

Untersuchung endokriner Effekte von Benzophenon-2 und 17 β -Estradiol in estrogen-rezeptiven Organen

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultäten
der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

Christiane Schlecht
aus Blankenburg/Harz

Göttingen 2006

D 7

Referent: Prof. Dr. R. Hardeland

Korreferent: Prof. Dr. D. Doenecke

Tag der mündlichen Prüfung: 03.05.2006

Gewidmet meiner „Familie“

Abkürzungsverzeichnis

In dieser Arbeit wurden die internationalen SI-Einheiten und davon abgeleitete Einheiten mit SI-Präfixen verwendet.

3MC	3-Methylcholanthren
Abb.	Abbildung
AF-1	Liganden-unabhängige Transaktivierungsfunktion
AF-2	Liganden-abhängige Transaktivierungsfunktion
AhR	Arylhydrocarbon-Rezeptor
ANOVA	<i>analysis of variance</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BP	Benzophenon
BrdU	5-Bromo-2'-deoxyuridin
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytidin
C3	Komplement-Protein 3
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
cDNA	komplementäre DNA
CED	kritische Effekt-Dosis
CES	kritische Effekt-Größe
cpm	<i>counts per minute</i>
CREB	cAMP-responsives Element-bindendes Protein
CTP	Cytidintriphosphat
Da	Dalton
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DES	Diethylstilbestrol
dest	destilliert
DI/II	Typ I/II 5'-Deiodase
DMEM	<i>dulbecco's modified eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

DNase	Desoxyribonuklease
DPN	Diarylpropionitril, ER β -Agonist
E2	17 β -Estradiol
E2V	17 β -Estradiolvalerat
EAC	endokrin aktive Chemikalie
EC50	Konzentration, bei der die halbmaximale Wirkung erreicht wird
ECLIA	Elektrochemilumineszenz-Immunoassay
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Estrogen-Rezeptor
ERE	Estrogen-responsives Element
EROD	Ethoxyresorufin-O-deethylase
EtOH	Ethanol
FAM	6-Carboxy-fluorescein
FCS	fötale Kälberserum
FSH	follikelstimulierendes Hormon
ft3; ft4	freies T3, freies T4
G	Guanosin
GH	Wachstumshormon
GnRH	Gonadotropin-Releasing-Hormon
GTP	Guanosintriphosphat
HDL	<i>high density lipoprotein</i>
HE	Hämatoxylin-Eosin
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonat
HPG	Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
HPT	Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüse
HRE	Hormon-responsives Element
HRP	Meerrettichperoxidase
ICI 182,780; ICI	Estrogen-Rezeptor-Antagonist
Ig	Immunoglobulin
IGF-1	<i>insulin-like growth factor 1</i>

Abkürzungsverzeichnis

Kg	Körpergewicht
LDL	<i>low density lipoprotein</i>
LH	luteinisierendes Hormon
LOAEL	<i>lowest observed adverse effect level</i>
MAP	<i>mitogen activated protein</i>
MBH	mediobasaler Hypothalamus
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
MS	Massenspektrometrie
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid
N-CoR	<i>nuclear receptor corepressor</i>
NIS	Natrium/Iodid-Symporter
NOAEL	<i>no observed adverse effect level</i>
OD	optische Dichte
OECD	Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung
ovx	ovarietomiert
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PCB	polychlorierte Biphenyle
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration
PKM	Permanentkultur-Medium
PPT	Propylpyrazoltriol, ER α -Agonist
PRL	Prolaktin
PTU	6-n-Propyl-2-thiouracil
QSAR	Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung
RBA	Rezeptorbindungsassay
REA	Repressor der ER-Aktivität
RIA	Radioimmunoassay
RLB	Reporter-Lysis-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RT	reverse Transkription

Abkürzungsverzeichnis

RTD-PCR	<i>real time detection-PCR</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SERM	selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator
SHR	Steroidhormonrezeptoren
SMRT	<i>silencing mediator of retinoid and thyroid hormone receptor</i>
SRC	Steroid-Rezeptor-Koaktivator
Swi/Snf	Chromatin-remodulierender Komplex
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TAMRA	6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin
TERP-1	<i>truncated estrogen receptor product</i>
TPO	Schilddrüsenperoxidase
TRAP/DRIP	Mediator zwischen Hormon-Rezeptor und Transkriptionsapparat
TRH	TSH-Releasing-Hormon
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
TSH	Thyroidea-stimulierendes Hormon
UF	Unsicherheitsfaktor
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTP	Uridintriphosphat
UV	ultraviolett
Velc	Velcorin
z.B.	zum Beispiel

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	I
Inhaltsverzeichnis	V
1 Einleitung.....	1
1.1 Funktion von Hormonen.....	1
1.2 Steroidhormonrezeptoren (SHR).....	1
1.2.1 Aufbau von SHR.....	2
1.2.2 Funktionsweise von SHR.....	2
1.2.3 Estrogen-Rezeptoren.....	3
1.3 Einflüsse von endokrin aktiven Chemikalien auf das Hormonsystem	4
1.4 UV-Filter als endokrin aktive Chemikalien	6
1.5 OECD-Protokoll zur Identifikation von EACs.....	8
1.6 Ziel dieser Arbeit	8
1.6.1 <i>In vitro</i> -Methoden	9
1.6.2 <i>In vivo</i> -Tierversuche	11
1.6.3 Metabolismus und Kinetik von BP2	14
1.6.4 Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung für ausgewählte Parameter.....	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Testsubstanzen.....	15
2.2 Sonstige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien.....	16
2.3 Rezeptorbindungsassay	16
2.4 Zellkultur	17
2.4.1 Proliferationstest (BrdU-Assay, <i>E-screen</i>).....	18
2.4.2 Transaktivierungsassays	19
2.4.3 EROD-Assay	19
2.4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976).....	21
2.4.4 Hypothalamuszellkultur	21
2.4.4.1 Bestimmung von GnRH im Zellkulturüberstand	21
2.4.5 Hypophysenzellkultur	22
2.4.5.1 Vitalitätstest (MTT-Test).....	23
2.5 Tierversuche	24
2.5.1 Tierhaltung.....	24
2.5.2 Ovariectomie	24

Inhaltsverzeichnis

2.5.3	Obduktion	25
2.5.4	Subakute Applikation von BP2.....	25
2.5.4.1	Testsubstanzen und Dosierungen.....	25
2.5.4.2	Messparameter	26
2.5.5	Kinetikversuch	26
2.5.5.1	Jugularvenen-Katheter	27
2.5.5.2	Messparameter	27
2.6	Serum Analyse.....	28
2.6.1	Radioimmunoassay (RIA)	28
2.6.2	Metabolische Parameter.....	30
2.6.3	HPLC	30
2.6.3.1	Hydrolyse.....	30
2.6.3.2	Extraktion	30
2.6.3.3	HPLC-Geräte und Laufbedingungen	31
2.6.4	Massenspektrometrie (HPLC-MS)	32
2.6.4.1	Geräte und Laufbedingungen.....	32
2.7	Molekularbiologische Arbeiten	33
2.7.1	Arbeiten mit Nukleinsäuren.....	33
2.7.2	RNA-Extraktion.....	33
2.7.3	Konzentrationsbestimmung der RNA	34
2.7.4	Reverse Transkription (RT)	34
2.7.5	<i>Real time detection</i> -PCR (RTD-PCR)	35
2.7.6	Herstellung der Standardkurven.....	37
2.7.7	Herstellung des Cyp1a1-TaqMan™ -Systems	38
2.8	Proteinarbeiten.....	39
2.8.1	Analyse der Proteinexpression des Natrium/Iodid-Symporters	39
2.8.1.1	Proteinextraktion aus Schilddrüsen.....	39
2.8.1.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	40
2.8.1.3	Semi-Dry-Blot	41
2.8.1.4	Natrium/Jodid-Symporter (NIS)-Proteinexpression	41
2.8.2	Typ I/II 5'-Deiodase (5'DI/II)-Assay.....	42
2.8.2.1	Proteinextraktion.....	42
2.8.2.2	Assay.....	43
2.8.3	Schilddrüsenperoxidase-Assay	44
2.8.3.1	Proteinextraktion.....	44
2.8.3.2	Assay.....	44
2.9	Histologie	45
2.9.1	Probenvorbereitung.....	45

Inhaltsverzeichnis

2.9.2	HE-Färbung	46
2.9.3	Auswertungskriterien	46
2.10	Statistische Auswertung	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Rezeptorbindungsassay	49
3.2	Zellkultur	50
3.2.1	Proliferationstest mit MCF-7-Zellen (<i>E-Screen</i>)	50
3.2.2	Transaktivierungsassays	50
3.2.3	EROD-Assay	51
3.2.4	Hypothalamuszellkultur	52
3.2.5	Hypophysenzellkultur	52
3.2.5.1	Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Test	53
3.3	Subakute Applikation von BP2	54
3.3.1	Körpergewicht	54
3.3.2	Uterus	54
3.3.2.1	Uterusgewicht	54
3.3.2.2	Histologie	55
3.3.3	Serumanalyse	57
3.3.3.1	Serumkonzentration von Estradiol	57
3.3.3.2	Serumkonzentration von Benzophenon-2	57
3.3.3.3	Hypophysenhormone	62
3.3.3.4	Schilddrüsenhormone	63
3.3.3.5	Metabolische Parameter	64
3.3.4	Genexpressionsdaten	65
3.3.4.1	Hypothalamus	65
3.3.4.2	Hypophyse	66
3.3.4.3	Schilddrüse	68
3.3.4.4	Uterus	69
3.3.4.5	Leber	70
3.3.5	Proteinarbeiten	71
3.3.5.1	5'-Deiodase-Aktivität	71
3.3.5.2	Schilddrüsenperoxidase (TPO)-Aktivität	72
3.3.5.3	Natrium/Iodid-Symporter (NIS)-Expression	72
3.3.6	Dosis-Wirkungsbeziehungen	73
3.4	Kinetikversuch	75
4	Diskussion	76

4.1	Bestätigung der estrogenen Aktivität von BP2 durch <i>screening</i> -Methoden	76
4.2	Auswirkungen von BP2 <i>in vivo</i>	78
4.2.1	Auswirkungen von BP2 auf metabolische Parameter	78
4.2.2	Beeinflussung des ER α /ER β -Status durch BP2	79
4.2.3	Auswirkungen von BP2 auf die HPG-Achse	82
4.2.4	Auswirkungen von BP2 auf die HPT-Achse	86
4.3	Metabolisierung und Kinetik von BP2	90
4.4	Dosis-Wirkungsbeziehung und Risiko-Bewertung	93
5	Zusammenfassung	95
6	Literatur	97
7	Anhang	112
7.1	Primersequenzen.....	112

1 Einleitung

1.1 Funktion von Hormonen

Viele essentielle Funktionen des menschlichen Körpers werden durch Hormone gesteuert. Diese Botenstoffe sind unter anderem an der Regulation des Wachstums, der Reproduktion, des Stoffwechsels, des Elektrolyt- und Wasserhaushaltes und der Immunabwehr beteiligt. Aufgrund ihrer Struktur lassen sich Hormone in Aminosäurederivate (z.B. Thyroxin), Peptidhormone (z.B. Releasing-Hormone des Hypothalamus und stimulierende Hormone der Hypophyse) und Steroidhormone (z.B. Sexualhormone und Cortisol) einteilen.

Die Spezifität der Hormone wird dabei durch Rezeptoren gewährleistet, welche nach der Bindung des Hormons die Signale in der Zielzelle, zum Beispiel durch die Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden (hauptsächlich bei hydrophilen Hormonen) oder durch die Regulation der Transkription (hauptsächlich bei lipophilen Hormonen), weiterleiten.

1.2 Steroidhormonrezeptoren

Zusammen mit Schilddrüsen-, Retinolsäure- und Vitamin D-Rezeptoren und einer Reihe von Rezeptoren ohne bekannte physiologische Liganden (*Orphan*-Rezeptoren) werden Steroidhormonrezeptoren (SHR) zur Superfamilie der Kernrezeptoren gezählt. Alle Mitglieder dieser Superfamilie zeichnen sich durch eine gemeinsame Grundstruktur aus (Evans 1988; Giguere *et al.* 1988; Gronemeyer *et al.* 1995).

Steroidhormonrezeptoren umfassen neben den Estrogen- und Androgen-Rezeptoren auch die Progesteron-, Glukokortikoid- und Mineralokortikoid-Rezeptoren.

1.2.1 Aufbau von Steroidhormonrezeptoren

Steroidhormonrezeptoren sind modular aus mehreren Domänen aufgebaut (Beato *et al.* 1995). Diese Domänen haben bestimmte Funktionen und sind zwischen den einzelnen Rezeptoren teilweise hochkonserviert (siehe Abbildung 1-1).

N-terminal liegt die A/B-Domäne, welche die Liganden-unabhängige Transaktivierungsfunktion AF-1 enthält. Es folgt die DNA-bindende Domäne (C-Domäne), die Ligandenbindungsdomäne (E-Domäne) und c-terminal die Liganden-abhängige Transaktivierungsfunktion AF-2.

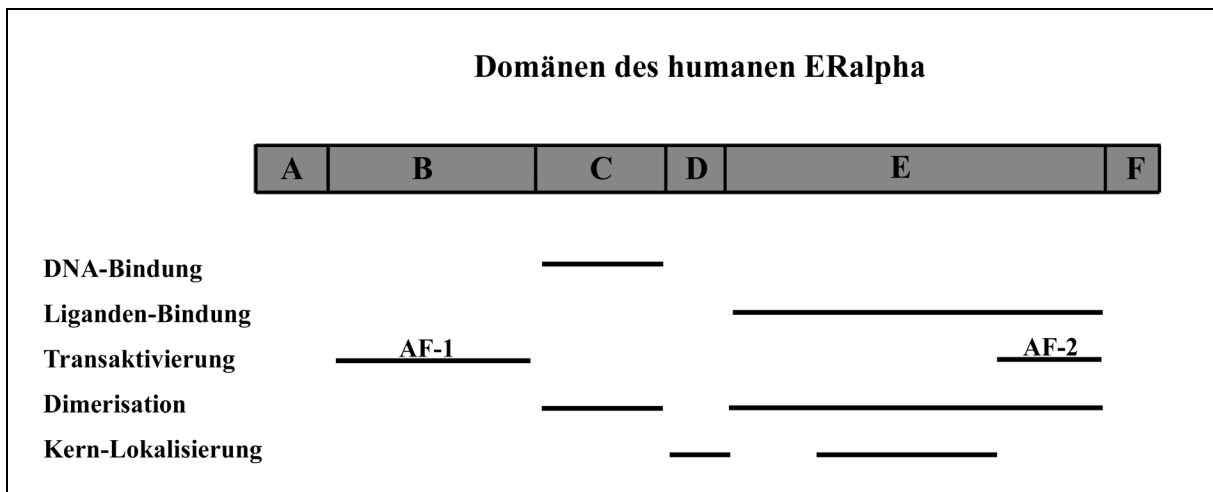


Abbildung 1-1: Aufbau und Funktionen der Domänen des humanen Estrogen-Rezeptor α . Modifiziert nach (Reid *et al.* 2002)

1.2.2 Funktionsweise von Steroidhormonrezeptoren

Die Rezeptoren liegen ohne Ligand in einem Komplex mit *Heat shock*-Proteinen vor (Landel *et al.* 1995). Durch die Bindung eines Liganden wird eine Konformationsänderung ausgelöst, welche dazu führt, dass die assoziierten Proteine den Komplex verlassen (Rachez *et al.* 2001). Durch die Konformationsänderung des Proteins werden außerdem die Dimerisation der Rezeptoren und die Bindung an das entsprechende Hormon-responsive Element (HRE) des Genes ermöglicht (Paech *et al.* 1997).

Das an die DNA gebundene Rezeptor-Dimer kann anschließend durch die Rekrutierung verschiedener Kofaktoren (z.B. Koaktivatoren wie SRC-1, SRC-2 und TRAP/DRIP, Korepressoren wie N-CoR oder SMRT [Nilsson *et al.* 2001] und Modulatoren der

Chromatinstruktur wie Swi/Snf [Collingwood *et al.* 1999]) die Transkription des Zielgens induzieren bzw. reprimieren. Die Rekrutierung der Kofaktoren ist dabei abhängig von dem gebundenen Liganden und der dadurch verursachten Konformationsänderung des Proteins, wobei die Position der Helix 12 (AF-2) den entscheidenden Ausschlag zwischen Induktion und Repression gibt (Brzozowski *et al.* 1997; Pike *et al.* 1999).

Neben der klassischen Transkriptionsregulierung wurden für Estrogene weitere mögliche Wirkmechanismen beschrieben. Dazu zählen zum Beispiel die Phosphorylierung von CREB (Zhou *et al.* 1996), die Aktivierung von MAP-Kinasen (Migliaccio *et al.* 1996), die Beeinflussung des cAMP- und Kalziumspiegels in der Zelle (Morley *et al.* 1992; Aronica *et al.* 1994; Collins *et al.* 1999), die Modifikation der DNA-Methylierung und die Modifikation der Aktivität von anderen Transkriptionsfaktoren. Diese schnellen, nicht-genomischen Effekte werden möglicherweise durch Estrogen-Rezeptoren in der Zellmembran vermittelt (Pappas *et al.* 1995; Collins *et al.* 1999).

1.2.3 Estrogen-Rezeptoren

Zu den SHR gehören die Estrogen-Rezeptoren (ER). 1986 wurde die Klonierung eines humanen Estrogen-Rezeptors (ER, später ER α) beschrieben (Green *et al.* 1986). Bis zur Entdeckung eines zweiten Estrogen-Rezeptors (ER β) 1996 in der Prostata und im Ovar von Ratten (Kuiper *et al.* 1996) ging man davon aus, dass nur ein Rezeptor die Hormonwirkung vermittelte.

Inzwischen sind zusätzlich von beiden Rezeptoren verschiedene Isoformen bekannt (Friend *et al.* 1995; Zhang *et al.* 1996; Chu *et al.* 1997; Leygue *et al.* 1998; Maruyama *et al.* 1998). Allerdings herrscht über deren Funktion noch Unklarheit. Es wird angenommen, dass diese Isoformen einen regulierenden Einfluss auf die Signaltransduktion der Estrogene haben (Murphy *et al.* 1998). Die ER α -Isoform TERP-1 stimuliert zum Beispiel die transkriptionelle Aktivität des ER α durch Titration des Repressorproteins REA (Lin *et al.* 2003). Beide ERs sind in der Lage Homodimere und auch Heterodimere mit einigen Isoformen zu bilden.

Über das Zusammenwirken der beiden Estrogen-Rezeptoren gibt es bislang keine gesicherten Erkenntnisse. Eine Möglichkeit stellt die „Yin/Yang“-Theorie dar, nach der ER β die durch ER α aktivierte Transkription moduliert oder in Geweben ohne ER α -Expression die Aufgaben von ER α übernimmt (Liu *et al.* 2002; Lindberg *et al.* 2003). Inzwischen wird zusätzlich davon ausgegangen, dass das Verhältnis der beiden Rezeptoren eine entscheidende Rolle bei

Umsetzung des Hormonsignals in Proliferation oder Differenzierung spielt. In HepG2-Zellen wurde nachgewiesen, dass für die Proliferation die Interaktion des Transkriptionsfaktors AF-1 mit ER α wichtig ist (Flouriot *et al.* 2000), außerdem konnte gezeigt werden, dass E2 in ER α -*knockout*-Mäusen keine Gewichtszunahme bzw. Proliferation des Uterus bewirken konnte (Couse *et al.* 1995). Andererseits konnte die durch Estrogen induzierte Differenzierung im murinen Ovidukt durch den E2-Antagonisten ICI 182,780 gehemmt werden (Okada *et al.* 2004), war aber in ER α -*knockout*-Mäusen trotzdem möglich, was auf eine Signaltransduktion unter Beteiligung von ER β schließen lässt.

1.3 Einflüsse von endokrin aktiven Chemikalien auf das Hormonsystem

Es ist bekannt, dass exogene, also körperfremde, Substanzen an vielen Punkten in die Regulationswege von Hormonregelkreisläufen eingreifen können (Degen *et al.* 1999). Zu diesen exogenen Substanzen gehören neben natürlich vorkommenden Substanzen wie z.B. Phyto- und Mykoestrogenen auch Xenobiotika. Diese Substanzen sind anthropogenen Ursprungs, wie zum Beispiel polychlorierte Biphenyle (PCB), und reichern sich teilweise aufgrund ihrer lipophilen Struktur und ihrer hohen Halbwertszeit in bestimmten Lebensräumen oder Geweben an (Cooke *et al.* 1982; Hooper *et al.* 1990). Man spricht bei diesen Substanzen von endokrin aktiven Chemikalien (EAC).

Es gibt vielfältige Möglichkeiten der Interaktion einer EAC mit einem Hormonsystem:

- Imitation der Wirkung eines hormonellen Agonisten bzw. Antagonisten. Dabei sind auch diverse Mischformen möglich (Landel *et al.* 1994).
- Hemmung der hormonellen Regulation durch Blockierung des Rezeptors, der Kofaktoren oder Bindestellen des Rezeptors. Auch die indirekte Induktion des Rezeptorabbaus durch Ubiquitinierung wurde beschrieben (Wormke *et al.* 2003).
- Modifikation von Produktion, Sekretion, Transport oder Metabolismus eines endogenen Hormons (Morinaga *et al.* 2004).

Mittlerweile umgibt sich der Mensch mit über 100.000 Chemikalien (Fent 2003), von denen viele noch nicht auf eine mögliche Toxizität und die meisten noch nicht auf eine mögliche endokrine Aktivität getestet wurden. Bei Vergleichen der strukturellen Eigenschaften von 58.000 Industriechemikalien mit den strukturellen Eigenschaften von ER-Liganden mittels des QSAR-Programms (Quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung) sind 6000 der

untersuchten Substanzen als mögliche ER-Liganden identifiziert worden (Hong *et al.* 2002) Dass diese Substanzen einen negativen Einfluss auf die menschliche Gesundheit haben könnten, wurde anhand mehrerer Kriterien diskutiert:

- **Spermienqualität:** In der Zeitspanne von 1938 bis 1990 wurde ein Rückgang der Spermienzahl pro ml um rund 50 % in westlichen Industrienationen beobachtet (Carlsen *et al.* 1992). Dieser Trend wurde inzwischen von mehreren Studien bestätigt (Auger *et al.* 1995; Swan *et al.* 1997; Swan *et al.* 2000). Außerdem konnte gezeigt werden, dass Söhne von Frauen, welche mit Diethylstilbestrol (DES) behandelt wurden, eine um etwa 1/3 reduzierte Spermiedichte aufwiesen (Bonde *et al.* 1998). DES ist ein starkes Estradiolanalogon, welches in den 50er bis 70er Jahren in den USA zur Prävention von Schwangerschaftsabbrüchen sowie als „Pille danach“ verschrieben wurde.
- **Hodenkarzinome:** Es konnte gezeigt werden, dass die pränatale Exposition gegenüber DES zu einem um den Faktor 2,6 erhöhten Risiko eines Hodenkarzinoms führt (Toppari *et al.* 1996).
- **Prostatakarzinome:** Das Risiko an Prostatakrebs zu erkranken, erhöhte sich signifikant bei Anwendern von hormonell wirksamen Pestiziden (Morrison *et al.* 1993; Keller-Byrne *et al.* 1997; Dich *et al.* 1998; Fleming *et al.* 1999; Parker *et al.* 1999). Es wurde außerdem ein Zusammenhang zwischen einem hohen Estrogenspiegel der Mutter während der Schwangerschaft und Prostataneoplasien bei männlichen Nachkommen vermutet (Santti *et al.* 1994).
- **Brustkrebs:** In den letzten Jahrzehnten wurde ein Anstieg der Inzidenz der Estrogensensiblen Tumore beobachtet. Es wird diskutiert, ob die Ursache in der Exposition gegenüber Xenobiotika wie zum Beispiel Dichlordiphenyltrichlorethan (DDT) liegt (Krieger *et al.* 1994; Hoyer *et al.* 1998; Dorgan *et al.* 1999; Laden *et al.* 2001).
- **Vaginalkarzinome:** In den 70er Jahren zeigten sich bei den Töchtern von mit DES behandelten Müttern Langzeitfolgen. Es konnte eine stark erhöhte Krebsinzidenz in der Vagina festgestellt werden (Herbst *et al.* 1971). Bei über 90 % der betroffenen Frauen entwickelten sich vaginale Fehlbildungen (Herbst 1987) und bei 0,1 % wurde eine sehr seltene Art von vaginalen Adenokarzinomen gefunden (Newbold 1995).

All diese Untersuchungen sind ein Indiz für die adverse Beeinflussung endokriner Systeme durch Xenobiotika, die eine weitere Untersuchung dieser Substanzen nötig machen, da die

genauen Ursachen und Mechanismen in den vielen Fällen noch nicht endgültig aufgeklärt werden konnten.

1.4 UV-Filter als endokrin aktive Chemikalien

Durch die zunehmende Sonnenexposition des Menschen kommt dem Schutz der Haut vor der kurzwelligeren UVA (320 – 400 nm)- und UVB (290 – 320 nm)-Strahlung des Sonnenlichtes eine immer größere Bedeutung zu.

Durch die energiereichere UVB-Strahlung wird die Melatoninbildung in den Melanocyten angeregt, wodurch einerseits die gewünschte Hautbräunung erreicht wird, andererseits ist UVB-Strahlung auch für Entzündungsreaktionen (Sonnenbrand, Photoallergien) verantwortlich. Zusammen mit UVA-Strahlung ist sie außerdem für die Hautalterung und die Entstehung von Tumoren durch Schädigung der DNA verantwortlich (Brash *et al.* 1991; Stege 2001) und wurde als karzinogen für den Menschen eingestuft (IARC 1992).

Um diesen Schäden vorzubeugen, werden unter anderem chemische UV-Filter eingesetzt, die in Sonnenlotionen und auch zunehmend in anderen Kosmetika wie Lippenstiften, Cremes und Haarpflegemitteln verwendet werden. Diese Substanzen ziehen im Gegensatz zu physikalischen UV-Filtern wie Titandioxid oder Zinkoxid in die Haut ein und absorbieren aufgrund ihrer kondensierten und häufig aromatischen π -Bindungssysteme die hochenergetische UV-Strahlung, um sie in Form von Wärme wieder abzugeben.

Eine Klasse der sehr heterogenen Gruppe der UV-Filter sind die Benzophenone. 12 Derivate der Grundstruktur Benzophenon (BP1 bis BP12) sind als UV-Filter im Gebrauch. Im europäischen Raum wird 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (BP2) zum Produktschutz Plastik- und Gummierzeugnissen beigelegt und darf im asiatischen Raum als UV Schutz mit bis zu 10% Gehalt benutzt werden. In Europa ist BP2 nicht auf der Positivliste für Sonnenschutzmittel (Council Directive 76/768/EEC) aufgeführt, darf aber in Kosmetika für den alleinigen Zweck des Produktschutzes beigelegt werden. Das kantonale Laboratorium Basel konnte in Aftershave bis zu 0,24 % BP2 feststellen (Bericht 58 vom 31.12.2003, erhältlich unter http://www.kantonslabor-bs.ch/infos_berichte.cfm).

Durch neuere Untersuchungen ist das vierfach hydroxylierte BP2 als mögliche EAC in Verdacht geraten. BP2 wurde positiv im ER α -Reporterassay sowie im uterotrophen Assay getestet (Yamasaki *et al.* 2003).

1. Einleitung

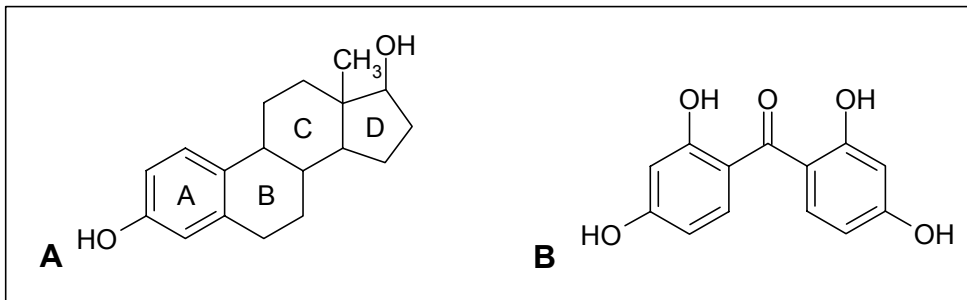


Abbildung 1-2: Strukturformeln von 17β-Estradiol (A) und Benzophenon-2 (B).

Untersuchungen der Kristallstruktur des Ligand-Rezeptor-Komplexes sowie Strukturvergleiche bekannter ER-Liganden haben eine Reihe von Merkmalen ergeben, die für eine Bindung an das aktive Zentrum der ERs von Bedeutung sind. Kernmerkmal ist eine 3'-Hydroxylgruppe an einem Phenylring, wie sie am A-Ring des 17β-Estradiol (E2) vorhanden ist. Eine sterische Behinderung an der *ortho*-Position verhindert häufig eine Interaktion. Des Weiteren weisen Liganden ein Hydroxylanalogon zur 17β-Hydroxylgruppe des E2 auf. Die Bindetasche des ER lässt nur Liganden mit einer zu E2 vergleichbaren Größe zu (Anstead *et al.* 1997). Die beiden Hydroxylgruppen sind durch Bildung von Wasserstoffbrücken für die Bindung und das Auslösen der Konformationsänderung des ER wichtig (Brzozowski *et al.* 1997).

Bei dem Vergleich von 517 Chemikalien, die einen transaktivierenden Einfluss in einem *yeast-two-hybrid*-Assay gezeigt haben, wurde ein mit Hydroxylgruppen in *ortho*- und *para*-Position substituierter Phenylring wie in der untersuchten Substanz BP2 als Hauptstrukturmerkmal von ER-Liganden identifiziert (Nishihara *et al.* 2000).

Es ist also davon auszugehen, dass BP2 selbst ein EAC ist. Das Gefahrenpotential, das von BP2 möglicherweise ausgeht, sowie mögliche andere Effekte sind noch gänzlich unerforscht.

1.5 OECD-Protokoll zur Identifikation von endokrin aktive Chemikalien

Es wurde erkannt, dass man anhand von *in vitro*-Assays zwar eine Aussage zu Mechanismen und speziellen biologischen Endpunkten machen kann, das endokrine Potential einer Chemikalie *in vivo* lässt sich damit jedoch nicht abschätzen. Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) hat deshalb ein Programm zur Validierung des uterotrophen Assays initiiert, um ein Testsystem zur Identifikation von estrogenen EACs zu etablieren (Kanno *et al.* 2003; Owens *et al.* 2003). In diesem *in vivo*-Assay wird die Estrogenität einer Testsubstanz anhand der Zunahme des Uterusgewichtes in kastrierten, weiblichen Ratten untersucht (ausführlich beschrieben in Abschnitt 1.6.2).

Dabei beschränkt man sich aber auf einen einzigen biologischen Endpunkt, der estrogenen Wirkung im Reproduktionstrakt, dem Uterusgewicht. Seit der Beschreibung von Tamoxifen existiert das „selektiver Estrogen-Rezeptor-Modulator (SERM)-Konzept“. Das heißt, dass eine potentiell estrogen Substanz organspezifisch eine agonistische oder antagonistische Wirkung entfalten kann. Dies beruht auf der Liganden-spezifischen Konformationsänderung des Rezeptors und der damit verbundenen Rekrutierung von gewebespezifisch exprimierten Kofaktoren. Der uterotrophe Assay kann deshalb nur rein estrogene Substanzen identifizieren, selektive ER α - und ER β -Agonisten sowie SERMs können mit dieser Methode durchaus übersehen werden. Nicht ER-vermittelte Effekte in endokrinen Systemen werden in diesem Modell ebenfalls nicht erfasst. Dass eine Substanz mehrere Rezeptoren und damit endokrine Systeme beeinflussen kann, wird anhand des Beispiels Prochloraz deutlich. Diese Substanz wirkt als Antagonist auf Estrogen- und Androgen-Rezeptor und als Agonist auf den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) (Vinggaard *et al.* 2006).

1.6 Ziel dieser Arbeit

Es soll die endokrine Wirkung des UV-Filters Benzophenon-2 untersucht werden. Über die Methoden des *in vitro-screenings* hinaus wird der uterotrophe Assay in einer erweiterten Form angewandt, um die Auswirkungen einer BP2-Behandlung auf die Organe der Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden (HPG)-Achse sowie der Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen (HPT)-Achse und auf metabolische Parameter zu erfassen. Damit soll untersucht werden, ob BP2 über die in der Literatur postulierte rein estrogene Wirkung noch über andere endokrine Aktivitäten verfügt, die bislang nicht beachtet wurden.

Des Weiteren soll eine mögliche Metabolisierung von BP2 *in vivo* überprüft werden.

Aus den Ergebnissen der untersuchten Parameter soll eine Dosis-Wirkungsbeziehung erstellt werden, die als Grundlage für eine Risiko-Bewertung verwendet werden kann.

Dazu werden verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Testsysteme eingesetzt, deren Grundlagen im Folgenden näher beschrieben werden.

1.6.1 *In vitro*-Methoden

Zunächst soll die estrogenen Aktivität von BP2 durch *in vitro*-Versuche bestätigt werden.

- **Rezeptorbindungsassay (RBA):** Im RBA können Substanzen identifiziert werden, die mit radioaktiv markiertem Estradiol um Bindestellen an rekombinantem ER α oder ER β bzw. in der klassischen Variante in uterinem Cytosol konkurrieren (Danzo 1997). Da Estrogene ihre Wirkung hauptsächlich über die ERs vermitteln, eignet sich dieser Assay zur Erfassung potentieller estrogenen Chemikalien. Ob durch die Bindung der Substanz eine agonistische oder antagonistische Aktivität vermittelt wird und über die Stärke der Transaktivierung, kann mit diesem Assay nichts ausgesagt werden.
- **Proliferationsassay (*E-screen*):** Die Zellen der Brustkrebszelllinie MCF-7 reagieren auf Estradiol mit vermehrtem Wachstum (Soto *et al.* 1995). Die Rate der Proliferation ist proportional zur Menge bzw. zur Aktivität des Estrogens. Ähnlich wie im RBA wird hier die Testsubstanz auf ihre Fähigkeit zur Induktion eines biologischen Endpunktes getestet.
- **Transaktivierungsassay:** Dieser Assay nutzt die Zelllinie MCF-7, welche mit einem durch ein Estrogen-responsives Element (ERE) reguliertem Reporter-gen (Luciferase) stabil transfiziert wurde (Gomez *et al.* 2005). Damit kann die Fähigkeit zur Transaktivierung von ER-regulierten Zielgenen anhand der induzierten Luciferase gemessen werden. Im Gegensatz zum *E-screen* wird hier ein spezifischer Mechanismus überprüft.

- **Ethoxyresorufindeethylase-Assay (EROD-Assay):** Viele Xenobiotika verstärken ihre eigene Degradation und Exkretion durch die Induktion der Enzyme der Biotransformation in der Leber (Ebert *et al.* 2005). In der Hepatomzelllinie H4IIE kann die Aktivität eines der an der Phase-I der Biotransformation beteiligten Enzyme, der EROD, gemessen werden (Whyte *et al.* 2004). Damit erhält man einen Anhaltspunkt für die mögliche Kinetik der Substanz *in vivo*. Die Enzymaktivität wird über eine vermehrte Transaktivierung durch den Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) verstärkt (Denison *et al.* 2002). AhR-Agonisten sind zudem in der Lage über den AhR einen antagonistischen Einfluss auf die Signaltransduktion der Estrogene auszuüben. Dies kann durch die Induktion der E2-Degradation, durch Induktion des Proteasom-abhängigen Abbaus der ERs, durch die Inhibition der E2-induzierten Transkription durch überlappende responsive Elemente auf der DNA oder auch durch die Konkurrenz um Kofaktoren geschehen (Safe *et al.* 2003).
- **Hypothalamuszellkultur:** Der Einfluss der Testsubstanzen auf die hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Sekretion soll mittels der murinen Hypothalamuszelllinie GT1-7 untersucht werden (Bowe *et al.* 2003). GnRH wird pulsatil sezerniert und über das portale Gefäßsystem zur Hypophyse transportiert, wo es die Sekretion des luteinisierenden Hormons (LH) und des follikelstimulierenden Hormons (FSH) bewirkt (Page 1983; Knobil 1990; Levine 1997).
- **Hypophysenzellkultur:** Durch die Inkubation von primären Ratten-Hypophysenzellen mit den Testsubstanzen soll der Einfluss auf die Sekretion des Thyroidea-stimulierenden Hormons (TSH) und LH untersucht werden. LH wird von den gonadotropen Zellen der Adenohypophyse nach Stimulation mit GnRH sezerniert. TSH wird nach Stimulation durch TRH (TSH-Releasing-Hormon) von den thyreotropen Zellen der Adenohypophyse sezerniert. *In vitro* reagieren die Zellen einer primären Hypophysenzellkultur auf eine Belastung mit estrogenen Substanzen mit einer Induktion der Sekretion von LH und TSH (Menon *et al.* 1985; Emons *et al.* 1988). Die Hormone können im Zellüberstand gemessen werden (Bieglmayer *et al.* 1980; Ortmann *et al.* 1999).

1.6.2 *In vivo*-Tierversuche

In vitro-Assays sind schnell, kostengünstig und erlauben durch die Untersuchung definierter Endpunkte Aussagen zu Mechanismen. *In vivo*-Tierversuche dagegen berücksichtigen Parameter des intakten Organismus wie Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung, Akkumulation und Exkretion der Testsubstanz. Eine Einschätzung des endokrinen Potentials auf einen Organismus ist nur in Tiermodellen möglich.

- **Uterotropher Assay:** Der uterotrophe Assay basiert auf der Regulation des Uteruswachstums im natürlichen Zyklus der Ratte durch Estrogene. Das endogene Estradiol spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation des weiblichen Zyklus. Bei Ratten machen die durch Estrogen regulierten Organe Vagina, Cervix und Uterus einen rapiden Zyklus von Wachstum und Regression durch. Der Zyklus der Ratte dauert dabei nur 4 bis 5 Tage (Smith *et al.* 1975).

Ein Ansteigen des Estrogenspiegels löst eine Kaskade von molekularen und zellulären Prozessen aus. Zu Beginn führt die Aktivierung der ERs durch Estradiol zu vermehrter Expression einiger Estrogen-regulierter Gene. Die Expression anderer Gene wiederum wird herunterreguliert (Clark *et al.* 1983). Diese molekulare Umstrukturierung in der frühen Phase (bis 6 h nach Exposition) führt zu morphologischen Veränderungen in den Geweben von Vagina, Cervix und Uterus in der späten Phase (bis 24 h nach Exposition). Die mitotische Aktivität im Uterus nimmt zu und erreicht nach ca. 24 Stunden nach der Exposition durch Estradiol ein Maximum (Kaye *et al.* 1971). Nach zwei bis drei Tagen manifestiert sich ein estrogener Effekt im Ansteigen des Uterusgewichtes auf das 2- bis 4fache.

Die Stimulation durch natürliche Estrogene entfällt in immaturren oder ovariectomierten Tieren fast vollständig, so dass estrogene Einflüsse (Einlagerung von Flüssigkeit und erhöhte Zellproliferation) von Testsubstanzen schnell sichtbar werden. Daher ist die ovariectomierte Ratte das ideale Modell zur Untersuchung estrogener Substanzen. Da das Protokoll des klassischen uterotrophen Assays (Allen *et al.* 1937) nur die Auswertung des Uterusgewichtes vorsieht (Yuan 1991), werden andere mögliche Endpunkte nicht erfasst. Es wird deshalb ein erweiterter Assay durchgeführt, bei dem auch verschiedene andere Organe und Parameter (siehe unten) betrachtet werden.

- **ER α - und ER β -Expression:** Estrogene vermitteln ihre Wirkung hauptsächlich über die ERs (siehe oben). Die Regulation der ERs ist hoch komplex (Reid *et al.* 2002) und noch nicht vollständig aufgeklärt. Es gibt jedoch Untersuchungen, die zeigen, dass die ERs gewebespezifisch einer Autoregulation unterliegen (Castles *et al.* 1997; Tena-Sempere *et al.* 2004). Neben anderen Faktoren wie der zellulären Ausstattung an Kofaktoren und Transkriptionsfaktoren und der Beschaffenheit der Promotoren der Zielgene (Weihua *et al.* 2003) ist die Affinität der Liganden und das Expressionsmuster der ERs entscheidend für die Umsetzung des estrogenen Signals (Fowler *et al.* 2005). Deshalb wird in verschiedenen Organen die Genexpressionen von ER α und ER β bestimmt.

- **Genexpression estrogenen Marker:** Verschiedene Gene werden in ihrer Transkription durch Estrogene direkt oder indirekt beeinflusst. Um zu untersuchen, ob BP2 eine ähnliche Regulation der Transkription verursacht, soll die mRNA-Menge verschiedener Markergene durch *Real Time Detection*-PCR (RTD-PCR) gemessen werden.

Truncated estrogen receptor product (TERP)-1: TERP-1 ist eine in den lactotrophen Zellen der Hypophyse exprimierte ER α -Isoform, welcher die Exons 1 bis 4 fehlen (Friend *et al.* 1995). Die Regulation der Transkription erfolgt durch ein ERE im Zusammenspiel mit einer Bindestelle für den Hypophysen-spezifischen Transkriptionsfaktor Pit-1 (Schausi *et al.* 2003). Estrogene haben auf die Transkription von TERP-1 einen stimulierenden Einfluss (Schreihöfer *et al.* 2000).

Insulin-like growth factor (IGF)-1: IGF-1 ist ein Peptid, welches die anabole und mitogene Wirkung von GH vermittelt. Es wird in der Leber und lokal in den Zielorganen exprimiert. Murphy *et al.* beschrieben eine erhöhte Transkription von IGF-1 im Uterus nach der Applikation von E2 (Murphy *et al.* 1987). In der Leber wurde eine verringerte Genexpression nach E2-Gabe beobachtet (Krattenmacher *et al.* 1994).

Komplement-Protein (C) 3: Die Proteine des Komplement-Systems spielen eine Rolle bei der Immunabwehr, indem sie Immunkomplexe solubilisieren, Zellen und Pathogene lysieren, die Phagozytose von Pathogenen verstärken und Entzündungsreaktionen auslösen. Die Komplementproteine bilden eine proteolytischen Kaskade, in der jedes Spaltungsprodukt als Protease des nächsten Substrates wirkt. Die Expression von C3 wird durch eine Sequenz von drei EREs im Promotor kontrolliert (Fan *et al.* 1996) und ist somit direkt durch Estrogene aktivierbar (Sundstrom *et al.* 1989).

- **Metabolische Parameter:** Untersuchungen haben gezeigt, dass Estrogene einen indirekten Einfluss auf die Funktion der Leber haben, so werden die Plasma Konzentrationen von Cholesterol, HDL und LDL (*high* bzw. *low density lipoprotein*) durch Steroidhormone modifiziert (Sacks *et al.* 1990; Walsh *et al.* 1991). Die molekulare Grundlage dafür ist noch nicht aufgeklärt, allerdings spielt der Signaltransduktionsweg der Estrogene dabei eine entscheidende Rolle (Nanjee *et al.* 1990). Aus epidemiologischen Studien wird deutlich, dass der Einfluss von Steroiden auf den Metabolismus auch Auswirkungen auf Herzgefäßerkrankungen hat (Colvin *et al.* 1993).
- **Hypothalamus-Hypophyse-Gonaden (HPG)-Achse:** Im Hypothalamus erfolgt die Produktion und Sekretion verschiedener Releasing-Hormone (z.B. GnRH) in das Pfortadersystem, welches für die Signalweiterleitung zum Hypophysenvorderlappen verantwortlich ist. In der Hypophyse bewirken diese Hormone die Sekretion von glandotropen Hormonen (z. B. LH) oder Hormonen, welche direkt auf bestimmte Körperzellen wirken wie z.B. GH (Wachstumshormon). Effekte von BP2 auf die Sekretion dieser Hormone können direkt über die Bestimmung der Serumspiegel von LH, PRL und GH gemessen werden. Außerdem erfolgt die Bestimmung der Genexpression der Untereinheiten von LH. Einflüsse von BP2 auf die GnRH-Sekretion werden durch Inkubation hypothalamischer Zellen mit der Testsubstanz gemessen.
- **Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen (HPT)-Achse:** Der Hypothalamus sezerniert neben den oben genannten Hormonen zusätzlich TRH, das in der Hypophyse die Freisetzung von TSH stimuliert. TSH steigert die Sekretion von T3 und T4 durch die Schilddrüse. Wie alle Hormonkreisläufe unterliegt auch die Funktion der Schilddrüse einer strikten Kontrolle durch *feedback*-Regulationen, welche in diesem Fall die Schilddrüsenhormone T3 und T4 auf Hypophyse und Hypothalamus ausüben. In diesem Versuch wird die Genexpression von TRH im Hypothalamus und der Untereinheiten von TSH in der Hypophyse mit RTD-PCR bestimmt. Zusätzlich werden die Serumspiegel von TSH, freiem und gesamten T3 und T4 bestimmt. Der Einfluss von BP2 auf die Schilddrüsenfunktion wird anhand der Natrium/Iodid-Symporter (NIS)-Proteinexpression und der Schilddrüsenperoxidase (TPO)-Aktivität in der Schilddrüse

sowie der 5'-Deiodase-Aktivität in der Leber untersucht. Diese Proteine sind wichtig bei der Produktion der Schilddrüsenhormone T3 und T4 (NIS und TPO) beziehungsweise bei deren Abbau (5'-Deiodase).

1.6.3 Metabolismus und Kinetik von BP2

Für den UV-Filter BP3 konnte gezeigt werden, dass die Substanz nach der Absorption im Organismus metabolisiert wird (Takatori *et al.* 2003). Dabei wurde nachgewiesen, dass die eigentlich endokrin aktive Substanz nicht das verabreichte BP3 war, sondern der Metabolit BP1, welcher um ein Vielfaches potenter als BP3 ist. Für das chemisch verwandte BP2 sind bislang keine Daten zur Kinetik vorhanden, deshalb wird die Kinetik anhand eines zusätzlichen *in vivo*-Versuches untersucht.

- **Serumanalyse:** Nach der Auftrennung von Serum- und Urinproben mittels HPLC kann die Menge der Substanz in der Probe mit einem UV-Photometer bestimmt werden. So kann der zeitliche Verlauf der Absorption und Exkretion von BP2 gemessen werden. Des Weiteren ist es möglich, mittels Massenspektrometrie, eventuell vorhandene Metabolite zu identifizieren.

1.6.4 Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung für ausgewählte Parameter

Das Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung ist der Kernpunkt bei der Untersuchung und Bewertung von Einflüssen durch Xenobiotika. Nachdem eine Substanz als endokrin aktive Chemikalie identifiziert wurde (Yamasaki *et al.* 2003; Schlecht *et al.* 2004), muss der Einfluss auf endokrine Regulationsmechanismen von Organismen untersucht werden.

Aus *in vitro*-Analysen ist es unmöglich, auf das Potential einer Testsubstanz zur Interaktion mit der exponierten Population, in diesem Fall den Menschen, zu schließen. Dies kann nur auf der Basis eines *in vivo*-Versuches in einem geeigneten Modell geschehen. Die Laborratte ist ein weltweit anerkanntes Modell zur Extrapolation von Effekten auf den Menschen (Gies *et al.* 2001).

Dafür wird anhand einiger ausgewählter Parameter mittels des sog. *Benchmark Approaches* der Schwellenwert, das heißt die Dosis, bei der die Wirkung auf den Parameter einsetzt, ermittelt. Dieser Schwellenwert bildet dann die Grundlage für eine Risiko-Bewertung

2 Material und Methoden

2.1 Testsubstanzen

Benzophenon-2 (BP2) (UVINUL D-50), Chargennummer 6021881 wurde von BASF (Burgbernheim) bezogen.

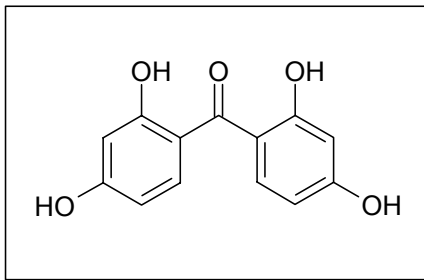


Abbildung 2-1: Strukturformel von Benzophenon-2

Substanzname: 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon

Summenformel: $C_{13}H_{10}O_5$

Molare Masse: 246,217 g/mol

CAS-Nummer: 131-55-5

β -Estradiol 17-valerat (E2V) (Kat. Nr.: E1631, Chargennummer 087H0141) wurde von Sigma (Schnelldorf) bezogen.

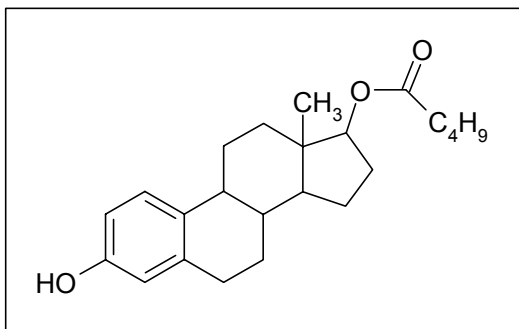


Abbildung 2-2: Strukturformel von β -Estradiol 17-valerat

Substanzname: Estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol (17-beta)-, 17-pentanoat

Summenformel: $C_{23}H_{32}O_3$

Molare Masse: 356,50 g/mol

CAS Nummer: 979-32-8

2.2 Sonstige Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Bachem (Weil am Rhein), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) und Sigma (Schnelldorf) bezogen. Es wurden Chemikalien der höchsten erhältlichen Reinheitsstufe verwendet. Verbrauchsmaterialien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Eppendorf (Hamburg), Greiner (Frickenhausen), Nunc (Wiesbaden) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.3 Rezeptorbindungsassay

Der Rezeptorbindungsassay beruht auf der Konkurrenz von radioaktiv markiertem Estradiol (*Tracer*) und der zu untersuchenden Substanz um Bindungsstellen im Cytosol. Nach der Abtrennung des ungebundenen *Tracers* ist die Menge des messbaren, radioaktiv markierten *Tracers* umgekehrt proportional zur Menge der Testsubstanz im Ansatz.

- Ansatz: 5 µl Probe oder Standard in 70 % Ethanol (EtOH)
200 µl Cytosol (aus Schweineuterus, laboreigene Herstellung)
50 µl ¹²⁵J-markiertes Estradiol (etwa 25.000 cpm)
350 µl Assay-Puffer

Die Ansätze wurden gevortext und über Nacht bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis mit 500 µl Aktivkohle-Lösung versetzt, 15 Minuten inkubiert, gevortext und 25 Minuten bei 2000 g abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Zählröhrchen dekantiert und 10 Minuten im Gamma-Counter (Wizard 1470, Wallac [Perkin-Elmer], Rodgau-Jügesheim) gezählt. Analog zu den Proben wurden die spezifische Bindung (Assay-Puffer + Protein + *Tracer*), die unspezifische Bindung (Assay-Puffer + *Tracer*) sowie eine Standardkurve mit 7 Punkten im Bereich von 8 pM bis 20 nM jeweils als Doppelbestimmung mitgeführt. Zusätzlich wurde die Totalaktivität (Assay-Puffer + *Tracer* ohne Aktivkohle-Fällung) bestimmt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm RIA-CALC Ver.2.7 (Wallac).

- Assay-Puffer 3,2 g Tris
0,504 g EDTA (Merck)
auf pH 7,4 einstellen und auf 900 ml mit H₂O_{dest} auffüllen
1 g BSA (Serva, Heidelberg)
100 ml Glycerol (Sigma)

- Aktivkohle-Lösung 3,2 g Tris
 0,504 g EDTA (Merck)
 auf pH 7,4 einstellen und auf 900 ml mit H₂O_{dest} auffüllen
 5 g Dextran (Pharmacia Biotech, Freiburg)
 5 g Aktivkohle (Sigma)
- Standardpräparat 17β-Estradiol (Sigma)
- *Tracer* 16α-[¹²⁵I]iodo-3,17β-Estradiol, 8,14 TBq/mmol
 (Kat.Nr.:NEX 144L, Perkin Elmer, Rodgau-Jügesheim)

2.4 Zellkultur

Alle Zellen wurden, soweit nicht anders angegeben, in einem Cytoperm 2-Inkubator (Heraeus, Hanau) bei 37°C, 10 % CO₂ und 95 % relativer Luftfeuchtigkeit inkubiert und wurden täglich mikroskopisch beurteilt, um Kontaminationen auszuschließen.

Die Kulturen wurden in 75 cm²-Flaschen kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde ein Mediumwechsel vorgenommen.

Die Kulturen wurden einmal pro Woche subkultiviert. Dazu wurde das Medium abgesaugt und nach einem Waschschrift mit PBS durch 6 ml Trypsinlösung ersetzt. Die Flaschen wurden maximal 5 Minuten bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen vom Flaschenboden lösten. Anschließend wurde die Zellsuspension in 10 ml Permanentkultur-Medium (PKM) gegeben und die Flasche wurde einmal mit Medium nachgespült. Die Zellen wurden sedimentiert (300 g, 10 Minuten) und einmal mit PKM gewaschen. Abschließend wurden die Zellen mit einer Neubauer-Zählkammer (Brand, Wertheim) gezählt und erneut ausgesät. Die Kulturen wurden maximal bis Passage 20 benutzt, um Veränderungen der Zellen auszuschließen (Whyte *et al.* 2004).

Zur Herstellung von Kryokulturen wurden Zellen einer möglichst frühen Passage mit einer Dichte von 1*10⁶ Zellen/ml in 10 % DMSO in FCS zunächst über Nacht bei -70°C in einer Styroporbox und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

Um eine neue Kultur aus Kryokulturen anzulegen, wurde ein Kryoröhrchen unter fließend warmem Wasser angetaut und der Inhalt sofort in 15 ml PKM überführt. Die Zellen wurden sedimentiert und einmal mit PKM gewaschen, bevor die Zellen in 75 cm²-Flaschen ausgesät wurden.

Allen Medien wurde vor der Verwendung jeweils 1 % Pen/Strep (10.000 U Penicillin/ml, 10 mg Streptomycin/ml in einer 0,85 % Kochsalzlösung, Gibco, Karlsruhe) zugegeben.

- Permanentkulturmedium (PKM) 500 ml DMEM (Kat.Nr.:41965-039), Gibco
50 ml Fetal Bovine Serum, (Kat.Nr:S0115) Biochrom,
Berlin
5 ml MEM Sodium Pyruvat 100 mM, Gibco
- Trypsin-EDTA 0.05 % Trypsin, (Kat.Nr.:25300-054), Gibco
- PBS 10x (Kat.Nr: 14200-067), Gibco

2.4.1 Proliferationstest (BrdU-Assay, E-screen)

Mit diesem Assay kann der Einbau von 5-Bromo-2'-deoxyuridin (BrdU), einem Pyrimidin-Analogon, in die DNA von proliferierenden Zellen gemessen werden. Dazu wird das eingebaute BrdU mit einem Antikörper markiert und anschließend durch eine Substratreaktion photometrisch quantifiziert.

Der Test wurde mit einem Kit der Firma Roche (Cell Proliferation ELISA BrdU, Roche, Mannheim) durchgeführt.

Die MCF7-Zellen (ACC 115; DSMZ, Braunschweig) wurden mit einer Dichte von 10.000 Zellen/*well* in steroidfreiem PKM ausgesät und 24 h inkubiert. Anschließend wurden 20 µl der 10fach konzentrierten Substanzen zugegeben. Nach einer 24stündigen Inkubation wurden 20 µl 100 µM BrdU-Lösung zugegeben und es wurde für weitere 2 h inkubiert. Das Medium wurde anschließend abgesaugt und die Zellen wurden mit 200 µl/*well* FixDenat-Lösung für 30 Minuten fixiert. Um den Hintergrund zu reduzieren, wurden nach dem Absaugen der Fixierungslösung 200 µl/*well* *Blocking Reagent* für ELISA (Roche) zupipettiert. Nach einer 30minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt; 100 µl/*well* der Antikörperlösung (1:100 Verdünnung der Stammlösung) wurden zugegeben und 90 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Platten 3-mal mit jeweils 200 µl/*well* Waschlösung gewaschen (ELISA-Washer, Tecan, Crailsheim). Nach der Zugabe von 100 µl/*well* Substratlösung wurden die Platten bei Raumtemperatur inkubiert, bis eine ausreichende Blaufärbung zu beobachten war (etwa 5 Minuten). Zum Abstoppen der Reaktion wurden 25 µl 1 M H₂SO₄ in jedes *well* pipettiert. Die Absorption der Proben wurde bei 450 nm und bei einer Referenzwellenlänge von 690 nm (Spectra, Tecan) gemessen.

- PKM steroidfrei 500 ml DMEM w/o Phenol Red (Kat.Nr:11880-028), Gibco
50 ml Fetal Bovine Serum, charcoal stripped (Kat.Nr:S3113),
Biochrom
5 ml Glutamine (200 mM), Gibco
5 ml MEM Sodium Pyruvat 100 mM, Gibco

2.4.2 Transaktivierungsassays

Mit diesem Assay wurde die Fähigkeit von BP2 zur spezifischen Transaktivierung der Luciferase-Expression durch ER α oder ER β gemessen. Dazu wurden MCF-7-Zellen, welche stabil mit einem Luciferase-Gen unter der Kontrolle eines EREs transfiziert wurden (MELN), zusätzlich mit einem Plasmid transfiziert, welches entweder ER α (MELN-ER α) oder ER β (MELN-ER β) überexprimiert (Gomez *et al.* 2005).

Die Zellen wurden in 150 μ l steroidfreiem PKM mit einer Dichte von 10.000 Zellen/*well* in weißen 96-*well*-Platten (Becton-Dickinson, Heidelberg) ausgesät. Die Zellen wurden anschließend mit BP2 in Konzentrationen zwischen $1 \cdot 10^{-8}$ M und $1 \cdot 10^{-5}$ M sowie dem Lösungsmittel Ethanol in der höchsten verwendeten Konzentration für 16 h belastet.

Für die Messung der Luciferase-Aktivität wurden das Medium gegen 50 μ l steroidfreies PKM mit 0,3 mM Luciferin ausgetauscht. Die Luciferase-Aktivität in den intakten Zellen wurde mit einem Trilux-Wallac Luminometer (Perkin-Elmer) gemessen.

2.4.3 EROD-Assay

Im EROD-Assay wird die Aktivität der Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) gemessen. Dieses Enzym ist neben Arylhydrocarbonhydroxylase und P450-Oxygenase ein Produkt des Cyp1a1-Gens, welches posttranslational prozessiert wird. Die Expression des Cyp1a1-Gens wird durch den Liganden-gebundenen Arylhydrocarbon-Rezeptor (AhR) aktiviert. Das entstehende Enzym ist in der Lage Ethoxyresorufin zu Resorufin zu spalten, welches seinerseits bei 530 nm zur Fluoreszenz angeregt werden kann.

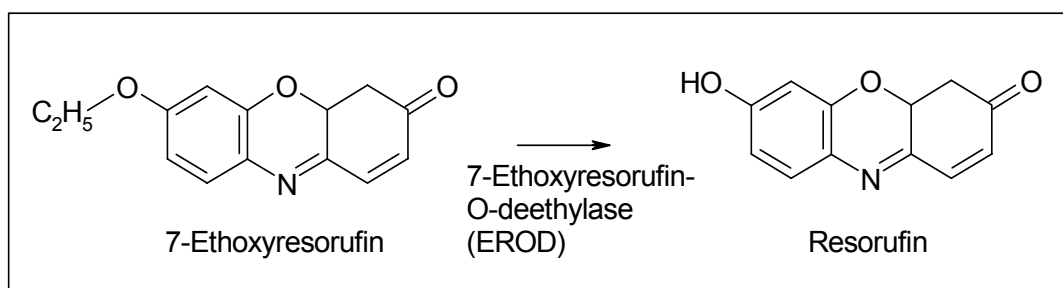


Abbildung 2-3: Durch die 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase katalysierte Reaktion.

Der EROD-Assay wurde mit Hepatomzellen der Ratte (H4IIE, [CRL-1548] ATCC, Manassas [VA], USA) nach (Clemons *et al.* 1997) durchgeführt.

Die Zellen wurden mit 10.000 Zellen/*well* in 96-*well*-Platten in PKM ausgesät und für 72 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Medium durch frisches Medium ersetzt, welchem die Testsubstanzen zugegeben wurden. Die Substanzen wurden als 10⁻² M Stammlösungen in DMSO angesetzt und entsprechend in Medium verdünnt.

Als Kontrollen wurden das Lösungsmittel in der niedrigsten Verdünnungsstufe und 3-Methylcholanthrene (3MC) 1*10⁻⁶ M als Positivkontrolle für jede Platte mitgeführt.

Die Platten wurden für 48 h inkubiert. Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und es wurden 50 µl 10 µM Dicumarol und 50 µl 4 µM Ethoxyresorufin jeweils in PBS verdünnt zugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 200 µl EtOH gestoppt. 200 µl der Lösung wurden in schwarze Fluoreszenzplatten (FluoroNunc F96, Nunc) überführt und bei einer Exitationswellenlänge von 530 nm und einer Emissionswellenlänge von 590 nm (Synergy HT, Bio-Tek, Bad Friedrichshall mit *Kineticalc4* Ver.3.4, Bio-Tek) gemessen. Als Standardkurve wurde eine 2,5 µM Resorufinlösung in 70 % EtOH in PBS verwendet. Damit wurden durch 1:2-Verdünnungen 6 Standardpunkte erstellt.

- Dicumarol (3,3'-Methylenbis[4-hydroxycoumarin]), Sigma; 1 mM in Ethanol gelöst
- Ethoxyresorufin (7-Ethoxy-3H-phenoxazin-3-on), Fluka; 400 µM in Ethanol gelöst
- Resorufin (7-Hydroxy-3H-phenoxazin-3-on), Sigma; 10 mM in Ethanol gelöst

2.4.3.1 Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

Die Zellen wurden trockengesaugt, mit 100 µl RLB (*Reporter-lysis-buffer*, Promega, Mannheim) versetzt und 30 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. 10 µl der Lösung wurden in eine neue Platte überführt und mit 200 µl Bradford-Reagenz (Protein Assay, Bio-Rad, München) versetzt. Als Standardkurve wurden sechs Verdünnungen einer bovinen IgG-Lösung (Standard I, Bio-Rad, München) zwischen 1,0 und 0,1 mg/ml eingesetzt. Nach weiteren 5 Minuten Inkubation auf dem Schüttler wurde die Absorption bei 595 nm (Spectra, Tecan) gemessen. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm *Magellan* Ver. 3.11. (Tecan).

2.4.4 Hypothalamuszellkultur

Um den Einfluss von BP2 auf die hypothalamische Gonadotropin-Releasing-Hormon (GnRH)-Sekretion zu untersuchen, wurden eine murine Hypothalamuszelllinie (GT1-7, zur Verfügung gestellt von Richard Weiner, University of California, San Francisco, USA) verwendet. Die Zellen wurden in 1 ml PKM mit 15 % FCS mit 200.000 Zellen/*well* in 24-*well*-Platten ausgesät und 3 Tage inkubiert. Anschließend wurde das Medium abgesaugt und durch 1 ml steroidfreies PKM mit 2 % Aktivkohle-behandeltem FCS ersetzt. Die Platten wurden erneut für 16 Stunden inkubiert. Für die Belastung der Zellen mit den Substanzen wurde das Medium entfernt und durch 500 µl frisches Medium ersetzt, welchem die Testsubstanzen aus einer 10fach konzentrierten Stammlösung zugegeben wurden. Die Inkubation erfolgte für 6 Stunden. Anschließend wurde das Medium abgenommen und für die Bestimmung von GnRH mit einem Radioimmunoassay bei -20°C gelagert.

2.4.4.1 Bestimmung von GnRH im Zellkulturüberstand

- Ansatz: 300 µl Zellkulturüberstand oder Standard
100 µl ¹²⁵J-markiertes GnRH
100 µl Antikörperlösung (1:20.000 verdünnt in PBS,
laboreigene Herstellung aus Kaninchen)

Die weitere Durchführung der Bestimmung erfolgte analog zu Punkt 2.3. Die Standardkurve umfasste 10 Punkte zwischen 1 pg/ml und 1 ng/ml.

- Aktivkohle-Lösung siehe Punkt 2.3
- Standardpräparat NIADDK GnRH-RP-2 (NIH, NHPP)
- *Tracer* [¹²⁵I]Tyr⁵-Luteinizing Hormone-Releasing-Hormone
81,4 TBq/mmol (Kat.Nr.:NEX 163, Perkin Elmer)

2.4.5 Hypophysenzellkultur

Zur Gewinnung von Hypophysenzellen aus Ratten wurden die tief mit CO₂ narkotisierten Tiere dekapitiert, die Adenohypophysen wurden präpariert und in eiskaltes Spinner-Medium überführt.

Unter der Sterilbank wurden die Hypophysen mit zwei Skalpellern zerkleinert. Dabei wurden Erythrozyten mit Spinner-Medium ausgewaschen. Die Fragmente wurden anschließend in 10 ml Trypsinlösung (1 mg/ml Trypsin in Spinner-Medium) mit DNase (beides Sigma) bei 37°C inkubiert.

Nach 30 Minuten wurden die Fragmente mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze trituriert. Die Lösung mit bereits vereinzelt Zellen wurde durch einen *Cell-strainer* (BD Biosciences, Erembodegem, Belgien) in 10 ml Serum-Medium gegeben, um das Trypsin zu inaktivieren. Die restlichen Fragmente wurden mit neuer Trypsinlösung weitere 60 Minuten inkubiert, wobei die Fragmente alle 15 Minuten trituriert wurden.

Nachdem sich alle Fragmente aufgelöst hatten, wurde die Lösung ebenfalls durch den *Cell-strainer* zu dem Serum-Medium gegeben. Die Zellen wurden abzentrifugiert (300 g, 10 Minuten) und einmal mit Serum-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in Serum-Medium resuspendiert und mit einer Neubauer-Zählkammer gezählt.

Die Zellsuspension wurde auf 250.000 Zellen/ml eingestellt und es wurden 250 µl/well in einer 96-well Platte ausplattiert. Die Zellen wurden 96 h bei 37°C inkubiert.

Im Anschluss wurde das Medium abgesaugt und gegen 250 µl steroidfreies PKM/well ausgetauscht. Die Substanzen wurden aus 10⁻² M Stammlösungen (in Ethanol gelöst und in Medium verdünnt) zugegeben. Ein Teil der Platten wurde zusätzlich mit dem Estrogen-Rezeptor-Antagonisten ICI 182,780 (Tocris, Avonmouth, UK) in einer Konzentration von 1*10⁻⁶ M koinkubiert. Nach einer 45stündigen Inkubation wurde ein Stimulationsmix aus GnRH und TRH (Bachem) in einer Endkonzentration von jeweils 10⁻⁶ M zugegeben. Nach weiteren 3 h Inkubation wurden 200 µl des Überstandes abgenommen und für die Messung von LH und TSH (siehe 2.6.1) verwendet.

2. Material und Methoden

- Spinner-Medium
500 ml DMEM (Kat.Nr:21068-028), Gibco
7 ml BSA Fraction V Sol. 7,5 %, Gibco
5 ml 1 M HEPES, Gibco
5 ml MEM Natrium Pyruvat 100 mM, Gibco
5 ml Glutamine (200 mM), Gibco
- Serum-Medium
500 ml DMEM (Kat.Nr:41965-039), Gibco
40 ml Horse Serum, (Kat.Nr:S9135), Biochrom
22,5 ml Fetal Bovine Serum, (Kat.Nr:S0115), Biochrom
5 ml MEM Natrium Pyruvat 100 mM, Gibco

2.4.5.1 Vitalitätstest (MTT-Test)

Zu den restlichen 100 µl Überstand wurden 10 µl MTT-Lösung (5 mg/ml in PBS) zugegeben. Die Platten wurden etwa 90 Minuten bei 37°C inkubiert, bis unter dem Mikroskop dunkle Kristalle erkennbar waren. Durch die Zugabe von 15 µl 12,5 %iger Glutaraldehydlösung in PBS und eine 15minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Reaktion abgestoppt. Der Überstand wurde abgesaugt und die Präzipitate wurden in 150 µl 0,04 N HCl in Isopropanol gelöst. Die Absorption wurde bei 590 nm und einer Referenzwellenlänge von 690 nm gemessen.

- MTT (3-[4,5-Dimethyl-2-thiazolyl]-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromid), Sigma
- Glutaraldehyd, 25 %ige Lösung in Wasser, Sigma

2.5 Tierversuche

Für die durchgeführten Tierversuche lag die Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig mit dem Aktenkennzeichen 509.42502/01-36.03 (Steroidrezeptor-spezifische Wirkung von endokrinen Disruptoren) vor.

2.5.1 Tierhaltung

Weibliche Sprague-Dawley Ratten (Winkelmann, Borchen oder eigene Zucht) wurden zu fünf oder zu sechst in Makrolon®-Käfigen Typ IV gehalten.

Die Tiere wurden nach Erhalt oder ab dem 21. Tag nach der Geburt auf sojafreiem Futter (Spezialanfertigung, Ssniff, Soest) gehalten, welches *ad libitum* zur Verfügung stand. Die relative Luftfeuchtigkeit betrug durchschnittlich 55 % bei 23°C Raumtemperatur. Das Licht wurde 12 h/d eingeschaltet. Die Tiere für die subakute 5-Tage-Applikation stammten aus eigener Zucht von sojafrei gehaltenen Müttern, alle anderen Tiere wurden von der Firma Winkelmann (Borchen) bezogen.

2.5.2 Ovariectomie

Zur Entfernung der Ovarien wurden die Tiere mit Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden) narkotisiert. Die Haut caudal der Rippenbögen wurde rasiert, desinfiziert und eröffnet. Nach dem Durchtrennen der Haut- und Muskelschichten wurde das Ovar freipräpariert, abgeklemmt, mit resorbierbarem Nahtmaterial (Vicryl, Ethicon, Norderstedt) abgebunden und entfernt. Anschließend wurden die Muskelschichten mit Vicryl verschlossen. Die Haut wurde mit nicht resorbierbarem Nahtmaterial (Supramid, Braun-Aesculap, Tuttlingen) verschlossen und zusätzlich mit Michel-Klammern (Martin Medizintechnik, Tuttlingen) gesichert.

2.5.3 Obduktion

Die Tiere wurden am Ende des jeweiligen Versuches unter einer tiefen CO₂-Narkose mit einer Guillotine dekapitiert. Das Blut wurde aufgefangen. Je nach Versuch wurden folgende Organe präpariert und sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und anschließend bei -70°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

- Adenohypophyse
- Gehirn
- Schilddrüse
- Uterus (ein Uterushorn wurde in Formalin fixiert)
- Leber (ein Teil des mittleren Lappens)

Das Blut wurde abzentrifugiert (2000 g für 30 Minuten), das Serum wurde abgenommen und bis zur weiteren Analyse bei -20°C gelagert.

2.5.4 Subakute Applikation von BP2

2.5.4.1 Testsubstanzen und Dosierungen

Benzophenon-2 (BP2) wurde in folgenden Konzentrationen in Olivenöl (DAB) suspendiert: 10 mg/kg Körpergewicht (Kg), 33 mg/kg Kg, 100 mg/kg Kg, 333 mg/kg Kg und 1000 mg/kg Kg.

β-Estradiol 17-valerat (E2V) wurde in einer Konzentration von 0,6 mg/kg Kg ebenfalls in Olivenöl eingesetzt. Als Kontrolle wurde reines Olivenöl verwendet.

Die Ratten wurden kurz vor Beginn des Versuches gewogen, um die Lösungen entsprechend ansetzen zu können.

Die Ratten wurden im Alter von 3 Monaten ovariektomiert (siehe 2.5.2). Nach 3 Wochen wurden die Tiere zu Gruppen von je 12 Tieren zusammengefasst.

Den Tieren wurde 5 Tage morgens zwischen 6 und 8 Uhr jeweils 1 ml der Testsubstanzen in Olivenöl beziehungsweise reines Olivenöl über eine Magensonde verabreicht.

2.5.4.2 Messparameter

Die Tiere wurden täglich bei der Fütterung auf klinische Zeichen von Toxizität untersucht. Nach der Gavagierung wurde täglich das Körpergewicht bestimmt.

Am Ende des Versuches wurden das Serum, die Hypophyse, das Gehirn, die Schilddrüse der Uterus und ein Teil der Leber entnommen.

Folgende Parameter wurden bestimmt:

Tabelle 2-1: Messparameter in den einzelnen Organen

	Messparameter
Hypothalamus (MBH)	Genexpression: ER α , ER β , Prä-Pro-TRH
Hypophyse	Genexpression: ER α , ER β , LH β , TSH β , α -Untereinheit, GH, TERP-1
Schilddrüse	Genexpression: ER α , ER β , Natrium/Iodid-Symporter-Expression, Schilddrüsenperoxidase-Aktivität
Uterus	Gewicht, Histologie Genexpression: IGF-1, Prä-Pro-C3, ER α , ER β
Leber	Genexpression: Cyp1a1, IGF-1, ER α , ER β Typ I/II-5'Deiodase-Aktivität
Serum	Serumkonzentrationen von: den Testsubstanzen (E2 und BP2), GH, LH, TSH, (f)T3/T4, Prolaktin, HDL, LDL, Cholesterin,

2.5.5 Kinetikversuch

Zur Bestimmung der Metabolisierungsgeschwindigkeit von Benzophenon-2 wurde weiblichen, ovariektomierten Tieren ein Jugularvenenkatheter gelegt, durch den in einem Abstand von 30 Minuten Blutproben gewonnen werden konnten. Nach der Gewinnung der Null-Proben (vor Beginn der Behandlung) wurde den Tieren *per gavage* 1 ml einer Benzophenon-2-Suspension (1000 mg/kg Kg) in Olivenöl verabreicht.

Wenn möglich, wurde den Tieren durch Druck auf die Blase eine Urinprobe entnommen.

Die Tiere blieben während der Behandlung unter Isofluran-Narkose.

Die gewonnenen Seren wurden anschließend mittels HPLC (siehe 2.6.3) analysiert.

2.5.5.1 Jugularvenen-Katheter

An einen Silikonschlauch mit 20 cm Länge (InnenØ 0,5 mm, AussenØ: 0,9 mm, Dow Corning, Wiesbaden) wurde mit Silikonkleber (Elastosil®, Wacker-Chemie, München) etwa 2 cm von einem Ende ein Teflonschild (ca. 0,5 x 1 cm, Perthese® silicon sheeting, LPI, Frankreich) angeklebt. Anschließend wurde dieses Ende des Schlauches auf eine abgesägte Kanüle (Sterican Gr.1, Braun, Melsungen) geschoben, die in einer weiteren abgesägten Kanüle (Sterican Gr.17, Braun) steckte. Beide Kanülen wurden zur Fixierung etwa 30° gebogen.

Die Kanülen mit dem Schlauch wurden in die freipräparierte Jugularvene des mit Isofluran narkotisierten Tieres eingeführt und durch den Brustmuskel wieder heraus gezogen. Die Kanülen wurden entfernt und der Schlauch wurde in die Vene zurückgezogen. In der Vene wurde der Schlauch vorwärts geschoben, bis mit einer aufgesteckten Spritze (1 ml, BD Plastipak™, Becton Dickinson) Blut gezogen werden konnte. Der Katheter wurde mit Heparinlösung (Liquemin®, Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen; 50 I.E. in 1 ml physiologischer NaCl-Lösung) gespült. Anschließend wurde der Katheter unter der Haut zum Nacken geführt.

Mit Hilfe einer 1 ml-Spritze wurden alle 30 Minuten 300 µl Blut abgenommen, welche jeweils durch 300 µl physiologische Kochsalzlösung ersetzt wurden. Der Katheter wurde nach jeder Blutabnahme mit 50 I.E. Heparin/ml in physiologischer Kochsalzlösung gespült.

2.5.5.2 Messparameter

In den Seren wurden der Benzophenon-2-Spiegel sowie die Spiegel möglicher Metabolite mit HPLC (siehe 2.6.3) gemessen.

2.6 Serum Analyse

2.6.1 Radioimmunoassay

Das Prinzip von Radioimmunoassays (RIA) beruht auf der Konkurrenz von in der Probe vorhandenem Hormon und radioaktiv markiertem Hormon (*Tracer*), welches in einer bekannten Aktivität zugegeben wird um Bindungsstellen eines primären Antikörpers. Der Primärantikörperkomplex wird anschließend gefällt, um ungebundenen *Tracer* zu entfernen. Die erhaltene Aktivität der Proben ist umgekehrt proportional zur Menge an Hormon in der Probe und kann über eine Standardkurve ausgewertet werden.

Folgende Hormone wurden mit kommerziell erhältlichen Kits nach Anweisung des Herstellers bestimmt:

- T3 (Active® T3, DSL, Sinsheim)
- T4 (Active® Thyroxin, DSL)
- fT3 (RIAZENco FT3, ZenTech, Angleur, Belgien)
- fT4 (RIAZENco FT4, ZenTech)

Folgende Hormone wurden mit im Labor entwickelten Assays gemessen:

- LH
- TSH
- GH
- Prolaktin

Die *Tracer* für die Bestimmung von LH, TSH, GH und Prolaktin wurden nach Hunter *et al.* (1962) mit ^{125}J markiert.

Das entsprechende Probenvolumen (siehe Tabelle 2-2) wurde zunächst mit 1 % BSA (Albumin bovine Fraction V, Serva) in PBS auf 500 μl aufgefüllt. Anschließend wurden 200 μl Primärantikörper (1:4.000 verdünnt mit Kaninchenserum [1:300 verdünnt in PBS]) zugegeben und für 24 h bei 4°C inkubiert.

Nach der Zugabe von 100 μl iodiertem *Tracer* (etwa 20.000 cpm) und einer Inkubation von 24 h bei 4°C erfolgte die Zugabe des 1:30 in PBS verdünnten Zweitantikörpers (Antiserum gegen Kaninchen-IgG). Nach einer weiteren Inkubation von 48-72 h bei 4°C wurden alle

2. Material und Methoden

Proben mit 2 ml PBS versetzt und bei 2000 g für 60 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Proben wurden mindestens 10 Minuten im Gamma-counter (Wizard 1470, Wallac [Perkin-Elmer]) gezählt. Die Auswertung erfolgte mit dem Programm RIA-CALC Ver.2.7 (Wallac).

In jedem Assay wurden die spezifische und unspezifische Bindung, die Totalaktivität und 10 Standardpunkte in Dreifachbestimmung gemessen.

Tabelle 2-2: Übersicht über verwendete Probenvolumina und Präparate

	GH	LH	TSH	Prolaktin
Probenvolumen				
Serum	100 µl	10 µl	50 µl	25 µl
Zellkultur	-	25 µl	50 µl	-
Referenz- Präparat	NIADDK GH-RP-2	NIADDK Rat-LH RP-2	NIADDK TSH-RP-2	NIADDK Rat-Prol-RP-3
Iodierungs- Präparat	NIADDK Rat- GH-I-5	NIADDK Rat- LH I-6	NIADDK Rat- TSH-I-9	NIADDK Rat- Prol-I-5
prim. Antiserum	NIADDK Anti-Rat-GH- AK S 5	NIADDK Anti-Rat LH- AK S 10	NIADDK Anti-Rat-TSH- AK S 5	laboreigenes Kaninchen- Antiserum (#2)
Bereich der Standardkurve	0,01-32 ng/Röhrchen	0,005-5,12 ng/Röhrchen	0,01-10 ng/Röhrchen	0,1-128 ng/Röhrchen

Das verwendete Probenvolumen hing von der Konzentration des Hormons im Serum, von der Art des Hormons sowie vom Alter des verwendeten *Tracers* ab. Die Referenzpräparate sowie die Iodierungspräparate und die primären Antiseren wurden vom *National Hormone and Pituitary Program* (NHPP) des NIH zur Verfügung gestellt.

Estradiol im Serum wurde nach einem leicht abgewandelten Testprinzip bestimmt. Der *Tracer* war in diesem Fall nicht radioaktiv, sondern mit einem Ruthenium-Komplex markiert, der nach Anlegen einer Spannung ein Lumineszenz-Signal abgibt, welches über einen Photomultiplier detektiert wurde (Elektrochemilumineszenz-Immunoassay, ECLIA). Die

Bestimmung erfolgte mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Estradiol II, Roche) nach Anleitung des Herstellers auf einem Elecsys 2010 (Roche)

2.6.2 Metabolische Parameter

Die Bestimmung der metabolischen Parameter erfolgte über optisch-enzymatische Tests auf einem Hitachi 902 Automatic analyzer (Roche, Mannheim). Folgende Parameter wurden mit kommerziell erhältlichen Kits nach Anleitung des Herstellers bestimmt:

- Cholesterin (Cholesterin CHOD-PAP, Roche)
- HDL (HDL-Cholesterin 2nd generation, Roche)
- LDL (LDL-Cholesterin 2nd generation, Roche)

2.6.3 HPLC

2.6.3.1 Hydrolyse

Für die Analyse von BP2 im Serum wurden 500 µl (300 µl im Kinetikversuch) aufgearbeitet. Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen NH₄-Acetat Puffer (0,1 M, pH 5,0) verdünnt. Um mögliche Metabolite (Sulfate und Glucuronide) mit zu bestimmen, wurde jeder Probe 1 mg β-Glucuronidase aus *Helix pomatia* zugegeben und bei 37°C über Nacht inkubiert. Kontrollseren wurden analog behandelt.

Zur Bestimmung der Konzentration von freiem BP2 im Serum wurden jeweils 500 µl Serum ohne Glucuronidase-Behandlung extrahiert.

- *Helix pomatia* β-Glucuronidase Typ H1 (Kat.Nr: G-0751, Sigma),
Glucuronidase-Aktivität >300.000 U/g, Sulfatase-Aktivität >10.000 U/g

2.6.3.2 Extraktion

Die Proben wurden nach der Inkubation über Strata X-Säulen mit einer Bettmasse von 60 mg und einem Säulenvolumen von 3 ml (8B-S100-UBJ, Phenomenex, Aschaffenburg) extrahiert. Die Säulen wurden mit 3 ml Methanol konditioniert und mit 3 ml H₂O equilibriert. Nach dem Beladen mit den Proben wurde mit 3 ml 5 % Methanol gewaschen und mit 3 ml 100 % Methanol eluiert.

2. Material und Methoden

Die Proben wurden anschließend lyophilisiert und mit 500 µl (300µl im Kinetikversuch) 25 % Acetonitril rekonstituiert. Vor dem Auftragen auf die HPLC wurde jede Probe durch einen Filter (Millex®-HV Syringe driven filter unit, 0,45 µm/4mm, Millipore, Schwalbach) gegeben, um eventuell noch vorhandene Partikel zu entfernen.

2.6.3.3 HPLC-Geräte und Laufbedingungen

Säule	NC 250 x 4,6 mm Hypersil-ODS 5,0 µm Part-Nr: 2546 1805, Ser.-Nr: 2711C30	Bischoff, Leonberg
Vorsäule	Guard 7,5 x 4,6 mm SS Jour-Guard RP/C18 5,0 µm Part-Nr: 69080, Ser.-Nr: 2110362.1	Jasco, Groß-Umstadt
Autosampler	851-AS Intelligent Sampler	Jasco
Injektionsvolumen	100 µl (50 µl im Kinetikversuch)	
Pumpen	HPLC Pump K-501	Knauer, Berlin
Mischkammer	Dynamic mixing chamber	Knauer
Flussrate	1 ml/Minute	
UV-Detektion	2158 UVICORD SD 280 nm	LKB, Bromma, Schweden
Laufmittel	A: H ₂ O mit 0,085 % H ₃ PO ₄ B: 100 % Acetonitril	

Gradient

Tabelle 2-3: Lösungsmittelgradient der HPLC

Minuten	% A	% B
0	75	25
5	75	25
10	20	80
25	0	100
30	0	100
35	75	25

Die Auswertung der UV-Signale erfolgte mit *Chromgate Ver 2.8* (Knauer).

Die Auswertung der Peak-Flächen erfolgte über eine Standardkurve mit BP2 in einem Kontrollserum-Pool, welche analog zu den Proben behandelt wurde. Die Standardkurve umfasste 5 Punkte im Bereich zwischen 0,1 und 10 µg/ml.

2.6.4 Massenspektrometrie (HPLC-MS)

Die bei der Analyse der Proben per HPLC gewonnenen Daten wurden mittels Massenspektrometrie genauer untersucht. Dazu wurden 5 µl einer nicht mit Glucuronidase behandelten, extrahierten Serumprobe mit einem *Ion-Trap*-Massenspektrometer analysiert. Die Probe wurde vorher durch eine HPLC mit UV-Detektion aufgetrennt.

2.6.4.1 Geräte und Laufbedingungen

Säule	Supersher 100, 100 x 2 mm RP-C18 endcapped, 4 µm	
Autosampler	851-AS Intelligent Sampler	Jasco
Injektionsvolumen	5 µl	
Pumpe	RHEOS 4000	Flux Instruments, Basel, Schweiz
Flussrate	0,3 ml/Minute	
UV-Detektion	Diodenarray-Detektor UV6000LP	Thermo Electron, San Jose (CA), USA
Massenspektrometer	Finnigan LCQ	Thermo Electron
Laufmittel	A: H ₂ O mit 0,05 % HCOOH B: 90 % Acetonitril + 10 % Wasser mit 0,05 % HCOOH	

Gradient

Tabelle 2-4: Lösungsmittelgradient

Minuten	% A	% B
0	90	10
5	90	10
20	0	100
25	0	100
27	90	10
32	90	10

2.7 Molekularbiologische Arbeiten

2.7.1 Arbeiten mit Nukleinsäuren

Zur Vermeidung von Kontaminationen mit Ribonukleasen (RNasen) wurden alle Arbeiten mit Ethanol-gewaschenen Handschuhen durchgeführt. Glaswaren wurden 12 Stunden bei 240°C sterilisiert und Plastikwaren wurden bei 120°C für 20 Minuten autoklaviert. Lösungen wurden entweder als sterile, RNase-freie Stammlösungen gekauft oder mit 1 ml Velcorin® (Dimethylpyrocarbonat, Bayer, Leverkusen) je 1 l Lösung für 4 Stunden inkubiert und anschließend autoklaviert (H_2O_{velc}).

2.7.2 RNA-Extraktion

Die Extraktion der RNA aus den entnommenen Geweben erfolgte mit RNeasy® Kits (Qiagen, Hilden).

- Stücke des tiefgefrorenen Gewebes (Leber und Uterus) wurden dazu mit einem Gewebe-Homogenisator (Micro-dismembrator™, Braun) 15 Sekunden bei 2500 Upm zerkleinert. Etwa 50 mg des Pulvers wurden in Lysispuffer aufgenommen.
- Die Adenohypophyse wurde mit einer Kanüle in einem Eppendorf-Cup in 350 µl Lysispuffer zerkleinert.
- Ein Schilddrüsenlappen wurde in 400 µl Lysispuffer mit einem Ultra-Turrax (TP18/10, IKA Labortechnik, Staufen) homogenisiert.
- Das Gehirn wurde auf ein Gefriermikrotom (Frigomobil 1206, Reichert-Jung, Bielefeld) mit Tissue-Tek® (Sakura Fintek, Zoeterwoude, Niederlande) aufgefroren. Es wurden frontale Serienschnitte von 600 µm Dicke angefertigt. Der mediobasale Hypothalamus (MBH) wurde nach der Methode von Palkovits (1973) isoliert. Die entsprechenden Koordinaten wurden nach Paxinos *et al.* (1998) ermittelt. Die Gewebestückchen wurden in 500 µl Lysispuffer homogenisiert.

Die lysierten Proben wurden 15 Sekunden in einem Ultraschallbad homogenisiert und anschließend über QIAshredder™-Säulen (Qiagen) gegeben. Das Eluat wurde auf die Extraktionssäule gegeben und entsprechend der Anleitung des Herstellers aufgereinigt. Zur Entfernung der DNA wurde während der Aufreinigung ein 15minütiger DNase-Verdau nach Herstellerempfehlung (RNase-free DNase Set, Qiagen; 27,3 Kunitz units je Probe) durchgeführt. Die gereinigte RNA wurde mit H_2O_{velc} eluiert.

Tabelle 2-5: Verwendete Lysispuffer- und Elutionsvolumina bei den jeweiligen RNA-Aufreinigungen

	Lysispuffervolumen (in μl)	Elutionsvolumen (in μl)
Hypothalamus (MBH)	500	50
Adenohypophyse	350	50
Schilddrüse	400	35
Leber	600	50
Uterus	500	50

2.7.3 Konzentrationsbestimmung der RNA

Zur Bestimmung der Konzentration wurden 5 μl der RNA-Lösung in 75 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Velc}}$ verdünnt und in Quarzküvetten (Suprasil®, Hellma, Müllheim) in einem Photometer (Biophotometer, Eppendorf, Hamburg) bei 260 und 280 nm gegen den Leerwert gemessen. Einer optischen Dichte (OD) von 1 bei 260 nm entspricht dabei näherungsweise eine Konzentration von 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Aus dem Quotienten $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ lässt sich die Reinheit der Lösung bestimmen, da aromatische Aminosäuren bei 280 nm absorbieren und so einen Hinweis auf Proteinverunreinigungen in der Lösung geben können. Der ideale Quotient liegt bei 1,8, niedrigere Werte weisen meist auf Proteinverunreinigungen hin.

2.7.4 Reverse Transkription (RT)

In der RT wird die gewonnene RNA in cDNA umgeschrieben, um als Vorlage für die sich anschließende *real time detection*-PCR dienen zu können. Dazu wurde eine murine retrovirale reverse Transkriptase ohne RNase-Aktivität eingesetzt.

Für die RT wurde die RNA-Lösung auf 20 $\text{ng}/\mu\text{l}$ mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{Velc}}$ eingestellt. In der Reaktion wurden jeweils 200 ng eingesetzt.

Nach der Zugabe von 3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Velc}}$ und 1 μl *Random-Primer* (Invitrogen, Karlsruhe; 1:30 verdünnt in $\text{H}_2\text{O}_{\text{Velc}}$) wurde der Ansatz zur Denaturierung von Sekundärstrukturen für 10 Minuten bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde zu jeder Probe ein Mastermix aus folgenden Bestandteilen zupipettiert:

- Mastermix: 1 µl reverse Transkriptase (M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus, Point Mutant, Promega)
4 µl Puffer (Bestandteil des RT-Sets)
1 µl 10 mM dNTP-Mix (Invitrogen)
0,1 µl RNasin® (Recombinant RNasin® Ribonuclease Inhibitor, Promega)

Die Anlagerung der Primer erfolgte bei 22°C für 10 Minuten, die Gegenstrangsynthese anschließend bei 42°C für 50 Minuten. Abschließend folgte ein Denaturierungsschritt bei 95°C für 10 Minuten. Die Ansätze wurden anschließend kurz abzentrifugiert und bei -20°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.7.5 Real time detection-PCR (RTD-PCR)

Bei der *real time detection*-PCR kamen in diesem Fall genspezifische Sonden zum Einsatz, an welche am 5'-Ende ein Reporterfluoreszenzfarbstoff (6-Carboxy-fluorescein, FAM) und am 3'-Ende ein Quencherfarbstoff (6-Carboxy-tetramethyl-rhodamin, TAMRA) gekoppelt wurde (TaqMan™-Prinzip)(Cardullo *et al.* 1988; Livak *et al.* 1995). Die Kombination dieser beiden Farbstoffe ermöglicht einen Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer. Wenn der Reporterfarbstoff durch Licht einer bestimmten Wellenlänge (hier 488 nm) angeregt wird, strahlt er Licht einer anderen Wellenlänge (hier 518 nm) ab, welches wiederum von einem räumlich benachbarten Quencherfarbstoff-Molekül aufgenommen werden kann. Während der Reaktion wird das vom Reporterfarbstoff abgegebene Licht registriert und ausgewertet. Durch die 5'-3'-Exonukleaseaktivität (Holland *et al.* 1991) der eingesetzten *Taq*-Polymerase (AmpliTaq DNA-Polymerase) wird die an die DNA gebundene Sonde im Verlauf der Elongation abgebaut. Die dabei auftretende räumliche Entfernung der beiden Farbstoffe führt zur Unterbrechung des Energietransfers und damit zur Erzeugung eines detektierbaren Fluoreszenzsignals des Reporterfarbstoffes. Die Signalstärke ist dabei proportional zur Produktkonzentration.

2. Material und Methoden

In dieser Arbeit wurden bereits im Labor vorhandene und validierte Systeme benutzt (Sequenzen im Anhang, siehe Tabelle 7-1). Das System für Cyp11a1 wurde neu erstellt. Primer und Sonden wurden von Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

- Reaktionsansatz: 12,5 µl Puffer mit 3,5 mM MgCl₂ (qPCR™ Core Kit, Eurogentec)
0,25 U Uracil-N-glycosylase (Eurogentec)
50 – 900 nM jedes Primers (Konzentrationen siehe Tabelle 2-6)
225 nM Sonde
2 – 4 µl cDNA

Das Volumen wurde mit H₂O_{Velc} auf 25 µl aufgefüllt.

Die Reaktionen für die einzelnen Gene wurden in 96-well Platten (96 well Multiply®-PCR-Plate, Sarstedt) pipettiert und mit optischen Deckelketten (0,2 ml Biosphere®, Sarstedt) verschlossen. Für jede Platte wurden mindestens 7 Standardpunkte in Doppelbestimmung und 6 Kontrollen ohne DNA zur Kontrolle auf Kontaminationen mitgeführt.

Die RTD-PCR wurde in einem ABI PRISM™ 7700 *Sequence detector* (Perkin Elmer) für 40 Zyklen durchgeführt.

- Programm:
 1. 94°C – 180 Sekunden
 2. 94°C – 30 Sekunden
 3. 60°C – 90 Sekunden
Schritte 2-3 39 mal wiederholt
 4. 72°C – 10 Minuten

Die Auswertung der Daten erfolgte mit dem Programm *Sequence Detection Systems* (Ver. 1.9.1) von Applied Biosystems (Darmstadt) im exponentiellen Teil der Reaktion.

Tabelle 2-6: Primerkonzentrationen für die einzelnen RTD-PCR-Ansätze

	ERα	C3	alle anderen Gene
forward (nM)	50	900	300
reverse (nM)	900	900	300

2.7.6 Herstellung der Standardkurven

Zur Herstellung von Standardpunkten wurde zunächst in einer normalen PCR (Mullis *et al.* 1987) mit genspezifischen Primern (siehe Tabelle 7-1) die DNA amplifiziert.

- Reaktionsansatz: 45 µl PCR SuperMix (Invitrogen)
25 nM jedes Primers
0,5 µl H₂O_{Velc}
4µl cDNA
- Programm:
 1. 95°C – 180 Sekunden
 2. 95°C – 30 Sekunden
 3. 60°C – 90 Sekunden
Schritte 2-3 39 mal wiederholt
 4. 72°C – 30 Minuten
 5. 4°C – Pause

Nach einer Aufreinigung des Produktes (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham Biosciences, Freiburg) nach Herstellervorschrift und der Kontrolle der Amplifikation auf einem Agarosegel wurden 4 µl des Produktes in eine zweite PCR eingesetzt (Ansatz siehe oben). Dabei wurde an die Gensequenz mit Hilfe eines Primers ein T7-Promoter angefügt.

- Programm:
 1. 95°C – 180 Sekunden
 2. 95°C – 30 Sekunden
 3. 60°C – 30 Sekunden
 4. 72°C – 30 Sekunden
Schritte 2-4 25 mal wiederholt
 5. 95°C – 30 Sekunden
 6. 72°C – 60 Sekunden
Schritte 5-6 35 mal wiederholt
 5. 4°C – Pause

Das aufgereinigte und durch Agarose-Gelelektrophorese kontrollierte Produkt wurde anschließend in eine *in vitro*-Transkription eingesetzt, welche bei 37°C über Nacht inkubiert wurde.

- Reaktionsansatz: 1 µl Transkriptionspuffer
je 1µl ATP, GTP, CTP und UTP (75 nM)
1 µl T7-MEGAshortscript™ Enzym Mix (Ambion, Huntingdon, UK)
4 µl DNA

Im Anschluss an die Reaktion wurden 0,5 µl DNase zugegeben und für weitere 15 Minuten bei 37°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 57,5 µl Wasser und 7,5 µl Stopplösung (5 M Ammoniumacetat, 100 mM EDTA) zu jedem Ansatz pipettiert und gemischt. Das Produkt wurde anschließend durch eine Phenol-Chloroform-Extraktion aufgereinigt. Dazu wurden 75 µl puffergesättigtes Phenol/Chloroform (5:1) zugegeben und gut gemischt. Die Ansätze wurden 5 Minuten bei 10.000 g zentrifugiert, um die Phasen zu trennen. Die wässrige Phase wurde mit 75 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) versetzt und erneut gut gemischt. Nach einer Zentrifugation von 5 Minuten bei 10.000 g wurde die wässrige Phase mit 150 µl Ethanol (100 %) versetzt und über Nacht bei -20°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben bei 10.000 g für 15 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % EtOH gewaschen, getrocknet und in 10-50 µl Wasser aufgenommen. Die so gewonnene RNA wurde analog zu den Proben verdünnt und in eine RT-Reaktion (siehe 2.7.4) eingesetzt.

2.7.7 Herstellung des Cyp1a1-TaqMan™ -Systems

Als Grundlage für die Auswahl von Primern und Sonde wurde die Sequenz von Cyp1a1 der Ratte (GenBank® *Accession*-Nummer: NM_012540, Cyp1a1-mRNA, *Rattus norvegicus*) verwendet.

Um die Amplifikation genomischer DNA auszuschließen, wurden die beiden Primer auf unterschiedliche Exons gelegt. Die Sonde überspannte die Exongrenzen.

Bei der Auswahl der Sonde wurde auf einige Aspekte besonderer Wert gelegt:

- Länge 20-30 Basen, GC-Gehalt 40-60 %
- Schmelzpunkt etwa 5°C unter dem der Primer
- Möglichst nicht mehr als 3 gleiche Basen hintereinander
- Am 5'-Ende kein G
- Keine Komplementarität zwischen der Sonde und den Primern

Die Ableitung von Primern und Sonde erfolgte mit dem Programm *Primer Express*, Ver. 1.5 (Applied Biosystems, Darmstadt).

Das erhaltene Amplifikat wurde kommerziell sequenziert (SEQLAB Sequence Laboratories, Göttingen), um die Sequenz verifizieren zu können.

2.8 Proteinarbeiten

2.8.1 Analyse der Proteinexpression des Natrium/Iodid-Symporters

Unterschiede in der Expression des Natrium/Iodid-Symporters sollten in einem Western-Blot untersucht werden.

2.8.1.1 Proteinextraktion aus Schilddrüsen

Alle Arbeiten wurden auf Eis ausgeführt.

Zwei Schilddrüsenlappen wurden in 500 µl Homogenisationspuffer mit einem Ultra-Turrax (TP18/10, IKA Labortechnik) homogenisiert und für 15 Sekunden mit Ultraschall (Sonifier B12, Branson Instruments, Danbury [CT], USA) behandelt. Anschließend wurden ungelöste Bestandteile für 10 Minuten bei 15.000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und bei -70°C gelagert. 10 µl einer 1:10-Verdünnung in Homogenisationspuffer wurden für eine Proteinbestimmung (siehe 2.4.3.1) eingesetzt.

Homogenisationspuffer 250 mM Saccharose
10 mM Tris-HCl, pH 7
5 mM NaCl
1 mM EDTA
1 Tablette Protease Inhibitor Cocktail (CompleteMini,
EDTA-frei, Roche) auf 10 ml

2.8.1.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Auftrennung der Proteine erfolgte nach Laemmli (1970) auf einem 7,5 % Polyacrylamid-Gel (80 x 73 x 0,75 mm) mit einem 5 %igen Sammelgel in einer Mini PROTEAN® 3 Cell (Bio-Rad). Die Proben wurden vor dem Auftragen mit Homogenisationspuffer auf eine Proteinkonzentration von 3,5 mg/ml verdünnt und mit 4x Probenpuffer (Roti®-Load 1, Roth) versetzt. Anschließend wurden die Proben 5 Minuten auf 95°C erhitzt, bevor sie auf das Gel aufgetragen wurden.

- Trenngel 1,25 ml 30 % Acrylamid
1,88 ml Trenngelpuffer
1,78 ml H₂O
50 µl 10 % SDS in H₂O
40 µl 10 % Ammoniumperoxodisulfat (APS) in H₂O
4 µl N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)
- Trenngelpuffer 1 M Tris-HCl pH 8,8
- Sammelgel 0,333 ml 30 % Acrylamid
0,250 ml Sammelgelpuffer
1,39 ml H₂O
20 µl 10 % SDS in H₂O
10 µl 10 % APS in H₂O
2 µl TEMED
- Sammelgelpuffer 1 M Tris-HCl pH 6,8
- Laufpuffer (10x) 144 g Glycin
30 g Tris
10 g SDS
auffüllen auf 1 l mit H₂O_{dest}, pH 8,9

2.8.1.3 Semi-Dry-Blot

Nach der Elektrophorese wurden die Proteine auf einer Nitrozellulose-Membran (Porengröße: 0,2 μm , Sartorius, Göttingen) mit Hilfe einer Semi-Dry-Blot Kammer (FastBlot, Bio-Rad) immobilisiert. Die Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Membran und Gel wurden zwischen 6 Lagen, mit Transferpuffer getränktem, Gel Blotting-Papier (GB003, Schleicher & Schuell, Dassel) in die Kammer gelegt. Der Blot erfolgte unter Wasserkühlung für 30 Minuten bei etwa 3 mA/cm² Gelfläche.

- Transferpuffer 5,8 g Tris-Base
2,9 g Glycin
0,375 g SDS
200 ml Methanol
auffüllen auf 1 l mit H₂O_{dest}

Die Membran wurde anschließend mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure, Sigma) 15 Minuten auf einem Schüttler inkubiert. Die Membran wurde anschließend kurz in Wasser entfärbt und gescannt. Mit Hilfe einer geeigneten Software (ds 1D, Kodak, New Haven (CT), USA) wurden die Banden im Bereich zwischen 30 und 100 kDa densitometrisch ausgewertet, um die gleichmäßige Beladung aller Spuren zu überprüfen.

2.8.1.4 Natrium/Iodid-Symporter (NIS)-Proteinexpression

Die Membran wurde anschließend in PBS mit 1 % Tween-20 (TPBS) und 7 % Trockenmilchpulver (Amersham) für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, um überschüssige Proteinbindstellen der Membran abzusättigen. Die Membran wurde 3-mal 5 Minuten in TPBS gewaschen und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem Primärantikörper (1:2500 in TPBS verdünnt) inkubiert. Nach drei Waschschritten in TPBS wurde der Sekundärantikörper für 1 h zugegeben. Vor der Inkubation in Diaminobenzidin-Lösung (1:50 in Substratpuffer, [Envision, Dako Cytomation, Hamburg]) für 1 Minute erfolgten drei weitere Waschschriffe in TPBS.

Die Membran wurde anschließend eingescannt und analog zu 2.8.1.3 ausgewertet.

Tabelle 2-7: Details der verwendeten Antikörper

	Hersteller	Kat.Nr.	erzeugt in	Gegen	Typ
Primär-antikörper	Acris Antibodies, Hiddenhausen	EUD4101	Kaninchen	Ratte	Ig-Fraktion, polyclonal
Sekundär-antikörper	Dianova, Hamburg	111-035-144	Ziege	Kaninchen	polyklonal, HRP-gekoppelt

2.8.2 Typ I/II 5'-Deiodase (5'DI/II)-Assay

In diesem Assay wurden die Aktivitäten von zwei Isoformen der 5'-Deiodase (Typ I und II) bestimmt. Deiodasen werden gewebe- und entwicklungspezifisch exprimiert und sind für die Bereitstellung und auch in geringerer Masse für den Abbau von T3 verantwortlich. In diesem Assay wurde die Aktivität der Typ I- und II-Deiodase durch die Abspaltung eines Jodatoms von ¹²⁵Jod-markiertem reversen T3 gemessen. Durch die Zugabe von 6-n-Propyl-2-thiouracil (PTU) wird spezifisch die Typ I-5'Deiodase gehemmt. Dadurch kann die Aktivität der Typ II-5'Deiodase bestimmt werden.

2.8.2.1 Proteinextraktion

Stücke des tiefgefrorenen Lebergewebes wurden mit einem Gewebe-Homogenisator (Microdismembrator™, Braun) 15 Sekunden bei 2500 Upm homogenisiert. Eine Spatelspitze des Gewebepulvers wurde in 500 µl Homogenisationspuffer auf Eis resuspendiert. Anschließend wurden die Proben auf Eis mit Ultraschall behandelt und sofort für 10 Minuten bei 10.000 g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde erneut in Homogenisationspuffer resuspendiert. Die Proteinkonzentration wurde analog zu 2.4.3.1 bestimmt. Für die Bestimmung der Aktivitäten wurden 20 µg Protein in 40 µl Homogenisationspuffer eingesetzt. Für die Bestimmung der 5'Deiodase-Gesamtaktivität (Typ I + II) wurden 10 µl H₂O_{dest} zugegeben beziehungsweise 10 µl 10 mM PTU für die Bestimmung der Typ II-5'Deiodase-Aktivität.

- Homogenisationspuffer 250 mM Saccharose
 - 20 mM HEPES
 - 1 mM EDTA
 - pH 7,4 einstellen
 - vor Gebrauch 1 mM Dithiothreitol zugeben

2. Material und Methoden

- 10 mM PTU-Lösung 1,7 g PTU (MP Biomedicals, Irvine [CA], USA)
80 ml 40 mM NaOH
unter Zugabe von 0,1 M NaOH lösen
anschließend 1:10 mit 40 mM NaOH verdünnen

2.8.2.2 Assay

Zunächst wurde der *Tracer* zur Entfernung von Abbauprodukten über Sephadex LH20-Säulen aufgereinigt. Die Säulen wurden mit 3 ml 0,1 N HCl gespült, bevor der *Tracer* auf die Säule aufgetragen wurde. Anschließend wurde mit 3 ml 0,1 N HCl und 3 ml Wasser gespült. Der *Tracer* wurde mit 1 ml EtOH/NH₄OH (49:1) eluiert. Das Eluat wurde 5 Minuten bei 2.000 g zentrifugiert und anschließend unter leichtem Stickstoffstrom in einem handwarmen Wasserbad eingedampft. Der *Tracer* wurde in Substratmix resuspendiert. Im Assay wurden je Probe 50 µl *Tracer*-Substratmix mit etwa 5000 cpm eingesetzt.

Um die Reaktion zu starten, wurden 50 µl *Tracer*-Substratmix zu den 50 µl Proteinextrakt pipettiert. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C wurden 50 µl Stopp-Lösung zupipettiert und gemischt. Die Proben wurden mit 400 µl 10 %iger Trichloressigsäure versetzt, 5 Minuten bei 14.000 g zentrifugiert und der Überstand anschließend auf AG 50W-X2-Säulen (Bio-Rad) gegeben, welche zuvor 2 mal mit 2 ml 10 %iger Essigsäure gespült wurden. Durch Zugabe von 2 ml 10 %iger Essigsäure erfolgte die Elution des freien ¹²⁵J⁻ in Zählröhrchen, welche anschließend im Gamma-Counter (Wizard 1470, Wallac (Perkin-Elmer) 10 Minuten gemessen wurden.

- Substrat-Mix 10 µl 1 M KPO₄-Puffer
2 µl 1 M Dithiothreitol
0,41 µl 40 mM NaOH
1 µl 0,1 M reverses T3
36,59 µl H₂O_{dest}
- Stopp-Lösung 10 g BSA
0 ml 0,1 M PTU-Lösung
auffüllen auf 100 ml mit H₂O_{dest}
- *Tracer* L-3,3',5'-[¹²⁵I]-Triiodothyronine ([¹²⁵I]-Reverse T₃),
11.9 MBq/ml (Kat.Nr.:NEX 109250UC, Perkin Elmer)

- KPO₄-Puffer
A: 43,55 g K₂HPO₄
0,93 g EDTA-Na-Dihydrat
auffüllen auf 250 ml mit H₂O_{dest}
B: 34,03 g KH₂PO₄
0,93 g EDTA-Na-Dihydrat
auffüllen auf 250 ml mit H₂O_{dest}
Lösung A mit Lösung B titrieren auf pH 6,8

2.8.3 Schilddrüsenperoxidase-Assay

Die Schilddrüsenperoxidase (TPO) ist ein Enzym in der apikalen Membran der Schilddrüse, welches die Oxidation von Iodid sowie den Einbau des Jods in Tyrosinreste des Thyreoglobulins katalysiert. Die TPO ist durch TSH stimulierbar und durch PTU hemmbar.

2.8.3.1 Proteinextraktion

Ein Lappen der Schilddrüse wurde in 1 ml Extraktionspuffer mit dem Ultra-Turrax zerkleinert. Die Suspension wurde 10 Minuten bei 1000 g und 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde bei 100.000 g und 4°C für 60 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 100 µl 200 mM Kaliumphosphat-Puffer aufgenommen und mittels Ultraschall homogenisiert. Die Proteinkonzentration wurde nach Bradford bestimmt (siehe 2.4.3.1).

- Extraktionspuffer 5 mM Kaliumphosphat-Puffer
200 mM Saccharose
1 mM EDTA
500 U/ml Katalase
auf pH 7,4 einstellen

2.8.3.2 Assay

- Reaktionsansatz: 250 µl 100 µM Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,4)
200 µl 100 mM Guaiacol (Sigma; in H₂O)
50 µg Membranprotein
auf 487,5 µl mit H₂O auffüllen
Start der Reaktion mit 12,5 µl 30 % H₂O₂

Die Reduktion von H₂O₂ wurde photometrisch bei 470 nm für 90 Sekunden verfolgt.

2.9 Histologie

2.9.1 Probenvorbereitung

Das linke Uterushorn wurde in 2 ml Formalin (4 % Paraformaldehyd in 0,01 M PBS) für 2 d fixiert. Anschließend wurde es quer in 3 Stücke geschnitten und in Einbettkassetten (Sarstedt) gegeben. Die Proben wurden 1 h in Leitungswasser gewässert und anschließend mit einem Einbett-Automaten (TP1020, Leica, Wetzlar) entwässert und mit flüssigem Paraffin durchtränkt.

Tabelle 2-8: Programm des Einbett-Automaten

Lösung	Zeit
50 % Ethanol	60 min
75 % Ethanol	80 min
75 % Ethanol	80 min
96 % Ethanol	80 min
96 % Ethanol	80 min
99 % Ethanol	80 min
99 % Ethanol	80 min
99 % Ethanol	80 min
Xylol	80 min
Xylol	80 min
Paraffin	60 min
Paraffin	60 min

Die Proben wurden anschließend mit Hilfe einer Paraffin-Ausgießstation (EG 1140C, Leica) so in Blöcken eingebettet, dass die Schnittflächen des Uterushorns parallel zur Schnittfläche der Blöcke lag. Alle 3 Proben eines Uterus wurden in einem Block eingebettet.

Nach dem Aushärten des Paraffins wurden von den Uteri mit einem Mikrotom (RM 2135, Leica) Dünnschnitte (3 µm) angefertigt, welche in warmem Wasser gestreckt und auf beschichtete Objektträger (Superfrost plus, Menzel, Braunschweig) aufgezogen wurden. Die Objektträger wurden anschließend bei 37°C getrocknet.

2.9.2 HE-Färbung

Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll entwässert und mit Hämatoxylin (Haematoxylin Mayer, Merck) und Eosin (0,25 % Eosin gelb [Merck] in 80 % Ethanol) (HE) gefärbt.

Tabelle 2-9: Protokoll der HE-Färbung

Lösung	Zeit
Xylol	3 x 10 min
99 % Ethanol	3 x 2 min
96 % Ethanol	2 x 2 min
75 % Ethanol	2 min
H ₂ O _{dest}	2 min
Hämatoxylin	2 min
Leitungswasser	5 – 10 min
Eosin	1 – 2 min
75 % Ethanol	2 min
96 % Ethanol	2 x 2 min
99 % Ethanol	3 x 2 min
Xylol	3 x 5 min

2.9.3 Auswertungskriterien

Die Schnitte wurden anschließend mikroskopisch ausgewertet. Dazu wurden die Morphologie der Zellen, die Dicke und das Erscheinungsbild bestimmter Zellschichten bestimmt. Die einzelnen Parameter waren:

- Zelldicke des Epithels des Endometriums
- Lage der Zellkerne des Epithels und Verhältnis der Flächen von Cytoplasma/Kern
- Form der Zellkerne der Zellen der *Lamina propria*

2.10 Statistische Auswertung

Alle Daten wurden vor der Auswertung auf ihre Plausibilität überprüft.

Die Daten wurden anschließend mit dem Grubbs-Test (Burke 2001) auf Ausreißer untersucht.

Verwendet wurde dazu folgende Formel:

$$G = \frac{|\bar{x} - x_i|}{s}$$

wobei \bar{x} den Mittelwert der Gruppe, x_i den Einzelwert und s die Standardabweichung darstellen.

Die erhaltenen Werte wurden mit den kritischen Werten für das 95 %-Konfidenzintervall verglichen. Lagen die erhaltenen Werte höher, wurde der Wert als Ausreißer betrachtet.

Bei den Genexpressionsdaten wurde der Mittelwert der Kontrollgruppen = 100 % gesetzt.

Alle anderen Behandlungsgruppen wurden dazu in Bezug gesetzt.

Alle Messwerte wurden mit *Prism*®, Ver.4 (GraphPad, San Diego [CA], USA) ausgewertet.

Die Daten wurden mit einem Kruskal-Wallis-Test (*One-Way analysis of variance* [ANOVA], nicht-parametrisch) und einem *Dunn's multiple comparison* Post-Test ausgewertet. Ein p-Wert von $\leq 0,05$ wurde als signifikant betrachtet (mit * oder # in Abbildungen markiert).

In den Graphen sind jeweils die Mittelwerte sowie der Standardfehler des Mittelwertes (*Mean* \pm *SEM*) angegeben. Sofern an den Graphen keine andere Einheit angegeben ist, wurden die Werte der einzelnen Gruppen auf den Mittelwert der Kontrollgruppe (=100 %) prozentrelativiert (% rel).

Dosis-Wirkungsbeziehungen wurden mit der PROAST-Software, Ver.02.R (Slob 2002) erstellt. Dieses Programm verwendet ineinander verschachtelte Gleichungen (1.-5.), um eine Kurve an die Daten zu modellieren

1. $y = a$
2. $y = a * \exp(b * x)$
3. $y = a * \exp(b * x^d)$
4. $y = a * (c - (c - 1) * \exp(b * x))$
5. $y = a * (c - (c - 1) * \exp(b * x^d))$

Die einzelnen Funktionen werden auf ihre Wahrscheinlichkeit mit einem *likelihood-ratio*-Test überprüft. Es wird das Modell ausgewählt, welches mit möglichst wenigen Variablen signifikant besser die Daten beschreibt als die vorhergehende Gleichung. Mit Hilfe dieser Funktion kann aus einer festgelegten Effekt-Größe (CES) die entsprechende Effekt-Dosis (CED) ermittelt werden. Die CES ist mathematisch definiert als $CES = f(CED) / f(0) - 1$.

In diesem Fall betrug die CES die einfache Standardabweichung der Kontrollgruppe. Die Schritte der Auswertung sind ausführlich in Woutersen *et al.* (2001) dargestellt.

3 Ergebnisse

3.1 Rezeptorbindungsassay

In Abbildung 3-1 ist die Verdrängung von radioaktiv markiertem E2 durch nicht markiertes E2 und durch BP2 von cytosolischen Komponenten gezeigt. Der EC_{50} für E2 liegt bei einer Konzentration von 0,47 nM der EC_{50} von BP2 bei einer Konzentration von 495 nM. E2 bindet etwa 1000-mal stärker an die Komponenten des Cytosols als BP2.

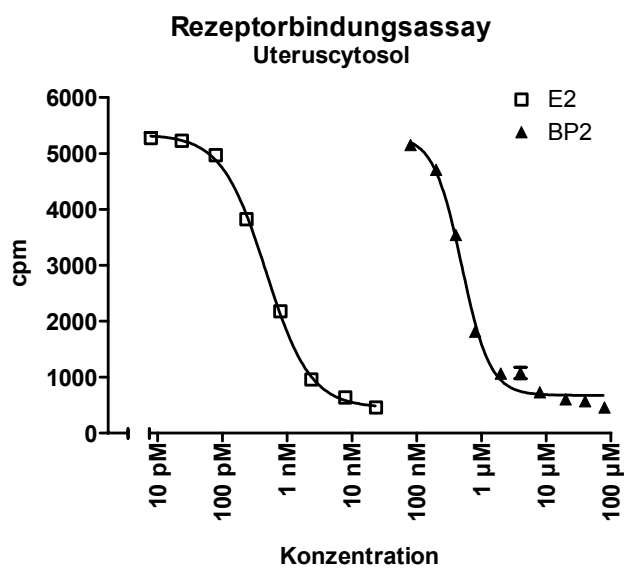


Abbildung 3-1: Rezeptorbindungsassay mit porcinem Uteruscytosol. Gemessen wurde die Verdrängung von radioaktivem E2 durch die Substanzen in den angegebenen Konzentrationen.

3.2 Zellkultur

3.2.1 Proliferationstest mit MCF-7-Zellen (E-Screen)

Die Proliferation von MCF-7-Zellen wurde durch die Behandlung mit BP2 in den Konzentrationen $1 \cdot 10^{-6}$ und $1 \cdot 10^{-5}$ M signifikant gesteigert. Von $1 \cdot 10^{-9}$ M bis $1 \cdot 10^{-7}$ M BP2 konnte kein Einfluss auf die Proliferation festgestellt werden. Eine Behandlung mit E2 in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-8}$ M hatte einen ähnlichen Einfluss auf die Proliferation wie die höchste Dosis BP2.

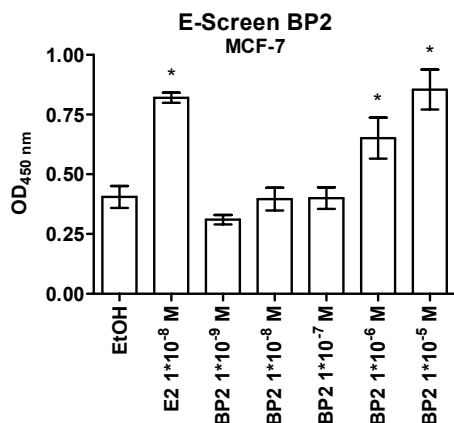


Abbildung 3-2: Einfluss von E2 und BP2 auf die Proliferation von MCF-7 Zellen. Die Umsetzung des Substrats wurde nach 5 Minuten abgestoppt und die OD bei 450 nm gemessen. * = signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (EtOH)

3.2.2 Transaktivierungsassays

Wie in Abbildung 3-3 zu erkennen, zeigte BP2 im Transaktivierungsassay bereits in einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M eine aktivierende Wirkung in MELN-ER β -Zellen. In MELN-ER α -Zellen zeigte sich die Aktivierung der Luciferase-Aktivität erst ab einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M und in MELN-Zellen, welche keinen der beiden Rezeptoren überexprimieren, wurde ab $3 \cdot 10^{-6}$ M BP2 eine Aktivierung beobachtet. Die ermittelten EC₅₀-Werte liegen für MELN-ER α bei 320 nM und für MELN-ER β bei 120 nM.

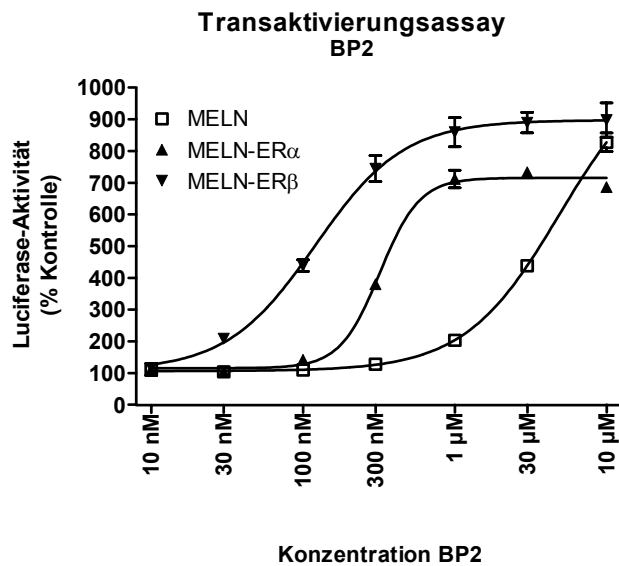


Abbildung 3-3: Luciferase-Aktivität nach Belastung der verschiedenen Zellen mit den angegebenen Konzentrationen BP2. Alle Werte wurden auf die Kontrollgruppe (EtOH) = 100 % bezogen.

3.2.3 EROD-Assay

Im EROD-Assay (Abbildung 3-4) wurde neben der Stimulation durch 3MC nur bei einer BP2-Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M eine signifikante Stimulation der EROD-Aktivität beobachtet. Bei dieser Konzentration wurde auch bei der Koinkubation mit $1 \cdot 10^{-6}$ M 3MC ein stimulierender Effekt beobachtet, welcher die Stimulation durch 3MC noch weiter verstärkte.

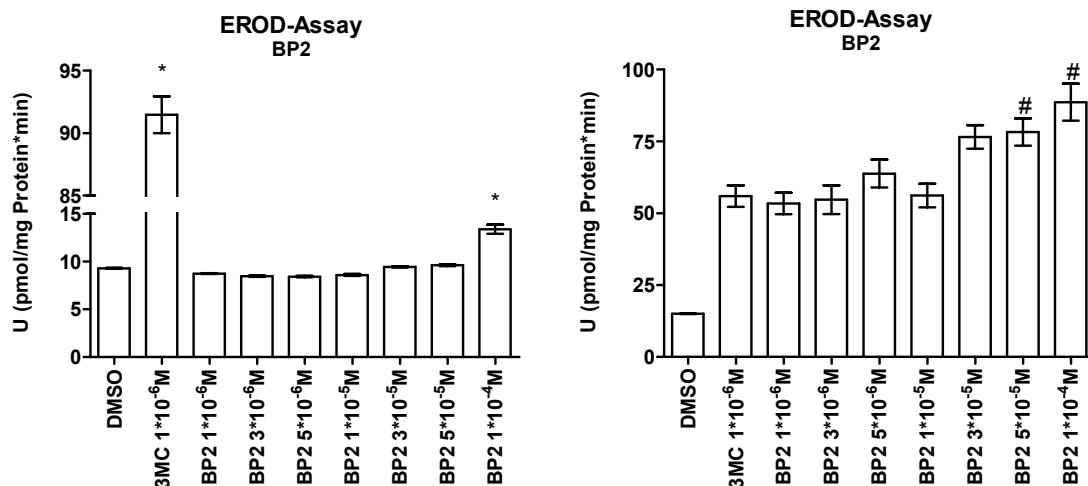


Abbildung 3-4: Ergebnisse der EROD-Assays für BP2. Der erste Graph zeigt die Stimulation durch BP2, der zweite Graph zeigt die Ergebnisse der Koinkubation mit $1 \cdot 10^{-6}$ M 3MC. * = signifikant gegenüber Lösungsmittel (DMSO), # = signifikant gegenüber 3MC

3.2.4 Hypothalamuszellkultur

Bei murinen Hypothalamuszellen zeigte sich eine Hemmung der GnRH-Sekretion bei einer Belastung mit E2 in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-9}$ M (Abbildung 3-5). Eine ähnliche Hemmung der Sekretion konnte auch bei Belastung der Zellen mit $1 \cdot 10^{-5}$ M BP2 gezeigt werden. Bei beiden Substanzen konnte die Hemmung durch eine Koinkubation mit ICI 182,780, einem Estrogen-Rezeptor-Antagonisten, in einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M aufgehoben werden.

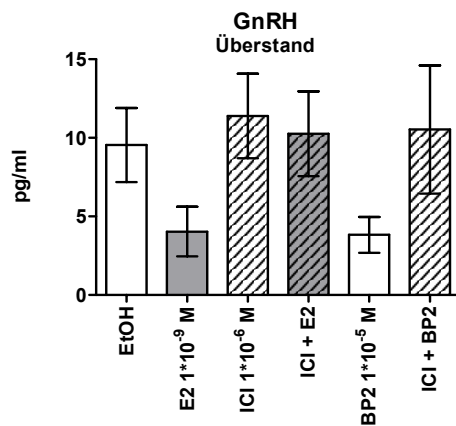


Abbildung 3-5: Messung der GnRH-Konzentration im Zellüberstand von GT1-7-Zellen. Die Belastung der Zellen erfolgte für 6 Stunden. ICI = ICI 182,780

3.2.5 Hypophysenzellkultur

Mit isolierten Ratten-Hypophysenzellen konnte nachgewiesen werden, dass die LH-Sekretion durch BP2 in Konzentrationen von $1 \cdot 10^{-5}$ M und $1 \cdot 10^{-6}$ M signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle gesteigert wurde (Abbildung 3-6). Dieser Effekt konnte durch eine Koinkubation mit ICI 182,780 in einer Konzentration von 10^{-6} M inhibiert werden. Auch die signifikante Stimulation der LH-Sekretion durch E2 konnte mit ICI inhibiert werden.

Die TSH-Sekretion der Hypophysenzellen wurde durch E2 und BP2 in den Konzentrationen $1 \cdot 10^{-5}$ und $1 \cdot 10^{-6}$ M signifikant gesteigert. Die Inkubation mit $1 \cdot 10^{-7}$ M BP2 zeigte eine leichte, jedoch nicht signifikante Stimulation der TSH-Sekretion. Diese stimulierenden Effekte konnten ebenfalls durch die Koinkubation mit ICI aufgehoben werden.

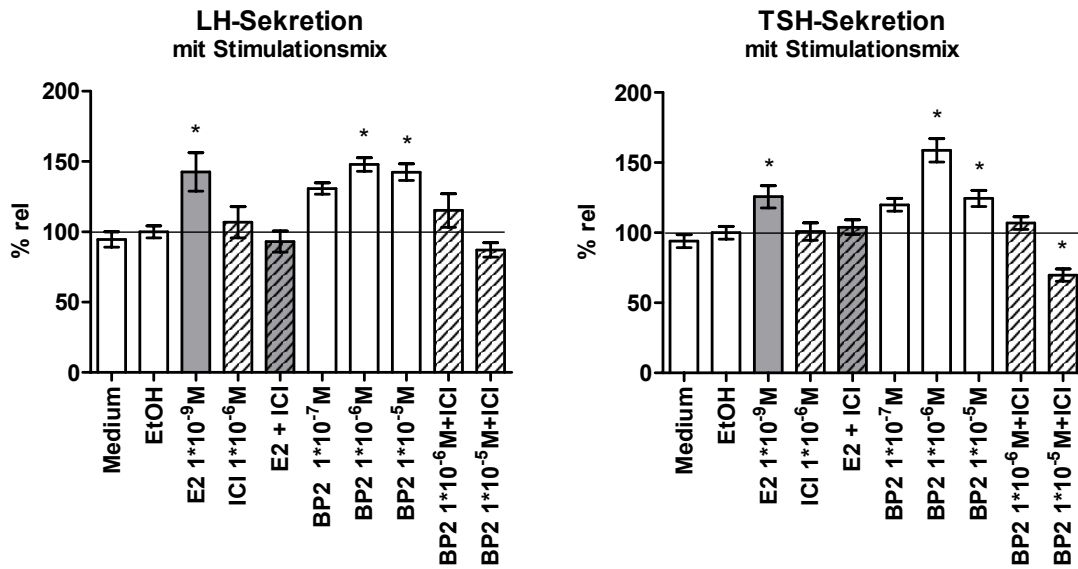


Abbildung 3-6: LH- und TSH-Sekretion in primären Rattenhypophysenzellen. Die Zellen wurden mit TRH und GnRH (jeweils 1*10⁻⁶ M) für 3 Stunden inkubiert. Die Werte wurden prozentrelativiert auf die Kontrollgruppe (EtOH + Mix). * = signifikant gegenüber der Lösungsmittelkontrolle (EtOH + Mix), Stimulationsmix = GnRH + TRH (beides 1*10⁻⁶ M), E2 = 17β-Estradiol, ICI = ICI 182,780

3.2.5.1 Viabilitätsbestimmung mittels MTT-Test

Im MTT-Test konnte keine signifikante Beeinträchtigung der Zellviabilität durch die Testsubstanzen in den eingesetzten Konzentrationen beobachtet werden (Abbildung 3-7).

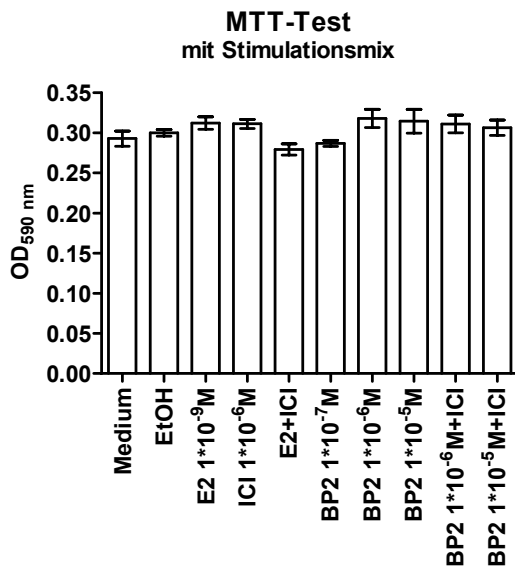


Abbildung 3-7: Auswirkungen der Testsubstanzen auf die Viabilität der Hypophysenzellen. Alle Gruppen wurden mit GnRH und TRH (jeweils 10⁻⁶ M) für 3 Stunden inkubiert.

3.3 Subakute Applikation von BP2

3.3.1 Körpergewicht

Alle Gruppen lagen bei Beginn der Behandlung bei einem durchschnittlichen Gewicht von $292,86 \pm 5,5$ g. Trotz einer leichten Gewichtsreduktion in der E2V-Gruppe auf durchschnittlich 278 g konnten keine signifikanten Unterschiede im Körpergewicht der Tiere nach fünf Tagen Behandlung beobachtet werden.

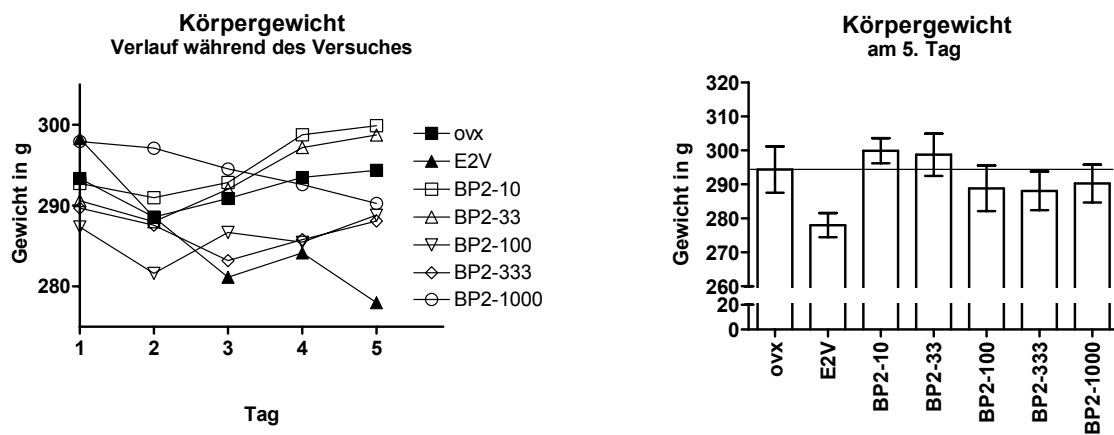


Abbildung 3-8: Entwicklung der Körpergewichte während der Behandlung und am letzten Tag. In der ersten Abbildung sind der Übersichtlichkeit wegen nur die Mittelwerte der Gruppen dargestellt.

3.3.2 Uterus

3.3.2.1 Uterusgewicht

Das Uterusgewicht in den Behandlungsgruppen zeigte deutliche Veränderungen gegenüber der ovx-Gruppe (Abbildung 3-9). Durch die E2V-Behandlung wurde fast eine Verdreifachung des Uterusgewichtes beobachtet. Auch in der BP2-1000-Gruppe wurde das Uterusgewicht verdreifacht. In den niedrigeren BP2-Gruppen 100 und 333 wurde eine leichte Erhöhung beziehungsweise eine Verdopplung des Uterusgewichtes gegenüber der ovx-Gruppe beobachtet.

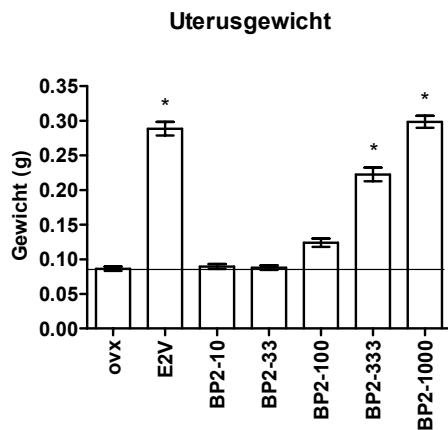


Abbildung 3-9: Absolute Uterusgewichte in den Behandlungsgruppen nach 5tägiger Behandlung. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.2.2 Histologie

Wie in Abbildung 3-10 zu erkennen, ist das Epithel des Endometriums bei allen Behandlungsgruppen meist einschichtig. Die Epithelzellen sind in der Kontrollgruppe klein und säulenförmig, die Zellkerne befinden sich in der Mitte der Zellen. Das Verhältnis Zytoplasma/Kern ist in diesen Zellen sehr klein. Bei den Gruppen E2V und BP2-1000 ist eine deutliche Streckung der Zellen in Richtung des Lumens zu beobachten. Das Ausmaß der Streckung ist in den beiden Gruppen etwa gleich. Der Zellkerne liegen in unterschiedlichen Positionen in den Zellen. Das Verhältnis von Zytoplasma zu Kern ist in diesen Zellen viel höher als in den Zellen der Kontrollgruppe.

Die Zellkerne der *Lamina propria*-Zellen sind in der Kontrollgruppe rund bis oval. In den beiden Behandlungsgruppen (E2V und BP2-1000) besitzen die Zellkerne dieser Zellen ein spindelförmiges Erscheinungsbild.

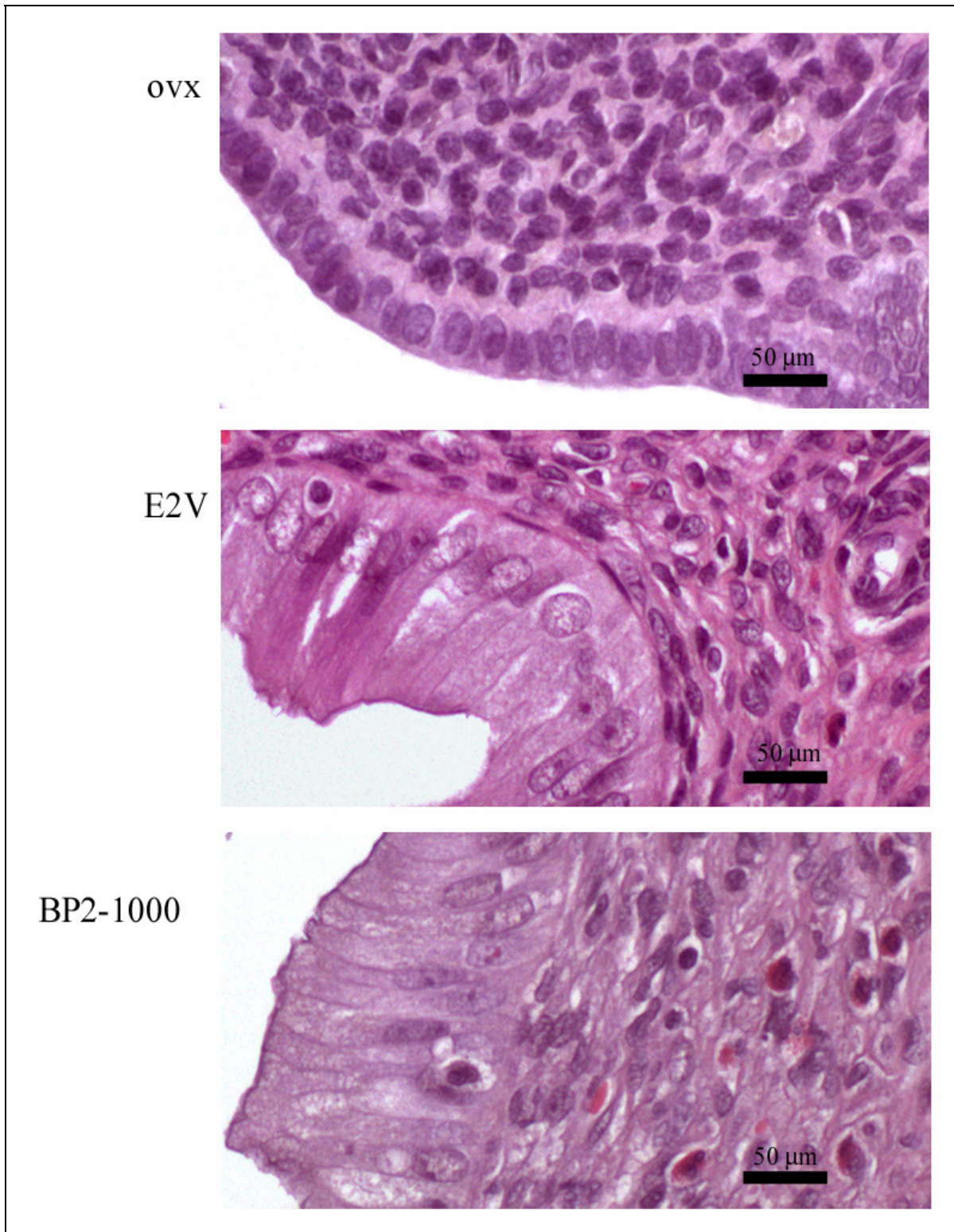


Abbildung 3-10: Histologisches Erscheinungsbild der Uteri nach 5 Tagen Behandlung mit Olivenöl (ovx), E2V oder BP2-1000. HE-Färbung der transversalen Uterus-Schnitte.

3.3.3 Serumanalyse

3.3.3.1 Serumkonzentration von Estradiol

Durch die Gabe von 600 µg/kg Kg E2V pro Tag wurden Estradiol-Serumspiegel von etwa 85 pg/ml erreicht (Abbildung 3-11). Damit liegen die erreichten Serumkonzentrationen etwas höher als die physiologischen Level, welche durch den Estradiolpeak während des Proestrus erreicht werden (etwa 50 pg/ml). Bei den ovariectomierten Tieren wurde eine durchschnittliche Serumkonzentration von 9 pg E2/ml gemessen.

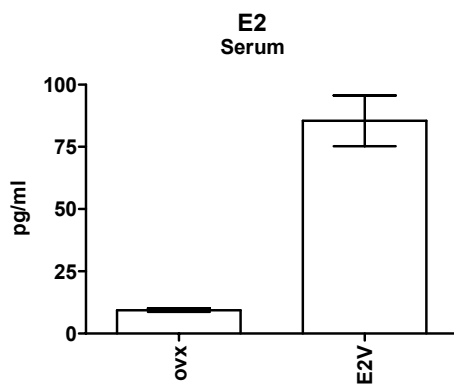


Abbildung 3-11: Serumkonzentration von Estradiol in der Kontrollgruppe (ovx) und in der E2V-Gruppe. Die Werte wurden mit einem ECLIA gemessen.

3.3.3.2 Serumkonzentration von Benzophenon-2

Zunächst wurden die Seren ohne Glucuronidase-Behandlung gemessen. Ein beispielhaftes Chromatogramm ist in Abbildung 3-12 gezeigt. Anhand der Standardkurve mit BP2 in Rattenserum konnte der Peak bei einer Retentionszeit von 11,9 Minuten (Peak 3 in der Abbildung) BP2 zugeordnet werden. Dosisabhängig wurden zwei weitere Peaks bei Retentionszeiten von 5,6 und 5,9 Minuten (Peaks 1 und 2) gefunden.

3. Ergebnisse

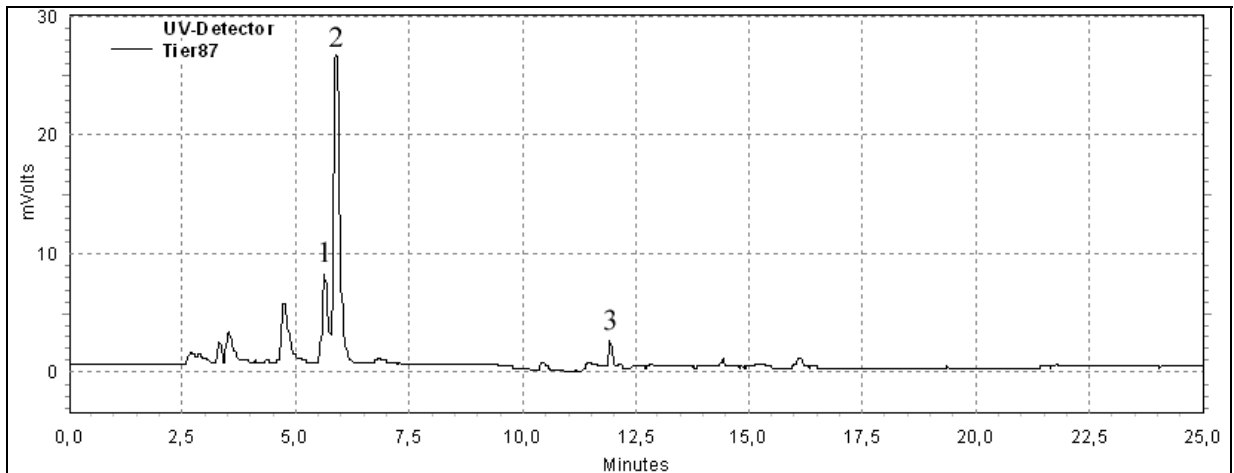


Abbildung 3-12: Beispiel eines Chromatogramms. Peak 3 entspricht dem freien BP2 mit einer Retentionszeit von 11,9 Minuten.

Anhand der Standardkurve wurden die Konzentrationen des freien BP2 im Serum der Versuchstiere bestimmt (Abbildung 3-13). Die niedrigen Gruppen bewegen sich im Bereich um 0,1 $\mu\text{g/ml}$, wobei in der BP2-33-Gruppe eine Konzentration von 0,2 $\mu\text{g/ml}$ gemessen wurde. Ein deutlicher Anstieg der Serumkonzentration von BP2 ist erst in der BP2-333-Gruppe sichtbar. In der höchsten Dosierung, BP2-1000, wurden Serumkonzentrationen von durchschnittlich 1,1 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Diese Konzentration entspricht 4,6 μM BP2.

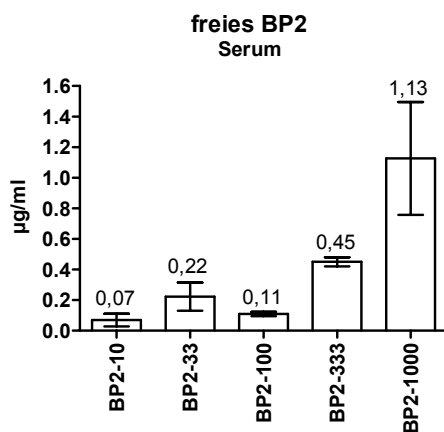


Abbildung 3-13: Serumkonzentrationen von freiem BP2 in den Behandlungsgruppen. Im Diagramm sind über den Balken die Mittelwerte angegeben.

3. Ergebnisse

Nach der Inkubation mit Glucuronidase aus *Helix pomatia* konnten die beiden zusätzlichen Peaks (1 und 2 in Abbildung 3-12) nicht mehr detektiert werden. Die Peakfläche der Reinsubstanz war dafür im Vergleich zu den unbehandelten Seren der gleichen Tiere entsprechend größer (Abbildung 3-14).

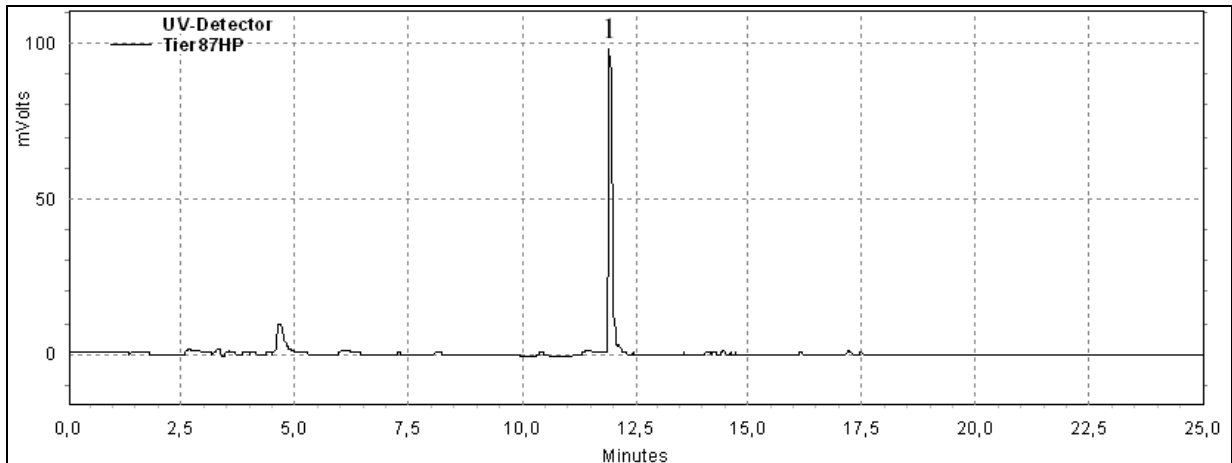


Abbildung 3-14: UV-Chromatogramm einer mit Glucuronidase behandelten Serumprobe. Die Probe entspricht, außer der Glucuronidasebehandlung der in Abbildung 3-12 verwendeten Probe. Es ist nur ein Peak (1) bei einer Retentionszeit von 11,9 Minuten erkennbar.

In Abbildung 3-15 sind die Serumkonzentrationen von BP2 aufgetragen, die nach der Behandlung des Serums mit Glucuronidase messbar waren. Hier zeigte sich im Gegensatz zum freien BP2 bereits in den niedrigen Gruppen, BP2-33 und BP2-100, ein Anstieg auf 2,3 beziehungsweise 6,4 $\mu\text{g/ml}$ ausgehend von einer Konzentration von 0,97 $\mu\text{g/ml}$ bei der BP2-10-Gruppe. Diese Werte liegen deutlich höher als die gemessenen Konzentrationen in den Seren ohne Glucuronidasebehandlung. In der BP2-333-Gruppe wurde eine Konzentration von 16,1 $\mu\text{g/ml}$ und in der BP2-1000-Gruppe eine Konzentration von 62,5 $\mu\text{g/ml}$ gemessen. Diese Konzentration entspricht 0,25 mM BP2.

3. Ergebnisse

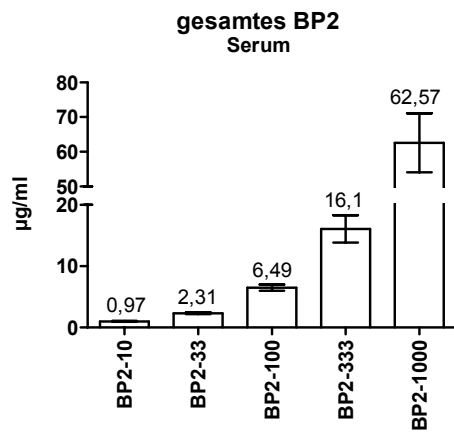


Abbildung 3-15: Serumkonzentrationen von BP2 nach der Behandlung des Serums mit Glucuronidase aus *Helix pomatia*. Die BP2-Konzentration wurde durch UV-Detektion bei 280 nm nach der Trennung durch HPLC bestimmt. In der Kontrollgruppe (ovx) war kein BP2 nachweisbar. In der Abbildung sind über den Balken die Mittelwerte der Gruppen angegeben.

Die Massenspektren der drei Substanzen sind Abbildung 3-16 gezeigt.

Die Massenbestimmung per HPLC-MS ergab für die beiden nicht identifizierten Peaks eine molare Masse von 326 g/mol (Peak 1 in Abbildung 3-12; A in Abbildung 3-16) beziehungsweise 422 g/mol (Peak 2 in Abbildung 3-12; B in Abbildung 3-16). Für den letzten Peak (Peak 3 in Abbildung 3-12; C in Abbildung 3-16) ergab sich eine molare Masse von 246 g/mol, welche der Masse von BP2 entspricht.

3. Ergebnisse

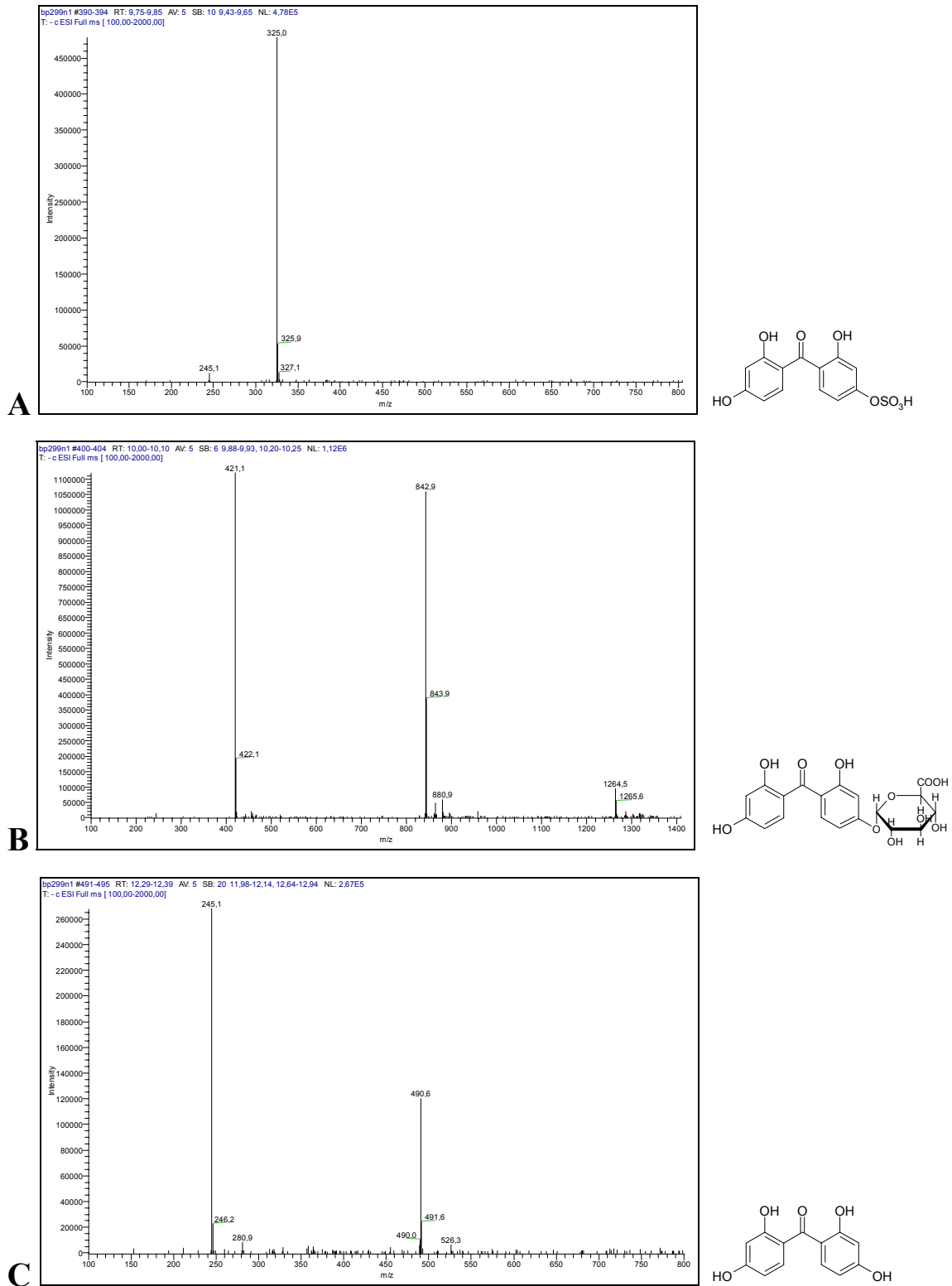


Abbildung 3-16: ESI(-)-Massenspektren der drei detektierbaren Substanzen. Die Substanzen wurden durch Abspaltung eines H^+ -Ions ionisiert, die im Spektrum angezeigten Massen sind deshalb 1 g/mol kleiner. Die Retentionszeiten (A = 9,80, B = 10,03 und C = 12,34 Minuten) sind aufgrund anderer Laufbedingungen etwas verschoben. Neben den Spektren wurde jeweils eine mögliche molekulare Struktur gezeigt, die mit dem ermittelten Molekulargewicht übereinstimmen würde.

3.3.3.3 Hypophysenhormone

Auf die Serumkonzentrationen von TSH hatte keine der Behandlungen einen signifikanten Einfluss, obwohl die TSH-Werte durch BP2-333 und -1000 leicht erhöht waren (Abbildung 3-17).

Auf die Serumkonzentrationen von LH hatte BP2 in den höchsten beiden Dosen einen signifikanten Einfluss. Auch bei den anderen BP2-Gruppen ist eine leichte dosisabhängige, jedoch nicht signifikante Erhöhung zu beobachten.

Die Bestimmung von GH im Serum ergab eine dosisabhängige Erhöhung der Werte durch die beiden höchsten Dosen von BP2. Die E2V-Behandlung hatte keinen Einfluss auf die GH-Serumspiegel.

Die Serumkonzentrationen von Prolaktin wurden durch die E2V- und die BP2-Behandlung in den beiden höchsten Konzentrationen signifikant erhöht.

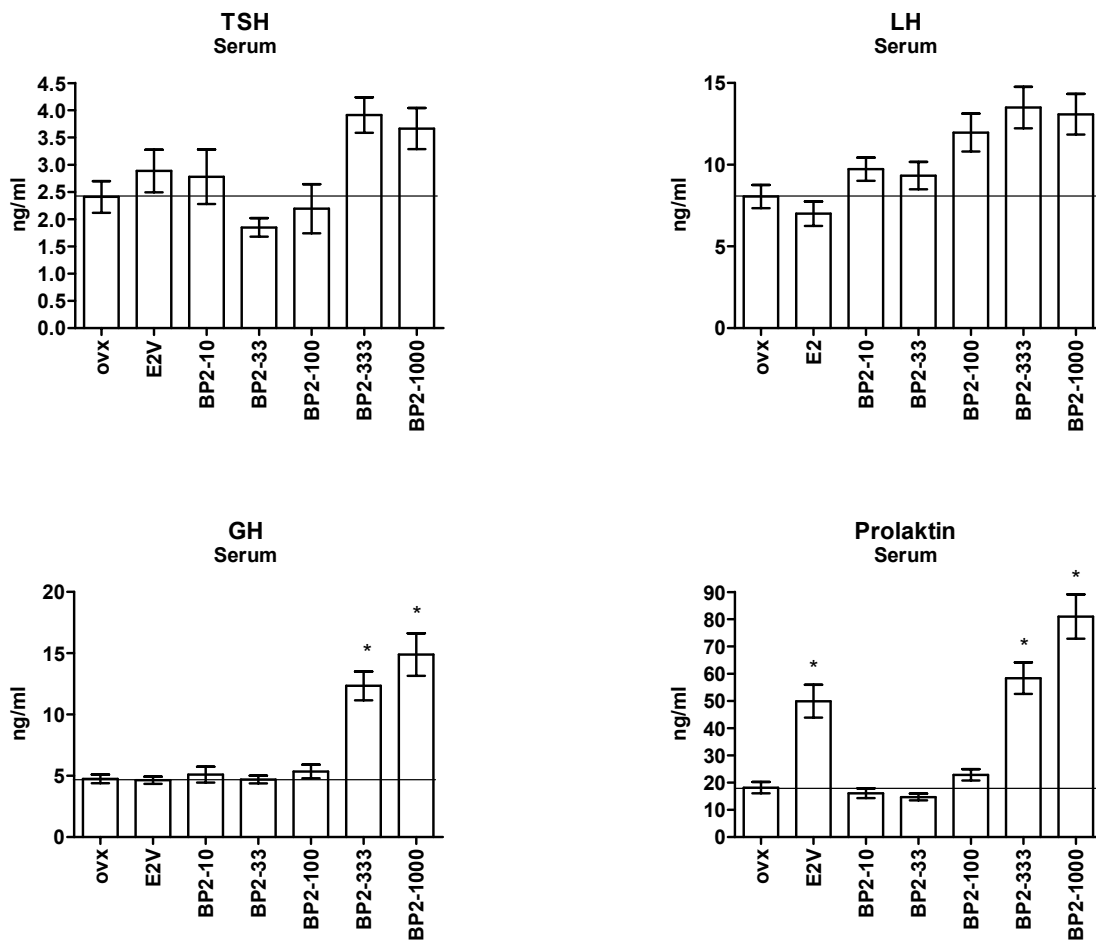


Abbildung 3-17: Serumkonzentrationen der Hypophysenhormone TSH, LH, GH und Prolaktin. * = signifikant gegenüber ovx.

3. Ergebnisse

3.3.3.4 Schilddrüsenhormone

Im Serum wurden die Konzentrationen von freiem T3 und T4 sowie von gesamt-T3 und -T4 bestimmt. Abbildung 3-18 zeigt einen leichten senkenden, aber nicht signifikanten Einfluss von E2V auf den Serumspiegel von T3 und freiem T3. Durch die Behandlung mit BP2 wurden die freien T3-Werte der Gruppen BP2-100 und BP2-333 signifikant gesenkt.

Auf den T4-Spiegel hatte die Behandlung mit E2V keinen Einfluss, auf die Konzentration von freiem T4 einen leicht stimulierenden Einfluss. Der gesamt-T4-Spiegel wurde deutlich dosisabhängig durch die Behandlung mit BP2 gesenkt. Die Serumkonzentration von freiem T4 wurde nur durch die höchste BP2-Dosis signifikant gesenkt.

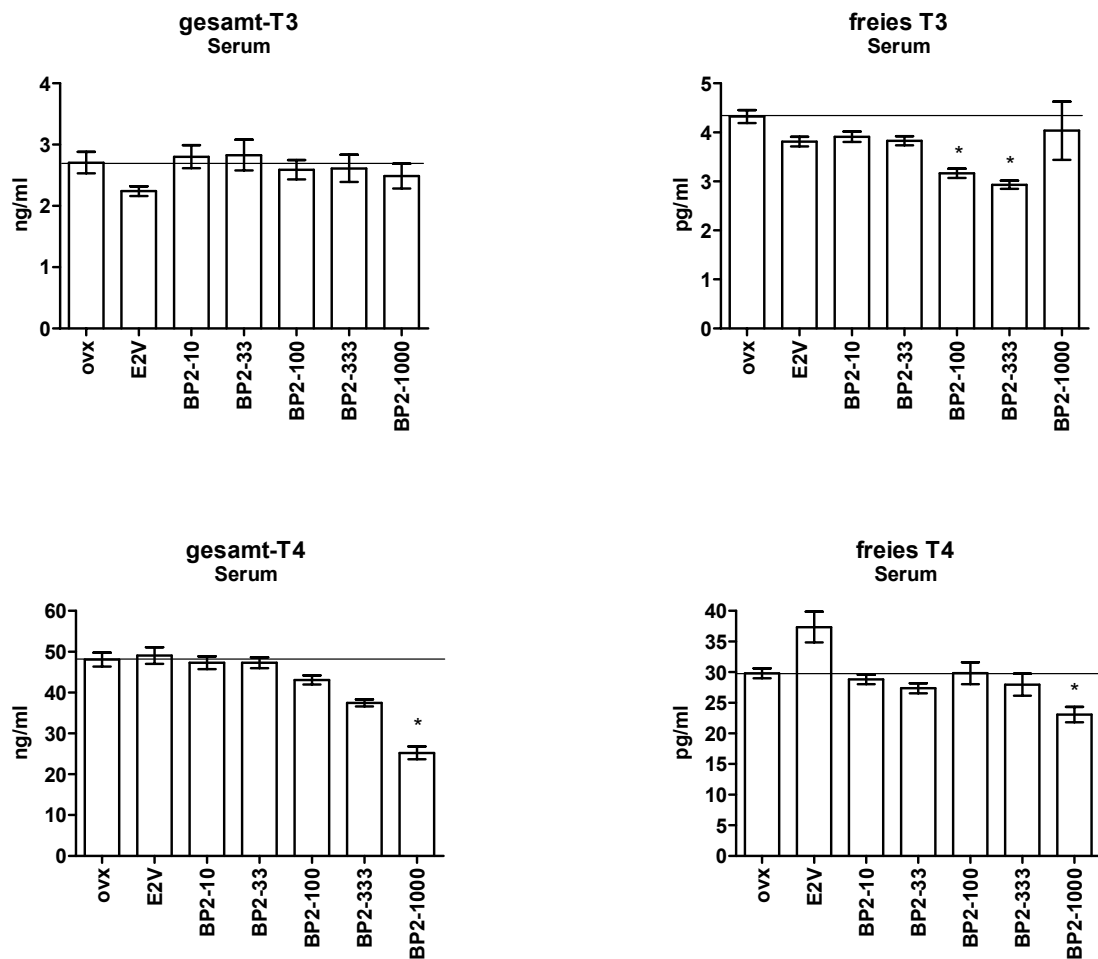


Abbildung 3-18: Serumkonzentrationen der Schilddrüsenhormone. * = signifikant gegenüber ovx.

3. Ergebnisse

3.3.3.5 Metabolische Parameter

Bei allen gemessenen Parametern wurde durch die Behandlung mit E2V eine signifikante Senkung beobachtet (Abbildung 3-19). Auch die Applikation von BP2 führte dosisabhängig zu einer E2V-ähnlichen Senkung der Serumspiegel von Cholesterin, HDL und LDL. Die Stärke der Effekte von BP2 in der höchsten Dosis ist mit der Stärke der E2V-Effekte vergleichbar (Cholesterin und LDL) beziehungsweise übersteigt diese im Fall von HDL noch.

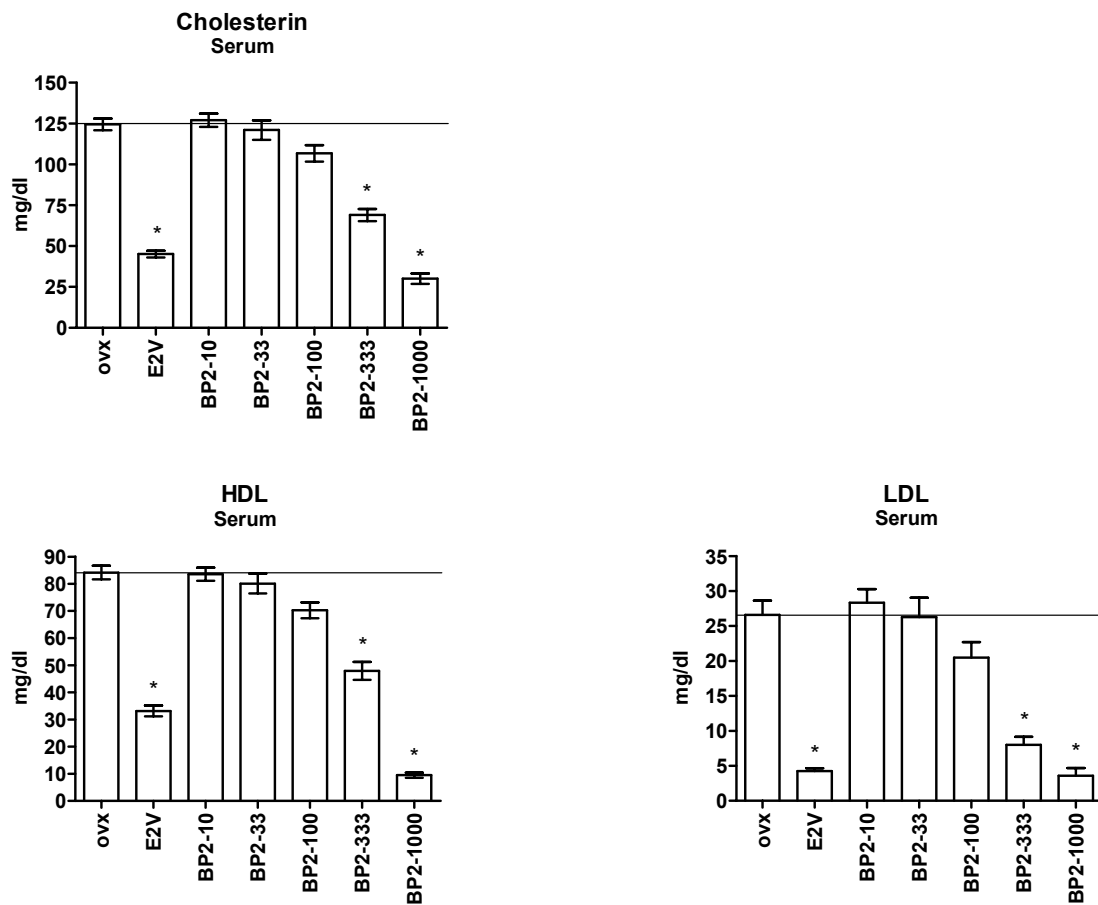


Abbildung 3-19: Cholesterin-, HDL- und LDL-Serumkonzentrationen. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.4 Genexpressionsdaten

3.3.4.1 Hypothalamus

Im mediobasalen Hypothalamus (MBH) wurde die Genexpression der beiden Estrogen-Rezeptoren (ER) α und β untersucht (Abbildung 3-20). Bei beiden Rezeptoren konnte keine signifikante Änderung der Genexpression durch die Behandlung mit E2V oder mit BP2 beobachtet werden. Bei der E2V-Gruppe wurde jedoch ein leichter Anstieg der Expression beider Rezeptoren gemessen.

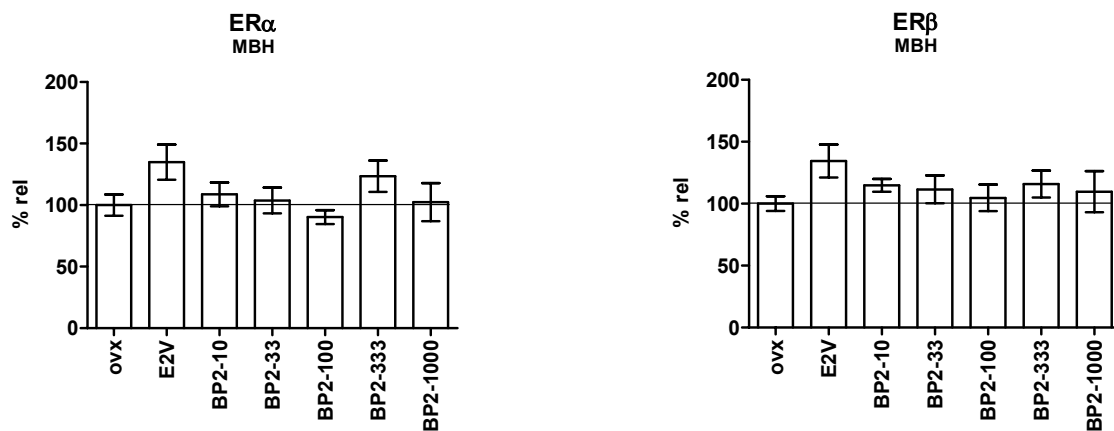


Abbildung 3-20: Genexpression von ER α und ER β im mediobasalen Hypothalamus (MBH).

Auch die Genexpression von Prä-Pro-TRH wurde in keiner Behandlungsgruppe signifikant verändert (Abbildung 3-21).

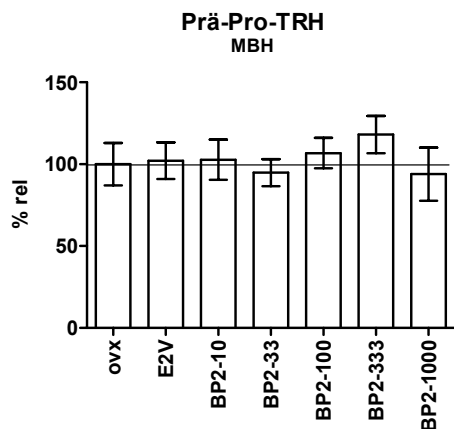


Abbildung 3-21: Genexpression von Prä-Pro-TRH im mediobasalen Hypothalamus.

3.3.4.2 Hypophyse

In der Hypophyse wurden die Genexpression der Untereinheiten von LH und TSH bestimmt (Abbildung 3-22). Die Expression der β -Untereinheit von LH zeigte keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrolle (ovx). In den höchsten beiden Konzentrationen von BP2 wurde jedoch eine ähnliche Absenkung wie in der E2V-Gruppe beobachtet.

Die Genexpression der β -Untereinheit von TSH wurde signifikant in den Gruppen BP2-333 und BP2-1000 gesenkt. Auch in den restlichen Behandlungsgruppen wurde die Genexpression gesenkt.

Bei der Genexpression der α -Untereinheit zeigten sich keine signifikanten Veränderungen. Ähnlich wie bei LH β wurde jedoch eine leichte Senkung in den Gruppen E2V, BP2-333 und BP2-1000 beobachtet.

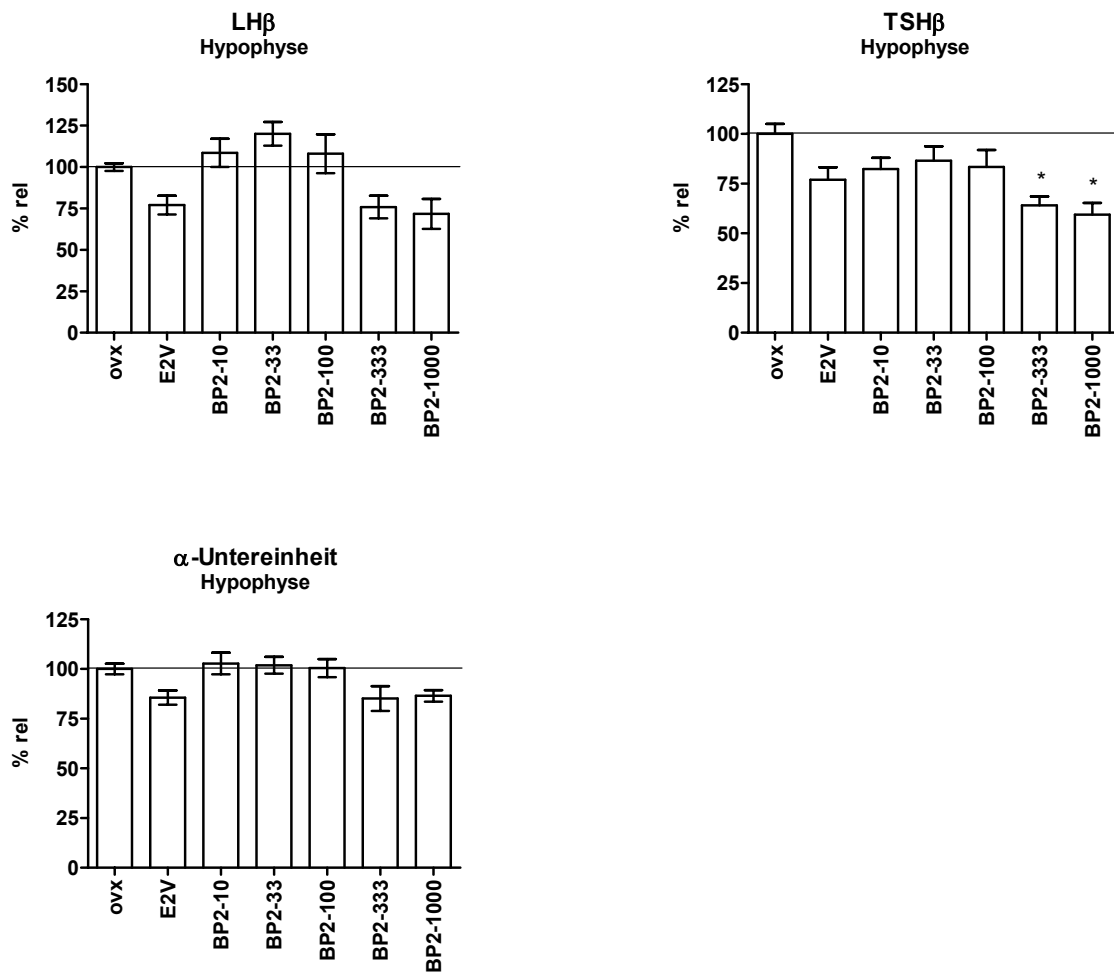


Abbildung 3-22: Genexpression der Untereinheiten von LH und TSH in der Hypophyse. * = signifikant gegenüber ovx.

3. Ergebnisse

Als Marker für eine Estrogen-ähnliche Wirkung wurde die Genexpression von TERP-1 in der Hypophyse bestimmt. In Abbildung 3-23 ist eine signifikante Steigerung der Expression durch die Behandlung mit E2V zu erkennen. Durch die Behandlung mit BP2 wurde schon bei der geringsten Dosierung eine leichte Stimulation der TERP-1-Genexpression beobachtet. Dieser Effekt setzte sich dosisabhängig bei den höheren Dosierungen fort. In den Gruppen BP2-333 und BP2-1000 wurde eine deutlich stärkere Stimulation als in der E2V-Gruppe gemessen. Die Effekte in der BP2-1000-Gruppe liegen etwa 4,3-mal höher, in der BP2-333-Gruppe etwa 2,2-mal höher als in der E2V-Gruppe.

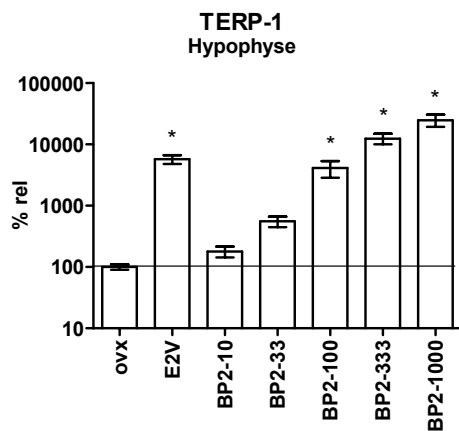


Abbildung 3-23: Genexpression von TERP-1 in der Hypophyse. * = signifikant gegenüber ovx.

Die Genexpression von ER α wurde in der Hypophyse durch keine Behandlung signifikant beeinflusst. Die Genexpression von ER β wurde durch E2V und BP2-1000 signifikant vermindert (Abbildung 3-24).

3. Ergebnisse

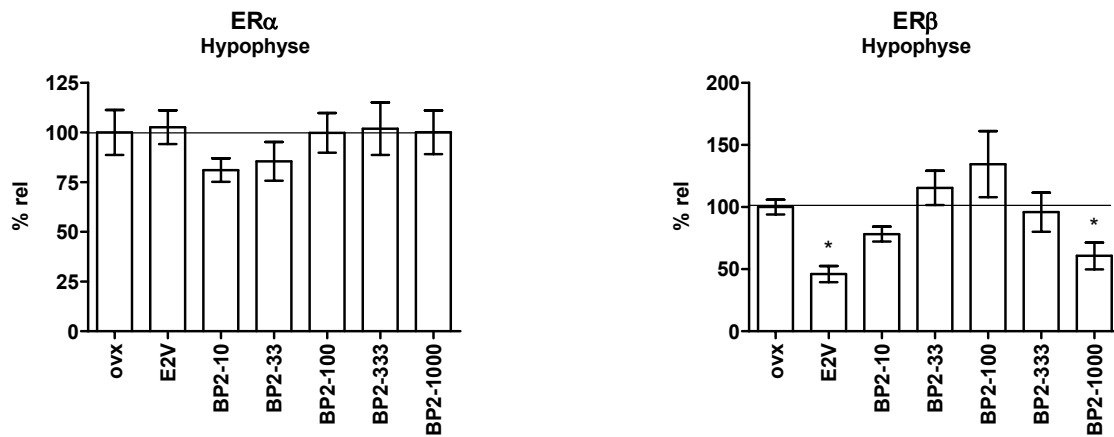


Abbildung 3-24: Genexpression der Estrogen-Rezeptor-Subtypen in der Hypophyse. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.4.3 Schilddrüse

In der Schilddrüse wurde nur die Genexpression von ER α durch die Behandlung mit BP2 in der höchsten Konzentration signifikant gesenkt. Durch E2V wurde jedoch ein ähnlicher Effekt beobachtet. Die Genexpression von ER β wurde in keiner Behandlungsgruppe signifikant verändert, obwohl durch BP2 in der höchsten Konzentration eine Steigerung der Expression beobachtet werden konnte.

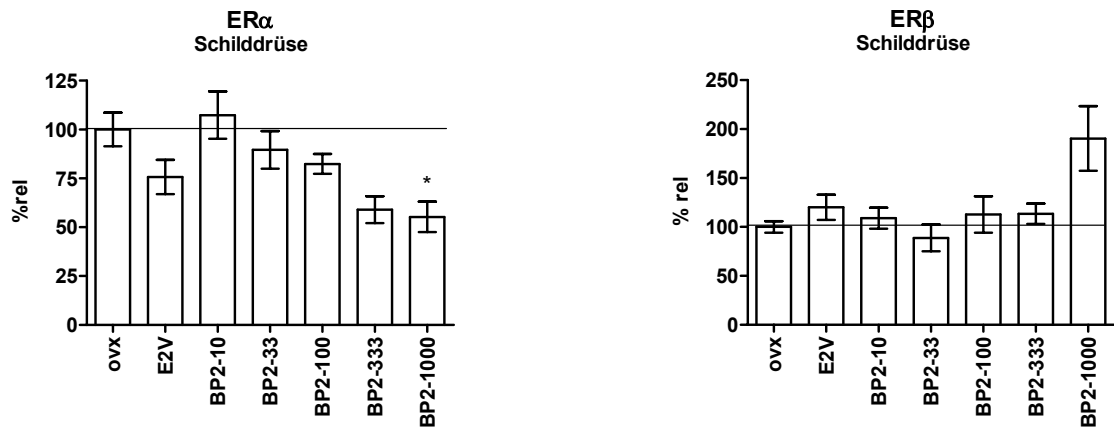


Abbildung 3-25: Genexpression von ER α und ER β in der Schilddrüse. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.4.4 Uterus

Als Marker für estrogene Wirkung im Uterus wurden die Genexpressionen von IGF-1 und Prä-Pro-C3 gemessen. Bei beiden zeigte sich eine signifikante Steigerung der Genexpression durch BP2 in den Gruppen BP2-333 und -1000. Die Steigerung war in beiden Systemen deutlich dosisabhängig. Auch die Behandlung mit E2V führte zu einer Steigerung der Genexpression in beiden Systemen.

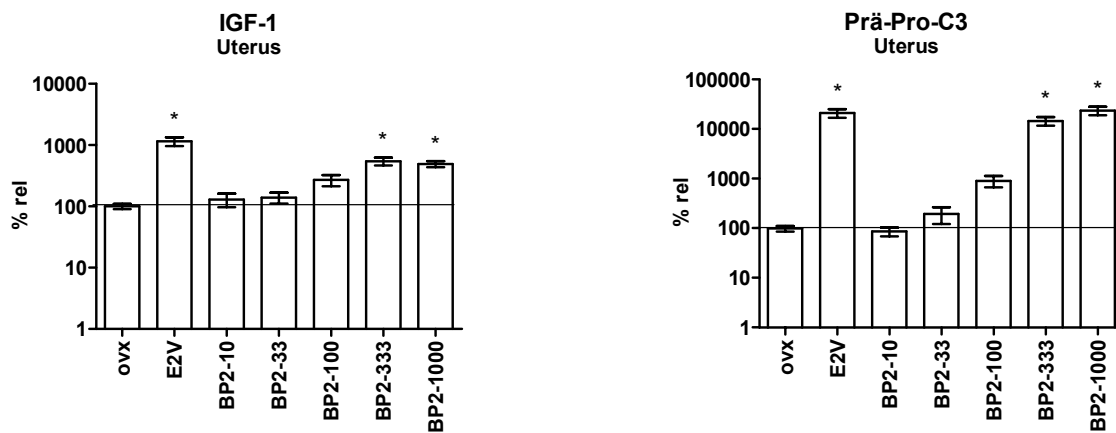


Abbildung 3-26: Genexpression von IGF-1 und Prä-Pro-C3 im Uterus. * = signifikant gegenüber ovx.

Auf die Genexpression von ER α hatte weder die Behandlung mit E2V noch die Behandlung mit BP2 einen Einfluss. Die Genexpression von ER β wurde jedoch durch die Gabe von E2V und BP2-333 und BP2-1000 signifikant gesenkt. In den Gruppen BP2-33 und BP2-100 wurde eine leichte Senkung der ER β -Expression gemessen.

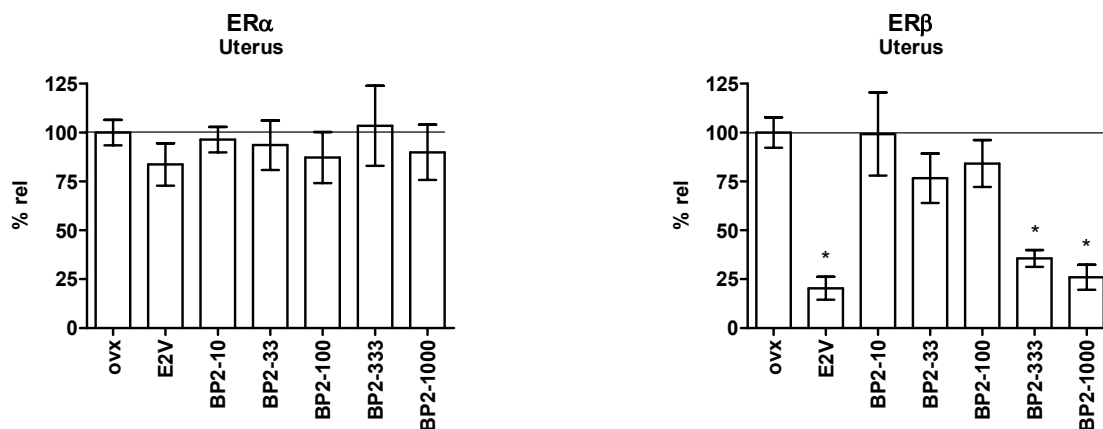


Abbildung 3-27: Genexpression von ER α und ER β im Uterus. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.4.5 Leber

In der Leber wurde die Genexpression von IGF-1 und ER α untersucht (Abbildung 3-28). Bei beiden Systemen wurde eine signifikante Verringerung der Expression durch E2V und BP2-1000 beobachtet. Die niedrigeren Konzentrationen von BP2 führten ebenfalls in beiden Fällen, zu einer leichten, nicht signifikanten Senkung der Genexpression. Die Expression von ER β konnte aufgrund zu geringer Mengen in allen Gruppen nicht mit dem beschriebenen System gemessen werden.

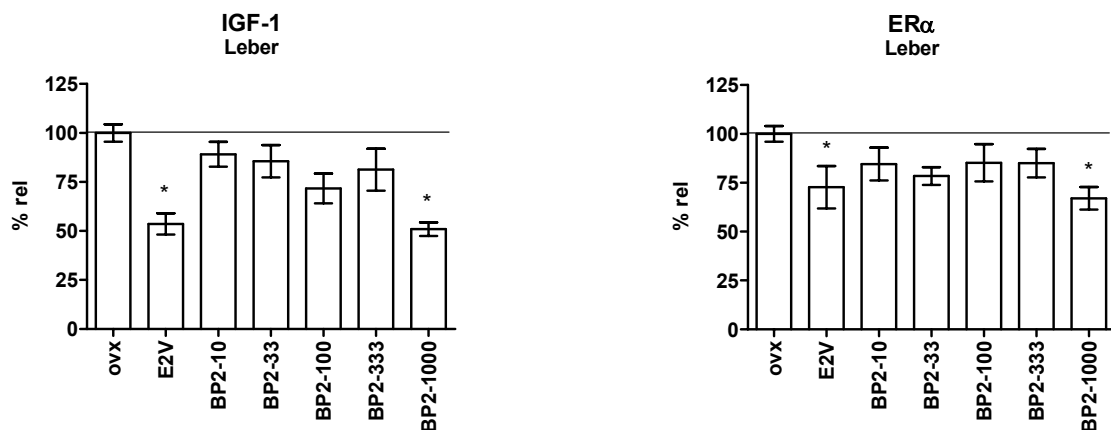


Abbildung 3-28: Genexpression von IGF-1 und ER α in der Leber. * = signifikant gegenüber ovx.

Die Genexpression von Cyp1a1 in der Leber wurde durch BP2 nur minimal in der höchsten Dosierung erhöht (Abbildung 3-29). Diese Erhöhung war jedoch etwa 10.000fach geringer als die Induktion der Genexpression durch 3-Methylcholanthren (3MC), einem Induktor des Cyp1a1-Systems, der ebenfalls 5 Tage an ovariektomierte Ratten verfüttert wurde. E2V hatte auf die Expression von Cyp1a1 einen leicht senkenden Einfluss, ebenso wie die niedrigen Dosierungen von BP2.

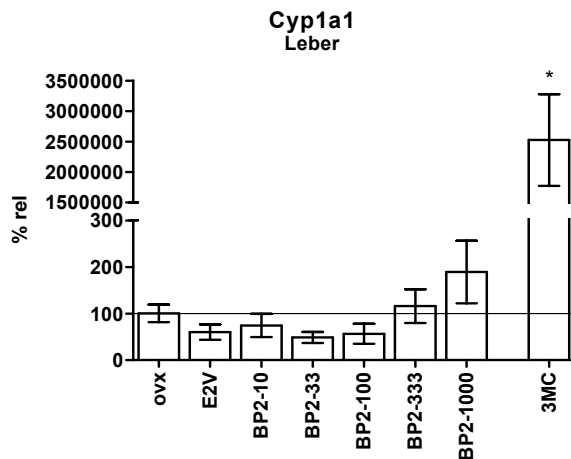


Abbildung 3-29: Genexpression von Cyp1a1 in der Leber. 3MC (= 3-Methylcholanthren) wurde unter gleichen Versuchsbedingungen in einer Dosis von 40 mg/kg Kg pro Tag verabreicht. * = signifikant gegenüber ovx.

3.3.5 Proteinarbeiten

3.3.5.1 5'-Deiodase-Aktivität

In Abbildung 3-30 ist die Aktivität der Typ I 5'-Deiodase gezeigt. Durch die Behandlung mit E2V und BP2-10 wurde die Aktivität nicht verändert. Durch die Gabe von BP2 in einer Konzentration von 33 mg/kg Kg wurde die Aktivität erhöht. Durch die höheren Dosen wurde jedoch eine Erniedrigung der Aktivität beobachtet. Die Aktivität bei der höchsten Dosierung lag unter der Aktivität der Kontrollgruppe. Die Aktivität der Typ II-5'-Deiodase war für eine Auswertung zu gering.

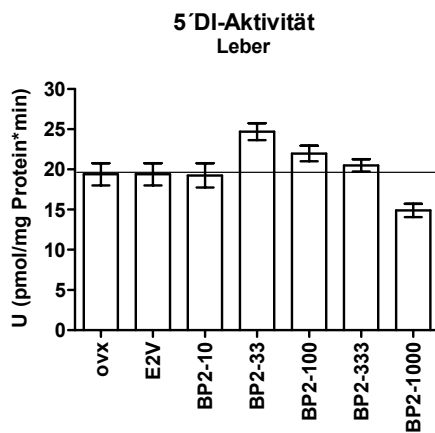


Abbildung 3-30: Typ I 5'-Deiodase-Aktivität in der Leber.

3.3.5.2 Schilddrüsenperoxidase (TPO)-Aktivität

Die TPO-Aktivität in der Schilddrüse wurde am stärksten, jedoch nicht signifikant in der BP2-100-Gruppe erhöht. In allen anderen BP2-Gruppen, außer der BP2-10-Gruppe, wurde nur eine leichte Erhöhung der TPO-Aktivität beobachtet.

In der E2V-Gruppe konnte keine Veränderung der TPO-Aktivität beobachtet werden.

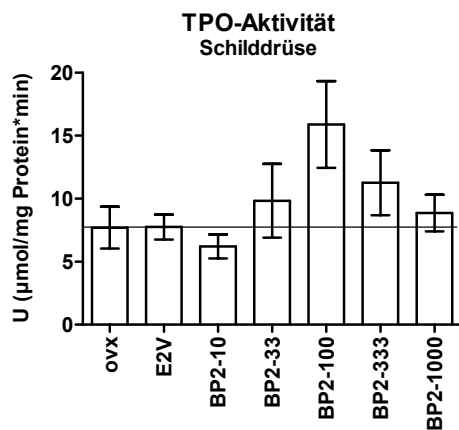


Abbildung 3-31: TPO-Aktivität in der Schilddrüse.

3.3.5.3 Natrium/Iodid-Symporter (NIS)-Expression

Eine Beeinflussung der NIS-Expression durch BP2 konnte im Western-Blot nicht festgestellt werden.

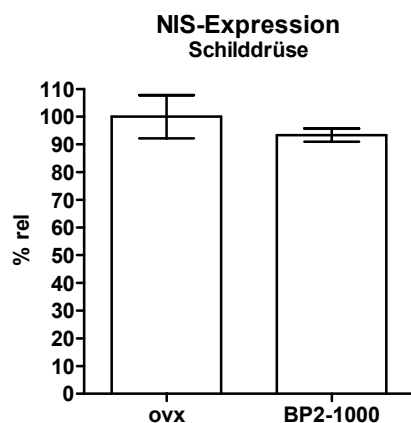


Abbildung 3-32: Proteinexpression des Natrium/Iodid-Syporters in der Schilddrüse.

3.3.6 Dosis-Wirkungsbeziehungen

Für die Parameter mit den stärksten Änderungen wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen mit Hilfe der PROAST-Software (Slob 2002) aufgestellt. Diese Parameter waren:

- TERP-1-Genexpression in der Hypophyse
- Prä-Pro-C3-Genexpression im Uterus
- LDL-Konzentration im Serum

Nachfolgend sind die Graphen der Regressionskurven für die einzelnen Parameter dargestellt (Abbildung 3-33).

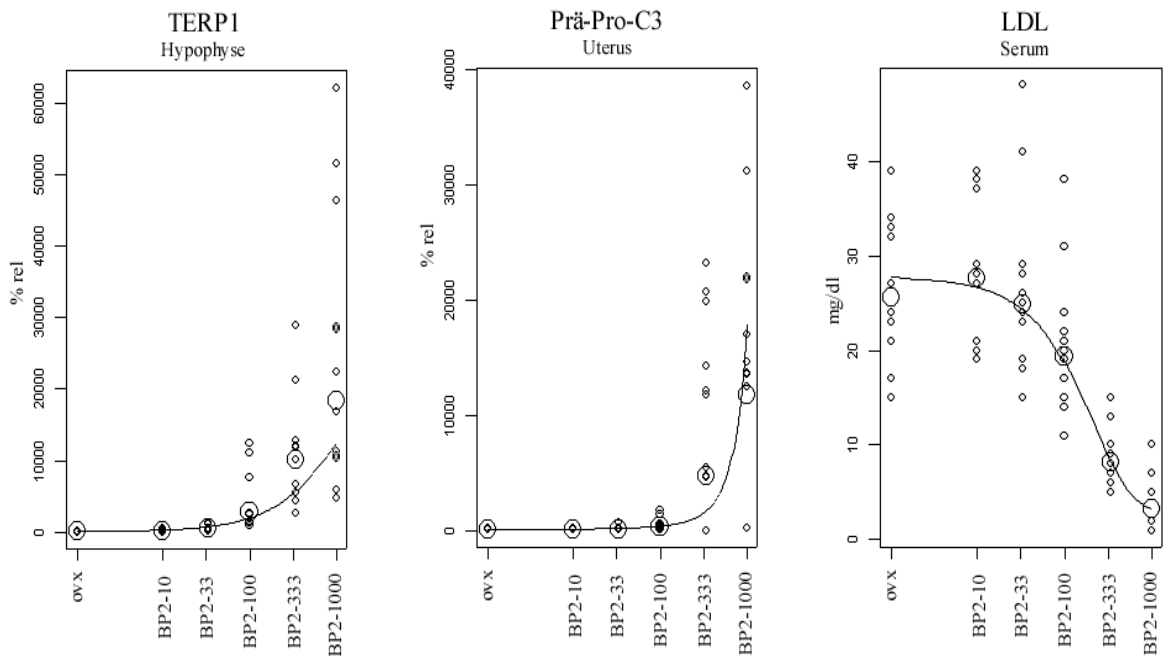


Abbildung 3-33: Graphische Darstellung der nichtlinearen Regression zur Ermittlung der Dosis-Wirkungsbeziehungen. Dargestellt sind die Einzelwerte (kleine Kreise) und der Mittelwert der einzelnen Gruppen (große Kreise).

3. Ergebnisse

Die entsprechenden Dosen (= kritische Effekt-Dosis; CED), bei denen eine Wirkung von mehr als der einfachen Standardabweichung der Kontrollgruppe (= kritische Effekt-Größe; CES) erreicht wurde, sind in der nachfolgenden Tabelle 3-1 angegeben.

Tabelle 3-1: Relevante Werte der Dosis-Wirkungsbeziehungen.

Parameter	CES (%)	CED (mg/kg Kg)	vereinfachte Gleichung der Regressionskurve
TERP-1 (Hypophyse)	+32,95	1,59	$y = a * [c - (c - 1) * \exp(-b * x)]$ $a = 96,16856; b = 0,00104; c = 200,03339$
Prä-Pro-C3 (Uterus)	+44,26	3,24	$y = a * \exp(b * x^d)$ $a = 55,18802; b = 0,208; d = 0,48118$
LDL (Serum)	-26,78 (= -7,115 mg/dl)	78,2	$y = a * [c - (c - 1) * \exp(-b * x)]$ $a = 27,74055; b = 0,00457; c = 0,10819$

Für Erklärung der Begriffe siehe Text. $CES = f(CED) / f(0) - 1$

3.4 Kinetikversuch

Bei der Bestimmung von P2 und den Metaboliten im Serum zeigte sich, dass die höchste Serumkonzentration bei allen Substanzen bereits nach 30 Minuten erreicht wurde (Abbildung 3-34). Die Menge an BP2 und BP2-Sulfat war zu diesem Zeitpunkt deutlich geringer als die Menge an BP2-Glucuronid. Die Kurve von BP2-Glucuronid fiel jedoch im Gegensatz zu den beiden anderen Substanzen schnell ab und erreichte nach 180 Minuten etwa das Niveau von BP2 und BP2-Sulfat.

Im Urin wurde ein Maximum aller Substanzen erst nach 120 Minuten festgestellt. Bis zu diesem Zeitpunkt stiegen die Messwerte kontinuierlich an. Auch bei diesen Messungen lagen die Anteile an BP2-Glucuronid deutlich über den Anteilen von BP2 und BP2-Sulfat. Im Vergleich zum Serum waren die gemessenen Werte insgesamt deutlich höher.

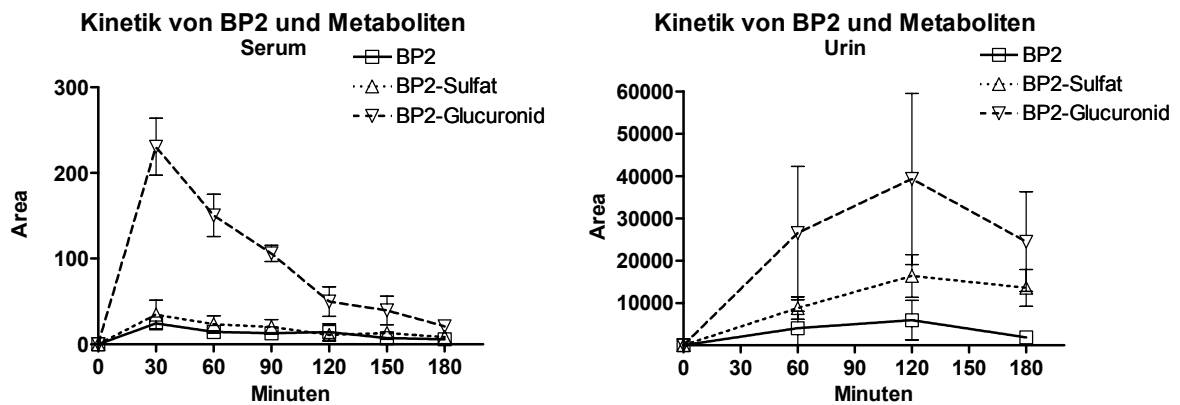


Abbildung 3-34: Messung von BP2 und den Metaboliten im Serum und im Urin. Die Bestimmung erfolgte per UV-Detektion bei 280 nm nach einer Trennung durch HPLC. Angegeben sind die Flächen der Peaks, da für die Metabolite keine Standardkurve erstellt werden konnte.

4 Diskussion

Aus den in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnissen ist ersichtlich, dass BP2 in den meisten der beobachteten Parameter eine Estrogen-ähnliche Aktivität besitzt und somit als ein Xenoestrogen bzw. eine EAC anzusehen ist.

Darüber hinaus wurden nicht Effekte von BP2 auf die GH- und LH-Sekretion gefunden, die, falls sie auch in männlichen Tieren zu beobachten sind, durch eine antiandrogene Aktivität von BP2 erklärt werden könnten.

In der HPT-Achse wurde eine nicht Estrogen-ähnliche Wirkung von BP2 auf die Schilddrüse identifiziert. Die Ergebnisse zeigen, dass in diesem Fall ein uterotropher Assay nicht ausreichend gewesen wäre, um das gesamte endokrine Potential von BP2 aufzudecken.

Es wurde gezeigt, dass BP2 *in vivo* metabolisiert wurde. Die Metabolite konnten identifiziert werden und die Kinetik der Exkretion wurde untersucht.

Aus den erhaltenen Daten wurden Dosis-Wirkungsbeziehungen aufgestellt, die als Grundlage für eine Risiko-Bewertung herangezogen werden können.

4.1 Bestätigung der estrogenen Aktivität von BP2 durch *screening*-Methoden

Die Testsubstanz BP2 entfaltet in den in dieser Arbeit benutzten *in vitro*-Testsystemen eine estrogenen Wirkung.

Im RBA verdrängte BP2 das radioaktiv markierte E2 ab einer Konzentration von etwa 100 nM. Der EC₅₀-Wert von BP2 liegt bei einer Konzentration von 495 nM, während der EC₅₀-Wert von „kaltem“ E2 bei einer Konzentration von 0,47 nM liegt. Damit hat BP2 nur ein 1000stel der Potenz von E2.

In Untersuchungen von funktionellen Gruppen wurde ein mit Hydroxylgruppen in *ortho*- und *para*-Position substituierter Phenolring als essentiell für die Bindung an das aktive Zentrum des ER identifiziert. Deshalb war eine Bindung von BP2 an den ER wahrscheinlich. Bei eigenen Untersuchungen von anderen Benzophenon-Derivaten (BP1, BP3) sowie der chemischen Grundstruktur Benzophenon im RBA (Daten nicht gezeigt) stellte sich BP2 als der stärkste Ligand heraus. Wodurch die Hypothese von Nishihara *et al.* (2000) experimentell bestätigt wurde, nach der Hydroxylgruppen in *ortho*- und *para*-Stellung am Phenylring strukturelle Hinweise auf eine estrogenen Aktivität geben.

2,4-Dihydroxybenzophenon (BP1) wurde im RBA mit einem EC_{50} von $3,65 \cdot 10^{-5}$ M getestet (Blair *et al.* 2000). Im Vergleich zu anderen Arbeitsgruppen liegen die eigenen Ergebnisse für BP1 bei einem EC_{50} von $1,67 \cdot 10^{-5}$ M. Damit sind die Messwerte des RBA mit den Ergebnissen anderer Arbeitsgruppen vergleichbar. Mit diesen Ergebnissen wurde BP2 verlässlich und reproduzierbar als Ligand für E2-Bindestellen identifiziert.

Obwohl der Rezeptorbindungsassay ein weltweit angewandter Assay für die Identifikation von Rezeptor-Liganden ist, erlaubt er keine Aussage über die Art der Wirkung am Rezeptor. Es wurde nur die Bindung von BP2 an den Rezeptor festgestellt; ob die Substanz jedoch in der Lage ist, die Rezeptorkonformation für eine agonistische oder antagonistische Funktion zu verändern, ist aus diesem Test nicht abzuleiten.

Der Endpunkt des Proliferationsassays ist die biologische Antwort auf das estrogene Signal. Das Wachstum der MCF-7-Zellen wurde ab einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-6}$ M BP2 stimuliert und erreichte bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M das gleiche Niveau wie in der Positivkontrolle mit E2 $1 \cdot 10^{-8}$ M. BP2 entfaltete hier also eine eindeutige Estrogen-agonistische Wirkung. Bislang sind noch keine Vergleichsdaten zu BP2 veröffentlicht. Die wirksame Konzentration von BP2 liegt hier allerdings im gleichen Bereich wie die des RBAs. Für ER α -negative MCF-7-Zellen konnte gezeigt werden, dass diese Zellen nicht mit Proliferation auf Estrogen reagieren (Zhang *et al.* 2005). Erst eine Re-Expression von ER α führte zur Proliferation bei Estrogengabe (Oesterreich *et al.* 2001). Die E2-induzierte Proliferation wird in MCF-7-Zellen also über den ER α vermittelt. Die Ergebnisse des in dieser Arbeit vorgestellten Proliferationsassays lassen demnach darauf schließen, dass BP2 den agonistischen Effekt über den ER α ausübt.

Im Transaktivierungsassay in MCF-7-Zellen wurde gezeigt, dass die Testsubstanz BP2 über die Fähigkeit verfügt, über beide Subtypen des ER die Expression des Reporters zu induzieren. Bei der Testsubstanz BP2 zeigte sich die Aktivierung der Luciferase-Aktivität ab einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-8}$ M in MELN-ER β -Zellen und ab einer Konzentration von $3 \cdot 10^{-7}$ M in MELN-ER α -Zellen. Die ermittelten EC_{50} -Werte liegen für MELN-ER α bei 320 nM und für MELN-ER β bei 120 nM. Hier zeigt sich, dass BP2 eine 2,7fach geringere Affinität zum ER α aufweist. Trotz der in diesem Assay ermittelten Präferenz für ER β ist die Bindung an ER α ausreichend, um die ER α -abhängige Proliferation der MCF-7-Zellen zu

induzieren. Das endogene Estradiol hingegen hat eine vergleichbare Affinität zu beiden Rezeptorsubtypen (Kuiper *et al.* 1998). Somit könnte *in vivo* ein von E2 abweichender Effekt zu erwarten sein, möglicherweise hat BP2 SERM-Eigenschaften. In einer aktuellen Veröffentlichung wurde BP2 in einem ähnlichen Transaktivierungssystem in MCF-7-Zellen auf die Fähigkeit der Induktion eines Estrogen-regulierten Reporters getestet (Suzuki *et al.* 2005). Der ermittelte EC₅₀-Wert lag in dieser Studie bei 300 nM. Dieses System verfügte allerdings nicht über die Möglichkeit, spezifisch die beiden ER-Subtypen zu überprüfen, da die Rezeptoren nicht einzeln überexprimiert wurden. Das Ergebnis entspricht dem EC₅₀-Wert der Transaktivierung über den ERβ.

Auch zeigte sich hier eine deutlich bessere Sensitivität des Transaktivierungsassays im Vergleich zum RBA und zum Proliferationsassay, da der durchschnittliche EC₅₀-Wert für BP2 zwei Potenzen geringer ausfällt. Die deutlich bessere Sensitivität von Transaktivierungsassays wurde auch schon von Korach beschrieben (Korach *et al.* 1995).

Im EROD-Assay konnte eine minimale Induktion der EROD-Aktivität bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-4}$ M BP2 gezeigt werden. Die Induktion betrug jedoch nur 9,5 % der maximalen Induktion durch die Positivkontrolle 3MC. Bei der Koinkubation konnte ebenfalls nur eine leichte Induktion festgestellt werden. Diese Beobachtungen werden durch die ebenfalls geringe Induktion der Cyp1a1-mRNA-Expression in der Leber gestützt. Die Induktion beträgt hier jedoch nur ein 25.000stel der Positivkontrolle mit 3MC. Eine Wirkung von BP2 als AhR-Ligand auf estrogene Signalwege kann aufgrund der geringen Induktion durch BP2 ausgeschlossen werden.

4.2 Auswirkungen von BP2 *in vivo*

4.2.1 Auswirkungen von BP2 auf metabolische Parameter

Die Tiere der E2V-Behandlungsgruppe verloren während der 5tägigen Behandlung an Körpergewicht. Dies resultierte in einem geringfügig niedrigeren Körpergewicht am letzten Tag des Versuches im Vergleich zu den anderen Behandlungsgruppen. Die BP2-Behandlungsgruppen zeigten einen leichten Anstieg während des Versuches mit Ausnahme der BP2-1000-Gruppe, in der das Tiergewicht im Verlaufe des Versuches

ebenfalls leicht absank. Obwohl die Tendenz erkennbar war, blieb das Tiergewicht am fünften Tag der Behandlung nahezu unverändert.

Die Serum-Konzentrationen von Cholesterin, HDL und LDL waren sehr deutlich durch E2V beeinflusst. E2V senkte die Konzentration aller drei Parameter signifikant. In den BP2-Behandlungsgruppen war der gleiche Effekt ab der BP2-100-Gruppe zu erkennen. In der BP2-1000-Gruppe wurde die maximale Wirkung von E2V noch übertroffen. Damit konnte der in der Literatur beschriebene estrogene Effekt auf die Serumlipidparameter (Lundeen *et al.* 1997) in der vorliegenden Arbeit auch für BP2 nachgewiesen werden.

Die Leber unterliegt als zentrales Organ des Metabolismus einer Regulation durch E2. Als Estrogen-regulierter Parameter der Leber wurde die Genexpression von IGF-1 bestimmt. In der Literatur wurde eine Senkung des IGF-1-Serumspiegels und der –Genexpression in der Leber nach E2-Administration beschrieben (Krattenmacher *et al.* 1994). In der vorliegenden Arbeit konnte dies für E2V bestätigt werden. Auch in der BP2-1000-Gruppe zeigte sich ein Estrogen-ähnlicher Effekt auf die IGF-1-Genexpression.

GH ist ein wichtiges Hormon in der Regulation des Metabolismus und der Entwicklung. Die Behandlung der Versuchstiere mit BP2 verursacht eine starke Induktion in der GH Sekretion in der Hypophyse, wie an den Serumspiegeln zu erkennen ist. Dieser Effekt konnte durch E2V nicht hervorgerufen werden. Bei der Untersuchung der Aktivität von UV-Filtern in einem Reporterassay für Estrogene und Androgene wurde BP2 als potentes Antiandrogen identifiziert (Suzuki *et al.* 2005). Für andere Antiandrogene ist gezeigt worden, dass diese den GH-Serumspiegel in Männchen erhöhen können (Metzger *et al.* 1993). Es könnte sich hier demnach um einen nicht-estrogenen sondern einen „antiandrogenen“ Effekt der Testsubstanz handeln (siehe auch LH-Sekretion).

4.2.2 Beeinflussung des ER α /ER β -Status durch BP2

Nach der Yin/Yang-Theorie bzw. der Erweiterung der Funktion in der Aufteilung nach Proliferation und Differenzierung wird postuliert, wie wichtig das Verhältnis der Expression der beiden Subtypen in Organen ist, in denen sie koexprimiert werden.

Im Hypothalamus wurde die Genexpression beider ERs durch die Behandlung mit E2V leicht hochreguliert. Das Verhältnis der Expression von ER α und ER β änderte sich dadurch allerdings nicht. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression beider ERs während des Zyklus in Abhängigkeit der E2-Serumkonzentration reguliert wird (Hatoya *et al.* 2003).

Damit wird das System in seiner Sensitivität an die verfügbare Menge des Induktors angepasst.

BP2 hat auf die Genexpression der beiden ERs im MBH keinen erkennbaren Einfluss, wodurch sich auch das Verhältnis der beiden Rezeptoren zueinander nicht ändert. Das System wird somit nicht sensitiver, wird aber auch in seiner Funktion nicht beeinträchtigt.

In der Hypophyse wurde der ER α durch E2V auf der Ebene der mRNA nicht reguliert, während die Expression des ER β deutlich auf unter 50 % im Vergleich zur Kontrollgruppe sank. Dies deckt sich mit der Arbeit von Schreihofner *et al.*, die allerdings auf der Proteinebene ein Absinken der ER α -Konzentration zeigen konnten (Schreihofner *et al.* 2000). Tena-Sempere *et al.* zeigten eine Stimulation der hypophysären ER β -Expression nach Ovariectomie, welche durch Gabe von E2-benzoat auf das Niveau intakter Tiere gesenkt werden konnte (Tena-Sempere *et al.* 2004). Dieser Effekt wird über ER α vermittelt, da der ER β -Agonist Diarylpropionitril (DPN) keine senkende Auswirkung auf die ER β -Expression hat.

Es wird vermutet, dass die Regulation der ERs in der Hypophyse eine wichtige Rolle bei der Hemmung der Induktion des prä-ovulatorischen LH-, FSH- und Prolaktin-Anstieges spielt (Schreihofner *et al.* 2000). Ein Ansteigen des E2-Serumspiegels führt direkt in der Hypophyse sowie indirekt über GnRH zu einem Ansteigen der Sekretion von LH, FSH und Prolaktin. Die Hemmung der ER-Expression unterbricht diesen positiven *feedback*-Mechanismus durch eine Desensibilisierung der estrogenen Signalwege. Zusätzlich wird die TERP-1-Genexpression induziert. TERP-1 agiert als Repressor der ER-vermittelten Wirkung, da die ERs durch die Bildung von inaktiven Heterodimeren gebunden werden (Resnick *et al.* 2000).

In den Behandlungsgruppen zeigte sich erst in der BP2-1000-Gruppe eine signifikante Hemmung der Genexpression des ER β . Die maximale Hemmung erreichte nicht das Niveau der E2V-Behandlungsgruppe, allerdings wurde die Funktion des Systems, das sich aus dem Verhältnis der beiden ERs definiert, in der gleichen Weise moduliert wie unter E2-Behandlung. Obwohl in den *in vitro*-Untersuchungen eine Präferenz für ER β gezeigt wurde, ist BP2 in der Lage, *in vivo* ER α -regulierte Systeme als Agonist zu beeinflussen. Die Funktion des Systems wird in der Hypophyse in der gleichen Weise wie durch E2 moduliert. BP2 wirkt auf die Regulation des „Zyklus“ als reines Estrogen.

Die Expression des ER α im Uterus wurde durch die E2V-Behandlung nicht beeinflusst, während die Genexpression des ER β noch stärker reprimiert wurde, als bereits in der Hypophyse beobachtet. Hier wird eine Veränderung der Signalwirkung des E2 durch die

Modulation des ER-Expressionssystems noch deutlicher. Ähnlich wie in der Hypophyse wurde von Murata *et al.* eine verstärkte ER β -Expression nach Ovariectomie beschrieben, die nach E2-Gabe auf das Niveau der intakten Kontrolle zurückfiel (Murata *et al.* 2003).

Die E2-Administration führt zu gravierenden Veränderungen im Uterus. Im Zuge dieser Veränderungen wird die ER β -Expression drastisch reduziert. Eine mögliche Interpretation ist, dass die Entfernung des ER β als Antagonist der ER α -Wirkung dafür sorgt, dass das estrogene Signal von E2 über ER α diese Veränderungen einleiten kann. Unter der Annahme, dass die ER-Subtypen eine unterschiedliche Funktion in der Regulation der Reproduktion einnehmen, bedeutet eine annähernde Elimination des ER β eine Stärkung des ER α -vermittelten Signals.

In den BP2-Behandlungsgruppen wurde eine deutliche Tendenz beobachtet. Die Repression der ER β -Genexpression erreicht in den Gruppen BP2-333 und BP2-1000 das Niveau der E2V-Gruppe. Das Expressionssystem der ER erfährt dieselbe Modulation wie unter E2V-Behandlung. Damit zeigt BP2 im Uterus eine klare estrogene Wirkung in Bezug auf die Remodulierung der estrogenen Signalwege.

In der Schilddrüse wurde die Expression des ER α unter E2V-Einfluss leicht reprimiert. Die Expression des ER β hingegen blieb unverändert. Damit sinkt das Verhältnis von ER α zu ER β . Die Behandlung mit BP2 senkte die ER α -Expression signifikant auf ein mit der E2V-Gruppe vergleichbares Niveau. Die ER β -Expression hingegen wurde bei der hohen Dosierung von BP2 (BP2-1000) auf über 150 % erhöht. Die Tendenz der Verschiebung des ER α /ER β -Verhältnisses bleibt dabei gleich, wird aber durch die Hochregulation von ER β noch verstärkt. Die genauen Funktionen der beiden ER-Subtypen in der Schilddrüse sind bislang unbekannt. Allerdings wurde die Regulation der Schilddrüsenfunktion durch Estrogene beschrieben (Cidlowski *et al.* 1975; Bray *et al.* 1976). Anhand dieser Daten wird deutlich, dass BP2 in der Schilddrüse einen von E2 abweichenden Effekt auf die Expression von ER α und ER β ausübt. Inwieweit diese Effekte eine biologische Relevanz haben, muss in weiteren Versuchen geklärt werden.

In der Leber konnte nur die Genexpression von ER α bestimmt werden, da Hepatozyten nur ER α exprimieren (Alvaro *et al.* 2000). ER β wird nur von einigen speziellen Zelltypen wie zum Beispiel den Kupffer'schen Sternzellen und Cholangiozyten exprimiert und ist daher kaum nachweisbar. In diesem Experiment wurde die ER α -Expression sowohl durch E2V als auch durch BP2 gesenkt. Die Genexpression von ER α in der Leber wird direkt durch

Estrogene reguliert. Durch Ovariectomie sinkt die mRNA-Konzentration, während eine Behandlung mit E2 diese wieder das Niveau von intakten Tieren anhebt (Xu *et al.* 2004).

Die Tendenz der Veränderung der Expression des ER α stimmt somit hier nicht mit der Literatur überein, dennoch zeigt BP2 in diesem Versuch ein rein estrogenes Verhalten. Eine mögliche Ursache könnten Splice-Varianten sein, die mit dem beschriebenen Messsystem nicht erfasst werden konnten. Da das TaqmanTM-Prinzip nur für die Amplifikation kurzer Sequenzen konzipiert wurde, können nicht alle alternativen Transkripte, wie sie auch für ER α beschrieben wurden (Herynk *et al.* 2004), erfasst werden.

4.2.3 Auswirkungen von BP2 auf die HPG-Achse

- **Hypothalamus:** Mit der Hypothalamuszellkultur wurde ein biologischer Endpunkt überprüft. Die Testsubstanz BP2 erreichte eine maximale, mit E2 vergleichbare Hemmung der GnRH-Sekretion bei einer Konzentration von $1 \cdot 10^{-5}$ M.

In vivo wurde für E2 sowohl eine Induktion der GnRH-Sekretion als auch eine Repression abhängig vom Zeitpunkt der Tötung der Versuchstiere, der Behandlungsdauer, der Kastrationsdauer, der E2-Dosis und der Position der Neurone im Hypothalamus beschrieben (Herbison 1998). *In vitro* konnte dagegen die Repression der GnRH-mRNA-Expression in GT1-7 und JEG-3-Zellen durch E2 in Abhängigkeit von der ER α -Konzentration in der Zelle gezeigt werden (Roy *et al.* 1999; Chen *et al.* 2001). Damit konnte ein Einfluss von BP2 auf ein biologisches System über ER α gezeigt werden. Andere Arbeitsgruppen postulieren einen anderen Mechanismus für das negative *feedback* der Estrogene auf die GnRH-Sekretion. Ein konstitutiver ER β ist in der Lage, über zwei bislang unbekannte EREs im Promotor des GnRH-Gens dessen Expression konstitutiv zu induzieren. Erst die Bindung durch einen Liganden verändert die Konformation des Rezeptors und inaktiviert ihn (Pak *et al.* 2005). Das erklärt auch die erhöhten LH-Serumspiegel nach der Kastration von Versuchstieren, die durch eine E2-Gabe gesenkt werden können (Smith *et al.* 1974; Blake 1977). Der *feedback*-Mechanismus funktioniert nicht in ER β -*knockout*-Mäusen (Dorling *et al.* 2003). Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, dass in *in vitro*-Studien eine konstitutive Aktivität des ER β auf einen minimalen Promotor festgestellt werden konnte (Pak *et al.* 2006). Da BP2 wie auch E2 über ER α und ER β transaktivierend wirkt, ist auch der Befund aus der Hypothalamuszellkultur mit dieser Hypothese vereinbar.

- **Hypophyse:** Bei der Messung der hypophysären Hormone LH und Prolaktin im Serum zeigten sich unterschiedliche Auswirkungen von E2V und BP2 auf die Hormonkonzentrationen. Die Serumkonzentration von Prolaktin wurde durch beide Substanzen erhöht. In der BP2-333-Gruppe zeigte sich ein ähnlich starker Anstieg der Serumkonzentration wie in der E2V-Gruppe. Die Serumkonzentrationen in der BP2-1000-Gruppe lagen noch höher als in der E2V-Gruppe.

Die LH-Serumkonzentration wurde leicht durch E2V-Gabe gesenkt, während sie durch BP2, besonders in den hohen Dosierungen, signifikant gesteigert wurde. Dieses Ergebnis ist im Hinblick auf die in der Hypothalamuszellkultur erhaltenen Ergebnisse unerwartet, da BP2 wie E2 auch dort einen negativen Einfluss auf die GnRH-Sekretion zeigte. Die Suppression der LH-Sekretion durch E2V fiel weniger stark als erwartet aus. Das im Versuch verwendete E2V, welches speziell für die orale Applikation entwickelt wurde, zeigte im Gegensatz zu anderen Präparaten wie E2-benzoat, welches für subkutane Applikation verwendet wird, einen schwächeren Effekt auf die LH-Suppression, obwohl die E2-Serumspiegel ausreichend hoch waren (Seidlova-Wuttke *et al.* 2005). Möglicherweise ist dieser Effekt auf die unterschiedliche Struktur und damit verbunden einer langsameren Freisetzung von E2 zurückzuführen (Hubertus Jarry, unveröffentlichte Daten).

Die Genexpression der beiden LH-Untereinheiten (α und β) hingegen wurde in der Hypophyse durch E2V und BP2 leicht, aber nicht signifikant, gesenkt. Die Senkung der Genexpression der Untereinheiten von LH nach E2-Gabe wurde von Shupnik und Mitarbeitern beschrieben (Shupnik *et al.* 1988). Diese Ergebnisse stützen die Beobachtungen der Hypothalamuszellkultur. Die Diskrepanz des erhöhten Serumspiegels ist ein Kurzeiteffekt, der bei einer Behandlungsdauer von 5 Tagen auftritt. Nach einer Behandlung von 3 Monaten sind die LH-Serumspiegel in der BP2-Behandlungsgruppe wie in der E2-Gruppe gesenkt (Seidlova-Wuttke *et al.* 2005). Da die erhöhten Serumspiegel nicht mit der Genexpression des Hormons korrelieren, ist es durchaus möglich, dass BP2 die Sekretion von LH moduliert und LH aus zellulären Speichern freigesetzt wird.

Die LH-Sekretion wird auch auf der Ebene der Hypophyse beeinflusst. So reagieren Hypophysenzellen in der Primärzellkultur auf die Belastung mit E2 durch eine erhöhte LH-Sekretion (Tang *et al.* 1975; Emons *et al.* 1986). Dies konnte auch für BP2 in der Hypophysenzellkultur gezeigt werden. Dieser Effekt ist ER-vermittelt und kann durch den ER-Antagonisten ICI 182,780 gehemmt werden. Die Aktivität von BP2 unterscheidet sich auch darin nicht von der der Positivkontrolle E2 und entfaltet somit eine rein estrogene Aktivität. Dieser *in vitro*-Versuch liefert keine Erklärung für den Kurzzeiteffekt von BP2 auf die Serumkonzentration von LH. Es kann sich dennoch um einen BP2 spezifischen SERM-Effekt auf die Hypophyse handeln, der mit diesem Assay nicht erfasst werden konnte.

Eine neuere Untersuchung konnte zeigen, dass BP2 die Effekte von Testosteron hemmt, also ein potentes Antiandrogen ist (Suzuki *et al.* 2005). Für andere Antiandrogene wie Flutamid, Procymidon oder Equol wurde gezeigt, dass diese Substanzen die LH-Sekretion induzieren können (Kerrigan *et al.* 1994; Lund *et al.* 2004; Svechnikov *et al.* 2005). Diese Versuche wurden in männlichen Ratten durchgeführt, so dass eine Übertragung dieser Ergebnisse nicht ohne weiteres möglich ist. Doch stellt es einen weiteren Wirkmechanismus von BP2 dar, der anhand eines anderen Tiermodells untersucht werden müsste.

Die Genexpression von TERP-1 in der Hypophyse wird durch E2V auf etwa 6000 % der basalen Expression in der Kontrollgruppe gesteigert. Die Behandlung mit BP2 hat ebenfalls in allen Dosen einen deutlich stimulierenden Effekt auf die TERP-1-Genexpression. In der BP2-100-Gruppe erreicht die Expression das Niveau der Positivkontrolle mit E2V, in den höheren Konzentrationen wird die Genexpression noch stärker als bei E2V stimuliert. In Zellkulturexperimenten wurde gezeigt, dass die TERP-1-Genexpression ER α -abhängig durch ein ERE vor Exon 5 reguliert wird (Schausi *et al.* 2003). BP2 ist demnach in der Lage, über ER α die Genexpression von TERP-1 zu stimulieren.

- **Uterus:** Morphologisch konnten in den Schnitten der E2V-Gruppe verschiedene Veränderungen, die für die Behandlung mit Estrogenen typisch sind, beobachtet werden. Die Zellen des Epithels des Endometriums machen ein deutliches

Längenwachstum durch. In sehr seltenen Fällen wurde auch ein lokal mehrschichtiges Epithel gefunden. Dies entspricht in der Ratte allerdings einem pathologischen Befund, da im natürlichen Zyklus der Ratte ein mehrschichtiges Epithel nicht vorkommt. Die Zellen des Endometriums (*Lamina propria*) zeigen Anzeichen einer Polarisierung. Die Zellen und auch die Zellkerne haben eine spindelförmige Form angenommen. Des Weiteren wurde eine Anreicherung von eosinophilen Zellen im Endometrium beobachtet. Dieses Phänomen wurde beim Menschen vor und nach der Menstruation beschrieben (Salamonsen *et al.* 1999) und auch bei Ratten während des Estrus (Rytomaa 1960). Eine E2-Behandlung induziert das chemotaktisch wirkende Eotaxin, welche zu der Einwanderung der eosinophilen Zellen führt (Tchernitchin *et al.* 1974). Die Rolle dieser Zellen ist bislang unbekannt, allerdings wird vermutet, dass sie an der Gewebedegradation und -regeneration beteiligt sind (Zhang *et al.* 2000).

Das Uterusgewicht wurde durch die Behandlung mit E2V im Vergleich zur Kontrollgruppe fast verdreifacht. Auch die Gabe von BP2 führte ab 100 mg/kg zu einer dosisabhängigen Steigerung des Uterusgewichtes. In der BP2-1000-Gruppe wurde ebenfalls eine Verdreifachung des Uterusgewichtes wie bei E2V beobachtet. Die Reaktion des Uterus, auf Estrogene mit einem vermehrten Wachstum zu reagieren, wurde von Couse und Mitarbeitern beschrieben (Couse *et al.* 1995). Bei Untersuchungen dieser Reaktion des Uterus in *knockout*-Mäusen ist festgestellt worden, dass ER α - und ER α/β -*knockout*-Mäuse im Gegensatz zu ER β -*knockout*-Mäusen auf die Behandlung mit Estrogenen nicht reagieren (Krege *et al.* 1998). Die Kaskade von zellulären und molekularen Interaktionen, die in dem Gewichtszuwachs des Uterus endet, ist hauptsächlich von der Funktion des ER α abhängig. Da aber ER β -*knockout*-Mäuse trotz einer intakten Entwicklung der Geschlechtsorgane unter einer starken Subfertilität leiden, ist nicht ausgeschlossen, dass der ER β einen wichtigen Einfluss auf die Reproduktion hat (Krege *et al.* 1998). Zudem können auch selektive ER β -Agonisten einen sehr schwachen, aber dosisabhängigen, induzierenden Einfluss auf das Uterusgewicht ausüben (Frasor *et al.* 2003). Inwieweit auch synergistische, also von ER α und ER β vermittelte Effekte bei *knockout*-Mäusen eine Rolle spielen, ist bislang unbekannt.

Die Genexpression von IGF-1 wurde durch die Behandlung mit E2V auf etwa 1000 % gesteigert. Die Behandlung mit BP2 bewirkte in den beiden höchsten Dosierungen nur eine Steigerung der Genexpression auf etwa 500 %. IGF-1 und auch der IGF-1-Rezeptor sind beteiligt an der Signaltransduktionskaskade des estrogenen Signals, welche zum Uteruswachstum führt (Richards *et al.* 1996). In IGF-1-*knockout*-Mäusen konnte das Uteruswachstum nicht durch E2-Gabe induziert werden (Adesanya *et al.* 1999). Andererseits konnte nach der Gabe von IGF-1 ein Estrogen-ähnliches Uteruswachstum beobachtet werden (Nelson *et al.* 1991). Verschiedene *in vivo*- und *in vitro*-Studien konnten zeigen, dass ER α bei der Induktion der IGF-1-Genexpression eine wichtige Rolle spielt (Ignar-Trowbridge *et al.* 1992; Curtis *et al.* 1996; Klotz *et al.* 2000).

Die C3-Genexpression im Uterus wurde durch die Behandlung mit BP2 deutlich dosisabhängig induziert. Dieser Effekt begann in der BP2-33-Gruppe und setzte sich bis in die BP2-1000-Gruppe fort. Die beiden höchsten Dosierungen von BP2 erreichten eine ähnlich hohe Stimulation der C3-Expression wie E2V. Durch die Behandlung mit E2V konnte die C3-Expression auf über 10.000 % gesteigert werden. Frasor *et al.* beschrieben die Induktion der C3-Expression nach Gabe von E2 und des ER α -Agonisten Propylpyrazoltriol (PPT). Die Gabe des ER β -Agonisten DPN konnte die C3-Expression dagegen nicht signifikant stimulieren (Frasor *et al.* 2003). Da in dieser Studie jedoch nur eine Dosis DPN verwendet wurde, ist es möglich, dass auch ER β -Agonisten eine stimulierende Wirkung auf die C3-Genexpression ausüben können. BP2 könnte demnach hauptsächlich über ER α seine stimulierende Wirkung ausüben, möglich wäre jedoch auch eine Wirkung über ER β .

4.2.4 Auswirkungen von BP2 auf die HPT-Achse

Estrogene haben einen regulierenden Einfluss auf Metabolismus und Anabolismus des menschlichen Organismus. So hat E2 einen direkten Einfluss auf die hypophysäre TSH-Sekretion. Weibliche Ratten zeigen ein anderes Profil in der Konzentration der TRH-Rezeptoren in der Hypophyse und auch in der 5'-Deiodase-Aktivität (Donda *et al.* 1990). Eine Behandlung von kastrierten Männchen mit E2 resultiert in der Verweiblichung dieser Merkmale. Physiologische Konzentrationen von E2 ($1 \cdot 10^{-11}$ - $1 \cdot 10^{-9}$ M) sind in der

Lage die TSH-Sekretion in der Hypophysenzellkultur um das 5fache und die intrazelluläre TSH-Konzentrationen um das 2fache zu erhöhen (Miller *et al.* 1977). Andere Steroidhormone wie Androgene, Progesteron und Glukokortikoide haben indes keinen Einfluss auf die hypophysäre TSH-Sekretion.

- **Hypophyse und Hypothalamus:** Der stimulierende Effekt von E2 auf die TSH-Sekretion von Hypophysenzellen wurde in der Zellkultur nachgewiesen. Durch die Koinkubation mit dem ER-Antagonisten ICI 182,780 konnte die Wirkung von E2 aufgehoben werden. Dies zeigt, dass der direkte Effekt von E2 auf die TSH-Sekretion abhängig von funktionsfähigen ERs in der Hypophyse ist. Auch die Testsubstanz BP2 zeigte eine deutliche Induktion der TSH-Sekretion. Diese Induktion war ebenfalls durch ICI hemmbar und belegt somit, dass BP2 auf die Funktion der Hypophyse in der HPT-Achse als reines Estrogen agiert. Auch *in vivo* konnte der stimulierende Effekt von E2 auf die TSH-Sekretion anhand des Serumspiegels beobachtet werden. Wie zu erwarten, hatte BP2 *in vivo* den gleichen Effekt wie die Positivkontrolle E2V. Zusätzlich zu den Serumspiegeln wurde die Produktion von TSH auf der Ebene der mRNA untersucht. Hier wurde ein hemmender Einfluss von E2 und auch von BP2 auf die Expression der α -Untereinheit, welche Bestandteil der drei Hormone LH, FSH und TSH ist, sowie auf die TSH β -Untereinheit nachgewiesen. Die TSH β -Untereinheit ist hier der entscheidende Faktor, da die TSH-Expression auf der Proteinebene von der Genexpression der α -Untereinheit nahezu unabhängig ist (Gurr *et al.* 1983). Der Widerspruch zwischen der Regulation des Serumspiegels und der Genexpression wurde schon von Lippman *et al.* beschrieben. In intakten Ratten führte die Administration von TRH zu einer starken Erhöhung der TSH-Serumspiegel, während die Genexpression der Untereinheiten des Hormons unbeeinflusst waren (Lippman *et al.* 1986). Daraus resultiert, dass die TSH-Produktion primär durch posttranslationale Glykosylierung und Sekretion aus zellulären Speichern kontrolliert wird. In einem Langzeitversuch mit BP2 über 3 Monate wurde in den BP2-Behandlungsgruppen keine Induktion der TSH-Sekretion im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrollgruppe gefunden (Seidlova-Wuttke *et al.* 2005). Bei der Regulation der TSH-Sekretion zeigen sich kurzzeitig Unterschiede in der Reaktion der Konzentration im Serum und der Genexpression, die sich erst nach drei Tagen ausgleichen (Murakami *et al.* 1991).

Um zu überprüfen, ob die Induktion der TSH-Sekretion ein direkter Effekt der Testsubstanzen auf die Hypophyse ist oder aber auf eine vermehrte TRH-Sekretion im Hypothalamus zurückzuführen ist, wurde die TRH-Genexpression im MBH gemessen. Es konnte gezeigt werden, dass die Genexpression in der E2V- sowie in den BP2-Behandlungsgruppen unbeeinflusst war. Die erhöhte TSH-Sekretion der Hypophyse ist demnach nicht auf eine Erhöhung der TRH-Expression im Hypothalamus durch die Testsubstanz BP2 zurückzuführen.

- **Schilddrüsenhormone:** Die Veränderungen, die BP2 auf die Serumspiegel der Schilddrüsenhormone T3 und T4 ausübt, sind abweichend von den bei E2V-Gabe beobachteten Veränderungen der Hormone. Es konnte gezeigt werden, dass BP2 im Gegensatz zu E2V einen hemmenden Einfluss auf die Produktion des T4 hat, während E2V die Konzentration des T3 senkt. Dies wurde im Langzeitversuch bestätigt (Seidlova-Wuttke *et al.* 2005). Zusätzlich dazu wurden einige Diskrepanzen im Verhältnis von gesamt-T3 bzw. -T4 und freiem Hormon gefunden. Nur ein kleiner Teil der Schilddrüsenhormone liegt in freier Form vor und ist aktiv. BP2 hat einen deutlich von E2V abweichenden, senkenden Effekt auf die fT3-Konzentration, während E2V die Konzentration von fT4, welches in Zielorganen in das aktive T3 umgesetzt werden kann, erhöht. Nur das freie Hormon ist biologisch aktiv, kann die Membran der Zielzelle passieren und im Allgemeinen die Stoffwechselrate und Entwicklungsvorgänge beschleunigen. E2 erhöht die Stoffwechselrate des Organismus und verringert die Nahrungsaufnahme (Young 1986), was zu einem reduzierten Körpergewicht führt. BP2 wiederum senkte das fT3 und verlangsamt somit den Stoffwechsel des Organismus. Das Bild, das BP2 *in vivo* verursacht, entspricht dem von hypothyreoten Ratten.
- **Proteine in der Schilddrüse und der Leber:** Das im Serum zirkulierende T3 und T4 wird durch die 5'-Deiodase-Aktivität in der Leber degradiert. Der 5'-Deiodase-Assay hat für die Behandlungsgruppen keine erhöhte Aktivität ergeben, so dass eine vermehrte Degradation und Exkretion der Schilddrüsenhormone durch einen Einfluss von BP2 in der Leber ausgeschlossen werden konnte. Bisher konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass BP2 Effekte verursacht die mit E2V vergleichbar sind. Auf die

Sekretion der Schilddrüsenhormone entfaltet BP2 jedoch eine nicht-estrogene Aktivität. Der Effekt von BP2 auf die TSH-Sekretion in der Hypophyse ist mit E2V vergleichbar und kann somit nicht für den Schilddrüseneffekt verantwortlich sein. Ein Einfluss auf Transportproteine im Serum würde nur die Diskrepanz zwischen gesamt-T3 bzw. -T4 und den freien Hormonen erklären. Deshalb wurde die Schilddrüsenfunktion anhand von Schlüsselenzymen (Natrium/Iodid-Symporter, Schilddrüsenperoxidase) untersucht.

Basierend auf den Untersuchungen von Carrasco, ist der Natrium/Iodid-Symporter (NIS) kloniert und molekular charakterisiert worden (Carrasco 1993). Der NIS transportiert aktiv Iodid in die Schilddrüsenzellen und hat damit eine Schlüsselposition in der Synthese der Schilddrüsenhormone. Bei der Untersuchung der Proteinexpression des NIS konnte kein Einfluss von BP2 festgestellt werden. Der hemmende Effekt von BP2 auf die Sekretion der Schilddrüsenhormone ist demnach nicht auf eine Störung der Iodid-Aufnahme in die Follikel der Schilddrüse zu erklären.

Die Jod-Atome der Schilddrüsenhormone werden über eine radikalische Reaktion im Inneren der Follikel in das dort gespeicherte Thyreoglobulin eingebaut. Hierfür ist die Schilddrüsenperoxidase (TPO) verantwortlich, die von den Follikelepithelzellen produziert und in das Innere des Schilddrüsenfollikels abgegeben wird. In einem *in vitro*-TPO-Assay mit rekombinantem humanem Protein inhibierte BP2 bei einer Konzentration von 0,4 μM die TPO-Aktivität signifikant (Schmutzler *et al.* 2006). Damit ist BP2 ein stärkerer Inhibitor der TPO-Aktivität als das bekannte Goitrogen Genistein. *In vivo* zeigte die Administration von BP2 allerdings ein anderes Bild. BP2 induzierte die TPO-Aktivität und entfaltet die stärkste Wirkung in der BP2-100-Gruppe. Die Serumanalysen ergaben, dass der Serumspiegel des freien BP2 (siehe Abbildung 3-13) in der Gruppe BP2-100 bei 0,44 μM liegt. Die effektive Konzentration von BP2 *in vivo* und *in vitro* ist demnach gleich. Der entgegengesetzte Effekt von BP2 auf die TPO-Aktivität *in vitro* und *in vivo* ist durch einen zellkulturspezifischen Effekt zu erklären. In *in vitro*-Zellkulturssays fehlen die Wechselwirkungen mit anderen Systemen des Organismus. Für MMI und PTU wurden ebenfalls Unterschiede in der Modulation der TPO-Aktivität *in vivo* und

in vitro gefunden (Davidson *et al.* 1978). Die Dosis-Wirkungsbeziehung der TPO-Aktivität entspricht nicht den Dosis-Wirkungsbeziehungen der Parameter TSH-, T3- und T4-Sekretion in den BP2-Behandlungsgruppen. Zudem ist die Aktivität der TPO *in vivo* induziert worden, was nicht in einem Absinken der Schilddrüsenhormone resultieren würde. Deshalb ist es unwahrscheinlich, dass die Veränderung der Synthese der Schilddrüsenhormone durch die Modulation der TPO-Aktivität für die veränderten Serumspiegel verantwortlich ist.

Die in der HPT-Achse erhobenen Daten zeigen einen nicht Estrogen-ähnlichen Effekt in der Schilddrüse. Der Mechanismus konnte allerdings nicht mit den verwendeten Assays aufgeklärt werden. Schon bei der Regulation von ER α und ER β zeigte sich ein von E2 abweichendes Bild in der Schilddrüse. Ob ein Zusammenhang zu den Effekten auf die Schilddrüsenhormone besteht, kann anhand dieser Daten nicht eindeutig geklärt werden. BP2 konnte durch Untersuchungen an der HPT-Achse als ein Disruptor der Schilddrüsenaktivität identifiziert werden.

4.3 Metabolisierung und Kinetik von BP2

Die Absorption der Testsubstanz nach der oralen Applikation sollte anhand der Serumspiegel verfolgt werden. Dazu wurde das Serum der Tiere mittels HPLC untersucht. Ein der Reinsubstanz entsprechender Peak konnte im Serum identifiziert werden, zudem wurden dosisabhängig zwei weitere Peaks gefunden, die nicht im Serum der Kontrolltiere nachweisbar und somit auf die Behandlung zurückzuführen waren.

Substanzen, die oral appliziert werden, gelangen nach der Absorption im Magen-Darm-Trakt über die Pfortader in die Leber. Dort kommt häufig der *first-pass*-Effekt zum Tragen (Whitehead *et al.* 1980). Die Leber ist neben Darm und Niere das zentrale Organ, welches Xenobiotika degradieren kann (Mutschler *et al.* 2001). Substanzen, die von den Stoffwechselwegen des Organismus nicht verwertet oder abgebaut werden können, werden über die Biotransformation in den Phase-I-Reaktionen transformiert und aktiviert. Dies geschieht bei Säugern häufig durch P450-Isoenzyme der Familien Cyp1 bis Cyp4. Anschließend werden diese aktivierten Substanzen in den Phase-II-Reaktionen mit polaren Resten gekoppelt und können dann in der Regel ausgeschieden werden (Mutschler *et al.* 2001).

Über den AhR werden einige wichtige Enzyme der Phase-I der Biotransformation reguliert. Häufig induzieren die Liganden des AhR ihre eigene Biotransformation über diesen Weg. Im EROD-Assay konnte eine schwache Induktion der Aktivität durch die Behandlung mit BP2 gemessen werden (siehe Abbildung 3-4). Dies wurde auf der Ebene der Genexpression anhand der Cyp1a1-Expression bestätigt (Abbildung 3-29). Da die Induktion jedoch im Vergleich zu 3MC eher gering ausfiel, ist es jedoch auch möglich, dass BP2 hauptsächlich durch andere Enzyme, zum Beispiel Transferasen der Phase-II-Biotransformation metabolisiert wird.

Durch die Behandlung mit *Helix pomatia*-Glucuronidase können die wichtigsten Aggregate der Biotransformation, die Glucuronide und Sulfate wieder gespalten werden. In der Tat war es möglich, durch die Inkubation der Seren mit diesem Enzym die zwei unbekannt Peaks aus den Chromatogrammen des Serums der BP2 Gruppen zu entfernen. Es war also anzunehmen, dass die oral applizierte Testsubstanz in der Leber zu BP2-Glucuronid und BP2-Sulfat metabolisiert wird.

Um diese Vermutung zu belegen, wurde die Seren der BP2-Tiere einer Massenspektroskopie unterzogen. Dabei konnte für den Peak, welcher die gleiche Retentionszeit wie der Standard aufwies, die Masse des BP2 ermittelt und für die beiden zusätzlichen Peaks die Masse des Glucuronids und des Sulfats gemessen werden. Die Annahme aus dem EROD-Assay wurde hier bestätigt. BP2 wird über die selbst induzierte Biotransformation zu BP2-Glucuronid und BP2-Sulfat metabolisiert.

Mit Hilfe dieser Methode konnte die Konzentration des freien BP2 sowie des gesamt BP2 im Serum der Versuchstiere bestimmt werden. Daraus lässt sich der Anteil des metabolisierten sowie des freien BP2 ermitteln. Der Anteil des freien BP2 und damit des biologisch verfügbaren, liegt durch alle 5 Behandlungsgruppen, also dosisunabhängig, bei etwa 2 % (1,67 - 2,8 %). Eine Ausnahme bildet die BP2-33-Gruppe mit 9,48 %. Aus der Abbildung 3-13 ist ersichtlich, dass der Mittelwert dieser Gruppe im Kontext aller Behandlungsgruppen unerwartet hoch liegt. Deshalb kann der Wert als Ausreißer angesehen werden. Es gibt zurzeit keine vergleichbaren Daten für Benzophenone oder andere UV-Filter.

Da der Anteil des freien BP2 hier dosisunabhängig zu sein scheint, kann man annehmen, dass die Kapazität der Leber in Bezug auf die Umsetzung der applizierten Substanz nicht ausgeschöpft wurde. Die leichte Induktion der EROD-Aktivität als Indiz für die Aktivität der

Biotransformation in den hohen Behandlungsgruppen zeigt allerdings schon eine Anpassung und damit Erhöhung der Kapazität der Leber.

Aus den Graphen der Dosiswirkungsbeziehung (Abbildung 3-33) ist eine deutliche Induktion der Effekte in der BP2-333-Gruppe ersichtlich. Dort liegt die Konzentration des freien BP2 bei 1,83 μM . Aus den *in vitro*-Versuchen können die BP2-Konzentrationen abgeleitet werden, die für eine signifikante Induktion des Endpunktes benötigt werden. Im RBA liegt die für eine Verdrängung von E2 benötigte Konzentration bei 0,4 μM BP2, im *E-screen* zeigt sich eine deutliche Induktion des Wachstums bei 1 μM BP2 und im Transaktivierungsassay sind Konzentrationen von 0,1 bzw. 0,3 μM BP2 nötig, um den Reporter über den jeweiligen ER-Subtyp zu induzieren. Die effektiven Konzentrationen der *in vitro*-Assays korrelieren mit den Konzentrationen des freien BP2 im Serum der Versuchstiere. Das bedeutet, dass das im Magen-Darm-Trakt resorbierte BP2 in einem *first-pass*-Effekt in der Leber metabolisiert wird und nur ca. 2 % des freien BP2 das Serum erreichen. Würde mehr freies BP2 die Leber passieren, um erst durch die wiederholten Passagen durch die Leber metabolisiert zu werden, würde der estrogene Effekt in den Behandlungsgruppen viel stärker ausfallen, da schon geringe Belastungszeiten mit estrogenen Substanzen *in vivo* zu einer Reaktion führen.

Um diese Vermutung zu überprüfen, wurde die Konzentration des BP2 und seiner Metaboliten zeitabhängig nach der Applikation im Serum sowie im Urin der behandelten Tiere gemessen. Die Messung der BP2-Konzentrationen im Serum hat ergeben, dass das Maximum an BP2 und den Metaboliten 30 Minuten nach der Applikation erreicht wurde. Bis 180 Minuten fällt die Konzentration des freien BP2 und die des BP2-Sulfats leicht aber stetig ab, während die Konzentration des BP2-Glucuronids nach 30 Minuten viel höher ist als bei BP2 und innerhalb von 120 Minuten rapide abfällt. Die im Vergleich zu Sulfat hohe Glucuronid-Konzentration im Serum war zu erwarten, da die Bildung des Sulfates, die eine Konkurrenzreaktion zur Glucuronidierung darstellt, durch die verfügbare Menge des endogenen Sulfates begrenzt wird (Coughtrie *et al.* 1998). Es handelt sich demnach um einen *first-pass*-Effekt, der für die Metabolisierung des BP2 verantwortlich ist. Der rapide Abfall der Konzentration des BP2-Glucuronids im Serum während der ersten 2 Stunden nach der Applikation deutet auf eine rasche Entfernung durch Exkretion hin. In der Tat ist anhand der Messwerte im Urin zu erkennen, dass das reine BP2 nur in sehr geringen Mengen und die beiden Metaboliten, und besonders das BP2-Glucuronid, in höheren Mengen ausgeschieden

wurden. Das Maximum der Exkretion liegt bei 120 Minuten, wobei der Messpunkt aber für den Zeitraum von 60 bis 120 Minuten steht, in dem der Urin im Tier produziert wurde.

4.4 Dosis-Wirkungsbeziehung und Risiko-Bewertung

Das Erstellen einer Dosis-Wirkungsbeziehung dient der Ermittlung von Schwellenwerten, bei denen ein Parameter einen deutlichen Effekt verursacht (EC_{50} oder *lowest observed adverse effect level*; LOAEL) oder bei denen ausgeschlossen werden kann, dass ein Effekt verursacht wird (*no observed adverse effect level*; NOAEL oder CED).

In *in vitro*-Assays werden Schwellenwerte für einen Mechanismus bzw. biologischen Endpunkt ermittelt, die aber in keinem Verhältnis zu einem Organismus stehen. Deshalb wurde ein *in vivo*-Versuch durchgeführt, bei welchem die Belastung quantifiziert werden und mit dem Effekt in Korrelation gebracht werden konnte. Anhand der Ergebnisse einer Dosis-Wirkungsbeziehung können Hypothesen aus epidemiologischen Studien bestätigt oder widerlegt werden.

Die aus dem Versuch ermittelten Daten wurden mit Hilfe des *Benchmark Approaches* analysiert. Eine detaillierte Analyse wurde veröffentlicht (Schlecht *et al.* 2006). Aus diesem Grund wird hier nur eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse gegeben.

Für die Analyse wurde der *Benchmark Approach* (Crump 1984) gewählt, da er erhebliche Vorteile gegenüber der Berechnung der NOAEL- und LOAEL-Werte hat. Die aus der Analyse erhaltenen CEDs sind im Gegensatz zu den NOAEL/LOAEL-Werten unabhängig von der Wahl der Dosierungen im Versuch und entsprechen mit einer deutlich höheren Wahrscheinlichkeit dem so genannten "wirklichen" *no-adverse-effect*-Level. Eine ausführliche Diskussion ist im Kemi-Report nachzulesen (Kemi 2003).

Es wurde ein CES von einer Standardabweichung gewählt, um die individuellen Schwankungen zwischen einzelnen Individuen innerhalb des Parameters zu berücksichtigen. Die sensitivsten Parameter waren die TERP-1-Genexpression in der Hypophyse mit einem CED von 1,59 mg/kg Kg, die C3-Genexpression im Uterus mit einem CED von 3,24 mg/kg Kg und der LDL-Serumspiegel bei den metabolischen Parametern mit einem CED von 78,2 mg/kg Kg.

Die Analyse zeigt, dass BP2 *in vivo* bei ovariectomierten weiblichen Ratten eine endokrine Aktivität oberhalb von Dosen von 1,6 bis 3,2 mg/kg Körpergewicht hervorrufen kann.

Die ermittelten Dosen können mit Hilfe von EU-Richtlinien für Expositionswerte herangezogen werden, um auf ein mögliches Risiko für den Menschen zu schließen. In Schlecht *et al.* sind die Ergebnisse ausführlich in Bezug auf einige Eventualitäten hinsichtlich der Absorption und Exposition diskutiert (Schlecht *et al.* 2006).

Für eine Extrapolation der Daten aus dem Tierversuch wurden so genannte Unsicherheitsfaktoren (UF) herangezogen, welche die Differenzen zwischen dem Tiermodell und dem Menschen als exponierte Gruppe berücksichtigen. In diesem Fall kann ein UF von 1440 benutzt werden, der sich aus den Faktoren 10 für die Intraspezies-Varianzen, 48 für die Interspezies-Varianzen und dem Faktor 3 für die Applikationsdauer zusammensetzt. Die maximal akzeptable Exposition berechnet sich aus CED/UF und beträgt somit 1,1 µg/kg Kg.

Die Exposition einer Risikogruppe kann experimentell ermittelt werden. Allerdings liegen hierzu für BP2 noch keine Ergebnisse vor. Die EU Direktive *Counsel Directive 95/17EC* gibt in einem solchen Fall, speziell für UV-Filter, Richtwerte für die Berechnung der Exposition. Bei einem Gehalt von 0,24 % in kosmetischen Produkten ergibt sich eine systemische Exposition von 40 µg/kg Körpergewicht.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die europäische und amerikanische Bevölkerung mit einem Effekt rechnen muss, der sich aber möglicherweise nur bei sensitiven Bevölkerungsgruppen wie z.B. bei Kindern auswirkt. In anderen Ländern wie z.B. in Japan ist aufgrund einer anderen Verordnung zu UV-Filtern in Kosmetika ein maximaler Gehalt von 10 % erlaubt. Dadurch ist mit einer höheren Belastung zu rechnen. Dies könnte auch bei gesunden Erwachsenen zu einer Beeinträchtigung führen. In diesem Zusammenhang müssen auch kombinierte Effekte mit anderen EAC, welchen der Mensch ausgesetzt ist, angenommen werden. So konnten Heneweer *et al.* zeigen, dass gerade UV-Filter in Mischungen additive Effekte verursachen (Heneweer *et al.* 2005). Außerdem werden Wirkungen chemischer Substanzen in sehr geringen Dosen (*low dose*-Effekte) diskutiert, die möglicherweise über andere Wirkmechanismen vermittelt werden können (Davis *et al.* 1990).

BP2 entfaltet *in vivo* eine estrogene Aktivität und könnte demnach Einfluss auf Estrogen-regulierte Systeme wie die Reproduktion, den Metabolismus und die Entwicklung nehmen. Dies stützt die Hypothesen aus vielen epidemiologischen Studien, dass die Belastung mit endokrin aktiven Chemikalien für Beeinträchtigungen der menschlichen Gesundheit verantwortlich sein kann.

5 Zusammenfassung

Das als UV-Filter zum Produktschutz in Kosmetikprodukten enthaltene BP2 ist in den Verdacht geraten, eine EAC zu sein. Aufgrund der Limitierung des von der OECD vorgeschlagenen uterotrophen Assay auf nur ein Estrogen-sensitives Organ wurde zusätzlich zu den *in vitro-Screening*-Methoden, ein erweitertes Modell zur Untersuchung der Estrogenität von BP2 eingesetzt. In diesem Modell wurden Parameter der HPG-Achse, der HPT-Achse und des Metabolismus berücksichtigt, um eine mögliche ER-Subtyp-spezifische, SERM- oder ER-unabhängige Aktivität zu erfassen.

In den *in vitro*-Analysen ist gezeigt worden, dass BP2 ein moderates Estrogen ist. Es verfügt über die Fähigkeit, mit E2 um Bindestellen zu konkurrieren, kann über ERs Reportergene induzieren und induziert Estrogen-regulierte Endpunkte. Obwohl *in vitro* eine ER β -Präferenz festgestellt wurde, vermittelt BP2 eine estrogene Aktivität über den ER α *in vivo*.

Der Metabolismus der Versuchstiere wurde durch BP2 auf eine mit E2 vergleichbare Weise beeinflusst. Dies wurde anhand eines estrogen regulierten Gens in der Leber (IGF-1) und von Serumlipidwerten untersucht. Ein BP2-spezifischer, von der E2-Wirkung abweichender Effekt ist die Induktion der GH-Sekretion in der Hypophyse. BP2 hat möglicherweise noch eine andere über Steroidrezeptoren, beispielsweise den Androgen-Rezeptor, vermittelte Aktivität.

Trotz eines fehlenden Effekts auf den Hypothalamus verursachte BP2 Veränderungen in der Genexpression des ER α/β -Systems in der Hypophyse, dem Uterus und der Leber, die denen von E2 gleichen. In der Schilddrüse gibt es Anzeichen einer von der E2-Wirkung abweichenden Modulation.

In der Sekretion der Hypophysenhormone zeigt sich bei LH ein von E2 abweichender Effekt. Auch hier ist es möglich, dass BP2 über andere Steroidhormonrezeptoren biologische Prozesse beeinflusst. Auf die Genexpression von TERP1 wirkt BP2 als Estrogen. Die Veränderungen im Uterus, die durch BP2 eingeleitet wurden, sind anhand der Morphologie sowie anhand der Markergene IGF-1 und C3 als rein estrogen bestätigt worden.

Innerhalb der HPT-Achse übt BP2 durch einen direkten Mechanismus auf die Hypophyse einen estrogenen Einfluss aus. Das Bild das BP2 *in vivo* bei der T3/T4 Sekretion verursacht, entspricht, im Gegensatz zu dem der E2 behandelten Tiere dem Bild von hypothyreoten Ratten. Weder die Degradation in der Leber noch die Schilddrüsenhormonproduktion ist hierfür verantwortlich. Es ist aber wahrscheinlich, dass ein Effekt auf die

Schilddrüsenfunktion die Ursache ist. Möglicherweise kommt eine Konkurrenzreaktion zwischen BP2 und Tyrosinresten des Thyreoglobulins bei der Iodierung in der Schilddrüse in Frage.

BP2 wird schnell durch den *first-pass*-Effekt in der Leber metabolisiert und ausgeschieden. Nur ein geringer Anteil freies BP2 erreicht das Serum. Die Serumkonzentration des freien BP2 in den Gruppen mit einer deutlichen estrogenen Wirkung korreliert mit den effektiven Konzentrationen der *in vitro*-Assays.

Die Analyse der durch BP2 am stärksten beeinflussten Parameter mit Hilfe des *Benchmark-Approaches* zur Extrapolation der Effekte auf exponierte Bevölkerungsgruppen hat ergeben, dass eine Beeinflussung gesunder Individuen durch BP2 möglich ist. Eine weitere Risikogruppe sind zum Beispiel Kinder, bei denen aufgrund sensibler Entwicklungsvorgänge und einem in diesem Fall ungünstigen Verhältnis von Körperoberfläche zu Körpervolumen stärkere Effekte zu erwarten sind. Besonders zu erwähnen sind in diesem Fall die Effekte auf die Schilddrüsenfunktionen, die als advers eingestuft werden sollten. Beachtung finden sollten hier auch mögliche Misch-Effekte mit anderen EAC und besondere Effekte bei geringen Dosen.

6 Literatur

- Adesanya, O.O., Zhou, J., Samathanam, C., Powell-Braxton, L., Bondy, C.A. (1999). Insulin-like growth factor 1 is required for G2 progression in the estradiol-induced mitotic cycle. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(6):3287-3291.
- Allen, E., Smith, G.M., Gardner, W.U. (1937). Accentuation of the growth effect of theelin on genital tissues of the ovariectomized mouse by arrest of mitosis with colchicines. *Amer J Anat* **61**:321-341.
- Alvaro, D., Alpini, G., Onori, P., Perego, L., Svegliata Baroni, G., Franchitto, A., *et al.* (2000). Estrogens stimulate proliferation of intrahepatic biliary epithelium in rats. *Gastroenterology* **119**(6):1681-1691.
- Anstead, G.M., Carlson, K.E., Katzenellenbogen, J.A. (1997). The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62**(3):268-303.
- Aronica, S.M., Kraus, W.L., Katzenellenbogen, B.S. (1994). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(18):8517-8521.
- Auger, J., Kunstmann, J.M., Czyglik, F., Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med* **332**(5):281-285.
- Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G. (1995). Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**(6):851-857.
- Bieglmayer, C., Spona, J., Schoeder, R. (1980). Modulation of LH-RH stimulated gonadotropin release by progestagens and 17 beta-estradiol in primary pituitary cell culture. *Endocrinol Exp* **14**(3):171-182.
- Blair, R.M., Fang, H., Branham, W.S., Hass, B.S., Dial, S.L., Moland, C.L., *et al.* (2000). The estrogen receptor relative binding affinities of 188 natural and xenochemicals: structural diversity of ligands. *Toxicol Sci* **54**(1):138-153.
- Blake, C.A. (1977). A medial basal hypothalamic site of synergistic action of estrogen and progesterone on the inhibition of pituitary luteinizing hormone release. *Endocrinology* **101**(4):1130-1134.
- Bonde, J.P., Kold Jensen, T., Brixen Larsen, S., Abell, A., Scheike, T., Hjollund, N.H., *et al.* (1998). Year of birth and sperm count in 10 Danish occupational studies. *Scand J Work Environ Health* **24**(5):407-413.
- Bowe, J., Li, X.F., Sugden, D., Katzenellenbogen, J.A., Katzenellenbogen, B.S., O'Byrne, K.T. (2003). The effects of the phytoestrogen, coumestrol, on gonadotropin-releasing hormone (GnRH) mRNA expression in GT1-7 GnRH neurones. *J Neuroendocrinol* **15**(2):105-108.

- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254.
- Brash, D.E., Rudolph, J.A., Simon, J.A., Lin, A., McKenna, G.J., Baden, H.P., *et al.* (1991). A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(22):10124-10128.
- Bray, G.A., Saiduddin, S., York, D.A., Swerdloff, R.S. (1976). Effect of estradiol on uterine weight, thyroid function food intake, and pituitary weight of genetically obese (fatty-Zucker) and lean rats. *Proc Soc Exp Biol Med* **153**(1):88-91.
- Brzozowski, A.M., Pike, A.C., Dauter, Z., Hubbard, R.E., Bonn, T., Engstrom, O., *et al.* (1997). Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**(6652):753-758.
- Burke, S. (2001). Missing Values, Outliers, Robust Statistics & Non-parametric Methods. *LCGC Europe Online Supplement*:19-24.
- Cardullo, R.A., Agrawal, S., Flores, C., Zamecnik, P.C., Wolf, D.E. (1988). Detection of nucleic acid hybridization by nonradiative fluorescence resonance energy transfer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**(23):8790-8794.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., Skakkebaek, N.E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Bmj* **305**(6854):609-613.
- Carrasco, N. (1993). Iodide transport in the thyroid gland. *Biochim Biophys Acta* **1154**(1):65-82.
- Castles, C.G., Oesterreich, S., Hansen, R., Fuqua, S.A. (1997). Auto-regulation of the estrogen receptor promoter. *J Steroid Biochem Mol Biol* **62**(2-3):155-163.
- Chen, Z., Zheng, H., Dong, K.W. (2001). Identification of negative and positive estrogen response elements in human GnRH upstream promoter in the placental JEG-3 cells. *Mol Cell Endocrinol* **184**(1-2):125-134.
- Chin, W.W., Godine, J.E., Klein, D.R., Chang, A.S., Tan, L.K., Habener, J.F. (1983). Nucleotide sequence of the cDNA encoding the precursor of the beta subunit of rat lutropin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(15):4649-4653.
- Chu, S., Fuller, P.J. (1997). Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor beta gene. *Mol Cell Endocrinol* **132**(1-2):195-199.
- Cidlowski, J.A., Black, J.B., Muldoon, T.G., Mahesh, V.B. (1975). Development of thyroidal responsiveness to estrogen in the maturing rat (38471). *Proc Soc Exp Biol Med* **148**(1):33-36.
- Clark, J.H., Markaverich, B.M. (1983). The agonistic and antagonistic effects of short acting estrogens: a review. *Pharmacol Ther* **21**(3):429-453.

- Clemons, J.H., Dixon, D.G., Bols, N.C. (1997). Derivation of 2,3,7,8-TCDD toxic equivalent factors (TEFs) for selected dioxins, furans and PCBs with rainbow trout and rat liver cell lines and the influence of exposure time. *Chemosphere* **34**(5-7):1105-1119.
- Collingwood, T.N., Urnov, F.D., Wolffe, A.P. (1999). Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* **23**(3):255-275.
- Collins, P., Webb, C. (1999). Estrogen hits the surface. *Nat Med* **5**(10):1130-1131.
- Colvin, P.L., Jr., Wagner, J.D., Heuser, M.D., Sorci-Thomas, M.G. (1993). Oral contraceptives decrease hepatic cholesterol independent of the LDL receptor in nonhuman primates. *Arterioscler Thromb* **13**(11):1645-1649.
- Cooke, B.K., A., S. (1982). Distribution and breakdown of DDT in orchard soil. *Pestic Sci* **13**:545-551.
- Coughtrie, M.W., Dajani, R., Kauffmann, F.C., Rubin, G.L., Sharp, S. (1998). Sulfotransferases and the Biology of Sulfation. In: *Drug Metabolism - Towards the Next Millennium* (Gooderham, N.J., ed). Amsterdam, Berlin, Oxford, Tokyo, Washington DC: I O S Press.
- Couse, J.F., Curtis, S.W., Washburn, T.F., Lindzey, J., Golding, T.S., Lubahn, D.B., *et al.* (1995). Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* **9**(11):1441-1454.
- Crump, K.S. (1984). A new method for determining allowable daily intakes. *Fundam Appl Toxicol* **4**(5):854-871.
- Curtis, S.W., Washburn, T., Sewall, C., DiAugustine, R., Lindzey, J., Couse, J.F., *et al.* (1996). Physiological coupling of growth factor and steroid receptor signaling pathways: estrogen receptor knockout mice lack estrogen-like response to epidermal growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(22):12626-12630.
- Danzo, B.J. (1997). Environmental xenobiotics may disrupt normal endocrine function by interfering with the binding of physiological ligands to steroid receptors and binding proteins. *Environ Health Perspect* **105**(3):294-301.
- Davidson, B., Soodak, M., Neary, J.T., Strout, H.V., Kieffer, J.D., Mover, H., *et al.* (1978). The irreversible inactivation of thyroid peroxidase by methylmercaptoimidazole, thiouracil, and propylthiouracil in vitro and its relationship to in vivo findings. *Endocrinology* **103**(3):871-882.
- Davis, J.M., Svendsgaard, D.J. (1990). U-shaped dose-response curves: their occurrence and implications for risk assessment. *J Toxicol Environ Health* **30**(2):71-83.
- Degen, G.H., Foth, H., Kahl, R., Kappus, H., Neumann, H.G., Oesch, F., *et al.* (1999). Hormonell aktive Substanzen in der Umwelt: Xenoöstrogene. 24: DGPT Forum.

- Denison, M.S., Pandini, A., Nagy, S.R., Baldwin, E.P., Bonati, L. (2002). Ligand binding and activation of the Ah receptor. *Chem Biol Interact* **141**(1-2):3-24.
- Dich, J., Wiklund, K. (1998). Prostate cancer in pesticide applicators in Swedish agriculture. *Prostate* **34**(2):100-112.
- Donda, A., Reymond, F., Rey, F., Lemarchand-Beraud, T. (1990). Sex steroids modulate the pituitary parameters involved in the regulation of TSH secretion in the rat. *Acta Endocrinol (Copenh)* **122**(5):577-584.
- Dorgan, J.F., Brock, J.W., Rothman, N., Needham, L.L., Miller, R., Stephenson, H.E., Jr., et al. (1999). Serum organochlorine pesticides and PCBs and breast cancer risk: results from a prospective analysis (USA). *Cancer Causes Control* **10**(1):1-11.
- Dorling, A.A., Todman, M.G., Korach, K.S., Herbison, A.E. (2003). Critical role for estrogen receptor alpha in negative feedback regulation of gonadotropin-releasing hormone mRNA expression in the female mouse. *Neuroendocrinology* **78**(4):204-209.
- Ebert, B., Seidel, A., Lampen, A. (2005). Induction of phase-1 metabolizing enzymes by oltipraz, flavone and indole-3-carbinol enhance the formation and transport of benzo[a]pyrene sulfate conjugates in intestinal Caco-2 cells. *Toxicol Lett* **158**(2):140-151.
- Emons, G., Hoffmann, H.G., Brack, C., Ortmann, O., Sturm, R., Ball, P., et al. (1988). Modulation of gonadotropin-releasing hormone receptor concentration in cultured female rat pituitary cells by estradiol treatment. *J Steroid Biochem* **31**(5):751-756.
- Emons, G., Ortmann, O., Fingscheidt, U., Ball, P., Knuppen, R. (1986). Short-term effects of oestradiol and 4-hydroxyoestradiol on gonadotrophin-releasing hormone induced luteinizing hormone secretion by rat pituitary cells in culture. *Acta Endocrinol (Copenh)* **111**(3):312-320.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* **240**(4854):889-895.
- Fan, J.D., Wagner, B.L., McDonnell, D.P. (1996). Identification of the sequences within the human complement 3 promoter required for estrogen responsiveness provides insight into the mechanism of tamoxifen mixed agonist activity. *Mol Endocrinol* **10**(12):1605-1616.
- Fent, K. (2003). Ökotoxikologie 2. überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart:Thieme.
- Fleming, L.E., Bean, J.A., Rudolph, M., Hamilton, K. (1999). Cancer incidence in a cohort of licensed pesticide applicators in Florida. *J Occup Environ Med* **41**(4):279-288.
- Flouriot, G., Brand, H., Denger, S., Metivier, R., Kos, M., Reid, G., et al. (2000). Identification of a new isoform of the human estrogen receptor-alpha (hER-alpha) that is encoded by distinct transcripts and that is able to repress hER-alpha activation function 1. *Embo J* **19**(17):4688-4700.

- Fowler, A.M., Solodin, N.M., Valley, C.C., Alarid, E.T. (2005). Altered Target Gene Regulation Controlled by Estrogen Receptor- $\{\alpha\}$ Concentration. *Mol Endocrinol*.
- Frasor, J., Barnett, D.H., Danes, J.M., Hess, R., Parlow, A.F., Katzenellenbogen, B.S. (2003). Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* **144**(7):3159-3166.
- Friend, K.E., Ang, L.W., Shupnik, M.A. (1995). Estrogen regulates the expression of several different estrogen receptor mRNA isoforms in rat pituitary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(10):4367-4371.
- Gies, A., Gottschalk, C., Greiner, P., Heger, W., Kolossa, M., Rechenberg, B., *et al.* (2001). Nachhaltigkeit und Vorsorge bei der Risikobewertung und beim Risikomanagement von Chemikalien. Teil II: Umweltchemikalien, die auf das Hormonsystem wirken - Belastungen, Auswirkungen, Minderungsstrategien -: Umweltbundesamt.
- Giguere, V., Yang, N., Segui, P., Evans, R.M. (1988). Identification of a new class of steroid hormone receptors. *Nature* **331**(6151):91-94.
- Godine, J.E., Chin, W.W., Habener, J.F. (1982). alpha Subunit of rat pituitary glycoprotein hormones. Primary structure of the precursor determined from the nucleotide sequence of cloned cDNAs. *J Biol Chem* **257**(14):8368-8371.
- Gomez, E., Pillon, A., Fenet, H., Rosain, D., Duchesne, M.J., Balaguer, P., *et al.* (2005). Estrogenic activity of cosmetic components in reporter cell lines: Parabens, UV screens, and musk. *J Toxicol Environ Health A* **68**(4):239-251.
- Green, S., Walter, P., Kumar, V., Krust, A., Bornert, J.M., Argos, P., *et al.* (1986). Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* **320**(6058):134-139.
- Gronemeyer, H., Laudet, V. (1995). Transcription factors 3: nuclear receptors. *Protein Profile* **2**(11):1173-1308.
- Gurr, J.A., Kourides, I.A. (1983). Regulation of thyrotropin biosynthesis. Discordant effect of thyroid hormone on alpha and beta subunit mRNA levels. *J Biol Chem* **258**(17):10208-10211.
- Hatoya, S., Torii, R., Kumagai, D., Sugiura, K., Kawate, N., Tamada, H., *et al.* (2003). Expression of estrogen receptor alpha and beta genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. *Neurosci Lett* **347**(2):131-135.
- Heneweer, M., Muusse, M., van den Berg, M., Sanderson, J.T. (2005). Additive estrogenic effects of mixtures of frequently used UV filters on pS2-gene transcription in MCF-7 cells. *Toxicol Appl Pharmacol* **208**(2):170-177.
- Herbison, A.E. (1998). Multimodal influence of estrogen upon gonadotropin-releasing hormone neurons. *Endocr Rev* **19**(3):302-330.

- Herbst, A.L. (1987). The effects in the human of diethylstilbestrol (DES) use during pregnancy. *Princess Takamatsu Symp* **18**:67-75.
- Herbst, A.L., Ulfelder, H., Poskanzer, D.C. (1971). Adenocarcinoma of the vagina. Association of maternal stilbestrol therapy with tumor appearance in young women. *N Engl J Med* **284**(15):878-881.
- Herynk, M.H., Fuqua, S.A. (2004). Estrogen receptor mutations in human disease. *Endocr Rev* **25**(6):869-898.
- Holland, P.M., Abramson, R.D., Watson, R., Gelfand, D.H. (1991). Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(16):7276-7280.
- Hong, H., Tong, W., Fang, H., Shi, L., Xie, Q., Wu, J., *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.
- Hooper, S.W., Pettigrew, C.A., Sayler, G.S. (1990). Ecological fate, effects and prospects for elimination of environmental polychlorinated biphenyls (PCBs). *Environ Toxicol Chem* **9**:655-667.
- Hoyer, A.P., Grandjean, P., Jorgensen, T., Brock, J.W., Hartvig, H.B. (1998). Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* **352**(9143):1816-1820.
- Hunter, W.M., Greenwood, F.C. (1962). Preparation of iodine-131 labelled human growth hormone of high specific activity. *Nature* **194**:495-496.
- IARC. (1992). Solar and Ultraviolet Radiation Volume 55. Lyon: WORLD HEALTH ORGANIZATION, INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER (IARC).
- Ignar-Trowbridge, D.M., Nelson, K.G., Bidwell, M.C., Curtis, S.W., Washburn, T.F., McLachlan, J.A., *et al.* (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(10):4658-4662.
- Kanno, J., Onyon, L., Peddada, S., Ashby, J., Jacob, E., Owens, W. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay. Phase 2: dose-response studies. *Environ Health Perspect* **111**(12):1530-1549.
- Kaye, A.M., Sheratzky, D., Lindner, H.R. (1971). Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation. *Biochim Biophys Acta* **261**(2):475-486.
- Keller-Byrne, J.E., Khuder, S.A., Schaub, E.A. (1997). Meta-analyses of prostate cancer and farming. *Am J Ind Med* **31**(5):580-586.

- Keml. (2003). HUMAN HEALTH RISK ASSESSMENT. Proposals for the use of assessment (uncertainty) factors. Application to risk assessment for plant protection products, industrial chemicals and biocidal products within the European Union. Solna, Sweden: Body for Competence and Methodology Development, National Chemicals Inspectorate and Institute of Environmental Medicine, Karolinska Institutet.
- Kerrigan, J.R., Veldhuis, J.D., Rogol, A.D. (1994). Androgen-receptor blockade enhances pulsatile luteinizing hormone production in late pubertal males: evidence for a hypothalamic site of physiologic androgen feedback action. *Pediatr Res* **35**(1):102-106.
- Klotz, D.M., Hewitt, S.C., Korach, K.S., Diaugustine, R.P. (2000). Activation of a uterine insulin-like growth factor I signaling pathway by clinical and environmental estrogens: requirement of estrogen receptor-alpha. *Endocrinology* **141**(9):3430-3439.
- Knobil, E. (1990). The GnRH pulse generator. *Am J Obstet Gynecol* **163**(5 Pt 2):1721-1727.
- Korach, K.S., McLachlan, J.A. (1995). Techniques for detection of estrogenicity. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**:5-8.
- Krattenmacher, R., Knauth, R., Parczyk, K., Walker, A., Hilgenfeldt, U., Fritzemeier, K.H. (1994). Estrogen action on hepatic synthesis of angiotensinogen and IGF-I: direct and indirect estrogen effects. *J Steroid Biochem Mol Biol* **48**(2-3):207-214.
- Krege, J.H., Hodgins, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., *et al.* (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptor beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(26):15677-15682.
- Krieger, N., Wolff, M.S., Hiatt, R.A., Rivera, M., Vogelmann, J., Orentreich, N. (1994). Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women. *J Natl Cancer Inst* **86**(8):589-599.
- Kuiper, G.G., Enmark, E., Peltö-Huikko, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. (1996). Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12):5925-5930.
- Kuiper, G.G., Lemmen, J.G., Carlsson, B., Corton, J.C., Safe, S.H., van der Saag, P.T., *et al.* (1998). Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta. *Endocrinology* **139**(10):4252-4263.
- Laden, F., Hankinson, S.E., Wolff, M.S., Colditz, G.A., Willett, W.C., Speizer, F.E., *et al.* (2001). Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer: an extended follow-up in the Nurses' Health Study. *Int J Cancer* **91**(4):568-574.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259):680-685.

- Landel, C.C., Kushner, P.J., Greene, G.L. (1994). The interaction of human estrogen receptor with DNA is modulated by receptor-associated proteins. *Mol Endocrinol* **8**(10):1407-1419.
- Landel, C.C., Kushner, P.J., Greene, G.L. (1995). Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**:23-28.
- Lechan, R.M., Wu, P., Jackson, I.M., Wolf, H., Cooperman, S., Mandel, G., *et al.* (1986). Thyrotropin-releasing hormone precursor: characterization in rat brain. *Science* **231**(4734):159-161.
- Levine, J.E. (1997). New concepts of the neuroendocrine regulation of gonadotropin surges in rats. *Biol Reprod* **56**(2):293-302.
- Leygue, E., Dotzlaw, H., Lu, B., Glor, C., Watson, P.H., Murphy, L.C. (1998). Estrogen receptor beta: mine is longer than yours? *J Clin Endocrinol Metab* **83**(10):3754-3755.
- Lin, V.Y., Resnick, E.M., Shupnik, M.A. (2003). Truncated estrogen receptor product-1 stimulates estrogen receptor alpha transcriptional activity by titration of repressor proteins. *J Biol Chem* **278**(40):38125-38131.
- Lindberg, M.K., Moverare, S., Skrtic, S., Gao, H., Dahlman-Wright, K., Gustafsson, J.A., *et al.* (2003). Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* **17**(2):203-208.
- Lippman, S.S., Amr, S., Weintraub, B.D. (1986). Discordant effects of thyrotropin (TSH)-releasing hormone on pre- and posttranslational regulation of TSH biosynthesis in rat pituitary. *Endocrinology* **119**(1):343-348.
- Liu, M.M., Albanese, C., Anderson, C.M., Hilty, K., Webb, P., Uht, R.M., *et al.* (2002). Opposing action of estrogen receptors alpha and beta on cyclin D1 gene expression. *J Biol Chem* **277**(27):24353-24360.
- Livak, K.J., Flood, S.J., Marmaro, J., Giusti, W., Deetz, K. (1995). Oligonucleotides with fluorescent dyes at opposite ends provide a quenched probe system useful for detecting PCR product and nucleic acid hybridization. *PCR Methods Appl* **4**(6):357-362.
- Lund, T.D., Munson, D.J., Haldy, M.E., Setchell, K.D., Lephart, E.D., Handa, R.J. (2004). Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biol Reprod* **70**(4):1188-1195.
- Lundeen, S.G., Carver, J.M., McKean, M.L., Winneker, R.C. (1997). Characterization of the ovariectomized rat model for the evaluation of estrogen effects on plasma cholesterol levels. *Endocrinology* **138**(4):1552-1558.
- Maruyama, K., Endoh, H., Sasaki-Iwaoka, H., Kanou, H., Shimaya, E., Hashimoto, S., *et al.* (1998). A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in

- the ligand binding domain as a putative dominant negative regular of estrogen action. *Biochem Biophys Res Commun* **246**(1):142-147.
- Menon, M., Peegel, H., Katta, V. (1985). Estradiol potentiation of gonadotropin-releasing hormone responsiveness in the anterior pituitary is mediated by an increase in gonadotropin-releasing hormone receptors. *Am J Obstet Gynecol* **151**(4):534-540.
- Metzger, D.L., Kerrigan, J.R. (1993). Androgen receptor blockade with flutamide enhances growth hormone secretion in late pubertal males: evidence for independent actions of estrogen and androgen. *J Clin Endocrinol Metab* **76**(5):1147-1152.
- Migliaccio, A., Di Domenico, M., Castoria, G., de Falco, A., Bontempo, P., Nola, E., *et al.* (1996). Tyrosine kinase/p21ras/MAP-kinase pathway activation by estradiol-receptor complex in MCF-7 cells. *Embo J* **15**(6):1292-1300.
- Miller, W.L., Knight, M.M., Gorski, J. (1977). Estrogen action in vitro: regulation of thyroid stimulating and other pituitary hormones in cell cultures. *Endocrinology* **101**(5):1455-1460.
- Misumi, Y., Sohda, M., Ikehara, Y. (1990). Nucleotide and deduced amino acid sequence of rat complement C3. *Nucleic Acids Res* **18**(8):2178.
- Morinaga, H., Yanase, T., Nomura, M., Okabe, T., Goto, K., Harada, N., *et al.* (2004). A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* **145**(4):1860-1869.
- Morley, P., Whitfield, J.F., Vanderhyden, B.C., Tsang, B.K., Schwartz, J.L. (1992). A new, nongenomic estrogen action: the rapid release of intracellular calcium. *Endocrinology* **131**(3):1305-1312.
- Morrison, H., Savitz, D., Semenciw, R., Hulka, B., Mao, Y., Morison, D., *et al.* (1993). Farming and prostate cancer mortality. *Am J Epidemiol* **137**(3):270-280.
- Mullis, K.B., Faloona, F.A. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* **155**:335-350.
- Murakami, M., Mori, M., Kato, Y., Kobayashi, I. (1991). Hypothalamic thyrotropin-releasing hormone regulates pituitary thyrotropin beta- and alpha-subunit mRNA levels in the rat. *Neuroendocrinology* **53**(3):276-280.
- Murata, T., Narita, K., Honda, K., Matsukawa, S., Higuchi, T. (2003). Differential regulation of estrogen receptor alpha and beta mRNAs in the rat uterus during pregnancy and labor: possible involvement of estrogen receptors in oxytocin receptor regulation. *Endocr J* **50**(5):579-587.
- Murphy, L.C., Dotzlaw, H., Leygue, E., Coutts, A., Watson, P. (1998). The pathophysiological role of estrogen receptor variants in human breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* **65**(1-6):175-180.

- Murphy, L.J., Murphy, L.C., Friesen, H.G. (1987). Estrogen induces insulin-like growth factor-I expression in the rat uterus. *Mol Endocrinol* **1**(7):445-450.
- Mutschler, E., Geisslinger, G., Kroemer, H.K., Schäfer-Korting, M. (2001). *Arzneimittelwirkungen*. Stuttgart:Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH.
- Nanjee, M.N., Koritnik, D.R., Thomas, J., Miller, N.E. (1990). Hormonal determinants of apolipoprotein B,E receptor expression in human liver. Positive association of receptor expression with plasma estrone concentration in middle-aged/elderly women. *Biochim Biophys Acta* **1046**(2):151-158.
- Nelson, K.G., Takahashi, T., Bossert, N.L., Walmer, D.K., McLachlan, J.A. (1991). Epidermal growth factor replaces estrogen in the stimulation of female genital-tract growth and differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**(1):21-25.
- Newbold, R. (1995). Cellular and molecular effects of developmental exposure to diethylstilbestrol: implications for other environmental estrogens. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**:83-87.
- Nilsson, S., Makela, S., Treuter, E., Tujague, M., Thomsen, J., Andersson, G., *et al.* (2001). Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* **81**(4):1535-1565.
- Nishihara, T., Nishikawa, J., Kanayama, T., Dakeyama, F., Saito, K., Imagawa, M., *et al.* (2000). Estrogenic activities of 517 chemicals by yeast two-hybrid assay. *J Health Sci* **46**(4):282-298.
- Oesterreich, S., Zhang, P., Guler, R.L., Sun, X., Curran, E.M., Welshons, W.V., *et al.* (2001). Re-expression of estrogen receptor alpha in estrogen receptor alpha-negative MCF-7 cells restores both estrogen and insulin-like growth factor-mediated signaling and growth. *Cancer Res* **61**(15):5771-5777.
- Okada, A., Ohta, Y., Brody, S.L., Watanabe, H., Krust, A., Chambon, P., *et al.* (2004). Role of foxj1 and estrogen receptor alpha in ciliated epithelial cell differentiation of the neonatal oviduct. *J Mol Endocrinol* **32**(3):615-625.
- Ortmann, O., Asmus, W., Diedrich, K., Schulz, K.D., Emons, G. (1999). Interactions of ovarian steroids with pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and GnRH in anterior pituitary cells. *Eur J Endocrinol* **140**(3):207-214.
- Owens, W., Koeter, H.B. (2003). The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay: an overview. *Environ Health Perspect* **111**(12):1527-1529.
- Paech, K., Webb, P., Kuiper, G.G., Nilsson, S., Gustafsson, J., Kushner, P.J., *et al.* (1997). Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* **277**(5331):1508-1510.
- Page, R.B. (1983). Directional pituitary blood flow: a microcinematographic study. *Endocrinology* **112**(1):157-165.

- Pak, T.R., Chung, W.C., Lund, T.D., Hinds, L.R., Clay, C.M., Handa, R.J. (2005). The androgen metabolite, 5alpha-androstane-3beta, 17beta-diol, is a potent modulator of estrogen receptor-beta1-mediated gene transcription in neuronal cells. *Endocrinology* **146**(1):147-155.
- Pak, T.R., Chung, W.C., Roberts, J.L., Handa, R.J. (2006). Ligand-independent effects of estrogen receptor beta on mouse gonadotropin releasing hormone (GnRH) promoter activity. *Endocrinology*.
- Palkovits, M. (1973). Isolated removal of hypothalamic or other brain nuclei of the rat. *Brain Res* **59**:449-450.
- Pappas, T.C., Gametchu, B., Watson, C.S. (1995). Membrane estrogen receptors identified by multiple antibody labeling and impeded-ligand binding. *Faseb J* **9**(5):404-410.
- Parker, A.S., Cerhan, J.R., Putnam, S.D., Cantor, K.P., Lynch, C.F. (1999). A cohort study of farming and risk of prostate cancer in Iowa. *Epidemiology* **10**(4):452-455.
- Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. London:Academic Press.
- Pike, A.C., Brzozowski, A.M., Hubbard, R.E., Bonn, T., Thorsell, A.G., Engstrom, O., *et al.* (1999). Structure of the ligand-binding domain of oestrogen receptor beta in the presence of a partial agonist and a full antagonist. *Embo J* **18**(17):4608-4618.
- Rachez, C., Freedman, L.P. (2001). Mediator complexes and transcription. *Curr Opin Cell Biol* **13**(3):274-280.
- Reid, G., Denger, S., Kos, M., Gannon, F. (2002). Human estrogen receptor-alpha: regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* **59**(5):821-831.
- Resnick, E.M., Schreihof, D.A., Periasamy, A., Shupnik, M.A. (2000). Truncated estrogen receptor product-1 suppresses estrogen receptor transactivation by dimerization with estrogen receptors alpha and beta. *J Biol Chem* **275**(10):7158-7166.
- Richards, R.G., DiAugustine, R.P., Petrusz, P., Clark, G.C., Sebastian, J. (1996). Estradiol stimulates tyrosine phosphorylation of the insulin-like growth factor-1 receptor and insulin receptor substrate-1 in the uterus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21):12002-12007.
- Roberts, C.T., Jr., Lasky, S.R., Lowe, W.L., Jr., Seaman, W.T., LeRoith, D. (1987). Molecular cloning of rat insulin-like growth factor I complementary deoxyribonucleic acids: differential messenger ribonucleic acid processing and regulation by growth hormone in extrahepatic tissues. *Mol Endocrinol* **1**(3):243-248.
- Roy, D., Angelini, N.L., Belsham, D.D. (1999). Estrogen directly represses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) gene expression in estrogen receptor-alpha (ERalpha)- and ERbeta-expressing GT1-7 GnRH neurons. *Endocrinology* **140**(11):5045-5053.

- Rytomaa, T. (1960). Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in rat. *Acta Pathol Microbiol Scand* **50(Suppl 140)**:1-118.
- Sacks, F.M., Walsh, B.W. (1990). The effects of reproductive hormones on serum lipoproteins: unresolved issues in biology and clinical practice. *Ann N Y Acad Sci* **592**:272-285; discussion 334-245.
- Safe, S., Wormke, M. (2003). Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action. *Chem Res Toxicol* **16**(7):807-816.
- Salamonsen, L.A., Woolley, D.E. (1999). Menstruation: induction by matrix metalloproteinases and inflammatory cells. *J Reprod Immunol* **44**(1-2):1-27.
- Santi, R., Newbold, R.R., Makela, S., Pylkkanen, L., McLachlan, J.A. (1994). Developmental estrogenization and prostatic neoplasia. *Prostate* **24**(2):67-78.
- Schausi, D., Tiffoche, C., Thioulant, M.L. (2003). Regulation of the intronic promoter of rat estrogen receptor alpha gene, responsible for truncated estrogen receptor product-1 expression. *Endocrinology* **144**(7):2845-2855.
- Schlecht, C., Klammer, H., Jarry, H., Wuttke, W. (2004). Effects of estradiol, benzophenone-2 and benzophenone-3 on the expression pattern of the estrogen receptors (ER) alpha and beta, the estrogen receptor-related receptor 1 (ERR1) and the aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats. *Toxicology* **205**(1-2):123-130.
- Schlecht, C., Klammer, H., Wuttke, W., Jarry, H. (2006). A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary 2 and uterus of female rats. *Arch Toxicol im Druck*.
- Schmutzler, C., Bacinski, A., Ambrugger, P., Klammer, H., Schlecht, C., Huhne, K., *et al.* (2006). The UV absorber benzophenone 2 is a more potent inhibitor of thyroid peroxidase than the anti-thyroid drugs propyl-thiouracil and methimazol. *In Vorbereitung*.
- Schreihöfer, D.A., Stoler, M.H., Shupnik, M.A. (2000). Differential expression and regulation of estrogen receptors (ERs) in rat pituitary and cell lines: estrogen decreases ERalpha protein and estrogen responsiveness. *Endocrinology* **141**(6):2174-2184.
- Seidlova-Wuttke, D., Jarry, H., Christoffel, J., Rimoldi, G., Wuttke, W. (2005). Effects of bisphenol-A (BPA), dibutylphthalate (DBP), benzophenone-2 (BP2), procymidone (Proc), and linurone (Lin) on fat tissue, a variety of hormones and metabolic parameters: a 3 months comparison with effects of estradiol (E2) in ovariectomized (ovx) rats. *Toxicology* **213**(1-2):13-24.
- Shupnik, M.A., Gharib, S.D., Chin, W.W. (1988). Estrogen suppresses rat gonadotropin gene transcription in vivo. *Endocrinology* **122**(5):1842-1846.
- Slob, W. (2002). Dose-response modeling of continuous endpoints. *Toxicol Sci* **66**(2):298-312.

- Smith, E.R., Davidson, J.M. (1974). Location of feedback receptors: effects of intracranially implanted steroids on plasma LH and LRF response. *Endocrinology* **95**(6):1566-1573.
- Smith, M.S., Freeman, M.E., Neill, J.D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology* **96**(1):219-226.
- Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernandez, M.F., Olea, N., Serrano, F.O. (1995). The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ Health Perspect* **103 Suppl 7**:113-122.
- Spreafico, E., Bettini, E., Pollio, G., Maggi, A. (1992). Nucleotide sequence of estrogen receptor cDNA from Sprague-Dawley rat. *Eur J Pharmacol* **227**(3):353-356.
- Stege, H. (2001). Effect of xenogenic repair enzymes on photoimmunology and photocarcinogenesis. *J Photochem Photobiol B* **65**(2-3):105-108.
- Strausberg, R.L., Feingold, E.A., Grouse, L.H., Derge, J.G., Klausner, R.D., Collins, F.S., *et al.* (2002). Generation and initial analysis of more than 15,000 full-length human and mouse cDNA sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(26):16899-16903.
- Sundstrom, S.A., Komm, B.S., Ponce-de-Leon, H., Yi, Z., Teuscher, C., Lyttle, C.R. (1989). Estrogen regulation of tissue-specific expression of complement C3. *J Biol Chem* **264**(28):16941-16947.
- Suzuki, T., Kitamura, S., Khota, R., Sugihara, K., Fujimoto, N., Ohta, S. (2005). Estrogenic and antiandrogenic activities of 17 benzophenone derivatives used as UV stabilizers and sunscreens. *Toxicol Appl Pharmacol* **203**(1):9-17.
- Svechnikov, K., Supornsilchai, V., Strand, M.L., Wahlgren, A., Seidlova-Wuttke, D., Wuttke, W., *et al.* (2005). Influence of long-term dietary administration of procymidone, a fungicide with anti-androgenic effects, or the phytoestrogen genistein to rats on the pituitary-gonadal axis and Leydig cell steroidogenesis. *J Endocrinol* **187**(1):117-124.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L. (1997). Have sperm densities declined? A reanalysis of global trend data. *Environ Health Perspect* **105**(11):1228-1232.
- Swan, S.H., Elkin, E.P., Fenster, L. (2000). The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* **108**(10):961-966.
- Takatori, S., Kitagawa, Y., Oda, H., Miwa, G., Nishikawa, J., Nishihara, T., *et al.* (2003). Estrogenicity of metabolites of Benzophenone derivatives examined by a yeast two-hybrid assay. *J Health Sci* **49**(2):91-98.
- Tang, L.K., Spies, H.G. (1975). Effects of gonadal steroids on the basal and LRF-induced gonadotropin secretion by cultures of rat pituitary. *Endocrinology* **96**(2):349-355.

- Tchernitchin, A., Roorijck, J., Tchernitchin, X., Vandenhende, J., Galand, F. (1974). Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* **248**(444):142-143.
- Tena-Sempere, M., Navarro, V.M., Mayen, A., Bellido, C., Sanchez-Criado, J.E. (2004). Regulation of estrogen receptor (ER) isoform messenger RNA expression by different ER ligands in female rat pituitary. *Biol Reprod* **70**(3):671-678.
- Toppari, J., Larsen, J.C., Christiansen, P., Giwercman, A., Grandjean, P., Guillette, L.J., Jr., *et al.* (1996). Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* **104 Suppl 4**:741-803.
- Vinggaard, A.M., Hass, U., Dalgaard, M., Andersen, H.R., Bonefeld-Jorgensen, E., Christiansen, S., *et al.* (2006). Prochloraz: an imidazole fungicide with multiple mechanisms of action. *Int J Androl* **29**(1):186-192.
- Walsh, B.W., Schiff, I., Rosner, B., Greenberg, L., Ravnkar, V., Sacks, F.M. (1991). Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* **325**(17):1196-1204.
- Weihua, Z., Andersson, S., Cheng, G., Simpson, E.R., Warner, M., Gustafsson, J.A. (2003). Update on estrogen signaling. *FEBS Lett* **546**(1):17-24.
- Whitehead, M.I., Townsend, P.T., Gill, D.K., Collins, W.P., Campbell, S. (1980). Absorption and metabolism of oral progesterone. *Br Med J* **280**(6217):825-827.
- Whyte, J.J., Schmitt, C.J., Tillitt, D.E. (2004). The H4IIE cell bioassay as an indicator of dioxin-like chemicals in wildlife and the environment. *Crit Rev Toxicol* **34**(1):1-83.
- Wormke, M., Stoner, M., Saville, B., Walker, K., Abdelrahim, M., Burghardt, R., *et al.* (2003). The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* **23**(6):1843-1855.
- Woutersen, R.A., Jonker, D., Stevenson, H., te Biesebeek, J.D., Slob, W. (2001). The benchmark approach applied to a 28-day toxicity study with Rhodorsil Silane in rats. the impact of increasing the number of dose groups. *Food Chem Toxicol* **39**(7):697-707.
- Xu, J.W., Gong, J., Chang, X.M., Luo, J.Y., Dong, L., Jia, A., *et al.* (2004). Effects of estradiol on liver estrogen receptor-alpha and its mRNA expression in hepatic fibrosis in rats. *World J Gastroenterol* **10**(2):250-254.
- Yabusaki, Y., Shimizu, M., Murakami, H., Nakamura, K., Oeda, K., Ohkawa, H. (1984). Nucleotide sequence of a full-length cDNA coding for 3-methylcholanthrene-induced rat liver cytochrome P-450MC. *Nucleic Acids Res* **12**(6):2929-2938.
- Yamasaki, K., Takeyoshi, M., Yakabe, Y., Sawaki, M., Takatsuki, M. (2003). Comparison of the reporter gene assay for ER-alpha antagonists with the immature rat uterotrophic assay of 10 chemicals. *Toxicol Lett* **142**(1-2):119-131.

- Young, J.K. (1986). Thyroxine treatment reduces the anorectic effect of estradiol in rats. *Behav Neurosci* **100**(2):284-287.
- Yuan, Y.D. (1991). Female reproductive system. In: Handbook of toxicologic pathology (Haschek, W.M., Rousseaux, C.G., eds). London:Academic Press, 891-933.
- Zhang, J., Lathbury, L.J., Salamonsen, L.A. (2000). Expression of the chemokine eotaxin and its receptor, CCR3, in human endometrium. *Biol Reprod* **62**(2):404-411.
- Zhang, Q.X., Hilsenbeck, S.G., Fuqua, S.A., Borg, A. (1996). Multiple splicing variants of the estrogen receptor are present in individual human breast tumors. *J Steroid Biochem Mol Biol* **59**(3-4):251-260.
- Zhang, S., Li, X., Burghardt, R., Smith, R., 3rd, Safe, S.H. (2005). Role of estrogen receptor (ER) alpha in insulin-like growth factor (IGF)-I-induced responses in MCF-7 breast cancer cells. *J Mol Endocrinol* **35**(3):433-447.
- Zhou, Y., Watters, J.J., Dorsa, D.M. (1996). Estrogen rapidly induces the phosphorylation of the cAMP response element binding protein in rat brain. *Endocrinology* **137**(5):2163-2166.

7 Anhang

7.1 Primersequenzen

Tabelle 7-1: Primer- und Sondensequenzen der verwendeten TaqMan™-Systeme.

Gen (Acc.-Nr.)	Sonde (5' → 3') (5'-FAM, 3'TAMRA)	Primer: Forward (5' → 3') Reverse (5' → 3')	Produkt- grösse (bp)	Referenz
ER α (X61098)	CGTCTGGCCCAAGCTCCTCCTCATC	AAGCTGGCCTGACTCTGCAG GCAGGTCATAGAGAGGCACGA	144	(Spreafico <i>et al.</i> 1992)
ER β (U57439)	ACGCCGTGACAGATGCCCTG	CTCTGTGTGAAGGCCATGAT GGAGATACCACTCTTCGCAATC	149	(Kuiper <i>et al.</i> 1996)
α -Untereinheit (J00757)	TGCCCTGGAGAAGCAACAGCCCCAT	TCTTGGACCTTGGGGGAGT GGTGCCCCCATCTATCAGTG	70	(Godine <i>et al.</i> 1982)
LH β (NM_012858)	CTGCCCTTGCCTCCCGTGCCCTCA	ACCTTCACCCACCAGCATCTGT AGCTCACGGTAGGTGCACACT	104	(Chin <i>et al.</i> 1983)
TSH β (BC058488)	TCAACACCACCATCTGCGCTGGG	GATGTACGTGGACAGGAGAGAGTGT GACATCCTGAGAGAGTGCCTACTTG	130	(Strausberg <i>et al.</i> 2002)
Prä-Pro-C3 (X52477)	TGCCATCCTCACAAACACTTCCGCAG	CTGTAGGGCATAGGGATATCACC ATGCTGGCCTGACCTTCAAGA	199	(Misumi <i>et al.</i> 1990)
IGF-1 (M15481)	TTACCAGCTCGGCCACAGCCGGAC	TGTCGTCTTTCACATCTCTTACCTG CCACACACGAACTGAAGAGCGT	121	(Roberts <i>et al.</i> 1987)
Cyp1a1 (NM_012540)	TGACCAGGAACTATGGGGTGATCC	TCCCCAAGGGACACTGTGTC CTTGCCCCAAACCAAGAGAATG	161	(Yabusaki <i>et al.</i> 1984)
TERP-1 (L38931)	ATGATTGGTCTGGTCTGGCGCTCCA	TTGAAACAGCGACCAAGGCTTT AGTTAGGAGCAACAGGAGCTTCC	141	(Friend <i>et al.</i> 1995)
Prä-Pro-TRH (NM_013046)	AGCACCTTGGCAGGGGATCCTTC	TTCTGGATTCTGGTTCACAGATG GGA TGTTGCCCTCTTGGTGACA	103	(Lechan <i>et al.</i> 1986)

Danksagung

Herrn Prof. Dr. R. Hardeland danke ich für die Bereitschaft zur Betreuung dieser externen Arbeit sowie für sein Interesse an deren Fortschritt.

Herrn Prof. Dr. D. Doenecke danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Mein Dank gilt Herrn Prof. Dr. W. Wuttke für die freundliche Überlassung des Themas, die Möglichkeit zum freien wissenschaftlichen Arbeiten und sein Interesse am Fortschritt dieser Arbeit. Innerhalb des „EURISKED“-Projektes ermöglichte er mir zudem die Teilnahme an nationalen und internationalen Treffen, wofür ich mich ebenfalls bedanken möchte.

Ebenfalls bedanken möchte ich mich bei Prof. H. Jarry für seine Bereitschaft zur Diskussion, seine zahlreichen Ideen (auch in der Praxis), die wesentlich zur Verbesserung dieser Arbeit beigetragen haben sowie für die kritische Durchsicht dieses Manuskriptes.

Bei Prof. Dr. J. Köhrle, Dr. C. Schmutzler und I. Hamann von der Endokrinologie der Charité in Berlin bedanke ich mich für die Möglichkeit, die TPO- und Deiodase-Aktivitäten in ihrem Labor zu bestimmen.

Mein besonderer Dank gilt Dr. P. Balaguer (INSERM, Montpellier, Frankreich) für seine Bereitschaft den Transaktivierungsassay mit stabil transfizierten MELN-Zellen für diese Arbeit zur Verfügung zu stellen.

Ferner möchte ich mich bei Prof. Dr. W. Slob und Herrn B. Bokkers vom RIVM der Niederlande für die Möglichkeit die PROAST-Software zu benutzen sowie für die freundliche Hilfe und Unterstützung bei der Bedienung des Programms bedanken.

Herrn Dr. H. Frauendorf, Leiter der Abteilung Analytik/Massenspektrometrie des Institutes für organische Chemie der Universität Göttingen, danke ich für die massenspektrometrische Analyse der Seren aus dem Tierversuch.

Allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik Göttingen danke ich für die freundliche Unterstützung. Insbesondere möchte ich mich bei Maria Metten für die Hilfe bei den radioaktiven Assays und der HPLC, bei Christel Düls für die Einführung in die Zellkultur und bei Anette Witt und Claudia Neitzel für die Unterweisung und Hilfe am TaqMan bedanken. Allen in der „Umgebung“ des Doktoranden-Zimmers danke ich für viele schöne Momente und interessante Diskussionen.

Meiner Familie und meinem Freund danke ich für die moralische Unterstützung, ohne die diese Arbeit ungleich schwerer gewesen wäre.

Lebenslauf

Christiane Schlecht

Geburtsdatum: 23.04.1979
Geburtsort: Blankenburg (Harz), Sachsen-Anhalt
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung

09.1985 - 07.1991 Grundschule „Am Regenstein“ in Blankenburg
09.1991 – 06.1997 Gymnasium „Am Thie“ in Blankenburg
Abschluss: Abitur

Hochschulbildung

10.1997 - 05.2003 Studium der Biologie an der Georg-August-Universität, Göttingen
Thema der Diplomarbeit: Versuche zur Gewinnung und Charakterisierung der Restriktions-Endonuclease *BglI* aus einem rekombinanten Bakterienstamm für einen Vergleich mit dem Enzym aus dem Wildtyp.
Abschluss: Diplombiologin
05.2003 – 05.2006 Promotionsstudium an der Georg-August-Universität, Göttingen
Thema der Dissertation: „Untersuchung endokriner Effekte von Benzophenon-2 und 17 β -Estradiol in estrogen-rezeptiven Organen“

Beruflicher Werdegang

04.2001 – 01.2002 Studentische Hilfskraft im Göttingen Genomics Laboratory
05.2003 – 12.2005 Wissenschaftliche Mitarbeiterin der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie der Universitätsfrauenklinik, Göttingen

Wissenschaftliche Veröffentlichungen

Effects of Estradiol, Benzophenone-2 and Benzophenone-3 on the expression pattern of the Estrogen receptors (ER) alpha and beta, the Estrogen receptor related receptor 1 (ERR1) and the Aryl hydrocarbon receptor (AhR) in adult ovariectomized rats.

Christiane Schlecht, Holger Klammer, Hubertus Jarry, Wolfgang Wuttke
Toxicology. 2004 Dec 1;205(1-2):123-30.

Multi-organic risk assessment of estrogenic properties of octyl-methoxycinnamate *in vivo*. - A 5 day sub-acute pharmacodynamic study with ovariectomized rats.

Holger Klammer, Christiane Schlecht, Wolfgang Wuttke, Hubertus Jarry
Toxicology. 2005 Nov 5;215(1-2):90-6.

A dose-response study on the estrogenic activity of benzophenone-2 on various endpoints in the serum, pituitary 2 and uterus of female rats.

Christiane Schlecht, Holger Klammer, Wolfgang Wuttke, Hubertus Jarry
Archives of Toxicology. Im Druck