet von Phthalaten liegt in der Kunststoffproduktion als Weichmacher. Die Ergebnisse bezüglich der endokrinen Wirkung sind widersprüchlich (UBA, 1997). Mittels Reinsubstanzen konnte Harris, 1997, *in vitro* unterschiedliche estrogenen Aktivitäten der Phthalsäureester nachweisen. Aufgrund des ubiquitären Vorkommens in den Umweltkompartimenten und den hohen Biokonzentrationsfaktoren ist eine endokrine Wirkung in verschiedenen Organismen vorstellbar (UBA, 1997). Nach einer Mehrgenerationenstudie von Mylchreest, 1998, scheinen im Gegensatz zur Arbeit von Harris besonders antiandrogene Wirkungen, insbesondere bei Dibutylphthalat

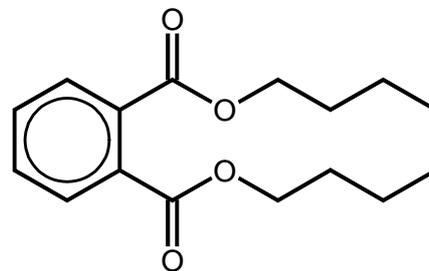
(DBP) bei dem spezifischen Studiendesign des National Toxicology Program (NTP), eine wesentliche Rolle zu spielen.

Dibutylphthalat, das in *in vitro* Assays (Harris, 1997; Ergebnisteil) als estrogen aktiv beschrieben wird, antagonisiert vermutlich während der Gonadendifferenzierung bei *in utero* exponierten männlichen Ratten die Testosteronwirkung, die zur Entwicklung des Wolff'schen Ganges essentiell ist. Der vollständige Mechanismus ist noch nicht abschließend geklärt. Trotzdem lassen sich Parallelen zu klinischen Erfahrungen mit Diethylstilbestrol (DES) ziehen. Aufgrund epidemiologischer Untersuchungen ergab sich für Männer, die *in utero* gegenüber dieser Verbindung exponiert waren, ein nahezu doppeltes Risiko, ein Hodenkarzinom zu entwickeln (Neubert, 1994).

Diese Beobachtungen liefern Anhaltspunkte für das mögliche Auftreten besonders empfindlicher Zeitfenster in der Ontogenese verschiedener Spezies gegenüber der Wirkung von endokrinen Disruptoren.



Diethylphthalat (DEP)



Dibutylphthalat (DBP)

Abb. 2-4: Diethylphthalat und Dibutylphthalat

2.4.4 Pflanzenschutzmittel

Bei der Vielzahl auftretender Pflanzenschutzmittel in verschiedenen Umweltkompartimenten ist bereits für einige Vertreter eine endokrine Wirkung nachgewiesen (z. B. Endosulfan, Dieldrin, Chlordan, o,p'-DDT, p,p'-DDE, etc.). Obwohl für einige dieser Substanzen bereits Anwendungsverbote ausgesprochen wurden (z. B. technisches DDT), sind sie oder die entsprechenden Metaboliten (z. B. p,p'-DDE) in der Umwelt und Lebensmitteln noch nachweisbar und besitzen damit nach wie vor eine Relevanz.

Andere Verbindungen wie z. B. Toxaphen, das in den neuen Bundesländern bis zur politischen Wende eingesetzt wurde, spielen hinsichtlich der Rückstandssituation ebenfalls eine bedeutende Rolle (Vetter, 1997). Die Relevanz der einzelnen Verbindungen ist von Fall zu Fall zu betrachten.

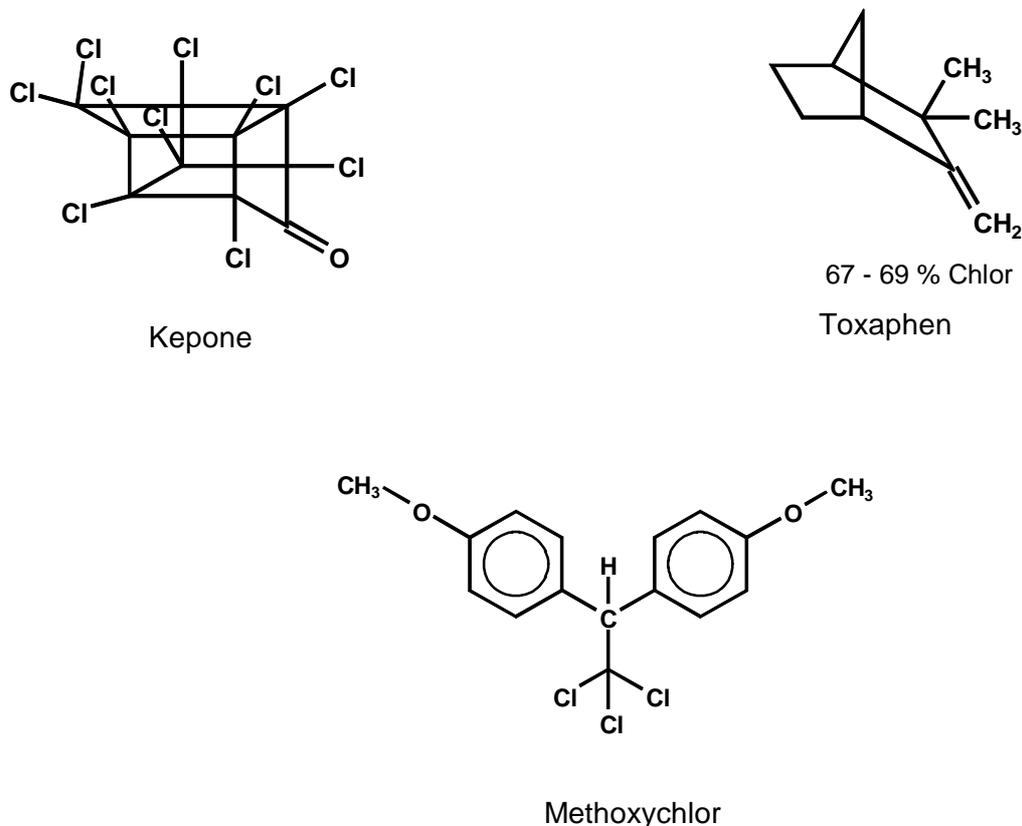


Abb. 2-5: Strukturen einiger Pflanzenschutzmittel mit möglichem endokrinen Potential

Während für o,p'-DDT eine schwache estrogene Wirkung nachgewiesen ist, gilt der Hauptmetabolit p,p'-DDE des technischen DDTs als antiandrogen aktiv. Dieser Effekt wurde jedoch erst 1995 von Kelce et al. beschrieben.

2.4.5 Antiandrogen aktive Verbindungen

Verschiedene Pestizide und Metabolite bilden einen Sonderfall unter den endokrinen Disruptoren, da manche Verbindungen potente Antiandrogene darstellen.

Zu der Zeit, in der die Beobachtungen der Folgen des Unfalls am Lake Apopka dokumentiert wurden, war noch nicht bekannt, daß der Hauptmetabolit von technischem DDT, p,p'-DDE ein sehr potentes Antiandrogen darstellt (Kelce, 1995). Mit diesem Befund ergaben sich mehrere neue Aspekte zu grundlegenden Fragen der Risikobewertung von endokrinen Disruptoren. Einerseits wurde deutlich, daß innerhalb einer Substanzklasse die Ausgangsverbindung estrogen aktiv sein kann und der Hauptmetabolit ein antiandrogenes Verhalten zeigen kann. Andererseits ergab die Identifikation eines potenten Xenoantiandrogens ein neues zellbiologisches Zielprotein, nämlich den Androgenrezeptor. In Anbetracht der Kenntnisse über die feinst austarierte zelluläre Hormonhomöostase, gerade während wichtiger Differenzierungsphasen in der Entwicklung eines Organismus, kompliziert sich die Bewertung des relativen Risikos durch endokrine Disruptoren erheblich. Ein mögliches Szenario wäre eine verstärkte Aktivierung des Estrogenrezeptors durch potentielle Xenoestrogene und die gleichzeitige Repression der Aktivität des Androgenrezeptors. Da sich diese beiden ligandabhängigen Transkriptionsfaktoren in einigen Geweben und Zellen als Gegenspieler gegenüberstehen, kann möglicherweise eine schwache Verschiebung des Gleichgewichts fatale Folgen nach sich ziehen. Desweiteren ergeben sich Fragen zu weiteren Strukturanalogen von p,p'-DDE oder anderen Verbindungen, die ein bisher nicht bekanntes antagonistisches Prinzip darstellen können. Ein solches Beispiel repräsentiert Vinclozolin bzw. der Vinclozolinmetabolit M2, dessen antiandrogenes Potential von Wong, 1995, ebenfalls erstmals beschrieben wurde. Vinclozolin ist ein im Wein- und Erdbeeranbau häufig eingesetztes Fungizid.

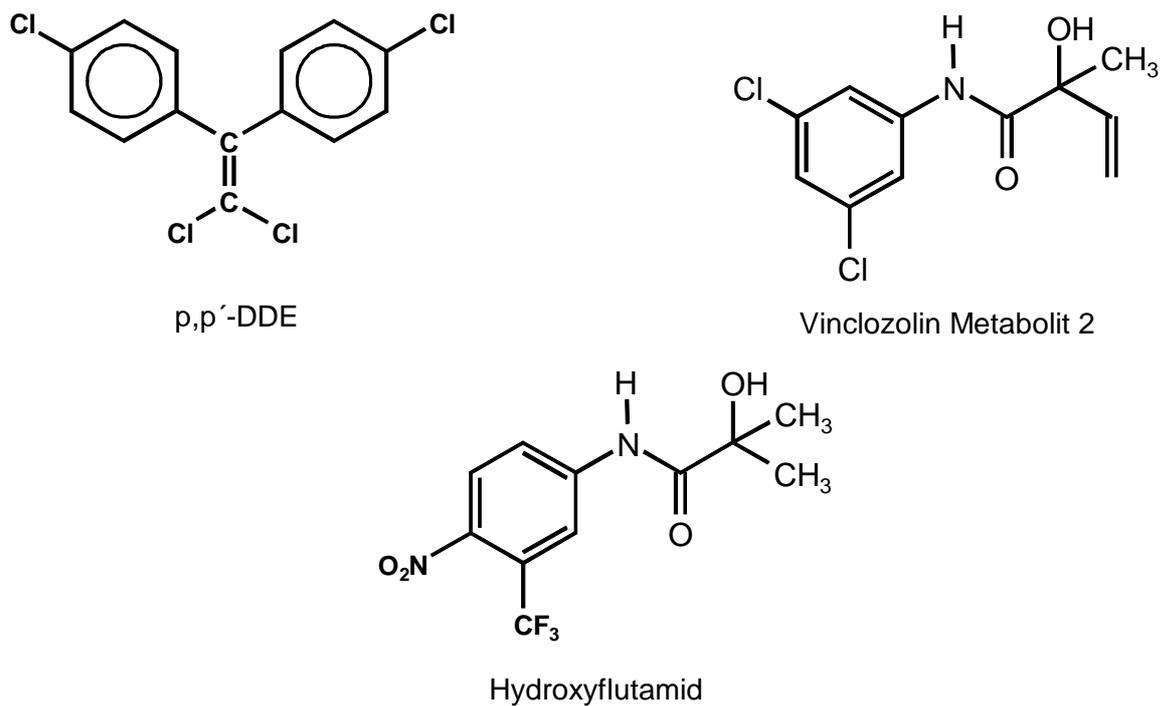


Abb. 2-6: Strukturen beschriebener Antiandrogene

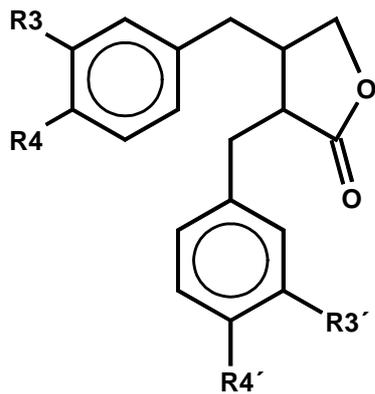
2.4.6 Phyto- und Mykoestrogene

Natürliche Estrogenrezeptorliganden begleiten den Menschen und andere Spezies bereits über die gesamte Evolution der Arten hinweg. Diese natürlichen Estrogenrezeptorliganden werden durch Pflanzen, Pilze oder Mikroorganismen produziert oder verändert. Diese Verbindungen zeigen häufig große strukturelle Ähnlichkeiten mit den als "endocrine disruptors" bezeichneten synthetischen Verbindungen anthropogenen Ursprungs (siehe Ergebnisse).

Phytoestrogene lassen sich in Lebensmittel pflanzlichen Ursprungs wie Sojabohnen, Kräutern und Gewürzen nachweisen. Aus der Tierhaltung sind negative Einflüsse von Inhaltsstoffen (Phytoestrogene) des roten Klees auf die Fertilität von Kühen und Schafen bekannt ("red clover disease"; Moule, 1963). Ähnliche Befunde ergaben auch Beobachtungen bei Hasen, Meerschweinchen und Mäusen nach Verabreichung von verschiedenen Kleearten und Alfalfa (Wright, 1960; Bradbury, 1954). Ebenfalls schädigende Effekte können Mykotoxine wie Zearalenon oder

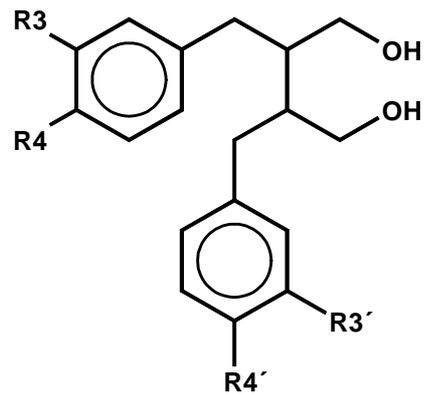
Zearalenol in verschiedenen Tierarten hervorrufen, besonders empfindlich reagiert das Hausschwein (Bradbury, 1960; Mirocha, 1977).

Zusätzlich finden sich in verschiedenen Pflanzenextrakten Ligninabkömmlinge die teilweise aus den verholzten Teilen der Pflanzen stammen. Diese Lignane zeigen ebenfalls schwache estrogene Effekte und kommen in vielen Pflanzen vor.



Enterolakton

R3: OH
 R3': OH
 R4: H
 R4': H

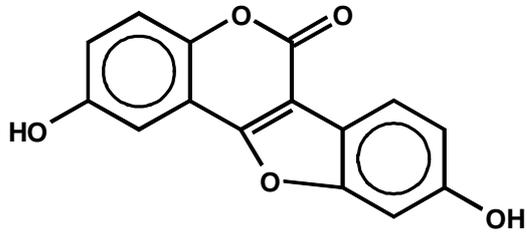


Enterodiol

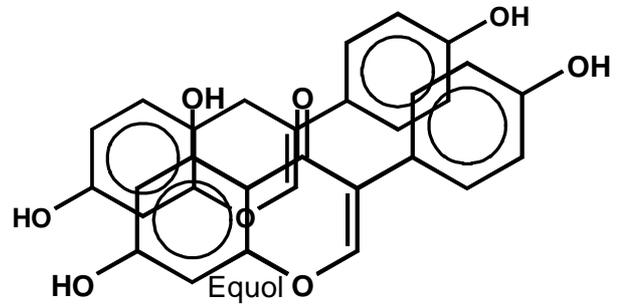
R3: OH
 R4: OH
 R3': H
 R4': H

Abb. 2-7: Struktur von Enterolakton und Enterodiol

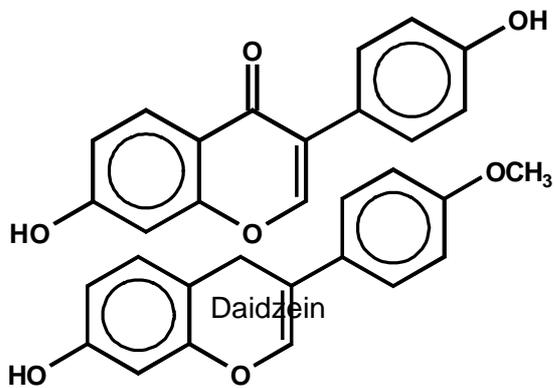
In der vorliegenden Arbeit wurden einige Vertreter dieser Verbindungsklasse als Reinsubstanzen auf ihr relatives estrogenes Potential hin untersucht.



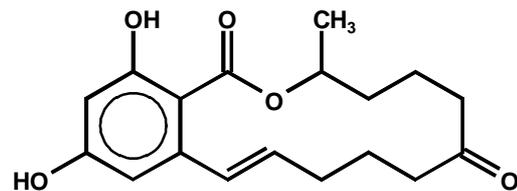
Coumestrol



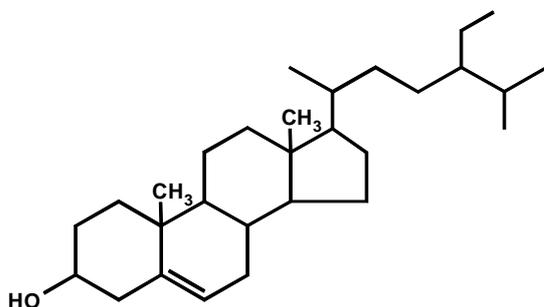
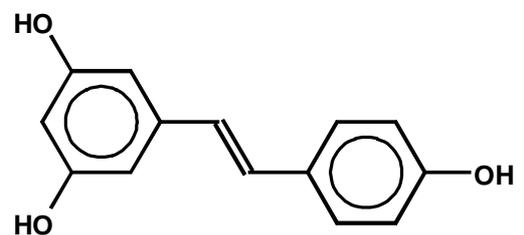
Genistein



Formononetin



Zearalenon

 β -Sitosterol

Resveratrol

Abb. 2-8: Strukturen verschiedener Coumestane, Flavone, Flavonoide, Sterole, Stilbene und Mykotoxine

2.4.7 Natürliche und synthetische weibliche Sexualhormone

Neben den bisher aufgeführten hormonell aktiven Industriechemikalien, Pflanzenschutzmitteln und Phytoestrogenen sind weiterhin das natürliche weibliche Sexualhormon (17 β -Estradiol) und die in Kontrazeptiva vorkommende synthetische Verbindung Ethinylestradiol von Bedeutung. Beide Verbindungen wurden, sowohl in Oberflächenwasser, als auch in Abwasser in wirkstoffrelevanten Bereichen nachgewiesen (Kalbfus, 1997, Stumpf, 1996).

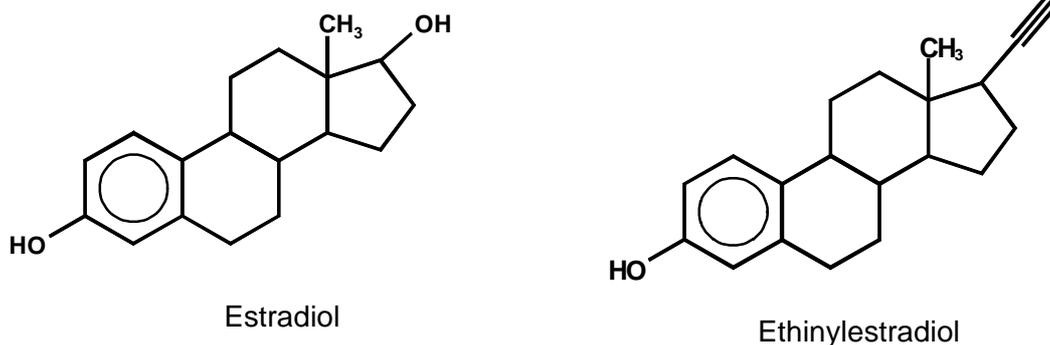


Abb. 2-9: Strukturen natürlicher und synthetischer Estrogene

Ein Beispiel für ein endokrin wirksames synthetisches Estrogen mit einer nachgewiesenen Toxizität ist Diethylstilbestrol (DES).

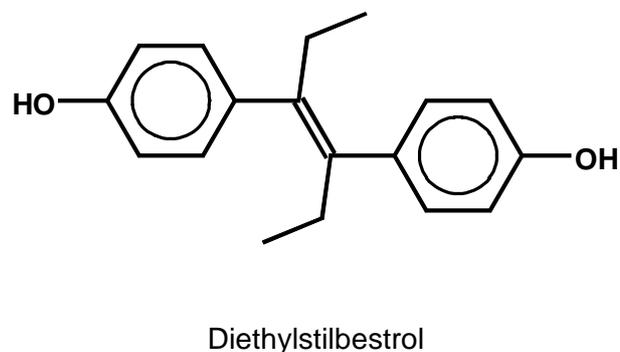


Abb. 2-10: Struktur von Diethylstilbestrol (DES)

In mehreren, zwischen 1979 und 1986 durchgeführten Studien, wurde ein signifikant erhöhtes Auftreten des relativ seltenen Scheidenkarzinoms bei Töchtern DES-behandelter Mütter mit Eintreten der Geschlechtsreife beobachtet.

Bei männlichen Diethylstilbestrol-exponierten Nachkommen wurde ebenfalls eine erhöhte Tumorinzidenz nachgewiesen. Für dieses Kollektiv wurde etwa eine Verdopplung des Risikos beschrieben, ein Hodenkarzinom zu entwickeln (Stillman, 1982; Neubert, 1994).

2.5 Versuche zur Systematisierung der Strukturheterogenität von endokrinen Disruptoren

Endokrine Disruptoren definieren sich bislang durch ihre Funktion. Sie können verschiedene schädigende Effekte sowohl in estrogen-abhängigen als auch in androgen-abhängigen Geweben hervorrufen. Bisher durchgeführte *in vitro* und *in vivo* Assays lassen erkennen, daß eine große Zahl strukturell sehr heterogener Verbindungen für solche schädigenden Effekte in Mensch und Tier verantwortlich sein könnten. Bisher liegen nur wenige Berichte zu quantitativen Struktur-Aktivitätsuntersuchungen vor. Solche "quantitative structure-activity relationship" (QSAR)- Modelle beruhen meist auf der Bestimmung der Bindungsaffinität von strukturell ähnlichen Verbindungen an die entsprechenden Steroidhormonrezeptoren oder an steroidmetabolisierende Enzyme. Der Aussagewert solcher Modelle für ein allgemeines Voraussagemodell für eventuell toxikologisch relevante Xenoestrogene bleibt beschränkt. Unsere Arbeiten sollen dazu beitragen, ausgehend von bekannten Xenoestrogenen weitere relevante Strukturanaloga zu identifizieren. Desweiteren soll untersucht werden, inwieweit ein allgemeingültigeres dreidimensionales QSAR-Modell für eine möglichst große Anzahl verschiedener Strukturklassen aufgestellt werden kann. Ein Ansatzpunkt sind molecular modeling Berechnungen verschiedenster Vertreter unterschiedlicher chemischer Klassen bekannter Estrogenrezeptorliganden, um so Erkenntnisse zu Strukturhomologien zu erarbeiten. In einem zweiten Schritt erfolgt die Bestimmung bzw. Extrapolation der *in vitro* oder

in vivo Potenz der entsprechenden Verbindungen. Diese sogenannte comparative molecular field analysis (CoMFA)-Methodik wurde ursprünglich im Bereich des Computer-aided drug designs entwickelt. Waller et al., 1995, zogen erstmals diese Methodik auch für die Identifikation von endokrinen Disruptoren heran und konnten in mehreren Arbeiten zeigen, daß es sich hierbei um ein durchaus valides Instrument für einen Einsatz in der Toxikologie handelt. Die Suche nach einem 3D-QSAR-Modell beruht auf der Pharmakophorhypothese (s.u.). Folglich sollte also eine gemeinsame Grundstruktur von Atomen oder funktionellen Gruppen der unterschiedlichsten Rezeptorliganden eine quantitative Extrapolation auf die essentiellen Consensus-Strukturelemente erlauben. Unser Interesse galt primär der Verbesserung der Datenlage innerhalb bereits vorab identifizierter chemischer Klassen mit endokriner Aktivität. Durch Berechnen einer Consensusstruktur für verschiedene Substanzklassen (z. B. Bisphenole, Stilbene oder Alkylphenole) sollen bessere Vorhersagemöglichkeiten zu bislang noch nicht als endokrin-aktiv erkannten Verbindungen gewonnen werden. Diese Suche nach weiteren struktur- und somit möglicherweise funktionsähnlichen Verbindungen wurde mittels on line Datenbankrecherche (Beilstein-Crossfire) durchgeführt. Um diese Datenbanksuche effizient zu gestalten, sollte die zugrundeliegende Consensuswirkstruktur möglichst exakt bestimmt sein.

2.6 Molecular Modeling

Unter dem Begriff molecular modeling versteht man die Berechnung, Darstellung und Bearbeitung von möglichst realistischen dreidimensionalen Molekülstrukturen und ihren physiko-chemischen Eigenschaften. Molecular modeling Berechnungen beruhen auf verschiedenen Ansätzen. Eine Möglichkeit besteht darin, von bekannten experimentellen Daten (Kristallografie) auf die Geometrie und physiko-chemischen Eigenschaften der zu untersuchenden Strukturen zu extrapolieren. Andere Methoden arbeiten sowohl mit quantenmechanischen Verfahren als auch mit Kraftfeldmethoden.

Der Aufbau eines Strukturmodells erfolgt in drei Schritten:

- Erzeugung eines Startmodells

- Optimierung und Analyse
- Arbeiten mit dem Modell (Vergleich mit weiteren Strukturen, Docking an Rezeptoren)

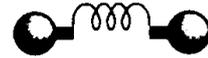
Ein besonderer Vorteil des molecular modeling stellt u. a. die Möglichkeit dar, selbst generierte Daten mit Datenbankwerten zu vergleichen. In der Cambridge-Datenbank liegen beispielsweise ca. 140 000 Kristallstrukturen kleiner organischer Moleküle vor. Die Brookhaven-Proteindatenbank liefert mehr als 4000 Protein- und DNA-Strukturen und auch die Beilstein - Crossfire Datenbank enthält mehrere Millionen chemischer Strukturen mit experimentell bestimmten physiko-chemischen Daten. Die beiden letzteren Datenbanken wurden auch in der vorliegenden Arbeit zur Identifizierung neuer Wirkstoffe und berechneter Proteinmoleküle herangezogen. Zur näheren Betrachtung von Strukturhomologien und möglicherweise daraus resultierender ähnlicher biologischer Wirkungen wurden in der vorliegenden Arbeit ausschließlich Kraftfeldberechnungen zur Ermittlung der energetisch minimierten Verbindungen herangezogen.

2.6.1 Kraftfeldmethoden

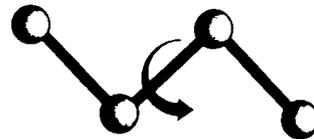
Kraftfeldmethoden sind empirische Verfahren zur Berechnung von Molekülgeometrien und -energien. Ziel ist die Ermittlung einer energetisch günstigen dreidimensionalen Struktur eines Moleküls. Die zwischen den Atomen wirkenden Kräfte werden in Form einer analytischen Funktion mit anpaßbaren Parametern beschrieben. Hierbei werden sowohl kovalente als auch nicht kovalente Kräfte berücksichtigt. Die zentrale Idee der Molekülmechanik ist die Annahme, daß Bindungslängen und -winkel in Molekülen Standardwerte einnehmen. Hauptsächlich sterische Wechselwirkungen (van-der-Waals-Wechselwirkungen), können dazu führen, daß bestimmte Bindungslängen und -winkel nicht ihre Idealwerte einnehmen können. Allgemein akzeptiert ist, daß die Verwendung der drei Terme van-der-Waals-Wechselwirkung, Bindungsstreckung und Winkeldeformation ausreichen, die Struktur und -energie von Molekülen zu bestimmen. Zusätzlich wird meist die Berechnung der Verdrehung des Diederwinkels als ein weiterer Term berücksichtigt.

$$E = E_{\text{Bindungslänge}} + E_{\text{Bindungswinkel}} + E_{\text{Torsion}} + E_{\text{nichtkovalent}}$$

$$E = \frac{1}{2} \sum_{\text{Bindungen}} K_b (b - b_0)^2$$



$$+ \frac{1}{2} \sum_{\text{Torsionswinkel}} K_\phi (1 + \cos(n\Phi - \delta))$$



$$+ \sum_{\text{nichtgebundene Atumpaare}} (A_{ij} r_{ij}^{-12} - C_{ij} r_{ij}^{-6} + q_i q_j / D r_{ij})$$

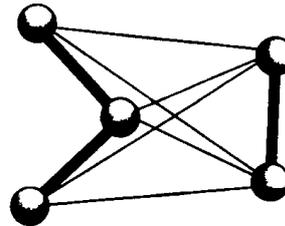


Abb. 2-11: Darstellung der Terme, die den Hauptbeitrag zur Gesamtenergie eines Moleküls leisten (Böhm, 1997). E ist die Gesamtenergie eines Moleküls oder eines Komplexes aus mehreren Molekülen. Sie setzt sich aus mehreren Beiträgen zusammen. Der erste Term beschreibt die Energieänderung bei Dehnung oder Stauchung einer chemischen Bindung. Im vorgestellten Beispiel handelt es sich um ein sogenanntes harmonisches Potential mit der Kraftkonstanten K_b und der Gleichgewichtsbindungslänge b_0 als Parameter. Die Energie als Funktion der Bindungswinkel \cup wird durch den zweiten Term erfasst. Auch hier wird ein harmonisches Potential mit einer Kraftkonstanten K_\cup und einem Gleichgewichtswert \cup_0 verwendet. Der dritte Beitrag beschreibt die Änderung der Energie bei der Änderung der Torsionswinkel und der letzte Term steht für nichtkovalente Wechselwirkungen. Für diesen letzten Beitrag wird eine Summe aus drei Termen verwendet. Der erste Term A_{ij}/r_{ij}^{12} ist immer positiv und steigt mit abnehmendem Abstand schnell an. Er beschreibt die Abstoßung zwischen Atomen, die

sich zu nahe kommen. Der Parameter A_{ij} ist proportional zur Summe der Atomradien der Atome i und j . Der Beitrag $-C_{ij}/r_{ij}^6$ ist immer negativ und geht mit zunehmendem Abstand r_{ij} gegen Null, wenn auch nicht ganz so schnell wie der Abstoßungsterm. Er beschreibt anziehende Wechselwirkungen, die auch als Dispersionswechselwirkungen bezeichnet werden. Zwischen polaren Molekülen existieren weitere anziehende Wechselwirkungen, die ebenfalls proportional zu $1/r_{ij}^6$ sind. Der letzte Term $q_i q_j / D r_{ij}$ beschreibt die elektrostatischen Wechselwirkungen, dargestellt mit einem Punktladungsmodell. D ist die Dielektrizitätskonstante. Die nichtkovalenten Beiträge zur Gesamtenergie, ohne den elektrostatischen Term, werden auch als van-der-Waals-Energie bezeichnet.

Die Ableitung eines Kraftfeldes erfolgt durch Kalibrierung anhand experimentellen Daten und aus den Resultaten möglichst genauer quantenmechanischer Berechnungen. Hierzu dienen vor allem 3D-Strukturen kleiner Moleküle, sowie aus Infrarot - und Ramanspektren abgeleitete Kraftkonstanten. Es ist offensichtlich, daß für eine Einfachbindung zwischen zwei Kohlenstoffatomen andere Parameter verwendet werden müssen als für eine Doppelbindung. Daher werden in einem Kraftfeld mehrere unterschiedliche Atomtypen pro Element verwendet. Kristallpackungen kleiner organischer Moleküle können zur Ableitung der Parameter für nichtbindende Wechselwirkungen herangezogen werden. Die neueste Version des AMBER-Kraftfelds, wie es auch in Sybyl 6.3 zur Berechnung herangezogen wird, verwendet allein für Kohlenstoff 13 näher spezifizierte Atomsubtypen. Diese große Zahl erfordert auch entsprechende Rechnerkapazität. Trotzdem gibt es keinen speziellen Typ z. B. für einen dreibindigen Kohlenstoff, da dieser nicht in Protein - und DNA - Molekülen vorkommt.

Die beiden wesentlichen bei Kraftfeldberechnungen auftretenden Probleme sind:

- die Wahl des Systems
- die Wahl der Startgeometrie

Zunächst die Wahl des Systems. In biologischen Systemen befindet sich sowohl der Wirkstoff, als auch das Protein in Wasser. Die Kraftfeldberechnung sollte also auch den Einfluß des Lösungsmittels berücksichtigen. Meist unterbleibt dies jedoch, um Rechenzeit und -kapazität zu sparen. Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel H_2O werden deshalb nicht berücksichtigt, insbesondere keine Wasserstoffbrücken. Dies bedeutet, daß bei der Optimierung eines einzelnen Moleküls nur intramolekulare

Wasserstoffbrücken ausgebildet werden können, da in Abwesenheit von Wasser diese energetisch begünstigt sind und die Kraftfeldberechnung zu einer Konformation mit intramolekularen Wasserstoffbrücken führen wird. Bei Kraftfeldberechnungen ohne Wasser sollte also immer überprüft werden, ob die Bildung solcher intramolekularer Wasserstoffbrücken ein Artefakt ist.

Die Wahl der Startgeometrie beeinflusst die rechnerische Energieminimierung teilweise erheblich. Ausgehend von einer energetisch ungünstigen Geometrie führt eine Kraftfeldberechnung zu einer Energieminimierung bis zum nächsten lokalen Minimum der Energiehyperfläche. Startet man von zwei unterschiedlichen Geometrien, so können auch die minimierten Strukturen unterschiedlich sein. Die meisten Moleküle können viele energetisch günstige Konformationen einnehmen. Es sollten also unterschiedliche Startpositionen gewählt und die Berechnungen mehrfach durchgeführt werden.

2.6.2 Konformationsanalyse

Verschiedene Konformationen sind im wesentlichen lokale Minima eines Moleküls. Besonders bei linear angeordneten Molekülen können einzelne Bindungen frei gedreht werden. In der Realität sind die Drehungen um diese Bindungen nicht völlig frei. Sie unterliegen einem Potential, das Molekül „rastet“ während der Drehungen bei bestimmten Winkeln in energetisch günstigen Lagen ein. Je nachdem, welche Atome und Gruppen an einer drehbaren Bindung beteiligt sind, können die Potentialverläufe eine Vielzahl von Maxima und Minima entlang einer vollen Umdrehung einnehmen. Sie liegen relativ zueinander, auf unterschiedlichen Energieniveaus. Ziel muß es jedoch sein, das absolute Minimum zu finden, welches auch als globales Minimum bezeichnet wird. Ein möglicher Ansatz verfolgt die systematische Drehung um die drehbaren Bindungen, z. B. in 10° Schritten. Bei jedem Schritt wird die Energie des Moleküls mittels Kraftfeldmethodik berechnet. Alle relativen Minima entsprechen möglichen Konformationen des Moleküls.

Alle Einfachbindungen in einem Wirkstoffmolekül können mehrere energetisch günstige Torsionswinkel aufweisen. Die Werte dieser Torsionswinkel sind für alle drehbaren Bindungen des Moleküls miteinander zu kombinieren. Die Zahl der möglichen Kombinationen steigt dadurch multiplikativ an. Im Prinzip muß für jede

Einstellung die Energie berechnet werden. Man kann sich leicht vorstellen, daß mit steigender Zahl von drehbaren Bindungen die Zahl der lokalen Minima und der einzustellenden Geometrien bei systematischer Suche enorm ansteigt.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Ausgangswinkel gewählt und versucht, ausgehend von diesen das absolute Minimum zu bestimmen. Diese empirische Vorgehensweise erfaßt möglicherweise nicht das globale Minimum, beschreibt jedoch viele lokale Minima. Hier liegt ein grundsätzliches Problem der molecular modeling Berechnungen. Als erste Hinweise für Strukturanalogien und zumindest angenäherte energieminierte Strukturen läßt sich die Kraftfeldmethodik, wie sie in der Arbeit genutzt wurde, jedoch gut heranziehen. Es bleibt offen, inwieweit die Struktur eines isoliert betrachteten niedermolekularen Molküls im globalen Minimum mit der Struktur übereinstimmt, die in der Proteinbindungstasche

eines Rezeptorproteins vorliegt. An der konformellen Flexibilität des Moleküls ändert sich vermutlich wenig. Es ist aber durchaus möglich, daß die Minima wegen sterischer und elektrostatischer Wechselwirkungen mit der Bindungstasche an anderen Stellen liegen und andere relative Energien besitzen. Moleküle stehen in der Bindungstasche eines Proteins unter dem Einfluß gerichteter Wechselwirkungen der dort befindlichen Aminosäuren. Man kann im allgemeinen die rezeptorgebundene Konformation eines Moleküls nicht aus seiner niedermolekularen Kristallstruktur oder Konformation ableiten. Man kann vielleicht noch davon ausgehen, daß sich ähnliche Strukturinkremente und ihre entsprechenden Konformationsenergien auch in den Proteinbindungstaschen ähnlich verhalten. Für die Bestimmung der rezeptorgebundenen Konformation ist nicht unbedingt die energetisch niedrigste Konformation entscheidend, sondern vielmehr ist das Auffinden der „richtigen“, dem gebundenen Zustand entsprechenden Konformation, von Bedeutung. Es ist also notwendig, Kriterien zu erarbeiten, die rezeptorgebundene Konformationen definieren.

2.6.3 Pharmakophorhypothese

Bei Wirkstoffen treten genau definierte Teilstrukturen des Moleküls mit funktionellen Aminosäuren der Bindungstasche des Rezeptors in Wechselwirkung. Aus dem Vergleich mehrerer Liganden erhofft man sich Informationen, um neuartige Strukturen ableiten zu können. Die Struktur der Bindungstasche legt fest, welche funktionellen Gruppen auf der Seite der niedermolekularen Liganden für eine Bindung erforderlich sind. Die räumliche Anordnung dieser funktionellen Gruppen im Liganden bezeichnet man als Pharmakophor. Dabei kann es sich um wasserstoffbrückenbildende Gruppen oder hydrophobe Molekülteile handeln. Die funktionellen Gruppen des Pharmakophors des Liganden richten sich auf die Gegengruppen der Proteinbindungstasche aus. Daher ist eine detaillierte Kenntnis der konformellen Eigenschaften des Liganden essentiell. Auf der Seite des Rezeptors kann sich die Gestalt der Bindungstasche an die Form des Liganden anpassen („induced fit“). Daraus resultiert, daß energetische Betrachtungen der ligandbindenden Domäne eines Rezeptors weniger verlässliche Daten hinsichtlich

einer äußeren 3D-Hülle aller möglichen Liganden liefert. Proteine sind so flexibel, daß auch sterisch etwas aufwendigere Moleküle noch als Liganden akzeptiert werden. Verlässlichere Daten erzielt man durch einen möglichst weitgehenden Pharmakophorvergleich unterschiedlicher Verbindungen. Hierzu werden einige weiterführende Techniken, wie der „Active Analog Approach“ nach Marshall, 1979, herangezogen. Dabei werden äquivalente Pharmakophorgruppen definiert und am Beispiel eines Moleküls die energetisch günstigste Konformation ermittelt. Wenn man mit einem möglichst starren Molekül beginnt, beschränken sich die möglichen Konformationen relativ schnell auf ein Minimum. Anschließend kann dieses erste bestimmte Molekül als Vergleichsmuster für weitere Strukturanaloga herangezogen werden. Dieses Verfahren erlaubt auch einen effizienten Einsatz von Strukturdatenbanken. Durch Ermitteln der möglichen relevanten Pharmakophorgruppen lassen sich neuartige Verbindungen, die die entsprechenden funktionellen Gruppen aufweisen, identifizieren.

Solche neu identifizierten Verbindungen erlauben eine weitere Verfeinerung oder Ausweitung der molecular modeling Berechnungen und erlauben, wenn das entsprechende biologische Testsystem zur Verfügung steht auch eine relative Einordnung der Ausgangsverbindungen und der neu identifizierten Verbindungen nach ihrem biologischen Effekt. Mit steigender Zahl möglicher Liganden steigt entsprechend auch die Genauigkeit und Verlässlichkeit der theoretisch ermittelten Daten und deren Voraussagewert.

2.6.4 Quantitative Struktur-Wirkungsbeziehungen (QSAR)

Um Zusammenhänge zwischen chemischen Strukturen und biologischem Verhalten zu erfassen und quantitativ zu beschreiben, werden verschiedene „quantitative structure-activity relationship“ Verfahren durchgeführt.

Voraussetzung ist, daß alle Verbindungen aus einer chemisch ähnlichen oder weitgehend einheitlichen Strukturklasse stammen. Außerdem müssen die Verbindungen am gleichen biologischen Zielprotein angreifen und einen identischen Wirkmechanismus aufweisen. Die Korrelation mit den physiko-chemischen Eigenschaften bezieht sich immer auf relative Wirkstärken in einem Modell, nicht auf unterschiedliche Wirkqualitäten.

Grundlage für quantitative Zusammenhänge zwischen chemischer Struktur und biologischer Wirkung ist die durchaus berechtigte Annahme, daß die Unterschiede in den physiko-chemischen Eigenschaften der Substanzen für die relative Wirkstärke ihrer Wechselwirkungen mit einem biologischen Makromolekül verantwortlich sind. Solche Wechselwirkungen tragen in erster Näherung additiv zur Affinität eines Wirkstoffes an den entsprechenden Rezeptor bei. Daraus leitet sich das Konzept ab, biologische Aktivitäten von Wirkstoffen mit mathematischen Modellen zu beschreiben.

Akzeptor- und Donorsubstituenten beeinflussen die Elektronendichte an einem Heteroatom und reduzieren bzw. erhöhen damit seine Fähigkeit, eine Wasserstoffbrücke auszubilden. Daraus erklärt sich u. a. der elektronische Einfluß aromatischer Substituenten auf die biologische Wirkung. Hansch und Fujita, 1964, identifizierten weitere wichtige Beziehungen und entwickelten eine weitergehende mathematische Beziehung. Dies mündete in der sogenannten Hansch-Analyse:

$$\log 1/C = -k_1 (\log P)^2 + k_2 \log P + k_3 \sigma + \dots k$$

In obiger Gleichung ist C eine molare Konzentration, die einen bestimmten biologischen Effekt hervorruft. Sinnvollerweise wird hier der x-Wert der K_D (Molare Konzentration der Effective Concentration (EC_{50})) gewählt. Bezogen auf eine Reihe von Substanzen sind das gleich stark wirkende äquieffektive molare Dosen. Log P ist der Logarithmus des Octanol / Wasser-Verteilungskoeffizienten P und σ ist die

Hammettkonstante. Der quadratische log P-Term erlaubt eine quantitative Beschreibung nichtlinearer Lipophilie-Wirkungsbeziehungen. Bei linearer Beziehung entfällt dieser Term. Jeder einzelne Term der Gleichung kann entfallen, wenn er nicht relevant ist. Weitere Terme wie Polarisierbarkeit, sterische Parameter, etc. können zusätzlich auftreten. Die Koeffizienten k_1 , k_2 , ... und k werden durch Regressionsanalysen ermittelt.

Ein solches mathematisches Modell erlaubt je nach Fragestellung Antworten zu bestimmten Wirkmechanismen der Verbindungen. Der wesentliche Vorteil liegt in der möglichen Vorhersage eventueller Wirkungen alleine aufgrund der physikochemischen Daten. Die Interpolation, d. h. Schlüsse auf sehr ähnliche Substituenten, erreichen dabei eine relativ hohe Zuverlässigkeit.

Diese bislang vorgestellten QSAR-Methoden werden zumeist retrospektiv durchgeführt, da die Fülle der Daten oft erst am Ende detaillierter Arbeiten zur Verfügung steht.

2.6.5 Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA)

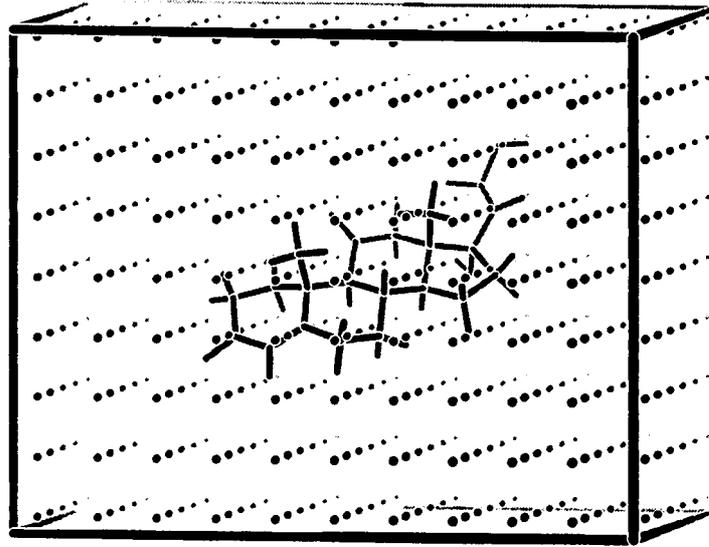
Weitergehende Ansätze versuchen direkt aus der 3D-Struktur, meist rechnerisch ermittelt, auf Wirkstärken zu schließen. Idealerweise möchte man aus Parametern, die man aus der 3D-Struktur der Wirkstoffe ablesen kann, direkt auf die Bindungsaffinitäten der Moleküle schließen. Die Zusammenhänge zwischen diesen Parametern und der Aktivität sind komplex und nicht vollständig aufgeklärt. Außerdem liegt für Systeme, auf die man die 3D-QSAR-Methoden anwendet, meist nicht die komplette Information über die Protein-Ligand Komplexe vor. Aus dem Mangel der vollständigen Information heraus versucht man nicht, die Absolutwerte der Affinitäten zu berechnen. Man versucht vielmehr die relativen Unterschiede zwischen den Wirkstoffmolekülen herauszuarbeiten. Die graduellen Änderungen der substanzspezifischen Parameter werden mit den biologischen Daten korreliert. Eine wesentliche Voraussetzung für den relativen Vergleich der Moleküle ist die strukturelle Überlagerung.

Als substanzspezifische Größen für die Korrelation der dreidimensionalen Eigenschaften von Verbindungen mit der Bindungsaffinität bieten sich die sterischen

(van-der-Waals-Potential) bzw. elektrostatischen (Coulomb-Potential) Wechselwirkungen an. Ein für die Berechnung von Wechselwirkungen geeignetes Verfahren bietet die sog. Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) nach Cramer and Milne, 1978. Trotz vieler theoretischer und praktischer Probleme hat sich die Methode schnell etabliert. Theoretische Probleme werden deutlich, wenn man sich vor der CoMFA-Berechnung klar macht, daß sich Bindungsaffinitäten aus einem enthalpischen (sterische und elektrostatische Potentiale) und aus entropischen Beiträgen zusammensetzen. Ein wesentlicher Teil der entropischen Energie setzt sich aus Solvations- und Desolvationsvorgängen zusammen. Durch solche Vorgänge erhöht sich die Entropie des Systems und begünstigt somit den spontanen Ablauf des Bindungsvorgangs. Das gleiche gilt für freigesetzte Wassermoleküle aus der Bindungstasche. In erster Näherung nimmt man jedoch an, daß diese Effekte für alle Verbindungen des Datensatzes gleich sind.

Voraussetzungen von praktischer Seite sind ausreichende Substanzanzahl (mind.15) und Variabilität der substanzabhängigen Wirkungen über mehrere Größenordnungen. Allen Bindungen muß ein identischer Mechanismus am gleichen Zielprotein zugrunde liegen.

Die rechnerischen Anforderungen sind hoch. Von allen Molekülen werden Konformationsberechnungen durchgeführt und diese werden z. B. nach dem Pharmakophorvergleich wie oben beschrieben überlagert. Anschließend werden die überlagerten Moleküle in ein Gitternetz eingebettet. Die Punkte des Gitternetzes weisen einen regelmäßigen Abstand von 1 - 2 Å Maschenweite auf. An jeden Gitterpunkt setzt der Rechner eine Sonde, z. B. ein Atom mit den Eigenschaften eines Wasserstoffs, Kohlenstoffs oder Sauerstoffs. Man berechnet die Wechselwirkungsenergien zwischen dieser Sonde und jedem Molekül des Datensatzes. Die Gesamtheit der Wechselwirkungsbeiträge an den Gitterpunkten bezeichnet man als Feld des Moleküls (Name der Methode). Anschließend werden die Felder der Moleküle des Datensatzes miteinander verglichen. Bei einer Kantenlänge von 15 - 25 Å und einer Maschenweite des Gitters von 1 - 2 Å sind pro Molekül des Datensatzes mehrere tausend Feldpunkte zu behandeln.



Verb.	$-\lg(IC_{50})$	S1	S2	S3	...	Sn	E1	E2	E3	...	En	...
	4.15											
	5.74											
...												
	3.89											
	8.83											
	6.74											

$$-\log(IC_{50}) = y + a S1 + b S2 + c S3 + \dots + h S_n + k E1 + m E2 + n E3 \dots + z E_n$$



Abb. 2-12: Darstellung eines Gitters, das der Berechnung molekularer Felder dient. Die resultierende CoMFA-Gleichung ähnelt stark der quantitativen QSAR-Gleichung. Zur Berechnung molekularer Felder erzeugt man ein Gitter, das ein Molekül weiträumig umfaßt. In den Schnittpunkten des Gitters mit einer Maschenweite von 1 bis 2 Å berechnet man die Beiträge der gewählten Felder. Für jeden Gitterpunkt werden die Feldbeiträge (S1, S2 ... Sn, E1, E2 ... En) in eine Tabelle eingetragen. Die Auswertung erfolgt für alle Moleküle des Datensatzes. Die Bindungsaffinitäten werden z. B. als $-\log(IC_{50})$ in die Tabelle aufgenommen. Mit einer besonderen statistischen Methode, der PLS-Analyse (partial least square), werden die Feldbeiträge mit den Affinitäten in Bezug gesetzt. Man erhält ein Modell, das in Form einer Gleichung angibt, an welchen

Gitterpunkten die verschiedenen Felder Beiträge zur Erklärung der biologischen Wirkung liefern.

Für die Kraftfeldrechnungen werden sterische und elektrostatische Wechselwirkungen mit einem Lennard-Jones- bzw. Coulomb-Potential beschrieben. Wenn der Abstand zwischen der Sonde und einem Atom des Moleküls gegen Null geht, nehmen das Lennard-Jones- bzw. Coulomb-Potential bei gleichgeladenen Teilchen unendlich große Werte an. Bei entgegengesetzt geladenen Teilchen strebt das Coulomb-Potential gegen negative unendliche Werte. Diese dem Betrag nach extrem großen Feldbeiträge werden an Gitterpunkten erreicht, die nahe der Oberfläche bzw. innerhalb eines Moleküls liegen. Sie müssen in einer CoMFA-Analyse vermieden werden. Daher werden die Feldbeiträge oberhalb und unterhalb eines vorgegebenen Grenzwertes auf den dort erreichten Wert limitiert. Nach dieser vorab erfolgten Definition kann man von jedem Punkt aus das Lennard-Jones- bzw. Coulomb-Potential berechnen. Diese Sondenberechnungen erfolgen in spezifischen Subprogrammen von Sybyl im Hintergrund. Ein Beispiel stellt das Programm GRID dar. Eine weitere Möglichkeit stellt das Programm HINT dar, das molekulare Felder berechnet, die hydrophobe Eigenschaften von Molekülen abtasten.

Betrachtet man die Gesamtheit aller Feldbeiträge als mehrdimensionale Matrix, so kann die Regressionsanalyse zur Erklärung der abhängigen Variablen, z. B. der Bindungsaffinität, nicht eingesetzt werden. Die PLS-Analyse (partial least squares) ist eine statistische Methode, die aus großen Datenmengen relevante und erklärende Faktoren, die sog. PLS-Vektoren, extrahiert. Bei CoMFA-Analysen beschreiben diese Vektoren die Bereiche der Felder, die mit den experimentell bestimmten Affinitäten am besten korrelieren. Das Ergebnis ist eine Gleichung ähnlich der QSAR-Gleichung. Sie gibt an, in welchem Ausmaß bestimmte Gitterpunkte der einzelnen Felder zu den Bindungsaffinitäten beitragen.

Das aus den Daten abgeleitete Modell kann genutzt werden, um auf das Bindungsverhalten weiterer Verbindungen zu schließen. Konformationsmuster neuer Verbindungen werden berechnet und mit dem etablierten Gitter des bekannten Datensatzes verglichen. Anschließend werden die Feldbeiträge berechnet. Mittels der Korrelationsgleichung läßt sich ermitteln, welche Gitterpunkte bei der Berechnung der Bindungsaffinitäten zu berücksichtigen sind.

CoMFA - Methoden erlauben eine Voraussage nur für Moleküle, die innerhalb des Modells bleiben. Das bedeutet, daß CoMFA-Methoden nur zwischen Feldbeiträgen innerhalb der Modellvorgabe interpolieren. Eine Extrapolation auf Bereiche, die von Strukturen des Datensatzes nicht abgedeckt werden, ist nicht möglich.

Die CoMFA-Ergebnisse lassen sich mittels Konturdiagrammen ("contour maps") grafisch darstellen. Aus dem Modell weiß man, an welchen Gitterpunkten Feldbeiträge auftreten, die signifikant zur Erklärung der Bindungsaffinitäten beitragen. Diese Beiträge lassen sich nach ihrem Gewicht für die verschiedenen Felder konturieren. Sie verweisen auf Volumenbereiche um die Moleküle, in denen Änderungen der Feldbeiträge parallel oder gegenläufig zu Affinitätsänderungen im Datensatz ablaufen. Diese Konturdiagramme geben an, an welchen Stellen die Eigenschaften einer Leitstruktur zu verändern sind, damit eine Affinitätssteigerung erzielt wird.

2.7 Pharmakologischer Hintergrund

2.7.1 Pharmakologie des endokrinen Systems

"Hormona" (griechisch = antreiben, in Bewegung setzen) bilden zusammen mit den Neurotransmittern und den Cytokinen die drei miteinander verbundenen und interagierenden chemischen Informationsübertragungssysteme des Organismus.

Nach historischen Definitionen werden Hormone in bestimmten Organen (Drüsen mit innerer Sekretion, endokrine Organe) gebildet und über das Blut zu dem meist fernab befindlichen Wirkorgan transportiert. Aktuelle Definitionen unterscheiden Hormone nach ihrer Funktion in drei Gruppen.

Hormone mit

- endokriner Funktion (= klassische Definition)
- parakriner Funktion (Bildung des Hormons in einer Zelle, Wirkung in Nachbarzelle ohne Transport über Blutkreislauf), z. B. Prostaglandine

- autokriner Funktion (hormonbildende Zelle ist auch Effektorzelle), z. B. Wachstumsfaktoren

Hormone sind in ihrer Funktion für den Organismus und die Arterhaltung essentielle Faktoren. Gemäß ihren Wirkungen können die Funktionen der Hormone für den Organismus in vier Bereiche aufgliedert werden:

- Aufrechterhaltung des internen Milieus (Elektrolyt / Mineralhaushalt)
- Energieproduktion und -nutzung , Reaktion auf Notsituationen
- Wachstum und Entwicklung
- Fortpflanzung

Im Prinzip kommen bei allen Wirbeltierspezies die gleichen endokrinen Drüsen vor. Stoffe mit hormoneller Wirkung treten entwicklungsgeschichtlich im Tierreich schon sehr früh auf z. B. bereits bei Krebsen und Mollusken. Mit Ausnahme der Peptid- und Proteohormone besteht keine Artspezifität hinsichtlich der produzierten Hormone. Das gleiche Hormon hat aber bei verschiedenen Spezies z. T. unterschiedliche Wirkungen.

Klinisch manifestieren sich Hormonmangel-bedingte Krankheitsbilder ebenso wie Krankheitsbilder, die durch Hormonüberproduktion hervorgerufen werden.

Hormone entfalten ihre Wirkungen im Zielgewebe im allgemeinen in extrem niedrigen Gewebespiegeln von 10^{-11} - 10^{-12} mol/l.

2.7.2 Regulationsmechanismen

Zwischen Hormonproduktion, Ausschüttung und Wirkung bestehen vielseitige Wechselbeziehungen. Die Hormonsynthese und Ausschüttung verschiedener endokriner Organe werden ihrerseits durch Hormone reguliert. Solche Hormone, deren Funktion darin besteht, die Hormonproduktion anderer endokriner Organe zu regulieren, werden als "trophe" Hormone bezeichnet.

Beispiele:

LH Luteinisierendes Hormon

FSH Follikelstimulierendes Hormon

Verschiedene Peptidhormone des Hypothalamus regulieren wiederum die Synthese und Sekretion der obengenannten "tropen" Hormone des Hypophysenvorderlappens.

Zu den "releasing hormones" gehören z. B.:

TRH	Thyreotropes Releasing Hormon
GnRH	Gonadotropes Releasing Hormon

2.7.3 Regelkreis mit negative-feedback am Beispiel GnRH - LH - Testosteron

GnRH aus dem Hypothalamus kontrolliert die Freisetzung von LH aus dem Hypophysenvorderlappen unter Abhängigkeit der Androgenkonzentration im Blut. Die Aktivität des Hypothalamus, der das GnRH bildet, hängt umgekehrt proportional von der Konzentration der Androgene im Blut ab. LH seinerseits stimuliert die Synthese und Ausschüttung der Androgene in den Leydigzellen (Zwischenzellen) im Hoden. Bei der Regulation der Schilddrüsen-, Gonaden- und Nebennierenrindenfunktion spielt die Rückkopplung mit negativer Wirkung eine übergeordnete Rolle. Eine Rückkopplung mit positiver Wirkung (positiv-feedback) liegt dann vor, wenn ein peripheres Hormon die Bildung des übergeordneten tropen Hormons stimuliert.

Bei Estrogenen (Follikelhormone) und Gestagenen (Gelbkörperhormone) dominiert zwar die negative Rückkopplung auf die entsprechenden Zentren des Hypothalamus (Hemmung von GnRH), unter bestimmten Bedingungen kann jedoch auch eine positive Rückkopplung vorliegen; d. h. Estrogene können die Ausschüttung von LH stimulieren. Dieser Mechanismus (Hohlweg-Effekt) spielt bei der Ovalationsauslösung eine ganz entscheidende Rolle.

2.7.4 Hypothalamische Freisetzungs- und Hemm-Hormone

Die meisten tropen Hormone des Hypophysenvorderlappens werden durch hypothalamische Freisetzungs- oder Hemm-Hormone reguliert. Es handelt sich um Peptide, die über ein besonderes Gefäßsystem, die Portalgefäße, direkt vom Hypothalamus in die Hypophyse gelangen.

GnRH hat auch eine therapeutische Bedeutung bei der Behandlung des Prostatakarzinoms. Durch Gabe von GnRH-Analoga, z. B. Zoladex[®] und Antiandrogenen wird in der palliativen Therapie des Prostatakarzinoms der initiale LH- und ein damit verbundener Testosteronanstieg verhindert. Analog wird auch beim prämenopausalen Mammakarzinom vorgegangen.

Die hypothalamischen Freisetzungshormone wirken physiologisch bereits im Nanogrammbereich.

2.7.5 Hormone des Hypophysenvorderlappens (Gonadotropine)

Gonadotropine sind Hypophysenvorderlappenhormone, deren Wirkung primär auf die Gonaden gerichtet ist. Gonadotropine sind hochmolekulare Glykoproteide.

Es gibt zwei hypophysäre Gonadotropine:

- FSH Follikelstimulierendes Hormon
- LH Luteinisierendes Hormon

2.8 Sexualhormone

Zu den Sexualhormonen gehören die Hormone der Gonaden (Hoden und Ovarien). Die Gesamtheit der physiologischen und der synthetischen männlichen Sexualhormone bezeichnet man als Androgene. Bei den weiblichen Sexualhormonen wird unterschieden zwischen Estrogenen und Gestagenen. Bei den Hormonen der Gonaden handelt es sich um Steroidhormone. Daneben werden Androgene, Estrogene und Gestagene nicht nur in den Gonaden gebildet, sondern auch in der Plazenta, in den Nebennieren und im Fettgewebe.

2.8.1 Biosynthese der Steroide

Die Gonadenhormone sind Metabolite des aus Acetyl-CoA über Mevalonsäure, Squalen, Lanosterin gebildeten Cholesterins. Dieses wird über verschiedene Zwischenstufen bis hin zu DHT und Estradiol/Estratriol metabolisiert. Die in Abb. 2-14 dargestellten Enzyme spielen eine zentrale Rolle in etwaigen antihormonellen Therapieansätzen, sowie möglicherweise in der Metabolisierung unterschiedlicher Fremdstoffe.

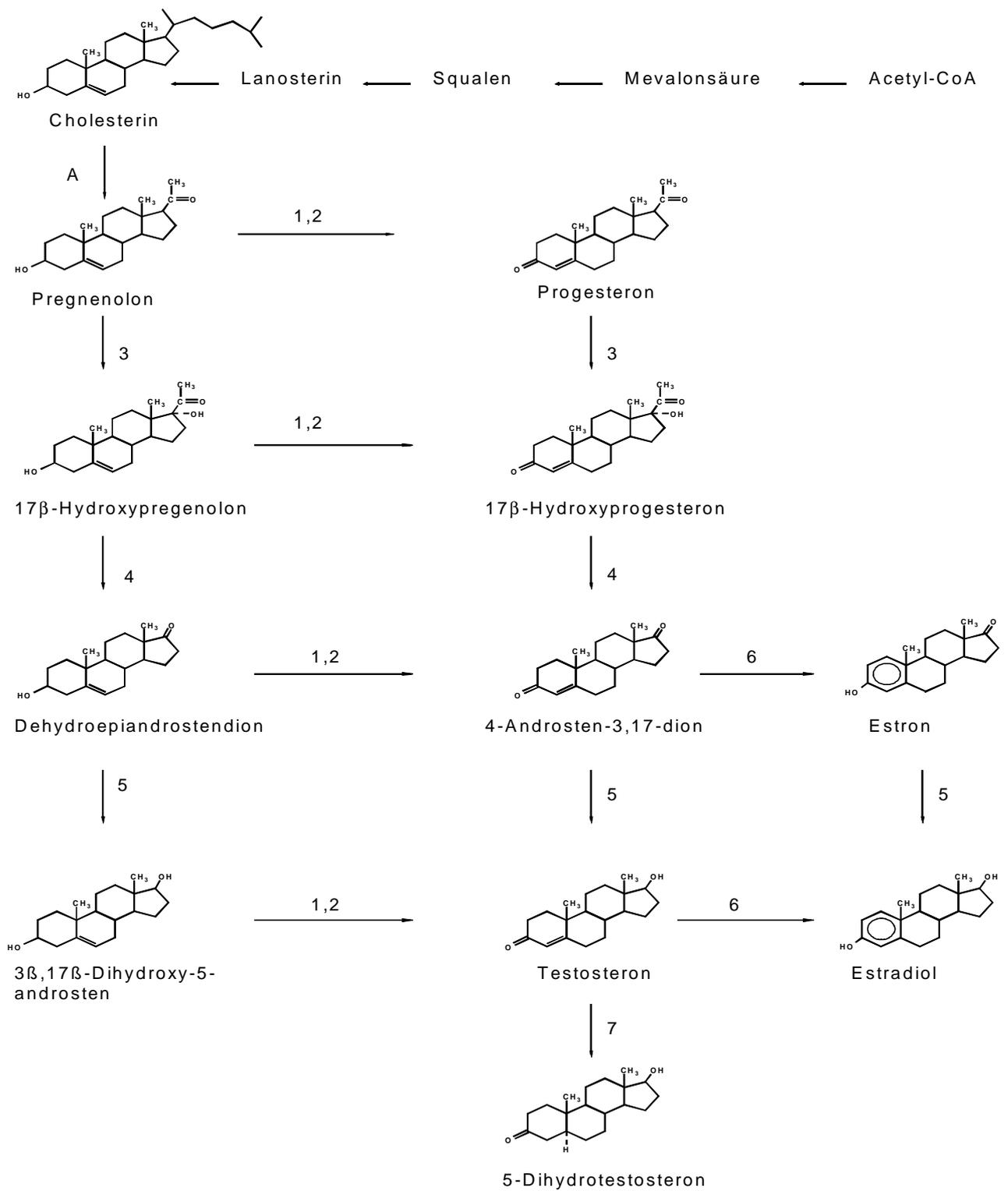


Abb. 2-13: Biosynthesewege der Steroidhormone und die relevanten metabolisierenden Enzyme

- A: Pregnenolon-Synthetase (Mitochondrien)
- 1,2: 3 β -Hydroxy-5 α -Steroid-Dehydrogenase, Steroid- Δ -Isomerase
- 3: Steroid-17 α -Monooxygenase
- 4: C-17,20-Lyase
- 5: 17 β -Hydroxysteroid-Dehydrogenase
- 6: Aromatase
- 7: 5 α -Reduktase

2.8.1.1 Androgene

Androgene werden hauptsächlich in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens gebildet, daneben aber auch in den Nebennieren und im Ovar. Das vorwiegend zirkulierende Androgen beim Mann ist Testosteron.

Androgene sind Steroidhormone mit 19 Kohlenstoffatomen (C19-Steroide). In den meisten Zielorganen wie der Prostata ist die reduzierte Form des Testosterons, das 5 α -Dihydrotestosteron, das biologisch wirksamste Androgen. Die tägliche Testosteronproduktion beim Mann beträgt ca. 7 mg, bei Frauen ca. 10 % dieses Wertes. Testosteron ist im Blut beim Mann zu 98 % an das (sex) Steroid Hormon Binding Globulin gebunden, bei Frauen zu 99 %. Die Serumkonzentration von Testosteron bei Männern beträgt 3 - 10 mg/l .Ein geringer Teil des Testosterons wird zu Estrogenen aromatisiert.

2.8.1.2 Estrogene

Estrogene werden im Ovar und in der Plazenta gebildet, daneben auch in geringen Mengen in den Nebennieren und im Hoden. Durch Aromatisierung von Androgenen können im Fettgewebe ebenfalls Estrogene entstehen.

Zusammen mit Gestagenen regulieren Estrogene nahezu alle Vorgänge der Reproduktion bei der Frau. Neben den sexualspezifischen Wirkungen spielen Estrogene auch eine wichtige Rolle bei einer Reihe weiterer physiologischer Vorgänge, wie z. B. bei der Kalzifizierung der Knochen.

Estradiol, Estron, Estriol und Ester dieser natürlich vorkommenden Estrogene sind auch oral wirksam. Durch Alkylierung der 3- oder 17- Position der Estrogene wird eine erhöhte orale Bioverfügbarkeit dieser Verbindungen erzielt.

Die tägliche Sekretionsrate von Estrogenen beträgt bei der Frau je nach Zyklusphase 25 - 100 µg. Estrogene werden im Blut vorwiegend an SHBG, aber auch an Albumin gebunden, transportiert.

In der Leber werden die Estrogene zu Estriol desaktiviert und für die renale Exkretion glucuronidiert oder sulfatiert.

2.8.1.3 Gestagene

Unter Gestagenen wird eine Stoffklasse von Sexualhormonen zusammengefaßt, die nur z. T. ähnliche Eigenschaften wie das physiologische Gelbkörperhormon Progesteron haben.

Die Reaktionen auf Gestagene, immer in Kombination mit Estrogenen, hängt dabei von dem Estrogen-Gestagen-Verhältnis und von der zeitlichen Sequenz des Zusammenwirkens ab.

2.9 Estrogenmetabolismus

Viele physiologische Funktionen von Estrogenen resultieren aus deren Wechselwirkung mit ligandabhängigen Transkriptionsfaktoren. Diese Proteine spielen in vielen Wachstums- und Differenzierungsprozessen eine wesentliche Rolle, die nicht auf sexual-assoziierte Vorgänge beschränkt sind.

Daneben interagieren Estrogene mit einer Vielzahl oxidativer und konjugierender Enzyme, die hauptsächlich in der Leber lokalisiert sind. Vor allem Mitglieder der Cytochrom-P450-Familie spielen eine wesentliche Rolle im oxidativen Metabolismus von Estrogenen. Diese Hydroxylierungsvorgänge konkurrieren oder bilden die Grundlage für verschiedene Konjugationsreaktionen wie Glucuronidierung, Sulfatierung und / oder O-Methylierung. All diese Vorgänge laufen hauptsächlich

zentral in der Leber ab, treten aber ganz spezifisch auch in anderen Geweben auf. Bereits in den 70er Jahren konnten Fishman und Norton (1975) die lokale 2-Hydroxylierung von Estradiol im Gehirn von Ratten nachweisen. Unter Berücksichtigung verschiedener Befunde, die die Hemmung der Inaktivierung zentral-nervös aktiver Catecholamine durch die Catechol-O-methyltransferase durch 2-Hydroxyestradiol belegen (Ball et al., 1972) wird die Komplexität der funktionellen Effekte, die durch Estrogene hervorgerufen werden können, ohne den klassischen Rezeptor-DNA-Interaktionsprozeß zu berücksichtigen, deutlich.

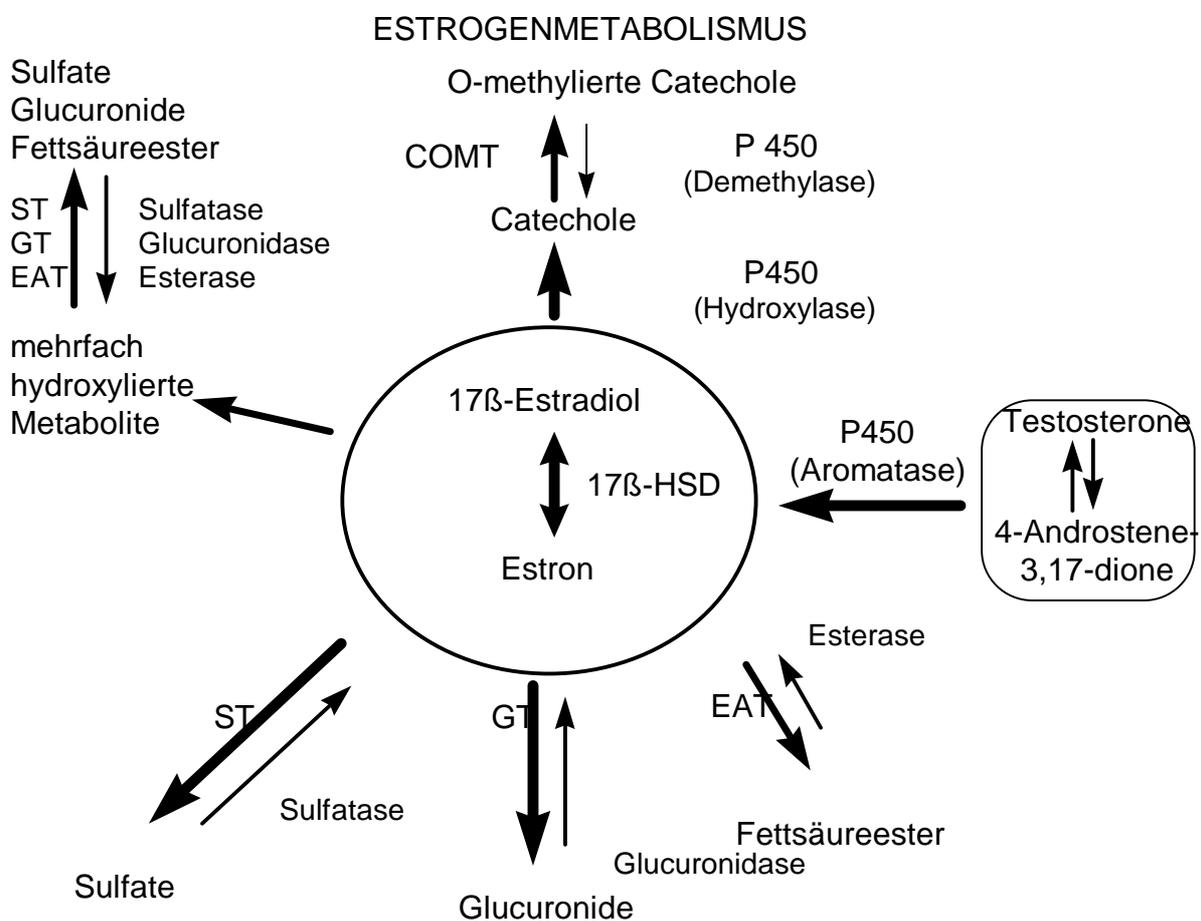


Abb. 2-14: Schematische Darstellung des Estrogenmetabolismus

Weiterhin sind viele andere Metabolismuswege beschrieben, deren Folgen sich wiederum erheblich auf den klassischen rezeptorvermittelten Prozeß auswirken. So

bestimmen unterschiedliche Enzymaktivitäten in den extrahepatischen Zielzellen die Wirkkonzentration des wirksamen Estrogens oder des möglicherweise andersartig wirksamen Metaboliten. So spielen die zellspezifischen Enzymmuster von Sulfotransferase versus Sulfatase möglicherweise eine wichtige Rolle z. B. im Hormonstatus post-menopausaler Brustkrebspatientinnen. Diese zeigen oft 10 - 50fach erhöhte Gewebespiegel im Brustkrebsgewebe gegenüber dem in geringerer Konzentration zirkulierenden Estradiol (Trevoux et al., 1986). Die hohen Estradiolgehalte resultieren vermutlich aus der peripheren Desulfonierung von Estrone-3-sulfat, einem möglichen Vorläufer aktiver Estrogene mit langer Halbwertszeit (~ 9 h beim Menschen), durch die Estrogensulfatase (Vignon et al. 1980).

Auch die Aromatase (Estrogen Synthetase; Cytochrome P450 19) trägt durch die Aromatisierung des A-Rings von 4-Androstene-3,17-dion und der daraus resultierenden Estronbildung erheblich zum entsprechenden Wirkspiegel aktiver Estrogene in spezifischen Geweben bei. Besonders interessant ist die weite Verbreitung der Aromatase in den unterschiedlichsten Geweben wie Gehirn, Fettgewebe, Leber, Fibroblasten und Brustgewebe. Die Aromataseaktivität korreliert positiv mit Fettleibigkeit und fortschreitendem Alter.

Hinsichtlich der relativen Bedeutung der Desulfonierung und der Aromataseaktivität für die Estrogenbereitstellung in den Zielzellen stellt die Desulfonierung von Estron-3-sulfat den größeren Beitrag an aktiven Estrogenen im menschlichen Organismus (Zhu, 1998).

Eine ähnliche Bedeutung wird der zelltypspezifischen Aktivität der β -Glucuronidase zugemessen, deren Aktivität das Verhältnis von Estradiol zu Estron reguliert. Diese Anhaltspunkte stützen sich derzeit hauptsächlich noch auf Tierversuche, da bislang wenig therapeutischer Nutzen aus der Beeinflussung der Glucuronidaseaktivität gezogen wird. Hier ist weitere Forschung notwendig, um eventuelle Umwelteinflüsse, die möglicherweise auch durch Verbindungen aus dem weiteren Umfeld der endokrinen Disruptoren stammen könnten, zu erfassen.

2.9.1 Beeinflussung des metabolischen Abbaus von Estrogenen durch exogene Liganden

Die metabolische Hydroxylierung und / oder Konjugation von Estrogenen verstärkt ihren hydrophilen Charakter und reduziert bzw. verhindert ihre klassische estrogenen Aktivität. Die enzymatische O-Methylierung oder Veresterung mit Fettsäuren erhöht die Lipophilie der Estrogenmetabolite drastisch. Diese Metabolite weisen lange Halbwertszeiten auf und zeigen unterschiedliche nicht-klassische Estrogeneffekte. Die O-Methylierung wird durch die Catechol-O-methyltransferase (COMT) dem Enzym, das die O-Methylierung physiologischer und nicht-physiologischer Catechole katalysiert, ermöglicht. Aufgrund der hohen katalytischen Aktivität der COMT stellt 2-Methoxyestron den häufigsten Estrogenmetaboliten in humanem Plasma und Urin dar. 2-Methoxyestron und 2-Methoxyestradiol weisen höhere Bindungsaffinitäten an SHBG auf, als Estron und Estradiol (she. 2.8).

Die monomethylierten Estrogenmetabolite zeigen nur sehr schwache klassische estrogenen Effekte. Die Verbindungen rufen andere spezifische biologische Effekte hervor. 2-Methoxyestradiol senkt den Serumcholesterinspiegel und den Triglyceridspiegel in Ratten (Patt et al., 1971; vgl. Resveratrol).

Daneben verhindert 2-Methoxyestradiol das Wachstum humaner Brustkrebszelllinien *in vitro* und *in vivo* (Cushman et al., 1995). Weitere Studien zeigen eine Störung der Mikrotubulifunktion und eine Hemmung der Angiogenese (D'Amato et al., 1994; Klauber et al. 1997). In diesem spezifischen Fall sind Einflüsse von Nahrungsmittelbestandteilen beschrieben. So stimuliert Indol-3-carbinol (aus Brassicaceen) die 2-Hydroxylierung von Estradiol, was schließlich zur vermehrten Bildung von 2-Methoxyestradiol und in C3H/OJ Mäusen inhibierend auf die Entwicklung spontaner Brusttumore wirkt. Zhu und Liehr, 1994, konnten durch chronische Gabe von Quercetin (Substrat und Inhibitor der COMT) in männlichen syrischen Hamstern estrogen abhängige Tumore induzieren. Der Anstieg der durch Estradiol induzierten Tumoren geht mit der Quercetingabe einher (Zhu und Liehr, 1996). In weiteren Arbeiten wurde auch der Einfluß hoher Catecholaminspiegel, die ebenfalls die COMT hemmen können, auf die herabgesetzte Bildung von 2-Methoxyestradiol und verstärkter Bildung von 2- und 4-hydroxylierten Estrogenen untersucht. Dies führt zu verstärkter Tumorbildung in diesen Geweben. Sowohl in Mäusen (Riley, 1975) als auch beim Menschen (Cooper, 1989) scheint Streß, vermittelt durch hohe Catecholaminspiegel, ein Risikofaktor unter vielen weiteren für die Brustkrebsentwicklung zu sein.

Der Mechanismus wie 2-Methoxyestradiol seine protektiven Eigenschaften entfaltet ist noch nicht geklärt.

Im Gegensatz zu 2-Hydroxyestradiol und 2-Methoxyestradiol, welches möglicherweise ein endogenes chemopräventives Agens darstellt, ist 4-Hydroxyestradiol, gebildet durch Cyp 3A kanzerogen. Unter anderem induziert 4-Hydroxyestradiol ein metabolisches Redox-cycling, welches reaktive Intermediate und reaktive Sauerstoffspezies hervorruft. 4-Hydroxyestradiol wechselwirkt ähnlich wie Estradiol mit dem Estrogenrezeptor.

Bradlow und Fishman sehen in einer vermehrten Bildung von 16α -Hydroxyestrogenmetaboliten einen erhöhten Risikofaktor für die Entwicklung von Brustkrebs. Ihre Hypothese stützt sich auf folgende Beobachtungen. Fishman, 1988, konnte eine kovalente Bindung von 16α -Hydroxyestradiol an den Estrogenrezeptor nachweisen. 16α -Hydroxyestradiol bildet mit dem Rezeptor eine Schiff'sche Base.

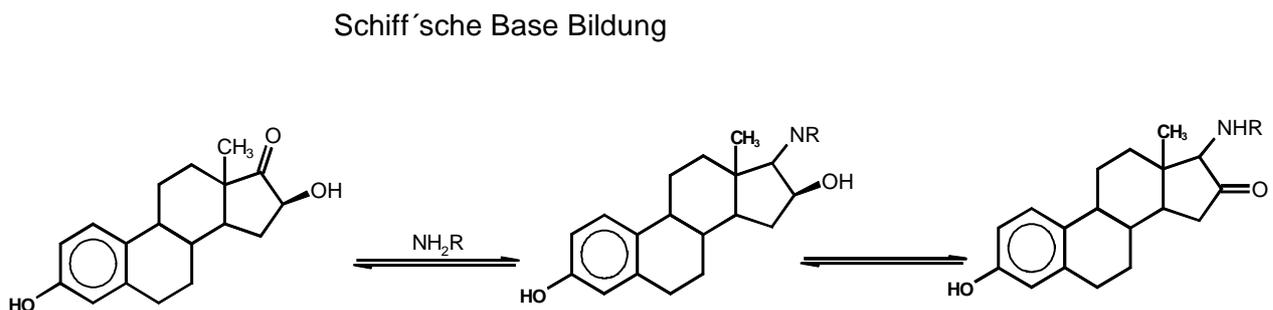


Abb. 2-15: Reaktionsmechanismus, der zur Bildung einer kovalenten Bindung von 16α -Hydroxyestradiol führt.

16α -Hydroxyestron induziert eine spezifische estrogenrezeptorvermittelte Oncogenexpression. Fishman, 1988, findet in Brustkrebspatientinnen erhöhte Werte von 16α -Hydroxyestron. 16α -Hydroxyestron, nicht jedoch 2α -Hydroxyestron, scheint ein potenter Tumorpromotor zu sein.

Verschiedene Pestizide und PCBs sollen das Verhältnis zwischen der Bildung von 2-Hydroxy- und 16α -Hydroxyestron hin zu 16α -Hydroxyestron verschieben. Bradlow

vermutet hier eine indirekte schädigende Einflußnahme von endokrinen Disruptoren auf den Menschen und Tiere.

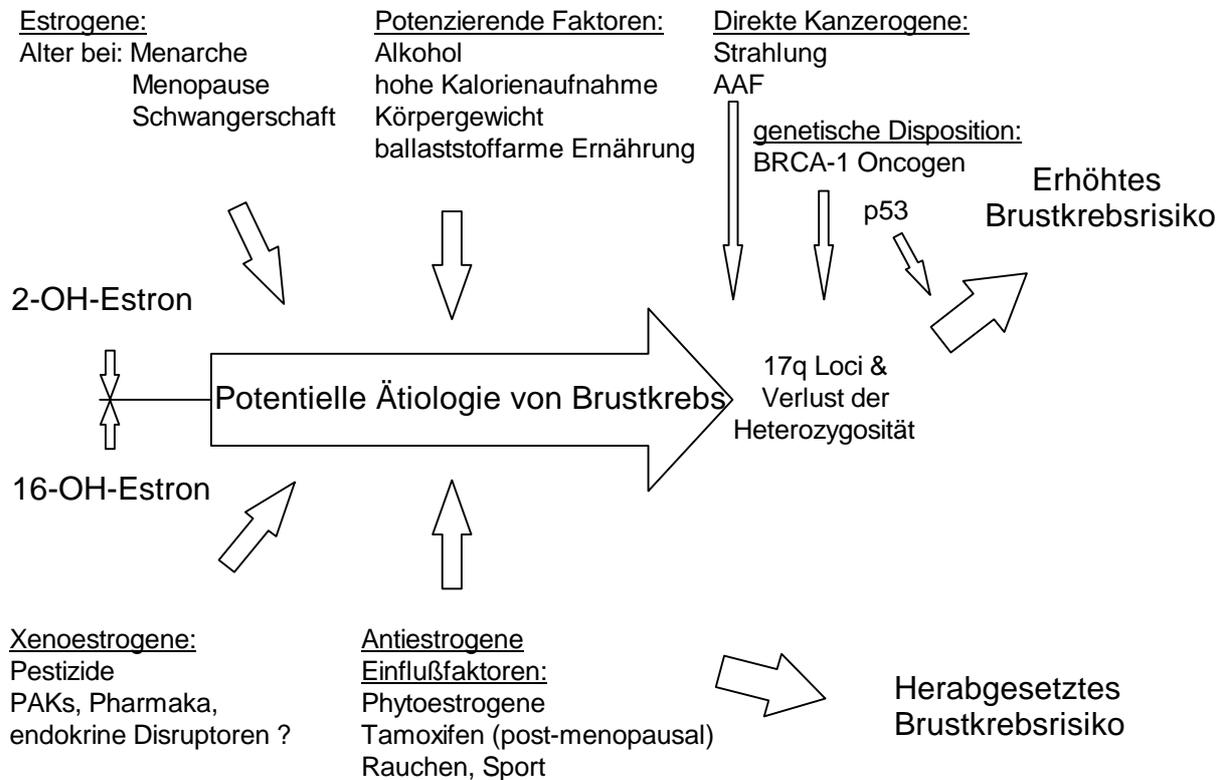


Abb. 2-16: Hypothetischer Mechanismus, der zur vermehrten Entstehung von Brustkrebs führen könnte (Davis, 1993)

2.10 Blutplasmaproteine und ihr Einfluß auf das estrogene Potential von Hormonen

Seit mehreren Jahrzehnten ist das Vorkommen von spezifischen steroidhormorezeptorbindenden Blutplasmaproteinen bekannt. Obwohl diese Plasmaproteine Corticosteroid-Binding Globulin (CBG) und (Sex) Steroid-Hormone-Binding Globulin (SHBG) Gegenstand vieler wissenschaftlicher Studien waren und sind, besteht bis heute keine Klarheit über deren Funktionen und Aufgaben. Es

besteht sogar über die ihnen zugrundeliegenden Mechanismen eine kontroverse Diskussion unter den führenden Instituten (Rosner, 1990).

Generellen Konsens gibt es in Bezug auf die sogenannte "Freie Hormon-Hypothese", d. h. nur die nicht proteingebundenen Steroide sind in der Lage in Kapillaren zu diffundieren und Zellmembranen zu passieren. Intrazellulär induzieren sie den entsprechenden biologischen "Response". Dabei dienen die SHBG-gebundenen Steroide vornehmlich als Speicher, der eine schnelle Freisetzung der Steroide bei Bedarf erlaubt. Bei CBG, das größere Mengen Cortisol speichert, welches in gewissen Stresssituationen rasch vom Körper benötigt wird, ist diese Reservoirbildung logisch nachvollziehbar. Für SHBG, das spezifisch Testosteron, DHT und Estradiol bindet sind bislang keine biochemischen Mechanismen bekannt, die in kürzester Zeit große Mengen dieser Sexualsteroiden benötigen. Hier weist die freie Hormonhypothese einen deutlichen Schwachpunkt auf.

Eine wesentliche Aufgabe des SHBG wird darin gesehen, daß es eine Feinregulierung der freien Steroidkonzentration erlaubt.

Eine andere diskutierte Hypothese im Zusammenhang mit SHBG und Sexualsteroiden stellt der mögliche regulierende Einfluß von SHBG auf die "Androgen-Estrogen-Balance" dar.

Da Testosteron mit höherer Affinität an SHBG bindet als Estradiol, während Estradiol stärker an Albumin bindet, wird spekuliert, daß Veränderungen in der Konzentration von SHBG die freie Konzentration dieser Steroide unterschiedlich beeinflusst.

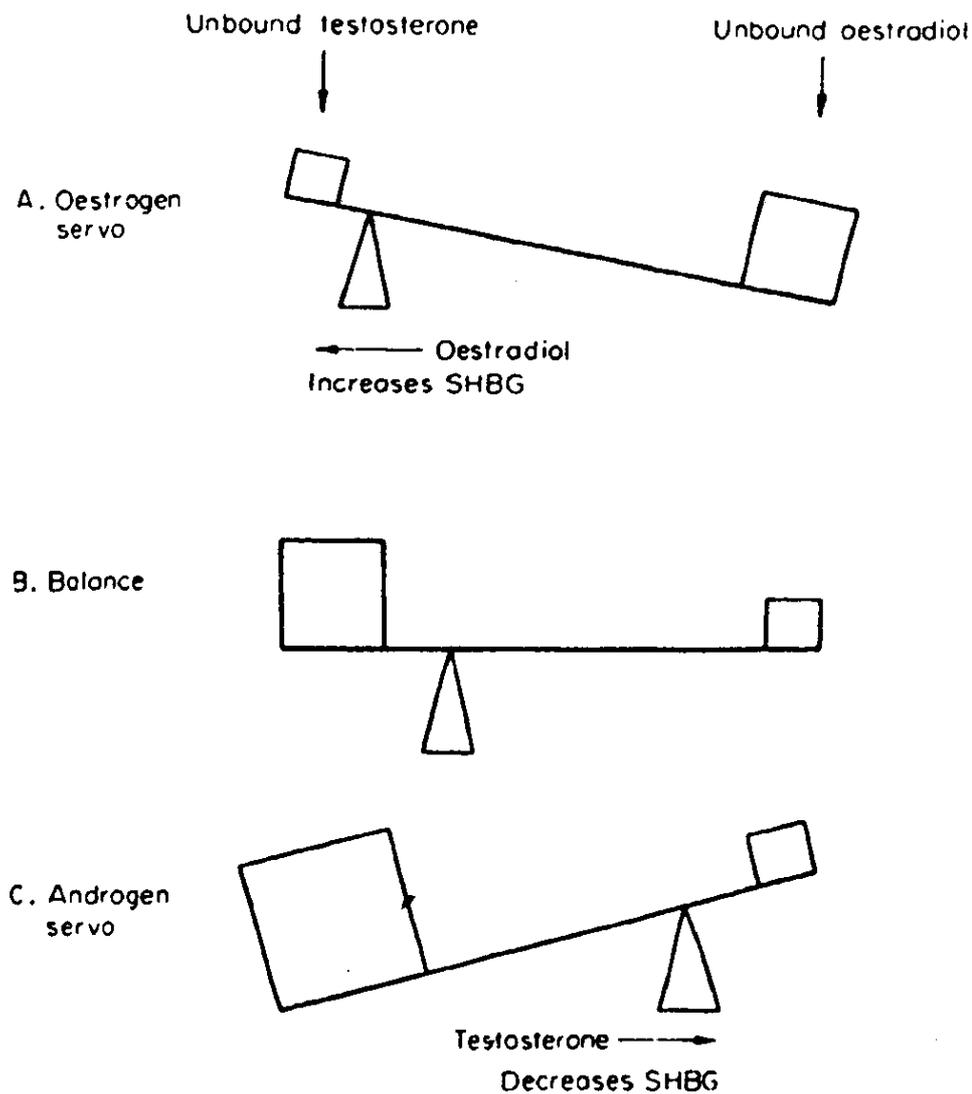


Abb. 2-17: Schematische Darstellung der postulierten Regulation der freien Estradiol- und Testosteronkonzentrationen durch SHBG.

Fall A: erhöhte Estradiolbildung

Ungebundenes Estradiol nimmt zu und induziert durch die Stimulation der SHBG-Bildung einen Abfall der Testosteronkonzentration.

Fall B: ausgeglichener Zustand; Balance

Fall C: zunehmende Testosteronkonzentration

Erhöhte Konzentration ungebundenen Testosterons; durch die Abnahme der SHBG-Konzentration wird dieser Effekt weiter verstärkt.

Fall A spiegelt die normale Situation bei der erwachsenen Frau wieder.
Fall C gibt die Verhältnisse beim erwachsenen Mann wieder.

Die biologische Bedeutung dieser Veränderung beruht darauf, inwieweit androgen abhängige oder estrogen abhängige Zielgewebe primär von der absoluten Konzentration dieser Steroide oder deren Verhältnis zueinander abhängen. Für die "Androgen-Estrogen-Balance-Hypothese" ist die Abhängigkeit des biologischen Effekts von dem Verhältnis der Steroide im Zielgewebe die grundlegende Voraussetzung. Mit diesem Denkmodell wird auch versucht, wenig verstandene Mechanismen zu erklären. Beispielsweise wird die Ausbildung einer weiblichen Brust bei Patienten, die einer androgenablativen Therapie unterzogen wurden auf einen solchen Mechanismus zurückgeführt (Rosner, 1990).

Problematisch sind bisher fehlende experimentelle Beweise, die für die Richtigkeit dieser Annahme sprechen.

Eine weitere interessante Hypothese diskutiert selektive Transportmechanismen von Sexualsteroiden via SHBG. Diese Hypothese postuliert, daß SHBG bestimmten Mechanismen in der Mikrozirkulation unterliegt, die die Dissoziation der gebundenen Steroide vom Protein fördern. Diese Mechanismen sind im Detail noch nicht verstanden. Sie sollen auch nicht in allen Geweben gleichmäßig verteilt sein und somit mithelfen, gewebespezifische Wirkspiegel zu erreichen. Mit diesem Modell ließe sich elegant erklären, warum in verschiedenen Geweben unterschiedliche Gewebehormonspiegel vorliegen; dies vor dem Hintergrund der gleichmäßigen Verteilung der Sexualsteroiden im arteriellen System.

Diese Hypothese ist auch für die gesamte Fragestellung der vorliegenden Arbeit von großer Bedeutung. Es ist somit denkbar, daß Xenobiotika, die spezifisch vielleicht auch an SHBG binden (siehe Danzo, 1997), selektiv in endokrin kontrollierte Gewebe transportiert werden können. Dies wäre von besonderer Tragweite für die toxikologische Gesamtbewertung möglicher endokriner Disruptoren. Dieser selektive Transport und damit verbundene gewebspezifische Akkumulationen in endokrin abhängigen Geweben würden die Bestimmung der Blutserumspiegel von Xenobiotika wertlos werden lassen.

Selbst bei sehr geringen Stoffkonzentrationen im Blut könnten durch die oben beschriebene Hypothese deutlich höhere Gewebespiegel in den eigentlichen Zielgeweben erreicht werden. Somit wären auch bisher nicht verstandene Effekte

von beispielsweise p.tert.-Octylphenol, das *in vivo* eine höhere Aktivität aufweist als *in vitro*, vielleicht besser zu erklären. Nach intravenöser Gabe von Octylphenol sind im Blutplasma bereits nach kurzer Zeit kaum noch feststellbare Gehalte an Octylphenol nachweisbar (Certa, 1996). Trotzdem können die typischen adversen Effekte, die Octylphenol bei gleichartiger Applikation und Konzentration zeigt, beobachtet werden. Eine mögliche Erklärung wäre vielleicht eine spezifische Bindung von p.tert.-Octylphenol an SHBG und anschließender selektiver Transport zu den Zielgeweben.

Neben den bisher dargestellten Reservoirfunktionen von SHBG werden diesem Plasmaprotein auch Transportvorgänge, die auf spezifischen Rezeptor- oder Membranwechselwirkungen beruhen sollen, zugeschrieben. Hryb, 1985, und Strel'chyonok, 1984, konnten eine spezifische SHBG-Rezeptorbindung, mit einem K_D -Wert von 0,15 nM bei 37° C als Membranpräparation mit präpariertem, solubilisiertem Rezeptor nachweisen.

Aufgrund der Bindungsdaten von DHT-SHBG an den SHBG-Rezeptor und Estradiol, Estron und Estriol ergibt sich möglicherweise ein ungewöhnliches Bindungsverhalten von SHBG an den Rezeptor. Die Gruppe um Rosner, 1990, diskutiert, daß freies SHBG an den SHBG-Rezeptor bindet. Eine russische Gruppe (Avvakumov, 1986) diskutiert den eigentlich naheliegenderen Mechanismus, daß die Steroide, die an SHBG gebunden vorliegen nach erfolgter SHBG-Rezeptorbindung in die rezeptorbesetzten Zellen eingeschleust werden, ohne daß SHBG in die Zelle eintritt. Beide Hypothesen stehen sich bis heute gegenüber, wobei die Theorie von Rosner biochemisch unwahrscheinlich wirkt, jedoch durch experimentelle Befunde gut abgesichert scheint.

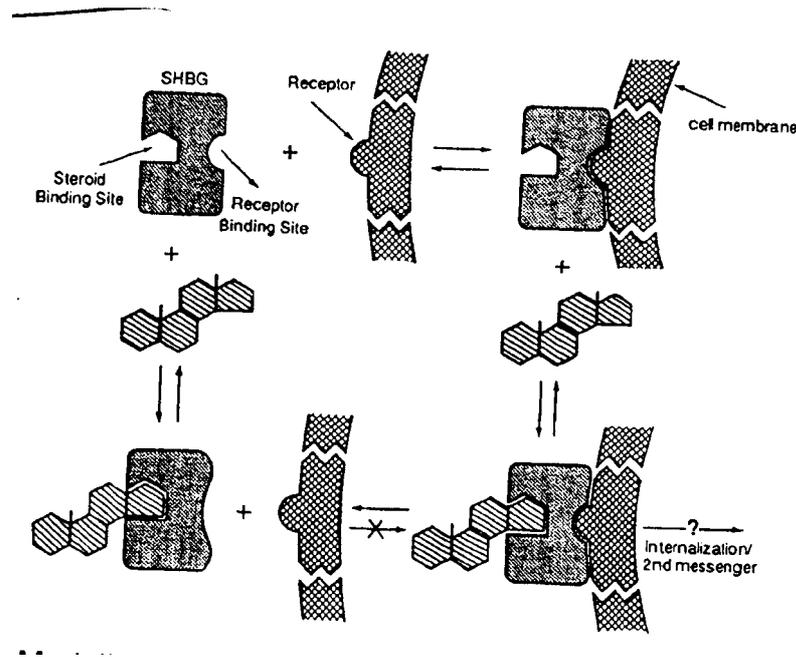


Abb. 2-18: Modell des SHBG-Rezeptor-SHBG-Steroid Systems

SHBG besitzt zwei Bindungsstellen, eine für Steroide und eine für den SHBG-Rezeptor der membrangebunden auf der Zelloberfläche entsprechender Zielzellen gebunden vorliegt. SHBG ist ein allosterisches Protein, das eine Konformationsänderung durchläuft. Nach Bindung eines Steroids in der Steroidbindungstasche wird die SHBG-Rezeptor-affine Stelle maskiert. Nachdem freies SHBG an den Membranrezeptor bindet behält es trotzdem die Fähigkeit, Steroide zu binden. Dies verursacht kein direktes Ablösen von SHBG von dem SHBG-Rezeptor. Nach Hryb, 1989, ruft die Bindung eines Hormons an den zuvor gebildeten SHBG-Rezeptorkomplex die verstärkte Bildung von intrazellulärem cAMP hervor.

Untersuchungen, die die Rolle von SHBG auf bestimmte Transport- und Verteilungsvorgänge klären sollen, werden in USA derzeit vom amerikanischen Chemieverband (CMA) sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt (Nader, 1998).

Für die Frage nach möglichen Effekten von Umweltestrogenen bleibt diese Thematik weiterhin hochaktuell. Hinweise geben Arbeiten aus der Gruppe um Rosner, 1990, die für 2-Methoxyestradiol, das besser an SHBG bindet als Testosteron, die Bindung von SHBG an den SHBG-Rezeptor inhibiert. Vertiefende mechanistische Einsichten über Xenobiotika-SHBG-Wechselwirkungen können möglicherweise viele bisher nicht verstandene Wirkungen im Tier oder am Menschen besser verständlich machen. Verbesserte Detailkenntnisse würden auch realistischere Pharmako-(Toxiko)kinetische Modelle generieren, die für ein intelligenteres "risk assessment"

notwendig sind. Rufe nach verbesserten Rechenmodellen zirkulieren bereits unter dem Bewußtsein, daß die bisherigen Rechenalgorithmen zu einfach konzipiert sind, um die beobachteten schädigenden Effekte theoretisch zu beschreiben. Einen solchen Ansatz stellen Berechnungen nach sogenannten "Physiologically Based Pharmacokinetik" Modellen (PBPK) dar. Diese Modelle betrachten den Organismus weitaus differenzierter nach verschiedenen Kompartimenten, Kompartimentvolumen, Kompartimenthierarchie, Blutfluß, Exkretionsfluß und weiteren Parametern. Verschiedene Blutplasmaproteine stellen für endokrine Disruptoren sicherlich ein wesentliches Kompartiment dar, welches bei heutigen Risikobetrachtungen unberücksichtigt bleibt. Hier müssen in naher Zukunft validere Modelle generiert werden als die heute zur Verfügung stehenden.

2.11 Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind die Schlüsselemente der endokrinen Signaltransduktion und besitzen zwei wichtige Funktionen.

Sie sind Signalverstärker und ligandinduzierbare Transkriptionsfaktoren, die die Transkription durch die Bindung an spezifische DNA-Sequenzen in Abhängigkeit vom Zielgen und vom Gewebe positiv oder negativ regulieren (Induktion oder Repression der Genexpression). Eine wichtige Rolle dieser regulatorischen Faktoren liegt in der embryonalen Entwicklung, der Zelldifferenzierung, Zellproliferation und der hormonellen Homöostase (Carson-Jurica, 1990; Church Landel, 1995; Gronemeyer, 1992; Meyer, 1989).

Die Steroidhormonrezeptoren gehören zu einer ganzen Familie von zellulären Rezeptoren, zu der auch die Rezeptoren der Retinolsäure, der Vitamin D₃-Rezeptor sowie der Thyroidrezeptor gezählt werden. Desweiteren konnte noch eine Vielzahl ligandaktivierbarer Rezeptoren identifiziert werden, deren physiologische Liganden bisher nicht identifiziert werden konnten. Sie werden daher als "orphan"-(Waise) Rezeptoren bezeichnet (Beato, 1989; Gronemeyer, 1992).

Verschiedenste molekularbiologische Untersuchungen haben gezeigt, daß Steroidhormonrezeptoren spezifische DNA-Bindungsproteine darstellen. Partiiell gereinigte Rezeptoren binden bevorzugt an DNA-Fragmente, die das entsprechende Responsive Element (RE) enthalten. Die Bindung des Hormonrezeptors an das RE muß nicht in jedem Fall hormonabhängig verlaufen. In *in vitro* Versuchen (Willmann und Beato, 1986) konnte eine spezifische Bindung des Glucocorticoidrezeptors an MMTV-DNA ohne Hormonzugabe beobachtet werden. Dieser Vorgang wird als basale Transkription bezeichnet. Im Gegensatz dazu wurde *in vivo* eine Protein-DNA-Interaktion des Glucocorticoidrezeptors an das Responsive Element des Tyrosinaminotransferase-Gens nur nach Hormongabe gefunden (Tsai und Gustafsson, 1988).

Die Steroidhormonrezeptoren weisen alle einen gemeinsamen strukturellen Aufbau auf. Sie besitzen bestimmte Domänen, die die verschiedenen Funktionen der DNA-

und der Hormon-Bindung, der Translokation und der Interaktion mit Heat-Shock-Proteinen erfüllen (McDonnell, 1992).

Steroidhormonrezeptoren sind in sechs Regionen eingeteilt (allgemein als Region A - F bezeichnet), die wiederum in eine oder mehrere Domänen unterteilt sind. Die Steroidhormonrezeptoren weisen in ihrer Aminosäuresequenz deutliche Homologien auf. Entsprechend der unterschiedlichen Sequenz in der C-Region lassen sich die Rezeptoren in Gruppen einteilen. Der Estrogenrezeptor ist der Hauptvertreter der größeren Untergruppe zu der auch der Vitamin-D₃-Rezeptor, der Thyroidhormonrezeptor sowie der Rezeptor der Retinolsäure zählen. Glucocorticoid-, Progesteron- und Androgenrezeptor gehören der kleineren Untergruppe an (Gronemeyer, 1992).

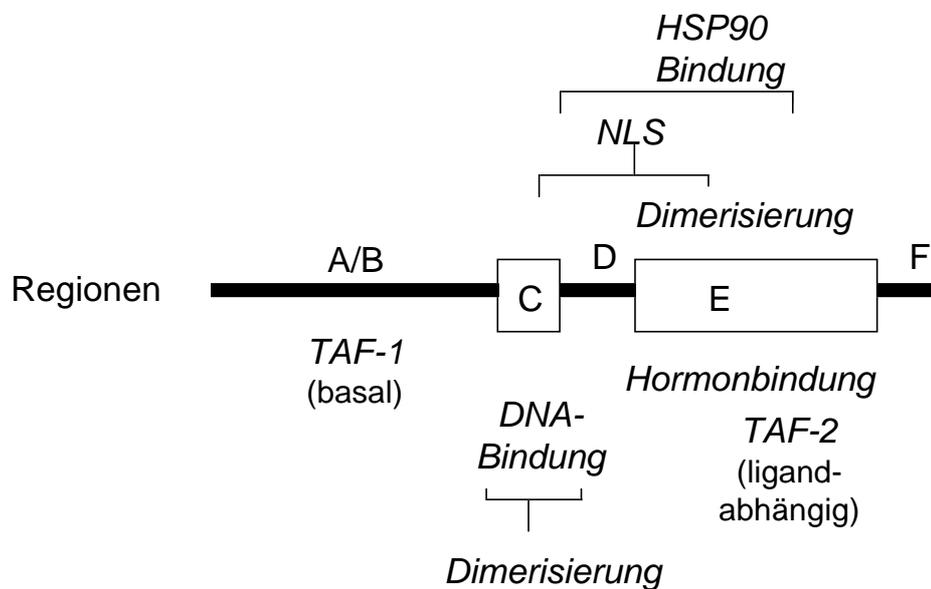


Abb. 2-19: Schematische Darstellung eines Steroidhormonrezeptors (modifiziert nach Gronemeyer, 1992)

2.11.1 Hormonbindende Domäne (HBD, Region E)

Die Region E ist an der carboxyterminalen Seite des Rezeptors lokalisiert. Sie ist für die Ligandenbindung verantwortlich und von den anderen Domänen des Rezeptors

unabhängig. Die konservierten Aminosäuren dieser Rezeptorregion sind für die Bildung einer hydrophoben Tasche von Bedeutung, die bei der Ligandenbindung eine wesentliche Rolle einnimmt. Die nicht-konservierten Aminosäuren sind für die Differenzierung der spezifischen Liganden wichtig.

Weitere Funktionen der HBD liegen in der Dimerisierung des Estrogenrezeptors, der ligandenabhängigen Translokation des Glucocorticoidrezeptors sowie der Interaktion des Rezeptors mit den Heat-Shock-Proteinen (Green, 1988; Gronemeyer, 1992).

2.11.2 DNA-bindende Domäne (DBD, Region C)

Die DNA-bindende Domäne ist in zwei Hälften CI und CII unterteilt. Sie besteht vor allem aus Cystein und basischen Aminosäuren. In jeder Region ist ein Zink-Atom tetraedrisch koordiniert, von vier Cystein-Resten gebunden. Diese bilden einen sogenannten Zink-Finger. Der erste Zink-Finger (CI) ist entscheidend für die spezifische Interaktion des Rezeptors mit der DNA, während der zweite Zink-Finger (CII) diese Bindung stabilisiert. Die hochkonservierten basischen Aminosäuren der Region CII ermöglichen die Wechselwirkung mit dem Phosphatrückgrat der DNA. Die Region CII spielt möglicherweise auch bei der Dimerisierung des Rezeptors nach der Ligandenbindung eine Rolle (Beato, 1991; Green, 1988; Gronemeyer, 1992).

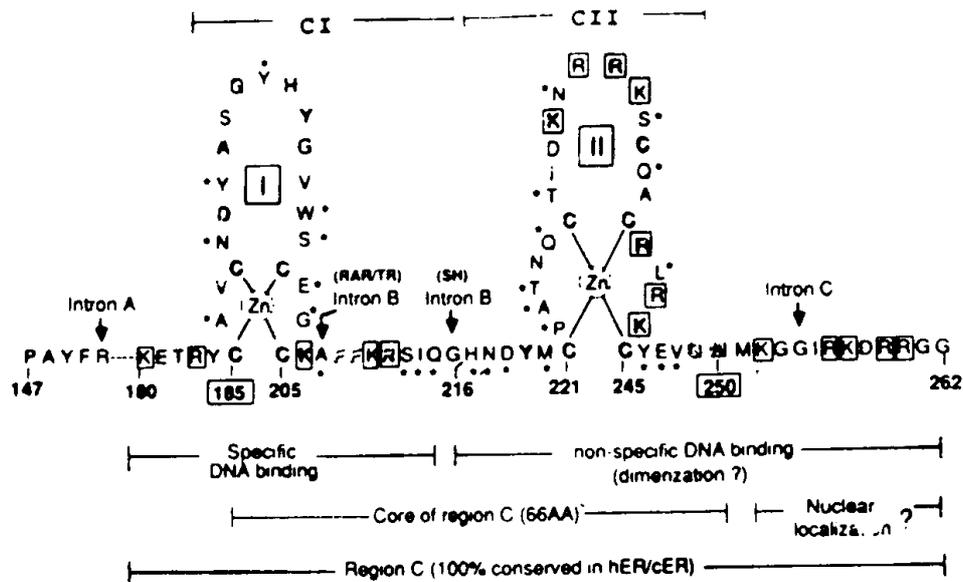


Abb. 2-20: Struktur der Region C des humanen Estrogenrezeptors

2.11.3 Genaktivierende Domäne (Region A/B)

Die Region A/B ist die variabelste Region des Steroidhormonrezeptors. Sie beeinflusst die Affinität des Rezeptors zur DNA und ist für die Regulation der Genexpression verantwortlich (Beato, 1989).

2.11.4 Heat shock proteine und ihr Einfluß auf die Funktion von Steroidhormonrezeptoren

Das Hsp 90, ein ubiquitär vorkommendes Protein ist mit allen Steroidhormonrezeptoren, die im inaktiven Zustand vorliegen, assoziiert. Die Bindung des Hsp 90 ist für die hohe Affinität der Hormon-bindenden Domäne (HBD) zum Liganden erforderlich. Für eine erfolgreiche Rezeptorpräparation ist die Zugabe eines Metallions (Mn^{2+} , Va^{2+} , Tu^{2+}) in den Präparationspuffer essentiell, da das Hsp eine intrinsische ATPase-Aktivität besitzt und sich teilweise selbst verdauen würde.

Bei Gabe der entsprechenden Metallionen wird jedoch die Abdissoziation der Hsp-Komplexe verhindert und es kann somit nicht zur DNA-Bindung des ligandenaktivierten Rezeptors kommen.

Der Komplex aus Hsp und Rezeptor wird durch ein endogenes Metallanion stabilisiert, das einen Bestandteil des Heterokomplexes darstellt. Das Metallion besetzt die ATP-Bindungsstelle und verhindert so den Selbstverdau des Rezeptors (Dalman, 1989; Pratt, 1988; Pratt, 1989; Pratt, 1993).

Das Hsp 70 ist an der Faltung von Proteinen beteiligt und wichtig für deren Transport durch Zellmembranen. An das Hsp 90 ist noch ein weiteres Heat-Shock-Protein, Hsp 56, gebunden, das ebenfalls durch das Metallanion stabilisiert wird.

Die Bindung des Hsp-Komplexes an den Rezeptor bewirkt die Entfaltung der HBD. Diese selbst hat mehrere Funktionen. Die HBD bindet nicht nur den Liganden, sie bestimmt auch die enge Assoziation des Steroidhormonrezeptors mit den Heat-Shock-Proteinen, welche für die exakte Faltung und Funktion des Rezeptors von Bedeutung ist (Pratt, 1993).

Das Freilegen der HBD wird durch das Hsp 90-Dimer stabilisiert, die HBD besitzt dann die zur Ligandenbindung notwendige Konformation. Die Ligandenbindung an die HBD induziert eine Konformationsänderung des Rezeptors, somit verringert sich die Affinität des Rezeptors zum Hsp 90. Der Hsp-Komplex dissoziiert ab und die DNA-bindende Domäne wird aktiviert. Der Hormon-Rezeptor-Komplex ist nun in der Lage, an das entsprechende RE zu binden und die Transkription auszulösen (Pratt, 1989; Pratt 1993).

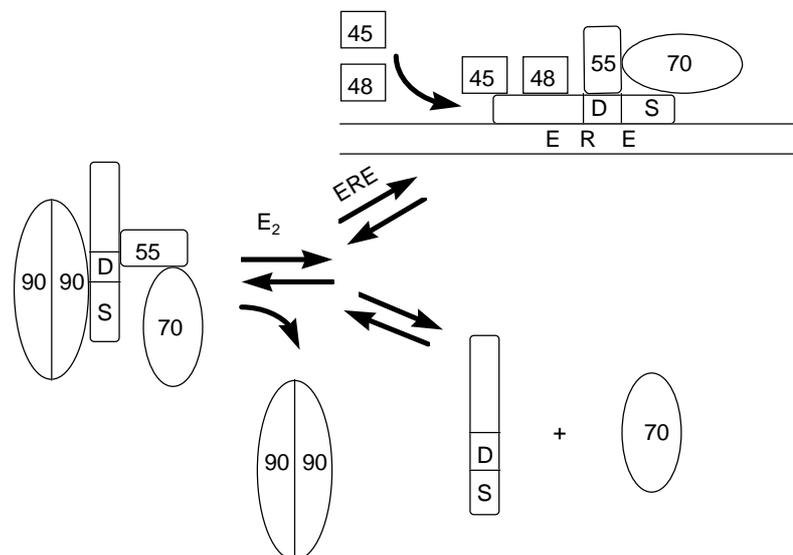


Abb. 2-21: Schematische Darstellung der Wechselwirkungen zwischen Steroidhormonrezeptor und Heat-Shock-Proteinen

2.11.5 Lokalisierung der Steroidhormonrezeptoren in der Zelle

Untersuchungen zur zellulären Lokalisation des Estrogenrezeptors (King und Green, 1984; Welshons, 1984) haben gezeigt, daß das Modell der Steroidhormonrezeptor-Transformation (Rezeptor-Translokation in den Zellkern nach der Ligandenbindung) nicht für alle Steroidhormonrezeptoren gültig ist. Der Estrogenrezeptor befindet sich mit oder ohne estrogenem Stimulus vor allem im Zellkern, wo er lose an den Zellkern gebunden vorliegt (analoge Ergebnisse liegen für den Vitamin D₃- und den Thyroidhormonrezeptor vor). Im Falle des Estrogenrezeptors findet nach der Ligandenbindung keine Translokation in den Zellkern statt, es kommt hier zu einer Erhöhung der Rezeptoraffinität zu den Responsiven Elementen (King und Green, 1984; Welshons, 1984; Carson-Jurica, 1990; Milgrom 1995).

Der Glucocorticoidrezeptor unterliegt dagegen einer hormonabhängigen Translokation vom Cytoplasma in den Zellkern. Unterschiedliche Untersuchungen zeigten, daß der GR zwischen Cytoplasma und Zellkern verteilt vorliegt und zwischen beiden Kompartimenten hin und her pendelt. In Abwesenheit des Liganden ist der GR hauptsächlich im Cytosol lokalisiert (Cadepond, 1992; Picard, 1987; Pratt, 1989).

Im Estrogenrezeptor konnte im Gegensatz zum Gucocorticoidrezeptor keine hormonabhängige NLS identifiziert werden (Ylikomi, 1992).

In vitro Versuche mit transfizierten COS-Zellen (Expression des humanen Androgenrezeptors) zeigten, daß der Androgenrezeptor in Abwesenheit des entsprechenden Liganden hauptsächlich im Cytosol vorliegt. Die Zugabe eines Androgens führt zur schnellen und vollständigen Translokation des Rezeptors in den Zellkern. Mutanten des Androgenrezeptors, denen die NLS fehlte, konnten selbst bei der Bindung des Hormons nur im Cytoplasma aufgefunden werden (Wilson, 1991).

Es gibt mindestens zwei Mechanismen, durch die der Ligand indirekt den Transport des Steroidhormons in den Zellkern beeinflusst.

In verschiedenen Untersuchungen wurde eine Phosphorylierung innerhalb oder in der Nähe des NLS für den Zellkerntransport verantwortlich gemacht. Die Phosphorylierung, die möglicherweise ligandeninduziert abläuft, könnte die Häufigkeit des nuklearen Imports regulieren. Daneben kann die cytoplasmatische Lokalisierung des Steroidhormonrezeptors durch die Maskierung der NLS hervorgerufen werden. Eine hormoninduzierte Konformationsänderung des Rezeptors oder die Dissoziation der Heat-Shock-Proteine könnte die NLS freilegen und den Import in den Zellkern bewirken (Jenster, 1992).

Die Aktivität vieler Transkriptionsfaktoren wird durch Phosphorylierung reguliert. Die Phosphorylierung als Aktivitätskontrolle von Transkriptionsfaktoren tritt bei der Änderung der DNA-Bindung, der Transkriptionsaktivierung und der intrazellulären Lokalisation auf. *In vivo* ist die Phosphorylierung der Steroidhormonrezeptoren nachgewiesen (Metzger, Chambon, 1993).

Im Fall des Androgenrezeptors ist eine hormonabhängige Phosphorylierung und der damit zusammenhängende Transport in den Zellkern bewiesen (Wilson, 1991).

Bei der Untersuchung des Estrogenrezeptors konnte eine Phosphorylierung von Tyrosin, die an der Modulation der Hormonbindung beteiligt ist, beobachtet werden. Die Phosphorylierung des Estrogenrezeptors *in vitro* verläuft ligandabhängig, bei Zugabe von Estradiol erhöht sich die Phosphorylierungsrate um das Achtfache. Eine dieser Phosphorylierungsstellen liegt in der N-terminalen A/B-Region und ist wichtig für die Aktivierung der Transkription durch TAF-I. Die Phosphorylierung des Estrogenrezeptors hat keine Auswirkungen auf die Translokation in den Zellkern, da dieser, wie bereits beschrieben, schon vor der Ligandenbindung im Zellkern lokalisiert ist (Metzger, Chambon, 1993).

2.11.6 Steroidhormonrezeptor kontrollierte Zielgene

2.11.6.1 Responsive Element (RE)

Die spezifischen DNA-Sequenzen, an die die DNA-bindende Domäne des Rezeptors bindet, werden als "responsive elements" (RE) bezeichnet. Die REs sind auf der DNA innerhalb des Promotors für das entsprechende Gen lokalisiert.

Entsprechend den Untergruppen der Steroidhormonrezeptoren lassen sich die REs in zwei Gruppen einteilen. Das "estrogen responsive element" (ERE) wird vom Estrogenrezeptor, Thyroid-Rezeptor, Vitamin-D₃-Rezeptor und dem Rezeptor der α - und β -Retinolsäure erkannt, während Glucocorticoid-, Progesteron-, Mineralcorticoid- und Androgenrezeptor an ein anderes gemeinsames "hormone responsive element" (HRE) binden.

Die REs bestehen aus 15 Basenpaaren (Bp) mit einer palindromischen "consensus"-Sequenz. Es werden jeweils zwei sechs Bp lange Arme von einem drei Bp langen "spacer" verbunden.

	1	2	3	4	5	6				10	11	12	13	14	15				
GRE	G	G	T	A	C	A	n	n	n	T	G	T	T	C	T				
PRE	G	G	T	A	C	A	n	n	n	T	G	T	T	C	T				
ARE	G	G	T	A	C	A	n	n	n	T	G	T	T	C	T				
MRE	G	G	T	A	C	A	n	n	n	T	G	T	T	C	T				
ERE	T	C	A	G	G	T	C	A	_	_	_	T	G	A	C	C	T	G	A

Abb. 2-22: Responsive Elements der Steroidhormonrezeptoren (Beato, 1991)

Der symmetrische Aufbau des RE ermöglicht die Bindung des aktivierten Rezeptors als Dimer, je ein Rezeptormolekül kann an einen Arm des RE binden.

Für das RE des Estrogenrezeptors (ERE) stehen beispielhaft zwei Strukturen aus unterschiedlichen Spezies und Promotoren, das VIT-ERE aus dem Xenopus Vitellogenin A2 Gen und das pS2 ERE aus dem humanen pS2 Gen. Die Sequenzen der beiden EREs unterscheiden sich in zwei Basenpaaren. Der Estrogenrezeptor bindet jedoch an beide EREs (Beato, 1991; Green, 1988; Gronemeyer, 1992).

2.11.6.2 Interaktion des Glucocorticoidrezeptors mit der Long-Terminal-Repeat-Sequenz des Mouse Mammary Tumor Virus

Die Interaktion des Glucocorticoidrezeptors oder des Androgenrezeptors mit dem HRE soll am Beispiel des Mouse Mammary Tumor Virus-Long-Terminal Repeat (MMTV-LTR) beispielhaft beschrieben werden. Der MMTV ist eines der am besten untersuchten hormonregulierten Gene. Die Regulation der MMTV-Expression kann z. B. durch Glucocorticoide und Gestagene erfolgen. Neben den Steroidhormonen üben eine ganze Reihe anderer Transkriptionsfaktoren Einfluß auf die MMTV-LTR-Sequenz aus (Bresnick, 1991; Hager, 1987).

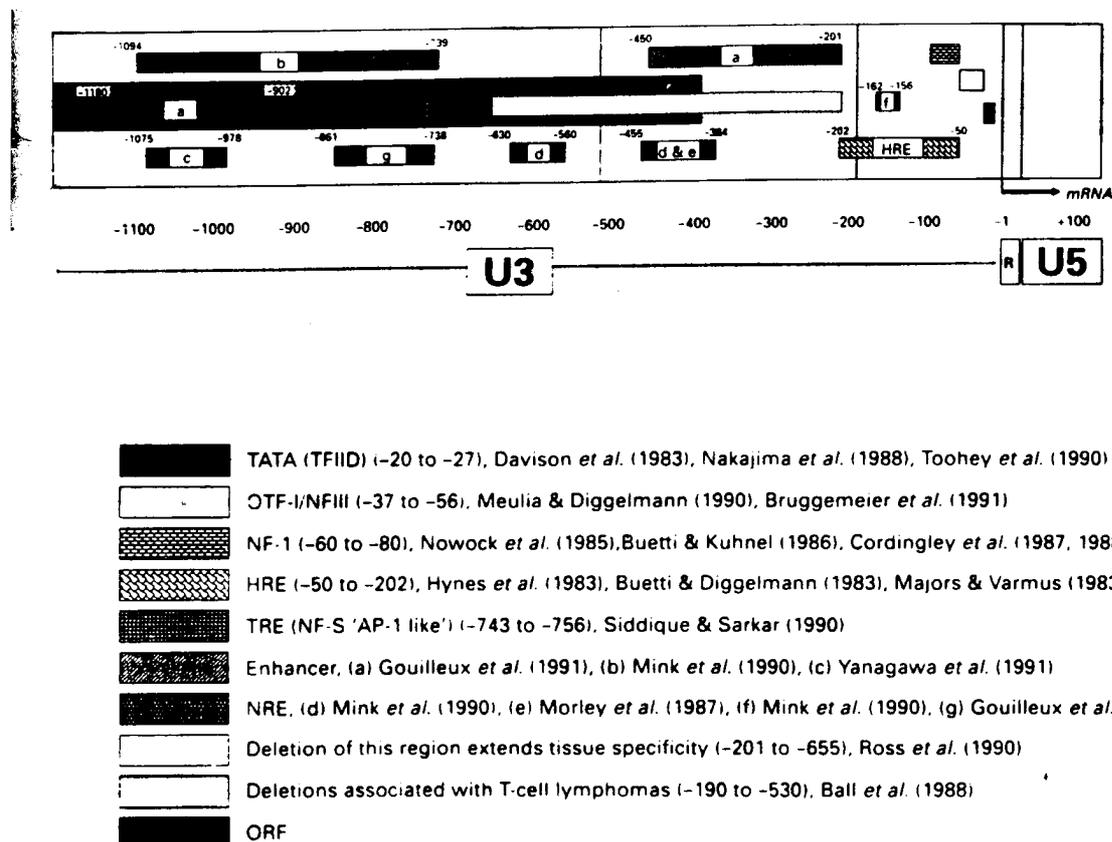


Abb. 2-23: Schematische Darstellung der Lokalisation der regulatorischen Sequenzen im MMTV-LTR (Günzburg, 1992)

In vivo ist die LTR des MMTV auf sechs Nukleosomen aufgewunden. Jedes Nukleosom enthält ca. 160 Bp der DNA, die in $1\frac{3}{4}$ Windungen um einen Histonkern (bestehend aus je zwei der Histone H2A, H2B, H3 und H4) gewickelt sind. Die Nukleosomen sind untereinander durch einen DNA-Abschnitt ("linker") variabler Länge verbunden. Das Histon H1 bestimmt die Struktur der Linker-DNA (Wolff, 1994).

Die Nukleosomen verhindern in Abwesenheit des Glucocorticoids oder des Androgenrezeptors die Assoziation des basalen Transkriptionsapparates mit dem Promotor. Die Bindung des Hormons an den Glucocorticoidrezeptor führt schließlich zur Assoziation des Rezeptorkomplexes mit dem HRE innerhalb eines Nukleosoms (Hager, 1987; Bresnick, 1991; Wolff, 1994).

Die Sequenzen, die an der Stimulierung des MMTV durch Glucocorticoide beteiligt sind, liegen alle in der U3-Region der LTR (Günzburg, 1992).

Die vier HRE-Sequenzen sind auf einem DNA-Stück lokalisiert, das den engsten Kontakt zum Kernhiston besitzt. Die große Furche von zwei HREs ist nach außen gerichtet, die der beiden anderen nach innen.

Die Bindungsstelle des Nuklearfaktors I (NF I), der bei der Transkriptionskontrolle ebenfalls von Bedeutung ist, überlappt teilweise mit den HRE-Sequenzen.

Der MMTV enthält noch zwei Oktamer-Motive, an die der Transkriptionsfaktor OTF-1 bindet. Die Bindung von OTF wird durch die Assoziation des Glucocorticoidrezeptors erleichtert und ist für die Transkriptionsinduktion ebenfalls notwendig.

Der Transkriptionsfaktor TF II-D bindet an eine sogenannte TATA-Box, die bei nahezu allen Promotoren, die von der Polymerase II erkannt werden, enthalten ist.

Eine Mutation innerhalb der TATA-Sequenz führt zu einem 6 - 8fachen Rückgang der Transkriptionsrate (Günzburg, 1992).

Die oben beschriebenen MMTV-Promotor-Sequenzen sind alle an der Oberfläche eines Histonkerns angeordnet. Dieser Komplex wird als Nukleosom B bezeichnet. Die Rezeptorbindung erfolgt bevorzugt an den HREs I und IV, da deren große Furchen nach außen gerichtet sind und damit für den Rezeptor leichter zugänglich sind. Die großen Furchen der HREs II und III sind dagegen zum Histonkern gerichtet und somit für den Rezeptor schlechter erreichbar (Beato, 1995; Hörz, 1994).

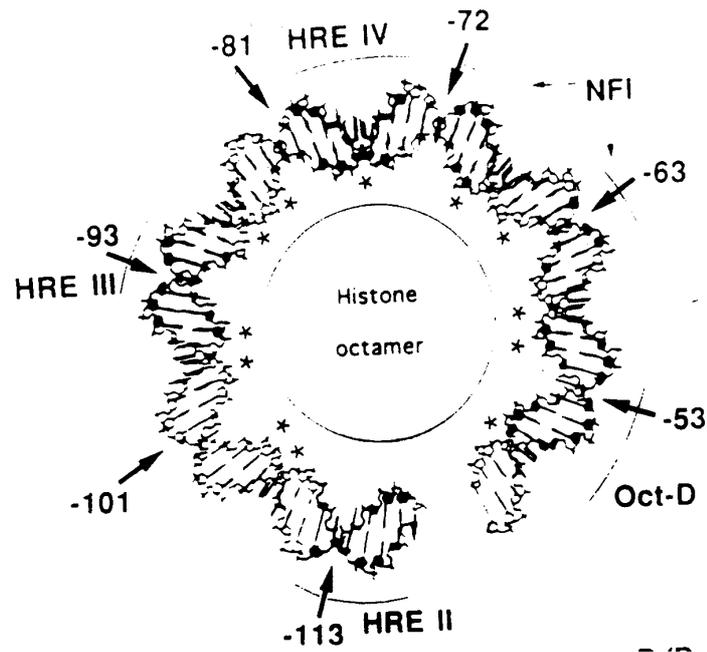


Abb. 2-24: Computergraphik der 3'-Hälfte des Nukleosoms B (Beato, 1995)

In der Abbildung sind die beiden Hälften der NF-I-Bindungsstelle und des OTF-Motivs (OCT-D) sowie die Gruppe der HRE II-IV dargestellt. Die Sequenzen, die von den entsprechenden Faktoren erkannt werden, sind fettgedruckt.

In ersten Arbeiten (Hörz, 1994; Hagen und Archer, 1991) ging man davon aus, daß es nach der Bindung des Steroid-Hormon-Rezeptor-Komplexes zur Ablösung des Nukleosoms von der DNA kommt. Der NF-I-Faktor kann dann an seine spezifische Bindungsstelle binden und die Genexpression wird induziert (Hörz, 1994).

In vitro Versuche, die mit freier, also nicht an einen Histonkern gebundener DNA durchgeführt wurden, ergaben, daß eine gleichzeitige Bindung des Steroidhormonrezeptors an die HREs und des NF-I an seine spezifische Bindungsstelle nicht auftritt, d. h. Rezeptor und NF-I konkurrieren um die Bindung an den MMTV-Promotor.

In neueren Untersuchungen konnte eine gemeinsame Bindung des Steroidhormonrezeptors und des NF-I beobachtet werden. Diese Versuche wurden im Gegensatz zu den oben genannten mit nukleosomaler DNA durchgeführt. Das Aufwinden der DNA um den Histonkern zwingt den gebundenen Proteinen eine radiale Konformation auf. Die sterische Behinderung der Transkriptionsfaktoren untereinander wird somit verringert. Der Rezeptor bindet vermutlich zuerst an die

Abb. 2-25B: Die Nukleotidsequenz ist um ein Histonoktamer gebunden. Es wird deutlich, wie die sterische Behinderung, die in der obigen Abbildung (2-26A) dargestellt ist, durch die Bindung an der Nukleosomenoberfläche überwunden wird. Die Rezeptormoleküle, die an die HREs II und III gebunden sind, sind gekennzeichnet (*), da diese Bindungsstellen in der nichtinduzierten Konformation des Nukleosoms für den Rezeptor nicht erreichbar sind.

2.12 Mechanismus der Transkriptionsaktivierung

Der Mechanismus, über den der ER bzw. andere Steroidhormonrezeptoren ihre biologischen Effekte in ihren Zielzellen ausüben ist weitgehend ähnlich. Die Steroidhormone lösen ihre Wirkungen über diese spezifischen intrazellulären Rezeptorproteine aus. Die Signaltransduktion zum Zellkern besteht dabei aus einer Reihe bestimmter nacheinander ablaufender Schritte.

Das Steroidhormon passiert höchstwahrscheinlich passiv die Zellmembran und bindet im Cytosol bzw. im Zellkern an seinen spezifischen Rezeptor. Das Rezeptorprotein liegt in Abwesenheit des Liganden als makromolekularer Komplex vor, der mit verschiedenen Heat-Shock-Proteinen und sogenannten akzessorischen Proteinen assoziiert ist. Nach der Bindung des Liganden wird der Rezeptor phosphoryliert, ändert dadurch seine Konformation, die Heat-Shock-Proteine dissoziieren ab und der Rezeptor dimerisiert.

Der Hormon-Rezeptor-Komplex unterliegt anschließend einer Translokation in den Zellkern bzw. bindet stärker an die entsprechenden DNA-Sequenzen. Im Zellkern interagiert das Rezeptor-Dimer mit spezifischen Responsive-Elementen der DNA. Der Zusammenschluß mit sogenannten Adapterproteinen, die im einzelnen noch nicht alle vollständig charakterisiert wurden (teilweise handelt es sich dabei um weitere Transkriptionsfaktoren) ermöglichen dem Rezeptor die Interaktion mit dem basalen Transkriptionsapparat. Die Adapterproteine spielen somit für die Initiation der Transkription eine entscheidende Rolle. Der Beginn der Transkription durch die RNA-Polymerase II erfolgt nach der Komplexbildung des Rezeptors mit den basalen Transkriptionsfaktoren und der Bindung an die TATA-Box (McDonnell, 1995).

In der nachfolgenden Abbildung sind die möglichen Schritte der Transkriptionsaktivierung durch den Ligand-Rezeptor-Komplex dargestellt.

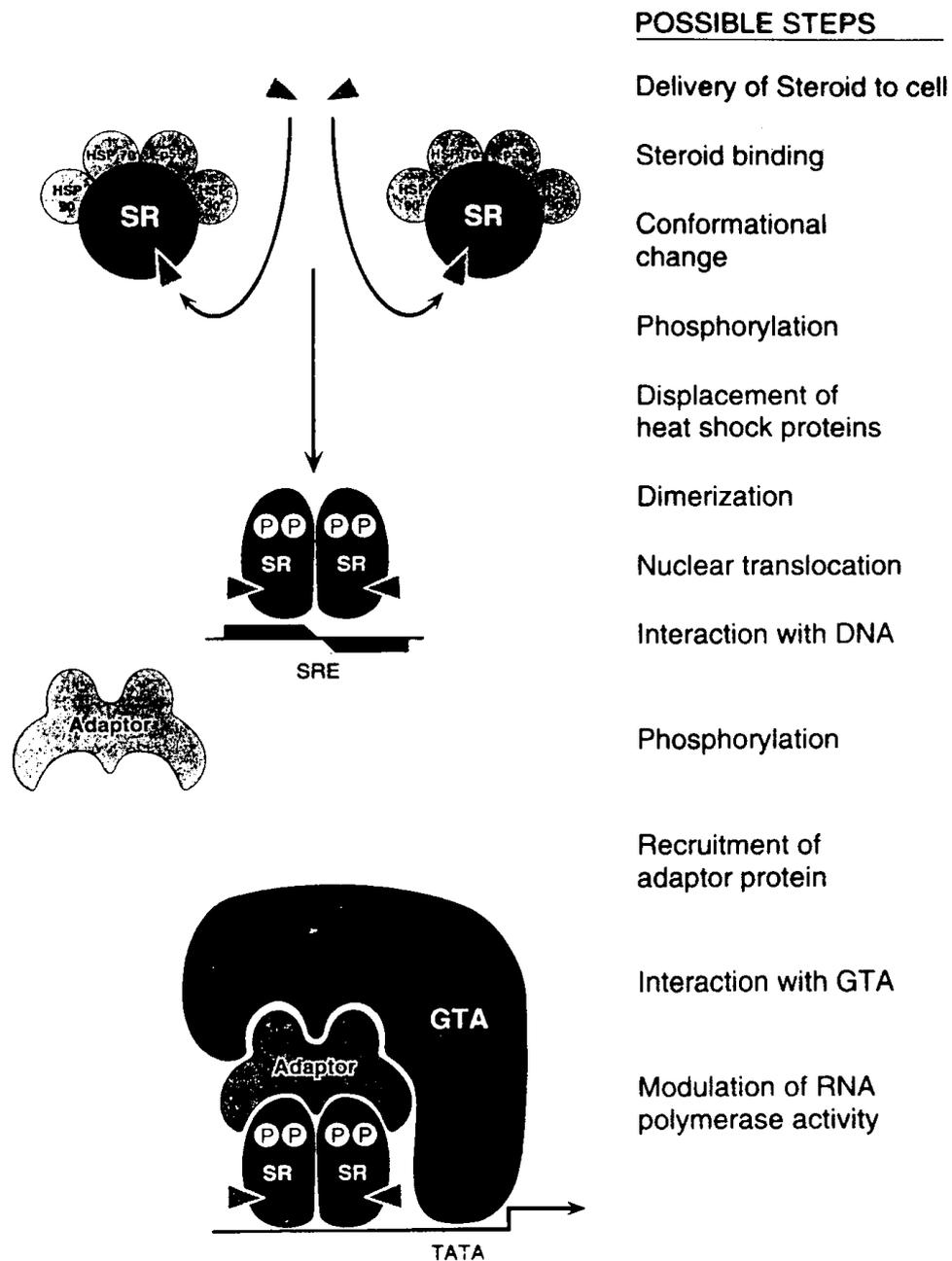


Abb. 2-26: Wirkungsmechanismus von Steroidhormonen im Zusammenhang mit anderen Adapterproteinen (McDonnell, 1995)

Die Interaktion der regulierenden DNA-Sequenz (HRE) und dem Transkriptionskomplex muß nicht direkt erfolgen. Diese kann durch Coaktivatoren vermittelt werden, die als "Brücke" zwischen dem HRE und dem Transkriptionsapparat fungieren. Die direkte Interaktion des Coaktivators mit der DNA muß dabei nicht erforderlich sein. Die Interaktion des Rezeptors mit dem

Transkriptionsapparat kann die Bildung eines DNA-Loops zur Folge haben, um den Abstand (dieser kann zwischen HRE und Transkriptionsapparat mehrere Kilobasen betragen) zu verkleinern. Die DNA-Looping-Bildung führt vermutlich zu einer Änderung der Chromatinstruktur, welche den Zugang anderer Transkriptionsfaktoren erleichtert (Church Landel, 1995; Wahli, 1991).

2.12.1 Zelluläre Mechanismen und ligandspezifische Einflüsse auf die molekularen Mechanismen der Funktion von Estrogenrezeptoren

Trotz der oben beschriebenen Kenntnisse zu den prinzipiellen Mechanismen, die die Funktion von Steroidhormonrezeptoren beeinflussen, ist das Verständnis über die Mechanismen der antagonisierenden Effekte von Antihormonen, der sogenannte "cross-talk" und auch gesamtzelluläre Mechanismen in Tumoren bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Dies ist unter anderem darin begründet, daß Estrogene und Androgene bzw. ihre Antagonisten die Regulation vieler verschiedener Zielproteine in der Zelle beeinflussen. Einige dieser Ziele sind Wachstumsfaktoren und / oder deren Rezeptoren (z. B. TGF β), was auf indirekte autokrine und parakrine Effekte der mitogenen Effekte der Steroide schließen läßt (Clarke, 1991). Daneben ergeben sich verstärkt Hinweise auf die direkte Kontrolle des Zellwachstums durch Steroide, über die direkte Regulation bestimmter Cycline oder verschiedener Kinaseinhibitoren. Neueste Arbeiten weisen daraufhin, daß neben der Regulation des Cyclin D1-Gens auch Cyclin D1 selbst einen kritischen Einflußfaktor für Steroide auf das Zellwachstum darstellt (Zwijssen, 1997).

Zusätzlich kompliziert wird das Verständnis und die Möglichkeit der Einflußnahme auf zelluläre Mechanismen durch Beobachtungen, daß die Rezeptor-Signalwege mit anderen zellulären Signaltransduktionswegen kreuzgekoppelt sind. Die ursprüngliche Theorie der relativen geradlinigen, direkten Signalübertragung ankommender extrazellulärer Signale in den Zellkern und eine entsprechende Regulation der Zielgene, die darauf beruht, daß der Steroidhormonrezeptor selbst als Transkriptionsrezeptor fungiert, kann nach Befunden der letzten Jahre so nicht aufrechterhalten werden. In neueren Arbeiten zeigt sich vermehrt, daß Wachstumsfaktoren, Neurotransmitter und andere Hormone die Aktivität der

Steroidhormone beeinflussen (Power, 1991; Arinica, 1993; Ignar-Trowbridge, 1993). Das bedeutet, daß Veränderungen in der Aktivität des Rezeptors und die Expression bestimmter Zielgene, die in die Zellproliferation involviert sind, nicht nur durch hormonelle Signale, sondern auch durch Veränderungen in anderen Signaltransduktionswegen, wie sie beispielsweise während der Progression von Brust- und Prostatakrebs ablaufen, bestimmt werden. Außerdem manipulieren Steroidhormonrezeptoren andere Transkriptionsfaktoren direkt oder indirekt und beeinflussen dadurch die Kontrolle anderer Signaltransduktionswege über deren Zielgenexpression.

2.12.2 Struktur und Funktion von Cofaktoren während des Transkriptionsprozesses

Die Gentranskription beruht auf der Formation eines Präinitiationskomplexes, der basale Transkriptionsfaktoren und Transkriptionsaktivatoren einschließt. Die Rolle der Transkriptionsaktivatoren einschließlich der Steroidhormonrezeptoren wird in der Stabilisierung dieses Transkriptionskomplexes gesehen. Die *in vitro* beobachtete direkte Bindung der Steroidhormonrezeptoren an basale Transkriptionsfaktoren spielt unter physiologischen *in vivo* Bedingungen möglicherweise keine Rolle, da diese durch spezifische Mutationen (site directed mutagenesis) unbeeinflusst bleiben.

Verschiedene Proteine, die als Cofaktoren in Frage kommen wurden aus Säugerzellen gewonnen. Diese Proteine binden ligandabhängig an die ligandbindende Domäne des Rezeptors (Cavaillès, 1994; Halachmi, 1994). Da diese Proteine mit mutierten Rezeptoren, die keine Transkription induzieren, nicht wechselwirken können wird über eine mögliche Rolle in der ligandabhängigen Transkriptionsaktivierung, die durch AF2 hervorgerufen wird, spekuliert.

Rezeptorinteragierende Proteine können vorläufig in zwei Klassen gruppiert werden. Die erste Gruppe setzt sich aus zwei Proteinfamilien zusammen, die offenbar die Transkription stimulieren und essentielle Transkriptionscofaktoren darstellen. Eine Familie, ursprünglich als Proteine mit 160 kDa identifiziert, besteht aus mehreren verwandten Proteinen, den sogenannten steroid receptor coactivator proteins (SRC-

1a and SRC-1e) (Oate, 1995; Kamei, 1996), transcription intermediary factor TIF2 (Voegel, 1996) and CREB binding protein (CBP) interacting protein (p/CIP) (Torchia, 1997).

Die zweite Familie setzt sich aus CBP and p300 zusammen. Diese beiden Proteine wurden ursprünglich als Coaktivatoren für das cAMP response element binding protein (CREB) identifiziert, also dem Transkriptionsfaktor, der die Stimulation von Proteinkinase A weiterleitet. CBP und p300 wird inzwischen eine zentrale Rolle in vielen Signaltransduktionswegen zugeschrieben (Janknecht, 1997).

Die zweite Gruppe setzt sich aus nicht näher verwandten Proteinen zusammen, die zwar auch mit der ligandbindenden Domäne interagieren, deren detaillierte Funktion bislang jedoch nicht bekannt ist. Diese Gruppe umfaßt ein 140 kDa Protein, das als RIP 140 bezeichnet wird (Cavaillès, 1995), TIF I (Le Douarin, 1995), ARA 70 (Yeh, 1997), welches mit dem Androgenrezeptor wechselwirkt und TRIPI/SUG I (Lee, 1995, von Baur, 1996).

RIP 140 stimuliert die rezeptorvermittelte Transkription in Hefen (Joyeux, 1996, vgl. Hefe-Reportergen-Modell zur Identifizierung von Xenoestrogenen) und besitzt eine "Activation domain", die in Säugerzellen ebenfalls funktioniert (L'Horset, 1996). Trotzdem ist bislang nicht bekannt, ob RIP 140 ein ubiquitär vorkommender Coaktivator ist.

Diese komplexen Zusammenhänge lassen sich derzeit noch nicht vollständig verstehen. Umso klarer wird, welche Ansprüche an ein zu etablierendes funktionelles Testsystem zur Erfassung endokriner Disruptoren gestellt werden muß.

Testsysteme die weit vom physiologischen Hintergrund entfernt sind können bestenfalls Indizien für ein bestimmtes Verhalten eines Stoffes liefern. Die eigentliche Antwort liefert der *in vivo* - Versuch. Als solche relativ unphysiologische Testsysteme können beispielsweise Rezeptorbindungstests oder Band-Shift-Assays angesehen werden. Die oben dargestellten biologischen Hintergründe verdeutlichen auch, daß sicher nur Einzelfalluntersuchungen, die sowohl mechanistische als auch tierexperimentelle Untersuchungen einschließen sollten, verlässliche Daten zu tatsächlich zu erwartenden Wirkungen liefern können.

2.13 Zelllinien

2.13.1 COS-7 Zelllinie

Die CV-1 Zelllinie, eine etablierte Affennierenzelllinie, wurde mit einer SV 40 Mutante transfiziert. Bei der Transfektion mit den Mutanten bildeten sich drei Zellpopulationen: COS-1, 3 und 7. Alle drei COS-Zelllinien exprimieren das SV40-T Antigen. COS-7 Zellen entsprechen im Hinblick auf den Sicherheitsstandard etablierten Affennierenzellen, die defekte virale Genome enthalten und keine infektiösen Viruspartikel abgeben (ZKBS, 1994).

2.13.2 MFM-223 Zelllinie

Die MFM-223 Zelllinie wurde aus dem pleuralen Erguß einer postmenopausalen Mammakarzinom-Patientin gewonnen. Der Primärtumor enthielt neben Androgenrezeptoren auch geringere Mengen Estrogen- und Progesteronrezeptoren. Der Gehalt im primären Tumorgewebe liegt bei 94, 63 und 6 fmol/mg Protein (Hackenberg, 1991a). In der etablierten Zelllinie ergab sich eine Verschiebung hin zur verstärkten Expression des Androgenrezeptors bei gleichzeitiger Abnahme des Gehaltes an Estrogen- und Progesteronrezeptor (Hackenberg, 1991b).

Rezeptor	Methode	Gehalt in fmol/mg Protein
Estrogenrezeptor	whole-cell-assay	8 ± 5
Progesteronrezeptor	whole-cell-assay	18 ± 11
Androgenrezeptor	whole-cell-assay	160 ± 7

2.13.3 MCF-7 Zelllinie

Eine als MCF-7 bezeichnete humane Mammakarzinom-Zelllinie wurde 1973 aus einem pleuralen Erguß einer Patientin mit metastasierendem Mammakarzinom gewonnen (Soule, 1973).

Die MCF-7 ist eine gut differenzierte Zelllinie und stellt ein etabliertes *in vitro* Testsystem dar. Sie ist eine der best charakterisiertesten steroidhormonrezeptor-positiven Mammakarzinom-Zelllinien.

Der Steroidhormonrezeptorgehalt der MCF-7 Zelllinie schwankt je nach Aufarbeitungsmethode und Nachweisverfahren erheblich (vgl. Jager, 1992).

Die stark schwankenden Rezeptorgehalte der eingesetzte Zelllinien machen Positiv- und Negativkontrollen absolut notwendig.

2.13.4 MCF-7-Luciferase (MVLN-C15)

Der im Luciferase-Assay eingesetzte Subklon der MCF-7 enthält ein ähnlich rekombiniertes Plasmid wie die LeC9/CAT-Zelllinie. Diese Zelllinie wurde mit dem Plasmid pVIT-tk-Luc stabil transfiziert. In dem Plasmid ist die 5'-flankierende Region des Vitellogenin A2-Promotors, welcher die EREs enthält, gekoppelt an einen starken Enhancer, das Thymidinkinasegen (tk) des Herpes Simplex Virus. Das Strukturgen der Luciferase wird durch diese regulatorische Sequenz kontrolliert. Die Luciferase selbst kann mit Hilfe einer Enzymreaktion detektiert werden.

Neben dem oben beschriebenen Plasmid wurde ein zusätzliches Plasmid pAG 60 in die Zellen cotransfiziert. Dieses enthält die bakterielle Aminoglykosid-Phosphotransferase unter Kontrolle des tk-Promotors, was eine Resistenz gegen das Antibiotikum Neomycin ermöglicht (Pons,1990). Die Selektion des stabilen Subclons wurde durch eine gleichzeitige Cotransfektion der Reporter- und des Selektionsplasmids ermöglicht.

2.13.5 LeC9/CAT-Zelllinie

Die LeC9/CAT-Zelllinie ist ein Subklon einer Maus L-Zelllinie, in deren Genom das Gen des humanen Estrogenrezeptors (hER) kontrolliert von einem viralen Promotor (SV 40) stabil genomisch transfiziert wurde (Klein-Hitpaß, 1991; Druége 1986). Aufgrund dieser gentechnischen Veränderung ist die kontinuierliche Synthese des menschlichen Estrogenrezeptors der humanen Mammakarzinom-Zelllinie MCF-7 möglich. Der Rezeptorgehalt liegt bei ca. 20 fmol/mg Protein. In diese Zellen wurde zusätzlich ein *in vitro* rekombinierter Reporter-genvektor eingeführt, welcher das Gen für das bakterielle Resistenzenzym Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) enthält. Vor dieses Reporter-gen ist ein sogenanntes "Estrogen Responsive Element" aus dem Vitellogenin Gen A2 des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* geschaltet, welches mit dem starken Enhancer eines viralen Gens, dem Thymidinkinasegen aus dem Herpes Simplex Virus, gekoppelt wurde. Eine Behandlung der Zellen mit einer estrogen aktiven Substanz bewirkt die Expression des CAT-Gens, das über eine spezifische Enzymreaktion nachweisbar ist. Den Subklon der Le-42, in dem das Plasmid genomisch stabil integriert wurde, bezeichnet man als LeC9/CAT (Mayr, 1990).

3 Problemstellung

Endokrine Disruptoren weisen eine große strukturelle Heterogenität untereinander und auch gegenüber den physiologischen Hormonen auf. Einzig die den unterschiedlichen Substanzklassen ähnliche biologische Wirkung erlaubt die Klassifizierung und Identifizierung einer Verbindung als endokrinen Disruptor.

Die klassische instrumentelle Analytik kann hier nur einen beschränkten Beitrag zur Problemlösung leisten. Hinzu kommt, daß typische endokrine Disruptoren bereits in äußerst geringen Substanzkonzentrationen (10 nM - 1 µM) teilweise ein agonistisches hormonelles Potential zeigen. In diesen Konzentrationsbereichen können nur technisch sehr anspruchsvolle LC-MS/MS-Systeme zur Identifizierung und Quantifizierung bereits bekannter Verbindungen herangezogen werden.

Die Erfassung von endokrinen Disruptoren unterschiedlichster chemischer Strukturen erfordert ein funktionelles Testsystem, das spezifisch hormonelle / antihormonelle Effekte bei hoher Spezifität anzeigt.

Ein Wachstumsassay mit humanen Mammakarzinomzellen (MCF-7) dient der Erfassung des estrogenen / antiestrogenen Potentials von Fremdstoffen. Dieser Testansatz (E-Screen-Assay), der das Wachstum dieser hormonabhängig wachsenden Zelllinie als Endpunktnutzt, sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit etabliert und validiert werden.

Ergänzend hierzu sollten spezifisch transfizierte humane und tierische Reporterzellensysteme für den Einsatz als Testsystem zur Prüfung endokriner Disruptoren etabliert werden. Ziel war es, möglichst spezifische, sensitive, schnelle und technisch relativ einfache Testsysteme zu etablieren und zu validieren.

Neben transgenen Systemen, die der Erfassung estrogen/antiestrogen Verbindungen dienen, sollte auch ein Reporterassay zur Prüfung antiandrogen aktiver Verbindungen etabliert werden. Der Bedarf solcher transgenen Systeme ist im Fall der Antiandrogene besonders vordringlich, da hier kein dem Proliferationsassay mit MCF-Zellen vergleichbares Testsystem existiert.

Diese transgenen Zellsysteme sollten zur Bestimmung des hormonellen Potentials von Reinsubstanzen, sowie von Stoffgemischen wie Pflanzenextrakten eingesetzt werden.

Zur näheren mechanistischen Untersuchung der Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen sollten sogenannte Band-Mobility-Shift-Assays etabliert und zur Prüfung von Verbindungen eingesetzt werden.

Zur verbesserten Systematisierung und Klassifizierung der vielen potentiellen endokrinen Disruptoren sollten begleitend zu den experimentellen und ausgehend von bekannten Vertretern mittels "molecular modeling" Berechnungen zur Identifizierung möglicher "Leitstrukturen" einzelner Substanzklassen erarbeitet werden. Durch Kombination von experimentellen Ergebnissen und "molecular modeling" Daten sollten erste quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehungen ermittelt werden.

Diese methodischen Ansätze sollten auch zur Identifizierung weiterer bislang unbekannter endokrin aktiver Verbindungen eingesetzt werden.

4 Ergebnisse und Diskussion

4.1 Kultur und Therapieansätze von primären menschlichen Prostatakarzinom-xenografts auf der Nacktmaus

Für die vorklinische Prüfung neuentwickelter Zytostatika haben sich, neben der frühen Testung an Zellkulturen, vor allem humane Xenograftmodelle, die als Heterotransplantate auf der immundefizienten Nacktmaus propagiert werden als effiziente Testmodelle bewährt. Um die antineoplastische Wirkung neuentwickelter Verbindungen möglichst umfassend erkennen zu können, werden vom National Cancer Institute der USA erfolgversprechende Verbindungen an 60 verschiedenen Xenografttypen getestet. Hierdurch erhofft man sich mögliche gewebespezifische Wirkqualitäten schnell und umfassend zu erkennen.

Obwohl das Prostatakarzinom bei Männern mit hoher Inzidenz auftritt gibt es nur sehr wenige vorklinische Modelle. Besonders für humane hormonabhängige Prostatakarzinome steht nur ein Modell zur Verfügung. Diese als PC-82 bezeichnete humane Prostatakarzinomzelllinie besitzt eine ausgeprägte Androgenabhängigkeit, zeigt ein langsames Wachstum und sezerniert Prostata acid Phosphatase und gleicht somit in diesen Parametern vielen klinischen Fällen (Steenbrugge, 1984). Alle anderen in der Literatur beschriebenen Zelllinien und Xenografts sind entweder tierischen Ursprungs (Dunning R 3327, Noble Ratte) oder sie zeigen keine Hormonabhängigkeit in ihrem Wachstum PC-3 oder DU-145. Auch die breit eingesetzte LNCaP stellt nur ein bedingt geeignetes Modell für antihormonell aktive Verbindungen dar, da die LNCaP auch unter dem Einfluß etablierter Antiandrogene proliferiert. Ursache ist eine beschriebene Mutation in der hormonbindenden Domäne des Androgenrezeptors. Diese Mutation ermöglicht auch die Bindung von Antiandrogenen an den Rezeptor und die dadurch vermittelte Wachstumsstimulation.

Die Etablierung von neuen Xenograftmodellen von Prostatakarzinomen ist sehr aufwendig und nur in wenigen Fällen erfolgreich. Im Labor von Prof. Dr. H. Fiebig in der Universitätsklinik Freiburg standen drei hormonabhängige humane

Prostatakarzinome zur Etablierung als Xenograftmodelle zur Verfügung. Bei einem Tumor handelt es sich um ein primäres hormonabhängiges Prostatakarzinom, bei den beiden anderen um Metastasen.

4.1.1 Ansätze zum verbesserten und stabileren Wachstum der humanen Xenografts auf der Nacktmaus

In einer ersten Versuchsreihe wurden kleine Silikonschläuche mit Testosteron subkutan implantiert, damit konnte zumindest ein stabiler Testosteronplasmaspiegel erreicht werden. Der natürliche Testosteronspiegel unterliegt in adulten männlichen Nacktmäusen einer relativ starken natürlichen Schwankung (Bartke, 1975; Rebar, 1982). Mit dieser Maßnahme konnte sowohl die Anwachsrate insgesamt deutlich verbessert, aber auch das Wachstumsverhalten stabilisiert werden.

Als zweite Maßnahme wurden verschiedene Inokulationstechniken auf ihren Einfluß auf das Wachstumsverhalten der Xenograftmodelle geprüft. Es wurden drei verschiedene Varianten genauer untersucht. Das erste Verfahren war bereits in der Arbeitsgruppe etabliert und wurde unverändert übernommen. Hierbei wurden relativ große Tumorstücke (> 4 mm) subkutan in die Seitenflanke der Tiere plaziert. Bei gut anwachsenden Tumoren ist dieses Verfahren relativ einfach durchführbar und meist sehr erfolgreich. Bei den sehr langsam und unregelmäßig wachsenden Prostatakarzinomen führte diese Methode nur zu geringen Erfolgen. Das schlechte Wachstumsverhalten beeinträchtigt die folgenden Therapieversuche so drastisch, daß aufgrund der sehr schlechten Wachstumseffizienz die Tests meist nicht auswertbar waren.

Als Alternativen wurden deshalb zwei neue Methoden untersucht. Es wurden zuerst möglichst schonend kleine Zellfraktionen hergestellt und mit einem Extrazellulärematrix-Substrat vermischt und sofort subkutan appliziert. Diese Extrazellulärematrix ist eine Präparation aus dem Engelbrecht-Holmes-Sarkom von Mäusen und ist im Handel unter dem Namen Matrigel[®] erhältlich. Für diese zweite Methode wurden die Tumore nach der etablierten Labortechnik präpariert, also in Stücken von mehr als 4 mm mit Matrigel vermischt und sofort subkutan appliziert. Diese Methode erwies sich als die erfolgversprechendste und wurde deshalb von mir

in den folgenden Therapieversuchen eingesetzt. Für die Therapieversuche ist die Wachstumseffizienz der Tumore bei mehreren Tieren entscheidend, da nur Tiere und Tumore aus einem Testansatz für einen Substanztest eingesetzt werden können.

Die oben geschilderten Vorarbeiten sind somit von großer Bedeutung auch hinsichtlich der Einschätzung der zytostatischen Potenz einer Testsubstanz. Gerade die Prüfung einer Testsubstanz, die potentiell zumindest teilweise antihormonelle Effekte aufweist, erfordert einen teilweise veränderten Therapieansatz. Da die erwarteten Wirkungen rezeptorvermittelt auftreten, darf der Gewebespiegel der physiologischen Liganden nicht in therapeutischen Bereichen liegen, da dadurch für die unphysiologischen Liganden keine Rezeptorbindung mehr möglich ist. Hier bestand also das Problem, daß das Testosterondepot, das für die Anwachsphase der Tumore essentiell war, bis zu Beginn des Therapieversuches möglichst erschöpft sein mußte. Für die Auswertung der Therapieversuche ist entscheidend, daß nur exakt gleich durchgeführte Therapieschemata vergleichbare Daten liefern können. Zusätzlich tritt bei der Prüfung hormonell aktiver bzw. antihormonell aktiver Verbindungen das Problem der konstanten Gewebewirkspiegel auf, da nur dadurch langfristige Effekte sichtbar werden können. Dies erforderte ein verändertes Applikationsschema im Vergleich zu beispielsweise genotoxischen Verbindungen.

Eine Möglichkeit wäre die Applikation in Form eines Implantates z. B. Alzet-Pumpen®, was jedoch aus Kostengründen nicht durchgeführt werden konnte. Es wurde deshalb eine tägliche Applikation von entsprechend geringeren Mengen vorgezogen. Dies führte wiederum zu dem Problem der Solubilisierungsmöglichkeiten. Da Ethanol und DMSO jeweils toxische Effekte bei den Mäusen zeigten, mußte auf Speiseöl ausgewichen werden, was die Applikation sowie die Bewertung der Ergebnisse durch die Zufuhr großer Kalorienmengen erschwerte.

Insgesamt betrachtet bieten die beschriebenen Testsysteme hervorragende präklinische Prüfmöglichkeiten, sind jedoch für den breiteren Einsatz noch nicht ausreichend etabliert und validiert. Der effektive Einsatz für die Prüfung von zytostatisch wirkenden Therapeutika auf der Basis von Verbindungen, die steroidhormonrezeptorvermittelte Effekte auslösen, würde vorab die Lösung verschiedener entscheidender Parameter erfordern. So wären abschließend die oben beschriebenen Probleme des Anwachsens und des stabilen Wachstums der

eingesetzten Xenografts zu verbessern. Erste Ansätze zum verbesserten Wachstumsverhalten wurden durch die oben beschriebenen Verfahren bereits geschaffen. Weiterhin müßten verbesserte Applikationsmöglichkeiten etabliert werden, die ein unproblematischeres Applizieren, auch in ihrer Chemie unterschiedlicher Verbindungen, erlauben. Grundlegend für eine verbesserte Prüfung der Verbindungen mit endokrinem Potential ist der Einsatz eines phytoestrogenfreien Futters (Boettgen-Tong, 1998). Die Lösung der Probleme ist jedoch sehr arbeits- und kostenintensiv, daraus ergibt sich eine starke Einschränkung dieses prinzipiell bedeutenden Testsystems.

Auch für die Prüfung endokriner Disruptoren wäre das Testsystem möglicherweise interessant. Hier wären zwei Verfahrensvarianten denkbar.

Es könnten in juvenilen oder ovariektomierten weiblichen Nacktmäusen das Wachstumsverhalten nach Depotgabe eines endokrinen Disruptors, der unter diesen Bedingungen wachsenden MCF-7 Mammakarzinomzellxenografts, als Meßgröße dienen. Unter Einschluß des intakten Organismus der Nacktmaus könnten zumindest zu einem großen Teil pharmakokinetische und pharmakodynamische Einflüsse des Säugerorganismus Maus auf die Wirkstärke eventueller endokriner Disruptoren näher untersucht werden. Eine weitere interessante Variante wäre die Nutzung der mit einem steroidhormonrezeptorkontrollierten Reporter gen stabil transfizierten MCF-7- Luciferasezellen als Xenograft. Durch die Nutzung dieses sensitiven und für die hormonelle Aktivität sehr spezifischen Testmodells ließe sich möglicherweise weitgehend unabhängig vom Gesamtzustand der Mäuse eine relativ spezifische Prüfung auch *in vivo* aktiver endokriner Disruptoren durchführen. Für eine umfassendere toxikologische Bewertung, der innerhalb der vorliegenden Arbeit geprüften Verbindungen, wären weitergehende Kenntnisse zum *in vivo* Verhalten, auch in der Maus, wünschenswert. Der Einsatz des Nacktmausmodells bietet im Verhältnis zum "reinen" Tierversuch, z. B. Uteruswachstumstests in der Ratte, die Vorteile, daß kostengünstiger höhere Fallzahlen durch Mehrfachinokulationen der Xenografts erzielt werden können und somit die statistische Aussagekraft verbessert wird. Daneben ist natürlich die Nutzung des menschlichen Zielgewebes von besonderer Bedeutung. Dies kann aufgrund wesentlicher Speziesunterschiede von Fall zu Fall verbesserte und spezifischere Aussagen liefern. Bei den Luciferase exprimierenden inokulierten Xenograftzellen müßten die Tiere für die Untersuchungen geopfert werden, um die gebildete Luciferase zu erhalten. Einen

wesentlichen methodischen Vorteil bieten hier "Reporterergenprodukte", die aus den Zielzellen in das Blut sezerniert werden. Möglich wäre hier der Einsatz von Zelllinien, die Reportergenkonstrukte enthalten, welche unter definierter Promotorkontrolle beispielsweise die sekretierbare alkalische Phosphatase (SEAP) oder das humane Wachstumshormon (hGH) bilden. Ein VITA2-SEAP-Plasmid liegt in der Arbeitsgruppe bereits vor.

Aufgrund der sehr geringen Enzymmengen, die für eine sensitive Erfassung eines agonistischen oder antagonistischen Effektes benötigt werden, sollten auch geringste Blutmengen genügen, um eine quantitative Ermittlung des endokrinen Potentials einer Verbindung in dem Xenograftmodell zu ermöglichen. Prinzipiell erlaubt dieses Vorgehen die Bestimmung verschiedener Zeitkinetikmodelle, die möglicherweise interessante Aspekte zur Pharmakokinetik und -dynamik eröffnen. Ein grundsätzlich zu lösendes Problem ist dabei die Blutmenge, die von den Mäusen maximal entnommen werden kann.

Weitere interessante "Reporterergenprodukte" stellen endogen hormon kontrolliert gebildete Proteine dar. Für die Prüfung auf estrogen aktive Verbindungen stellt pS2 ein solches Protein dar. pS2 unterliegt der direkten Kontrolle eines estrogen abhängigen Promotors und wird von MCF-7 Zellen sezerniert. Ein solcher endogener Reporter erlaubt ebenfalls eine sensitive Bestimmung der hormonellen / antihormonellen Potenz möglicher Testsubstanzen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. Im Falle von pS2, das auch in der Klinik als Tumormarker eingesetzt wird, kann eine sehr sensitive Bestimmung des Proteins im Blutplasma mittels eines Radio-Immuno-Assays erfolgen (Miyashita, 1994). Das Testsystem ist in der Gruppe bereits für das *in vitro* System etabliert und validiert.

Die Ausweitung der bereits vorhandenen *in vitro* Systeme auf *in vivo* Ansätze, die eine exakte quantitative Bestimmung der endokrinen Potenz einer Verbindung ermöglichen, erlaubt eine deutliche methodische Erweiterung der zu bearbeitenden Fragestellungen. So könnten verstärkt die Aufnahme, der Metabolismus, die Elimination und weitere wichtige Einflußgrößen auf das pharmakokinetische und pharmakodynamische Verhalten verschiedener Verbindungen ermittelt werden.

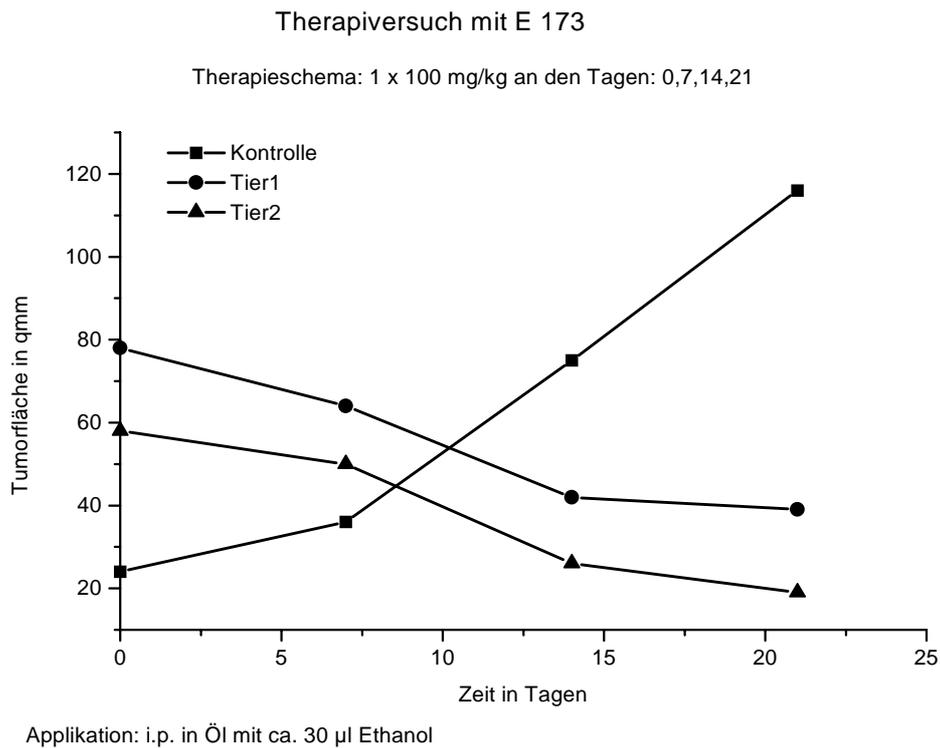


Abb. 4-1: Beispielhafte Darstellung eines Therapieversuches mit einem primären humanen Prostatakarzinom, das unter Androgenkontrolle wächst. Therapiert wurde mit einem 19-Nortestosteron verknüpften Chlorethylnitrosoharnstoffderivat (E173).

4.2 Etablierte *in vitro* Testsysteme

4.2.1 E-Screen -Assay

Die endogenen Estrogene regulieren die Zellproliferation und die Genexpression im weiblichen Genitaltrakt und in den Keimdrüsen. Der Proliferationseffekt wird oft zur Detektion einer estrogenen Aktivität herangezogen. Estrogen aktive Fremdstoffe können diese physiologischen Wirkungen der Estrogene nachahmen (Soto, 1991). Zur Erfassung und Klassifizierung dieser Substanzen ist ein funktionelles Testsystem

von Bedeutung. Ziel ist dabei ein schnelles und effektives Screening dieser Substanzen *in vitro*.

Die Identifizierung einer estrogen aktiven Verbindung kann beispielsweise mit dem "uterotrophen Assay" erfolgen. Dieser basiert auf dem Anstieg der mitotischen Aktivität in Geweben des Genitaltraktes von weiblichen, juvenilen Nagetieren, als Meßgröße dient dabei eine Zunahme des Uterusgewichtes. Ein weiterer *in vivo* Assay an weiblichen Nagern ist die Bestimmung der vaginalen Verhornung, die ebenfalls durch die Einwirkung von Estrogenen hervorgerufen wird (Villalobos, 1995; Nimrod und Benson, 1996).

Diese *in vivo* Modelle sind jedoch für ein breites und schnelles Screening von verschiedensten Substanzen zur Bestimmung ihrer potentiellen estrogenen Aktivität nur beschränkt einsetzbar. Die Durchführung dieser *in vivo* Assays erfordert einen hohen technischen Aufwand und großes "know how", verursacht enorme Kosten sowie hohe Tierzahlen. Aus diesem Grund wird nach neuen Screening-Verfahren gesucht, die es ermöglichen sollen, in möglichst kurzer Zeit eine Vielzahl von Verbindungen zu testen.

Das weibliche Sexualhormon Estradiol zeigt eine proliferationsfördernde Wirkung auf ER-positive menschliche Brustkrebszellen (Lykkesfeldt, 1986). Diese Eigenschaft der Estrogene dient als Grundlage des sogenannten Estrogenic-Screening-Assays (E-Screen-Assay), der von A. Soto und C. Sonnenschein entwickelt wurde. Lange galt das Wachstumsverhalten der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 als "goldener Standard" für *in vitro* Methoden (McLachlan, 1995). Neueste Entwicklungen zeigen nun, daß aus heutiger Sicht transgene Reporterassays aufgrund höherer Spezifität und schnellerer Testdurchführung dem Wachstumsassay überlegen sind (Welsch, 1998).

Die Kultivierung der MCF-7-Zellen in einem Kulturmedium mit 10 % FKS führt zur maximalen Proliferation der Zellen. Eine Behandlung des Serums mit Charcoal-Dextran führt zu einer deutlichen Verringerung der Zellproliferation. Durch diese Behandlung werden dem Serum die endogenen Hormone, aber möglicherweise auch viele niedermolekulare Komponenten (z. B. Wachstumsfaktoren) entzogen. Eine Kultivierung der Zellen in CDFKS-Medium und zusätzliche Inkubation mit Estradiol führt zur maximalen Proliferationsrate der Zellen (Soto, 1985). Im E-Screen-Assay wird CDFKS-Medium als Kulturmedium verwendet, um den Einfluß der im Serum endogen enthaltenen Hormone zu minimieren.

Der E-Screen-Assay basiert auf der dosisabhängigen Beziehung zwischen der Proliferation von MCF-7 Zellen und der Konzentration an Estradiol, mit der die Zellen über einen bestimmten Zeitraum inkubiert wurden. In diesem funktionellen Viabilitätsassay wird die Lebendzellzahl, die bei gleicher Inkubationsdauer von MCF-7-Zellen mit Estradiol als Positivkontrolle, ohne Estradiol als Negativ-Kontrolle und verschiedenen Konzentrationen von Testsubstanzen erhalten wird, verglichen (Soto, 1995). Die Lebendzellzahl kann durch Anfärben der fixierten Zellen mit Sulforhodamin-B bestimmt werden. Der proteingebundene Farbstoff wird photometrisch vermessen und die so erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und damit der Lebendzellzahl proportional (Skehan, 1990).

Ein Nachteil des E-Screen-Assays ist die 7 - 10 tägige Versuchsdauer, was bedeutet, daß die Zellen jeden zweiten Tag inkubiert werden müssen, wobei das Medium steril filtriert werden muß, um eine mikrobielle Kontamination der Zellen zu vermeiden. Ein möglicher Metabolismus der Ausgangsverbindung über den langen Inkubationszeitraum von mindestens einer Woche ist zu berücksichtigen. Auch können toxische Effekte der Verbindungen und der Metabolite über den langen Inkubationszeitraum das Versuchsergebnis sehr stark beeinflussen.

4.2.2 Reportergene

Zur funktionellen Analyse regulatorischer DNA-Sequenzen werden oft Reportergene eingesetzt. Der Begriff Reportergen umfaßt Gene, die für detektierbare und quantifizierbare Genprodukte codieren. Ein Reportergen ohne Promotor kann dazu verwendet werden, potentielle Promotor-/Enhancer-enthaltende DNA-Fragmente auf ihre transkriptionsregulierende Funktion zu untersuchen. Das zu untersuchende DNA-Fragment wird in einen Vektor vor das Reportergen kloniert, dessen eigene regulatorische Sequenz deletiert ist. Der rekombinierte Vektor wird anschließend in die geeignete Wirtszelle transfiziert. In dieser wird das Reportergen gegebenenfalls unter der Kontrolle funktionsfähiger, regulierender Sequenzen exprimiert. Durch den Einsatz von Reportergenen sind auch DNA-Bindungs- und Genaktivierungsstudien möglich (Hartmann, 1991).

Zur Nutzung von Reportergensystemen müssen folgende Erkenntnisse / Bedingungen berücksichtigt werden (Alam, Cook, 1990; Gorman, 1982):

- Das Reporter-gen sollte für ein Protein codieren, das eine einmalige enzymatische Aktivität besitzt oder sich in einem Gemisch der intra- und extrazellulären Proteine leicht detektieren läßt.
- Das endogene Vorkommen des zu detektierenden Proteins sollte ausgeschlossen sein.
- Die Transfektion des Reporter-gens in eine Vielzahl von Wirtszellen ist möglich, wenn keine posttranskriptionalen Modifikationen des Proteins notwendig sind.
- Eine Störung durch andere enzymatische Reaktionen, die z. B. um die gleichen Substrate oder Co-Substrate konkurrieren, sollte nicht vorliegen.
- Der Reporter-gen-Assay sollte schnell, sensitiv und reproduzierbar sein.

Die Reporter-gene können mit den unterschiedlichsten Techniken in die Wirtszelle transfiziert werden. Die häufigsten Methoden sind die Calcium-Phosphat-Methode, die DEAE (Diethylaminoethyl)-Methode und die Elektroporation. Das DNA-Fragment, das in die Zelle eingeschleust wird, muß in das zelluläre Chromatin integriert werden, bevor eine Expression erfolgen kann. Die Integration in das Genom vollzieht sich innerhalb der ersten 12 h und in den meisten Fällen wird die Fremd-DNA nach ungefähr 72 h wieder ausgestoßen. Die stabile Transfektion wird nur mit einer Häufigkeit von 0,001 - 1 % beobachtet (Alam, Cook, 1990).

Die Identifizierung und Isolierung der stabil transfizierten Zellen erfordert effektive Selektionssysteme. Ein bekannter und oft verwendeter Selektionsmarker ist das bakterielle Antibiotikum Geneticin, das entweder auf dem eingeführten Plasmid lokalisiert ist oder auf einem zweiten Plasmid cotransfiziert wird. Mit diesen Selektionssystemen wird erreicht, daß nur Zellen, die die Fremd-DNA in ihr Genom integriert haben, die Antibiotikabehandlung überleben.

Die stabile Transfektion weist gegenüber der transienten (die fremde DNA wird nur vorübergehend aufgenommen) Vorteile auf, wenn das Testsystem der umfangreichen Substanztestung dienen soll. Die stabil transfizierten Zellen können über einen längeren Zeitraum kultiviert werden, ohne daß eine neue Transfektion

notwendig ist. Zu berücksichtigen ist der Einbau der Sequenzen in eine "natürliche" Chromatiumgebung, dies kann von Vor- oder Nachteil sein.

Bei transienter Transfektion erscheint es vorteilhaft, daß bereits 1 - 3 Tage nach dem Gentransfer ohne vorherige Selektion der Zellen Analysen durchgeführt werden können. Bei Wiederholung der Analysen muß allerdings eine erneute Transfektion erfolgen, was die Reproduzierbarkeit im Gegensatz zur stabilen Transfektion beeinträchtigt (Alam, Cook, 1990; Koch-Brandt, 1993). Hier müssen zusätzlich Kontrollplasmide, die konstitutiv ein weiteres Reporter gen exprimieren cotransfiziert werden. Die Ergebnisse des induzierbaren Reporter gens werden durch das Kontrollplasmid normalisiert.

4.2.3 Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT)

Die bakterielle CAT ist das bekannteste und am häufigsten verwendete Reporter gen. CAT ist nicht endogen in Säugetierzellen enthalten und erfüllt somit die Voraussetzung für ein Reporter gen (Alam, Cook, 1990).

4.2.2.1.1 Prinzip des LeC9-CAT-Zellsystems

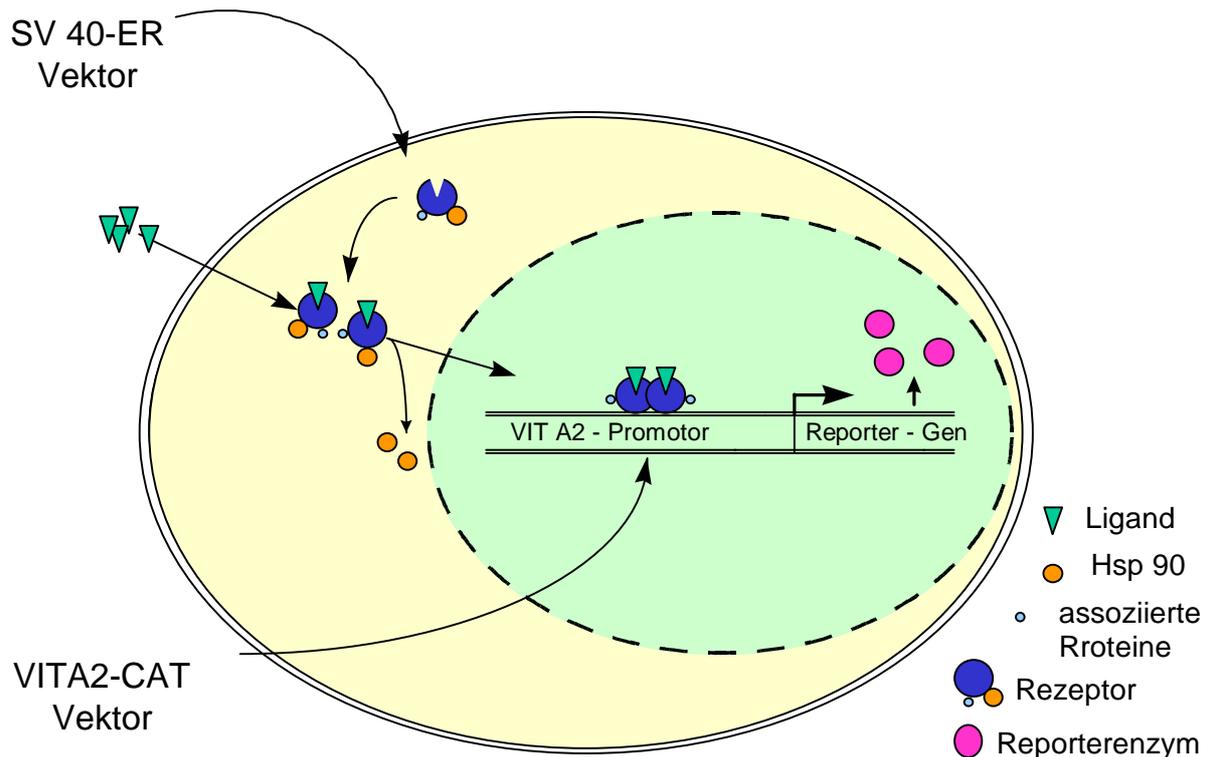


Abb. 4-2: Schematische Darstellung des LeC9-CAT-Zellsystems (mod. Mayr, 1990)

In das Genom der LeC9-CAT-Mauszelllinie ist das Gen des humanen ER (hER) stabil integriert. Dies hat die kontinuierliche Synthese des hER aus der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7 zur Folge. Zusätzlich wurde ein Plasmid eingeschleust, welches für das Reporter-gen CAT codiert. Vor dieses Reporter-gen wurde der Promotor des Vitellogenin A2-Gens des afrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* kloniert, der vier EREs in Wildtyp-Sequenz beinhaltet. Der Promotor wurde mit dem Enhancerelement eines viralen Gens (des Thymidinkinasegens) gekoppelt. Kommt es nun in der Zelle zur Bindung des entsprechenden Liganden an den hER, wird dieser aktiviert. Der Rezeptor dimerisiert und nach einer Konformationsänderung bindet das Rezeptor-Dimer an das ERE. Die Aktivierung des ERE durch den Ligand-Rezeptor-Komplex führt zur Expression der CAT (Druége, 1986; Mayr, 1990).

4.2.2.1.2 Nachweismethoden

CAT katalysiert den Transfer der Acetyl-Gruppe von Acetyl-Coenzym A (Acetyl-CoA) auf die 3-Hydroxy-Gruppe von Chloramphenicol. Die Bildung des 1-Acetyl-Produkts tritt bei einer nicht-enzymatischen Umlagerung von 3-Acetylchloramphenicol auf. Damit wird die 3-Hydroxy-Position erneut frei und kann wieder durch CAT acetyliert werden. Es entsteht 1,3-Diacetylchloramphenicol.

Die acetylierte und nicht-acetylierte Form besitzt in organischen Lösungsmitteln unterschiedliche Löslichkeiten. Nach Extraktion mit einem geeigneten Lösungsmittel kann eine Auftrennung mittels Dünnschichtchromatographie (DC) erfolgen (Alam, Cook, 1990).

Eine andere Möglichkeit der CAT-Bestimmung ist die Inkubation des Zellextraktes von transfizierten Zellen mit Acetyl-CoA und radioaktiv markiertem (^{14}C)-Chloramphenicol. Chloramphenicol und die acetylierten Produkte werden ebenfalls extrahiert und durch DC getrennt. Die Visualisierung erfolgt durch Autoradiographie. Die Quantifizierung der acetylierten Formen kann mit dem Scintillationszähler durchgeführt werden (Gorman, 1982; Sleigh, 1986).

Die im folgenden dargestellten Ergebnisse des CAT-Reportergen-Assays wurden mit dem von Boehringer Mannheim entwickelten Sandwich-Enzym-Immunoassay (ELISA) durchgeführt. Der Assay basiert auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion. Der CAT-ELISA hat gegenüber den beschriebenen Methoden wesentliche Vorteile:

- Er ist schneller und sicherer, da keine radioaktiven Isotope verwendet werden.
- Er ist genauer, da die augenblickliche Konzentration an CAT-Protein gemessen wird und nicht die CAT-Aktivität, die bei längerer Lagerung abnimmt.
- Er ist in seiner Sensitivität mit den radioaktiven Assays vergleichbar.
- Die Methode ist standardisiert, d. h. der direkte Vergleich von Ergebnissen aus verschiedenen Experimenten ist möglich.

4.2.2.2 Luciferase (Luc)

Luciferasen sind Enzyme, die eine effektive Biolumineszenz-Reaktion katalysieren. Die bekanntesten Luciferasen wurden aus dem nordamerikanischen Leuchtkäfer (*Photinus pyralis*) und Bakterien isoliert. Daneben sind weitere pro- und eukaryontische Luciferasen beschrieben.

Die Luciferase der nordamerikanischen Feuerfliege besteht aus einer einzelsträngigen Polypeptidkette mit einem Molekulargewicht von 62 kDa. Eine posttranslationale Modifikation ist nicht notwendig, das Luciferaseenzym enthält keine prosthetischen Gruppen, Metallionen oder Disulfidbrücken. Das aktive Enzym ist somit bereits das primäre Translationsprodukt. Aufgrund seiner relativ einfachen Struktur kann es in jedem Wirtsorganismus oder in jeder Wirtszelle exprimiert werden (Hartmann, 1991; Wood, 1990).

Das bakterielle Luciferaseenzym besitzt im Gegensatz dazu eine wesentlich komplexere Struktur und unterscheidet sich hinsichtlich der Substratspezifität von den Leuchtkäfer-Luciferasen.

4.2.2.2.1 Prinzip des MCF-7-Luc-Systems

Das Luciferase-System wird als Reportergen-Assay bei der Untersuchung von Steroidhormonen eingesetzt. Zellen, die den entsprechenden Rezeptor endogen enthalten, werden mit dem Reportergen Luciferase stabil transfiziert. Die Expression des Reportergens wird von dem endogenen Rezeptor kontrolliert. In diesem artifiziellen System wird die natürliche Hormonantwort durch die Expression der Luciferase nachgeahmt (Gagne, 1994).

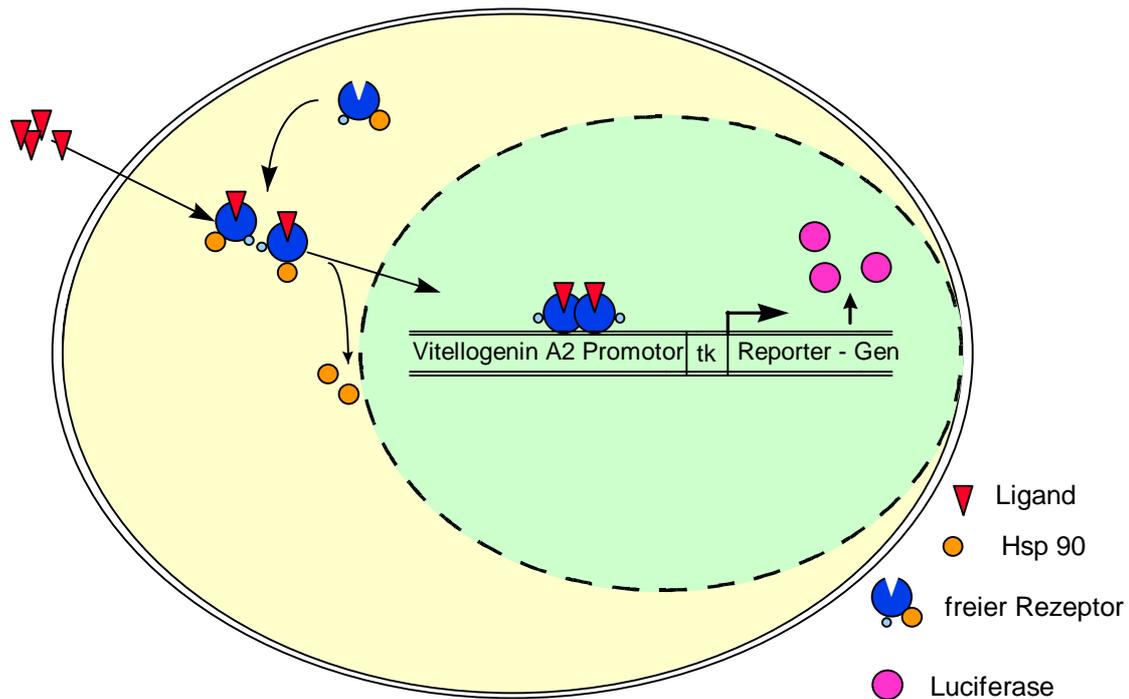


Abb. 4-3: Schematische Darstellung der transgenen MCF-7-Luciferase Zelle

Bei der MCF-7-Luc-Zelllinie (MVLN-2B) handelt es sich ebenfalls um eine stabil transfizierte Zelllinie. In dieser ist der hER jedoch endogen enthalten. In die Zellen wurde ein Plasmid eingeschleust, in dem die Expression des Luciferase-Gens unter der Kontrolle des ERE enthaltenden Promotors des *Xenopus laevis* Vitellogenins A2 abläuft. Die Bindung von Estradiol an den hER führt zur Aktivierung des Rezeptors. Dieser dimerisiert und bindet als Dimer an das ERE, worauf es zur Expression der Luciferase kommt. Diese wird mit Hilfe ihrer spezifischen Enzymreaktion detektiert. Die Menge des produzierten Lichts ist proportional zur vorhandenen Luciferasemenge (Demirpence, 1993; Pons 1990).

4.2.2.2.2 Nachweismethode

Die enzymkatalysierte Reaktion beruht auf der Oxidation des Käfer-Luciferins, einer heteropolyzyklischen Säure. Im ersten Reaktionsschritt erfolgt ATP- und Mg^{2+} -abhängig die Aktivierung von Luciferin zu einem Enzym-Luciferyladenylat-Komplex.

Dieser reagiert im zweiten Schritt mit molekularem Sauerstoff. Durch Decarboxylierung entsteht Oxyluciferin im elektronisch angeregten Zustand, das bei der Rückkehr in den Grundzustand Photonen emittiert. Die Quantenausbeute von 0,88 ist die höchste, die bei Luciferase-Reaktionen beobachtet wurde, das bedeutet, daß 88 % aller oxidierten Luciferin-Moleküle auch Licht emittieren. Betrachtet man ein emittiertes Photon mit der Wellenlänge von 560 nm so hat dieses sechsmal mehr Energie gespeichert als bei der Phosphat-Hydrolyse aus ATP frei werden. Der optimale pH-Wert der Reaktion liegt bei 7,75. Bei diesem pH-Wert weist der Emissionspeak bei 560 nm ein breites Maximum auf (Albrecht, 1992; Hartmann, 1991; Kricka, 1989).

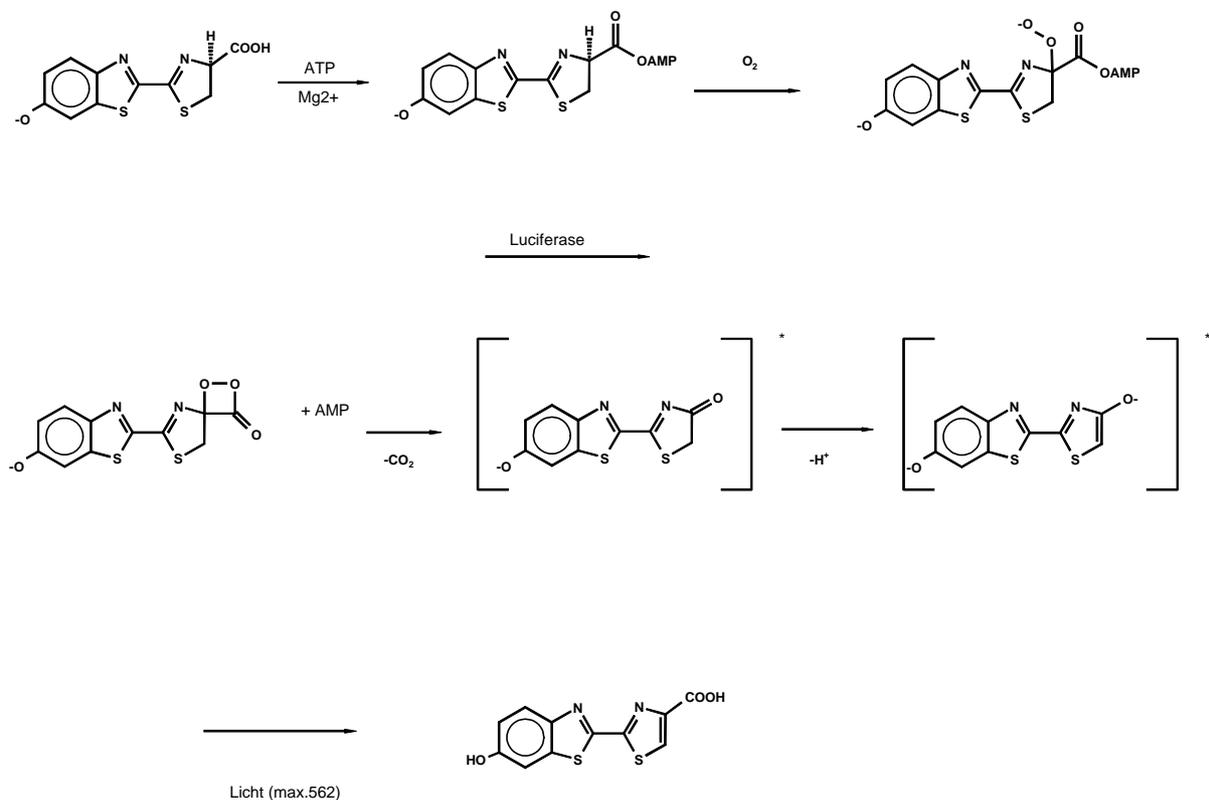


Abb. 4-4: Mechanismus der enzymatischen Reaktion der Leuchtkäfer-Luciferase (Gundermann, McCapra, 1987)

Der Luciferase-Assay besitzt gegenüber den CAT-Reporter-Gen-Assays entscheidende Vorteile (Albrecht, 1992; Berthold, 1990; Wood, 1990):

- Der Luciferase-Assay ist um eine Größenordnung empfindlicher als z. B. der CAT-Assay.
- Aufgrund der größeren Sensitivität werden weniger Zellen benötigt.
- Eine endogene Lumineszenz ist in den verwendeten Zellen nicht vorhanden. Eine Signalverfälschung durch die Probe ist somit ausgeschlossen.
- Die Verwendung von radioaktiven Substraten ist nicht erforderlich.
- Im Vergleich zum CAT-Assay ist er schneller und einfacher durchführbar.

4.2.3 Band-Shift-Assay (Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay)

Der Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay, kurz Band-Shift-Assay sollte eine weitere Möglichkeit zur Bestimmung von estrogen-aktiven Substanzen *in vitro* bieten. Mit diesem Assay wurde versucht ein System zu etablieren das die Möglichkeit bietet, eine direkte Ligand-Rezeptor-Interaktion mit dem spezifischen RE zu beobachten und zu quantifizieren.

Zur Detektion der spezifischen DNA-Interaktion werden markierte Oligonukleotide benötigt. Das Oligonukletid kann radioaktiv markiert oder alternativ dazu am 3'-Ende mit Digoxigenin endgelabelt sein. Ein Vorteil der nicht-radioaktiven Markierung der Oligonukleotide besteht zum einen in der Vermeidung des Umgangs mit radioaktivem ^{32}P , zum anderen wird die geringe Lebensdauer der radioaktiven Oligos umgangen. Im Gegensatz zu den ^{32}P -gelabelten Oligos, die höchstens über einen Zeitraum von zwei Wochen stabil sind, sind die mit Digoxigenin markierten Oligonukleotide sehr lange haltbar (Ikeda, 1993).

Für den Band-Shift-Assay ist eine native Aufarbeitung des benötigten Rezeptors besonders wichtig. Zur Bindung an die DNA genügt nicht nur der Rezeptor selbst, vielmehr ist ein ganzer Transkriptionsapparat für die spezifische Interaktion des Rezeptors mit seinem RE notwendig. Die benötigten Cofaktoren (z. B. Proteine,

lonen, Transkriptionsfaktoren) dürfen deshalb während der Aufarbeitung nicht vom Rezeptor abgetrennt werden (Garner, 1986).

Bei der nativen Präparation ist es vor allem wichtig, daß der Rezeptor die Fähigkeit zur DNA-Bindung nicht verliert. Dieser Aspekt muß bei der Zusammensetzung des verwendeten Puffers berücksichtigt werden. Für eine nicht-native Aufarbeitung (z. B. für einen qualitativen Nachweis mittels Western Blot) wird dem Aufarbeitungspuffer ein Molybdat-Salz zugesetzt. Molybdat bindet an den Rezeptor und verhindert so dessen Selbstverdau. Durch die Bindung des Molybdats wird die Abdissoziierung des Hsp-Komplexes verhindert und es kann damit auch keine DNA-Bindung des ligandaktivierten Rezeptors mehr beobachtet werden. Die Zugabe von Molybdat zum Puffer ist bei der nativen Aufarbeitung daher nicht möglich (Guth, 1996).

Die Präparation des Rezeptorproteins erfolgt durch Lyse der entsprechenden Zellen, die zuvor mit den zu untersuchenden Substanzen inkubiert wurden. Durch verschiedene Lösungs-, Präzipitations- und Zentrifugationsschritte wird der Rezeptor isoliert. Hierbei ist es erforderlich, möglichst schnell und bei niedriger Temperatur zu arbeiten, da sich der Rezeptor aufgrund seiner ATPase-Aktivität selbst verdauen kann. Desweiteren ist es wichtig, am Ende der Aufarbeitung die zum Aussalzen des Rezeptors (zur Abtrennung von Histonen und DNA) benötigte Salzkonzentration auf eine Endkonzentration < 100 mM zu verdünnen. Bei einer höheren Salzkonzentration ließe sich keine Bindung des Ligand-Rezeptor-Komplexes an die DNA nachweisen (Robidoux, 1992; Cato, pers. Mitteilung).

Der Rohextrakt des Rezeptors wird mit dem endmarkierten Oligonukleotid über einen bestimmten Zeitraum inkubiert. Der Inkubationsansatz wird anschließend auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und durch native Gelelektrophorese aufgetrennt. Der Protein-DNA-Komplex bleibt während der nativen Elektrophorese stabil assoziiert. Der Komplex aus Protein und DNA wird bei der nicht-denaturierenden Elektrophorese daran erkannt, daß er im Vergleich zum freien unkomplexierten DNA-Fragment eine reduzierte Mobilität besitzt.

Die im Gel schnell bewegliche ungebundene freie DNA wird somit von dem langsameren DNA-Protein-Komplex abgetrennt, was durch eine Bandenverschiebung sichtbar wird (Crothers, 1987; Novak, 1995; Ramanujam, 1990; Schneider, 1986).

Nach der Auftrennung durch die native Elektrophorese wird das Gel durch Semidry-Blotting auf eine Nylonmembran geblottet. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle sind somit für höhermolekulare Liganden (beispielsweise Antikörper) frei zugänglich. Mit Hilfe der Blotting-Methode wird daher die Nachweismöglichkeit von elektrophoretisch getrennten Molekülen erweitert (Westermeier, 1993). Die DIG-markierten Oligonukleotide lassen sich schließlich mit Hilfe einer Chemilumineszenz-Reaktion nachweisen. Die Quantifizierung der spezifischen Rezeptorbande ist mit einer speziellen Auswertesoftware am Computer möglich.

4.2.3.1 Diskussion des Band-Shift-Verfahrens

Mit der Etablierung des sogenannten Band-Shift-Assays, der die Bindung des ligandaktivierten Estrogenrezeptors an rezeptorspezifische "Estrogen Responsive Element"-Sequenzen sichtbar macht, sollte versucht werden, weitere mechanistische Einflüsse auf die Ligand-Rezeptor-DNA-Interaktion zu erfassen. Leider ergaben sich bei der Etablierung dieses Testsystems erhebliche Schwierigkeiten. Im Gegensatz zu den ursprünglich von Kumar und Chambon, 1988, gezeigten ligandspezifischen Banden in dem nativen Gel wurden von uns, aber auch von anderen Gruppen (Katzenellenbogen, B., 1995, Metzger und Chambon, 1995, Klein-Hitpaß, 1997) speziell mit dem Estrogenrezeptor keine solchen spezifischen Banden gefunden. Teilweise wurden scheinbar spezifische Banden detektiert, deren Auftreten und Ausprägung jedoch auch unter sorgfältigster Durchführung der Versuche zum größten Teil nicht reproduzierbar waren. Insgesamt erwies sich die Band-Shift-Methode als für die Fragestellung nicht geeignet. Dies gilt höchstwahrscheinlich nur für die Experimente mit dem Estrogenrezeptor, im Falle des Androgenrezeptors kann sich die Prüfung des Testansatzes als valides Testsystem für die Untersuchung der Ligand-Rezeptor-DNA-Wechselwirkung durchaus lohnen. Nach pers. Mitteilung von Herrn Dr. Cato, Forschungszentrum Karlsruhe, läßt sich durch Konkurrenz von Hydroxyflutamid die Teststeron spezifische Bande in ihrer Ausprägung abschwächen.

4.3 Prüfstrategie zur Identifizierung und Charakterisierung endokriner Disruptoren

Neben der Prüfung des hormonellen oder antihormonellen Potentials von Medikamenten wie Zytostatika oder Kontrazeptiva können die vorgestellten funktionellen Reportergeratestsysteme auch zur Erfassung und Bewertung der hormonellen oder antihormonellen Wirkung von Lebensmittelinhaltsstoffen und von Verbindungen, die in Bedarfsgegenständen eingesetzt werden, herangezogen werden. Initiiert durch Arbeiten von Colborn und Davis, 1993, wurde die Nutzung der funktionellen Reportergerenassays auf die verschiedensten Verbindungen ausgeweitet, die möglicherweise eine hormonelle Aktivität aufweisen können. Neben der Konzentration auf unterschiedliche Phytoestrogene und das Mykotoxin Zearalenon konnten nach und nach weitere in der Literatur beschriebene Verbindungsklassen untersucht werden.

Neben bereits als estrogen aktiv beschriebenen Verbindungen ergaben sich im weiteren Verlauf der Arbeit verbesserte Einsichten in weitere Strukturanaloga. Diese Verbindungen wurden durch Strukturvergleiche und unterstützt durch "molecular-modeling" Berechnungen ausgewählt. Durch schnelles Screening unterschiedlicher Liganden ergaben sich verfeinerte Strukturkenntnisse. So konnten teilweise innerhalb einer Substanzgruppe detaillierte Struktur-Wirkungsbeziehungen erstellt werden. Diese Erkenntnisse erlaubten mittels on line Struktursuche (Beilstein-Crossfire) und erneuter Literatursuche die Identifizierung weiterer potentieller Estrogenrezeptorliganden.

Damit konnte eine effiziente Systematisierung von Estrogenrezeptorliganden in verschiedene Untergruppen begonnen werden. Ausgehend von den bisher identifizierten Hauptvertretern kann damit auf weitere Verbindungen geschlossen werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene *in vitro* Verfahren mit unterschiedlichen Endpunkten zur Bestimmung des endokrinen Potentials von unterschiedlichsten Xenobiotika etabliert.

Diese Assays sind effizient durchzuführen und erlauben einen hohen Probendurchsatz.

4.4 Validierung des Transaktivierungsassays

Durch Inkubation der transgenen Zellen und Präparation des Reporterergenprodukts ergibt sich die erwartete Dosis-Wirkungsbeziehung über einen, mehrere Größenordnungen umfassenden Dosisbereich. Der Kurvenverlauf ergibt bei halblogarithmischer Auftragung eine klassisch sigmoidale Form. Dieser für die Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor typische Kurvenverlauf erstreckt sich vom subphysiologischen Bereich (1 pM) bis hin zum Sättigungsbereich des Rezeptors (ca. 10 μ M). Der Wendepunkt der Kurve repräsentiert gleichzeitig die effektive Konzentration (EC_{50}), die die halbmaximale rezeptorvermittelte Induktion eines promotorkontrollierten Reportergens hervorruft. Dieser Wendepunkt der Kurve entspricht gleichzeitig auch der physiologischen Konzentration von Estradiol *in vivo*. In erster Näherung lassen sich somit, die in diesen *in vitro* Assays erzielten Wirkspiegel auf die entsprechende Situation *in vivo* extrapolieren.

4.4.1 Validierung des Estradiolantagonismus durch ICI 182 780

Zur vollständigen Validierung des Testsystems sollen auch die Effekte beschrieben werden, die durch die Rezeptorantagonisten alleine oder in Konkurrenzexperimenten mit dem physiologischen Liganden induziert werden. Wie in Abb. 4-2 zu erkennen ist wirkt ICI 182 780, wie in der Literatur beschrieben (Wakeling, 1988), als reiner Estrogenrezeptorantagonist. In Konkurrenzexperimenten mit Estradiol bewirkt ICI 182 780 eine vollständige Hemmung der Reporterogeninduktion durch Estradiol. Ab einer ausreichend hohen Konzentration von ICI 182 780 (ca. 50 μM) wird die Reporterogeninduktion vollständig antagonisiert.

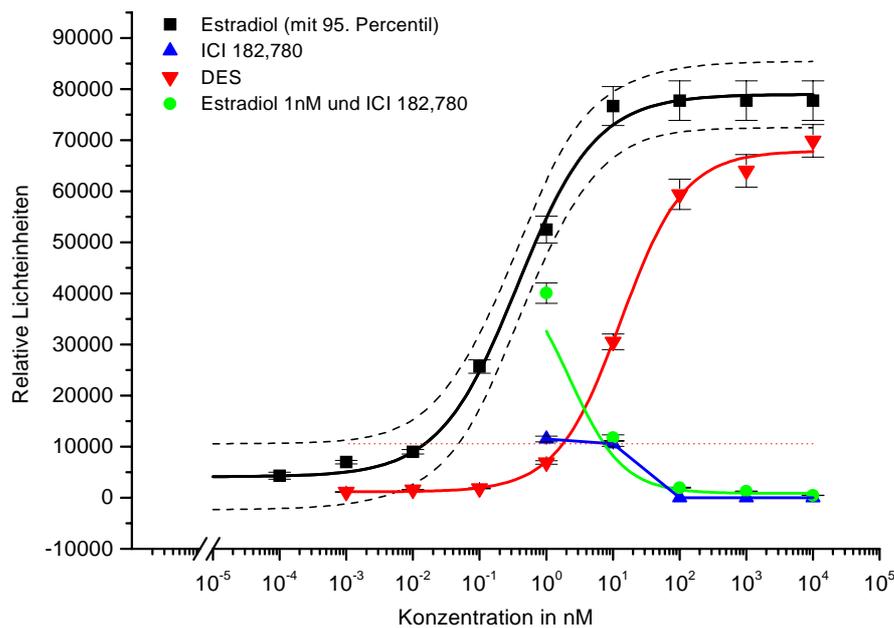


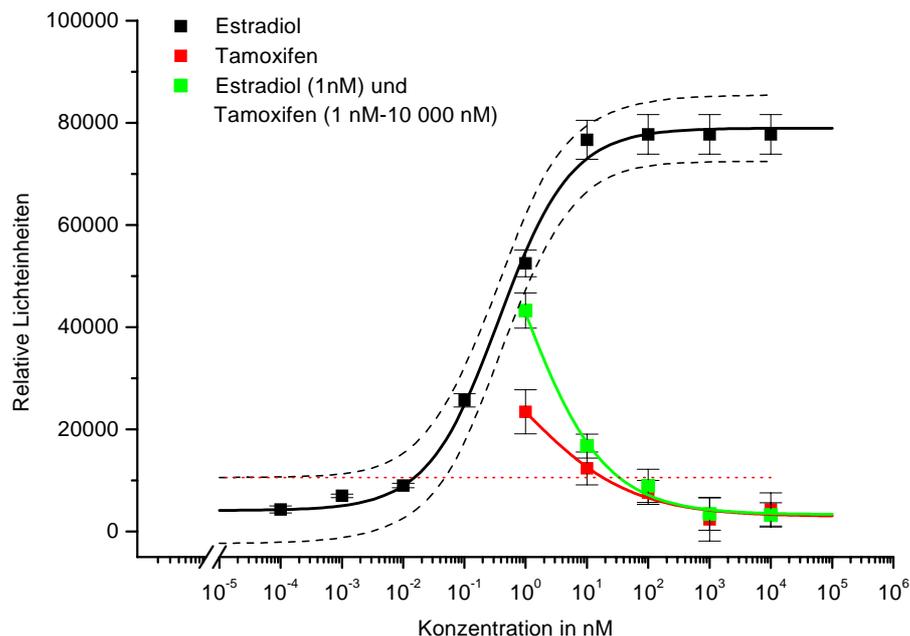
Abb. 4-5 Validierung des Transaktivierungssystems mittels zweier Agonisten (Estradiol, Diethylstilbestrol) und eines Antagonisten (ICI 182 780)

4.4.2 Validierung des Estradiolantagonismus durch Tamoxifen

Wie in Abb. 4-6 zu erkennen ist, verhält sich Tamoxifen bzw. sein Metabolit 4-OH-Tamoxifen je nach Konzentration als potentieller Agonist oder auch als potentieller Antagonist am Estrogenrezeptor.

In therapeutischer Dosierung (1 μM) antagonisiert Tamoxifen die Wirkung von Estradiol effektiv. In geringeren Konzentrationen (ca. 1 nM - 100 nM) wirkt Tamoxifen zumindest in Brustgewebe, also auch in MCF-7- Zellen und in Knochengewebe als schwacher Agonist.

Abb. 4-6: Validierung des Transaktivierungsassays mittels eines Agonisten (Estradiol) und eines Antagonisten (Tamoxifen)



Die stabil transfizierte MCF-7-Luciferase- und die LeC-9-CAT-Zelllinien stellen sehr sensitive und äußerst spezifische Testsysteme dar. Durch die Prüfung des physiologischen Liganden Estradiol und bekannter Antiestrogene konnten die Testsysteme ausreichend validiert werden.

Bereits in den relativ simplen *in vitro*-Testsystemen ergeben sich für die Verbindungen z. T. komplexe zelluläre Antworten. Das bekannteste Beispiel ist das Tamoxifen[®] selbst (she. Abb. 4-2).

Kompliziert wird das *in vivo* Verhalten durch eine auch im antagonistischen Wirkungsbereich auftretende schwache estrogenere Aktivität. Diese geringere stimulierende Aktivität der Verbindungen wird als eine Folge der Stimulation der Transaktivierungsfunktion I (TAF I) des Estrogenrezeptors diskutiert. Für den therapeutischen Einsatz stellt die partielle agonistische Aktivität von Tamoxifen[®] durchaus einen erwünschten Nebeneffekt dar. Durch die Tamoxifengabe lassen sich Nebenwirkungen der estrogenablativen Therapie wie verstärkte Osteoporoseausbildung mit geringeren Nebenwirkungen durchführen. In der adjuvanten Chemotherapie hormonabhängiger Tumore wie Mammakarzinome oder Uteruskarzinome stellt die partielle estrogenere Aktivität von Tamoxifen[®] teilweise ein therapeutisches Problem dar. Hier ergeben sich durch den Einsatz reiner Antiestrogene wie der Verbindungen ICI 164 780 oder ICI 182 780 möglicherweise bessere Therapiemöglichkeiten.

Die partiellen und vollständigen Antiestrogene ermöglichen für die *in vitro* Testmethodik eine optimale Möglichkeit der Validierung dieser Systeme. Tatsächlich ergeben Testansätze, die gleichzeitig Estradiol, den physiologischen Liganden und ICI 182 780 als Antagonisten in therapeutischen Dosierungen beinhalten, eine nahezu vollständige Unterdrückung der zellulären Hormonantwort. Die Verbindung ICI 182 780 selbst induziert keine meßbare Hormonantwort in diesen *in vitro* Systemen. Diese eindeutigen Ergebnisse sind bislang mit keiner anderen bekannten Verbindung zu erzielen.

Die Meßwerte die nach Gabe von ICI 182 780 erzielt wurden befinden sich alle im Wertebereich unterhalb des 95. Percentils des Vertrauensbereiches der Estradiolkurve. Dieser Befund unterstützt die Wahl des oberen Limits des 95. Percentils im Bereich des Nullniveaus der Estradiolkurve als Signifikanzschwelle. Dieses Kriterium dient im weiteren Verlauf der Ergebnisdiskussion als wesentlicher Parameter zur Klassifizierung eines Stoffes als estrogen aktiv oder estrogen inaktiv (she. Kapitel 4.4).

Diese Dosis-Wirkungsbeziehungen validieren das Reportergensystem als ausreichend sensitives Meßsystem, das bereits subphysiologische Wirk-

konzentrationen von Estrogenen erfassen kann. Zusätzlich gewährleistet dieses System die Messung der tatsächlichen physiologischen Wirkungen von Verbindungen und Substanzgemischen. Wie sich am Beispiel des Kombinationsassays von Estradiol mit therapeutischen Konzentrationen von ICI 182 780 zeigt können antagonistische und kompetitive Effekte von Antiestrogenen ebenfalls in dem Modell bestimmt werden.

4.5 Auswertalgorithmen zur verbesserten relativen Einordnung der estrogen aktiven Xenobiotika

Die eingesetzten funktionellen Testsysteme bieten die Möglichkeit, viele Verbindungen schnell und effektiv auf eventuelle hormonelle Effekte zu überprüfen und zumindest *in vitro* eine relative Einteilung des Wirkpotentials der einzelnen Verbindungen vorzunehmen.

Ergänzt durch Strukturüberlegungen und -berechnungen durch verschiedene molecular modeling Verfahren konnten bereits vor einer tatsächlichen experimentellen Prüfung vermutlich relevante Verbindungen vorselektiert werden.

Die Vielzahl der Messungen erlaubt die Identifikation vieler für die estrogen Aktivität relevanter Parameter sowohl innerhalb einzelner Substanzklassen als auch über verschiedene Klassen hinweg. Je umfangreicher die Meßergebnisse sind, desto genauer läßt sich wiederum ein Bild einer möglichen "Leitstruktur" innerhalb einzelner Verbindungsklassen oder über mehrere Klassen hinweg erarbeiten.

Der für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen typische sigmoidale Kurvenverlauf (siehe z. B. Abb. 4-7) läßt sich mathematisch durch die sogenannte logistische Gleichung allgemein beschreiben:

$$Y = \frac{A1 - A2}{1 + (X/X_0)^p} + A2$$

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

p : Exponent; Steigung im Übergangsbereich
 X_0 : x-Wert bei 50 % Aktivierung, Wendepunkt der Kurve
 = Dissoziationskonstante (K_D)

In Abb. 4-7 ist dieser funktionelle Zusammenhang mittels nichtlinearer Regression an die Daten gefittet.

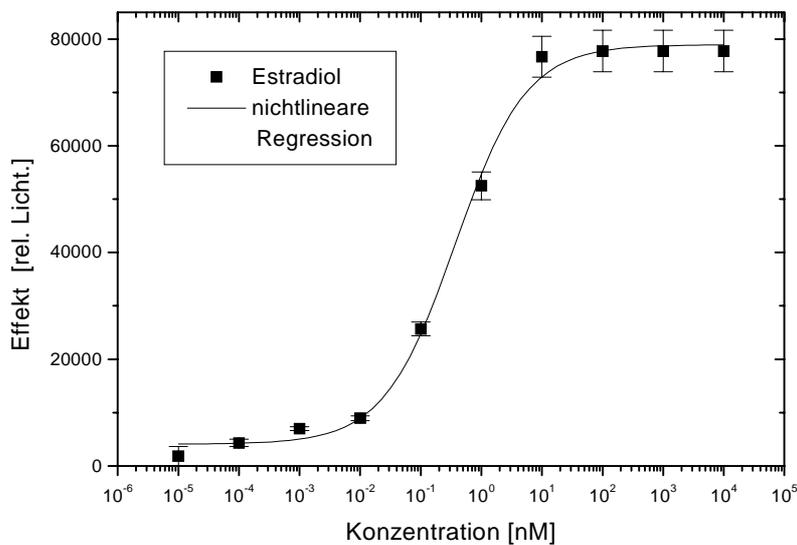


Abb. 4-7: Logistische Darstellung der Reporterogeninduktion durch Estradiol mit nichtlinearer Regression

Das untere Plateau beschreibt den Nulleffekt bei nichtaktiviertem Rezeptor, der maßgeblich von der experimentellen Nachweismethode und den äußeren Versuchsbedingungen abhängt. Um Aussagen über die intrinsische Aktivität ($A=A_2-A_1$) zu erhalten, muß dieser Nulleffekt von den Meßdaten abgezogen werden ($\tilde{Y}=Y-A_1$). Seine genaue Kenntnis ist für die Verwendung von linearen Auftragungsarten essentiell, doch ohne vorherige nichtlineare Regression schwierig. Der Exponent p , der die Steigung im Übergangsbereich beschreibt, wird bei allen gebräuchlichen linearen Auftragungsarten gleich eins gesetzt, womit ein wichtiger Fitparameter verlorengeht. (In Abb. 4-7 ergibt die nichtlineare Regression $p=0.74$.) Durch Einführung von A und Festsetzen von p bleiben nur noch zwei Parameter variabel,

so daß die Transformation auf eine lineare Darstellungsart möglich wird. Folgende lineare Auftragungen sind gebräuchlich:

Lineweaver-Burke:
$$\frac{1}{\tilde{Y}} = \frac{X_0}{A} \cdot \frac{1}{X} + \frac{1}{A}$$

Hanes:
$$\frac{X}{\tilde{Y}} = \frac{1}{A} \cdot X + \frac{X_0}{A}$$

Eadie-Hofstee:
$$\tilde{Y} = -X_0 \cdot \frac{\tilde{Y}}{X} + A$$

In den Abb. 4-8 - 4-11 sind die Estradioldaten aus Abb. 4-7 in der jeweiligen Darstellung zu sehen. Durch die Transformationen kommt es zu Häufungspunkten der Meßdaten, so daß im jeweils unteren Graph eine Ausschnittsvergrößerung verwendet wurde. Ebenfalls zu sehen sind die angefitteten Geraden. Dabei war es teilweise nötig, einige Datenpunkte beim Fitten zu ignorieren, um überhaupt einigermaßen sinnvolle Ergebnisse zu erzielen. Diese sind in den Abbildungen eingeklammert.

Bei fehlerfreien Meßdaten kann man diese Transformationen ohne Probleme verwenden. Doch sobald auch nur die kleinste Varianz vorhanden ist wird diese durch die Umformung erheblich verstärkt. Wird die Konzentration linear oder reziprok aufgetragen kommt es zur Häufung der Meßpunkte, so daß einzelne Meßdaten überproportional gewichtet werden. Deren Fehler bestimmen das Ergebnis. Bei der Eadie-Hofstee-Darstellung kommt erschwerend hinzu, daß sowohl Ordinate als auch Abszisse von der Meßgröße abhängen, womit beide fehlerbehaftet sind. Am ehesten scheint die Hanes-Darstellung für eine Meßdatenauswertung geeignet zu sein (vgl. Abb. 4-9).

Abb. 4-11 zeigt den Vergleich der drei linearen Methoden mit der nichtlinearen logistischen Gleichung. Während das Verhalten bei hohen Konzentrationen von allen vier Methoden zumindest dem Trend nach akzeptabel beschrieben wird, versagen die linearen Methoden im Bereich niedriger Konzentrationen völlig. Daraus ist zu

schließen, daß für die Meßdatenauswertung die Verwendung der logistischen Gleichung mittels nichtlinearer Regression anzuraten ist.

Weiterhin offen ist die Frage nach der adäquaten Darstellung der Ergebnisse. Natürlich bietet sich hier auch die sigmoidale Auftragung an, doch kann es aus Gründen der Vergleichbarkeit mit Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen sinnvoll sein, eine der linearen Darstellungsarten zu wählen, zumal vor allem die Lineweaver-Burke-Darstellung weit verbreitet ist.

Unabhängig von der Wahl der Auftragungsart ist es einsichtig, daß beim Vergleich vieler verschiedener Prüfansätze die Übersichtlichkeit umso schneller verloren geht, je mehr Parameter verglichen werden müssen. Letztlich bleibt die Möglichkeit, die Angabe der Ergebnisse auf Basis der sigmoidalen Kurven auf zwei Parameter zu reduzieren. Dabei kann der X_0 -Wert (auch EC_{50} oder K_D) und der Plateaubestand ($A=A_2-A_1$) herangezogen werden. Diese beiden Parameter spielen im Verhältnis zu den absoluten Plateauwerten und zum Exponenten der Kurve für die Interpretation und relative Einordnung der Ergebnisse für unterschiedliche Verbindungen die größere Rolle.

Für die K_D sprechen mehrere Aspekte:

- Die Kurve weist in diesem Wertebereich das kleinste Konfidenzintervall auf und somit die größte Verlässlichkeit der Ergebnisse.
- Der K_D -Wert repräsentiert die physiologisch relevante Induktion und den entsprechenden Konzentrationsbereich.
- Die halbmaximale Induktion des Wachstums oder der Reportergeninduktion ist ausreichend signifikant für einen spezifischen Effekt und liegt deutlich unterhalb des physiologisch weniger relevanten Sättigungsbereiches der Rezeptoren.

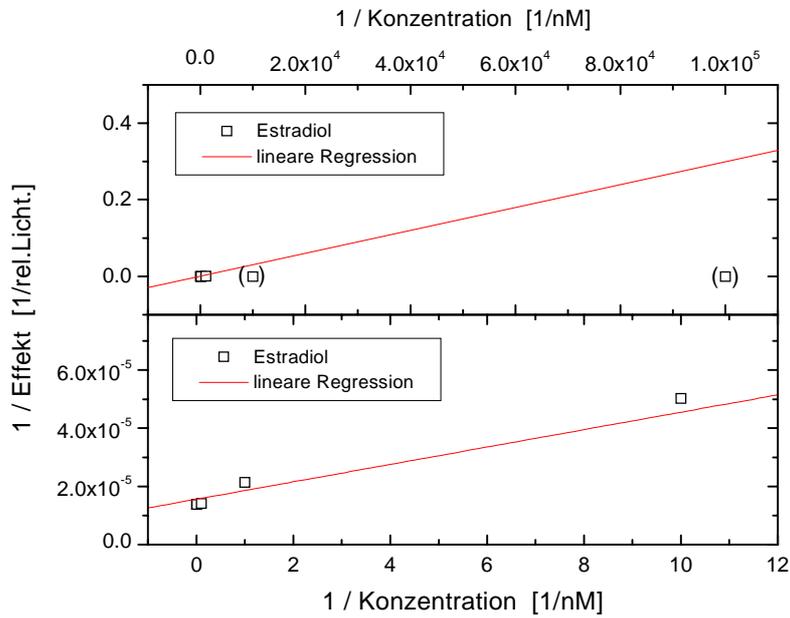


Abb. 4-8: Lineweaver-Burke-Darstellung der Reportergeninduktion durch Estradiol mit linearer Regression. Der untere Graph ist eine Ausschnittsvergrößerung.

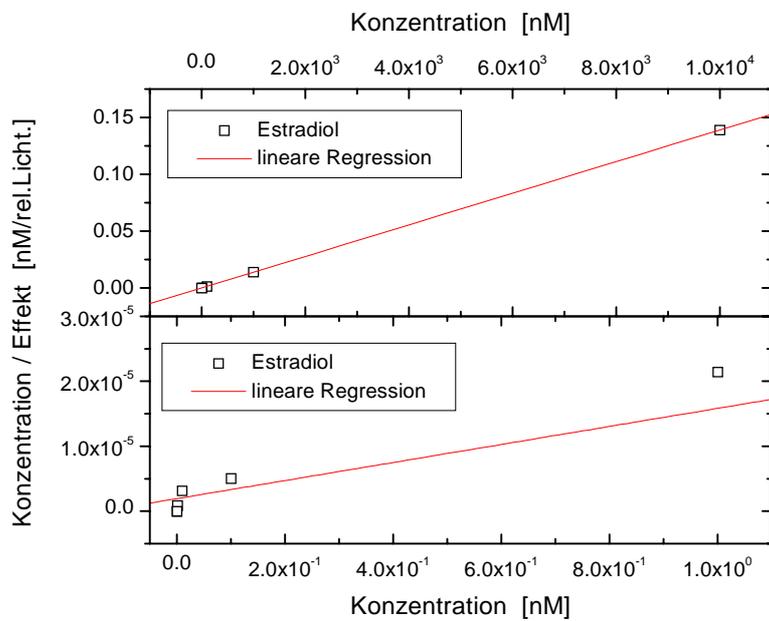


Abb. 4-9: Hanes-Darstellung der Reporterageninduktion durch Estradiol mit linearer Regression. Der untere Graph ist eine Ausschnittsvergrößerung.

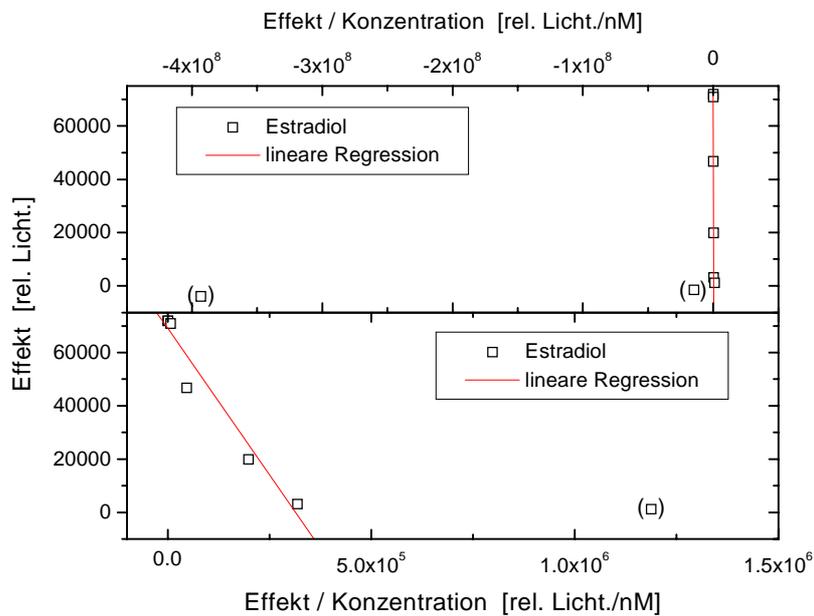
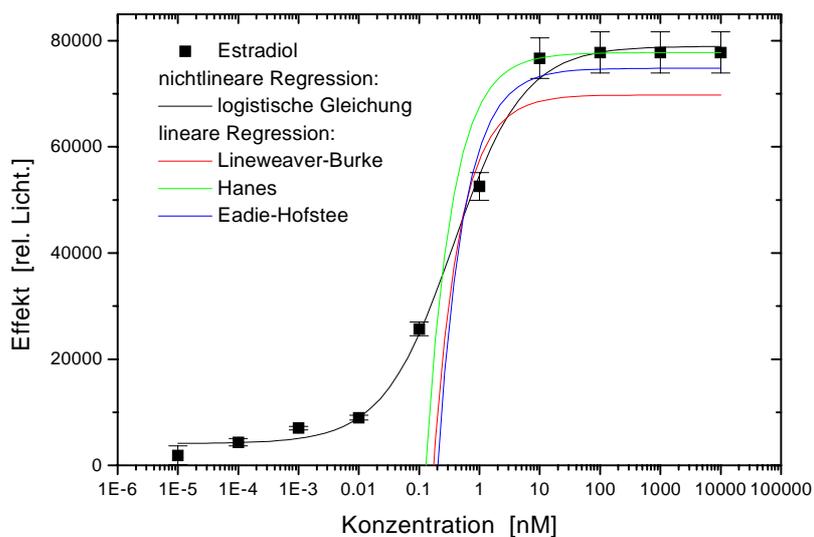


Abb. 4-10: Eadie-Hofstee-Darstellung der Reporterageninduktion durch Estradiol mit linearer Regression. Der untere Graph ist eine Ausschnittsvergrößerung.



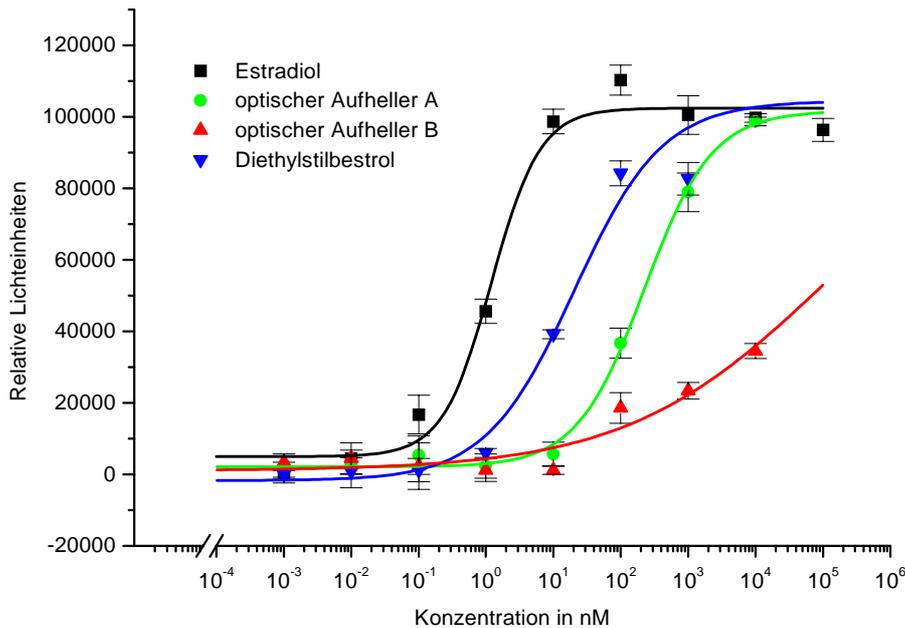


Abb. 4-11: Vergleich der vier Auswertemethoden am Beispiel der Reporteragen-induktion durch Estradiol

Für den Plateaubestand der jeweiligen Testverbindung spricht, daß mit diesem Parameter direkt die intrinsische Effektivität einer Verbindung angegeben wird. Diese wird in Bezug zur intrinsischen Effektivität des physiologischen Liganden gesetzt. Es ergibt sich eine Einteilung zwischen 0 und 100 % oder 0 und 1. Ein solches Vorgehen ergibt analoge Ergebnisse wie sie mit Lineweaver-Burke erhalten werden. (Im Gegensatz zur Meßauswertung wird bei der Ergebnisdarstellung bei Lineweaver-Burke auf eine Vergleichsaktivität normiert, d.h. die Gleichung mit A (Estradiol) multipliziert.).

Die relative Einstellung der Wirkstärke von einzelnen Verbindungen kann aufgrund der jeweiligen Abstände der K_D -Werte erfolgen. Der Quotient von jeweiligem K_D -Wert und K_D (Estradiol) liefert den Faktor, um den die Testsubstanz höher dosiert werden muß als der physiologische Ligand Estradiol, um eine äquivalente Wirkung hervorzurufen.

Abb. 4-12 : Berechnung der K_D -Werte von Estradiol und verschiedener Stilbene. Alle Verbindungen wurden als vollständige Agonisten definiert. Für Estradiol wurde die Kurve mit vier variablen Parameter der logistischen

Formel berechnet, für die Stilbene wurde A2 (aktiviertes Plateau) festgesetzt, die drei anderen Parameter blieben variabel.

Die berechneten Kurvenparameter im einzelnen:

Data: Data1_Estradiol

Model: Logistic

A1	4967.22931	±	4339.29811
A2	102432.94764	±	3305.01892
x0	1.21589	±	0.29917
p	1.2031	±	0.41729

Data: Data1_Diethylstilbestrol

Model: Logistic

A1	-1745.765	±	5430.57995
A2	104426.33917	±	0
x0	20.44067	±	8.78854
p	0.66321	±	0.16354

Data: Data1_Aufheller A

Model: Logistic

A1	2114.10635	±	1230.91583
A2	102432.94764		0
x0	225.27496	±	36.15324
p	0.86539	±	0.09599

Data: Data1_Aufheller B

Model: Logistic

A1	1045.29118	±	3182.71716
A2	104426.33917		0
x0	97576.71908	±	1744.23736
p	0.29589	±	0.09514

Aus den rot markierten K_D -Werten lassen sich die relativen Verhältnisse der Potenz der Testverbindungen zu der Potenz von Estradiol berechnen. Der Quotient aus K_D

(Estradiol) / K_D (Testverbindung) läßt die relative Potenz einer Verbindung im Verhältnis zu Estradiol erkennen. Daraus ergeben sich aus dem oberen Beispiel folgende Werte:

Testverbindung	relative Potenz
DES	$5,9 \times 10^{-2}$
optischer Aufheller A	$5,4 \times 10^{-3}$
optischer Aufheller B	$1,24 \times 10^{-5}$

Die relative intrinsische Effektivität läßt sich nach der vorab erfolgten Definition der Verbindungen als vollständige Agonisten nicht bestimmen.

Bei Verbindungen, deren estrogene Potenz relativ stark ausgeprägt ist und deren intrinsische Aktivität dazu führt, daß durch Meßpunkte ein oberes Plateau erarbeitet werden kann, läßt sich durch dieses Verfahren die unterschiedliche Potenz und die relative Effektivität der Testverbindungen sehr genau beschreiben.

Probleme ergeben sich bei Verbindungen, die aufgrund toxischer Effekte oder auch durch die in extrem hohen Konzentrationsbereichen unvollständige Löslichkeit keine experimentelle Plateaufindung ermöglichen.

Je nach Definition des Liganden, entweder als vollständiger Agonist oder als partieller Agonist / Antagonist, ergibt die Berechnung der K_D -Werte bei gleichen Meßpunkten eine große Differenz.

Dieses Problem tritt bei Transformationen nach Lineweaver-Burke, Hanes und Eadie-Hofstee teilweise noch erheblich stärker auf. Die beste Einteilung läßt sich noch durch logistische Dose-Response-Berechnung durchführen, unter vorab erfolgter Definition der relevanten Kurvenparameter. So kann durch Festsetzen des oberen Plateaus von Estradiol (A_2) der K_D -Wert von Verbindungen berechnet werden deren Meßwerte kein oberes Plateau beschreiben, die jedoch als vollständige Agonisten definiert werden (siehe Abb. 4-9).

Durch Festsetzen der Werte des Plateaus A_1 und A_2 von Estradiol (A_1 = kein Effekt über einen bestimmten Konzentrationsbereich und A_2 = vollständige "Response" ab einer bestimmten Konzentration) werden durch die Meßwerte, die die Testverbindung hervorruft lediglich der Wendepunkt ($X = K_D$ -Wert) und der Plateauübergang der Kurve beschrieben. Diese Vorgaben können dann erfolgen,

wenn nach dem wissenschaftlichen Kenntnisstand davon ausgegangen werden kann, daß das untere Plateau von Estradiol den Nulleffekt beschreibt. Das ist so zu erwarten.

Komplizierter wird die Vorausgabe beim oberen Plateau (A2, vollständige Wirkung). Grundvoraussetzung ist, daß keine synergistischen Effekte zu erwarten sind, die das Wirkplateau über das von Estradiol anheben könnten. Ein solches Verhalten konnte bislang nicht nachgewiesen werden und erscheint nach bisherigem Kenntnisstand auch nicht sinnvoll. Die Rezeptorpopulation über die Meßzeit sollte relativ konstant sein insbesondere beim Kurzzeittest in den Reportergensystemen. Neuerdings wird zwar auch über eine Heterodimerenbildung des Rezeptors (Estrogenrezeptor α und β) diskutiert, aber auch hier bleibt die Rezeptorzahl endlich und der Effekt auf ein Zielgen ebenfalls.

Einen deutlich kritischeren Punkt stellt die oft beschriebene gemischt agonistische / antagonistische Wirkcharakteristik vieler Rezeptorliganden dar. Die Plateauhöhe dient in gewisser Weise sogar als Maß für diese gemischt aktivierende und hemmende Aktivität einer Verbindung.

Als Alternative zu den oben vorgeschlagenen Verfahren wäre auch denkbar, den höchsten erzielbaren Meßpunkt als Maß für das obere Plateau dieser Verbindung anzunehmen. In Konsequenz dieser Vorgehensweise verschiebt sich der rechnerisch ermittelte Wendepunkt der Kurve zu deutlich niedrigeren Werten. Dies würde zu erheblich niedrigeren relativen Potenzwerten führen und folglich auch zu höherer estrogener Wirkpotenz einer Testverbindung.

Die Definition, daß der höchste Meßwert der Beginn des oberen Wirkplateaus sein soll stellt eine willkürliche Festlegung der relativen Wirkeffizienz einer Testverbindung dar. Obwohl in der Literatur (Soto,1991) vielfach nach dieser Methode verfahren wird stellt diese Berechnungsart eine subjektive Auswertung der Meßergebnisse dar.

Ein möglicher Vorschlag für eine annähernd verlässliche Auswertung von schwach aktiven Verbindungen kann vielleicht folgendes Verfahren darstellen:

1. Alle Verbindungen, die die zelluläre "Response" nicht über das 95. Perzentil des unteren Plateaus (A1) von Estradiol induzieren können, werden als inaktiv eingestuft.

2. Durch Extrapolation aus den Meßdaten nach einem der beiden oben beschriebenen Verfahren kann der K_D -Wert einigermaßen verlässlich ermittelt werden. Dabei liefert das erste Verfahren (Berechnung des K_D -Wertes unter der Annahme, daß die Testverbindung einen vollständigen Agonist darstellt) vergleichbarere Werte als das zweite Verfahren. Durch die mögliche Varianz des Plateaus A_2 der Testsubstanz variieren drei der vier Kurvenparameter; somit ergibt sich auch für den errechneten K_D -Wert eine deutlich höhere Varianz. Hieraus folgt wiederum eine erhöhte Schwankung der relativen Potenzbeträge, was letztlich zu einer starken Unschärfe der Aussage und Einteilung einer solchen Testverbindung führen kann, da sich der Betrag schnell um ein bis zwei Größenordnungen ändern kann.

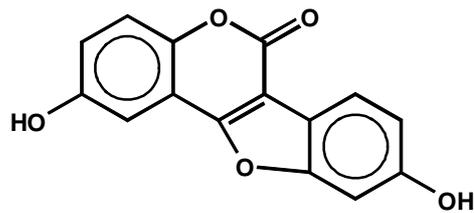
Durch die Ausweitung der Substanzprüfungen auf verschiedene Verbindungsklassen ergaben sich hinsichtlich Struktur-Wirkungsbeziehungen der selbst untersuchten und der in der Literatur beschriebenen hormonell / antihormonell aktiven Verbindungen interessante Rückschlüsse auf weitere Strukturanaloga erlaubten. In Arbeiten von Colborn, 1993, und Davis, 1994, wurden strukturell sehr heterogene Verbindungen als hauptsächlich estrogen aktiv beschrieben (siehe Einleitung).

Durch eigene experimentelle Untersuchungen verschiedener Verbindungen, die auch in der Literatur beschrieben wurden, konnten eine zunehmende Zahl von Stoffen identifiziert werden, die ein agonistisches aber auch antagonistisches Verhalten am Estrogenrezeptor vermuten lassen. Es gelang auch schon in einem frühen Stadium der Untersuchungen eine vorläufige Systematisierung der potentiellen Estrogenrezeptorliganden zu erarbeiten. Neben den allgemeinen Strukturüberlegungen dienten vor allem die relativen Potenzwerte als Parameter für die Einstufung der geprüften Verbindungen. Durch die Erfassung sowohl möglichst potenter Agonisten als auch nur schwacher Agonisten lassen sich mit zunehmender Fallzahl detailliertere Kenntnisse zu relevanten Strukturinkrementen erarbeiten. Diese Vorgehensweise ist mit dem Prozedere der CoMFA-Methode vergleichbar.

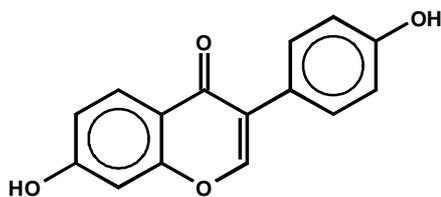
4.6 Phyto- und Mykoestrogene

4.6.1 Bestimmung der Reporterageninduktion durch Phytoestrogene

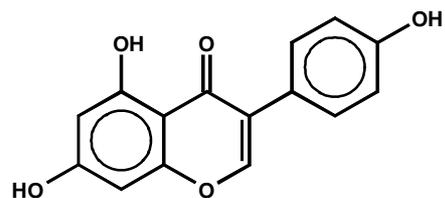
Sojabohnen haben aufgrund ihres hohen Verbrauches eine große Bedeutung als Grundnahrungsmittel und bei speziellen Ernährungssituationen des Menschen. Da sie gleich mehrere potentiell estrogen aktive Inhaltsstoffe aufweisen, sind sie einerseits für die Bewertung der Aufnahme estrogen aktiver Stoffe durch Nahrungsmittel für den Menschen, andererseits als Vergleichsverbindungen zu Fremdstoffen besonders interessant. Neben Coumestrol gelten die beiden Isoflavone Daidzein und Genistein als Estrogenrezeptorliganden. Zuerst wurden die Reinsubstanzen auf ihr estrogenes Potential hin untersucht.



Coumestrol



Daidzein



Genistein

Abb. 4-13: Strukturen von potentiell estrogen aktiven Sojainhaltsstoffen

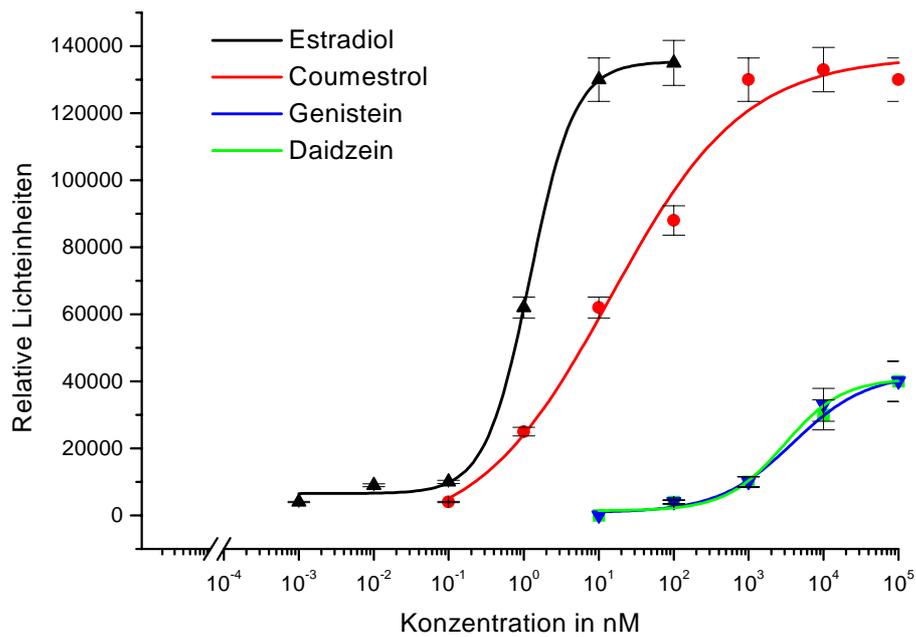


Abb. 4-14: Estrogene Aktivität von Coumestrol, Daidzein, Genistein im Vergleich zu 17 β -Estradiol in der stabil transfizierten MCF-7-Luc

Die berechneten Kurvenparameter im einzelnen:

Data: Data1_Estradiol

Model: Logistic

A1	6518.86585	1594.36031
A2	135398.57884	2435.78305
x0	1.20937	0.08509
p	1.46134	0.23726

Data: Data1_Coumestrol

Model: Logistic

A1	-13295.12716	27000.77115
A2	147443.35361	19750.83333
x0	16,73434	0.14319
p	0.40888	0.18245

Data: Data1_Genistein

Model: Logistic

A1	867.30883	1814.93001
A2	42421.47583	3421.96042
x0	3901,8769	0.12943
p	0.87337	0.21256

Data: Data1_Daidzein

Model: Logistic

A1	1376.92897	1869.26115
A2	40900.83591	2922.18816
x0	2979,4675	0.09652
p	1.11544	0.28168

Relative Potenz von

Testverbindung	relative Potenz
Coumestrol	$7,23 \times 10^{-2}$
Genistein	$3,1 \times 10^{-4}$
Daidzein	$4,1 \times 10^{-4}$

Intrinsische Effektivität von

Testverbindung	intrinsische Effizienz
Coumestrol	100 %
Genistein	28 %
Daidzein	28 %

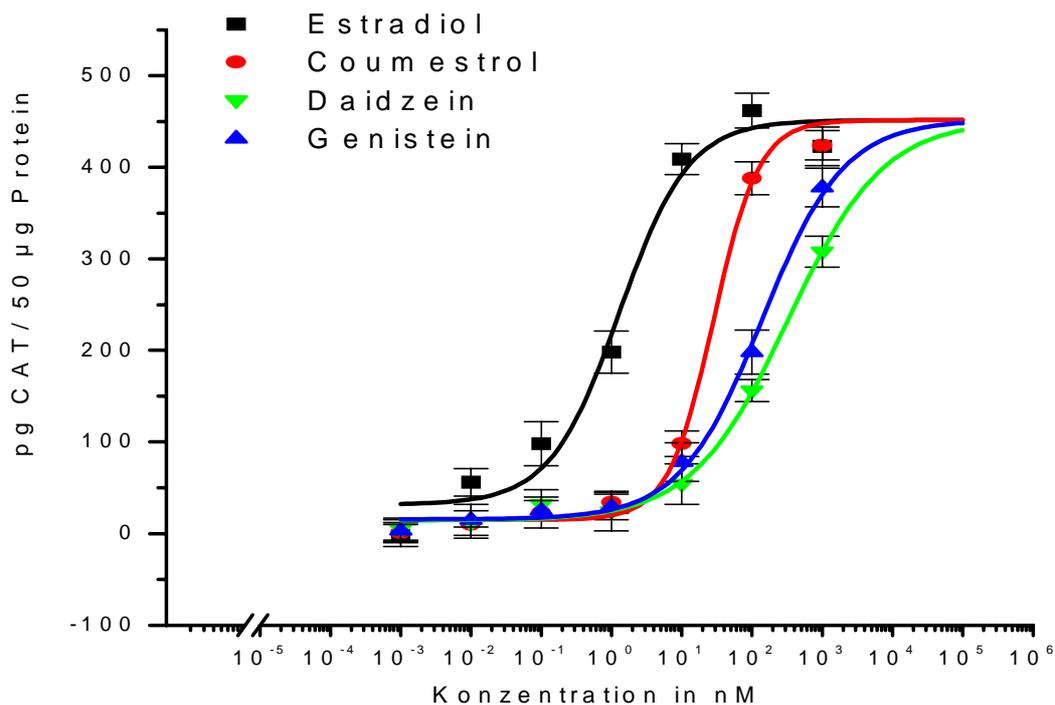


Abb. 4-15: Estrogene Aktivität von Coumestrol, Daidzein und Genistein im Vergleich zu 17 β -Estradiol in der stabil transfizierten LeC-9-CAT-Zelllinie

Die resultierenden relativen Potenzfaktoren im einzelnen:

Testverbindung	relative Potenz
Coumestrol	0,77
Genistein	9 x 10 ⁻³
Daidzein	4 x 10 ⁻³

Die intrinsische Effektivität kann nur für Coumestrol sicher mit 100 % angegeben werden. Bei Genistein und Daidzein wurde A₂ (Testsubstanz) = A₂ (Estradiol) gesetzt.

In den Reportergenversuchen mit der Mauszelllinie LeC-9-CAT und der humanen MCF-7-Luciferase Zelllinie ergab sich für Coumestrol ein eindeutiges agonistisches

Verhalten im Vergleich zu Estradiol, wobei Coumestrol eine um den Faktor $7,2 \times 10^{-2}$ geringere estrogene Potenz im Vergleich zu Estradiol aufweist. Trotzdem kann Coumestrol in diesem Versuchsansatz als potentes Estrogen betrachtet werden. Daidzein und Genistein zeigen bei weiter herabgesetzter Potenz ein partiell agonistisches / antagonistisches Verhalten im Vergleich zu Estradiol.

Interessanterweise ergaben Versuche, die mit der Mauszelllinie LeC-9 durchgeführt wurden für Genistein und Daidzein eine höhere relative Effizienz in der CAT-Reporterogeninduktion gegenüber Versuchen mit der humanen Mammakarzinomzelllinie MCF-7-Luciferase (s. o.). Im Gegensatz zur nur mit dem Reporter-genvektor transfizierten Mammakarzinomzelllinie MCF-7-Luc exprimiert die Mauszelllinie auch den humanen Estrogenrezeptor, der aus der MCF-7-Zelllinie gewonnen wurde, erst nach erfolgter Transfektion. Das bedeutet, daß der humane Estrogenrezeptor nicht in seinem natürlichen zellulären Kontext gebildet wird, sondern als rekombinantes Protein mit dem Transkriptionsapparat der Mauszelllinie wechselwirkt.

Von Daidzein und insbesondere von Genistein ist bekannt, daß diese Isoflavone nicht nur durch ihre Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor das Wachstum von verschiedenen Brustkrebszellen beeinflussen, sondern auch teilweise hemmende Effekte auf das Wachstum solcher Zellen nehmen indem sie verschiedene Proteintyrosinkinasen, die wichtige Schlüsselenzyme der zellulären Signaltransduktion darstellen, blockieren. Eine abgeschwächte Wachstumsinduktion durch Daidzein oder Genistein ließe sich durch die wachstumshemmenden Wirkungen dieser Isoflavone erklären.

Eine Erklärung, warum auch in den Transaktivierungsassays mit der MCF-7-Luc nur vergleichbar schwache induzierende Effekte zu beobachten sind, läßt sich nicht mit diesen parallel ablaufenden Enzymhemmungen alleine erklären. Eine denkbare Erklärung könnten Wirkungen der Isoflavone auf eventuell hemmende Begleitproteine des Estrogenrezeptors sein, die spezifisch nur im Kontext der Mammakarzinomzelllinie MCF-7 vorkommen. Diese Beobachtung stellt ein interessantes Beispiel dar, welche zellbiologischen und auch biochemischen Faktoren die Transaktivierung der Reporter-gene beeinflussen können.

Inwieweit der von Kuiper et al. (1996) und Mosselmann (1996) erstmals beschriebene Estrogenrezeptor β diese doch deutlichen Unterschiede der Reporter-geninduktion mitbeeinflusst kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht beantwortet

werden. Ein möglicher Einfluß ist jedoch denkbar, da MCF-7 Zellen sowohl den Estrogenrezeptor α (klassischer Estrogenrezeptor) als auch den Estrogenrezeptor β exprimieren sollen (Vollmer, 1998).

In einer Arbeit von Barkhem et al. (1998) wird beschrieben, daß Genistein den ER β gegenüber dem ER α deutlich schlechter aktiviert. Die intrinsische Effektivität von Genistein am ER β erreicht gerade noch die 50 % Schwelle gegenüber der Aktivierung von ER α . Interessanterweise zeigt Genistein am ER β das typische Verhalten eines gemischt funktionellen Agonisten / Antagonisten. Dies könnte eine Erklärung für die oben beobachteten unterschiedlichen Effekte der gleichen Verbindungen in den ähnlich konzipierten Zellmodellen sein. Es wird zudem deutlich, daß den einzelnen kritischen Parametern der Zellmodelle (Ursprungsgewebe der Zelle, Steroidhormonrezeptoren, Promotor, Reportergeren) große Bedeutung hinsichtlich der Interpretierbarkeit und eventueller Verallgemeinerungen zukommt.

Trotz des prinzipiell agonistischen Verhaltens am Estrogenrezeptor wird diesen Phytoestrogenen in der Literatur teilweise eine mögliche Schutzwirkung vor der Entwicklung eines Mammakarzinoms zugesprochen (Adlercreutz, 1982; Zava, 1997). Auch hier könnten unterschiedliche Aktivierungsmuster durch ER α und ER β von Bedeutung sein. Unter anderem werden verschiedene Lignane und Flavonoide als Aromataseinhibitoren beschrieben (Wang, 1994).

Daneben werden Wechselwirkungen mit der Catechol-O-methyltransferase beschrieben, die wiederum die Spiegel der endogenen Estrogenderivate und -metabolite beeinflussen (Zhu, 1998). Interaktionen mit der 16α -Steroiddehydrogenase von Naringenin, einem Flavanon, sind ebenfalls bekannt (Maser, 1998).

Diese Wechselwirkungen mit Enzymen des Steroidmetabolismus finden in Konzentrationsbereichen von ca. 1 μ M bis 1 mM statt, während Interaktionen am Estrogenrezeptor im hohen nmolaren bis mittleren μ molaren Bereich ablaufen. Obwohl für viele Verbindungen die prinzipielle Möglichkeit der Entfaltung einer estrogenen Aktivität besteht, wurden solche Fälle bislang nur vereinzelt beschrieben. In epidemiologischen und experimentellen Studien wurde oft aus einer positiven Korrelation geringer Lignan- und Flavonoidkonzentrationen im Harn und der Erkrankung an Brustkrebs geschlossen, daß Lignane und Flavonoide chemopräventive Eigenschaften besitzen (Adlercreutz, 1982).

Cassidy (1996) beschreibt Zyklusverschiebungen um 2 - 3 Tage durch die Aufnahme von 60 g Leinsamen pro Tag über vier Wochen. Das gleiche wird von japanischen Frauen berichtet, die sich traditionell mit einem höheren Anteil an Sojaprodukten ernähren, als Frauen in westlichen Kulturen. Mit dieser erhöhten Aufnahme an Phytoestrogenen soll ein deutlich reduziertes Risiko dieser Frauen einhergehen, an einem malignen Mammakarzinom zu erkranken. Diese möglichen positiven Effekte werden über eine Wechselwirkung der Phytoestrogene mit dem Estrogenrezeptor und einer im Verhältnis zu Estradiol schwächeren agonistischen Effizienz diskutiert. Somit käme diesen Verbindungen ein quasi anti-estrogenes Potential zu, wodurch eventuelle mitogene Effekte, die durch Estradiol hervorgerufen werden könnten, reduziert würden. Mit der Verlängerung des Menstruationszyklus geht auch die Absenkung des Progesteronspiegels in der Lutealphase, sowie der LH- und FSH-Spiegel einher.

Leinsamen, ebenfalls reich an Phytoestrogenen, senkt ab ca. 40 g/d auch bei Männern den FSH-Spiegel, jedoch daneben auch den Cholesterin- und LDL-Cholesterinwert. Die Testosteron- und DHT-Spiegel der männlichen Probanden zeigten jedoch nur eine schwache Absenkung nach einer Leinsamendiät.

Die bei Phytoestrogenen zu beobachtenden protektiven Einflüsse gegenüber einem erhöhtem Krebsrisiko können auch in weiteren möglichen Mechanismen begründet sein. So hemmt Genistein die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) (Utsumi, 1992; Wei, 1993). In hohen Konzentrationen (7 µg/ml) hemmt Genistein die Aktivität der *epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase*. Serin und Threonin-Kinasen werden ab Konzentrationen von über 30 µg/ml ebenfalls gehemmt (Akiyama, 1987).

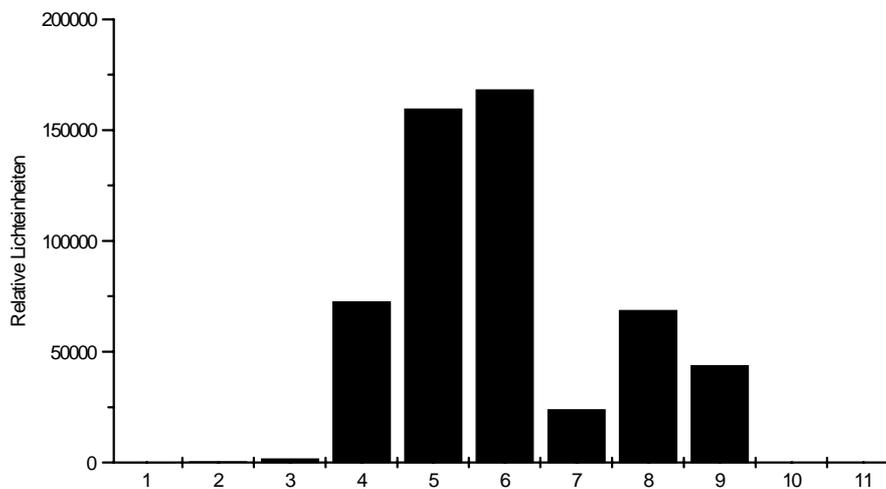
Diese Mechanismen können theoretisch zu geringeren mitogenen Stimuli und auch zu reduzierten Zellschädigungen beitragen, die *in vivo* Relevanz ist bislang jedoch nicht belegt. Dies verdeutlicht auch die komplexe Situation der Bewertung möglicher hormoneller / antihormoneller Effekte durch Isoflavone *in vivo*. Ebenso ist auch die Einstufung dieser Phytohormone als chemopräventive Agenzien nicht eindeutig durchführbar. So ergeben Versuchstierstudien einen Einfluß von Genistein auf den LH-Spiegel der F1-Generation bei Gabe von Genistein an die Mutter während der Schwangerschaft (Levy, 1995).

Auch hier gelten die gleichen Einschränkungen für allgemeingültige auch auf den Menschen bezogene Aussagen oder Abschätzungen hinsichtlich schädigender Effekte von endokrin aktiven Verbindungen während der Individualentwicklung. Die Kenntnislücken sind mit denen bei den Xenobiotika vergleichbar. Hinzu kommen Wissenslücken in den Bereichen der Zellbiologie, Entwicklungsbiologie und der allgemeinen Differenzierungsvorgänge.

4.6.2 Bestimmung des endokrinen Potentials von Pflanzenextrakten

Nach diesen ersten Versuchen mit Reinsubstanzen sollte geprüft werden, ob und inwieweit dieses biologische, funktionelle Testsystem auch auf Extrakte mit weitgehend unbekanntem Inhaltsstoffen angewendet werden kann.

Hierzu wurden aus frisch gekeimten Sojasprossen (Keimdauer 11 Tage) mit n-Hexan Extrakte präpariert. Diese Rohextrakte wurden zur Trockene eingedampft und anschließend mit Hilfe von Ethanol p.A. anteilig in Zellkulturmedium gelöst. Daneben wurde mit Hilfe einer Festphasenextraktion mit Extrelut[®] und Elution mit n-Hexan, ebenfalls eindampfen bis zur Trockene und lösen von Aliquots mittels Ethanol p.A. in Zellkulturmedium, die Rohextrakte für die Reportergerentests vorbereitet. In den Zellkulturtests ergab sich als Hauptproblem die starke toxische Wirkung verschiedener Sojainhaltsstoffe wie Lecithin und verschiedene Saponine, die als natürliche Detergenzien für die lebenden Zellen nur kurzfristig zu tolerieren sind. Aufgrund des enormen Vorteils des Reportergerentassays, daß die Zellen nur kurz inkubiert werden müssen (weniger als 24 h) konnte bei entsprechend kurzer Inkubationszeit (12 h) und geringer Ethanolkonzentration (< 1 %) und bei vergleichsweise geringer toxischer Wirkung (< 15 % im Sulforhodamin B-Assay unter gleichen Versuchsbedingungen) mit dem Extrakt aus 300 mg getrockneter Sojabohnensprossen ein Reportergerentensignal gemessen werden, das mit dem durch 1 nM Estradiol (physiologisch) induzierten Signal übereinstimmte. Trotz der toxischen Wirkung der Extrakte auf dieses biologische Testsystem erwies sich dieses als prinzipiell tauglich für den Einsatz als, die zur Erkennung neuer Leitstrukturen für Wirkstoffe nach deren Identifizierung dienen kann.



Nr.	Stoff / Stoffgemisch	Konzentration
1	Estradiol	1 pM
2	Estradiol	10 pM
3	Estradiol	100 pM
4	Estradiol	1 nM
5	Estradiol	10 nM
6	Estradiol	100 nM
7	Sojabohnenextrakt	150 mg getrocknete Sojasprossen
8	Sojabohnenextrakt	300 mg getrocknete Sojasprossen
9	Sojabohnenextrakt	450 mg getrocknete Sojasprossen

Abb. 4-16: Reporterinduktion durch Sojabohnensprossenextrakte im Vergleich zur Estradiolwirkung über einen weiten Dosisbereich

Erste orientierende HPLC-Untersuchungen konnten in den Methanolextrakten der gekeimten Sojabohnen die Verbindungen Coumestrol und Genistein eindeutig nachweisen. Vermutlich ist diesen Verbindungen die estrogene Aktivität der Sojaextrakte zuzuschreiben. Daidzein wird in der Probe ebenfalls vermutet, konnte jedoch nicht durch Cochromatografie eindeutig nachgewiesen werden (Grub, 1994).

Diese nur vorläufigen Arbeiten zeigen einen weiteren Nutzen der funktionellen *in vitro* Testsysteme auf. Die Systeme können sehr hilfreich sein, Bioassay geleitete Wirkstoffsuche zu betreiben oder auch komplexe Substanzgemische aufgrund ihrer Aktivität im *in vitro* System zu charakterisieren. Nach einer Grobfractionierung können, die für die Wirkung verantwortlichen Verbindungen, mittels einer Kombination aus instrumenteller und funktioneller Analytik identifiziert werden.

Eine andere mögliche Anwendung liegt in der Umweltanalytik. Hier bieten die funktionellen Testsysteme die Möglichkeit, das endokrine Potential eines unbekannt zusammengesetzten Gemisches zu ermitteln. Eine exakte Bestimmung der jeweiligen Einzelsubstanzen ist für eine Gesamtbewertung eines möglichen Risikos je nach Fragestellung nicht unbedingt notwendig.

4.6.3 Bestimmung der Reporterageninduktion durch Zearalenon

Ergänzend wurden auch das Mykotoxin Zearalenon auf seine estrogen Aktivität untersucht. Die "Mykoestrogene" Zearalenon und die epimeren α - und β -Zearalenole entstehen durch Fusarienkontaminationen von schlecht gelagertem Getreide, Ölsamen und Heu. α -Zearalenol ist in den USA u. a. als Masthilfsmittel (Zeranol[®], Ralgo[®]) zugelassen (Eisenbrand, 1995). Zearalenon zeigt ein eindeutig estrogen agonistisches Verhalten im Transaktivierungsassay.

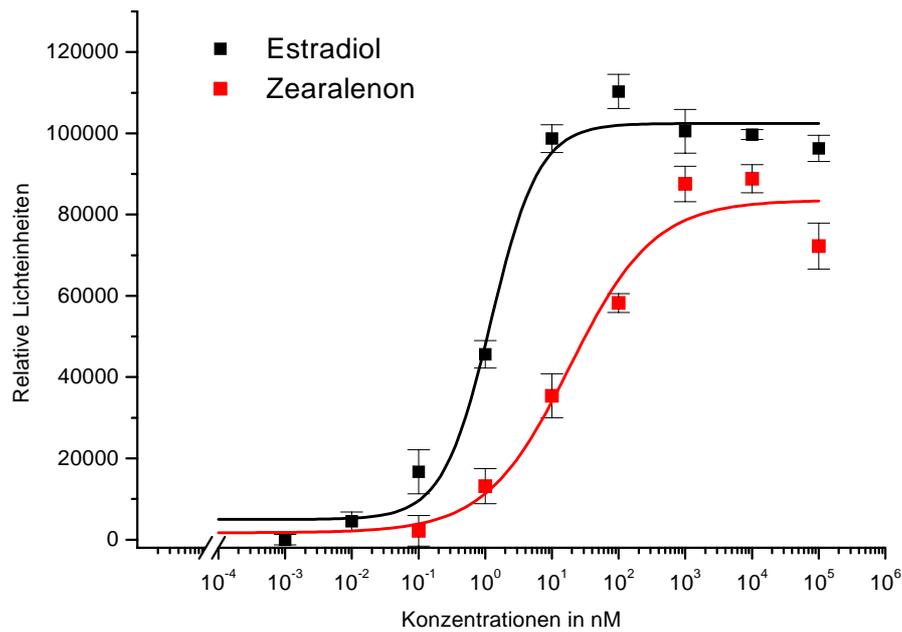


Abb. 4-17: Reportergeninduktion durch Zearalenon im Vergleich zu Estradiol

Zahlenwerte der wesentlichen Kurvenparameter:

Data: Data1_Estradiol1

Model: Logistic

A1	4967.22931	±	4339.29811
A2	102432.94762	±	3305.01892
x0	1.21589	±	0.29917
p	1.2031	±	0.41729

Data: Data1_Zearalenon

Model: Logistic

A1	1685.79694	±	12292.13822
A2	83554.61635	±	7315.08765
x0	18.61397	±	7.56843
p	0.68857	±	0.36298

Daraus ergibt sich eine relative Potenz:

Testverbindung	relative Potenz
Zearalenon	6×10^{-2}

Die Reporterageninduktion durch Zearalenon ist ein anschauliches Beispiel für Verbindungen für die die intrinsische Effektivität bestimmbar ist.

Der Wert ergibt sich aus dem Quotienten intrinsische Effektivität (A2; Testverbindung) / intrinsische Effektivität (A2; Estradiol) x 100.

Intrinsische Effektivität von Zearalenon: 81,6 %

Die relative intrinsische Effektivität kann auch der relativen Einteilung verschiedener endokriner Disruptoren dienen, sofern für diese experimentell eine Plateaufindung möglich ist.

Da Zearalenonkontaminationen teilweise hohe Konzentrationen erreichen können scheint dies ein möglicherweise nicht zu unterschätzender Kontaminationspfad für die Aufnahme von estrogen aktiven Verbindungen zu sein. Bislang ist keine Arbeit publiziert, die einen Zusammenhang zwischen hoher Zearalenonaufnahme und eine Störung der hormonellen Homöostase beim Menschen beschreibt. Bei landwirtschaftlichen Nutztieren wird vereinzelt von Fertilitätsstörungen vermutlich durch Futtermittel, die mit hohen Zearalenonmengen kontaminiert sind, berichtet (Khodabandehlou, 1997).

4.7 Alkylphenolanaloga

Alkylphenolpolyethoxylate (APEOs), die seit den 40er Jahren in Gebrauch sind, werden jährlich zu ca. 300 000 t produziert. Sie erfahren eine sehr breite Anwendung, nicht nur als Detergentien, sondern auch als Zusatzstoff in vielen

Formulierungen wie Farben, Pestiziden, Herbiziden und auch Kunststoffen etc. Am häufigsten werden APEOs mit 8 - 12 Ethoxylatgruppen eingesetzt.

Nonylphenol ist mit 80 % der weltweiten Produktion das meist produzierte APEO, die restlichen 20 % entfallen zum größten Teil auf Octylphenol. Nach Schätzungen sollen ca. 60 % der APEOs im aquatischen System wiederzufinden sein (Naylor, 1992). Den größten Eintragspfad stellen Kläranlagen dar, in denen APEOs zu relativ stabilen Metaboliten abgebaut werden. Einige dieser Metabolite sind hydrophob (Octyl-, Nonylphenol) und neigen daher dazu, in Klärschlämmen und Gewässersedimenten zu akkumulieren. Bis heute werden Alkylphenoethoxylate Klärschlämmen zugesetzt, um diese hydrophiler zu machen. Diese Zugabe soll einen beschleunigenden Einfluß auf Zersetzungsprozesse haben (FAZ, 1998).

Andere Metabolite, vornehmlich kurzkettige APEOs und Carbonsäurederivate (APECs) sind wiederum besser wasserlöslich. Für diese Stoffgruppe liegen bislang in Deutschland nur wenige Messungen im aquatischen System vor (Zellner und Kalbfus, 1997). In anderen europäischen Ländern wurden in Gewässerproben zum Teil APEO-Konzentrationen nachgewiesen, die zu Veränderungen der Geschlechtsmerkmale bei Forellen führen (UBA, 1997). Interessant sind auch einzelne Berichte, daß diese APEOs und APECs bereits in Trinkwasser nachgewiesen wurden (Clark, 1992).

Die estrogenen Potenz von Alkylphenolen konnte von Soto, 1991, und von Jobling, 1993, erstmals nachgewiesen werden.

Dabei zeigten Kunststoffadditive und Detergentien, die jeweils auf Alkylphenolen basierten, *in vitro* (E-Screen- und Transaktivierungsassay), aber auch *in vivo* (Vitellogenininduktion in männlichen Forellen in Gewässern) deutliche estrogenagonistische Effekte. Da diese Stoffe einen gemischt lipophilen / hydrophilen Charakter aufweisen unterliegen sie einem komplexen Metabolismus und sind auch in ihrem Umweltverhalten nicht einfach einzuordnen.

Aufgrund der Veränderung hin zu stärker lipophilen Verbindungen sowohl *in vivo* als auch in Ökosystemen kann eine Depotbildung im Körperfett vermutet und in der Umwelt allgemein in Speichermedien z. B. Flußsedimente beobachtet werden. Durch den körpereigenen Metabolismus *in vivo* oder durch mikrobiologische oder abiotische Abbauprozesse in Ökosystemen kann es auf niedrigem Niveau zu einer ständigen Freisetzung der Ausgangsverbindungen kommen. Somit ist eine

bestimmte Hintergrundbelastung von Mensch und Tier zumindest denkbar und in Ökosystemen auch nachweisbar (Nimrod, 1996).

Neben einer Vielzahl ökotoxikologischer Daten liegen zur Zeit wenige Daten zur Expositionssituation des Menschen vor. Eine Migrationsstudie von Gilbert, 1986, berichtet von einem Übergang von 0,1 mg/kg Nonylphenol aus einer PVC-Flasche in Lebensmittel und Lebensmittelsimulantien. Unter Voraussetzung der Aufnahme von einem Kilo / Liter des Nahrungsmittels aus einer derartigen PVC-Flasche durch eine 60 kg (70 kg) schwere Person bei 100 %-iger Resorption und theoretisch homogener Verteilung im Organismus ergibt sich ein Gehalt von 1,6 ng / kg KG (1,4 ng / kg KG). Boockfor et al., 1997, findet bei einer Gabe von 80 mg/Ratte/d über einen Monat eine erhebliche Reduktion der Spermienzahlen. Zwischen beiden Werten liegen 7 Größenordnungen wobei festzuhalten bleibt, daß in der Tierstudie kein NOAEL-Wert bestimmt wurde und auch die Expositionssituation des Menschen nur unzureichend beschrieben wurde.

Diese Verhältnisse stellen rein hypothetische Annahmen dar und bieten nur ein äußerst grobes Denkmodell, um eventuelle Risiken abschätzen zu können. Es werden keine detaillierteren Parameter wie Resorption, Verteilung oder Elimination berücksichtigt. Wie bereits genannt, weisen gerade Alkylphenoethoxylate und deren Metabolite viele Parameter auf, die dafür sprechen, daß diese Verbindungen möglicherweise spezifischen Verteilungs- und Speichermechanismen unterworfen sind, welche bei selektiver Betrachtung von langsam perfundierten und gleichzeitig endokrin kontrollierten Geweben (z. B. Brustgewebe) den Abstand zwischen Konzentration im Gewebe und potentieller Wirkkonzentration (auch aus *in vitro* Daten) schrumpfen lassen könnte. Verbesserte Abschätzungsmöglichkeiten liesen sich durch vertiefende pharmakokinetische Betrachtungen erhalten. Einen Ansatz stellen möglicherweise spezifische "physiologically based pharmacokinetic models" dar, die auch eine verbesserte Extrapolation von Tierdaten auf den Menschen erlauben könnten. Bei genauerer Kenntnis der Organspiegel könnten die *in vitro* Systeme auch ein verlässlicheres Bild der funktionellen Aktivität *in vivo* liefern.

Aus der breiten Anwendung der Stoffe und dem eventuell ungünstigen human- und ökotoxikologischen Verhalten leiten sich wiederum Befürchtungen ab, daß solche Alkylphenole die Gesundheit von Mensch und Tier beeinflussen können.

Da in vielen pflanzlichen Lebensmitteln sehr verbreitet StrukturanaLOGA von solchen Alkylphenolen vorkommen ergaben sich Ansatzpunkte für eine weitergehende Prüfung verschiedenster Reinsubstanzen. Zusätzlich wurden jedoch auch zum Zwecke der mechanistischen Klärung möglicher relevanter Strukturinkremente die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt.

Mechanistisch besonders interessant ist der simple chemische Aufbau dieser Verbindungen. Viele sekundäre Pflanzeninhaltsstoffe weisen teilweise eine ähnliche Struktur auf. Neben Aromastoffen verläuft das Substanzspektrum u. a. bis hin zu biogenen Aminen, die eine hohe Analogie zu den unten aufgeführten Verbindungen zeigen.

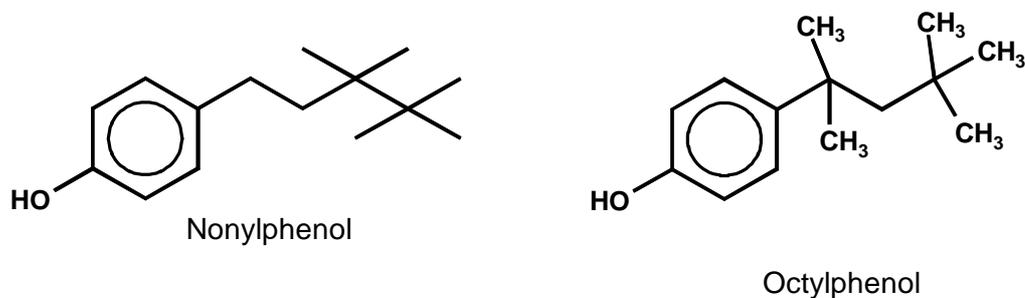


Abb. 4-18: Strukturen von Nonylphenol und Octylphenol

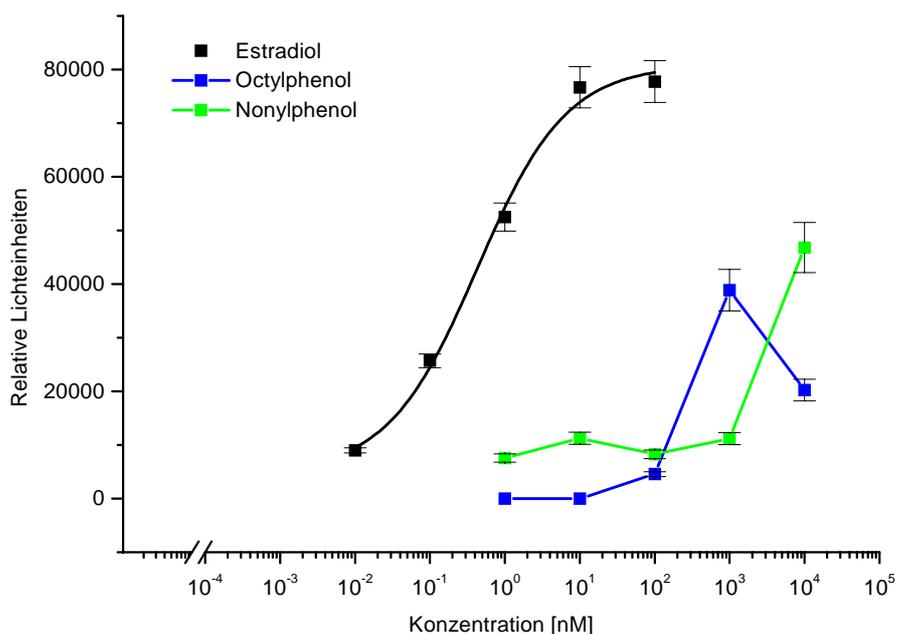


Abb. 4-19: Reportergeninduktion in MCF-7 Zellen durch Nonyl- und Octylphenol

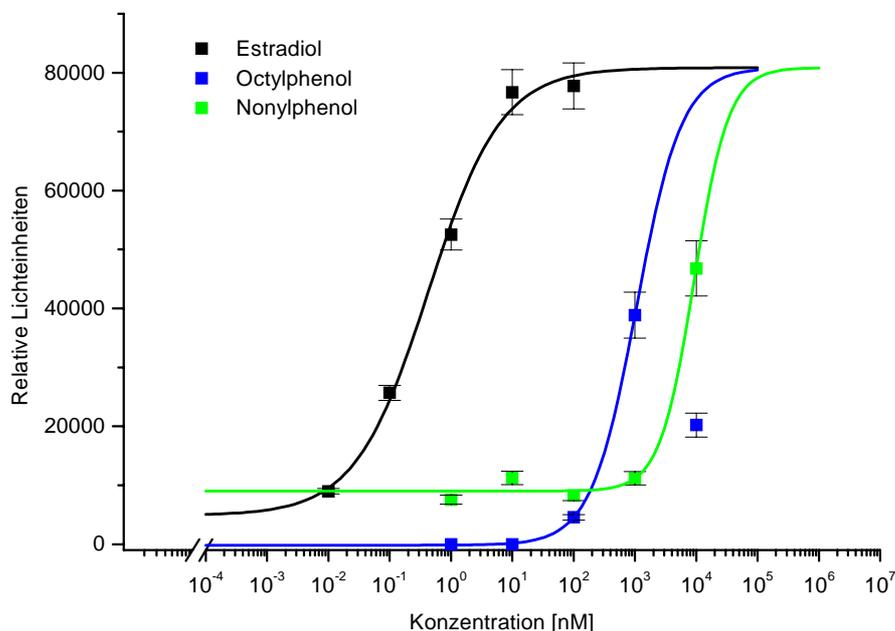


Abb. 4-20: Logistisch berechnete Kurvenverläufe der oben dargestellten Meßwerte unter Vorgabe eines vollständigen Agonismus beider Testverbindungen

Daraus ergibt sich eine relative Potenz:

Testverbindung	relative Potenz
Octylphenol	4×10^{-4}
Nonylphenol	$4,5 \times 10^{-5}$

Eine intrinsische Effektivität ist nicht bestimmbar.

Wie in dem oben dargestellten Graphen ersichtlich zeigen Nonyl- und Octylphenol im Transaktivierungsassay erst bei relativ hohen Konzentrationen einen estrogenen Effekt, der jedoch deutlich zu erkennen ist. Die festgestellten Wirkspiegel der einzelnen Verbindungen liegen weitaus höher als ermittelbare Blutplasmaspiegel in Mensch und Tier.

Dieser Abgleich kann für ein wissenschaftlich korrektes *risk assessment* jedoch nur bedingt genutzt werden, da gerade für p.-tert.-Octylphenol gezeigt werden konnte, daß diese Verbindung *in vivo* bereits bei geringeren Konzentrationen schädigende endokrine Effekte hervorrufen kann wie das von den *in vitro* Ergebnissen zu erwarten gewesen wäre. Dieser höhere *in vivo* Effekt kann auf verschiedenen Ursachen basieren. Mit einem Einfluß kann der oben erwähnte Metabolismus haben, aber auch spezifische Wechselwirkungen mit Blutplasma-Proteinen (z. B. SHBG, α -Fetoprotein, Albumin, usw.) können das *in vivo* Verhalten von solchen Verbindungen erheblich beeinträchtigen.

Bereits aus den durchgeführten *in vitro* Assays ergeben sich Hinweise, daß diese Verbindungen auch mit den Serumproteinen des mit Aktivkohle behandelten fötalen Kälberserum wechselwirken. Versuche ohne Kälberserum, also in serumfreien Medium, waren durch eine hohe allgemeintoxische Wirkung von Octyl- und Nonylphenol gekennzeichnet. Unter solchen Versuchsbedingungen war aufgrund sehr starker allgemeintoxischer Wirkungen kein Reporter-Signal detektierbar.

Es ist somit durchaus denkbar, daß die Serumproteine eine Pufferfunktion haben und *in vivo* vielleicht sogar spezifische Transportfunktionen in endokrinabhängige Gewebe erfüllen. Durch derartige Mechanismen kann es in bestimmten Kompartimenten möglicherweise zu erheblich höheren Gewebespiegeln kommen als die Blutplasmaspiegel es vermuten lassen. Diese Hypothese kann nur durch gezielte *in vivo* Untersuchungen geklärt werden. Daneben ist auch vorstellbar, daß *in vitro* Bindungsstudien an Blutplasma-Proteine einen Beitrag zu dieser Fragestellung liefern können (vgl. SHBG-Diskussion).

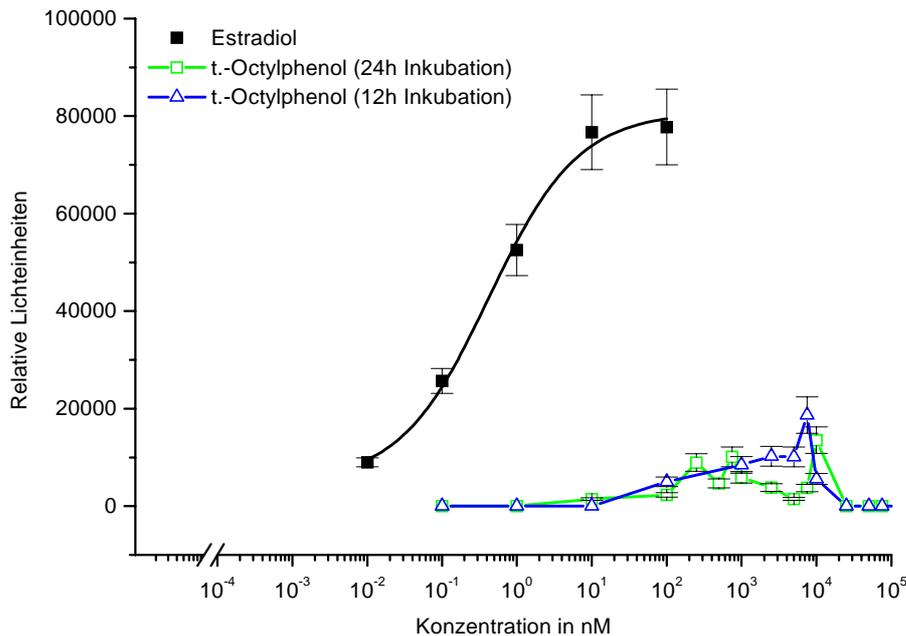


Abb. 4-21: Reporterageninduktion in MCF-7 Zellen in serumfreiem Medium

4.8 Verbindungen mit Strukturhomologien zu Alkylphenolen

Durch Strukturvergleiche von Nonyl- und Octylphenol mit verschiedenen ähnlichen Verbindungen ergaben sich bislang viele Hinweise auf weitere *in vitro* estrogen aktive Verbindungen. Diese Verbindungen können sowohl natürlichen als auch anthropogenen Ursprungs sein. Im folgenden sind einige Beispiele aufgeführt. Hauptzweck der bisherigen Arbeiten war jedoch die Erarbeitung grundlegender Gesetzmäßigkeiten innerhalb der ausschließlich über ihre Funktion definierten Gruppe der endokrinen Disruptoren.

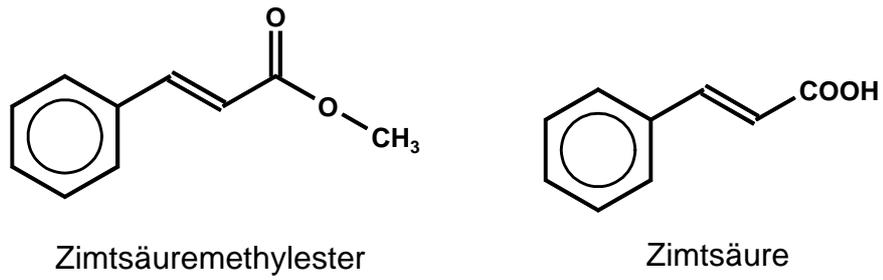


Abb. 4-22: Struktur von Zimtsäure und Zimtsäuremethylester

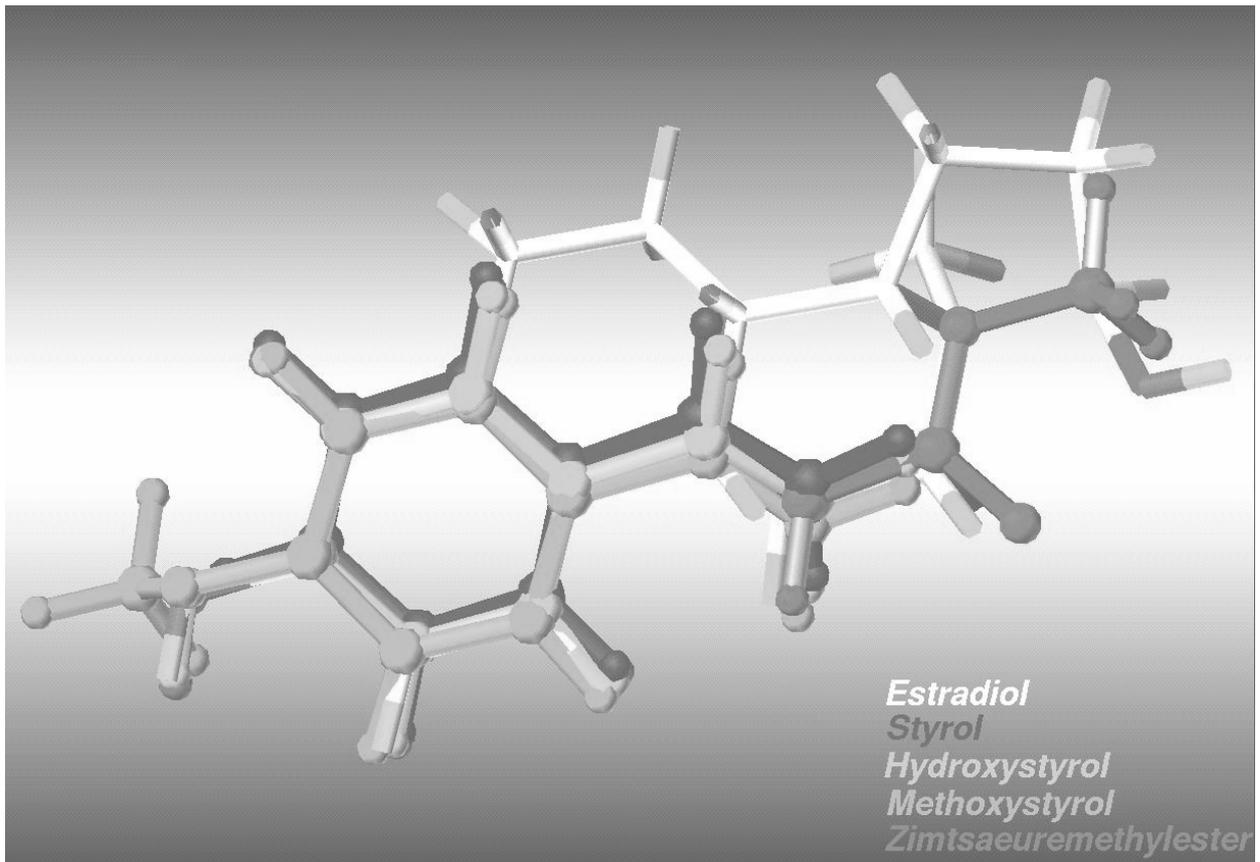


Abb. 4-23: Energieminimierte und "gefittete" Strukturen von Estradiol, Zimtsäuremethylester, Methoxystyrol, Hydroxystyrol und Styrol

Es ist wichtig, daß alle potentiellen Kandidaten einen vergleichbaren Rauminhalt in Anspruch nehmen. Neben der Größe spielen auch die elektrostatischen Verhältnisse innerhalb der Verbindungen eine wesentliche Rolle, auch diese kann mittels des molecular modeling Programms Sybyl berechnet und dargestellt werden. Als erstes Raster wurden jedoch die Größenverhältnisse der einzelnen Kandidaten bestimmt. Bei linearen Molekülen des Alkylphenoltyps ist besonders die absolute Länge interessant. Daneben können durch Rotationen der Einfachbindungen verschiedene Raumansprüche der Moleküle simuliert dargestellt und vermessen werden.

Zuerst wurde die absolute Länge vom 17 β -Estradiol von dem Sauerstoffatom in Position 3 bis zum Sauerstoffatom in Position 17 bestimmt. Diese Atome wurden gewählt, da davon ausgegangen werden kann, daß diese beiden Sauerstoffatome über Wasserstoffbrückenbindungen mit den für die ligand-induzierten Aktivierung relevanten Aminosäuren im Estrogenrezeptor interagieren (Brrzozowski, 1997). Die Distanz von 3 O - 17 O in Estradiol beträgt nach Kraftfeldminimierung in der Gasphase 10,9 Å.

Bei detaillierten Betrachtungen müssen zusätzlich die elektrostatischen Verhältnisse innerhalb der Moleküle berücksichtigt werden. Auch hier sollte sich bei Verbindungen, die analog zu Position 17 in Estradiol ebenfalls ein Sauerstoffatom oder ähnliches Heteroatom aufweisen ein Aktivitätsmaximum bestimmen lassen.

Möglicherweise wurde bereits eine solche Verbindung identifiziert. Es handelt sich um Zimtsäuremethylester, eine Verbindung, die die oben beschriebenen Strukturanforderungen zum größten Teil erfüllt. Tatsächlich induziert Zimtsäuremethylester im Transaktivierungsassay das Reporteragen bei einer 100 nM Konzentration genauso stark wie dies für Estradiol ab einer Konzentration von 10 nM zu beobachten ist.

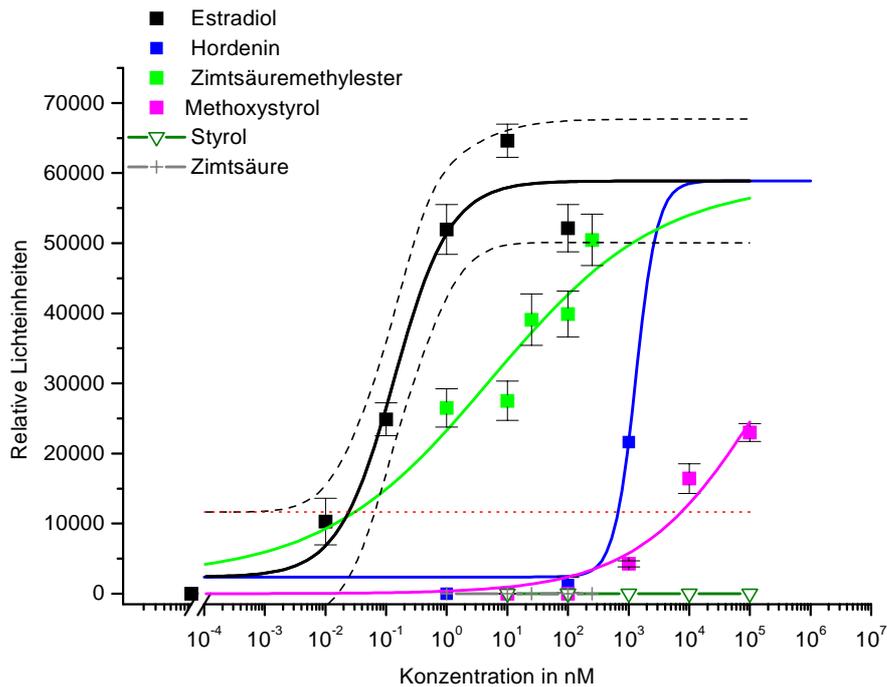


Abb. 4-24: Reporterageninduktion (berechnet) hervorgerufen durch Estradiol, Zimtsäuremethylester, Zimtsäure, Hordenin, Methoxystyrol und Styrol

Daraus ergibt sich die relative Potenz:

Testverbindung	Konzentration
Hordenin	$9,3 \times 10^{-5}$
Zimtsäuremethylester	8×10^{-2}
Zimtsäure	-
Styrol	-
Methoxystyrol	$5,7 \times 10^{-7}$

Zimtsäure und Zimtsäuremethylester weisen ähnlich den stilbenoiden Verbindungen eine Doppelbindung auf. Somit ergeben sich auch mit den estrogen aktiven Stilbenen Strukturhomologien (s. u.).

4.9 Styrol und Methoxystyrol

Eine weitere strukturhomologe Verbindung zu den Zimtsäurederivaten und auch zu den Stilbenderivaten stellt Styrol dar. Das Styrolmonomer ist der Hauptbestandteil von Polystyrolprodukten, die die unterschiedlichsten Anwendungen als Verpackungsmittel und sonstigen Bedarfsgegenstände erfahren.



Abb. 4-25: Struktur von Styrol und Methoxystyrol

Da vermutlich aufgrund der kurzen Inkubationszeit (24 h) ein Metabolismus zu vernachlässigen ist kann für Stoffe, die nach momentanem Kenntnisstand erst als Metabolite estrogen aktiv sind, die Prüfung der Ausgangsverbindung negativ verlaufen. Dieses *in vitro* Ergebnis würde dann ein falsch-negatives Ergebnis vortäuschen. Deshalb wurde versucht, in solchen Fällen möglichst auch potentielle Metabolite der Ausgangsverbindungen mit zu untersuchen.

Ein solcher Fall liegt konkret bei Styrol vor. Styrol zeigt im Transaktivierungstest unter den gewählten Bedingungen keine feststellbare Reporterageninduktion. Methoxystyrol (Hydroxystyrol, die potentiell wirksamste Prüfverbindung konnte nicht käuflich erworben werden) zeigt bereits im Transaktivierungsassay nach 24-stündiger Inkubationszeit eine deutliche estrogen Aktivität.

Im Gegensatz dazu induzieren beide Verbindungen in dem unspezifischeren, langandauernden Wachstumsassay in der gleichen Zelllinie (Inkubationsdauer: 5 Tage) deutliche Wachstumsstimuli.

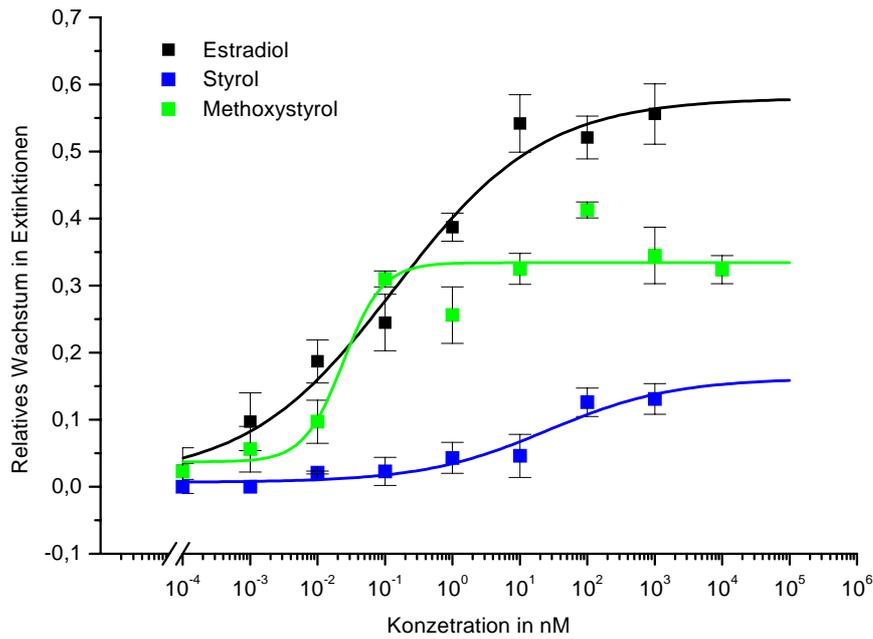
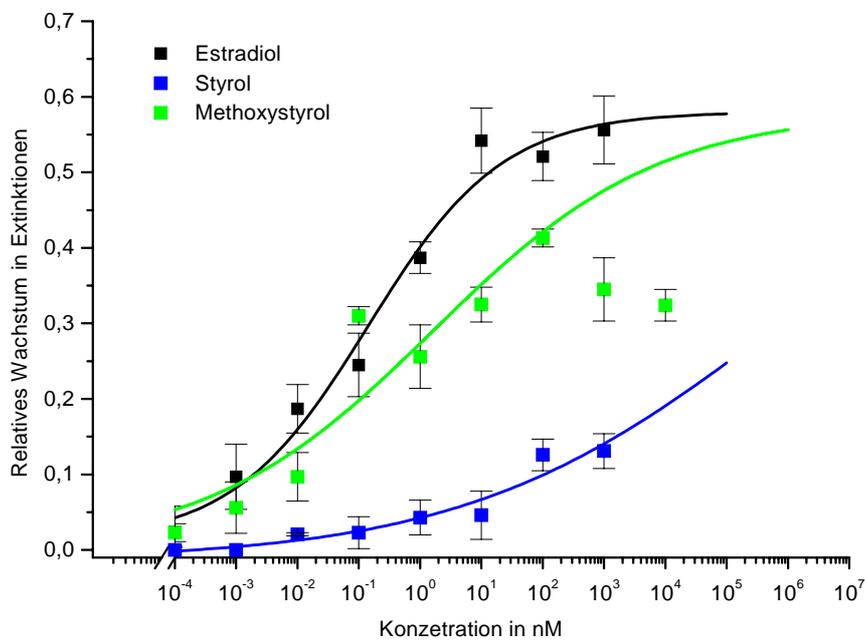


Abb. 4-26a: Wachstumsinduktion durch Styrol und Methoxystyrol mittels logistischer Funktion (vier unabhängige Variablen)

Abb. 4-26 b: Wachstumsinduktion durch Styrol und Methoxystyrol in MCF-7-Zellen



Im Falle der oben dargestellten Ergebnisse wird ersichtlich welche Konsequenzen aus unterschiedlichen Berechnungsarten resultieren.

Abb. 4-26 a wurde zwar auch mit logistischer Funktion berechnet, jedoch bei vier voneinander unabhängigen Variablen (A_1 ; A_2 ; X_0 ; p) während in Abb. 4-26 b die Werte A_1 und A_2 durch Estradiol definiert wurden. Beide Verbindungen wurden als vollständige Agonisten definiert. Im Falle von Methoxystyrol wurde in Abb. 4-26 b die Kurve nur auf Basis der Y-Werte der Konzentrationen 10^{-4} - 10^2 nM berechnet. Die zu beobachtende Absenkung der beiden y-Werte der beiden höchsten Konzentrationen wird als Ergebnis eines dem induzierenden Effekt der Verbindung entgegenlaufenden Mechanismus angesehen. Dies können sowohl zytotoxische als auch hemmende Effekte am Rezeptor sein.

4.9.1 Vergleich der meßbaren estrogen agonistischen Aktivität im Reporteragenassay und dem Wachstumsassay

Am Beispiel von Styrol und Methoxystyrol soll der Einfluß des Testsystems auf die relative Einstufung der Testverbindungen aufgezeigt werden. Die testspezifischen Unterschiede der beobachteten Wirkung können bei mehreren Verbindungen festgestellt werden.

Besonders deutlich waren die Unterschiede im Fall von Styrol (s. o.) und von trans-Stilben (s.u.), also jeweils bei Verbindungen, deren potentielle Metabolite eine phenolische Gruppe aufweisen. Ein phenolisches Strukturinkrement scheint das wesentliche Charakteristikum potentieller Estrogenrezeptorliganden zu sein.

Diese Beispiele verdeutlichen, weshalb versucht wurde, die meisten Verbindungen sowohl im Reporteragenassay als auch im Wachstumsassay zu prüfen.

Für besondere Einzelfälle ist auch denkbar, den Transaktivierungsassay ebenfalls über mehrere Tage durchzuführen. Dies verlangt jedoch eine Abweichung von dem einmal gewählten Schema und somit einen erheblichen Mehraufwand.

Zur effizienten und möglichst sensitiven Prüfung der estrogenen Aktivität von potentiellen endokrinen Disruptoren wurden serumfreie Inkubationsbedingungen im Transaktivierungsassay gewählt. Dies beschränkt jedoch die Inkubationszeit auf ca. 24 h. Eine weitere Einschränkung ergab sich bei den Alkylphenolen, die durch ihre starken allgemein toxischen Effekte eine serumfreie Testdurchführung unmöglich machten. Diese Veränderungen am einmal gewählten Vorgehen muß bei

diesen abweichend durchgeführten Tests berücksichtigt werden. Außerdem lassen sich Ergebnisse, die nach unterschiedlichen Testschemata erzielt wurden nicht mehr direkt vergleichen.

Styrol bzw. Methoxystyrol wurde nicht nur aufgrund der ersichtlichen Strukturhomologie zu den Alkylphenolen oder Stilbenen für die experimentelle Prüfung herangezogen. Ein weiteres Indiz für eine mögliche estrogenen Aktivität von Styrol oder einem relevanten Metaboliten ergibt sich aus Tierversuchsdaten zur Kanzerogenität von Styrol in weiblichen Ratten. Nach Koss (1994) liegen Daten vor, die einen signifikanten Anstieg der Brustkrebsinzidenz bei Ratten in Kanzerogenitätsstudien zu Styrol nach inhalativer und oraler Gabe aufzeigen.

Mechanistisch ist vorstellbar, daß durch 7,8-Styrolepoxid, Styrol oder seine Metabolite nach erfolgter Initiation auch tumorprovierende Effekte durch eine estrogen agonistische Aktivität dieser Substanzen ausgelöst werden können. Dies könnte eine mögliche Erklärung für die relativ selektive Ausbildung von Brustkrebstumoren in Ratten sein.

4.10 Weitere Analoga zu Alkylphenolen

Viele pflanzliche und tierische Nahrungsmittel enthalten biogene Amine. Hordenin, ein Folgeprodukt von Tyramin, das aus der Aminosäure Tyrosin gebildet wird und in verschiedenen Lebensmitteln vorkommt wurde als *in vitro* estrogen aktiv identifiziert. Tyramin steht in naher Verwandtschaft zu Catecholaminen. Da jedoch die zweite Hydroxygruppe in Position 3 am Phenylring fehlt, stellt Tyramin nur eine Vorstufe von Catecholaminen dar.

Da für die estrogen Wirkung nach bisheriger Kenntnis eine einfache Hydroxysubstitution des aromatischen Rings genügt und auch der Alkylrest unterschiedlich lang sein darf, erschien eine Prüfung in den *in vitro* Systemen sinnvoll. Begleitend wurden molecular modeling Berechnungen und Strukturabgleiche mit bereits etablierten estrogen aktiven Verbindungen durchgeführt.

Im allgemeinen zeigen Steroidhormonrezeptorliganden bereits in nanomolaren Konzentrationen einen Effekt, der über den Rezeptor vermittelt wird, während die entsprechenden steroidbindenden und metabolisierenden Enzyme erst durch Konzentrationen im mikromolaren Bereich zu beeinflussen sind. *In vivo* besteht natürlich auch die Möglichkeit einer schnellen Metabolisierung (vielleicht zu Catecholaminen) oder Eliminierung, so daß effektive Wirkspiegel *in vivo* nicht erreicht werden können.

Somit ergibt sich prinzipiell eine Vielzahl verschiedener alkylphenolischer Verbindungen. Die Strukturanforderungen an den Alkylrest müssen durch weitere experimentelle Untersuchungen und theoretische Berechnungen näher ermittelt werden. Hier sollten verschiedene Verbindungen in den funktionellen Testsystemen geprüft und deren Struktureigenschaften begleitend durch molecular modeling Betrachtungen beschrieben werden.

Bis heute werden verschiedene Verbindungen als estrogen aktiv beschrieben, die aber bisher nur wenig systematisch oder teilweise kaum untersucht sind. In der Literatur werden beispielsweise immer wieder verschiedene Pestizide als estrogen aktiv erwähnt. Eine systematische Untersuchung scheint bislang jedoch noch nicht durchgeführt worden zu sein. Hier könnten Kenntnisse über Substitutionsmuster einer noch zu bestimmenden Grundeinheit oder Aussagen über essentielle

Heteroatome oder über die Länge von Alkylresten einen wichtigen Beitrag zum schnellen Erkennen und schnellerer, gezielterer Prüfung leisten.

Während der Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit hat sich auch gezeigt, daß einige Verbindungen, die auf den ersten Blick als endokrine Disruptoren in Frage kommen könnten nur eine sehr geringe Aktivität in den eingesetzten in vitro Systemen gezeigt haben. Wie durch Untersuchungen weiterer potentieller estrogen aktiver Verbindungen noch zu zeigen sein wird, können durch Ergebnisse aus der vorliegenden Arbeit einige Teilstrukturen auch als nicht estrogen aktiv bzw. nur sehr schwach estrogen aktiv identifiziert werden.

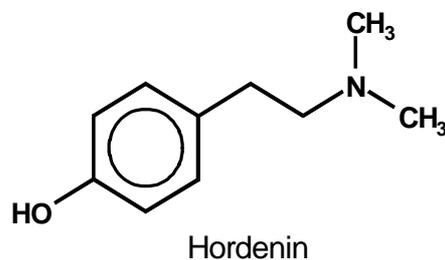


Abb. 4-27: Struktur von Hordenin

4.11 Stilbene

4.11.1 Prüfung von Stilbenderivaten natürlichen Ursprungs

Diethylstilbestrol (DES) wurde sehr früh als potentes Estrogen identifiziert und als Therapeutikum eingesetzt. Ab den 40er Jahren wurde DES in den USA bei Schwangeren zur Abortprophylaxe, im folgenden auch als postkoitales Kontrazeptivum verwandt. Heute wird DES nur noch in der Therapie des hormonabhängigen Prostatakarzinoms eingesetzt. Aufgrund seiner nachgewiesenen transplazentaren Karzinogenese und der aneuploiden Aktivität verlor DES seine

Bedeutung für therapeutische Zwecke. Auch als Masthilfsmittel sind Stilbene und deren Ester weltweit verboten.

In jüngster Zeit rückten natürliche partielle Strukturanaloga von DES, die in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs verbreitet vorkommen, als interessante Wirkkomponenten mit möglicherweise positiven gesundheitlichen Effekten verstärkt in das wissenschaftliche und öffentliche Interesse.

Resveratrol, ein Bestandteil roter Weinbeeren, wird in verschiedenen epidemiologischen Arbeiten mit dem sogenannten "french paradoxon" in Zusammenhang gebracht. Danach soll der maßvolle Konsum von Rotwein das relative Risiko für die Entwicklung einer koronaren Herzerkrankung gegenüber vergleichbaren Bevölkerungsgruppen signifikant senken (Frankel, 1993).

Vom "french paradoxon" spricht man, da bei Kohortenstudien in Südfrankreich Gruppen, die eine vergleichbare tägliche Fettaufnahme wie US-Amerikaner zeigen, im Vergleich zu diesen jedoch ein deutlich geringeres Risiko haben, eine koronare Herzerkrankung zu entwickeln. Beim Vergleich der Ernährungsgewohnheiten der beiden Kohorten ergab sich vor allem ein Unterschied in der täglichen Aufnahme von Rotwein.

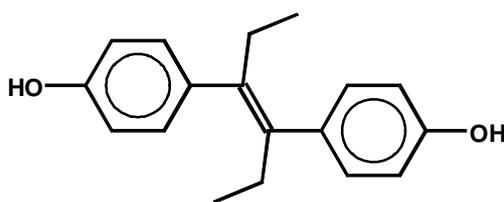
Da diese Beobachtung nicht alleine mit den vasodilatatorischen Effekten von Ethanol erklärt werden konnte, wurde versucht, die Wirkung einzelner Inhaltsstoffe des Rotweins auf mögliche protektive Eigenschaften für das Herz-Kreislaufsystem zu untersuchen. Da Resveratrol in relativ großen Mengen in der Beerenhaut von roten Weintrauben und auch in Rotwein vorkommt wurde es hinsichtlich seiner möglichen positiven Gesundheitseffekte näher geprüft.

Neben den positiven Einflüssen von Resveratrol auf das Gefäßsystem ergaben auch Untersuchungen von Jang et al., 1997, daß Resveratrol einen wirkungsvollen Hemmstoff der Cyclooxygenase II darstellt. Die gleiche Gruppe konnte im DMBA-induzierten Mäusehautmodell eine anti-kanzerogene Aktivität von Resveratrol nachweisen. Die Cyclooxygenase II stellt in diesem Tiermodell ein wichtiges Schlüsselenzym für die Tumorpromotion in der Mäusehaut dar. Inwieweit die Stilbenstruktur oder der funktionelle estrogene Effekt eine Rolle bei diesen Wirkungen von Resveratrol spielt, ist bislang ungeklärt. Hier sind zukünftig möglicherweise weitere interessante Ergebnisse zu erwarten.

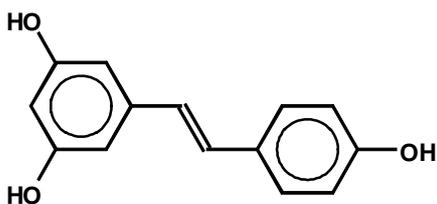
Daß Resveratrol einen estrogenen Effekt in humanen Mammakarzinomzellen hervorruft konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden. Die Resultate von Gehm et al., 1997, bestätigen die ermittelten Ergebnisse. In systematisch durchgeführten Struktur-Wirkungsbeziehungen verschiedener Stilbenderivate konnten in der vorliegenden Arbeit erste Hinweise auf mögliche essentielle Strukturmerkmale der einzelnen Vertreter dieser Klasse ermittelt werden. So spielt die Anzahl und die Position der Hydroxygruppen bei der Induktion des estrogenen Effektes im Wachstumsassay (E-Screen) und im Transaktivierungsassay eine erhebliche Rolle.

Die oben genannten Wirkungen von Resveratrol auf die menschliche Gesundheit lassen diese Verbindungsklasse als interessante potentielle chemopräventive Agenzien erscheinen. Durch die vorgestellten agonistischen estrogenen Effekte wird der therapeutische Nutzen der Verbindung jedoch wesentlich eingeschränkt.

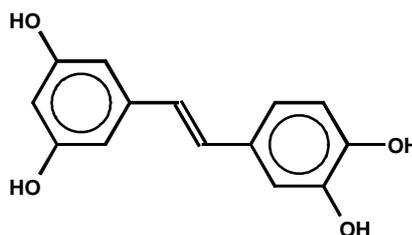
Besonders interessant erscheinen deshalb Verbindungen wie Piceatannol, das nur einen äußerst schwachen estrogenen Effekt *in vitro* zeigt, aber möglicherweise die protektiven Eigenschaften des strukturanalogen Resveratrols zumindest teilweise aufweisen kann. Erste Hinweise für einen Einfluß von Piceatannol auf die Vasodilatation von koronaren Herzkranzgefäßen ergeben sich durch *ex vivo* Untersuchungen von Muller et al. 1996. Piceatannol wurde von Thakkar, 1993, als Hemmstoff der SYK- Proteintyrosinkinase identifiziert, der antileukämische Aktivität zeigt.



Diethylstilbestrol



Resveratrol



Piceatannol

Abb. 4-28: Struktur von Diethylstilbestrol, Resveratrol und Piceatannol

Der maximal durch Resveratrol induzierte Stimulus im Transaktivierungsassay wird bei einer Konzentration von 0,1 μM erzielt. Mit Piceatannol wird eine noch schwächere Reporterinduktion erst mit einer Wirkkonzentration von 10 μM erreicht. Da erst bei diesem sehr hohen Wert eine beobachtbare Reporterinduktion im *in vitro* System erfolgt, ist die potentielle estrogenische Aktivität *in vivo* als schwach ausgeprägt zu erwarten.

Dies muß natürlich im Tierversuch bestätigt werden, da im gesamten Organismus weitere Einflußfaktoren eine möglicherweise nicht unerhebliche Rolle spielen können. So ist aufgrund der Catecholstruktur, die Piceatannol aufweist, prinzipiell eine Wechselwirkung mit der Catechol-O-methyltransferase (COMT) vorstellbar. Dies könnte einen zusätzlichen indirekten Einfluß auf die estrogenische Homöostase haben, der in den eingesetzten *in vitro* Systemen nicht erfaßt werden könnte. Dieses Beispiel verdeutlicht eine wesentliche Einschränkung der zur Verfügung stehenden Testmethode gegenüber dem Tierversuch.

Vorteilhaft ist dagegen, daß besonders das Transaktivierungstestsystem nur die Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor und die anschließende Induktion der Genaktivierung, hier speziell des Reportergens, anzeigt. Somit lassen sich spezifische Fragestellungen zum Verhalten einzelner Verbindungen gezielt aufklären. Demgegenüber steht die Einschränkung, daß mit den *in vitro* Systemen nicht das gesamte mögliche estrogenische Potential einer Verbindung erfaßbar ist.

Trotzdem zeigt sich bereits an diesem Beispiel welchen möglichen prädiktiven Wert die eingesetzten *in vitro* Systeme haben können. In weiteren detaillierten Arbeiten, die auch tiefere Struktur-Wirkungsüberlegungen einschließen müssen, können möglicherweise bereits *in vitro* interessante Wirkstoffe ermittelt und schon früh hinsichtlich potentieller Nebenwirkungen klassifiziert werden. Durch strukturelle Vergleiche innerhalb der Gruppe der Stilbenverbindungen lassen sich durch die Prüfung weiterer Strukturanaloga sicherlich verfeinerte Struktur-Wirkungsbeziehungen aufstellen, die vielleicht zukünftig eine Voraussage eventueller Wirkungen ausschließlich aufgrund der Struktureigenschaften noch nicht geprüfter Verbindungen ermöglicht.

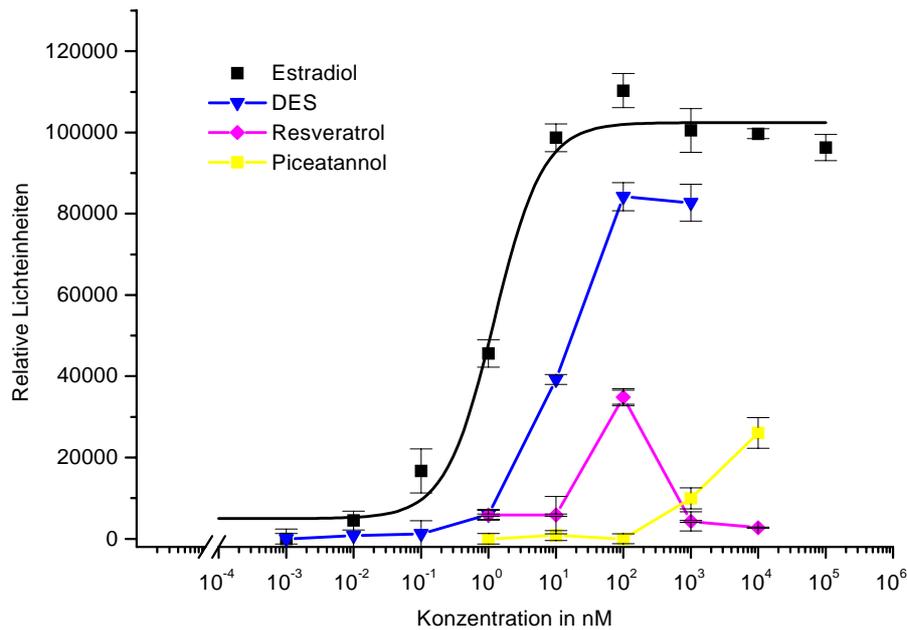


Abb. 4-29: Reportergeninduktion durch Resveratrol und Piceatannol im Vergleich zu DES und Estradiol in MCF-7-Luciferase Zellen

4.11.2 Weitere Verbindungen mit Stilbenteilstrukturen

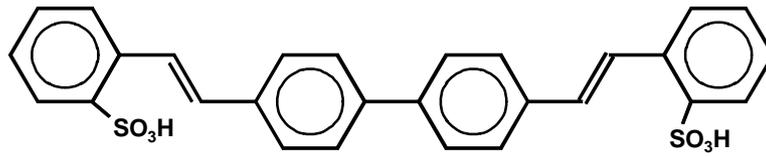
Einen weiteren, für die gesamte Fragestellung sehr interessanten Ansatzpunkt stellen Verbindungen dar, die eine Stilbenkomponente als Teilstruktur beinhalten. Solche Verbindungen werden als optische Aufheller u. a. in Waschmitteln, in der Papierindustrie etc. breit eingesetzt.

Neben den möglichen ökotoxikologischen Folgen, die aus dem Eintrag solcher Waschmittel- und Papierzusatzstoffe in Abwässern resultieren können, liegen verschiedene arbeitsmedizinische Berichte über potentielle schädigende Wirkungen von optischen Aufhellern auf die Beschäftigten in Herstellerfirmen vor. So berichten Landrigan, 1983, und Grajewski, 1996, daß mehrere Arbeiter, die mit der Produktion von optischen Aufhellern beschäftigt waren, verschiedene Symptome aufwiesen, die auf eine estrogene Wirkung solcher Verbindungen schließen lassen. In den

Berichten wird über eine Herabsetzung der Fertilität, der Libido und herabgesetzte Testosteronspiegel berichtet. Diese Humandaten werden durch *in vivo* Untersuchungen von Smith, 1992, unterstützt. Smith konnte durch die Bestimmung der Zunahme des Uterusgewichtes im „Uterotrophen Assay“ in Ratten, hervorgerufen durch 4,4'-Diaminostilben-2,2'-disulfonsäure (Amsonic acid) ab einer Konzentration von 300 - 1000 mg/kg KG, die mögliche Einflußnahme auf die Gesundheit der Arbeiter untermauern.

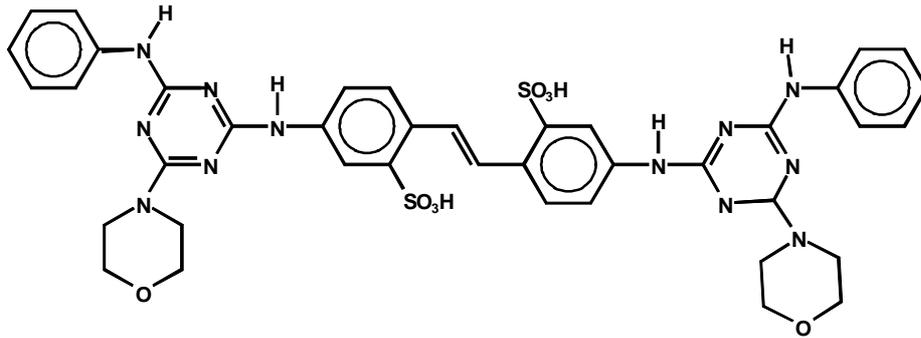
Diese Anhaltspunkte sprechen neben den reinen Strukturvergleichen und den Ergebnissen der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten *in vitro* Experimenten für eine tatsächlich relevante hormonelle Aktivität solcher optisch aktiver Verbindungen. Derartige negative Effekte treten beim Menschen natürlich erst oberhalb bestimmter Blut- bzw. Gewebespiegel auf. Somit besteht für den Verbraucher vermutlich keine Gefährdung. Ganz anders stellt sich die Situation für den arbeitsmedizinischen Bereich dar. Wie das obige Beispiel zeigt, werden hier offensichtlich solch hohe Gewebespiegel erreicht, daß sich tatsächlich negative Effekte sogar klinisch manifestieren können. Durch verschiedene verfahrenstechnische Verbesserungen, wie geschlossene Prozesse und Behältnisse, könnte dieses Gefährdungspotential für die Arbeiter sicherlich minimiert werden.

Möglicherweise viel kritischer muß dagegen die ökotoxikologische Situation und hier speziell die Verhältnisse in aquatischen Systemen bewertet werden. Individuen, die ihre gesamte Entwicklung in Gewässern durchlaufen, also in jedem Lebensabschnitt endokrinen Disruptoren ausgesetzt sein können, zeigen möglicherweise bereits bei sehr viel geringeren Konzentrationen schon negative Wirkungen, die auf solche Verbindungen zurückzuführen sein könnten. Erschwerend kommen eine sehr komplexe Eintragssituation und bislang nur unzureichende Kenntnisse über Abbauverhalten oder Kumulationseffekte in Gewässern oder auch Nahrungsketten hinzu.



4,4'-Bis-(2-sulfostryl)-biphenyl

Aufheller A



4,4'-Bis[(4-anilino-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)-amino]-stilben-2,2'-Disulfonsäure

Aufheller B

Abb. 4-30: Struktur verschiedener optischer Aufheller

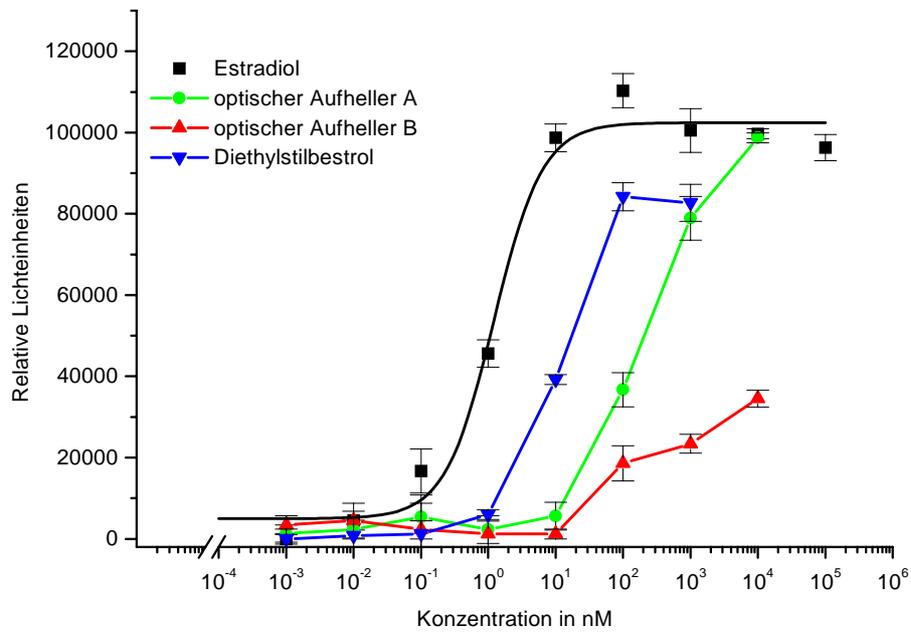


Abb. 4-31: Reporterageninduktion in MCF-7 Zellen durch optische Aufheller im Vergleich zu Estradiol und DES

Aus den oben dargestellten Kurven ergeben sich folgende relative Potenzen:

Testverbindung	Konzentration
DES	$5,9 \times 10^{-2}$
optischer Aufheller A	$5,4 \times 10^{-3}$
optischer Aufheller B	$1,24 \times 10^{-5}$
Resveratrol	$7,4 \times 10^{-3}$
Piceatannol	3×10^{-5}

Eine intrinsische Effektivität kann nur für Diethylstilbestrol mit ca. 80 % und für den optischen Aufheller A mit 100 % angegeben werden. Bei Resveratrol, Piceatannol und dem optischen Aufheller A wurde A_2 (Testsubstanz) = A_2 (Estradiol) gesetzt.

Dieses Beispiel verdeutlicht auch, daß eine Trennung in natürliche und anthropogene endokrine Disruptoren nur eine künstliche Trennung ist. Diese Verbindungen unterscheiden sich zumindest in ihrem *in vitro* Verhalten nicht voneinander. Für alle untersuchten Verbindungsklassen ist der Übergang von anthropogenen Verbindungen hin zu Verbindungen natürlichen Ursprungs fließend. Umso schwerer wird die Bewertung natürlicher Stilbene wie Resveratrol, das möglicherweise als chemopräventives Agens für die menschliche Gesundheit positiv zu betrachtende Verbindung eingestuft werden sollte unter dem Bewußtsein, daß sich optische Aufheller und Resveratrol *in vitro* hinsichtlich ihrer estrogenen Aktivität nicht wesentlich unterscheiden. Hinzu kommt, daß gerade für optische Aufheller eine estrogenen Aktivität im Menschen beschrieben ist.

Um sich mögliche chemopräventive Wirkungen von Resveratrol zunutze zu machen, müssen auch entsprechend hohe Wirkspiegel erzielt werden, ab denen die Verbindung auch hormonell aktiv sein könnte. Eine exemplarische Wirkspiegelberechnung kann diese Dilemma verdeutlichen.

Die Datenlage ist bislang sehr beschränkt. So liegen keine Blutserumspiegel von Resveratrol nach Rotweinkonsum vor, die eine vertrauenswürdige Extrapolation erlauben würden. Aufgrund der relativ hohen Gehalte von Resveratrol in Rotweinen

(bis zu 5 mg/l, Frankel, 1993) kann über einen entsprechend hohen Blutserumspiegel spekuliert werden. Goldberg et al., 1995, findet ab einer Aufnahme von 2 mg Resveratrol pro Tag eine verminderte Thrombinaggregation bei den Probanden. Von der Konzentration, die in dem Reportergensystem einen maximalen estrogenen Stimulus induziert auf einen möglichen *in vivo* Wirkspiegel zu schließen bleibt bei der momentanen Datenlage spekulativ. Bei der Annahme einer vollständigen Resorption von ca. 2,5 mg Resveratrol aus einem halben Liter Rotwein wird vermutlich ein Blutspiegel erreicht, der unter vereinfachten Betrachtungen einen für einen potentiell estrogenen Wirkspiegel notwendigen Wert erreichen kann.

Wie sich die Situation in endokrin abhängigen Geweben verhält kann zur Zeit sicherlich noch schlechter bewertet werden. Auch in der Literatur finden sich keine näheren Hinweise für eine mögliche Abschätzung des estrogenen Potentials von Resveratrol, ausschließlich auf der Basis der *in vitro* Ergebnisse (Gehm, 1997).

4.11.3 Unterschiede in der Charakteristik der Induktion des zellulären Endpunktes bei Resveratrol

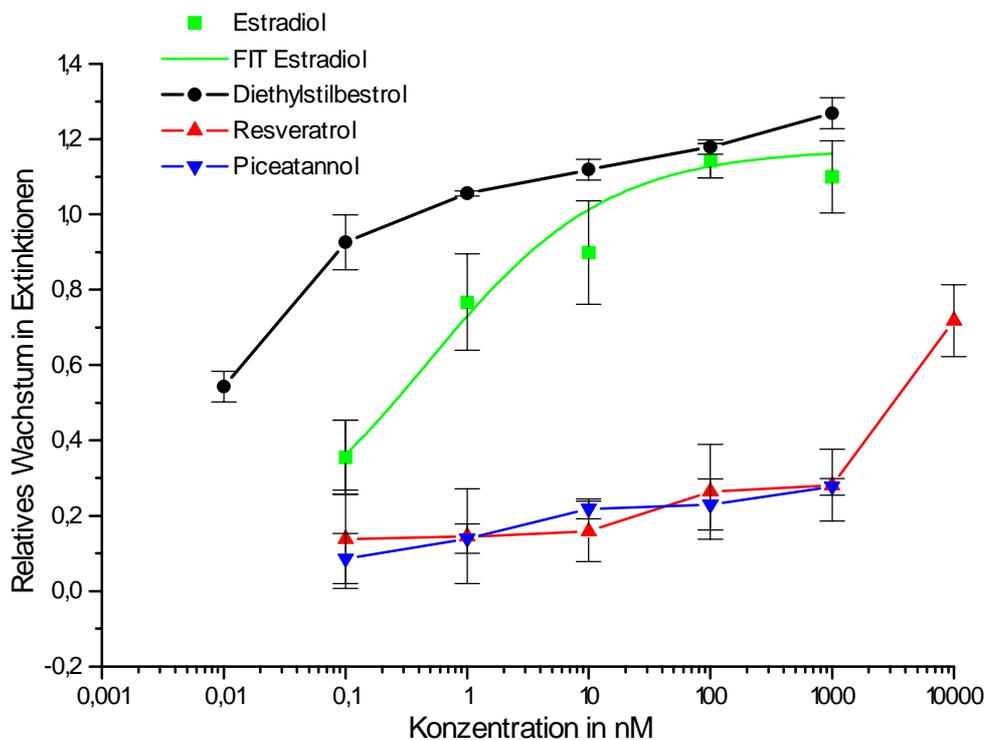


Abb. 4- 32: Wachstumsinduktion der MCF-7 Zellen durch verschiedene Stilbene

Im Unterschied zum Reporterassay (s.o.) induziert Resveratrol das Wachstum der MCF-7 Zelllinie effektiv erst ab einer Konzentration von 10 μ M. Besonders interessant ist im Gegensatz zum Reporterassay, daß kein "Maximum" der Wirkung, mit einem späteren Abfall zu beobachten ist.

Solche unsteten Kurvenverläufe konnten nur beim Reporterassay beobachtet werden. Dieses Verhalten wird nicht durch allgemeine toxische Effekte hervorgerufen, sondern muß auf andersartigen Mechanismen, die möglicherweise direkt am Rezeptor ablaufen, beruhen. Inwieweit hier ein allgemeines Problem der Reporterassays vorliegt, kann momentan nicht abschließend beantwortet werden.

4.12 Bisphenole

Bisphenol A wird in erheblichen Mengen in Deutschland hergestellt (1995: 210.000 Tonnen) und vor allem in der Kunststoffindustrie (Lebensmittelverpackungen, Papierchemikalien u. a.) eingesetzt. Obwohl die endokrine Wirkung von BP A bereits seit den dreißiger Jahren bekannt ist (Dodds und Lawson, 1936) und von Reid und Wilson, 1944, bereits erste Struktur-Wirkungsbeziehungen aufgestellt werden konnten, sind bis heute kaum Daten zum Umweltverhalten von auf Bisphenolen beruhenden Kunststoffen bekannt (UBA, 1997).

Durch die Diskussion möglicher estrogenen Effekte angestoßene experimentelle Untersuchungen, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*, ergaben sich in jüngster Zeit weitere interessante Hinweise auf mögliche Kontaminationspfade besonders für den Menschen. Aufschlußreiche Struktur - Dosis - Wirkungsbeziehungen, auch von Strukturhomologen (Perez, 1998; s. Diskussion), aber auch Hinweise auf mögliche teratogene Effekte in der F1-Generation in Mehrgenerationenstudien (Nagel, 1997) führen zu neuen verfolgungswerten Teststrategien.

Aufgrund hoher Produktionszahlen und dem ubiquitären Einsatz in Bedarfsgegenständen stellt BP A einen interessanten Vertreter der Klasse der Diphenylalkane dar. In Arbeiten von Krishnan, 1993, Brotons, 1995, und Olea, 1996,

werden mögliche Kontaminationspfade, die gerade für den Menschen von Bedeutung sind, aufgezeigt. So konnten Brotons et al., 1995, die Freisetzung von BP A aus Konservendoseninnenlacken nach Erwärmung instrumentell-analytisch mittels GC/MS nachweisen und mit entsprechenden Extrakten auch das estrogen abhängige Wachstum der humanen MCF-Zelllinie induzieren. Olea, 1996, weist ebenfalls *in vitro* die estrogene Aktivität von Zahnfüllmaterial auf Kunststoffbasis nach. Dieses Material besteht in wesentlichem ebenfalls aus BP A.

In einer neuen weitergehenden Arbeit untersuchte Perez, 1998, mögliche Struktur-Dosis-Wirkungsbeziehungen innerhalb einer Gruppe strukturähnlicher Diphenylalkane. Analoge Untersuchungen wurden im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt.

Neben BP A ist bei einem strukturellen Vergleich und möglichen analogen biologisch-funktionellen Effekten ein weiterer prominenter Vertreter dieser Verbindungsklasse wichtig hinsichtlich seines Vorkommens und seiner Effekte als Inhaltsstoff verschiedener Bedarfsgegenstände in Lebensmittelverpackungen. Diese partiellen Strukturanalogen sind der Diglycidylether von BP A (BADGE) und weitere BP A Analoge. Aufgrund der Epoxygruppen und dem damit verbundenen möglichen alkylierenden Potential wird diesen Verbindungen große Aufmerksamkeit zuteil. Obwohl auch hier relativ wenig zum Metabolismus von BADGE bekannt ist, kann ein möglicher estrogener Effekt durch diese Verbindung bzw. deren Metabolite nicht ausgeschlossen werden (Climie, 1981). BADGE, ein Diglycidylderivat von Bisphenol A, fand sich bis vor einem Jahr in sehr hohen Konzentrationen (bis zu 10 mg/kg Fisch) in sogenannten "pull-off"-Fischkonservendosen. (Schlatter, 1997).

Gerade Arbeiten zum *in vivo* Metabolismus und zu endokrinen Effekten *in vivo* kommen zu sehr konträren Ergebnissen. So liegen die Befunde von Dodds und Lawson (1936), die auf Ergebnissen aus uterotrophen Tests an juvenilen Nagern beruhen, vor. Zusätzlich ergaben Arbeiten von Nagel (1997) eine 35%ige Gewichtszunahme der Prostata der F1-Generation von Mäusen, die während der Schwangerschaft mit nur 2 µg/kg KG BP A behandelt wurden.

Trotz des bislang für eine estrogenen Aktivität nicht-klassischen Zielorgans Prostata ergibt sich möglicherweise hier ein brisanter Befund, der die Hypothese der sensitiven Zeitfenster während der Embryonalentwicklung stützt und außerdem klar erkennen läßt, daß möglicherweise nicht nur die klassischen Zielgewebe zu

berücksichtigen, sondern auch weitere endokrin-abhängige Organe zu beachten sind.

Demgegenüber stehen breitangelegte Kanzerogenitätsstudien mit BP A wie sie für die Substanzzulassungen durchgeführt werden müssen, bei denen BP A selbst bei äußerst hoher Dosierung keine mit dem Endokrinium verbundenen Krebsarten induzieren konnte und keine hormonellen Wirkungen zeigte (Jekat, 1998).

Aus der Betrachtung dieser unterschiedlichen Ergebnisse leiten sich grundlegende Fragen zur Prüfung und Bewertung des toxikologischen Potentials von endokrinen Disruptoren ab (siehe Ende Einleitung bzw. Diskussion).

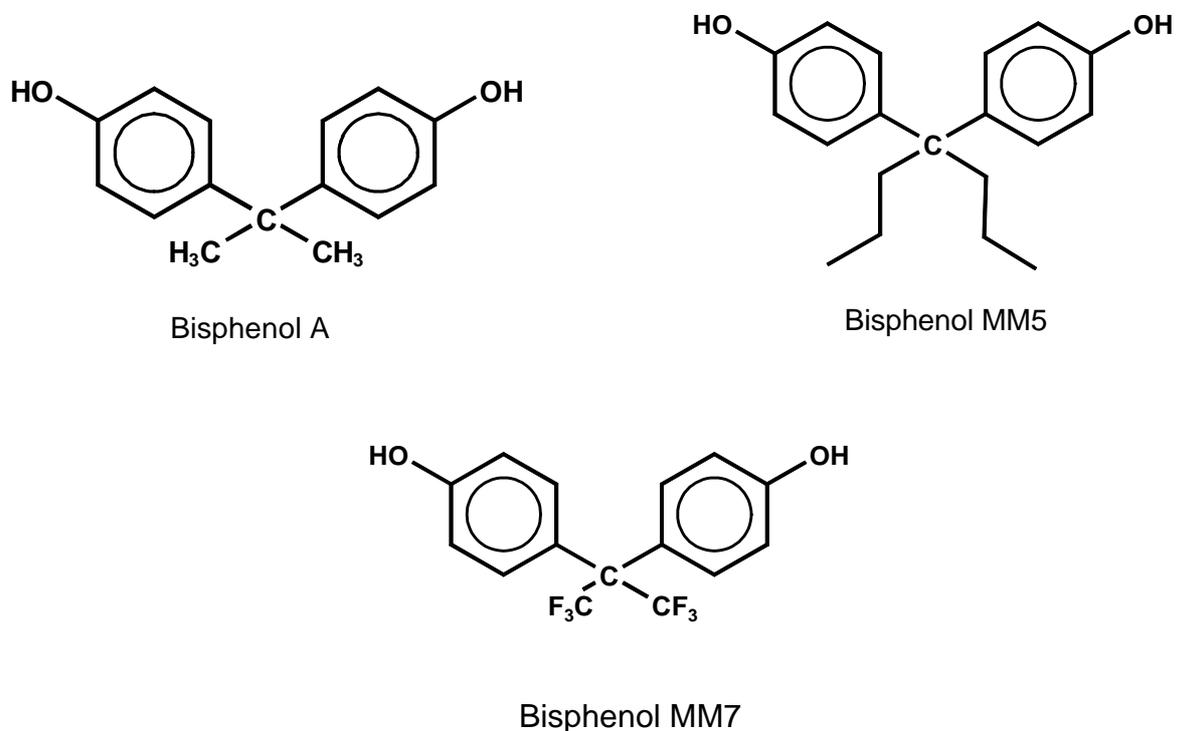


Abb. 4-33: Struktur von Bisphenol A, Bisphenol MM5 und Bisphenol MM 7

Aufgrund der breiten Anwendung, des direkten Kontaktes zum Verbraucher und der zumindest *in vitro* starken estrogen agonistischen Aktivität von Bisphenol A und seiner Derivate erscheint eine eingehende wissenschaftliche Untersuchung als angebracht.

In der Diskussion potentieller estrogener Effekte, die möglicherweise durch Xenobiotika hervorgerufen werden sollen, ergeben sich deutliche Hinweise auf die

estrogene Potenz von Bisphenol A. Diese Kenntnisse beruhen auf sehr frühen Arbeiten von Dodds et al., 1936. In diesen Arbeiten wurde u. a. als mögliches kontrazeptives Agens auch Bisphenol A intensiv untersucht. In dem von Doisy et al., 1938, etablierten "Uterotrophen Assay" in juvenilen oder ovariectomierten Ratten wurde für Bisphenol A ein eindeutig positiver uterotropher Effekt festgestellt.

Besonders nach dem Zweiten Weltkrieg bis heute ergab sich für Bisphenol A und ähnliche Derivate ein enorm großer Nachfrageschub durch den Einsatz dieser Verbindungen als Grund- und Zusatzstoffe in Polycarbonaten. Erst mit der allgemein aufkommenden Diskussion möglicher estrogener Effekte verschiedener Verbindungsklassen rückten Bisphenole erneut in den Mittelpunkt der wissenschaftlichen Auseinandersetzung, eventuell auch für *in vivo* feststellbare endokrine Effekte verantwortlich zu sein. Die Fragestellungen erscheinen auf verschiedenen Ebenen besonders interessant. Die Vielschichtigkeit, der zu führenden Diskussion steht, möglicherweise exemplarisch für weitere Verbindungsklassen, die ein ähnliches Wirkspektrum aufweisen.

Bisphenole wurden auch in der vorliegenden Arbeit intensiv untersucht. Durch Prüfung verschiedener Bisphenole, die uns freundlicherweise von Herrn Professor Dr. Dr. Metzler, Universität Karlsruhe, zur Verfügung gestellt wurden, konnten im sogenannten E-Screen-Assay und im Transaktivierungsassay das relative estrogene Potential der einzelnen Verbindungen ermittelt werden. Dabei ergaben sich strukturabhängig unterschiedlich starke wachstums- oder reporterageninduzierende Effekte.

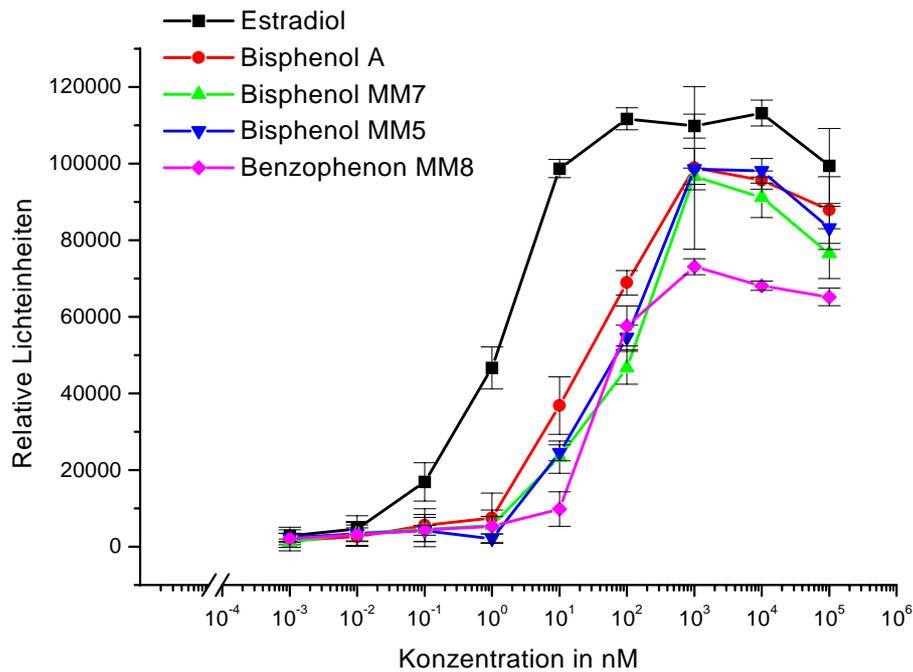


Abb. 4-34: Reporterinduktion durch verschiedene Bisphenole in MCF-7-Luciferase-Zellen

Daraus ergibt sich die relative Potenz:

Testverbindung	Konzentration
Bisphenol A	6×10^{-2}
Bisphenol MM5	$2,4 \times 10^{-2}$
Bisphenol MM7	$1,95 \times 10^{-2}$
Bisphenon MM8	$3,5 \times 10^{-2}$

Als resultierende intrinsische Effektivität ergibt sich:

Testverbindung	intrinsische Effektivität
Bisphenol A	87 %
Bisphenol MM5	86,5 %
Bisphenol MM7	81,5 %

Benzophenon MM8

63 %

Durch den intensiven Vergleich der Einzelstrukturen mittels des molecular modeling Programms SYBYL der Fa. Tripos, München, und der vorliegenden *in vitro* Daten aus den Proliferationsassays und den Transaktivierungsassays ergab sich die Chance, mögliche grundlegende Gesetzmäßigkeiten und Abhängigkeiten in den Struktur - Wirkungsbeziehungen zu erarbeiten. Neben den Arbeiten, die eine möglichst verlässliche Ermittlung der EC₅₀-Werte der einzelnen Verbindungen erforderten, wurden die mittels Kraftfeldmethoden berechneten Moleküle detailliert verglichen.

Die theoretische Energieminimierung mittels Rechenprogramm berücksichtigt neben den sterischen Ansprüchen der Moleküle auch deren elektrostatische Ladungsverteilungen. Durch mehrfaches Verändern der voreingestellten Struktureigenschaften wurde angestrebt, möglichst das absolute Energieminimum, das mit der Kraftfeldmethodik berechenbar ist, zu ermitteln.

Die Berechnung des Energieminimums der Moleküle erfolgt mittels iterativer Rechenoperationen. Die Güte der Berechnung basiert im wesentlichen auf dem Berechnungsalgorithmus, der dem Programm zugrunde liegt. Hier gehört das Programm SYBYL zu den weltweit führenden Programmen, so daß eine gewisse Vertrauenswürdigkeit der Ergebnisse vorausgesetzt werden kann. Außerdem hat der Operator, der die Grundeinstellungen vornimmt, weiteren Einfluß auf die Qualität der Berechnung. So kann die Zahl der iterativen Rechenschritte beliebig definiert werden, aber auch der Wert des sich minimierenden Energiegradienten bestimmt die Genauigkeit der Berechnung.

Von größter Bedeutung ist jedoch das Auffinden des Hauptminimums des Energiewertes eines Moleküles. Hier können die schwerwiegendsten Fehler vom Operator gemacht werden. Im Bewußtsein dieser methodischen Beschränkungen wurde versucht, im momentanen Stadium empirisch, durch vielfaches Verändern der Strukturen, möglichst das absolute Minimum zu berechnen.

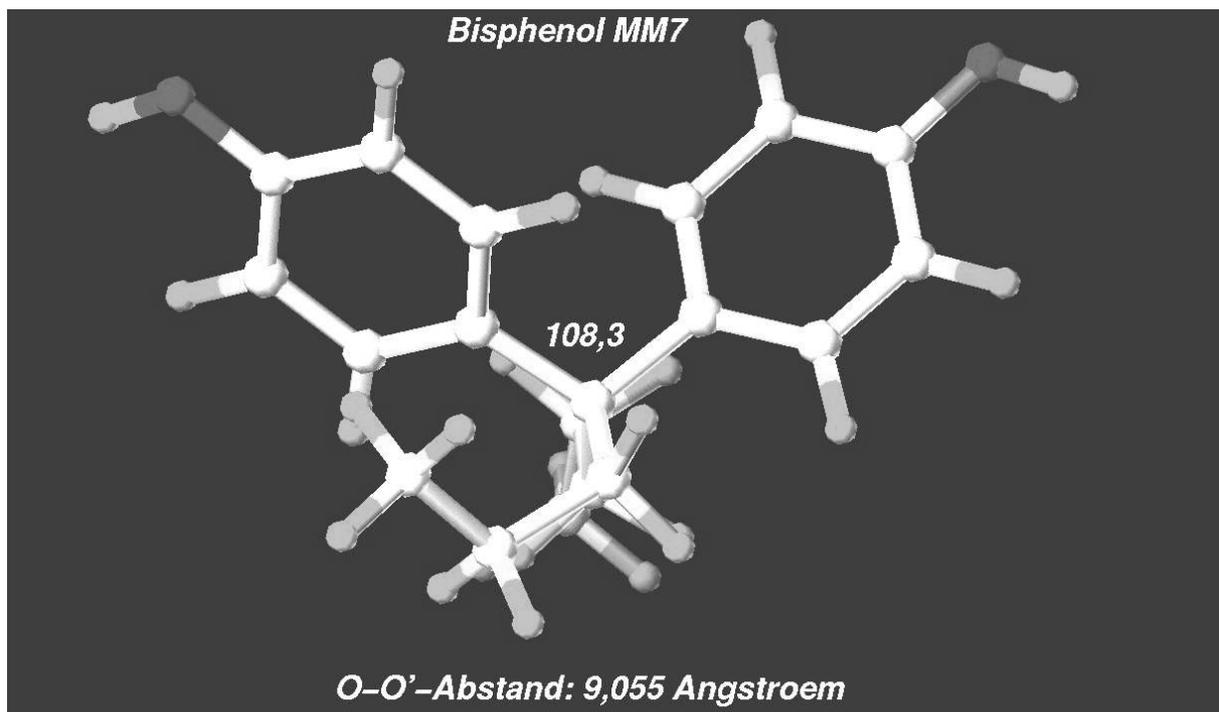
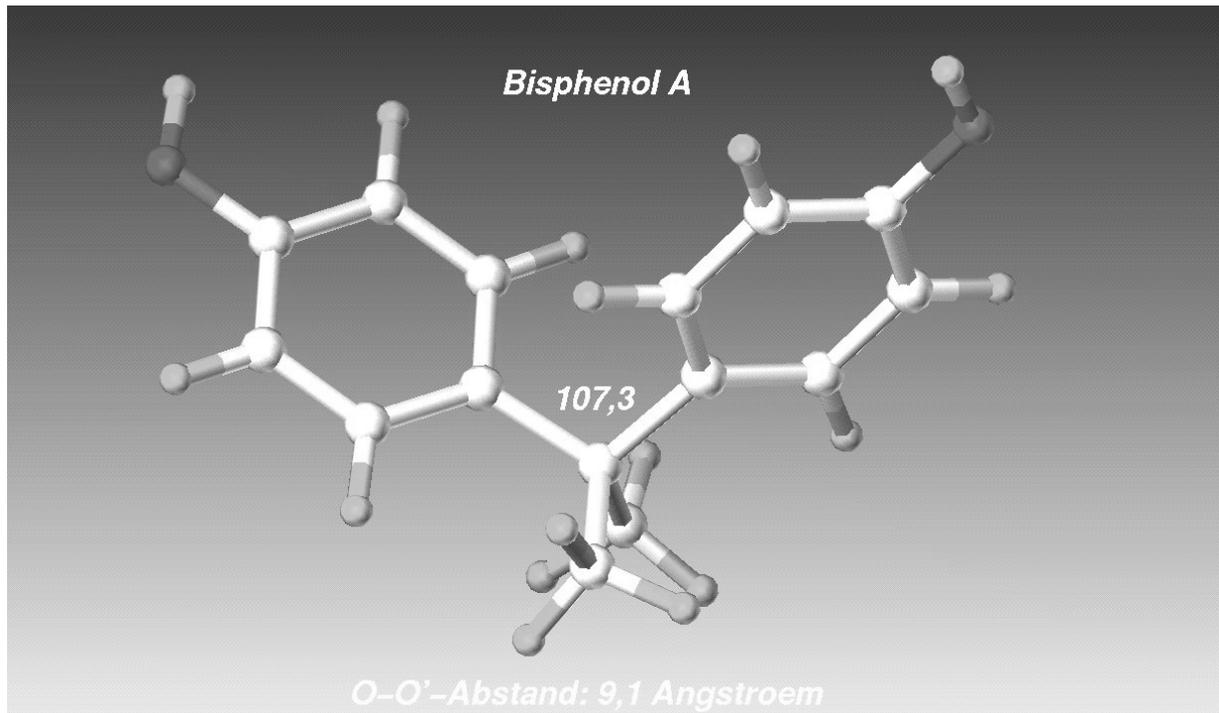


Abb. 4-35: Energieminimierte Bisphenole

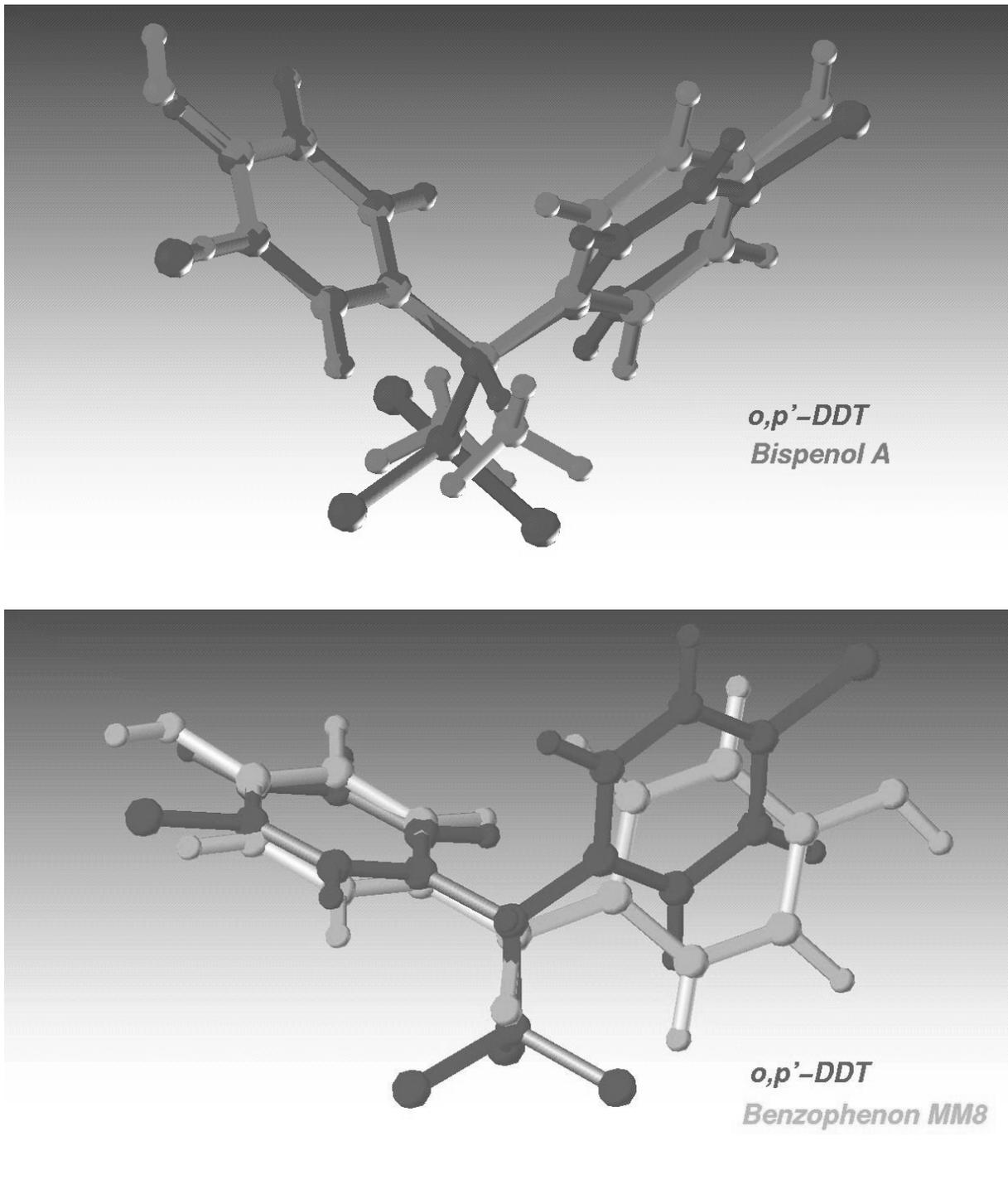


Abb. 4-36: Gefittete Bisphenole im Vergleich mit *o,p'*-DDT

Durch exaktes Ausmessen der Partialladungen, der absoluten Molekülgröße, der Bindungslängen und -winkel sowie der Torsionswinkel der einzelnen Verbindungen können einzelne Parameter als wesentliche Einflußfaktoren identifiziert werden.

Durch die sogenannte "FIT"-Option ist ein Vergleich einzelner oder mehrerer Verbindungen direkt miteinander möglich. Hierzu werden bestimmte Teilstrukturen oder einzelne Atome zweier oder mehrerer Moleküle deckungsgleich miteinander überlagert. Dies ermöglicht die qualitative optische Erfassung der unterschiedlichen Raumanprüche der zu vergleichenden Moleküle. Das Programm berechnet jedoch auch die Quadratwurzel des Abstandes der frei beweglichen Molekülteilstrukturen miteinander. Somit ergibt sich ebenfalls ein quantitatives Maß für mögliche unterschiedliche Raumanprüche verschiedener Moleküle.

Bei derartig durchgeführten Strukturvergleichen zwischen verschiedenen Vertretern der Klasse der Bisphenole ergab sich als größter Einflußfaktor, der die estrogenen Aktivität nach momentanem Kenntnisstand im wesentlichen bestimmt, der Winkel am zentralen Kohlenstoffatom der Bisphenole. Dieser Winkel wird, zumindest in der den theoretischen Berechnungen zugrundeliegenden Gasphase, durch den sterischen Anspruch der verschiedenen Alkylreste der Bisphenole bestimmt. In den durchgeführten *in vitro* Arbeiten korrelierte die Zunahme des Öffnungswinkels direkt mit der Abnahme der estrogenen Aktivität der Verbindungen in den genutzten Testsystemen. Die Voraussagesicherheit nimmt natürlich mit der wachsenden Zahl der unterschiedlichen Testsubstanzen zu. Der besondere Wert der parallel durchgeführten *in vitro* Assays und der theoretischen Arbeiten mittels molecular modeling Berechnungen ergab sich im folgenden durch die Identifizierung einer ganz neuen Substanzklasse, die mit den Bisphenolen verschiedene Homologien aufzeigt, sich in ihrem funktionellen Verhalten in biologischen Systemen jedoch wahrscheinlich stark abweichend verhält.

4.13 Benzophenone

Etwa zeitgleich zu den von mir durchgeführten Untersuchungen publizierte Kelce et al., 1995, daß *p,p'*-DDE, der Hauptmetabolit des technischen DDT's im Säugerorganismus, sowohl *in vitro* als auch *in vivo* ein potentes Antiandrogen darstellt. Außergewöhnlich an dieser Beobachtung war u. a., daß der Metabolit einer Verbindung, die prinzipiell als estrogen aktiv einzustufen ist, ein starkes Antiandrogen sein kann. Diese überraschende Erkenntnis kompliziert die Risikobeurteilung möglicher endokriner Disruptoren zusätzlich.

Durch diese Arbeiten von Kelce et al. rückten *o,p'*-DDT und *p,p'*-DDE für die theoretischen Arbeiten in den Mittelpunkt des Interesses. Besonders interessant erschien bereits anfänglich die deutliche Strukturhomologie von *o,p'*-DDT zu den von mir bereits untersuchten Bisphenolen und der ebenfalls großen Strukturähnlichkeit von *p,p'*-DDE zu den von mir kurz zuvor als partielle Agonisten bzw. Antagonisten des Estrogenrezeptors identifizierten Benzophenonen.

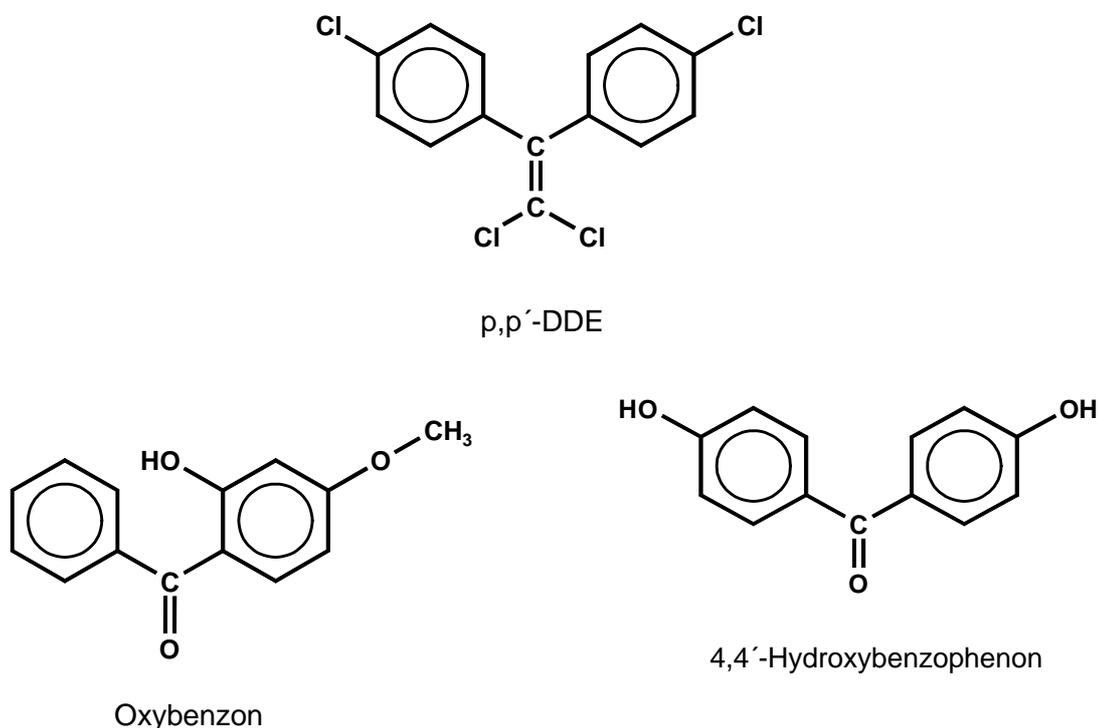


Abb. 4-37: Vergleich eines etablierten Antiandrogens, *p,p'*-DDE, mit weiteren potentiellen Antiandrogenen der Strukturklasse der Benzophenone (Oxybenzon und 4,4'-Hydroxybenzophenon)

Diese Einstufung der Benzophenone und des p,p'-DDE erfolgte aufgrund des typischen Kurvenverlaufs bei halblogarithmischer Darstellung der Dosis-Wirkungsbeziehungen am Estrogenrezeptor. Sowohl mit p,p'-DDE, Oxybenzon als auch Bisphenol MM8 konnte jeweils nur eine halbmaximale Wirkung der Reporteragen- und Wachstumsinduktion im estrogen abhängigen System erzielt werden.

Nach Forth et al., 1987, spricht man bei einem Pharmakon oder toxischem Wirkstoff dann von einem partiellen Agonisten oder partiell agonistisch / antagonistischen Wirkstoff, wenn dessen Bindung nur zu einer leichten Verschiebung der Gleichgewichtslage in Richtung Aktivität führt und dieser Stoff selbst in hohen therapeutischen Dosen keine dem reinen Agonisten vergleichbare Wirkung auslösen kann. Die zu beobachtenden Wirkungen partieller Agonisten hängen entscheidend vom Ausgangszustand des Prüfsystems ab. In Abwesenheit des Agonisten bewirken sie eine Aktivierung, da sie zu einer zahlenmäßigen Zunahme aktiver Rezeptoren führen. Ist das System jedoch durch einen Agonisten stark aktiviert (oberhalb der EC_{50} oder K_D), wird durch Zugabe steigender Mengen des partiellen Agonisten durch allmähliche Verdrängung des reinen Agonisten die Zahl der aktiven Rezeptoren herabgesetzt; zu beobachten ist eine antagonistische Aktivität.

Bei Pharmaka oder toxischen Stoffen, die sich hinsichtlich der im selben Prüfsystem zu erzielenden maximalen Wirkstärke unterscheiden, spricht man von unterschiedlicher "intrinsischer Aktivität". Die intrinsische Aktivität ist definiert als das Verhältnis der durch den in Frage kommenden Stoff an einem Effektor maximal auslösbaren Wirkung zum absoluten Wirkmaximum. Sie kann damit Werte zwischen null und eins annehmen. Pharmaka oder toxische Stoffe mit derselben Wirkqualität an einem bestimmten Effektorsystem können sich in ihrer Wirksamkeit sowohl im Hinblick auf die Affinität zum Rezeptor als auch im Hinblick auf die maximal erzielbare Wirkung unterscheiden. Ein Kurvenverlauf, wie er für die Benzophenonabkömmlinge zu beobachten ist kann verschiedene Ursachen haben. Die Benzophenone binden nur an einen Rezeptorsubtyp, also vielleicht $ER\alpha$ oder $ER\beta$ oder diese Substanzen zeigen eine schwache Affinität zur ligandbindenden Domäne der Steroidhormonrezeptorsuperfamilie.

Es ist somit denkbar, daß sie partielle Agonisten des Estrogenrezeptors darstellen, also prinzipiell an den Estrogenrezeptor binden, aber das Gleichgewicht zwischen

aktiver und inaktiver Form nicht im gleichen Maße verschieben wie ein vollständiger Agonist. Aufgrund des nahezu gleichen Verhaltens dieser drei Verbindungen in den durch Estrogene induzierbaren Reporterensystemen und eines Literaturhinweises, daß auch Oxybenzon *in vivo* ein antiandrogenes Potential aufweist, liegt der Schluß nahe, daß alle drei Verbindungen Liganden des Androgenrezeptors sind.

Diese Hypothese wird durch weitreichende molecular modeling Berechnungen ebenfalls eindrücklich unterstützt.

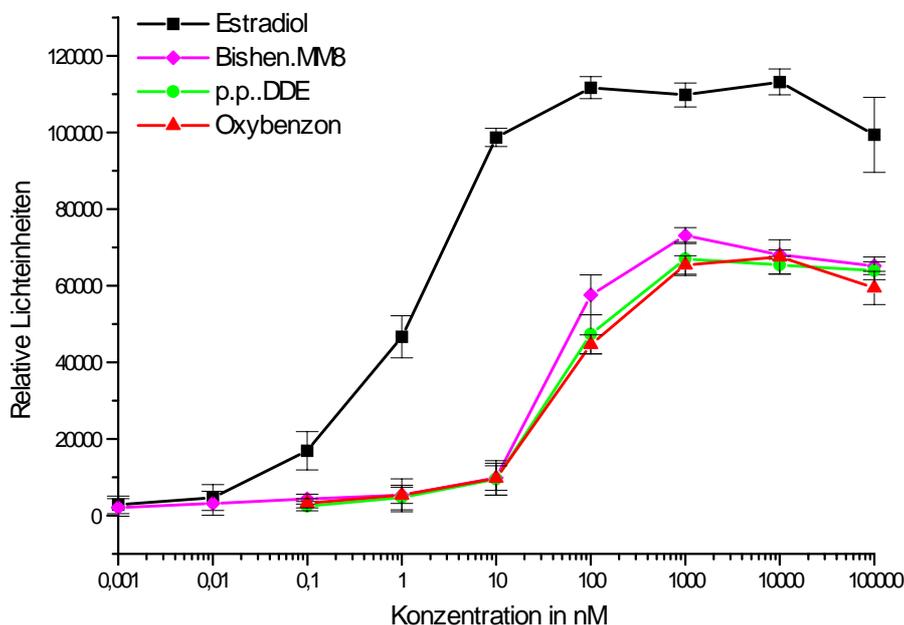


Abb. 4-38: Luciferaseinduktion in stabil transfizierten MCF-7 Zellen durch p,p'-DDE, Oxybenzon und 4,4'-Hydroxybenzophenon (Bisphenol MM8) im Vergleich zu Estradiol in MCF-7-Luciferase Zellen

Die ausführlich durchgeführten Strukturvergleiche zwischen Benzophenonen und p,p'-DDE lassen eine hohe strukturelle Homologie dieser Verbindungen erkennen. Im Gegensatz zu den Bisphenolen und zu o,p'-DDT liegt bei diesen Verbindungen das zentrale Kohlenstoffatom in einer sp²-Konfiguration vor. Diese vergrößert den Öffnungswinkel zwischen den Phenylresten in der Gasphase auf ca. 120° - 121° und das gesamte Molekül wird insgesamt starrer. Die Chlorsubstitution ergibt gegenüber

den Hydroxygruppen der Bisphenole keine signifikanten Veränderungen im Ligand-Rezeptor-Bindungsverhalten.

In Struktur-Wirkungsvergleichen läßt sich o,p'-DDT in die Reihe der Bisphenole einreihen, so daß die estrogenen Aktivität dieser Verbindung nicht überrascht. Genau wie bei den Bisphenolen liegt bei o,p'-DDT das zentrale Kohlenstoffatom in einer sp³-hybridisierten Konfiguration vor.

Die Chloratome, welche o,p'-DDT im Gegensatz zum Bisphenol A aufweist, imitieren den gemischt hydrophilen/hydrophoben Charakter der Phenolreste der Bisphenole. Für die Ligand-Rezeptor-Wechselwirkung scheinen sie essentiell zu sein.

Diese Vergleiche konnten nur am Rechner durchgeführt werden und haben somit nur theoretischen Charakter. Trotzdem verdichten sich die Verdachtsmomente, daß Benzophenonstrukturen ein mögliches antiandrogenes Prinzip darstellen. In einer Arbeit von Pathak, 1997, konnten Naturstoffe aus einer *Dahlbergia* Subspezies identifiziert werden, die am Androgenrezeptor antagonistisch wirken. Hier kehrt die Benzophenongrundstruktur wieder.

Da zum Zeitpunkt des Erscheinens der Arbeiten über antiandrogene Wirkstoffe mit benzophenonischer Grundstruktur kein auf die Prüfung antiandrogenen Wirkungen zugeschnittenes Testsystem zur Erfassung möglicher Antiandrogene zur Verfügung stand wurde versucht, zumindest zwei verschiedene Benzophenone und p,p'-DDT vergleichend im Transaktivierungs- und E-Screen-Assay einzusetzen. Tatsächlich ergab sich für alle drei geprüften Verbindungen ein typischer Kurvenverlauf partieller Agonisten / Antagonisten. Durch diese Ergebnisse und die theoretischen Überlegungen liegt die Vermutung nahe, daß sich Benzophenone ähnlich wie p,p'-DDE als Androgenrezeptorantagonisten einstufen lassen.

Ein bekannter Vertreter der Benzophenone ist das Oxybenzon. Oxybenzon wird neben vielfältigen technischen Anwendungen auch vielfach als UV-Lichtschutzverbindung neben Zimtsäuremethylester in kosmetischen Sonnenschutzprodukten eingesetzt. Je nach Lichtschutzfaktor enthalten kosmetische Sonnenschutzprodukte einen Anteil von bis zu 10 % an UV-Absorbern. Von Oxybenzon ist bekannt, daß es durch die Haut penetriert und auch in der Muttermilch zu finden ist. Außerdem unterliegt Oxybenzon einer starken

Bioakkumulation in Fischen (Karpfen, Schleie), die in Badegewässern beheimatet sind (Nagel, 1996). All diese Faktoren rechtfertigen eine genaue Untersuchung des human-, aber auch des ökotoxikologischen Verhaltens dieser Verbindung.

Neben diesem konkreten Einsatz von Oxybenzon als Lichtschutzmittel werden Benzophenone allgemein als Kopolymere in Kunststoffen eingesetzt, um diesen spezifische Eigenschaften zu verleihen. Für Oxybenzon liegt eine NTP-Studie vor, die für diese Verbindung in der höchsten Konzentration einen deutlichen Einfluß auf die Quantität der Spermien von Ratten erkennen läßt (NTP-Studie TOX-21). Bei einer Futterverabreichung von 50 000 ppm Oxybenzon über 13 Wochen reduziert sich bei männlichen Ratten die Spermiedichte, während sich bei weiblichen Ratten der Zyklus verlängert. Besonders interessant sind Befunde an B6C3F1 Mäusen, die bei topischer Applikation von 22, 75, 91 und 200 mg/kg Oxybenzon über einen Zeitraum von 13 Wochen reduzierte Spermienzahlen bei allen drei verabreichten Dosen aufwiesen.

Ein NOAEL für eine Beeinträchtigung der Spermienqualität konnte bei 13-wöchiger dermalen Applikation mit < 23 mg/kg/d in Mäusen nicht bestimmt werden.

Dieser Befund ist ein erster Beweis für eine potentielle antiandrogene Aktivität von Oxybenzon und läßt möglicherweise Rückschlüsse auf das Verhalten strukturanaloger Verbindungen zu.

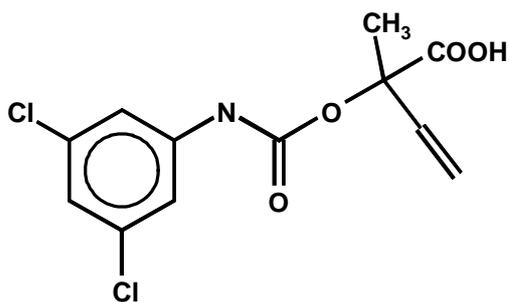
Ähnlich wie im Falle der estrogen aktiven Verbindungen zeigt sich auch bei Androgenrezeptorliganden möglicherweise eine starke Heterogenität potentieller Liganden. Neben benzophenonischen Strukturen kommen für eine eventuelle antiandrogene Wirkung weitere Verbindungsklassen in Frage, die nach momentanem Kenntnisstand möglicherweise vor allem eine ökotoxikologische Relevanz besitzen können. Strukturanaloge zum klinisch etablierten Antiandrogen Hydroxyflutamid können möglicherweise ebenfalls antiandrogen aktiv sein. Verschiedene Phenylharnstoffherbizide zeigen eine große Strukturhomologie zu Hydroxyflutamid.

Einige interessante Verbindungen konnten im Rahmen dieser Arbeit als Strukturhomologe identifiziert werden, die jedoch nicht in einem Testsystem, das dem von Kelce, 1995, gleicht, getestet werden konnten, da dieses im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht vollständig etabliert werden konnte.

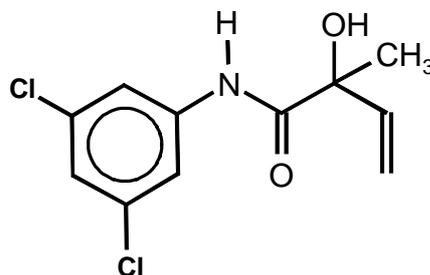
4.14 Antiandrogen-aktives Dicarboximid-Fungizid Vinclozolin

Zu den oben beschriebenen Untersuchungen wurden in der vorliegenden Arbeit weitere analoge Überlegungen für eine Gruppe nicht-steroidaler Androgenrezeptorantagonisten durchgeführt. Diese theoretischen Betrachtungen und Berechnungen möglicher Strukturanaloga des klinisch als Antiandrogen eingesetzten Hydroxyflutamids wurden durch eine Arbeit von Wong et al., 1996, initiiert. Wong et al. konnte einen von zwei Metaboliten des Dicarboximid-Fungizids "Vinclozolin" als potentes Antiandrogen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* identifizieren. Die Verabreichung von Vinclozolin verursacht in erwachsenen männlichen Ratten eine Leydigzell-Hypoplasie, eine Prostataatrophie und eine Atrophie der Samenblase. Eine Verabreichung von Vinclozolin an schwangere Weibchen führt zu einer unvollständigen und krankhaften Entwicklung des Genitaltraktes der männlichen Nachkommen. Neben Hypospadie werden weitere Mißbildungen beobachtet, wie eine krankhafte Ausbildung der Harnröhre im Penis der betroffenen Tiere, die auf antiandrogene Effekte von Vinclozolin schließen lassen.

In den begleitenden zellbiologisch-mechanistischen Untersuchungen gelang außerdem der Nachweis, daß nur der Enanilidmetabolit, einer der beiden Hauptmetaboliten von Vinclozolin, die Aktivität von R1881, einem nicht-metabolisierbaren Androgen, am rekombinanten humanen Androgenrezeptor antagonisieren kann. Neben funktionellen Transaktivierungsassays wurden auch Gel-Mobility-Shift-Assays unter nicht-denaturierenden Bedingungen durchgeführt, um das antiandrogene Potential des Vinclozolinmetaboliten zu ermitteln. Hier besteht im Gegensatz zur Situation beim Estrogenrezeptor die Möglichkeit, daß, sich tatsächlich aussagekräftige Gel-Mobility-Shifts durchführen lassen.



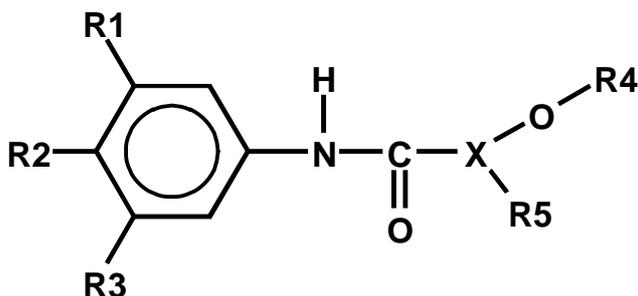
Vinclozolin Metabolit 1



Vinclozolin Metabolit 2

Abb. 4-39: Vinclozolin und die im Säuger entstehenden Metabolite

Ausgehend von den mittels des "molecular modeling" Programms Sybyl der Fa. Tripos, München, energetisch minimierten Molekülen Hydroxyflutamid und Vinclozolin Metabolit M2 konnte eine potentielle Consensus-Struktur identifiziert werden. Diese "Leitstruktur" konnte durch den Abgleich der ermittelten Strukturen und dem ebenfalls klinisch eingesetzten nicht-steroidalen Antiandrogen Casodex verifiziert werden. Durch diese Überlegungen und Berechnungen ergab sich folgendes Strukturinkrement als essentiell für die antiandrogene Wirkung eventueller Umweltschadstoffe oder Therapeutika.



- R1: Cl, H
- R2: Cl, Br, NO₂, H,
- R3: CF₃, Cl, H
- R4: H, CH₃, Alkyl-Rest ?,
- R5: H, CH₃, Alkyl-Rest
- X: C, N,

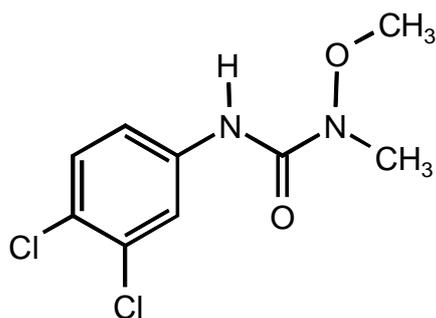
"Leitstruktur" nicht-steroidaler Antiandrogene

Abb. 4-40: Ermittelte vorläufige Leitstruktur für nicht-steroidale Antiandrogene

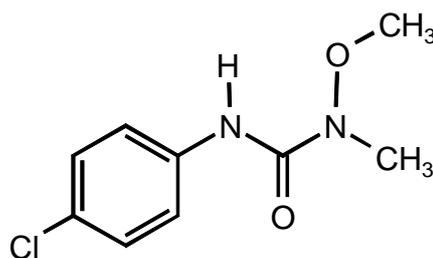
4.15 Phenylharnstoffderivate

Auf der Basis dieser "Leitstruktur" wurde versucht, durch den Einsatz einer on line Strukturdatenbank (Beilstein-Crossfire) weitere ähnliche Strukturen zu identifizieren. Tatsächlich ergab sich eine weitgehende strukturelle Ähnlichkeit der drei Ausgangsverbindungen (Vinclozolin M2, HO-Flutamid, Casodex) mit einer Wirkstoffklasse, die im Pflanzenschutz breite Anwendung erfährt.

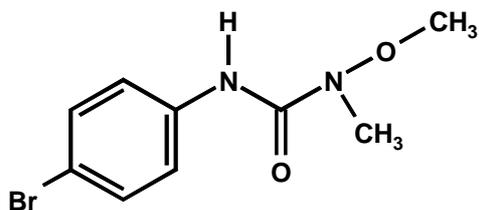
Diese als Herbizide bezeichnete Struktur- und Wirkklasse umfaßt bestimmte Phenylharnstoffherbizide. Diese Verbindungen werden sowohl als Totalherbizide als auch zur selektiven Unkrautbekämpfung breit eingesetzt. Durch den breiten Einsatz in der Landwirtschaft haben Phenylharnstoffderivate große wirtschaftliche Bedeutung erlangt. Bei einem ersten Sichten der Strukturdatenbank Beilstein-Crossfire erwiesen sich die Verbindungen Monolinuron, Metobromuron und Linuron, die jeweils am terminalen Stickstoffatom ein Hydroxy- bzw. eine Methoxygruppe aufweisen, als besonders interessant. Neben diesen Verbindungen gibt es eine ganze Reihe weiterer Strukturanaloga, die jedoch keine, nach unseren Erkenntnissen für die antiandrogene Aktivität essentielle, Hydroxy- oder auch Methoxygruppe aufweisen. Durch genauere Betrachtung der elektrostatischen Verhältnisse am Phenylring ergeben sich nur äußerst geringe Unterschiede zwischen einer NO₂-Gruppe und einer Halogensubstitution. Für die Wechselwirkung mit der Ligandenbindungstasche des Rezeptors ist vor allem das Vorhandensein einer hydrophilen Teilstruktur von Bedeutung. Das elektrostatische Verhalten einer Hydroxygruppe (z. B. Estradiol), einer Ketogruppe (z. B. Testosteron, DHT), von Chlorsubstituenten (z. B. o,p'-DDT, PCBs) oder einer NO₂-Gruppe scheint nur graduelle Unterschiede im Bindungsverhalten am Rezeptor hervorzurufen.



Linuron



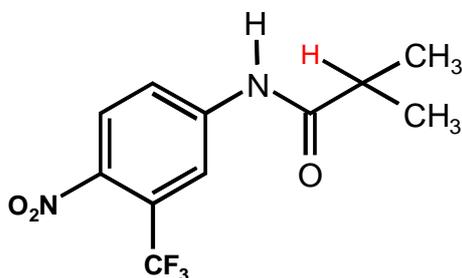
Monolinuron



Metobromuron

Abb. 4-41: Phenylharnstoffherbizide Linuron, Monolinuron und Metobromuron mit potentiell antiandrogener Wirkung

Ein weiteres Indiz dafür, daß die Hydroxygruppe am terminalen Stickstoffatom ein wesentliches Strukturmerkmal ist, zeigt sich im *in vivo* Verhalten von Flutamid bzw. von Hydroxyflutamid. Hier spielt der metabolisch katalysierte Einbau dieses terminalen Sauerstoffatoms und eine möglicherweise daraus folgende Pseudo-Ringbildung für die Wirkung der Verbindungen als Antiandrogen eine wesentliche Rolle. Da das antihormonelle Prinzip von Hydroxyflutamid erst durch die Hydroxylierung von Flutamid am terminalen Kohlenstoffatom eintritt, zeigt sich hier exemplarisch, welche Bedeutung die strukturelle Veränderung der Ausgangsverbindung auf das Wirkprinzip hat.



Flutamid

kein antiandrogenes Potential

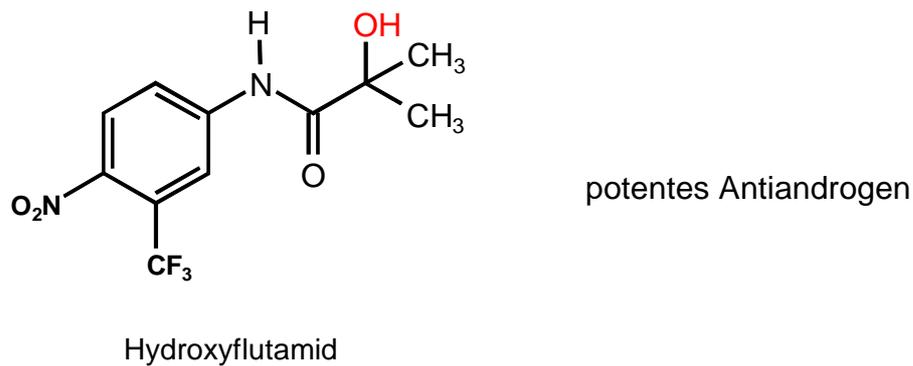


Abb. 4-42: Struktur des als Antiandrogen inaktiven Flutamids und des potenten Antiandrogens Hydroxyflutamid

Unter Berücksichtigung der Kenntnis dieses Wirkprinzips kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht ausgeschlossen werden, daß nicht auch nicht-hydroxylierte bzw. methoxylierte Phenylharnstoffherbizide ähnliche antagonistische Effekte am Androgenrezeptor zeigen. Dadurch würde sich die Zahl potentiell antiandrogener Verbindungen deutlich erhöhen. Sollte für eine mögliche antiandrogene Funktion einer Ausgangsverbindung jedoch zusätzlich ein Metabolisierungsschritt notwendig werden, kann dies zu spezies-, organ- oder vielleicht sogar zelltypspezifischen Wirkprofilen einer Verbindung führen.

Anhaltspunkte für eine solche Speziespezifität stellt die Wirkung von Procymidon, einem Insektizid, dar, das bisher offenbar nur in Ratten als antiandrogen beschrieben werden kann. Diesem Mechanismus liegt eine Besonderheit des Metabolismus der Ratte zugrunde, die bislang in keiner anderen Versuchstierspezies wiedergefunden werden konnte. Die Wirkung am Menschen ist bis heute nicht geklärt.

Die im frühen Stadium der Überlegungen vermutete nur theoretische Gültigkeit der oben beschriebenen Hypothese, die bestenfalls noch *in vitro* bestehen könnte, wurde durch Literaturbefunde für Linuron (Seibert, UBA, 1995) und durch experimentelle *in vivo* Studien in Ratten durch einen Hersteller bestätigt. Leider konnten diese theoretischen Überlegungen bislang nicht in einem funktionellen Testsystem bestätigt werden, da sich die Expression des rekombinanten Androgenrezeptors in COS-7 Zellen als sehr schwierig erwies. Außerdem gelang es

nicht, eine stabile Cotransfektion eines Reporter-genvektors in diesen Androgenrezeptor exprimierenden Zellen durchzuführen. Durch die nun in der Gruppe vorhandene Expertise und instrumentelle Ausstattung (Mikroplattenluminometer, Elektroporator) sollte eine transiente Transfektion von androgenrezeptorexprimierendem Vektor und MMTV-Promotor kontrolliertem Reporter-genvektor in COS-7 Zellen durchzuführen sein.

Mittels dieses Testmodells könnte eine Bestätigung der oben erläuterten Hypothese *in vitro* erfolgen. Sollte sich *in vitro* und *in vivo* bestätigen, daß nicht hydroxylierte bzw. nicht methoxylierte Verbindungen kein antiandrogenes Potential aufweisen, könnte hier exemplarisch der Wert einer möglichen auf Struktur-Wirkungsbeziehungen beruhenden Prädiktivität für eine auf diesen Kenntnissen basierende mögliche Prävention aufgezeigt werden.

Anhand dieser Beispiele wird deutlich, wie komplex sich eine zukünftige Risikobewertung einer potentiellen Gefährdung des Verbrauchers durch endokrine Disruptoren gestalten könnte. Es wird deutlich, welchen Einfluß der Metabolismus (she. p,p'-DDT, p,p'-DDE / Flutamid, Hydroxy-Flutamid / Vinclozolin, Metabolit2) auf das funktionelle Verhalten der Verbindungen *in vivo* haben kann. Zusätzlich wird klar erkennbar, wie ein Bogen über ein weites Strukturspektrum geschlagen werden kann, dessen Extrema funktionell unterschiedliche Effekte hervorrufen können.

So unterschiedlich diese Effekte auch sind - estrogene Aktivität gegenüber antiandrogenem Verhalten - so nahe liegen die möglichen fatalen Folgen für das Zielgewebe schlußendlich zusammen. So können Substanzgemische in einem Produkt sowohl estrogen aktiv als auch antiandrogen aktiv sein, was für die hormonelle Homöostase im Zielgewebe möglicherweise schlecht zu tolerieren sein wird. Die momentan zur Verfügung stehenden *in vitro* Testsysteme können keinen oder nur einen geringen Beitrag zur Lösung solcher Fragestellungen leisten.

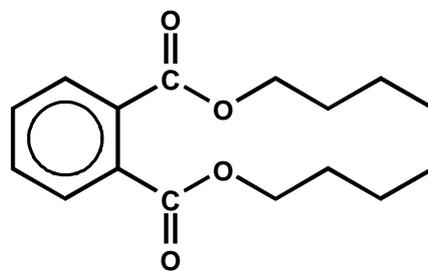
Jedoch auch Tierversuche können nur in gewissem Maße so durchgeführt werden, daß sie zumindest teilweise die komplexen Zusammenhänge erfaßbar machen können. Ein gutes Beispiel stellen hier Mehrgenerationenstudien dar, die zwar viele mögliche adverse Effekte erfassen können, aber technisch und finanziell aufwendig sind, hohe Tierzahlen beanspruchen und zusätzlich noch begleitender mechanistischer Untersuchungen bedürfen.

4.16 Widersprüchliche endokrine Aktivität in *in vitro* und *in vivo* Untersuchungen

In jüngster Zeit werden Verbindungen, deren endokrine Aktivität bislang weitgehend nur in *in vitro* Ansätzen geprüft wurde, verstärkt in Tierversuchen und hier besonders in Mehrgenerationenstudien untersucht. Teilweise ergeben sich sehr deutliche Unterschiede in den Wirkkonzentrationen, aber auch in den biologischen Effekten. Für Bisphenol A liegen viele Ergebnisse aus *in vitro* Untersuchungen vor (s.o.). In den am häufigsten eingesetzten *in vitro* Testsystemen (E-Screen- und Transaktivierungsassay) zeigt Bisphenol A eine ausgeprägte wachstumsstimulierende bzw. reporterageninduzierende estrogen agonistische Aktivität. Die EC_{50} von Bisphenol A im Transaktivierungsassay liegt bei einer Konzentration von ca. 10 nmol/l. Dagegen liegen sehr viele und genaue *in vivo* Daten zu Bisphenol A vor, wie sie für das Zulassungsverfahren als Handelschemikalie zu erbringen sind. Diese auf klassische Endpunkte ausgerichteten Untersuchungen wie akute, subchronische und chronische Toxizität, aber auch Kanzerogenität einer Verbindung lassen keine Präferenz einer möglichen hormonellen Wirkkomponente im Wirkspektrum, der bis zur maximal tolerierbaren Dosis (MTD) verabreichten Verbindung erkennen. Es ergeben sich auch aus den Kanzerogenitätsuntersuchungen keine Hinweise auf eine eventuell stärker ausgeprägte Entwicklung von Neoplasien in endokrin kontrolliertem Gewebe (Jekat, 1998).

Dagegen werden an nicht-klassischen Zielorganen wie der Prostata, insbesondere in Mehrgenerationenstudien, bereits bei sehr geringen Konzentrationen (2 µg/kg Körpergewicht) eine 35%ige Gewichtszunahme in der F1-Generation bei Ratten beobachtet (Nagel, 1997). Dieser Bericht ist aus zwei Gründen besonders interessant. Einerseits kann ein biologischer Effekt von Bisphenol A bereits in einem sehr niedrigen Konzentrationsbereich (geschätzte tägliche Aufnahme 0,15 - 1 µg/kg KG/d; Hugett, 1998; Welsch, 1998) beobachtet werden, andererseits ergibt sich aus der Entdeckung des Estrogenrezeptors β durch die Gruppe um Gustafsson, 1998, eine mögliche mechanistische Erklärung für eine eventuelle Einflußnahme von Estrogenrezeptorliganden auf die Entwicklung eines eigentlich als Zielgewebe für Androgene oder Antiandrogene geltenden Organs wie der Prostata.

Gerade der Estrogenrezeptor β wird im Verlauf der Organdifferenzierung während der Ontogenese männlicher Ratten stark in der Prostata exprimiert. Dabei zeigen die bislang durchgeführten Affinitätsuntersuchungen keine besonders signifikanten Unterschiede mit wenigen, aber deutlichen Ausnahmen (Genistein) hinsichtlich der relativen Bindungsaffinität zwischen Estrogenrezeptor α und β (Tagungsbeitrag DGPT Kuiper; Frühjahrstagung '98). Diese Befunde werden auch durch ältere Arbeiten wie von Ekman et al., 1983, unterstützt, die den Estrogenrezeptor in Prostatagewebe nachweisen konnten und unterschiedliche Bindungsstellen beobachteten, die zum damaligen Zeitpunkt mechanistisch nicht verstanden wurden. Diese widersprüchlichen Befunde zeigen die komplexe Situation auf vor der eine momentane Bewertung des allgemeinen Gefährdungspotentials, das durch endokrine Disruptoren vorliegen könnte, zu erfolgen hätte. Hinzu kommt der mangelnde Kenntnisstand über viele Details der Entwicklungsbiologie, besonders der Geschlechtsdifferenzierung, aber auch mancher ungeklärter Substanzwirkungen, die sich teilweise *in vitro* und *in vivo* noch unterscheiden. Ein solches einprägsames Beispiel liefert Dibutylphthalat (DBP), das häufig als Vertreter der Phthalate allgemein für Untersuchungen herangezogen wird.



Dibutylphthalat

Abb. 4-43: Struktur von Dibutylphthalat

Eine neue Arbeit von Mylchreest, 1998, zeigt einen deutlichen adversen Effekt von Dibutylphthalat (DBP), einem *in vitro* schwachen Estrogenrezeptorliganden, auf die strukturelle und funktionelle Entwicklung der primären und sekundären Geschlechtsorgane der F1-Generation in Ratten. Auch hier widersprechen sich auf

den ersten Blick die zu beobachtenden Wirkungen in den *in vitro* Untersuchungen und den genannten Mehrgenerationenstudien.

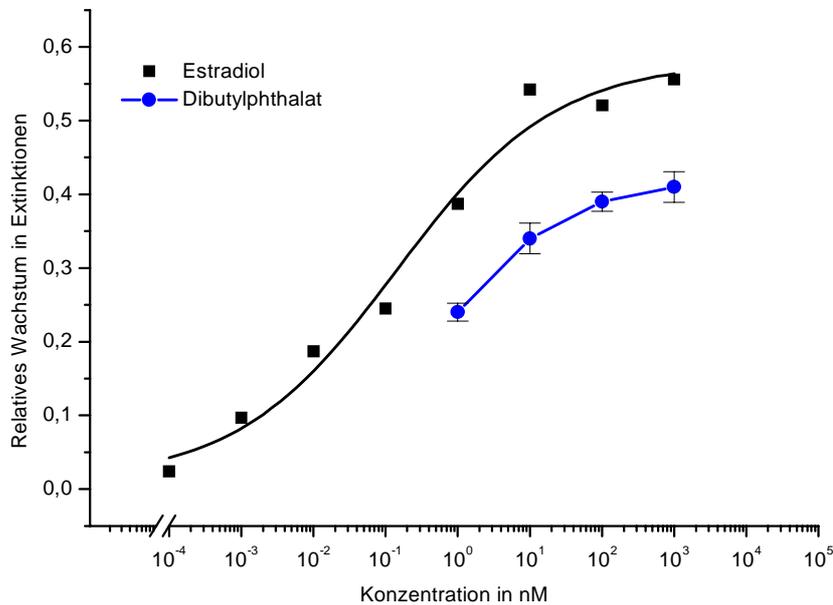


Abb. 4-44:

Dibutylphthalat induziert das Wachstum von MCF-7 Zellen im E-Screen-Assay

Es ist bekannt, daß therapeutische Dosen von Estrogenen teilweise an den Androgenrezeptor binden und als direkte Folge dieser Überflutung die Wirkungen von in physiologischen Konzentrationen vorliegenden Androgenen antagonisieren können. Offensichtlich liegen während der Individualentwicklung bestimmte zeitliche Abschnitte vor, während deren eine definierte Konzentration von physiologischen Hormonen irreversible Differenzierungsvorgänge hervorrufen bzw. steuern. Unphysiologische Verhältnisse während dieser Phasen können somit ebenfalls bleibende Schädigungen der Zielgewebe verursachen.

Im Falle der sekundären und primären Geschlechtsorgane ist damit eine gleichzeitige Verschiebung eventuell beobachtbarer Fehlentwicklungen auf die Zeit während oder nach der Pubertät denkbar. Diese Langzeitwirkungen komplizieren zusätzlich die Beobachtung, aber auch die Bewertung möglicher schädigender Wirkungen, die durch endokrine Disruptoren hervorgerufen werden können.

Über den Einfluß von Verbindungen, die direkte Androgenrezeptorantagonisten darstellen, kann bislang nur spekuliert werden, da der wissenschaftliche

Kenntnisstand bislang als zu gering entwickelt eingestuft werden muß. In Anbetracht der Ergebnisse, die Verbindungen wie Dibutylphthalat ergeben, müssen hier ebenfalls negative Wirkungen zumindest detailliert untersucht werden.

Initiiert durch eine Mehrgenerationenstudie innerhalb des National Toxicology Program (NTP) (NTP, 1991; Wine, 1997) untersuchte das Chemical Industry Institute of Toxicology (CIIT) die Zusammenhänge zwischen DBP und adversen Effekten hauptsächlich in der F1-Generation bei männlichen Nachkommen.

Innerhalb der NTP-Studie konnte kein „No Adverse Effect Level“ (NOAEL) bestimmt werden. Der "Lowest Adverse Effect Level" (LOAEL) wurde bei ca. 66 mg/kg/d für die männliche F1-Generation bestimmt. In der neuen CIIT - Studie wurde ein sehr viel engeres Zeitfenster für die Substanzverabreichung an das Muttertier gewählt. Trotz dieser Modifikation wurden die wesentlichen Ergebnisse der NTP-Studie bestätigt.

Durch diese Untersuchungen kristallisiert sich ein kritisches Zeitfenster von Tag 12 - 20 nach der Befruchtung heraus, währenddessen das Genitalsystem der männlichen Ratte die Hauptdifferenzierungsschritte durchläuft.

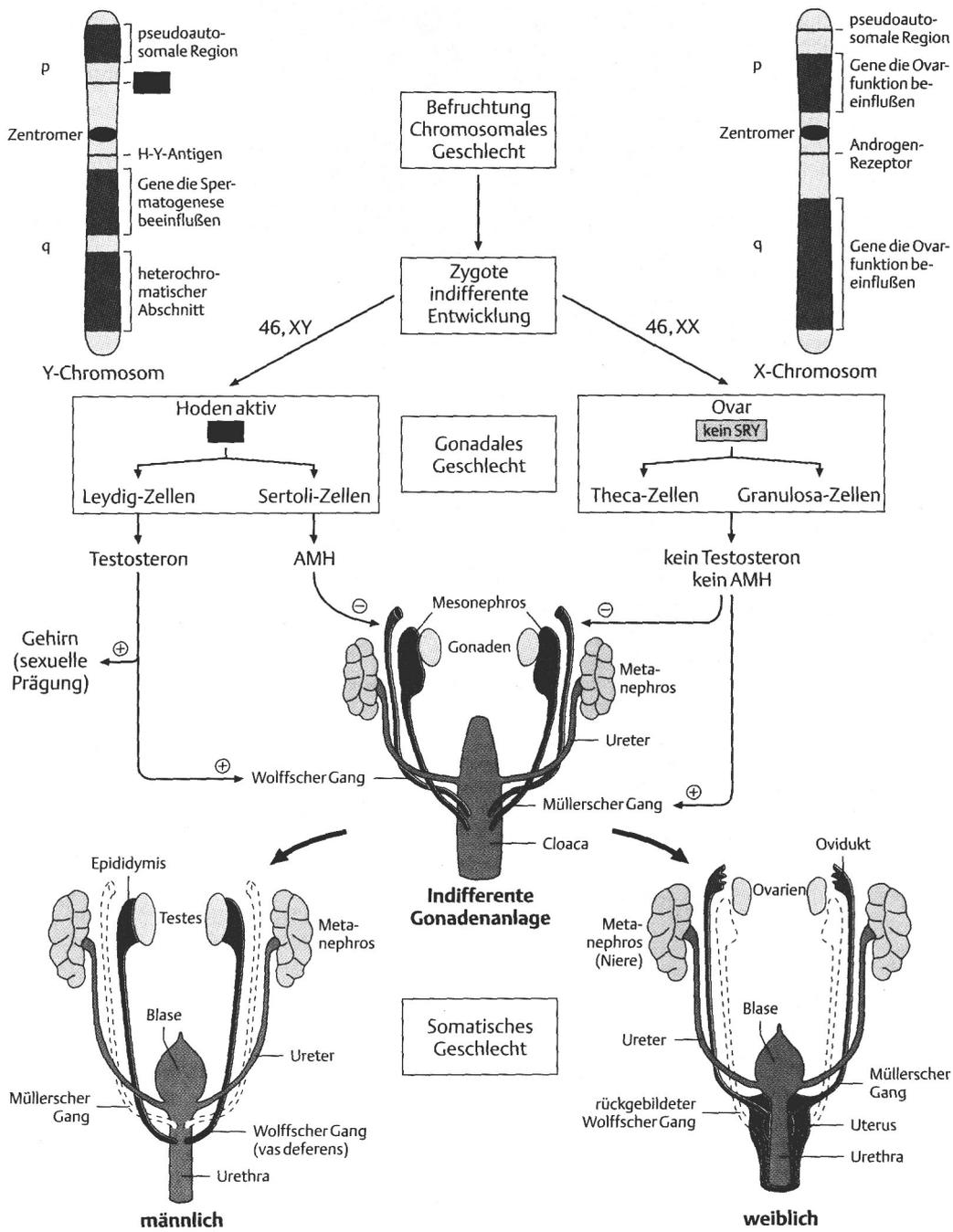


Abb. 4-45: Differenzierungsvorgänge endokrin kontrollierter Gewebe während der Embryonalentwicklung (Spindler, 1998)

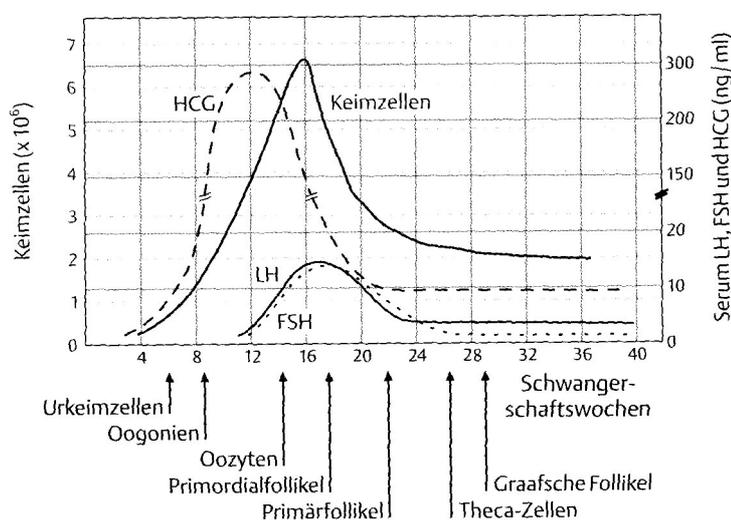
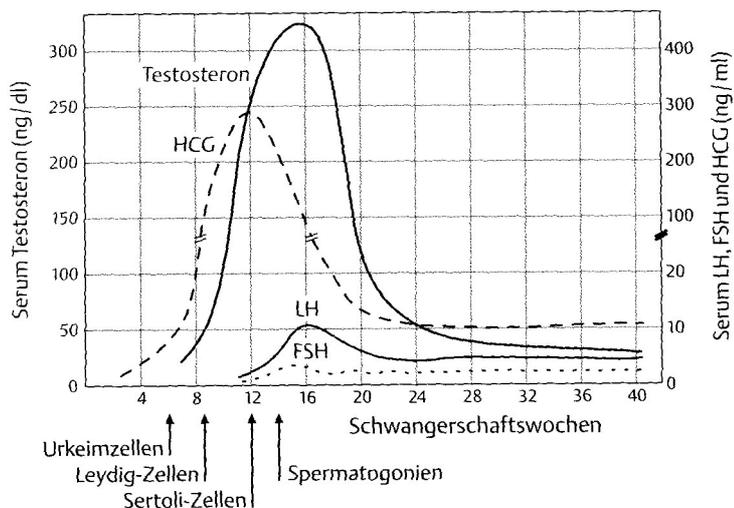


Abb. 4-46: Zeitraum kritischer Einflüsse von Steroidhormonen und Antihormonen während der Embryonalentwicklung der Ratte (Spindler, 1998)

Diese Befunde stützen eindrucksvoll die Hypothese von Sharpe & Skakkebaek, 1993, daß eine Exposition gegenüber endokrinen Disruptoren während kritischer Zeitfenster eine plausible Erklärung für vermehrt auftretende Schädigungen der männlichen Fertilität des Menschen erklären könnte. Sharpe & Skakkebaek sehen die Ursache desweiteren in einer estrogenen Aktivität, die DBP in *in vitro* Systemen entfaltet. Die CIIT - Studie findet *in vivo* keinen Einfluß von DBP auf das weibliche

Endokriniem, was die Autoren der Studie veranlaßt, DBP als nicht estrogen agonistisch einzustufen.

Diese Klassifizierung widerspricht im wesentlichen dem vor dieser Studie allgemein akzeptierten Kenntnisstand. Ebenfalls durchgeführte *in vitro* Untersuchungen konnten einen antagonistischen Effekt von DBP am Androgenrezeptor zeigen. Der vermutlich relevante Metabolit Mono-n-butylphthalat (MBP) zeigt jedoch keinen antagonistischen Effekt am Androgenrezeptor.

Eine für die humane Situation durchzuführende Risikobewertung für eventuelle adverse Fortpflanzungs- und Entwicklungseffekte von DBP über einen hormonell / antihormonell vermittelten Mechanismus wird ausgehend von dem LOAEL-Wert der NTP-Studie 66 mg/kg/d durchzuführen sein.

Ausgehend von diesem Wert ergibt sich eine Referenzdosis von 66 µg/kg/d unter Berücksichtigung eines jeweiligen Faktors 10 für Interspeziesunterschiede, 10 für interindividuelle Unterschiede und 10 für das Fehlen eines NOAEL-Wertes. Humane Expositionsdaten erreichen unter einem "worst case"-Szenario für Kleinkinder durch Aufnahme aus Kinderfertignahrung, berechnet über den Gesamtphthalatgehalt, den Konzentrationsbereich der Referenzdosis von ca. 66 µg/kg/d. Nach Mylchreest, 1998, spricht jedoch der unterschiedliche Metabolismus von Ratte und Primaten einschließlich Mensch gegen mögliche negative Effekte.

Im Gegensatz zu Nagern metabolisieren Primaten DBP mit weitaus geringerer Effizienz als beispielsweise die Ratte zu MBP. Nach Mylchreest kann somit davon ausgegangen werden, daß für den Menschen kein Risiko besteht, schädigende Effekte durch Dibutylphthalat zu erleiden.

Die Studie von Mylchreest erscheint aus zwei Gründen für die Aufklärung der potentiellen Wirkungen von endokrinen Disruptoren interessant. Beispielhaft werden zwei vermutlich sehr wichtige Gesichtspunkte in dieser Studie näher beleuchtet. Das Prüfprotokoll bezieht die offensichtlich wichtigen kritischen prä-, peri- und postnatalen Zeitfenster der Individualentwicklung beider Geschlechter mit ein. Daneben beschränkt sich die Studie nicht nur auf mögliche estrogen agonistische / antagonistische Wirkungen einer Verbindung, sondern schließt auch androgen agonistische / antagonistische Wirkungen mit ein.

4.17 Erarbeitung von strukturellen Eigenschaften möglicher Androgenrezeptor-antagonisten

Wiederum ausgehend von bekannten, in der Literatur beschriebenen Verbindungen, lassen sich mittels detaillierter Strukturüberlegungen möglicherweise weitere Strukturen erfassen. Dies können ebenfalls Verbindungen sein, die im weitesten Sinne mit der Diskussion über endokrine Disruptoren in Zusammenhang stehen können. Möglicherweise finden sich solche Verbindungen, die natürlichen oder anthropogenen Ursprungs sein können, auch verbreitet in Umweltkompartimenten oder Bedarfsgegenständen. Ein gleichzeitiges Vorkommen von estrogen mimikrierenden Verbindungen und androgen antagonisierenden Verbindungen können möglicherweise für sich entwickelnde oder auch adulte männliche Organismen schlecht tolerierbare und teilweise irreversible Folgen nach sich ziehen.

Durch die ökotoxikologischen Beobachtungen und den aus der Epidemiologie entstandenen Verdachtsmomenten begründete sich die Überlegung, daß nicht nur estrogen aktive Verbindungen, sondern auch Verbindungen, die mit dem Androgenrezeptor wechselwirken für die Bewertung möglicher negativer Effekte auf Mensch und Tier berücksichtigt werden müssen. Unterstützt wurden diese Überlegungen durch zwei bedeutende Arbeiten von Kelce, 1995, und Wong, 1996, aus dem Umfeld von Wilson, Chapel Hill, North Carolina, und Gray, EPA, USA. Kelce berichtet vom antiandrogenen Potential des Säugermetaboliten von p,p'-DDT, p,p'-DDE, das zu 80 % in technischen DDT-Produkten vorliegt (she. Einleitung und Bisphenoldiskussion).

Wong beschreibt das antiandrogene Potential eines Metaboliten von Vinclozolin, einem Fungizid, welches strukturelle Ähnlichkeiten zu klinisch etablierten Verbindungen wie Hydroxyflutamid[®] oder Casodex[®] aufweist. Besonders interessant erscheint, daß beide Verbindungen strukturell keine auffallenden Ähnlichkeiten aufweisen. In eigenen Überlegungen wurde auch ausgehend von Hydroxyflutamid[®] und Casodex[®] nach weiteren Verbindungen gesucht, die ebenfalls mit diesen Strukturen zumindest Teilhomologien aufweisen.

Durch eine genaue Analyse der für die antihormonelle Aktivität essentiellen Strukturinkremente ergab sich eine diesen Verbindungen gemeinsame "Leitstruktur". Mittels dieser Consensusstruktur konnten durch die *on line* Analyse der Datenbank

"Beilstein-Crossfire" tatsächlich Verbindungen identifiziert werden, die in der Diskussion über endokrine Disruptoren immer wieder genannt werden. Besonders auffällig zeigten sich die Strukturähnlichkeiten bei den Phenylharnstoffderivaten und hier speziell solcher Verbindungen, die am N-Terminus hydroxiliert sind wie Linuron, Monolinuron oder Monobromuron.

Inwieweit weitere Phenylharnstoffderivate für eine antiandrogene Aktivität relevant sind kann bisher nicht geklärt werden. Für eine Klärung dieser Fragestellung wären umfangreiche Metabolismus- sowie toxikokinetische-Untersuchungen im Tier notwendig.

Für eine erste Erfassung der antiandrogenen Aktivität der genannten Verbindungen kann ein Transaktivierungsassay in transgenen Zellen benutzt werden. Eine eukaryontische Zelle kann mittels eines Expressionsvektors, der für den Androgenrezeptor kodiert und mittels eines Reporter-genvektors, der eine Reporter-geninduktion unter Kontrolle eines steroidhormonrezeptorabhängigen Promotors erlaubt, cotransfiziert werden.

In diesem speziellen Fall sollten COS-7-Zellen transfiziert werden, die durch die Transfektion mit einem im Origin deletierten SV 40-Vektor immortalisiert sind. Durch die Expression des Large T Antigens, das durch diese Transfektion in der Zelle produziert wird, ergibt sich für Expressionsplasmide, die auf einem SV 40-Promotor aufbauen, eine erhöhte Transkriptionseffizienz.

Daneben sollte der Mouse Mammary Tumour Virus (MMTV)-Luciferase Reporter-genvektor in diese Zellen transfiziert werden. Dies gelang jedoch nicht vollständig. Es konnte zwar mittels Western-Blot der rekombinante Androgenrezeptor in sehr schwacher Konzentration nachgewiesen werden, eine funktionelle Prüfung des Reporter-genplasmids mißlang jedoch in mehreren Versuchen.

Dies kann vielfältige Ursachen haben:

1. Einer der beiden Plasmide erbringt nicht die gewünschte Funktion.
Dies kann inzwischen ausgeschlossen werden, da dieses Meßsystem nach

verschiedenen Optimierungsschritten funktioniert und auch evaluiert werden konnte (Guth, 1998).

2. Die Transfektionseffizienz war möglicherweise zu gering. Die ersten Transfektionsversuche mußten mittels chemischer Transfektionsvermittler unternommen werden, deren Effizienz bei der Transfektion von Eukaryontenzellen gering ist. Deshalb wurde versucht ein verbessertes Transfektionssystem zu etablieren. Dies gelang durch die Anschaffung eines Elektroporators der Fa. Invitrogen, der auch für die aktuellen Transfektionsversuche eingesetzt wird. Dieses Transfektionssystem dient auch der Transfektion weiterer eukaryontischer Zelllinien, aber auch der von Prokaryonten. Auch die Befunde aus Punkt 1 sprechen für eine sehr geringe Transfektionseffizienz der chemischen Methoden. Die Transfektionseffizienz sinkt direkt proportional mit der Größe des einzuschleusenden Plasmides. Der Expressionsvektor pSG5-Ar kann mit 4,9 kb noch zu den kleinen Plasmiden gezählt werden, während der Reportergenvektor MMTV-tk-Luciferase mit 10,9 kb eindeutig zu den sehr großen Vektoren zu rechnen ist.
3. Die Sensitivität des Meßinstrumentes der Enzymaktivität (Luminometer) war möglicherweise nicht ausreichend für eine Bestimmung der entstandenen Photonen.
Das benutzte Leihgerät erlaubte auch keine Veränderung der Meßzeit, so daß auch keine Summation der gemessenen Ereignisse möglich war. Für die neueren Arbeiten steht ein Mikrotiterplattenluminometer mit guter Sensitivität und benutzerfreundlichen Konfigurationsmöglichkeiten zur Verfügung.
4. Es wurde versucht, möglichst stabile Klone zu gewinnen, deshalb wurde immer erst nach mehreren Tagen die Reportergenaktivität bestimmt. Mit länger andauernder Wartezeit steigt jedoch auch die Wahrscheinlichkeit, daß die Plasmide von den Wirtszellen wieder ausgeschleust werden.

Diese Parameter und weitere Verbesserungen wie erhöhte Kopienzahl der Plasmide, die für die Transfektion benutzt werden, tragen dazu bei, daß mittlerweile eine gute Transfektions - und Meßsicherheit in den Versuchen erzielt wird.

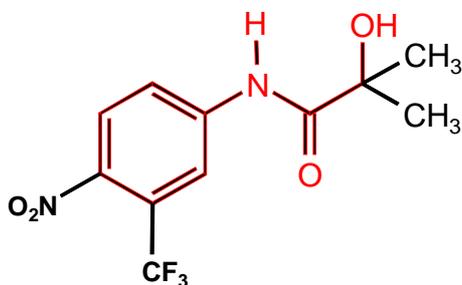
Mittels dieses Testsystems kann in einem ersten Screeningschritt die antiandrogene Funktion von Verbindungen erfaßt werden, die durch die theoretischen Überlegungen als potentiell wirksam identifiziert wurden. Der Nutzen der *in vitro*

Systeme beschränkt sich nicht nur auf die Erfassung einer estrogenen oder antiandrogenen Aktivität einer Verbindung. Durch die qualitative und quantitative Prüfung der Funktion einer Testsubstanz kann auch eine relative Einstufung der Aktivität einer Substanz mit definierten Struktureigenschaften im Verhältnis zu weiteren Struktur- oder Wirkhomologen erfolgen.

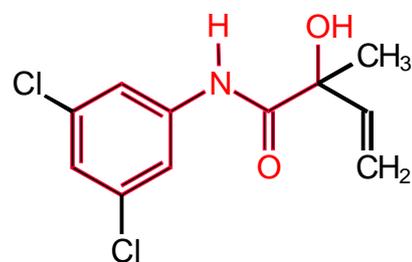
Neben den reinen theoretischen molecular modeling Daten fließen hier die logarithmierten IC_{50} - bzw. EC_{50} - Werte, die im funktionellen Testsystem erarbeitet wurden, in die Gesamtbetrachtung der Zusammenhänge mit ein. Diese sogenannte Comparative Molecular Field Analysis (CoMFA) erlaubt bei einer rechnergestützten Durchführung direkt die Prüfung der Güte der erarbeiteten Zusammenhänge und bei ausreichender Qualität der linearen Regression innerhalb einer Strukturgruppe auch eine Darstellung der Parameter, die eine optimierte Leitstruktur ergeben könnten.

Diese Möglichkeiten des molecular modeling wurden genutzt, um ausgehend von klinisch etablierten Antiandrogenen weitere Strukturanaloga zu identifizieren, deren antiandrogenes Potential bisher nicht bekannt war.

Von großer klinischer Relevanz sind verschiedene Antiandrogene in der Therapie des malignen Prostatakarzinoms. Neben steroidalen Antiandrogenen werden besonders auch nichtsteroidale Verbindungen eingesetzt, die meist geringere Nebenwirkungen auf das gesamte endokrine System entfalten als steroidale Antihormone. Ausgehend von bekannten klinisch etablierten Verbindungen wurde durch einen primären Strukturvergleich versucht, eine gemeinsame Grundstruktur zu ermitteln.



OH-Flutamid



Vinclozolin Metabolit 2

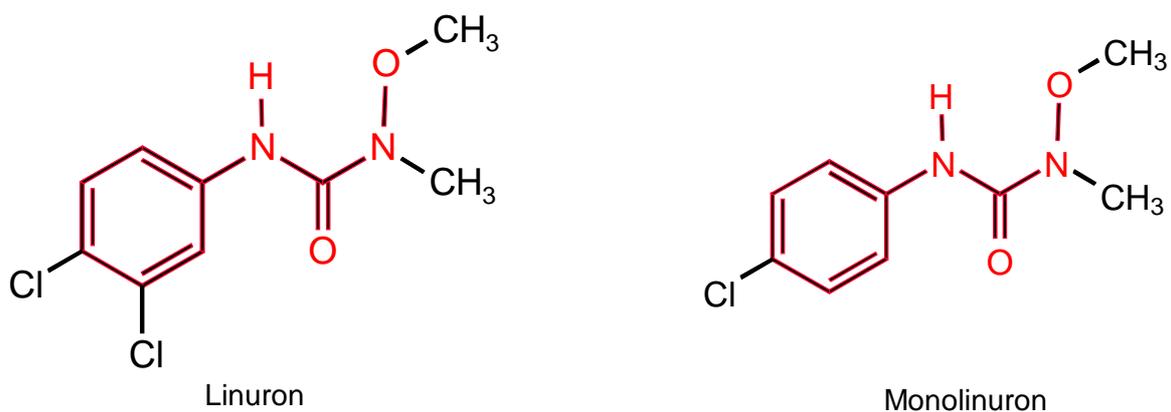


Abb. 4-47: Grundstruktur nicht-steroidaler Antiandrogene

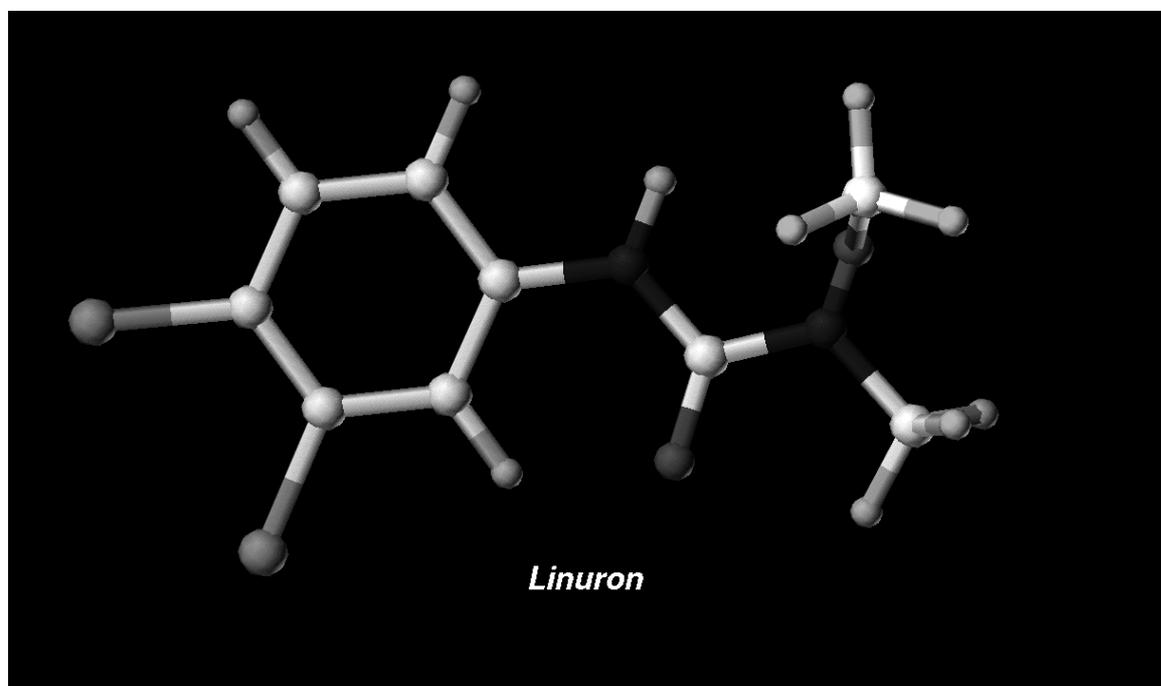


Abb. 4-48: Energieminimierte Struktur des potentiellen Antiandrogens Linuron

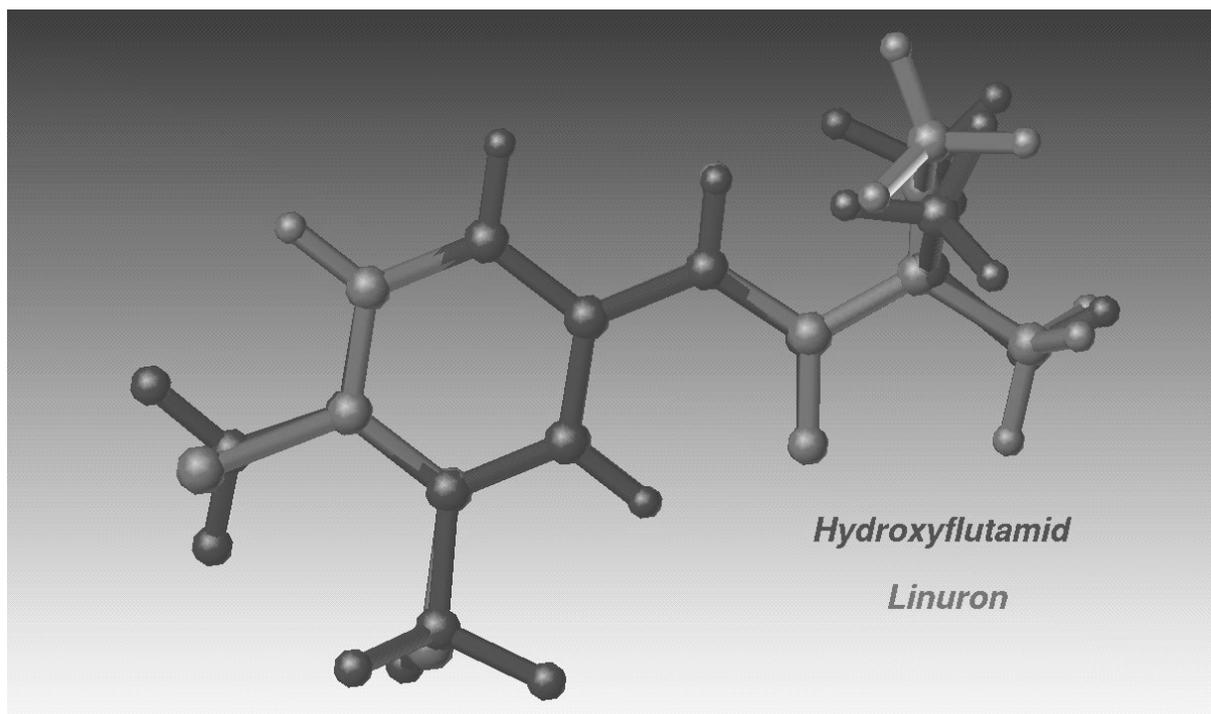


Abb. 4-49: "Fit" des potentiellen Antiandrogens Linuron mit Hydroxyflutamid

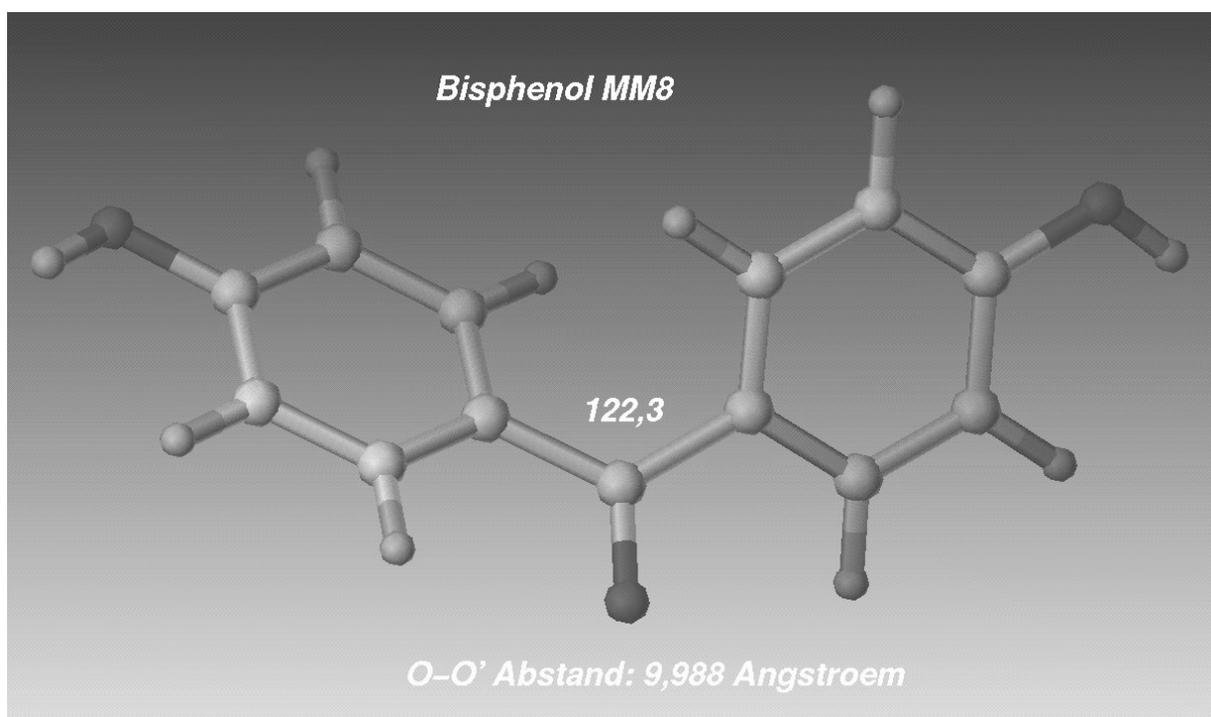


Abb. 4-50: Energieminimierte Struktur des Benzophenons MM8

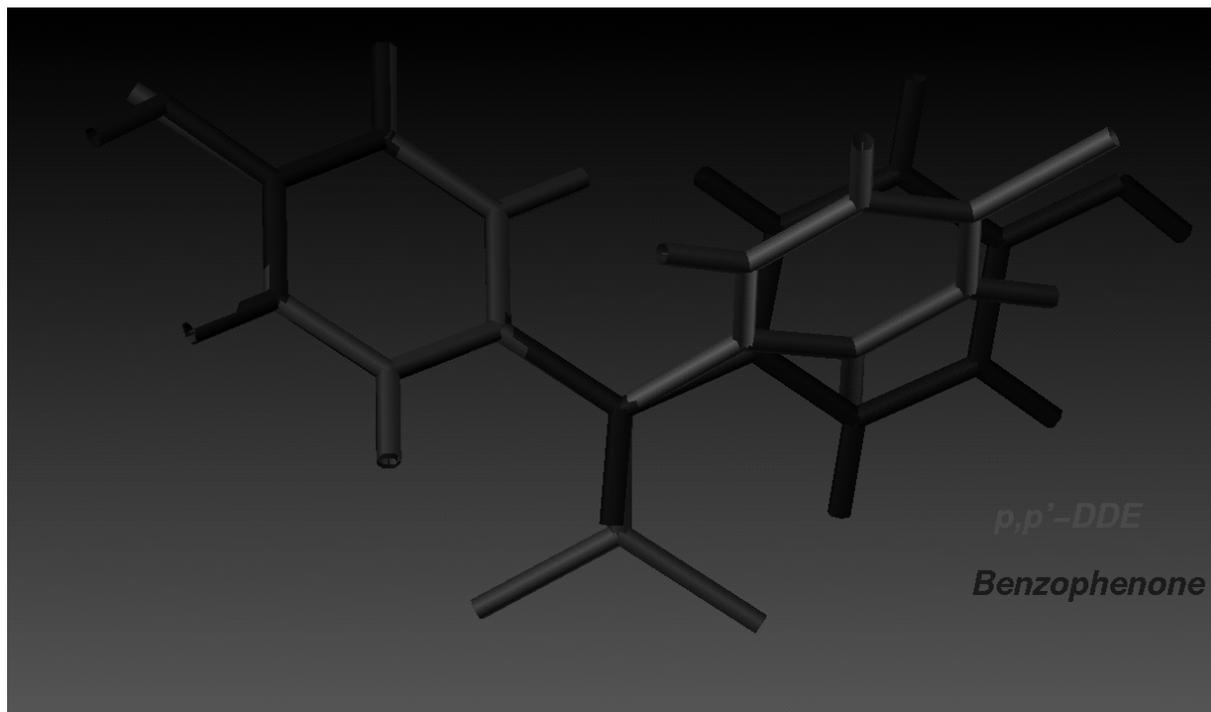


Abb. 4-51: "Fit" des potentiellen Antiandrogens Benzophenon MM8 mit p,p' -DDE

Durch die Operation des Molekülfittings wird die Strukturähnlichkeit der zu vergleichenden Verbindungen optisch qualitativ besonders deutlich. Zusätzlich erlaubt diese Programmfunktion die Angabe eines quantitativen Maßes als Quadratwurzel der Abstände der einzelnen Moleküle voneinander. Eine sehr kleine Zahl bedeutet somit eine weitgehende Übereinstimmung der verglichenen Verbindungen.

Für die oben genannten Antiandrogene lies sich bisher keine CoMFA-Analyse durchführen, da das *in vitro* Testsystem noch nicht zur Verfügung stand.

Trotzdem lassen die deutlichen Übereinstimmungen, die durch die theoretischen Überlegungen ersichtlich werden vermuten, daß die theoretisch erarbeiteten Verbindungen auch tatsächlich als Antiandrogene fungieren.

Weitere Antiandrogene stellen Strukturanaloga von p,p' -DDE dar. Diese Stoffe weisen eine eindeutig andere Struktur auf als die gerade beschriebenen hydroxyflutamidanalogen Verbindungen.

Zukünftig wird zu klären sein, ob diese beiden unterschiedlichen Verbindungsklassen mit demselben Rezeptorteil wechselwirken. Leider sind die Kenntnisse über mögliche Bindungsverhältnisse im Androgenrezeptor nicht soweit ermittelt wie die

des Estrogenrezeptors. Für den Estrogenrezeptor liegen bereits ausführliche kristallographische Daten zu Estrogen-Estrogenrezeptor-Hormonbindende Domäne-Komplexen vor. Hierdurch und durch Mutationsstudien (site directed mutagenesis) lassen sich bereits konkrete Aussagen über Aminosäuren treffen, die für die Ligandenbindung hauptsächlich verantwortlich sind. Dieses Wissen erlaubt anschließend wiederum eine verbesserte theoretische Ermittlung einer möglichen Rezeptor-Ligand-Wechselwirkung mit weiteren Liganden.

Diese für den Estrogenrezeptor bereits gegebenen Möglichkeiten sind für den Androgenrezeptor noch lange nicht möglich. Somit ist man weiterhin auf die Nutzung von QSAR-Daten von bereits bekannten Verbindungen angewiesen.

4.18 Diskussion der erarbeiteten Ergebnisse und des derzeitigen wissenschaftlichen Kenntnisstandes über endokrine Disruptoren

In der vorliegenden Arbeit sollten verschiedene *in vitro* Screeningverfahren für sogenannte endokrine Disruptoren etabliert werden. Das weitergehende Ziel war eine verbesserte Strukturierung und Klassifizierung potentieller endokriner Disruptoren. Zu diesem Zweck wurden neben dem Erarbeiten von Dosis-Wirkungsbeziehungen einzelner Verbindungen auch die detaillierte Aufklärung von Struktur-Wirkungsbeziehungen angestrebt.

Hierzu wurden sowohl klassische Strukturüberlegungen wie auch neuartige molecular modeling Verfahren eingesetzt. *In vitro* Testverfahren und rechnergestützte molecular modeling Verfahren konnten jeweils ergänzend durchgeführt werden. Somit konnte zumindest exemplarisch eine Testsystematik etabliert werden, die eine breite Anwendung in verschiedenen wissenschaftlichen Gebieten erlaubt. Der Einsatz dieser Testsysteme ist sowohl in der Nahrungsmittel- und Bedarfsgegenständeanalytik als auch in der Umweltanalytik vorstellbar.

Ein weiteres sehr interessantes Anwendungsgebiet dieser Testmethoden stellt die Suche nach Wirkstoffen dar. Deren therapeutisches Potential kann im Zusammenspiel von funktionellen *in vitro* Testsystemen und molecular modeling Verfahren in der frühen Entwicklungsphase neuartiger Wirkstoffe geprüft und gegebenenfalls weiterentwickelt werden.

Eines der etablierten *in vitro* Verfahren stellt einen Wachstumsassay in intakten Mammakarzinomzellen dar, die unter einer Estrogengabe ein verstärktes Wachstum zeigen. Für diesen Proliferationsassay (E-Screen-Assay) wird die humane Mammakarzinomzelllinie MCF-7 benutzt, die unter anderem den Estrogenrezeptor exprimiert. Dieser kernständige ligandabhängige Transkriptionsfaktor stellt ein Schlüsselprotein der biologischen Reaktion auf einen estrogenen Stimulus dar.

Ein wesentlicher Vorteil des Testsystems gegenüber der bloßen Bestimmung der Bindungsaffinität eines Liganden an den präparierten Rezeptor wird die Bestimmung der Proliferation der Zelle angesehen; d. h. das Zielprotein liegt im intakten zellulären Kontext vor und der gesamte durch die Verbindung induzierte Stimulus unterliegt den verschiedensten Regulationsmechanismen. Dieser Sachverhalt ist um so wichtiger, je mehr Details über die verschiedensten Phasen der zellulären Signaltransduktion, die durch Steroidhormonrezeptoren vermittelt werden, bekannt werden (siehe Theorie). Der Wachstumsassay birgt jedoch auch entscheidende Nachteile in sich. So sind von verschiedenen Phytoestrogenen neben der Interaktion mit dem Estrogenrezeptor auch Wechselwirkungen mit anderen für die zelluläre Signaltransduktion bedeutenden Enzymen oder Transkriptionsfaktoren bereits bekannt (s.o.). Diese weiteren Wirkungen können teilweise erheblichen Einfluß auf das Wachstum der Zielzellen ausüben. Besonders interessant erscheinen gerade die Estrogenrezeptorliganden pflanzlicher Herkunft, die teilweise auch eine zentrale Rolle bei estrogenrezeptorunabhängigen Signaltransduktionsketten spielen. Als Paradebeispiele können hier Genistein, Daidzein, Resveratrol und auch Piceatannol hervorgehoben werden (siehe Diskussion der jeweiligen Einzelergebnisse).

Hier ist bereits heute bekannt, daß die estrogenrezeptorunabhängigen Signaltransduktionswege für das zelluläre Wachstum von ebenso großer oder sogar größerer Bedeutung sein können als die Effekte, die estrogenrezeptorvermittelt ablaufen (Wang, 1998; Johnson, 1995; Oliver, 1994). Durch diese vielfältigen Regulationsvorgänge, die ein singuläres Signal, das durch einen Steroidhormonrezeptorliganden über einen Steroidhormonrezeptor vermittelt wird, hervorruft, kann der zu bestimmende Endpunkt, Wachstum, alleine nicht als Maß für die hormonelle Potenz der Verbindung dienen.

Eine Ergänzung dieses Wachstumsassays stellen Transaktivierungsassays dar. Diese Testsysteme können durch spezifische Transfektionen von Expressions- und Reporter-genvektoren in nahezu beliebig wählbare Zielzellen gewonnen werden. So ist es möglich, eine Zelle spezifisch mit einem Reporter-genvektor zu transfizieren,

die weitgehend den natürlichen Wild-Typ repräsentiert. Daneben können ursprünglich steroidhormonrezeptorfremde Zellen so verändert werden, daß sie einen spezifischen rekombinanten Steroidhormonrezeptor und ein entsprechendes Reportergenkonstrukt exprimieren. Beide Möglichkeiten bieten je nach Fragestellung Vorteile, haben aber auch ihre Beschränkungen.

Gegenüber dem Wachstumsassay weisen beide transgenen Varianten teilweise entscheidende Vorteile auf (Shekhar, 1997). Die Möglichkeit, das Reportergen als Maß für die hormonelle oder antihormonelle Potenz zu nutzen, verbessert die Spezifität des Testsystems. Daneben ist zu beachten, daß es sich bei diesen Systemen durchweg um transgene Konstrukte handelt. Aus diesen Gründen wurden in allen Versuchsansätzen Positiv - und Negativkontrollen mitgeführt. Außerdem konnte die Validität der transgenen Testsysteme durch Prüfungen von bereits bekannten estrogen aktiven Verbindungen vielfach verifiziert werden.

Ergänzende Testverfahren, die die sensitive und selektive Erfassung endogener Markergene erlauben werden zukünftig ebenfalls genutzt werden können. Hierzu zählen durch Estrogene positiv regulierte Gene wie pS2, bei den Androgenen PSA, aber auch negativ regulierte Zielgene wie das TRPM-2, das nach Androgenablation induziert wird. Viele verschiedene Zielgene sind auch in tierischem Gewebe bestimmbar. Als Nachweistechiken bieten sich Northern-Blotting, quantitative RT-PCR oder teilweise auch ELISAs an.

Da bis heute nicht geklärt ist, ob und inwieweit eine Bedrohung der Gesundheit von Mensch und Tier durch endokrine Disruptoren gegeben ist, ist eine Risikoabschätzung auf Basis von *in vitro* Befunden, wie sie auch in dieser Arbeit erarbeitet wurden, nicht möglich. Der Wert der erzielten Ergebnisse liegt dagegen vor allem in neuen mechanistischen Einsichten und der strukturellen Systematisierung potentieller endokriner Disruptoren.

Daß mögliche negative Wirkungen von endokrinen Disruptoren nur übertriebene Panikmache ist, die nur auf Ergebnissen aus artifiziellen Testsystemen beruhen, kann jedoch so auch nicht gelten gelassen werden. Neben Verdachtsmomenten aus epidemiologischen Untersuchungen und Wildtierbeobachtungen (siehe Einleitung), lassen sich vermehrt auch *in vivo* negative Effekte in solchen Studien nachweisen, die verschiedene Gesichtspunkte wie eine gegenüber älteren Studien modifizierte

Applikationsart und -form, aber auch möglicherweise entscheidende Applikationszeiten beachten.

So ergaben sich beispielweise für Diethylphthalat (DEP) eindeutige Hinweise, daß DEP nur einen negativen Effekt auf die Spermienbildung in der F1-Generation von Swiss CD-1 Mäusen entwickelt, wenn die Studien nach dem sogenannten Reproductive Assessment by Continuous Breeding (RACB) Studiendesign durchgeführt wurden (NTP-study number RACDB 83092).

Ältere Studien, die auch Kanzerogenisierungsuntersuchungen einschlossen, ergaben keinen Hinweis auf mögliche endokrine Effekte von DEP. Weder in den kurzzeitigeren toxikologischen Untersuchungen noch im Kanzerogenitätsmuster ergaben sich Hinweise auf mögliche schädigende endokrine Effekte (NTP-study number TR 429). Dies ist auch der Grund weshalb sehr viele alte Studien mit erweitertem Studiendesign heute erneut durchgeführt werden.

Interessant erscheinen dadurch auch Vergleiche zwischen älteren Kanzerogenitätsstudien, wie sie bisher für die Zulassung als Handelschemikalie nachzuweisen waren, und Studien, die auch bisher nicht-klassische Endpunkte für eine Risikobewertung mitberücksichtigen. Beispielhaft können hier Arbeiten von Jekat (1998) und Nagel (1997) Bisphenol A betreffend, betrachtet werden. Hier stehen sich zwei weitgehend unterschiedlich durchgeführte und ausgewertete Tierstudien gegenüber. Für eine abschließende Bewertung der jeweiligen Studien müssen weitere experimentelle Erkenntnisse abgewartet werden.

Diese Beispiele zeigen deutlich, daß die toxikologischen Untersuchungen, die die Basis für ADI/TDI/NOEL/NOAEL etc. bilden, dem jeweiligen Stand der wissenschaftlichen Kenntnisse entsprechen und nach den zu diesem Zeitpunkt allgemein anerkannten Methoden durchgeführt worden sind. Somit ist es nicht unmöglich, daß insbesondere ältere Studien bereits Mängel in der Planung (Inkubationszeitraum / Applikationsschema) sowie auch in der Auswertung (hormonelle Effekte wurden möglicherweise nicht berücksichtigt) aufweisen.

Derzeit liegen keine Belege vor, daß endokrine Disruptoren für den Verbraucher eine gesundheitliche Gefährdung darstellen. Lediglich für optische Aufheller, Chlordecone und DES liegen arbeitsmedizinische Berichte vor, daß Arbeiter unter einer ganz spezifischen Expositionssituation negative hormonelle Effekte, wie reduzierte Fertilität und reduzierte Testosteronlevel zeigten (Landrigan, 1983; Smith, 1992; Whelan, 1996).

Diese ganz spezielle Expositionssituation kann mit der Gefahrensituation des Verbrauchers nicht verglichen werden, da die allgemeinen Aufnahmemengen sehr gering sind. Sie liegen deutlich unter den Dosen, die im Tierversuch bestimmte Parameter verändern, die mit einer endokrinen Wirkung zusammenhängen könnten und auch unter den mit erheblichen Sicherheitsfaktoren abgeleiteten ADI- und TDI-Werten. Diese Meinung wird auch von verschiedenen nationalen und internationalen Expertengremien vertreten. Trotzdem besteht allgemeiner Konsens darüber, daß vielfältige Kenntnislücken bestehen und daß auf verschiedenen Gebieten Forschungsbedarf gegeben ist (Eisenbrand, 1998).

Hormonähnliche Wirkqualitäten sind ein neuer Aspekt in der Beurteilung des toxikologischen Wirkspektrums von Chemikalien. Inwieweit eine tatsächliche Gefährdung des Verbrauchers oder in der Herstellung und Anwendung Beschäftigter zu befürchten sind, kann zur Zeit nicht abschließend beantwortet werden. Das Vorsorgeprinzip im gesundheitlichen Verbraucherschutz gebietet jedoch auch, potentielle gesundheitliche Gefahren zu erkennen und daraus potentiell resultierende Risiken zu minimieren. Für die toxikologische Bewertung von Chemikalien mit möglicher endokriner Wirkung besteht die Notwendigkeit, deren mögliches Gefährdungspotential bei der Neuzulassung und im Rahmen der Risikobewertung von sogenannten "Altstoffen" auf verschiedenen Stufen zu prüfen.

Da diese neuen möglichen Wirkaspekte in der toxikologischen Bewertung von Chemikalien sehr vielschichtig sein können besteht bislang kein Einverständnis darüber, welche Prüfmethoden und Prüfsysteme für den Nachweis oder die Voraussagbarkeit von endokrin-assoziierten Wirkungen von Chemikalien erforderlich sind. Die Gründe liegen vor allem in den komplexen, teilweise bisher nicht vollständig verstandenen physiologischen Zusammenhängen. So gibt es verschiedene, von endogenen Hormonen abhängige biologische Systeme, die einem Regelkreis unterliegen, d. h. das Hormonsystem bzw. die hormonähnliche Wirkqualität als solche gibt es nicht (siehe Theorie / Einleitung).

Außerdem kann heute a priori noch nicht abgeschätzt werden, welches Ausmaß an endokriner Fehlregulation bzw. Ungleichgewicht vorliegen muß, bevor Störungen für den Gesamtorganismus relevant werden, da endokrinabhängige Gewebe einer fein regulierten Homeostase unterliegen. Dies gilt im Besonderen bei einer versuchsweise durchgeführten Extrapolation von *in vitro* Befunden auf ein mögliches humanes Gefährdungspotential. Weiterhin gibt es bislang nur Hinweise darauf, wo und wie sich solche Störungen manifestieren, also welche Wirkungen auf welcher

Organisationsstufe eines Organismus auftreten können und wie sie sich letztlich auswirken (siehe Nagel et al., 1997, Prostatagewichtsreduktion in F1-Generation einer relevanter Endpunkt?).

Aus diesen vielschichtigen Fragen wird deutlich wie notwendig es ist, zu klären, welche Wechselwirkungen mit welchem hormonabhängigen biologischen System oder welche schädigenden Effekte für die menschliche Gesundheit oder auch für die Funktion von Ökosystemen relevant sein können.

Diese Fragen sind nur durch weitergehende systematisierte Untersuchungen zu klären. Diese Untersuchungen müssen verschiedenste Anforderungen erfüllen können. So muß eine Relevanz des biologischen Endpunktes, der bestimmt wird, vorliegen und diese muß zweifelsfrei belegt sein. Die Testsysteme müssen weltweit validiert werden und sollten von möglichst vielen Laboratorien durchführbar sein. Es sollte eine relativ günstige Kosten- und Zeiteffizienz vorliegen, desweiteren sollte darauf geachtet werden, daß auch Tierersatzmethoden herangezogen werden können, da durch die vielfältigen Fragestellungen hohe Tierzahlen und ein erheblicher Kostenaufwand entstehen könnte.

Eine von der OECD Joint Working Group Endocrine Disruptor Testing und Assessment (OECD-EDTA; 1998) vorgeschlagene Teststrategie sieht Prüfungen auf drei verschiedenen Testebenen vor:

- Screening-Untersuchungen zur
 - a) Prioritätensetzung für weitere Prüferfordernisse (*in vitro* / *in vivo*)
 - b) Charakterisierung von Wirkmechanismen (*in vitro* / *in vivo*)
- Prüfungen zur Identifizierung und Charakterisierung möglicher hormonähnlicher Effekte von Chemikalien
- Prüfungen zur Auswirkung hormonähnlicher Effekte von Chemikalien (definitive Prüfung)

Dieses Schema und die vorgestellten Ergebnisse zeigen, daß die in dieser Arbeit etablierten *in vitro* Methoden geeignete Screeningverfahren darstellen. In Kombination mit den ebenfalls etablierten molecular modeling Verfahren ergeben sich Möglichkeiten, neue strukturähnliche Verbindungen zu identifizieren. Somit kann eine Selektion von relevanten Strukturinkrementen erfolgen.

4.19 Versuch eines "risk assessment" für verschiedene endokrine Disruptoren

Auf dem heutigen wissenschaftlichen Kenntnisstand ist eine Risikoabschätzung für den Menschen nur begrenzt durchführbar. Eine vorläufige Berechnung des relativen Risikos für den Menschen ist bislang nur für einzelne Stoffe und nur mit erheblichen Einschränkungen möglich.

Vorab muß darauf hingewiesen werden, daß aufgrund der Ergebnisse von Mehrgenerationenstudien davon ausgegangen werden muß, daß Tiere und der Mensch verschiedene Entwicklungsstadien durchlaufen, während der die Individuen eine deutlich unterschiedliche Anfälligkeit gegenüber endokrinen Disruptoren zeigen. So zeigt sich, daß vor allem definierte Zeitfenster während der Entwicklung *in utero* bei männlichen Nachkommen erheblichen Einfluß von endokrinen Disruptoren möglich erscheinen lassen. So können die grundlegenden Mechanismen der sexuellen Differenzierung in Säugern während der Individualentwicklung weitgehend als gleichartig angesehen werden (Spindler, 1997).

Wie Abb. 4-42 zeigt, werden durch zeitlich eng umrissene Entwicklungsstufen und definierter Androgenrezeptorexpression und Testosteron - Dehydrotestosteronspiegel der männliche Phänotyp ausgebildet. Bei der Ratte geschieht dies von Tag 12 - 20 nach der Befruchtung (Spindler, 1997), beim Menschen um den Tag 65 nach der Befruchtung. Beim Fehlen von Testosteron wird der weibliche Phänotyp ausgebildet unabhängig davon, ob Ovarien vorliegen oder nicht. Dies führt zu der Befürchtung, daß auch eine Antagonisierung der Testosteronwirkung am Rezeptor durch Testosteronantagonisten zur partiellen Ausbildung des weiblichen Phänotyps führt oder zumindest teilweise zu strukturellen und auch funktionellen Schädigungen der männlichen Genitalien führen kann.

Ähnliches wäre zu befürchten, wenn durch genetische Regulationsmechanismen, die eventuell durch endokrine Disruptoren beeinflusst werden, die Expression des Androgenrezeptorproteins beeinträchtigt wird.

Ergebnisse aus Tierversuchen lassen beide Mechanismen als durchaus möglich erscheinen (Mylchreest, 1998; Kelce, 1998).

Die Expositionssituation während der sexuellen Differenzierung erscheint aus mehreren Gründen für die Frage nach der Relevanz von endokrinen Disruptoren von besonderem Interesse:

- Die Geschlechtsentwicklung kann bereits durch geringe Substanzkonzentrationen von endokrinen Disruptoren beeinflusst werden.
- Auch eine vorübergehende Exposition gegenüber endokrinen Disruptoren kann dauerhafte und irreversible körperliche Schäden, aber auch funktionelle Störungen hervorrufen.
- Besonders funktionelle Fehlentwicklungen manifestieren sich erst nach der Pubertät oder noch später.
Dies könnte mit eine Rolle spielen, warum in älteren Tierstudien oft keine negativen Wirkungen von potentiellen endokrinen Disruptoren detektiert wurden (vgl. NTP-Studie RACB-DEP gegen ältere Studie).
- Mögliche negative Wirkungen auf die sexuelle Differenzierung können nicht von No adverse Effect level (NOAEL) abgeleitet werden, die in erwachsenen Tieren bestimmt wurden. Da die Genitalien erwachsener Tiere vollständig differenziert sind ist denkbar, daß diese deutlich höhere Wirkspiegel von endokrinen Disruptoren noch tolerieren können als sich entwickelnde Individuen.

Um diese Gefahr der falsch-negativen Bestimmung eines NOAEL in erwachsenen Tieren zu vermeiden, der auf sich entwickelnde Tiere negativ auswirken könnte, müssen weitergehende reproduktions-toxikologische Daten erarbeitet werden.

Neben diesen reproduktions-toxikologischen Fragestellungen bleiben auch Fragen zur Verteilung der endokrinen Disruptoren und dem daraus resultierenden Vorkommen in endokrin abhängigem Gewebe bislang unzureichend beantwortet.

Aufgrund ihrer Lipophilie und langer biologischer Halbwertszeiten *in vivo* wird über selektive Transport- und Speichermechanismen *in vivo* spekuliert. Verschiedene experimentelle Studien deuten darauf hin, daß bestimmte Xenoestrogene mit spezifischen, für den Transport oder als Speichermedien relevanten Proteinen im Blut interagieren (Danzo, 1997). Da diese Proteine (z. B. SHBG) auch als Kompartiment angesehen werden können, tauchen in jüngster Zeit verstärkt Forderungen nach differenzierteren pharmakokinetischen Modellen auf (Mylchreest, 1998).

Einen möglichen Lösungsansatz könnten zukünftig sogenannte "Physiologically based pharmacokinetic" (PBPK) Modelle liefern, die ein differenziertes Bild des

Körpers durch die Nutzung mehrerer physiologischer Parameter mathematisch nachbilden.

Angewandt auf die Fragestellung zur Wirkung von endokrinen Disruptoren wäre beispielsweise denkbar, Blutplasmaproteine als ein wesentliches Kompartiment für endokrine Disruptoren zu definieren. Daneben müssen weiterhin langsam und schnell perfundierte Gewebe, Leber, Niere und Gastro-Intestinaltrakt in die Betrachtungen miteinbezogen werden. Für eine möglichst exakte Bestimmung der Gewebespiegel können die langsam perfundierten Gewebe weiterhin in endokrin abhängige und endokrin unabhängige Organe / Gewebe unterschieden werden. Mit solch einer Methode kann ein wesentlich genaueres Bild des Verhaltens eines potentiellen endokrinen Disruptors erhalten werden. Bisherige Risikoabschätzungen beziehen sich bestenfalls auf ein Zweikompartimentenmodell des Organismus. Aus Arbeiten, die die Wechselwirkung von endokrinen Disruptoren mit im Blutplasma vorkommenden spezifischen Proteinen untersuchen wird ersichtlich, daß eine hohe Bindungsaffinität von Xenoestrogenen an SHBG gegeben ist (Danzo, 1997).

Zwei mögliche Auswirkungen sind denkbar:

- spezifischer Transport von endokrinen Disruptoren zu verschiedenen Zielgeweben und Speicherung der Fremdstoffe im Kompartiment Blutplasmaproteine
- Freisetzung von endogenen Hormonen durch Xenoestrogene mit anschließend reduziertem Transport der endogenen Hormone zu Zielgeweben und möglicherweise rascherer Abbau der freigesetzten endogenen Hormone

Beide potentiellen physiologischen Szenarien können weitreichende Folgen hinsichtlich des Wirkspektrums und der Wirkqualitäten von endokrinen Disruptoren haben.

Die dargestellten Ansatzpunkte für mögliche wichtige Parameter, die bislang nicht ausreichend für ein *adequates risk assessment* berücksichtigt wurden stellen eindrücklich dar, welchen prinzipiellen Beschränkungen bisherige Risikoabschätzungen unterliegen. Vor diesem Hintergrund sollten auch die folgenden exemplarischen Versuche einer Risikoermittlung betrachtet werden.

Es besteht vielfältiger Konsens darüber, daß Phytoestrogene, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, in sehr viel höheren Konzentrationen auf den

Menschen wirken als verschiedene Verbindungen anthropogenen Ursprungs. Diese Verbindungen treten im allgemeinen nur als Kontaminanten auf.

Verschiedene ältere Arbeiten beschreiben bei Schafen und sonstigen Weidetieren eine Infertilität als Folge der Aufnahme großer Mengen Klees ("red clover disease"; s. Phytoestrogene). Neuere Arbeiten von Cassidy, 1997, beschreiben in nicht-klinischen Studien, daß bereits 60 g/d Soja über einen Zeitraum von vier Wochen den Plasmaspiegel von Luteinisierendem Hormon (LH) bei postmenopausalen Frauen signifikant absenkt. Bereits 40 g Leinsamen schwächen sogar den LH- und den Follikel Stimulierendes Hormon (FSH)- Spiegel. Bei prämenopausalen Frauen bewirken 45 mg konjugierter Hormone, die in Form von "textured vegetable protein" (60 g/d) über einen Zeitraum von einem Monat aufgenommen, eine signifikante Verlängerung des Menstruationszykluses. Besonders die Follikularphase wurde verlängert, was mit einer Verzögerung des Progesteronpeaks in der Lutealphase einherging (Cassidy, 1994).

Diese Befunde sprechen für eine schwache estrogene Wirkung auf die Hypothalamus-Hypophysen-Gonaden-Achse. Eine verlängerte Follikularphase ergibt einen positiven Gesundheitseffekt, da Brustzellen in dieser Phase des Zyklus wenig proliferieren. Somit wird versucht zu erklären, wie beobachtbare schützende Wirkungen von Phytoestrogenen auf die Entwicklung von Brustkrebs physiologisch begründet sein können. Weitere direkte protektive Einflüsse sind ebenfalls denkbar. So kann ein Phytoestrogen, das eine intrinsisch geringere estrogene Potenz aufweist, bei großen Verzehrsmengen durchaus mit Estradiol um den Estrogenrezeptor kompetieren. Der resultierende mitogene Stimulus im Brustgewebe könnte in seiner Aktivität herabgesetzt sein. Dies wiederum könnte sich positiv auf die mögliche Entwicklung eines Brusttumors auswirken, da gerade diese mitogenen Stimuli, die von Estradiol hervorgerufen werden, als wesentliche promovierende Effekte im Brustgewebe angesehen werden.

Diese Beispiele zeigen, daß bei ausreichend hohem Verzehr von Phytoestrogenen durchaus mit endokrinen Effekten zu rechnen ist, die nicht auf der Wirkung von physiologischen Hormonen beruhen. Aber auch diese Effekte sind nur mit einer speziellen Diät zu beobachten, die tägliche Aufnahme von Sojaprotein beträgt in westlichen Ländern nur ca. 3 g/d (Golbitz, 1992). Eine Ausnahmesituation liegt bei Kleinkinderfertiernahrung auf Sojabasis vor. Hier wird eine möglicherweise noch relativ sensible Population teilweise sehr hohen Phytoestrogenkonzentrationen ausgesetzt. Eine Bewertung erscheint hier wiederum äußerst schwierig. In einer

Nutzen-Risiko-Abschätzung wird empfohlen auf Kindernahrung auf Sojabasis nur dann auszuweichen, wenn gegen Kuhmilchnahrung eine präzise medizinische Indikation vorliegt (Zimmerli, 1997).

Die Kontaminanten anthropogenen Ursprungs liegen in der Regel mindestens 1000 - 10000fach geringer in Lebensmitteln vor als Phytoestrogene. Aufgrund dieser Situation ist nach allgemeinem Verständnis über die Aufnahme durch Lebensmittel für den erwachsenen Organismus das relative Risiko, Schädigungen durch endokrine Disruptoren zu erleiden als sehr gering einzustufen (Eisenbrand et al.; 1998).

Für verschiedene Verbindungen liegen relativ exakte Expositionsdaten vor. So wird die tägliche Aufnahme von Bisphenol A mit ca 0,15 - 1 µg/kg KG/d (Huggett, 1998; Welsch, 1998) angegeben. Einen Anhaltspunkt für die unterschiedlichen Gehalte erhält man durch Vergleich der Phytoestrogenmenge, die in prämenopausalen Frauen eine Zyklusverlängerung hervorruft, 45 mg konjugierter Isoflavone, mit der Aufnahmemenge von Bisphenol A von ca. 10 - 70 µg/d/Person. Hier ergibt sich ein Faktor von ca. 1000 - 5000.

Die Aufnahmemenge von Phthalat (Gesamtphthalatgehalt) über die Nahrung liegt bei Erwachsenen in Großbritannien zwischen 0,013 - 0,027 mg/kg/KG/d. Dies sind pro Person ca. 0,9 mg - 1,9 mg/d. Im Falle der Phthalate ergibt sich ein Faktor von ca. 50.

Solche Phthalate spielen auch eine Rolle bei Kleinkindernahrung, die auf Kuhmilchbasis hergestellt wird. Hier wurden in Großbritannien Gehalte von 1,2 - 10,2 mg/kg Trockengewicht nachgewiesen (MAFF, 1996). Nach Huggett, 1998, kann ausgehend von diesen Werten auf eine Exposition von ca. 0,13 mg/kg/KG für Neugeborene und von 0,1 mg/kg/KG für sechs Monate alte Kleinkinder ausgegangen werden. Dies veranlaßte das wissenschaftliche Beratergremium, das für eine Unbedenklichkeit von Lebensmitteln innerhalb der EU verantwortlich ist, das Scientific Committee for Food (SCF), die maximale Aufnahme von Butyl-Benzylphthalat auf 0,009 mg/kg KG/d abzuschätzen. Dieser Wert liegt deutlich unter dem momentan geltenden tolerable daily intake - Wert von 0,1 mg/kg/KG/d dieser Verbindung (Huggett, 1998).

Diese Versuche, die Belastungssituation abzuschätzen weisen auf verschiedene Probleme hin, die die bisher benutzten Modellrechnungen mit sich bringen.

Höchstmengenbegrenzungen werden nur für Einzelverbindungen durchgeführt, so sieht dies auch die Gesetzgebung vor. Am Beispiel der Phthalate wird deutlich wie artifiziell ein solches Vorgehen im Falle der endokrinen Disruptoren sein kann. Es ist allgemein bekannt, daß verschiedene Kongenere der Phthalate via den zellulären Rezeptor prinzipiell die gleichen oder ähnliche Effekte hervorrufen können. Für die Bewertung und anschließende Höchstmengenbegrenzung können jedoch nur jeweils Beschränkungen für ein einzelnes Kongener berechnet werden. Bei kritischer Betrachtung der tatsächlichen Expositionssituation wird klar wie teilweise verfälschend eine solche Aufsplitterung in Einzelkongenere sein kann. So zeigt die Studie von Mylchreest, daß unter *worst case* Betrachtungen die Referenzdosis auf Basis des LOAEL der NTP-Studie unter Berücksichtigung des Gesamtphthalatgehaltes in Kleinkindernahrung durchaus erreicht wird.

Nach Betrachtung, der in diesem Abschnitt dargestellten Expositionssituationen wird erkennbar, daß unter bestimmten Voraussetzungen der Abstand zwischen nachgewiesenen Gehalten von potentiellen endokrinen Disruptoren und beschriebenen Effekten *in vivo*, zumindest teilweise nicht um den Faktor 10000 - 100000 auseinanderliegen, sondern teilweise durchaus die Referenzdosis des LOAEL im Bereich der Expositionsgehalte liegt.

Diese etwas differenziertere Betrachtungsweise widerspricht deutlich einigen Publikationen, die mögliche Effekte von endokrinen Disruptoren mit etablierten Denkansätzen wegdiskutieren. Solche Denkansätze wie sie Safe, 1995, ausgeführt hat haben nach dem etablierten Denkmodell durchaus ihre Berechtigung und wurden nach diesen theoretischen Ansätzen korrekt berechnet.

So vergleicht Safe die Konzentration der Anti-Baby-Pille, die Estrogenkonzentration der Osteoporosetherapie post-menopausaler Frauen und die Aufnahme von estrogen aktiven Flavonoiden mit Gehalten von umweltrelevanten Organochlorverbindungen, die ebenfalls ein estrogenes Potential *in vitro* entfalten, miteinander. Danach ergeben sich Verhältnisse als Gramm-Äquivalente pro Tag berechnet von entsprechend 16675, 3350, 102 und 0,0000025. Daraus läßt sich theoretisch ein Differenzfaktor von 10^{11} berechnen.

Nach Greim, 1998, besteht aufgrund dieser Abschätzung selbst bei einem Fehler von einem Faktor 1000 für den Menschen und die Umwelt kein nennenswertes Risiko, das eventuell von endokrinen Disruptoren ausgehen könnte.

Aufgrund oben genannter Studien und Beobachtungen sollten diese Behauptungen kritisch betrachtet werden. Natürlich ist es teilweise überzogen jeglichen Altstoff auf sein mögliches estrogenes Potential hin zu untersuchen, wie es oft gefordert und in den USA teilweise bereits durchgeführt wird. Andererseits ist es möglicherweise ebenso fahrlässig, ein etwaiges Gefährdungspotential hormon aktiver Verbindungen mit wissenschaftlich nicht adequadem Lösungsansätzen wegzudiskutieren.

Zu fordern wäre vielmehr eine neue Ausrichtung und Erweiterung toxikologischer Arbeits- und Bewertungsansätze wie sie in verschiedenen internationalen Expertengremien gefordert werden. Die klassischen toxikologischen Arbeits- und Bewertungskriterien müssen kritisch auf ihre Tauglichkeit hinsichtlich der Risikoabschätzung gegenüber endokrinen Disruptoren überprüft werden. So müssen verschiedene Aspekte des Tierstudiendesigns modifiziert werden wie es das National Toxicological Program mit der Etablierung des Reproductive Assessment by Continuous Breeding (RACB) bereits getan hat.

In ähnlicher Weise sollten differenziertere Bewertungsmöglichkeiten unter Berücksichtigung verschiedener neuer experimenteller Studienansätze erarbeitet werden. Verschiedene Ansätze sind hier zukünftig zu verfolgen, so muß sicherlich eine differenziertere Betrachtung pharmakokinetisch relevanter Kompartimente erfolgen. Solche Ansätze werden durch das sogenannte "Physiologically based pharmacokinetic" (PBPK) Modell bereits intensiv verfolgt.

Eine gewisse, vielleicht auch untergeordnete Rolle spielen, zumindest in einem frühen Stadium, funktionelle *in vitro* Testsysteme wie die in der vorliegenden Arbeit etablierten, die eine Systematisierung und frühe Klassifizierung verschiedenster Substanzklassen erlauben. Damit können möglicherweise allgemeingültige Struktur-Wirkungsbeziehungen erarbeitet werden, die ein gezielteres Prüfen der besonders relevanten Verbindungen im Tier erlaubt. Auch die beschriebenen molecular modeling Verfahren können möglicherweise einen gewissen Beitrag zu verschiedenen mechanistischen Fragestellungen liefern. Wie auch insgesamt weitere mechanistische Untersuchungen auf zellulärem Niveau, aber auch in Bereichen der Entwicklungsbiologie viele offene Fragen beantworten helfen können. Diese neuen Verfahren müssen weiterhin eine Validierungsphase durchlaufen, können jedoch nach erfolgter Validierung möglicherweise entscheidende Antworten auf die drängendsten Fragen, die durch endokrine Disruptoren aufgeworfen wurden, liefern.

5 Zusammenfassung

Wesentliches Ziel der vorliegenden Arbeit war der Aufbau und die Evaluierung funktioneller *in vitro* Testsysteme zur Identifizierung und Charakterisierung von hormonartig wirkenden Fremdstoffen. Es gelang die Etablierung und Validierung stabil transfizierter Reporterzellensysteme in tierischen und humanen Zelllinien mittels bekannter Estrogene und Antiestrogene. Diese Reporterzellensysteme ermöglichen eine spezifische und auch sehr sensitive zellbiologische Analyse der hormonellen/antihormonellen Effekte, die durch Estrogenrezeptorliganden hervorgerufen werden. Die eingesetzten Reporterzellensysteme bestehen jeweils aus dem wild-type Vitellogenin A2-Promotor und den Reportergenen Luciferase bzw. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Der Vitellogenin A2-Luciferase Vektor liegt stabil integriert in der humanen Brustkrebszelllinie MCF-7 vor. Der Vitellogenin A2-CAT Vektor wurde mit einem Estrogenrezeptorexpressionsvektor in eine Mauszelllinie kotransfiziert.

Die Reportergeninduktion korreliert direkt mit der estrogenen/antiestrogenen Potenz der Prüfsubstanzen. Insbesondere mittels der MCF-7 Luciferase Zelllinie konnten quantitative Dosis-Wirkungsbeziehungen über weite Dosisbereiche für verschiedene Verbindungen erstellt werden.

Neben transgenen Reporterzellensystemen konnte ein bereits früher etablierter Wachstumsassay mit humanen MCF-7 Zellen für die Prüfung von Fremdstoffen mit potentiell hormoneller/antihormoneller Wirkung modifiziert werden. Dieser sogenannte Estrogen-Screening-Assay weist eine ausreichende Sensitivität zur Prüfung von Estrogenrezeptor vermittelten Wachstumseffekten auf. Da als zellbiologischer Parameter das Wachstum der Gesamtzelle genutzt wird, ist dieser Proliferationsassay für verschiedene Fragestellungen jedoch nicht spezifisch genug. Hinsichtlich der Spezifität und auch der Durchführung erwiesen sich die Reporterzellensysteme dem E-Screen-Assay als deutlich überlegen.

Mittels dieser Testsysteme wurden Verbindungen unterschiedlichster Anwendungsbereiche auf ihr hormonelles Potential hin untersucht. Neben Pflanzeninhaltsstoffen wurden Komponenten von Bedarfsgegenständen und Kosmetika sowie Pestizide untersucht. Solche Stoffe können als Inhaltsstoffe von Nahrungsmitteln oder auch als Kontaminanten auf den Menschen einwirken.

Neben der Prüfung von Einzelverbindungen lassen sich diese etablierten Systeme auch zur Prüfung von Gemischen unbekannter Zusammensetzung heranziehen. Exemplarisch gezeigt wurde dies in der Arbeit durch die Messung von Rohextrakten von Sojabohnenkeimlingen. Ein analoges Vorgehen ist bei weiteren Pflanzenextrakten aber auch bei Umweltproben denkbar. Auf diesen Systemen aufbauend sind „Bio-Assay geleitete Analyseverfahren“ zur Identifizierung bisher nicht beschriebener Verbindungen aus Pflanzen denkbar.

Zur relativen Einstufung der Verbindungen im Verhältnis zu Estradiol konnte ein, gegenüber einer in der Literatur gebräuchlichen Methode verbessertes Auswerteverfahren, erarbeitet werden. Diese Methodik erlaubt auch eine Datenreduktion auf die für eine Bewertung wesentlichen Parameter „relative Potenz“ und „intrinsische Effektivität“.

Rechnergestützte Struktur-Wirkungsanalysen unter Zuhilfenahme von molecular modeling Verfahren, erlaubten eine Systematisierung endokriner Disruptoren in verschiedene Strukturklassen. Durch Erarbeiten von vorläufigen „Leitstrukturen“ wurden Struktur-geleitete Datenbankrecherchen zur Ermittlung weiterer potentieller Estrogenrezeptorliganden ermöglicht. Dabei wurden Hinweise zu Strukturklassen erarbeitet, die hauptsächlich mit dem bis dahin unberücksichtigten Androgenrezeptor in den Zielzellen wechselwirken. Besonders eindrücklich läßt sich das im Falle der Benzophenone aufzeigen. Diese Strukturklasse weist eine gewisse Strukturhomologie gegenüber Bisphenolen auf, welche als aktive Estrogenrezeptorliganden beschrieben sind. Aus einer *in vivo* Studie ergibt sich aber der begründete Verdacht, daß Benzophenone möglicherweise potente Androgenrezeptoragonisten darstellen. In Strukturvergleichen erwiesen sich Benzophenone als Strukturanaloga des effektiven Antiandrogens p,p'-DDE. Die experimentelle Bestätigung konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit noch nicht erbracht werden, da die Kotransfektion von Androgenrezeptorexpressionsplamid und einem entsprechenden Reporter-genvektor nicht gelang. Die Hypothese einer antiandrogenen Wirkung von Benzophenonen und von Phenylharnstoffherbiziden wird durch mehrere Tierversuchsergebnisse allerdings gestützt.

Die Etablierung des sogenannten Band-Shift-Assays scheiterte aufgrund einer zellbiologischen Besonderheit des Estrogenrezeptors. Die ursprüngliche Idee eine konzentrationsabhängige Ligand-Rezeptor-Responsive Element-Wechselwirkung in einem nativen Gel zu simulieren, basierte auf einer nicht nachvollziehbaren Arbeit von Kumar und Chambon aus dem Jahre 1989. Zeitgleich mit anderen Gruppen,

Katzenellenbogen und Metzger/Chambon, 1995, konnte zwar eine Wechselwirkung zwischen Rezeptor und Responsiven Elementen dargestellt werden, diese waren jedoch in keinem Fall ligand- oder konzentrationsabhängig.

Insgesamt konnten funktionelle Testsysteme und Verfahrensweisen etabliert werden, die eine effektive Prüfung von potentiell hormonell aktiven Verbindungen ermöglicht. Die Testsystematik kann sowohl zur Wirkstofffindung als auch zur Charakterisierung möglicher toxikologisch relevanter Wirkungen genutzt werden. Die experimentellen Systeme und die molecular modeling Verfahren ergänzen sich. Durch die experimentellen Arbeiten können theoretische Erkenntnisse aus den molecular modeling Verfahren schnell verifiziert oder falsifiziert werden, was wiederum die theoretischen Überlegungen besser absichert. Fernziel könnte die Etablierung von sogenannten „Comparative Molecular Field Analysis-Studien (CoMFA) sein, die im Idealfall eine theoretische Voraussage von Wirkungen ermöglicht.

6 Material und Methoden

6.1 Zellkultur

6.1.1 Chemikalien und Lösungen

FKS

Fötales Kälberserum (Gibco, Karlsruhe)

CDFKS

0,5 % Norrit A (Serva) und 0,05 % Dextran (Sigma) werden in einer 0,14 M NaCl-Lösung gelöst. 50 ml hiervon werden zu 500 ml FKS gegeben und 45 Minuten bei 50° C im Wasserbad inkubiert. Nach zweimaliger Zentrifugation (800 g, 20 min) wird der Überstand bei -20 °C gelagert.

2 x CDFKS

Das nach obiger Vorschrift hergestellte CDFKS wird erneut mit der Norrit A/Dextran-Lösung versetzt und nach Inkubation im Wasserbad bei 45 °C für 45 Minuten zweimal bei 800 g und 20 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird bei -20 °C gelagert.

Penicillin/Streptomycin (Gibco, Karlsruhe)

10000 I.E./ml Penicillin; 10000 µg/ml Streptomycin

L-Glutamin (Gibco)

200 mM Lösung von L-Glutamin

Kulturmedien für MFM, MCF-7 und COS-7 Zellen

serumhaltig:

- Dulbecco's DMEM (Gibco) ohne Phenolrot und L-Glutamin
500 ml Kulturmedium; 50 ml CDFKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin; 3,6 ml L-Glutamin
- RPMI 1640 (Gibco) mit Phenolrot und L-Glutamin
500 ml Kulturmedium; 50 ml FKS; 5 ml Penicillin/Streptomycin

Phosphate Buffer Saline (PBS)

5 g NaCl; 0,72 g Na_2HPO_4 , pH 7,3-7,4; 0,25 g KCl; 0,125 g KH_2PO_4
mit bidestilliertem Wasser auf 500 ml auffüllen, autoklavieren

Trypsin-Lösung

125 mg Trypsin; 62,5 mg EDTA; mit PBS auf 250 ml auffüllen; über Nacht gekühlt
rühren;
sterilfiltrieren

DMSO Dimethylsulfoxid für die Spektroskopie (Merck, Darmstadt)

Trypanblau-Lösung

0,4 g Trypanblau (Serva); 0,81 g NaCl; 0,06 g KH_2PO_4 , pH 7,2; mit bidestilliertem
Wasser auf 100 ml auffüllen

6.1.2 Geräte

Lamin-Air (Heraeus)

Brutschrank (Heraeus)

Minifuge T (Heraeus)

Umkehrmikroskop (Zeiss)

Vakuumsaugpumpe (KNF-Neuberger)

automatische Pipettierhilfe (Pipetus)

Bunsenbrenner

6.1.3 Material

Kulturflaschen 25, 75 und 175 cm^2 (Greiner, Sarstedt)

Petrischalen 60 und 140 mm (Nunc, Sarstedt, Greiner)

Sterile Einwegröhrchen 10, 15 und 50 ml (Greiner, Sarstedt)

Sterile Einwegspritzen

Sterile Einwegkanülen

Sterile Pipetten

Neubauerzählkammer

6.1.4 Kultivierungsbedingungen

Die verwendeten Zelllinien wachsen adhärent und werden unter sterilen Bedingungen in Kulturflaschen oder Petrischalen bei 37° C, 5 % Kohlendioxidgehalt und einer Luftfeuchtigkeit von 90 % kultiviert (Lindl, 1987).

In der Regel wird serumhaltiges Medium verwendet. Dem Medium wird nach Temperieren auf 37° C Penicillin/Streptomycin zugesetzt. Pen/Strep dient zur Kontaminationsprophylaxe gegen Prokaryonten (Lindl, 1987).

6.1.5 Mediumwechsel

Alle 3 - 4 Tage wird das Medium gewechselt, um eine Übersäuerung des Milieus zu vermeiden. Als Indikator hierfür kann bei phenolrothaltigen Medien der Farbumschlag von rot nach orange-gelb verwendet werden.

Nach Abgießen oder Absaugen des alten Mediums wird mit PBS gewaschen und frisches Medium auf die Zellen gegeben.

6.1.6 Passagieren

Ist eine Kulturflasche zu ca. 70 % konfluent bewachsen, werden die Zellen in eine oder mehrere größere Flaschen überführt. Der Boden der Kulturflasche wird nach Entfernen des Mediums und zweimaligem Spülen mit PBS mit Trypsinlösung bedeckt. Nach wenigen Minuten Inkubation im Brutschrank kommt es zum Ablösen der Zellen. Das Trypsin wird durch Zugabe von serumhaltigem Medium inaktiviert.

Sollen die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert werden, werden sie steril abzentrifugiert (200 g, 10 min) und im entsprechenden Medium aufgenommen. Nach der Überführung in neue Flaschen wird mit dem Medium aufgefüllt.

6.1.7 Einfrieren von Zellen

Zellen sind in flüssigem Stickstoff lange lagerfähig. Es werden ca. 10^6 abzentrifugierte Zellen in 1 ml Kulturmedium, das 10 % DMSO enthält, langsam eingefroren (-20° C, -70° C, flüssiger Stickstoff).

6.1.8 Auftauen von Zellen

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellsuspensionen werden im Wasserbad bei 37° C möglichst schnell aufgetaut, zu FKS-haltigem Medium dazugegeben und bei 200 × g eine Minute zentrifugiert, um das cytotoxische DMSO zu entfernen. Das in FKS-haltigem Medium resuspendierte Zellsediment wird zur Kultivierung eingesetzt (Lindl, 1987).

6.1.9 Auszählen von Zellen

Durch mehrmaliges Aufziehen mit einer sterilen Pasteurpipette lassen sich die Zellen vereinzeln. Die Zellen werden mit Trypanblaulösung angefärbt. Lebende Zellen färben sich hellgelb, tote Zellen erscheinen blau gefärbt.

Unter dem Mikroskop wird mit einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt, wobei ein Feld einem Volumen von 0,1 μl entspricht (Verdünnung durch Färbelösung berücksichtigen!) (Lindl, 1987).

6.2 Isolierung von Kernproteinen

6.2.1 Prinzip

Die Zellen werden lysiert und die Kernproteine durch mehrere Lösungs-, Präzipitations- und Zentrifugationsschritte isoliert.

(Wong und Wilson, 1993)

6.2.2 Lösungen und Chemikalien

PBS

Phosphate Buffer Saline; pH 7,4

Extraktionspuffer mit hohem Salzgehalt

0,5 M KCl; 1 mM EDTA; 1 mM DTT; 10% (v/v) Glycerin; 10 mM Tris;

Proteaseinhibitoren:

0,5 mM PMSF; 0,1 μM Aprotinin; 1 μM Leupeptin; 1 μM Pepstatin; 1 μM Benzamidin;

pH 7,4

Extraktionspuffer mit niedrigem Salzgehalt

50 mM KCl; 1mM EDTA; 1mM DTT; 10% (v/v) Glycerin; 10 mM Tris;
Proteaseinhibitoren: 0,5 mM PMSF; 0,1 μ M Aprotinin; 1 μ M Leupeptin; 1 μ M
Pepstatin; 1 μ M Benzamidin;
pH 7,4

6.2.3 Methode

Für die Gewinnung der Kernproteine werden ca. 4 Millionen Zellen in CDFKS-Medium ausplattiert. Nach 24 Stunden wird ein Mediumwechsel durchgeführt und die Zellen für weitere 24 Stunden in 2 x CDFKS kultiviert. Am dritten Tag werden die Zellen mit den entsprechenden Testsubstanzen in serumfreien Medium für 5 Stunden inkubiert. Danach wird mit der Aufarbeitung nach Wilson begonnen.

Die Zellen werden auf Eis gekühlt. Das Medium wird verworfen und die Zellen mit kaltem PBS (pH 7,4) gewaschen. Die Zellen werden abgeschabt und zentrifugiert ($200 \times g$, $2^\circ C$ für 10 Minuten). Das Sediment wird zweimal mit dem zehnfachen Volumen der gepackten Zellen zentrifugiert (bei $200 \times g$, $2^\circ C$ über 10 Minuten).

Das Zellpellet wird in 50 μ l Extraktionspuffer mit hohem Salzgehalt aufgenommen und anschließend dreimal in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei Raumtemperatur aufgetaut.

Danach wird 30 Minuten bei $4^\circ C$ auf einem Rotator inkubiert und ebenfalls 30 Minuten bei $4^\circ C$ mit 14000 U/min zentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation wird 1:10 mit Extraktionspuffer mit niedrigem Salzgehalt verdünnt. Die Proben werden bei $-70^\circ C$ eingefroren.

Dieses Präzipitat wird für die Band-Shift-Assays eingesetzt.

(Wong und Wilson, 1993)

6.3 Band-Shift

6.3.1 Prinzip

Band-Shift, auch Gel-Retardation oder Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) genannt, ist eine relativ einfache und schnelle Methode zur Identifizierung von Protein-DNA-Interaktionen. Mit Hilfe des Band-Shift können sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, beispielsweise Transkriptionsfaktoren, detektiert werden.

Ein Protein-DNA-Komplex wandert in einem nativen (=nichtdenaturierenden) Polyacrylamidgel langsamer als freie, ungebundene DNA-Fragmente bzw. Oligonukleotide.

Es werden nichtradioaktiv markierte Oligonukleotide zur Detektion der spezifischen DNA-bindenden Proteine verwendet. Die eingesetzten Oligonukleotide sind am 3'-Ende mit Digoxigenin markiert. Das Rohextrakt des zellulären Proteins, gegebenenfalls das gereinigte Proteinextrakt, wird mit dem endmarkierten Oligonukleotid (dies entspricht der spezifischen DNA-Bindungsstelle für das Protein) inkubiert. Das Gemisch wird auf ein natives Polyacrylamidgel aufgetragen und durch native Elektrophorese aufgetrennt.

Nach der Elektrophorese wird das Gel durch Semidry-Blotting auf eine Nylonmembran geblottet. Die auf der Membranoberfläche adsorbierten Moleküle sind nun für höhermolekulare Liganden (z.B. Antigene, Antikörper) frei zugänglich. Mit Hilfe der Blotting-Methode wird daher die Nachweismöglichkeit von elektrophoretisch getrennten Molekülen erweitert. Die DIG-markierten Oligonukleotide werden in einer Chemilumineszenz-Reaktion nachgewiesen.

Zelluläre Rohextrakte enthalten eine große Zahl DNA-bindender Proteine, die nicht spezifisch an das gelabelte Oligonukleotid binden. Es wird deshalb ein Überschuß unspezifischer Oligonukleotide zugegeben, um diese nichtspezifischen Proteine zu binden.

Mit dem Band-Shift kann die Wanderungsgeschwindigkeit einer DNA-Doppelstrang-Sequenz, beispielsweise des Hormone Responsive Elements, mit und ohne Zugabe eines Agonisten oder Antagonisten des steroidhormonbindenden Liganden untersucht werden. Eine Verschiebung der Bande bedeutet, daß der entsprechende Testsubstanz-Rezeptor-Komplex an die DNA bindet.

(Berger et al., 1993; Promega, 1992; Westermeier, 1993; Winter et al., 1994)

6.3.2 Lösungen und Chemikalien für die native Polyacrylamidelektrophorese

Gel-Shift-Binding 5 × Puffer

20 % (v/v) Glycerin; 5 mM MgCl₂; 2,5 mM EDTA; 2,5 mM DTT; 250 mM NaCl; 50mM Tris-HCL; 0,25 mg/ml poly (dl-dC) • poly (dl-dC); pH 7,5

Zelluläres Extrakt aus MCF-7 Zellen

ungelabeltes ERE

gelabeltes ERE

nichtradioaktiv markierte doppelsträngige DNA-Sequenz (ERE), die unter Verwendung des Enzyms Terminale Transferase mit Digoxigenin-11-ddUTP (DIG-11-ddUTP) 3'-endmarkiert wurde

Gel-Ladungs-Puffer (10×)

250 mM Tris-HCl; 0,2 % Bromphenolblau; 0,2 % Xylencyanol; 40 % (v/v) Glycerin; pH 7,5

10 × TBE-Puffer (Tris-Borat-Puffer)

1 M Tris-Base; 0,85 M Borsäure; 0,01 M EDTA; pH 8,0

Elektrophoresepuffer

0,25 × TBE-Puffer, pH 8,0

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung

73g Acrylamid; 2g Bisacrylamid; mit bidestilliertem Wasser auf 250 ml auffüllen

APS-Lösung, 40%

1g Ammoniumpersulfat in 100 ml bidestilliertem Wasser (frisch ansetzen!)

TEMED

N, N, N', N'- tetramethylethyldiamin

natives Polyacrylamidgel (5 %)

2,49 ml Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung; 1,5 ml TBE-Puffer (10 ×); 10,95 ml bidestilliertes Wasser; diese Mischung 10 - 15 Minuten unter Wasserstrahlvakuum entgasen; dann Zugabe von 0,075 ml APS; 6µl TEMED; Mengenangaben gelten für Mini-Protean-Elektrophoresekammer, Fa. Bio-Rad

6.3.3 Methode

Das polymerisierte Gel muß vor dem Einbringen der Proben eine Stunde bei 100 V und 4° C vorlaufen, um einen möglichen Überschuß von Persulfat bzw. nicht polymerisiertem Acrylamid zu entfernen und um den Salzgradienten einzustellen. (Rickwood, 1990)

Es werden verschiedene Probenansätze vorbereitet (Promega, 1992) und nach Zugabe des Ladungspuffers jeweils bis zu 10 µl in die Geltaschen pipettiert.

Die Auftrennung erfolgt bei einer Spannung von 100 V und 4° C bis die Xylencyanol-Bande ca. 1 cm vom unteren Rand des Gels entfernt ist. Das Gel wird anschließend direkt zum Semidry-Blotting verwendet und nach dem Blotten mit Coomassie-Lösung angefärbt.

6.3.4 Lösungen und Chemikalien für das Semidry-Blotting

Membran

Membranfilter Nytran-N 12 N, amphotere Nylonmembran, Porengröße 0,2 µm

Blotting-Puffer

0,25 × TBE-Puffer, pH 8,0

Blockierstammlösung

10 g Blockierreagenz (Rinder- BSA) werden in 100 ml Puffer 1 für 2 Stunden auf 50° C erhitzt

Puffer 1

100 mM Maleinsäure; 150 mM NaCl; pH 7,5

Puffer 2

1 % (v/v) Blockierstammlösung in Puffer 1

Puffer 3

100 mM Tris-HCl; 100 mM NaCl; 50 mM MgCl₂ ; pH 9,5

TE-Puffer

10 mM Tris; 1 mM EDTA; pH 8,0

Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase**CSPD**

Dinatrium 3-(4-methoxy Spiro{1,2-dioxethan-3,2'-(5'chloro)tricyclo[3.3.1.1]decan}-4-yl) phenylphosphat; Chemilumineszenzsubstrat der alkalischen Phosphatase

Kodak X-OMAT RP Film; Hyperfilm MP, High Performance Autoradiography Film, Amersham

Kodak BioMax Light Film für Chemilumineszenz Detektion

6.3.5 Methode

Das native Gel sowie die Nylonmembran werden ca. 30 Minuten in Blotting-Puffer äquiliert. Für den Blottvorgang wird folgende Anordnung aufgebaut: Graphitanode, 8 Lagen Filterpapier, Nylonmembran, Gel, 8 Lagen Filterpapier, Graphitkathode. Die Übertragung findet bei 50 mA über 12 Minuten statt. Nach Beendigung des Blotts wird die DNA auf der Membran mit UV-Licht fixiert (bei 254 nm für 5 Minuten).

Die Membran wird dann 1 Minute lang in Puffer 1 + 0,3 % Tween gelegt. Danach lässt man die Blockierlösung (= Puffer 2) für mindestens 1 Stunde auf die Membran einwirken. Anschließend wird die Membran für 30 Minuten mit dem Antikörper Anti-DIG-Alkalische-Phosphatase in Puffer 2 inkubiert.

Die Membran wird dann zweimal mit Puffer 1 + 0,3 % Tween für jeweils 15 Minuten gewaschen. Nun wird die Membran für 2 Minuten in Puffer 3 inkubiert, bevor sie in die Detektionslösung (CSPD in Puffer 3, Verdünnung 1:100) gelegt wird. Nach 5 - 10 Minuten wird die Membran eingeschweißt, für 5 Minuten bei 37° C inkubiert und ein Röntgenfilm 3 - 48 Stunden in einer Filmkassette belichtet.

Die an den Antikörper gekoppelte Alkalische Phosphatase dephosphoryliert das Chemilumineszenzsubstrat CSPD. Es entsteht ein instabiles Intermediat (Phenolat-Anion), das zerfällt. Das Zerfallsprodukt liegt im angeregten Zustand vor, beim Rückgang in den Grundzustand wird Licht emittiert.

(Berger, 1993; Boehringer, 1994)

6.4 3'-Endmarkierung von Oligonukleotiden mit Digoxigenin-11-ddUTP

Aufreinigung der Oligonukleotide:

Die Aufreinigung der Oligonukleotide erfolgt mit einer NAP (Nucleid Acid Purification) 10 Säule (Pharmacia Sephadex G-25). Nach dem Auftragen der DNA-Lösung (in Ammoniak) wird mit bidestilliertem Wasser eluiert und die einzelnen Fraktionen aufgefangen. Von jeder Fraktion wird eine definierte Menge auf ein Tüpfelgel (bestehend aus Wasser, Agarose und Ethidiumbromid) aufgetragen und mit einem UV-Transluminator photographiert. Die Fraktionen mit hohem DNA-Gehalt werden vereinigt.

6.4.1 Prinzip:

Zur Markierung von Nucleinsäuren mit Hilfe des DIG-Systems wird Digoxigenin-11-ddUTP (DIG-11-ddUTP) verwendet.

Bei der DIG-Oligonucleotid-3'-Endmarkierung wird nur ein Molekül des DIG-11-ddUTP an das Oligonucleotid angehängt. Dieser Schritt wird durch die Verwendung des Enzyms Terminale Transferase gewährleistet, die immer nur ein Molekül DIG-11-ddUTP pro Nucleotid anhängt. Eine Kettenverlängerung nach dem Dideoxynucleotid kann nicht stattfinden.

Diese Methode ermöglicht eine nichtradioaktive Markierung von Oligonucleotiden, die zudem eine hohe Spezifität und Lagerstabilität aufweist (Boehringer, 1994; G. Schmitz, 1990).

6.4.2 Lösungen und Chemikalien:

5 × Reaktionspuffer:

1M Na-Cacodylat; 125 mM; Tris 1,25 mg/ml Rinderserumalbumin; pH 6,6

CoCl₂ -Lösung:

25 mM CoCl₂

DIG-11-ddUTP:

1 mM Digoxigenin-11-ddUTP (Digoxigenin-11-2'-dideoxyuridin-5'-triphosphat) in bidest. Wasser

Terminale Transferase:

50 U/ml terminale Transferase in 200 mM Na-Cacodylat; 1 mM EDTA; 200 mM KCl; 0,2 mg/ml Rinderserumalbumin; 50 % (v/v) Glycerol; pH 6,5

Glykogen-Lösung

20 mg/ml Glykogen in bidest. Wasser

EDTA

200 mM EDTA; pH8,0

LiCl

4 M LiCl-Lösung; 3 M Na-Acetat; pH 5,5

Ethanol p.A.

Steriles, bidestilliertes Wasser

6.4.3 Methode:

Es werden folgende Reagenzien nacheinander in ein Eppendorfgefäß auf Eis pipettiert: 5 × Reaktionspuffer, CoCl_2 -Lösung, das zu markierende Oligonukleotid, DIG-11-ddUTP, Terminale Transferase und Wasser. Nach erfolgter Inkubation des Reaktionsgemischs bei 37° C für 15 Minuten wird die Inkubation auf Eis gestoppt und Glykogen- sowie EDTA-Lösung zur Mischung zugegeben. Die anschließende Fällung mit Ethanol dient zur Entfernung von nichtmarkierten Nukleotiden.

Die markierten Oligonukleotide werden mit 4 M LiCl_2 -Lösung und vorgekühltem absoluten Ethanol ausgefällt und gut durchmischt. Die Inkubation erfolgt entweder bei -70° C für 30 Minuten oder bei -20° C für 2 Stunden. Danach wird bei 13000 × g für 15 Minuten bei -4° C zentrifugiert. Der Ethanol wird abdekantiert und das Pellet mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen (Zentrifugation bei 13000 × g, 4° C für 15 Minuten). Das Pellet wird getrocknet und in sterilem bidestilliertem Wasser aufgenommen. Die DIG-markierten Oligonukleotide werden bei -20° C eingefroren (Boehringer, 1994).

6.5 BCA-Protein-Assay

6.5.1 Prinzip:

Bicinchoninsäure (BCA) ist ein hochspezifisches und stabiles Komplexbildungsreagenz für Kupfer(I)-Ionen. Nach vorangegangener Biuretreaktion, bei der Kupfer(II)-Ionen im alkalischen Milieu durch Proteine zu Kupfer(I)-Ionen reduziert werden, reagiert BCA zu einem violetten Komplex mit einem Absorptionsmaximum bei 562 nm und kann so photometrisch quantifiziert werden.

6.5.2 Lösungen und Chemikalien

- BCA-Protein Assay Reagenz (Pierce)
- Reagenz A (Na_2CO_3 , Bicinchoninic Acid (BCA), Natriumtartrat); Reagenz B (4 % CuSO_4); 50:1 mischen
- Proteinstandard (Pierce): 2mg/ml BSA in 0,9 % NaCl und 0,05 % NaN_3 ; Verdünnungen von 100-1200 $\mu\text{g/ml}$
- UV-Spektralphotometer Uvikon 810 (Kontron)
- Halbmikroeinmalküvetten, Polystyrol (Hellma)

6.5.3 Methode

50 μl Probe werden mit 1 ml BCA-Reagenz 30 min. bei 37° C inkubiert und die Extinktionen gegen einen Blindwert bei 562 nm gemessen. Gegebenenfalls wird die Messung mit einer Verdünnung wiederholt, so daß die Extinktion den Wert 1 nicht übersteigt. Mit Hilfe der linearen Regression aus den Werten der Proteinstandardverdünnungen lassen sich die Konzentrationen der Proben ermitteln.

6.6 CAT-ELISA-Assay

6.6.1 Prinzip

Das Reporteragen wird durch die Bindung von aktiven Substanzen an das Responsive Element der DNA (in diesem Fall das Estrogen Responsive Element) aktiviert. Es kommt somit zur Expression von Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). CAT ist mit Hilfe des ELISA (Enzym-linked-Immunsorbent Assay) quantitativ nachweisbar. Bei dem vorliegenden ELISA handelt es sich hierbei um einen sogenannten Sandwich-Enzym-Immunsorbent Assay. CAT wird durch einen bereits am Modul fixierten CAT-Antikörper (anti-CAT) gebunden und durch einen Sekundärantikörper (Anti-CAT-Digoxygenin; anti-CAT-DIG) erkannt. An diesen bindet ein weiterer mit Peroxidase gekoppelter Antikörper (Anti-DIG-POD). Die gekoppelte Peroxidase katalysiert eine Substratreaktion, die quantitativ nachweisbar ist.

6.6.2 Lösungen und Chemikalien

- CAT-Enzym (Typ I)
100 ng CAT-Standard Enzym, lyophilisiert
- Anti-CAT-DIG
200 µg Anti-Cat-DIG-Konjugat, stabilisiert, lyophilisiert
- Anti-DIG-POD
25 U Anti-DIG-POD, stabilisiert, lyophilisiert
- POD-Substrat
- Wasch-Puffer-Konzentrat (10 x)
(Phosphatpuffer mit NaCl und Tween[®]20)
- Proben-Puffer
(PBS mit Blockierungsreagenz)
- Lysis-Puffer (5 x)
5 x hypotonischer Lysis-Puffer, pH 6,5 (MOPS-Puffer mit NaCl und Triton[®]X-100)

- Mikrotiterplatten-Module (MTP-Module) beschichtet mit Anti-CAT (polyklonaler Antikörper vom Schaf); blockiert
- Rahmen für die MTP-Module
- Mikrotiterplatten-Abdeckfolien
- EIA-Reader Modell 450, Filter 405 nm
- Eppendorfszentrifuge 5414 C
- Brutschrank oder Wasserbad (37° C)

6.6.3 Methode

1. Inkubation der Zellkultur

Die in hormonfreiem, serumhaltigem Medium wachsende Zellkultur wird zweimal mit PBS gewaschen und für 24 Stunden mit Estradiol sowie verschiedenen Testsubstanzen in unterschiedlichen Konzentrationen in serumfreiem Medium inkubiert. Nach erfolgter Inkubation wird erneut zweimal mit PBS gewaschen und für weitere 16 Stunden in hormonfreiem, serumhaltigem Medium nachinkubiert.

2. Herstellung der Zellextrakte

Die am Boden der Petrischale anhaftenden Zellen werden dreimal mit PBS gewaschen und jeweils mit 1 ml Lysispuffer 30 Minuten bei Raumtemperatur versetzt. Die Zellen werden abgeschabt und die Zellsuspension wird bei 14000 U/min für 10 Minuten bei 4° C zentrifugiert. Im Überstand ist die extrahierte Chloramphenicol-Acetyl-Transferase enthalten.

Der Proteingehalt der Proben wird mit Hilfe des BCA-Protein-Assays bestimmt und jeweils ein Proteingehalt von 50 µg Protein/200µl eingestellt.

Die mittels der oben beschriebenen Methode erhaltenen Zellextrakte sollten sofort im CAT-ELISA eingesetzt werden oder bei -80° C gelagert werden.

3. Vorbereitung der CAT-Standards

Aus der von Boehringer mitgelieferten CAT-Standard-Enzymlösung werden verschiedene Verdünnungen hergestellt.

4. Durchführung des CAT-ELISA

Die Wells der MTP-Module werden mit 250 μ l Probenpuffer rehydratisiert. Nach Verwerfen des Probenpuffers werden jeweils 200 μ l der CAT-Standards und der Probenlösungen jeweils als Doppelbestimmung einpipettiert. Die MTP-Module werden mit der Abdeckfolie abgedeckt und bei 37° C für eine Stunde inkubiert. Anschließend wird viermal mit jeweils 250 μ l Waschpuffer gewaschen und 200 μ l der Anti-CAT-DIG-Lösung (2 μ g/ml) zugegeben. Nach erneuter Inkubation bei 37°C für eine Stunde wird wieder viermal mit 250 μ l Waschpuffer gewaschen und jeweils 200 μ l der Anti-DIG-POD-Lösung (150 mU/ml) zugegeben. Es wird wieder bei 37° C für eine Stunde inkubiert und nach vier weiteren Waschschritten 200 μ l POD-Substrat einpipettiert. Es wird solange bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine deutliche Grünfärbung erkennbar ist. Die Substratreaktion ist nach 30 Minuten beendet. Die Extinktionen werden mittels eines EIA-Readers bei 405 nm bestimmt.

Die resultierende Signalhöhe ist direkt proportional der eingesetzten CAT-Konzentration. Durch Auftragung der Standard-Konzentration gegen die erhaltenen Extinktionen erhält man durch lineare Regression eine lineare Standardkurve. Aus dieser lassen sich die unbekanntes CAT-Konzentrationen der Zellextrakte ermitteln.

6.7 Luciferase-Assay

6.7.1 Lösungen und Chemikalien

- 30 ml Zellkultur Lysis-Puffer 5x (Promega)
Zusammensetzung des Zell-Lysis-Puffer (1x Reagenz):
25 mM Tris-Phosphat; pH 7,8; 2 mM DTT; 2 mM 1,2-Diaminocyclohexan-
N,N,N',N'-tetraessigsäure; 10 % Glycerin; 1 % Triton X-100
- 10 ml Luciferase Assay Puffer (Promega)
Zusammensetzung des rekonstituierten Puffers:
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
- 7 mg Luciferase Assay Substrat (Promega)
- PBS
- Luminometer

6.7.2 Methode

1. Inkubation der Zellkultur

Die in Petrischalen in hormonfreiem, serumhaltigem Medium wachsende Zellkultur wird zweimal mit PBS gewaschen und für 24 Stunden mit Estradiol und verschiedenen Testverbindungen in unterschiedlichen Konzentrationen in serumfreiem Medium inkubiert. Anschließend wird zweimal mit PBS gewaschen und erneut für 16 - 24 Stunden in hormonfreiem, serumhaltigem Medium nachwachsen gelassen.

2. Herstellung der Zellextrakte

Das Kulturmedium wird abgezogen und die Petrischalen zweimal mit PBS gewaschen. Die am Boden der Petrischalen anhaftenden Zellen werden mit Lysis-Puffer (250 µl bei einem Durchmesser von 6 cm) versetzt und bei Raumtemperatur für 10 - 15 min. inkubiert. Die Zellen werden anschließend mit einem Gummischaber abgeschabt und in ein Eppendorfprobengefäß überführt. Nach Zentrifugieren für 5 sec. bei 14000 U/min wird direkt mit der Messung der Luciferase begonnen oder die Zellextrakte bei -70° C gelagert. Die Luciferase-Aktivität verringert sich allerdings beim Einfrier- und Auftauprozeß, weshalb alle Proben gleich behandelt werden sollten.

3. Durchführung des Luciferase-Assays

20 µl des Zellextraktes und 100 µl des Luciferase-Assay Reagenz werden gemischt. Beide Lösungen sollten auf Raumtemperatur temperiert werden, da eine Temperatur von 0 - 4° C die Enzymaktivität um 5 - 10 % verringern würde. (Promega, 1996) Die Messung der Photointensität kann über einen Zeitraum von 10 sec. bis 5 min. erfolgen. Die Lichtintensität der Reaktion bleibt für ungefähr 20 sec. annähernd konstant und nimmt dann nur langsam ab (Halbwertszeit von ca. 5 min.). Es wird daher empfohlen, mit der Messung innerhalb der ersten 10 sec. nach dem Mischen des Zellextraktes und des Assay-Reagenz zu beginnen. Im automatischen Luminometer kann die Messung mit Hilfe eines Computerprogrammes über 90 sec. erfolgen und bis zu zehnmal je Probe wiederholt werden. Die Messung kann bis zu 250 sec. ausgeweitet werden. Je nach Luminometer und Umgebungstemperatur ergeben sich zum Teil stark unterschiedliche Lichtausbeuten.

6.8 E-Screen-Assay (modifizierter Sulforhodamin-B-Assay)

6.8.1 Lösungen und Chemikalien

- Sulforhodamin B (Sigma)
- 50 %ige Trichloressigsäure (TCA, Merck)
- 1 %ige Essigsäure (aus Eisessig, Merck)
- Tris-Base, 10 mM, pH-Wert 10,5 (Sigma)
- 24-Loch-Titerplatten (Greiner)
- Einwegküvetten

6.8.2 Prinzip

Beim Sulforhodamin-B-Assay werden die mit Trichloressigsäure am Boden der Titerplatten fixierten Zellen mit dem anionischen Farbstoff Sulforhodamin-B angefärbt. Sulforhodamin-B bindet unter milden sauren Bedingungen durch seine anionischen Sulfitgruppen an basische Aminosäuren in Proteinen. Im schwach basischen wird der Farbstoff quantitativ von den Proteinen extrahiert. Die Extinktion der Farbstofflösung, die proportional der Zellzahl ist, wird photometrisch quantifiziert. (Skehan et al. 1990)

6.8.3 Methode

In jedes Loch der 24-Loch-Titerplatte werden ca. 5000 Zellen unter kreisenden Bewegungen eingesät. Nach 24stündiger Kultivierung in CDFKS-Medium erfolgt die Inkubation mit unterschiedlichen Testsubstanzen (je Konzentration vier Einzelbestimmungen), gelöst in CDFKS-Medium. Aufgrund der langen Inkubationszeit der Zellen mit den Substanzen müssen die einzelnen Inkubationsansätze (auch das Kontrollmedium) direkt vor der Inkubation steril filtriert werden. Als Negativ-Kontrolle dienen Zellen, die nur mit CDFKS-Medium inkubiert werden, als Positiv-Kontrolle Zellen, die mit verschiedenen Estradiolkonzentrationen

behandelt werden. Jeden zweiten Tag erfolgt ein Mediumwechsel mit den entsprechenden Substratkonzentrationen, in der Regel über 5 - 7 Tage.

Zum Abbruch des Testansatzes werden die lebenden Zellen am Boden der Titerplatten durch Zugabe von 250 µl 4° C kalter 50%iger TCA (10 % TCA Endkonzentration) und 60 min. Inkubation bei 4° C fixiert und die Zellproteine ausgefällt. Nach vier- bis fünfmaligem Waschen mit kaltem Leitungswasser werden die Platten an der Luft getrocknet.

Die Platten werden dann mit jeweils 250 µl 0,4 %iger Sulforhodamin-B-Lösung in 1 %iger Essigsäure pro Loch angefärbt. Nach 30 min. wird der überschüssige Farbstoff abgegossen und die Platten vier bis fünfmal mit 1 %iger Essigsäure gewaschen, bis kein Farbstoff mehr an das Waschwasser abgegeben wird. Der proteingebundene Farbstoff wird nach erneutem Trocknen in 1 ml 4° C kaltem Tris-Puffer (pH 10,5) pro Well solubilisiert und innerhalb von 15 min. bei 562 nm photometrisch vermessen. Überschreiten die Extinktionen einen Wert von 1,2 werden die Lösungen entsprechend mit Tris-Puffer verdünnt, bis die gemessenen Extinktionen im linearen Bereich des Photometers liegen.

Die erhaltenen Extinktionen sind der Proteinmenge und somit der Lebendzellzahl proportional.

6.9 Transformation prokaryontischer Zellen

Als Transformation wird die Einführung von fremdem genetischen Material, beispielsweise Plasmiden in eine intakte lebende Wirtszelle bezeichnet (Brandt-Koch, 1993; Winnacker, 1985).

Grundvoraussetzung für die Transformation von Prokaryonten ist eine ausreichend saubere Reinigung der einzuschleußenden Plasmide. Da alle eingesetzten Expressions- und Reporter-genplasmide bereits fertig kloniert vorlagen, erfolgte jeweils zur Vervielfältigung der Plasmide für die eukaryontische Transfektion, vorab eine Transformation in kompetente E.coli mit anschließender "Minipräparation", zur Überprüfung der erfolgreichen Transformation, einer "Maxipräparation" zur ausreichenden Plasmidgewinnung.

6.9.1 Herstellung von transformationskompetenten E. coli-Zellen

Diese Methode ist für den E.coli Stamm DH5 α anwendbar. Für andere E. coli sollten jeweils spezifische Protokolle herangezogen werden.

6.9.2 Lösungen und Chemikalien

L-Medium

1 %- Bactotrypon (Gibco); 0,5 % Bactohefeextrakt (Gibco); 0,5 % NaCl (Roth)

SOC-Medium

2 %-Bactotrypon (Gibco); 0,5 % Bactohefeextrakt (Gibco); 10 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 10 mM MgCl₂; 10 mM MgSO₄; 20 mM Glucose

LB-Medium

10 g Caseinhydrolysat (Gibco); 5 g Bactohefeextrakt (Gibco); 5 g NaCl: pH 7,5; bidest. Wasser ad 1000 ml, autoklavieren

LB-Agar mit 35 mg/l Ampicillin

7,5 g Agar (Gibco); LB-Medium ad 500 ml; autoklavieren, auf ca. 40°C abkühlen, Ampicillin (Sigma) zugeben; jeweils 20 ml in 10 cm Petrischalen geben, bei ca. 4° C lagern

TE-Puffer

10 mM Tris/HCl , pH 8,0; 1 mM EDTA; autoklavieren

TENS- Puffer

0,1 M NaOH; 0,5% Natriumdodecylsulfat; in TE-Puffer

6.9.3 Materialien

Frische Kolonien des o.g. E. coli-Stammes

500-ml-Erlenmeyer-Kolben (steril)

DMSO (Ultrapure, Fluka)

Glycerol (Ultrapure, Fluka)

1 M MgCl_2 / 1 M MgSO_4 (sterilfiltrieren)

LM-Agar

FSB-Puffer: 10 mM KOAc (pH 7,0), 100 mM KCl, 45 mM $\text{MnCl}_2 \times 4 \text{H}_2\text{O}$, 10 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$, 3 mM Hexamincobaltchlorid, 10 % (v/v) Glycerol mit 0,1 M HCl auf pH 6,4 einstellen und die Lösung sterilfiltrieren (Lagerung bei +4° C).

SOB-Medium: 10 g Hefeextrakt, 20 g Bacto-Trypton, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, ad 1 L H_2O zufügen, mit 1 M NaOH auf pH 7,5 einstellen, autoklavieren und danach mit der sterilfiltrierten Stammlösung auf 10mM MgCl_2 und 10 mM MgSO_4 einstellen.

6.9.4Durchführung

1. Herstellung einer Vorabkultur

Eine frische Zellkolonie in 5 ml SOB-Medium suspendieren (ÜNK-Röhrchen).

Zellen unter Schütteln bei 37°C bis zu einer Zelldichte von 1×10^8 bis 2×10^8 /ml (0,5 bis 0,6 A600/ml) kultivieren.

Mit einem gleichen Volumen 40 % Glycerol / 60 % SOB-Medium verdünnen und in Eis kühlen.

Zellen für 5 min im Eis stehenlassen.

Suspension in 210- μl -Portionen in flüssigem N_2 einfrieren.

Zellen der Vorabkultur bei -70° C aufbewahren (bis zu 6 Monate möglich).

2. Herstellung von kompetenten Zellen zur Aufbewahrung bei -70 °C

Aus der Vorabkultur einen Zellausstrich auf einer LM-Platte anlegen und über Nacht bei 37° C inkubieren.

5 Kolonien mit einem Durchmesser von etwa 0,5 bis 1 mm abimpfen und damit 50 ml SOB-Medium in einem 500-ml-Erlenmeyer-Kolben animpfen (Medium auf 37°C vorwärmen).

Zellen für 2 bis 3 h bis zu einer Dichte von $4 \text{ bis } 7 \times 10^7$ /ml (0,44 bis 0,55 A578/ml) bei 37° C unter Schütteln (250 rpm/min) kultivieren.

Ab diesem Zeitpunkt alle Arbeiten auf Eis und mit vorgekühlten (4°C) Materialien und Lösungen durchführen.

Zellen 10 min in Eis kühlen.

Kultur in SS-34-Zentrifugenröhrchen überführen und im HB-4-Rotor einer Sorvallzentrifuge bei 2,5 krpm und 4° C für 5 min sedimentieren.

Überstand dekantieren und Sediment in 17 ml FSB-Puffer resuspendieren.

Suspension 15 min in Eis inkubieren.

Suspension im HB-4-Rotor wie oben zentrifugieren.

Überstand dekantieren und Sediment in 4 ml FSB-Puffer resuspendieren.

Suspension 5 min in Eis inkubieren.

140 µl DMSO zugeben, mischen und Suspension 5 min in Eis inkubieren.

Nochmals 140 µl DMSO zugeben, mischen und Suspension 5 min in Eis inkubieren.

Zellsuspension in Portionen zu je 210 µl in vorgekühlte Eppendorfgefäße überführen und in -70° C-Truhe langsam tieffrieren.

Die kompetenten Zellen können bei -70° C mehrere Monate aufbewahrt werden.

6.10 Transformation von kompetenten E. coli-Zellen

6.10.1 Materialien

Kompetente E. coli-Zellen aus 5.9.1

Plasmid-Ansatz

Ampicillin (35 mg/ml, in H₂O sterilfiltriert)

TE-Puffer

2 M Glucose (sterilfiltriert)

SOC-Medium: SOB-Medium, 20 mM Glucose (SOB-Medium nach dem Autoklavieren auf ca 45° C abkühlen und mit der sterilfiltrierten 2 M Glucose-Stammlösung auf 20 mM Glucose einstellen.)

LM-Amp-Agar: LM-Agar nach dem Autoklavieren auf 40° bis 50° C abkühlen und auf 35 mg Ampicillin/L einstellen

6.10.2 Durchführung

Für das jeweilige Plasmid je eine Portion kompetente Zellen in Eis auftauen bis sie gerade flüssig sind und weitere 10 min in Eis inkubieren.

0,5 bis 30 ng der DNA des Annealing-Ansatzes in weniger als je 10 µl in je einem Greinerröhrchen vorlegen und mit TE-Puffer auf 50 µl auffüllen.

Je 200 µl Zellen zugeben und mischen ("Antippen") und 30 min in Eis inkubieren.

Transformations-Ansätze 90 s bei 42° C inkubieren (ohne Schütteln) und 2 min in Eis abkühlen.

Je 800 µl SOC-Medium zugeben.

Transformations-Ansätze für 1 h bei 37°C auf dem Schüttler mit 200 rpm/min inkubieren.

Verdünnungen (10^{-1} bis 10^{-3} für ligierte, rekombinante DNA) mit SOB-Medium herstellen; Volumen: je 1 ml.

Je 200 µl Zellsuspension jeder Verdünnung auf einer LM-Amp-Platte ausplattieren.

Bei 37° C über Nacht inkubieren.

Aus den wachsenden Kolonien wird die Plasmid-DNA isoliert (Mini-Präparation, she. 5.11.1) und analysiert (she. 5.11.2).

6.11 Isolierung von Plasmiden

Plasmide sind extrachromosomale ringförmige, doppelsträngige DNA-Moleküle einer Größe zwischen 2 und 100 kbp. Sie können sich autonom, d.h. unabhängig vom Chromosom der Wirtszelle, replizieren. Ihr Vorkommen beschränkt sich auf

Bakterien und einige niedere Eukaryonten wie Hefen, wobei sie ihren Wirten Überlebensvorteile bieten, wie den Abbau schwer zugänglicher Substrate oder Resistenzen gegenüber Antibiotika. In der Molekularbiologie werden Plasmide neben viralen Genomen als Vektoren für die Klonierung von DNA-Sequenzen eingesetzt. Dabei werden Plasmid-Gene genutzt, um zwischen Zellen ohne Plasmide, Zellen mit Plasmiden und Zellen mit rekombinanten Plasmiden zu unterscheiden. Setzt man ein DNA-Fragment in ein Expressionsplasmid ein, sind die Zellen auch in der Lage, das klonierte Gen zu exprimieren. Für die Nutzung von Plasmiden als Werkzeuge in der Molekularbiologie sind neben Verfahren zur Einführung von Plasmiden in die Zielzellen Verfahren zur Isolierung der Plasmide aus den Zellen von entscheidender Bedeutung. So wird die Minipräparation zur schnellen Gewinnung kleinerer Plasmidmengen eingesetzt und ist vor allem für analytische Untersuchung einzelner Verfahrensschnitte oder zur Überprüfung mehrerer Plasmide geeignet. Die Maxipräparation erlaubt die Gewinnung größerer Plasmidmengen in relativ reiner Form, die nachfolgend für verschiedene Zwecke wie Klonierung, Transformation oder Sequenzierung eingesetzt werden können.

6.11.1 Mini-Präparation von Plasmid- DNA

Diese Methode dient der schnellen qualitativen Überprüfung der Transformation der *E. coli* Dh5 α . Es handelt sich hierbei um ein zeitoptimiertes Verfahren der Plasmidisolierung, die sich gut für den qualitativen Nachweis der erfolgreichen Transfektion geeignet ist.

Die Zellen werden je nach erwarteter Plasmidmenge in 50 -100 μ l bidest. Wasser aufgenommen und gevortext. Nach Zugabe von 300 μ l TENS wird ca. 5 - 10 sec. gevortext, wobei sich die Mischung aufgrund der Denaturierung der *E.coli* Proteine verdickt. Nach Zugabe von 150 μ l einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) wird nochmals 5 - 10 sec. gevortext und die Zelltrümmer bei 4° C über 15 min. bei 13 000 g abzentrifugiert. Das Pellet wird zweimal mit je 1 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und 2 - 3 min. im Vakuum getrocknet. Zur weiteren Verarbeitung wird das Pellet in 20 μ l TE-Puffer aufgenommen.

6.11.2 Restriktion des präparierten Plasmids und elektrophoretische Größenbestimmung

Die isolierte Plasmid-DNA wird durch analytische Hydrolysen mit Restriktionsendonukleasen überprüft. Die Inkubationszeit für die analytischen Hydrolysen beträgt bei Plasmiden nur 2 h. Die hydrolysierte Plasmid-DNA wird in einem 0,7 %igen Agarose-Gel elektrophoretisch analysiert.

Nur die durch den enzymatischen Verdau linearisierten Plasmide, können durch einen Längenvergleich mit einem mitgeführten Marker, dienen der Prüfung der Transformation. Für den Verdau wird je ein Ansatz mit 4 µl Plasmidlösung, 1,5 µl All-for-one-Buffer OPA (Pharmacia) und 0,5 ml Hind III (Pharmacia) mit bidest. Wasser auf 14,5 µl aufgefüllt und ca. 2 h bei 37 °C inkubiert. Als Marker wird ein 1 KB-Leiter-Marker und ein mit HIND III geschnittener λ-Marker verwendet. Die einzelnen Ansätze werden in ein 0,7 %igen Agarose-Gel eingetragen und bei 70 V getrennt. Zur Detektion wird das Gel in einem Ethidiumbromid haltigem Bad inkubiert, wodurch mittels UV-Transilluminator die DNA-Sequenzen als Banden sichtbar werden. Durch Längenvergleich lassen sich die Banden zuordnen und eine erfolgreiche Transformation nachweisen.

6.11.3 Maxi-Präparation von Plasmid- DNA

Die Verfahren zur Großpräparation von Plasmiden aus E. coli gründen auf dem unterschiedlichen physikalischen Verhalten der Plasmid und der Bakterien-DNA. Durch die Alkalidenaturierung erreicht man bei einem pH-Wert von 12,0 - 12,5 eine Denaturierung nicht überspiralierter DNA. Superspiralisierte DNA dagegen wird nicht denaturiert.

Bei pH 12,5 lösen sich die Wasserstoffbrücken der nicht über spiralisierten DNA-Stränge auf und ballen sich bei pH-Wert Absenkung ungeordnet zusammen. Diese lassen sich anschließend durch Denaturierung entfernen, die Plasmid-DNA verbleibt im Überstand. Durch Na-Acetat / Ethanol-Fällung werden die genomische DNA, RNA und Proteine nach einer Zentrifugation abgetrennt. Nach einer RNAase-Behandlung werden die Plasmide durch eine Festphasenextraktion an DEAE aufgereinigt und durch einen "High-salt-buffer" von der Festphase eluiert.

6.12 Transfektion eukaryontischer Zellen

6.12.1 Prinzip

Die Elektroporation ist ein rein physikalisches Verfahren zur Einbringung von DNA in eine Wirtszelle. Durch die Anwendung eines kurzen elektrischen Impulses bei einer bestimmten Feldstärke wird die Permeabilität einer Membran kurzzeitig so vergrößert, daß nun auch DNA-Moleküle in die Zelle eindringen können.

Es wird zwischen stabiler und transienter Transfektion unterschieden. Bei der stabilen Transfektion wird im Gegensatz zur transienten die genetische Information in das Wirtszell-Genom eingebaut, während bei der transienten das Plasmid frei im Cytosol vorliegt und nach einer gewissen Zeit von der Wirtszelle wieder ausgestoßen werden kann.

Die Plasmide die zur Transfektion verwendet werden, enthalten häufig Resistenzgene gegen verschiedene Antibiotika, um eine Selektion der transfizierten Zellen zu ermöglichen (Gassen, 1991; Koch-Brandt, 1993).

6.12.2 Methode

Transfektion von COS 1 und MCF-7 Zellen mittels Elektroporation

Die Transfektion dieser beiden Zelllinien erfolgte mit den Plasmiden HEGO - ER /VIT-tk-CAT bzw. pSG5-AR / MMTV-Luc.

Die Zellen werden abtrypsiniert und zentrifugiert (bei 4° C, 200 x g, 5 min), mit eiskaltem PBS gewaschen und erneut zentrifugiert. Die Zellen werden in PBS mit einer Zelldichte von 3×10^6 bis 1×10^7 aufgenommen und in einer Elektroporationsküvette vorgelegt. Nach Zugabe von jeweils 10 µl der Plasmidlösungen (COS 1 Zellen: HEGO-ER / VIT-tk-CAT oder pSG5-AR / MMTV-Luc; MCF-7-Zellen: VIT-tk-CAT) wird die Küvette für 10 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wird bei beiden Zelllinien mit 500 µF und unendlichem Widerstand bei 330 V, 25 mA und 25 W durchgeführt.

Die Suspension, die infolge denaturierter Proteine zähflüssig wird, wird in serumhaltigem Medium aufgenommen, auf Petrischalen ausplattiert und für drei Tage im Brutschrank inkubiert. Danach kann mit der Selektion mit Hilfe des Antibiotikum Genitacin begonnen werden. (Invitrogen Electroporator II Manual).

6.13 Detektion und Eliminierung von Mycoplasmen

Die Kontamination von Mycoplasmen stellt ein Problem in der Zellkulturtechnik dar, wobei ihr Einfluß sehr unterschiedlich sein kann, beispielsweise kann eine Inhibition der Kohlenhydrat-, Protein- und Nukleinsäurensynthesen, eine Beeinflussung der Makrophagenaktivität etc. auftreten. Bis zu 80% aller Zellkulturen sind von Mycoplasmeninfektionen betroffen. Es konnten bisher bis zu 20 verschiedene Mycoplasmenarten aus verschiedenen kontaminierten Zellkulturen isoliert werden. Mycoplasmen wachsen oft nur langsam und zerstören die befallenen Zellen nicht. Sie üben jedoch vielfältige negative Effekte auf die infizierten Zellen aus, was vor allem bei permanenten Zellen Probleme mit sich bringt (Lindl, 1987; Biochemica Information, 1996).

6.13.1 Detektion von Mycoplasmen

6.13.2 Chemikalien und Reagenzien

4',6- Diamidin- 2'-phenylindol-dihydrochlorid (DAPI)

Fluoreszenzmikroskop

6.13.3 Prinzip

Der Fluoreszenzfarbstoff DAPI bindet selektiv an doppelsträngige DNA und bildet stark fluoreszierende DNA-DAPI-Komplexe mit einer hohen Spezifität. In wässriger Lösung besitzt DAPI ein Absorptionsmaximum bei 340 nm und ein Emissionsmaximum bei 488 nm. DAPI wird von den Zellen sehr schnell in die DNA aufgenommen, wodurch stark fluoreszierende Zellkerne entstehen, eine cytoplasmatische Fluoreszenz ist dagegen nicht nachweisbar. Ist eine Zellkultur mit Mycoplasmen kontaminiert, so findet man einzelne fluoreszierende Punkte im Cytoplasma und z.T. auch im interzellulären Raum (Testvorschrift Boehringer Mannheim, Mycoplasma Detection Kit).

6.13.4 Durchführung

Die Zellkultur wird auf ca. 50-70 % Konfluenz pro Objektträger anwachsen gelassen. Eine vollständige Konfluenz würde die Visualisierung der Mycoplasmen stark herabsetzen. Der Objektträger wird mit einer sterilen Pinzette aus dem Quadriperm herausgenommen und mit 1 ml eiskaltem Methanol (-20° C) Mediumreste abgespült. Der Objektträger wird in -20° C kaltes Methanol gestellt, bei -20° C gelagert oder für 15 min fixiert. Nachdem der Objektträger an der Luft getrocknet wurde, ca. 40 µl Färbelösung auftropfen lassen. Es wird mit einem Deckglas abgedeckt, mit Nagellack abgedichtet und unter einem Fluoreszenzmikroskop mit 340/380 Anregungsfilter und LP 430 Sperrfilter untersucht. Die besten Ergebnisse erzielt man mit einem Ölimmersions-Objektiv bei einer 100-fachen Vergrößerung.

6.14 Eliminierung von Mycoplasmen

6.14.1 Reagenzien

Mycoplasma Removal Agent: enthält 50 µg 4-Oxo-chinolin-3carboxylsäure-Derivate in 1 ml Wasser (ICN Biomedicals)

6.14.2 Durchführung

Die Zellen werden über eine Woche mit Mycoplasma Removal Agent behandelt (100 µg/ml). Danach wird die Zellkultur erneut auf Mycoplasmen überprüft.

7 Literatur

Adami, H., Bergström, R., Möhner, M., Zatonski, W., Storm, H., Ekblom, A., Tretli, S., Teppo, L., Ziegler, H., Rahu, M., Gurevicius, R. & Stengrevics, A. (1994): Testicular cancer in nine Northern European countries; *Int. J. Cancer*, **59**, 33-38.

Adlercreutz, H.A., Fotsis, T., Heikkinen, R., Dwyer, J.T., Woods, M., Goldin, B.R., Gorbach, S.L. (1982): Excretion of the lignans enterolactone and enterodiol and of equol in omnivorous and vegetarian postmenopausal women and in women with breast cancer; *Lancet* **2**, 1295-1299.

Akiyama, T., Ishida, J., Nakagawa, S., Ogawara, S., Watanabe, S., Itoh, N., Shiyba, M., Fukami, Y. (1987): Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases; *J. Biol. Chem.* **262**, 5592-5595.

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

Albrecht, S. et al. (1992): Angewandte Biolumineszenz: Luciferasen in der biochemischen Analytik; *Chemie in unserer Zeit* **26**, 63-69.

Arinica, S.M., Katzenellenbogen, B.S. (1993): Stimulation of estrogen receptor-mediated transcription and alteration in the phosphorylation state of the rat uterine estrogen receptor by estrogen, cyclic adenosine monophosphate, and insulin-like growth factor-I; *Mol. Endocrinol.* **7**, 743-752.

Arnold, S., McLachlan, J. (1996): Synergistic effects of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals; *Science* **272**, 1489-1492.

Auger, J., Czyglik, F., Kunstmann, J.M., Jouannet, P. (1994): Significant decrease of semen characteristics of fertile men from Paris area during the last 20 years; *Hum. Reprod.* **9** (Suppl 4), 72.

Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F. & Jouannet, P. (1995): Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years; *New Engl. J. Med.*, **332**, 281-285.

Ball, P., Knuppen, R., Haupt, M. and Breuer, H. (1972): Interactions between estrogens and catechol amines. III. Studies on the methylation of catechol estrogens, catechol amines and other catechols by the catechol O-methyltransferase of human liver; *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **34**, 736-746.

Barkhem, T., Carsson, B., Nilsson, Y., Enmark, E., Gustafsson, J.A., and Nilsson, S. (1998): Differential Response of Estrogen Receptor α and Estrogen Receptor β to Partial Estrogen Agonists/Antagonists; *Molecular Pharmacology*, **54**, 105-112.

Bartke, A., Dalterio, S. (1975): Evidence for episodic secretion of testosterone in laboratory mice, *Steroids*, Dec; **26**(6):749-56.

Beato, M. (1989): Gene regulation by steroid hormones; *Cell* **56**, 335-344.

Beato, M. (1991): Transcriptional control by nuclear receptors; *The FASEB Journal* **5**, 2044-2051.

Beato, M. (1995): Hormone induces binding of receptors and transcription factors to a rearranged nucleosome on the MMTV promoter in vivo; *The EMBO Journal* **14**, 1737-1751.

- Berger, R. et al. (1993): Nonradioactive Gel Mobility Shift Assay using Chemiluminescent Detection, *BioTechniques* 15, 650-651.
- Berthold, A. (1990): Advances in measurement of reporter genes: Choramphenicolacetyltransferase and firefly luciferase; *Biomed Biochim Acta* 40, 1243-1245.
- Blond, J., Denis, M., Bezard, J. (1995): Antioxidant action of resveratrol in lipid peroxidation; *Science des aliments* 15 (4), 347-358.
- Boehringer Mannheim Biochemica (1994): The DIG System User's Guide for filter Hybridization.
- Boehringer Mannheim Biochemica (1996): Mycoplasmen Detection.
- Boettger-Tong, H., Murthy, L., Chiappetta, C., Kirkland, J.L., Goodwin, B., Adlercreutz, H., Stancel, G.M. and Mäkelä, S. (1998): A Case of a Laboratory Animal Feed with High Estrogenic Activity and Its Impact on *in Vivo* Responses to Exogenously Administered Estrogens; *Environ. Health Perspect.*, 106 (7), 369-373.
- Boockfor, F.R., Blake, C.A. (1997): Chronic administration of 4-tert-octylphenol to adult male rats causes shrinkage of the testes and male accessory sex organs, disrupts spermatogenesis, and increases the incidence of sperm deformities; *Biol. Reprod.*, **57** (2), 267-277.
- Bradbury, R.B. and White, D.E. (1954): Estrogens and related substances in plants, in *Vitamins and Hormones*; Vol. 12, Harris, R.S., Marrian, G.G., and Thimann, K.V., Eds., Academic Press, New York, 207-230.
- Bresnick, E. et al. (1991): The transcriptionally-active MMTV promotor is depleted of histone H1; *Nucleic Acids Research* 20 (2), 273-278.
- Brolin, S., Wettermark, G. (1992): *Bioluminescence Analysis*; VCH Verlag Weinheim, New York, Basel.
- Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Villalobos, M., Pedraza, V., Olea, N. (1995): Xenoestrogens releases from lacquer coating in food cans; *Environ. Health Perspect.* **103**, 608.
- Brrzozowski, A.M., Pike, A.C.W., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engström, O., Öhman, L., Greene, G.L., Gustafsson, JA, and Carlquist, M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the estrogen receptor; *Nature (Lond)*, **389**, 753-758.
- Cadepond, F. et al. (1992): Hormonal regulation of the nuclear localization signals of the human glucocorticosteroid receptor, *Experimental Research* 201, 99-108.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N. & Skakkebaek, N.E. (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years; *B. Med. J.*, **305**, 609-613.
- Carson-Jurica, M. et al. (1990): Steroid receptor family: structure and functions; *Endocrine Reviews* 11 (2), 201-220.
- Cassidy, A. (1998): Risks and Benefits of Phytoestrogen-rich Diets; *Hormonally active agents in food: symposium / Deutsche Forschungsgemeinschaft*; Ed.: Eisenbrand, G., Weinheim, Wiley-VCH, 91-117.
- Cassidy, A., Bingham, S., Setchell, K. (1994): Biological effects of isoflavones present cancer; *Amer. J. Clin. Nutr.* 60, 333-340.
- Cato, A. (1996): *Pers. Mitteilung*.

Cavaillès, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., Parker, M.G. (1994): Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 10009-10013.

Cavaillès, V., Dauvois, S., L'Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., Parker, M.G. (1995): Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor; *EMBO, J* **14**, 3741-3751.

Certa, H., Fedtke, N., Wiegand, H.J., Muller, A.M., Bolt, H.M. (1996): Toxicokinetics of p-tert-octylphenol in male Wistar rats; *Arch Toxicol*, **71 (1-2)**, 112-122.

Church-Landel, C., Kushner, P., Greene, G. (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA-interactions; *Environmental Health Perspectives* **103 (7)**, S. 23-29.

Climie IJG, Hutson DH, Stoydin G., (1981); Metabolism of the epoxy resin component 2,2-bis[4-(2,3-epoxy propoxy)phenyl] propane, the diglycidyl ether of bisphenol A (DGEBA) in the mouse. Part II. Identification of metabolites in urine and faeces following a single oral dose of ¹⁴C-DGEBA, *Xenobiotica* **11**, 401-424.

Colborn, T. (1995): Health Implications for Humans and Wildlife; *Environ. Health Perspect. (Suppl 7)*, 135-137.

Colborn, T., Clement, C., eds. (1992): *Chemically-Induced Alterations in Sexual and Functional Development: The Wildlife/Human Connection*; Princeton, Princeton Scientific Publishing.

Colborn, T., Saal, F., Soto, A. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans; *Environmental Health Perspectives* **101 (3)**, 378-384.

Cooper, C.L., Cooper, R. and Faraghe, E.B. (1989): Incidence and perception of psychosocial stress: the relationship with breast cancer; *Psychol. Med.*, **19**, 415-422.

Crothers, D.M. (1987): Gel electrophoresis of protein-DNA-complexes; *Nature* **325**, 464-465.

Cushman, M., He, H.M., Katzenellenbogen, J.A., Lin, C.M. and Hamel, E. (1995): Synthesis, antitubulin and antimetabolic activity, and cytotoxicity of analogs of 2-methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite of estradiol that inhibits tubulin polymerization by binding to the colchicine binding site; *J. Med. Chem.*, **38**, 2041-2049.

D'Amato, R., Lin, C., Flynn, E., Folkman, J. and Hamel, E. (1994); Methoxyestradiol, an endogenous mammalian metabolite, inhibits tubulin polymerization by interacting at the colchicine site. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 3964-3968

Dalman, F., Bresnick, E., Pratt, W. et al. (1989): Direct evidence that the glucocorticoid receptor binds to hsp 90 at or near the termination of receptor translation in vitro; *The Journal of Biological Chemistry* **264 (33)**, 19815-19821.

Danzo, B.J. (1997): Environmental Xenobiotics May Disrupt Normal Endocrine Function by Interfering with the Binding of Physiological Ligands to Steroid Receptors and Binding Proteins; *Environ. Health Perspect.*, **105**, 294-301.

Davis, D. et al. (1993): Medical hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer; *Environmental Health Perspectives* **101 (5)**, 372-377.

- Demirpence, E., Pons, M. et al. (1993): MVLN cells: A bioluminescent MCF-7-derived cell line to study the modulation of estrogen activity; *Steroid Biochem Molec* 46, 335-364.
- Dewailly, E., Dodin, S., Verreault, R. Ayotte, P., Sauve, L. and Morin, J. (1994): High organochlorine body burden in women with oestrogen receptor positive breast cancer, *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 232-234
- Dodds EC, Lawson W., (1936); Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus, *Nature* **137**, 996
- Druege, P., Klein-Hitpass, L. et al. (1986): Introduction of estrogen-responsiveness into mammalian cell lines; *Nucleic Acids Research* 14, S. 9329-9337.
- Eisenbrand, G., Ed. (1998): *Hormonally active agents in food: symposium / Deutsche Forschungsgemeinschaft*; Weinheim, Wiley-VCH.
- Eisenbrand, G., Schreier, P. (1995): *Lebensmittelchemie Römpp*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
- Ekman, P.; Barrack, E.; Greene, G.; Jensen, E. and Walsh, P. (1983); Estrogen Receptors in Human Prostate: Evidence for Multiple Binding Sites, *J. Clin. Endocrin. Metab.* 57 (1), 166-176.
- Falbe, J., Regitz, M. (1992): *Römpp Chemie Lexikon*, 9. erweiterte und neubearbeitete Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.
- Falck, F.J., Ricci, A., Wolff, M.S., Godbold, J. and Deckers, J. (1992): Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer, *Archives of Environmental Health*, **47**, 143-146.
- FAZ, Frankfurter Allgemeine Zeitung, 15.08.1998, Sanftere Behandlung von Abwasser zugesagt.
- Feldman D., (1997); Editorial: Estrogens from plastic - Are we being exposed?, *Endocrinology* **138**, 1777-1779.
- Fishman, J. and Köster, G. (1974): Catechol estrogen formation in the central nervous system of the rat; *Endocrinology*, **96**, 1054-1059.
- Forth, W., Henschler, D., Rummel, W., Starke, K. (1992): *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*, 6. völlig neubearbeitete Auflage, Wissenschaftlicher Verlag, Mannheim, Leipzig, Zürich, Wien.
- Fox, G.A. (1991): Practical causal inference for ecoepidemiologists; *J. Toxicol. Environ. Health*, **33**, 359-373.
- Frankel, E.N., Waterhouse, A.L. and Kinsella, J.E. (1993); *Lancet* **341**, 1103-1104.
- Fry, D.M., Toone C.K. (1981): DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* 213, 922-924.
- Gagne, D., Pons, M., et al. (1994): Stable luciferase transfected cells for studying steroid receptor biological activity; *Journal of bioluminescence and Chemiluminescence* 9, 201-209.
- Garner, M., Revzin, A. (1986): The use of gel electrophoresis to detect and study nucleic acid protein interactions; *TIBS* 11, 395-396.
- Gassen, H.G., Bertram, S. (1991): *Gentechnische Methoden*; Gustav Fischer Verlag, Stuttgart.

- Gehm, B.D., McAndrews, J.M., Chien, P-Y. and Jameson, L. (1997): Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol. 94, 14138-14143.
- Gilbert, J., Startin, J., McGuinness, J. (1986): Compositional analysis of commercial PVC bottles and studies of aspects of specific and overall migration into foods and simulants; *Food Addit. Contam.* 3, 133-144.
- Golbitz, P. (1992): *Soyatech Surveys and Estimates*; Soyatech, Inc., Bar Harbor, ME.
- Gorman, C. et al. (1982): Recombinant genomes which express Chloramphenicolacetyltransferase in mammalian cells; *Molecular and Cellular Biology* 2, 1044-1051.
- Grajewski, B., Whelan, E.A., Schnorr, T.M., Mouradian, R., Alderfer, R., Wild, D.K. (1996): Evaluation of reproductive function among men occupationally exposed to a stilbene derivative: I. Hormonal and physical status; *Am. J. Ind. Med.*, **29**(1), 49-57.
- Green, S., Chambon P. (1988): Nuclear receptor enhance our understanding of transcription regulation; *Trends in Genetic (TIG)* 4, 309-314.
- Green, S., Chambon, P. (1991): The estrogen receptor: From perception to mechanism; in: Parker M (ed); *Nuclear hormone receptors*, Academic Press, London, 15-38.
- Greim, H. (1998): Environmental estrogens and human health; *IUTOX NEWSLETTER*, 21.
- Gronemeyer, H. (1992): Control of transcription activation by steroid hormone receptors; *The FASEB Journal* 6, 2524-2529.
- Guillette, L.J. Jr., Crain D.A., Roney, A.A., Pickford, D.B. (1995): Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic development in wildlife. *Environ. Health Perspect.* 103 (Suppl 7), 157-164.
- Guillette, L.J., Gross, T.S., Masson, G.R., Matter, J.M., Percival, H.F., Woodward, A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida; *Environ. Health Perspect.* 102, 680-688.
- Gundermann, Mc Capra (1987): *Chemiluminescence in Organic Chemistry*; Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, Paris, Tokyo.
- Günzburg, W., Salomons, B. (1992): Factors controlling the expression of mouse mammary tumor virus; *Biochemical Journal* 283, 625-632.
- Guth, S. (1996): Erfassung und Charakterisierung estrogenaktiver Verbindungen mittels verschiedener in-vitro Testansätze; *Wissenschaftliche Abschlußarbeit*, Universität Kaiserslautern.
- Guth, S. (1998): Pers. Mitteilung
- Hackenberg, R. et al. (1991a): Autoregulation of androgen receptorlevel in the new human breast cancer cell line MFM-223, 6th SEK-Meeting, Heidelber, Abstract Z 18.
- Hackenberg, R. et al. (1991b): Androgen Sensitivity of the Human Breast Cancer Cell Line MFM-223; *Cancer Res.* 51, 5722-5727.
- Hager, G., Archer, T. (1991): The interaction of steroid receptors with chromatin; *Nuclear Hormone Receptors*, Hrsg. Parker, M. Academic Press, 217-232.

Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., Brown, M. (1994): Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription; *Science*, 264, 1455-1458.

Handbuch, Alchemy III (1992): For the IBM Personal computer and compatibles and the windows graphical environment; TRIPOS Associates, INC., Evans & Sutherland, St. Louis, Missouri.

Hansch, C. und Klein, T.E. (1991): Quantitative Structure-Activity Relationships and Molecular Graphics in Evaluation of Enzyme-Ligand Interactions; *Methods Enzymol.*, **202**, 512-543.

Hany, J., Nagel, R. (1995): Nachweis von UV-Filtersubstanzen in Muttermilch, *Deutsche Lebensmittelrundschau* 91, 341-345.

Hartmann, A. (1991): Luciferasen als Reportergene der genetischen Regulation; *Bio Tec Biotechnologie* **5**, Sonderdruck.

Hedden, A. et al. (1995): A new interpretation of Antiestrogen action; *Annals of the New York Academy of Sciences* 761, 109-120.

Hörz, W. (1994): Chromatinstruktur und Genregulation; *Naturwissenschaften* 81, 74-78.

Howell, W.M. & Denton, T.E. (1989): Gonopodial morphogenesis in female mosquitofish, *Gambusia affinis affinis*, masculinized by exposure to degraded products from plant sterol; *Environ. Biol. Fish.*, **24**, 43-51.

Huggett, A.C., Tritscher, A.M., Schilter, B., Offord, E.A. (1998): Estrogenic Agents in Foods for Babies, Infants and Children; Ed. Eisenbrand, DFG, Wiley-VCH, 208-221.

Ignar-Trowbridge, D.M., Teng, C.T., Ross, K.A, Parker, M.G., Korach, K.S., McLachlan, J.A. (1993): Peptide growth factors elicit estrogen receptor-dependent transcriptional activation of an estrogen-responsive element; *Mol. Endocrinol.*, **7**, 992-998.

Ikeda, S., Oda, T. (1993): Nonisotopic Gel-Mobility-Shift-Assay using chemiluminescent detection system; *BioTechniques* 14, 878-880.

Jager, M. (1992): Untersuchungen zum Wirkungsmechanismus und zum pharmakokinetischen Verhalten von N-(2-Chlorethyl)-N-nitrosocarbamoyl-L-alanyl-17-dihydrotestosteron; Dissertation Universität Kaiserslautern.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C., Pezzuto, J.M. (1997): Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes, *Science* **275**, 218-220.

Jang, M., Cai, L., Udeani, G.O., Slowing, K.V., Thomas, C.F., Beecher, C.W., Fong, H.H., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D., Mehta, R.G., Moon, R.C. and Pezzuto, J.M. (1997): Inhibition of human LDL oxidation by resveratrol; *Science* **275**, 218-220.

Janknecht, R., Hunter, T. (1997): Activation of the Sap-1a transcription factor by the c-Jun N-terminal kinase (JNK) mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem* Feb 14;272(7):4219-24.

Jekat, (1998): , Ed. Eisenbrand, DFG, Wiley-VCH, 208-221.

Jenster, G. et al. (1991): Domains of the Human Androgen Receptor involved in Steroid Binding, Transcriptional Activation and subcellular localisation; *Molecular Endocrinology* 5 (10), 1396-1404.

Jenster, G. et al. (1993): Nuclear Import of the human androgen receptor; *Biochemical Journal* 293, 761-768.

Jobling, S. and Sumpter, J.P. (1993): Detergent components in sewage effluent are weakly oestrogenic to fish: an *in vitro* study using rainbow trout hepatocytes; *Aquat. Toxicol.*, 27, 361.

Johnson, M.S., Wolbers, W.B., Noble, J., Fennell, M., Mitchell, R.: (1995): Effect of tyrosine kinase inhibitors on luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH)-induced gonadotropin release from the anterior pituitary; *Mol Cell Endocrinol*, **109** (1), 69-75.

Kamei, Y., Xu, L., Heinzl, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S-C, Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1996): A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors; *Cell*, **85**, 403-414.

Katzenellenbogen, B., Reese, J. (1991): Differential DNA-Binding abilities of estrogen receptor occupied with two classes of antiestrogens: studies using human estrogen receptor overexpressed in mammalian cells; *Nucleic Acids Research* 19 (23), 6595-6602.

Katzenellenbogen, J., O'Malley, B.W. and Katzenellenbogen, B.S. (1996): Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones; *Mol. Endocrinol.*, **10**, 119-131.

Kelce, W., Wilson, E. (1995): Persistent DDT metabolite p,p'-DDE is a potent androgen receptor antagonist; *Nature* 375, 581-585.

Kenneth, S., et al. (1985): Stereochemical analysis of stilbene estrogens: receptor binding and hormone responsiveness; *Estrogens in the Environment II*, Elsevier-Verlag, New York, Amsterdam, Oxford.

Khodabandehlou, H., Hoffmann, B., Pallauf, J., (1997): Investigations in central Hesse on the occurrence of estrogenic activity content of cattle feed, *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr.*; **104**(8), 291-294.

King, W., Green, C. (1984): Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells; *Nature* 307, 745-747.

Klauber, N.; Parangi, S.; Flynn, E.; Hamel, E. and D'Amato, R. (1997); Inhibition of angiogenesis and breast cancer in mice by the microtubule inhibitors 2-methoxyestradiol and taxol, *Cancer Res.* 57, 81-86

Klebe, G., Abraham, U. und Mietzner, T. (1994): Molecular Similarity Indices in a Comparative Analysis (CoMSIA) of Drug Molecules to Correlate and Predict Their Biological Activity; *J. Med. Chem.*, **37**, 4130-4146.

Klein-Hitpass (1997): Pers. Mitteilung

Klein-Hitpass, C., Cato, A. (1990): Two types of antiprogestins identified by their differential action in transcriptionally active extracts from T47D cells; *Nucleic Acids Research* 19 (6), 1227-1234.

Koch-Brandt, C. (1993): *Gentransfer: Prinzipien-Experimente-Anwendungen bei Säugern*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, New York.

Kohlmeyer, L. and Mendez, M. (1997): Controversies surrounding diet and breast cancer, *Proc. Nutrition Society*, **56**, 369-382.

Koss, G. (1994): Kohlenwasserstoffe; in Eds. Marquardt H, Schäfer S, Lehrbuch der Toxikologie; Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.

Kricka, L., Leach, F. (1989): Firefly Luciferase: mechanism of action, cloning and expression of the active enzyme; *Journal of Bioluminescence and Chemiluminescence* 3 (1), 1-5.

Krieger, N.; Wolff, M.S., Hiatt, R.A., Rivera, M. Vogelman, J. And Orentreich, N. (1994): Breast cancer and serum organochlorine: a prospective study among white, black and Asian women, *J. Natl. Cancer. Inst.* **86**, 589-599

Krishnan AV, Stathis p, Permuth SF, Tokes L, Feldman D., (1993); Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving, *Endocrinology* **132**, 2279-2286.

Kuiper, G.G.J.M, Enmark, E., Pelto-Huikko, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary; *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 5925-5930.

Kuiper, Tagungsbeitrag der DGPT Frühjahrstagung 1998 in Mainz

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

L'Horset, F., Dauvois, S., Heery, D.M., Cavailles, V., Parker, M.G. (1996): RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites; *Mol. Cell. Biol.*, 16, 6029-6036.

Lamuella-Raventos, R. (1993): Occurrence of resveratrol in selected California wines by a new HPLC-method; *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 41 (4), 521-523.

Landrigan, P.J., Melius, J.M., Rosenberg, M.J., Coye, M.J., Binkin, N.J., (1983): Reproductive hazards in the workplace. Development of epidemiologic research, *Scand J Work Environ Health*; **9** (2 Spec No), 83-88.

Le Douarin, B., Zechel, C., Garnier, J.M., Lutz, Y., Tora, L., Pierrat, B., Heery, D., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. (1995): The N-terminal part of TIF1, a putative mediator of the ligand-dependent activation function (AF-2) of nuclear receptors, is fused to B-raf in the oncogenic protein T18; *EMBO, J* 14, 2020-2033.

Lee, J.W., Ryan, F., Swaffield, J.C., Johnston, S.A., Moore, D.D. (1995): Interaction of thyroid-hormone receptor with a conserved transcriptional mediator; *Nature*, 374, 91-94.

Levy, J.; Faber, K.; Ayyash, L.; Hughes, C. (1995); The effect of prenatal exposure to the phytoestrogen genistein on sexual-differentiation in rats. *Proc.Soc. Exper. Biol Med.* 208, 60-66.

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

Lykkesfeldt, A., Briand, P. (1986): Indirect mechanism of oestradiol stimulation of cell proliferation of human breast cancer cell lines; *Breast Journal Cancer* 53, 29-35.

MacLeod, J. and Wang, Y. (1979): Male fertility potential in terms of semen quality : a review of the past, a study of the present, *Fertil. Steril.*, **31**, 103

MAFF (1996): Food surveillance information sheet number 83: Phthalates in food; UK Ministry of Agriculture, Fisheries and Food, London.

Maniatis, T., Sambrook, J., Fritsch, E. (1989): *Molecular cloning*; 2. Auflage; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview.

Marquardt, H., Schäfer, S. (1994): Lehrbuch der Toxikologie; Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.

Marshall, G.R., Barry, C.D., Bossard, H.E., Dammkoehler R.A. und Dunn, D.A. (1979): The Conformational Parameter in Drug Design: The Active Analog Approach; in: Computer Assisted Drug Design, ACS Symp. Series 112, Olson, E.C. und Christoffersen, R.E., Hrsg., Amer. Chem. Soc., Washington DC., S. 205-226.

Maser (1998): Pers. Mitteilung

Matthiesen; P. and Gibbs, P.E. (1998): Critical appraisal for tributyltin-mediated endocrine disruption in mollusks; Environ. Toxicol.Chem. **17** (1), 37-43.

Mayr, U. (1990): Gewebekulturtests zum Nachweis östrogenaktiver Substanzen als Alternative zum uterotrophen Assay; Alternativen zu Tierexperimenten **13**, 5-16.

McDonnell, P. et al. (1992): Identification of a negative regulatory function for steroid receptors; Proc Natl Acad Sci **89**, 10563-10567.

McDonnell, P. et al. (1995): Cellular Mechanisms which distinguish between Hormone- and Antihormone-activated Estrogen receptor; Annals of the New York Academy of Sciences, **761**, 121-137.

McLachlan, J. (1993): Functional toxicology: a new approach to detect biologically active xenobiotics; Environmental Health Perspectives 101 (5), 386-387.

McLachlan, J., Korach, K. (1995): Techniques for detection of estrogenicity; Environmental Health Perspectives **103**, 5-8.

Metzger, D. and Chambon, P. (1995): Effekt of antagonists on DNA binding properties of the human estrogen receptor in vitro an in vivo; Molecular Endocrinology **9** (5), 579-591.

Metzger, D., Cambon, P. et al. (1990): Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promotor-context dependent agonistic activity of the anti-oestrogen 4-hydroxytamoxifen; The EMBO Journal **9** (9), 2811-2818.

Metzger, D., Chambon, P. (1993): Modulation of transcriptional activation by ligand-dependent phosphorylation of the human oestrogen receptor A/B region; The EMBO Journal **12** (3), 1153-1160.

Metzler, M., (1981): The metabolism of Diethylstilbestrol; Critical Reviews in Biochemistry, 171-205.

Meyer, M., Gronemeyer, H., Chambon, P. et al. (1989): Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function; Cell 52, 433-442.

Michna, H. (1998): Pers. Mitteilung.

Milgrom, E. et al. (1988): Receptors bound to antiprogestin from abortive complexes with hormon responsive elements; Nature **336**, 695-698.

Milgrom, E. et al. (1995): Nuclear localization signals also mediate the outward movement of proteins from the nucleus; 12th International Symposium of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, Berlin.

Miljoprojekt Nr. 290 (1995): Male Reproductive Health and Environmental Chemicals with Estrogenic Effects; Ministry of Environment and Energy, Denmark, and Danish Environmental Protection Agency.

- Mirocha, C.J., Pathre, S.V., and Christensen, C.M. (1977): Zearalenone, in *Mycotoxins in Human and Animal Health*; Rodricks, J.V., Hesselstine, C.W. and Mehlman, M.A., Eds., Pathotox, Park Forest South, Ill., 345-364.
- Miyashita, S., Nomoto, H., Konishi, H., Hayashi, K. (1994): Estimation of pS2 protein level in human body fluids by a sensitive two-site enzyme immunoassay, *Clin Chim Acta.*; **228**(2),71-81.
- Mosselman, S., Polman, J. and Dijkema, R. (1996): ER β : identification and characterization of a novel human estrogen receptor; *FEBS Lett* **392**, 49-53.
- Moule, G.R., Braden, A.W.H., and Lammond, D.R. (1963): This significance of oestrogens in pasture plants in relation to animal production; in *Anim. Breeding Abstr.*, **31**, 139-157.
- Müller, A., Bolt, H. (1995): Hormonartig wirkende Substanzen in Umwelt und Nahrung; *Deutsche Apotheker Zeitung* **135** (42), 3923-3930.
- Muller, J.M.; Davis, M.J. and Chilian, W.M. (1996); Coronary arteriolar flow-induced vasodilation signals through tyrosine kinase, *Am. J. Phys.* **270** (6Pt 2), H 1878-H1884.
- Mußler, B. (1992): Untersuchung zum Einfluß von steroidverknüpften Nitrosoharnstoffen auf die Expression steroidhormonrezeptorkontrollierter Reportergene; Diplomarbeit Universität Kaiserslautern.
- Mylchreest, E., Cattlex, R.C. and Foster, P.M.D. (1998): Male Reproductive Tract Malformations in Rats Following Gestational and Lactational Exposure to Di(n-butyl) Phthalate: An Antiandrogenic Mechanism?; *Toxicological Sciences.*, In press.
- Nader (1997): Pers. Mitteilung
- Nagaoka, M. et al. (1993): Alteration of DNA Binding Specificity by Nickel (II) Substitution in three Zink(II) Fingers of Transcription Factor Sp1; *Biochemical and Biophysical Research Communications* **194** (3), 1515-1520.
- Nagel, S.C., vom Saal, F.S., Thayer, K.A., Dhar, M.G., Coechler, M., Welshons, W.V., (1997); Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol, *Environ Health Perspect* **105**, 70-76.
- Naylor, C.G. (1992): Environmental fate of alkylphenol ethoxylates; *Soap Cosmet. Chem. Spec.*, **68**, 27.
- Neubert, D. (1994): Reproduktion und Entwicklung; in Eds. Marquardt H, Schäfer S, *Lehrbuch der Toxikologie*; Wissenschaftsverlag, Mannheim, Leipzig, Wien, Zürich.
- Nimrod, A., Benson, W. (1996): Environmental estrogenic effects of alkylphenol ethoxylates; *Critical Reviews in Toxikology* **26** (3), 335-364.
- Nordeen, S. et al. (1987): A rapid, sensitive method and inexpensive assay for chloramphenicolacetyltransferase; *DNA* **6**, 173-178.
- Novak, U., Paradiso, L. (1995): Identification of Proteins in DNA-Protein Complexes after Blotting of EMSA Gels; *BioTechniques* **19** (1), 54-55.
- NTP-Studie (1992): TOX-21, Toxicity Studies of 2-Hydroxy-4-methoxybenzophenone (CAS No. 131-57-7) Administered Topically an in Dosed Feed to F344/N Rats and B6C3F₁ Mice; <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/ST-studies/TOX021.html>.

NTP-Studie (1995): TR 429, Toxicology and Carcinogenesis Studies of Diethylphthalate (CAS No. 84-66-2) in F344/N Rats and B6C3F₁ Mice (Dermal Studies); <http://ntp-server.niehs.nih.gov/htdocs/LT-studies/tr429.html>.

OECD; European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife. Report of Proceedings 2-4 December 1996, Weybridge, UK.

Olea, N., Pulgar, R., Pérez, P., Olea-Serrano, F., Rivas, A., Novillo-Fertrell, A., Pedraza, V., Soto, A.M, Sonnenschein, C., (1996); Estrogenicity of resin-based composites and sealants used in dentistry, Environ. Health Perspect. **104**, 298-305.

Olea-Serrano, M. et al. (1995): Xenoestrogens released from laquere coatings in food cans; Environmental Health Perspectives, **103** (6), 608-612.

Oliver, J.M., Burg, D.L., Wilson, B.S., McLaughlin, J.L., Geahlen, R.L. (1994): Inhibition of mast cell Fc epsilon R1-mediated signaling and effector function by the Syk-selective inhibitor, piceatannol; J. Biol. Chem., **269** (47), 29697-29703.

Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M-J, O'Malley, B.W. (1995): Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily; Science, **270**, 1354-1357.

Pathak, V.; Shirota, O.; Sekita, S.; Hirayama, Y.; Hakamata, Y.; Hayashi, T.; Yanagawa, T. and Satake, M. (1997); Antiandrogenic phenolic constituents from *dalbergia cochinchensis*, Phytochemistry **46** (7), 1219-1223.

Patt, V., Möllerring, M. and Breuer, H. (1971): The effect of 2- or 4-substituted derivatives of oestrogens on blood lipids in rats; Arzneimittel-Forsch., **21**, 308-310.

Perez, P., Pulgar, R., Olea-Serrano, F., Villalobos, M., Rivas, A., Metzler, M., Pedraza, V., Olea, N. (1998): The Estrogenicity of Bisphenol A-related Diphenylalkanes with Various Substituents at the Central Carbon and the Hydroxy Groups, Environ Health Perspect 1998 Mar; **106**(3):167-7.

Picard, D., Yamamoto, K. (1987): Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor 6 (11), 3333-3340.

Pons, M. (1990): A new cellular model of response to estrogens: a bioluminescent test to characterize (anti)estrogen molecules; BioTechniques **9**, 450-459.

Power, R.F., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. (1992): New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily. Trends Pharmacol Sci. Aug; **13**(8):318-23.

Power, R.F., Mani, S.K., Codina, J., Conneely, O.M., O'Malley, B.W. (1991): Dopamine activation of an orphan of the steroid receptor superfamily; Science **254**, 1636-1639.

Pratt, W. (1993): The role of Heat Shock Proteins in regulating the function, folding and trafficking of the Glucocorticoid Receptor 268, 21455-21458.

Pratt, W. et al. (1989): Interaction of the Glucocorticoid Receptor with the M_R 90000 Heat Shock Protein: An evolving model of ligand-mediated receptor transformation and translocation; Cancer Research **49**, 2222s-2229s.

Pratt, W., Bresnick, E. et al. (1988): Evidence that the endogenous heat-stable glucocorticoid receptor stabilizing factor is a metal component of the untransformed receptor complex; The Journal of Biological Chemistry **263** (32), 16809-16817.

Promega (1992): Gel Mobility Shift Assay Systems; Technical Bulletin.

Ptashne, M., Gann A. (1990): Activators and Targets; Nature **346**, 324-331.

- Raloff, J. (1994): Are environmental "hormones" emasculating wildlife?; *Science News* **145**, 24-27.
- Raloff, J. (1994): Are men suffering from prenatal or childhood exposures to "hormonal" toxicants?; *Science News* **145**, 56-58.
- Rebar, R.W., Morandini, I.C., Petze, J.E., Erickson, G.F. (1982): Hormonal basis of reproductive defects in athymic mice: reduced gonadotropins and testosterone in males, *Biol Reprod. Dec*; **27**(5):1267-76.
- Reid, E.E., Wilson, E. (1944): The relation of estrogenic activity to structure in some 4,4'-dihydroxydephenylmethanes; *J. Am. Chem. Soc.* **66**, 967.
- Richard-Foy, H., Hager, G. (1987): Sequence-specific positioning of nucleosomes over the steroid-inducible MMTV promotor; *The EMBO Journal* **6** (8), 2321-2328.
- Rickwood, D. (1990): *Gel Electrophoresis of Nucleic Acids, A practical approach*, 2. Auflage, Oxford University Press.
- Rideau, F. (1996): Funktionelle Analyse hormonell aktiver Verbindungen in in-vitro Testsystemen; *Forschungsarbeit Universität Kaiserslautern*.
- Riley, V. (1975): Mouse mammary tumors: alteration of incidence as apparent function of stress; *Science*, **189**, 465-467.
- Robidoux, S. et al. (1992): Salt-dependent formation of DNA/protein complexes in vitro as viewed by the gel-mobility shift assay; *BioTechniques* **13**, 136-140.
- Rochefort, H. (1991): Mechanism of action of high-affinity antiestrogens. An overview; *American Journal of Clinical Oncology* **14** (2), S1-S4.
- Romanujam, P. et al. (1990): Fast electrophoresis to analyze DNA-protein interactions; *BioTechniques* **8**, 556-563.
- Safe, S.H. (1995): Environmental and dietary estrogens and human health: is there a problem?; *Environ. Health. Perspect* **103**, 346-351.
- Schmitz, G. et al. (1990): Nonradioactive Labeling of Oligonucleotids in vitro with the hapten Digoxigenin by Tailing with Terminal Transferase; *Analytical Biochemistry* **192**, 222-231.
- Schneider, M. (1993): Antihormone, von der Entdeckung der Steroidhormone zu spezifischen Krebstherapeutika; *Arch Pharm Weinheim* **326**, 769-784.
- Schneider, R. et al. (1986): A sensitive and rapid gel retention assay for nuclear factor I and other DNA-binding proteins in crude nuclear extracts; *Nucleic Acids Research* **14**, 1303-1317.
- Seed, B., Sheen, J-Y. (1988): A simple phase-extraction assay for chloramphenicolacetyltransferase activity; *Gene* **67**, 271-277.
- Setchell, K., Zimmer-Nechemias, L., Cai, J., Heubi, J.E. (1997): Exposure of infants to phyto-oestrogens from soy-based infant formula; *The Lancet*, **350**, 23-27.
- Sharpe, R., Skakkebaek, N. (1993): Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract?; *The Lancet* **341**, 1392-1395.
- Shekhan, P.V.M., Werdell, J., Basrur, V.S. (1997): Environmental Estrogen Stimulation of Growth and Estrogen Receptor Function in Preneoplastiv and Cancerous Human Breast Cell Lines; *J. of National Cancer Institute*, **89**, No. 23, 1774-1782.

- Shen, K. and Nowak, R.F. (1997); DDT stimulates c-erbB2, c-met, and STAT5 tyrosine phosphorylation, Grb-Sos association, MAPK phosphorylation and proliferation of human breast epithelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 17-21.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., McMahon, J., Vistica, D., Warren, J.T., Bokesch, H., Kenney, S., Boyd, M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening; *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- Sleigh, M. (1986): A nonchromatographic assay for expression of the chloramphenicolacetyltransferase gene in eucaryotic cells; *Analytical Biochemistry* **156**, 251-256.
- Smith, E.R. and Quinn, M.M. (1992): Uterotropic action in rats of amsonic acid and three of its synthetic precursors, *J Toxicol Environ Health*; **36**(1):13-25
- Soto, A., Sonnenschein, C. (1995): Development of a marker of estrogenic exposure in human serum; *Clinical Chemistry* **41**, 1888-1895.
- Soto, A., Sonnenschein, C. (1985): The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7); *Journal of steroid Biochemistry* **23**, 87-94.
- Soto, A., Sonnenschein, C. (1995): The E-Screen-Assay as a tool to identify Estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants; *Environmental Health Perspectives* **103**, 113-122.
- Soto, A.M., Justica, H., Wray, J.W., Sonnenschein, C. (1991): *p*-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene; *Environ Health Perspect* **92**, 167-173.
- Soule, H. (1973): A human cell line from a pleural effusion derived from a breast carcinoma; *Journal of the National Cancer Institute* **51**, 1409-1413.
- Stillman, R.J. (1982): In utero exposure to diethylstilbestrol: adverse effects on the reproductive tract and reproductive performance in males and female offspring; *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **142**, 905-921.
- Thakkar, K.; Geahlen, R.L. and Cushman, M. (1993); Synthesis and protein-tyrosine kinase inhibitory activity of polyhydroxylated stilbene analogues of piceatannol, *J. Med. Chem.* **36** (20), 2950-2955.
- Toppari, J., McLachlan, J., Sharpe, S., Skakkebek, N., et al. (1995): Male reproductive health and environmental chemicals with estrogenic effects; Ministry of Environment and Energy, Denmark.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., Rosenfeld, M.G. (1997): The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear-receptor function, *Nature*. **387**(6634):677-84.
- Trévoux, R., De Brux, J., Castanier, M., Nahoul, K., Soule, J.-P. and Scholler, R. (1986): Endometrium and plasma hormone profile in the perimenopause and post-menopause; *Maturitas*, **8**, 309-326.
- Tsai, S., Gustafson, J.-A. (1988): Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation; *Cell* **55**, 361-369.
- Utsumi, T., Klostergaard, J., Akimura, K., Edashige, K., Sato, E.F. (1992): Modulation of TNF- α -priming and stimulation-dependent superoxide generation in human neutrophils by protein kinase inhibitors; *Arch. Biochem. Biophys.* **294**, 271-278.

van Steenbrugge, G.J., Groen, M., de Jong, F.H., Schroeder, F.H. (1984): The use of steroid-containing Silastic implants in male nude mice: plasma hormone levels and the effect of implantation on the weights of the ventral prostate and seminal vesicles, *Prostate.*; **5**(6):639-47.

Vetter, W. und Luckas, B. (1997): Chirale chlorierte Kohlenwasserstoffe und ihre stereoselektive Anreicherung innerhalb mariner Nahrungsketten, Dt. Lebensmittelchemikertag 1997, Berlin

Vignon, F.; Terqui, M.; Westley, B.; Deroq, D. and Rochefort, H. (1980); Effects of plasma estrogen sulfates in mammary cancer cells; *Endocrinology*, **106**, 1079-1086

Villalobos, M., Olea, N., Brotons, J.A., Olea-Serrano, M.F., Ruiz de Almodovar, J.M., Pedraza, V. (1995): The E-screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks; *Environ Health Perspect*, **103**(9):844-50.

Voegel, J.J., Heine, M.J.S., Zechel, C., Chambon, P., Gronemeyer, H. (1996): TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors; *EMBO, J* **15**, 3667-3675.

Vollmer, G. (1998): Pers. Mitteilung

Von Baur, E., Zechel, C., Heery, D., Heine, M.J.S., Garnier, J.M., Vivat, V., Le Douarin, B., Gronemeyer, H., Chambon, P., Losson, R. (1996): Differential ligand-dependent interactions between the AF-2 activating domain of nuclear receptors and the putative transcriptional intermediary factors mSUG1 and TIF1; *EMBO, J* **15**, 110-124.

W.H.O. (1991): Congenital Malformations Worldwide: A Report from The International Clearinghouse for Birth Defects Monitoring Systems; Elsevier, Oxford, p. 113-118.

Wahli, W., Martinez, E. (1991): Superfamily of steroid nuclear receptors: positive and negative regulators of gene expression; *The FASEB Journal* **5**, 2243-2249.

Wakeling, A.E., Bowler, J. (1988): Biology and mode of action of pure antiestrogens; *Journal of Steroid Biochemistry*, **30**, No 1-6, 141-147.

Wang, B., Lu, Z. and Polya, G. (1998): Inhibition of eukaryote serine/threonine-specific protein kinases by piceatannol; *Planta Med*, **64** (3), 195-199.

Wang, H. and Murphy, P.A. (1994): Isoflavone content in commercial soybean foods; *J. Agric. Food Chem.* **42**, 1666-1673.

Wei, H.; Wei, L.; Frenkel, K.; Bowen, R.; Barnes, S. (1993); Inhibition of tumor-promotor induced hydrogen peroxide formation by genistein *in vitro* and *in vivo*, *Nutr. Cancer* **20**, 1-12.

Welsch, 1998, pers. Mitteilung

Welshons, W. (1984): Nuclear localization of unoccupied oestrogen receptors; *Nature* **307**, 747-749.

Westermeier, R. (1990): Gelelektrophorese-Praktikum, VCH-Verlagsgesellschaft, Weinheim, New York, Basel, Cambridge.

White, R. et al. (1994): Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic; *Endocrinology* **135** (1), 175-182.

- Wiese, T.E., Polin, L.A., Palomino, E. and Brooks, S.C. (1997): Induction of the Estrogen Specific Mitogenic Response of MCF-7 Cells by Selected Analogues of Estradiol-17 β : A 3D QSAR Study; *J. Med. Chem.*, **40**, 3659-3669.
- Wilson, E. et al. (1992): Androgen receptor phosphorylation, turnover, nuclear transport and transcriptional activation; *The Journal of Biological Chemistry* **267** (2), 968-974.
- Wilson, E., et al. (1991): Transcriptional activation and nuclear targeting signals of the human androgen receptor; *The Journal of Biological Chemistry* **266** (1), 510-518.
- Wine, R.N., Li, L.H., Barnes, L.H., Gulati, D.K. and Chapin, R.E. (1997): Reproductive toxicity of di-*n*-butyl phthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats; *Environ. Health. Perspect.* **105**, 102-107.
- Winter, H. (1994): Nachweis spezifischer DNA-Proteinkomplexe mit Hilfe eines nichtradioaktiven Gel-Shift-Assays, *Boehringer Mannheim Biochemica Information* **93**, 19-20.
- Wolffe, A.P. (1994): Nucleosome positioning and modification: chromatin structures that potentiate transcription; Elsevier Science Ltd, 240-244.
- Wong, C., Wilson, E. (1993): Steroid requirement for androgen receptor dimerization and DNA binding; *The Journal of Biological Chemistry* **268**, 19004-19012.
- Wood, K. (1990): Firefly luciferase: A new tool for molecular biologists; *Promega Notes* 28.
- Wright, P.A. (1960): Infertility in rabbits induced by feeding ladino clover; *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **105**, 428-430.
- Yeh, S., Miyamoto, H., Chang, C. (1997): Hydroxyflutamide may not always be a pure antiandrogen; *Lancet*, **349**(9055):852-3.
- Ylikomi, T., Gronemeyer, H., (1992): Cooperation of proto-signals for nuclear accumulation of estrogen and progesteron receptors; *The EMBO Journal* **11** (10), 3681-3694.
- Zava, D.T., Blen, M., Duwe, G. (1997): Estrogenic activity of natural and synthetic estrogens in human breast cancer cells in culture; *Environ. Health. Perspect.* **105** (Suppl 3), 637-645.
- Zhu, B. and Liehr, J. (1994): Quercetin increases the severity of estradiol-induced tumorigenesis in hamster kidney, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **125**, 149-158.
- Zhu, B. and Liehr, J. (1996): Inhibition of catechol O-methyltransferase - catalyzed O-methylation of 2- and 4- hydroxyestradiol by Quercetin: possible role in estradiol-induced tumorigenesis, *J. Biol. Chem.* **271**, 1357-1363.
- Zhu, B.T. and Conney, A.H. (1998): Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives; *Carcinogenesis*, **19** (1), 1-27.
- Zhu, B.T., Bui, Q.D., Weisz, J. and Liehr, J.G. (1994): Conversion of estrone to 2- and 4-hydroxyestrone by hamster kidney and liver microsomes: implications for the mechanism of estrogen-induced carcinogenesis; *Endocrinology*, **135**, 1772-1779.
- Zimmerli, B. und Schlatter, J. (1997): Vorkommen und Bedeutung der Isoflavone Daidzein und Genistein in der Säuglingsernährung; *Mitt. Gebiete Lebensm. Hyg.* **88**, 219-232.

ZKBS (1994): Stellungnahmen der zentralen Kommission für die biologische Sicherheit; Bundesgesundheitsblatt 319/320.

Zwijzen, R.M., Wientjens, E., Klompmaker, R., van der Sman, J., Bernards, R., Michalides, R.J. (1997): CDK-independent activation of estrogen receptor by cyclin D1; *Cell.*, **88**(3):405-15.

Publikationsliste

Activity of Steroid-linked nitrosoureas in a cell line derived from human meningioma
F.J.H. Taut, B. Mußler, M.B. Jager, G. Eisenbrand, B. Wowra, W.J. Zeller
in: Zeller W.J., D'Incalci M., Newell D.R. (eds): Novel approaches in anticancer drug
design, molecular modeling new treatment strategies, *Contrib Oncol*, Basel Karger,
vol 49, pp 187-191 (1995)

Identification and characterization of antiandrogens by in vitro assays and molecular
modeling G. Mußler, S. Guth, G. Eisenbrand
in: "Carcinogenic/anticarcinogenic factors in food: novel concepts? (Eds. G.
Eisenbrand et al), Proc. DFG-Symposium der Senate Commission of Food Safety,
DFG-Publikation, Wiley-VCH, im Druck

Analytik oestrogen- und anabolaktiver Verbindungen durch Bestimmung der Expressionsraten von stabil transfizierten Reportergenen in einem biologischen Testsystem

B. Mußler, G. Eisenbrand

in: Schöffel H., Spielmann H., Tritthart H.A. (eds): Ersatz- und Ergänzungsmethoden zu Tierversuchen; Forschung ohne Tierversuche; Springer Verlag, Wien, New York, 1998

Endokrin wirksame Stoffe in der Nahrung: Erkenntnisse und Kenntnislücken für die Risikobewertung B. Mußler, M. Hofer und G. Eisenbrand
Eds. Kochen; in press

Abstracts - Poster - Vorträge

The estradiol responsive element in stably transfected MCF-7 mammary carcinoma cells is inhibited by an androgen linked nitrosourea.

B. Mußler, M. Jager, G. Eisenbrand

Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 34, 1509, 1993

Effects of an androgen linked N-(2-chloroethyl)-N-nitrosourea on the estrogen responsive element in mammary carcinoma cells assayed by luciferase reporter gene response

B. Mußler, M. Jager G., Eisenbrand

Suppl. to J. of Canc. Res. Clin. Oncol., Vol 119, T 1, 1993

The induction rate of reportergene products (CAT/LUC) in steroid hormone receptor positive mammary carcinoma cells is reduced by an androgen-linked alkylating agent
Mußler, B., Eisenbrand G., 12th International Symposium of the Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 21-24. Mai 1995, Berlin

Bestimmung des hormonellen Potentials von Lebensmittelinhaltsstoffen in einem Zellkultursystem mit stabil transfizierten Reportergenen

B. Mußler, G. Eisenbrand

Lebensmittelchemie 49, 10-26, 1995

Screeningsystem für Umweltkontaminanten mit hormoneller Wirkung

Mußler, B. und Eisenbrand, G. Symposium des Forschungsschwerpunktes

Umweltschutz und Energietechnik der Universität Kaiserslautern am 23.02.1996

(Vortrag)

Untersuchungen zur hormonellen/antihormonellen Aktivität verschiedener Lebensmittelinhaltsstoffe in funktionellen *in vitro* Assays

D. Seng, A. Yusuf, S. Böhm, S. Guth, B. Mußler, G. Eisenbrand

Lebensmittelchemie 52, 34, 1998

Erfassung endokriner Aktivität von Stoffen aus der Umwelt und Lebensmitteln mittels funktioneller *in vitro*-Tests

G. Eisenbrand, D. Seng, B. Mußler

Analytica Scientific Conference 98, 21.-24. April München (Vortrag)

Dank

Mein Dank gilt allen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Arbeitskreises G. Eisenbrand, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Besonders danken möchte ich:

Herrn Dr. Martin Jager für die Einführung in das wissenschaftliche Arbeiten und für seine aufmunternden Worte und Taten.

Frau Dr. Monika Hofer für viele lustige und ernste Unterredungen und manch geseligem Abend in KL

Frau Daniela Seng für ihre unermüdliche Mithilfe eine kleine Gruppe zu etablieren und einige erfolgsversprechende Arbeitsansätze zu etablieren

Frau Dr. Anne Fuchs für viele durchgelernte Wochen in irgendwelchen deutschen Städten zur Erlangung des Fachtoxikologen

Meinen Kolleginnen Sabine Guth und Sonja Böhm für ihre unermüdliche Arbeiten und ihre Unterstützung

Meinen Forschungspraktikantinnen Sybylle Grub, Daniela Seng, Sabine Guth, Sigrid Follmann

Meinen Diplomantinnen Daniela Seng, Sabine Guth, Sigrid Follmann und Miriam Gensler für ihr Engagement, ihre zuverlässige Mitarbeit und ihren Durchhaltewillen

Frau Ingrid Romani für ihre freundliche Unterstützung in allen Verwaltungsangelegenheiten und die aufmunternden Worte wenn es mal wieder gestern fertig sein sollte.

Frau Dr. Susanne Lauck-Birkel für verschieden Plauderstündchen und viele wichtige Infos

Herrn Wolfgang Petry und Herrn Aribert Vetter für die gesamte apparative Hilfe während der Promotion

Herrn Ralph Hössel für viele verzweifelte Stunden vor der O2 und mit Sybyl

Mein besonderer Dank gilt auch denen, die ich jetzt leider vergessen habe, aber meine Arbeit manchmal, um den entscheidenden Schritt nach vorne gebracht haben.

Besonders danken möchte ich vor allem meiner Frau Sabine für ihre tolle Unterstützung und bei meiner Tochter Rebecca für viele aufheiternde Stunden.

Mein größter Dank gilt meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Hilfen diese Arbeit nie entstanden wäre.

Lebenslauf

Name: Bernd Helmut Mußler
Geburtsdatum: 18.10.1967
Geburtsort: Offenburg
Familienstand: verheiratet, eine Tochter
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung:

1974-1978 Besuch der Grundschule Theodor-Heuss in Lahr
1978-1987 Besuch des Max-Planck-Gymnasiums in Lahr,
abgeschlossen mit der Allgemeinen Hochschulreife am
19.05.1987

Hochschulausbildung:

WS1987 - 13.12.1991 Studium der Lebensmittelchemie an der Unisversität
Kaiserslautern, Abschluß durch die 1. Staatsprüfung

01.04.1991 - 30.11.1991	Diplomarbeit im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand
01.12.1991 - 31.12.1992	Wissenschaftliche Arbeit in der Firma Oncotest GmbH, Prof. Dr. H. Fiebig
01.01.1993 - 31.12.1997	Promotion in der Fachrichtung Lebensmittelchemie & Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand
01.01.1998- heute	Weiterbeschäftigung als wissenschaftlicher Mitarbeiter in der Fachrichtung Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie an der Universität Kaiserslautern im Arbeitskreis von Prof. Dr. G. Eisenbrand