

Aus der Arbeitsgruppe für Endokrinologie
(Prof. Dr. med W. Wuttke)
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Auswirkungen von Östradiol, Bisphenol A und Octyl-
methoxycinnamat in östrogen sensitiven Organen im
Langzeitversuch an ovariectomierten Mäusen**

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

vorgelegt von
Carl Christian Opitz
aus Göttingen

Göttingen 2011

Dekan: Prof. Dr. med. C. Frömmel

1. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. H. Jarry

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. H. Siggelkow

Tag der mündlichen Prüfung: 28.08.2013

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Endokrine Disruptoren</i>	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Exposition, Gefährdung und Wirkmechanismus	2
1.2	<i>Steroidhormone und deren Rezeptoren</i>	5
1.2.1	Steroidhormone im Überblick	5
1.2.2	Östrogene	5
1.2.3	Steroidrezeptoren im Überblick	5
1.2.4	Östrogenrezeptor α und β	6
1.2.5	Östrogene Wirkung auf biologische Marker	7
1.3	<i>Testsubstanzen</i>	7
1.3.1	Bisphenol A	8
1.3.2	Octyl-methoxycinnamat (OMC)	9
1.4	<i>Uterotropher Assay der OECD</i>	9
1.5	<i>Zielsetzung</i>	11
2	Material und Methoden	12
2.1	<i>Material</i>	12
2.1.1	In-vivo-Versuche	12
2.1.1.1	Versuchstiere und ihre Haltungsbedingungen	12
2.1.1.2	Ovarektomie	13
2.1.1.3	Gewinnung des biologischen Probenmaterials	13
2.2	<i>Methoden</i>	14
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	14
2.2.1.1	Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe	14
2.2.1.2	Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA	14
2.2.1.3	Reverse Transkription	14
2.2.1.4	Real-Time-PCR	15
2.2.1.4.1	TaqMan® PCR	15
2.2.1.4.2	iCycler® PCR	17
2.2.1.5	Primer und Sonden	18
2.2.1.6	Auswertung der Real-Time-PCR	19
2.2.2	Serumdiagnostik	19
2.2.3	Quantitative Computertomographie	19
2.2.4	Statistische Methoden	20
3	Ergebnisse	21
3.1	<i>Tiergewichtsentwicklung</i>	21
3.1.1	Körpergewichtsverlauf über 3 Monate	21

3.1.2	Körpergewicht am Tag der Obduktion	22
3.1.3	Futtermaufnahme	23
3.2	<i>Untersuchte Veränderungen im Uterus</i>	24
3.2.1	Absolutes und relatives Uterusgewicht	24
3.2.2	Genexpressionsanalyse im Uterus	25
3.2.2.1	IGF – 1 und C3 im Uterus.....	25
3.2.2.2	ER α und ER β im Uterus.....	26
3.3	<i>Untersuchte Veränderungen in der Leber</i>	28
3.3.1	Absolutes und relatives Lebergewicht.....	28
3.3.2	IGF – 1- und ER α -Expression in der Leber	29
3.4	<i>Untersuchte Veränderungen im Herzen</i>	30
3.4.1	Absolutes und relatives Herzgewicht	30
3.4.2	ER α - und ER β - Expression im Herzen	31
3.4.3	IGF-1-Expression im Herzen.....	32
3.5	<i>Untersuchte Veränderungen in der Hypophyse</i>	32
3.5.1	LH β -Expression in der Hypophyse	32
3.5.2	ER α - und ER β -Expression in der Hypophyse.....	33
3.6	<i>Untersuchte Veränderungen an der Tibia</i>	34
3.6.1	Knochendichte in der Spongiosa und Kortikalis	35
3.6.1.1	Spongiosadichte	35
3.6.1.2	Kortikalisdichte	35
3.6.1.3	Gesamtdichte von Tibia-Metaphyse und -Diaphyse.....	36
3.7	<i>Gemessene Veränderungen im Serum</i>	37
3.7.1	Cholesterol, Triglyceride, LDL und HDL im Serum	37
3.7.2	Östradiol im Serum.....	37
4	Diskussion	38
4.1	<i>Die Östradiolwirkung im Langzeit-Mausmodell</i>	38
4.2	<i>Die Wirkung von BPA und OMC im Langzeit-Mausmodell</i>	40
4.2.1	BPA	40
4.2.2	OMC	42
	Zusammenfassung	44
5	Literaturverzeichnis	46
6	Abbildungsverzeichnis	54
7	Tabellenverzeichnis	56

Abkürzungsverzeichnis

α/β ERKO	Östrogenrezeptor(α/β)-Knock-out
Abb.	Abbildung
BPA	Bisphenol A
C3	Komplementfaktor 3
cDNA	Komplementäre Desoxyribonucleinsäure
C_t	Threshold-Zyklus
DES	Diethylstilböstrol
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	desoxyNucleosidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang DNA
E1	Östron
E2	Östradiol
E3	Östriol
ED	Endokrine Disruptoren
EFSA	European Food Safety Authority
EPA	US Environmental Protection Agency
ER α	Östrogenrezeptor alpha
ER β	Östrogenrezeptor beta
EU	Europäische Union
FSH	Follikel stimulierendes Hormon
GH	Growth Hormon
HDL	High Density Lipoproteine
HPG	Hypothalamus – Hypophysen – Gonaden – Regelkreis
HRT	Hormonersatztherapie
HSP 90	Hitzeschockprotein 90
i.e.	id est „das ist, mit anderen Worten“
IGF – 1	Insulin-like growth factor 1
KG	Körpergewicht
KO	Knock out
LDL	Low Density Lipoproteine

LH	Luteinisierendes Hormon
MCF-7	Human breast adenocarcinoma cell line
mRNA	messenger Ribonucleinacid
NO	Nitric Oxide (Stickstoffmonoxid)
NOAEL	No observed adverse effect level
OD	Optical Density
OECD	Organisation for Economic Co-operation and Development
OMC	Octyl-methoxycinnamat
ovx	ovarektomiert
OVX	Ovarektomie
PCR	Polymerase Chain Reaction
PET	Polyethylene terephthalate
qCT	Quantitativer Computertomograph
RT	Reverse Transkriptase
s.c.	subkutan
SERM	Selektiver Östrogenrezeptor-Modulator
T3	Triiodthyronin
T4	Thyroxin
Tab.	Tabelle
TDI	tolerable daily intake
TG	Triglyceride
TSH	Thyreotropin Releasing Hormon
UNG	Uracil-N-Glycosylase
upm	Umdrehung pro Minute
UV	Ultraviolett
WHO	World Health Organization
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

Die potentiellen negativen gesundheitlichen Wirkungen von Produkten, die wir tagtäglich konsumieren, werden vor allem in Bezug auf Lebensmittel kritisch diskutiert. Doch auch Kosmetika, wie z. B. Sonnencreme oder kunststoffhaltige Gegenstände, mit denen wir beispielsweise in Form von PET-Wasserflaschen in Berührung kommen, enthalten Stoffe, deren Auswirkung auf den menschlichen Körper nicht abschließend geklärt ist. Welchen Effekt diese Substanzen, Bisphenol A (BPA) und Octyl-methoxycinnamat (OMC), auf den Organismus und im Speziellen auf das endokrine System von Mäusen haben, soll in der vorliegenden Arbeit genauer untersucht werden.

1.1 Endokrine Disruptoren

Endokrinen Disruptoren (ED) werden insbesondere östrogenartige Effekte an verschiedenen Erfolgsorganen zugeschrieben (Bergeron et al. 1994). Um das Gefährdungspotential von ED einschätzen zu können, muss deren mögliche Wirkungsweise untersucht werden. Im Folgenden ist ein Überblick über ED mit deren Wirkungsspektrum gegeben.

1.1.1 Definition

Im Jahre 1962 machte die Autorin Rachel Carson mit ihrem Buch „Silent Spring“ (Carson 1962) zum ersten Mal auf die Verbreitung von hormonell wirksamen Umweltgiften, die vom Menschen produziert werden (sogenannte Xenobiotika), aufmerksam und legte damit den Grundstein zur Umweltbewegung.

Spätestens nach der Veröffentlichung von „Our stolen future“ (Colborn et al. 1996) sind derartige Umweltchemikalien, die als endokrine Disruptoren bezeichnet werden, stark in den Blickpunkt von Medien, Politik und öffentlichem Interesse gerückt. Diesen wird vorgeworfen, das endokrine System zu beeinflussen und so weitreichende Gesundheitsschäden hervorzurufen.

Viele Beobachtungen, die zu diesen Bedenken geführt haben, wurden an wild lebenden Tieren oder bei Versuchstieren aufgezeigt (LeBlanc 1995, Daston et al. 1997); Effekte auf den menschlichen Organismus konnten bisher nach Exposition mit hohen Dosen einiger

weniger Chemikalien (Diethylstilböstrol und polychlorierten Biphenylen) nachgewiesen werden (Giusti et al. 1995, Mittendorf 1995).

Das breite mediale und wissenschaftliche Interesse führte zur Initiierung von internationalen Forschungsprogrammen, Workshops und zur Installation von Expertengremien, die das Gefährdungspotential der einzelnen Substanzen einschätzen sollten. Es wurden verschiedene Definitionen für endokrine Disruptoren publiziert:

So definierte die US-Umweltschutzbehörde (EPA) im Jahre 1995 endokrine Disruptoren als exogene Substanzen, welche Synthese, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Aktivität oder Elimination natürlicher Hormone, die im Körper für die Aufrechterhaltung der Homöostase, der Reproduktion und der Regulation von Entwicklungsprozessen und des Verhaltens verantwortlich sind, beeinflussen (Kavlock et al. 1996).

Auf der im Jahre 1996 stattgefundenen Konferenz *"European Workshop on the Impact of Endocrine Disruptors on Human Health and Wildlife"* unter Federführung der EU-Kommission DG XII, der *European Environment Agency* und des *European Center for Environmental Health* der WHO in Weybridge hat man sich auf folgende Definition für endokrine Disruptoren geeinigt: „Bei den endokrinen Disruptoren handelt es sich um körperfremde Verbindungen, die in das endokrine System eines gesunden Organismus oder das seiner Nachkommen eingreifen und zu signifikanten Gesundheitsstörungen führen.“¹.

Die Definition der OECD (Organization for Economic Co-operation and Development) für ED lautet: Endokrine Disruptoren sind Fremdstoffe mit schädlichen Wirkungen auf die Gesundheit in einem unversehrten Organismus oder seiner Nachkommenschaft, die auf Änderungen von endokrinen Funktionen zurückgeführt werden können (nach OECD 1996)².

1.1.2 Exposition, Gefährdung und Wirkmechanismus

Menschen wie auch Tiere sind Umweltchemikalien durch dermale, ingestitive oder inhalative Aufnahme z.B. in Kosmetika, Nahrungsmitteln, Wasser oder Staub ausgesetzt.

Diese können sowohl zu einer Akkumulation im Fettgewebe des Menschen führen (Smeds and Saukko 2001, Mullerova and Kopecky 2007), als auch in die Regulationsvorgänge des Hormonsystems eingreifen und für verschiedene Krankheiten verantwortlich sein.

¹ http://ec.europa.eu/environment/endocrine/documents/reports_conclusions_en.htm

² www.oecd.org/dataoecd/39/12/2350385.pdf

Als Indiz für diese Hypothese, die kontrovers diskutiert wird, spricht unter anderem eine positive Korrelation von pränataler Exposition mit DES und einem signifikanten Anstieg der Inzidenz von Hodenkarzinomen (Toppari et al. 1996). Einige epidemiologische Studien zeigen eine deutlich höhere Prostatakrebsrate bei Anwendern von hormonell aktiven Pestiziden (Keller-Byrne et al. 1997, Dich and Wiklund 1998, Fleming et al. 1999) sowie gehäuft auftretende Fehlbildung männlicher Genitalien (Toppari et al. 1996).

Große Metaanalysen über den Zeitraum von 1934 bis 1996 beweisen einen drastischen Rückgang der Spermiedichte bei Männern aus westlichen Industrieländern im Vergleich zu denen aus anderen Ländern. Die Beobachtungen waren unabhängig von statistischen Störgrößen, so dass diskutiert werden muss, ob eine Exposition des Mannes gegenüber Umweltchemikalien, als Folge der Industrialisierung, eventuell ursächlich für dieses Phänomen ist (Carlsen et al. 1992, Swan et al. 2000).

Ein weiterer Befund, der mit Umwelthormonen in Verbindung gebracht wird, ist eine mögliche Erhöhung des Brustkrebsrisikos (Wolff et al. 1993, Krieger et al. 1994, Charlier et al. 2003). Außerdem ist sowohl ein direkter als auch indirekter Einfluss auf das Immunsystem beschrieben worden (Sweeney 2002).

In der Tierwelt wurden vor allem Veränderungen an den Fortpflanzungsorganen beobachtet. So kam es beispielsweise zu einer Feminisierung der Alligatoren im Lake Apopka in Florida (Semenza et al. 1997) und zu einer Fortpflanzungsstörung des Florida-Panthers aufgrund von verringerter Spermienanzahl und -qualität (Facemire et al. 1995).

Endokrine Disruptoren haben unterschiedliche Angriffspunkte im endokrinen System:

- Als Antagonist oder Agonist des Hormonrezeptors durch Imitation einer hormonellen Wirkung, wobei die antagonistische/agonistische Aktivität einer Verbindung beeinflusst wird durch Metabolismus, Bindungsaffinität, Assoziations- und Dissoziationsrate (Kempainen et al. 1999). Endokrine Disruptoren entwickeln ihre Wirkung dabei nicht nur spezifisch am Östrogenrezeptor, sondern zeigen auch antagonistische/agonistische Effekte durch an anderen nukleäre Rezeptoren wie z.B. am Androgenrezeptor. (Fang et al. 2003) (Hu et al. 2012).
- Es kann eine Verstärkung der Produktion, der Freisetzung oder des Transportes sowie eine Veränderung der Metabolisierung eines endogenen Hormons moduliert werden (Morinaga et al. 2004). So zeigt zum Beispiel DES als ED dieselbe Bindungsaffinität an Transthyretin, dem T3- und T4-Plasmatransportprotein, wie

Triiodthyronin. Unter einer DES Exposition würde es damit zu einem Anstieg des freien T3-Spiegels kommen und letztendlich eine Reaktion an den Erfolgsorganen hervorrufen. Yamauchi et al. schlussfolgerten, dass neben den Plasmaproteinen, die hauptsächlich Sexualhormone transportieren, auch diejenigen untersucht werden sollten, die die übrigen Steriodhormone binden, um mögliche indirekte Wirkungen zu detektieren (Yamauchi et al. 2000).

- Beeinflussung der Aktivität und Expression von hormonregulierenden Enzymen (Whitehead and Rice 2006). Auch hier ein Beispiel aus dem endokrinen System Schilddrüse. Deren Hormone haben Rezeptoren an beinahe jeder Zelle des Organismus. Eine Veränderung der euthyreoden Situation kann mit gravierenden Folgen einhergehen. Das Enzym Thyreoperoxidase ist in der apikalen Wand der Schilddrüsenzelle gelegen und ist für die Oxidation des Iodids verantwortlich. Schmutzler et al. untersuchten eine mögliche Beeinflussung des sensiblen Systems und konnten zeigen, dass vor allem der UV-Filter Benzophenon 2 zur einer Inhibition der Thyreoperoxidase führte und damit einen Abfall der zirkulierenden Hormone auslöst. Die exponierten Ratten zeigten schon nach 5 Tagen den Beginn eines hypothyreoden Status (Schmutzler et al. 2007a).
- Bestandteil aktueller Forschung und mittlerweile von den Printmedien aufgegriffen³ ist der Einfluss einer epigenetischen Prägung. Dabei wird die DNA-Sequenz nicht verändert, sondern nur der Aktivitätszustand von Genen. So kann z..B. eine Veränderung des Methylierungsgrades der DNA oder auch der Histone ein An- bzw. Ausschalten des Gens bewirken. Am Beispiel des „Agouti Mausmodells“ erfolgt eine Veränderung des Methylierungsgrades im Bereich des Agouti-Gens, was eine vermehrte Expression des Agouti Signal Proteins zur Folge hat. Augenscheinliche Auswirkungen sind nicht nur in einer Veränderung des Phänotyps im Sinne einer gelben Fellfarbe zu dokumentieren, sondern gehen einher mit einem gehäuften Risiko an Diabetes, Fettleibigkeit und Krebserkrankungen. (Bultman et al. 1992, Duhl et al. 1994, Morgan et al. 1999, Dolinoy et al. 2006). Interessanterweise führt die orale Substitution von Methyl-Gruppen-Donatoren in der Schwangerschaft bei diesen gelben, dicken Muttertieren wieder zu mehrheitlich braunen, schlanken Jungtieren (Cropley et al. 2006).

³ <http://www.faz.net/themenarchiv/2.1151/wirkung/epigenetik-dna-ist-nicht-alles-1759709.html>

1.2 Steroidhormone und deren Rezeptoren

1.2.1 Steroidhormone im Überblick

Cholesterin ist die Basis der Biosynthese für Steroidhormone. Sie lassen sich in fünf Gruppen unterteilen: Östrogene, Gestagene, Androgene, Kortikosteroide und Mineralkortikoide. Aufgrund ihrer hohen Lipophilie können sie problemlos Zellmembranen überwinden, müssen dafür aber im Blut an Trägerproteine, wie z.B. Albumin, gebunden werden (Löffler and Petrides 2003). Steroidhormone werden meist in der Leber im Rahmen der Biotransformation inaktiviert und dann über die Niere oder den Darm ausgeschieden (Cheng et al. 1998).

1.2.2 Östrogene

Östrogene werden primär in den Granulosazellen des Ovars, in einem geringen Maß in der Nebennierenrinde und während der Schwangerschaft auch in der Plazenta gebildet. Weiterhin besteht die Möglichkeit einer peripheren Synthese in Fett, Muskel und Leber (Gruber et al. 2002).

Die Produktion wird gesteuert durch einen feinjustierten Regelkreis zwischen Hypothalamus, Hypophyse und Ovar im Rahmen eines Feedbackmechanismus. Im Zusammenspiel mit den anderen Steroidhormonen sind Östrogene an zahlreichen Prozessen im Körper beteiligt. Sie regulieren Wachstum und Entwicklung und haben einen Einfluss auf das Nerven- und Immunsystem. Darüber hinaus wird die Reproduktion geregelt und die hormonelle Homöostase aufrechterhalten (Reid et al. 2002).

Östrogene binden an die beiden bekannten Östrogenrezeptoren α und β . Es wurden aber auch östrogene Wirkungen unabhängig von einer Rezeptorbindung beschrieben (Yue et al. 2010).

1.2.3 Steroidrezeptoren im Überblick

Steroidhormonrezeptoren gehören zur Superfamilie der nukleären Rezeptoren und befinden sich zusammen mit Schilddrüsen-, Retinolsäure- und Vitamin - D - Rezeptoren und einer Reihe von Rezeptoren ohne bekannte physiologische Liganden (Orphan - Rezeptoren) im Zellinneren. Dabei entfalten sie ihre Wirkung direkt durch ihre DNA - Bindungsfähigkeit über eine Änderung der Transkription verschiedener Gene.

Steroidrezeptoren bestehen aus einer variablen N – terminalen Region, die an die DNA – Bindungsstelle andockt, und einer C – terminalen Region, an welche die Steroidhormone binden (Brinkmann 1994).

In ihrer inaktiven Form wird die DNA – Bindungsdomäne durch beispielsweise das Hitzeschockprotein HSP 90 sowie weitere Proteine blockiert (Landel et al. 1995).

Bindet ein Hormon an den intrazellulären Rezeptor, führt dies zur Dissoziation der Hitzeschockproteine, der Hormon - Rezeptor - Komplex erfährt eine Konformationsänderung und kann an das entsprechende „Hormon – Response – Element“ des jeweiligen Gens auf dem entsprechenden DNA - Abschnitt binden (Brinkmann 1994).

1.2.4 Östrogenrezeptor α und β

Im Jahre 1986 ist die Gensequenz des Östrogenrezeptors (ER) alpha von Greene et al. entschlüsselt worden (Greene et al. 1986). Die Entdeckung des ER beta, der erstmals in der Prostata von Ratten nachgewiesen wurde, erfolgte später (Kuiper et al. 1996).

Die Östrogenrezeptoren gehören zu den nukleären Rezeptoren, die als Ligand-induzierbare Transkriptionsfaktoren eine Schlüsselrolle in der endokrinen Signaltransduktion spielen, aber auch außerhalb des Zellkerns im Zytoplasma und der Plasmamembran ihren Einfluss ausüben können (Deroo and Korach 2006).

Es kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei den beiden Rezeptoren um Spleißvarianten handelt (Enmark et al. 1997), da sie auf unterschiedlichen Genloci zu finden sind.

Beide Rezeptoren sind in unterschiedlicher Menge in verschiedensten Geweben exprimiert.

ER α ist vor allem in Hypophyse, Niere, Nebenniere und Nebenhoden vertreten und ER β in Prostata, Lunge, Harnblase und Gehirn; beide sind ungefähr zu gleichen Anteilen in Uterus, Ovar und Hoden vorhanden (Kuiper et al. 1997).

Im Knochen sind beide Östrogenrezeptoren exprimiert (Arts et al. 1997), wobei in der Kortikalis überwiegend ER α und in der Spongiosa ER β vorherrscht (Bord et al. 2001).

Grohe et al. beschreiben eine Expression von beiden Rezeptoren im Herzen (Grohe et al. 1998).

Man geht davon aus, dass es zu einem Zusammenspiel der beiden Rezeptoren in der Zelle kommt. Vereinfacht kann gesagt werden, dass ER alpha die Transkription aktiviert, während ER beta modulierend als Co-Regulator eingreift. Diese Interaktion wird als Ying – Yang – Theorie beschrieben (Lindberg et al. 2003).

Neben diesen beiden Östrogenrezeptoren gibt es weitere Subklassenrezeptoren so genannte „*estrogen receptor-related receptors*“, die eine östrogene Wirkung auf eine noch nicht gesicherte Weise beeinflussen können, da die Moleküle kein E2 binden und bereits beschrieben worden sind (Giguere 2002, Horard and Vanacker 2003).

1.2.5 Östrogene Wirkung auf biologische Marker

Eine große Zahl von Genen wird in ihrer Transkription durch Östrogene direkt oder indirekt beeinflusst. Sie können somit als biologische Marker für die Östrogenwirkung dienen. Die Expression von Komplementfaktor C3, des Luteinisierenden Hormon β und des *Insulin-like growth factor 1* wurden in dieser Arbeit daraufhin untersucht.

Komplement C3, als zentraler Baustein im Komplementsystem, gehört zur angeborenen, nicht adaptiven Immunabwehr. Die Synthese von Komplementfaktor C3 als Reaktion auf einen östrogenen Stimulus ist typisch für das Uterusgewebe. C3 ist somit ein verlässlicher Marker für eine östrogene Wirkung (Komm et al. 1986, Sundstrom et al. 1990).

Das Luteinisierende Hormon (LH) wird in der Hypophyse produziert und durch Östradiol supprimiert im Sinne eines negativen Feedbackmechanismus, daher kann die LH-Expression als biologischer Marker für die Östradiolwirkung an der Hypophyse benutzt werden (Wolinska-Witort et al. 2000).

Ein weiterer geeigneter biologischer Parameter für den Nachweis eines Östradioleinflusses ist der *Insulin-like growth factor 1* (IGF-1). Dieser wird normalerweise stimuliert durch das Growth Hormons (GH) und vermittelt eine anabole Wirkung in fast allen Geweben des Organismus. Die Wirkung des Proteins kann endokrin, parakrin oder autokrin sein (Bondy and Cheng 2004). Im Uterus wird durch einen membranständigen IGF-Rezeptor ein stimulierender Effekt auf die Proliferation und Differenzierung des Gewebes ausgeübt. Östrogen stimuliert die Genexpression von IGF-1 im Endometrium und dieses vermittelt daraufhin die östrogen- spezifische Wirkung (Rutanen 1998).

1.3 Testsubstanzen

In der vorliegenden Arbeit wurden Bisphenol A und Octyl-methoxycinnamat auf ihre endokrine Aktivität untersucht.

1.3.1 Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) ist ein wichtiger Bestandteil in der Herstellung von Kunststoffen. In beinahe allen kunststoffhaltigen Plastikmaterialien ist dieser nachweisbar, so auch in Kinderspielzeug, Lebensmittelverpackungen und Zahnfüllungen.

Im Jahre 2006 sind weltweit ungefähr 4 Millionen Tonnen BPA produziert worden mit einer jährlich steigenden Tendenz von 6-10%⁴. 2003 detektierte eine amerikanische Arbeitsgruppe Bisphenol A in ca. 90% aller Urinproben, die aus einem repräsentativen Kollektiv der US-Bevölkerung gesammelt wurden. Damit wurde deutlich, dass bereits ein endokriner Disruptor im menschlichen Organismus zweifelsfrei nachweisbar ist (Calafat et al. 2008).

Wie groß die öffentliche Furcht vor Chemikalien wie BPA ist und welcher Druck auf Konzernen lastet, zeigen Pressemitteilungen, in denen mitgeteilt wird, dass z.B. Philips zukünftig kein BPA mehr in Babyflaschen verwenden wird⁵. Auch der Drogeriemarkt Schlecker und der Supermarktkonzern Kaufland⁶ geben an, ab jetzt nur noch BPA-freie Babyschnuller anbieten zu wollen, obwohl die europäische Behörde für Lebensmittelsicherheit (EFSA) am 23.07.2008 ihren Beschluss⁷ unterstrich, die Höhe des festgesetzten TDI-Wertes (tolerable daily intake) von 2006 bei 0,05mg/kg Körpergewicht vom Jahre 2006 aufgrund des unveränderten Risikopotentials (EFSA-Q-2008-382) nicht zu ändern.

BPA besitzt eine wesentlich höhere Bindungsaffinität zum Östrogenrezeptor beta als zum Alpha-Rezeptor (Seidlova-Wuttke et al. 2004). Weiterhin ist bekannt, dass die Substanz am ER β als Agonist und am ER α gewebespezifisch entweder als Agonist oder Antagonist (Kurosawa et al. 2002) wirkt, weswegen die Behauptung aufgestellt worden ist, dass BPA SERM-Eigenschaften (*selective östrogen receptor modulator*) besitzt (Seidlova-Wuttke et al. 2004).

Antiandrogene Effekte (Xu et al. 2005) und eine mögliche Störung der Entwicklung des Gehirns beim Feten durch Bindung an den Schilddrüsenrezeptor sind ebenfalls beschrieben worden (Zoeller 2007).

⁴ <http://www.iehn.org/publications.reports.bpa.php>.

⁵ http://medienservice.philips.de/apps/p_dir/e3700001.nsf/0/8827BC1D01663D79C1257465003C57AA?openDocument

⁶ <http://www.premiumpresse.de/kaufland-und-schlecker-nehmen-bisphenol-a-belastete-babyschnuller-aus-ihren-regalen-hersteller-von-nuk-babylove-und-baby-nova-schnullern-kuendigen-umstellung-der-produktion-an-PR614941.html>

⁷ <http://www.efsa.europa.eu/de/efsajournal/pub/759.htm>

Ein Hauptmetabolit von Bisphenol A, 4-Methyl Benzophenon (MBP), durch Verstoffwechslung in der Leber produziert, zeigt in einem in-vitro-Versuch mit MCF-7-Zellen eine stärkere östrogene Wirkung als das noch nicht verstoffwechselte Produkt (Yoshihara et al. 2004).

1.3.2 Octyl-methoxycinnamat (OMC)

Die höhere Belastung mit UV – Strahlung und die damit verbundenen gesundheitlichen Folgeschäden führen zu einer Sensibilisierung in der Bevölkerung in Bezug auf den individuellen Sonnenschutz. Das die bestehenden Befürchtungen nicht unbegründet sind, bestätigten Schlumpf et al., indem sie unter anderem UV-Filter in 85,2% aller gesammelten Muttermilchproben nachweisen konnten (Schlumpf et al. 2010). Das Zimtsäurederivat Octyl-methoxycinnamat kann kurzwellige Strahlung (UVA und UVB) absorbieren und wird deshalb als UV – Filter in vielen Sonnencremes eingesetzt. Zudem ist es auch in anderen Kosmetikartikeln wie Waschlotionen zu finden.

Laut Verordnung über kosmetische Mittel in der Bundesrepublik und EU (Council Directive 76/768/EEC⁸) ist im europäischen Raum ein Gehalt an OMC in Kosmetikprodukten von bis zu 10 % zugelassen.

Eine östrogene Wirkung von OMC wurde sowohl in vivo bei immaturren Ratten im Rahmen eines uterotrophen Assays als auch bei in vitro Versuchen an der östrogen sensitiven Zellreihe MCF-7 nachgewiesen (Schlumpf et al. 2001). In einem in-vitro-Transaktivierungsassay induziert OMC die ER alpha-vermittelte Genexpression (Schreurs et al. 2002).

In einer neueren Studie konnte eine Modifizierung der Hypothalamus-Hypophysen-Schilddrüsen-Achse beschrieben werden. Hier zeigte E2 allerdings keinerlei Effekte (Klammer et al. 2007), während OMC genauso wie Östradiol eine immunmodulatorische Fähigkeit besitzt (Rachon et al. 2006).

1.4 Uterotropher Assay der OECD

Der Uterus ist ein für Östrogene hochempfindliches Organ und wird deshalb häufig als Zielorgan im Rahmen toxikologischer Tests benutzt, um eine östrogene Wirkung einzelner Pharmaka zu bestätigen oder auszuschließen (Diel et al. 2000).

⁸ <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:1976L0768:20100301:en:PDF>

Die OECD setzt als etabliertes und validiertes Modell zur Erforschung von östrogenen Effekten in-vivo die immature oder ovariectomierte Ratte ein, weil die Aufnahme, Verteilung, Metabolisierung und Akkumulation des zu untersuchenden Stoffes in vitro nicht erfasst werden können.

Der normale Zyklus einer Ratte, der das Uteruswachstum bestimmt, beträgt 4 Tage. Im Rahmen des uterotrophen Assays wird ovariectomierten Tieren dreitägig oral oder subkutan die Testsubstanz verabreicht. Am vierten Tag, nach Tötung der Tiere, weist ein signifikant gesteigertes Uterusfeuchtgewicht eine östrogene Wirkung nach (Kanno et al. 2001).

Somit ist die ovariectomierte Ratte ein geeignetes Tiermodell, um zu evaluieren, ob eine Testsubstanz eine Östrogenität in vivo besitzt.

Für weitergehende Forschung zu den molekularen Mechanismen der hormonellen Wirkung einer Substanz ist es wichtig, bestimmte Gene mittels Klonverfahren auszuschalten oder artfremde Gene einzuschleusen. Ein Beispiel sind ER α - und ER β -Knock-out (KO) -Tiere, auch α ERKO und β ERKO genannt (Couse et al. 1995). Aufgrund der hohen technischen Schwierigkeit, Knock-out-Ratten herzustellen, ist es einfacher KO-Mäuse zu verwenden.

Die an Mäusen generierten Ergebnisse lassen sich nicht mit an Ratten gewonnenen Resultaten vergleichen, deswegen ist es nötig, die Effekte von Östradiol und endokrinen Disruptoren an Wildtyp-Mäusen zu erforschen, um sie später als Vergleichsgruppe für Daten von KO-Mäusen heranzuziehen.

Drei Schwachpunkte des uterotrophen Assays der OECD sind:

- Die kurze Behandlungsdauer von drei Tagen. Im Falle von Umweltchemikalien ist der Mensch diesen lebenslang ausgesetzt und somit bietet es sich an, eine Langzeituntersuchung von drei Monaten durchzuführen, um positive wie auch negative Einflüsse aufzudecken.
- Das eventuelle Auftreten von Effekten einer Testsubstanz außer im Uterus auch in weiteren Zielorganen von E2 wie z.B. Hypophyse oder Knochen, wird bei dem OECD Testmodell nicht berücksichtigt.
- Nicht-Östrogen-ähnliche bzw. nicht-ER-vermittelte Effekte, wie z.B. die Beeinflussung des TSH-, T3- und T4- Spiegels, können unbemerkt bleiben (Klammer et al. 2007)

1.5 Zielsetzung

Unsere hochindustrielle Welt entwickelt immer neue Chemikalien, die zum Einsatz in der Fertigung von Alltagsgegenständen benutzt werden und denen man somit ungewollt ausgesetzt ist. Auch der veränderte Lebensstil des Menschen erhöht die Exposition gegenüber Chemikalien, wie die Benutzung verschiedenster Hygieneprodukte.

Ziele dieser Arbeit sind:

- Im Rahmen des uterotrophen Assays der OECD konnte durch Studien in Ratten ein östrogenen Einfluss von Bisphenol A und OMC auf den Uterus nachgewiesen werden (s. Seite 12).

Ein Ziel dieser Arbeit ist, einen eventuell bestehenden Multi-Organ-Effekt zu untersuchen, indem Herz, Leber, Hypophyse, Knochen, Körpergewicht und Serumlipide auf einen möglichen östrogenen Stimulus nach Applikation der Testsubstanzen analysiert werden.

- Es gibt schon viele Studien über endokrine Disruptoren im Kurzzeitversuch von mehreren Tagen, in denen eine Langzeitbeobachtung gefordert wird, um mögliche Langzeiteffekte nicht zu übersehen (Bernanke and Kohler 2009). Der hier vorliegende Versuchsaufbau beinhaltet eine dreimonatige orale Exposition von zwei endokrinen Disruptoren und Östradiol.

2 Material und Methoden

2.1 Material

In dieser Arbeit wurden ausschließlich in-vivo-Versuche durchgeführt.

2.1.1 In-vivo-Versuche

Für die Tierexperimente lag eine Genehmigung der Bezirksregierung Braunschweig vor: Aktenzeichen 33.42502/01-30.05.

2.1.1.1 Versuchstiere und ihre Haltungsbedingungen

Die Wildtyp-Mäuse wurden von der Firma Winkelmann (Borchen) bezogen. Bei den Tieren handelte es sich um weibliche Mäuse (C 57 BL/6J) im Alter von zwei Monaten mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von 19 g. Sie wurden in Makrolon-Typ-IV-Käfigen in Gruppen von sieben bis acht Mäusen pro Käfig gehalten. Die durchschnittliche Temperatur betrug 23°C, die durchschnittliche Luftfeuchtigkeit 55 %. Der Haltungsraum wurde täglich von 6:00 bis 18:00 Uhr beleuchtet. Futter und Trinkwasser standen ad libitum zur Verfügung. Das Futter war eine sojafreie Spezialanfertigung (Ssniff, Soest), welche zusätzlich die Testsubstanzen in der vorgegebenen Konzentration enthielt (s. Tabelle 1, Seite 13). Die Kontrollgruppe, als Negativ-Kontrolle, erhielt das gleiche sojafreie Futter ohne Zusätze.

Es wurde eine tägliche Futteraufnahme von ca. 3g pro Tier und Tag angenommen.

Hierbei enthielt ein Kilo sojafreies Futter 4,32mg 17 β -östradiolbenzoat, bzw. 1000mg Octylmethoxycinnamat (Octylmethoxycinnamat, OMC) oder 500mg Bisphenol A. Es wurde genau diese Menge an OMC und BPA gewählt, da in vorangegangenen Studien bei einer ähnlichen Futterkonzentration östrogenartige Veränderungen an Ratten hervorgerufen werden konnten (Seidlova-Wuttke et al. 2006a).

Im Verlauf wurden regelmäßig Vergiftungen oder andere Missstände der Tiere ausgeschlossen. Darüber hinaus wurden wöchentlich Körpergewicht und Futteraufnahme der Versuchstiere bestimmt. Die durchschnittliche effektive Substanzaufnahme pro Tier und pro Tag zeigt Tabelle 1.

Nach einer dreimonatigen Behandlung mit den Testsubstanzen wurden die Tiere unter tiefer CO₂-Narkose dekapitiert und seziiert.

Tabelle 1: Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Futter und ihre Aufnahme pro Tier und Tag und die Anzahl der Versuchstiere pro Substanzgruppe (Kontroll- und Östradiolaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

Testsubstanz	Konzentration der Substanz im Futter in mg/kg	Quantitative Aufnahme der Substanzen pro Tier und Tag in mg	Anzahl der Versuchstiere pro Substanzgruppen
Soja Frei	---	---	15
Östradiol	4,3	0,016	15
OMC	1000	3,54	15
Bisphenol A	500	1,62	15

2.1.1.2 Ovarektomie

Die Tiere wurden im Alter von 8 Wochen beidseits ovarektomiert. Hierzu wurde eine Ketamin- (90 mg/kg) und Rompun- (7,5 mg/kg) Narkose durchgeführt (ip-Applikation). Nach Entfernung des Felles und Desinfektion des Operationsgebietes erfolgte eine Eröffnung der Bauchhöhle und Darstellung des Ovars durch sorgfältige Präparation. Dieses wurde dann per Naht ligiert und scharf abgesetzt. Daraufhin Verschluss der Muskulatur und der Cutis mittels resorbierbarer Naht (Supramid, B.Braun).

Die Mäuse erhielten post operationem 1ml isotoner NaCl-Lösung (Braun) subkutan (s.c.), um eine Dehydratation zu vermeiden und eine einmalige Schmerzprophylaxe mit Rimadyl s.c (5 mg/kg). Bis zum vollständigen Erwachen wurden die Tiere überwacht.

2.1.1.3 Gewinnung des biologischen Probenmaterials

Unter CO₂-Narkose wurden die Tiere dekapitiert und ausgeblutet. Das Blut wurde bis zur Abtrennung des Serums auf Eis gelagert. Die Hypophyse wurde aus der Sella turcica herausgehoben. Mit einer spitzen Pinzette wurde die Neurohypophyse entfernt und verworfen. Das Herz wurde freipräpariert und in den rechten und linken Ventrikel getrennt. Der Uterus wurde am Uterushals abgetrennt. Ein Teil eines Leberlappens wurde entnommen. Weiterhin wurde am linken Bein die Tibia frei von Muskel und Bindegewebe dargestellt und unterhalb der Kondylen und oberhalb des Tarsus abgetrennt. Die Länge der Tibiae wurde anschließend per Schublehre bestimmt und danach bei -20° C verwahrt. Alle Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bei -80° C aufbewahrt.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Extraktion der Gesamt-RNA aus Gewebe

Die entnommenen Organe wurden bis zur Probenaufbereitung bei -70°C gelagert. Mit Hilfe des RNeasy Minikits (Cat. No. 74106, der Firma Qiagen, Hilden) wurde die Gesamt-RNA isoliert. Dazu wurden die Leber und ein Fragment des Uterus in einem stickstoffgekühlten Teflongefäß in einem Mikro-Dismembrator (Braun, Melsungen) für 15s bei 2500Upm zerkleinert. Das Gewebepulver wurde in 600 μl RT-Lysis-Puffer suspendiert. Das Herz und die Adenohypophyse wurden komplett in 600 μl RT-Lysis-Puffer mit einem Ultra Turrax (TP18/10, Janke & Kunkel, Staufen) in ca. 30s zerkleinert. Danach wurden die Suspensionen für 15s in einem Ultraschallbad (Bransonic 32 Sonicator Bath, Branson Instruments, Danbury, CT, USA) homogenisiert. Das Homogenat wurde über QIAshredder Säulen (Qiagen, Hilden) von groben Gewebestückchen befreit und über 3 Waschzyklen (1. 700 μl RW1 Puffer, 15 sec., 10.000 rpm; 2. und 3. je 500 μl RPE Puffer, 15 sec. bzw. 2 min, 10.000 rpm) mit Hilfe des RNeasy Kits gemäß den Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die getrocknete RNA in der Kieselgelmembran-Säule wurde durch Gabe mittels 50 μl RNase-freien Wassers eluiert.

2.2.1.2 Bestimmung der Konzentration und der Reinheit der RNA

Zur Bestimmung der Konzentration der RNA wurde diese im Verhältnis von 1:16 mit $\text{H}_2\text{O}_{\text{velc}}$ verdünnt. Die Extinktion bei 260 nm wurde in Quarzküvetten (Suprasil, Hellma, Müllheim) in einem Biophotometer (Eppendorf, Hamburg) gemessen. Aufgrund der Tatsache, dass Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm absorbieren, kann durch den Quotienten $\text{OD}_{260\text{nm}}$ zu $\text{OD}_{280\text{nm}}$ der Grad der Verunreinigung durch Aminosäuren bestimmt werden. Als „rein“ gilt RNA bei einem Quotienten von 1,8 bis 2.

Die Proben wurden mittels Verdünnung mit RNase-freiem Wasser auf eine einheitliche RNA-Konzentration von 20ng/ml eingestellt, um später einen quantitativen Vergleich der Ergebnisse zu ermöglichen.

2.2.1.3 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription wurde die isolierte mRNA in amplifizierbare cDNA im Thermocycler (Fa. Biometra, Göttingen) umgeschrieben. Dazu wurde ein Kit mit einer

murinen, retroviralen RT ohne RNase-Aktivität eingesetzt. Das Reaktionsvolumen von 20 μl setzte sich wie folgt zusammen:

3 μl $\text{H}_2\text{O}_{\text{Velc}}$

1 μl Random-Primer (Invitrogen, Karlsruhe; 1:30)

10 μl RNA Lösung mit einer Konzentration von 20 ng/ μl .

Zur Denaturierung von Sekundärstrukturen wurde der Ansatz für 10 min bei 70°C inkubiert und mit folgendem Mix versetzt:

1 μl Reverse Transkriptase M-MLV Reverse Transcriptase RNase H Minus,
Point Mutant, Promega, Mannheim

4 μl M-MLV RT 5x Reaction Buffer

1 μl 10 mM dNTP-Mix Invitrogen, Karlsruhe

0,1 μl RNasin Recombinant RNasin Ribonuclease Inhibitor, Promega,
Mannheim.

Zur Anlagerung der Primer wurde der Ansatz für 10 min bei 22°C inkubiert und die darauf folgende Gegenstrangsynthese erfolgte für 50 min bei 42°C. Nach der Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C wurden die Ansätze abzentrifugiert und bei -20°C eingefroren.

2.2.1.4 Real-Time-PCR

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit zwei verschiedenen PCR-Methoden zur Bestimmung der Genexpression gearbeitet. IGF-1- und ER α -Expression wurde im TaqMan® -PCR-Assay (Fa. Applied Biosystems GmbH, Darmstadt) gemessen, während die Analysen von ER β , LH β und C3 auf dem iCycler® (BioRad iCycler, Hercules, CA, USA) vorgenommen wurden.

2.2.1.4.1 TaqMan® PCR

Zuerst wurde ein 2x Taqman-PCR-Puffer aus Eurogentec-Reagenzien (Eurogentec, Köln) angesetzt. Er bestand aus folgenden Reagenzien:

2500 μl 10 x Reaction Buffer

1750 μl 50 nM MgCl_2

1000 μl 5,0 mM dNTP-Mix

125 μl PCR Enzym

250 μl UNG

6875 μl Ampuwa.

Für die Taqman-PCR wurde eine 96-Well-Mikrotiter-Platte (MicroAmp Optical 96-Well reaction Plate, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) mit folgender Mischung (je 25 µl pro Well) gefüllt und danach mit optischen Deckelketten (MicroAmp Optical Caps, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verschlossen:

Tabelle 2: Reaktionslösung Taqman

	ER α / IGF-1
cDNA der Probe	2 µl
Taqman-PCR-Puffer (2x)	12,5 µl
Primer sense (300 µM)	0,75 µl
Primer antisense (300 µM)	0,75 µl
Sonde (225 µM)	0,5 µl
Ampuwa	8,5 µl

Die Standardkurve wurde als Doppelbestimmung angelegt, sowie mehrere Negativkontrollen ohne cDNA. Zur Analyse wurde die gefüllte 96-Well-Mikrotiter-Platte in das ABI PRISM 7700 Sequence Detection System verbracht. Die Zyklen eins und zwei wurden einmal, die Zyklen drei und vier 40mal durchlaufen:

1. 2 min - 50°C
2. 10 min - 95°C
3. 15 sec - 95°C
4. 1 min - 60°C.

Über jedem Well befand sich eine Linse, welche den Strahl eines Argon-Lasers (488 nm) zur Fluoreszenzanregung weiterleitete. Auch die Fluoreszenzemission wurde auf diesem Weg gemessen und von einem Power Macintosh 4400 aufgezeichnet.

2.2.1.4.2 iCycler® PCR

Im iCycler® System erfolgt die Detektierung des PCR-Produktes mittels SYBRGreen-Markierung. Dies ist ein unspezifischer Fluoreszenzfarbstoff, der sich direkt in die dsDNA einlagert. Dadurch kommt es zu einem Anstieg der zu messenden Fluoreszenz dieses Farbstoffes. Es besteht, genau wie beim Taqman-Assay, eine direkte Korrelation zwischen der Zunahme der Fluoreszenz und der Zunahme der DNA. Die so gewonnenen Ergebnisse werden zur Quantifizierung des DNA-Gehaltes der Proben mit einer relativen Standardkurve verglichen. Die Berechnung der Standardkurve erfolgt aus acht doppelt bestimmten Verdünnungsreihen, die im Verhältnis von 1:2 aus einem cDNA-Pool der Proben erzeugt wird. Einzig die Standardkurve für IGF-1 wird in Verdünnungsreihen von 1:10 angesetzt. Jeder untersuchte Probenansatz hat außerdem Negativkontrollen, die frei von cDNA sind.

Für die Real-Time-PCR im iCycler-System wurde ein Mastermix aus 2x Supermix (IQ BioRad SYBR Green Supermix, Hercules, CA, USA), Ampuwa und den beiden Primerpaaren hergestellt.

Für die Durchführung der PCR wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (96 Multiply PCR plate, Sarstedt, Nümbrecht) mit folgender Mischung (je 22 µl pro Well) gefüllt und danach mit einer optischen Klebefolie (Adhäsiv Folie, Sarstedt, Nümbrecht) verschlossen. Es wurde eine Standardkurve und Negativkontrollen ohne cDNA hinzupipettiert.

Tabelle 3: Reaktionsansatz iCycler

	C3 / ERβ	LHβ
cDNA der Probe	2 µl	2 µl (1:10 verdünnt mit Ampuwa)
BioRad-iQ-SYBR-Green-Supermix (2x)	10 µl	10 µl
Primer sense	1 µl	1 µl
Primer antisense	1 µl	1 µl
Ampuwa	8 µl	8 µl

Zur Analyse wurde die gefüllte 96-Well-Mikrotiter-Platte in das iCycler-IQ-real-time-Detection-System (BioRad, Hercules, CA, USA) verbracht. Nach einmaliger Erhitzung des Reaktionsgemisches auf 95°C für 15 Minuten (1. Reaktionsschritt) wurden die folgenden Zyklen 50mal durchlaufen:

Tabelle 4: Temperaturzyklen, iCycler

C3 / ERβ	LHβ
1. 15 min - 95°C	1. 10 min - 95°C
2. 30 sec - 95°C	2. 30 sec - 95°C
3. 30 sec - 60°C	3. 1 min - 60°C
4. 30 sec - 72°C	4. 10 sec - 55°C
5. 10 sec - 55°C	

Die Auswertung erfolgte über die iCycler-Optical-System-Software (BioRad, Hercules, CA, USA).

2.2.1.5 Primer und Sonden

Folgende Sonden und Primer wurden für diese Arbeit verwendet:

ERα □(Gen Bank Accession No.: X61098, vom eigenen Labor entworfen):

Sense Primer: 5'-AAGCTGGCCTGACTCTGCAG-3'

Antisense Primer: 5'-GCAGGTCATAGAGAGGCACGA-3'

TaqMan Sonde: 5'-CGTCTGGCCCAGCTCCTCCTCATC-3' (5'-FAM-3'TAMRA)

IGF-1 (Gen Bank Accession No.: NM_12754, vom eigenen Labor entworfen):

Sense Primer: 5`-CTTCAACAAGCCCACAGGCTA-3`

Antisense Primer: 5`-GCTCCGGAAGCAACTCAT-3`

TaqMan Sonde: 5`FAM-CTCCAGCATTCGGAGGGCACCTC-TAMRA3`

LHβ (QuantiTect Primer Assay, Qiagen Kat. Nr. QT00262829):

Sonde: SYBR Green

C3 (QuantiTect Primer Assay, Qiagen Kat. Nr. QT00109270):

Sonde: SYBR Green

ERβ (QuantiTect Primer Assay, Qiagen Kat. Nr. QT00096222)

Sonde: SYBR Green

2.2.1.6 Auswertung der Real-Time-PCR

Die Analyse der PCR lieferte digitale, während der Reaktion aufgenommene Daten. Aus einem Diagramm, in dem die Fluoreszenz (abgeglichen gegen die Hintergrundfluoreszenz) über die Zeit (in PCR-Zyklen) aufgetragen wurde, lässt sich der Threshold-Zyklus (C_T) bestimmen. Der C_T -Wert gibt an, in welchem Zyklus die Fluoreszenz einer Probe erstmalig deutlich über der Hintergrundfluoreszenz liegt. Es gilt: Je mehr Ziel-Gen in der Ausgangsprobe vorhanden ist, desto kleiner ist der C_T -Wert.

Von den C_T -Werten der Kontrolltiere wird ein Mittelwert gebildet, gegen den die C_T -Werte der Testsubstanztiere relativiert und statistisch ausgewertet werden.

2.2.2 Serundiagnostik

Nach erfolgter Dekapitation der Tiere wurde das isolierte Blut bei 2800 Upm für 30 min zentrifugiert (Rotixa RP, Hettich, Tuttlingen). Das Serum wurde für die Zeit bis zur weiteren Analyse bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ eingefroren.

Die zu untersuchenden Lipoproteine (Triglyceride, Cholesterin, HDL und LDL) wurden mit kommerziell erhältlichen Kits der Firma Roche (Mannheim) auf einem Hitachi 902 Automatic Analyzer gemessen. Folgende Kits wurden dafür verwendet:

Triglyceride: Triglycerides GPO-PAP.

Cholesterin: Cholesterin CHOD-PAP.

HDL: HDL-Cholesterin 2nd Generation.

LDL: LDL-Cholesterin 2nd Generation.

2.2.3 Quantitative Computertomographie

Zur Bestimmung der Knochendichte wurde ein spezieller Computertomograph (XCT Research SA, Stratec, Pforzheim) benutzt. Dieser ist eigens zur Messung der Knochendichte bei experimentell verwendeten Kleintieren entwickelt worden.

Die einzelne Messung wurde wie folgt vorgenommen: Die Tibiae der Versuchstiere wurden nach der Präparation ex-vivo im Querschnitt an drei Stellen gemessen. Hierzu wurde die Referenzlinie auf die proximalen Kondylen festgelegt, so dass zwei Messungen in der metaphysären Spongiosa (1,75mm und 2mm von der Referenzlinie entfernt) und eine

Messung in der diaphysären Kortikalis bei 7,5mm Abstand von der Referenzlinie erfolgte. Die Referenzlinie selbst galt es hierbei manuell einzustellen.

Die Knochendichte wird im Rahmen der Messung farblich kodiert und in mg/cm^3 angegeben. Die Dichte der Spongiosa muss im Bereich von $280 - 400 \text{ mg}/\text{cm}^3$ und die der Kortikalis ab $700 \text{ mg}/\text{cm}^3$ liegen, um zur Auswertung zugelassen zu werden.

Ausgewertet wurde mit einem mitgelieferten Programm. Nach Beendigung des Versuches wurden die Werte der Testsubstanztiere auf die Werte der Kontrolltiere prozentrelativiert.

2.2.4 Statistische Methoden

Für die statistische Auswertung wird das Computerprogramm PRISM® (GraphPad, San Diego, USA) benutzt.

Bei der Auswertung der Genanalysen und der Knochendichtemessungen ist mit Prozentwerten gearbeitet worden, um labortechnisch bedingte Schwankungen zwischen den absoluten Messwerten der verschiedenen Aufarbeitungsgruppen zu verhindern. Die ovariectomierten Tiere in der Kontrollgruppe dienen als Vergleichstiere, gleichgesetzt mit 100% und alle anderen Behandlungsgruppen sind dazu in Relation gesetzt.

Aus den Werten aller Proben einer Behandlungsgruppe ist der Mittelwert und der Standardfehler des arithmetischen Mittelwerts (SEM) bestimmt und graphisch in Säulendiagrammen dargestellt worden. Die Signifikanz wurde mit einer einfachen Varianzanalyse für wiederholte Messungen eines Faktors (ANOVA) und anschließend dem Dunnett`s-Comparison-Test festgestellt. Hierbei wurde jeweils die Kontrollgruppe mit den substanzgefütterten Gruppen verglichen.

Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von kleiner 0,05 festgelegt und in den Graphen mit * gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Die im Folgenden dargestellten Ergebnisse stammen aus einer tierexperimentellen Studie, in der neben den beiden endokrinen Disruptoren OMC und Bisphenol A die Phytoöstrogene Genistein, Equol und Resveratrol untersucht wurden. Als Referenzsubstanz wurde Östradiol verwendet. Ovariectomierte, unbehandelte Tiere dienten als Bezugsgruppe. Die Daten über die Phytoöstrogene wurden für die Doktorarbeit von Frau Dr. Sandra Mählmeyer (Maehlmeyer 2010) ausgewertet. Die Ergebnisse bezüglich der ED sind Gegenstand der vorliegenden Schrift.

Es sei an dieser Stelle betont, dass die Fragestellung von Frau Dr. Mählmeyer die Abschätzung einer Multiorganwirkung von Phytoöstrogenen, die als Alternative zur klassischen Hormonersatztherapie in Erwägung gezogen werden, war. Diese genannten Substanzen sind somit potentielle Arzneimittel. In der vorliegenden Dissertation hingegen werden mögliche Auswirkungen von zwei Industriechemikalien untersucht, die in zahlreichen Produkten des Alltags enthalten sind und somit ist der Anwender einer unfreiwilligen Exposition ausgesetzt.

Um dem Gedanken des Tierschutzes gerecht zu werden, wurden für beide Fragestellungen, i.e. Phytoöstrogene und endokrine Disruptoren zwei gemeinsame Kontrollgruppen gewählt, nämlich unbehandelte ovariectomierte Mäuse sowie die Positivkontrolle von OVX-Östradiol-substituierten Tieren. Daher sind in der Dissertation von Frau Dr. Mählmeyer als auch in der hier vorliegenden Arbeit die Daten zur Kontrolle und zu Östradiol identisch, da sie in einem gemeinsamen Tierexperiment erhoben wurden.

Bei den Graphiken des Ergebnisteils (außer bei Abbildung 1) sind Standardfehler des Mittelwertes in Form von Fehlerbalken dargestellt. Das Symbol * kennzeichnet $p < 0,05$ vs. Kontrolle.

3.1 Tiergewichtsentwicklung

3.1.1 Körpergewichtsverlauf über 3 Monate

Das Körpergewicht (KG) nimmt weitgehend konstant über den Behandlungszeitraum von drei Monaten, wie in Abbildung 1 dargestellt, zu.

Die E2-substituierten Tiere nahmen weniger an Gewicht zu als die der Kontrollgruppe. Dies zeigte sich bereits innerhalb des ersten Monats nach Versuchsbeginn. Die Endokrinen Disruptoren erzeugten im Gegensatz dazu eine überproportionale Gewichtszunahme bei den Versuchstieren über die gesamte Versuchslaufzeit.

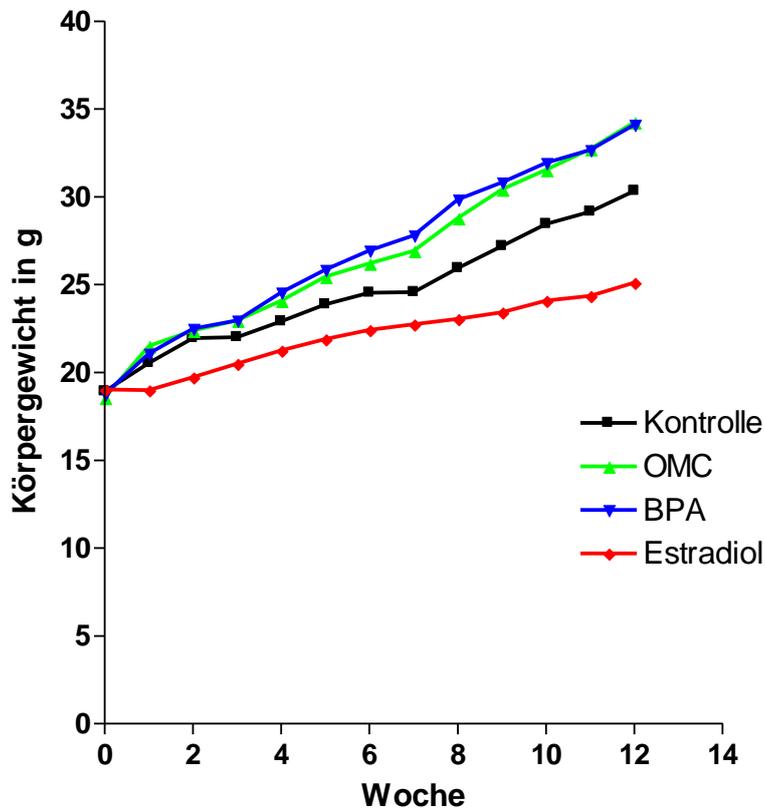


Abbildung 1: Körpergewichtsverlauf über 3 Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte (Kontroll- und Östradiolaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.1.2 Körpergewicht am Tag der Obduktion

Wird am Tag der Obduktion das durchschnittliche Tiergewicht der verschiedenen Gruppen mit der Kontrolle (30,35g) verglichen, ist das KG der mit OMC- (34,25g) und BPA-behandelten Tiere (34,11g) signifikant erhöht, in der Östradiolgruppe (25,12g) signifikant erniedrigt (s. Abb. 2).

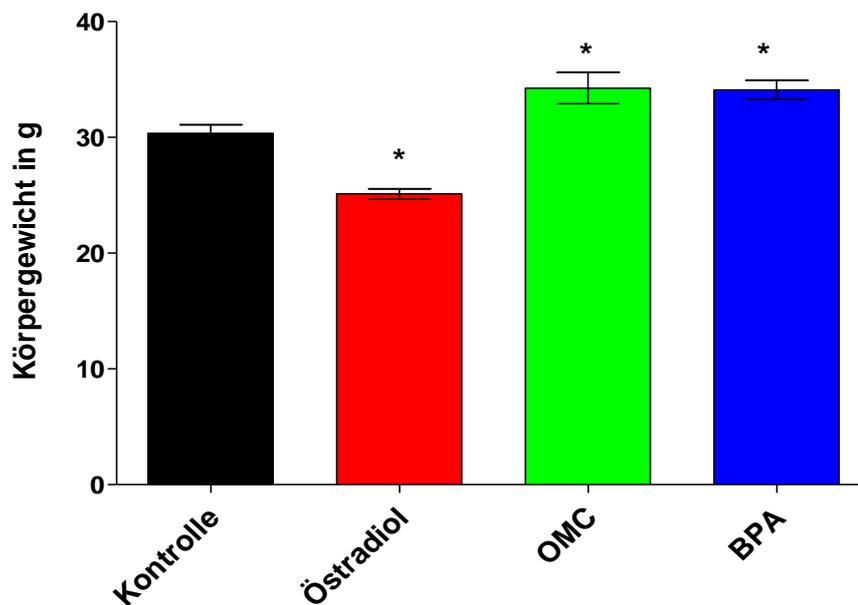


Abbildung 2: Körpergewicht am Tag der Obduktion in g (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.1.3 Futteraufnahme

Zur Übersicht wird in Tabelle 5 die durchschnittliche tägliche Futteraufnahme der einzelnen Gruppen dargestellt und hieraus die tägliche Aufnahme der jeweiligen Substanz ermittelt.

Die mit Östradiol substituierten Mäuse haben die höchste Futteraufnahme mit 3,77g.

Tabelle 5: Futter- und quantitative Substanzaufnahme (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

Testsubstanz	Tägliche Futteraufnahme pro Tier in g	Quantitative Aufnahme der Substanzen pro Tier und Tag in mg
Kontrolle	2,84	---
Östradiol	3,77	0,016
Octyl-methoxycinnamat	3,35	3,54
Bisphenol A	3,24	1,62

3.2 Untersuchte Veränderungen im Uterus

3.2.1 Absolutes und relatives Uterusgewicht

Der Uterus reagiert auf Östrogene mit einer sehr starken Proliferation, demzufolge ist das Uterusgewicht absolut und relativ gegenüber der Kontrollgruppe auf 977 % bzw. auf 1181 % erhöht (s. Abb. 3). Die anderen Substanzen haben einen vernachlässigbaren Einfluss.

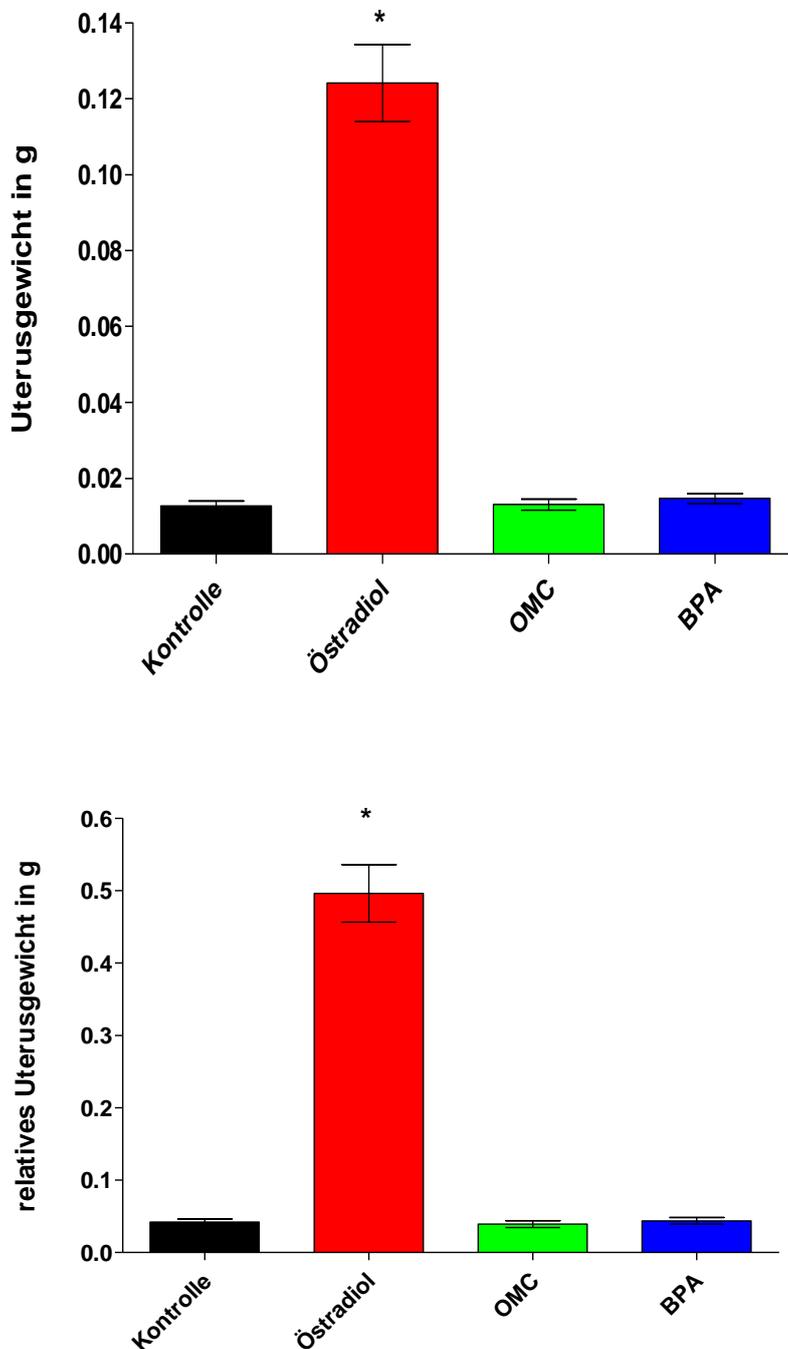


Abbildung 3: Wirkungen von Östradiol, OMC und BPA auf das absolute und relative Uterusgewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.2.2 Genexpressionsanalyse im Uterus

Der Einfluss der Testsubstanzen auf die Genexpression von IGF - 1, C3 und die beiden Östrogenrezeptoren wird auf Ebene der mRNA untersucht.

3.2.2.1 IGF – 1 und C3 im Uterus

Wie Abbildung 4 zeigt, induziert nur Östradiol einen signifikanten Anstieg der IGF-1-Expression um das vierfache im Vergleich zur Kontrollgruppe.

Signifikant ist auch der Anstieg der C3-mRNA-Expression um 1433 % bei Gabe von östradiolhaltigem Futter (s. Abbildung 5).

Die Gruppen OMC und BPA zeigen sowohl für die Expression für IGF – 1 als auch für C3 keine Veränderung.

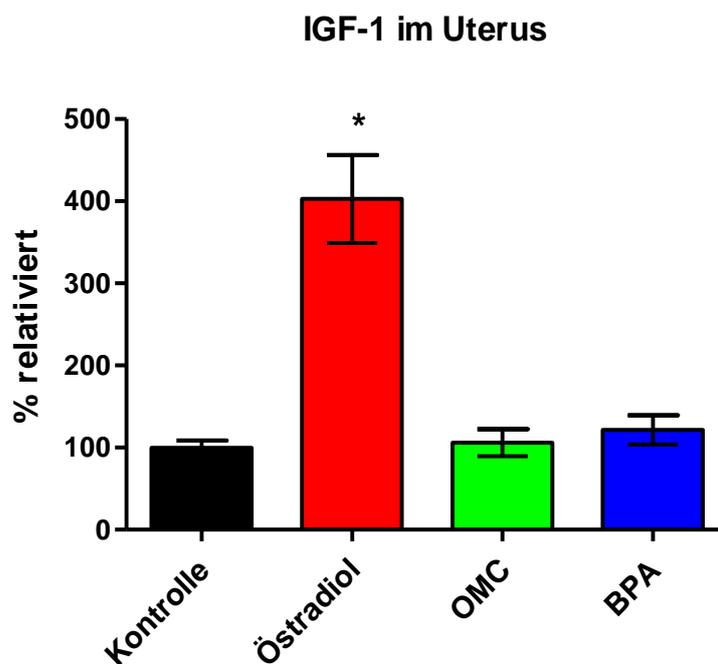


Abbildung 4: Einfluss von Östradiol , OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und C3 im Uterus (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

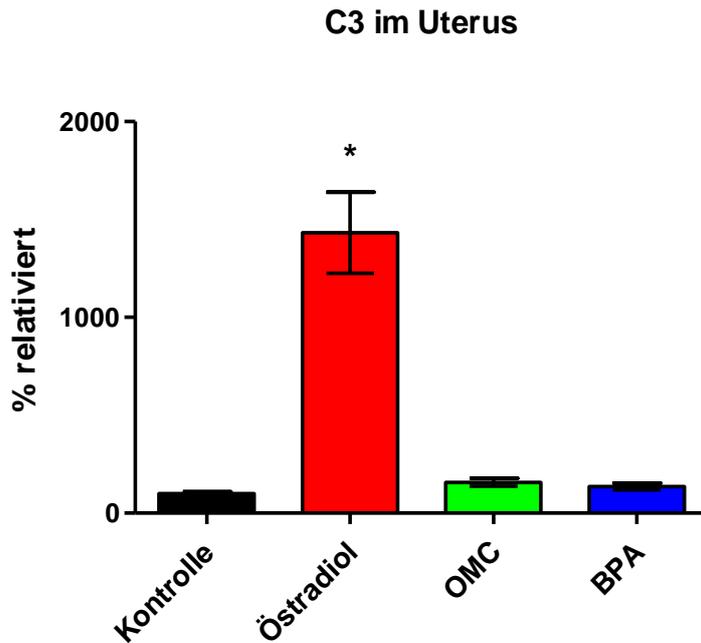


Abbildung 5: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und C3 im Uterus (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.2.2.2 ER α und ER β im Uterus

Die Expression des Östrogenrezeptors alpha in den Zellen des Uterus ist unter Östradiolsubstitution nicht signifikant, aber auf 166,8 % erhöht. Die Gruppen OMC und BPA führen zu einer leichten Steigerung der Genexpression.

Im Falle des Östrogenrezeptor beta führt die Östradiol Behandlung zu einem signifikanten Anstieg um 413 %. OMC hat einen leichten induktiven Einfluss, während BPA zu einer Hemmung der Expression führte (s. Abb.6).

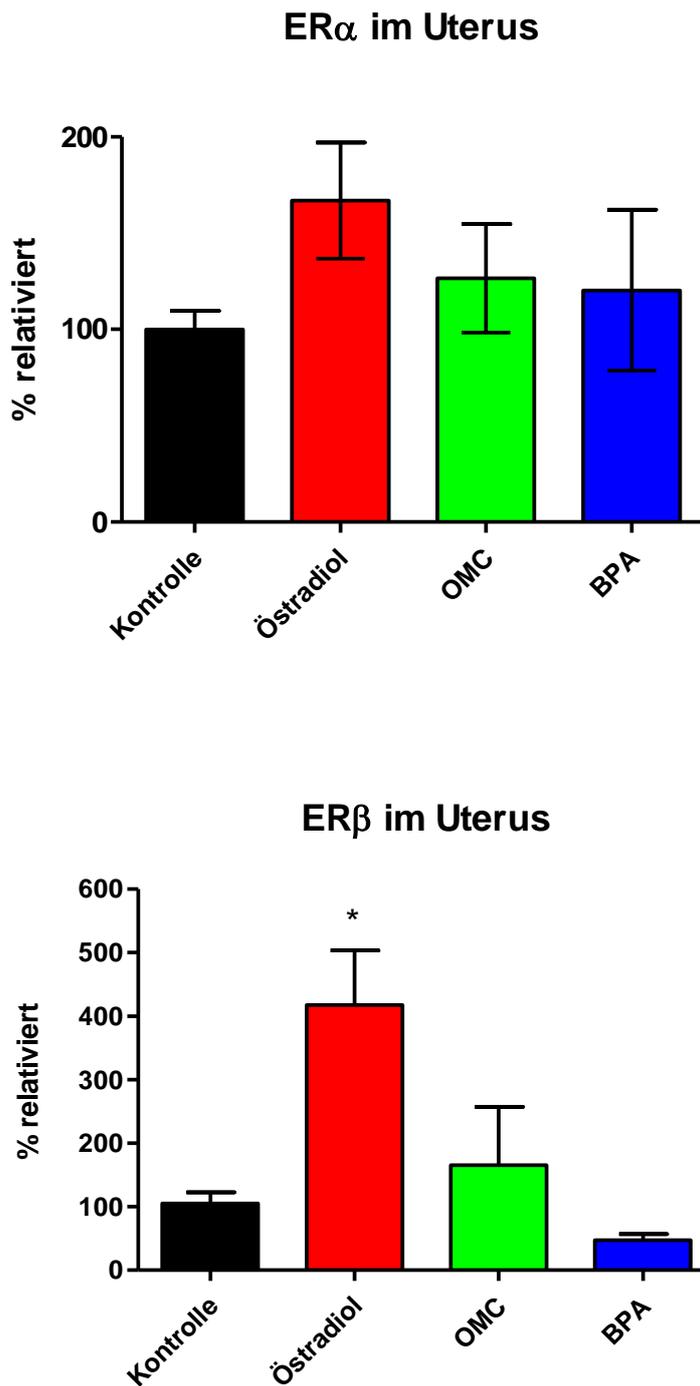


Abbildung 6: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β im Uterus (Kontroll- und Östradiol Daten bereits veröffentlicht (Maehlmeier 2010)).

3.3 Untersuchte Veränderungen in der Leber

3.3.1 Absolutes und relatives Lebergewicht

In allen drei Testsubstanzgruppen war das absolute Lebergewicht am Ende des Versuchs signifikant gleich stark (1,3g) gegenüber der Kontrollgruppe angestiegen (s. Abb.7). In der Substanzgruppe BPA ist der deutlichste Anstieg von 19% zu verzeichnen.

In Relation zum Körpergewicht ist nur eine Signifikanz in der Östradiolgruppe um einen Anstieg von 41% zu beobachten. Ein geringer positiver Effekt kann bei den endokrinen Disruptoren belegt werden.

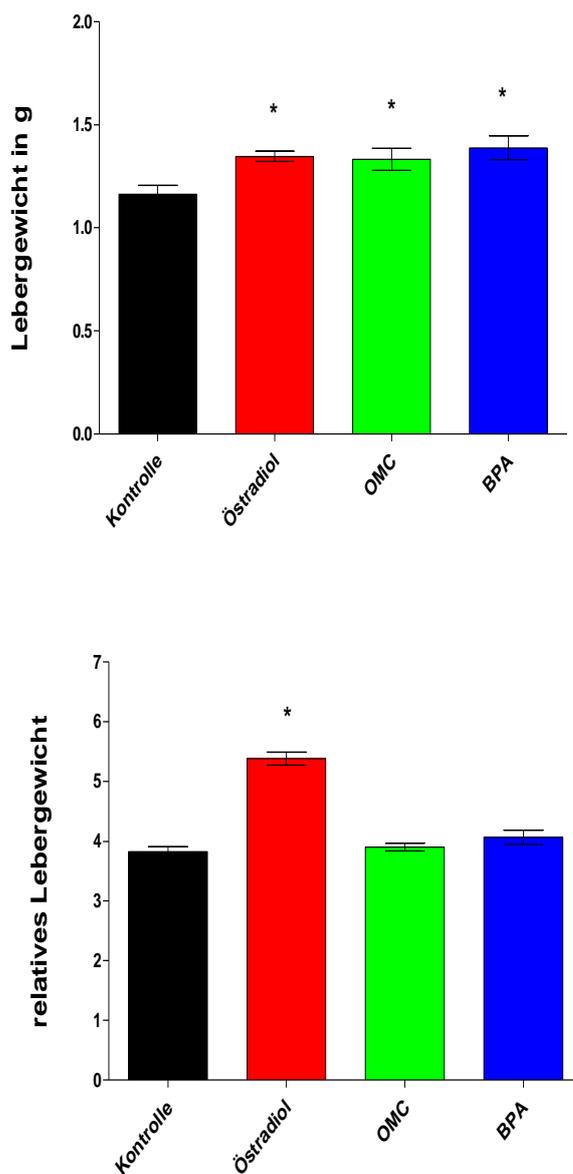


Abbildung 7: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf das absolute und relative Lebergewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.3.2 IGF – 1- und ER α –Expression in der Leber

Eine Tendenz zum Anstieg der Expression des IGF-1 Proteins in der Leber lässt sich bei Östradiol, OMC und BPA nachweisen, aber ohne das Signifikanzniveau zu erreichen (Abb.8). Ein Trend zur Steigerung des Genproduktes des Östrogenrezeptors alpha in der Leber ist in den Gruppen Östradiol und OMC festzustellen, während in der Gruppe BPA das Produkt um 6,9 % niedriger ausfällt als bei der Kontrolle. Hingewiesen sei auf die große Streuung der Werte.

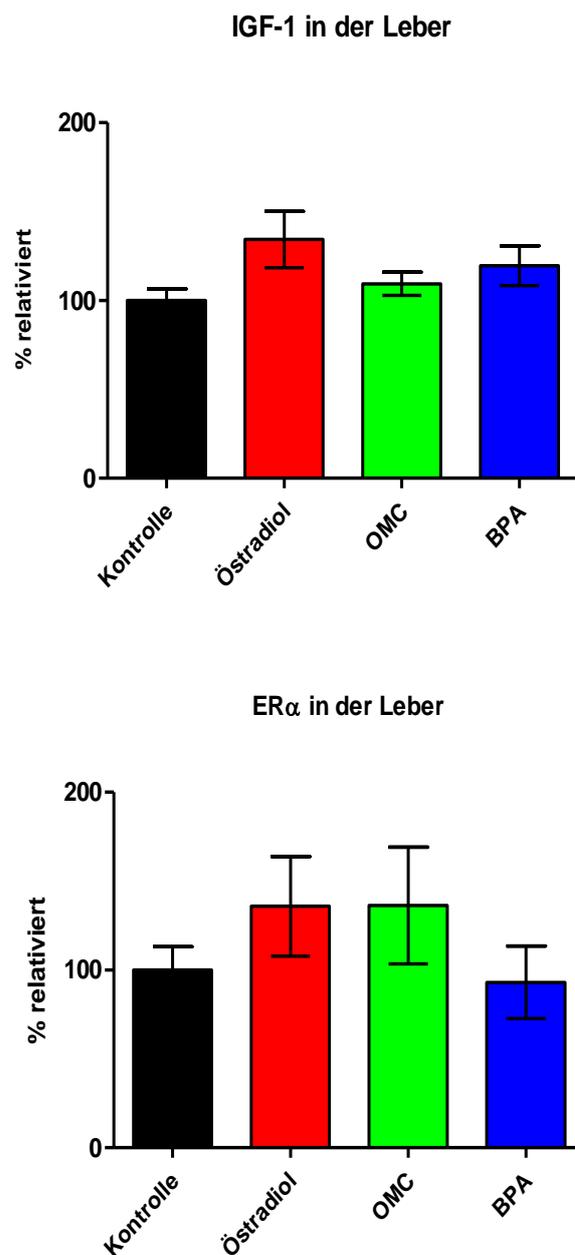


Abbildung 8: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und ER α in der Leber der Versuchstiere (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.4 Untersuchte Veränderungen im Herzen

3.4.1 Absolutes und relatives Herzgewicht

Eine signifikante Erhöhung des absoluten Herzgewichts ist bei den E2 (0,1131g), wie auch bei den BPA (0,1138g) Mäusen nachzuweisen (s. Abb.9). Zum Vergleich liegt das Gewicht bei der Kontrollgruppe um 0,1024g. OMC zeigte nur marginale Veränderungen. Bei Betrachtung des relativen Herzgewichts hat nur Östradiol zu einer signifikanten Erhöhung um 32,5% geführt, während für OMC und BPA eine minimal hemmende Tendenz auszumachen ist.

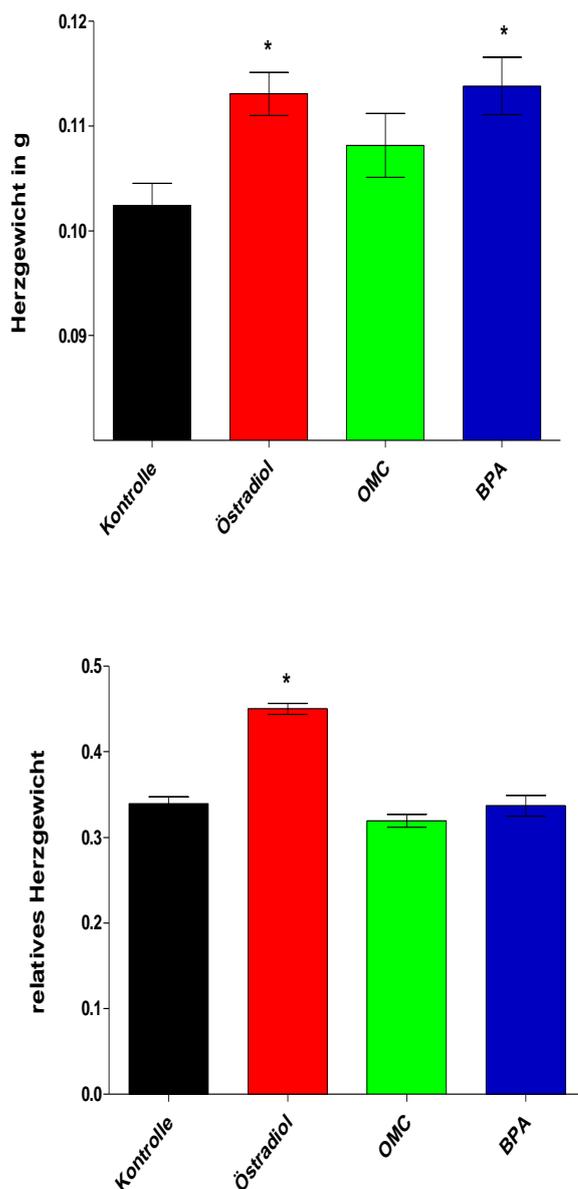


Abbildung 9: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf das absolute und relative Herzgewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.4.2 ER α - und ER β - Expression im Herzen

Der Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die ER α - und ER β -Expression im linken Ventrikel wird in Abbildung 10 graphisch abgebildet.

Der mRNA-Spiegel des ER beta wird durch die Behandlung von Östradiol und BPA auf 79 % sowie 85 % des Ausgangswertes der Kontrollgruppe gesenkt. Die Testsubstanz OMC hat einen Anstieg um 13 % zur Folge. Anders verhält es sich jedoch mit ER alpha. Hier kommt es alleinig unter BPA-Einfluss zu einem Anstieg der Expression, während die anderen beiden Substanzen zu einer Abnahme führen. Keine dieser Veränderungen erreicht das Signifikanzniveau.

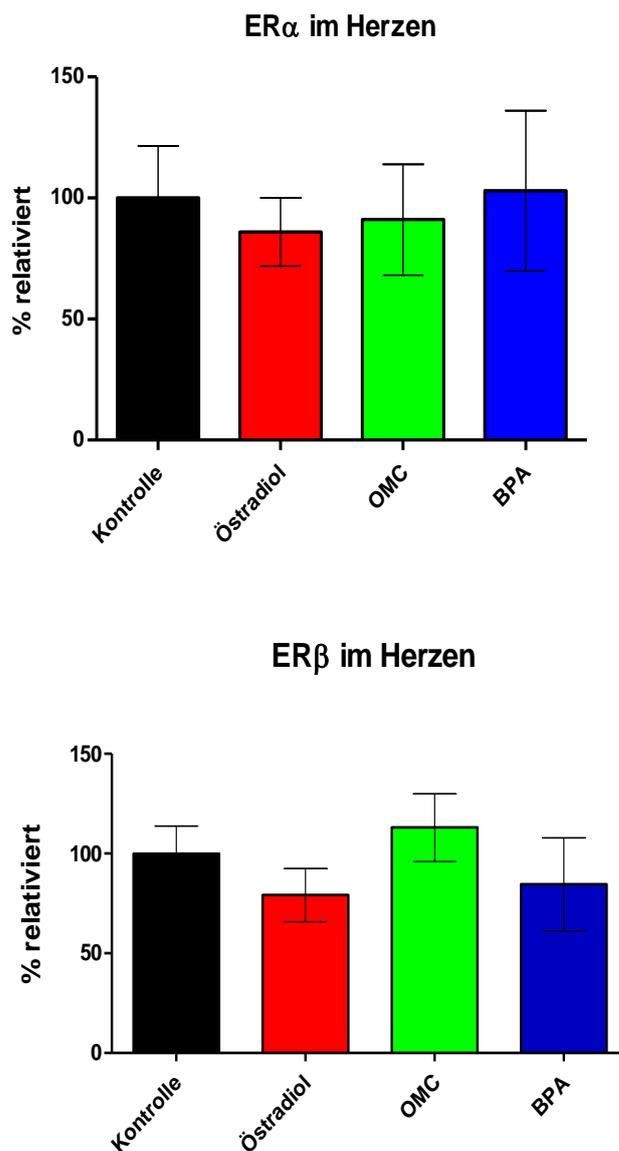


Abbildung 10: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β im Herzgewebe (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.4.3 IGF-1-Expression im Herzen

In Abbildung 11 ist die gemessene Genexpression von IGF – 1 im linken Ventrikel unter dem Einfluss der applizierten Substanzen graphisch veranschaulicht.

Die Expression des IGF – 1 ist signifikant durch die Östradiol Gabe gesteigert. Die Tendenz der endokrinen Disruptoren lässt auf einen induktiven Effekt dieser Stoffe schließen.

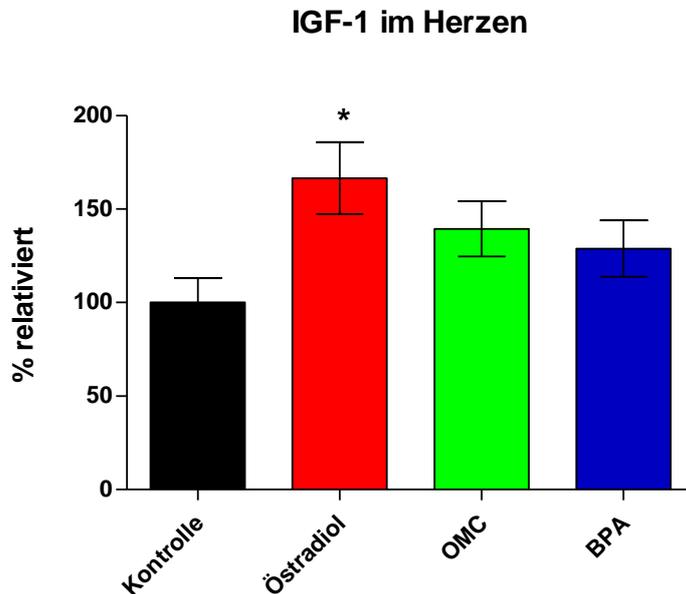


Abbildung 11: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 im Herzgewebe (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.5 Untersuchte Veränderungen in der Hypophyse

3.5.1 LH β -Expression in der Hypophyse

Auf Ebene der mRNA ist die Expression von LH beta in der Adenohypophyse durch die Testsubstanzen nicht signifikant verändert worden (s. Abb.12). Im Vergleich zur Kontrollgruppe hat BPA die größte Steigerung der Expression (129,1%) von allen Testsubstanzen zur Folge. Die Genexpression von LH β wird durch Östradiol- und OMC-haltiges Futter gesenkt.

LH β in der Hypophyse

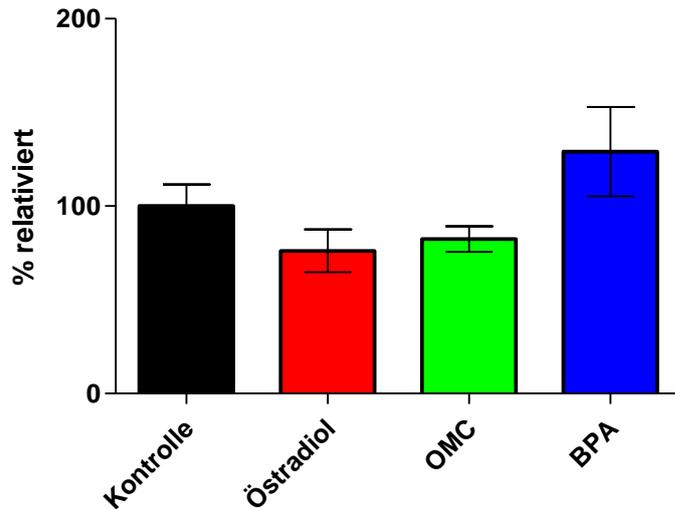


Abbildung 12: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von LH β in der Hypophyse (Kontroll- und Östradiol-daten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.5.2 ER α - und ER β -Expression in der Hypophyse

In Abbildung 13 ist der Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf Ebene der mRNA Konzentration des α - und β -Rezeptors in den Zellen der Hypophyse dargestellt.

Sowohl die endokrinen Disruptoren, als auch Östradiol haben eine leicht induzierende Wirkung auf die ER α -Expression, wobei OMC noch die größte Steigerung von 40% zur Kontrollgruppe aufweist.

Im Gegensatz dazu ist bei der Auswertung der ER β -Expression ein signifikanter Anstieg unter Östradiol auf das Sechsfache zu verzeichnen.

BPA (304%) und OMC (235%) führen auch zu einer deutlichen Induktion der Genexpression, aber ohne statistische Signifikanz.

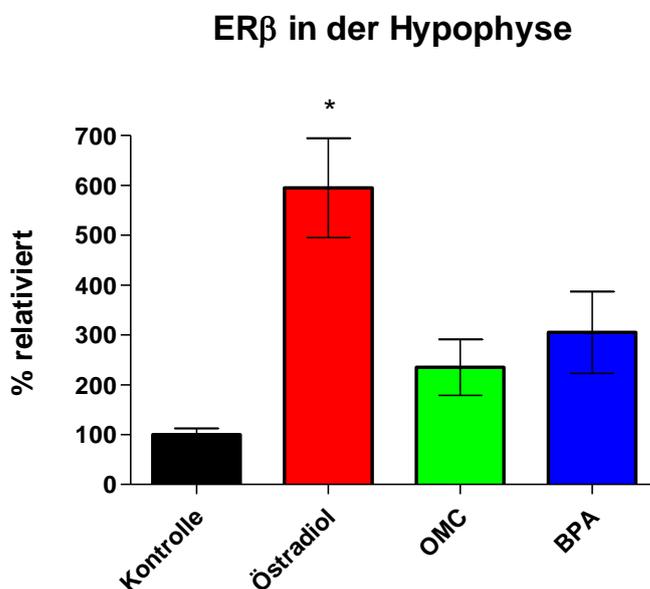
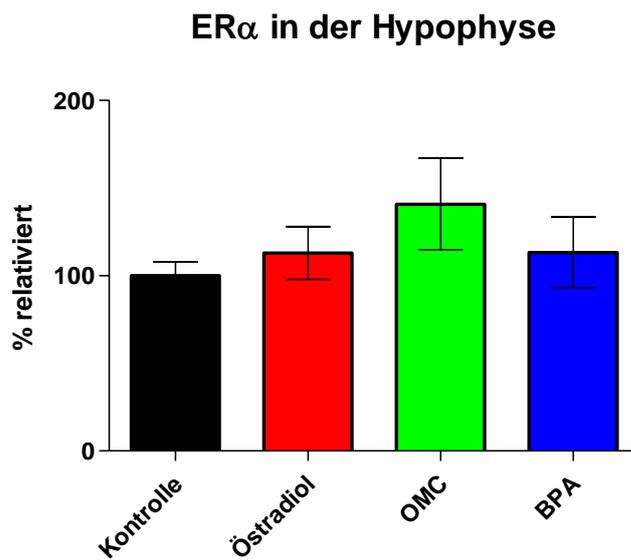


Abbildung 13: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β in der Hypophyse (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.6 Untersuchte Veränderungen an der Tibia

Als ossärer Parameter wird in diesem Versuchsaufbau die linke Tibia im Bereich der Spongiosa und Kortikalis untersucht.

3.6.1 Knochendichte in der Spongiosa und Kortikalis

3.6.1.1 Spongiosadichte

Die im Kleintier-CT gemessene Spongiosadichte unter dem Einfluss der Testsubstanzen ist in Abbildung 14 dargestellt.

In diesem Versuch kann ein signifikanter Erhalt der Spongiosadichte nach Ovariectomie nur unter Gabe von Östradiol bestätigt werden. So wird durchschnittlich ein Wert von 153,3 mg/cm³, im Vergleich zu 119,9 mg/cm³ in der Kontrollgruppe erreicht. BPA verhindert einen Substanzverlust bei 133,2 mg/cm³, während OMC mit 117,8 mg/cm³ noch unter dem Wert der Kontrollgruppe liegt.

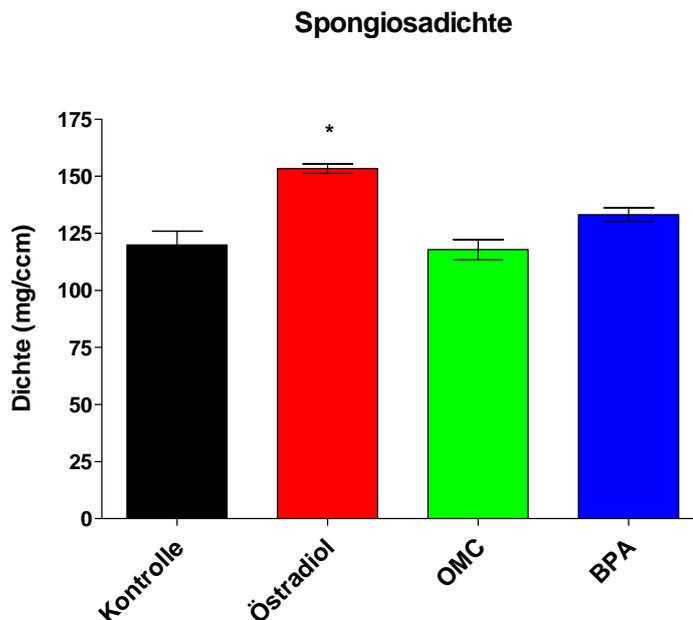


Abbildung 14: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in der Spongiosa (gemessen in der Metaphyse) der Tibia (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.6.1.2 Kortikalisdichte

Im Versuchsaufbau wird die Kortikalisdichte unter dem Einfluss der drei Substanzen in der Tibiadiaphyse gemessen (s. Abb.15).

Ähnlich wie in der Spongiosa kann nur bei den Tieren der Östradiolgruppe eine signifikante Verhinderung der Ovariectomie-induzierten Knochendichteabnahme nachwiesen werden. Die endokrinen Disruptoren haben keinen signifikanten Einfluss.

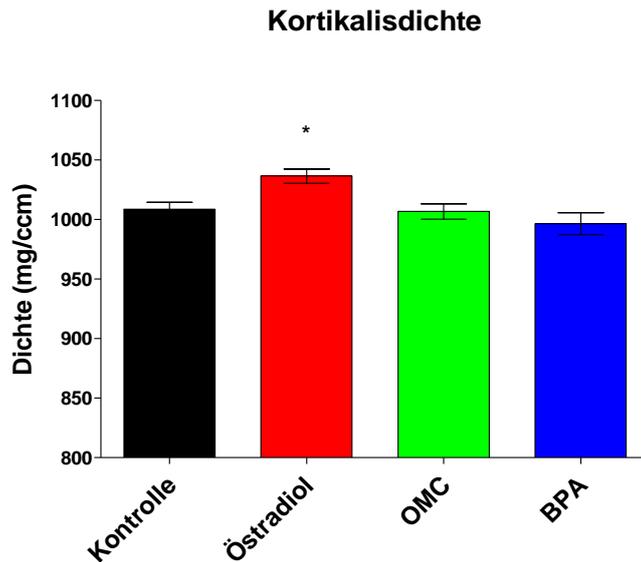


Abbildung 15: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in der Kortikalis (gemessen in der Diaphyse) der Tibia (Kontroll- und Östradiolaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.6.1.3 Gesamtdichte von Tibia-Metaphyse und -Diaphyse

Aus den oben beschriebenen Parametern kann die Gesamtdichte in Meta- und Diaphyse berechnet werden. Es ergibt sich auch hier nur eine signifikante Verzögerung des Knochensubstanzverlustes für die Mäuse, die als Futterbeimischung Östradiol bekommen haben. OMC und BPA führen zu keinem signifikanten Ergebnis (s. Abb. 16).

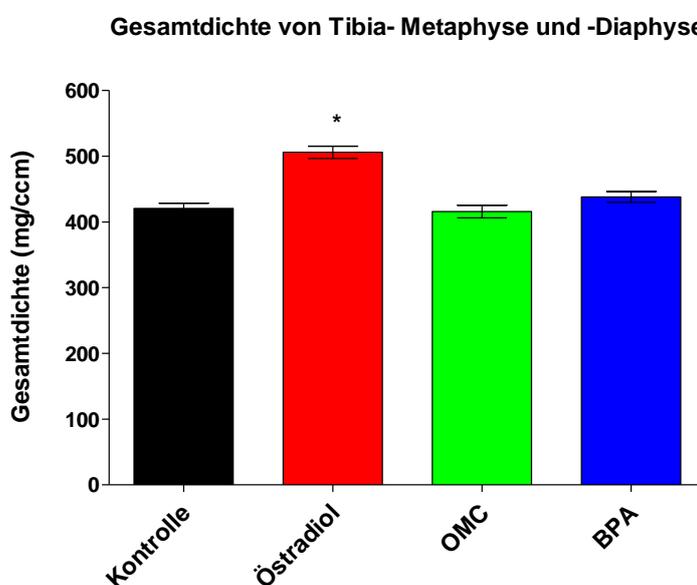


Abbildung 16: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in Tibia-Metaphyse und -Diaphyse (Kontroll- und Östradiolaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

3.7 Gemessene Veränderungen im Serum

Das bei der Obduktion gewonnene Serum wird zur Analyse von Cholesterol, Triglyceriden, HDL und LDL benutzt. Der Blutspiegel von Östradiol wird ebenso bestimmt.

3.7.1 Cholesterol, Triglyceride, LDL und HDL im Serum

Keiner der Werte zeigt im Serum signifikante Abweichungen von denen der Kontrollgruppe. Es lassen sich lediglich Tendenzen feststellen (s. Tab.6).

Tabelle 6 : Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Serumwerte von Cholesterol, Triglyceriden, LDL und HDL in mg/dl. Zusätzlich angegeben ist die jeweilige Standardabweichung (Kontroll- und Östradiolaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).

Testsubstanz	Cholesterol in mg/dl	Triglyceride in mg/dl	LDL in mg/dl	HDL in mg/dl
Kontrolle	97,2 +/- 14,33	103,1 +/- 11,51	20,3 +/- 3,85	84,7 +/- 14,87
Östradiol	92,0 +/- 28,90	92,6 +/- 24,76	17,8 +/- 2,99	77,2 +/- 28,65
OMC	105,6 +/- 6,80	108,0 +/- 18,96	18,8 +/- 1,48	96,1 +/- 6,77
BPA	109,8 +/- 19,02	96,4 +/- 8,72	21,8 +/- 5,14	100,0 +/- 17,96

3.7.2 Östradiol im Serum

Ebenfalls ausgewertet, jedoch nicht graphisch dargestellt, wurde der Serum Östradiolspiegel und der Einfluss der Versuchssubstanzen auf diesen.

In der mit Östradiol behandelten Mäusegruppe kann eine signifikante Erhöhung des Wertes für Östradiol im Serum (30,1pg/ml) auf das Fünffache belegt werden.

Die anderen Tiergruppen zeigten einen dem Kontrollwert ähnlichen Östradiolspiegel.

4 Diskussion

4.1 Die Östradiolwirkung im Langzeit-Mausmodell

Die ovariectomierte Ratte ist ein etabliertes Modell für die in-vivo Prüfung von Substanzen auf eine östrogen-agonistische Wirkung. In der gemeinsamen Arbeitsgruppe mit Frau Dr. Mählmeyer konnte analog dazu das Tiermodell Maus ebenfalls als funktionierendes Modell für östrogene Effekte beschrieben werden. Dieses wurde erstmals in der Dissertation von Frau Dr. Mählmeyer veröffentlicht (Maehlmeyer 2010).

Ein Standardtest ist der Uterotrophieassay. Nach Vorgaben der OECD wird in diesem Test die Prüfsubstanz für drei Tage appliziert um eine Aussage über deren „Östrogenität“ treffen zu können. In Abbildung 17 wird jedoch deutlich, wie überaus unterschiedlich, je nach Versuchsdauer, die erhobenen Resultate ausfallen können. Die Applikationsdauer einer östrogen-agonistisch wirkenden Substanz ist von grundlegender Bedeutung für ihre pharmakologisch/endokrinologische Wirkung wie dies anhand von drei typischen, durch östrogen-regulierten Genen in adulten ovx-Ratten exemplarisch verdeutlicht werden soll. Die Expression vom *Transformin growth factor β* im Knochen wird akut, d.h. 6 Stunden nach Applikation von E2 deutlich gesteigert. Eine längere Gabe des Hormons bleibt dagegen ohne jeden Effekt auf die Expression des Wachstumsfaktors. Ein anderer Wachstumsfaktor, *epidermal growth factor* wird hingegen nur nach siebentägiger E2-Substitution, d.h. etwa analog der Behandlungsdauer der OECD-Vorgabe, hochreguliert. Ein drittes „Beispiel“ der Östrogenwirkung zeigt sich bei der Expression von Osteocalcin im Knochen. Eine deutliche Steigerung der Expression erfolgt nach akuter Gabe, hingegen sind die mRNA-Spiegel nach 7 Tagen Behandlung gegenüber der Kontrolle unverändert. Wird E2 für 3 Monate verabreicht, ist die Expression hingegen signifikant reduziert. Diese Ergebnisse lassen nur den Schluss zu, dass es für Prüfsubstanzen, die möglicherweise „östrogenartig“ wirken, kein allgemeingültiges Protokoll gibt, um deren endokrinologischen Eigenschaften zweifelsfrei zu beschreiben.

Bei einer langanhaltenden Exposition, wie im Falle von Umweltchemikalien, ist daher die Durchführung einer Langzeituntersuchung (3 Monate) somit zwingend indiziert, um positive wie auch negative Einflüsse aufzudecken. Deshalb wurde für die vorliegende Studie eine Expositionsdauer von drei Monaten gewählt.

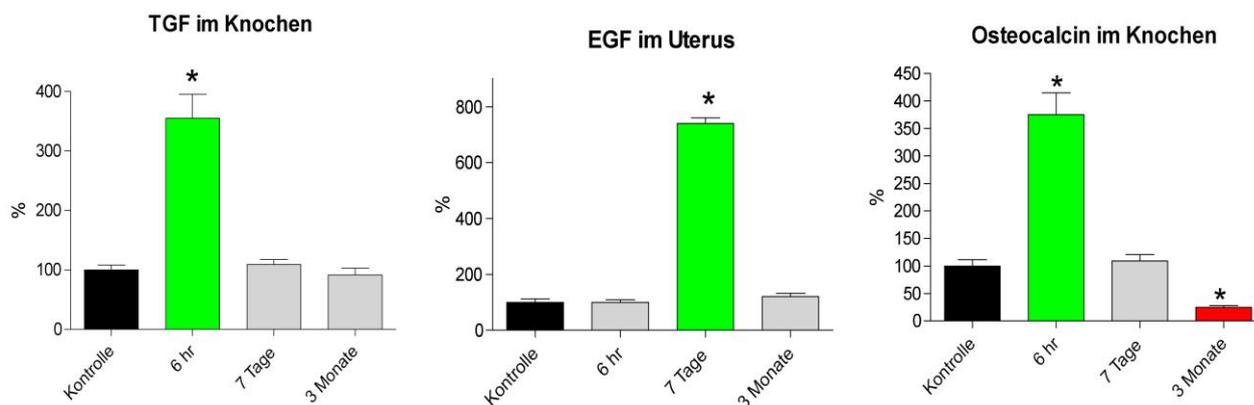


Abbildung 17: Expression von Östrogen-regulierten Proteinen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer

Ein weiterer Schwachpunkt im Versuchsaufbau des OECD-Modells zur östrogenen Wirkung ist die alleinige Betrachtung von Veränderungen im Uterus. Östrogene besitzen schließlich nicht nur dieses eine Zielorgan, sondern wirken auf verschiedene Organsysteme im Organismus. Diesem Aspekt wurde in der vorliegenden Studie Rechnung getragen, indem in drei weiteren Zielorganen des Östrogens, Hypophyse, Leber und Knochen, die Expression bekannter E2-regulierten Gene, bzw. die Veränderungen der Knochenmorphologie untersucht wurde.

Weiterführend kann diskutiert werden, dass E2 signifikant den ovariectomie-bedingten Anstieg des Körpergewichts der Tiere verhindert hat. Mögliche Erklärungen für diese Beobachtung, sind die gesteigerte Fettsäureoxidation und das Eingreifen in die Energiehomöostase. Ein möglicher weiterer Erklärungsansatz ist das deutlich erhöhte Aktivitätsniveau der Mäuse und der damit einhergehende erhöhte Grundumsatz. Dies deckt sich mit publizierten Studienergebnissen (Hertrampf et al. 2006).

In der Dissertation von Frau Dr. Mählmeyer ist erstmals ein hypertropher Effekt im Myokard, ausgelöst durch Östradiol beschrieben worden. Dieser wird auf eine mögliche direkte Wirkung zurückgeführt, untermauert auch durch eine Steigerung der Expression von IGF-1, und nicht auf indirekte Mechanismen wie eine NO-Freisetzung im Endothel, oder durch Effekte auf die Atherogenese und den Serumlipidspiegel (Saltiki and Alevizaki 2007, Miller and Duckles 2008). Unter pathologischen Bedingungen hat E2 eine kardioprotektive Wirkung, indem unter anderem eine Herzhypertrophie verhindert wird. (Pelzer et al. 2005, Skavdahl et al. 2005, Harris 2007).

Die beiden EDs OMC und BPA haben in der applizierten Dosis keinen Effekt auf das relative Herzgewicht. Somit kann unter den gewählten experimentellen Bedingungen kein pharmakologischer Effekt dieser Substanzen im Herzen beobachtet werden.

4.2 Die Wirkung von BPA und OMC im Langzeit-Mausmodell

4.2.1 BPA

Die Studienlage zu akuten in-vivo-Wirkungen von BPA ist umfassend, doch es gibt bisher keine Erkenntnisse in Bezug auf eine Langzeitbehandlung von Mäusen. Sowohl in-vitro-Versuche als auch Kurzzeitversuche in-vivo an Nagern zeigten östrogenartige Effekte von BPA. Vor allem bei einer präpartalen Exposition bis hin zur Pubertät wurden Interaktionen beschrieben, die schon bei geringer Wirkstoffkonzentration auftraten. (Markey et al. 2005). Dabei sind östrogenartige Effekte im weiblichen und männlichen Reproduktionstrakt, in Brustdrüsengewebe und im Gehirn, sowie in Bezug auf das Verhalten gefunden worden (Colerangle and Roy 1997, Markey et al. 2001, Richter et al. 2007). Weiter wird Bisphenol A als ein stimulierender Faktor in der Entstehung von Übergewicht diskutiert (Newbold 2010). Um dieselben östrogenen Effekte wie Östradiol zu erzeugen, muss Bisphenol A in einer um das 10 bis 1.000fach höheren Konzentration als E2 vorliegen (Richter et al. 2007). In dem hier beschriebenen Experiment ist die Dosis von 1,6 mg/kg/Tag gewählt worden, welche in früheren Studien an der Ratte zu multiplen, östrogenartigen Effekten geführt hatte (Seidlova-Wuttke et al. 2006a).

In der vorliegenden Arbeit zeigte sich in der Auswertung der Ergebnisse ein signifikanter Anstieg des Körpergewichts unter BPA-Substitution. Dieses Phänomen wurde in anderen Studien für die gleiche Dosis berichtet (Miyawaki et al. 2007), während neuere Daten eine Abnahme des Körpergewichts bei Konzentrationen ab 50mg/kg/Tag zeigten (Tyl 2009).

Eine herabgesetzte Insulinsensitivität durch Suppression von Aponektin über Bisphenol A und eine dadurch resultierende Gewichtssteigerung kann als Erklärungsversuch herangezogen werden (Hugo et al. 2008), wie aber auch der bereits durch Grun und Blumberg beschriebene direkte Einfluss von BPA durch Stimulation nukleärer Rezeptoren des Fettgewebes (Grun and Blumberg 2007).

Eine mögliche Erklärung für das Ausbleiben von Effekten bei Applikation von 1,6mg/kg/Tag in den anderen Zielorganen des Versuchsaufbaus könnte an der zu gering gewählten Dosis der

Substanz liegen. Dabei ist die verabreichte Konzentration immer noch 32fach höher als der festgelegte Grenzwert der EFSA (EFSA-Q-2008-382). Rochelle Tyl verweist in seinen Arbeiten auf eine minimale Dosis von über 5mg/kg/Tag um systemische Effekte in der adulten Maus zu erzeugen (Tyl 2009).

Die gewählte Dosis basierend auf publizierten Daten zu einer endokrinologisch/pharmakologischen Wirkung von BPA in der adulten ovx-Ratte (Seidlova-Wuttke et al. 2004) zeigte Bisphenol A in der adulten ovx-Maus schwache östrogene Effekte. Signifikant ist ein Anstieg des Körpergewichts im Vergleich zur östrogendefizienten Maus. Gründe für die Unterschiede zwischen den Wirkungen von BPA in Ratten vs. Maus könnten in einem höherem First-pass Effekt im Vergleich zum Rattenmodell begründet sein.

Eine Unbedenklichkeit gegenüber BPA aufgrund der hier vorgestellten und in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse kann jedoch nicht ausgesprochen werden, denn es ist unbestritten, dass die Substanz im Menschen nachweislich aufgenommen wird und somit potentiell Interaktionen möglich sind (Calafat et al. 2008).

Außerdem zeigten Studien mit Wirkdosen im Bereich von unter 1 µg/kg/Tag bei perinataler Exposition eindeutige Effekte in Zielorganen von Östrogenen (Markey et al. 2005, Richter et al. 2007). Wie genau der östrogene Wirkmechanismus von Bisphenol A zustande kommt, ob primär singular oder im Zusammenwirken mit anderen Endokrinen Disruptoren, die der Mensch täglich resorbiert, ist noch nicht abschließend geklärt. Auch die Möglichkeit eines adversen Effekts auf die Wirkung von endogenen Östrogenen wird diskutiert (Rajapakse et al. 2002). Letztendlich beschäftigen sich deshalb neuere Arbeiten zunehmend mit der Frage, ob eine Mischung von endokrinen Substanzen eine klare endokrine Wirkung *in vivo* erzielt, während die einzelnen Stoffe bei isolierter Substitution unterhalb des „*No observed adverse effect level*“ (NOAEL) keine Effekte auslösen können. Ein solcher Studienaufbau versucht ein möglichst realitätsnahes Szenario widerzuspiegeln. Auch hier wird auf die besondere Situation von Risikogruppen wie Schwangere, Feten und Säuglingen hingewiesen (Christiansen et al. 2012, Jacobsen et al. 2012). Bereits in der Einleitung angesprochen und in mehrfachen Studien inzwischen belegt, ist die Möglichkeit einer BPA-induzierte Veränderung des Genoms durch eine Alteration der Methylierung im Sinne einer epigenetischen Prägung (Bernal and Jirtle 2010, Kundakovic and Champagne 2011).

Die positive Korrelation zwischen BPA-Konzentration im Urin und Anstieg der Prävalenz von Diabetes und Herz-Kreislauf-Erkrankungen (Lang et al. 2008) könnte in Zusammenschau mit dem Risikofaktor „Übergewicht“ Anlass zur weiteren Vertiefung der Forschung in diesem Bereich sein.

4.2.2 OMC

UV-Filtern wird ein hohes Bioakkumulationspotenzial aufgrund ihrer lipophilen Eigenschaft zugeschrieben. Im Jahre 1997 zeigte sich erstmals eine Belastung von Fischen in kleinen Badeseen durch OMC (Nagtegaal et al. 1997). Somit stellte sich die Frage einer fraglichen Akkumulation auch im menschlichen Organismus. Nachdem erste Studien zeigten, dass OMC nach dermalen Applikation von Sonnenschutzcremes beim Menschen in Urin und Serum nachzuweisen ist und somit resorbiert wird (Janjua et al. 2004), schlossen sich auch weitere in-vivo-Studien an, die OMC auf seine Eigenschaft als ED in multiplen Zielorganen hin untersuchten.

Östrogene Wirkungen von OMC wurden sowohl in-vitro an der Östrogen-sensitiven-Zellreihe MCF-7, als auch in-vivo bei immaturen ovariectomierten Ratten im Rahmen eines uterotrophen Assays über 5 Tage bei einer mittleren Wirkdosis von 935 mg/kg/Tag nachgewiesen (Schlumpf et al. 2001). In einem Langzeitversuch konnte an ovx – Ratten mit einer Dosis unter 250mg/kg/Tag keine uterotrophe Wirkung erzielt werden, wohl aber die signifikante Hochregulierung von Markerproteinen bei einer Tagesdosis von 57,5 mg/kg (Seidlova-Wuttke et al. 2006a, Seidlova-Wuttke et al. 2006b). In weiteren in-vivo-Experimenten bestätigten sich milde östrogene Effekte auf den Hypothalamus - Hypophysen - Schilddrüsen - Regelkreislauf, auf die Vagina, auf Serumlipide, Fettgewebe und die LH-Sekretion (Schmutzler et al. 2007b).

Wie auch unter dem Einfluss von BPA zeigte sich für OMC in der vorliegenden Studie eine signifikante Zunahme des Körpergewichts. Eine östrogene Wirkung an Uterus, Knochen, Hypophyse, Leber und Herz konnte in diesem Versuchsaufbau nicht beobachtet werden.

Wird allein die täglich konsumierte Futtermenge der OMC-Tiere betrachtet, liegt diese 18% über der aufgenommenen Futtermenge der Kontrollgruppe. Somit könnte das erhöhte Körpergewicht als ein OMC – unabhängiger Effekt gedeutet werden, der allein der gesteigerten Futteraufnahme geschuldet ist. Seidlova-Wuttke et al. beschrieben, konträr zu den hier erhobenen Ergebnissen, eine Gewichtsabnahme im Rattenmodell bei gleicher Versuchsdauer jedoch zwanzigfach höheren OMC-Konzentration. Die Autoren mutmaßten, dass es sich dabei um eine bekannte ovariectomie-bedingte Gewichtsabnahme bei Ratten handele (Seidlova-Wuttke et al. 2006a). In dieser hohen Dosis kann aber ein unspezifischer toxischer Effekt von OMC nicht ausgeschlossen werden.

Wird OMC transdermal überhaupt in entsprechend großer Menge resorbiert, um in die Hormonhomöostase eingreifen zu können? Dies ist die entscheidende Frage, welche ebenso

die Basis für die Risikoeinschätzung darstellt bei eher zu vernachlässigender oraler Exposition durch OMC. Bisher konnte nur eine Studie diesen Nachweis erbringen (Janjua et al. 2004). Wobei die Methodik in dieser Arbeit diskussionswürdig erscheint, da eine eigens hergestellte Sonnencreme für die durchgeführten Versuche verwendet wurde. Diese Creme besaß unter anderem keine Resorptionshemmer und beinhaltete eine höhere Dosis an OMC, als gesetzlich erlaubt ist (Gilchrest 2004). Es wäre demnach wünschenswert, kommerzielle Sonnencremes für Folgeversuche zu verwenden und deren transdermale Absorption zu untersuchen.

Eine Erklärung für die fehlenden östrogenen Wirkungen von OMC an Östrogen-sensiblen Organen in der vorliegenden Arbeit könnte in der zu gering gewählten Dosis begründet sein. In anderen Studien mit Ratten mit wesentlich höheren Substanzkonzentrationen konnten schließlich östrogene Effekte beobachtet werden. Ob derart hohe Dosen, die in keinsten Weise dem Gebrauch von OMC in Kosmetikprodukten entsprechen, relevant für eine toxikologische Bewertung sind, muss bezweifelt werden. Die wahrscheinlichste Erklärung für die Diskrepanz bezüglich der endokrinen Wirkung von OMC in Ratte und Maus könnte die schnellere Metabolisierung der Substanz in der Maus als in der Ratte sein.

Zusammenfassend kann in der vorliegenden Arbeit für OMC und BPA unter den gewählten Bedingungen kein negativer Effekt in den Zielorganen von Östrogenen festgestellt werden. Da der Goldstandard E2 die erwarteten Effekte hervorgerufen hat, ist das gewählte Tiermodell grundsätzlich geeignet, potentiell östrogenartig wirkende Stoffe zu identifizieren.

Zusammenfassung

Bei der Betrachtung, dass Nahrungsmittel, Getränke usw. heutzutage immer mehr mit Verpackungsmaterialien in Kontakt kommen, die zu ihrer Herstellung Chemikalien benötigen und die möglicherweise bei langfristiger Exposition zu gravierenden Gesundheitsschäden führen können, verunsichert zunehmend viele Verbraucher. Es konnte noch nicht abschließend geklärt werden, ob diese Stoffe zu einer Akkumulation im Organismus führen und damit ein Gefährdungspotential für den Menschen darstellen. Auch der vermehrte Gebrauch von Pflegeprodukten erhöht die Exposition gegenüber synthetisch hergestellten Inhaltsstoffen mit potentiellen Nebenwirkungen insbesondere im endokrinen System.

Vor allem Störungen der Fortpflanzungsorgane, als sensibler Indikator für ein gestörtes Gleichgewicht in der Hormonhomöostase durch interferierende Substanzen, sind, wenn sie auftreten, früh zu beobachten. Ob beobachtete Veränderungen nur durch einen sich wandelnden Lebensstil der Menschen oder durch Substanzen, die in den Hormonhaushalt eingreifen, hervorgerufen werden, muss geklärt werden.

Ein validiertes Modell der OECD zur Untersuchung von Substanzen auf eine östrogene Wirkung ist die ovariectomierte Ratte. Dabei wurde eine Testdauer von drei Tagen gewählt, was ungefähr der Zykluslänge einer Ratte entspricht. Um weitere Erkenntnisse zu molekularen Mechanismen der potentiellen Wirksubstanzen zu erlangen, verwenden neuere Studien KO-Mäuse in ihren Arbeiten. Aus diesem Grund wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit das Modell der ovariectomierten Maus gewählt.

Um mögliche Langzeiteffekte zu erfassen, wurde ein Versuchsaufbau mit den Testsubstanzen Östradiol, Bisphenol A und Octyl-methoxycinnamat (OMC) über drei Monate gewählt und deren Wirkung auf Östrogen-sensitive Organe und Parameter hin untersucht.

Das Studiendesign beinhaltete 60 zwei Monate alte C-57-BL/6J-Mäuse, die nach Ovariectomie in 4 Gruppen aufgeteilt wurden. Über einen Zeitraum von drei Monaten stand der Kontrollgruppe sojafreies Futter zu Verfügung, die anderen Gruppen erhielten entweder Östradiol (4,32mg/kg sojafreies Futter), Bisphenol A (500mg/kg sojafreies Futter) oder OMC (1000mg/kg sojafreies Futter) versetzte Nahrung. Nach Tötung der Tiere wurde das Feuchtgewicht von Uterus, Leber und Herz sowie das Körpergewicht bestimmt. Die Genexpression von ER α (Uterus, Leber, Herz und Hypophyse) und ER β (Uterus, Herz und Hypophyse) wurde per PCR analysiert. Die Expression der biologischen Marker für eine östrogene Wirkung, C3 (Uterus), IGF-1 (Uterus, Leber und Herz) und LH β (Hypophyse),

wurde untersucht und die Serumspiegel für Cholesterol, Triglyceride, HDL und LDL bestimmt. Zusätzlich wurde mittels Kleintier-CT eine Messung der Spongiosa- und Kortikalisdichte in der linken Tibia durchgeführt.

Auch im Modell der ovx-Maus können die erwarteten Effekte des Goldstandards E2 nachgewiesen werden. So kann z.B. eine ausgeprägte uterotrophe Wirkung, sowie eine signifikante Verbesserung der Knochenstrukturen im Vergleich zu den Steroid-depletierten ovx-Mäusen beobachtet werden. Solche Effekte wurden nicht durch OMC oder BPA hervorgerufen. Ob dieser fehlende endokrinologische Effekt der beiden getesteten Industriechemikalien auf eine zu geringe Dosierung und/oder einer unzureichenden Applikationsdauer beruht, muss in weiteren Studien geprüft werden, bevor OMC und BPA bezüglich einer östrogenartigen Wirkung in-vivo als unbedenklich eingestuft werden können.

5 Literaturverzeichnis

- Arts J, Kuiper GG, Janssen JM, Gustafsson JA, Lowik CW, Pols HA, van Leeuwen JP (1997): Differential expression of estrogen receptors alpha and beta mRNA during differentiation of human osteoblast SV-HFO cells. *Endocrinology* 138, 5067-5070
- Bergeron JM, Crews D, McLachlan JA (1994): PCBs as environmental estrogens: turtle sex determination as a biomarker of environmental contamination. *Environ Health Perspect* 102, 780-781
- Bernal AJ, Jirtle RL (2010): Epigenomic disruption: the effects of early developmental exposures. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88, 938-944
- Bernanke J, Kohler HR (2009): The impact of environmental chemicals on wildlife vertebrates. *Rev Environ Contam Toxicol* 198, 1-47
- Bondy CA, Cheng CM (2004): Signaling by insulin-like growth factor 1 in brain. *Eur J Pharmacol* 490, 25-31
- Bord S, Horner A, Beavan S, Compston J (2001): Estrogen receptors alpha and beta are differentially expressed in developing human bone. *J Clin Endocrinol Metab* 86, 2309-2314
- Brinkmann AO (1994): Steroid hormone receptors: activators of gene transcription. *J Pediatr Endocrinol* 7, 275-282
- Bultman SJ, Michaud EJ, Woychik RP (1992): Molecular characterization of the mouse agouti locus. *Cell* 71, 1195-1204
- Calafat AM, Ye X, Wong LY, Reidy JA, Needham LL (2008): Exposure of the U.S. population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004. *Environ Health Perspect* 116, 39-44
- Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE (1992): Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *BMJ* 305, 609-613
- Carson R: *Silent Spring*. Houghton Mifflin Company, New York, 1962
- Charlier C, Albert A, Herman P, Hamoir E, Gaspard U, Meurisse M, Plomteux G (2003): Breast cancer and serum organochlorine residues. *Occup Environ Med* 60, 348-351
- 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, 52-57
- Christiansen S, Kortenkamp A, Axelstad M, Boberg J, Scholze M, Jacobsen PR, Faust M, Lichtensteiger W, Schlumpf M, Burdorf A (2012): Mixtures of endocrine disrupting contaminants modelled on human high end exposures: an exploratory study in rats. *Int J Androl* 35, 303-316

- Colborn T, Dumanoski D, Meyers J: Our stolen future. 1 edition; Dutton Adult, New York, 1996
- Colerangle JB, Roy D (1997): Profound effects of the weak environmental estrogen-like chemical bisphenol A on the growth of the mammary gland of Noble rats. *J Steroid Biochem Mol Biol* 60, 153-160
- Couse JF, Curtis SW, Washburn TF, Lindzey J, Golding TS, Lubahn DB, Smithies O, Korach KS (1995): Analysis of transcription and estrogen insensitivity in the female mouse after targeted disruption of the estrogen receptor gene. *Mol Endocrinol* 9, 1441-1454
- Cropley JE, Suter CM, Beckman KB, Martin DI (2006): Germ-line epigenetic modification of the murine A vy allele by nutritional supplementation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 17308-17312
- Daston GP, Gooch JW, Breslin WJ, Shuey DL, Nikiforov AI, Fico TA, Gorsuch JW (1997): Environmental estrogens and reproductive health: a discussion of the human and environmental data. *Reprod Toxicol* 11, 465-481
- Deroo BJ, Korach KS (2006): Estrogen receptors and human disease. *J Clin Invest* 116, 561-570
- Dich J, Wiklund K (1998): Prostate cancer in pesticide applicators in Swedish agriculture. *Prostate* 34, 100-112
- Diel P, Schulz T, Smolnikar K, Strunck E, Vollmer G, Michna H (2000): Ability of xeno- and phytoestrogens to modulate expression of estrogen-sensitive genes in rat uterus: estrogenicity profiles and uterotrophic activity. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73, 1-10
- Dolinoy DC, Weidman JR, Waterland RA, Jirtle RL (2006): Maternal genistein alters coat color and protects Avy mouse offspring from obesity by modifying the fetal epigenome. *Environ Health Perspect* 114, 567-572
- Duhl DM, Vrieling H, Miller KA, Wolff GL, Barsh GS (1994): Neomorphic agouti mutations in obese yellow mice. *Nat Genet* 8, 59-65
- Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, Nordenskjöld M, Gustafsson JA (1997): Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4258-4265
- Facemire CF, Gross TS, Guillette LJ, Jr. (1995): Reproductive impairment in the Florida panther: nature or nurture? *Environ Health Perspect* 103 Suppl 4, 79-86
- Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM (2003): Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem Res Toxicol* 16, 1338-1358
- Fleming LE, Bean JA, Rudolph M, Hamilton K (1999): Cancer incidence in a cohort of licensed pesticide applicators in Florida. *J Occup Environ Med* 41, 279-288
- Giguere V (2002): To ERR in the estrogen pathway. *Trends Endocrinol Metab* 13, 220-225

- Gilchrest BA (2004): If it's not the hamburgers, it's the sunscreens. *J Invest Dermatol* 123, xi-xii
- Giusti RM, Iwamoto K, Hatch EE (1995): Diethylstilbestrol revisited: a review of the long-term health effects. *Ann Intern Med* 122, 778-788
- Greene GL, Gilna P, Waterfield M, Baker A, Hort Y, Shine J (1986): Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231, 1150-1154
- Grohe C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H (1998): Expression of oestrogen receptor alpha and beta in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 156, R1-7
- Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, Huber JC (2002): Production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 346, 340-352
- Grun F, Blumberg B (2007): Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis. *Rev Endocr Metab Disord* 8, 161-171
- Harris HA (2007): Estrogen receptor-beta: recent lessons from in vivo studies. *Mol Endocrinol* 21, 1-13
- Hertrampf T, Degen GH, Kaid AA, Laudenschlager U, Seibel J, Di Virgilio AL, Diel P (2006): Combined effects of physical activity, dietary isoflavones and 17beta-estradiol on movement drive, body weight and bone mineral density in ovariectomized female rats. *Planta Med* 72, 484-487
- Horard B, Vanacker JM (2003): Estrogen receptor-related receptors: orphan receptors desperately seeking a ligand. *J Mol Endocrinol* 31, 349-357
- Hu WY, Shi GB, Hu DP, Nelles JL, Prins GS (2012): Actions of estrogens and endocrine disrupting chemicals on human prostate stem/progenitor cells and prostate cancer risk. *Mol Cell Endocrinol* 354, 63-73
- Hugo ER, Brandebourg TD, Woo JG, Loftus J, Alexander JW, Ben-Jonathan N (2008): Bisphenol A at environmentally relevant doses inhibits adiponectin release from human adipose tissue explants and adipocytes. *Environ Health Perspect* 116, 1642-1647
- Jacobsen PR, Axelstad M, Boberg J, Isling LK, Christiansen S, Mandrup KR, Berthelsen LO, Vinggaard AM, Hass U (2012): Persistent developmental toxicity in rat offspring after low dose exposure to a mixture of endocrine disrupting pesticides. *Reprod Toxicol* 34, 237-250
- Janjua NR, Mogensen B, Andersson AM, Petersen JH, Henriksen M, Skakkebaek NE, Wulf HC (2004): Systemic absorption of the sunscreens benzophenone-3, octyl-methoxycinnamate, and 3-(4-methyl-benzylidene) camphor after whole-body topical application and reproductive hormone levels in humans. *J Invest Dermatol* 123, 57-61
- Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W (2001): The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspect* 109, 785-794

- Kavlock RJ, Daston GP, DeRosa C, Fenner-Crisp P, Gray LE, Kaattari S, Lucier G, Luster M, Mac MJ, Maczka C (1996): Research needs for the risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: a report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 715-740
- Keller-Byrne JE, Khuder SA, Schaub EA (1997): Meta-analyses of prostate cancer and farming. *Am J Ind Med* 31, 580-586
- Kemppainen JA, Langley E, Wong CI, Bobseine K, Kelce WR, Wilson EM (1999): Distinguishing androgen receptor agonists and antagonists: distinct mechanisms of activation by medroxyprogesterone acetate and dihydrotestosterone. *Mol Endocrinol* 13, 440-454
- Klammer H, Schlecht C, Wuttke W, Schmutzler C, Gotthardt I, Kohrle J, Jarry H (2007): Effects of a 5-day treatment with the UV-filter octyl-methoxycinnamate (OMC) on the function of the hypothalamo-pituitary-thyroid function in rats. *Toxicology* 238, 192-199
- Komm BS, Rusling DJ, Lyttle CR (1986): Estrogen regulation of protein synthesis in the immature rat uterus: the analysis of proteins released into the medium during in vitro incubation. *Endocrinology* 118, 2411-2416
- Krieger N, Wolff MS, Hiatt RA, Rivera M, Vogelman J, Orentreich N (1994): Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women. *J Natl Cancer Inst* 86, 589-599
- Kuiper GG, Enmark E, Pelto-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, 5925-5930
- 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, 863-870
- Kundakovic M, Champagne FA (2011): Epigenetic perspective on the developmental effects of bisphenol A. *Brain Behav Immun* 25, 1084-1093
- 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, 465-471
- Landel CC, Kushner PJ, Greene GL (1995): Estrogen receptor accessory proteins: effects on receptor-DNA interactions. *Environ Health Perspect* 103 Suppl 7, 23-28
- Lang IA, Galloway TS, Scarlett A, Henley WE, Depledge M, Wallace RB, Melzer D (2008): Association of urinary bisphenol A concentration with medical disorders and laboratory abnormalities in adults. *JAMA* 300, 1303-1310
- LeBlanc GA (1995): Are environmental sentinels signaling? *Environ Health Perspect* 103, 888-890
- 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, 203-208
- Löffler G, Petrides P: *Biochemie & Pathobiochemie*. 7. Auflage; Springer Verlag, Berlin, 2003
- Maehlmeyer S: Einfluss von Estradiol, Genistein, Equol und Resveratrol auf verschiedene östrogensensitive Organe und Parameter der ovariectomierten Maus. *Med. Diss. Göttingen* 2010
- Markey CM, Michaelson CL, Veson EC, Sonnenschein C, Soto AM (2001): The mouse uterotrophic assay: a reevaluation of its validity in assessing the estrogenicity of bisphenol A. *Environ Health Perspect* 109, 55-60
- Markey CM, Wadia PR, Rubin BS, Sonnenschein C, Soto AM (2005): Long-term effects of fetal exposure to low doses of the xenoestrogen bisphenol-A in the female mouse genital tract. *Biol Reprod* 72, 1344-1351
- Miller VM, Duckles SP (2008): Vascular actions of estrogens: functional implications. *Pharmacol Rev* 60, 210-241
- Mittendorf R (1995): Teratogen update: carcinogenesis and teratogenesis associated with exposure to diethylstilbestrol (DES) in utero. *Teratology* 51, 435-445
- Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, Yamamoto H, Masuno H (2007): Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice. *J Atheroscler Thromb* 14, 245-252
- Morgan HD, Sutherland HG, Martin DI, Whitelaw E (1999): Epigenetic inheritance at the agouti locus in the mouse. *Nat Genet* 23, 314-318
- Morinaga H, Yanase T, Nomura M, Okabe T, Goto K, Harada N, Nawata H (2004): A benzimidazole fungicide, benomyl, and its metabolite, carbendazim, induce aromatase activity in a human ovarian granulosa-like tumor cell line (KGN). *Endocrinology* 145, 1860-1869
- Mullerova D, Kopecky J (2007): White adipose tissue: storage and effector site for environmental pollutants. *Physiol Res* 56, 375-381
- Nagtegaal M, Ternes T, Baumann W, Nagel R (1997): UV-Filtersubstanzen in Wasser und Fischen. *WSF-Z Umweltchem Ökotox* 9:79-86
- Newbold RR (2010): Impact of environmental endocrine disrupting chemicals on the development of obesity. *Hormones (Athens)* 9, 206-217
- Pelzer T, Jazbutyte V, Hu K, Segerer S, Nahrendorf M, Nordbeck P, Bonz AW, Muck J, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C (2005): The estrogen receptor-alpha agonist 16alpha-LE2 inhibits cardiac hypertrophy and improves hemodynamic function in estrogen-deficient spontaneously hypertensive rats. *Cardiovasc Res* 67, 604-612
- Rachon D, Rimoldi G, Wuttke W (2006): In vitro effects of benzophenone-2 and octyl-methoxycinnamate on the production of interferon-gamma and interleukin-10 by murine splenocytes. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 28, 501-510

- Rajapakse N, Silva E, Kortenkamp A (2002): Combining xenoestrogens at levels below individual no-observed-effect concentrations dramatically enhances steroid hormone action. *Environ Health Perspect* 110, 917-921
- Reid G, Denger S, Kos M, Gannon F (2002): Human estrogen receptor- α : regulation by synthesis, modification and degradation. *Cell Mol Life Sci* 59, 821-831
- Richter CA, Birnbaum LS, Farabollini F, Newbold RR, Rubin BS, Talsness CE, Vandenberg JG, Walser-Kuntz DR, vom Saal FS (2007): In vivo effects of bisphenol A in laboratory rodent studies. *Reprod Toxicol* 24, 199-224
- Rutanen EM (1998): Insulin-like growth factors in endometrial function. *Gynecol Endocrinol* 12, 399-406
- Saltiki K, Alevizaki M (2007): Coronary heart disease in postmenopausal women; the role of endogenous estrogens and their receptors. *Hormones (Athens)* 6, 9-24
- Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, Haller V, Steinmann B, Lichtensteiger W (2001): In vitro and in vivo estrogenicity of UV screens. *Environ Health Perspect* 109, 239-244
- Schlumpf M, Kypke K, Wittassek M, Angerer J, Mascher H, Mascher D, Vokt C, Birchler M, Lichtensteiger W (2010): Exposure patterns of UV filters, fragrances, parabens, phthalates, organochlor pesticides, PBDEs, and PCBs in human milk: correlation of UV filters with use of cosmetics. *Chemosphere* 81, 1171-1183
- Schmutzler C, Bacinski A, Gotthardt I, Huhne K, Ambrugger P, Klammer H, Schlecht C, Hoang-Vu C, Gruters A, Wuttke W (2007a): The ultraviolet filter benzophenone 2 interferes with the thyroid hormone axis in rats and is a potent in vitro inhibitor of human recombinant thyroid peroxidase. *Endocrinology* 148, 2835-2844
- Schmutzler C, Gotthardt I, Hofmann PJ, Radovic B, Kovacs G, Stemmler L, Nobis I, Bacinski A, Mentrup B, Ambrugger P (2007b): Endocrine disruptors and the thyroid gland--a combined in vitro and in vivo analysis of potential new biomarkers. *Environ Health Perspect* 115 Suppl 1, 77-83
- Schreurs R, Lanser P, Seinen W, van der Burg B (2002): Estrogenic activity of UV filters determined by an in vitro reporter gene assay and an in vivo transgenic zebrafish assay. *Arch Toxicol* 76, 257-261
- 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, 103-112
- Seidlova-Wuttke D, Christoffel J, Rimoldi G, Jarry H, Wuttke W (2006a): Comparison of effects of estradiol with those of octylmethoxycinnamate and 4-methylbenzylidene camphor on fat tissue, lipids and pituitary hormones. *Toxicol Appl Pharmacol* 214, 1-7
- Seidlova-Wuttke D, Jarry H, Christoffel J, Rimoldi G, Wuttke W (2006b): Comparison of effects of estradiol (E2) with those of octylmethoxycinnamate (OMC) and 4-methylbenzylidene camphor (4MBC)--2 filters of UV light - on several uterine, vaginal and bone parameters. *Toxicol Appl Pharmacol* 210, 246-254

- Semenza JC, Tolbert PE, Rubin CH, Guillette LJ, Jr., Jackson RJ (1997): Reproductive toxins and alligator abnormalities at Lake Apopka, Florida. *Environ Health Perspect* 105, 1030-1032
- Skavdahl M, Steenbergen C, Clark J, Myers P, Demianenko T, Mao L, Rockman HA, Korach KS, Murphy E (2005): Estrogen receptor-beta mediates male-female differences in the development of pressure overload hypertrophy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288, H469-476
- Smeds A, Saukko P (2001): Identification and quantification of polychlorinated biphenyls and some endocrine disrupting pesticides in human adipose tissue from Finland. *Chemosphere* 44, 1463-1471
- Sundstrom SA, Komm BS, Xu Q, Boundy V, Lyttle CR (1990): The stimulation of uterine complement component C3 gene expression by antiestrogens. *Endocrinology* 126, 1449-1456
- Swan SH, Elkin EP, Fenster L (2000): The question of declining sperm density revisited: an analysis of 101 studies published 1934-1996. *Environ Health Perspect* 108, 961-966
- Sweeney T (2002): Is exposure to endocrine disrupting compounds during fetal/post-natal development affecting the reproductive potential of farm animals? *Domest Anim Endocrinol* 23, 203-209
- Toppari J, Larsen JC, Christiansen P, Giwercman A, Grandjean P, Guillette LJ, Jr., Jegou B, Jensen TK, Jouannet P, Keiding N (1996): Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Environ Health Perspect* 104 Suppl 4, 741-803
- Tyl RW (2009): The presence (or not) of effects from low oral doses of BPA. *J Toxicol Sci* 34, 587-588
- Whitehead SA, Rice S (2006): Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 20, 45-61
- Wolff MS, Toniolo PG, Lee EW, Rivera M, Dubin N (1993): Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 85, 648-652
- Wolinska-Witort E, Snochowski M, Gajewska A, Lerrant Y, Counis R, Baranowska B (2000): Effect of estradiol 17-beta on LH subunits and prolactin mRNAs expression in the pituitary of old female rats. *Neuro Endocrinol Lett* 21, 431-436
- Xu LC, Sun H, Chen JF, Bian Q, Qian J, Song L, Wang XR (2005): Evaluation of androgen receptor transcriptional activities of bisphenol A, octylphenol and nonylphenol in vitro. *Toxicology* 216, 197-203
- Yamauchi K, Prapunpoj P, Richardson SJ (2000): Effect of diethylstilbestrol on thyroid hormone binding to amphibian transthyretins. *Gen Comp Endocrinol* 119, 329-339
- 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, 50-59

- Yue W, Wang JP, Li Y, Fan P, Liu G, Zhang N, Conaway M, Wang H, Korach KS, Bocchinfuso W (2010): Effects of estrogen on breast cancer development: Role of estrogen receptor independent mechanisms. *Int J Cancer* 127, 1748-1757
- Zoeller RT (2007): Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. *Thyroid* 17, 811-817

6 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Körpergewichtsverlauf über 3 Monate. Dargestellt sind die Mittelwerte (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	22
Abbildung 2: Körpergewicht am Tag der Obduktion in g (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	23
Abbildung 3: Wirkungen von Östradiol , OMC und BPA auf das absolute und relative Uterusgewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	24
Abbildung 4: Einfluss von Östradiol , OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und C3 im Uterus (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	25
Abbildung 5: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und C3 im Uterus (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	26
Abbildung 6: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β im Uterus (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	27
Abbildung 7: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf das absolute und relative Lebergewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	28
Abbildung 8: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 und ER α in der Leber der Versuchstiere (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	29
Abbildung 9: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf das absolute und relative Herzgewicht (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	30
Abbildung 10: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β im Herzgewebe (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	31
Abbildung 11: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von IGF-1 im Herzgewebe (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	32
Abbildung 12: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von LH β in der Hypophyse (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	33
Abbildung 13: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Expression von ER α und ER β in der Hypophyse (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	34

Abbildung 14: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in der Spongiosa (gemessen in der Metaphyse) der Tibia (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	35
Abbildung 15: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in der Kortikalis (gemessen in der Diaphyse) der Tibia (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	36
Abbildung 16: Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Knochendichte in Tibia-Metaphyse und -Diaphyse (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	36
Abbildung 17: Expression von Östrogen-regulierten Proteinen in Abhängigkeit von der Versuchsdauer.	39

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Konzentrationen der untersuchten Substanzen im Futter und ihre Aufnahme pro Tier und Tag und die Anzahl der Versuchstiere pro Substanzgruppe (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	13
Tabelle 2: Reaktionslösung Taqman	16
Tabelle 3: Reaktionsansatz iCycler	17
Tabelle 4: Temperaturzyklen, iCycler	18
Tabelle 5: Futter- und quantitative Substanzaufnahme (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	23
Tabelle 6 : Einfluss von Östradiol, OMC und BPA auf die Serumwerte von Cholesterol, Triglyceriden, LDL und HDL in mg/dl. Zusätzlich angegeben ist die jeweilige Standardabweichung (Kontroll- und Östradioldaten bereits veröffentlicht (Maehlmeyer 2010)).	37

Danksagung:

Ich möchte mich an dieser Stelle bei allen bedanken, die durch ihr Engagement zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Ganz besonders möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Hubertus Jarry danken, der mich von der ersten Stunde an bei der praktischen Durchführung der Versuche und dem Niederschreiben der Ergebnisse unterstützt hat. Ich möchte ihm für seine stetige Diskussions- und Hilfsbereitschaft danken.

Zudem gilt mein Dank allen weiteren Mitarbeitern und Mitarbeiterinnen der Abteilung für experimentelle Endokrinologie der Universitätsklinik Göttingen und ihrem Leiter Herrn Prof. Dr. Wolfgang Wuttke. Insbesondere Frau Dr. Tina Vortherms und Herrn Dr. Markus Wuttke vielen Dank für die geduldige Unterstützung bei der Anwendung des Kleintier CTs und für die Einführung in das Statistikprogramm. Ebenso ein herzliches „Dankeschön“ an Frau Dr. Dana Seidlová-Wuttke für die Hilfestellungen bei der Auswertung der an den Knochen erhobenen Ergebnisse.

Des Weiteren vielen herzlichen Dank für die, zum Teil über den Feierabend hinaus bestehende, Unterstützung durch Martina Bremer, sowie durch alle weiteren MTAs der Abteilung.

Besonderer Dank gilt speziell auch Frau Dr. Sandra Mählmeyer für die gegenseitige Motivation und persönliche Inspiration.

