

Aus der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie  
(Prof. Dr. med. W. Wuttke)  
im Zentrum Frauenheilkunde  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Der Einfluss endokriner Disruptoren auf das Fettgewebe  
der Sprague – Dawley – Ratte**

INAUGURAL - DISSERTATION  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Georg - August - Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Matthias Müller  
aus Würzburg

Göttingen 2007

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. W. Wuttke

2. Berichterstatter/in:

3. Berichterstatter/in:

Tag der mündlichen Prüfung:

## **Inhaltsverzeichnis:**

Inhaltsverzeichnis:.....	3
Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Einleitung .....	9
1.1 Endokrine Disruptoren (ED) .....	9
1.1.1 Definition und Wirkmechanismen endokriner Disruptoren.....	9
1.1.2 Vorkommen von ED.....	10
1.1.3 Wirkung auf den Menschen .....	10
1.2 Allgemeines über Steroidhormone und deren Rezeptoren .....	11
1.2.1 Steroidhormone im Überblick.....	11
1.2.2 Grundlagen zu Steroidhormonrezeptoren .....	11
1.3 Sexualsteroiden .....	12
1.3.1 Sexualsteroiden im Überblick.....	12
1.3.2 Östrogene.....	13
1.3.3 Das Androgen Testosteron .....	13
1.4 Untersuchte Gensequenzen der verschiedenen Fettgewebsarten .....	14
1.4.1 Östrogenrezeptor alpha und beta (ER $\alpha$ & ER $\beta$ ).....	14
1.4.2 Der Aryl - hydrocarbon - Rezeptor (AhR) .....	15
1.4.3 Wingless - type MMTV (Wnt 10b) .....	15
1.4.4 Insulin - like growth factor 1 (IGF - 1) .....	16
1.5 Im Serum bestimmte Fettgewebsparameter.....	17
1.5.1 Insulin.....	17
1.5.2 Leptin.....	17
1.6 Verwendete Substanzklassen .....	18
1.6.1 Bisphenol A (BPA).....	18
1.6.2 Benzophenon 2 (BP2).....	18
1.6.3 Dibutylphthalat (DBP) .....	19
1.6.4 Linuron (LIN).....	20
1.6.5 Procymidon (PROC) .....	20
1.6.6 Strukturformeln der verwendeten Substanzen .....	21
1.7 OECD - Protokoll zur Identifikation endokrin aktiver Substanzen .....	22
1.8 Das untersuchte Fettgewebe .....	22
1.9 Studienziel .....	24
2 Material und Methoden.....	25
2.1 Tierexperimente in vivo .....	25
2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen.....	25
2.1.2 Narkose und Ovariectomie der Ratten.....	25

2.1.3 Identifikation der Tiere .....	25
2.1.4 Versuchsablauf und Studienbeschreibung .....	25
2.1.5 Tötung der Ratten .....	27
2.2 Experimente in vitro .....	28
2.2.1 Ligandenbindungsassays .....	28
2.2.2 Molekularbiologische Methoden.....	28
2.2.3 Isolierung der total RNA.....	29
2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA .....	30
2.2.5 Reverse Transkription.....	30
2.2.6 Polymerase - Kettenreaktion (PCR) .....	31
2.2.7 TaqMan™ PCR Assay .....	32
2.2.8 Sonden - Design .....	33
2.2.9 Auswahl der PCR - Primer .....	34
2.2.10 Durchführung einer real Time - PCR.....	34
2.2.11 ABI PRISM™ 7700 Sequenze Detection System.....	35
2.2.12 Serumdiagnostik .....	35
2.3 Prinzip der qCT - Messmethode.....	36
2.4 Statistische Auswertung .....	37
3 Ergebnisse .....	38
3.1 In - vitro - Versuch.....	38
3.2 In - vivo - Versuche .....	39
3.2.1 Futteraufnahme .....	39
3.2.2 Kalorienaufnahme.....	40
3.2.3 Das subkutane Fettgewebe (FS).....	41
3.2.4 Das mesenteriale Fettgewebe (FM) .....	46
3.2.5 Das paratibiale Fettgewebe (FT).....	52
3.2.6 Fettgewebsparameter des Serums: Glukose, Insulin, IGF - 1 und Leptin .....	58
3.3 Zusammenfassende Tabellen der Versuchsergebnisse .....	62
3.3.1 Das subkutane Fettgewebe .....	62
3.3.2 Das mesenteriale Fettgewebe .....	62
3.3.3 Das paratibiale Fettgewebe .....	63
3.3.4 Im Serum ermittelte Fettgewebsparameter .....	63
4 Diskussion.....	64
4.1 Ziel dieser Studie .....	64
4.2 Ligandenbindungsassays.....	64
4.2.1 Aussagekraft der Ligandenbindungsstudien .....	64

4.3 Versuchsaufbau .....	65
4.3.1 Tiermodell.....	65
4.3.2 Futteraufnahme .....	65
4.3.3 Dosierung der Substanzklassen .....	66
4.4 Das subkutane Fettgewebe.....	66
4.4.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression .....	67
4.4.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene.....	68
4.5 Das mesenteriale Fettgewebe.....	70
4.5.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression .....	70
4.5.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene.....	72
4.6 Das paratibiale Fettgewebe.....	73
4.6.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression .....	73
4.6.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene.....	75
4.7 Serumparameter .....	76
4.7.1 Insulin und Glukose .....	76
4.7.2 Serum IGF - 1 .....	77
4.7.3 Leptin.....	77
5 Zusammenfassung.....	78
6 Methodischer Anhang.....	82
6.1 Primer- und Sondensequenzen.....	82
6.2 Arbeitsanleitung Rat Insulin / IGF - 1 RIA Kit.....	82
6.3 Arbeitsanleitung Rat Leptin RIA Kit .....	83
6.4 Inhaltsstoffe des sojafreien Haltungsfutters und des herkömmlichen Alleinfutters für Ratten.....	84
7 Literaturverzeichnis .....	86
8 Abbildungsverzeichnis.....	94
9 Tabellenverzeichnis.....	95

**Abkürzungsverzeichnis**

A.	Adenin
Abb.	Abbildung
5 $\alpha$ DHT	5 $\alpha$ - Dihydrotestosteron
AhR	Aryl - hydrocarbon - Rezeptor
ARNT	AhR nuclear Translocator
as	anti - sense - Primer
BMI	body mass index
BP2	Benzophenon 2
BPA	Bisphenol A
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
ca.	circa
Cat. No.	Katalognummer
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cm	Zentimeter
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CYP	Cytochrom
DBP	Dibutylphthalat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E - Cups	Eppendorfcups, Eppendorf - Gefäße
E2	17 $\beta$ - Östradiol bzw. Östradiolbenzoat
ED	endokrine Disruptoren
ED <sub>50</sub>	effektive Dosis 50
EDSTAC	Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee
EPA	Environmental Protection Agency
ER ( $\alpha$ , $\beta$ )	Östrogenrezeptor ( $\alpha$ , $\beta$ )
ERE	estrogen response element
ERR	estrogen receptor related proteins
ERs	Östrogenrezeptoren
et al.	et alii
ETD	erlaubte Tagesdosis
f.	folgende
Fa.	Firma

FET	Fluoreszenz – Energietransfer
FM	mesenteriales Fettgewebe
FS	subkutanes Fettdepot
FSH	follikelstimulierendes Hormon
FT	paratibiales Fettdepot
FZ	frizzled receptor
g	Gramm
G	Guanin
GH	Wachstumshormon (growth hormone)
GLUT	Glukosetransporter
GnRH	Gonadotropin Releasing Hormone
griech.	griechisch
H	hoch
H <sub>2</sub> O	Wasser (0,9% Kochsalzlösung)
ID	Identifikation
IFN $\gamma$	Interferon $\gamma$
IGF - 1	Insulin - like growth factor 1
J <sup>125</sup>	Jod <sup>125</sup>
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
Konz.	Konzentration
LH	luteinisierendes Hormon
LIN	Linuron
LRP	low - density lipoprotein receptor related protein
M	Mol
MBuP	Monobutyl – Phthalat
$\mu$ g	Mikrogramm
mg	Milligramm
Min.	Minuten
$\mu$ l	Mikroliter
ml	Milliliter
$\mu$ m	Mikrometer
$\mu$ M	Mikromol
mm	Millimeter
mRNA	messenger - Ribonukleinsäure
n	Anzahl
N	niedrig

ng	Nanogramm
nm	Nanometer
nM	Nanomol
NOAEL	Non Observable Adverse Effect Level
NSB	non - specific - binding
OD	Optische Dichte
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
ovx	ovarektomiert
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase - Kettenreaktion)
pMol	Pikomol
präovx	vor Ovariektomie
PROC	Procymidon
qCT	quantitative Computertomographie
RIA	Radioimmunoassay
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rT - PCR	real Time - Polymerase chain reaction
RT	Reverse Transkriptase
SD - Ratte	Sprague - Dawley - Ratte
s	sense - Primer
sec.	Sekunden
SERMs	Selektive Östrogenrezeptormodulatoren
Std.	Stunde
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
u.a.	unter anderem
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vgl.	vergleiche
vs	versus
Wnt 10b	Wingless - type MMTV
XRE	xenobiotic response element
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
z.T.	zum Teil



# 1 Einleitung

## 1.1 Endokrine Disruptoren (ED)

Schon seit den frühen 1960er Jahren stellten Schriftsteller und Forscher (z.B. Rachel Carson in „Silent Spring“, 1962 (Carson 1962) oder Theo Colborn in „Our stolen future“, 1997 (Colborn et al. 1997)) die Hypothese auf, dass industriell hergestellte Chemikalien die Gesundheit sämtlicher Lebewesen beeinflussen können; hierbei besonders die Funktionalität des endokrinen Systems und dessen Gleichgewicht (Kanno 2000). Diese Vermutungen erhärteten sich vor allem durch die zunehmend registrierte Feminisierung von männlichen Wasserbewohnern wie zum Beispiel der Alligatoren am Lake Apopka in Florida, der sehr hoch mit Pestiziden belastet ist (Guillette et al. 1994; Guillette et al. 2002; Milnes et al. 2002). Beunruhigt von diesen Beobachtungen wurden verschiedene Arbeitsgruppen ins Leben gerufen, welche sich mit der Wirkung chemischer Stoffe auf Mensch und Tier beschäftigen sollten.

Diese Forschergruppen (z.B. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC), Environmental Protection Agency (EPA)) benannten chemische Substanzen, welche vor allem das endokrine System schädigen, endokrine Disruptoren.

Grundsätzlich lässt sich die Familie der endokrinen Disruptoren in Xenohormone und Phytohormone einteilen.

Xenohormone (griech. xenos = fremd) entsprechen Hormonen, die vom Menschen chemisch synthetisiert sind und in den Organismus gelangen.

Unter dem Begriff Phytohormone (griech. phytos = Pflanze) fasst man pflanzliche Substanzklassen, die das Endokriniem beeinflussen, zusammen.

Sehr viele endokrine Disruptoren nehmen aufgrund ihres Sterangerüsts und der daraus resultierenden Ähnlichkeit zu Sexualhormonen direkt Einfluss auf das reproduktive Geschehen, welches auch Hauptaugenmerk der Erforschung sämtlicher ED darstellt. Dennoch sind die anderen Organsysteme mit den dazugehörigen Regelkreisläufen und den entsprechenden Organen gerade in jüngerer Forschung keineswegs vernachlässigt, da in sehr vielen Zellen des Körpers Rezeptoren für Sexualsteroiden exprimiert werden.

Sie wirken auf die Reproduktion, das Nervensystem, das Immunsystem, auf viele andere Gewebe und sind an der Karzinomentstehung beteiligt (Kavlock und Ankley 1996). Weltweit werden Forschungen bezüglich Wirkweise, Auftreten, Screening, Analyse und Eindämmung von ED betrieben und gefördert (Zacharewski 1998).

### 1.1.1 Definition und Wirkmechanismen endokriner Disruptoren

Endokrine Disruptoren sind exogen zugeführte chemische Verbindungen, welche endogenen Einfluss auf das Hormonsystem nehmen. Sie greifen als Agonisten oder Antagonisten auf verschiedenste Weise in die Regulierung desselben ein, imitieren die Funktion endogener

Hormone, stören ihre Synthese, ihren Metabolismus oder deren Rezeptoren (Sonnenschein und Soto 1998). Neueren Erkenntnissen zufolge beeinflussen ED auch die Aktivität und Expression von hormonregulierenden Enzymen (Whitehead und Rice 2006).

### **1.1.2 Vorkommen von ED**

In zahlreichen Dingen des alltäglichen Lebens, in Nahrungsmitteln (Vivacqua et al. 2003), in Trink- und Regenwasser (Boyd et al. 2004; Falconer et al. 2006), in sämtlichen Kosmetikartikeln, dort vor allem in Lichtschutzmitteln, Deodorants, Nagellackentfernern sowie in anti - aging - Produkten (Darbre 2005; Gershwin et al. 2005; Gill 2006; Koda et al. 2005; Schlumpf et al. 2004) und auch in inhalierbaren Stoffen wie Zigarettenrauch (Band et al. 2002) dürfen ED vermutet werden. Unzählige weitere Beispiele könnten an dieser Stelle angeführt werden. Verdeutlicht wird das ubiquitäre Vorhandensein von potentiellen endokrinen Disruptoren. Der Organismus kann sie demzufolge über die Nahrung, über Hautkontakt durch Resorption oder mittels Inhalation aufnehmen. Zwar liegen sie in den aufgezählten Konsumgütern meist nur in sehr geringer Konzentration vor, können sich aber addieren, in Geweben, wie beispielsweise dem Fett, akkumulieren und dann ihre Wirkung entfalten (Munoz-de-Toro et al. 2006).

### **1.1.3 Wirkung auf den Menschen**

Wie wirken Xenohormone auf den menschlichen Organismus? Stellen sie ein Gesundheitsrisiko für den Einzelnen dar oder machen sich die Folgen erst Generationen später bemerkbar? Diese Fragen werden von Wissenschaftlern weltweit kontrovers diskutiert und bieten unterschiedlichste, zum Teil völlig gegensätzliche Antwortmöglichkeiten. Beispielsweise klagen Fabrikarbeiter, welche mit Xenohormonen in Kontakt kommen, über Libidoverlust und Impotenz. Verminderte Spermienzahlen werden zusätzlich festgestellt (Guzelian 1982). Zahlreiche Beobachtungen dieser Art unterstreichen das schädliche Potential auf die menschliche Gesundheit, besonders von androgen-/östrogen ähnlichen endokrinen Disruptoren. Eine groß angelegte Metaanalyse von 61 Studien mit über 15 000 untersuchten Männern bestätigte eine stetig sinkende Spermienzahl von 1938 bis 1990, verursacht durch endokrine Disruptoren (Eertmans et al. 2003). Demgegenüber stehen Studien, welche je nach geographischer Lage und Abstammung eine große Variabilität in der Spermienqualität und -quantität beschreiben, jedoch keinesfalls einen prinzipiellen Rückgang derselben, hervorgerufen durch ED (Fisch et al. 1996).

Auch weibliche Individuen unterliegen den Einflüssen verschiedener Xenohormone. Argentinische Frauen beispielsweise, welche in landwirtschaftlich stark genutzten Landesabschnitten oder in industriell dicht besiedelten Gegenden leben, sind einer quantifizierbaren Belastung des körpereigenen Fettgewebes mit Pestizidderivaten

ausgesetzt. Die Anreicherung im Brustfett korreliert dabei sowohl positiv mit dem „body mass index“ (BMI), als auch mit dem Lebensalter der Probandinnen (Munoz-de-Toro et al. 2006).

Achtjährige puertoricanische Mädchen erleben verfrühtes Brustwachstum ohne andere Hinweise auf eine Pubertas praecox. Wissenschaftlich untermauerte Erklärungen dieser Beobachtung gibt es bisher noch nicht. Spekuliert wird jedoch über eine vermehrte Anreicherung von Pestiziden und Weichmachern in Plastikprodukten (Phthalate), die im Brustgewebe der Kinder östrogenagonistisch wirken (Colon et al. 2000).

Nicht nur Erwachsene und Adoleszente können durch endokrine Disruptoren beeinträchtigt werden. Mittlerweile gibt es begründete Sorge, dass ED sogar das Endokriniem des ungeborenen Lebens manipulieren (Landrigan et al. 2003).

Wie bereits erwähnt ist der Einfluss der ED auf den menschlichen Körper unter Wissenschaftlern sehr umstritten. Ziel der zukünftigen Forschung muss es sein, die Interaktionen der verschiedenen hormonaktiven Chemikalien im Körper besser zu verstehen und eventuelle dosisabhängige Antworten des Organismus für verschiedene Substanzklassen herauszufinden und festzulegen (Chen CW 2001).

## **1.2 Allgemeines über Steroidhormone und deren Rezeptoren**

Endokrine Disruptoren besitzen eine große Ähnlichkeit zu Steroidhormonen. In der Konsequenz weisen sie deshalb auch eine hohe Bindungsaffinität an deren Rezeptoren auf.

### **1.2.1 Steroidhormone im Überblick**

Alle Steroidhormone sind Abkömmlinge des Cholesterins und besitzen wie dieses ein Sterangerüst. Deshalb werden sie auch als Steroid - Derivate bezeichnet. Sie lassen sich in fünf funktionelle Gruppen einteilen: Östrogene, Androgene, Kortikosteroide, Gestagene und Mineralkortikoide. Sowohl in der Nebennierenrinde als auch in den Gonaden werden sie gebildet. Progesteron entsteht immer als Zwischenprodukt ihrer Synthese (Löffler und Petrides 2003).

Aufgrund ihrer geringen Polarität zählen sie zu den lipophilen Hormonen und können sich nicht in ausreichendem Umfang im Blut lösen. Aus diesem Grund gibt es Trägerproteine (z.B. Albumin), welche an die lipophile Substanz binden und sie so „schwimmfähig“ machen (Löffler und Petrides 2003).

Die Steroidhormone werden meist im Rahmen einer Biotransformation (Glukuronidierung, Sulfatierung) in der Leber inaktiviert und dann über Niere und Darm ausgeschieden (Cheng et al. 1998).

### **1.2.2 Grundlagen zu Steroidhormonrezeptoren**

Vom Wirkort und Wirkungsspektrum unabhängig muss man zunächst für alle Signalmoleküle annehmen, dass sie primär mit einem Rezeptor reagieren. Der dabei entstehende Signalmolekül - Rezeptor - Komplex ist für die Ausbildung der intrazellulären Signale

verantwortlich. Die Bindung von Rezeptor und Botenstoff erfolgt in so genannten „Bindungstaschen“, die mehr oder wenig spezifisch sein können (Hand - Handschuh Prinzip) (Löffler und Petrides 2003).

Steroidhormonrezeptoren befinden sich zusammen mit Schilddrüsen-, Retinolsäure- und Vitamin - D - Rezeptoren und einer Reihe von Rezeptoren ohne bekannte physiologische Liganden (Orphan - Rezeptoren) im Zellinneren und wirken direkt mit ihrer DNA - Bindungsfähigkeit über eine Änderung der Transkription verschiedener Gene.

All diese intrazellulär gelegenen Rezeptoren weisen Strukturähnlichkeiten auf. Sie bestehen aus einer variablen N - terminalen Region, welche in die Modulation der Genexpression involviert ist, einer kurzen, hoch spezifischen und konservierten DNA - Bindungsdomäne, die für die korrekte DNA - Bindungsstelle und die Rezeptor - Dimerisation verantwortlich ist, und einer C - terminalen Liganden - Bindungs - Tasche, welche für das „Hormonandocken“, für die Rezeptor - Dimerisation und - Aktivierung unerlässlich ist (Brinkmann 1994).

In ihrer inaktiven Form liegen diese Rezeptorkomplexe in Bindung an andere Proteine im Zytosol oder Zellkern vor. Sie blockieren ihre DNA - Bindungsdomäne, beispielsweise das Hitzeschockprotein Hsp 90, sowie weitere Proteine (Landel et al. 1995). Bindet nun ein Hormon an den intrazellulären Rezeptor, führt dies zur Dissoziation der Hitzeschockproteine. Im Anschluss erfährt der Hormon - Rezeptor - Komplex eine Konformationsänderung und kann an das entsprechende Hormon - response - element des jeweiligen Genes auf dem entsprechenden DNA - Abschnitt koppeln (Brinkmann 1994).

Durch Rekrutierung verschiedener Koaktivatoren oder Repressoren, sowie einer Modulation der Chromatinstruktur im Zellkern kann die Transkription des Zielgens induziert oder reprimiert werden (Collingwood et al. 1999; Nilsson et al. 2001). Entscheidend für die Regulation der Transkriptionsaktivität ist die molekulare Struktur des bindenden Liganden (Brzozowski et al. 1997; Wallace et al. 2003).

### **1.3 Sexualsteroid**

Eine besonders große strukturelle Affinität besteht zwischen vielen endokrinen Disruptoren und Sexualsteroiden.

#### **1.3.1 Sexualsteroid im Überblick**

Östrogene und Androgene sind die beiden wichtigsten physiologischen Sexualhormone. Testosteron, das bekannteste Androgen, wird unter dem Einfluss des Enzyms 5 $\alpha$  - Reduktase in seinen Zielgeweben zu 5 $\alpha$  - Dihydrotestosteron (5 $\alpha$  DHT) reduziert, wodurch seine biologische Aktivität um etwa das 2,5fache zunimmt. Ferner dient Testosteron als Prohormon für die Biosynthese des Östrogens. Der entscheidende Schritt ist die Umwandlung von Testosteron in 17 $\beta$  - Östradiol (E2) durch den Cytochrom - P - 450 - Aromatase - Komplex (CYP19). Das Enzym Aromatase spaltet die Methylgruppe C19 ab und

aromatisiert den A - Ring des Testosterons zu E2, welches der Hauptvertreter der Östrogene ist.

Sowohl bei der Frau als auch beim Mann gibt es Aromatase - Aktivitäten in den unterschiedlichsten Geweben (z.B. im Fett, Knochen, Haut, Gehirn) und ist keinesfalls auf den Reproduktionstrakt beschränkt (Brodie 1979; Nelson und Bulun 2001).

### 1.3.2 Östrogene

Im weiblichen Organismus werden Östrogene vor allem in den Thekazellen der Graf'schen Follikel und im Corpus luteum gebildet. Geringere Mengen entstehen in den Testes des Mannes, der Nebennierenrinde und dem Fettgewebe.

Synthesestimulus ist das hypothalamische GnRH, welches wiederum das hypophysäre FSH und LH stimuliert. FSH regt die Östrogenproduktion im Ovar an. LH bewirkt an den Tertiärfollikeln die Ovulation und damit die Umwandlung der folliculären Granulosa- und Thekazellen zu Progesteron - produzierenden Lutealzellen. Ansteigende Östrogen- und Progesteronspiegel koppeln an Hypothalamus und Hypophyse zurück und schließen den streng zyklusabhängigen hypothalamo- hypophysio- ovariellen Regelkreis der Frau.

Nach Ovariectomie bzw. im postmenopausalen Lebensabschnitt kommt es nach Erlöschen der Ovarfunktion zum Östrogenmangel, der zu einer vermehrten pulsatilen Ausschüttung von GnRH und zu erhöhten FSH - und LH - Spiegeln im Blut führt (Löffler und Petrides 2003; Stauder und Weyerstahl 2005).

Die wichtigsten natürlichen Östrogene sind Östradiol als biologisch aktivste Substanz, Östron mit 1/3 und Östriol mit 1/10 der biologischen Wirksamkeit von Östradiol. Sie unterscheiden sich untereinander durch Hydroxylgruppen an C-3 (Östron = E1), an C-3 und C-17 (Östradiol = E2) und C-3, C-16, C-17 (Östriol = E3) (Stauder und Weyerstahl 2005).

Östrogene binden bevorzugt an die beiden bekannten Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$ .

### 1.3.3 Das Androgen Testosteron

Bei männlichen Individuen wird Testosteron nach LH - Ausschüttung der Hypophyse in den Leydigzellen des Hodens produziert und durch den hypothalamo- hypophysio- testikulären Regelkreis reguliert. Weibliche Organismen synthetisieren Testosteron im Ovar. Dies ist zyklusabhängig und kann zu Östrogenen aromatisiert werden (Sanders et al. 1996). So ist es Testosteron möglich, indirekt über Östrogenrezeptoren zu wirken.

## 1.4 Untersuchte Gensequenzen der verschiedenen Fettgewebsarten

### 1.4.1 Östrogenrezeptor alpha und beta (ER $\alpha$ & ER $\beta$ )

Vor mehr als 40 Jahren kam Jensen zu dem Ergebnis, dass 17 $\beta$  - Östradiol (E2) im Uterus an bestimmte Proteine koppelt und biologische Effekte vermittelt (Jensen 1962). 1986 konnte die Gensequenz des intrazellulär gelegenen Östrogenrezeptors entschlüsselt werden (Greene et al. 1986). 9 Jahre später wurde die Existenz eines weiteren Östrogenrezeptors nachgewiesen. Diesen benannte man ER $\beta$ , den erstbeschriebenen ER $\alpha$  (Kuiper et al. 1996). Beide Rezeptoren sind in unterschiedlicher Menge in verschiedensten Geweben exprimiert. In Hypophyse, Niere, Nebenniere und Nebenhoden ist vor allem ER $\alpha$  vertreten und ER $\beta$  in Prostata, Lunge, Harnblase und Gehirn; beide zu etwa gleichen Anteilen in Uterus, Ovar und Hoden (Kuiper et al. 1997). Ständig werden neue Gewebelokalisationen und Interaktionen der ER - Rezeptoren und deren Splicevarianten gefunden; in Knochen, ZNS, Herz, Brust- und Fettgewebe (Ferro et al. 2003; Pedersen et al. 2001; Poola et al. 2002; Wallace et al. 2003).

Diese Rezeptoren sind sich in Aufbau und Form sehr ähnlich. E2 kann mit annähernd gleicher Affinität an sie binden. Die Bindungstaschen der ERs sind sowieso sehr promiskuit, d.h. zahlreiche Substanzen, die häufig nur entfernte Ähnlichkeit zu Steroidhormonen haben, finden dort Platz und können auf diese Weise agonistische oder antagonistische Wirkungen auf den Organismus ausüben (Rodriguez AL et al. 2004; Wallace et al. 2003; Wiseman 2005). Nachdem ein Ligand an die Rezeptorbindungsdomäne „angedockt“ hat, geht der Rezeptorkomplex eine Verbindung mit dem entsprechenden „estrogen response element“ (ERE) an der DNA ein und die Transkription beginnt (Pace et al. 1997). Unterschiede in der ERE - Nukleotidsequenz in Kombination mit dem jeweiligen ER - Subtyp können ER - ERE Interaktionen verändern und so die Genexpression (Gruber et al. 2004).

Ob es schließlich zu einer Förderung oder Hemmung der Transkriptionsrate kommt, unterliegt sehr komplexen Interaktionen von Ligand, Rezeptorkomplex und „estrogen response element“ und ist noch nicht bis ins Detail erforscht (Weatherman und Scanlan 2001). Die sehr komplizierten und verschiedenen Wirkungen der beiden ERs in Geweben können pauschalisierend folgendermaßen zusammengefasst werden: ER $\alpha$  aktiviert die Transkription, während ER $\beta$  diese moduliert (Matsuzaki et al. 2001; Paech et al. 1997). Anders ausgedrückt, ER $\beta$  fungiert je nach Gewebe als ein fördernder oder hemmender, meist jedoch als ein KO - Regulator der ER - Aktivität (Frasor et al. 2003; Pettersson et al. 2000). Das Zusammenspiel dieser Rezeptoren wird bezeichnend auch „Ying - Yang - Theorie“ genannt (Lindberg et al. 2003).

Das eben Beschriebene bietet in Zusammenhang mit regionalen Verteilungsunterschieden von Rezeptor und Splicevarianten die Grundlage für das Verständnis von selektiven

Östrogenrezeptormodulatoren (SERMs). Sie weisen je nach Gewebe östrogenagonistische oder -antagonistische Wirkart auf und finden klinischen Einsatz in der Hormontherapie.

Ferner ist es dem ER $\alpha$  ligandenunabhängig möglich, die Genexpression zu fördern (Deblois und Giguere 2003).

#### **1.4.2 Der Aryl - hydrocarbon - Rezeptor (AhR)**

Der intrazellulär gelegene, ligandengesteuerte Transkriptionsfaktor AhR wird in vielen Geweben exprimiert und unterliegt Spezies - spezifischen Aktivierungsunterschieden (Ramadoss und Perdew 2005).

Besonders gut können polyzyklische aromatische Chemikalien an die promiskuiten Bindungstaschen des AhR binden (Sovadinova et al. 2006). Bevor der aktivierte Aryl - hydrocarbon - Rezeptor jedoch an die DNA docken kann, muss er sich mit dem intranukleär gelegenen „AhR nuclear Translocator“ (ARNT) verbinden (Rowlands et al. 1996).

Über das so genannte „xenobiotic response element“ (XRE), oder das „estrogen response element“ (ERE), welches den betreffenden Zielgenen vorgeschaltet ist, moduliert der durch AhR - Agonisten aktivierte AhR/ARNT/Ligand - Komplex eine Vielzahl von Genen (Chen G und Bunce 2004; Shipley und Waxman 2006). Somit können AhR - Liganden auch in die Regulierung endokriner Systeme eingreifen. Beispielsweise sind sie im Stande, Zielgene der Östrogenrezeptoren, besonders des ER $\alpha$ , zur Transkription anzuregen (Liu et al. 2006; Wiseman 2005). Kurioserweise ist der AhR - Rezeptorkomplex ebenfalls befähigt, den Abbau des ER $\alpha$  über Proteasomenaktivierung zu mediieren (Wormke et al. 2003).

Ebenso kann durch AhR - Agonisten über noch nicht verstandene Mechanismen die regenerative Zellproliferation inhibiert werden (Mathew et al. 2006).

Ferner sind Xenohormone, welche an diesen Rezeptor binden, in der Lage, die Induktion der Fremdstoff metabolisierenden Phase - I - Enzyme der Cytochrom - P - 450 - Familie (z.B. CYP1A) zu aktivieren (Billiard et al. 2006). Über diesen Weg können im Fettgewebe akkumulierte toxische Substanzen inaktiviert und eliminiert werden (Yoshinari et al. 2006).

#### **1.4.3 Wingless - type MMTV (Wnt 10b)**

Wnt's gehören zur großen Familie der Protoonkogene. Sie sind hoch konservierte Glykoproteine, die verschiedenste Entwicklungs- und Differenzierungsstadien der Zelle regulieren und bei Mutation an der Karzinomentstehung beteiligt sind (Lu et al. 2004). Wachstumsfaktoren (z.B. TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ ) kontrollieren die Expression des Wnt (Saitoh et al. 2001). Das Protoonkogen Wnt koppelt an den membranständigen FZ/LRP - Rezeptor - Komplex (frizzled receptor and low - density lipoprotein receptor related protein) und löst so intrazelluläre Aktivitätskaskaden aus, welche im Nukleus die Transkriptionsmaschinerie der Wnt - Zielgene induzieren (Habas 2006).

Die Wnt - Familie beeinflusst zahlreiche Gewebe, im besonderen Maße auch den Auf- und Abbau verschiedenster Fettspeicher (Longo et al. 2004).

Das Glykoprotein Wnt 10b wird hauptsächlich von Präadipozyten exprimiert und unterdrückt ihre Differenzierung zu Adipozyten. So bewirkt eine vermehrte Wnt - 10b - Synthese bei transgenen Mäusen eine Reduzierung der Körperfettmasse trotz hochkalorischer Nahrung. Aufgrund dieser Beobachtung ist die nähere Untersuchung des Wingless - type - MMTV - Genes oder dessen Mutationsvarianten Gegenstand aktuellster Forschung. Seine Fehlfunktionen könnten nämlich durchaus entscheidend an der Entstehung von Adipositas beteiligt sein (Christodoulides et al. 2006).

#### **1.4.4 Insulin - like growth factor 1 (IGF - 1)**

Die Wachstumsfaktoren Insulin - like growth factor 1 und 2 (=Somatomedine) regulieren die Wachstumshormonwirkung im Knochen ausschließlich, in Muskulatur und Fettgewebe partiell. Zu 80% in der Leber synthetisiert, besitzen sie 70% Strukturhomologie zueinander und 50% zu Insulin (Löffler und Petrides 2003).

IGF - 1 unterliegt der Regulation des hypophysär ausgeschütteten Wachstumshormons (GH). Dieses wiederum wird im Wesentlichen über hypothalamisch gebildete Peptide aktiviert oder inhibiert. Somatostatin hemmt und Somatoliberein fördert die Ausschüttung von GH (Veldhuis 2003). Zusätzlich wirkt das in den endokrinen Zellen des Magens synthetisierte Ghrelin stimulierend auf die GH - Freisetzung. Ghrelin gelangt über den Blutweg zur Hypophyse (Date et al. 2000).

IGF - 1 & 2 werden zum Transport im Plasma an hochmolekulare Trägerproteine (IGF - Bindungsproteine 1 bis 6) gebunden und gelangen so zum Zielgewebe. In dieser Bindung sind die Somatomedine biologisch inaktiv (Löffler und Petrides 2003).

Ferner kann GH direkt das Wachstum am Zielorgan fördern oder indirekt über die Produktion von IGF. Verschiedene Gewebe synthetisieren zusätzlich eigenes IGF - 1 und üben parakrine Wirkungen auf den Zellverband aus (Butler und LeRoith 2001). Zum einen wird die organeigene Insulin - like - growth - factor - 1 - Herstellung über GH moduliert, zum anderen gibt es manifeste Hinweise, dass dies auch über E2 oder strukturell ähnliche Verbindungen geschieht. Oral aufgenommenes Östrogen oder strukturähnliche Substanzen werden im first-pass - Effekt in der Leber verstoffwechselt und unterdrücken oder steigern dabei die IGF - 1 - Synthese (Ho et al. 2006; Leung et al. 2004; Seidlova-Wuttke et al. 2003).

IGF - 1 ruft in vivo sowohl GH - ähnliche, als auch Insulin - ähnliche Wirkungen hervor (Mauras und Haymond 2005). Im Fettgewebe initiiert IGF - 1 eine Zunahme und GH eine Abnahme desselben (Bluher et al. 2005). Aller Wahrscheinlichkeit nach verhindert GH als Antagonist des fettgewebsständigen Insulinrezeptors die Glukoseaufnahme in dieses Organ (Louveau und Gondret 2004). Bisher wurde von einem Insulin - sensitivierenden Effekt des IGF - 1 auf das Fettgewebe ausgegangen, der zur Gewichtszunahme führt. Gegenstand



neuster Forschungen ist, dass die Höhe der Wachstumshormon - Spiegel die Interaktionen des Fettauf- und abbaus über komplexe IGF - 1 Wirkmechanismen steuert (Yuen KC und Dunger 2006).

Durch die Bestimmung von IGF - 1 kann demzufolge eine Aussage darüber gemacht werden, ob die Fettgewebsmasse in Bezug zur Kontrollgruppe eher größer oder kleiner geworden ist.

## **1.5 Im Serum bestimmte Fettgewebsparameter**

### **1.5.1 Insulin**

Insulin ist das wichtigste anabole Hormon. Das Peptidhormon wird über mehrere Vorstufen in den B - Zellen der Langerhans'schen Inseln des Pankreas gebildet, und dort in Sekretgranula gespeichert (Kitabchi 1977). Steigende Blutglukosespiegel triggern die pulsatile Insulinausschüttung (Meier et al. 2006). Es kann schnell und effizient den Blutzuckerspiegel senken, indem es sämtliche Stoffwechselschritte im Kohlenhydrat-, Lipid- und Eiweißmetabolismus, die zu einer Verminderung der Glukosekonzentration im Blut führen, beeinflusst. Dies wird initial über eine Glukoseaufnahme in die Zellen erreicht. Dafür sind verschiedene Glukosetransporter verantwortlich, da die Plasmamembranen für Glukose impermeabel sind. Von besonderer Bedeutung ist der GLUT - 4, welcher für die Glukoseaufnahme in Adipozyten und Muskelzellen sorgt (Löffler und Petrides 2003).

Ferner wird über dieses Hormon die Glukoneogenese in der Leber gehemmt und die Glykogenbiosynthese stimuliert (Löffler und Petrides 2003).

Im Fettgewebe treibt es die Speicherung von Fett in Form von Triacylglycerid voran und wirkt der Lipolyse entgegen (Löffler und Petrides 2003).

Eine Langzeitbelastung mit dem Xenohormon Bisphenol A steigert zum Beispiel in vitro die Insulinsekretion über Östrogenrezeptoren (Adachi et al. 2005). Derartige in - vivo - Effekte sind bisher nicht untersucht.

### **1.5.2 Leptin**

Adipozyten synthetisieren das Protein Leptin, welches sie besonders während der Lipogenese an das Blut abgeben. Steigende Serumspiegel hemmen das Hungergefühl über folgenden Regelkreislauf: Leptin wird nach der Nahrungsaufnahme, getriggert durch ansteigende Triacylglycerinspiegel im Fettgewebe, ausgeschüttet. Nun gelangt es über den Blutweg zu membranständigen Zytokinrezeptoren im Hypothalamus und im Plexus choroideus. Daran bindet das Protein, was u.a. zu einer Inhibition des hypothalamischen Neuropeptids Y führt und schließlich den Appetit reduziert (Meinders et al. 1996).

Leptin versucht demzufolge der Fettanreicherung entgegenzuwirken und kann somit als Gegenspieler des Insulins verstanden werden (Fan et al. 2003).

Zahlreiche Studien belegen ein enges Zusammenspiel von Insulin und Leptin. Vereinfachend kann gesagt werden, dass eine postprandiale Insulinfreisetzung, mit geringer Zeitverzögerung, die Leptinspiegel anwachsen lässt (Lee und Fried 2006). Leptin wiederum reguliert dann die Insulinfreisetzung herunter (Ahren und Havel 1999; Lee und Fried 2006). Wie ausgeprägt dieser Leptinanstieg ist, hängt vor allem von der Konstitution des Lebewesens ab. Bei fettleibigeren Organismen steigt der Leptinspiegel wegen der Menge an Adipozyten stärker an als bei dünneren und korreliert positiv mit dem BMI (Knerr et al. 2006).

## 1.6 Verwendete Substanzklassen

### 1.6.1 Bisphenol A (BPA)

Bisphenol A ist eine wichtige Chemikalie zur Herstellung verschiedenster Plastikmaterialien, welche seit den späten 1950er Jahren ihren industriellen Einsatz findet. Es lässt sich in allen kunststoffhaltigen Gegenständen nachweisen, vom Kinderspielzeug über kunststoffbeschichtete Nahrungsmittelverpackungen bis hin zu Sportgeräten, um nur einige Beispiele aufzuführen. Über Diffusion kann diese Chemikalie in den Organismus gelangen.

Eine wesentlich geringere Bindungsaffinität von BPA zum rekombinanten ER $\alpha$  als zum rekombinanten ER $\beta$  ist unumstritten (Seidlova-Wuttke et al. 2004). Leider lassen sich die Wirkungen und deren Intensität nicht für jede Spezies und jedes Gewebe pauschalisieren. In vitro, am menschlichen Östrogenrezeptor, wirkt BPA meist als Agonist am ER $\beta$  und je nach Gewebe als Agonist oder Antagonist am ER $\alpha$  (Kurosawa et al. 2002). So kann BPA am ehesten als SERM bezeichnet werden (Seidlova-Wuttke et al. 2004).

Am lebenden Organismus nehmen aber zusätzlich mannigfaltige Faktoren Einfluss auf die Eigenschaften von BPA.

Ein wichtiger Parameter ist der Applikationszeitpunkt. Im Tierexperiment wurde nachgewiesen, dass BPA um die Neugeborenenperiode keinen Effekt auf die Sexualentwicklung von männlichen SD - Ratten nimmt (Kato et al. 2006).

Sowohl im Reagenzglas als auch am adulten Lebendmodell konnte demgegenüber aufgezeigt werden, dass BPA die Aktivität der pankreatischen  $\beta$  - Zellen stark stimuliert und so eine Hyperinsulinämie hervorruft (Adachi et al. 2005; Alonso-Magdalena et al. 2006).

In der Leber wird BPA zu 4-Methyl-2,4-bis(p-hydroxyphenyl)pent-1-ene, einem seiner Hauptmetabolite, verstoffwechselt. MBP zeigt im Gegensatz zu BPA eine deutlich stärkere östrogene Wirkung im estrogen- response- element- Luziferase- transfizierten MCF7- Zell-Assay (Yoshihara et al. 2004).

### 1.6.2 Benzophenon 2 (BP2)

Benzophenone gehören als Substanzgruppe den UV - Filtern an. 12 Derivate der Grundstruktur Benzophenon (BP1 - BP12) sind in Gebrauch. BP2 besitzt in vivo, am Rattenmodell, starke östrogene Wirkung (Seidlova-Wuttke et al. 2005). Es bindet bevorzugt

an den ER $\alpha$  und wirkt unter anderem leber- und nephrotoxisch (Chhabra 2000; Yamasaki et al. 2003). Deshalb ist diese Chemikalie nicht in der europäischen Positivliste für Sonnenschutzmittel aufgeführt (Council Directive 76/768/EEC) (<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/site/de/consleg/1976/L/01976L0768-20060809-de.pdf>);, d.h. 2,2',4,4'-Tetrahydroxybenzophenon (BP2) darf nicht in Sonnencremes als UV - Filter verwendet werden. Zum Produktschutz darf es aber sehr wohl Kosmetika beigefügt werden. Besonders Parfums und Rasierwassern wird BP2 zur Konservierung beigesetzt und belastet somit unnötig den Konsumenten, wie das kantonale Laboratorium Basel feststellt (<http://www.kantonslabor-bs.ch/files/berichte/AftershavesUVFilter.pdf>).

Ferner binden und aktivieren Benzophenone an den Pregnane - X - Rezeptor, der die Genexpression von Cytochrom - P - 450 - 3A (CYP3A) induziert und somit östrogenaktive Metabolite schafft, welche nicht näher erforschte Störungen im Endokrinium hervorrufen können (Mikamo et al. 2003).

Hohe BP2 - Dosen, welche via Magensonde Ratten über 5 Tage appliziert wurden, nehmen störenden Einfluss auf das endokrine System. Fundierte Daten, ob eine transkutane Applikation dem Organismus auch Schaden zufügt, liegen bisher nicht vor (Schlecht et al. 2006).

### **1.6.3 Dibutylphthalat (DBP)**

Als Weichmacher in der Kunststoffherstellung, als Beschichtung von Magensaft - resistenten Tabletten, in Lacken und Klebstoffen finden Phthalate Verwendung. Der Mensch nimmt Phthalate hauptsächlich über Nahrungsmittel auf (Jen und Liu 2006). Im menschlichen Urin werden sie und ihre Metabolite in biologisch aktiven Konzentrationen nachgewiesen (Blount et al. 2000).

Die Wirkung der Phthalate im Allgemeinen, jedoch besonders diejenige des Dibutylphthalats auf den lebenden Organismus, gestaltet sich als sehr komplex und ist bisher fast ausschließlich am Urogenitaltrakt beschrieben.

Spezies - übergreifend und vereinfachend kann vorweggenommen werden, dass DBP bei weiblichen Lebewesen vor allem die Funktion des Reproduktionstraktes und bei männlichen die Entwicklung desselben stört (Hoyer 2001).

Umstritten ist jedoch, inwieweit DBP in vivo wirken kann. Der Nachweis einer östrogenen Wirkung in vitro erweist sich als problemlos. Dort bindet die Chemikalie an den ER $\beta$  schwach, nicht jedoch an den ER $\alpha$  (Seidlova-Wuttke et al. 2004). Die orale Gabe von Dibutylphthalat über wenige Tage mittlerer Dosis an trächtige Ratten konnte weder bei den Muttertieren noch bei den neugeborenen weiblichen Tieren einen östrogenen Einfluss auf den Uterus hervorrufen (Hong et al. 2005). Es wurden aber durchaus Frucht - schädigende Komplikationen oder Aborte nach chronischer Applikation sehr hoher Dosen beobachtet (Gray et al. 2006).

Kommt es unter Substanzbelastung zu einer Geburt, leiden männliche Jungtiere oft an einem fehlentwickeltem Urogenitalsystem und verminderten Testosteronspiegeln (Bowman et al. 2005). Auf jeder Entwicklungsstufe kommt demnach DBP eine starke antiandrogene Bedeutung zu. Es fungiert jedoch nicht als Antagonist am Androgenrezeptor (O'Connor et al. 2002) sondern wahrscheinlich vielmehr als ein Agonist am ER $\beta$  (Seidlova-Wuttke et al. 2004). Auf diese Weise wird nachvollziehbar, dass weibliche Neugeborene seltener Malformationen aufweisen und somit ontogenetisch weniger anfällig in Bezug auf Phthalate und dessen Metabolite sind. In der gleichen Studie erwies sich der Stoffwechselmetabolit Monobutyl - Phthalat (MBuP) potenter als DBP (Ema 2002). Des Weiteren kann MBuP die Proteinsynthese nachhaltig behindern (Kim YH und Lee 2005).

Noch heute wird diese Chemikalie in hohem Maße industriell verarbeitet, obwohl es Alternativen gäbe (Tanaka et al. 2005).

#### **1.6.4 Linuron (LIN)**

Linuron ist ein Herbizid und dient der Schädlingsbekämpfung in der Landwirtschaft. Es wird in großen Mengen auf Feldern verspritzt, reichert sich in den so behandelten Lebensmitteln an und gelangt in die menschliche Nahrungskette. Kartoffeln und Produkte daraus können beispielsweise hoch belastet sein (Escuderos-Morenas et al. 2003).

Sowohl in vivo als auch in vitro fungiert Linuron als schwacher Androgenrezeptor - Antagonist, indem es als kompetitiver Inhibitor diesen Rezeptor besetzt (Lambright et al. 2000).

Bereits in utero bindet dieses Herbizid an den Androgenrezeptor des Rattenembryos und verändert die androgenassoziierte mRNA - Regulation. Dies führt zu einer gestörten Differenzierung primärer und sekundärer Geschlechtsmerkmale (McIntyre et al. 2002; Turner et al. 2003), welche mit den Fehlentwicklungen, bedingt durch Dibutylphthalat vergleichbar sind. Der Einfluss des Linurons auf weibliche Lebewesen ist bisher wenig erforscht. Erhöhte Fettstoffwechsel - Parameter, erniedrigte Schilddrüsenhormone und Leptinwerte, sowie ein vermindertes Körpergewicht sind derzeit beschrieben (Seidlova-Wuttke et al. 2005).

#### **1.6.5 Procymidon (PROC)**

Procymidon ist ein Fungizid und wird zur Vermeidung einer Pilzbesiedlung prophylaktisch über Obst und Gemüse versprüht. Auch diese chemische Substanz gelangt über so konservierte Nahrungsmittel, ähnlich wie LIN, in nennenswerten Konzentrationen in lebende Organismen. Große Mengen lassen sich in Weintrauben und Produkten daraus nachweisen (Rodriguez R et al. 2001). Selbstverständlich sind sämtliche, auf diese Weise kontaminierte Lebensmittel belastet. Hinzukommend reichert es sich stark und mit einer langen Verweildauer im Erdboden an (Nagami 1996).

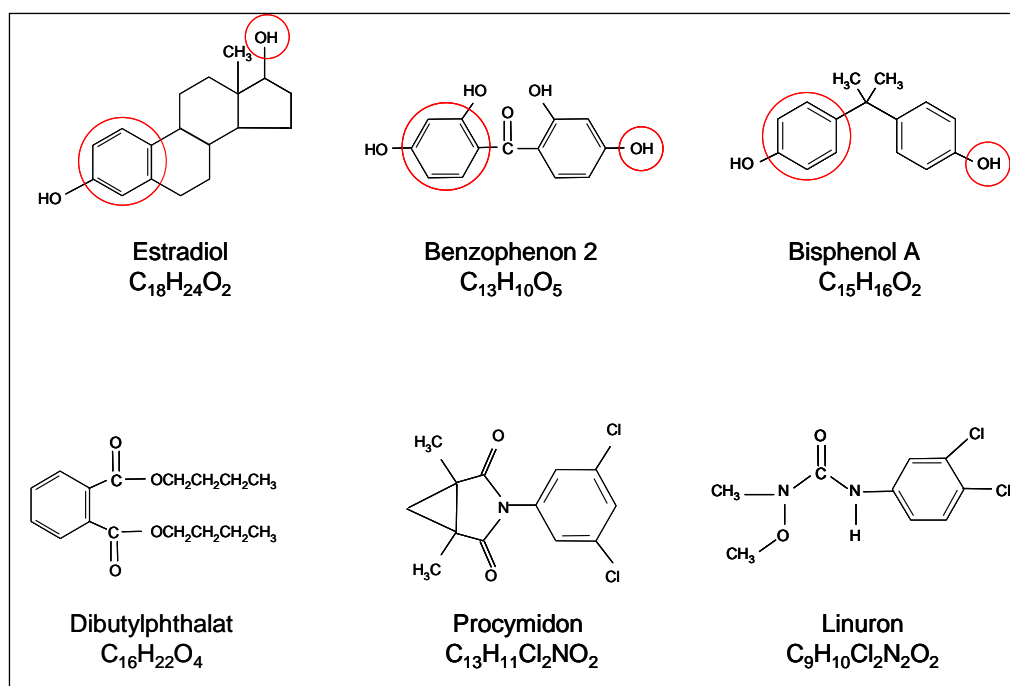
Der Androgenrezeptor - Antagonist Procymidon besitzt eine höhere antiandrogene Potenz als Linuron (Kang et al. 2004).

Eine kontinuierliche PROC - Applikation während der Schwangerschaft und in der frühen Postnatalphase ruft bei männlichen Rattennachkommen ausgeprägte Entwicklungsstörungen des Urogenitaltraktes sowie der primären und sekundären Geschlechtsmerkmale hervor (Ostby et al. 1999).

Nachhaltig greift die chronische Aufnahme des Pilzschutzmittels in die Regulierung der Hypophysen - Gonaden - Achse ein. Daraus resultieren erhöhte Serum - Blutspiegel des luteinisierenden Hormons und des Testosterons (Svechnikov et al. 2005).

Karzinogene Eigenschaften, besonders in der Leber nach kontinuierlicher Verabreichung, konnten über komplexe Induktionswege der Cytochrom - P - 450 - Familie im Mausmodell nachgewiesen werden (Sapone et al. 2003). Außerdem wurde über eine indirekte Aktivierung der ERs durch diesen Stoff in der Leber von Forellen berichtet (Radice et al. 2006). Auf weibliche Ratten wirkt Procymidon wie Linuron (Seidlova-Wuttke et al. 2005).

### 1.6.6 Strukturformeln der verwendeten Substanzen



**Abb. 1** BP2, BPA und DBP haben wenig Strukturähnlichkeit zu E2. Diese Xenohormone können aber dennoch mit einer gewissen Affinität an die Östrogenrezeptoren binden. Ermöglicht wird dies vor allem durch die rot markierten Strukturen. PROC und LIN sind Androgenrezeptor - Antagonisten und können nicht an die ERs koppeln (Seidlova-Wuttke 2004, Seite 11).

Der aromatische A - Ring des Östradiols (E2) ist eine wichtige Voraussetzung, um an Östrogenrezeptoren binden zu können (Tabira et al. 1999). Wenn auch Benzophenon 2 (BP2), Bisphenol A (BPA) und Dibutylphthalat (DBP) wenig Strukturähnlichkeit zu Östradiol

besitzen, so weisen sie dennoch eine aromatische A - Ringstruktur auf. Ferner optimiert eine weitere OH - Gruppe am D - Ring des Östradiols, in Äquidistanz zum A - Ring, die Bindungsfähigkeit an Östrogenrezeptoren (Anstead et al. 1997). E2, BP2 und BPA sind im Besitz einer solchen OH - Gruppe. Eine Bindung an beide ERs wird so möglich.

Die Androgenrezeptor - Antagonisten Procymidon (PROC) und Linuron (LIN) haben keinerlei Ähnlichkeit zu Östradiol und koppeln nicht an den Östrogenrezeptor, wie später gezeigt werden wird.

### **1.7 OECD - Protokoll zur Identifikation endokrin aktiver Substanzen**

Die Organisation für wirtschaftliche Zusammenarbeit und Entwicklung (OECD) hat screening - Tests zur Identifikation endokrin wirksamer Substanzen entwickelt (Gelbke et al. 2004). Eine östrogene Wirkung wird nach OECD - Richtlinien im Uterotropie - Assay bestimmt (Kim HS et al. 2005), eine androgene im Hershberger - Assay (Yamasaki et al. 2006).

Hierzu appliziert man adulten ovariectomierten oder kastrierten Tieren über einen längeren Zeitraum verdächtige Substanzen. Im Anschluss daran werden Sexualsteroid - regulierte Reproduktionsorgane, bei weiblichen Tieren meist die Uterusgewichte und bei männlichen oft die Prostatagewichte, mit Kontrollgruppen verglichen. Kann eine Gewichtszunahme der beschriebenen Organe verzeichnet werden, demaskieren die getesteten Substanzen östrogenähnliche Effekte auf weibliche und androgen assoziierte auf männliche Tiere.

Da die östrogene/antiöstrogene bzw. androgene/antiandrogene Wirkung der oben beschriebenen Substanzen validiert ist und endokrine Disruptoren auch Einflüsse auf extragenitale Organsysteme nehmen, sollen in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Fettgewebsarten der weiblichen Sprague - Dawley - Ratte (SD - Ratte) sowie Blut - Serum - Parameter untersucht werden.

### **1.8 Das untersuchte Fettgewebe**

Fettgewebe besteht neben interstitiellem Bindegewebe und Blutgefäßen hauptsächlich aus Adipozyten, welche sich aus Präadipozyten differenzieren. Sowohl eine Vergrößerung der Fettzellen durch Lipidablagerung als auch eine Zunahme ihrer Anzahl bewirkt eine Steigerung der Fettmasse (Jeffrey 2003). Ferner kann Fett in braunes, welches an der körpereigenen Wärmeregulation beteiligt ist, und in weißes unterteilt werden.

Lange Zeit wurden die Adipozyten des weißen nur als ein Depot für Fett angesehen, ohne ihre mannigfaltigen Aufgaben im Organismus zu erkennen. Sie sind maßgeblich an der Regulation der Leptin -, Zytokin -, Angiotensinogen - Ausschüttung und an der Plasminogen - Aktivator - Inhibitor - Ausschüttung beteiligt. Außerdem werden dort auch Steroidhormone produziert. Ebenfalls beeinflusst es den Energie-, Lipid-, und Glukosestoffwechsel, das Blutgefäß-, Immun- und das Reproduktionssystem entscheidend (Guerre-Millo 2002). Blut

als Botenstoff ermöglicht die Kommunikation mit Gehirn und peripheren Organen (Guerre-Millo 2002; Trayhurn 2005). Hinzu kommt, dass dieses Gewebe einen hervorragenden Speicher für lipophile Umweltgifte darstellt, welche, dort eingelagert, die Funktionen desselben stören können und in der Konsequenz viele Körpersysteme (Tabb und Blumberg 2006; Yoshinari et al. 2004).

Bekanntermaßen differenzieren sich verschiedene Fettgewebsdepots in Bezug auf Stoffwechseleigenschaften und Rezeptordichte voneinander (Rodriguez-Cuenca et al. 2005; Tchernof et al. 2006). Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit drei Fettgewebsarten untersucht (subkutanes Fettgewebe, mesenteriales Fettgewebe und das paratibiale Fettgewebsdepot).

Die Eigenschaften und genauen Aufgaben dieser Fettspeicher werden sehr kontrovers diskutiert und sind nicht eindeutig. Vorsichtig formuliert besitzt das subkutane Fettgewebe der Ratte große Adipozyten, die enorme Speicherkapazitäten aufweisen. Sie können schnell auf- und wieder abgebaut werden, sind sehr stoffwechselaktiv und werden dem braunen Fettgewebe zugerechnet (Avram et al. 2005). Im Vergleich dazu ist der Fettgewebsspeicher des Mesenteriums kleiner und reagiert weniger sensibel auf äußere Einflüsse (Fruhbeck und Gomez-Ambrosi 2002; Tchernof et al. 2006). Dieses im Abdomen befindliche Depot gehört dem weißen Fettgewebe an.

Dem paratibialen Fettdepot wird eine spontane Regulierung auf sich verändernde Körperbedingungen zugesprochen (Seidlova-Wuttke et al. 2003). Vermutlich ist es dem weißen Fettspeicher zuzurechnen.

Die Gegenüberstellung der internationalen Literatur zeigt außerdem, dass die abdominal gelegenen Fettspeicher nicht differenziert betrachtet werden. So werden die Begriffe (intra-) abdominales und viszerales Fettgewebe synonym verwendet und nur in intraperitoneal bzw. retroperitoneal gelegenes unterteilt. Das intraperitoneale Fett wird auch nicht, je nach Lokalisation, in omentales, mesenteriales und viszerales untergliedert; vielmehr werden diese Fettgewebsarten nicht konsequent voneinander abgegrenzt und beschrieben (Avram et al. 2005). Dieser Sachverhalt erschwert das Literaturstudium.

Zusammenfassend ist sehr wenig über die verschiedenen Fettdepots bekannt. Teilweise sind die Angaben in der verwendeten Literatur widersprüchlich oder Begrifflichkeiten unklar definiert, wie beispielsweise die des oben erwähnten abdominalen Fettdepots.

Darüber hinaus stehen nur bedingt Daten der untersuchten Fettmassen zur Verfügung, da sie offenbar in divergentem Interesse beforscht werden. So hat das paratibiale Polster bisher nur Seidlova - Wuttke beschrieben (Seidlova-Wuttke et al. 2005). Demzufolge sind die Datenmengen begrenzt. Alle wissenschaftlichen Arbeiten bekräftigen aber, dass die Fettpolster je nach Lokalisation unterschiedliche Aufgaben im Organismus wahrnehmen und

differenziert auf bestimmte Stimuli reagieren. Zusätzlich besitzt jedes Fettgewebsdepot Steroidhormonrezeptoren in unterschiedlicher Ausprägung (Rodriguez-Cuenca et al. 2005).

### **1.9 Studienziel**

Die verwendeten Substanzklassen greifen in die Wirkmechanismen der Sexualsteroiden ein und deshalb wurden ihre Effekte bisher überwiegend an reproduktionsrelevanten Organen getestet. In sämtlichen Organsystemen werden aber Steroidrezeptoren exprimiert. Es liegt also nahe, auch andere Organe auf die Beeinflussung durch Xenohormone zu testen, da möglicherweise wichtige Effekte dieser Stoffe außerhalb des Genitaltraktes zu erwarten sind. Die Speicherfunktion des Fettgewebes stellt einen hervorragenden Pool für endokrine Disruptoren dar. Dort eingelagert können sie aufgrund ihrer Bindungsaffinität zu bestimmten Rezeptoren das Funktionsgleichgewicht dieses Organs stören und in Folge indirekt andere Organsysteme beeinflussen.

Ziel der vorliegenden Studie ist es, den Effekt auf die drei zuvor „skizzierten“ Fettgewebsarten nach dreimonatiger Substitution von BPA, DBP, BP2, PROC und LIN an der ovariectomierten Sprague - Dawley - Ratte (SD - Ratte) zu untersuchen und mit der Wirkung von  $17\beta$  - Östradiol (E2) zu vergleichen.

Dieses Tiermodell der ovariectomierten Ratte bietet sich für die Fragestellung besonders gut an, da die störende körpereigene Steroidhormonsynthese weitgehend unterbunden ist. Ferner entspricht der intensive Applikationszeitraum über drei Monate ca. 12,5% der Lebenserwartung einer Ratte. Dies simuliert einen relativ langen Lebensabschnitt des Tieres und wird deshalb hervorragend mit einer Langzeitaufnahme geringer Mengen der Umweltgifte am Menschen vergleichbar.



## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Tierexperimente in vivo**

#### **2.1.1 Versuchstiere und Haltungsbedingungen**

Die Versuche wurden an selbstgezogenen weiblichen Sprague - Dawley - Ratten durchgeführt. Bei Studienbeginn waren die Tiere 12 Wochen alt und hatten ein durchschnittliches Gewicht von  $246 \pm 1,4$  g. In Makrolon - Käfigen Typ 4 hielt man die Tiere in 24 Gruppen zu je 6 Tieren. Die Beleuchtung des Käfigraumes erfolgte im 12 - Stunden - dark - light - cyclus mit Licht von 6 bis 18 Uhr. Dort herrschte eine Temperatur von 23°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 55 %; Wasser, sojafreies Pellet - Futter stand den Tieren zu jeder Zeit zur freien Verfügung.

Gesetzliche Bestimmungen:

Für alle Tierexperimente liegt eine Versuchstiergenehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor (Aktenzeichen 509.42502/01 - 13.00).

Unter der Anleitung und Aufsicht von Prof. Dr. med. Wolfgang Wuttke, Guillermo Rimoldi und Dr. Dana Seidlova - Wuttke wurden die Experimente durchgeführt.

#### **2.1.2 Narkose und Ovariectomie der Ratten**

Um die Ovariectomie - Operation durchzuführen, mussten die Tiere für 10 – 15 Minuten in Vollnarkose versetzt werden. Hierzu verabreichte man ihnen CO<sub>2</sub> über ein Inhalationsgeschirr. Nachdem die Ratten betäubt waren, injizierte man jedem Tier intraperitoneal 45 mg/kg KG (~11mg) Ketamin (Hostaket®, Firma Hoechst, Bad Soden) und 10 mg/kg KG (~2,5 mg) Xylocain (Rompun®, Firma Bayer, Leverkusen).

Zur Ovariectomie wurde die Bauchdecke etwa 2 cm kaudal des Rippenbogens eröffnet und die Ovarien freigelegt. Die Abbindung dieser erfolgte distal der Uterushornspitzen und die Entfernung derselben mit einem Skalpell. Es folgte der Verschluss aller eröffneten Strukturen mit sterilem Nahtmaterial.

Ausgeleitet wurde die Kurznarkose mit Antisedan (Antipamazolhydrochlorid®, Firma Pfizer).

#### **2.1.3 Identifikation der Tiere**

Die subkutane Implantation eines Transponder - UNO MICRO - ID - Systems (ISO - Transponder 12 mm Uno - Roesvaststaal BV, Zevenaar, Holland) unter Inhalationsnarkose ermöglichte die Identifikation der verschiedenen Tiere.

#### **2.1.4 Versuchsablauf und Studienbeschreibung**

Im Anschluss an die Ovariectomie teilte man die Tiere in 12 Gruppen á 12 Tiere gleicher Gewichtsklassen auf und hielt sie in Käfigen zu je 4 Tieren.

Über einen Zeitraum von 3 Monaten nahmen die jeweiligen Gruppen folgende Futtersubstanzen auf:

- sojafreies und testsubstanzfreies Kontrollfutter
- sojafreies Östradiolbenzoat - haltiges Futter (= 34,5 mg E2 - benzoat entsprechen 25 mg freies 17 $\beta$  - Östradiol)/kg Futter
- sojafreies Bisphenol A - haltiges Futter (0,5 mg/kg Futter) = BPA N
- sojafreies Bisphenol A - haltiges Futter (5mg/kg Futter) = BPA H
- sojafreies Dibutylphthalat - haltiges Futter (1,25 g/kg Futter) = DBP N
- sojafreies Dibutylphthalat - haltiges Futter (6,25 g/kg Futter) = DBP H
- sojafreies Benzophenon 2 - haltiges Futter (2,5 g/kg Futter) = BP2 N
- sojafreies Benzophenon 2 - haltiges Futter (12,5 g/kg Futter) = BP2 H
- sojafreies Procymidon - haltiges Futter (312,5 mg/kg Futter) = PROC N
- sojafreies Procymidon - haltiges Futter (1,25 g/kg Futter) = PROC H
- sojafreies Linuron - haltiges Futter (250 mg/kg Futter) = LIN N
- sojafreies Linuron - haltiges Futter (1,25 g/kg Futter) = LIN H.

Die Bestimmung der Menge an gefressenem Futter und getrunkenem Wasser pro Käfig erfolgte zweimal wöchentlich. Auf diesem Weg konnte die mittlere Futter- und Wasseraufnahme pro Tier in drei bis vier Tagesabständen abgeschätzt werden. Die mittlere Futterraufnahme pro Tier der letzten 3 Versuchswochen diente der Berechnung der täglichen Aufnahme an Testsubstanz und ist nachfolgend angegeben.

Tab. 1 Tägliche Futter- und Substanzaufnahme (in g/Tier/Tag bzw. µg/Tier/Tag)

Sojafreie Testsubstanz	Futtermenge in g	Substanzmenge in µg
Kontrollfutter	19,0	0
freies 17β - Östradiol (E2)	13,1	327,50
Bisphenol A N (BPA N)	17,56	8,78
Bisphenol A H (BPA H)	17,45	87,80
Dibutylphthalat N (DBP N)	17,68	22100
Dibutylphthalat H DBP H	17,01	106300
Benzophenon 2 N (BP2 N)	16,54	41350
Benzophenon 2 H (BP2 H)	14,65	183130
Procymidon N (PROC N)	17,96	5610
Procymidon H (PROC H)	17,89	22360
Linuron N (LIN N)	17,58	4390
Linuron H (LIN H)	14,12	17650

### 2.1.5 Tötung der Ratten

Nachdem die Tiere 3 Monate die jeweiligen Testsubstanzen zu sich genommen hatten, wurden sie zum Versuchsende in CO<sub>2</sub> - Narkose dekapitiert. Die Anzahl der Ratten und die Entnahme zahlreicher Organe machte es unmöglich, alle Tiere an einem Tag zu eliminieren. Deshalb führte man die Enthauptung an verschiedenen Tagen durch; jedoch immer zwischen 8.00 und 12.00 Uhr, um Schwankungen in der zirkadianen Rhythmik der Tiere und damit Fehler der Messparameter zu vermeiden.

Nach Entnahme der verschiedenen Organe wurden diese sofort in Eppendorfcups (Firma Sarstedt, Nümbrecht) gegeben, welche mit 1000µl RNAlater (RNAlater RNA Stabilization Reagent 250ml, Cat.No.76106, QIAGEN GmbH, 40724 Hilden) zur Stabilisierung der im

Gewebe enthaltenen RNA gefüllt waren. Im Anschluss fror man die Gewebeproben in Flüssigstickstoff tief und zur weiteren Verarbeitung bei  $-70^{\circ}\text{C}$  ein.

Ferner diente das bei der Enthauptung gewonnene Blut der Analyse verschiedener Serumparameter.

Die Ergebnisse dieser Arbeit beruhen auf der Untersuchung von so gewonnenem und weiterverarbeitetem Fettgewebe und Blutserumproben.

## 2.2 Experimente in vitro

### 2.2.1 Ligandenbindungsassays

Zur Untersuchung der Bindungsfähigkeit der verwendeten endokrinen Disruptoren an ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  wurden rekombinante Proteine der Firma Panvera (Carlsbad, California, USA) eingesetzt. 13,5 pMol rekombinantes Protein wurden für den ER $\alpha$  und 8,5 pMol für den ER $\beta$  mit Phosphatpuffer und radioaktiv markiertem E2 ( $J^{125}$  - Östradiol, ~25.00 CPM; NEN, Dreieichenhain, Deutschland) versetzt. Dann wurden diesem Ansatz nicht markiertes E2 bzw. die Testsubstanzen in aufsteigenden Mengen zugegeben. Bindet eine Testsubstanz an den rekombinanten ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  wird der Tracer, das  $J^{125}$  - markierte E2, in zunehmender Weise vom Rezeptor verdrängt. So lassen sich Standardkurven für E2 bzw. die ED konstruieren. Die Lage der Standardkurven der ED im Vergleich zu derjenigen des E2 macht die relative Bindungsfähigkeit erkennbar. Im Anschluss lässt sich die ED<sub>50</sub>, also die Menge Substanz, die 50% des radioaktiv markierten Tracers aus der Bindung verdrängt, berechnen.

### 2.2.2 Molekularbiologische Methoden

In der vorliegenden Arbeit untersuchte man vor allem die Expression verschiedener Genprodukte in drei unterschiedlichen Fettgewebe - Depots je Tier mittels „real Time - Polymerase chain reaction“ (rT - PCR).

Dazu waren die vier folgenden Arbeitsschritte notwendig:

1. Auftauen und Wiegen jedes Fettgewebestückes
2. Aufarbeitung der Gewebeproben und Isolierung der total RNA
3. Umschreibung der RNA in cDNA (reverse Transkription)
4. Nachweis und Quantifizierung verschiedener Genprodukte durch die rT - PCR.

Alle diese Arbeitsabläufe führte man mit Ethanol desinfizierten Latex - Handschuhen durch. Bei Raumtemperatur konnte in Arbeitsschritt eins und zwei gearbeitet werden; auf Eis wurden Schritt drei und vier erledigt. Sämtliche Gefäße, Pipetten und Eppendorfcups, die der Probenverarbeitung dienlich waren, wurden bei  $121^{\circ}\text{C}$  autoklaviert (30 Min.) und dann bei  $240^{\circ}\text{C}$  sterilisiert (12 Std.), um mögliche Verschmutzungen der Proben zu vermeiden.

Aufgrund der großen Probenzahl (103 Tiere je drei verschiedene Fettgewebsarten = 309 Proben; 41 Tiere je Gewebeart stellten die Grundlage der histologischen Aufarbeitung dar) konnten nicht alle Proben parallel verarbeitet werden. An jedem Fettgewebsdepot wurden

erst alle vier Arbeitsvorgänge ausgeführt, im Anschluss daran, die statistische Auswertung vorgenommen und dann die nächste Gewebegruppe aufgearbeitet.

Die cDNA - Herstellung der 103 Tiere einer Fettgewebeat gliederte sich in 4 verschiedene Aufarbeitungsgruppen à 3 x 24 und 1 x 31 Tiere. 2 Tiere der gleichen Behandlungsgruppe/Stoffgruppe befanden sich in jeder Aufarbeitung.

Auf zwei PCR - Platten (96 - well - Platten) fanden schließlich die 103 Proben zur Quantifizierung der gesuchten Nukleotidsequenz Platz.

### **2.2.3 Isolierung der total RNA**

Zunächst wurden die in RNAlater (RNAlater RNA Stabilization Reagent 250ml, Cat.No.76106, QIAGEN GmbH, 40724 Hilden) eingefrorenen Fettgewebeproben der jeweiligen Aufarbeitungsgruppe aufgetaut und gewogen. Um optimale RNA - Ausbeuten zu erzielen, sollte das Gewicht eines jeden Gewebestückes zwischen 150 – 500 mg liegen. Im Anschluss gab man die Gewebeproben in ein 5ml Cup (Firma Sarstedt, Nümbrecht), welches zuvor mit 1000µl QIAzol Lysis Reagenz (Cat. No 79306, QIAGEN GmbH, Hilden) befüllt wurde. Nun wurde jede einzelne Probe mit einem Ultra - Turrax bei 20000 UpM (Firma Janke & Kunkel, Staufen) zerkleinert. Um die RNA - Ausbeute zu verbessern mussten die E - Cups (Firma Sarstedt, Nümbrecht) mit dem Gewebemix für 10 Sekunden in ein eisgekühltes, hochfrequentes Ultraschallbad gegeben werden (Sonifer, Branson Sonic Power Company, Danbury, Connecticut).

Danach wurde jede so homogenisierte Probe in ein Eppendorfcup (2ml) (Firma Sarstedt, Nümbrecht), welches bereits mit 200µl Chloroform (J.T. Baker, Deventer - Holland) befüllt war, gegeben und 15 sec. auf dem Vortex geschüttelt. Bevor die Proben für 15 Min. bei 4°C zentrifugiert wurden, mussten sie 2 Min. bei Raumtemperatur stehen.

Nach der Zentrifugation waren drei Phasen zu unterscheiden; eine obere farblose, welche RNA enthält, eine weiße Interphase und eine hellrote, organische Phase. Wichtig für die weitere Vorgehensweise war die obere, wässrig anmutende Phase. Sie enthielt die RNA und musste nun vorsichtig abpipettiert werden.

Das gewonnene RNA - enthaltende Zentrifugat (ca. 600µl) wurde in ein neues 2ml Eppendorfcup (Firma Sarstedt, Nümbrecht) überführt und mit der gleichen Menge Ethanol (70%) (J.T. Baker, Deventer - Holland) verdünnt und anschließend für 10 sec. gevortext.

Im folgendem wurden alle Gefäße, Spin Columns und Chemikalien aus dem RNeasy Mini Kit (Cat. No.74106, Firma Qiagen GmbH, 40724 Hilden) verwendet. Zunächst wurden 600µl des entstandenen Mix auf die Säule der RNeasy - Mini - Spin - Columns (Cat. No.74106, Firma Qiagen GmbH, Hilden) pipettiert und bei 10.000 Umdrehungen für 15 sec. zentrifugiert. Die Flüssigkeit im Sammelröhrchen wurde verworfen und die restliche Menge an RNA - enthaltendem Wasser - Ethanolmix auf die Säule gegeben und erneut abzentrifugiert. Die zu extrahierende RNA wurde durch diesen Arbeitsschritt an die Membran der RNeasy - Mini -

Spin - Columns (Cat. No.74106, Firma Qiagen GmbH, Hilden) gebunden. Die Zugabe von Ethanol zur RNA erhöht die Bindungskapazität für RNA an die Membran des Säulchens. Anschließend wurde die RNA in der Membran der RNeasy - Mini - Spin - Säule (Cat. No.74106, Firma Qiagen GmbH, Hilden) mit 700µl RW1 - Puffer einmal und zweimal mit 500µl RPE - Puffer gewaschen um Verunreinigungen zu entfernen. Nach jeder Zugabe der verschiedenen Wasch - Puffer wurde die Flüssigkeit abzentrifugiert und verworfen (je 15 sec. für die ersten beiden Waschschrte und 2 Min. für den letzten Reinigungsvorgang bei stets 10000UpM). Im letzten Schritt wurde die RNA mit 50µl RNase - freiem Wasser aus der Membran der RNeasy - Mini - Spin - Column in ein 1,5ml Eppendorfcup herauszentrifugiert (1 Min bei 10000 UpM) und sofort auf -70°C gefroren .

#### **2.2.4 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung der RNA**

Mit Hilfe der photometrischen Absorptionsmessung erlangte man Aufschluss über die Quantität und Qualität der isolierten RNA.

Bei einer Wellenlänge von 260 nm wurde unter Einbeziehung folgender Formel: ( $OD_{260} = 1 = 40\mu\text{g/ml RNA}$ ) ( $OD_{260} \times \text{Verdünnung in der Küvette} \times 40 = \mu\text{g RNA/ml}$ ) die Konzentration der RNA bestimmt (Photometer: Eppendorf Bio Photometer, Eppendorf - Netheler - Hinz GmbH Hamburg). Die RNA - Konzentrationen der verschiedenen Fettgewebe variierte aufgrund der sehr unterschiedlichen Gewebegröße von 20 bis 500µg/ml.

Aufgrund der Tatsache, dass Nukleinsäuren zwei Absorptionsmaxima bei 260 nm und 280 nm in einem Verhältnis von 2:1 besitzen, kann aus dem Verhältnis  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  eine Aussage über die Verunreinigung mit Proteinen gemacht werden. Liegt der Wert (=Ratio)  $>2$  besteht eine Verschmutzung. Im Fettgewebe lag die Ratio bei  $\sim 1,85$ .

Nach der Bestimmung der RNA - Menge und - Reinheit wurden alle Proben zur weiteren Verarbeitung auf die gleiche RNA - Konzentration mit „Velcorin - Wasser“ (Dimethyldicarbonat :  $H_2O_{\text{bidest.}} = 1 : 1000$ ; Dimethyldicarbonat, Bayer AG, D - 51368 Leverkusen) verdünnt, da nur quantitativ gleichwertige Proben vergleichbare Ergebnisse liefern. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA auf 20ng/µl eingestellt.

#### **2.2.5 Reverse Transkription**

Voraussetzung für die PCR ist das Umschreiben von total RNA in cDNA, da nur cDNA in der PCR amplifiziert werden kann. Hierfür ist die RNA - abhängige DNA - Polymerase, Reverse - Transkriptase verantwortlich. Damit das Enzym Reverse - Transkriptase richtig arbeiten kann, muss eine Oligonukleotidsequenz an den RNA - Strang angelagert werden. Dieses „priming“ übernimmt ein random - Hexamer (Random Primer: Firma Invitrogen, Cat. No. 48190-011).

Die Reverse Transkription wurde mit M - MLV Reverse Transkriptase (Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase) durchgeführt (Firma Promega, Madison). Das in

diesem System verwendete Enzym weist keine RNase - H - Aktivität auf, so dass besonders lange RNA - Abschnitte umgeschrieben werden können. Um einem vorzeitigen RNA - Abbau entgegenzuwirken, musste dem Ansatz noch RNasin (Ribonuclease Inhibitor: Firma Promega, Madison) beigemischt werden.

Zur Bereitstellung ausreichender Basenmengen zur cDNA - Synthese wurde 10mM dNTP - Mix hinzugegeben (Firma Invitrogen).

Der Reaktionsansatz für 20,1µl Endvolumen setzte sich zusammen aus:

10µl vorverdünnte RNA

3µl Velcorin Wasser

1µl Random Primer.

Dieser Ansatz musste zunächst für 10 Min. bei 70°C inkubieren, um störende Sekundärstrukturen aufzulösen und so eine Anlagerung des Random Primers an die RNA zu ermöglichen.

Anschließend wurden folgende Reagenzien je Probe hinzugegeben:

4µl M - MLV RT 5x Reaction Buffer

1µl dNTP - Mix

1µl M-MLV Reverse Transkriptase

0,1µl RNasin.

Der Reaktionsansatz durchlief im Thermozykler (Firma Biometra, Trio Heated Lid, Göttingen) folgende Inkubationsschritte:

10 Min. bei 22°C zur Anlagerung der Primer (Annealing)

50 Min. bei 42 °C zur Gegenstrangsynthese

10 Min bei 95°C zur Denaturierung.

Nach allen Inkubationsschritten wurde die neu hergestellte cDNA sofort abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

### **2.2.6 Polymerase - Kettenreaktion (PCR)**

Für diese Arbeit war die Polymerase - Kettenreaktion ein wichtiges Hilfsmittel. Durch sie konnte indirekt über die in cDNA umgeschriebene totale Menge an RNA die Expression verschiedener Gene nachgewiesen werden.

An dieser Stelle sei die grundsätzliche Arbeitsweise der PCR erläutert.

Mit der Entwicklung der PCR wurde eine schnelle und hoch effektive Methode entdeckt, selbst kleinste Mengen an DNA zu amplifizieren und nachzuweisen. Die Polymerase - Kettenreaktion besteht grob aus drei Schritten: der Denaturierung der doppelsträngigen DNA - Matrize, Anlagerung der Primer (Annealing) und Polymerisation.

Zunächst wird der Reaktionsansatz auf ca. 90°C erhitzt, um die doppelsträngige cDNA in ihre Einzelstränge aufzuteilen (zu denaturieren). Im Anschluss wird der Reaktionsmix auf

etwa 50°C abgekühlt, so dass sich die Primer an das 5' - Ende des jeweiligen cDNA Stranges anlagern (Annealing, Hybridisierung) können. Diese Primer (Oligonukleotide) sollten aus maximal 30 Basen bestehen und komplementär zum gesuchten cDNA - Abschnitt sein. Jetzt kann die DNA - Polymerase bei ca. 70°C ihren Dienst aufnehmen und den gesuchten DNA - Abschnitt zum Doppelstrang komplementieren (polymerisieren). Für die Reaktion wird die thermostabile Taq - DNA - Polymerase eingesetzt. Dieses Enzym besitzt ein Temperaturoptimum bei 70°C und ist kurzzeitig bis 95°C stabil und somit für die Hitzedenaturierung der Doppelstrang - DNA geeignet. Diese Zyklen werden mehrfach wiederholt.

### **2.2.7 TaqMan™ PCR Assay**

Ein großer Vorteil des TaqMan™ PCR Assay (Fa. Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) ist das hohe Automatisierungsniveau. Dieser Assay ermöglicht die Amplifikation und den Nachweis des PCR - Produktes simultan in einem Reaktionsgefäß. Erreicht wird dies durch die Aktivität der 5' - 3' - Exonukleaseaktivität der AmpliTaq - DNA - Polymerase. Aufgabe dieser 5' - 3' - Exonukleaseaktivität ist es, die spezifischen Sondensequenzen vom neu synthetisierten cDNA - Strang zu entfernen und die entstandene Lücke, beginnend mit dem freien 3' - OH - Ende des vorangegangenen cDNA - Stückes mit Desoxyribonukleosidtriphosphat komplementär zur Basensequenz des Matrizenstranges aufzufüllen.

Der TaqMan™ PCR Assay ist mit einer speziellen fluorogenen Sonde ausgestattet, die aus einem Oligonukleotid besteht, dessen 5' - Ende mit einem fluoreszenten Reporter - Farbstoff (Fluoreszein - Derivat = FAM = 6 - Carboxy - Fluorescein) markiert ist, während das 3' - Ende einen Quencher - Farbstoff (Rhodamin - Derivat = TAMRA = 6 - Carboxy - tetramethyl - rhodamin) trägt und außerdem mit einem Phosphatrest blockiert ist. Wird die intakte Sonde, entweder gebunden an cDNA oder noch ungebunden bei einer spezifischen Wellenlänge (488nm) zur Fluoreszenz angeregt, so wird die Fluoreszenz des Reporter - Farbstoffes aufgrund der räumlichen Nähe zum Quencher - Farbstoff unterdrückt, was einem Fluoreszenz - Energietransfer entspricht.

Trifft die AmpliTaq - DNA - Polymerase während der PCR - Zyklen auf eine am Matrizenstrang angelagerte Sonde, so beginnt diese, die Sonde zu verdrängen. Es entsteht eine Y - förmige Sekundärstruktur. Diese Y - förmige Struktur aktiviert die 5' - 3' - Exonuklease Aktivität der AmpliTaq - DNA - Polymerase. Die Sonde wird hydrolysiert und löst sich vollständig vom Matrizenstrang.

Die räumliche Nähe von Quencher - und Reporter - Farbstoff wird aufgehoben und damit der FET, so dass die Sonde zur Fluoreszenz angeregt wird.

Entsprechend der Akkumulation von PCR - Produkt steigt die Fluoreszenz des Reporter - Farbstoffes mit jedem PCR - Zyklus an. Das dabei gebildete Signal ist streng



sequenzspezifisch, da nicht 100%ig bindende Sondenmoleküle verdrängt werden, noch bevor die Exonukleaseaktivität der AmpliTaq - DNA - Polymerase aktiviert wird.

Gemessen wird die Fluoreszenzänderung Zyklus für Zyklus mit Hilfe des ABI PRISM 7700 Sequenze Detectors (FA. PE Applied Biosystems GmbH, Darmstadt).

Die Quantifizierung der Fluoreszenzemission wird während der PCR für jede Probe gemessen und zu einem gleich bleibenden Referenzfarbstoff, welcher im TaqMan™ Universal Master - Mix (Eurogentec, 4102 Seraing, Belgium) enthalten ist, in Bezug gesetzt. Die gewonnenen Daten werden durch die ABI PRISM™ Sequenze Detection Software verarbeitet und der CT - Wert ermittelt. Dieser Wert gibt diejenige Zyklenzahl an, bei welcher die Fluoreszenzintensität der Probe die des Referenzfarbstoffes übersteigt. Abhängig ist der CT - Wert von der in der Probe enthaltenen, zur Sonde komplementären cDNA - Menge. Im Durchschnitt liegt er bei 25 von 40 Zyklen.

Der relativen Quantifizierung der Fluoreszenzänderung dient eine genspezifische, die Zielsequenz enthaltende Standardkurve. Es werden Verdünnungsreihen von  $10^1$  -  $10^8$  verwendet. Die Steigung der Standardkurve sollte zwischen 3,3 und 3,7 liegen und mindestens 5 Standardpunkte beinhalten.

### **2.2.8 Sonden - Design**

Zur Entwicklung einer möglichst optimalen, genspezifischen Sondensequenz sollten folgende Dinge berücksichtigt werden.

Der Quencher - Farbstoff sollte immer am 3' - Ende der Sondensequenz sitzen, da so gewährleistet wird, dass der erste endonukleolytische Schnitt auch wirklich detektiert wird. Ferner sollten sich die Sonden in einer  $Mg^{2+}$  - reichen Umgebung befinden, da so die elektrostatische Anziehung von Quencher - und Reporter - Farbstoff eine Förderung erfährt. So wird die Abstoßung der negativen Phosphatreste des Moleküls verhindert und dadurch eine Auffaltung der Sonde.

Am 5' - Ende der Sonde sollte sich kein G befinden, da es auch nach Sondenhydrolyse noch in der Lage ist, den daran gebundenen Reporter - Farbstoff einem FET zu unterziehen.

Damit es zu einer sicheren Hydrolyse der Sonde durch die 5' - 3' - Exonuklease - Aktivität der AmpliTaq - DNA - Polymerase kommt, muss die Sonde vorher stabil an die Zielsequenz gebunden haben. Um dies zu erreichen, sollte der GC - Gehalt der Sonde etwa 50 % betragen. Mehr als drei Nukleotide eines Typs in Folge sollten vermieden werden, besonders Poly (G) Bereiche. Auf keinen Fall ist eine Komplementarität von Sonde und den beiden PCR - Primern erstrebenswert.

Um eine ausreichende Spezifität zu erlangen, liegt die optimale Sondenlänge zwischen 24 und 30 Nukleotiden. Sonden, welche länger als 35 Nukleotide sind, bergen die Gefahr der übermäßigen Ausbildung von Sekundärstrukturen und wirken somit einer ausreichenden Hybridisierung entgegen.

Prinzipiell kann die Sonde an jeder Stelle innerhalb des entsprechenden Amplicons platziert werden. Es sollte jedoch derjenige Strang gewählt werden, welcher in der Sondensequenz mehr C's als G's enthält.

Abschließend ist darauf zu achten, dass das 5' - Ende der Sonde möglichst nahe am 3' - Ende des PCR - Primers liegt. Sonde und Primer dürfen sich aber nicht überlappen.

### 2.2.9 Auswahl der PCR - Primer

Folgende Essentials sind für die richtige Primerauswahl hilfreich.

Die Primerlänge sollte 18 - 30 Basen nicht überschreiten. 20 – 80 % an G + C - Gehalt sind einzuhalten. Auf Poly(T) - Bereiche und palindromische Sequenzabschnitte ist zu verzichten. Theoretisch sind beliebig lange Amplicons denkbar, bei der praktischen PCR - Umsetzung empfiehlt es sich aber, eine Länge von 75 – 150 Basenpaaren nicht zu überschreiten.

Tab. 2 Übersicht der verwendeten Sonden, Primer und deren Konzentration

Genprodukt	Sonde(Konz.)	Primer(Konz.)(s/as)
AHR	225nm	300/300nm
ER $\alpha$	225nm	50/900nm
ER $\beta$	225nm	300/300nm
IGF - 1	225nm	300/300nm
Wnt 10b	225nm	900/900nm

### 2.2.10 Durchführung einer real Time - PCR

Sind Sonden, Primer und Standardkurve für das gesuchte Gen gemäß der eben erwähnten Richtlinien gefunden und etabliert, kann der TaqMan™ PCR Assay in eine 96 - well - Microtiterplatte (MicroAmp® Optical 96 - well reaction Plate, Fa.Applied Biosystems, Weiterstadt) pipettiert werden.

Der Reagenzienansatz (Master - Mix) besteht aus folgenden Komponenten für ein Reaktionsvolumen von 25 $\mu$ l pro Probengefäß und berechnet sich je nach Konzentration für s/as - Primer und Sonde für jedes Gen.

12,5 $\mu$ l PCR - Reaction - Mix (qPCR™ Core Kit, EUROGENTEC, 4102

Seraing, Belgium)

0,125 $\mu$ l - 2,25 $\mu$ l sense - Primer

0,75 $\mu$ l - 2,25 $\mu$ l anti - sense - Primer

0,5625 $\mu$ l Sonde

5,5625 $\mu$ l - 8,4375 $\mu$ l H<sub>2</sub>O

2 - 5 $\mu$ l cDNA.

Nach dem Befüllen der 96 - well - Microtiterplatte (MicroAmp® Optical 96 - well reaction Plate, Fa.Applied Biosystems, Weiterstadt) wird diese mit optischen Deckeln (MicroAmp®

Optical Caps, Fa Applied Biosystems, Weiterstadt) verschlossen, für 5 min. bei 3000 UpM zentrifugiert und danach zur Analyse in das ABI PRISM™ 7700 Sequenze Detection System gegeben.

### 2.2.11 ABI PRISM™ 7700 Sequenze Detection System

Hinter dem ABI PRISM™ Sequenze Detection System (7700 SDS, Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verbirgt sich ein Thermocycler mit eingebautem Argon - Laser, gekoppelt an einen Power Macintosh G3. Diese Apparatur entspricht der verwendeten real Time - PCR - Maschine. Die 96 - well - Microtiterplatte (MicroAmp® Optical 96 - well reaction Plate, Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt), bestückt mit den jeweiligen Proben und den Reagenzien findet Platz im ABI PRISM™ Sequenze Detection System (7700 SDS, Fa. PE Applied Biosystems, Weiterstadt). Dort durchlaufen die Proben folgenden Zyklus:

- |    |         |      |  |
|----|---------|------|--|
| 1. | 2 min   | 50°C | Aktivierung der Uracil - DNA Glyk osylase  |
| 2. | 10 min  | 95°C | irreversible Inaktivierung der Ura cil - DNA Glykosylase und Aktivierung der AmpliTaq - DNA - Polymerase |
| 3. | 15 sec. | 95°C | Denaturierung der DNA Stränge  |
| 4. | 1 min   | 60°C | Amplifikation.   |

Schritt 1 und 2 werden einmalig zu Beginn des „PCR - Runs“ angewendet; Schritt 3 und 4 werden 40 - mal unmittelbar hintereinander wiederholt.

Nach jedem Zyklus werden die einzelnen Probengefäße durch einen Argon - Laser, der sich über der Microtiterplatte befindet, zur Fluoreszenz angeregt. Dasselbe optische System misst die von den Proben ausgehende Fluoreszenzemission. Diese Werte werden mit der Standardkurve und dem Referenzfarbstoff des Master - Mix in Bezug gesetzt.

### 2.2.12 Serumdiagnostik

Um verschiedene Hormonkonzentrationen zu bestimmen, wurde Dekapitationsblut verwendet. Leptin -, Insulin - und IGF - 1 - Spiegel wies man mit Hilfe handelsüblicher Radioimmunoassays nach (Rat Leptin RIA Kit, Cat.# RL - 83K, Linco Research, St. Charles, Missouri 63304 USA, Rat Insulin RIA Kit, Cat. RIA - 1253, DRG Instruments GmbH). Alle im Serum gemessenen Hormonwerte bezogen sich auf die Kontrollgruppe, da zu Versuchsbeginn keine ausreichenden Blutmengen zu Verfügung standen.

Einem Radioimmunoassay liegt folgendes Versuchsprinzip zugrunde:

Definierten Mengen an markiertem Antigen (=J<sup>125</sup> - markiertes Leptin/Insulin/IGF - 1) und im Überschuss vorhandenen, unmarkiertem Probenantigen wird eine geringere Menge an Antikörpern gegenübergestellt, so dass die Antigenbindungskapazität am Antikörper

begrenzt ist. Beide Antigene (markiert und unmarkiert) konkurrieren jetzt um die begrenzte Zahl der Bindungsstellen. Nach einer gewissen Zeit werden die Antigen - Antikörper - Komplexe durch chemische Ausfällung von den freien Antigenen getrennt und die Aktivität des  $J^{125}$  - markierten Leptin/Insulin/IGF - 1 mit einer Gamma - Kamera bestimmt. Die Menge des  $J^{125}$  - markierten Hormons, welches an den Antikörper gebunden ist, ist umgekehrt proportional zur Hormonkonzentration der Probe. Die genaue Hormonkonzentration lässt sich durch die Erstellung einer aus bekannten Hormonmengen definierten Standardkurve festlegen. Sie zeigt einen sigmoiden Verlauf (counts per minute vs. Logarithmus der Hormonkonzentration).

Genauere Pipettieranleitungen und Inkubationsschritte sind dem jeweiligen RIA - Kit zu entnehmen und im methodischen Anhang näher erläutert. Die Hormonbestimmung führte aufgrund des Umgangs mit radioaktiv markierten Arbeitsstoffen eine speziell ausgebildete medizinisch - technische Assistentin der Abteilung durch.

Der Glukosebestimmung im Dekapitationsblut lag ein anderes Testprinzip zugrunde. Sie erfolgte mit dem Testkit „Gluko - quant“ (Firma Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Best.-Nr.: 11447513) im „Hitachi“ (Boehringer Mannheim, 902 Automatic Analyzer).

In diesem vollautomatischen, computergesteuerten Analyzer, der für die klinische Chemie konzipiert wurde, führte man die Messung durch. Die Grundlage hierfür bietet ein enzymatischer in - vitro - Test zur quantitativen Bestimmung von Glukose im Blutserum, basierend auf der Hexokinase - Methode. Glukose wurde hierbei durch ATP und Hexokinase zu Glukose - 6 - Phosphat phosphoryliert. Im Anschluss oxidierte Glukose - 6 - Phosphat in Gegenwart von NADP durch Glukose - 6 - Phosphat - Dehydrogenase zu Glukonat - 6 - Phosphat. Dabei fand keine Oxidierung anderer Kohlenhydrate statt. Die direkte Proportionalität der NADPH - Zunahme und die im Gegenzug abnehmende Glukosekonzentration wurde photometrisch gemessen.

### **2.3 Prinzip der qCT - Messmethode**

Das angewendete Verfahren der quantitativen Computertomographie (qCT) ist vor allem zur objektiven Messung von Knochendichten bei Kleintieren entwickelt worden (Helterbrand et al. 1997). Dieses Gerät kann aber auch über die Dichtemessung andere Gewebe erfassen und quantifizieren. Eine farbliche Kodierung veranschaulicht die Dichteunterschiede.

Zur quantitativen Bestimmung des Fettgewebes wurden Erfahrungen aus der Knochendichtemessung genutzt.

Mit Hilfe des quantitativen Computertomographen STRATEC XCT 4.50 (Stratec Inc., Pforzheim, Germany) und einer gerätespezifischen Software (XCT 5.40, Stratec Inc., Pforzheim, Germany) war es möglich, das paratibiale sowie das mesenteriale Fettpolster der SD - Ratte zu erfassen.

Hierzu narkotisierte man die Tiere vor Beginn und kurz vor Beendigung des Versuches mit einer Isofluran - Inhalationsnarkose. Im Anschluss fixierte man ihren linken Hinterlauf im Gerät. Mit der Durchführung einer Probemessung konnte die Metaphyse der Tibia lokalisiert werden. Nachdem sie erfasst war, wurde sie mit einer Referenzlinie markiert. Mit der Referenzlinie als Ausgangspunkt wurden drei Messungen im Abstand von 0,1 mm nach distal durchgeführt. Auf diese Weise war es möglich, die Fläche (in mm<sup>2</sup>) des paratibialen Fettpolsters stets auf gleicher Höhe zu bestimmen. Um das Ausmaß des mesenterialen Fettpolsters zu ermitteln, wurde die Referenzlinie auf den 4. Lendenwirbelkörper gelegt. Von dieser Ausgangsposition wurde im Abstand von 1,00 mm je eine Messung nach caudal und cranial durchgeführt. Anhand der gewonnenen Daten berechnete die mitgelieferte Software die entsprechenden Fettgewebsflächen.

Um Veränderungen der Fettmasse zu verifizieren, wurden die beschriebenen Messungen vor Ovariectomie und vor Versuchsende in jeder Behandlungsgruppe durchgeführt und statistisch ausgewertet.

## **2.4 Statistische Auswertung**

In der Auswertung wurde mit prozentrelativierten - Werten gearbeitet, um eventuelle labortechnisch bedingte Schwankungen und die damit verbundene Streuung der Ergebnisse zu verhindern.

Dies wurde erreicht, indem man die Mittelwerte der Kontrolltiere gleich 100% setzte und jeder einzelne Wert in Relation zu diesem 100% - Wert berechnet wurde. So können prozentrelativierte Mittelwerte und die Standardfehler der Mittelwerte erhoben werden. Die Absolutdaten (= Rohdaten - Means) der PCR - Daten haben somit keine direkte Bedeutung für die statistische Auswertung. Sie liefern nur die Grundlage.

Die prozentrelativierten Ergebnisse für die Statistik wurden mit dem Computerprogramm EXCEL (Microsoft Windows XP - Paket) berechnet und dann zur Erstellung der Graphen und zur Berechnung der Signifikanz (Signifikanzniveau auf  $P < 0,05$  festgelegt) in das Programm PRISM (GraphPad Software, Inc. San Diego, California, USA) eingefügt.

Durch die Anwendung des non parametric T - Test nach Dunnett erfolgte die statistische Auswertung.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 In - vitro - Versuch

In Tabelle 3 sind Radiorezeptordaten dargestellt.

Tab. 3 Um 50% des radioaktiv markierten E2 ( $ED_{50}$ ) vom humanen  $ER\alpha$  bzw.  $ER\beta$  zu verdrängen, wurden folgende Konzentrationen an Testsubstanz verwendet:

	<b><math>ER\alpha</math></b>	<b><math>ER\beta</math></b>
<b>E2</b>	11,24 nM	1,96 nM
<b>DBP</b>	>100 $\mu$ M	8,9 $\mu$ M
<b>BP2</b>	9,49 $\mu$ M	11,10 $\mu$ M
<b>BPA</b>	45,9 $\mu$ M	0,07 $\mu$ M
<b>LIN</b>	>100 $\mu$ M	>100 $\mu$ M
<b>PROC</b>	>100 $\mu$ M	>100 $\mu$ M

An radioaktiv markiertes E2 banden sowohl rekombinantes  $ER\alpha$  - als auch  $ER\beta$  - Protein. Dieses konnte wiederum von verschiedenen Mengen des unmarkierten E2 verdrängt werden. Die so entstandene Standardkurve ließ die Konzentration berechnen, bei der 50% des markierten  $J^{125}$  - E2 verdrängt wurde. Das war der  $ED_{50}$  - Wert und ist in Tabelle 3 für die verwendeten Testsubstanzen aufgeführt.

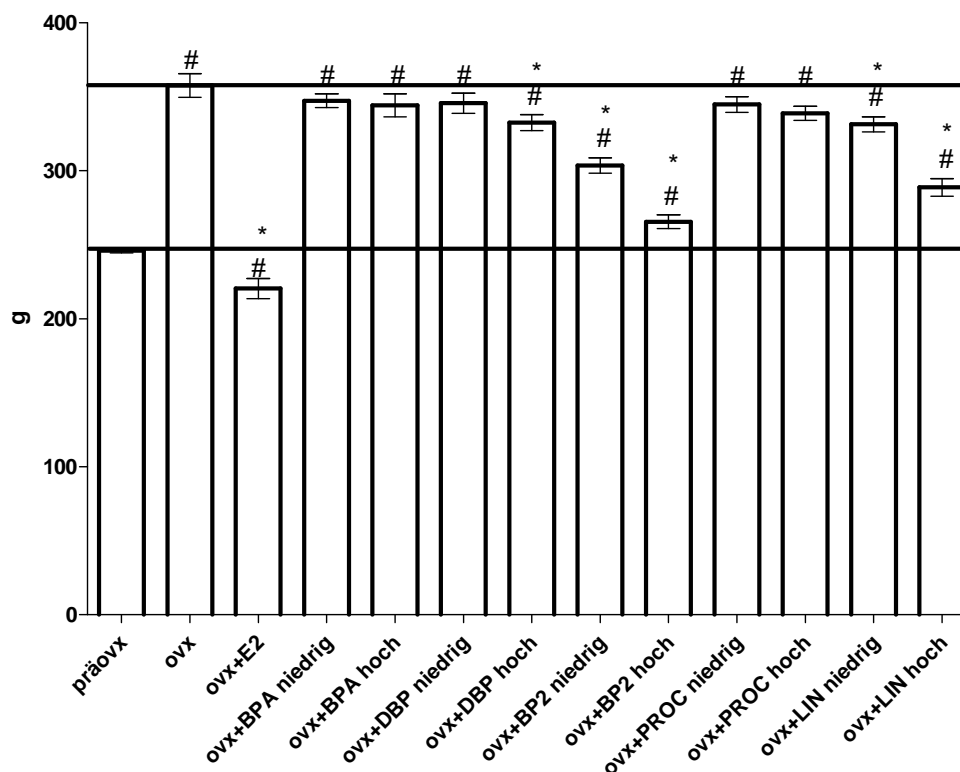
E2 band, ebenso wie BPA und DBP, mit einer wesentlich höheren Affinität an  $ER\beta$  als an  $ER\alpha$ . DPB ging keine Bindung mit  $ER\alpha$  ein, während BP2 mit annähernd gleicher  $ED_{50}$  beide Östrogenrezeptoren besetzte. Die Antiandrogene LIN und PROC koppelten weder an den  $ER\alpha$  noch an  $ER\beta$  an.

## 3.2 In - vivo - Versuche

### 3.2.1 Futteraufnahme

Die Körpergewichte der einzelnen Tiergruppen nach drei monatiger Testsubstanzaufnahme zeigt Abbildung 2.

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Körpergewichte



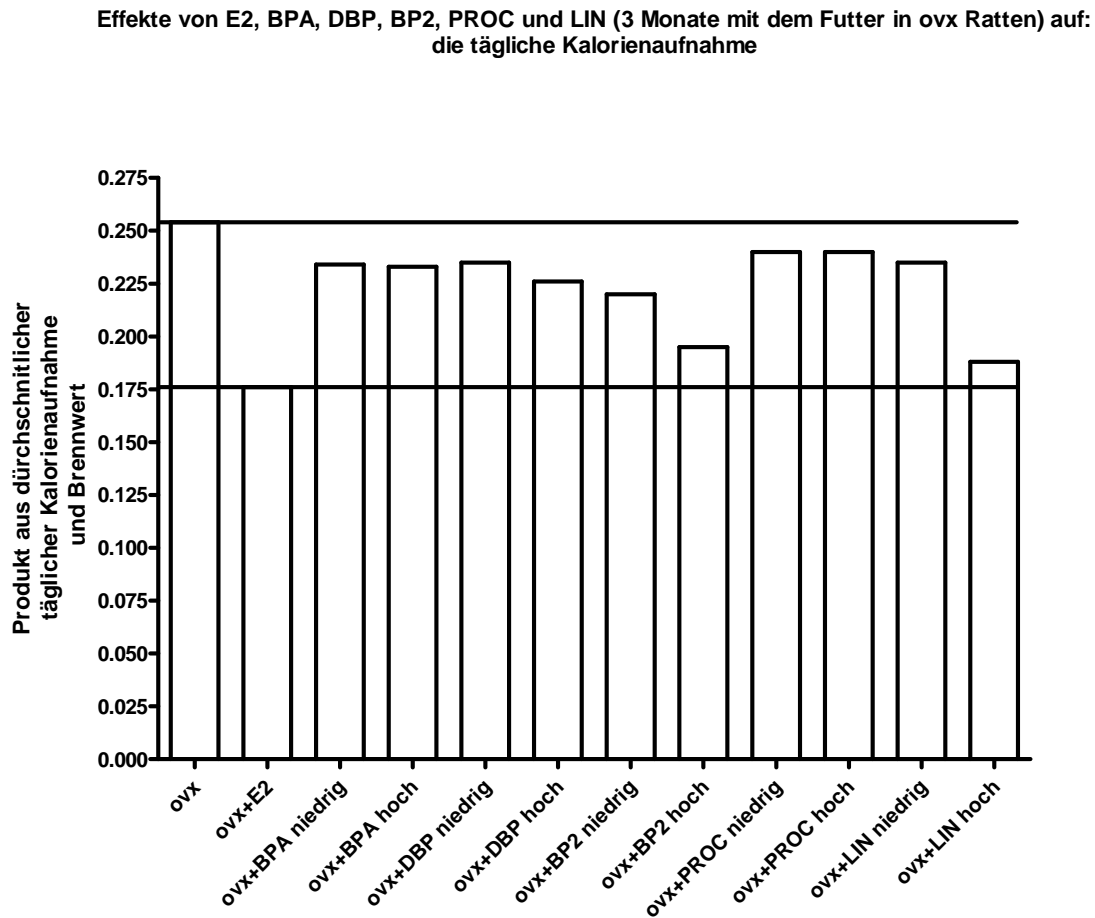
**Abb. 2** Die Körpergewichte der ovx Kontrolltiere waren signifikant höher als die der E2 - behandelten Tiere. Im Vergleich zu den Kontrolltieren reduzierten BP2 und LIN das Körpergewicht signifikant in hoher und niedriger Dosis, DBP nur in hoher. Statistisch nicht signifikant waren die geringfügigen Gewichtsverminderungen unter BPA N & H und PROC N & H sowie DBP N. \*P<0,05 versus ovx, # P<0,05 versus präovx.

Die mit E2 -, BP2 - N - & H -, LIN - N - & H - und DBP - H - behandelten Tiere waren nach Ovariectomie signifikant leichter als die Kontrollgruppe. Keine signifikanten Gewichtsunterschiede traten bei BPA N & H, PROC N & H und bei DBP N auf. Die signifikant geringere Gewichtszunahme der eben genannten Futtergruppen ist durch eine verminderte Nahrungsaufnahme zu erklären (vgl. Tab. 1, Seite 27).

### 3.2.2 Kalorienaufnahme

0,0122 Millijoule pro Gramm gefressenem sojafreiem Spezialfutter nahmen die Tiere auf. Aus dem Produkt der durchschnittlich aufgenommenen Nahrungsmenge je Versuchstag und der Brennwertangabe ließ sich die täglich aufgenommene Kalorienzahl berechnen.

Am meisten Energie stand demnach den ovariectomierten Kontrolltieren zur Verfügung und am wenigsten der E2 - Behandlungsgruppe (Abb.3)



**Abb. 3** Durchschnittlich nahmen die ovx Kontrolltiere am meisten Kalorien zu sich und die E2 - behandelten am wenigsten. Alle anderen Substanzgruppen lagen dazwischen, wobei die LIN - H - und BP2 - H - Ratten ebenfalls wenig gefressen haben.



### 3.2.3 Das subkutane Fettgewebe (FS)

Die Genexpression von ER $\alpha$  im subkutanen Fettgewebe war durch E2 leicht und durch BP2 H stärker gehemmt (Abb.4). DBP H, BP2 N und PROC dagegen stimulierten sie signifikant. Alle anderen Substanzklassen erhöhten die Genexpression nicht signifikant.

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\alpha$  im subkutanen Fettgewebe

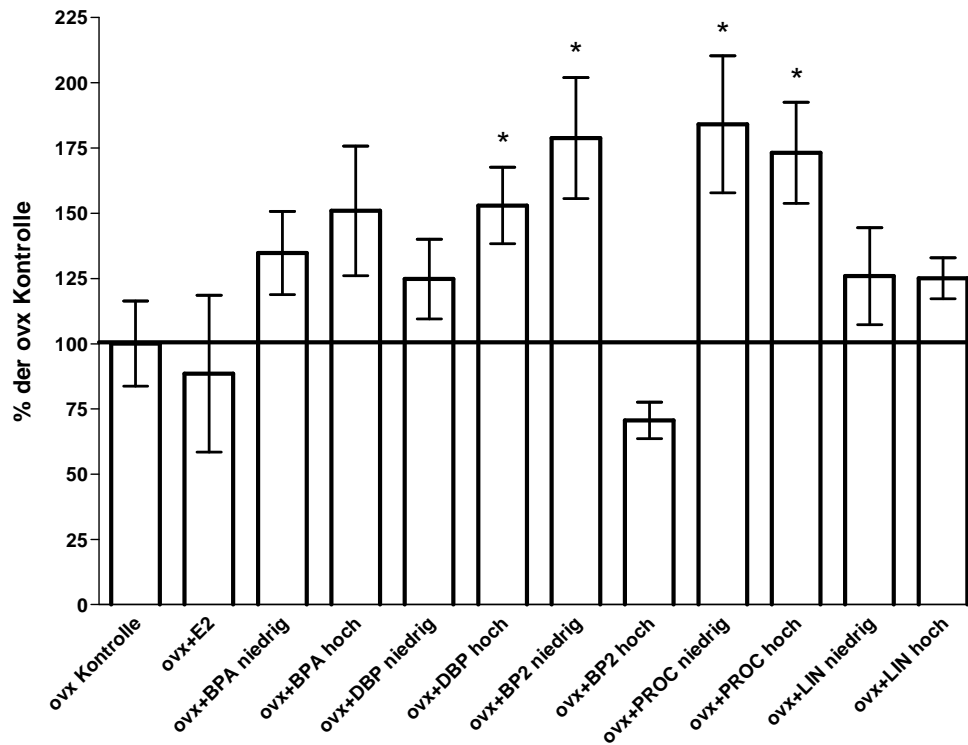
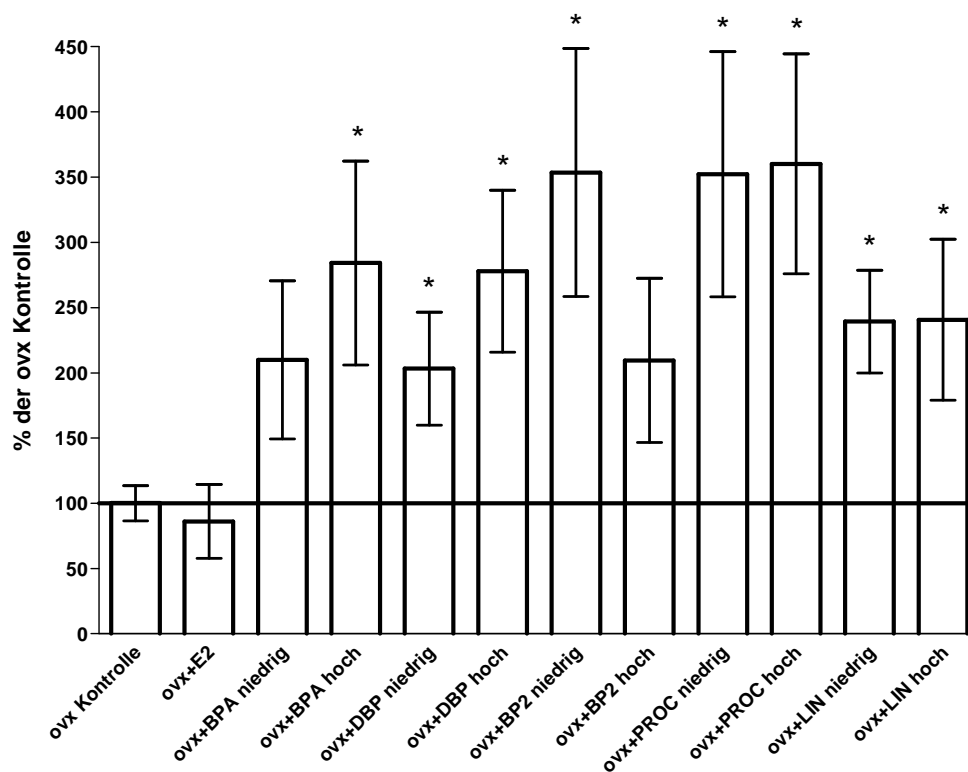


Abb. 4 Das ER $\alpha$  - Transkript war unter E2 und BP2 H erniedrigt. Die übrigen Substanzen stimulierten die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . \*P<0,05 versus ovx.

Stimulierend auf die Transkriptionsmenge des ER $\beta$  wirkten alle untersuchten endokrinen Disruptoren, mit Ausnahme von E2 (Abb.5). Nicht signifikant beeinflussten BPA N und BP2 H die Zunahme dieses Östrogenrezeptors. Am ausgeprägtesten und in ähnlich hohem Umfang regten BP2 N, PROC N & H, weniger stark BPA H, DPB N & H und LIN N & H die signifikante Proliferation dieses Östrogenrezeptors an.

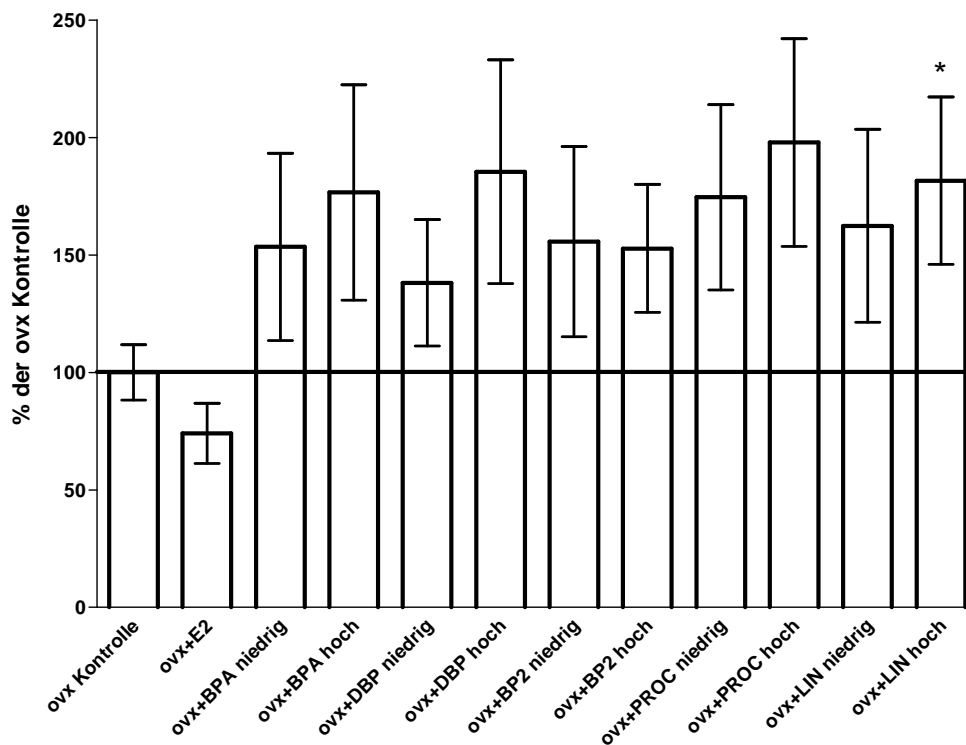
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\beta$  im subkutanen Fettgewebe**



**Abb. 5** E2 verminderte die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\beta$  geringfügig, während alle anderen Substanzklassen dessen Synthese förderten. \*P<0,05 versus ovx.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe stimulierte jedes verwendete Umweltgift die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors dosisabhängig (Abb.6). Das Herbizid Linuron rief in hoher Dosierung eine signifikante Zunahme hervor. Geringfügig inhibierte E2 die Synthese dieses intrazellulär gelegenen Rezeptors.

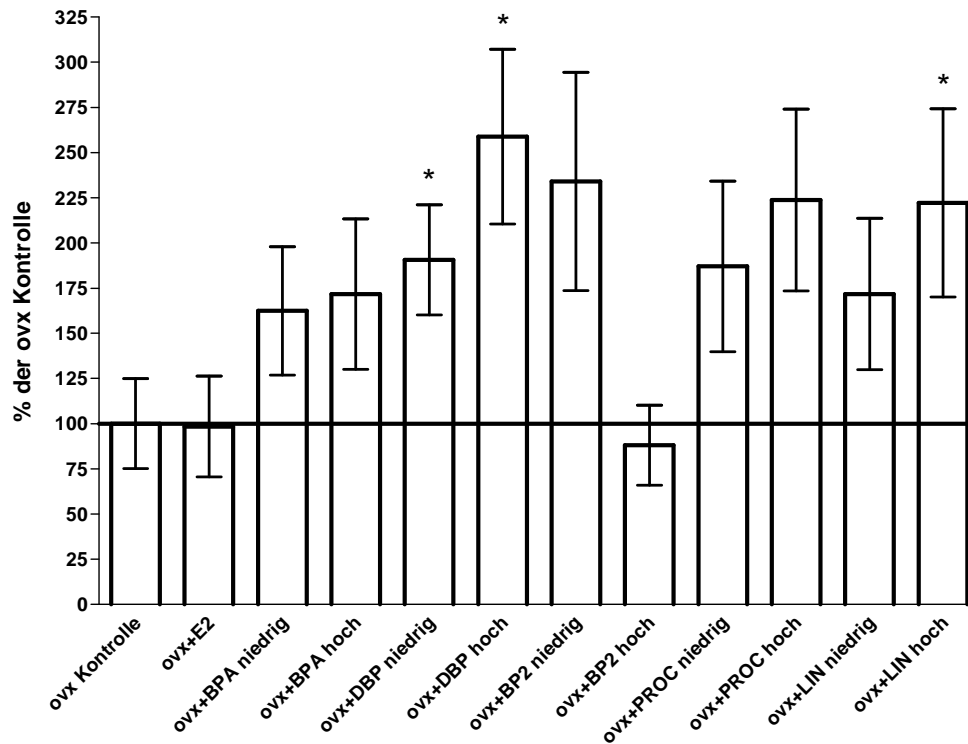
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von AHR im subkutanen Fettgewebe**



**Abb. 6 E2 inhibierte, alle anderen Substanzen förderten die Synthese des Ah - Rezeptors; Linuron in hoher Dosierung sogar signifikant. \*P<0,05 versus ovx.**

Im Vergleich zur Kontrollgruppe rief E2 keinen und BP2 H einen herabgesetzten Effekt auf die Genexpression von IGF - 1 im subkutanen Fettgewebe hervor (Abb.7). Sämtliche verbleibende Substanzklassen förderten sie, DPB N & H und LIN H sogar signifikant.

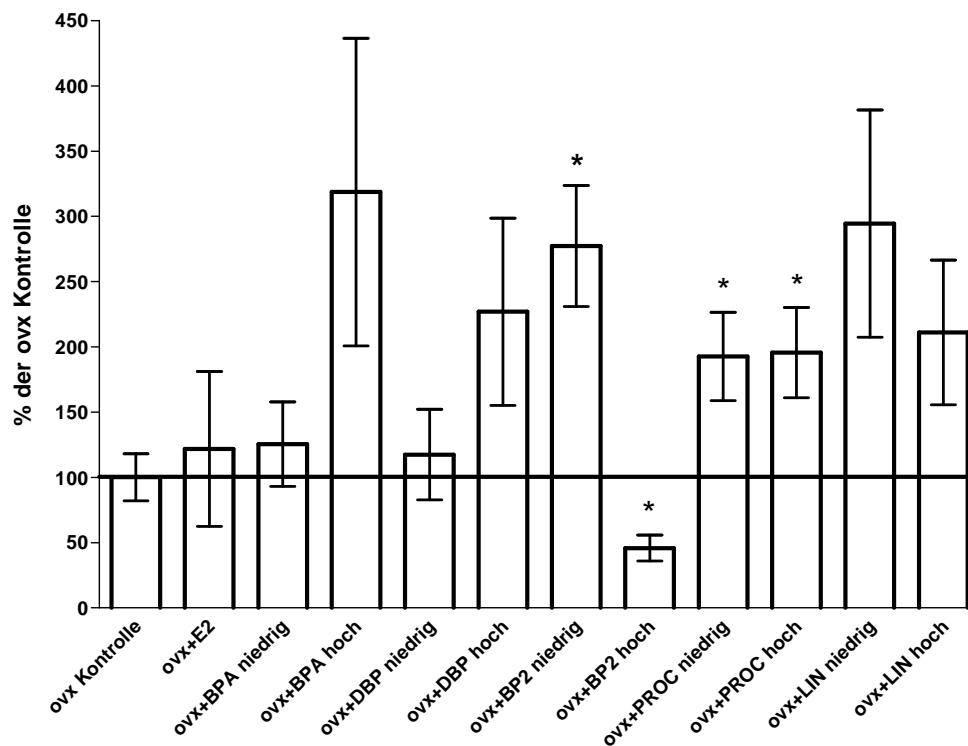
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von IGF-1 im subkutanen Fettgewebe**



**Abb. 7** E2 zeigte keine Wirkung auf die IGF - 1 - Synthese, BP2 H eine verminderte. Signifikant stimulierten DBP N & H und LIN H, während BPA und PROC in beiden, BP2 und LIN in niedriger Dosierung keine signifikante Steigerung der IGF - 1 Transkriptionsrate erreichten. \*P<0,05 versus ovx.

Der UV - Filter BP2 H regulierte die Genexpression des Protoonkogens Wnt 10b signifikant herab, während alle anderen Substanzklassen sie induzierten (Abb.8). Lediglich geringfügig, aber in ähnlicher Intensität, steigerten BPA N, DBP N und E2 die Aktivität. Weitaus stärker beeinflussten BPA H, DBP H, LIN N & H die Synthese des Glykoproteins Wnt 10b; BP2 N, PROC N & H sogar signifikant.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von Wnt 10b im subkutanen Fettgewebe**



**Abb. 8** Allein BP2 H verminderte signifikant die Expression von Wnt 10b. Alle anderen endokrinen Disruptoren steigerten sie; BP2 N sowie PROC N & H signifikant. \*P<0,05 versus ovx.

### 3.2.4 Das mesenteriale Fettgewebe (FM)

Mit Hilfe des qCT konnte das intraperitoneal gelegene, mesenteriale Fettdepot perimetrisch quantifiziert werden. Der Fettspeicher der Kontrolltiere hatte drei Monate nach Ovarektomie signifikant an Größe zugenommen. Unter E2 und BP2 H gelang es den Tieren, das Fettgewebe der gemessenen Region signifikant unter die Ausgangsmasse (präovx) der Kontrollgruppe zu senken. Keine nennenswerte Veränderung der Fettgewebsmasse konnte unter Linuron und Procymidon in jeweils hoher Dosierung registriert werden.

Alle anderen Substanzgruppen steigerten im Vergleich zur präovx Kontrollgruppe ihre Fettmasse signifikant. (Abb.9)

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Mesenteriales Fettgewebe (FM)

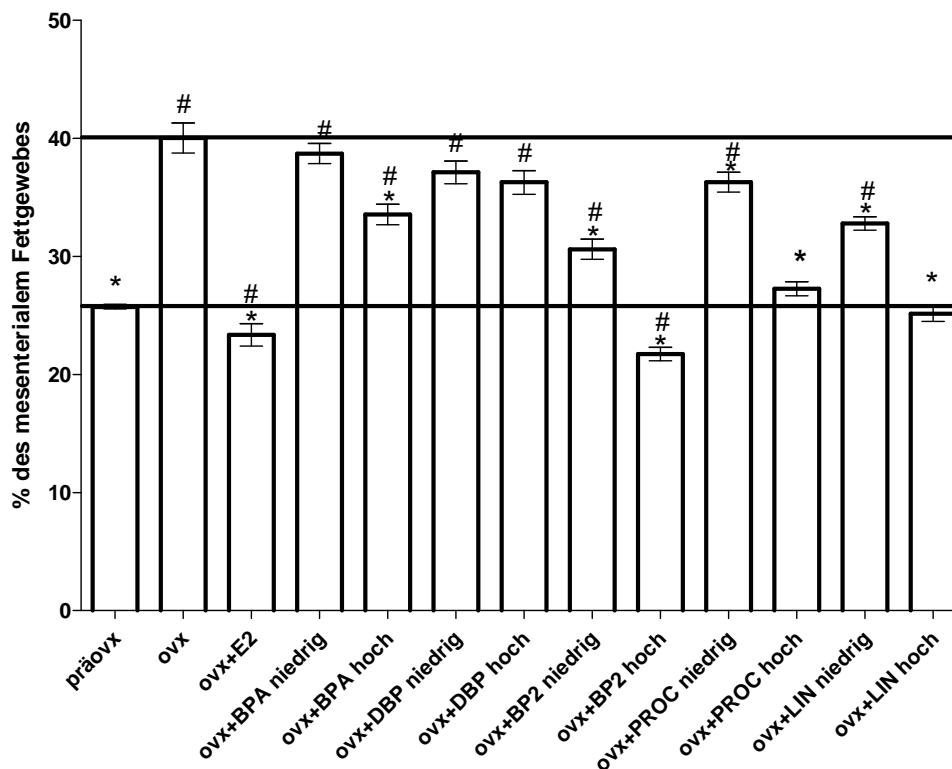
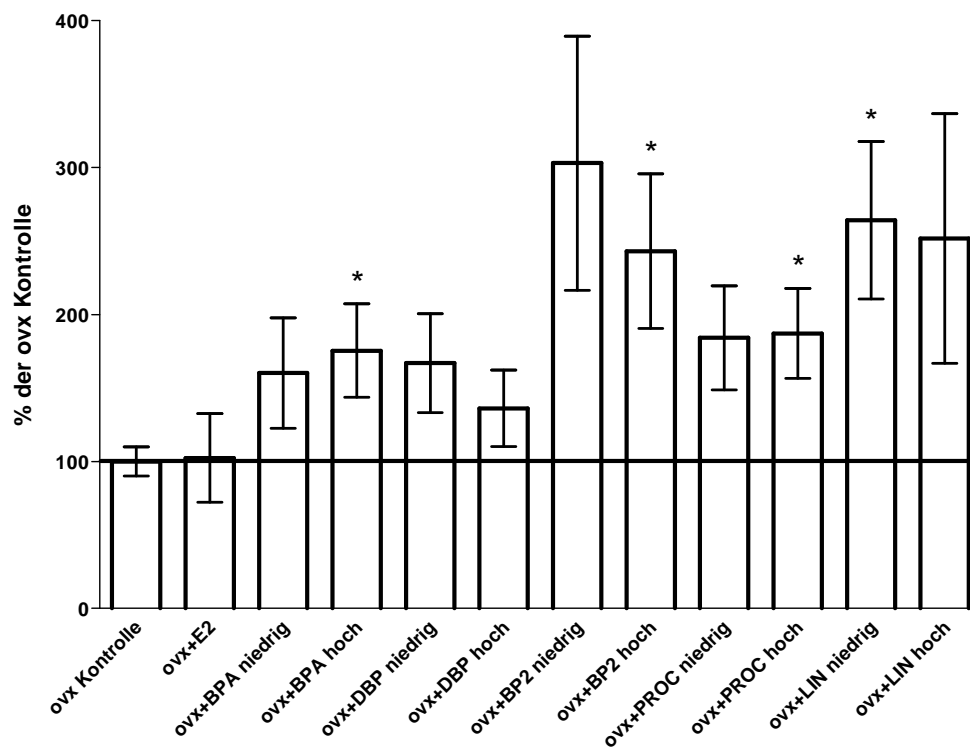


Abb. 9 Die Kontrollgruppe konnte den mesenterialen Fettanteil nach Ovarektomie signifikant steigern. Reduzierenden Einfluss auf dieses Fettgewebe nahmen sowohl die E2 - als auch die BP2 - H - Behandlungsgruppen. Nicht nennenswert veränderte sich der Fettanteil unter PROC H und LIN H. Alle übrigen Substanzklassen stimulierten die Fettgewebsproliferation signifikant. \*P< 0,05 versus ovx; #P< 0,05 versus präovx.

Im mesenterialen Fett beeinflusste E2 die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$  im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht (Abb.10). Stimulierend wirkten die restlichen Chemikalien. Signifikanzen erzielten BPA, BP2, PROC in jeweils hoher Dosierung und LIN in niedriger. BP2 und LIN regten in jeder Dosierung die Synthese dieses Rezeptors mehr an als BPA, DBP und PROC.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\alpha$  im mesenterialen Fettgewebe**



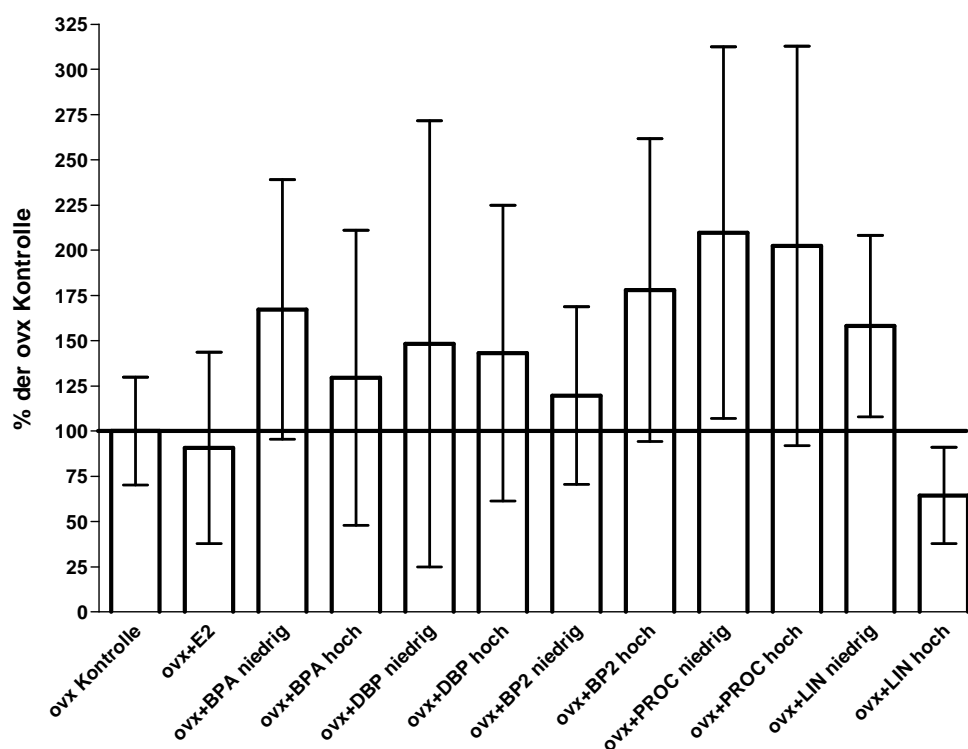
**Abb. 10** Mit Ausnahme von E2 förderten alle Umweltgifte die ER $\alpha$  - Transkriptionsrate in unterschiedlicher Intensität. BPA, BP2 und PROC in hoher und LIN in niedriger Dosierung stimulierten die Genexpression dieses Östrogenrezeptors signifikant. \*P<0,05 versus ovx.

Besonders hohe Standardabweichungen erschwerten die Aussagekraft und die Interpretation der ER $\beta$  - Genexpression im Fettgewebe des Mesenteriums (Abb.11).

Ferner konnten keine Signifikanzen festgestellt werden.

LIN H und E2 hemmten die Synthese des Östrogenrezeptors; BPA H, DBP N & H, BP2 N förderten geringfügig, BPA N, BP2 H, PROC N & H und LIN N induzierten sie in ausgeprägterer Form.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\beta$  im mesenterialen Fettgewebe**

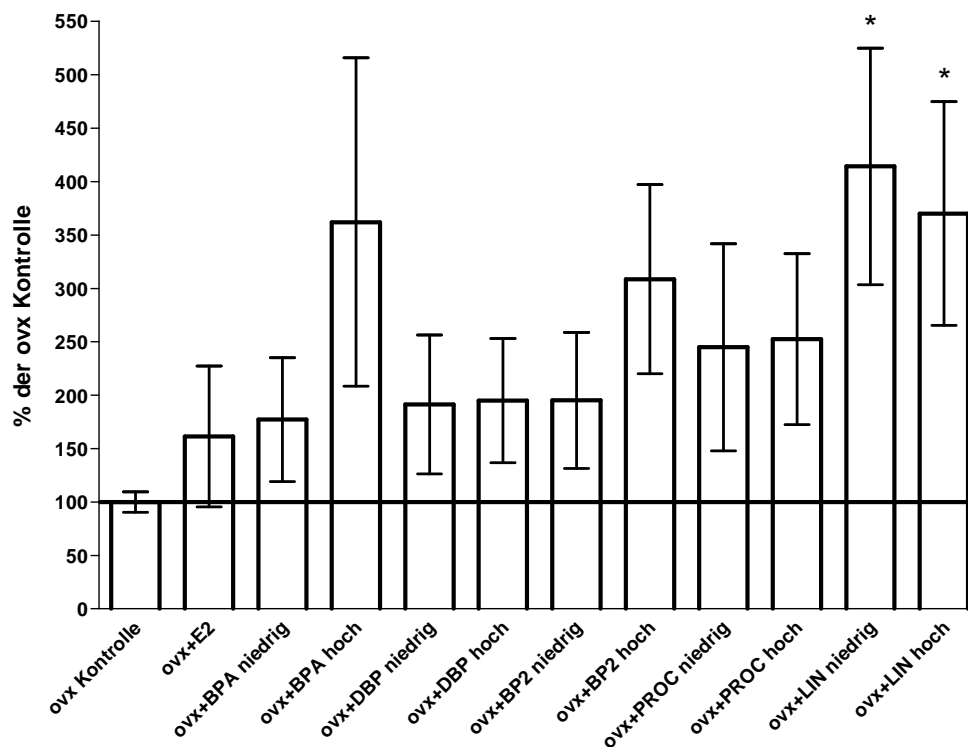


**Abb. 11** Die Quantifizierung der ER $\beta$  - Syntheserate im FM gestaltete sich schwierig. Die statistische Auswertung der PCR - Ergebnisse lieferte hohe Standardabweichungen und zeigte keine Signifikanzen. LIN in hoher Dosis und E2 reduzierten die Rezeptorexpression, die übrigen Substanzen erhöhten sie in unterschiedlicher Weise. \*P<0,05 versus ovx.



Jede verwendete Substanzklasse, interessanterweise auch E2, induzierte die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors, welcher die Verstoffwechslung körperschädlicher Stoffgruppen moduliert (Abb.12). Linuron förderte die Transkription dieses Rezeptors signifikant in beiden Dosierungen. Weitaus geringer stimulierten E2, gefolgt von BPA N, DBP N & H, BP2 N und PROC N & H die Rezeptorsynthese. Größeren Einfluss darauf nahmen BPA H und BP2 H.

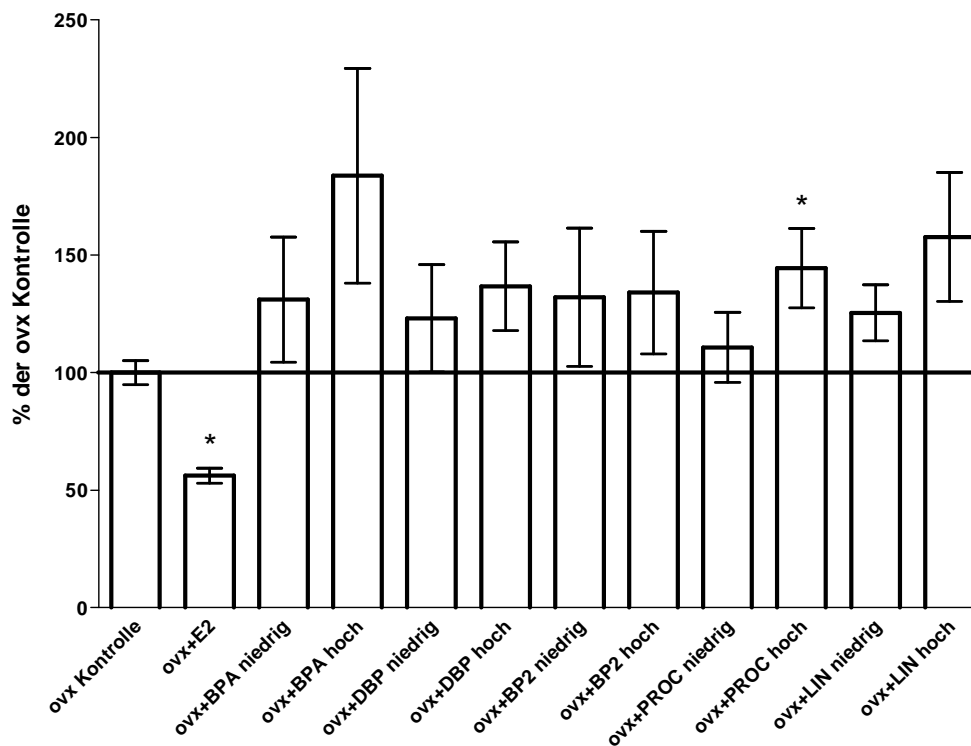
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von AHR im mesenterialen Fettgewebe**



**Abb. 12** Ausnahmslos förderten alle Substanzgruppen die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors. Signifikante Syntheseraten erzielte Linuron in beiden Dosierungen. \*P<0,05 versus ovx.

E2 wirkte signifikant reduzierend, PROC H signifikant stimulierend auf die IGF - 1 - Genexpression im FM (Abb.13). Alle Xenohormone nahmen in beiden Dosierungen induzierenden Einfluss auf die IGF - 1 - Transkriptionsmenge. BPA H hatte auf die Transkriptionsmenge den stärksten und PROC N den schwächsten Effekt. Die verbleibenden Substanzklassen förderten sie in ähnlichem Umfang.

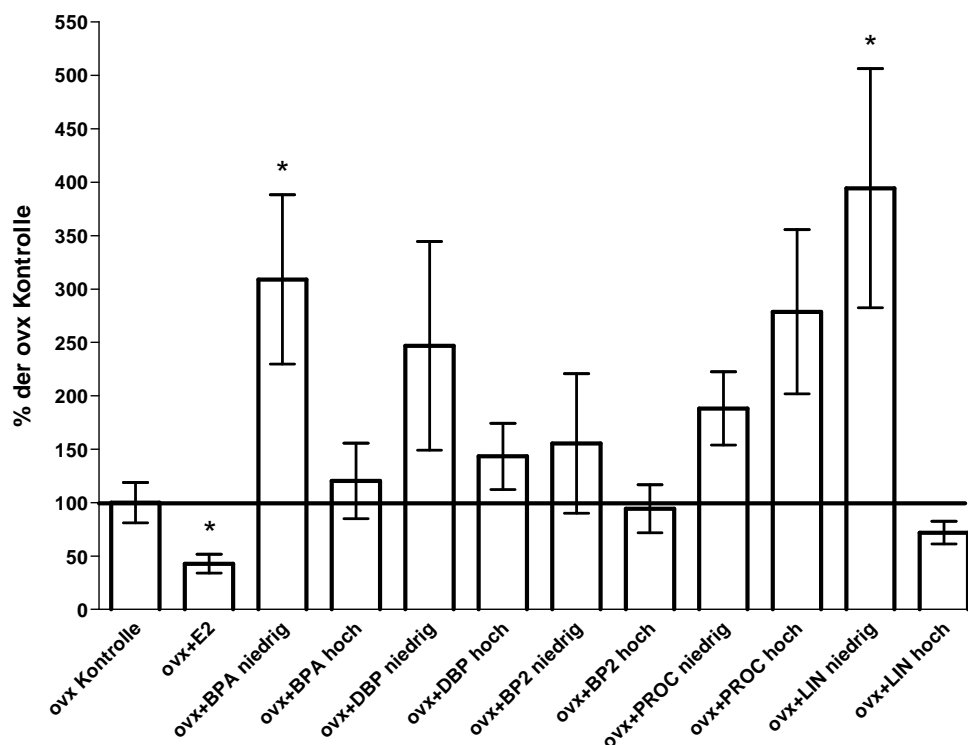
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von IGF-1 im mesenterialen Fettgewebe**



**Abb. 13** Abgesehen von E2 förderten alle verwendeten Umweltgifte die IGF - 1 - Genexpression in ähnlichem Umfang, wobei BPA H die stärkste Wirkung zeigte. Signifikanzen wiesen E2 und PROC H auf. \*P<0,05 versus ovx.

Verschiedene Dosierungen der Umweltgifte riefen z.T. völlig inverse Effekte in der Genexpression des Protoonkogens Wnt 10b im mesenterialen Fettgewebe hervor (Abb.14). BPA, DBP, BP2 und LIN in niedriger Dosis förderten die Wnt - 10b - Transkription, während die hohe Applikationsform diese eher hemmte. Einzig PROC stimulierte die Wnt - 10b - Syntheseleistung stärker in hoher als in niedriger Substanzmenge. Signifikant induzierenden Einfluss nahmen dabei BPA N und LIN N, signifikant reduzierenden E2.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von Wnt 10b im mesenterialen Fettgewebe**



**Abb. 14** Dosisabhängige inverse Effekte zeigten alle Substanzklassen mit Ausnahme des Fungizids Procymidon. Dabei stimulierten die niedrigen Dosierungen die Wnt - 10b - Genexpression in ausgeprägter Form als die hohen. Die Transkriptmenge von BPA N und LIN N bzw. von E2 war signifikant stimuliert bzw. gehemmt. \*P<0,05 versus ovx.

### 3.2.5 Das paratibiale Fettgewebe (FT)

Auch das paratibiale Fettdepot konnte mittels qCT quantifiziert werden. Die Kontrolltiere wiesen einen signifikant größeren Fettanteil drei Monate nach Ovariectomie auf. Ein signifikant geringeres Fettdepot im Vergleich zu den ovariectomierten Tieren bildeten die E2 -, die BP2 - N - & H - und die LIN - H - Ratten aus. Unter allen anderen Substanzen nahmen die Tiere im Versuchsverlauf stark zu (Abb.15).

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Paratibiales Fettdepot (FT)

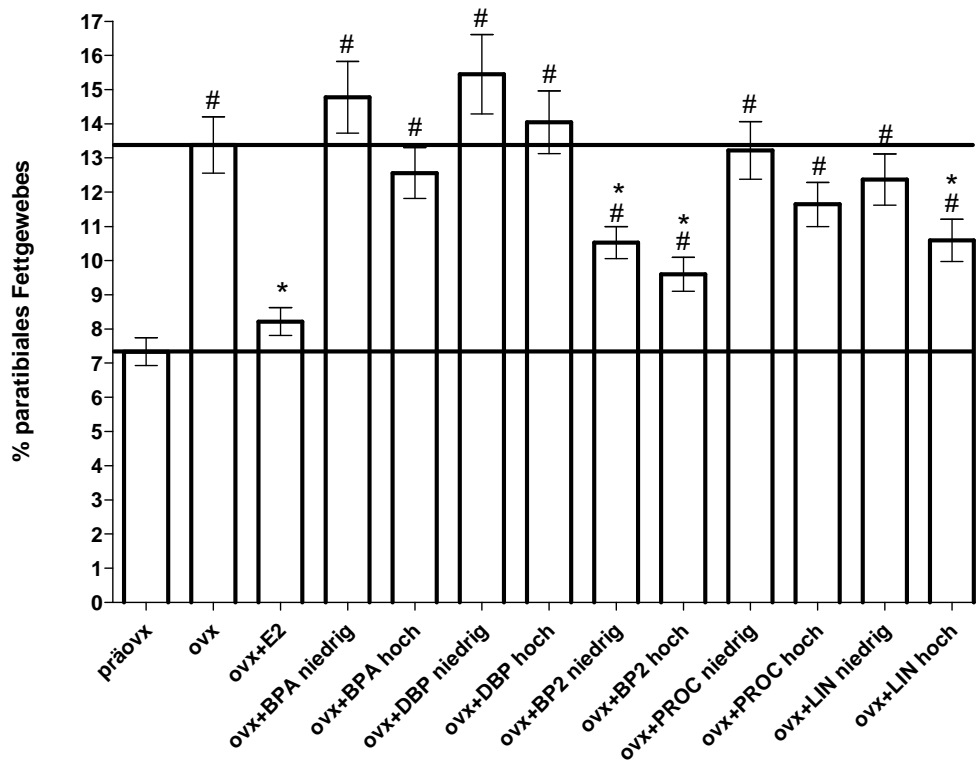
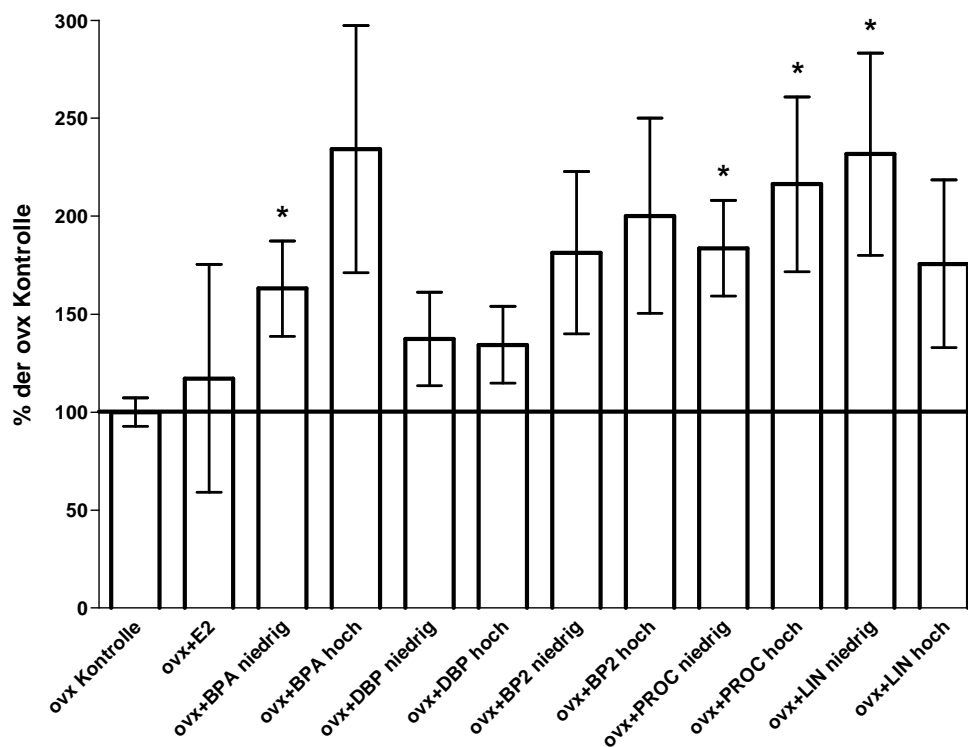


Abb. 15 Auf Höhe der tibialen Metaphyse war die Größe des paratibialen Fettdepots drei Monate nach Ovariectomie signifikant größer als zu Versuchsbeginn. Unter der Behandlung mit E2, BP2 N & H und LIN H konnte die Fettzunahme im Vergleich zu den ovx Tieren signifikant vermindert werden. Alle anderen Substanzgruppen vermehrten ihr paratibiales Fettpolster enorm. \*P< 0,05 versus ovx; #P< 0,05 versus präovx.

Im Gegensatz zum Fettgewebe des Mesenteriums und des subkutanen Fettgewebes stimulierten alle verwendeten Substanzklassen die Genexpression des ER $\alpha$  im paratibialen Fettgewebe (Abb.16). Sowohl steigerten BPA und LIN jeweils in niedriger als auch das Fungizid PROC in beiden Dosierungen die Synthese dieses Östrogenrezeptors signifikant. Der Plastikweichmacher DBP regte in hoher und niedriger Applikationsdosis die Amplifikation des ER $\alpha$  zu annähernd gleicher Intensität an. E2 verringerte die Expression dieses Rezeptors im Vergleich zu DBP nur geringfügig.

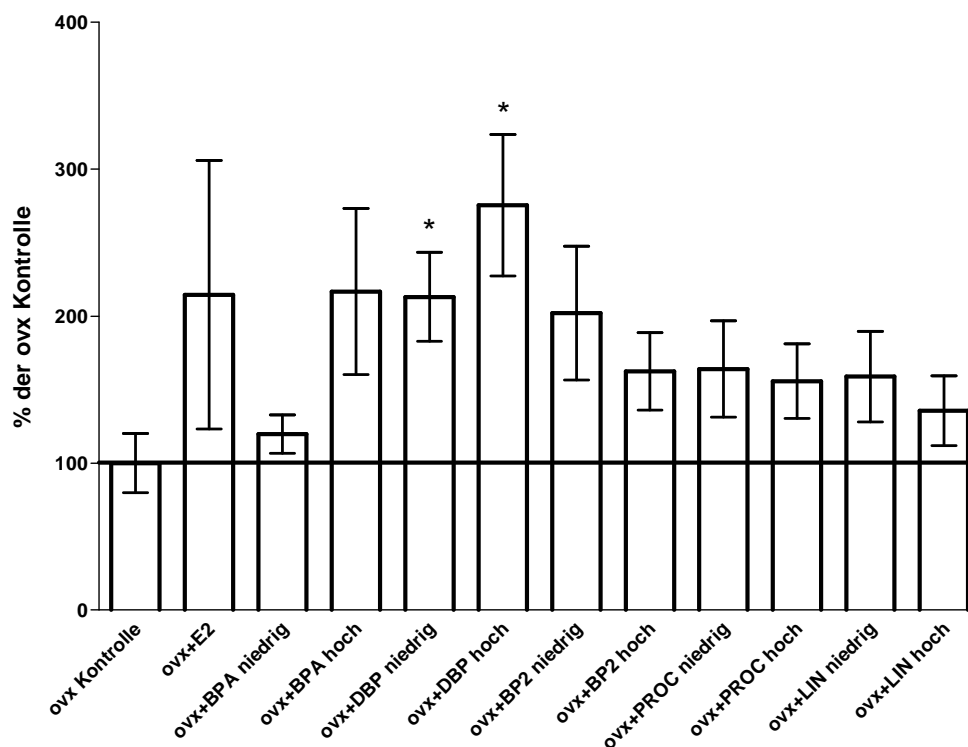
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\alpha$  im paratibialen Fettgewebe**



**Abb. 16** Ausnahmslos steigerten alle verwendeten Substanzen die Genexpression des ER $\alpha$ . Am geringsten war der Einfluss von E2 gefolgt von DBP, welches in beiden Dosierungen mit sehr ähnlicher Intensität wirkte. Jeweils in niedriger Dosierung erzielten BPA und LIN, und in beiden PROC einen signifikanten Anstieg des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . \*P<0,05 versus ovx.

Ebenfalls erhöhten alle im Experiment verwendeten Substanzklassen die Amplifikationsrate des Östrogenrezeptors  $\beta$  im paratibialen Fettgewebe (Abb.17). Geringste Effekte erzielten im Vergleich zur Kontrollgruppe BPA N und LIN H. Keine Unterschiede in der Genexpression dieses Östrogenrezeptors wiesen BP2 in hoher, PROC in beiden und LIN in niedriger Dosierung auf. Ähnlich ausgeprägt war die stimulierende Wirkung von E2, BPA H, BP2 N und DPB N. Beide Applikationsdosen des Plastikweichmachers DBP konnten eine signifikante Stimulation der ER $\beta$  - Transkription hervorrufen.

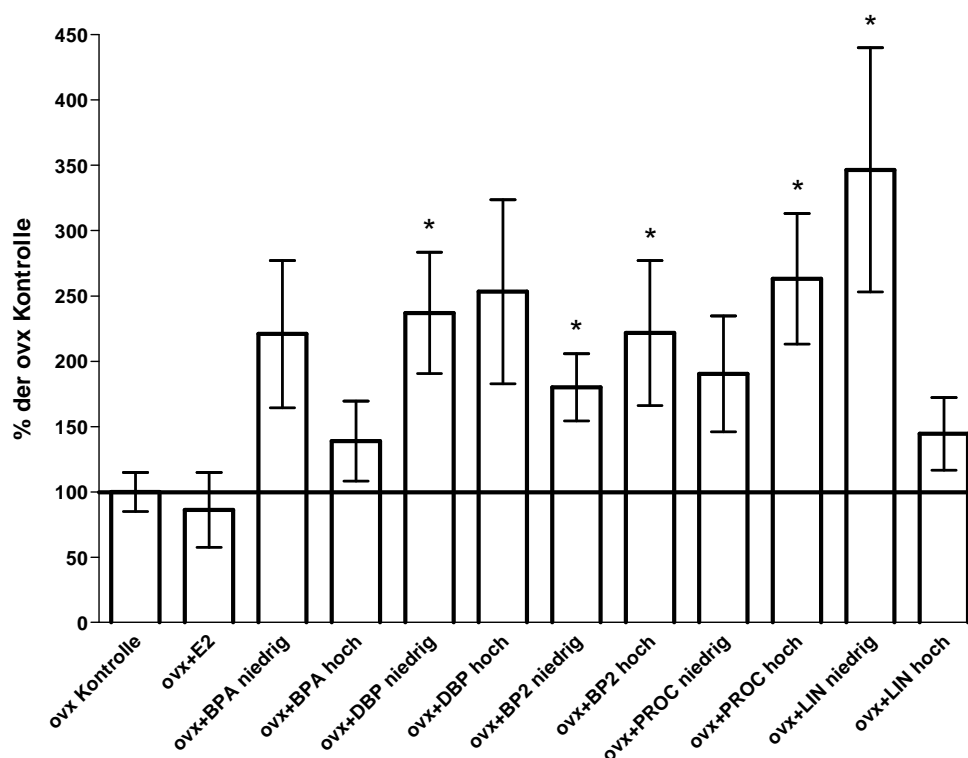
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von ER $\beta$  im paratibialen Fettgewebe**



**Abb. 17** E2 stimulierte in ausgeprägter Form die Genexpression des ER $\beta$ . Ähnlich hohe Effekte erzielten BPA H, DBP N und BP2 N. Sowohl der UV - Filter Benzophenon 2 als auch das Herbizid Linuron erreichten in niedriger Dosierung eine höhere ER $\beta$  - Amplifikationsrate als in hoher. PROC wirkte in beiden Dosierungen gleich auf die Syntheseaktivität des Östrogenrezeptors und BPA N in geringstem Maße. Signifikant stimulierten die dargereichten Applikationsmengen des DBP die Syntheseleistung. \*P<0,05 versus ovx.

Nur E2 senkte die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors (AhR) im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.18). Alle anderen Substanzen förderten diese. Signifikant steigerten DBP und LIN in niedriger, PROC in hoher und BP2 sowohl in niedriger als auch in hoher Dosierung die Synthese des Rezeptors. Niedrige Konzentrationen von BPA und LIN erzielten größere Amplifikationsraten als hohe Futterbeimengungen. Mengenmäßig ausgeprägte, jedoch nicht signifikante Wirkungen hatten der Weichmacher Dibutylphthalat in hoher und das Fungizid Procymidon in niedriger Applikationsform.

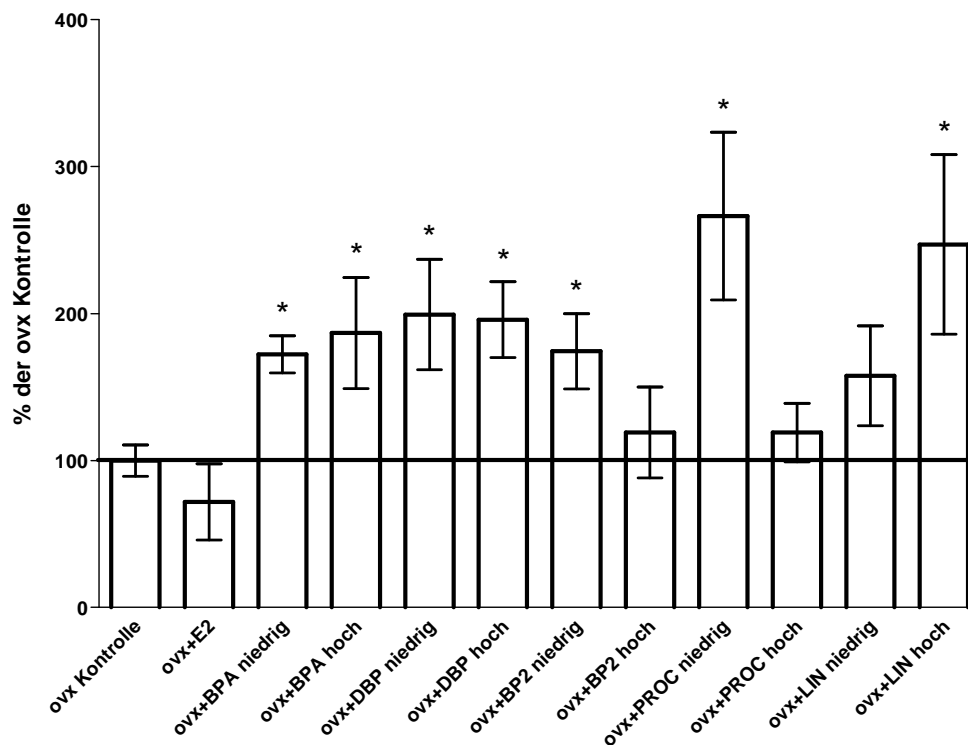
**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von AHR im paratibialen Fettgewebe**



**Abb. 18** Mit Ausnahme von E2 stimulierten alle Testsubstanzen die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors. Signifikant konnte sie durch DBP und LIN N, PROC H und BP2 N & H gesteigert werden. Alle übrigen endokrinen Disruptoren induzierten die Genamplifikation dosisabhängig, wobei BPA und LIN in niedriger Dosierung ausgeprägtere Effekte erzielten als in hoher. DBP H und PROC N förderten die Zunahme der Rezeptorsynthese nicht signifikant. \*P<0,05 versus ovx.

Ebenso wie im Fettgewebe des Mesenteriums verminderte E2 die Genexpression von IGF - 1 im paratibialen Fettdepot im Vergleich zur Kontrollgruppe (Abb.19). Die Bestimmung dieses Gens deckte sehr viele signifikante Syntheseraten auf. In beiden Dosierungen waren BPA und DBP, in niedriger BP2 und PROC und in hoher LIN signifikant erhöht. Nicht signifikant und nur in geringem Umfang steigerte BP2 H, PROC H und LIN N die Amplifikationsrate des IGF - 1 - Gens. Ferner hatten BP2 und PROC in niedriger Applikationsform ausgeprägtere Effekte auf die IGF - 1 - Syntheseleistung als in hoher.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von IGF-1 im paratibialen Fettgewebe**

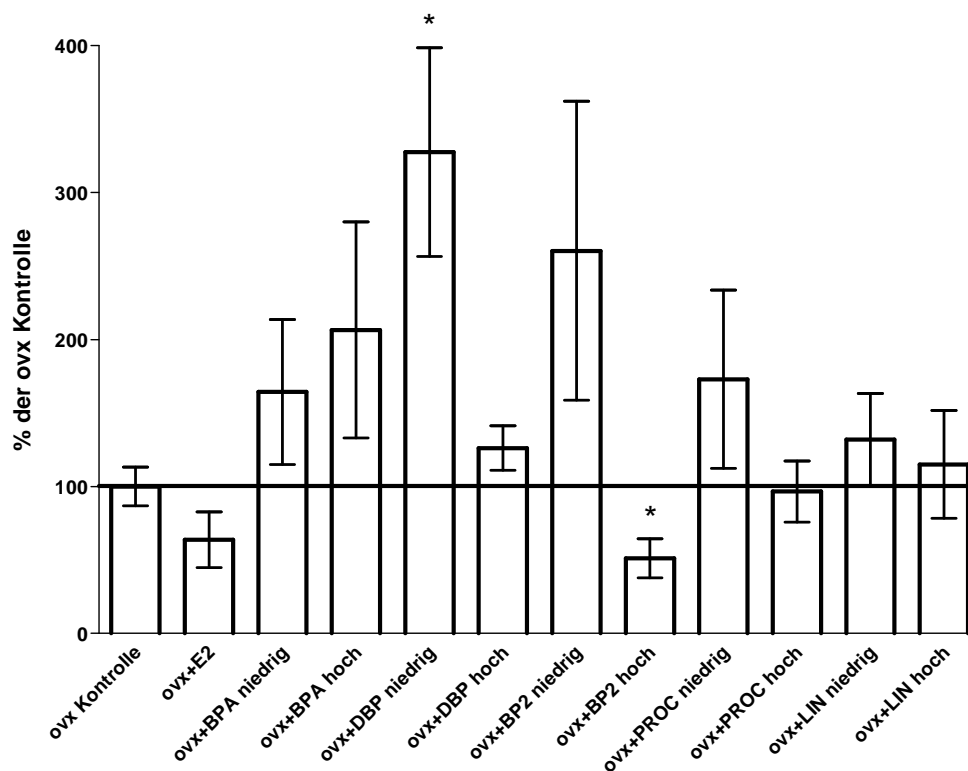


**Abb. 19** Zahlreiche endokrine Disruptoren steigerten die IGF - 1 - Synthese signifikant. Zu ihnen gehörten BPA N & H, DBP N & H, BP2 N, PROC N und LIN H. Nicht signifikante und weitaus geringere Effekte riefen BP2 und PROC in hoher und LIN in niedriger Dosierung hervor. E2 verringerte geringfügig die Transkriptionsrate des IGF - 1. \*P<0,05 versus ovx.



BP2 in hoher Dosierung verminderte die Genexpression des Wnt 10b im paratibialen Fettgewebe signifikant (Abb.20). Auch konnten E2 und PROC H die Synthese dieses Gens in geringerem Maße herabsetzen. Nur mäßig stimulierten DBP H und LIN N & H die Amplifikationsrate im Vergleich zur Kontrollgruppe. In ausgeprägterer Form induzierten BPA N & H, BP2 N und PROC N die Syntheseleistung des Wnt - 10b - Gens. DBP N steigerte sie über das Signifikanzniveau hinaus.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Genexpression von Wnt 10b im paratibialen Fettgewebe**



**Abb. 20** Während unter dem Einfluss von DBP N die Wnt - 10b - Syntheseleistung signifikant gesteigert wurde, hemmte BP2 H diese signifikant. E2 und PROC H verminderten sie ebenfalls. Alle anderen Substanzklassen förderten die Genexpression dieses Gens dosisabhängig, wobei DBP, BP2, PROC und LIN in niedriger Dosierung stärkere Effekte hervorriefen als in hoher. \*P<0,05 versus ovx.

### 3.2.6 Fettgewebsparameter des Serums: Glukose, Insulin, IGF - 1 und Leptin

Weder die Serum - Glukose- noch die Serum - Insulinwerte waren durch die Testsubstanzen signifikant beeinflusst. Im Gegensatz zu den Insulinspiegeln zeigten die Glukosespiegel zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen keine ausgeprägten Konzentrationsschwankungen (Abb.21, Abb.22).

Leptinwerte und Körpergewichte der verschiedenen Substanzklassen korrelierten sehr gut miteinander und wiesen in den gleichen Tiergruppen überwiegend identische Signifikanzen auf.

In keinem unmittelbaren Zusammenhang konnten die Ergebnisse der IGF - 1 - Bestimmung zu den bereits erwähnten Blutparametern gebracht werden.

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Glukose im Serum

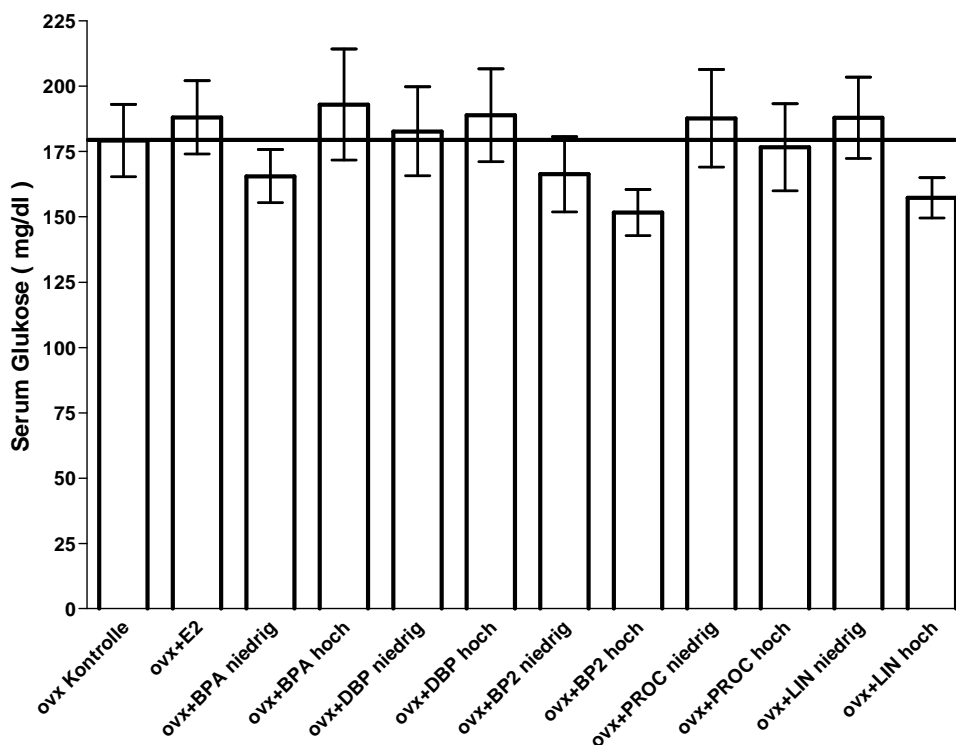
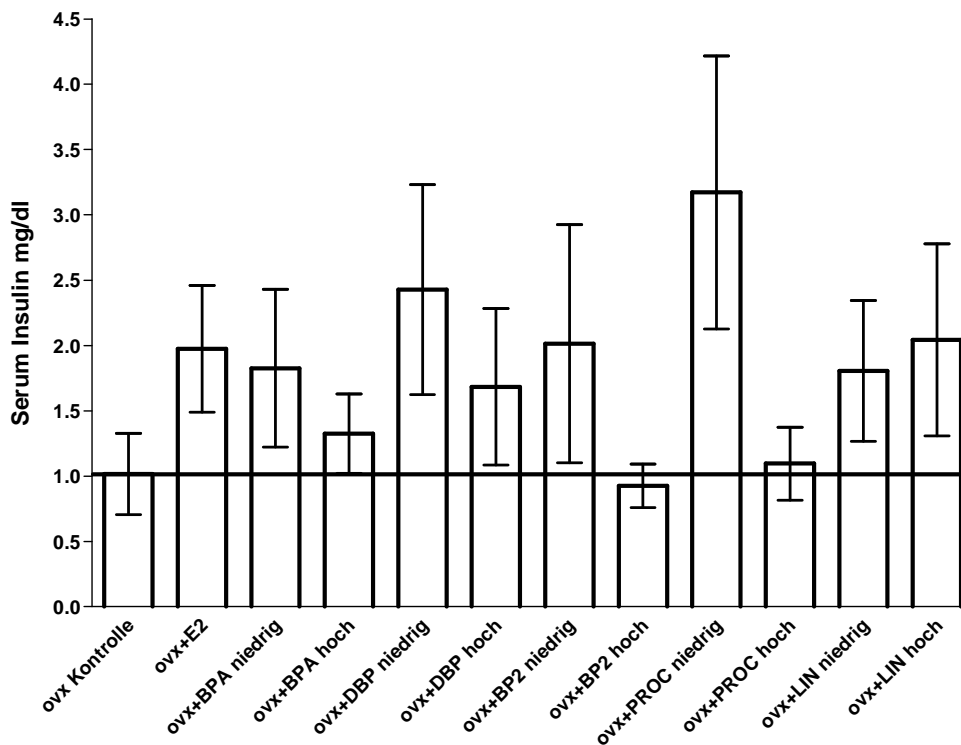


Abb. 21 Keine ausgeprägten bzw. signifikanten Schwankungen der Serum Glukosespiegel sind unter den verschiedenen Substanzklassen und im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar. \*P<0,05 versus ovx.

Wie bereits erwähnt zeigte die Messung der Serum - Insulinspiegel enorme Schwankungen zwischen den verschiedenen Behandlungsgruppen. Signifikante Ausprägungen wurden jedoch nicht erreicht (Abb.22).

Mit Ausnahme des Herbizids Linuron erlangte die niedrige Dosierung der endokrinen Disruptoren stets ausgeprägtere Insulinspiegel als die hohe.

**Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf:  
Insulin im Serum**



**Abb. 22** Zwischen den Substanzgruppen riefen die untersuchten Xenohormone starke Schwankungen der Insulinspiegel hervor. Keine Behandlungsgruppe erreichte jedoch das Signifikanzniveau. \*P<0,05 versus ovx.

Mit Ausnahme von BP2 H und E2 erhöhten alle Testsubstanzen die Serum IGF - 1 - Spiegel. E2 reduzierte sie signifikant. DBP H, PROC H und LIN N & H bewirkten eine signifikante Steigerung des zirkulierenden IGF - 1 (Abb.23).

Effekte von E2,BPA,DBP,BP2,PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf: Serum IGF - 1

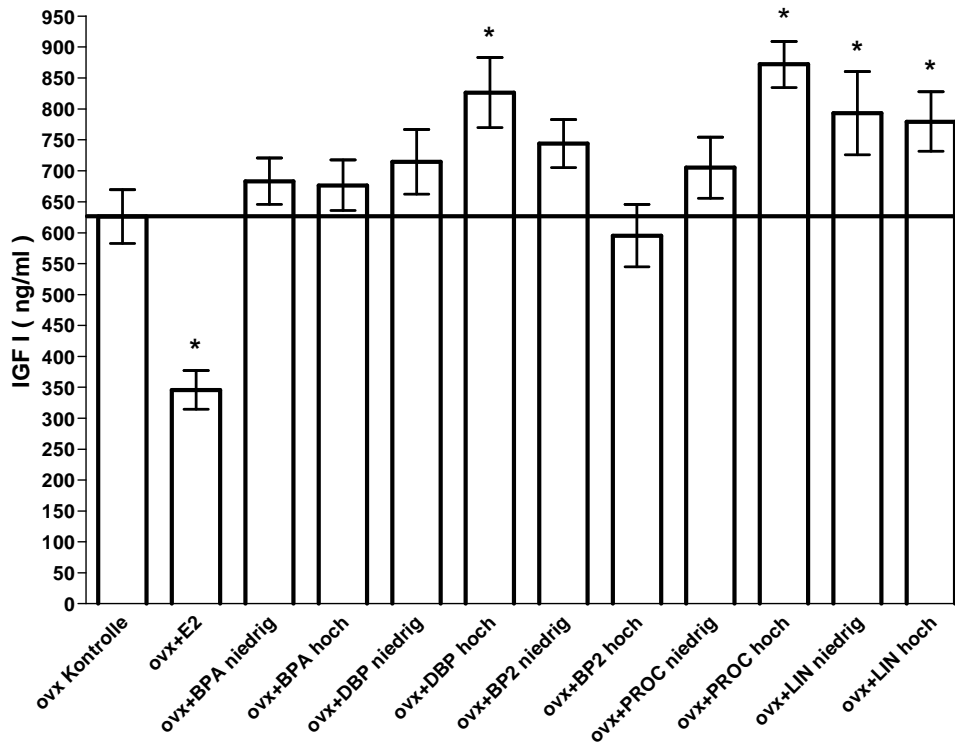


Abb. 23 Die Behandlung mit DBP H, PROC H und LIN N & H stimulierte die Serum IGF - 1 - Spiegel signifikant. Unter E2 waren sie signifikant reduziert. \*P<0,05 versus ovx.

Auch die Serum - Leptinspiegel erreichten in niedriger Dosierung der jeweiligen Substanzgruppe ausgeprägtere Untersuchungsergebnisse als in hoher (Abb.24).

Die Leptinkonzentration war bei den ovariectomierten Kontrolltieren am höchsten und signifikant erniedrigt bei den mit E2 -, BPA - H -, BP2 - N - & H -, PROC - H - und LIN - N - & H - behandelten Tieren.

Effekte von E2, BPA, DBP, BP2, PROC und LIN (3 Monate mit dem Futter in ovx Ratten) auf:  
Leptin im Serum

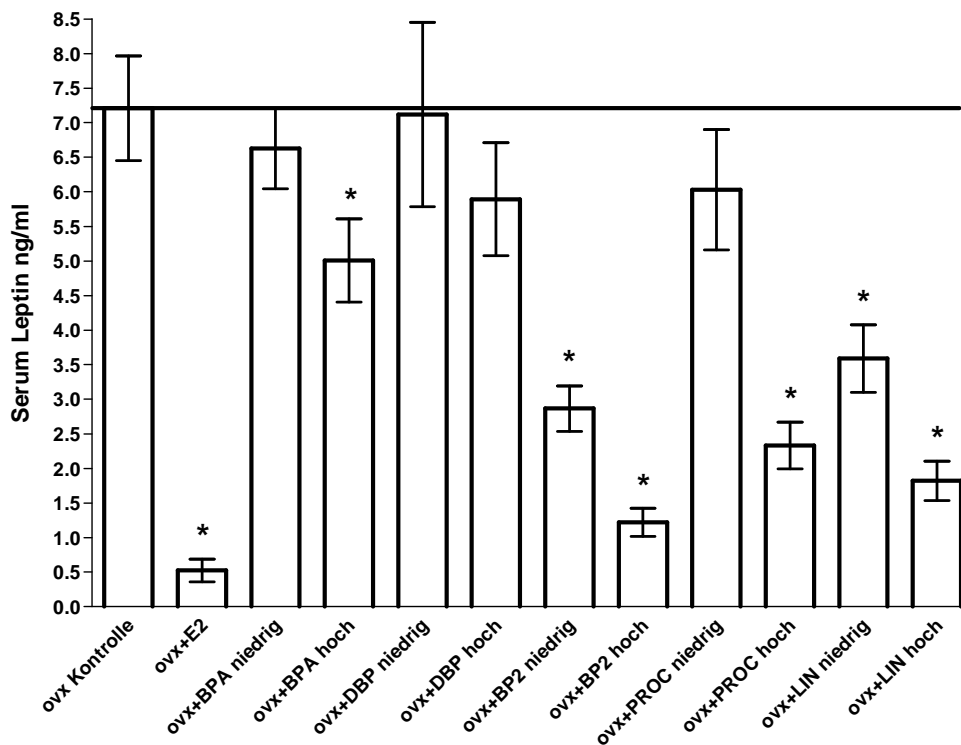


Abb. 24 Die Serum - Leptinspiegel waren unter E2, BPA und PROC in hoher und BP2 und LIN in beiden Dosierungen signifikant reduziert. \*P<0,05 versus ovx.

### 3.3 Zusammenfassende Tabellen der Versuchsergebnisse

Im Folgenden werden die Versuchsergebnisse, die oben ausführlich dargestellt wurden, tabellarisch aufgezeigt.

#### 3.3.1 Das subkutane Fettgewebe

Die nachstehende Tabelle zeigt die tendenziellen Ergebnisse der statistisch ausgewerteten rT - PCR - Daten im Vergleich zur Kontrollgruppe.

	ER $\alpha$	ER $\beta$	AHR	IGF - 1	Wnt 10b
E2	↓	↓	↓	↔	↑
BPA N	↑	↑	↑	↑	↑
BPA H	↑	↑↑	↑	↑	↑
DBP N	↑	↑↑	↑	↑↑	↑
DBP H	↑↑	↑↑	↑	↑↑	↑
BP2 N	↑↑	↑↑	↑	↑	↑↑
BP2 H	↓	↑	↑	↓	↓↓↓
PROC N	↑↑	↑↑	↑	↑	↑↑
PROC H	↑↑	↑↑	↑	↑	↑↑
LIN N	↑	↑↑	↑	↑	↑
LIN H	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑

Tab. 4 Die tendenzielle Entwicklung der statistischen Auswertung der rT - PCR - Daten werden durch diese Tabelle veranschaulicht. ↑~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, ↓~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, ↑↑ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), ↓ ↓ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), ↔ ~ keine Veränderung versus ovx.

#### 3.3.2 Das mesenteriale Fettgewebe

Die Tendenz der statistisch ausgewerteten rT - PCR - Daten werden in der folgenden Tabelle widergespiegelt.

	ER $\alpha$	ER $\beta$	AHR	IGF - 1	Wnt 10b
E2	↔	↓	↑	↓↓↓	↓↓↓
BPA N	↑	↑	↑	↑	↑↑↑
BPA H	↑↑	↑	↑	↑	↑
DBP N	↑	↑	↑	↑	↑
DBP H	↑	↑	↑	↑	↑
BP2 N	↑	↑	↑	↑	↑
BP2 H	↑↑	↑	↑	↑	↔
PROC N	↑	↑	↑	↑	↑
PROC H	↑↑	↑	↑	↑↑	↑
LIN N	↑↑	↑	↑↑	↑	↑↑
LIN H	↑	↓	↑↑	↑	↓

Tab. 5 Die dargestellte Tabelle visualisiert abstrahiert die statistisch ausgewerteten rT - PCR - Versuchsergebnisse des mesenterialen Fettdepots. ↑~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, ↓~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, ↑↑ ~ signifikant erhöhte

Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↓ ↓ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↔ ~ keine Veränderung versus ovx.

### 3.3.3 Das paratibiale Fettgewebe

Nachfolgend werden die stigmatisierten Ergebnisse der statistisch ausgewerteten rT - PCR - Daten skizziert.

	ER $\alpha$	ER $\beta$	AHR	IGF - 1	Wnt 10b
E2	↑	↑	↓	↓	↓
BPA N	↑↑	↑	↑	↑↑	↑
BPA H	↑	↑	↑	↑↑	↑
DBP N	↑	↑↑	↑↑	↑↑	↑↑
DBP H	↑	↑↑	↑	↑↑	↑
BP2 N	↑	↑	↑↑	↑↑	↑
BP2 H	↑	↑	↑↑	↑	↓↓
PROC N	↑↑	↑	↑	↑↑	↑
PROC H	↑↑	↑	↑↑	↑	↔
LIN N	↑↑	↑	↑↑	↑	↑
LIN H	↑	↑	↑	↑↑	↑

Tab. 6 Mit Hilfe dieser Tabelle werden die statistisch ausgewerteten Ergebnisse der rT - PCR - Daten dargelegt. ↑ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, ↓ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, ↑↑ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↓↓ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↔ ~ keine Veränderung versus ovx.

### 3.3.4 Im Serum ermittelte Fettgewebsparameter

Die nachstehende Tabelle fasst die statistisch ausgewerteten Resultate der Blutserum - Analysen zusammen.

	Glukose	Insulin	IGF - 1	Leptin
E2	↑	↑	↓↓	↓↓
BPA N	↓	↑	↑	↓
BPA H	↑	↑	↑	↓↓
DBP N	↔	↑	↑	↔
DBP H	↑	↑	↑↑	↓
BP2 N	↓	↑	↑	↓↓
BP2 H	↓	↓	↓	↓↓
PROC N	↑	↑	↑	↓
PROC H	↔	↑	↑↑	↓↓
LIN N	↑	↑	↑↑	↓↓
LIN H	↓	↑	↑↑	↓↓

Tab. 7 Diese Tabelle präsentiert die Quintessenz der statistisch ausgewerteten Serumparameter. ↑ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, ↓ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, ↑↑ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↓↓ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx ( $P < 0,05$ ), ↔ ~ keine Veränderung versus ovx.

## 4 Diskussion

### 4.1 Ziel dieser Studie

Obwohl das Fettgewebe mittlerweile als Organ mannigfaltigster Aufgaben verstanden wird, ist bisher wenig über die Reaktion dieses Gewebes nach Langzeitapplikation endokriner Disruptoren bekannt. Deshalb verfolgt die vorliegende Arbeit das Ziel, drei unterschiedliche Fettdepots der Sprague - Dawley - Ratte auf mögliche Effekte, hervorgerufen durch Xenohormone, zu untersuchen. Die ausgewählten Fettpolster besitzen Steroidhormonrezeptoren und reagieren in unterschiedlicher Weise auf Östrogen und strukturell verwandte Substanzen. Ferner wurden Blutserumwerte bestimmt, die in den Fettauf- und abbau involviert sind.

Sowohl der lange Expositionszeitraum als auch die explizite molekulargenetische Untersuchung dieser drei Fettgewebsdepots mittels rT - PCR ist ein Novum und erlaubt nur bedingt den Vergleich mit der internationalen Literatur.

### 4.2 Ligandenbindungsassays

Vor dem eigentlichen Versuchsbeginn charakterisierte man die Bindungseigenschaften der verwendeten Testsubstanzen an die Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  mittels Ligandenbindungsassays. Hierzu führte man einem Ansatz aus radioaktiv markiertem E2 und rekombinantem ER $\alpha$  - bzw. ER $\beta$  - Protein unmarkiertes E2 bzw. Testsubstanz in aufsteigenden Konzentrationen zu. Dieses kalte Östrogen bzw. die jeweilige Testsubstanz verdrängte das markierte E2 aus seiner Bindung und erlaubte die Berechnung von Standardkurven. Mittels so entstandener Standardkurven konnte die ED<sub>50</sub> abgelesen werden. Dieser ED<sub>50</sub> - Wert gibt Auskunft über die Menge an unmarkierter Substanz, die nötig ist, um 50% des radioaktiv markierten E2 vom rekombinanten ER $\alpha$  bzw. ER $\beta$  zu verdrängen.

Neben E2 war BPA und DBP in der Lage, mit einer wesentlich höheren Affinität an den ER $\beta$  als an den ER $\alpha$  zu binden. Während BP2 mit annähernd gleicher ED<sub>50</sub> beide Östrogenrezeptoren besetzte, ging DBP keine Bindung mit ER $\alpha$  ein. Weder an den ER $\alpha$  noch an den ER $\beta$  koppelten die beiden Antiandrogene LIN und PROC (vgl. Tab. 3, Seite38).

#### 4.2.1 Aussagekraft der Ligandenbindungsstudien

Die durchgeführten Ligandenbindungsstudien geben Auskunft darüber, ob es den Testsubstanzen prinzipiell möglich ist, an Östrogenrezeptoren zu binden und zu welchem eine höhere Affinität besteht. Hingegen kann keine Auskunft über transaktivierende Wirkungen der aus den Rezeptoren entstehenden Transkriptionsfaktoren, der Aktivität stoffwechselbedingter Metabolite oder der intrazellulären komplexen Rezeptorinteraktion gegeben werden.



So wäre es nach den Ergebnissen der Bindungsstudien dem Herbizid Linuron und dem Fungizid Procymidon nicht möglich, Wirkungen an den beiden Östrogenrezeptoren zu erzielen. Sicherlich können diese ED auch keine direkten Effekte an den Östrogenrezeptoren hervorrufen, dennoch beeinflussen sie deren Genexpression, wie die Untersuchungsergebnisse beweisen. Beispielsweise ist es möglich, dass sowohl Linuron als auch Procymidon über die Kopplung an sogenannte „estrogen receptor related proteins“ (ERR) die Interaktionen der Östrogenrezeptoren beeinflussen. ERR - $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  sind eine Unterfamilie der Orphan - Rezeptoren, die den herkömmlichen Östrogenrezeptoren sehr ähnlich sind und sich Zielgene und molekulare Mechanismen mit den Östrogenrezeptoren teilen (Bardet et al. 2006; Giguere 2002).

Ferner ist der Aryl - hydrocarbon - Rezeptor im Stande, die „estrogen response elements“ (ERE) auf der DNA zu besetzen, nachdem ein AhR - ER - Rezeptorkomplex gebildet wurde. Darüber kann dann die Transkription der ER - Zielgene moduliert werden (Liu et al. 2006; Shipley und Waxman 2006; Wiseman 2005).

Zusätzlich existieren nicht nur kernständige Rezeptoren, sondern auch ER - Plasmamembranrezeptoren, über die von extrazellulär schnell intrazelluläre Antworten ausgelöst werden können (Moriarty et al. 2006). Es besteht natürlich auch die Möglichkeit, dass auf diesem Weg körperfremde Stoffe zelluläre Effekte triggern.

Das komplexe Wechselspiel von Substanz, Rezeptor und folgender Konsequenz ist schemenhaft und noch nicht völlig entschlüsselt. In der vorliegenden Arbeit befasste man sich deshalb ausschließlich mit der molekularen Quantifizierung der ausgewählten Genprodukte.

## **4.3 Versuchsaufbau**

### **4.3.1 Tiermodell**

Um die körpereigene Östrogenproduktion zu umgehen, wurde der Versuch an 12 Wochen alten ovariectomierten SD - Ratten durchgeführt.

Da der Mensch endokrine Disruptoren meist in geringen Dosierungen über lange Lebensabschnitte aufnimmt, wählte man eine Applikationsdauer von drei Monaten im Tiermodell. So wurde die Langzeitaufnahme am Tier mit derjenigen des Menschen gut vergleichbar, da 90 Tage einen relativ langen Lebensabschnitt (ca. 12,5% der durchschnittlichen Lebenserwartung) der Ratte beschreiben.

### **4.3.2 Futteraufnahme**

Handelsübliches Haltungsfutter für Ratten enthält als Haupteiweißquelle Soja. Soja wiederum beinhaltet in großen Mengen östrogen - ähnliches Isoflavon; in erster Linie Genistein und Daidzein (Diel et al. 2004), welches östrogene Effekte der untersuchten

Substanzen eventuell maskieren würde. Beispielsweise wäre oral aufgenommenes Genistein in der Lage, Fettgewebe zu reduzieren (Kim HK et al. 2006).

Deshalb wurden sowohl die Mütter während der Gravidität als auch die Versuchstiere selbst nach der Stillperiode mit sojafreiem Pellet - Futter ernährt.

Proteine, Aminosäuren, Spurenelemente, Vitamine wie auch andere wichtige Nahrungsbestandteile sind dem sojafreien Pellet - Futter in ausreichender Konzentration beigemischt. (vgl. Tab. 8, Seite. 84f. ) Verzichtet wurde hauptsächlich auf die Beimengung von Sojabohnen und Sojaerzeugnissen.

Ferner fügte man diesem Spezialfutter die zu testenden Substanzen bei, um den Leberkreislauf und die dortige Fremdstoff - Metabolisierung nicht zu umgehen. In Tabelle 1 (Seite 27) ist die durchschnittliche Futter- und Substanzaufnahme je Tier und Tag aufgeführt.

#### **4.3.3 Dosierung der Substanzklassen**

Mit Hilfe von geeigneten Screenigmethoden sollten eventuelle Wirkungen der getesteten ED auf das Fettgewebe erforscht werden. Um dieses Ziel zu verfolgen, bestimmte man für jede verwendete Substanz eine hohe (H) und eine niedrige (N) Dosierung. Stets orientierte sich die niedrige Dosierung am NOAEL - Wert (Non Observable Adverse Effect Level) für Ratten und Mäuse bzw. an der ETD (erlaubte Tagesdosis) für Menschen, welche von internationalen Gremien definiert wurden; die Multiplikation der niedrigen Substanzmenge mit dem Faktor 5 lieferte diejenige der hohen. Toxische Effekte sollte jedoch kein verwendetes Xenohormon hervorrufen.

Obwohl es sicherlich auch sinnvoll gewesen wäre, mehr als zwei Dosisbereiche zu testen, entschied man sich dagegen, da für viele Substanzen bereits tierexperimentelle Orientierungsdosierungen existierten. In der Konsequenz erlaubte diese Entscheidung leider nicht, Aussagen über optimale Dosis - Wirkungs - Beziehungen zu treffen. Sehr wohl konnten aber, je nach Dosierung, tendenzielle Effekte am Gewebe festgestellt werden, die in niedriger Dosierung oftmals ausgeprägter waren als in hoher. Aus pharmako- und toxikologischen Studien ist dieses Phänomen der herabgesetzten Wirksamkeit zu niedrig oder zu hoch applizierter Fremdstoffe bestens bekannt.

#### **4.4 Das subkutane Fettgewebe**

Das nuchal entnommene Fettgewebe besteht aus großen Adipozyten mit enormer Speicherkapazität und gehört bei Nagern zum braunen Fettgewebe. Dieses spezifische Gewebe dient der Wärmeregulation, bleibt der Ratte lebenslang erhalten und bildet sich nicht, wie beim Menschen, nach der Geburt zurück (Avram et al. 2005).

Das im Tierexperiment gewonnene subkutane Fettgewebe unterschied sich rein äußerlich von den anderen Fettgewebeproben durch seine dunklere Farbe, die es aufgrund seiner

extensiven Vaskularisation und wegen der hohen Mitochondriendichte annimmt (Avram et al. 2005).

#### 4.4.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression

Zweifelsohne müssen die beiden Östrogenrezeptoren  $\alpha$  und  $\beta$  im Zusammenhang betrachtet werden. Hierbei lassen sich für jedes Xenohormon klare Wechselspiele der gegenseitigen Modulation erkennen. Als quantitativ eindeutig dominierender Regulator der prozentrelativierten Daten in direkter Gegenüberstellung darf der ER $\beta$  betrachtet werden, welcher für den Fettgewebsaufbau verantwortlich ist (Naaz et al. 2002). Im unmittelbaren Vergleich beider Östrogenrezeptoren übertraf ER $\beta$  die Genexpression des Gegenspielers ER $\alpha$  kontinuierlich in jeder Xenohormon - Behandlungsgruppe. E2 denunzierte homolog die Synthese der ERs unter das Niveau der Kontrollgruppe.

Erstaunlicherweise war es den Antiandrogenen Procymidon und Linuron in hoher und niedriger Dosierung möglich, die Synthese des ER $\beta$  signifikant zu fördern. Sie kurbelten auch die ER $\alpha$  - Synthese an; Procymidon ebenfalls signifikant. Der Vergleich dieser Pestizide veranschaulichte, dass der Östrogenrezeptor  $\beta$  die Menge an ER $\alpha$  - Transkript um ca. 50% übertraf.

Die Kunststoffbestandteile Bisphenol A und Dibutylphthalat besitzen dem Ligandenbindungsassay zufolge eine hohe Affinität zum ER $\beta$ . Anscheinend sind sie auch in der Lage, die in - vivo - ER $\beta$  - Rezeptorexpression zu fördern. DBP stimulierte die ER $\beta$  - Genexpression in beiden Dosierungen und BPA in hoher signifikant. Auch diesen Xenohormonen gelang die Stimulierung des ER $\alpha$ , jedoch war im Vergleich die Syntheserate des ER $\alpha$  um 40% – 50% reduziert.

Der UV - Filter BP2 steigerte in niedriger Dosierung die Proliferationsrate beider ERs signifikant, wobei auch hier der ER $\beta$  stärker exprimiert wurde. Denselben Regulierungsmechanismen unterlag BP2 H in nicht - signifikanter Weise. Dennoch muss die Tatsache erwähnt werden, dass die Transkriptionsrate des ER $\alpha$  unter BP2 H unter die des E2 abfiel. BP2 H wirkte daher am Östrogenrezeptor  $\alpha$  ähnlich wie E2.

Diese Ergebnisse lassen die Folgerung zu, dass im subkutanen Fettgewebe beide ERs exprimiert werden und miteinander kommunizieren. Unklar ist, ob ER $\alpha$  die Expression des ER $\beta$  fördert oder ER $\beta$  die des ER $\alpha$  hemmt. Die Literatur schreibt dem Östrogenrezeptor  $\alpha$  die Vorsteherrolle im Fettgewebe zu (Dieudonne et al. 2004).

Auch wenn dieser Sachverhalt nicht geklärt werden kann, so gelingt dennoch keiner Substanz die Entkoppelung der gegenseitigen Interaktion. Sogar die beiden Antiandrogene PROC und LIN sind in der Lage, die Östrogenrezeptor - Proliferation zu fördern und gewährleisten so funktionierende Interaktionsmechanismen. Mit Hilfe dieser Beobachtungen können die mannigfaltigen Aktivierungsmöglichkeiten der Rezeptorsynthese erklärt werden.

E2 inhibierte, alle anderen Substanzen induzierten die Proliferationsrate des Fremdstoff - metabolisierenden AhR. Die unzähligen Funktionen dieses Rezeptors erschwerten die Interpretation der Versuchsergebnisse.

Yoshinari konnte vor kurzem nachweisen, dass der AhR in der Lage ist, zur Entgiftung der im Fettgewebe akkumulierenden Fremdstoffe beizutragen. Dies gelingt dem Rezeptor mit Unterstützung der Cytochrom - P450 - Familie (Yoshinari et al. 2006). Bei Betrachtung der Versuchsergebnisse erscheint Yoshinaris Aussage plausibel, da alle Xenohormone die Expression des Rezeptors stimulierten. Unterstützend kann die stärkere Aktivierung durch die höher dosierten Giftstoffe erwähnt werden; einzig BP2 kurbelte in beiden Dosierungen die Rezeptorsynthese in gleicher Ausprägung an. In diesem Interpretationsansatz fügt sich ebenfalls hervorragend die durch E2 verminderte AhR - Transkriptionsrate ein, da es den physiologischen Zustand und keinesfalls eine toxische Belastung der Ratte simulieren sollte. Versteht man die AhR - proliferationssteigernden Xenohormone als Agonisten an diesem Rezeptor und betrachtet man gleichzeitig die bis zur Signifikanz induzierte Synthese unter dem Antiandrogen Linuron in hoher Dosierung, so spielen sicherlich auch die Forschungsergebnisse von Liu eine entscheidende Rolle bei der Interpretation dieser Studie. Er konnte nachweisen, dass Agonisten des AhR in der Lage sind, die ER $\alpha$  - Synthese zu aktivieren (Liu et al. 2006). Beide Antiandrogene, Linuron und Procymidon, konnten wahrscheinlich mit Hilfe dieser Interaktion die ER $\alpha$  - Genexpression unterstützend fördern. Da aber die Höhe der AhR - Expression nicht proportional zur ER $\alpha$  - Syntheserate war, spielten sicherlich noch viele andere Aktivierungsmechanismen eine Rolle bei der ER $\alpha$  - Synthese.

E2 würde hier als Ah - Rezeptor - Antagonist fungieren und auf diese Weise Mitverantwortung für die erniedrigte ER $\alpha$  - Syntheserate in dieser Tiergruppe tragen.

#### **4.4.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene**

Mit Ausnahme von BP2 H und E2 induzierten alle Substanzen die zelleigene IGF - 1 - Syntheseratesrate.

Sowohl die E2 - Tiere, als auch die Kontrollgruppe stellten die gleiche Transkriptmenge her. Als Einzelbeobachtung würde dieses Ergebnis eine fehlende östrogenbedingte Regulation des subkutanen Fettes suggerieren. Im Vergleich zu den anderen beiden Fettgewebsarten konnte aber beobachtet werden, dass Östrogen sehr wohl die Menge des Fettdepots proliferativen Somatomedins (IGF - 1) steigerte. Betrachtet man das subkutane Fettgewebe als Körperform - modulierendes Gewebe der Frau und als die Wärmeregulation unterstützende Körpermasse der Ratte, so scheint die E2 - induzierte IGF - 1 - Synthese sehr sinnvoll.

BP2 H reduzierte die IGF - 1 - Menge unter diejenige der Kontrollgruppe. Seidlova - Wuttke schrieb dem Kunststoffzusatz BP2 H eine östrogenähnliche Wirkung zu, die sicherlich auf

bestimmte Organe zutrifft (Seidlova-Wuttke et al. 2005). Im Gegensatz zu den anderen Substanzgruppen nahm aber jedes Versuchstier der BP2 - H - Gruppe die höchste Substanzmenge pro Tag zu sich. Es könnte deshalb genauso gut möglich sein, dass die verminderte IGF - 1 Produktion durch eine zu hohe, invers wirkende Substanzakkumulation zustande kam. Die übrigen Tiergruppen steigerten die Genexpression; LIN H und DBP N & H signifikant. LIN H konnte in Abhängigkeit von aufgenommener Futtermenge und Körpergewicht eine enorme IGF - 1 - Proliferationsrate erreichen. Mit 14,12 g gefressenem Futter pro Tag lag diese Gruppe im unteren Bereich. Trotzdem gelang ihr eine Gewichtszunahme, welche sicherlich auch auf die von Blüher beschriebene Adipogenese, mediiert durch IGF - 1, zurückzuführen ist (Blüher et al. 2005).

BP2 H reduzierte, BP2 N und PROC N & H steigerten die Wnt - 10b - Syntheseraten signifikant; alle anderen Substanzen förderten sie in nicht signifikanter Weise.

Longo schreibt der vermehrten Wnt - 10b - Genexpression eine reduzierende Entwicklung des weißen und braunen Fettgewebes zu (Longo et al. 2004). Demzufolge müssten alle Tiergruppen mit erhöhter Wnt - 10b - Expressionsrate eine reduzierte Fettmasse und konsequenterweise ein geringeres Körpergewicht aufweisen. Die Versuchsergebnisse zeigten aber eine erhöhte Genexpression in Verbindung mit erhöhten Körpergewichten et vice versa. Procymidon und Benzophenon 2 N sind gute Beispiele dafür. Diese Resultate weisen entweder auf eine verlangsamte Wnt - 10b - Transkriptionsmaschinerie hin, die träge auf vermehrtes Körpergewicht reagiert; oder die Substanzen entkoppeln funktionierende Wirkmechanismen. Außerdem benutzte Longo in seinem Experiment transgene Mäuse, die stets Wnt 10b exprimierten und dem Fettaufbau grundsätzlich entgegenwirkten. Denkbar wäre deshalb auch, dass Wnt 10b nicht in der Lage ist, bereits bestehende Fettpolster durch adäquate Abbauförderung zu minimieren.

Die signifikant reduzierte Wnt - 10b - Genexpression unter BP2 H könnte eher in Verbindung mit einer geringen Futter- und Kalorienaufnahme gesehen werden, woraus ein niedriges Körpergewicht resultierte. Deshalb ist es möglich, dass die Syntheserate des Protoonkogens bei den BP2 - H - Tieren prinzipiell überflüssig war. Vergleicht man aber Körpergewicht, Kalorienzufuhr und Wnt - 10b - Syntheseraten der E2 - mit der BP2 - H - Gruppe, so kann die eben postulierte These nicht gehalten werden. Die Nahrungszufuhr der mit Östrogen behandelten Tiere ist weitaus geringer, die Wnt - 10b - Proteinbiosynthese aber höher als die der BP2 - H - Ratten. Eindeutige Zusammenhänge zwischen der Wnt - 10b - Genexpression und der Nahrungsaufnahme können demzufolge im subkutanen Fettgewebe nicht erkannt werden.

Versteht man dagegen das IGF - 1 als Gewebe proliferatives Somatomedin, so könnte Wnt 10b und IGF - 1 in gegenseitiger Abhängigkeit vom Adipozyten exprimiert werden.

Es konnten jedoch keine aussagekräftigen Interaktionsmuster erkannt werden, so dass von unabhängigen Regulierungsmechanismen ausgegangen werden muss.

## **4.5 Das mesenteriale Fettgewebe**

Formal darf das mesenteriale Fettgewebe dem weißen Fettgewebsdepot zugeordnet werden. Es erfüllt vielseitige Aufgaben im Organismus und kann auf eine Stufe mit den übrigen intraperitoneal gelegenen Fettpolstern gestellt werden. Hierzu kann auch das viszerale Fett gerechnet werden, welches Eingeweide schützt und stützt (Avram et al. 2005). Diese Fettspeicher sollen weniger sensibel auf lipogenetische Stimuli reagieren (Tchernof et al. 2006).

### **4.5.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression**

Ein unmittelbarer Vergleich der Östrogenrezeptorexpression des mesenterialen Fettgewebes ist nicht möglich, da die Menge an ER $\beta$  - Transkript verschwindend klein und deshalb schlecht auswertbar war. Ferner ließen hohe Standardabweichungen diesen Graphen an die Grenze der Interpretationsfähigkeit stoßen. Trotz des maximalen Einsatzes von Gewebematerial in die rT - PCR gelang der ausreichende Nachweis des ER $\beta$  nicht. Verantwortlich hierfür könnte eine zu geringe Startkopienanzahl sein. Diese Behauptung würde durch die hohe PCR - Zykluszahl (Daten zur Zykluszahl sind in der Arbeit nicht aufgeführt) erhärtet werden, die nötig war, um erstmals geringfügige Mengen ER $\beta$  nachzuweisen.

Eine weitere Erklärung hierfür wäre die Expression eines ER $\beta$  - Subtypes im mesenterialen Fettgewebe, der durch die verwendete Gensequenz nicht erfasst wurde. Diese These würden Forschergruppen um Rodriguez - Cuenca stützen, die den Östrogenrezeptor  $\beta$  1 im intraperitoneal gelegenen viszeralem Fettgewebe mittels rT - PCR nachgewiesen haben (Rodriguez-Cuenca et al. 2005). Im Abgleich der verwendeten Primer konnte festgestellt werden, dass die abgegriffenen Gensequenzen divergierten, jedoch beide der ER $\beta$  - Nukleotidsequenz entstammten.

Ganz im Gegensatz zum ER $\beta$  konnte die ER $\alpha$  - Synthese problemlos im mesenterialen Fettgewebe nachgewiesen werden. Demzufolge ist die Regulation mit Hilfe dieses Rezeptors wahrscheinlich und spiegelt die Erkenntnisse der aktuellen Literatur wider, welche die dominierende Rolle des ER $\alpha$  im Fettgewebe postuliert (Dieudonne et al. 2004; Rodriguez-Cuenca et al. 2005).

Quantitativ war die ER $\alpha$  - Genexpression unter E2 derjenigen der ovariectomierten Kontrollgruppe gleich. Alle übrigen Substanzen stimulierten die Syntheseraten des ER $\alpha$  stärker als im subkutanen Fettgewebe. Bis zum Signifikanzniveau konnten LIN N, PROC H, BP2 H und BPA H die Rezeptorexpression anregen.

Die erlangten Ergebnisse verdeutlichen eingehend die unzähligen Aktivierungsmechanismen der ER $\alpha$  - Maschinerie. So gelang es nicht nur dem rezeptoraffinem BPA und BP2, diese anzuregen, sondern auch den Antiandrogenen LIN und PROC. Möglicherweise nehmen die Antiandrogene über Interaktionen am Aryl - hydrocarbon - Rezeptor modulierenden Einfluss auf die ER $\alpha$  - Syntheserate. Ebenso könnte sie über eine kompetitive Hemmung des Androgenrezeptors vermittelt sein, der auch im Fettgewebe existiert (Mayes und Watson 2004).

Leider kann nur bedingt eine Aussage über die Konsequenz der beschriebenen Resultate gemacht werden, da keine Abhängigkeiten in Bezug auf die Größe des mesenterialen Fettdepots und der ER $\alpha$  - Expression beobachtet werden können.

Schenkt man der aktuellen Literatur Glauben, so dürfte sich dieses Fettlager unter ED - Einfluss nur geringfügig vergrößert haben. Dafür spricht, dass ihm Tchernof geringe lipogenetische Aufgaben zuschreibt (Tchernof et al. 2006). Er postuliert eine verminderte Aktivität der Lipoproteinlipase, welche Triacylglyceride spaltet und sie für die Zellmembran permeabel macht (Tchernof et al. 2006). Die Quantifizierung des mesenterialen Fettgewebes beweist aber eine Zunahme desselben mit Ausnahme von BP2 H, E2 und LIN H. Diese dennoch gesteigerte Lipogenese der meisten Behandlungsgruppen kommt eventuell durch die vermehrte ER $\alpha$  - Expression zustande, die wiederum die „alpha2A-adrenergic receptor“ - Synthese nach Koppelung des Östrogenrezeptors  $\alpha$  induzierte. Dem „alpha2A-adrenergic receptor“ werden nämlich antilipolytische Eigenschaften im humanen subkutanen Fett zugesprochen, die auch am mesenterialen Depot der Ratte greifen könnten (Pedersen et al. 2004). Eindeutige gegenseitige Regulierungsmechanismen des ER $\alpha$  und der intraperitonealen Fettmasse sind jedoch nicht zu erkennen.

Die Betrachtung der AhR - Genexpression im Fettgewebe des Mesenterium ließ keine wesentlichen Unterschiede zu derjenigen im subkutanen Fettspeicher erkennen. Demnach ist es durchaus vorstellbar, dass der AhR in beiden Depots dieselben Aufgaben der Entgiftung und der ER $\alpha$  - Interaktion besitzt. Aus diesem Grund seien im Folgenden nur die Unterschiede zum subkutanen Fettgewebe aufgeführt.

Das mesenteriale Fettdepot förderte im Vergleich zu den anderen beiden Fettdepots die quantitative Rezeptorsynthese in beinahe jeder Behandlungsgruppe am stärksten. Sogar E2 vermochte sie zu steigern und ist vermutlich dosisbedingt zum AhR - Agonisten geworden. Eine starke Durchblutung und die Nähe zum Verdauungstrakt könnten hierfür verantwortlich sein. So konnten die verwendeten Substanzen in großen Mengen dort anfluten und in der Konsequenz die Rezeptorbildung forciert anregen.

Sowohl das Fungizid Procymidon als auch der Plastikweichmacher Dibutylphthalat stimulierten in beiden Dosierungen die Rezeptorexpression mit gleicher Intensität. Mögliche

Erklärungen hierfür wären, dass das Gewebe nicht fähig war, die höhere Fremdstoffkonzentration aufzunehmen oder darauf mit einer veränderten Rezeptorsynthese zu reagieren. Ferner könnte die Syntheserate des Ah - Rezeptors bereits bis zum Maximum ausgereizt gewesen sein. Dagegen würden aber die bis zur Signifikanz gesteigerten AhR - Expressionsraten der Linuron - Behandlungsgruppen sprechen.

#### **4.5.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene**

E2 hemmte und PROC H induzierte die IGF - 1 - Syntheserate signifikant; die übrigen Xenohormone förderten sie in nicht signifikanter Weise.

Tchernof wies eine geringere Aktivität der Lipoproteinlipase im mesenterialen Fettgewebe nach (Tchernof et al. 2006). Dennoch war es diesem Gewebe meist möglich zu proliferieren. Die gesteigerte IGF - 1 - Syntheserate unterstützte bei einigen Behandlungsgruppen eventuell die Akkumulation des Fettgewebes.

Werden die Versuchsergebnisse des Somatomedins IGF - 1 betrachtet, so war es keinem Xenohormon möglich, die Expressionsraten dieses Wachstumsfaktors um mehr als 75%, bezogen auf die Kontrollgruppe, zu steigern. Dennoch konnte die Fettmasse vergrößert werden. Erstaunlicherweise exprimierten die Tiere unter der hohen Substanzbelastung im Vergleich zur niedrigen mehr IGF - 1, häuften aber weniger Fettmasse an.

IGF - 1 wurde signifikant weniger unter Östrogenbehandlung synthetisiert. Dies verwundert nicht, da die E2 - Tiere im Vergleich die geringste Nahrungsmenge zu sich nahmen. Viel bemerkenswerter ist es, dass die Linuron - H - behandelten Ratten nur unwesentlich mehr Nahrung als die E2 - Tiere aufnahmen und im Verhältnis viel mehr IGF - 1 synthetisierten. Trotz der starken Expression des Somatomedins vergrößerten die LIN - H - Tiere ihre mesenteriale Fettmasse nicht. Linuron war also erneut in der Lage, den Wachstumsfaktor IGF - 1 stark zu stimulieren, jedoch ohne Effekt auf das untersuchte Gewebe.

Anscheinend hat die Menge an gewebseigenem IGF - 1 nur geringen Einfluss auf das Anwachsen der Gewebsmenge.

Linuron und Bisphenol A induzierten jeweils in niedriger Dosierung die Wnt - 10b - Genexpression signifikant; E2 hemmte sie signifikant. Mit Ausnahme von Procymidon waren alle Xenohormone in der Lage, die Wnt - 10b - Synthese in der niedrigen Applikationsgruppe mehr zu fördern als in der hohen. Dieses Phänomen kann einerseits auf eine Überschreitung der optimalen Wirkspiegel unter der hohen Applikationsdosis zurückzuführen sein, andererseits aber auch auf die geringere mesenteriale Fettmasse unter hoher Substanzbelastung, welche die Wnt - 10b - Syntheserate reduzierte.

Die unter E2 signifikant verminderte Wnt - 10b - Synthese ist gut mit der sparsamen Futteraufnahme und dem daraus resultierenden, kleinen Fettpolster zu erklären. Auf die gleiche Weise können die Effekte unter LIN H und BP2 H verstanden werden.



Über eine gesteigerte Futtermittelaufnahme sind die Signifikanzen unter LIN N und BPA N zu erklären, indem eine überschießende Wnt - 10b - Transkription der vergrößerten Fettmasse entgegensteuerte. Dieser Interpretationsansatz beinhaltet leider Schwachstellen, da beispielsweise die PROC - N - Behandlungsgruppe mengenmäßig mehr Nahrung zu sich nahm und weniger Wnt 10b transkribierte, obwohl sich das mesenteriale Fettgewebe größer darstellte, als das der LIN - N - Tiere.

Offensichtlich lassen sich tendenzielle Regulationsmechanismen der Wnt - 10b - Synthese in Abhängigkeit von der Fettgewebsgröße erkennen. Allem Anschein nach funktionierten aber auch diese unter Substanzbelastung nicht uneingeschränkt.

#### **4.6 Das paratibiale Fettgewebe**

Dieses schmetterlingsförmig, am Unterschenkel der Ratte angelegte Fettdepot wurde erstmals von der Forschergruppe um Seidlova - Wuttke beschrieben. Sie beobachtete, dass dieser Speicher äußerst sensibel auf Östrogene und strukturell ähnliche Substanzen reagiert (Seidlova-Wuttke et al. 2003).

##### **4.6.1 Wirkung auf die Rezeptorexpression**

Im Gegensatz zum Fettgewebe des Mesenteriums konnten im paratibialen wieder beide Östrogenrezeptoren nachgewiesen werden. Bei Betrachtung der absoluten rT - PCR - Werte (Daten nicht gezeigt) überwiegt mengenmäßig eindeutig der ER $\alpha$ . Die Gegenüberstellung der prozentrelativierten Ergebnisse verdeutlicht jedoch durchaus Expressionsunterschiede beider Östrogenrezeptoren in den einzelnen Behandlungsgruppen.

So synthetisieren die E2 - behandelten Tiere wesentlich mehr ER $\beta$  als ER $\alpha$ . Dies erscheint durchaus sinnvoll, wenn das paratibiale Fettdepot als schnell mobilisierbarer Energiespeicher der Unterschenkelmuskulatur verstanden wird und dem ER $\beta$  eine fettgewebsproliferative Aufgabe zugesprochen wird (Naaz et al. 2002). Im Zusammenhang mit der den Bewegungstrieb steigernden Eigenschaft des Östrogens (Yuen EH et al. 1985), kann aus diesem Speicher schnell und verbrauchsnahe Energie für die Unterschenkelmuskulatur mobilisiert werden. Das soeben Postulierte lässt sich sicherlich nicht uneingeschränkt auf jede Futtergruppe übertragen, da einzig die Dibutylphthalat - Ratten die ER $\beta$  - Rezeptorexpression signifikant erhöhen konnten. Vergleicht man diese Daten mit dem Körpergewicht und der paratibialen Fettmasse, so gehörten diese Tiere mit zu den schwersten und fettreichsten, obwohl DBP H das Gewicht im Vergleich zur ovx Kontrollgruppe signifikant reduzierte. Das würde für eine Energiebereitstellung aufgrund des erhöhten Körpergewichts sprechen. Setzt man aber die signifikant gesteigerte ER $\alpha$  Synthese der PROC - N - & H -, LIN - N - und BPA - N - behandelten Gruppen in Bezug zum Körpergewicht, so lässt sich die These nicht länger uneingeschränkt halten, da die Tiere

dieser Behandlungsgruppen ebenso schwer waren und auch mehr Energie im paratibialen Fettgewebe bräuchten und dann natürlich auch eine erhöhte ER $\beta$  - Expressionsrate hätten.

Um die Ebene des Spekulativen zu verlassen, ist es sinnvoll, die im Ligandenbindungsassay ermittelten Daten heranzuziehen. So banden sowohl E2, als auch DBP mit hoher Affinität an den Östrogenrezeptor  $\beta$ . Es ist also möglich, dass einzig die höhere Bindungsfähigkeit die vermehrte Synthese dieses Rezeptors förderte.

Auch in diesem Gewebe ist es den Antiandrogenen Procymidon N & H und Linuron N gelungen, die Östrogenrezeptor -  $\alpha$  - Proteinsynthese signifikant zu steigern. Wie in allen anderen Geweben kann diese Aktivierung durch verschiedenste Mechanismen hervorgerufen werden. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang neben der Interaktion mit dem AhR eine kompetitive Hemmung des Androgenrezeptors, der auch im Fettgewebe exprimiert wird (Mayes und Watson 2004).

Mit Ausnahme von E2 induzierten alle Substanzen die AhR - Genexpression. E2 inhibierte sie. Auch das paratibiale Fettgewebe fordert für sich dieselben Aufgaben wie die bereits besprochenen, nämlich die Fremdstoffmetabolisierung und die unterstützende AhR - ER $\alpha$  - Interaktion. Sowohl die ER $\alpha$  - als auch die AhR - Syntheserate war unter LIN N und PROC H bis zur Signifikanz gesteigert. Auf diese Weise kann nochmals die AhR bedingte ER $\alpha$  - Modulation bekräftigt werden. Vergleicht man die relative Rezeptorexpression der drei Fettdepots, so nimmt das paratibiale die Mittelstellung zwischen dem subkutanen und mesenterialen ein, was möglicherweise auf die Größe und die Durchblutung zurückzuführen ist.

DBP N, LIN N, PROC H und BP2 in beiden Dosierungen konnten hier die Rezeptorsynthese bis zum Erreichen des Signifikanzniveaus steigern. Diese vielen Signifikanzen unterstreichen das von Seidlova - Wuttke beschriebene sensible Ansprechen auf Östrogene und strukturell verwandte Substanzen (Seidlova-Wuttke et al. 2003).

Paradoxe Effekte riefen der Kunststoffzusatz Bisphenol A und das Herbizid Linuron im paratibialen Fettgewebe hervor. Sie förderten in niedriger Konzentration die AhR - Genexpression wesentlich stärker als in hoher. Linuron deutete dieses Phänomen bereits im mesenterialen Fettgewebe an. Die unerwartete Wirkung kann aller Wahrscheinlichkeit nach auf die eingangs erläuterte optimale Wirkdosis zurückgeführt werden. Diese Substanzen haben sie demnach überschritten und können die AhR - Expression nicht mehr erwartungsgemäß induzieren.

Bemerkenswerterweise war Linuron dosisabhängig befähigt, in allen Fettgeweben die Ah - Rezeptorsynthese bis zur Signifikanz zu steigern, was auf eine besondere Affinität dieses Herbizids zur Aryl - hydrocarbon - Rezeptor - Synthese schließen lässt.

#### 4.6.2 Wirkung auf die Proliferation - regulierenden Gene

Erneut nahm die relative IGF - 1 - Transkriptionsrate die Mittelstellung zwischen den untersuchten Fettgewebsarten ein. E2 verringerte sie, alle Xenohormone steigerten sie; signifikant stimulierten BP2 N, PROC N, LIN H, sowie BPA und DBP in beiden Dosierungen.

Obwohl das paratibiale Fettgewebsdepot sehr klein ist, korrelierte die gewebeeigene IGF - 1 - Transkriptionsmenge sehr genau mit dem Körpergewicht und der paratibialen Fettmenge der jeweiligen Tiergruppe. Diese Aussage gilt nicht ausnahmslos für die Antiandrogene Linuron und Procymidon. Linuron exprimierte auch im paratibialen Fettpolster im Vergleich zu Körpergewicht, Futteraufnahme und ortständiger Fettmasse zuviel IGF - 1. Procymidon hingegen produzierte in hoher Dosierung zu wenig IGF - 1, was am ehesten auf einen paradoxen Effekt, hervorgerufen durch zu hohe Wirkspiegel, zurückzuführen ist.

Dennoch bestätigte sich wiederum das äußerst sensible Ansprechen des paratibialen Fettgewebes auf endokrine Disruptoren, die Strukturähnlichkeiten zu Östrogen aufwiesen.

Unklar bleibt jedoch für alle drei Fettdepots, über welche Mechanismen die zelleigene IGF - 1 - Synthese reguliert wurde. Es bestünde die Möglichkeit, dass die verwendeten ED die Wachstumshormonspiegel beeinflussten und darüber die IGF - 1 - Produktion modulierten (Ho et al. 2006; Yuen KC und Dunger 2006). Festzuhalten bleibt, dass im Detail alle untersuchten Gewebe in der IGF - 1 - Synthese divergierten. Grundsätzlich hemmte E2 die IGF - 1 - Synthese, wie es auch von Ho beschrieben wurde, und alle anderen Substanzen förderten sie (Ho et al. 2006). Demnach wurden die Effekte nicht über einen Agonismus am Östrogenrezeptor mediiert.

Ebenso wie im subkutanen Fettgewebe reduzierte BP2 H auch im paratibialen die Wnt - 10b - Expression signifikant. Möglicherweise waren hierfür wiederum die verringerte Nahrungsaufnahme und die geringe paratibiale Fettmasse verantwortlich. Sie machten eine Wnt - 10b - Synthese überflüssig. Ähnliches gilt für E2, welches die Wnt - 10b - Menge nicht signifikant reduzierte.

DBP N induzierte die Expression des Protoonkogens bis zum Signifikanzniveau. Diese Tiergruppe nahm verhältnismäßig viel Futter zu sich und bildete auch den höchsten paratibialen Fettanteil aus. Eventuell wirkte die vermehrte Wnt - 10b - Menge einer noch größeren Gewichtszunahme entgegen. Die forcierte Protoonkogen - Herstellung der übrigen Xenohormone konnte nicht aussagekräftig interpretiert werden und lässt eine Entkopplung durch die Xenohormone vermuten.

Alle drei Fettpolster exprimierten in unterschiedlichster Weise Wnt 10b. Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren auch alle substanzbelasteten Tiere leichter. Es besteht also durchaus die Möglichkeit, dass Wnt 10b in die Modulation der Fettspeicher involviert war und einer übermäßigen Gewichtszunahme oder -abnahme entgegenwirkte. In der Literatur werden zwar Versuche beschrieben, die eindeutige Interaktionen zwischen der Fettmasse und der

Wnt - 10b - Expression beschreiben, jedoch nur an knockout - Tieren oder an der isolierten Zelle (Longo et al. 2004).

Am Lebendmodell unter Substanzbelastung und schneller Gewichtsveränderung konnten jedoch keine pauschal gültigen Regelmechanismen der Wnt - 10b - Synthese festgestellt werden. Das Protoonkogen ist also nicht gut geeignet, die Fettgewebsentwicklung unter veränderten Lebensbedingungen vorherzusagen. Christodoulides untersuchte Wnt - 10b - Mutationen an übergewichtigen Menschen. Er stellte fest, dass auch funktionslose Wnt - 10b - Allele nicht zwangsläufig zu Fettleibigkeit führen (Christodoulides et al. 2006). Er unterstreicht damit die bedingte Aussagekraft dieses Protoonkogens in Bezug auf die Fettgewebsentwicklung und -differenzierung.

## 4.7 Serumparameter

### 4.7.1 Insulin und Glukose

Weder die Serum - Glukose- noch die Serum - Insulinwerte waren durch die Testsubstanzen signifikant beeinflusst. Während die Glukosespiegel über alle Behandlungsgruppen relativ konstant waren, schwankten die Insulinkonzentrationen des Dekapitationsblutes enorm.

Einen insulinsensitiven Effekt hatten BP2 und PROC jeweils in hoher Dosierung. Diesen Xenohormonen gelang es mit geringen Insulinmengen, niedrige Blutglukosespiegel zu erreichen. Um hohe Blutglukosewerte zu vermeiden, mussten die PROC - N - und DBP - N - Tiere sehr viel Insulin ausschütten. Der Versuch bestätigte, dass ovariectomisierte, E2 - behandelte Tiere hohe Blutglukose- und Insulinspiegel aufweisen (Naaz et al. 2002). Ähnliches gilt für BPA H und DBP H. Ferner konnten nur unter ausgeprägter Insulinausschüttung die normalen Glukosespiegel der Linuron - und BP2 - N - Gruppe aufrechterhalten werden. Trägt man zirkulierendes Insulin und Glukosespiegel gegeneinander auf, so werden unter E2, DBP H und PROC N entkoppelte Regulationsmechanismen beobachtet (Graphen nicht gezeigt).

Allen Tiergruppen ist es scheinbar möglich, durch schwankende Insulinausschüttung relativ konstante Blutglukosespiegel aufrecht zu erhalten. Deshalb dürfen primär keine toxischen Einflüsse der Xenohormone auf die B - Zellen des Pankreas vermutet werden.

Vielmehr lassen die Ergebnisse gestörte Glukose - Aufnahmemechanismen in die Zelle erahnen. Es ist also mit einer verminderten Insulinsensitivität beispielsweise durch funktionell beeinträchtigte GLUT - 4 - Transporter an Skelett, Herzmuskel- und Fettzellen zu rechnen.

Wie erwähnt verwendete man für die Serumanalysen frisches Dekapitationsblut. Stress, hervorgerufen durch forcierte Katecholaminausschüttung, könnte durchaus die Blutglukosespiegel erhöht haben. Dennoch befanden sich alle Behandlungsgruppen im Normbereich (Normbereich: 134 – 219 mg/dl = 7,44 – 12,16 mmol/l) (Van Zutphen et al. 1995). Keine Substanz verursachte demnach diabetogene Effekte.

#### 4.7.2 Serum IGF - 1

Das Somatomedin IGF - 1 wird zu 80% in der Leber synthetisiert. Bekanntermaßen reduziert oral aufgenommenes Östrogen die zirkulierenden IGF - 1 - Spiegel (Ho et al. 2006). Das konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Ferner besitzt es Yuen zufolge Insulin - sensitivierende Effekte (Yuen KC und Dunger 2006). Hohe IGF - 1 - Spiegel reduzieren somit die Insulinspiegel und umgekehrt. Voll zutreffend ist dieser Regelmechanismus für E2, DBP H und PROC H.

Sowohl im subkutanen als auch im paratibialen Fettgewebe stimulierten das Herbizid Linuron und der Weichmacher Dibutylphthalat jeweils in hoher Dosierung die IGF - 1 - Synthese signifikant. Einerseits besaßen diese Umweltgifte dort eine induzierende Wirkung auf die zelleigene IGF - 1 - Synthese, andererseits ist aber auch mit einer gesteigerten Leberaktivität zu rechnen. Linuron in niedriger Dosierung konnte zwar die zelleigene Syntheserate des Somatomedins nicht signifikant steigern, jedoch die hepatogene, was auf eine verstärkte Leberaktivität hindeutet. Schon von Seidlova - Wuttke wurde die durch PROC H induzierte, signifikante Steigerung des Lebermetabolismus beschrieben (Seidlova-Wuttke et al. 2005).

Mit Ausnahme von BP2 H und E2 steigerten alle Substanzen die zirkulierenden IGF - 1 - Spiegel. Für einige Xenohormone ist ein eindeutiger IGF - 1 - sensitivierender Insulin - Interaktionsmechanismus zu erkennen. Andere steigerten die Syntheseraten sicherlich nur aufgrund der hepatischen Verstoffwechslungsaufgaben ohne weiterreichende Konsequenzen. BP2 H konnte wahrscheinlich aufgrund seiner Östrogenwirkung die Expression des Somatomedins reduzieren (Seidlova-Wuttke et al. 2005).

#### 4.7.3 Leptin

Leptin wird von den Adipozyten synthetisiert und dessen Ausschüttung steigt proportional zur Fettmasse. So überrascht es nicht, dass die Kontrollgruppe mit den höchsten Körpergewichten am meisten Leptin im Blut hatte und die stark gewichtsreduzierten E2 - Tiere am wenigsten. Die anderen Behandlungsgruppen reduzierten je nach Größe des Fettdepots die Leptinspiegel; E2, BPA H, PROC H, LIN N & H und BP2 N & H signifikant. Da Leptin zeitnah zur Nahrungsaufnahme ausgeschüttet wird, können die gemessenen Blutwerte variieren, je nachdem, wie viel Zeit zwischen Messung und Mahlzeit liegt.

## 5 Zusammenfassung

1. Endokrine Disruptoren sind körperfremde Substanzen, die Effekte am Endokriniem hervorrufen. In der vorliegenden Studie wurde untersucht, inwieweit industriell hergestellte Umweltchemikalien auf die Transkriptionsmenge bestimmter Fettgewebsparamter Einfluss nehmen können. Dazu wurden drei Fettgewebsarten unterschiedlicher Lokalisation untersucht, denen divergente Aufgaben im Organismus der Ratte zugesprochen werden: das wärmeregulierende, subkutane Fettgewebe, das lipogenetisch unempfindliche, mesenteriale Fettpolster und das paratibiale Fettdepot, welches äußerst sensibel auf Umweltreize reagiert.

Zu diesem Zweck nahmen über einen Zeitraum von drei Monaten ovariectomisierte Sprague - Dawley - Ratten oral folgende Substanzen in jeweils einer hohen und einer niedrigen Dosierung zu sich: das zur Produktion von Plastikprodukten verwendete Dibutylphthalat (DBP) und Bisphenol A (BPA), der Absorber von ultraviolettem Licht, Benzophenon 2 (BP2), und die Pestizide Linuron (LIN) und Procymidon (PROC). Es konnte *in vitro* nachgewiesen werden, dass BP2 und BPA an beide Östrogenrezeptoren bindet, DBP nur an den ER $\alpha$  und die beiden Antiandrogene an keinen Östrogenrezeptor. *In vivo* wirkten ausnahmslos alle Substanzen auf die Transkriptionsrate der Östrogenrezeptoren bzw. deren Synthese.

### Subkutanes Fettgewebe:

2. Beide ERs werden im subkutanen Fettgewebe exprimiert und unterliegen gut funktionierenden Regulationsmechanismen. Dabei divergiert im prozentrelativierten Direktvergleich die ER $\beta$  - Synthese von derjenigen des ER $\alpha$  um durchschnittlich 50%. Alle Tiergruppen vermehrten ihr Gewicht in Bezug zur E2 - Gruppe, was die proliferativen Eigenschaften des ER $\beta$  im Fettgewebe bestätigte und untermauerte. Die pluripotenten Aktivierungsmöglichkeiten der Östrogenrezeptorexpression *in vivo* veranschaulichten die Antiandrogene PROC und LIN eindrücklich, da sie im Ligandenbindungsassay keine Affinität zu beiden ERs zeigten.
3. Die Xenohormone modulierten dosisabhängig die AhR - Genexpression, was auf eine Anreicherung dieser Substanzen im subkutanen Fettgewebe schließen ließ. Ferner konnten die Versuchsergebnisse in Einklang mit der Fremdstoff - metabolisierenden Wirkung dieses Rezeptors gebracht werden, der gleichzeitig die Fähigkeit besaß, in die Modulation des ER $\alpha$  einzugreifen. Es ist nicht unwahrscheinlich, dass E2 als möglicher Antagonist die AhR - abhängige ER $\alpha$  - Regulierung inhibierte und die Xenohormone diese als potentielle Agonisten induzierten.

4. Mit Ausnahme von BP2 H induzierte jede Substanz die IGF - 1 - Syntheserate. Durch die gesteigerte IGF - 1 - Herstellung gelang es den Tieren eventuell, das subkutane Fettdepot aufzubauen und auf diese Weise zur Gewichtssteigerung beizutragen. Unter Umständen stand die reduzierte IGF - 1 - Expression mit der hohen BP2 - H - Substanzmenge in Zusammenhang.
5. Das Protoonkogen Wnt 10b wurde zwar synthetisiert, es konnten aber keine sicheren Interaktionsmechanismen im subkutanen Fettgewebe festgestellt werden.

#### Mesenteriales Fettgewebe:

6. Der Nachweis des ER $\beta$  gelang im mesenterialem Fettgewebe nicht zuverlässig und steht im Gegensatz zur Information des Literaturstudiums. Konsequenterweise wird die dominante Regulierung dieses Gewebes durch den ER $\alpha$  erwartet, der eindeutig exprimiert wurde.  
Der Vergleich von Kontrollgruppe und E2 - Gruppe lies keine Unterschiede in der ER $\alpha$  - Genexpression zu. Demnach besteht die Möglichkeit, dass dieses Fettgewebe der ovariectomierten Ratte eingeschränkt östrogensensibel ist und dessen Regulierung nur bedingt unterliegt.
7. Dem AhR kommen im mesenterialen Fettgewebe die Aufgaben der Entgiftung und der unterstützenden ER $\alpha$  - Synthese zu. Alle Substanzen konnten dort stark anfluten, was eventuell auf die gute Durchblutung und die Nähe zum Verdauungstrakt zurückzuführen ist.  
Im Gegensatz zu den anderen beiden Fettgewebsdepots induzierte auch E2 die Ah - Rezeptor - Genexpression. E2 könnte deshalb dosisabhängig die Rezeptor - Proliferation als Agonist oder Antagonist modulieren.
8. Ausnahmslos förderten alle Xenohormone die zelleigene IGF - 1 - Synthese, im Vergleich zur Kontrollgruppe jedoch ohne allzu große Unterschiede. Den ED war es deshalb substanz- und dosisabhängig möglich, die IGF - 1 - Expressionsrate zu beeinflussen. Eindeutige Abhängigkeiten zwischen der IGF - 1 - Transkriptionsmenge und der Größe des mesenterialen Fettgewebes konnten jedoch nicht erkannt werden.
9. Die signifikant reduzierte Wnt - 10b - Syntheserate unter E2 kann in Verbindung mit der geringen Futteraufnahme und dem daraus resultierenden kleinen Fettdepot gebracht werden. Der Umkehrschluss erklärt die signifikant gesteigerte Gensynthese unter BPA N und LIN N. Alle anderen Versuchsergebnisse deuten darauf hin, dass Wnt

10b zwar in Abhängigkeit von der Fettmasse exprimiert wird, jedoch in seiner Funktion unter Substanzbelastung beeinträchtigt ist.

#### Paratibiales Fettgewebe:

10. Das paratibiale Fettgewebe ist östrogensensibel und synthetisiert beide Östrogenrezeptoren. Alle im Versuch verwendeten Substanzen modulierten die Östrogenrezeptorexpression. E2, DPB N & H und BP2 N förderten die relative ER $\beta$  - Expression mehr als die des ER $\alpha$ . Alle anderen Umweltgifte forcierten die ER $\alpha$  - Proteinsynthese.
  
11. Bei der Betrachtung der relativen AhR - Expression nimmt das paratibiale Fettgewebsdepot die Mittelstellung ein. Sehr viele Xenohormone erreichten im Vergleich zur Kontrollgruppe das Signifikanzniveau. Dies lässt auf eine fein eingestellte Regulierung des Fremdstoffmetabolismus schließen.  
Linuron und BPA wirkten in hoher Dosierung paradox auf die AhR - Synthese, was in Beziehung mit der Überschreitung der maximalen Dosierungsspiegel für dieses Gewebe stehen könnte.
  
12. Die gewebeeigene IGF - 1 - Synthese der östrogen - ähnlichen Umweltgifte korrelierte sehr gut mit der Futteraufnahme, dem Körpergewicht und der paratibialen Fettmasse. Unter den Antiandrogenen Procymidon und Linuron war es nicht möglich, funktionierende Regelkreisläufe aufrecht zu erhalten.
  
13. Wie im subkutanen Fettgewebe reduzierte BP2 die Wnt - 10b - Synthese signifikant, DBP N stimulierte sie dagegen signifikant. Es konnten auch in diesem Gewebe keine eindeutigen Interferenzen zwischen Fettmasse und Wnt 10b unter Substanzbelastung festgestellt werden.  
Der rT - PCR - Nachweis dieses Protoonkogens konnte in keinem Fettgewebe aussagekräftige Erkenntnisse über den Fettstoffwechsel liefern.

#### Blutserum Parameter:

14. Allen Behandlungsgruppen war es möglich, relativ konstante Blutglukosespiegel innerhalb der Normwerte aufrechtzuerhalten. Zur Sicherstellung dieser Homöostase schwankten die Insulinspiegel enorm. Vermutlich waren die pankreatischen B - Zellen durch die Umweltgifte nicht geschädigt, sondern die Fähigkeit der Zellen, Glukose aufzunehmen.



15. Klar zu erkennen ist der Insulin - sensitivierende Effekt des IGF - 1 bei den Tieren, die mit Procymidon und Dibutylphthalat in hoher Dosierung behandelt wurden. Ferner reduzierte oral aufgenommenes Östrogen die zirkulierenden IGF - 1 - Serumspiegel, wie es die Literatur beschreibt. In Verbindung mit den Beobachtungen auf zellulärer Ebene und den signifikant gesteigerten Somatomedin - Spiegeln im Serum unter Linuron und Procymidon H ist eine starke hepatogene Wirkung dieser Substanzklassen nicht auszuschließen.
16. Das im Serum gemessene Leptin wird von Adipozyten synthetisiert und steigt mit zunehmender Fettmasse an. Dieser Regulationsmechanismus ist eindeutig in der ovx Kontrollgruppe mit dem höchsten Körpergewicht und dem ausgeprägtesten Leptinspiegel und in der Östrogengruppe mit den niedrigsten Parametern nachzuweisen. Alle anderen Substanzklassen unterliegen tendenziell den aufgezeigten Synthesemustern.

Abschließend kann festgehalten werden, dass alle im Versuch verwendeten Xenohormone in unterschiedlicher Weise auf die drei untersuchten Fettdepots wirkten. Die endokrinen Disruptoren waren ausnahmslos in der Lage, den Fettstoffwechsel zu beeinflussen. Jedes Fettpolster reagierte aber divergent auf die Substanzbelastung: Dies steht eventuell mit der Menge an angereichertem Xenohormon oder der Funktion des jeweiligen Fettspeichers in Verbindung.

ED, die im Ligandenbindungsassay weder an den ER $\alpha$  noch an den ER $\beta$  banden, vermochten dennoch in vivo über komplexe Mechanismen deren Rezeptorproliferation zu beeinflussen. Beispiele hierfür sind die Antiandrogene Procymidon und Linuron. Des Weiteren konnte über die Quantifizierung des Protoonkogens Wnt 10b keine befriedigende Aussage über die Größe des jeweiligen Fettspeichers gemacht werden. Wnt 10b eignete sich somit nicht als aussagekräftiger Screeningparameter der Fettgewebsgröße. Ferner rief keine Testsubstanz eine diabetogene Stoffwechsellaage hervor. Die Glukosewerte bewegten sich stets, reguliert durch die Menge an ausgeschüttetem Insulin, im Normbereich. Auch unter Substanzbelastung korrelierten die zirkulierenden Leptinwerte sehr gut mit der Fettgewebsmasse. Besonders eindrucksvoll konnte diese Beobachtung anhand des paratibialen Fettdepots demonstriert werden, welches sehr sensibel auf Östrogene und strukturell verwandte Substanzen reagiert.

In zahlreichen Publikationen wurde die Wirkung von ED auf den Menschen nachgewiesen. Deshalb sollten im Tierexperiment gezielt Dosis - Wirkungs - Beziehungen erstellt werden, die eine sichere Risikoabschätzung für den Menschen erlauben.

## 6 Methodischer Anhang

### 6.1 Primer- und Sondensequenzen

#### **AHR: (Lovekamp-Swan et al. 2003)**

sense - Primer: 5' – CAT CCT GGA AAT TCG AAC CAA – 3'

anti - sense - Primer: 5' – TGC AAG AAG CCG GAA AAC T – 3'

Sonde: 5'FAM – CGC AGA ATC CCA CAT CCG CAT GAT – TAMRA3'

#### **Östrogenrezeptor $\alpha$ : (Spreafico et al. 1992)**

sense - Primer: 5' – AAG CTG GCC TGA CTC TGC AG – 3'

anti - sense - Primer: 5' – GCA GGT CAT AGA GAG GCA CGA – 3'

Sonde: 5'FAM – CGT CTG GCC CAG CTC CTC CTC ATC – TAMRA3'

#### **Östrogenrezeptor $\beta$ : (Kuiper et al. 1996)**

sense - Primer: 5' – CTC TGT GTG AAG GCC ATG AT -3'

anti - sense - Primer:5' – GGA GAT ACC ACT CTT CGC AAT C – 3'

Sonde:5'FAM – ACG CGG TGA CAG ATG CCC TG – TAMRA3'

#### **IGF - 1: (Schoenfeld et al. 1998)**

sense - Primer: 5' TGT CGT CTT CAC ATC TCT TCT ACC TG – 3'

anti - sense - Primer: 5' – CCA CAC ACG AAC TGA AGA GCG T – 3'

Sonde: 5'FAM – TTA CCA GCT CGG CCA CAG CCG GAC – TAMRA3'

#### **Wnt 10b (Longo et al. 2004)**

sense - Primer: 5' – GAA CTG CTC GGC ACT AGA GG – 3'

anti – sense - Primer: 5' – AGC TCA CCA GCT TAC CCA AG – 3'

Sonde: 5'FAM – CCT TCT CCA TGC TGG CTG CT – TAMRA3'

### 6.2 Arbeitsanleitung Rat Insulin / IGF - 1 RIA Kit

Erster Tag: Für jede Probe, Standards und Qualitätskontrollen wurden non - specific - binding (NSB) tubes vorbereitet (im Kit mitgeliefert).

Nun pipettierte man auf die entsprechenden NSB - tubes entweder 100 $\mu$ l Standard, Qualitätskontrollen oder Proben und gleich im Anschluss 100 $\mu$ l J<sup>125</sup>- Insulin / IGF - 1, gefolgt von 100 $\mu$ l Ratten - Insulin / IGF - 1 - Antikörpern.

20 - 24 Stunden mussten die so vorbereiteten NSB - tubes bei 4°C inkubieren, nachdem sie gevortext wurden.

Zweiter Tag: Zum vorbereiteten Ansatz fügte man 1000µl precipitating Reagent zur Trennung von gebundenen und ungebundenen Antigenen.

Inkubation für 20 Minuten bei 4°C.

Jetzt wurden alle NSB - tubes für 20 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert, der Überstand dekantiert.

Im Anschluß bestückte man den Gamma - Counter (Automatik - Gamma - Counter, 1470 Wizard,P. Wallac GmbH, 79111 Freiburg) mit den jeweiligen NSB - tubes.

Der Gamma - Counter übernahm die Berechnung der Standardkurve und die Bestimmung der Hormonkonzentration voll automatisch.

### **6.3 Arbeitsanleitung Rat Leptin RIA Kit**

Erster Tag: Für jede Probe, Standards und Qualitätskontrollen wurden NSB - tubes vorbereitet (im Kit mitgeliefert) und mit 300µl Assay buffer befüllt.

Nun pipettierte man auf die entsprechenden NSB - tubes entweder 100µl Standard, Qualitätskontrollen oder Proben und gleich im Anschluss 100µl Ratten - Leptin - Antikörper.

20 - 24 Stunden mussten die so vorbereiteten NSB - tubes bei 4°C inkubieren, nachdem sie gevortex wurden.

Zweiter Tag: Zum vorbereiteten Ansatz fügte man 100µl J<sup>125</sup> - Ratten - Leptin.

Wieder wurden die Proben gevortex und inkubierten für weitere 20 - 24 Stunden bei Raumtemperatur.

Dritter Tag: Zum vorbereiteten Ansatz fügte man 1000µl precipitating Reagent zur Trennung von gebundenen und ungebundenen Antigenen.

Inkubation für 20 Minuten bei 4°C.

Jetzt wurden alle NSB - tubes für 20 Minuten bei 3000 UpM zentrifugiert, der Überstand dekantiert.

Im Anschluß bestückte man den Gamma - Counter (Automatik - Gamma - Counter, 1470 Wizard,P. Wallac GmbH, 79111 Freiburg) mit den jeweiligen NSB - Tubes.

Der Gamma - Counter übernahm die Berechnung der Standardkurve und die Bestimmung der Hormonkonzentration voll automatisch.

## 6.4 Inhaltsstoffe des sojafreien Haltungsfutters und des herkömmlichen Alleinfutters für Ratten

Tab. 8 gibt Auskunft über die Inhaltsstoffe des im Versuch verwendeten sojafreien Futtermittels für Ratten und die Inhaltsstoffe des herkömmlichen Alleinfutters für die Rattenhaltung.

### Inhaltsstoffe:

Inhaltsstoffe	sojafreies Futter	herkömmliches Futter
Rohprotein	19,0%	19,0%
Rohfett	3,3%	3,3%
Rohfaser	4,9%	4,9%
Rohasche	6,7%	6,7%
Calcium	1,0%	1,0%
Phosphor	0,7%	0,7%
Natrium	0,3%	0,25%
Magnesium	0,2%	0,2%
Kalium	0,9%	0,9%

### Aminosäuren:

Aminosäuren	sojafreies Futter	herkömmliches Futter
Lysin	1,00%	1,0%
Methionin	0,35%	0,30%
Cystin	0,30%	0,30%
Glycin	0,90%	0,90%
Leucin	1,00%	1,30%
Isoleucin	0,90%	0,70%
Arginin	1,00%	1,20%
Phenylalanin	0,80%	0,90%
Tryptophan	-	0,25%
Histidin	0,50%	0,50%
Tyrosin	-	0,60%
Asparaginsäure	-	1,70%
Glutaminsäure	-	3,80%
Valin	0,90%	0,90%
Threonin	-	0,70%

**Vitamine (je kg):**

<b>Vitamine</b>	<b>sojafreies Futter</b>	<b>herkömmliches Futter</b>
A	15.000 IE	15.000 IE
D3	1.000 IE	1.000 IE
E	100 mg	100 mg
B1	10 mg	10 mg
B2	20 mg	20 mg
B6	12 mg	12 mg
B12	80 mg	80 µg
Biotin	400 mg	400 µg
Pantothensäure	30 mg	30 mg
Cholin	1.600 mg	1.600 mg
Folsäure	4 mg	4 mg
Nikotinsäure	-	60 mg
K3	5 mg	5 mg
Inosit	-	50 mg

**Spurenelemente (je kg):**

<b>Spurenelemente</b>	<b>sojafreies Futter</b>	<b>herkömmliches Futter</b>
Mangan	90 mg	90 mg
Kupfer	12 mg	12 mg
Zink	75 mg	75 mg
Jod	2 mg	2 mg
Eisen	220 mg	220 mg
Selen	0,2 mg	0,2 mg
Kobalt	2 mg	2 mg

**Energie (in Millijoule je kg)**

<b>Energie</b>	<b>sojafreies Futter</b>	<b>herkömmliches Futter</b>
	12,2	12,2

**Artikelnummer:**

<b>Artikelnummer:</b>	<b>sojafreies Futter</b>	<b>herkömmliches Futter</b>
	S 8585 – S010	V 1534

Das Futter wurde über ssniff Spezialdiäten GmbH, Ferdinand – Gabriel Weg 16, D – 59494 Soest bezogen.

## 7 Literaturverzeichnis

- Adachi T, Yasuda K, Mori C, Yoshinaga M, Aoki N, Tsujimoto G, Tsuda K (2005): Promoting insulin secretion in pancreatic islets by means of bisphenol A and nonylphenol via intracellular estrogen receptors. *Food Chem Toxicol* **43**:713-9.
- Ahren B, Havel PJ (1999): Leptin inhibits insulin secretion induced by cellular cAMP in a pancreatic B cell line (INS-1 cells). *Am J Physiol* **277**:R959-66.
- Alonso-Magdalena P, Morimoto S, Ripoll C, Fuentes E, Nadal A (2006): The estrogenic effect of bisphenol A disrupts pancreatic beta-cell function in vivo and induces insulin resistance. *Environ Health Perspect* **114**:106-12.
- Anstead GM, Carlson KE, Katzenellenbogen JA (1997): The estradiol pharmacophore: ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids* **62**:268-303.
- Avram AS, Avram MM, James WD (2005): Subcutaneous fat in normal and diseased states: 2. Anatomy and physiology of white and brown adipose tissue. *J Am Acad Dermatol* **53**:671-83.
- Band PR, Le ND, Fang R, Deschamps M (2002): Carcinogenic and endocrine disrupting effects of cigarette smoke and risk of breast cancer. *Lancet* **360**:1044-9.
- Bardet PL, Laudet V, Vanacker JM (2006): Studying non-mammalian models? Not a fool's ERRand! *Trends Endocrinol Metab* **17**:166-71.
- Billiard SM, Timme-Laragy AR, Wassenberg DM, Cockman C, Di Giulio RT (2006): The role of the aryl hydrocarbon receptor pathway in mediating synergistic developmental toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to zebrafish. *Toxicol Sci* **92**:526-36.
- Blount BC, Silva MJ, Caudill SP, Needham LL, Pirkle JL, Sampson EJ, Lucier GW, Jackson RJ, Brock JW (2000): Levels of seven urinary phthalate metabolites in a human reference population. *Environ Health Perspect* **108**:979-82.
- Bluher S, Kratzsch J, Kiess W (2005): Insulin-like growth factor I, growth hormone and insulin in white adipose tissue. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* **19**:577-87.
- Bowman CJ, Turner KJ, Sar M, Barlow NJ, Gaido KW, Foster PM (2005): Altered gene expression during rat Wolffian duct development following di(n-butyl) phthalate exposure. *Toxicol Sci* **86**:161-74.
- Boyd GR, Palmeri JM, Zhang S, Grimm DA (2004): Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) and endocrine disrupting chemicals (EDCs) in stormwater canals and Bayou St. John in New Orleans, Louisiana, USA. *Sci Total Environ* **333**:137-48.
- Brinkmann AO (1994): Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. *J Pediatr Endocrinol* **7**:275-82.
- Brodie AM (1979): Recent advances in studies on estrogen biosynthesis. *J Endocrinol Invest* **2**:445-60.
- Brzozowski AM, Pike AC, Dauter Z, Hubbard RE, Bonn T, Engstrom O, Ohman L, Greene GL, Gustafsson JA, Carlquist M (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor. *Nature* **389**:753-8.
- Butler AA, LeRoith D (2001): Minireview: tissue-specific versus generalized gene targeting of the igf1 and igf1r genes and their roles in insulin-like growth factor physiology. *Endocrinology* **142**:1685-8.
- Carson R: *Silent Spring*. 1. Auflage; Houghton Mifflin Verlag, Boston 1962.
- Chen CW (2001): Assessment of endocrine disruptors: approaches, issues, and uncertainties. *Folia Histochem Cytobiol* **39 Suppl 2**:20-3.
- Chen G, Bunce NJ (2004): Interaction between halogenated aromatic compounds in the Ah receptor signal transduction pathway. *Environ Toxicol* **19**:480-9.
- Cheng Z, Rios GR, King CD, Coffman BL, Green MD, Mojarrabi B, Mackenzie PI, Tephly TR (1998): Glucuronidation of catechol estrogens by expressed human UDP-glucuronosyltransferases (UGTs) 1A1, 1A3, and 2B7. *Toxicol Sci* **45**:52-7.
- Chhabra RS (2000): NTP technical report on the toxicity studies of benzophenone (CAS No. 119-61-9). Administered in feed to F344/N rats and B6C3F mice. *Toxic Rep Ser* **61**:1-53, A1-13.

- Christodoulides C, Scarda A, Granzotto M, Milan G, Dalla Nora E, Keogh J, De Pergola G, Stirling H, Pannacciulli N, Sethi JK et al. (2006): WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia* 49:678-84.
- Colborn T, Dumanoski D, Meyers JP: *Our Stolen Future*. 1. Auflage; Penguin Books USA Inc., New York 1997.
- Collingwood TN, Urnov FD, Wolffe AP (1999): Nuclear receptors: coactivators, corepressors and chromatin remodeling in the control of transcription. *J Mol Endocrinol* 23:255-75.
- Colon I, Caro D, Bourdony CJ, Rosario O (2000): Identification of phthalate esters in the serum of young Puerto Rican girls with premature breast development. *Environ Health Perspect* 108:895-900.
- Darbre PD (2005): Aluminium, antiperspirants and breast cancer. *J Inorg Biochem* 99:1912-9.
- Date Y, Murakami N, Kojima M, Kuroiwa T, Matsukura S, Kangawa K, Nakazato M (2000): Central effects of a novel acylated peptide, ghrelin, on growth hormone release in rats. *Biochem Biophys Res Commun* 275:477-80.
- Deblois G, Giguere V (2003): Ligand-independent coactivation of ERalpha AF-1 by steroid receptor RNA activator (SRA) via MAPK activation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 85:123-31.
- Diel P, Schmidt S, Vollmer G, Janning P, Upmeier A, Michna H, Bolt HM, Degen GH (2004): Comparative responses of three rat strains (DA/Han, Sprague-Dawley and Wistar) to treatment with environmental estrogens. *Arch Toxicol* 78:183-93.
- Dieudonne MN, Leneuve MC, Giudicelli Y, Pecquery R (2004): Evidence for functional estrogen receptors alpha and beta in human adipose cells: regional specificities and regulation by estrogens. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C655-61.
- Eertmans F, Dhooge W, Stuyvaert S, Comhaire F (2003): Endocrine disruptors: effects on male fertility and screening tools for their assessment. *Toxicol In Vitro* 17:515-24.
- Ema M (2002): Antiandrogenic effects of dibutyl phthalate and its metabolite, monobutyl phthalate, in rats. *Congenit Anom (Kyoto)* 42:297-308.
- Escuderos-Morenas ML, Santos-Delgado MJ, Rubio-Barroso S, Polo-Diez LM (2003): Direct determination of monolinuron, linuron and chlorbromuron residues in potato samples by gas chromatography with nitrogen-phosphorus detection. *J Chromatogr A* 1011:143-53.
- Falconer IR, Chapman HF, Moore MR, Ranmuthugala G (2006): Endocrine-disrupting compounds: A review of their challenge to sustainable and safe water supply and water reuse. *Environ Toxicol* 21:181-91.
- Fan X, Bradbury MW, Berk PD (2003): Leptin and insulin modulate nutrient partitioning and weight loss in ob/ob mice through regulation of long-chain fatty acid uptake by adipocytes. *J Nutr* 133:2707-15.
- Ferro P, Forlani A, Muselli M, Pfeffer U (2003): Alternative splicing of the human estrogen receptor alpha primary transcript: mechanisms of exon skipping. *Int J Mol Med* 12:355-63.
- Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH (1996): Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril* 65:1009-14.
- Frasor J, Barnett DH, Danes JM, Hess R, Parlow AF, Katzenellenbogen BS (2003): Response-specific and ligand dose-dependent modulation of estrogen receptor (ER) alpha activity by ERbeta in the uterus. *Endocrinology* 144:3159-66.
- Fruhbeck G, Gomez-Ambrosi J (2002): Depot-specific differences in the lipolytic effect of leptin on isolated white adipocytes. *Med Sci Monit* 8:BR47-55.
- Gelbke HP, Kayser M, Poole A (2004): OECD test strategies and methods for endocrine disruptors. *Toxicology* 205:17-25.
- Gershwin ME, Selmi C, Worman HJ, Gold EB, Watnik M, Utts J, Lindor KD, Kaplan MM, Vierling JM (2005): Risk factors and comorbidities in primary biliary cirrhosis: a controlled interview-based study of 1032 patients. *Hepatology* 42:1194-202.
- Giguere V (2002): To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 13:220-5.

- Gill MS (2006): Endocrine targets for pharmacological intervention in aging in *Caenorhabditis elegans*. *Aging Cell* 5:23-30.
- Gray LE, Jr., Laskey J, Ostby J (2006): Chronic Di(n)butyl Phthalate Exposure Rats Reduces Fertility and Alters Ovarian Function During Pregnancy in Female Long Evans Hooded Rats. *Toxicol Sci* 93:189-95.
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986): Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231:1150-4.
- Gruber CJ, Gruber DM, Gruber IM, Wieser F, Huber JC (2004): Anatomy of the estrogen response element. *Trends Endocrinol Metab* 15:73-8.
- Guerre-Millo M (2002): Adipose tissue hormones. *J Endocrinol Invest* 25:855-61.
- Guillette LJ, Jr., Gross TS, Masson GR, Matter JM, Percival HF, Woodward AR (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ Health Perspect* 102:680-8.
- Guillette LJ, Jr., Vonier PM, McLachlan JA (2002): Affinity of the alligator estrogen receptor for serum pesticide contaminants. *Toxicology* 181-182:151-4.
- Guzelian PS (1982): Comparative toxicology of chlordecone (Kepone) in humans and experimental animals. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 22:89-113.
- Habas R (2006): Canonical wnt signaling: an unexpected new player. *Dev Cell* 11:138-9.
- Helterbrand JD, Higgs RE, Jr., Iversen PW, Tysarczyk-Niemeyer G, Sato M (1997): Application of automatic image segmentation to tibiae and vertebrae from ovariectomized rats. *Bone* 21:401-9.
- Ho KK, Gibney J, Johannsson G, Wolthers T (2006): Regulating of growth hormone sensitivity by sex steroids: implications for therapy. *Front Horm Res* 35:115-28.
- Hong EJ, Ji YK, Choi KC, Manabe N, Jeung EB (2005): Conflict of estrogenic activity by various phthalates between in vitro and in vivo models related to the expression of Calbindin-D9k. *J Reprod Dev* 51:253-63.
- Hoyer PB (2001): Reproductive toxicology: current and future directions. *Biochem Pharmacol* 62:1557-64.
- Jeffrey SF: *Harrison's Principles of Internal Medicine*. 15. Auflage; Dietel, M., Berlin 2003.
- Jen JF, Liu TC (2006): Determination of phthalate esters from food-contacted materials by on-line microdialysis and liquid chromatography. *J Chromatogr A* 13:28-33.
- Jensen EV (1962): On the mechanism of estrogen action. *Perspect Biol Med* 6:47-59.
- Kang IH, Kim HS, Shin JH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Choi KS, Kil KS, Park YI, Dong MS et al. (2004): Comparison of anti-androgenic activity of flutamide, vinclozolin, procymidone, linuron, and p, p'-DDE in rodent 10-day Hershberger assay. *Toxicology* 199:145-59.
- Kanno J (2000): [In vivo test for endocrine disruptors]. *Nippon Rinsho* 58:2495-501.
- Kato H, Furuhashi T, Tanaka M, Katsu Y, Watanabe H, Ohta Y, Iguchi T (2006): Effects of bisphenol A given neonatally on reproductive functions of male rats. *Reprod Toxicol* 22:20-9.
- Kavlock RJ, Ankley GT (1996): A perspective on the risk assessment process for endocrine-disruptive effects on wildlife and human health. *Risk Anal* 16:731-9.
- Kim HK, Nelson-Dooley C, Della-Fera MA, Yang JY, Zhang W, Duan J, Hartzell DL, Hamrick MW, Baile CA (2006): Genistein decreases food intake, body weight, and fat pad weight and causes adipose tissue apoptosis in ovariectomized female mice. *J Nutr* 136:409-14.
- Kim HS, Kang TS, Kang IH, Kim TS, Moon HJ, Kim IY, Ki H, Park KL, Lee BM, Yoo SD et al. (2005): Validation study of OECD rodent uterotrophic assay for the assessment of estrogenic activity in Sprague-Dawley immature female rats. *J Toxicol Environ Health A* 68:2249-62.
- Kim YH, Lee J (2005): Enzymatic degradation of dibutyl phthalate and toxicity of its degradation products. *Biotechnol Lett* 27:635-9.
- Kitabchi AE (1977): Proinsulin and C-peptide: a review. *Metabolism* 26:547-87.



- Knerr I, Herzog D, Rauh M, Rascher W, Horbach T (2006): Leptin and ghrelin expression in adipose tissues and serum levels in gastric banding patients. *Eur J Clin Invest* 36:389-94.
- Koda T, Umezu T, Kamata R, Morohoshi K, Ohta T, Morita M (2005): Uterotrophic effects of benzophenone derivatives and a p-hydroxybenzoate used in ultraviolet screens. *Environ Res* 98:40-5.
- Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA (1996): Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:5925-30.
- Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997): Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138:863-70.
- Kurosawa T, Hiroi H, Tsutsumi O, Ishikawa T, Osuga Y, Fujiwara T, Inoue S, Muramatsu M, Momoeda M, Taketani Y (2002): The activity of bisphenol A depends on both the estrogen receptor subtype and the cell type. *Endocr J* 49:465-71.
- Lambright C, Ostby J, Bobseine K, Wilson V, Hotchkiss AK, Mann PC, Gray LE, Jr. (2000): Cellular and molecular mechanisms of action of linuron: an antiandrogenic herbicide that produces reproductive malformations in male rats. *Toxicol Sci* 56:389-99.
- Landel CC, Kushner PJ, Greene GL (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7:23-8.
- Landrigan P, Garg A, Droller DB (2003): Assessing the effects of endocrine disruptors in the National Children's Study. *Environ Health Perspect* 111:1678-82.
- Lee MJ, Fried SK (2006): Multilevel regulation of leptin storage, turnover and secretion by feeding and insulin in rat adipose tissue. *J Lipid Res*.
- Leung KC, Johannsson G, Leong GM, Ho KK (2004): Estrogen regulation of growth hormone action. *Endocr Rev* 25:693-721.
- Lindberg MK, Moverare S, Skrtic S, Gao H, Dahlman-Wright K, Gustafsson JA, Ohlsson C (2003): Estrogen receptor (ER)-beta reduces ERalpha-regulated gene transcription, supporting a "ying yang" relationship between ERalpha and ERbeta in mice. *Mol Endocrinol* 17:203-8.
- Liu S, Abdelrahim M, Khan S, Ariazi E, Jordan VC, Safe S (2006): Aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells. *Biol Chem* 387:1209-13.
- Löffler G, Petrides PE: *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage; Springer Verlag, Berlin 2003.
- Longo KA, Wright WS, Kang S, Gerin I, Chiang SH, Lucas PC, Opp MR, MacDougald OA (2004): Wnt10b inhibits development of white and brown adipose tissues. *J Biol Chem* 279:35503-9.
- Louveau I, Gondret F (2004): Regulation of development and metabolism of adipose tissue by growth hormone and the insulin-like growth factor system. *Domest Anim Endocrinol* 27:241-55.
- Lovekamp-Swan T, Jetten AM, Davis BJ (2003): Dual activation of PPARalpha and PPARgamma by mono-(2-ethylhexyl) phthalate in rat ovarian granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 201:133-41.
- Lu D, Zhao Y, Tawatao R, Cottam HB, Sen M, Leoni LM, Kipps TJ, Corr M, Carson DA (2004): Activation of the Wnt signaling pathway in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3118-23.
- Mathew LK, Andreasen EA, Tanguay RL (2006): Aryl hydrocarbon receptor activation inhibits regenerative growth. *Mol Pharmacol* 69:257-65.
- Matsuzaki S, Murakami T, Uehara S, Canis M, Sasano H, Okamura K (2001): Expression of estrogen receptor alpha and beta in peritoneal and ovarian endometriosis. *Fertil Steril* 75:1198-205.
- Mauras N, Haymond MW (2005): Are the metabolic effects of GH and IGF-I separable? *Growth Horm IGF Res* 15:19-27.
- Mayes JS, Watson GH (2004): Direct effects of sex steroid hormones on adipose tissues and obesity. *Obes Rev* 5:197-216.

- McIntyre BS, Barlow NJ, Foster PM (2002): Male rats exposed to linuron in utero exhibit permanent changes in anogenital distance, nipple retention, and epididymal malformations that result in subsequent testicular atrophy. *Toxicol Sci* 65:62-70.
- Meier JJ, Kjemis LL, Veldhuis JD, Lefebvre P, Butler PC (2006): Postprandial suppression of glucagon secretion depends on intact pulsatile insulin secretion: further evidence for the intraislet insulin hypothesis. *Diabetes* 55:1051-6.
- Meinders AE, Toornvliet AC, Pijl H (1996): Leptin. *Neth J Med* 49:247-52.
- Mikamo E, Harada S, Nishikawa J, Nishihara T (2003): Endocrine disruptors induce cytochrome P450 by affecting transcriptional regulation via pregnane X receptor. *Toxicol Appl Pharmacol* 193:66-72.
- Milnes MR, Woodward AR, Rooney AA, Guillette LJ (2002): Plasma steroid concentrations in relation to size and age in juvenile alligators from two Florida lakes. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 131:923-30.
- Moriarty K, Kim KH, Bender JR (2006): Estrogen Receptor-mediated Rapid Signaling. *Endocrinology* 147:5557-63.
- Munoz-de-Toro M, Beldomenico HR, Garcia SR, Stoker C, De Jesus JJ, Beldomenico PM, Ramos JG, Luque EH (2006): Organochlorine levels in adipose tissue of women from a littoral region of Argentina. *Environ Res* 102:107-12.
- Naaz A, Zakroczymski M, Heine P, Taylor J, Saunders P, Lubahn D, Cooke PS (2002): Effect of ovariectomy on adipose tissue of mice in the absence of estrogen receptor alpha (ERalpha): a potential role for estrogen receptor beta (ERbeta). *Horm Metab Res* 34:758-63.
- Nagami H (1996): Fungicide procymidone residue in agriculture land. *Bull Environ Contam Toxicol* 56:594-8.
- Nelson LR, Bulun SE (2001): Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol* 45:S116-24.
- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA (2001): Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 81:1535-65.
- O'Connor JC, Frame SR, Ladics GS (2002): Evaluation of a 15-day screening assay using intact male rats for identifying antiandrogens. *Toxicol Sci* 69:92-108.
- Ostby J, Kelce WR, Lambright C, Wolf CJ, Mann P, Gray LE, Jr. (1999): The fungicide procymidone alters sexual differentiation in the male rat by acting as an androgen-receptor antagonist in vivo and in vitro. *Toxicol Ind Health* 15:80-93.
- Pace P, Taylor J, Suntharalingam S, Coombes RC, Ali S (1997): Human estrogen receptor beta binds DNA in a manner similar to and dimerizes with estrogen receptor alpha. *J Biol Chem* 272:25832-8.
- Paech K, Webb P, Kuiper GG, Nilsson S, Gustafsson J, Kushner PJ, Scanlan TS (1997): Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 277:1508-10.
- Pedersen SB, Bruun JM, Hube F, Kristensen K, Hauner H, Richelsen B (2001): Demonstration of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human adipose tissue: influences of adipose cell differentiation and fat depot localization. *Mol Cell Endocrinol* 182:27-37.
- Pedersen SB, Kristensen K, Hermann PA, Katzenellenbogen JA, Richelsen B (2004): Estrogen controls lipolysis by up-regulating alpha2A-adrenergic receptors directly in human adipose tissue through the estrogen receptor alpha. Implications for the female fat distribution. *J Clin Endocrinol Metab* 89:1869-78.
- Pettersson K, Delaunay F, Gustafsson JA (2000): Estrogen receptor beta acts as a dominant regulator of estrogen signaling. *Oncogene* 19:4970-8.
- Poola I, Abraham J, Baldwin K (2002): Identification of ten exon deleted ERbeta mRNAs in human ovary, breast, uterus and bone tissues: alternate splicing pattern of estrogen receptor beta mRNA is distinct from that of estrogen receptor alpha. *FEBS Lett* 516:133-8.

- Radice S, Chiesara E, Frigerio S, Fumagalli R, Parolaro D, Rubino T, Marabini L (2006): Estrogenic effect of procymidone through activation of MAPK in MCF-7 breast carcinoma cell line. *Life Sci* 78:2716-23.
- Ramadoss P, Perdew GH (2005): The transactivation domain of the Ah receptor is a key determinant of cellular localization and ligand-independent nucleocytoplasmic shuttling properties. *Biochemistry* 44:11148-59.
- Rodriguez AL, Tamrazi A, Collins ML, Katzenellenbogen JA (2004): Design, synthesis, and in vitro biological evaluation of small molecule inhibitors of estrogen receptor alpha coactivator binding. *J Med Chem* 47:600-11.
- Rodriguez R, Boyer I, Font G, Pico Y (2001): Capillary zone electrophoresis for the determination of thiabendazole, prochloraz and procymidone in grapes. *Analyst* 126:2134-8.
- Rodriguez-Cuenca S, Monjo M, Proenza AM, Roca P (2005): Depot differences in steroid receptor expression in adipose tissue: possible role of the local steroid milieu. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 288:E200-7.
- Rowlands JC, McEwan IJ, Gustafsson JA (1996): Trans-activation by the human aryl hydrocarbon receptor and aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator proteins: direct interactions with basal transcription factors. *Mol Pharmacol* 50:538-48.
- Saitoh T, Kirikoshi H, Mine T, Katoh M (2001): Proto-oncogene WNT10B is up-regulated by tumor necrosis factor alpha in human gastric cancer cell line MKN45. *Int J Oncol* 19:1187-92.
- Sanders SL, Stouffer RL, Brannian JD (1996): Androgen production by monkey luteal cell subpopulations at different stages of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 81:591-6.
- Sapone A, Affatato A, Canistro D, Broccoli M, Trespidi S, Pozzetti L, Biagi GL, Cantelli-Forti G, Paolini M (2003): Induction and suppression of cytochrome P450 isoenzymes and generation of oxygen radicals by procymidone in liver, kidney and lung of CD1 mice. *Mutat Res* 527:67-80.
- 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 and uterus of female rats. *Arch Toxicol* 80:656-61.
- Schlumpf M, Jarry H, Wuttke W, Ma R, Lichtensteiger W (2004): Estrogenic activity and estrogen receptor beta binding of the UV filter 3-benzylidene camphor. Comparison with 4-methylbenzylidene camphor. *Toxicology* 199:109-20.
- Schoenfeld JR, Vasser M, Jhurani P, Ng P, Hunter JJ, Ross J, Jr., Chien KR, Lowe DG (1998): Distinct molecular phenotypes in murine cardiac muscle development, growth, and hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol* 30:2269-80.
- Seidlova-Wuttke D: Vergleich der Wirkungen von Estradiol und fünf endokrinen Disruptoren in ovariectomierten Ratten. *Med. Diss. Göttingen* 2004.
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Becker T, Christoffel V, Wuttke W (2003): Pharmacology of *Cimicifuga racemosa* extract BNO 1055 in rats: bone, fat and uterus. *Maturitas* 44 Suppl 1:S39-50.
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Wuttke W (2004): Pure estrogenic effect of benzophenone-2 (BP2) but not of bisphenol A (BPA) and dibutylphthalate (DBP) in uterus, vagina and bone. *Toxicology* 205:103-12.
- 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* 213:13-24.
- ShIPLEY JM, Waxman DJ (2006): Aryl hydrocarbon receptor-independent activation of estrogen receptor-dependent transcription by 3-methylcholanthrene. *Toxicol Appl Pharmacol* 213:87-97.
- Sonnenschein C, Soto AM (1998): An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *J Steroid Biochem Mol Biol* 65:143-50.

- Sovadinova I, Blaha L, Janosek J, Hilscherova K, Giesy JP, Jones PD, Holoubek I (2006): Cytotoxicity and aryl hydrocarbon receptor-mediated activity of n-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons: structure-activity relationships. *Environ Toxicol Chem* 25:1291-7.
- Spreafico E, Bettini E, Pollio G, Maggi A (1992): Nucleotide sequence of estrogen receptor cDNA from Sprague-Dawley rat. *Eur J Pharmacol* 227:353-6.
- Stauder M, Weyerstahl T: Gynäkologie und Geburtshilfe. 2. Auflage; MLP, Duale Reihe, stuttgart 2005.
- Svechnikov K, Supornsilchai V, Strand ML, Wahlgren A, Seidlova-Wuttke D, Wuttke W, Soder O (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* 187:117-24.
- Tabb MM, Blumberg B (2006): New modes of action for endocrine-disrupting chemicals. *Mol Endocrinol* 20:475-82.
- Tabira Y, Nakai M, Asai D, Yakabe Y, Tahara Y, Shinmyozu T, Noguchi M, Takatsuki M, Shimohigashi Y (1999): Structural requirements of para-alkylphenols to bind to estrogen receptor. *Eur J Biochem* 262:240-5.
- Tanaka N, Nomura Y, Nishikiori R, Shibata S, Shirai K, Fujitani M (2005): Temporary restorative resins using non-phthalate ester plasticizers. *J Dent* 33:577-83.
- Tchernof A, Belanger C, Morisset AS, Richard C, Mailloux J, Laberge P, Dupont P (2006): Regional differences in adipose tissue metabolism in women: minor effect of obesity and body fat distribution. *Diabetes* 55:1353-60.
- Trayhurn P (2005): The biology of obesity. *Proc Nutr Soc* 64:31-8.
- Turner KJ, McIntyre BS, Phillips SL, Barlow NJ, Bowman CJ, Foster PM (2003): Altered gene expression during rat Wolffian duct development in response to in utero exposure to the antiandrogen linuron. *Toxicol Sci* 74:114-28.
- Van Zutphen LFM, Baumans V, Beynen AC: Grundlage der Versuchstierkunde. 1. Auflage; Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, New York 1995.
- Veldhuis JD (2003): A tripeptidyl ensemble perspective of interactive control of growth hormone secretion. *Horm Res* 60:86-101.
- Vivacqua A, Recchia AG, Fasanella G, Gabriele S, Carpino A, Rago V, Di Gioia ML, Leggio A, Bonofiglio D, Liguori A et al. (2003): The food contaminants bisphenol A and 4-nonylphenol act as agonists for estrogen receptor alpha in MCF7 breast cancer cells. *Endocrine* 22:275-84.
- Wallace OB, Richardson TI, Dodge JA (2003): Estrogen receptor modulators: relationships of ligand structure, receptor affinity and functional activity. *Curr Top Med Chem* 3:1663-82.
- Weatherman RV, Scanlan TS (2001): Unique protein determinants of the subtype-selective ligand responses of the estrogen receptors (ERalpha and ERbeta) at AP-1 sites. *J Biol Chem* 276:3827-32.
- Whitehead SA, Rice S (2006): Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20:45-61.
- Wiseman A (2005): Oestrogen-receptors (ER) are likely to be promiscuous: wider role for oestrogens and mimics. *Med Hypotheses* 65:760-5.
- Wormke M, Stoner M, Saville B, Walker K, Abdelrahim M, Burghardt R, Safe S (2003): The aryl hydrocarbon receptor mediates degradation of estrogen receptor alpha through activation of proteasomes. *Mol Cell Biol* 23:1843-55.
- Yamasaki K, Takeyoshi M, Sawaki M, Imatanaka N, Shinoda K, Takatsuki M (2003): Immature rat uterotrophic assay of 18 chemicals and Hershberger assay of 30 chemicals. *Toxicology* 183:93-115.
- Yamasaki K, Ohta R, Okuda H (2006): OECD validation of the Hershberger assay in Japan: Phase 3. Blind study using coded chemicals. *Toxicol Lett* 163:121-9.
- Yoshihara S, Mizutare T, Makishima M, Suzuki N, Fujimoto N, Igarashi K, Ohta S (2004): Potent estrogenic metabolites of bisphenol A and bisphenol B formed by rat liver S9 fraction: their structures and estrogenic potency. *Toxicol Sci* 78:50-9.

- Yoshinari K, Sato T, Okino N, Sugatani J, Miwa M (2004): Expression and induction of cytochromes p450 in rat white adipose tissue. *J Pharmacol Exp Ther* 311:147-54.
- Yoshinari K, Okino N, Sato T, Sugatani J, Miwa M (2006): Induction of detoxifying enzymes in rodent white adipose tissue by aryl hydrocarbon receptor agonists and antioxidants. *Drug Metab Dispos* 34:1081-9.
- Yuen EH, Goold RD, Wilson BJ (1985): Effect of some synthetic steroids on rat liver function. *Steroids* 45:53-72.
- Yuen KC, Dunger DB (2006): Impact of treatment with recombinant human GH and IGF-I on visceral adipose tissue and glucose homeostasis in adults. *Growth Horm IGF Res* 16 Suppl A:S55-61.
- Zacharewski T (1998): Identification and assessment of endocrine disruptors: limitations of in vivo and in vitro assays. *Environ Health Perspect* 106 Suppl 2:577-82.

## 8 Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1 BP2, BPA und DBP haben wenig Strukturähnlichkeit zu E2. Diese Xenohormone können aber dennoch mit einer gewissen Affinität an die Östrogenrezeptoren binden. Ermöglicht wird dies vor allem durch die rot markierten Strukturen. PROC und LIN sind Androgenrezeptor - Antagonisten und können nicht an die ERs koppeln (Seidlova-Wuttke 2004, Seite 11). ..... 21
- Abb. 2 Die Körpergewichte der ovx Kontrolltiere waren signifikant höher als die der E2 - behandelten Tiere. Im Vergleich zu den Kontrolltieren reduzierten BP2 und LIN das Körpergewicht signifikant in hoher und niedriger Dosis, DBP nur in hoher. Statistisch nicht signifikant waren die geringfügigen Gewichtsverminderungen unter BPA N & H und PROC N & H sowie DBP N. \*P<0,05 versus ovx, # P<0,05 versus präovx. .... 39
- Abb. 3 Durchschnittlich nahmen die ovx Kontrolltiere am meisten Kalorien zu sich und die E2 - behandelten am wenigsten. Alle anderen Substanzgruppen lagen dazwischen, wobei die LIN - H - und BP2 - H - Ratten ebenfalls wenig gefressen haben. .... 40
- Abb. 4 Das ER $\alpha$  - Transkript war unter E2 und BP2 H erniedrigt. Die übrigen Substanzen stimulierten die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . \*P<0,05 versus ovx. .... 41
- Abb. 5 E2 verminderte die Genexpression des Östrogenrezeptors  $\beta$  geringfügig, während alle anderen Substanzklassen dessen Synthese förderten. \*P<0,05 versus ovx. .... 42
- Abb. 6 E2 inhibierte, alle anderen Substanzen förderten die Synthese des Ah - Rezeptors; Linuron in hoher Dosierung sogar signifikant. \*P<0,05 versus ovx. .... 43
- Abb. 7 E2 zeigte keine Wirkung auf die IGF - 1 - Synthese, BP2 H eine verminderte. Signifikant stimulierten DBP N & H und LIN H, während BPA und PROC in beiden, BP2 und LIN in niedriger Dosierung keine signifikante Steigerung der IGF - 1 Transkriptionsrate erreichten. \*P<0,05 versus ovx. .... 44
- Abb. 8 Allein BP2 H verminderte signifikant die Expression von Wnt 10b. Alle anderen endokrinen Disruptoren steigerten sie; BP2 N sowie PROC N & H signifikant. \*P<0,05 versus ovx. .... 45
- Abb. 9 Die Kontrollgruppe konnte den mesenterialen Fettanteil nach Ovariectomie signifikant steigern. Reduzierenden Einfluss auf dieses Fettgewebe nahmen sowohl die E2 - als auch die BP2 - H - Behandlungsgruppen. Nicht nennenswert veränderte sich der Fettanteil unter PROC H und LIN H. Alle übrigen Substanzklassen stimulierten die Fettgewebeproliferation signifikant. \*P<0,05 versus ovx; #P<0,05 versus präovx. .... 46
- Abb. 10 Mit Ausnahme von E2 förderten alle Umweltgifte die ER $\alpha$  - Transkriptionsrate in unterschiedlicher Intensität. BPA, BP2 und PROC in hoher und LIN in niedriger Dosierung stimulierten die Genexpression dieses Östrogenrezeptors signifikant. \*P<0,05 versus ovx. .... 47
- Abb. 11 Die Quantifizierung der ER $\beta$  - Syntheserate im FM gestaltete sich schwierig. Die statistische Auswertung der PCR - Ergebnisse lieferte hohe Standardabweichungen und zeigte keine Signifikanzen. LIN in hoher Dosis und E2 reduzierten die Rezeptorexpression, die übrigen Substanzen erhöhten sie in unterschiedlicher Weise. \*P<0,05 versus ovx. .... 48
- Abb. 12 Ausnahmslos förderten alle Substanzgruppen die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors. Signifikante Syntheseraten erzielte Linuron in beiden Dosierungen. \*P<0,05 versus ovx. .... 49
- Abb. 13 Abgesehen von E2 förderten alle verwendeten Umweltgifte die IGF - 1 - Genexpression in ähnlichem Umfang, wobei BPA H die stärkste Wirkung zeigte. Signifikanzen wiesen E2 und PROC H auf. \*P<0,05 versus ovx. .... 50
- Abb. 14 Dosisabhängige inverse Effekte zeigten alle Substanzklassen mit Ausnahme des Fungizids Procymidon. Dabei stimulierten die niedrigen Dosierungen die Wnt - 10b - Genexpression in ausgeprägterer Form als die hohen. Die Transkriptmenge von BPA N und LIN N bzw. von E2 war signifikant stimuliert bzw. gehemmt. \*P<0,05 versus ovx. .... 51
- Abb. 15 Auf Höhe der tibialen Metaphyse war die Größe des paratibialen Fettdepots drei Monate nach Ovariectomie signifikant größer als zu Versuchsbeginn. Unter der Behandlung mit E2, BP2 N & H und LIN H konnte die Fettzunahme im Vergleich zu den ovx Tieren signifikant vermindert werden. Alle anderen Substanzgruppen vermehrten ihr paratibiales Fettpolster enorm. \*P<0,05 versus ovx; #P<0,05 versus präovx. .... 52
- Abb. 16 Ausnahmslos steigerten alle verwendeten Substanzen die Genexpression des ER $\alpha$ . Am geringsten war der Einfluss von E2 gefolgt von DBP, welches in beiden Dosierungen mit sehr ähnlicher Intensität wirkte. Jeweils in niedriger Dosierung erzielten BPA und LIN, und in beiden PROC einen signifikanten Anstieg des Östrogenrezeptors  $\alpha$ . \*P<0,05 versus ovx. .... 53
- Abb. 17 E2 stimulierte in ausgeprägter Form die Genexpression des ER $\beta$ . Ähnlich hohe Effekte erzielten BPA H, DBP N und BP2 N. Sowohl der UV - Filter Benzophenon 2 als auch das Herbizid Linuron erreichten in niedriger Dosierung eine höhere ER $\beta$  - Amplifikationsrate als in

	hoher. PROC wirkte in beiden Dosierungen gleich auf die Syntheseaktivität des Östrogenrezeptors und BPA N in geringstem Maße. Signifikant stimulierten die dargereicherten Applikationsmengen des DBP die Syntheseleistung. *P<0,05 versus ovx. ....	54
Abb. 18	Mit Ausnahme von E2 stimulierten alle Testsubstanzen die Genexpression des Aryl - hydrocarbon - Rezeptors. Signifikant konnte sie durch DBP und LIN N, PROC H und BP2 N & H gesteigert werden. Alle übrigen endokrinen Disruptoren induzierten die Genamplifikation dosisabhängig, wobei BPA und LIN in niedriger Dosierung ausgeprägtere Effekte erzielten als in hoher. DBP H und PROC N förderten die Zunahme der Rezeptorsynthese nicht signifikant. *P<0,05 versus ovx. ....	55
Abb. 19	Zahlreiche endokrine Disruptoren steigerten die IGF - 1 - Synthese signifikant. Zu ihnen gehörten BPA N & H, DBP N & H, BP2 N, PROC N und LIN H. Nicht signifikante und weitaus geringere Effekte riefen BP2 und PROC in hoher und LIN in niedriger Dosierung hervor. E2 verringerte geringfügig die Transkriptionsrate des IGF - 1. *P<0,05 versus ovx. ....	56
Abb. 20	Während unter dem Einfluss von DBP N die Wnt - 10b - Syntheseleistung signifikant gesteigert wurde, hemmte BP2 H diese signifikant. E2 und PROC H verminderten sie ebenfalls. Alle anderen Substanzklassen förderten die Genexpression dieses Gens dosisabhängig, wobei DBP, BP2, PROC und LIN in niedriger Dosierung stärkere Effekte hervorriefen als in hoher. *P<0,05 versus ovx. ....	57
Abb. 21	Keine ausgeprägten bzw. signifikanten Schwankungen der Serum Glukosespiegel sind unter den verschiedenen Substanzklassen und im Vergleich zur Kontrollgruppe feststellbar. *P<0,05 versus ovx. ....	58
Abb. 22	Zwischen den Substanzgruppen riefen die untersuchten Xenohormone starke Schwankungen der Insulinspiegel hervor. Keine Behandlungsgruppe erreichte jedoch das Signifikanzniveau. *P<0,05 versus ovx. ....	59
Abb. 23	Die Behandlung mit DBP H, PROC H und LIN N & H stimulierte die Serum IGF - 1 - Spiegel signifikant. Unter E2 waren sie signifikant reduziert. *P<0,05 versus ovx. ....	60
Abb. 24	Die Serum - Leptinspiegel waren unter E2, BPA und PROC in hoher und BP2 und LIN in beiden Dosierungen signifikant reduziert. *P<0,05 versus ovx. ....	61

## 9 Tabellenverzeichnis

Tab. 1	Tägliche Futter- und Substanzaufnahme (in g/Tier/Tag bzw. µg/Tier/Tag).....	27
Tab. 2	Übersicht der verwendeten Sonden, Primer und deren Konzentration.....	34
Tab. 3	Um 50% des radioaktiv markierten E2 (ED <sub>50</sub> ) vom humanen ER $\alpha$ bzw. ER $\beta$ zu verdrängen, wurden folgende Konzentrationen an Testsubstanz verwendet: .....	38
Tab. 4	Die tendenzielle Entwicklung der statistischen Auswertung der rT - PCR - Daten werden durch diese Tabelle veranschaulicht. $\uparrow$ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, $\downarrow$ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, $\uparrow\uparrow$ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\downarrow\downarrow$ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\leftrightarrow$ ~ keine Veränderung versus ovx. ....	62
Tab. 5	Die dargestellte Tabelle visualisiert abstrahiert die statistisch ausgewerteten rT - PCR - Versuchsergebnisse des mesenterialen Fettdepots. $\uparrow$ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, $\downarrow$ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, $\uparrow\uparrow$ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\downarrow\downarrow$ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\leftrightarrow$ ~ keine Veränderung versus ovx. ....	62
Tab. 6	Mit Hilfe dieser Tabelle werden die statistisch ausgewerteten Ergebnisse der rT - PCR -Daten dargelegt. $\uparrow$ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, $\downarrow$ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, $\uparrow\uparrow$ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\downarrow\downarrow$ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\leftrightarrow$ ~ keine Veränderung versus ovx. ....	63
Tab. 7	Diese Tabelle präsentiert die Quintessenz der statistisch ausgewerteten Serumparameter. $\uparrow$ ~ erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx, $\downarrow$ ~ erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx, $\uparrow\uparrow$ ~ signifikant erhöhte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\downarrow\downarrow$ ~ signifikant erniedrigte Transkriptionsmenge versus ovx (P<0,05), $\leftrightarrow$ ~ keine Veränderung versus ovx. ....	63
Tab. 8	gibt Auskunft über die Inhaltsstoffe des im Versuch verwendeten sojafreien Futtermittels für Ratten und die Inhaltsstoffe des herkömmlichen Alleinfutters für die Rattenhaltung. ....	84

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. W. Wuttke danke ich für die Bereitstellung des Themas, die Betreuung und die großzügigen Arbeitsmöglichkeiten in seiner Abteilung.

Ferner möchte ich mich bei Frau Dr. Dr. D. Seidlova - Wuttke für die stetige Gesprächsbereitschaft und die fachlich inspirierende Unterstützung, besonders im schriftlichen Teil der Arbeit bedanken.

Nicht minder Dank soll den derzeitigen und ehemaligen Mitarbeitern der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie des Zentrums Frauenheilkunde der Universitätsklinik Göttingen entgegengebracht werden; vor allem Frau S. Lüdemann und D. Adams für die kompetente Einarbeitung in die Laborarbeit, Frau H. Brüggemann - Meyer für die Aufarbeitung der radioaktiv markierten Blutseren sowie den Sekretärinnen Frau Seeger, Frau Kettler und Frau Neitzel für die Behebung sämtlicher Software - Probleme.



## Lebenslauf

Am 16. Juni 1977 wurde ich, Matthias Johann Müller, als erstes Kind von Margarethe Müller (geb. Gampel; Arzthelferin) und Dr. med. Herbert Müller (Facharzt für Allgemeinmedizin) in Würzburg geboren.

Von 1983 bis 1989 besuchte ich die Grund- und Hauptschule in Geiselwind (Bayern). Im Oktober 1989 wechselte ich an das Egbert - Gymnasium Münsterschwarzach (Bayern), wo ich im Juni 1998 die allgemeine Hochschulreife (Abitur) erlangte.

Ab 01. Juli 1998 leistete ich bis zum 31. Juli 1999 Zivildienst in der Seniorengruppe des Behindertenwohnheims der Mainfränkischen Werkstätten Kitzingen (Bayern). Dort übernahmen Zivildienstleistende unterstützende Tätigkeiten im Bereich Pflege und Tagesgestaltung der Bewohner.

Während und nach dem Zivildienst fertigte ich Bewerbungsmappen für die Aufnahmeprüfung an Kunsthochschulen zum Studium der freien Kunst an.

Dieses Studium wurde ab Sommersemester 2000 an der Kunsthochschule Kassel unter der Betreuung von Professorin Barbara Hammann und Professor Urs Lüthi aufgenommen. Hauptaugenmerk legte man dabei auf die Ausarbeitung künstlerischer Arbeiten im Bereich neue Medien. Nach Präsentation einer abschließenden Ausstellung beendete ich das Kunststudium im März 2002.

Das Studium der Humanmedizin an der Georg - August - Universität Göttingen begann ich im April 2002. In der Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie im Zentrum Frauenheilkunde fertigte ich unter der Leitung von Prof. Dr. med. W. Wuttke von Frühjahr 2005 bis Sommer 2007 meine Dissertationsarbeit an.

Das Studium der Humanmedizin wird voraussichtlich im Sommer 2008 beendet sein.