

MASTERARBEIT / MASTER'S THESIS

Titel der Masterarbeit / Title of the Master's Thesis

Modifikation eines in vitro Östrogen-Screening-Verfahrens
zur integrierten Erfassung von
Metabolismusprozessen der Leber

verfasst von / submitted by

Réka Anna Bándi BSc.

angestrebter akademischer Grad / in partial fulfilment of the requirements for the degree of
Master of Science (MSc.)

Wien, 2017

Studienkennzahl lt. Studienblatt /
degree programme code as it appears on
the student record sheet:

A 066863

Studienrichtung lt. Studienblatt /
degree programme as it appears on
the student record sheet:

Masterstudium Biologische Chemie

Betreut von / Supervisor:

Univ. Doz. Dr. Manfred Tacker

Danksagung

Ich bedanke mich vielmals bei Univ.Doiz.Dr.Manfred Tacker für die Betreuung der Masterarbeit und für seine ansteckende Begeisterung für das Forschungsgebiet der Verpackungstechnologie.

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem praktischen Betreuer und Mentor Dr. Christian Kirchnawy und seinem wundervollen Team: Mag. Christopher Hartl, Dr. Johannes Mertl und Dipl.Ing Elisabeth Mertl dafür, dass sie mir auch bei den mühsamsten Problemen kompetent zur Seite standen.

Ich danke meiner Diplomandenkollegin Grace Lin für die fröhlichen Mittagspausen die ich mit ihr hier im Institut verbringen durfte.

Selbstverständlich bedanke ich mich beim gesamten Team des österreichischen Forschungsinstituts für Chemie und Technik für die Bereitstellung der Forschungseinrichtungen und die Hilfe bei der Abwicklung der bürokratischen Angelegenheiten rund um diese Masterarbeit.

Liebe Familie!

Ich möchte mich für Eure Unterstützung während meines gesamten Studiums bedanken! Meine Abschlussarbeit verdanke ich meinem Lebensgefährten Dr Marcus Schrauder der mir naturwissenschaftliches Denken vorlebt, in jeder schwierigen Situation seelischen Beistand leistet und Sponsor meiner gesamten Ausbildung ist.

Meiner Tochter Timna danke ich herzlichst dafür, dass sie mir erklärt hat wie man überhaupt ein Buch schreibt (die schwierigen Seiten zuerst).

Prof. Edith Schrauder danke ich für die geschenkte Zeit, die man als Mutter sonst misst.

Schlussendlich danke ich meinen Eltern dafür, dass sie immer an mich geglaubt haben.

Zusammenfassung

Für die Biodetektion von endokrin aktiven Substanzen (EAS) werden bevorzugt in vitro Assays verwendet. Diese Methoden können allerdings nicht die Auswirkung der Biotransformation auf die endokrine Aktivität der Testsubstanz berücksichtigen. Es wurde daher für den humanen Östrogenrezeptor $hER\alpha$ eine neue Methode entwickelt, welche die S9 Fraktion von Rattenleber-Extrakten in den CALUX Reporter-gen-Assay inkorporiert. Methoxychlor (MC), ein organochlorines Pestizid, wurde als Modellsubstanz herangezogen. Der Metabolismus wurde entweder durch den (1) Shift in der mittleren effektiven Konzentration (EC_{50}), (2) durch eine erhöhte rezeptorvermittelte Transkriptionsaktivität (erhöhte maximale Induktion) oder durch beides ausgedrückt. Dadurch konnte entweder eine erhöhte Östrogenaktivität, eine Detoxifikation oder kein Effekt durch den Metabolismus festgestellt werden. Das Ziel dieser Masterarbeit war die Reproduzierbarkeit der Messwerte zu bestätigen. Darüber hinaus wurden verschiedene S9 Chargen verglichen und die Auswirkung der unterschiedlichen S9 Induktionen (Aroclor 1254 oder β NF/PB) auf den Metabolismus untersucht. Bei Screenings von HPTE (einem Metaboliten von MC), Benzophenon (BP), 1,3 Diphenylpropan (DPP) und 17β -Estradiol selbst, konnte festgestellt werden, dass die Messergebnisse im erwarteten Bereich waren und weder BP noch DPP durch die Metabolisierung aktiviert werden konnten. Bei der Untersuchung der Effekte verschiedener Probenmatrizen auf den Metabolismus durch S9 und MC konnte bis auf die Detoxifikation durch eine beschichtete Alu Probe keine Auswirkung festgestellt werden. Die Resultate dieser Arbeit machen deutlich, dass die Einbeziehung von S9-Fraktionen als Metabolisierungskomponente in den CALUX-Bioassay für die Biodetektion östrogenaktiver Substanzen möglich ist und reproduzierbare Ergebnisse im erwarteten Bereich liefert.

Abstract

The use of in vitro assays is the first choice for the biodection of endocrine active substances. However, in vitro assays are often not capable to consider the role of biotransformation on the activity of the substance of interest. Therefore a new method, incorporating an S9 fraction of rat liver extracts into the CALUX-reportergene-assay, for estrogen receptor hER α has been developed. Methoxychlor (MC) which is an organochloric pesticide was used to set up the method. The metabolism was either shown as (1) a shift of the half maximal effective concentration (EC₅₀) or (2) as an increased receptor-mediated transcription activity (an increase of the maximal induction) or both. Thus an increased estrogen activity, a detoxification or no effect on the activity through the metabolism was determined. The goal of this master's thesis was to confirm the reproducibility of the measured data. Furthermore several S9 charges have been compared and the effect of the variable S9 inductions (Aroclor 1254 oder β NF/PB) on the metabolism have been probed. It could be asserted in screening analyses of HPTE (a metabolite of MC), Benzophenone (BP), 1,3 Diphenylpropane (DPP) and 17 β -Estradiol that the measured values are exactly in the expected range and neither BP nor DPP could be activated through metabolism. While studying the effects of different sample-matrices on the metabolism through S9 and MC, except of the detoxification of one Alu sample, no influence could be detected. The results of this master's thesis show that it is possible and it gives reproducible results to use the incorporation of S9 fractions as a metabolising component in the CALUX-reportergene-assay for the biodection of estrogen active substances.

Inhaltsangabe

Abkürzungsverzeichnis	9
1 Einleitung.....	10
1.1 Das endokrine System des Menschen.....	10
1.2 Östrogene.....	11
1.2.1 Natürliche Östrogene.....	11
1.2.1.1 Struktur und Biosynthese.....	11
1.2.1.2 Abbau und Exkretion.....	14
1.2.2 Körperfremde Östrogene.....	15
1.2.2.1 Östrogene als endokrin aktive Substanzen (EAS).....	15
1.2.2.1.1 Östrogene als Arzneimittel.....	15
1.2.2.1.2 Phytoöstrogene.....	16
1.2.2.2 Endokrine Disruptoren (ED).....	17
1.2.2.2.1 EAS aus Lebensmittelverpackung.....	19
1.2.2.2.1.1 Migration.....	23
1.3 Toxizität und Metabolismus.....	23
1.3.1 Biotransformation.....	24
1.3.1.1 Phase I – Funktionalisierungsreaktionen.....	24
1.3.1.1.1 Oxidationsreaktionen.....	24
1.3.1.1.2 Desalkylierungs- und Desaminierungsreaktionen.....	25
1.3.1.1.3 Hydrolytische Spaltungsreaktionen.....	25
1.3.1.1.4 Methylierungsreaktionen.....	26
1.3.1.1.5 Enzyme der Phase I Reaktionen.....	27
1.3.1.1.5.1 Cytochrom-P450-Enzyme.....	27
1.3.1.1.6 Aktivierung des Östrogenrezeptors aufgrund von Phase I Reaktionen.....	28
1.3.1.2 Phase II –Kopplung.....	30
1.4 In vitro Testsysteme für die Identifizierung östrogenaktiver Substanzen.....	31
1.4.1 Estrogen Screen Assay (E-Screen).....	32
1.4.2 Yeast Estrogen Screen Assay (YES).....	32

1.4.3 ER α -CALUX (Chemically Activated Luciferase Gen Expression Assay).....	33
1.5 In vitro Integration des Metabolismus in Östrogen-Screening-Verfahren.....	33
1.5.1 Computersimulation des Metabolismus.....	33
1.5.2 Endogene Metabolisierungssysteme.....	35
1.5.2.1 Hepatozyten.....	35
1.5.2.2 Gentechnisch veränderte Zellen.....	36
1.5.3 Exogene Metabolisierungssysteme.....	37
1.5.3.1 Subzelluläre Fraktionen aus der Leber.....	37
1.6 Integration der S9 Metabolisierung in den ER α -CALUX Assay.....	37
2 Materialien und Methoden.....	39
2.1 Verwendete Materialien und Geräte.....	39
2.2 Verwendete Chemikalien.....	41
2.3 Verwendete Enzyme und Kofaktoren.....	42
2.4. Analysierte Substanzen.....	44
2.5 Verwendete Zelllinie.....	46
2.6 Verwendete Medien und Pufferlösungen.....	46
2.6.1 Phosphatpuffer.....	46
2.6.2 Freezing Medium.....	46
2.6.3 Rotes Zellkulturmedium.....	46
2.6.4 Weißes Testmedium	46
2.6.5 DCC-FCS.....	47
2.7 Leber und S9-Mix.....	47
2.7.1 Leber und S9.....	47
2.7.2 S9-Mix	48
2.8 Herstellung der 17 β -Estradiol Verdünnungsreihe für die Responskurve.....	48
2.9 Herstellung der 17 β -Estradiol Verdünnungsreihe für die Quantifizierung.....	49
2.10 Herstellung der G418 Stock-Solution.....	50
3 Durchführung.....	51
3.1 Fließschema zur Durchführung der Versuche.....	51
3.2 Migrationslagerung	51

3.3 Aufkonzentrierung.....	52
3.4. Vorbehandlung der Migratlösungen für die Extraktion.....	52
3.5 Festphasenextraktion.....	52
3.6 Herstellung der Verdünnungsreihe der Reinsubstanzen.....	53
3.7 Zellkultivierung.....	54
3.7.1 Anzucht der Zellen.....	54
3.7.2 Passage der Zellen.....	55
3.7.3 Zellzahlbestimmung.....	55
3.7.4 Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff.....	55
3.8 Durchführung des CALUX Bioassays mit integrierter Metabolisierung.....	56
3.8.1 CALUX Tag 1: Platten ansähen aus Cryokultur.....	56
3.8.2 CALUX Tag 2: Zugabe der Testsubstanzen und Inkorporation eines Metabolisierungssystems.....	56
3.8.3 CALUX Tag 3: Auswertung.....	57
3.8.3.1 Optische Kontrolle im Mikroskop.....	57
3.8.3.2 Messung der Luciferase Aktivität im Photometer.....	58
3.9 Negativkontrolle.....	58
4 Ergebnisse.....	59
4.1 Auswertung.....	59
4.2 Metabolisierung der Modellsubstanz Methoxychlor.....	59
4.2.1 Vergleich Methoxychlor mit und ohne S9.....	60
4.2.2 Mehrfachbestimmung und Reproduzierbarkeit.....	60
4.2.3 Testvergleich in Zusammenarbeit mit anderen Labors.....	63
4.2.4 Vergleich von β NF/PB und Aroclor 1254 induziertem S9 und Chargenvarianzen.....	65
4.2.5 Versuche ohne $MgCl_2$ im S9-Mix.....	66
4.3 Metabolisierung weiterer Reinsubstanzen.....	68
4.3.1 Metabolisierung des Metaboliten HPTE.....	68
4.3.2 Metabolisierung von Benzophenon (BP).....	69
4.3.3 Metabolisierung von 1,3-Diphenylpropan (DPP).....	70
4.3.4 Metabolisierung von 17β -Estradiol.....	71
4.4 Auswirkung verschiedener Probenmatrizen auf die Verstoffwechselung durch S9.....	72

4.4.1 Methoxychlor mit Probenmatrix PP.....	73
4.4.2 Methoxychlor mit Probenmatrix GVK.....	74
4.4.3 Methoxychlor mit Probenmatrix beschichtetes Aluminium.....	75
4.4.4 Methoxychlor mit Probenmatrix Papier.....	76

5 Interpretation.....	77
------------------------------	-----------

6.Literaturverzeichnis.....	82
------------------------------------	-----------

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACN-MeOH	Acetonitril-Methanol Gemisch 1:1
CALUX	Chemically Activated Luciferase Expression
DCC-FCS	Dextran-Coated Charcoal gestripptes Fetal Calf Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
EAS	Endokrin aktive Substanz
EC ₅₀	mittlere effektive Konzentration
ED	Endokriner Disruptor
EEQ	Estradioläquivalent
EFSA	European Food Safety Authority
EtOH	Ethanol
ER	Östrogen Rezeptor
ERE	Estrogen Response Elements
FCS	Fetal Calf Serum
FDA	Food Drug Agency
GVK	Getränkeverbundkarton
hER	humaner Östrogen Rezeptor
HQ-H ₂ O	High Quality Water
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
LOQ	Limit of Quantification (Bestimmungsgrenze)
MeOH	Methanol
MW	Mittelwert
NIAS	Non intentionally added substances
PE	Polyethylen
PP	Polypropylen
RO-H ₂ O	Revers Osmose Wasser
RSD	Relative Standardabweichung
SPE	Solid Phase Extraction
YES	Yeast Estrogen Screen

1 Einleitung

1.1 Das endokrine System des Menschen

Das endokrine System des Menschen ist ein funktionell sehr komplexes System, welches selbstregulierend zur Aufrechterhaltung der Homöostase im Organismus dient. Das Endokrinium kontrolliert dabei verschiedenste physiologische Prozesse im Körper wie z.B.: Fortpflanzung und Sexuelle Differenzierung, physische & psychische Entwicklung und Wachstum, Stressbewältigung, Regulation des Metabolismus und das Verhalten. Zum Endokrinium gehören neben den verschiedenen endokrinen Drüsen auch endokrine Zellen in Herz, Leber, Niere und anderen Organen (Nussey & Whitehead, 2001; Alberts, 2007)

Während die lokale Regulation im Menschen über sekundäre Botenstoffe, Neurotransmitter und Transkriptionsfaktoren erfolgt, setzt das Endokrinium Hormone als Botenstoffe ein, um eine systematische Informationskommunikation zu bewerkstelligen und die falls nötige Regulation als Antwort „in Auftrag zu geben“ (Horn, 2012).

Der Begriff „Hormon“ stammt vom griechischen Wort „horman“ und bedeutet, als Anspielung auf die Antreibung einer chemischen Aktion in einer Zielzelle, soviel wie „antreiben“. Die klassischen Hormone werden von einer spezialisierten endokrinen Drüse oder Zelle als Antwort auf ein „negative feedback control“ gebildet. Sie wirken entweder parakrin auf die Nachbarzellen ein oder werden ins Blut abgegeben um schließlich an einem anderem locus im Organismus, z.B. an der Leber, über spezifische Rezeptoren an den Zielzellen, eine endokrine Wirkung auszulösen. Diese nach den Schlüssel-Schloß Prinzip funktionierenden Rezeptoren können sich entweder an der Oberfläche oder an der Innenseite der Zielzelle befinden (Horn, 2012; Alberts, 2007; Nussey & Whitehead, 2001). In dieser Arbeit wird ein besonderes Augenmerk auf die durch Östrogene, Androgene, Thyroid Hormone und durch Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren stimulierte Hormone (PPAR) aktivierten Zellkernrezeptoren gelegt. Die Aktivierung von Zellkernrezeptoren, basiert auf Ligandenbindung, welche erstmals eine Konformationsänderung des Rezeptors auslöst und somit eine Dimerisation hervorruft. In Folge dessen bindet der Rezeptor in direkter Kombination mit transcriptionalen Koregulatoren an die DNA und löst eine Genexpression aus (Gronemeyer, Gustafsson & Laudet, 2004; WHO/IPCS, 2002).

Die Einteilung der Hormone erfolgt in 3 chemische Gruppen: 1. Aminosäurederivate wie z.B.: Adrenalin oder Thyroid Hormone; 2. Peptide wie Insulin oder Oxytocin sowie 3. Lipid Derivate wie z.B.: Steroid Hormone oder Prostaglandine (Horn, 2012; Nussey & Whitehead 2001).

1.2 Östrogene

1.2.1 Natürliche Östrogene

Östrogene sind neben den Gestagenen die wichtigsten weiblichen Sexualhormone (Horn, 2012). Sie sind für die Entwicklung und Regulation des weiblichen Reproduktionssystems sowie der sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich und spielen eine wichtige Rolle in der Schwangerschaft. Zusätzlich beeinflussen Östrogene die hormonelle Gesundheit des Mannes und noch viele weitere Faktoren im menschlichen Organismus wie z.B., den Wachstum der Knochen, die Fettverteilung im Körper, das Immunsystem, die Wasser und Na^+ Retention in der Niere, die Entwicklung des Zentralnervensystems und das Kardiovaskuläre System (Dohmen, 1995; Horn, 2012).

1.2.1.1 Struktur und Biosynthese

Östrogene gehören zum chemischen Grundgerüst der lipophilen Steroidhormone. Diese sind Abkömmlinge des Cholesterins und besitzen wie Cholesterin selbst ein Sterangerüst (siehe Abbildung 1), weshalb sie auch oft als Steroid-Derivate bezeichnet werden. Sterane setzen sich aus drei sechsgliedrigen und einem fünfgliedrigem Kohlenstoff Ring zusammen (Horn, 2012; Harper et al., 2013)

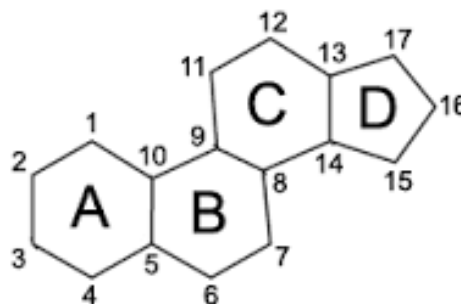


Abbildung 1: Das Grundgerüst der Steroidhormone

Während Cholesterin vor allem in der Leber gebildet wird, aber auch zu einem geringen Teil in den hormonbildenden Zellen selbst, wird das Östrogen, an unterschiedlichen Orten des Organismus synthetisiert: Ovarien, Plazenta, Nebennierenrinde und Leydig-Zwischenzellen des Hodens (Dohmen, 1995; Horn, 2012). Die Produktion und Freisetzung von Östrogenen wird über das Hypothalamus-Hypophysen-System und weiters über das Zentralnervensystem gesteuert. In der Frau erfolgt die Biosynthese des Östrogens hauptsächlich in den Ovarien (in schwangeren Frauen in der Plazenta). Die Synthese des Östrogens im Mann hingegen erfolgt meist in den Hoden, wobei Östrogene höchstwahrscheinlich in der Produktion der Samenflüssigkeit eine Rolle spielen, allerdings als Sexualhormon von signifikant weniger Bedeutung für den Mann als für die Frau ist.

Östrogene werden aber nicht nur im Menschen sondern insgesamt in allen Vertebraten sowie in einigen Insekten synthetisiert (Horn, 2012; Harper et al., 2013)

Östrogen wird im Menschen aus dem wichtigsten Gestagen, dem Progesteron, synthetisiert. Dieses wird aus dem Cholesterin mit Pregnenolon als Zwischenprodukt gebildet (siehe Abbildung 2) und diffundiert dann im weiblichen Organismus in die Ovarien in die Theca-interna Zellen, wo eine ausreichende Enzymausstattung für die weitere Reaktion zum Androgen Androstendion vorliegt. Das Androstendion kehrt zurück in die Progesteron-Synthese-Zelle, welches in den weiblichen Ovarien die Granulosazelle ist und reagiert dort zu einem weiterem Androgen, dem Testosteron. Diese beiden Androgene, Androstendion und Testosteron bilden gemeinsam die direkte Vorstufe der Östrogene. Aromatase, ein weiteres Enzym, aromatisiert einen Ring des Androstendions gezielt zu Östron (E1 oder auch Estron) sowie einen Ring des Testosterons zum 17 β -Östradiol (E2 oder auch 17 β -Estradiol). Zwischen E1 und E2 besteht somit ein Fließgleichgewicht. Östriol (E3 oder auch Estriol), welches aus Östron entsteht bildet die dritte Art von endogenen Östrogenen, zählt aber bereits zu den Abbauprodukten und hat nur geringe biologische Aktivität (siehe Abbildung 3).

Alle drei Formen des Östrogens bestehen im Gegensatz zu Androgenen und weiteren Steroidhormonen aus 18 Kohlenstoffatomen (C-18) und einem aromatische A-Ring. Dieser verleiht dem Östrogen phenolische Eigenschaften und scheint für die Rezeptorbindung von hoher Relevanz zu sein. Aus der Gruppe der endogenen Östrogene gilt im menschlichen Organismus das Steroid 17 β -Estradiol als das bedeutsamste, gängigste und biologisch wirksamste Östrogen (Dohmen, 1995; Horn, 2012; Harper et al., 2013; Alberts et al., 2007).

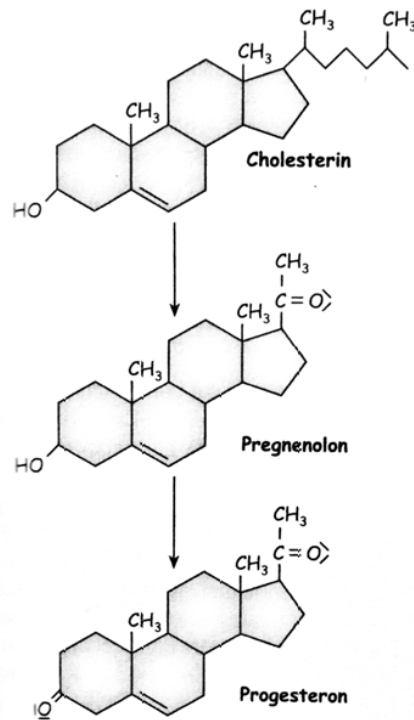


Abbildung 2: Progesterinsynthese aus Cholesterin (Horn, 2012)

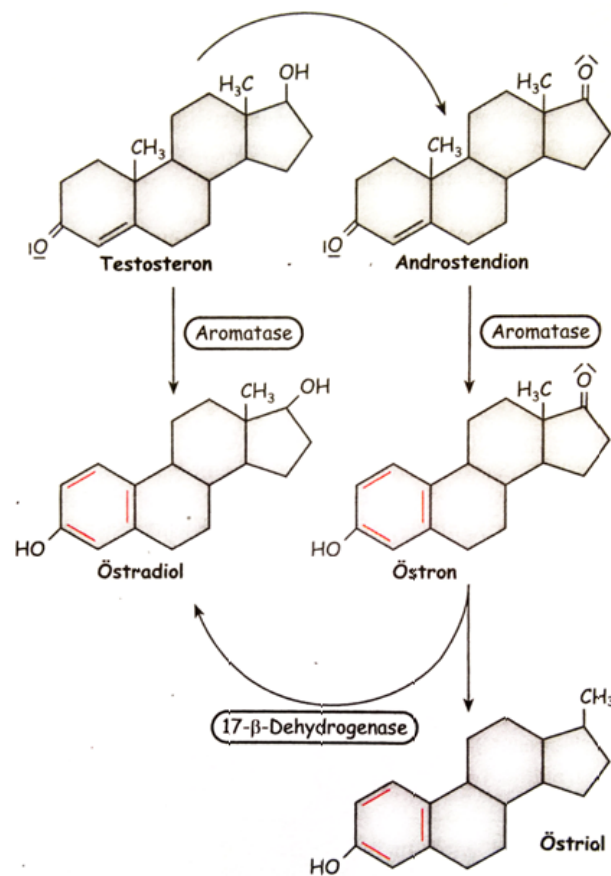


Abbildung 3: Östrogensynthese aus Testosteron (Horn, 2012)

1.2.1.2 Abbau und Exkretion

Östrogene werden im gesunden Organismus nicht akkumuliert. Sie werden sofort nach ihrer Bildung in den Blutkreislauf sekretiert. Östrogene, Gestagene und Androgene werden im Blut zu 98% an das sog. sex hormone binding protein (SHBP) gebunden und zu den Zielzellen transportiert, die restlichen 2% liegen in der nicht gebundenen Form vor. Nur die ungebundene freie Form ist aktiv und zeigt im Vergleich zu anderen Hormonen schon ab niedrigsten Konzentrationen Effekte. Der Östrogenvorläufer Progesteron wird im Blut von dem Protein Transkortin, welches auch das namensgebende Kortison bindet, transportiert. Durch die Blutzirkulation können nun die lipophilen Hormone mit Hilfe der hydrophoben Proteine an das Zielgewebe gelangen (Horn, 2012; Nussey & Whitehead, 2001). Die Signalübertragung der Östrogene erfolgt (wie in Kapitel 1.1 beschrieben) über östrogenabhängige Rezeptoren, welche in den Zielzellen im Zellkern lokalisiert sind. Östrogene kapseln sich in ihrer aktiven Form von ihren polaren Transportproteinen ab, wodurch sie aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaften durch die Zell- und Zellkernmembran diffundieren um an den Rezeptor zu binden und ihn zu aktivieren (Alberts et al., 2007; Nussey & Whitehead, 2001). Im menschlichen Organismus sind zwei unterschiedliche Östrogenrezeptortypen bekannt: 1. Der humane Östrogen Rezeptor alpha (hER α) und der humane Östrogen Rezeptor beta (hER β). Der Rezeptor hER α wird direkt im Zielgewebe (Uterus) exprimiert, wo es für die „klassischen“ Aufgaben des Sexualhormons Östrogen verantwortlich ist zB.: Regulation des Menstruationszyklus. Der Rezeptor hER β andererseits ist hauptsächlich in der Prostata, in den Hoden und Teile des Zentralnervensystems lokalisiert und scheint bei Experimenten mit Nagetieren als Modellorganismen eine vergleichsweise geringe Rolle zu spielen. Während beispielsweise jene Mäuse ohne hER α eine komplette Sterilität aufweisen, zeigen Mäuse, welchen nur der Rezeptor hER β fehlt eine völlig normale Aktivität und eine normale Reproduktionsfähigkeit (Katzenellenbogen et al., 2000; Nilsson et al., 2001; Rosseau, 2013). Der Abbau der Östrogene erfolgt über Detoxifikation via Cytochrom P450 Enzyme durch die Leber. Dabei werden die Hormone im Phase II Metabolismus glukuronidiert oder sulfatiert um durch die Niere ausgeschieden zu werden. Ein Teil der Steroidhormone zirkuliert allerdings vor dem endgültigen Abbau durch die Leber im enterohepatischem Kreislauf in die Galle und durch den Darm zur Rückresorption sowie anschließend wieder in die Leber (Horn, 2012; Alberts, 2007). Bei Störungen des Östrogenabbaus in der Leber, kann Östrogen nicht mehr in der

erforderlichen Menge ausgeschieden werden und es kommt zu einer krankhaften Ansammlung von Östrogenen. Dies hat im männlichen Organismus fatale Auswirkungen (Horn, 2012; Leung, 1989).

1.2.2 Körperfremde Östrogene

Als Östrogen werden auch alle jene Substanzen bezeichnet, welche den Effekt des natürlichen Östrogens nachahmen. Diese Substanzen haben zwar eine andere Struktur als das natürliche Östrogen, weisen allerdings chemische Fähigkeiten auf, die es ihnen ermöglichen sich in den Zellkern von östrogensensiblen Zellen zu diffundieren und dort an die Östrogenrezeptoren zu binden. Man unterscheidet zwischen dem Begriff der endokrin aktiven Substanz (EAS) welche eine Substanz bezeichnet, die allgemein (in positiver oder negativer Form) auf die Hormonaktivität des Körpers Einfluss nimmt, sowie des endokrinen Disruptors (ED) die all jene Substanzen bezeichnet, die als EAS in negativer Form ausschließlich zur Beeinträchtigung des Organismus führen (EFSA, 2016; Tacker, 2011; Bergman et al., 2013).

1.2.2.1 Östrogene als endokrin aktive Substanzen (EAS)

1.2.2.1.1 Östrogene als Arzneimittel

Da das natürliche Östrogen als oral verabreichtes Medikament ungeeignet ist, weil es sich in der Magen- und Darmschleimhaut zu schnell zersetzt wird, haben einige synthetisch hergestellte Östrogene in der Medizin hohe therapeutische Bedeutung gefunden.

Zur heutigen Zeit wird für diesen Zweck fast ausschließlich Ethinylestradiol hergestellt (siehe Abbildung 4), welches im Gegensatz zum natürlichen Estradiol (ohne Ethinylgruppe) eine deutlich verlängerte Halbwertszeit aufweist.

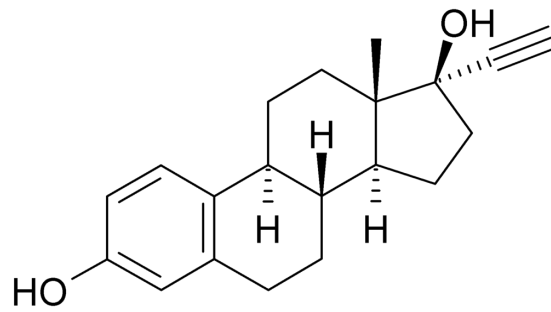


Abbildung 4: Strukturformel von Ethinylestradiol

Zum Einsatz kommt es in der Verhütung als Antibaby-Pille, gegen Beschwerden in der Menopause der Frau, als Hormontherapie vorbeugend gegen Osteoporose, palliativ bei Prostatakrebs, bei stark großwüchsigen Mädchen uva. (EMC, 2016; Dohmen, 1995).

1.2.2.1.2 Phytoöstrogene

Es wurden bislang mindestens 20 Phytomere in 300 verschiedenen Pflanzen aus 16 unterschiedlichen Pflanzenfamilien identifiziert. Phytoöstrogene sind dabei die besterforschten. Diese sind sekundäre Pflanzenstoffe von denen die bedeutendsten zwei Klassen die Lignane und die Isoflavone bilden (Barrett, 1996). Sowohl Isoflavone als auch Lignane weisen eine oder mehrere phenolische Gruppen in ihrer Struktur auf (siehe Abbildung 5). Sie gelangen beide hauptsächlich über die Nahrungsmittelaufnahme in den Körper von Menschen und Tieren. Lignane werden durch die Darmflora als Abbauprodukte aus Vollkorngetreide, Fasern, Leinsamen und verschiedensten Früchte- und Gemüsesorten gebildet. Beispiele für Lignane bilden Enterodiole und Enterolactone. Isoflavone, wie Genistein, Daidzein oder Glycitein gelangen aus Sojabohnen und unterschiedlichsten Gemüsesorten in den Organismus. Studien an Ratten zeigen, dass die Bindungsaffinität von Isoflavonen an die Rezeptoren ER α und ER β wesentlich geringer ist, als die des natürlichen Hormons 17 β -Östradiol, allerdings höher als bei Xenohormonen (Barrett, 1996; Kuiper, 1996; Adlercreutz, 1995).

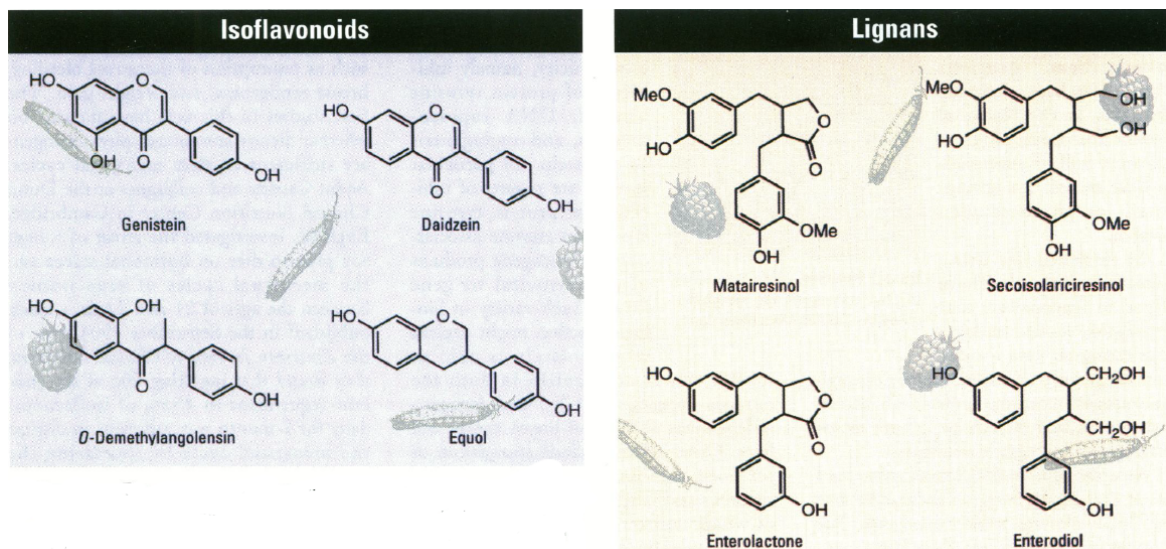


Abbildung 5: Die Phenolischen Strukturen der Isoflavone und Lignane (Adlercreutz, 1995)

Den ersten Hinweis auf eine tatsächliche biologische Aktivität von Phytoöstrogenen lieferten weibliche Schafe in Australien, die von einer hohen Unfruchtbarkeit und Läsionen in ihren Fortpflanzungsorganen geplagt wurden. Es wurde nach wissenschaftlichen Ermittlungen aufgeklärt, dass diese Schafe die Kleeart *Trifolium subterraneum* fraßen, welches Equol und Coumestrol (ein weiteres Phytoöstrogen) enthält (Barrett, 1996). Derzeit wird weltweit in diversen Publikationen diskutiert, in wie fern der Konsum von Phytoöstrogenen, insbesondere der Genuss von Soja sich auf den menschlichen Organismus auswirkt. Es gibt Studien in denen gezeigt wird, dass Soja den Blutglucosespiegel senkt, Triglycerid senkend wirkt und Übergewicht reduzieren kann sowie positive Wirkung bei Osteoporose, kardiovaskulären Erkrankungen oder einigen hormonabhängigen Krebsarten wie z.B.: Prostatakarzinom aufweist (Adlercreutz, 1995; Barrett, 1996; Cederroth, 2009; Tham, 1998). Allerdings braucht es noch weitere Studien um die Auswirkungen des Sojakonsums auf die Fertilität des Menschen festzustellen, sowie weitere Analysen über jene Sojabestandteile welche für die oben genannten positiven Wirkungen verantwortlich sind, da diese möglicherweise nicht der Östrogenaktivität von Sojabestandteilen zuzuschreiben sind (Adlercreutz, 1995; Cederroth, 2009).

1.2.2.2 Endokrine Disruptoren (ED)

Endokrine Disruptoren werden von der WHO verbindlich definiert als: „Endokrine Disruptoren sind von außen zugeführte Substanzen oder Gemische, die die Funktion des

Hormonsystems verändern und dadurch gesundheitlich schädigende Wirkungen im Organismus, bei seinen Nachkommen oder (Teil-)Populationen verursachen“ (WHO, 2002).

Als „schädigende Wirkung“ legt die Definition aus dem Internationalen Programm für Chemikaliensicherheit (IPCS) zugrunde: *„Eine schädigende Wirkung ist die Veränderung der Morphologie, der Physiologie, des Wachstums, der Entwicklung, der Fortpflanzung oder der Lebensdauer eines Organismus, eines Systems oder einer (Teil-)Population, die Funktionseinschränkungen, eine Einschränkung der Fähigkeit zur Bewältigung erhöhten Stresses oder eine erhöhte Anfälligkeit für andere Einflüsse zu Folge hat“ (WHO, 2009).*

ED werden vom Menschen hauptsächlich über den Lebensmittelkonsum aufgenommen können aber auch aus Lebensmittelverpackungsmaterialien, Arzneimittel und Medizinprodukte, Kosmetika und Körperpflegemittel, Kleidung, Pflanzenschutzmittel, Benzin, Lacke u.v.a. in den Menschen übergehen (EFSA, 2016; Grob et al, 2006).

Die Herausforderung auf dem Gebiet der ED ist, dass die als solche identifizierten Substanzen oft sehr verschieden sind und nur wenige chemische Gemeinsamkeiten bestehen. Die bis dato beobachteten Gemeinsamkeiten sind in solche, dass ED meist eine niedrige molekulare Masse aufweisen (< 1000 Daltons). Weiters wird vermutet, dass ED wie Dioxine, PCBs, PBBs und Pestizide oft Halogengruppen als Substituenten enthalten. Es konnte auch beobachtet werden, dass Steroid nachahmende Substanzen meistens phenolische Gruppen besitzen, welche die Interaktion mit den Hormonrezeptoren erlaubt. Auch Schwermetalle und Metallartige stehen in Verdacht als östrogenaktiv zu gelten, allerdings gibt es auf diesem Gebiet noch keine bekannten aussagerelevanten Forschungsergebnisse (Diamanti-Kandaraki et al., 2009). Die WHO/UNEP (2013) veröffentlichte von den mehreren hundert potentiellen und bekannten ED eine Liste von chemischen Stoffklassen welche in unterschiedlichen Testsystemen identifiziert wurden.

Die wichtigsten Wirkungsmechanismen von EDs sind laut Lintelmann (2003) folgende:

- Direkte Bindung an den Hormonrezeptoren (als Agonisten oder Antagonisten)
- Bindung an weitere Rezeptoren, welche eine Hormonwirkung indirekt beeinflussen können
- Beeinflussung der Konzentration des Hormons durch eine Erhöhung der Hormonproduktion, der Hormondegradation bzw. der Exkretionsrate
- Gewebspezifische Veränderungen der Konzentration der Rezeptoren

(Lintelmann et al., 2003)

Das endokrine System reagiert sehr sensibel auf störende Einflüsse, welche die natürliche Entwicklung des Organismus gravierend beeinflussen können (Lintelmann et al., 2003).

Die Wirkung von ED können alle Hormonabhängigen Systeme von Tieren oder Menschen stören. Oft erfolgt die eigentliche Auswirkung auf den Organismus erst nach einem längeren Zeitraum der Exposition. Die Interaktion zwischen ED und endogenen Hormonen sowie zwischen diversen ED untereinander lässt oft nicht eindeutig erkennen, welcher störende endokrine Effekt genau welchen ED zuzuordnen wäre. Für die Auswirkung von ED auf den Menschen sind auch viele weitere Faktoren entscheidend, wie z.B.: das Lebensstadium, das Geschlecht, die Lebensdauer und die Lebensweise des Organismus. Im Menschen ist die hormonelle Entwicklung in gewissen Lebensphasen wie im fetalen Stadium, im Kleinkindalter und in der Pubertät bekanntlich besonders sensibel für endokrine Störungen. Dennoch ist sehr schwer am Menschen einen kausalen Zusammenhang zwischen den Auswirkungen von ED und der Zunahme von endokrinen Störungen zu erkennen, da zusätzlich „a priori“ sehr viele Faktoren wie z.B.: genetische Vorprogrammierung und Lebensführung (bzw. Lebensführung der Mutter in der Schwangerschaft) einen bedeutsamen Einfluss auf die Endokrinologie des Menschen ausüben können (EFSA, 2013).

Die Verordnung EG 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) legt daher fest, *„dass Substanzen mit endokrin disruptiven Eigenschaften als besonders besorgniserregende Stoffe identifiziert wurden und als zulassungspflichtig erklärt werden können“* (EFSA, 2013).

1.2.2.2.1 EAS aus Lebensmittelverpackung

Die für den Menschen wohl wichtigste Quelle für EAS sind Lebensmittel (Grob et al., 2006). In diesen können neben typischen Kontaminanten wie Pestizide, Dioxine oder Schwermetalle auch diverse für den Verzehr nicht vorgesehene Substanzen aus den Verpackungsmaterialien übergehen (migrieren) (Muncke, 2009; Schafer und Kagley, 2002). Einige Verpackungsmigrate deuten auch darauf hin, als endokrine Disruptoren zu wirken (vom Saal et al., 2007, Muncke, 2009). In den letzten fünf Jahren erregte vor allem Bisphenol A (BPA), welches extensiv in vielen Lebensmittelverpackungssystemen verwendet wurde, nach wissenschaftlichen Publikationen über dessen Wirkung als ED, großes öffentliches Interesse (vom Saal et al., 2007).

Der deutsche Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde definiert: *„Die Funktion einer Lebensmittelverpackung ist in erster Linie auf die Gewährleistung des Produktschutzes (Erhalt der Eigenschaften), der Transportfähigkeit und Lagerfähigkeit ausgerichtet sowie auf die Anforderungen als Informationsträger (Etiketten, Bedruckung)“* (BLL, 2010). Die Packstoffe setzen sich hierbei aus definierten Packstoffarten zusammen, wobei endokrine Disruptoren aus zahlreichen Quellen stammen können. Sie kommen beispielsweise aus Kunststoffen oder polymeren Schichten, welche als Laminierungen oder Beschichtungen in direktem Kontakt mit den Lebensmitteln stehen. Hierbei gelten sie als NIAS (non intentionally added substances), also Verunreinigungen aus dem Herstellungsprozess bei der Polymerisation (Nebenprodukte, Katalysatorreste), der Verarbeitung und des Abbauprozesses bei der Lagerung (Muncke, 2011; Tacker, 2011). Auch eingesetzte Additive bei Kunststoffen (z.B.: Weichmacher, Emulgatoren, UV- und Hitzestabilisatoren, Antioxidantien etc.) können, da sie nicht im Polymergerüst eingefügt sind, leicht herausdiffundieren und so in die Lebensmittel gelangen (Muncke 2009, Weybridge, 2012). Packstoffe wie Papier und Karton können bei der Herstellung, die auch die recycling Prozedur der Faserstoffe durchlaufen, mit verschiedensten ED in Berührung kommen. Weiters können sich ihre Veredelungsmittel wie Farbe oder Lacke ablösen und als ED in das Füllgut migrieren. Letztendlich können auch über Verpackungsmaschinen, während der Zusammenlagerung, verschiedener Packmittel, über den Lagerort (zB. Auf Holzpaletten die mit Chemikalien behandelt wurden) oder beim Transport durch den Kontakt mit Abgasen, welche eine Reaktion mit diesen hervorrufen können, diverse Kontaminationen erfolgen (Kaßmann, 2014). Für Hersteller gilt europaweit die Verordnung (EG) Nr. 1935/2004 über Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmitteln in Berührung zu kommen: *„Lebensmittelbedarfsgegenstände sind nach Guter Herstellungspraxis so herzustellen, dass sie unter den normalen oder vorsehbaren Verwendungsbedingungen keine Bestandteile auf Lebensmittel in Mengen abgeben, die geeignet sind, die menschliche Gesundheit zu gefährden oder eine unverträgliche Veränderung der Zusammensetzung der Lebensmittel oder eine Beeinträchtigung der organoleptischen Eigenschaften der Lebensmittel herbeizuführen“* (ABl. der EU Nr. L 338; 2004). *„Die „Regeln für die gute Herstellungspraxis“ (Good Manufacturing Practice, auch: GMP) müssen während des gesamten Herstellungsprozesses der Lebensmittelkontaktmaterialien befolgt werden“* (BLL, 2010). Allerdings ist der oben genannten Bestimmung zu entnehmen, dass der Übergang

von Substanzen in Lebensmittel nicht generell verboten ist, solange die Gesundheit der Konsumenten nicht gefährdet bzw. die Beschaffenheit des Lebensmittels nicht folgenswer beeinträchtigt wird (BLL, 2010). Laut dem Bund der Verpackungsingenieure gelten zur Vermeidung von Migration EU weit: *„Es dürfen keine CMR (kanzerogene, mutagene, reproduktionstoxische) – Stoffe verwendet werden. Werte für toxikologisch bewertete Substanzen sind einzuhalten. Der Grenzwert für die Globalmigration von 60 ppm (mg/kg) als Summenfunktion darf nicht überschritten werden. Für toxikologisch nicht bewertete Substanzen gilt ein Grenzwert von 0,01 mg/kg“* (Kaßmann, 2011). Für einige der migrierfähigen Substanzen gibt es festgesetzte Listen von zugelassenen und verbotenen Stoffen, Reinheitskriterien und spezifischen Migrationsgrenzwerten (BLL, 2010; Muncke, 2009). Tabelle 1 zeigt eine solche Liste mit 50 bekannten migrierfähigen endokrin disruptiven Substanzen aus Lebensmittelverpackungsmaterialien.

Tabelle 1: Endokrin Aktive Substanzen in Lebensmittelverpackungsmaterialien (Muncke, 2009)

ED	CAS-Nr.	EDC	EU spez. Migrationslimit [mg/kg]
1	59-50-7	4-Chloro-3-methyl-phenol	nein
2	74-31-7	Diphenyl-p-phenylenediamine	
3	77-40-7	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-n-butan (bisphenol B)	
4	80-05-7	4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane (bisphenol A)	0,6
5	80-46-6	p-(tert-pentyl)phenol	
6	84-61-7	Dicyclohexyl phthalate	
7	84-66-2	Diethyl phthalate	
8	84-69-5	Diisobutyl phthalate (DiBP)	
9	84-74-2	Dibutyl phthalate (DBP)	0,3
10	84-75-3	Di-n-hexylphthalate (DnHP)	
11	85-68-7	Butyl benzyl phthalate (BBP)	30
12	87-18-3	4-tert-Butylphenylsalicylate	12
13	88-24-4	2,2'-Methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol)	1,5
14	88-99-3	Phthalic acid	nein
15	90-43-7	2-Phenylphenol	
16	92-69-3	4-Phenylphenol	
17	92-88-6	4,4'-Biphenol	6
18	94-13-3	n-Propyl-p-hydroxybenzoate (Propylparaben)	nein
19	96-69-5	4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-3-methyl-phenol)	0,48
20	99-76-3	Methyl p-hydroxybenzoate (Methylparaben)	nein
21	99-96-7	p-Hydroxybenzoic acid	nein
22	103-23-1	Diethylhexyl adipate	18
23	104-40-5	4-Nonylphenol	
24	106-44-5	p-cresol	nein
25	108-46-7	1,4 Dichlorobenzene	12
26	108-46-3	Resorcinol 1,3-dihydroxybenzene	2,4
27	117-81-7	Bis (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)	1,5
28	119-47-1	2,2'-Methylene bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)	1,5
29	119-61-9	Benzophenon (BP)	0,6
30	120-47-8	Ethyl-4-hydroxy-benzoate (Ethylparaben)	nein
31	121-79-9	Propyl gallate	30
32	121-91-5	Isophthalic acid	5
33	131-53-3	2,20-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone	6
34	131-56-6	2,4-Dihydroxybenzophenone	6
35	131-57-7	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (Oxybenzone)	6
36	301-02-0	9-octadecenamide (Oleamide)	nein
37	599-64-4	p-Cumyl phenol	0,05
38	611-99-4	4,4'-Dihydroxybenzophenone	6
39	620-92-8	Bis(4-hydroxyphenyl)methane (Bisphenol F)	
40	683-18-1	Dibutyltin dichloride	
41	1131-60-8	4-Cyclohexylphenol	nein
42	1675-54-3	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane bis (2,3-epoxypropyl) ether	
43	3380-34-5	2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (triclosan)	5
44	18964-53-9	2,4,6-triphenyl-1-hexene (Styrene trimer 1)	
45	4809-35-2	2,2-bis[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propane	
46	25013-16-5	tert.-Butylhydroxy-anisole (BHA)	30
47	26027-38-3	Nonylphenol ethoxylate	nein
48	26523-78-4	Tris(nonylphenyl)phosphate (TNPP)	nein
49	26761-40-0	Diisodecyl phthalate (DiDP)	9
50	-	1e-phenyl-4a-(1'-phenylethyl)tetralin (Styrene trimer 4)	

Allerdings sind in der von Muncke 2009 publizierte Liste aus Tabelle 1 die Auswirkungen der Biotransformation durch den Metabolismus auf die endokrine Aktivität nicht berücksichtigt worden.

1.2.2.2.1.1 Migration

In die Bewertung einer möglichen Migration einer Substanz aus dem Verpackungsmaterial in das Lebensmittel, ist das gesamte Verpackungssystem einzubeziehen (BLL, 2010). Dabei ist neben einer Kontaktmigration auch eine Verdampfungsmigration (Übergang der Substanzen auf das Lebensmittel z.B. bei einem Tiefkühlgericht beim Erhitzen), eine Penetrationsmigration (z.B. Migration einer Druckfarbe durch die Verpackung) sowie eine Destillationsmigration (Austausch zwischen Substanzen durch eine Destillation) möglich (Kaßmann 2011). Migrationssimulationen werden im Labor zur Qualitätskontrolle des Verpackungsguts in standardisierten Verfahren durchgeführt, um zu testen, ob, wie viel und auf welche Art und Weise schädliche Substanzen im Verlauf der Lebensmittelaufbewahrung in die Lebensmittel übergehen können. Bei Migrationstests werden die Testmaterialien unter den maximal ungünstigsten späteren Verwendungsweisen mit den Lebensmitteln oder Simulanzien in Kontakt gebracht (Kaßmann, 2011). Die Stoffmigration wird analytisch bestimmt. Dabei werden auf Basis der VO EU 10/2011 bei den Tests: *„ die Kontaktzeiten, die Temperaturen und die Art des Lebensmittels bei der Wahl des Simulationstests“* berücksichtigt. Da im Fall von einigen Nahrungsmitteln aufgrund langer Mindesthaltbarkeitsdaten die Aufbewahrung über einige Jahre hinweg betragen kann, muss die Migrationszeit hierbei für Testzwecke verkürzt werden. Dies geschieht unter der Erhöhung der Lagerungstemperatur um den Stressfaktor aufrecht zu erhalten. Die Auswahl der Simulanzlösemittel für Migrationstests ist durch die ÖN EN 1186 bzw. VO EU 10/2011 geregelt. In Europa wird die Lebensmittelmigration durch die EFSA überwacht.

1.3 Toxizität und Metabolismus

Für die Evaluation der Toxizität einer Substanz ist es unvermeidbar die metabolische Stabilität zu erfassen. Der hepatische Metabolismus kann eine Substanz chemisch schwerwiegend verändern und somit die Transformation in eine toxisch aktivere Form

(metabolische Aktivierung) oder eine toxisch weniger aktive Form (metabolische Detoxifikation) bewirken (Coecke et al. 2006; Horn, 2012; Dohmen, 1995).

1.3.1 Biotransformation

Eine Substanz die oral konsumiert wird, gelangt über den Gastrointestinaltrakt via der Pfortader in die Leber. Dort wird sie dem hepatischen Metabolismus unterzogen und schlussendlich über die Galle oder die Nieren ausgeschieden. Der Sinn der hepatischen Biotransformation ist die Bereitstellung von biologisch möglichst inaktiven Molekülen die für eine Ausscheidung hydrophil genug sind. Die Leber erreicht dies in einem zweiphasigen Prozess (Horn, 2012; Langguth, 2012).

1.3.1.1 Phase I -Funktionalisierungsreaktionen

Das Prinzip der Phase I Biotransformation ist der Umbau von funktionellen Gruppen, woraus oft die biologische Inaktivierung folgt. Dies kann durch neu angehängte Substituenten, welche zu erhöhter Affinität für polare Gruppen (Wasserlöslichkeit) in der Phase II Biotransformation führt, bzw. durch simple Entfernung wichtiger Gruppen erfolgen. Besonders häufige Reaktionen sind Oxidationsreaktionen, Desalkylierungs und Desaminierungsreaktionen, hydrolytische Spaltungsreaktionen von Estern und Methylierungsreaktionen. Diese werden durch verschiedenste, nur gering substanzspezifische, Enzyme katalysiert (Horn, 2012; Reichel, 2009).

1.3.1.1.1 Oxidationsreaktionen

Oxidationsreaktionen können durch die Katalyse von Monooxygenasen, Dehydrogenasen und Peroxidasen katalysiert werden. Für die Phase I Biotransformation ist die Oxidationsreaktion der Monooxygenasen am bedeutendsten (Horn, 2012). Dabei wird O_2 mit Hilfe eines Cytochrom- P_{450} Koenzyms und $NADPH/H^+$ reduktiv gespalten (Horn, 2012; Langguth, 2012). Ein polares Sauerstoffatom wird an die zu metabolisierende Substanz gehängt (siehe Abbildung 6). Auf die Funktion der Oxygenasen wird in Kapitel 1.3.1.1.5 Cytochrom-P450-Enzyme genauer eingegangen.

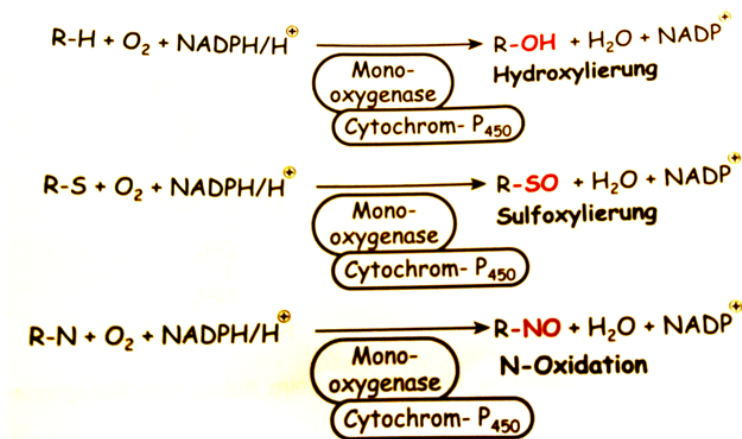


Abbildung 6: Phase I Oxidationsreaktionen (Horn, 2012)

1.3.1.1.2 Desalkylierungs- und Desaminierungsreaktionen

Es kommt in der Phase I Biotransformation auch zur Entfernung von funktionellen Gruppen. Die Entfernung von Alkyl-Gruppen (Desalkylierung) oder Amino-Gruppen (Desaminierung) führt zur wesentlichen Veränderung der Moleküle (Horn, 2012; Siebert et al., 2012; Langguth, 2012). In Abbildung 7 wird die Alkylierung von Tamoxifen, einem Prodrug, welches zur Behandlung von Brustkrebs eingesetzt wird, zu seinem Östrogenaktivem Metabolit Endoxifen gezeigt.

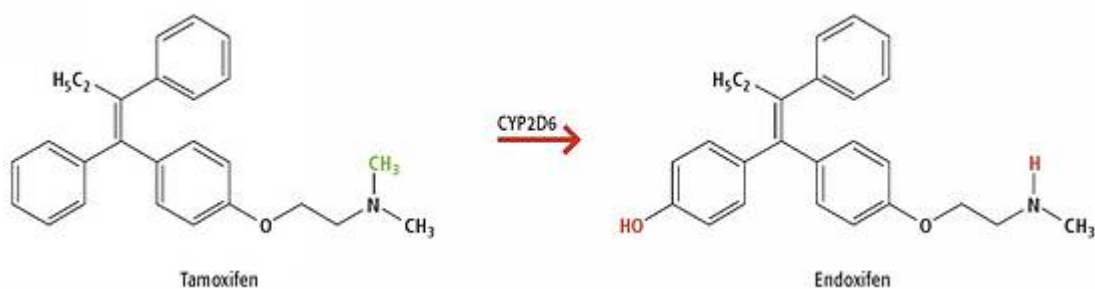


Abbildung 7: Phase I Alkylierung von Tamoxifen zu Endoxifen (Siebert et al., 2012)

1.3.1.1.3 Hydrolytische Spaltungsreaktionen

Bei der hydrolytischen Spaltung werden Ester und Amide hydrolytisch gespalten, so dass freigelegte OH- und Amin-Gruppen entstehen. Diese sind neu angreifbare funktionelle Gruppen. Ein oft genanntes Beispiel hierfür ist die Hydrolyse von Acetylsalicylsäure (Aspirin), das in der Phase I Biotransformation durch Anlagerung von Wasser zu

Salicylsäure und Essigsäure reagiert (siehe Abbildung 8) (DM Vasudevan et al., 2013; Langguth, 2012; Horn, 2012). Die katalysierenden Enzyme sind Esterasen und Hydrolasen (Horn, 2012)

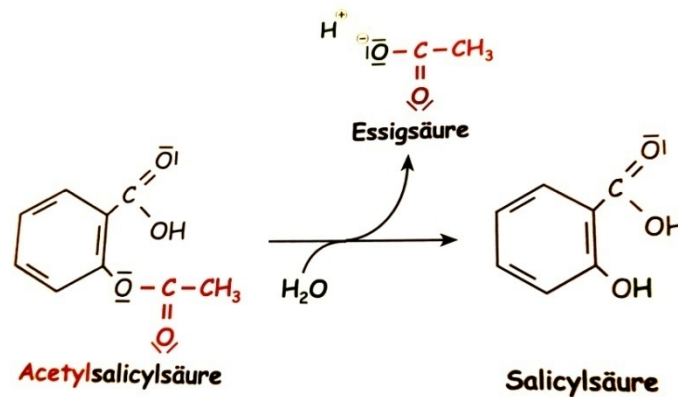


Abbildung 8: Phase I Hydrolyse von Aspirin durch Anlagerung von Wasser (Horn, 2012)

1.3.1.1.4 Methylierungsreaktionen

Bei der Phase I Methylierung steht nicht die Erhöhung der Hydrophilie, sondern der Zweck der Inaktivierung im Vordergrund. Ein Beispiel für diesen Reaktionsmechanismus ist der Abbau von Noradrenalin durch Methylierung (siehe Abbildung 9). Noradrenalin ist bereits ein stark hydrophiles Molekül, so dass die Apolarität der angehängten Methylgruppe nicht stört (Königshoff & Brandenburger, 2012; Horn, 2012). Die Catechol-O-Transferase dient dabei als katalysierendes Enzym (Königshoff & Brandenburger, 2012).

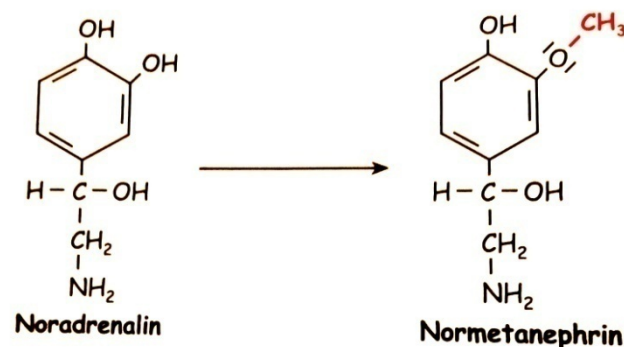


Abbildung 9: Phase I Methylierung, Abbau von Noradrenalin (Horn, 2012)

1.3.1.1.5 Enzyme der Phase I Reaktionen

1.3.1.1.5.1 Cytochrom-P₄₅₀-Enzyme

Cytochrome-P450-Enzyme (CYP) sind Proteine von 44-55 kDa, die ein oder mehrere Häme (Komplexverbindungen mit einem Eisen-Ion als Zentralatom und einem Porphyrin Molekül als Ligand) als prosthetische Gruppe enthalten. Sie sind Redoxvermittler, auch MFOs (mixed function oxidases) genannt, wobei das Eisenion im Häm die Oxidationszahl wechselt (Coecke et al., 2006, Guengerich, 1991;). CYPs sind in der Phospholipidmatrix vom Endoplasmatischem Retikulum (ER) eukaryontischer Zellen lokalisiert, wobei in Säugetieren die höchste Konzentration und Aktivität von CYPs in der Leber vorherrscht. Dort sind die Isoformen der CYPs relativ unspezifisch an der Biotransformation und am Abbau von Substanzen beteiligt (Guengerich, 1991; Hasler, 1999; Zhou et al. 1999, Horn 2012). Einige CYPs sind auch in der Biosynthese an der Hydroxylierung von Steroidhormonen und Gallensäure beteiligt. Auch bei der Synthese von Eikosanoiden und ungesättigten Fettsäuren spielen sie eine Rolle. Bei diesen Aufbauprozessen arbeiten die Enzyme gegenteilig zu den Abbauprozessen in der Leber außergewöhnlich spezifisch (Horn, 2012). Die unzählig bekannten CYP Isoenzyme werden in zwölf CYP-Genfamilien eingeteilt und nach ihrem Licht-Absorptionsspektrum unterschieden (Coecke et al., 2006; Zhou et al. 1999; Horn, 2012). Die in der Leber für den Arzneistoffmetabolismus wichtigsten Familien sind CYP1, CYP2 und CYP3. Diese katalysieren insgesamt die Biotransformation von ca. 80% aller Wirkstoffe (Zhou et al. 1999; Horn, 2012). In vitro Studien gehen davon aus, dass der Metabolismus von Xenobiotika im Mensch zu ca. 50% durch die CYP3A4 (siehe Abb. 10) vermittelte Oxidation abläuft (Zhou et al., 2009; OECD, 2008).

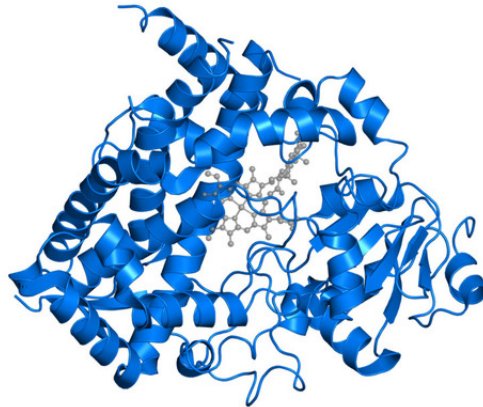


Abbildung 10: Die Struktur des Cytochrom P450 Isoenzyms CYP3A4 (blau) gebunden an das Hormon Progesteron (grau) (Sevrioukova & Poulos, 2015)

Gefolgt wird dieses von CYP2D6 mit ca. 20 bis 30%-iger Beteiligung an dem Metabolismus. Andere bekannte im humanem Metabolismus beteiligte CYP Isoenzyme sind CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1, CYP2A6, CYP2B6, CYP2C8, CYP2C9, CYP2C19, CYP2E1, CYP3A5, CYP3A7 und CYP4A11 (OECD, 2008). Dabei sind sie die Überträger von Elektronen und agieren somit als Kofaktoren von Oxidoreduktasen, zu denen auch die in Kapitel 1.3.1.1.1 Oxidationsreaktionen erwähnten Monooxygenasen gehören. Oxidoreduktasen spalten molekularen Sauerstoff reduktiv. Die Lieferanten der nötigen Elektronen sind NADPH/H⁺Moleküle, welche folglich die Elektronen auf ein Flavoprotein übertragen. Das Flavoprotein überträgt die Elektronen auf das Eisen des Cytochroms. Von dort aus werden die Elektronen weiter auf die Sauerstoffmoleküle übertragen, so dass schlussendlich eins der Sauerstoffatome als –OH Gruppe des Produkts eingebaut wird und das andere als Bestandteil des Nebenprodukts (Wasser) ausscheidet (Horn, 2012; Coecke et al., 2006). In der Biotransformation werden durch die CYPs größtenteils apolare Verbindungen, welche aliphatische oder aromatische Ringstrukturen enthalten z.B.: Steroidhormone umgesetzt (Coecke et al., 2006).

1.3.1.1.6 Aktivierung des Östrogenrezeptors aufgrund von Phase I Reaktionen

Diverse Forschungsergebnisse über Struktur-Aktivitäts-Relationen (SAR) zwischen Ligand und dem Östrogenrezeptor hER α zeigen, dass eine freie Hydroxylgruppe auf einem Arylring und eine hydrophobe Gruppe welche in einer para-Form an eine Hydroxylgruppe angehängt ist, essentiell für die Bindung ist (OECD, 2008; Combes, 2000).

Computerberechnungen, welche diese berücksichtigen, können so bereits für erste Auswertungen von noch ungetesteten Chemikalien herangezogen werden (Walker, 1999). Über die Phase I Biotransformation kann die Bildung einer solchen östrogenaktiveren Struktur erfolgen. Insbesondere die in Kapitel 1.3.1.1 beschriebenen Oxidationsreaktionen, welche durch CYPs katalysiert werden, stehen in Verdacht, gewisse Substanzen durch das Anhängen von Hydroxylgruppen für den Östrogenrezeptor zu aktivieren (Reinen & Vermeulen, 2015; OECD, 2008; Mollergues et al., 2016). Es wäre deshalb wichtig, den Metabolismus der Phase I Biotransformation in die Toxikologische Bewertung von Lebensmittelkontaktmaterialien, insbesondere solcher mit welchen Lebensmittel lange und unter gestressten Bedingungen in Kontakt kommen, einzubeziehen. Basierend auf früheren Forschungsergebnissen sowie sämtliche weitere Literatur über das östrogene Reaktionsverhalten von Methoxychlor (MC) und seinem Metaboliten HPTE durch CYP vermittelte Biotransformation, erscheint MC als optimale Modellsubstanz für in vitro Forschungstests über die Metabolisierung durch CYP-Enzyme (Reinen & Vermeulen, 2015; Jacobs et al., 2013; Shelby et al., 1996; Mollergues et al., 2017). MC gilt als ein leicht östrogenaktives Pestizid, welches 1000 bis 14000 fach weniger östrogenaktiv als 17 β -Östradiol ist (Aoyama et Chapin, 2014). Sein durch CYP-Enzyme biotransformiertes Metabolit Hydroxyphenyltrichloroethan (HPTE) hingegen, weist hohe Östrogenaktivität auf und agiert in den MC ausgesetzten Zielorganen von Säugetieren mindestens 100-fach stärker als MC selbst (Aoyama et Chapin, 2014; Hu et Kupfer, 2002; Gaido et al., 2000). In Abbildung 11 wird die Biotransformation von MC zu seinem Metabolit HPTE durch CYP450 gezeigt.

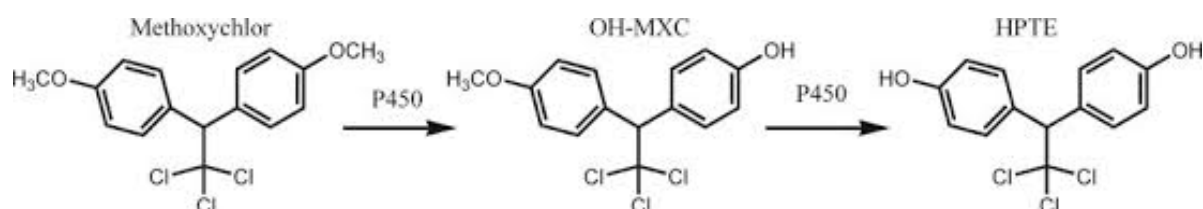


Abbildung 11: Demethylierung von MC zu HPTE (Stuchal et al., 2006).

Einige andere Substanzen erregen aufgrund ihrer Struktur den Verdacht, ebenfalls durch CYP vermittelte Biotransformation in der Leber, in einen weitaus östrogenaktiveren Metaboliten umgeformt werden zu können. Benzophenon (BP) beispielsweise (siehe Abb. 12) wird u.a. in Lebensmittelverpackungsmaterialien als gängiger Fotoinitiator in Tinten

und Beschichtungen in der Druckindustrie oder auch in Kunststoffverpackungen als Schutzfaktor vor UV-Bestrahlung verwendet (Römpp online, 2016). BP besteht dabei gleich aus zwei Arylgruppen, welche durch Oxidationsreaktionen der Phase I Metabolisierung hydroxyliert werden könnten. Dies entspräche dann der oben beschriebenen Schlüsselstruktur und wäre somit ein guter Ligand für den Östrogenrezeptor.

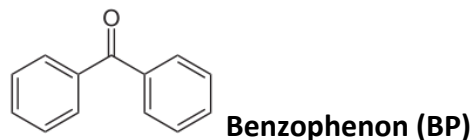


Abbildung 12.: BP, ein Molekül mit zwei Arylgruppen

Ein weiteres Molekül mit zwei Arylgruppen ist 1,3 Diphenylpropan (DPP), welches als Styrol Oligomer in der Lebensmittelverpackung häufig zur Verwendung kommt. Die östrogene Aktivität von DPP nach metabolischer Aktivierung durch Rattenleber Mikrosomen wurde von Kitamura et al. 2003 in einem widersprüchlichen Forschungstest als positiv gemessen.



Abbildung 13: Chemische Struktur von DPP

1.3.1.2 Phase II - Kopplung

In den Reaktionen der Phase II Biotransformation werden an jene lipophile Fremdstoffsubstrate, welche Phase I bereits durchlaufen haben bzw. an jene, welche Phase I nicht nötig hatten, sehr polare, negativ geladene endogene Moleküle angehängt (Konjugationsreaktion) (Horn, 2012; Reichel, 2009). Durch diese Kopplung steigt die Wasserlöslichkeit der Fremdstoffsubstrate an, so dass sie schließlich über die Niere, den Schweiß oder durch die Atmung ausgeschieden werden können. Dabei kommt es zu Glukuronidierung, Sulfatierung, Konjugation mit Aminosäuren oder zur Konjugation mit Acetat und Gluthation (Reichel, 2009; Horn, 2012). Für Steroidhormone sind die Konjugationsreaktionen der Glukuronidierung von Bedeutung. Diese sind auch allgemein die häufigsten Kopplungsreaktionen in der Phase II Biotransformation der Leber (Horn, 2012). Die bei der Glukuronidierung an der Reaktion beteiligten Enzyme befinden sich,

gleich den Enzymen der Phase I Reaktionen, im ER der Hepatozyten. Das Ausgangsprodukt ist UDP-Glucuronsäure. Dieses wird mit Hilfe der Glukunoryltransferase auf verschiedene funktionelle Gruppen übertragen um so je nach Funktionelle Gruppe O-, N-, S- oder Ester-Glukuronid Konjugate zu bilden (Reichel, 2009; Horn 2012). In welchem Ausmaß die Phase II Biotransformation in der Lage ist jene östrogenaktive Substanzen, welche in der Phase I gebildet wurden, zu neutralisieren ist unklar und noch Gegenstand heutiger Forschung. (OECD, 2008; Mollergueset al., 2016)

1.4 In vitro Testsysteme für die Identifizierung östrogenaktiver Substanzen

Für die Identifizierung östrogenaktiver Substanzen wurden verschiedene biologische Testsysteme entwickelt (Mertl, 2010; Fang et al., 2000; Van der Burg, 2010; Kase et al., 2009). Etablierte in-vitro Testsysteme ermöglichen ein Screening von verschiedensten Reinsubstanzen und Migratproben und sind daher vielfältig einsetzbar. Dabei können Rezeptorbindungsassays zur Feststellung einer spezifischen Rezeptorbindung, Proliferatintests zum Nachweis des Wachstums von östrogensensitiven Zellen und Reporteragenassays zur Kontrolle über die Transkriptionsstimulation von Reporter genen verwendet werden (Hippe, 2006; Kase et al., 2009, Fang et al., 2000, Mertl, 2010; Sonneveld et al. 2005). Am bekanntesten und in der Literatur am häufigsten erwähnt werden dabei der Estrogen-Screen Assay (E-Screen), der Yeast Estrogen Assay (YES) und der CALUX-Assay. Durch eine Vielzahl an Positiva, welche diese in vitro Tests bieten, wie zB. schnelle Analyseergebnisse, einheitlicher Mechanismus (Wiederholbarkeit), wenig Zeit- und Kostenaufwand, Minimierung von Tierversuchen, etc. kommen heutzutage zur Detektion von Östrogenaktivität fast ausschließlich solche in Verwendung (Sonneveld et al., 2005). Zum großen Nachteil werden hierbei allerdings nur spezifische Mechanismen getestet und deren Wirkungskaskade, also das „komplexe Ganze“ in einem intakten Organismus nicht berücksichtigt. In der Toxikologie wäre aber insbesondere die Auswirkung des Metabolismus auf getestete Substanzen bedeutsam. In vielen anderen Gebieten der Toxizitätsbestimmung ist die Einbeziehung des Metabolismus in die Screeningverfahren selbstverständlich und heutzutage nicht mehr wegzudenken. Zu diesen gehören beispielsweise Genotoxizitätstests und Zytotoxizitätststs, welche laut OECD representative Vorreiter für den Design von Hormontestsystemen mit integriertem Metabolismus sind (OECD, 2008). Umso verwunderlicher ist es also, dass obwohl bereits

verschiedenste Testmechanismen für die Identifizierung von Östrogenen und die Rolle des Metabolismus in Säugetieren bekannt sind, heute dem EVCAM noch keine validierten Testmethoden zur Verknüpfung beider vorgelegt wurden.

1.4.1 Estrogen-Screen Assay (E-Screen)

Durch Verwendung des E-Screen Assays kann man mit Hilfe von östrogensensitiven Brustkrebszellen, den MCF-7 Zellen (oder T47D-Zellen), die Proliferationssteigerung als indirekten Endpunkt einer östrogenen Wirkung bestimmen (Soto, 1995; Silva, 2007). Die Zellen werden in östrogenfreiem Medium mitsamt der zu analysierenden Probe kultiviert. Nur wenn die Probe östrogenaktiv ist, kommt es zum Wachstum der Zelle (Soto, 1995). Der E-Screen ist zwar sensitiv genug um ein aussagekräftiges Ergebnis über Östrogenaktivität zu erhalten, aber gibt keine genauen mechanistischen Daten und führte auch beim Einsatz mit weiteren Hormonachsen wie Androgenen zu Problemen. Daher wird der E-Screen nicht als erste Präferenz zur Ermittlung von Östrogenaktivität herangezogen (Sonnenschein et Soto 1998).

1.4.2 Yeast Estrogen Screen Assay (YES)

Der YES Test ist ein Reporter-gen-Assay und basiert auf genetisch veränderten *Saccharomyces cerevisiae* (Hefe) Zellen, in welchen das Gen für den menschlichen Östrogenrezeptor (hER) an den Reporter-gen lacZ gekoppelt ist. Die Aktivierung des Rezeptors führt zur Expression des Reporter-genprodukts β -Galactosidase welche zur Farbänderung des Mediums von gelb auf rot führt. Die Bildung des roten Farbstoffes verhält sich dabei linear zur Östrogenkonzentration (Routledge & Sumpter, 1996; Schultis & Metzger 2004). Der Test ist sehr sensitiv, kostengünstig und schnell und somit eine gute Wahl für ein Östrogenscreeningverfahren. Allerdings kommen in diesem Assay Hefezellen zum Einsatz, welche sich von humanen Zellen deutlich unterscheiden. Die Etablierung eines möglichst humangetreuen Metabolisierungsverfahrens ergibt in diesem Assay daher keinen Sinn.

1.4.3 ER α -CALUX (Chemically Activated Luciferase Gen Expression Assay)

Der ER α -CALUX Bioassay ist ein weiterer Reporter-gen-Assay, der aber auf humanen Zellen basiert. Zur Verwendung kommen genetisch modifizierte U2OS Osteosarcoma Zellen.

Diese weisen eine hohe Sensitivität und Selektivität für natürliche und synthetische östrogene Substanzen auf (Van der Burg, 2010; Van der Linden et al., 2008). Die modifizierten Zellen sind mit einem Expressionskonstrukt für den Östrogenrezeptor hER α (pSG5-neo-hER α) co-transfiziert. Weiters ist ein Luciferase Reportergenkonstrukt mit drei auf Östrogen reagierenden Elementen in der Promoter Region (pGL3 3xERE α tataLuc) im Genom der U2OS Zellen integriert (Legler et al., 2002). Die Aktivierung des Östrogenrezeptors hER α über die Bindung einer östrogenartigen Substanz aus der Probe, führt zur Transkription der Luciferase. Nach der Zugabe von Luciferin und ATP, emittiert die Luciferase ein Licht, welches mit dem Luminometer detektiert werden kann (Sonneveld et al., 2005). Die Signalintensität ist umso höher, je größer die Menge an östrogenaktiven Substanzen ist, die an die Rezeptoren bindet (Legler et al., 2002). Der ER α CALUX kann somit die Quantität der Östrogenaktiven Substanzen aus der Probe bestimmen. Für eine qualitative Aufschlüsselung der rezeptorbindenden Substanzen müssen weitere Analysen (HPLC-MS/ GC-MS) durchgeführt werden. Der ER α -CALUX ist zum Stand der Zeit der einzige Assay, welcher die Möglichkeit bietet eine Substanz in vitro mit humanen Rezeptoren auf ihre Östrogenaktivität zu prüfen, somit ist eine wohldurchdachte Kombination und/oder Integration eines metabolen Testsystems mit dem ER α CALUX sinnvoll.

1.5 In-vitro Integration des Metabolismus in Östrogen-Screening-Verfahren

1.5.1 Computersimulation des Metabolismus

Es gibt Literatur über zahlreiche Computersimulationsprogramme, welche mit mehr oder weniger genauen Vorhersagen den Metabolismus einer Substanz im Organismus rechnerisch simulieren können und in einigen wenigen Fällen sogar die Toxizität des Metaboliten in die Prädiktion eines toxikologischen Vorläufer-Gutachtens einbeziehen (Dearden et al., 1997; Cronin, 2001). HazardExpert beispielsweise ist ein auf bekannten Biotransformationsgesetzen basiertes Programm, welches von CompuDrug Chemistry Ltd. entwickelt wurde. Es kann Spezies, Dosis, Transportroute im Organismus und die Aussetzungsdauer mit der Substanz von Interesse berücksichtigen (OECD, 2008).

Die Transformationswahrscheinlichkeiten werden dabei über Biotransformationsgesetze der Enzymaktivitäten berechnet. MetabolExpert (ein weiteres Programm von CompuDrug Chemistry Ltd.) prüft hingegen fertige Metaboliten von Testsubstanzen auf ihre Toxizität. Durch die Verlinkung mehrerer Programme zB. HazardExpert mit MetabolExpert kann es zu genaueren Berechnungen und Simulationen kommen. So kann in diesem Fall nicht nur die Toxizität der Reinsubstanz, sondern auch der Tochtersubstanz (des Metaboliten) in ersten „rule-basierten-Berechnungen“ untersucht werden (OECD, 2008).

TIMES ist ein Programm welches einen heuristischen Algorithmus verwendet um Biotransformationskarten aus aktuellen Datenbasen und Bibliotheken mit gesammelter Information über Biotransformationsprozesse und abiotischen Reaktionen zu erstellen, um System-spezifische Transformationswahrscheinlichkeiten zu berechnen (Mekenyan et al, 2004a). TIMES wird in Mutagenizitätstests und Hautsensibilisierungstests für die Berechnung des Metabolismus von diversen Chemikalien eingesetzt (Mekenyan et al. 2004a; 2004b). Ein weiteres Simulationsverfahren ist das COMPACT (Computer-Optimised Molecular Parametric Analysis of Chemical Toxicity). Diese Methode berechnet im Detail voraus, ob ein Molekül überhaupt die chemische Voraussetzung erfüllt, als Substrat für ein CYP bzw. als Promotor für die Peroxisom Proliferation zu dienen (Lewis et al., 1998). Um den oxidativen Metabolismus zu durchlaufen, muss ein Substrat durch ihre planare molekulare Struktur an ein CYP binden können. Moleküle, welche an ein CYP binden können, müssen für eine chemische Oxidierung empfindlich sein (Lewis et al., 1998; Parke et al., 1990). Es werden daher von COMPACT zwei Faktoren beachtet: 1.) molekulare Planarität und 2.) Elektronen Aktivierungsenergie. Heute wird das COMPACT-Programm in Kombination mit molekularen Modellierungstests von CYP Enzymen verwendet (Lewis et al., 1998).

Die Möglichkeit der Einführung eines einzelnen Simulationsprogramms für endokrine Aktivatoren, welche die quantitative Struktur- und Wirkungsmechanismen voraussagt, die Auswirkungen des Metabolismus auf die Testsubstanz einbezieht sowie die Interaktion des Metaboliten mit endogenen Hormonprozessen im Organismus berücksichtigt, erwies sich als äußerst schwierig. Die potenziell hormonaktiven Chemikalien unterscheiden sich in ihrer Struktur oft sehr stark und erhöhen somit die Komplexität von Prädiktionen. Das Projekt ToxCast, welches durch die US-amerikanische EPA ins Leben gerufen wurde und zur Zeit das Endocrine Disruption Screening Program (EDSP) durchführt, beschäftigt sich

intensiv mit der Erstellung von Informationsdomains über die Strukturen, Wirkungsmechanismen und Effekten von EAS um so viele Informationen wie nur möglich in einer Datenbank zu verfestigen und sie in Zukunft in Prädiktionsprogrammen verwenden zu können (EPA, 2016; OECD, 2008).

1.5.2 Endogene Metabolisierungssysteme

1.5.2.1 Hepatozyten

Primäre Hepatozyten, also Leberepithelzellen, können eine in vivo Situation perfekt nachahmen, da sie lebende Systeme sind und sowohl Phase I als auch Phase II Enzyme beinhalten. Sie bilden das robusteste bekannte in vitro System um den Metabolismus in toxikologische Verfahren mit einzubeziehen und brauchen für ihre Funktion keine zusätzlich ergänzenden Kofaktoren (Donato et al., 2008; Castell et al. 2006). Allerdings liegt ein wesentliches Problem in der Verwendung von primären Hepatozyten als metabolisierendes System vor, insbesondere wenn der Bedarf nach menschlichen Hepatozyten besteht, denn die unzureichende Verfügbarkeit und hohe Variabilität (Alter, Geschlecht, Kondition, eventueller Verlust der P450 Expression/Aktivität) des Spenderorganismus lässt keine aussagekräftige Ergebnisse der Tests zu (Donato et al., 2008). Da primäre Hepatozyten bis dato unter stabilen Konditionen auch nicht in Kultur gehalten werden können, ist es nicht möglich sie als metabolisierendes System in ein weiteres Testsystem einzuführen. Um die Limitationen der primären Hepatozyten zu umgehen, wurden in den letzten Jahren diverse Zelllinien für die Metabolisierung vorgestellt (darunter auch genetisch veränderte, siehe Kapitel 1.5.2.2 Gentechnisch veränderte Zellen). Allerdings konnten bis jetzt in allen in der Literatur beschriebenen Versuchen auch etablierte hepatische Zelllinien für Metabolisierungsversuche, nicht Fuß fassen. Sie alle wiesen eine nur sehr geringe und partielle Expression von Cytochrom P450 –Isoenzymen auf (Donato et al. 2013; Donato et al. 2008; Castell et al. 2006). Verschiedene Forschungsprojekte befassen sich zwar aktuell mit neuen Strategien um eine Hochregulierung der CYP Expression in diesen Zellen zu ermöglichen, doch aktuell ist es noch nicht möglich etablierte Hepatozyten als erfolgreiches Metabolisierungssystem geltend zu machen (Donato et al., 2013; Castell et al. 2006).

1.5.2.2 Gentechnisch veränderte Zellen

In Zytotoxizitätstests werden bereits verschiedenste gentechnologisch manipulierte Zelllinien verwendet, die in der Lage sind Phase I und Phase II Enzyme, sowohl einzeln als auch in Kombination, zu exprimieren (Doehmer, 1993; Macé et al. 1998). In einem Vergleich von Insekten-, Bakterien-, Hefe- und Säugetier Metabolismusmodellen, konnte gezeigt werden, dass die katalytischen CYP Eigenschaften von Modell zu Modell sehr ähnlich sind (Friedberg et al., 1999). Ein besonderer Erfolg der Metabolisierung durch gentechnisch veränderte Zellen, war die Einführung von etablierten Zelllinien wie den V79 Zellen, welche dank ihrer Manipulation selektiv, bestimmte Varianten des CYP Enzyms exprimieren können. Diese Zelllinien weisen einen stabilen diploiden Karyotyp auf, zeigen keine CYP Background-Aktivität und können mit Nager und menschlichen CYPs transfiziert werden. (Coecke et al., 2001; OECD 2008). Nichts desto trotz ist ein wesentliches Problem, dass aufgrund der Einschränkung der Viabilität der Zellen, nur eine limitierte Anzahl an P450 Enzymen in derselben Zelle exprimiert werden kann (Coecke et al., 2006). Da die Simulation des Metabolismus aber nur als Zusammenspiel möglichst vieler verschiedener CYPs Sinn ergibt, ist auch mit gentechnisch veränderten Zelllinien die Möglichkeit heute noch nicht gegeben, den Metabolismus umfangreich genug auf Basis von Zellen endogen zu erfassen. Sollte es eines Tages doch gelingen eine kompetente Zelle zu generieren, welche genug CYP Sorten exprimieren kann um den Metabolismus auf diese Weise umfangreich erfassen zu können, müssten die Metaboliten für die Prüfung ihrer ED-Aktivität erstmals isoliert, dann identifiziert und ev. für eine representative Quantität synthetisiert werden um anschließend mit den heute zur Anwendung kommenden Hormonaktivitätstests (zB. CALUX) getestet werden zu können. Es ist jedoch wohl bekannt und zu berücksichtigen, dass die gefährlichsten Metaboliten gleichzeitig die reaktivsten und unstabilsten von allen sind (Coecke et al., 2006). Aus diesem Grund programmiert ein solches Verfahren mit derart vielen Zwischenschritten bis zum Endergebnis Fehler geradezu vor und sollte nach Möglichkeit nicht die erste Wahl bei der Suche nach einem geeignetem Metabolisierungstest als Kombinationspartner für Hormontests sein (Coecke et al., 2006).

1.5.3 Exogene Metabolisierungssysteme

1.5.3.1 Subzelluläre Fraktionen aus der Leber

Subzelluläre Systeme für die Metabolisierung werden bereits von der EC und OECD anerkannt und erfolgreich in diversen in vitro Genotoxizitätstests als Enzymhomogenate zugefügt. Die Vorteile eines exogenen Metabolisierungssystems sind, dass die Enzyme in direktem Kontakt mit den Xenobioten stehen. Diese müssen daher nicht zuerst in die Zelle eingebracht werden. Allerdings müssen sie um die Funktion zu verstärken mit Kofaktoren kombiniert angewendet werden (Coecke et al., 2006). Solche Homogenate können entweder purifizierte Enzyme, im Cytosol lösliche Enzymfraktionen (S100 Zentrifugat (Überstand)), mikrosomale Enzymfraktionen (S100 Pellet) und post-mitochondriale S9 Zentrifugate sein, welche sowohl aus Cytosol als auch aus Mikrosomen bestehen (Coecke et al., 2006). Bei anerkannten Genotoxizitätstests ist die induzierte männliche Sprague Dawley Ratten S9 die erste Wahl für ein exogenes Metabolisierungssystem, da sie von allen Enzymhomogenaten am reichhaltigsten an metabolisierenden Enzymen ist. Die Bezeichnung S9 stammt dabei einerseits aus dem englischen „supernatant“ (Überstand) und andererseits aus der Zentrifugation bei 9000g, denn nach der Isolierung der Leber wird diese homogenisiert und bei 9000g für 10 Minuten zentrifugiert. Der dabei entstehende Überstand bildet den S9-Mix. Vor Entnahme der Leber werden die Ratten mit Cytochrom P450 induzierenden A. Aroclor 1254, B. einer Mixtur aus Benzonaphtoflavon und Phenobarbital oder C. anderen enzyminduzierenden Mitteln vorgefüttert (Elliot et al., 1992; Garcia Franco et al., 1999). Das Induktionsmittel Aroclor 1254 besteht aus einer Mixtur von Polychlorobiphenylen (PCBs) und induziert in Ratten CYPs 1A1/2, 2B1/2 und 2C6 (Ku et al., 2007). Dieselben CYPs werden auch durch die Kombination von β -Naphtoflavon und Phenobarbital induziert, nur dass diese zusätzlich noch zur Induktion von 3A1/2 führen (Parkinson et al., 2013).

1.6 Integration der S9 Metabolisierung in den ER α -CALUX Assay

Abbildung 14 zeigt eine Liste aus EC und OECD anerkannten Tests, in welchen die Metabolisierung mit dem S9-Enzymmix erfolgreich integriert wurde.

EC	OECD	Test
B13-14	471	Bacterial reverse mutation test
B10	473	Mammalian chromosome aberration test
B17	476	Mammalian cell gene mutation test
B19	479	Sister chromatid exchange assay in mammalian cells (SCE)
B15	480	Saccharomyces cerevisiae gene mutation assay
B16	481	Saccharomyces cerevisiae mitotic recombination assay
B18	482	Unscheduled DNA synthesis (USD) in mammalian cells

Abbildung 14: Genotoxizitätstests mit S9-Mix als exogenes Metabolisierungssystem (Coecke et al., 2006)

Da es bereits einige etablierte Protokolle des S9-Mix in Testmethoden gibt, erschien es sinnvoll diese genau zu prüfen und sie schließlich mit dem ER α -CALUX Assay in Kombination zu erwägen. In enger Kooperation mit Nestle und aufgrund Nestle-interner Forschungsergebnisse (hier nicht gezeigt) und beratender Gespräche, wurden im Zuge dieser Arbeit die Zellen nicht wie beim standardisiertem AMES Test mit 0,2 mg/ml S9 Enzyme in einer Zeitspanne von 3h inkubiert sondern aufgrund von zytotoxischen Effekten lediglich mit 0,01 mg/ml S9 Enzymen 24h lang metabolisiert.

Sollte dieses Testsystem standardisiert und validiert werden können, wäre es eine relativ einfache und kostengünstige Möglichkeit den Phase I Metabolismus durch Enzyme in in vitro Tests für Endokrine Disruptoren zu integrieren.

2 Materialien und Methoden

2.1 Verwendete Materialien und Geräte

In Tabelle 1 sind sämtliche für die Versuchsdurchführungen benötigten Materialien und Geräte aufgelistet.

Tabelle 1: Verwendete Materialien und Geräte

Gerät	Hersteller
96 Well Plate, flat, white, non sterile, No. 611F96WT	Sterilin
96 Well Tissue Culture Plate, flat Bottom with lid, sterile	Sarstedt
Analysenwaage A 200	Sartorius
Analysenwaage A 200S	Sartorius
Autoklav HV-50L	Hirayama
Brutschrank BK 3108	Ehret
Centrifuge Tubes 50mL, steril	Iwaki
Cryo Tube Vials 1,8 ml	Nunc
DeepWell Plates P-2ml-SQ-C-S	Axygen
Einwegpipetten: 2 ml, 5 ml, 25 ml	Sterilin
Einwegspritzen 25 ml	Braun
Glasspritze 100 ml	VWR
HLB 6cc (200mg) ExtractionCartridges	Oasis
Injektspritzen 2 ml, 5 ml	B. Braun
Laminarflowsterilbank Biosafe 7-130	Ehret
Migrationskammern, Aluminium, 100 ml	Eigenanfertigung
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon
MultichannelXplorer 50-1200 µl	Eppendorf

Multichannelpipette 8x 1-20 µl	Gilson
Multichannelpipette 8x 20-300 µl	Gilson
Multilabel Counter 1420 Victor³	Perkin Elmer
Oasis HLB6CC (200mg) ExtractionCartidges	Waters
pH-Messgerät Lab 860	Schott Instr.
Pipetboyacu	IBS
Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Probenaufbereitungsvials, Klarglas mit PP Kappe und PTFE beschichteter Dichteinlage	Infochroma
Reinstwasseraufbereitungsanlage Q-Gard 3	Millipore
Rotilabo Spritzenfilter steril, Porengröße 0,22 µl	Roth
Schottflaschen	Duran
Schraubkappe mit PTFE Septum 9 mm	Infochroma
Stickstoff Dewar GT11	Air Liquide
SUPELCO Visiprep TMSPE Vacuum Manifold 24 port	Sigma Aldrich
Teflonschläuche	Supelco
Tissue Culture Flask	VWR
Ultraschallbad RK 514	Bandelin Sonorex
Ultratiefkühlschrank TelstarIgloo	Skadi
VialKlarglas 2 ml	Merz
Vortex Genius 3	IKA
Wasserbad, 1002	GFL
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

2.2 Verwendete Chemikalien

Alle Chemikalien, die für diese Masterarbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 2 aufgelistet.

Tabelle 2: Verwendet Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Artikelnr.
Acetonitril, HPLC Grade	J.T. Baker	1104209017
Aktivkohle	Sigma Aldrich	53663
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck	1.029.521.000
DMEM/F-12 (1x)	Gibco	21041-025
DMEM/F-12 (1x) + GlutaMAX-I	Gibco	31331-028
DimethylsulfoxidHybri-MAX, sterile filtered	Sigma Aldrich	D2650
Dulbecco's Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich	D8537
Ethanol, HPLC Grade	Merck	1.117.272.500
Fetal Bovine Serum (FBS)	Gibco	10270
G418 Disulfate, Cell Culture Tested	Calbiochem	345810
MEM NEAA- Minimum Essential Medium- Non Essential AminoAcids 100x	Gibco	11140-035
Methanol, HPLC Grade	J.T. Baker	84.022.500
Penicillin 5000 U/ml + Streptomycin 5000 µg (Pen-Strep)	Lonza	DE17-603E
NaCl 1M	Merck	1.090.571.000
Steady-GloLuciferase Assay Buffer	Promega	E254B
Steady-GloLuciferase Assay Substrate	Promega	E253B
TRIS-Buffer, Trometamol	Merck	1.083.820.100
Trypsin-EDTA Solut 0,25%	Sigma Aldrich	T4049

2.3 Verwendete Enzyme und Kofaktoren

In Tabelle 3 sind sämtliche Kofaktoren, welche im Laufe dieser Masterarbeit zur Verwendung kamen, angeführt.

Tabelle 3: Verwendete Kofaktoren

Kofaktor	Hersteller	Artikelnr.
β-Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate, Reduced Tetra (Cyclohexylammonium) Salt	Sigma Aldrich	NS130
D-Glucose 6-Phosphat Sodium	Sigma Aldrich	G7879
Magnesium Chloride Hexahydrate	Sigma Aldrich	M9272

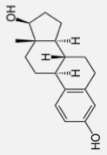
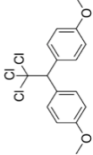
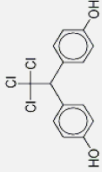
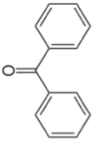
In Tabelle 4 sind alle Enzyme und S9-Mix aufgelistet

Tabelle 4: Verwendete Enzyme und S9-Mix				
Enzym	Hersteller	Artikelnr.	Lot-Nr.	
Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase	Sigma Aldrich	G7877	SLBM6269V	
5,6 Benzoflavone/Phenobarbital induced rat liver S9	Xenometrix	PRS-PB01	3109	
β -Naphthoflavon/Phenobarbital induced rat liver S9	Xenometrix	S2067	150917B	
β -Naphthoflavon/Phenobarbital induced S9, from rat liver	Sigma Aldrich	S2067	061M0606V	
Aroclor 1254 induced rat liver S9	Moltox	M11-101.1	3470	
Aroclor 1254 induced rat liver S9	Moltox	M11-101.1	3449	
Aroclor 1254 induced rat liver S9	Moltox	M11-101.1	3359	

2.4 Analyalisierte Substanzen

In Tabelle 5 befindet sich eine Übersicht über die untersuchten Substanzen und Materialien welche als Proben vorbereitet wurden. Die Proben wurden mit einem Probencode versehen, da die Namen der in Auftrag gebenden Unternehmen, und Probendaten vertraulich sind.

Tabelle 5. Analyisierte Substanzen und Proben

Substanz	CAS-Nr.	Molekulargewicht (g/mol)	Hersteller, Artikelnr.	Charge	Chemische Struktur
17 β -Estradiol	50-28-2	272,38	Sigma E8875	SLBK4189V	
Methoxychlor (MC)	72-43-5	345,65	Sigma 36161	SZBC340XV	
1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethane (HPTE)	2971-36-0	317,59	Sigma T340944	B00270305	
Benzophenon (BP)	119-61-9	182,22	Ehrenstorfer C10539000	90223	
1,3-Diphenylpropan, 98% (DPP)	1081-75-0	196,29	AB178637	1236718	
Material	Probencode	Produktbeschreibung	Migrationsbedingungen		
beschichtetes Aluminium	354	Beschichtete Aluminiumfolie (Coextrusionsbeschichtung)			
Getränke Verbund Karton (GVK)	314	Milchgetränkeverbundkarton			
Papier	355	Karton			
Polypropylen (PP)	310	Aufbewahrungsdose 1,3 l			

2.5 Verwendete Zelllinie

Für das CALUX Testsystem wurden ausschließlich humane Osteosarkomzelllinien U2OS (CL-BDS-060/674) verwendet.

Zur Aufrechterhaltung selektiver Kulturbedingungen erfolgte das Wachstum der U2OS Zellen in 225 cm² Kulturflaschen mit rotem Zellkulturmedium in Gegenwart von G418. Der Zellinkubator hatte eine regulierte Innentemperatur von 37°C bei 21% O₂ und 5% CO₂. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

2.6 Verwendete Medien und Pufferlösungen

2.6.1 Phosphatpuffer

Es wurden 156 g NaH₂PO₄* 2H₂O eingewogen und anschließend mit Reinstwasser auf ein Volumen von 1000 mL aufgefüllt. Danach wurde der Puffer durch Zugabe von H₃PO₄ (85%) auf pH 3,0 eingestellt. Der Phosphatpuffer wurde bei Raumtemperatur gelagert.

2.6.2 Freezing Medium

5 ml hochreines DMSO wurden mit 20 mL rotem Medium vermengt und im Kühlschrank bei 4°C gekühlt.

2.6.3 Rotes Zellkulturmedium (mit ungestripptem FCS)

Das rote Zellkulturmedium wurde aus 500 ml DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMax-I , 41 ml ungestripptem FCS, 5,5 ml nicht-essentiellen Aminosäuren und 10 ml Penicillin/Streptomycin hergestellt, anschließend geschüttelt und im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.6.4 Weißes Testmedium (mit DCC-FCS)

Das weiße Testmedium ist identisch zum roten Zellkulturmedium, allerdings musste der hormonaktive Phenolrot pH-Indikator und das FCS durch ein 5%-iges aktivkohlegestripptes und somit hormonfreies Serum ersetzt werden (DCC-FCS). So wurde sichergestellt, dass im Medium keine Background-Hormonaktivität vorherrschte.

Die Herstellung des weißen Testmediums erfolgte aus 500 ml DMEM/F-12 (1x), 26,4 ml DCC-FCS, 5,3 ml nicht-essentiellen Aminosäuren und 10 ml Penicillin/ Streptomycin. Das

Medium wurde zwecks Vermischung geschüttelt und ebenfalls im Kühlschrank bei 4°C gelagert.

2.6.5 DCC-FCS

Für das Strippen des FCS wurden 1,5 g TRIS in 125 ml Reinstwasser gelöst und mittels 1M HCl ein pH-Wert von 8,0 eingestellt. Danach wurde die Lösung mit Reinstwasser auf weitere 1250 ml aufgefüllt. 0,625 g Dextran konnten zunächst nur mit 20 ml der hergestellten Lösung vermengt werden um Verklumpung zu vermeiden, danach wurde langsam mit der vollen Menge verrührt. 6,25 g Aktivkohle wurden unter Schütteln mit der Suspension vermischt und über Nacht bei 4°C gerührt (1000 rpm).

Am nächsten Tag wurde eine Flasche FCS bei 37°C aufgetaut und anschließend bei 56°C für 30 min im Wasserbad temperiert. Unterdessen wurde die Suspension vom Vortag auf 30 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt welche dann bei 1000g 20 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und auf die Hälfte der Röhrchen mit zurückgebliebenen Aktivkohlepellets wurde das hitzebehandelte Serum auf optisch idente Füllstandhöhe aufgeteilt und geschüttelt. Diese wurden bei 45°C 45 min im Wasserbad inkubiert, wobei alle 5 min händisch aufgeschlämmt wurde. Daraufhin erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 1000g 20min um das Serum in die übrigen 15 Aktivkohlepelletsröhrchen zu überführen. Erneut wurde geschüttelt und bei 45°C für 45 min im Wasserbad unter gelegentlichem aufschlämmen inkubiert. Um die Aktivkohlereste zu entfernen wurde das Serum in leeren Röhrchen überführt und ein drittes Mal bei 1000g 20 min zentrifugiert. Nach der Sterilfiltration wurde das gestrippte FCS im Tiefkühlschrank bei -80°C gelagert.

2.7 Leber und S9-Mix

2.7.1 Leber und S9

Der S9- Mix wurde aus der Leber männlicher Sprague-Dawley Ratten gewonnen, welche mit Cytochrom P450 induzierendem β -Naphtoflavon und Phenobarbital bzw. mit Arochlor 1254 vorgefüttert wurden.

2.7.2 S9-Mix

Die Herstellung des S9 Lebermix wurde aus der BDS SOP übernommen. Die Stocklösungen der Reagenzien wurden in sterilem RO-H₂O hergestellt. Laut BDS SOP können die Stocklösungen bei -20°C bis 6 Monate gelagert werden. Für diese Masterrarbeit wurden die Stocklösungen nie länger als eine Woche gelagert. Die Glc-6- Dehydrogenase und das Testmedium wurden im Kühlschrank bei -6°C gelagert.

Tabelle 6: Herstellung des S9 Mix laut BDS SOP

Präparat	Stocklsg.	10x S9-Mix	Konz. im S9-Mix	Konz. im Well
weißes Testmedium	-	2,1 ml	-	-
Glc-6-Ph-Deh.	4 units/μl	2,25 μl	3 units/ml	0,3 units/ml
NADPH	20 mM	300 μl	2 mM	0,2 mM
Glc-6-Ph	300 mM	300 μl	30 mM	2 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	500 mM	300 μl	50 mM	5 mM
S9	35 mg/ml	9 μl	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml

Tabelle 7: Pipettierschema des S9 Mix in dieser Masterarbeit aus speziell in Tabelle 4 und Tabelle 5 aufgelisteten Substanzen

Präparat	für die Stocklsg.	für den S9-Mix	Konz. im S9-Mix	Konz. im Well
weißes Testmedium	-	2,1 ml	-	-
Glc-6-Ph-Deh.	-	2,25 μl	3 units/ml	0,3 units/ml
NADPH	0,0228 g in 1 ml	300 μl	2 mM	0,2 mM
Glc-6-Ph	0,2115 g in 2,5 ml	300 μl	30 mM	2 mM
MgCl ₂ * 6 H ₂ O	0,476 g in 10 ml	300 μl	50 mM	5 mM
S9	-	9 μl	0,1 mg/ml	0,01 mg/ml

2.8 Herstellung der 17β-Estradiol (E2)-Verdünnungsreihe für die Responskurve

In Tabelle 8 sind die Pipettierschritte zur Verdünnung des Standards für die Responskurve des CALUX ersichtlich.

Tabelle 8: Verdünnungsschema der 17 β –Estradiol Reihe für die Responsskurve

Bezeichnung	[E2] (M) DMSO	[E2] (M) Medium	Verdünnung für 1ml
S	1,00E-02	5,00E-05	27,2 mg Einwaage in 10 ml DMSO
V1	1,00E-04	5,00E-07	10 μ l S + 990 μ l DMSO
V2	1,00E-06	5,00E-09	10 μ l V1 + 990 μ l DMSO
H	2,00E-08	1,00E-10	100 μ l V2 + 4900 μ l DMSO
G	2,00E-09	1,00E-11	100 μ l H + 900 μ l DMSO
F	1,60E-09	8,00E-12	80 μ l H + 920 μ l DMSO
E	1,00E-09	5,00E-12	50 μ l H + 950 μ l DMSO
D	6,00E-10	3,00E-12	30 μ l H + 970 μ l DMSO
C	4,00E-10	2,00E-12	20 μ l H + 980 μ l DMSO
B	1,00E-13	1,00E-13	10 μ l H + 990 μ l DMSO
A	0,00E+00	0,00E+00	- 1000 μ l DMSO

2.9 Herstellung der 17 β -Estradiol (E2)-Verdünnungsreihe für die Quantifizierung

Für die Herstellung der 17 β –Estradiol Stocklösung mit der Konzentration 5,0E-6 M im DMSO wurden 13,6 mg 17 β –Estradiol (E2) in 10ml DMSO gelöst. Die Stocklösung wurde 1000x verdünnt und portioniert als 1 ml Aliquots bei -20°C aufbewahrt.

Es wurde bei Herstellung der Standardreihe jeweils eins dieser Aliquots auf eine Konzentration von 5,0E-8 M im DMSO 1:100 in RO-H₂O verdünnt, danach wurde nochmals auf eine finale Endkonzentration von 5,0E-10 M im DMSO 1:100 in RO-H₂O untermenget bevor, wie in Tabelle 9 dargestellt, die Verdünnungsreihe hergestellt wurde. Schlussendlich wurden 675 μ l Testmedium in jedes Röhrchen hinzugefügt.

Die Aufbewahrung der Standardreihe erfolgte immer bei -20°C.

Tabelle 9: Verdünnungsschema der 17 β –Estradiol Reihe für die Quantifizierung

Röhrchen	RO-H ₂ O	Verdünnung	[E2] (M) RO-H ₂ O	[E2] (M) Medium
A	0 μ l	1500 μ l von 5,00E-10 E2 Stocklsg.	5,00E-10	3,30E-10
B	1050 μ l	450 μ l von 5,00E-10 E2 Stocklsg.	1,50E-10	1,00E-10
C	1350 μ l	150 μ l von A	5,00E-11	3,30E-11
D	1350 μ l	150 μ l von B	1,50E-11	1,00E-11
E	1350 μ l	150 μ l von C	5,00E-12	3,30E-12
F	1350 μ l	150 μ l von D	1,50E-12	1,00E-12
G	1350 μ l	150 μ l von E (Verwurf von 150 μ l)	5,00E-13	3,30E-13
H	1350 μ l	150 μ l von F (Verwurf von 150 μ l)	1,50E-13	1,00E-13
I	1350 μ l	-	0,00E+00	0,00E+00

2.10 Herstellung der G418 Stock-Solution

Für die Herstellung wurde 1 g des G418 disulfats eingewogen und diese in 20 mL Reinstwasser vollständig gelöst, welches eine Endkonzentration von 50 mg/mL ergab. Die Lösung wurde dann steril filtriert und portioniert im Tiefkühler bei -20°C gelagert.

3. Durchführung

3.1 Fließschema zur Durchführung der Versuche

Abbildung 1 zeigt einen Überblick über die Arbeitsschritte, die in der vorliegenden Masterarbeit zur Durchführung kamen.

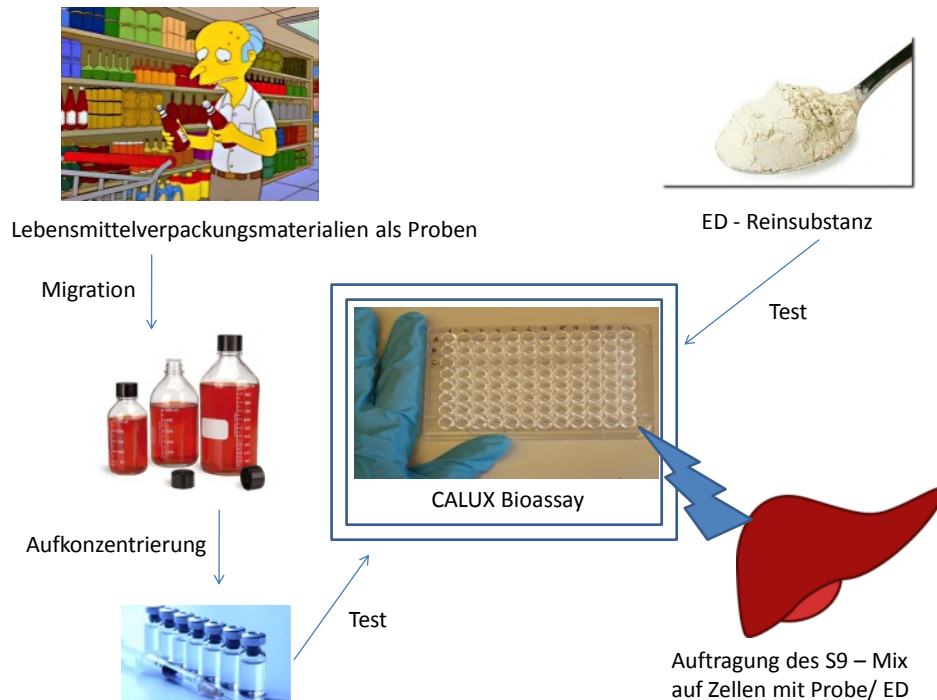


Abbildung 1.: Fließschema zur Durchführung der Masterarbeit

Die gesamte Probenvorbereitung, welche die Migration und die Aufkonzentrierung der Proben umfasst, erfolgte laut der in Grininger (2013) beschriebenen Diplomarbeit.

Der CALUX Bioassay mit integrierter Metabolisierung wurde analog der „Standard Operation Procedur“ von BDS (Biodetection Systems) und der Vorversuche von Julie Mollergues vom NRC (Nestle Research Center) durchgeführt.

3.2 Migrationslagerung

Die Migrationslagerung der Proben erfolgte laut Prüfverfahren an Werkstoffe und Gegenstände im Kontakt mit Lebensmitteln nach ÖN EN 1186 bzw. VO EU 10/2011.

Die Verpackungsproben wurden in Migrationskammern eingespannt und mit dem Nennfüllvolumen von 100 mL Lebensmittelsimulanzlösemittel befüllt. Für die Simulation

von besonders fettreichen Lebensmitteln wurde 95%-iges Ethanol, ansonsten 50%-iges Ethanol verwendet. Die befüllten Proben, wurden für 10 Tage bei 40°C bzw. 60°C im Trockenschrank gelagert. Die Lagerversuche wurden jeweils zumindest in Doppelbestimmung durchgeführt und es wurde immer zumindest ein Blindwert mitgeführt. Die Proben und die Blindwerte wurden bis zur Festphasenextraktion im Kühlschrank bei 4°C gelagert. In Tabelle 1 werden die genauen Migrationsansätze der Proben, welche untersucht wurden, gezeigt.

Tabelle 1.: Migrationsansatz der Proben

Material	Probencode	Simulanzlösemittel	Lagerbedingungen
Beschichtetes Aluminium (Alu)	354	95 % EtOH	60°C, 10d
Getränke Verbund Karton (GVK)	314	50 % EtOH	60°C, 10d
Papier	355	50 % EtOH	40°C, 10d
Polypropylen (PP)	310	95 % EtOH	60°C, 10d

3.3 Aufkonzentrierung

Die Proben wurden nach der Migration mittels Festphasenextraktion (engl.: solid-phase-extraction, SPE) über OASIS HLB 6CC mg Säulen aufkonzentriert.

Die Säulen waren mit einer Festphase (Sorbent) gefüllt über die, die Flüssigphase mit Hilfe des Visiprep Vakuum Manifolds gezogen wurde.

Der Analyt stand in Wechselwirkung mit dem Sorbent und verblieb in der Säule. Salze und Lösungsmittel hingegen passierten ungehindert.

3.4 Vorbehandlung der Migratlösungen für die Extraktion

Um ein frühzeitiges Eluieren von Probenkomponenten zu vermeiden, durften die wässrigen Migratlösungen nur einen Ethanolgehalt von maximal 10% (v/v) aufweisen und wurden daher immer mit Reinstwasser zusätzlich verdünnt bevor sie die Säulen durchliefen. Außerdem wurde der pH-Wert der Ethanol enthaltenden Migratlösungen durch die Zugabe von 4 mL Phosphatpuffer pH3 pro Liter angesäuert.

3.5 Festphasenextraktion

Um sicher zu gehen, dass die Proben wegen Verunreinigung der Apparatur sowie der Säulen nicht Background Aktivität aufwiesen, wurde die gesamte Anlage vorgereinigt.

Es wurden jeweils 15 ml ACN-MeOH Gemisch (1:1 v/v), sowie 5ml H₂O-HQ durch die Schläuche und Ventile der Apparatur gespült um Lösungsmittelrückstände zu entfernen. Die Extraktionssäulen wurden in die Vorrichtung gesteckt und mit 15 ml ACN-MeOH Gemisch (1:1 v/v), 5 ml MeOH und 5 ml H₂O-HQ ebenfalls vorgewaschen.

Anschließend wurde die Migratlösung mit einem Unterdruck von -400 bis -600 mbar durch die Säulen gezogen. Das ergab eine Durchflussmenge von ungefähr 5 mL/min. Um die Migratlösungen während der Aufkonzentration vor Staub und Schmutzpartikel aus der Luft zu schützen, wurden die Flaschenöffnungen während dieser Zeit mit unbeschichteter Alufolie abgedeckt. Anschließend wurden die Säulen mit 5 mLH₂O-HQ nachgespült und im Durchschnitt ca. 2 Stunden getrocknet bis die Festphase pulverförmig vorlag.

Es wurden für jede Probe bereits vorbeschriftete Glasvials abgewogen, je 200 µl DMSO vorgelegt und die Vials so in die Apparatur eingebracht um darin das Eluat aufzufangen. Als Eluent dienten insgesamt 4,5 ml ACN-MeOH Gemisch (1:1 v/v). Die Zugabe erfolgte schrittweise. Im ersten Schritt wurden mit leichtem Unterdruck erst 1,5 ml eluiert, danach auf 0,5 ml eingengt. Im zweiten, dritten und vierten Schritt wurde noch jeweils auf gleiche Weise mit 1 ml eluiert. Der Rückstand wurde auf ein Rückstandsvolumen von 300 µl eingengt (optischer Vergleich) und abgewogen. Das Volumen des DMSO konnte, mit der Annahme, dass die Dichte, der von reinem DMSO also 1,1 g/ml entspricht, so errechnet werden.

Die Berechnung erfolgte anhand folgender Formel:

$$V (ml) = \frac{\text{Auswaage Vial mit DMSO und Rückstand (g)} - \text{Auswaage leeres Vial (g)}}{1,1 \text{ g/ml}}$$

Abschließend wurden die Glasvials mit den Proben verschlossen, gevortext und bis zu ihrer Verwendung bei 4°C im Kühlschrank gelagert.

3.6 Herstellung der Verdünnungsreihe der Reinsubstanzen

So Reinsubstanzen getestet wurden, war keine Probenvorbereitung in Form einer Migration oder Aufkonzentrierung nötig. Die Reinsubstanzen wurden direkt eingewogen und danach mit DMSO zunächst für eine Stockkonzentration von 100 mmol/L verdünnt. Daraus wurde wie in Tabelle 2 gezeigt, eine Verdünnungsreihe hergestellt, die sowohl für

die Modellschubstanz Methoxychlor, als auch für alle weiteren zur Testung gekommenen ED-Schubstanzen gilt.

Tabelle 2: Pipettierschema der Verdünnungsreihe für ED Schubstanzen

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Konzentration im Medium	Verdünnungsschritte
1	100 mM	100 µM	Einwaage!
2	30 mM	30 µM	150 µL aus 1 + 350 µL DMSO
3	10 mM	10 µM	50 µL aus 1 + 450 µL DMSO
4	3 mM	3 µM	15 µL aus 1 + 485 µL DMSO
5	1 mM	1 µM	5 µL aus 1 + 495 µL DMSO
6	0,3 mM	0,3 µM	150 µL aus 5 + 350 µL DMSO
7	0,1 mM	0,1 µM	50 µL aus 5 + 450 µL DMSO
8	0,03 mM	0,03 µM	150 µL aus 7 + 350 µL DMSO
9	0,01 mM	0,01 µM	50 µL aus 7 + 450 µL DMSO

3.7 Zellkultivierung

Alle Arbeitsschritte im Rahmen der Zellkultivierung und des CALUX Bioassays wurden laut SOP (Version 2015) durchgeführt. Es wurde an lebenden Zellen immer in der Laminarflow Sterilbank gearbeitet. Vor Verwendung, wurden alle Lösungen und Medien auf 37°C im Wasserbad aufgewärmt. Der Zellinkubator hatte stets eine regulierte Innentemperatur von 37°C bei 21% O₂ und 5% CO₂.

3.7.1 Anzucht der Zellen

Für die Anzucht wurden 45 ml rotes Zellkulturmedium und 120 µl G418 in einer Zellkulturflasche (Oberfläche 225 cm²) vorgelegt. Ein Cryoröhrchen mit U2OS ER-Zellen wurde aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und rasch aufgetaut. Nach mehrmaligem schwenken wurde der Inhalt des Röhrchens vorsichtig in die Kulturflasche überführt. Als der Flaschenboden gleichmäßig mit Medium bedeckt war, wurden die Zellen für 24h in den Inkubator gelegt. Nach einem Tag konnte man unter dem Mikroskop optisch auf Viabilität überprüfen.

3.7.2 Passage der Zellen

Vor Erreichen der vollständigen Konfluenz nach ca. 2-3 Wachstumstagen, wurde das Medium entfernt, die Zellen zweifach mit 6 ml PBS-Puffer gewaschen und anschließend mit 4 ml Trypsin behandelt. Nachdem das Trypsin abpipettiert war, brauchten die Zellen noch 5 min in der umgedrehten Flasche im Inkubator bis sie abgelöst waren. Danach konnten sie im Verhältnis 1:3 passagiert werden. Bei jeder Passage wurde frisches Zellkulturmedium vorgelegt sowie bei jeder zweiten Passage erneut zusätzlich 120 µl G418 dem frischem Zellkulturmedium zugefügt. Pro Anzucht wurden insgesamt zwei Passagen durchgeführt.

3.7.3 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Anzahl an Zellen in den Kulturflaschen, wurden die von der Flaschenwand abgelösten Zellen in 10-30 ml frischem Kulturmedium in einen 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt und das Volumen (V_{alt}) notiert. Mit Hilfe einer Neubauer Zählkammer, die vorsichtig mit ca 10-20 µl dieser Zellsuspension befüllt wurde, konnten die Zellen pro 0,1 µl Füllkapazität abgezählt werden. Es wurden je 4 große Quadrate (2 Ränder pro Quadrat) ausgezählt und der Mittelwert errechnet. Zwischenzeitlich konnte das Zentrifugenröhrchen mit der restlichen Zellsuspension 5 min bei 1200 rpm zentrifugiert werden. Danach wurde der Überstand vom Pellet vorsichtig entfernt um Trypsinrückstände zu reduzieren und mit temperiertem frischem Zellkulturmedium auf das errechnete Volumen für die gewünschte Konzentration gefüllt und daraufhin resuspendiert.

3.7.4 Einfrieren von Zellen in flüssigem Stickstoff

Für das Einfrieren der Zellen in Cryovials musste pro Vial mit einer Zellkonzentration von $8,8 \cdot 10^6$ Zellen / ml gerechnet werden. So konnte aus einem Vial, nach wieder auftauen, die Zellmenge für sechs 96-er Well Platten (11000 Zellen pro well ohne Rand) genommen werden.

Berechnung: $V_{(neu)} = V_{(alt)} \cdot \text{Zellen (ausgezählt)} / 880$

Vor dem Einfrieren wurden die Cryovials im Tiefkühler bei -20°C und das Freezing Medium im Kühlschrank bei 6°C vorgekühlt.

Die Arbeitsschritte beim Einfrieren der Zellen entsprachen der genauen Zellzahlbestimmung (siehe 3.7.3). Nach der Resuspension des Pellets im Zellkulturmedium wurde 0,5 ml des Freezing Mediums in den vorgekühlten Cryovials vorgelegt und mit dem gleichem Volumen an Zellsuspension (also $4,4 \cdot 10^6$ Zellen pro Cryovial) vorsichtig überschichtet. Um einen sanften Einfriervorgang zu gewährleisten, wurde die Cryovials nach leichtem schwenken vorerst wenige Tage in isolierten Boxen bei -80°C gelagert, bevor sie in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

3.8 Durchführung des CALUX Bioassays mit integrierter Metabolisierung

3.8.1 CALUX Tag 1: Platten ansähen aus Cryokultur

Am ersten Tag wurden 40 ml weißes CALUX Medium in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen vorgelegt. Darin wurde nach schnellem auftauen und 10 fachem vorsichtigem schwenken der Inhalt eines Cryoröhrchens in das Zentrifugenröhrchen überführt. Um das DMSO aus dem Freezing Medium zu entfernen, musste die Zellsuspension für 5 min. bei 1200 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 40 ml frischem weißen CALUX Medium wieder aufgenommen. Je 100 µl rotes Zellkulturmedium wurden als Rand in den 96-er Well Platten pipettiert. Die inneren Wells wurden mit jeweils 100 µl Zellsuspension befüllt. Die fertigen Platten mussten anschließend 24 ± 4 Stunden im Inkubator brüten.

3.8.2 CALUX Tag 2: Zugabe der Testsubstanzen und Inkorporation eines Metabolisierungssystems

In einer Deep-Well-Platte wurden 1,5 ml weißes CALUX Medium vorgelegt. Dazu wurden 7,5 µl Standardlösung bzw. 6,6 µl Probe mit 1,65 µl Methoxychlorlösung (bzw. 1,65 µl Testsubstanz) mit 6,6 µl DMSO gemengt. So war eine finale DMSO Konzentration von 0,5% im Medium gegeben. Es wurde mehrmals gründlich durch auf- und abpipettieren mit der multichannel Pipette suspendiert. Die 96-er Platten welche am Vortag ausgesät wurden, konnten danach aus dem Inkubator genommen werden. Das alte Medium auf den Zellen wurde abpipettiert und wie in Abb. 2 gezeigt, durch 100 µl der Standard- bzw. der Probenlösungen aus den Deep-Wells ersetzt.

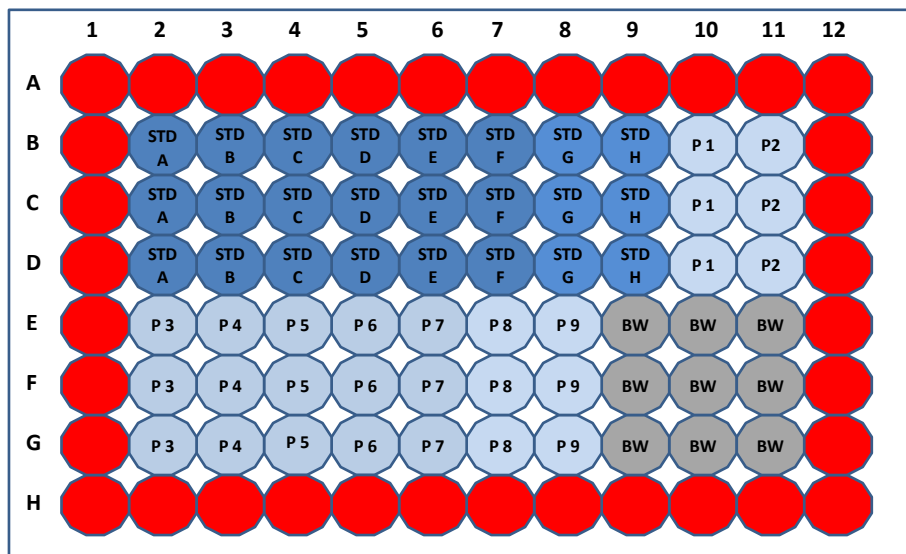


Abbildung 2: Pipettierschema CALUX Zellplatten

Zu jenen Platten, auf denen die Verstoffwechselung durch den S9-Mix simuliert werden sollte, wurde schlussendlich noch 10 µl von dem Leber-S9-Mix in die Proben und Blindwerte beigemischt. Auf die Vergleichsplatten mit denselben Proben ohne gewünschter Metabolisierung, kam lediglich 10 µl weißes CALUX Medium um die Konzentration der Proben auf beiden Platten gleich zu halten. Danach wurden die Zellplatten für weitere 20 ± 4 Stunden im Inkubator bebrütet.

3.8.3 CALUX Tag 3: Auswertung

3.8.3.1 Optische Kontrolle im Mikroskop

Bevor es zur Auswertung mit dem Luminometer kam, wurden die Zellen im Mikroskop optisch auf Kontaminationen und cytotoxe bzw. wachstumsinhibierende Effekte geprüft.

Bei einem normalem Wachstumsverlauf, konnte man einen gut bewachsenen Zellrasen deutlich erkennen. Viele abgerundete und lose schwimmende Zellen deuteten auf eine cytotoxe Probe hin. Eine Trübung des Mediums und viele herumschwirrende feste Partikel zeigten eine Kontamination durch Bakterien.

3.8.3.2 Messung der Luciferase Aktivität im Photometer

Vor der photometrischen Messung wurde eine Färbelösung aus: (pro Platte) 8,5 mg Glowmix Pulver, 1,2 ml Steady-Glow Puffer und 1,8 ml RO-H₂O hergestellt, sodass das Volumsverhältnis von Steady-Glow Puffer zu RO-H₂O genau 1:1,5 betrug. In jedes der 60 inneren Wells auf der Zellplatte wurden nun 50 µl der Färbelösung zugegeben.

Nach 20-30 min Einwirkzeit bei Raumtemperatur wurde der Inhalt aus den einzelnen Wells der transparenten Platte in die Wells einer seitlich lichtdichten weißen 96er Well Platte quantitativ überführt. Danach erfolgte die Auswertung am Luminometer (Victor³). Es wurde über den multilabel Counter die Intensität der Lumineszenz bestimmt, wodurch auf den Aktivitätsgrad der Luciferase und durch Vergleich mit der Standardreihe auf die Östrogenaktivität zu schließen ist.

3.9 Negativkontrolle

Die auf den CALUX Platten aufgetragenen Blindwerte waren reine DMSO Proben, welche als Negativkontrolle galten. Es war sehr wichtig möglichst viele Blindwerte zu testen, da es in dieser Masterarbeit zu der Einführung eines neuen CALUX Verfahrens mit integrierter Metabolisierung kam und somit verschiedene neue Substrate den Hormonempfindlichen Zellen ausgesetzt wurden. Die Reaktion der hER Zellen auf die Probensubstanzen musste daher immer ausreichend mit den „leeren“ DMSO Proben hinterfragt werden. Zusätzlich zu den DMSO Blindwerten wurden schon bei der Migration einer Probe immer mindestens zwei unabhängige Blindwerte mit EtOH mitgeführt. Diese wurden gemeinsam mit den anderen Proben aufkonzentriert, kamen aber in dieser Arbeit nicht zur erneuten Verwendung, da sie schon in vorherigen Tests (hier nicht angeführt) als negativ bestätigt wurden.

4 Ergebnisse

4.1 Auswertung

Alle Rohdaten der in dieser Masterarbeit angeführten Ergebnisse sind OFI intern archiviert. Für die Berechnungen und für eine bestmögliche Darstellung der Resultate wurden sowohl Microsoft Office Excel 2007 als auch das Programm GraphPad Prism , Version 6.04 verwendet. Die Quantifizierung der Östrogenaktivität erfolgte durch Vergleich mit der Aktivität des natürlichen Östrogens 17 β -Estradiol. Deshalb wurde auf jeder CALUX Platte neben den Proben bzw. Reinsubstanzen eine 17 β -Estradiol Standardreihe (siehe Materialien und Methoden, Tabelle 8) mitgetestet. Die Messung der Proben, der Reinsubstanzen und der Standardreihe wurde auf einer Platte immer als Dreifachbestimmung (siehe Auftragungschema CALUX Platten) durchgeführt. Es wurde von jeder Dreifachbestimmung immer der Mittelwert der luminometrisch gemessenen relativen Lichteinheiten (RLUs) errechnet und davon der Mittelwert der Blindwerte abgezogen. Danach konnte das Ergebnis durch den Mittelwert der höchsten Standards dividiert werden um so die relative Induktion in Prozentwerten zu erhalten. Mit GraphPad Prism 6.04 wurde schließlich eine log Transformation der Konzentrationen sowie eine non-lineare sigmoidale Regression durchgeführt, indem der „comand“ log (agonist) vs response – variable slope (four parameters) eingegeben wurde. Mit der in Abbildung 1 gezeigten Formel konnte durch das Programm die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀), welche den halbmaximalen Effekt angibt, berechnet werden:

$$Y = \text{Bottom} + \frac{\text{Top} - \text{Bottom}}{1 + 10^{((\log XC_{50} - X) \cdot \text{Hill slope})}}$$

Abbildung 1: Formel zur Berechnung des EC₅₀

4.2. Metabolisierung der Modellschubstanz Methoxychlor

4.2.1 Vergleich Methoxychlor mit und ohne S9

In Abbildung 2 wird veranschaulicht, wie unterschiedliche Konzentrationen der Modellsubstanz Methoxychlor (MC) auf eine im CALUX integrierte Metabolisierung mit β NF/PB induzierten S9 Enzymen reagiert. Es wird der Graph einer nicht metabolisierten MC Reihe (blau) sowie der Graph einer metabolisierten MC Reihe (rot) gezeigt. Als Vergleich wird die Aktivität der β -Estradiol Standardreihe (grau) angeführt.

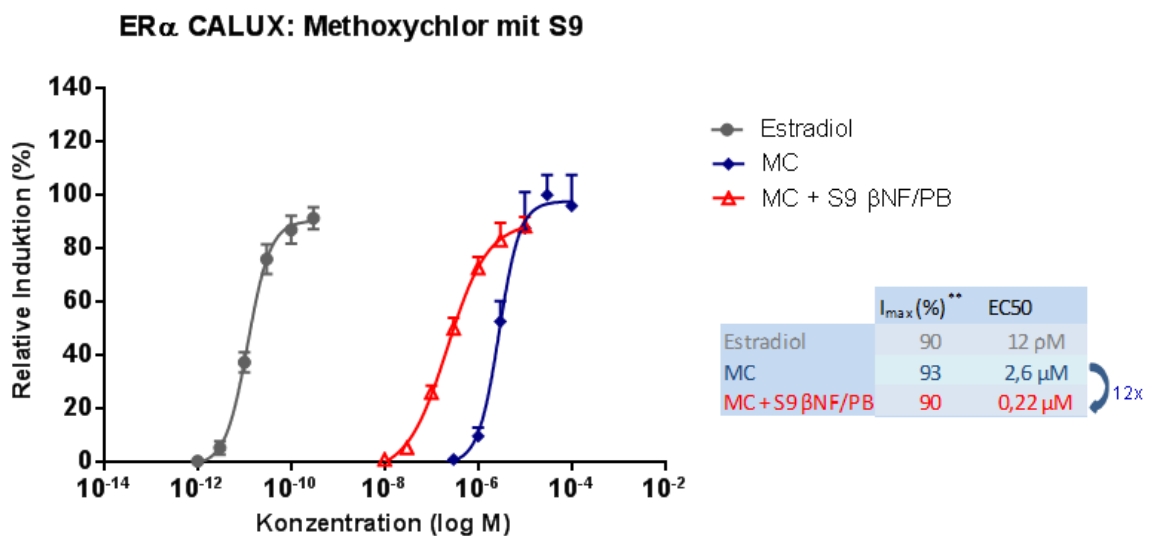


Abbildung 2: Vergleich Methoxychlor mit und ohne S9

Der EC_{50} des nicht metabolisierten MC wird durch die Biotransformation um eine Zehnerpotenz aktiviert. Dies ergibt hinsichtlich der EC_{50} der beiden, einen Faktor von 12. Allerdings ist die metabolisierte Form von MC deutlich geringer aktiv als Estradiol selbst, welches einen EC_{50} von 12 pm aufweist.

4.2.2 Mehrfachbestimmung und Reproduzierbarkeit

Für die Vergleichspräzision wurde wie in Tabelle 1 ersichtlich, der Versuch sowohl am selben Tag öfters durchgeführt um die Wiederholbarkeit zu prüfen (siehe auch Abbildung 3), als auch des weiteren an mehreren Tagen insgesamt 13 Mal wiederholt um die Reproduzierbarkeit zu testen. Ebenfalls in Tabelle 1 ersichtlich ist, dass OFI intern zusätzlich innerhalb von vier Monaten an drei unabhängigen Tagen von folgenden drei Personen getestet wurde: Reka Anna Bandi, Christopher Hartl und Lisa Fernau (siehe auch Abbildung. 4).

Es wurden von allen Resultaten der Mittelwert sowie die relative Standardabweichung (RSD) bestimmt.

Tabelle 1: Reproduzierbarkeit der Messung Methoxychlor mit und ohne S9

Probe	Datum	Nr.	Person	S9	I _{max} (%)**	EC50
Estradiol	20.11.2015		Bandi	-	90	12 µM
MC	18.03.2016		Bandi	-	92	2,7 µM
MC	01.04.2016		Bandi	-	102	2,9 µM
MC	13.04.2016		Bandi	-	98	2,8 µM
				Mittelwert	97 %	2,8 µM
				RSD	5 %	36 %
MC + S9	18.03.2016	I.	Bandi	S9 βNF/PB	105	0,44 µM
MC + S9	18.03.2016	II.	Bandi	S9 βNF/PB	103	0,44 µM
MC + S9	23.03.2016	I.	Bandi	S9 βNF/PB	90	0,22 µM
MC + S9	23.03.2016	II.	Hartl	S9 βNF/PB	92	0,22 µM
MC + S9	23.03.2016	III.	Bandi	S9 Aroclor 1254	88	0,20 µM
MC + S9	23.03.2016	IV.	Bandi	S9 Aroclor 1254	107	0,22 µM
MC + S9	23.03.2016	V.	Bandi	S9 Aroclor 1254	86	0,20 µM
MC + S9	13.05.2016	I.	Bandi	S9 βNF/PB	56	0,25 µM
MC + S9	13.05.2016	II.	Bandi	S9 βNF/PB	52	0,29 µM
MC + S9	13.05.2016	III.	Bandi	S9 βNF/PB	50	0,25 µM
MC + S9	19.05.2016	I.	Bandi	S9 βNF/PB	49	0,40 µM
MC + S9	19.05.2016	II.	Bandi	S9 βNF/PB	56	0,31 µM
MC + S9	01.06.2016	I.	Fernau	S9 βNF/PB	103	0,20 µM
				Mittelwert	80%	0,28 µM
				RSD	29%	32%

Betreffend der EC₅₀ Werte ist das Ergebnis der Messungen der mit S9 metabolisierten MC, wenn nicht exakt identisch, sehr ähnlich. Die Werte der maximalen Induktion weisen allerdings trotz Ähnlichkeiten der EC₅₀-Werte, eine erhöhte Standardabweichung auf.

ER α CALUX: Methoxychlor mit S9, Wiederholbarkeit an einem Tag

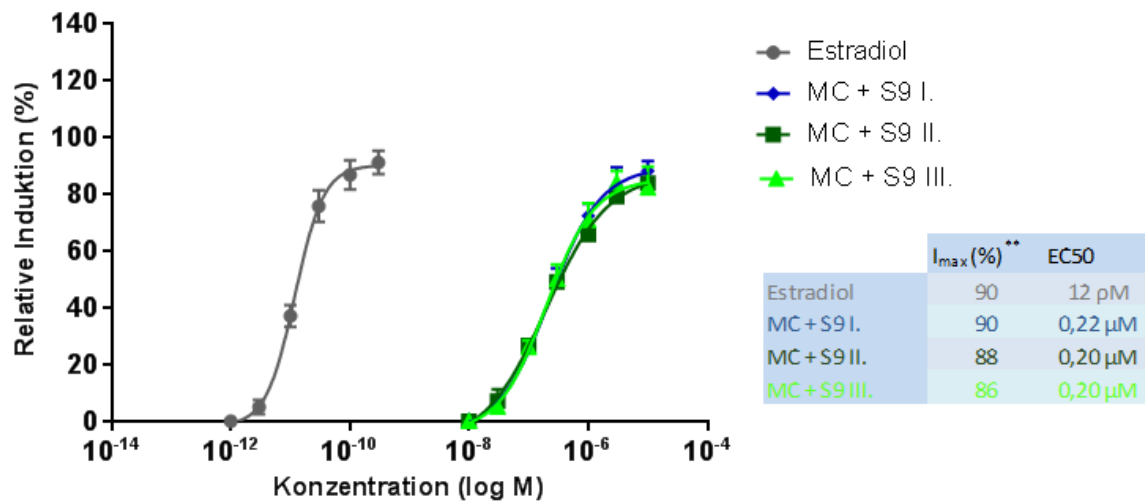


Abbildung 3: Wiederholbarkeit an einem Tag unter Idealbedingungen

Eine Dreifachbestimmung am selben Tag zeigt kongruente Werte mit analogen Graphen (blau, hellgrün und dunkelgrün). Sowohl die EC₅₀, als auch die maximale Induktion sind sogut wie deckungsgleich.

ER α CALUX: Methoxychlor mit S9

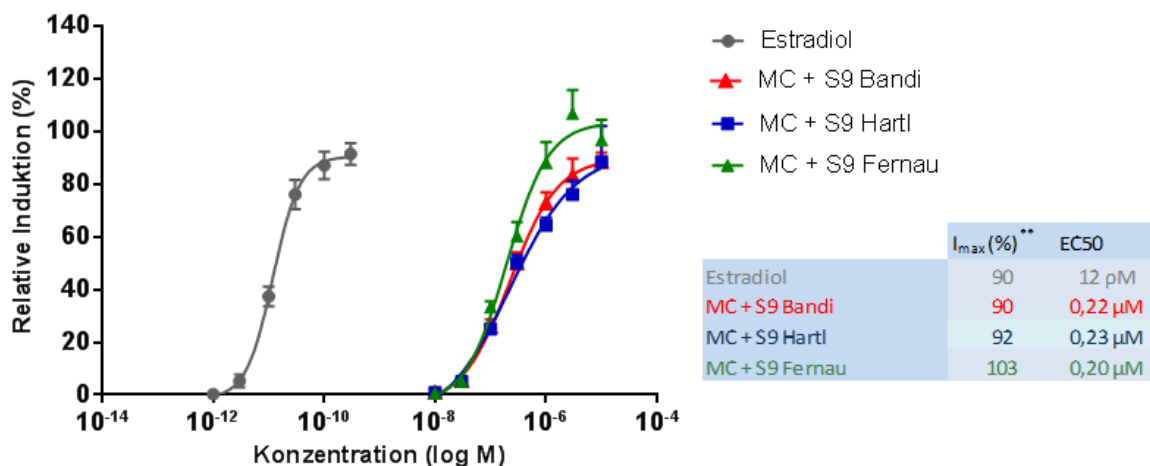
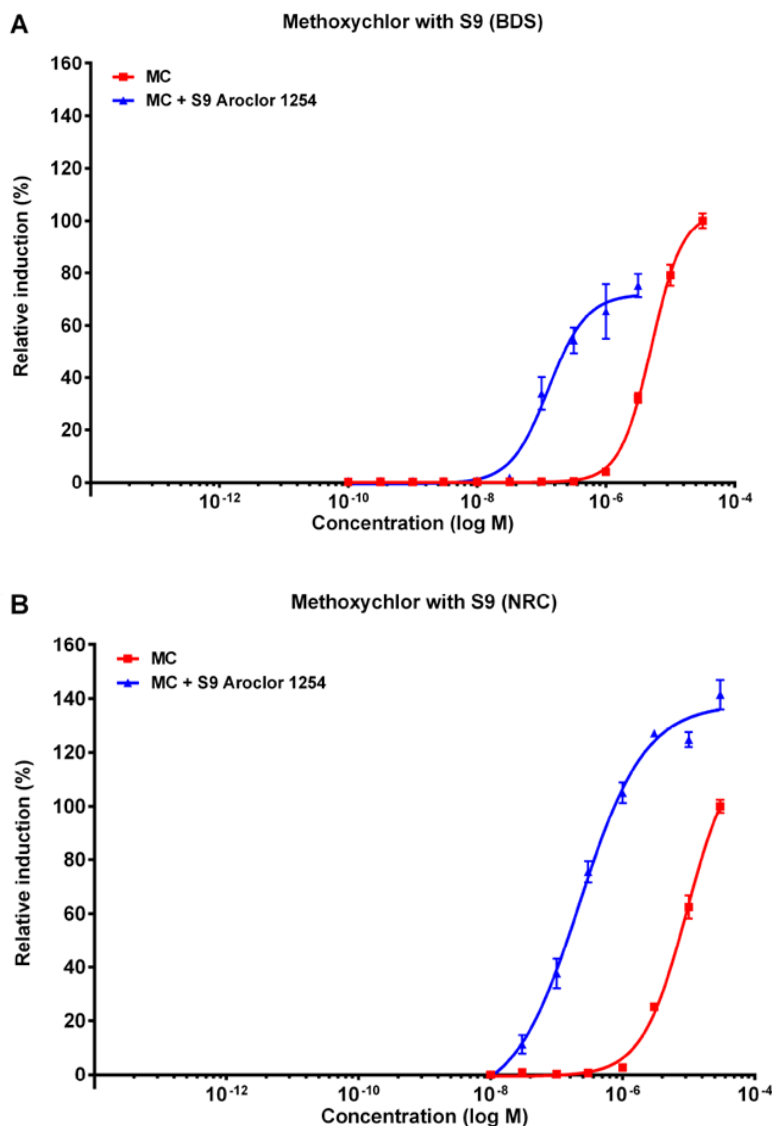


Abbildung 4: Reproduzierbarkeit im realen Laborbetrieb durch 3 verschiedene Personen

Die Resultate der Tests, welche durch verschiedene Personen in einem Zeitraum von vier Monaten durchgeführt wurden, deuten darauf hin, dass die EC₅₀ Werte auch über einen längeren Zeitraum hinweg perfekt reproduzierbar sind. Die maximale Induktion ist allerdings wenn Messungen an unterschiedlichen Tagen durchgeführt wurden unstetig.

4.2.3. Testvergleich in Zusammenarbeit mit anderen Labors

Es wurde zusätzlich ein Testvergleich zwischen folgenden drei Labors durchgeführt: Österreichisches Forschungsinstitut (OFI) in Österreich, Biodetection Systems Labor (BDS) in den Niederlanden und Nestle Research Labor (NRC) in der Schweiz. In diesem Versuch wurde der ER α -CALUX mit integriertem Metabolismus an der Modellsubstanz MC getestet. Es wurde in allen Labors mit demselben Protokoll gearbeitet, aber es kamen laboreigene Reagenzien und die eigene Laborausrüstung zur Verwendung. Die Ergebnisse wurden auf einem Poster veröffentlicht (Mollergues et al.2016) und werden in dieser Masterarbeit in Abbildung 5 als A.) Resultate von BDS B.) Resultate von NRC und C.) Resultate von OFI gezeigt.



C ER α CALUX: Methoxychlor mit S9, OFI

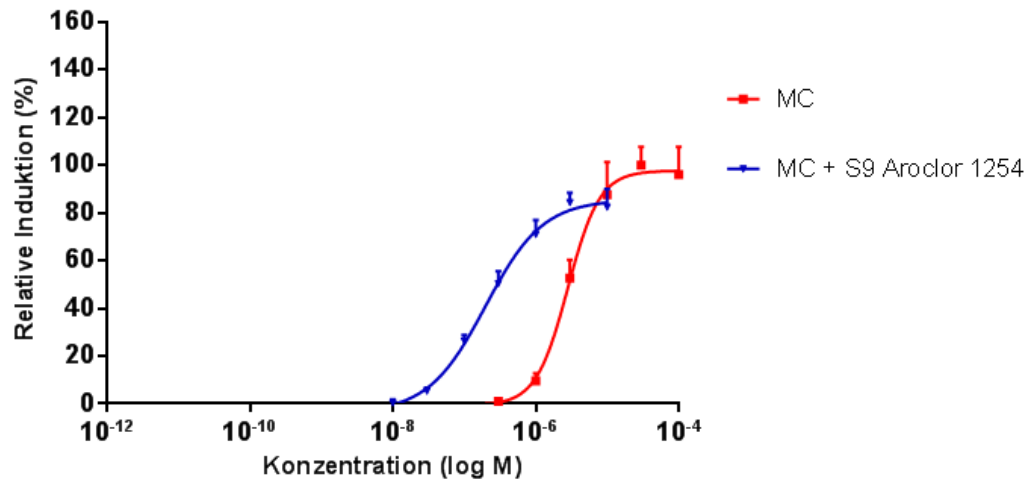


Abbildung 5: Testvergleich zwischen 3 Labors: MC mit S9 Aroclor 1254

Die Resultate der drei Labors sind sehr ähnlich und demonstrieren die Reproduzierbarkeit der Metabolisierungsmethode. Der EC_{50} -Wert vom BDS Experiment beträgt: MC = $5,08 \cdot 10^{-6}$, MC + S9 = $1,28 \cdot 10^{-7}$; der EC_{50} -Wert vom Nestle Experiment beträgt: MC = $9,38 \cdot 10^{-6}$, MC + S9 = $2,42 \cdot 10^{-7}$; und der EC_{50} -Wert vom OFI Versuch liegt bei: MC = $2,7 \cdot 10^{-6}$, MC + S9 = $2,03 \cdot 10^{-7}$. In der maximalen Intensität sind auch zwischen den Labors in den Graphen deutliche Unterschiede zu erkennen.

4.2.4 Vergleich von β NF/PB und Aroclor 1254 induziertem S9 und deren Chargenvarianzen

Der Vergleich der Chargen war von Bedeutung, da die Resultate laut Vorversuchen (hier nicht angeführt), Chargenabhängig sind. Um also mit dem im CALUX integrierten Metabolisierungssystem arbeiten zu können, wurde jene Charge mit dem besten Aktivierungsvermögen ermittelt, damit im Weiteren entschieden werden konnte, ob die Metabolisierung mit Aroclor1254 oder β NF/PB induziertem S9 erfolgen sollte. Die Resultate sind für S9 β NF/PB in Abbildung 6 und für Aroclor 1254 in Abbildung 7 verbildlicht.

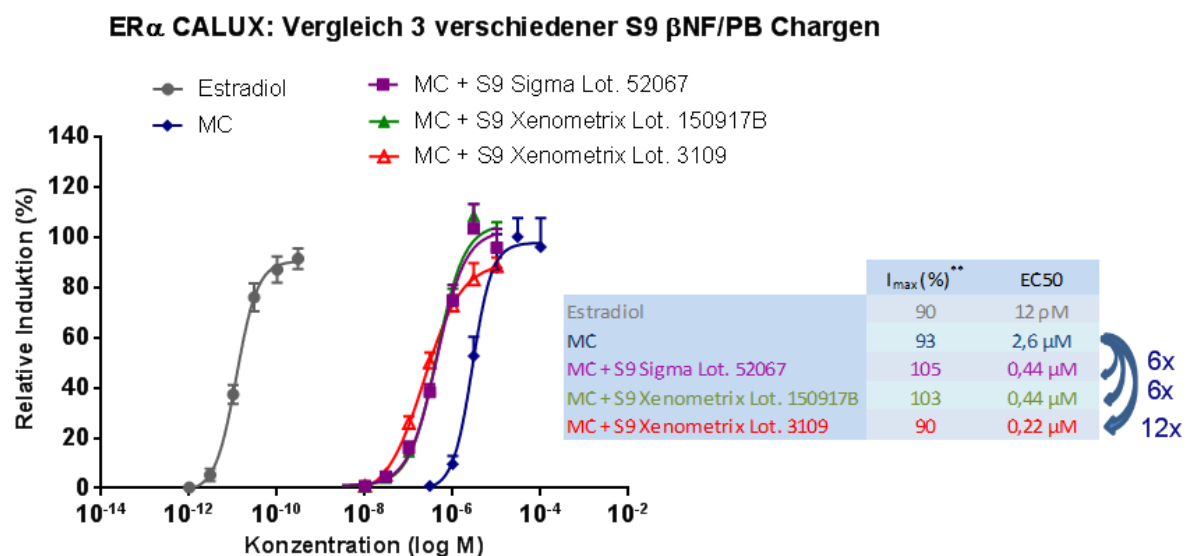


Abbildung 6: Vergleich drei verschiedener S9 β NF/PB Chargen

Innerhalb der Chargen von mit β NF/PB induzierten S9 Enzymen, weisen die S9-Enzyme von Xenometrix (Artikelnr.: PRS-PB01) mit der Charge 3109, laut EC_{50} -Wert, eine doppelt so starke Potenz der Metabolisierung auf als die übrigen zwei getesteten Enzymchargen. Die maximale Induktion ist allerdings 10% niedriger. Es ist jedoch zu vermerken, dass an unterschiedlichen Tagen getestet wurde und somit betreffend der maximalen Induktion nicht unbedingt von einer Chargenabhängigkeit auszugehen ist (siehe auch maximale Induktionen in Tabelle 1).

ER α CALUX: Methoxychlor mit S9, Vergleich von Aroclor 1254 Chargen

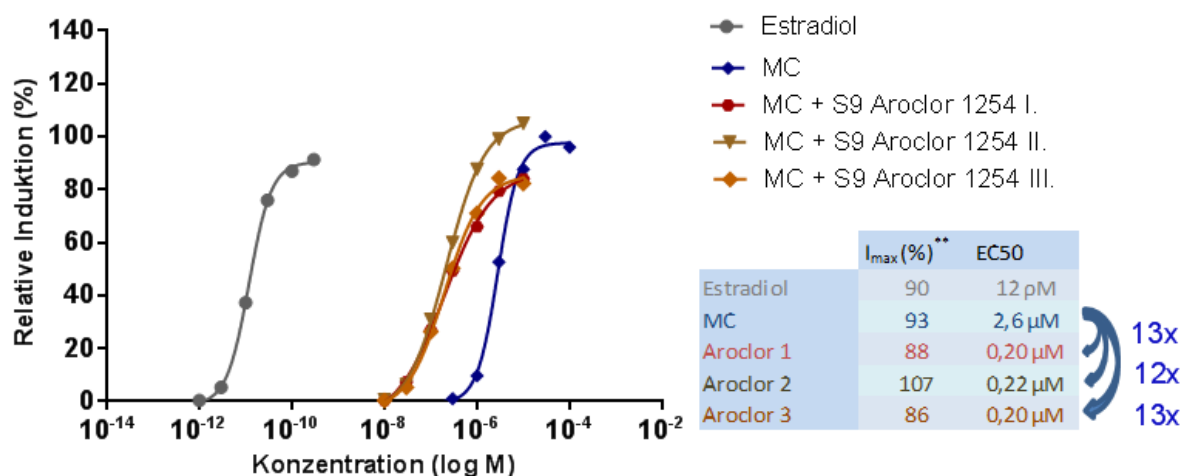


Abbildung 7: Vergleich drei verschiedener S9 Aroclor 1254 Chargen

Die getesteten Aroclor 1254 Chargen zeigen eine deutliche Ähnlichkeit in ihren EC₅₀-Werten. Trotz Versuchsdurchführungen am selben Tag, unterscheidet sich eines der Testchargen in ihrer maximalen Intensität um 20%. Bei Betrachtung der EC₅₀-Werte erkennt man, dass die Metabolisierungspotenz sogar wie gleich hoch ist als bei der besten Charge der getesteten βNF/PB induzierten Enzymen (Abbildung 6).

In Schlussfolgerung an die in Abbildung 6 und 7 gezeigten Resultate und aufgrund der Tatsache dass eine mit βNF/PB erfolgte Induktion ein breiteres Spektrum an CYPs erfasst, wurden in allen Experimenten in dieser Masterarbeit, wenn nicht ausdrücklich anders erwähnt, die βNF/PB induzierten Enzyme von Xenometrix mit der Charge 3109 verwendet.

4.2.5 Versuche ohne MgCl₂

In anfänglichen Versuchen ist aufgefallen, dass die Menge an MgCl₂ im S9-Mix einen Einfluss auf die maximale Intensität haben muss. Infolgedessen wurden an zwei Tagen Experimente ohne MgCl₂ durchgeführt. Es wurden immer zwei Platten, einmal mit MgCl₂ und einmal ohne MgCl₂ im zugefügten S9-Mix miteinander verglichen. Die Resultate sind in Tabelle 2 ersichtlich. Der Versuch vom 18.3.2016 wird graphisch in Abbildung 8 gezeigt. Die Dreifachbestimmung vom 19.5.2016 wird in Abbildung 9 veranschaulicht.

Tabelle 2: Messungen an zwei Tagen mit und ohne MgCl_2

Probe	Datum	Nr.	S9	$I_{\max}(\%)^{**}$	EC50
MC + S9	18.03.2016	I.	S9 β NF/PB (Sigma Lot. 52067)	105	0,44 μM
MC + S9	19.05.2016	I.	S9 β NF/PB	49	0,40 μM
MC + S9	19.05.2016	II.	S9 β NF/PB	56	0,31 μM
Mittelwert				53 %	0,36 μM
RSD				9 %	18 %
MC + S9 ohne MgCl_2	18.03.2016	I.	S9 β NF/PB (Sigma Lot. 52067)	216	0,52 μM
MC + S9 ohne MgCl_2	19.05.2016	I.	S9 β NF/PB	95	0,23 μM
MC + S9 ohne MgCl_2	19.05.2016	II.	S9 β NF/PB	100	0,27 μM
MC + S9 ohne MgCl_2	19.05.2016	III.	S9 β NF/PB	117	0,34 μM
Mittelwert				104 %	0,28 μM
RSD				11 %	20 %

ER α CALUX: Methoxychlor mit S9, ohne MgCl_2 am 18.3.2016

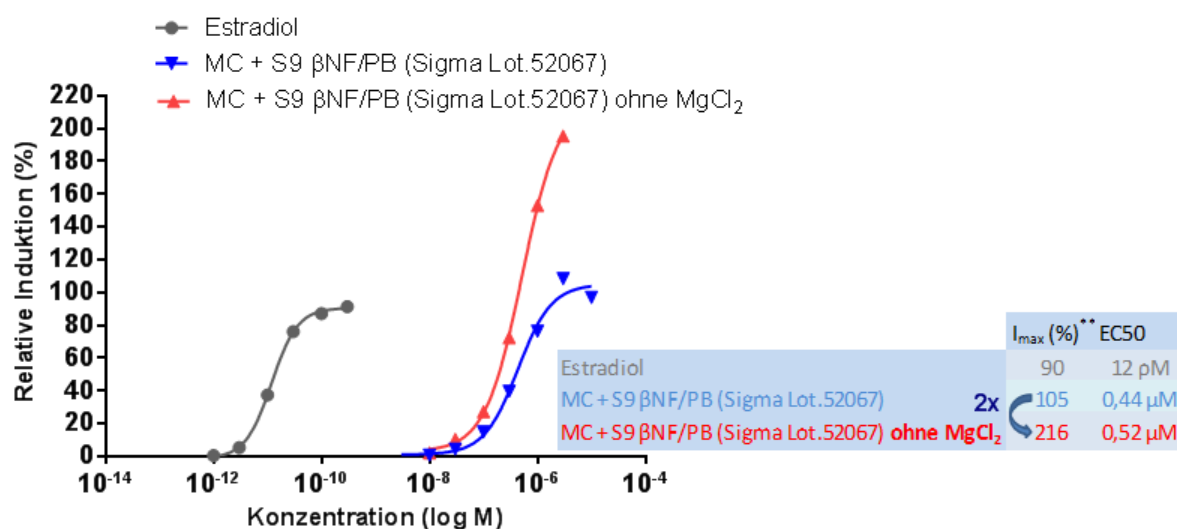


Abbildung 8: Metabolisierung von MC mit und ohne MgCl_2 am 18.3.2016 gemessen

Die maximale Induktion von MC durch die Metabolisierung ohne MgCl_2 im S9-Mix zeigt ein doppelt so starkes Signal als bei der Metabolisierung mit MgCl_2 . Dies deutet darauf hin, dass das MgCl_2 wahrscheinlich eine cytotoxische Wirkung auf die Zellen hat, allerdings konnte dies durch Beobachtungen im Mikroskop nicht bestätigt werden.

ER α CALUX: Methoxychlor mit S9, ohne MgCl₂ am 19.5.2016

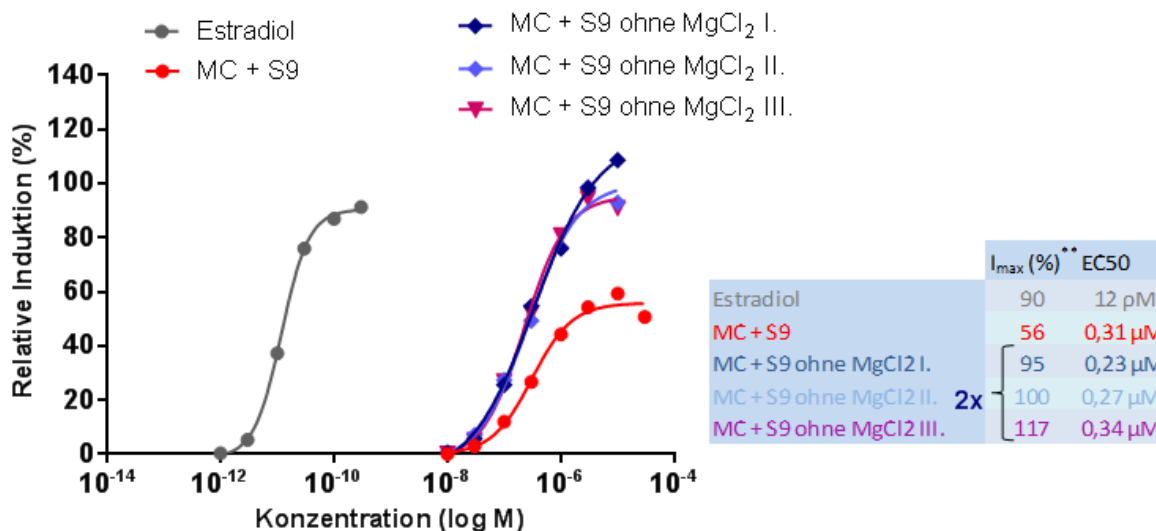


Abbildung 9: Dreifachbestimmung, Metabolisierung von MC mit und ohne MgCl₂ am 19.5.2016 gemessen

Auch aus den Resultaten des Folgeexperiments am 19.5.2016 ist ersichtlich, dass ohne MgCl₂ im S9-Mix eine doppelt so hohe maximale Induktion hervorgerufen wird als mit MgCl₂. Die Dreifachbestimmung zeigt, die drei Messungen vergleichend, sehr ähnliche fast deckungsgleiche Werte.

4.3. Metabolisierung weiterer Reinsubstanzen

4.3.1 Metabolisierung des Metaboliten HPTE

Ein wichtiges Abbauprodukt von MC ist das biologisch aktive 1,1,1-Trichloro-2,2-bis(4-hydroxyphenyl)ethane (HPTE). Die Transformation des HPTE Metaboliten aus dem MC erfolgt durch enzymatische Biotransformation (Aoyama et Chapin, 2014). Im folgendem Versuch wurde das Ausmaß der Biotransformation durch den Enzymcocktail des S9-Mix geprüft. Die Resultate werden in Abbildung 10 gezeigt.

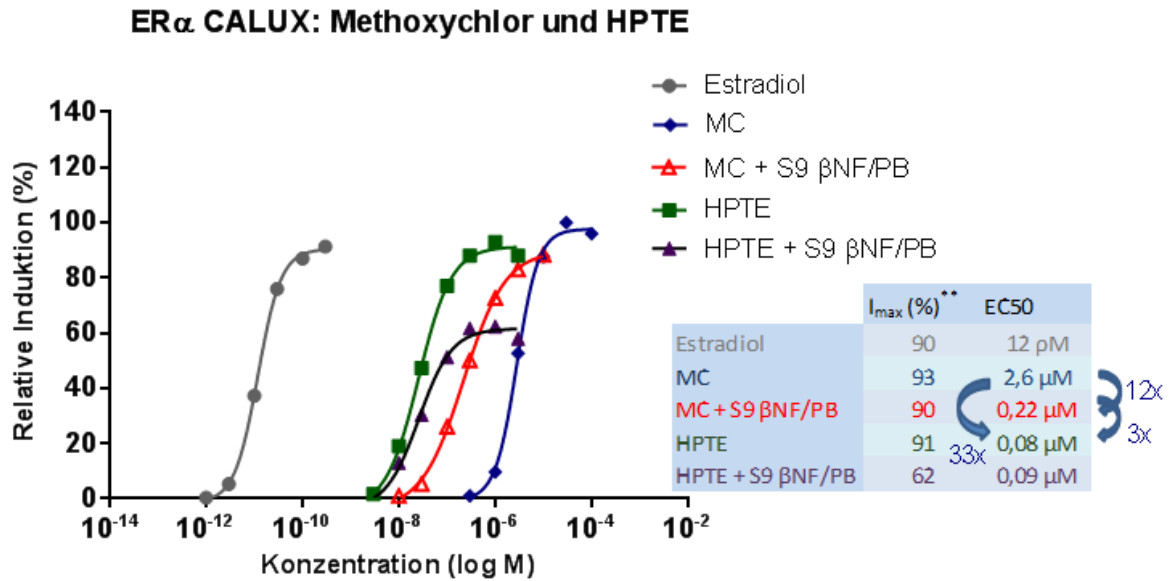


Abbildung 10: Methoxychlor und sein Metabolit HPTE vor und nach Zugabe von S9 Enzymen

In den EC₅₀-Werten ist zu erkennen, dass HPTE (grün) 33-fach östrogenaktiver als MC (blau) ist. Die maximale Intensität ist bei beiden Substanzen gleich hoch. Der Vergleich der EC₅₀-Werte des direkten Metaboliten von MC (MC +S9 in rot) und des HPTE zeigen eine 3-fache Abweichung bei gleicher max Intensität. HPTE und HPTE +S9 (violett) weisen keine Differenzen in ihren EC₅₀-Werten auf und sind somit gleichstark östrogenaktiv.

4.3.2 Metabolisierung von Benzophenon (BP)

Benzophenon (BP) ist ein häufig verwendetes Industrieprodukt, welches aufgrund seiner zwei Phenylringe ein potentieller Bindungspartner des ER α -Rezeptors ist. Aus diesem Grund wurde auch BP mit S9-Enzymen biotransformiert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 11 ersichtlich.

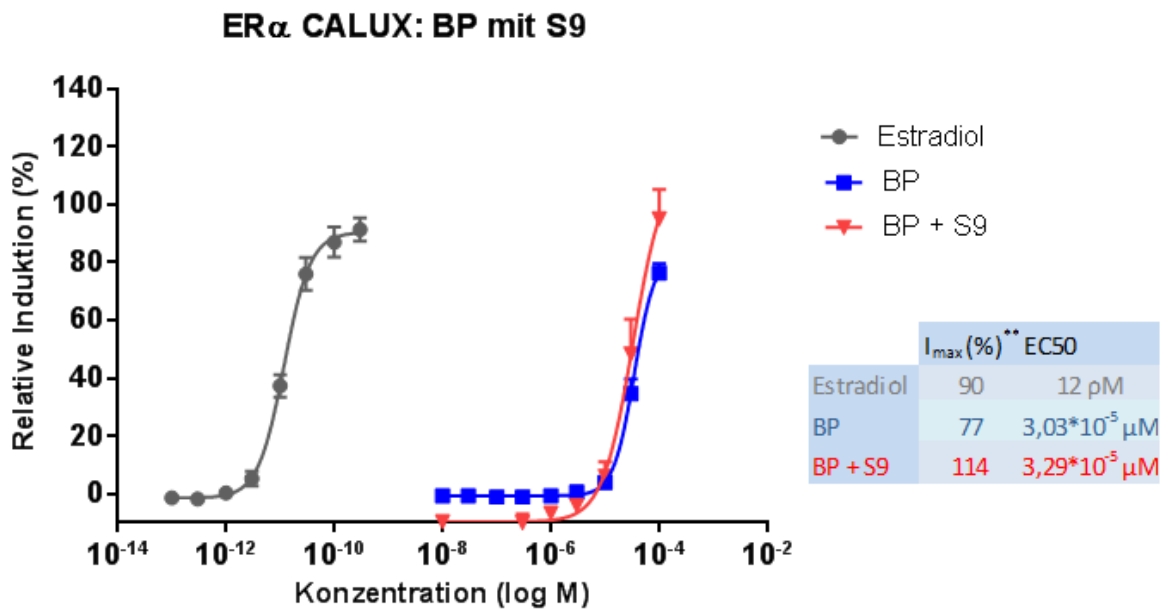


Abbildung 11: Benzophenon (BP) vor und nach Metabolisierung mit S9

BP zeigt metabolisiert keinen Shift in ihrer Östrogenaktivität. Der EC₅₀ –Wert ist vorher und nachher im selben Wertbereich.

4.3.3 Metabolisierung von 1,3 Diphenylpropan (DPP)

Auch 1,3 Diphenylpropan (DPP) besitzt zwei aromatische Phenylringe in seiner Struktur und wurde insbesondere aufgrund widersprüchlicher Literatur über seine Östrogenaktivierung nach einer Metabolisierung (Kitamura et al. 2003), in dieser Masterarbeit ebenfalls durch S9 Leberenzyme metabolisiert. Die Resultate für die Verstoffwechselung von DPP sind in Abbildung 12 verbildlicht.

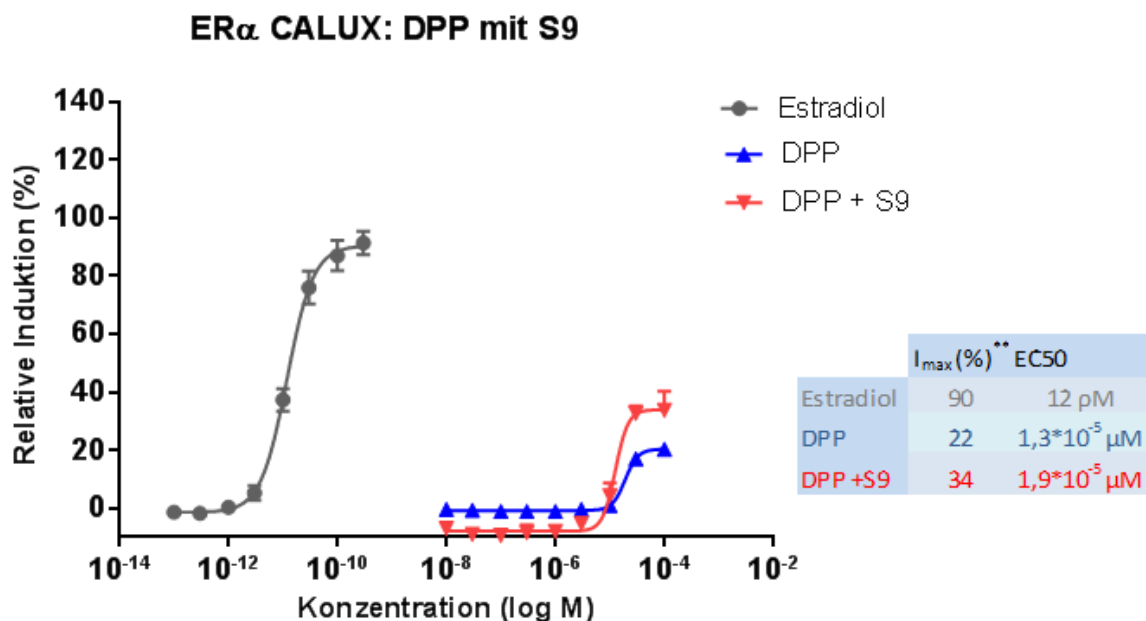


Abbildung 12: 1,3 Diphénylpropan (DPP) vor und nach Metabolisierung mit S9

Die Metabolisierung von DPP mit S9 zeigt keine signifikante Auswirkung in der Östrogenaktivität von DPP. Der EC_{50} bleibt nach Zugabe der S9- Leberenzyme im selben logarithmischen Bereich.

4.3.4 Metabolisierung von 17 β -Estradiol

Auch die 17 β -Estradiol Standardreihe wurde einer Metabolisierung durch S9 Leberenzyme, unterzogen. In Erwartung stand, dass durch die Zugabe von S9 Enzymen keine erhöhte Aktivität nachzuweisen ist. Die Ergebnisse werden in Abbildung 1 gezeigt. Es wurden zwei CALUX Platten, einmal mit sowie einmal ohne S9, getestet. Die Messergebnisse liegen auch in diesem Versuch in Dreifachbestimmung vor. Es werden die Mittelwerte im Vergleich dargestellt. Auf jener Platte mit S9, wurde als Kontrolle einer positiven Metabolisierung, Methoxychlor mitgetestet (Ergebnisse hier nicht angeführt).

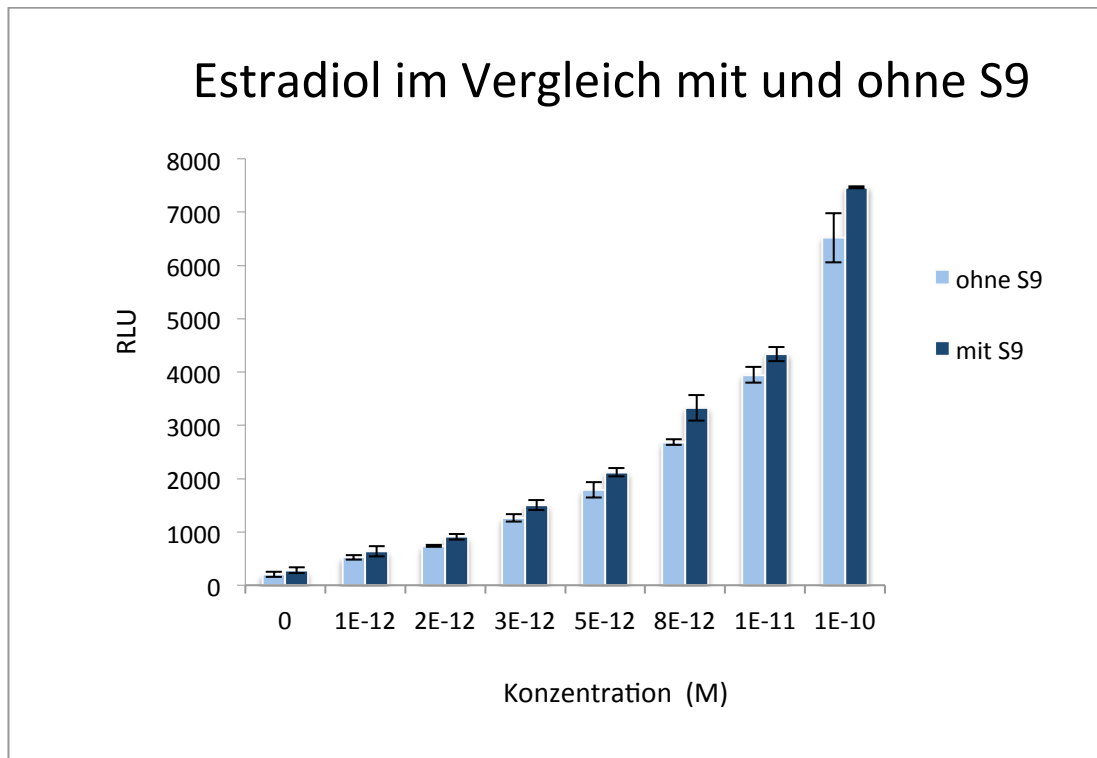


Abbildung 13: Metabolisierung von 17 β -Estradiol mittels S9 Leberenzymen

Die Messergebnisse zeigen deutlich, dass kein signifikanter Unterschied hinsichtlich der Östrogenaktivität zwischen der metabolisierten 17 β -Estradiol-Reihe und der nicht metabolisierten 17 β -Estradiol-Reihe gemessen werden kann.

4.4 Auswirkung von verschiedenen Probenmatrizen auf die Metabolisierung durch S9

Es wurden folgende vier Proben auf ihre Auswirkung auf die Metabolisierung durch S9-Enzyme in Präsenz von MC im CALUX –Assay getestet: Probe Polypropylen (PP), Probe Getränkeverbundkarton (GVK), Probe beschichtetes Aluminium (Alu) und Probe Papier (für Probendetails siehe auch in Materialien und Methoden Tabelle 5). In Erwartung stand, dass keines dieser Proben die Aktivität von MC beeinflussen wird. Die Resultate aller Proben sind in Tabelle 3 zusammengefasst. Es wurde von den Ergebnissen, Mittelwerte und Standardabweichung berechnet.

Tabelle 3: Messungen von Methoxychlor mit vier verschiedenen Probenmatrizen mit und ohne S9

Probe	Datum	S9	Nr.	I _{max} (%)**	EC50
MC + Probe PP (310)	13.05.2016	-		97	2,5 µM
MC + Probe PP (310)	19.05.2016	-		139	6,4 µM
		Mittelwert		118%	4,5 µM
		RSD		25%	61%
MC + Probe PP (310)	13.05.2016	+S9		67	0,28 µM
MC + Probe PP (310)	19.05.2016	+S9	I.	98	0,31 µM
MC + Probe PP (310)	19.05.2016	+S9	II.	70	0,34 µM
		Mittelwert		78%	0,31 µM
		RSD		22%	10%
MC + Probe GVK (314)	13.05.2016	-		132	3,3 µM
MC + Probe GVK (314)	13.05.2016	+S9		45	0,30 µM
MC + Probe Alu (354)	13.05.2016	-		N.A.	N.A.
MC + Probe Alu (354)	19.05.2016	-		N.A.	N.A.
MC + Probe Alu (354)	13.05.2016	+S9		56	0,56 µM
MC + Probe Alu (354)	19.05.2016	+S9	I.	135	0,32 µM
MC + Probe Alu (354)	19.05.2016	+S9	II.	62	0,30 µM
MC + Probe Alu (354)	19.05.2016	+S9	III.	59	0,33 µM
		Mittelwert		78%	0,40 µM
		RSD		49%	34%
MC + Probe Papier (355)	13.05.2016	-		80	2,6 µM
MC + Probe Papier (355)	19.05.2016	-		159	5,7 µM
		Mittelwert		120%	4,15 µM
		RSD		47%	53%
MC + Probe Papier (355)	13.05.2016	+S9		71	0,46
MC + Probe Papier (355)	19.05.2016	+S9	I.	102	0,50
MC + Probe Papier (355)	19.05.2016	+S9	II.	158	2,24
		Mittelwert		110%	1,35 µM
		RSD		40%	93%

4.4.1 Methoxychlor mit Probenmatrix PP

Die Resultate sind als Graphen in Abbildung 13 ersichtlich.

ER α CALUX: Methoxychlor mit Probenmatrix PP und S9

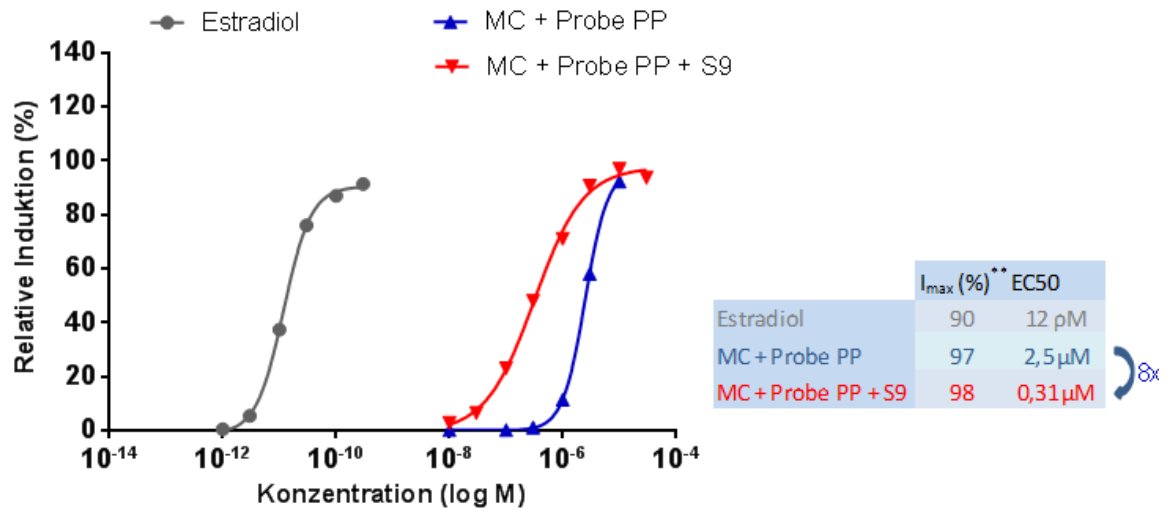


Abbildung 13: Vergleich Methoxychlor mit Probenmatrix PP $\pm$ S9

PP weist weder für sich alleine noch mit Zugabe von S9 eine Auswirkung auf die Östrogenaktivität von MC auf. Die Differenz der EC₅₀ – Werte ist in der oben dargestellten Abbildung 8-fach und befindet sich somit im Normbereich.

4.4.2 Methoxychlor mit Probenmatrix GVK

Die Resultate sind als Graphen in Abbildung 14 ersichtlich.

ER α CALUX: Methoxychlor mit Probenmatrix GVK und S9

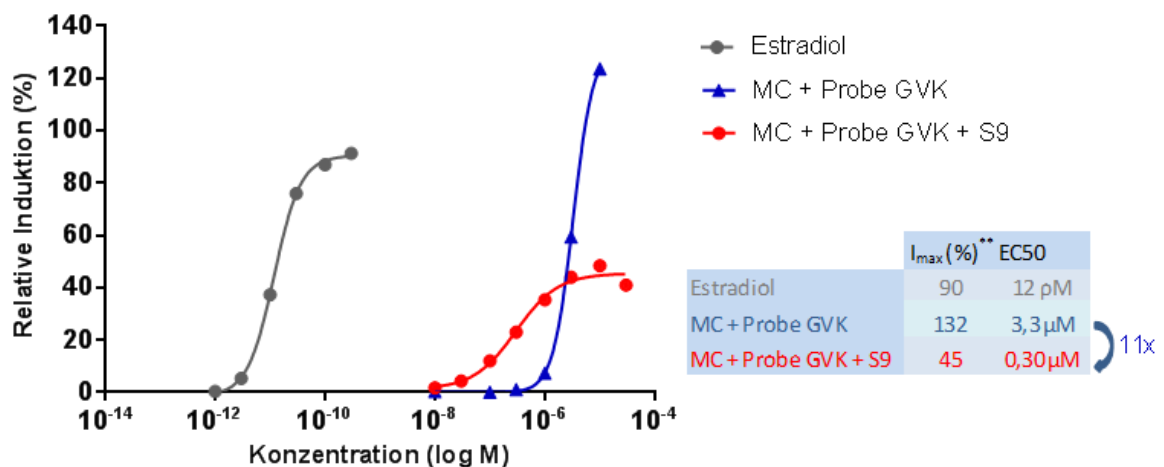


Abbildung 14: Vergleich Methoxychlor mit Probenmatrix GVK $\pm$ S9

Auch die Messungen mit GVK legen ein gleichwertiges Resultat dar wie die Messungen von MC ohne GVK (siehe Tabelle 1). GVK scheint damit keinen Einfluss auf die Hormonaktivität von MC zu nehmen. Der EC_{50} liegt für MC im Normalbereich. Die maximale Intensität differiert allerdings trotz Messungen am selben Tag, um das 3-fache, welches für MC auch bei bekannter hoher Schwankungsbreite unüblich hoch ist.

4.4.3 Methoxychlor mit Probenmatrix beschichtetes Aluminium

Die Resultate sind als Graphen in Abbildung 15 ersichtlich.

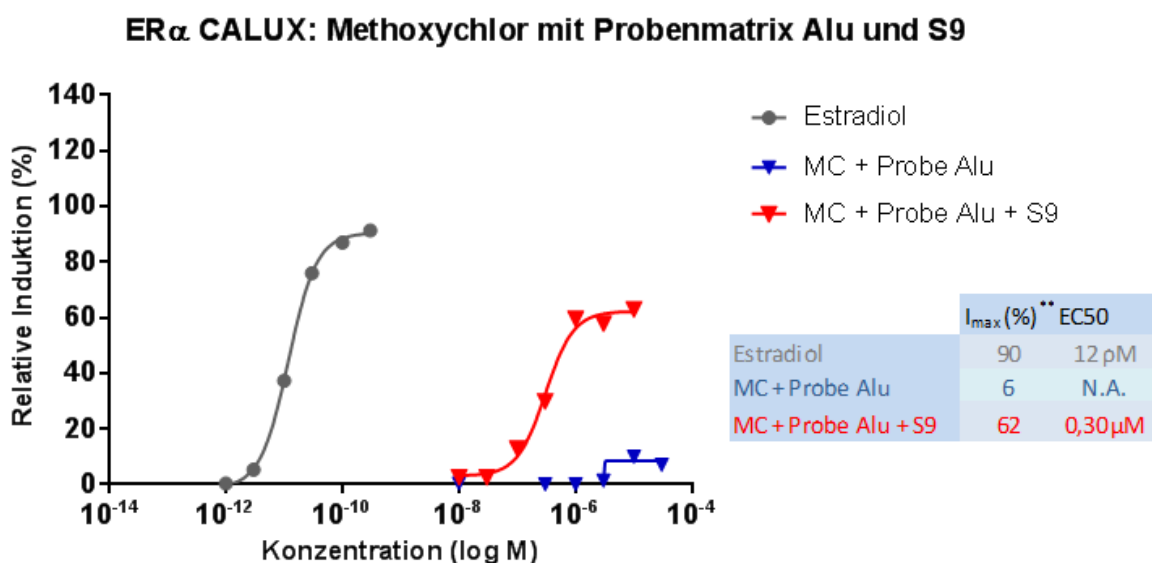


Abbildung 15: Vergleich Methoxychlor mit Probenmatrix beschichtetes Alu $\pm$ S9

Die Ergebnisse für beschichtetes Alu als Probenmatrix sind hoch interessant, da die Alu Probe auf MC einen zytotoxischen Effekt auszuüben scheint. Schon vor der Messung, war im Mikroskop deutlich erkennbar, dass die Versuchszellen nach 24h Einwirkzeit von Alu, lose im Medium schweben und eine abgerundete Struktur aufweisen. In Folge dessen war das in Abbildung 15 abgebildete Resultat von MC+Probe Alu ohne S9 mit einer deutlich abflachenden Kurve und einer maximalen Intensität von nur 6% zu erwarten. Der EC_{50} war hier nicht auswertbar. Für MC mit Alu und S9-Mix konnte man allerdings bei der Kontrolle im Mikroskop vor der Messung durch den Luminometer eine normale Zellstruktur mit schönen und dicht anhaftenden Zellen beobachten. Auch der Graph zeigt, dass die Zellen eine für MC normale Aktivität aufweisen. Dieses Resultat wurde durch eine zweite Messung an einem weiteren Tag (siehe Tabelle 3) bestätigt.

4.4.4 Methoxychlor mit Probenmatrix Papier

Bei der Dreifachmessung für Papier als Probenmatrix konnte zwei Mal ein für MC im Normalbereich liegendes Ergebnis festgestellt werden.

Die Resultate einer dieser Messung sind als Graphen in Abbildung 16 ersichtlich. Bei der dritten, in Tabelle 3 gelisteten abweichenden Messung, wird ein systematischer Fehler vermutet.

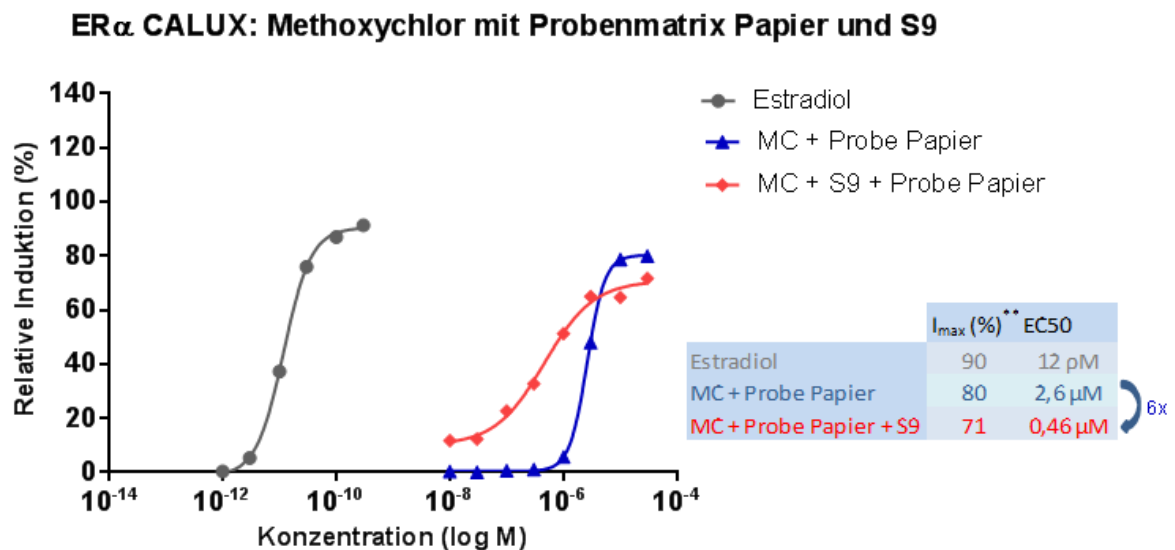


Abbildung 16: Vergleich Methoxychlor mit Probenmatrix Papier $\pm$ S9

Das oben dargestellte Ergebnis zeigt möglicherweise eine Auswirkung von Papier auf die Östrogenaktivität von MC. Obwohl die EC₅₀-Werte und die maximale Induktionen keine Abweichungen zu den üblichen Werten von MC zeigen, wurde der „bottom“-Wert, also der niedrigste Wert der Messung, durch die Metabolisierung von 0 auf 10 verschoben.

5 Interpretation

Für die Biodetektion von endokrin aktiven Substanzen werden in vitro Assays herangezogen. Diese sind allerdings nicht im Stande die Biotransformation der Testsubstanzen zu berücksichtigen. Da aber bekannt ist, dass mehrere Substanzen (z.B. Methoxychlor (MC)) erst durch den Phase I Metabolismus hormonaktiv werden, ist es möglich, dass die Auswirkungen von EAS derzeit nicht ausreichend erfasst werden. Eine mögliche Lösung für ein neues Testsystem, in welchem sowohl die Biodetektion von EAS als auch der Metabolismus durch Phase I Enzyme gescreent werden kann, ist die Inkorporation von Rattenleber S9 in den CALUX-Assay. Methoxychlor wird als Modellsubstanz herangezogen. Aus früheren Verfahren z.B. dem Ratten uterotrophen Assay, ist bekannt, dass das MC durch CYP vermittelte Aktivierung eine erhöhte Östrogenaktivität zeigt (Ayoma and Chapin, 2013).

Als Anfangstest wurde eine Metabolisierung im CALUX-Assay an der β -Estradiol Standardreihe durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eindeutig keinen Effekt der Metabolisierung auf diese Standardreihe und bestätigte Literaturergebnisse, wonach E2 nicht durch Phase I Enzyme metabolisiert wird sondern erst durch Phase II Konjugation (Raftogianis et al., 2000). Für die Verifizierung der Funktion der Metabolisierung in diesem Versuch, wurde MC als Positivkontrolle mitgetestet.

In darauf folgenden Arbeitsschritten konnte mit MC als Modellsubstanz, der metabolisierungsintegrierter CALUX-Assay eindeutig belegen, dass induzierte S9 Leberenzyme aus der Ratte die östrogene Aktivität von MC beträchtlich erhöhen. Die Divergenz der EC_{50} Werte zwischen der Substanz MC und seines Metaboliten MC+S9 liegt konstant in einer vollständigen Zehnerpotenz mit einer durchschnittlichen metabolischen Aktivierung von 10. Die Werte der relativen Standardabweichung (RSD) der I_{max} erscheinen betreffend der Reproduzierbarkeit hoch. Dies wird akzeptiert da die Experimente an Zellen und somit lebenden Organismen durchgeführt wurden und deshalb von einer durch unterschiedlichen Umwelteinflüssen gegebenen natürlichen Dynamik ausgegangen werden kann.

Die Messwerte der EC_{50} liegen alle innerhalb einer logarithmischen Stufe im Bereich von 0,1 μ M bis 1 μ M und zeigen somit eine hervorragende Reproduzierbarkeit. Die Ergebnisse wurden unter gleichen Bedingungen insgesamt 13 Mal auch an unterschiedlichen Tagen,

von unterschiedlichen Personen und in stetiger Kooperation mit den Labors von Nestle Research Center (NRC) und Biodetection Systems (BDS) bestätigt und in einem gemeinsamen Paper von NRC veröffentlicht (Mollergues et al. 2016).

Über alle an unterschiedlichen Tagen durchgeführten Versuche ist jedoch zu bemerken, dass in der relativen Induktion (die der Anregungspotenz der Luciferase Aktivität der U2OS Zellen zuzuschreiben ist) eine besonders hohe Schwankungsbreite zu beobachten ist. Allerdings scheint dies keinesfalls Einfluss auf die Potenz der Aktivierung, respektive den Shift der EC_{50} -Werte zu nehmen. Da diese Unterschiede in der maximalen Intensität an Versuchen, welche am selben Tag mit gemeinsam aufbereiteten Zellen durchgeführt wurden, nicht beobachtet werden kann, muss man diese wahrscheinlich als Schwankungen von Umwelteinflüssen, welche durch den normalen Zellkultur -Laborbetrieb auftreten hinnehmen.

Während der Verzicht auf Koenzyme eine deutlich negative Auswirkung auf die Messergebnisse (sowohl auf die EC_{50} -Werte als auch auf die maximale Induktion) hatte, zeigte bei Versuchen an zwei unterschiedlichen Tagen die Absenz von $MgCl_2$ im Prokoll des herkömmlichen S9-Mix eine doppelte Steigerung der maximalen Intensität als in parallel durchgeführten Vergleichstests mit $MgCl_2$ im S9-Mix. Die genauen Werte waren allerdings wiederum von Versuchstag zu Versuchstag unterschiedlich hoch. Die Ursache für die Schwankungsbreite der maximalen Intensität konnte daher auch durch die Erkenntnis, dass $MgCl_2$ wahrscheinlich einen negativen bzw. cytotoxischen Effekt auf das Metabolisierungssystem ausübt, nicht aufgeklärt werden. Da mikroskopische Begutachtungen nach 24h Einwirkzeit keine auffälligen Resultate zeigten, sollte dieser Effekt weiter beobachtet werden.

Es kamen während dieser Masterarbeit S9 Enzyme zur Verwendung, welche entweder durch mit β NF/PB oder Aroclor 1254 Vorfütterung der Spenderratte induziert wurden. Von beiden S9 Variationen wurden drei unterschiedliche Chargennummern getestet.

Obwohl die CYP Induktion laut Literatur verschieden ist, konnte zwischen den Testergebnissen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Aroclor 1254 bestehend aus einer Mischung von Polychlorobiphenylen (PCBs) induziert in Ratten CYPs 1A1/2, 2B1/2 und 2C6 (Ku et al. 2007). Dieselben CYPs werden auch durch die Kombination von β -Naphthoflavon und Phenobarbital induziert, allerdings ist Phenobarbital zusätzlich ein mäßiger „Inducer“ von 3A1/2 in Ratten (Klaassen, 2013).

Weil daher insgesamt die Induktion durch β NF/PB das Erfassen des breiteren Spektrums an CYPs ermöglicht, wurden für alle darauffolgenden Versuche β NF/PB induzierte S9 Enzyme eingesetzt. Obwohl somit beachtlich viele CYPs durch die Leber-S9 zur metabolischen Aktivität kommen und insgesamt ein maximal großes Potential zur Detektion von hormoneller Zu- oder Abnahme der agonistischen Aktivität kommt, kann dennoch nicht die Gesamtheit aller CYPs gleichermaßen durch β NF/PB induziert werden.

Aus diesem Grund ist es theoretisch möglich, dass die metabolische Aktivierung jener EAS, deren Bioaktivierung spezifischere CYPs benötigt, nicht in diesem Assay erfasst werden kann.

Basierend auf all diesen Vorversuchen, zeigt sich die Inkorporation von S9 in die Biodetektion von EAS als vorteilhaftig mit dem CALUX Bioassay und als eine robuste Methode zur Phase I Metabolisierung. Die Resultate legen nahe, dass eine Vernachlässigung der Rolle der Metabolisierung in der Detektion von endokriner Aktivität von Substanzen ggf. aus Lebensmittelkontaktmaterialien, zu einer Unterschätzung seiner endokrinen Aktivität führen kann.

Weitere Versuche mit Reinsubstanzen und deren Metaboliten ergaben, dass die Metabolisierung einer Substanz durch S9 Leberenzyme nicht immer eine Veränderung in der Östrogenaktivität bewirkt. Am Beispiel von drei Reinsubstanzen, nämlich HPTE, BP und DPP ist ersichtlich, dass sich die Bindungsaffinität der Metaboliten von der Bindungsaffinität der nicht metabolisierten Substanzen an die Östrogenrezeptoren nicht unterscheidet. Dies lässt vermuten, dass entweder die Reinsubstanz nicht metabolisiert wird, oder die Metaboliten insgesamt eine Östrogenaktivität wie die Reinsubstanzen selbst aufweisen, oder beides. Dies müsste allerdings durch die Aufschlüsselung der Strukturen analytisch-chemisch genauer untersucht werden, bevor eine Aussage getroffen werden kann.

Die Differenz der metabolischen Aktivierung zwischen MC+S9 und HPTE ist 3-fach und lässt somit deutlich erkennen, dass die Biotransformation von MC zu seinem bedeutendsten Metabolit HPTE durch S9 nicht vollständig abläuft.

Es ist wahrscheinlich, dass die Enzymkinetik und die Stabilität der Metaboliten in höchstem Maß ausschlaggebend für die Formung des Endmetabolits sind. In jenen 24h in welchen das Metabolisierungssystem Kontaktzeit mit dem Substrat hat, können theoretisch verschiedenste enzymatische Reaktionen stattfinden, welche zur Erzeugung von

Metaboliten aller Art mit verschiedenst wirkenden Eigenschaften auf die Nukleare Rezeptoren führen können.

Durch den Test von unterschiedlichen Probenmatrizen auf ihre Auswirkung auf MC während der Verstoffwechselung durch S9, konnten weitere neue Erkenntnisse gewonnen werden. Während die Proben *PP*, *GVK* und aller Wahrscheinlichkeit nach auch *Papier* (ein weiterer Versuch sollte hier aufgrund eines systematischen Fehlers bei einem Test in der Dreifachbestimmung durchgeführt werden) keinen Einfluss auf die Östrogenaktivität von MC auszuüben scheinen, zeigt der Versuch mit der Probe *beschichtetes Alu* eine entgiftende Wirkung auf die Zellen.

Bei einer Dreifachbestimmung ist deutlich, dass wenn die *beschichtete Alu-Probe* auf die Zellen ohne ein Metabolisierungssystem aufgetragen wird, nach spätestens 24h durch cytotoxische Effekte nur mehr eine maximale Induktion von 6% gemessen werden kann. Wenn allerdings parallel ein Versuch mit der Zugabe von S9 durchgeführt wird, kann nach 24h noch immer eine durchschnittliche maximale Induktion von 78% gemessen werden. Dies führt klar eine positive Biotransformation der für die Zellen giftigen *beschichteten Alu Probe* vor Augen, welche für die Zellen so effektiv ist, dass die Cytotoxizität entweder zum größten Teil oder sogar völlig verhindert wird.

Es ist wichtig zu erwähnen, dass die Verstoffwechselung ausschließlich mit Enzymen von Versuchstieren die der Ordnung der Nagetiere angehören erfolgt. Da sich die Grundfunktion der Leber in diesen Tieren von der der Menschen unterscheidet, kann man eventuell nur lückenhaft auf den humanen Organismus aussagekräftige Schlussfolgerungen aus singulären Tests mit S9-Leber der Ratte ziehen. In vitro Studien gehen davon aus, dass der Metabolismus von Xenobiotika im Mensch zu ca. 50% durch die CYP3A4 vermittelte Oxidation abläuft (Zhou et al., 2009). In der induzierten S9 der Ratte werden statt diesen jedoch nur CYP3A1/2 generiert (Ku et al., 2007).

Es ist außerdem wichtig für alle Fälle hervorzuheben, dass mit der in dieser Masterarbeit behandelten Methode des integrierten Systems einer Metabolisierung in den CALUX Assay nur Cytochrom P450 Phase I enzymatische Aktivität bemessen werden kann. Die Rolle der Phase II Konjugationsreaktionen, welche für gewöhnlich endokrine Aktivität herabsetzen, wird mit den Ratten Leber Enzymen des S9 außer Acht gelassen (Norris et Carr, 2005).

Aus ethischer Betrachtung wäre wohl nachhaltiger eine Möglichkeit der Metabolisierung ohne Versuchstiere zu finden, aber für den derzeitigen Stand der Forschung ist die in dieser

Masterarbeit getestete Methode des in den CALUX-Assay integrierten S9 Metabolisierungsystems die best mögliche Annäherung um die Auswirkung der Oxidativen Metabolisierung auf die Hormonaktivität von Lebensmittelverpackungsmigraten zu erfahren.

Durch die neuen Erkenntnisse über diese Methode, wird es in Zukunft möglich sein, ein Augenmerk auf jene Substanzen zu richten, welche bis jetzt als harmlos galten und nun durch erfolgreiche Integration von S9 Metabolismus in den CALUX Test in den Focus weiterer Untersuchungen gerückt werden.

6 Literaturverzeichnis

Adlercreutz (1995). Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ Health Perspect.* 1995 Oct; 103(Suppl 7): 103–112.

Bund für Lebensmittelrecht und Lebensmittelkunde (2010). Spezifikation in der Lebensmittelverpackungskette. From: <https://www.bll.de/de/lebensmittel/verpackung>

Alberts et al. (2007). *Molecular Biology of the Cell*. 5.Auflage, New York: Garland Science ISBN:978-0815341062.

Aoyama & Chapin (2014). Reproductive toxicities of methoxychlor based on estrogenic properties of the compound and its estrogenic metabolite, hydroxyphenyltrichloroethane. *Vitam Horm* 94, 193-210, 10.1016/B978-0-12-800095-3.00007-9.

Barrett (1996). Phytoestrogens. Friends or foes? *Environ Health Perspect.* 104(5): 478–482.

Bergman et al. (2013). State of the science of endocrine disrupting chemicals 2012. United Nations Environment Programme (UNEP) & World Health Organisation (WHO), ISBN 978-92-807-3274-0.

Bund der Verpackungsingenieure (2014). Wissenswertes zum Thema Migration. Vortragsfolien EasyFairs. From: <http://www.bdvi.org/fileadmin/pool/Vortraege/Wissenswertes%20zum%20Thema%20Migration.pdf>

Castell et al. (2006). Hepatocyte cell lines: their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.* 2006 Apr;2(2):183-212.

Cederroth et al. (2009). Soy, phyto-oestrogens and male reproductive function: a review. *Int J Androl.* 33(2):304-16.

Coecke et al. (2001). The use of genetically engineered cells for assessing CYP2D6-related polymorphic effects. *Toxicology in Vitro* 15, 553-556.

Coecke et al. (2006). Metabolism: a bottleneck in in vitro toxicological test development. The report and recommendations of ECVAM workshop 54. *Altern Lab Anim.* 34(1):49-84.

Combes (2000). The use of structure-activity relationships and markers of cell toxicity to detect non-genotoxic carcinogens. *Toxicology In Vitro* 14,387-399

Coon et al. (1992). Cytochrom P450: progress and predictions. *FASEB J.* 6(2):669-73.

Cronin (2001). Computational methods for the prediction of drug toxicity. *Current opinion in drug discovery and development* 3, 292-297.

Dahlman-Wright et al. (2006). International Union of Pharmacology. LXIV. Estrogen receptors. *Pharmacol Rev.* 58(4):773-81.

Dearden (1997). The development and validation of expert systems for predicting toxicity. The report and recommendation of an ECVAM/ECB workshop (ECVAM workshop 24). ATLA 25, 223-252.

Diamanti-Kandarakis et al. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: an endocrine society scientific statement. Endocrine Reviews, 30(4):293-342

Doehmer (1993). V79 Chinese hamster cells genetically engineered for cytochrome P450 and their use in mutagenicity and metabolism studies. Toxicology 82, 105-118.

Dohmen, K. (1995). Hormone. Köln, Aulis-Verl. Deubner ISBN: 9783761416310.

Donato et al. (2008). Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. Curr Drug Metab. 9(1):1-11.

Donato et al. (2013). Hepatic cell lines for drug hepatotoxicity testing: limitations and strategies to upgrade their metabolic competence by gene engineering. Curr Drug Metab. 2013 Nov;14(9):946-68.

EEA (2012). The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments. EEA Technical report No 2/2012, ISSN 1725-2237

Eintrag zu Benzophenon in Römp online. Thieme Verlag, abgerufen am 20. November 2016

Eintrag auf homepage von United States Environmental Protection Agency (EPA) (2016). What is the ToxCast Dashboard? <https://www.epa.gov/chemical-research/toxicity-forecasting> abgerufen am 5. Jänner 2017 (last updated: Dezember 2016)

EFSA (2016). Endokrin active Substanzen. Abgerufen am 15. Okt. 2016: <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/eas.html>

Elliott et al. (1992). Alternatives to Aroclor 1254-induced S9 in in vitro genotoxicity assays. Mutagenesis. 1992 May;7(3):175-7.

EMC (2016). Fachinformation eines Ethinylestradiol-Monopräparats. Abgerufen am 15. Okt. 2016: www.medicines.org.uk/emc/medicine/16780 (last updated: 12. Jul. 2016)

European Parliament (2013). Report on the protection of public health from endocrine disrupters. 2012/2066(INI) Abgerufen am 15. Okt. 2016: <http://www.europarl.europa.eu/sides/getDoc.do?pubRef=-//EP//TEXT+REPORT+A7-2013-0027+0+DOC+XML+V0//EN>

Fang et al. (2000). Quantitative comparison of in vitro assays for estrogenic activities. *Environ Health Perspect* 108(8): 723-729.

Food and Drug Administration (1997). Guidance for industry, Drug metabolism/ drug interaction studies in the drug development process: studies in vitro. From: <http://www.fda.gov/downloads/drugs/guidancecomplianceregulatoryinformation/guidances/ucm292362.pdf>

Friedberg et al. (1999). Merits and limitations of recombinant models for the study of human P450-mediated drug metabolism and toxicity: an intralaboratory comparison. *Drug Metab Rev* 31, 523-544.

Gaido et al. (2000). Interaction of methoxychlor and related compounds with estrogen receptor alpha and beta, and androgen receptor: structure-activity studies. *Mol Pharmacol* 58(4), 852-8.

Garcia et al. (1999). Alternatives in the induction and preparation of phenobarbital/naphthoflavone-induced S9 and their activation profiles. *Mutagenesis*. 1999 May;14(3):323-6.

Grininger, A. (2013). Validierung und Vergleich zweier in-vitro Reporterassays zur Bestimmung von Androgenagonisten & Androgenantagonisten in Migraten von Lebensmittelkontaktmaterialien. Diplomarbeit der Universität für Bodenkultur Wien.

Guengerich (1991). Reactions and significance of cytochrome P-450 enzymes. In: *J. Biol. Chem.* 266, Nr. 16, Juni 1991, S. 10019–22.

Harper et al. (2013). *Physiologische Chemie: Eine Einführung in die medizinische Biochemie für Studierende der Medizin und Ärzte*. Springer-Verlag ISBN 3662097664, 9783662097663.

Hasler (1999). Human Cytochromes P450. In: *Mol. Aspects Med.* 20, 1999, S. 1–137. doi:10.1016/S0098-2997(99)00005-9

Hong et al. (2002). Prediction of estrogen receptor binding for 58,000 chemicals using an integrated system of a tree-based model with structural alerts. *Environ Health Perspect.* 110(1):29-36.

Hock, B. and Rothe, S. (2000), Hormone in der Umwelt-die Tests im Überblick. *Nachr. Chem.*, 48: 918–924. doi:10.1002/nadc.20000480709

Horn (2012). *Biochemie des Menschen. Das Lehrbuch für das Medizinstudium*. 5. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart. DOI: 10.1055/b-002-10324

Hu and Kupfer (2002). Metabolism of the endocrine disruptor pesticide-methoxychlor by human P450s: pathways involving a novel catechol metabolite. *Drug Metab Dispos.* 30(9):1035-42.

Jacobs et al. (2013). In vitro metabolism and bioavailability tests for endocrine active substances: what is needed next for regulatory purposes. *Altex*, 30(3), 331-351.

Kase et al. (2009). Identifikation geeigneter Nachweismöglichkeiten von hormonaktiven und reproduktionstoxischen Wirkungen in aquatischen Ökosystemen. *Environmental Sciences Europe* 21:72

Kaßmann (2011). Grundlagen der Verpackung: Leitfaden für die fächerübergreifende Verpackungsausbildung. Beuth Verlag ISBN: 3410204938, 9783410204930

Katzenellenbogen, et al. (2000). Molecular mechanisms of estrogen action: selective ligands and receptor pharmacology. *J Steroid Biochem Mol Biol.*, 74(5), 279-285.

Kitamura et al. (2003). Estrogenic activity of styrene oligomers after metabolic activation by rat liver microsomes. *Environ Health Perspect.* 111(3):329-34.

Kitamura et al. (2004). Comparative Study of the Endocrine-Disrupting Activity of Bisphenol A and 19 Related Compounds. *Toxicological Science*, 84(2), 249-259.

Königshoff & Brandenburger (2012). Kurzlehrbuch der Biochemie 3. Auflage. Thieme Verlag

Ku et al. (2007). Strategy for genotoxicity testing- metabolic considerations. *Mutat Res* 627(1), 59-77, 10.1016/j.mrgentox.2006.10.004

Kuiper et al. (1996). Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*. 138(3):863-70.

Langguth (2012). Biopharmazie. John Wiley & Sons, 2012, ISBN 978-3-527-66263-0

Legler et al. (2002). Comparison of in vivo and in vitro reporter gene assays for short-term screening of estrogenic activity. *Environ Sci Technol.* 2002 Oct 15;36(20):4410-5

Leung (1989). Gynecomastia. *Am Fam Physician.* 39(4):215-22.

Lewis et al. (1998). An improved and updated version of the compact procedure for the evaluation of the P450-mediated chemical activation. *Drug Metabolism Reviews* 30, 709-737.

Lintelmann et al. (2003). Endocrine disruptors in the environment. *Pure Appl. Chem.* 75(5): 631-681.

Leusch et al. (2009). Balancing the budget of environmental estrogen exposure: The contribution recycled water. *Water Science & Technology* 60(4):1003-1012.

Macé et al. (1997). Drug metabolism and carcinogen activation studies with human genetically engineered cells. In: J.V. Castell & M.J. Gómez-Lechón (Eds.), *In vitro Methods in Pharmaceutical Research*, Academic Press, London, pp. 433-456.

Mekenyan et al. (2004a). A systems approach to simulating metabolism in computational toxicology. I. The Times Heuristic Modelling Framework. *Current Pharmaceutical Design* 10 (11), 1273-1293.

Mekenyan et al. (2004b). Identification of the structural requirements for mutagenicity, by incorporating molecular flexibility and metabolic activation of chemicals I. TA100 model. *Chem. Res. Toxicol.* 17(6):753-766

Mertl (2010). Einsatz verschiedener Bio-Assays zur Detektion von endokrinen Disruptoren in Kunststoffverpackungen. Diplomarbeit Institut für Angewandte Genetik und Zellbiologie (IAGZ), BOKU-Universität für Bodenkultur, pp 61

Mollergues et al. (2016). Incorporation of a metabolizing system in biodegradation assays for endocrine active substances. *ALTEX*. Doi: 10.14573/altex. 1611021

Muncke, J. (2009). Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Science of The Total Environment*, 407(16), 4549-4559.

Muncke, J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: An updated review of exposure, effect and risk assessment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 118-127.

Nilsson et al. (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev*, 81(4), 1535-1565.

Norris et Carr (2005). *Endocrine Disruption: Biological bases for health effects in wildlife and human*. Oxford University Press 2005. ISBN: 019535026X, 9780195350265

Nussey & Whitehead (2001). *Endocrinology, an integrated approach*. Oxford: BIOS Scientific Publishers; ISBN-10: 1-85996-252-1.

OECD (2008). Detailed Review Paper: The use of metabolising systems for in vitro testing of endocrine disruptors, No. 97. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris

Parke et al. (1990). The safety evaluation of drugs and chemicals by the use of computer optimised molecular parametric analysis of chemical toxicity (COMPACT). *ATLA* 18, 91-102.

Parkinson et al. (2013). Biotransformation of Xenobiotics. In Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons (C. D. Klaassen, Ed.) Eds.) doi: 8th ed., pp. 185-366. McGraw-Hill Education, New York.

Raftogianis et al. (2000). Estrogen Metabolism by Conjugation. *J Natl Cancer Inst Monogr* (2000) 2000 (27): 113-124.

Reichel (2009). *Taschenatlas Toxikologie*, 3. Aufl., Thieme Verlag, Stuttgart, New York 2009, ISBN 978-3-13-108973-1

Reinen & Vermeulen (2015). Biotransformation of endocrine disrupting compounds by

selected phase I and phase II enzymes-formation of estrogenic and chemically reactive metabolites by cytochromes P450 and sulfotransferases. *Curr Med Chem* 22(4), 500-27.

Rodgers-Gray et al. (2000). Long-term temporal changes in the estrogenic composition of treated sewage effluent and its biological effects on fish. *Environ. Sci. Technol.* 34, 1521–1528.

Rousseau (2013). Fifty years ago: the quest for steroid hormone receptors. *Molecular and cellular endocrinology*, 375(1-2), 10-13.

Routledge & Sumpter (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15: 241-248.

Roy et al. (2009). Estrogen-like endocrine disrupting chemicals affecting puberty in humans--a review. *Med Sci Monit.* 15(6):RA137-45.

Sattelberger (2002). Hormonell wirksame Substanzen in der aquatischen Umwelt, Österr. UBA Monographie 161.

Schafer & Kegley (2002). Persistent toxic chemicals in the US food supply. *J Epidemiol Community Health.* 56(11):813-7.

Schultis & Metzger (2004). Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere* 57: 1649-1655.

Sekizawa (2008). Low-dose effects of bisphenol A: a serious threat to human health? *J Toxicol Sci.* 33(4):389-403

Sevrioukova & Poulos (2015). Anion-Dependent Stimulation of CYP3A4 Monooxygenase. *Biochemistry*, 54(26), pp 4083–4096.

Shelby et al. (1996). Assessing environmental chemicals for estrogenicity using a combination of in vitro and in vivo assays. *Environ Health Perspect* 104 (12), 1296-300

Siebert (2012). Prodrugs: Potente Metaboliten. *Pharmazeutische Zeitung online Ausgabe* 28/2012. From: <http://www.pharmazeutische-zeitung.de/index.php?id=42688>

Silva (2007). Activity of xenoestrogens at nanomolar concentrations in the E-Screen assay. *Environ Health Perspect.* 155 Suppl 1 (Activity of xenoestrogens in E-screen): 91-97.

Sonnenschein & Soto (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 65: 143-150.

Sonneveld, E., et al. (2005). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and estrogenic activities. *Toxicological sciences*, 89(1), 173-187.

Soto et al. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environmental Health Perspectives*, 103(Suppl 7), 113–122.

Stresser and Kupfer (1998). Human cytochrome P450-catalyzed conversion of the proestrogenic pesticide methoxychlor into an estrogen. Role of CYP2C19 and CYP1A2 in O-demethylation. *Drug Metab Dispos.* 26(9):868-74.

Stuchal et al. (2006). Demethylation of the Pesticide Methoxychlor in Liver and Intestine From Untreated, Methoxychlor-Treated, and 3-Methylcholanthrene-Treated Channel Catfish (*Ictalurus Punctatus*): Evidence for Roles of CYP1 and CYP3A Family Isozymes. *Drug Metab Dispos* 34 (6), 932-938.

Tacker, M. (2011). Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln und Verpackungen. *Ernährung/ Nutrition*, Volume 35, 7-8.

Tham et al. (1998). Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 83(7):2223-35.

Van der Burg , B., et al. (2010). Optimization and prevalidation of the in vitro ER α CALUX method to test estrogenic and antiestrogenic activity of compounds. *Reproductive Toxicology*, 30(1), 73-80.

Van der Linden et al. (2008). Detection of multiple hormonal activities in wastewater effluents and surface water, using a panel of steroid receptor CALUX bioassays. *Environ Sci Technol.* 2008 Aug 1;42(15):5814-20.

Vasudevan et al. (2013). *Textbook of Biochemistry for Medical Students* 7th Edition. JAYPEE Verlag

Vom Saal et al. (2007). Chapel hill bisphenol A expert panel consensus statement: integration of mechanisms, effects in animals and potential to impact human health at current levels of exposure. *Reprod Toxicol.* (2):131-8.

Walker JD. (1999). Past and future strategies for sorting and ranking chemicals: applications to the 1998 drinking water contaminations list chemicals. In: *Identifying future drinking water contaminants*. Washington, DC: National Academy Press, 1999;51-102.

WHO IPCS. (2002). Global assessment of the state-of-the-science of endocrine disruptors, Switzerland, WHO/PCS/EDC/02.2.

WHO (2009). International Program on Chemical Safety, Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. *Environmental Health Criteria*

WHO & UNEP (2013): *State of the science of endocrine disrupting chemicals – 2012*, ISBN 978-92-4-150503-1

Zhou et al. (2009). Polymorphism of human cytochrome P450 enzymes and its clinical

impact. Drug Metab Rev. 2009;41(2):89-295.