

Projekt Umwelt und Gesundheit (PUG)

Forschungsbericht

Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-
Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien

von

W. Körner, W. Schuller*, H. Hagenmaier, V. Hanf*

Institut für Organische Chemie , Universität Tübingen

* Universitäts-Frauenklinik Ulm

Die Arbeiten des Projektes Umwelt und Gesundheit
wurden mit Mitteln des Landes Baden-Württemberg gefördert

Förderkennzeichen: PUG U 95 004

101 Seiten

45 Abbildungen

15 Tabellen

Juli 1999

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung/Summary	5
I Einleitung	7
II Aufgabenstellung und Zielsetzung	8
III Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens	
1 Personal	9
2 Räumliche und materielle Ausstattung	10
IV Wissenschaftlicher Kenntnisstand, an den angeknüpft wurde	
1 Struktur und Funktion des Estrogenrezeptors	10
2 Estrogenrezeptor-Antagonisten	12
3 Xenoestrogene	13
4 In vitro-Testsysteme	15
V Methoden	
1 Kultivierung der Zellen	17
2 E-Screen-Assay	17
2.1 Start des Assays	18
2.2 Substanzzugabe	18
2.3 EFM-19-Zellen	19
2.4 Bestimmung der Zellzahl	19
2.4.1 Sulforhodamin B-Assay	19
2.4.2 MTT-Assay	21
2.4.3 Alamar-Blue-Assay	21
2.4.4 Erstellung der Eichgerade für die Zellzahl	21
2.5 Strippen von fötalem Kälberserum	22
2.5.1 Methode nach Soto et al.	22
2.5.2 Methode nach Stanley et al.	22
3 Sekretion von Matrixproteinen (pS2-Messung)	23
4 Bestimmung des Estrogen- und Progesteronrezeptor-Gehaltes	23
VI Ergebnisse	

1	Etablierung, Optimierung und Validierung des E-Screen-Assays	24
1.1	Auswahlkriterien	24
1.2	Etablierung des E-Screen-Assay mit eigenen MCF-Zellen	24
	1.2.1 Charakterisierung der MCF-7-Zelllinie	24
	1.2.2 Durchführung und quantitative Auswertung des E-Screen-Assays	25
1.3	Validierung	30
	1.3.1 Vergleich mit Literaturdaten	30
	1.3.2 Test von Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren	31
1.4	Miniaturisierung, Vereinfachung und Optimierung	35
1.5	Einfluß möglicher Störfaktoren	37
	1.5.1 Temperatur des Experimentalmediums	37
	1.5.2 Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums	38
	1.5.3 Strippen des fötalen Kälberserums	39
1.6	Etablierung des E-Screen-Assay mit EFM-Zellen	40
2	Untersuchung von Einzelsubstanzen	41
2.1	Alkylphenole, Bisphenole, Hydroxybiphenyle	44
2.2	Halogenierte Phenole	48
2.3	Pestizide	53
	2.3.1 Hexachlorcyclohexan-Isomere	54
	2.3.2 Dieldrin und Endosulfan	57
	2.3.3 Atrazin, Simazin, Dimethoat und Metiram	59
2.4	Phthalate und andere Chemikalien	59
2.5	Phytoestrogene	63
2.6	Metabolite des 17 β -Estradiols	66
2.7	Synthetische Estrogene	70
2.8	Induktion der estrogenabhängigen Sekretion des pS2-Proteins	72
3	Testung von Substanzgemischen	74
4	Untersuchung von aquatischen Umweltproben	76
4.1	Quantifizierung und Nachweisgrenzen	77
4.2	Beschreibung der Proben, Probenahme und -vorbereitung	79
	4.2.1 Kläranlagenabläufe	79
	4.2.2 Flußwasserproben	79

4.2.3	Bodensee-Sedimente	81
4.3	Ergebnisse und Diskussion	82
4.3.1	Blindwerte	82
4.3.2	Kläranlagenabläufe	83
4.3.3	Flußwasser	85
4.3.4	Bodensee-Sedimente	87
VII	Fortschritte bei anderen Stellen	88
VIII	Bewertung und Nutzen	
	90	
IX	Literatur	93

Entwicklung und praktische Erprobung eines einfachen Screening-Systems für estrogenartig wirkende Umweltchemikalien

W. Körner, W. Schuller*, H. Hagenmaier, V. Hanf*

Institut für Organische Chemie, Universität Tübingen * Universitäts-Frauenklinik Ulm

Zusammenfassung

Im Rahmen dieses Projektes konnte ein einfach durchzuführendes Screening-System zum quantitativen Nachweis estrogenartiger Wirkungen von Einzelstoffen und Umweltproben erfolgreich etabliert werden. Es beruht auf der Proliferationsmessung estrogenrezeptor(ER)-positiver menschlicher MCF-7-Brustkrebszellen im Vergleich zu Kontrollen mit und ohne 17β -Estradiol (E2). Bei einer Nachweisgrenze für E2 von 1 pmol/L (0,27 ng/L) und einer EC_{50} von 4 - 9 pmol/L gibt es derzeit kein empfindlicheres routinemäßig einsetzbares Testsystem. Gegenüber der Originalmethode von A. Soto („E-Screen“-Assay) wurden wesentliche Standardisierungen und Vereinfachungen eingeführt; so gelang z.B. die Miniaturisierung des Tests (Durchführung in 96-Well-Mikrotiterplatten). Darüberhinaus konnten weitere Veränderungen eingeführt werden, welche das Anwendungsgebiet und die Aussagekraft des Testsystems wesentlich erweitern:

So konnte gezeigt werden, daß die ER-positive humane Zelllinie EFM-19 trotz langsameren Wachstums ähnlich empfindlich auf E2 reagiert wie die MCF-7-Zelllinie und ebenfalls als Screening-System eingesetzt werden kann, wenn die Inkubationszeit auf zehn Tage verlängert wird. Nicht nur der Aufklärung des Rezeptor-abhängigen Wirkmechanismus sondern auch der Erhöhung der Spezifität im modifizierten E-Screen-Test dient der erstmals eingeführte routinemäßige Einschluß der Ko-Inkubation einer wirksamen Konzentration der Testsubstanz bzw. Umweltprobe zusammen mit einem ER-Antagonisten (5 μ M Tamoxifen, 5 nM ICI 182.780). Diese Ko-Inkubation sollte zu einer kompletten Hemmung der induzierten Zellproliferation führen. Bei allen in unserem E-Screen-Assay estrogenartig wirkenden Einzelsubstanzen oder Extrakten von Umweltproben gelang durch Zugabe eines der beiden Antiestrogene die vollständige Hemmung der induzierten Zellproliferation. Die erstmalige Testung von phenolischen Stoffen mit struktureller Ähnlichkeit zu bekannten Xenoestrogenen ergab für einige Industriechemikalien (Tetrabrombisphenol-A, 4-Chlor-3-methylphenol, 4-Chlor-2-methylphenol, 2,4-Dibromphenol) eine schwache estrogenartige Wirkung.

Zur quantitativen Auswertung wird die estrogene Potenz einer Einzelsubstanz relativ zur Positivkontrolle E2 durch Vergleich der halbmaximal wirksamen Konzentrationen (EC_{50}) bestimmt. Diese relative estrogene Potenz wird als „ 17β -Estradiol-Äquivalenzfaktor“ (EEF) bezeichnet. Experimente mit zwei definierten Gemischen von jeweils drei Xenoestrogenen bestätigten das rechnerisch erwartete additive Verhalten der estrogenen Wirkung der Einzelstoffe. Somit läßt sich das Konzept der EEF auf Umweltproben übertragen und, in Analogie zur Handhabung der Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) bei den Ah-Rezeptor-Liganden, der Gesamtgehalt an estrogenartig wirkenden Stoffen als „ 17β -Estradiol-Äquivalentkonzentration“ (EEQ) ausdrücken. Extrakte von Umweltproben werden mit 50 μ l des schwer flüchtigen DMSO versetzt und das Lösungsmittel vollständig entfernt. Um zytotoxische Effekte des DMSO zu vermeiden, muß mit steroidfreiem Kulturmedium auf 50 ml (1:1000) verdünnt werden. Bei einer Wasserprobe von 1 L resultiert somit ein Anreicherungsfaktor von 20; die Nachweisgrenze des E-Screen liegt somit bei 0,014 ng EEQ/L.

Mit dem E-Screen-Test wurden in Abläufen von zwei kommunalen Kläranlagen aus dem Großraum Stuttgart bei nahezu gleich starker Induktion der Zellproliferation wie 17β -Estradiol estrogene Gesamtaktivitäten von 1 bis 18 ng EEQ/L gefunden. Im Wasser der Körsch, die mehreren Kläranlagen als Vorfluter dient und deren Wasser im Mittel zu etwa 1/3 aus geklärtem Abwasser besteht, wurden ähnlich hohe estrogene Aktivitäten von 1 - 10 ng EEQ /L bestimmt. In einem nicht durch Kläranlagenabläufe belasteten Kontrollgewässer aus der gleichen Region wurde dagegen keine estrogenartige Wirkung gemessen. Aus einem Sedimentkern des Bodensees zeigten die Aceton/Hexan-

Extrakte von allen drei getesteten Schichten aus den Zeiträumen 1985-90, 1945-55 und 1900-15 eine ähnliche estrogenere Aktivität: der Proliferationseffekt relativ zu E2 betrug bei einer Sedimentkonzentration von 40 g/L Kulturmedium 35 - 40 % (partieller Agonismus). Für die älteste Schicht kann die Wirkung nur durch die Präsenz von Naturstoffen erklärt werden, die im anaeroben Milieu des Sedimentes stabil sein können.

Insgesamt hat sich der von uns standardisierte und vereinfachte E-Screen-Assay als empfindliches und reproduzierbar einsetzbares System zur quantitativen Messung estrogenere und anti-estrogenere Aktivität von Einzelsubstanzen und Umweltproben bewährt. Anwendungsmöglichkeiten sehen wir in der Umweltüberwachung, der Chemikalien testing sowie in der biomedizinischen Forschung.

Development and practical application of a simple screening system for estrogenic xenobiotics

W. Körner, W. Schuller, H. Hagenmaier, V. Hanf

Summary

The proliferative response of ER-positive human MCF-7 breast cancer cells in relation to controls with and without 17 β -estradiol (E2) was successfully established as a simple screening system for the quantitative determination of estrogenic activity of chemicals and environmental samples. With a detection limit for E2 of 1 pmol/L (0.27 ng/L) and a EC₅₀ of 4 - 9 pmol/L there is presently no other screening system being more sensitive in routine testing. Compared to the original method developed by A. Soto ("E-Screen" assay), several substantial modifications and standardizations were introduced; e.g. a practicable miniaturization of the assay (performance in 96-well plates) was achieved. Further substantial alterations in the methodology were developed that allowed a significant broadening of possible applications or scientific questions to be answered:

It could be shown that the ER-positive human mammary carcinoma cell line EFM-19 that grows much more slowly than the MCF-7 line could be used in the adapted assay showing similar sensitivity to E2 by extension of the incubation time to ten days. In order to elucidate the mode of action of test compounds under investigation and to increase the specificity of the E-screen assay, one proliferatively active concentration of any given test compound or environmental sample is now tested together with an ER antagonist (5 μ M tamoxifen, 5 nM ICI 182,780). This co-incubation with the antiestrogen should cause a complete inhibition of the proliferative response if an ER-mediated effect is suspected. For all chemical substances and extracts of environmental samples showing estrogenic activity in our E-screen assay, the induced cell proliferation could be completely abolished by the addition of one of the two antiestrogens. The screening of phenolic substances with structural similarity to known xenoestrogens revealed a weak estrogenic activity for some industrial chemicals like tetrabromobisphenol A, 4-chloro-3-methylphenol, 4-chloro-2-methylphenol, and 2,4-dibromophenol.

The estrogenic potency of a test compound relative to the positive control E2 is determined quantitatively by comparison of the concentrations at which a half-maximal effect is achieved (EC₅₀). This relative estrogenic potency is referred to as "17 β -estradiol equivalency factor" (EEF). Experiments with two defined mixtures of three xenoestrogens confirmed the predicted additive behaviour of the estrogenic activity of the single compounds. Thus, the EEF concept, which is in analogy to the TEF-concept commonly used for Ah-receptor agonists, can be applied for environmental samples. The total estrogenic activity can be expressed as "17 β -estradiol equivalent concentration" (EEQ). For environmental samples, each extract was mixed with 50 μ l DMSO and the remaining solvent was evaporated completely. In order to avoid cytotoxic effects of DMSO, the extracts must be diluted to 50 ml (1:1000) with steroid-free culture medium. This procedure results in a concentration factor of 20 for a sample volume of 1 L and a detection limit of the E-screen assay of 0.014 ng EEQ/L.

During the course of this project we successfully applied the E-screen test for the determination of total estrogenic activity in samples from the aquatic environment: in effluents from two municipal sewage plants in the region of Stuttgart total estrogenic activities were found between 1 and 18 ng EEQ/L and proliferative effects were nearly as high as that of 17 β -estradiol (complete agonism). Similar estrogenic activities between 1 and 10 ng EEQ/L were detected in water from the small stream "Körsch" which receives the effluents from several municipal sewage plants. On average, about one third of the Körsch water consists of effluents. In contrast, no estrogenic activity was found in the water of a non-polluted

control brook located in the same region. The acetone/hexane extracts of three tested layers of a sediment core from the Lake Constance, representing the periods 1985-90, 1945-55, and 1900-15, showed each a comparable estrogenic activity: the proliferative effect relative to E2 was 35 - 40 % at a sediment concentration of 40 g/L medium (partial agonism). For the oldest layer, the estrogenic activity can only be explained by the presence of natural compounds, which may be persistent in the anaerobic milieu of the sediment.

In summary, the modified and standardized E-Screen assay proved an extremely sensitive and reproducibly quantitative instrument for the detection of estrogenic and anti-estrogenic activity of defined chemicals and environmental samples. We see possible applications in environmental monitoring, testing of chemicals (e.g. before commercial introduction) as well as biomedical basic and applied research.

I Einleitung

In jüngster Zeit hat in Europa die unerwartete Entdeckung einer estrogenartigen Wirkung bei verschiedenen nichtsteroidalen Chemikalien und die damit verbundene mögliche Gefährdung der Fortpflanzung von Mensch und Tierwelt einen breiten Raum in der wissenschaftlichen und allgemeinen öffentlichen Diskussion eingenommen. In den USA, wo bereits 1979 und 1985 wissenschaftliche Symposien zum Thema „Estrogens in the Environment“ stattfanden, wurde von der Environmental Protection Agency (EPA) für „*Fremdstoffe, die mit der Produktion, Freisetzung, Transport, Metabolismus, Bindung, Wirkung oder Ausscheidung von natürlichen Hormonen, welche im Organismus die Homöostase und die Regulation der Entwicklungsprozesse aufrechterhalten, interferieren*“ der zusammenfassende Begriff **“endokrine Disruptoren”** (*endocrine disruptors* oder *endocrine disrupting chemicals*) eingeführt (Kavlock et al. 1996).

Von einer **direkten** hormonartigen Wirkung einer Substanz spricht man, wenn diese mit dem entsprechenden endogenen Hormonrezeptor in Wechselwirkung tritt und

- a) nach Aktivierung des Rezeptors die Wirkung des endogenen Hormons in den Zellen der Zielgewebe simuliert (*agonistische* Wirkung), oder
- b) durch die Blockade des Rezeptors eine Bindung des Hormons verhindert und folglich *antagonistisch* wirkt.

Bei Wildpopulationen von verschiedenen Wirbeltieren (Fischen, Reptilien und Vögel), die nachweislich erhöhten Konzentrationen von persistenten Organohalogenverbindungen ausgesetzt waren, wurden vor allem in jüngster Zeit Reproduktionsstörungen und Mißbildungen an Genitalien, z.B. Verweiblichung oder Zwitterbildung der Männchen, Verringerung der Fruchtbarkeit oder Änderung des Sexualverhaltens beobachtet (Colborn et al. 1993). Teilweise war eine eindeutige Zuordnung der beobachteten Effekte zu bestimmten estrogen- und z.T. antiandrogenartig wirkenden Stoffen möglich. Bereits Anfang der 80er Jahre konnten Fry und Toone (1981) zeigen, daß die Exposition von Seemöwenembryonen gegenüber DDT und dessen Metabolite zu histologisch nachweisbaren Anzeichen der Feminisierung führt. Die im Gebiet der Großen Seen der USA beobachtete und gut dokumentierte Erhöhung von Embryonensterblichkeit und Mißbildungen bei fischfressenden Wasservögeln wurde in einen klaren Zusammenhang mit der dort stark erhöhten PCB-Exposition gebracht (Gilbertson et al. 1991).

Ein bekanntes und gut untersuchtes Beispiel ist der Lake Apopka in Florida, der seit einem Unfall im Jahre 1980 durch DDT, DDE und andere Organochlorinsektizide kontaminiert ist. Bereits wenige Jahre später wurde - im Gegensatz zu anderen Seen in der Nähe - eine Abnahme der dortigen Alligatorpopulation dokumentiert. In den letzten Jahren wurden dort bei jungen männlichen Alligatoren verringerte Testosteronplasmaspiegel, verkümmerte Penisse und Zwitterbildung festgestellt (Guillette et al. 1994). In England (Purdom et al. 1994; Harries et al. 1996) und den USA (Folmar et al. 1996) wurde in männlichen Forellen und Karpfen im Abflußbereich von Kläranlagen eine Induktion der estrogenabhängigen Synthese des Glykoproteins Vitellogenin festgestellt. Als eine wesentliche Ursache konnte 4-Nonylphenol identifiziert werden.

Ob estrogenartig wirkende Chemikalien in der Umwelt auch ein Risiko für die menschliche Gesundheit darstellen, wird nach wie vor kontrovers diskutiert. Im Mittelpunkt der Diskussion stehen die hohe Inzidenz und der stetige Inzidenzanstieg des Mammakarzinoms in westlichen und östlichen Industrieländern, der in den USA seit 1940 im Schnitt 1,2 %/Jahr betrug (Harris et al. 1992). Nur etwa 30 - 50 % der Brustkrebskrankungen können mit den bekannten Risikofaktoren erklärt werden. Während in den USA zwischen 1975 und 1985 die Inzidenz der estrogenrezeptor(ER)-positiven Brustkrebskrankungen um 131 % stieg, erhöhte sich die Rate der ER-negativen Fälle nur um 22 - 27 % (Glass & Hoover 1990). Genetische Faktoren sind nach heutiger Erkenntnis nur für ca. 5 % aller Mammatumore verantwortlich. Davis et al. stellten 1993 die Hypothese auf, daß ein beträchtlicher Anteil der Brustkrebsfälle mit der Exposition gegenüber persistenten, estrogenähnlich wirkenden Chemikalien zusammenhängt, die in den letzten Jahrzehnten z.T. in großen Mengen in die Umwelt eingetragen wurden. Auch wenn bis jetzt schlüssige Beweise für diese Hypothese fehlen, so deuten für o,p'-DDE, β -HCH und Dieldrin, deren estrogen Wirkung *in vivo* nachgewiesen wurde, epidemiologische Hinweise, wenn auch nicht unwidersprochen, auf einen solchen Zusammenhang hin (Mussalo-Rauhamaa et al. 1990; Falck et al. 1992; Wolff et al. 1993; Flesch-Janys et al. 1993; Dewailly et al. 1994; Güttles et al. 1998; Hoyer et al. 1998). Einige neuere Arbeiten konnten jedoch keinen Zusammenhang zwischen den Serumkonzentrationen von Gesamt-DDE und dem Brustkrebsrisiko finden (Krieger et al. 1994; Hunter et al. 1997; López-Carrilo et al. 1997). Allerdings erscheint die Reduktion dieser drei Untersuchungen auf eine einzige estrogen wirksame Substanz in diesem Zusammenhang sehr fragwürdig, da die Gesamtzahl der Stoffe mit bereits bekannter oder wahrscheinlicher estrogenartiger Wirkung erheblich größer ist.

II Aufgabenstellung und Zielsetzung

Das erste Ziel des vorliegenden Forschungsprojektes war die Etablierung, Optimierung und Validierung eines möglichst einfachen *in vitro*-Testsystems, mit dem die estrogenartige Wirkung sowohl von verschiedenen nicht-steroidalen Chemikalien als auch von natürlichen Estrogenen quantitativ und zuverlässig, d.h. spezifisch, bestimmt werden kann. Da die estrogenale Potenz der bisher bekannten anthropogenen Chemikalien mit estrogenartiger Wirkung in verschiedenen *in vitro*- und *in vivo*-Testsystemen im Vergleich zum natürlichen 17 β -Estradiol vier bis sechs Größenordnungen niedriger liegt, muß ein geeignetes Testsystem sehr empfindlich sein, um die Wirkung solch schwach wirksamer Xenoestrogene vollständig erfassen zu können.

Das zweite wesentliche Ziel des Forschungsvorhabens war die praktische Anwendung des für Einzelsubstanzen und definierte Stoffgemische etablierten Test-Systems zum Screening von Extrakten verschiedener Umweltmatrices auf estrogenartig wirkende Substanzen. Besondere Berücksichtigung sollten dabei Kläranlagenabläufe und Oberflächengewässer finden, die wahrscheinlich die Haupteintragspfade für estrogenale Stoffe in die Umwelt darstellen. Bei Nachweis einer estrogenartigen Aktivität in einem Extrakt sollten nach Möglichkeit mit Hilfe der chemischen Spurenanalytik (GC/MS) die wirksamen Substanzen identifiziert und quantifiziert werden.

Die in der Literatur beschriebenen Testsysteme wurden bisher nicht in der praktischen Umweltanalytik erprobt. Das Screening von Umweltproben erfordert vom angewandten Testsystem neben einer guten Empfindlichkeit insbesondere eine hohe Robustheit, da in den Extrakten eine Vielzahl von unterschiedlichsten Substanzen vorliegen, die z.B. durch Zytotoxizität die Funktionsfähigkeit des Assays beeinträchtigen könnten.

III Voraussetzungen für die Durchführung des Vorhabens

1 Personal

Projektleitung:

Prof. Dr. Hanspaul Hagenmaier, Institut für Organische Chemie , Universität Tübingen
PD Dr. Volker Hanf, Universitäts-Frauenklinik Ulm

Wissenschaftliche Durchführung:

Dr. rer. nat. Wolfgang Körner, Dipl.-Biol. Winfried Schuller

Weitere Mitwirkende:

Silke Poppinga (cand. med.)

Dr. Manfred Zwirner, Universitäts-Frauenklinik Tübingen, Hormonlabor

Der für den 1.4.1995 mögliche Beginn des Projektes mußte auf den 15.9.1995 verschoben werden, da Dr. W. Körner nach seiner Promotion, unterstützt durch ein Stipendium des Umweltbundesamtes, am einjährigen internationalen Postgraduierten-Kurs „Environmental Science and Technology“ am IHE in Delft, Niederlande, bis zum 10.9.1995 teilnehmen konnte. Verschiedenste während dieser Fortbildung gesammelten Kenntnisse und Erfahrungen waren für die Durchführung des vorliegenden Forschungsvorhabens direkt und indirekt sehr wertvoll. Beispielfhaft genannt seien hier eine zweimonatige Forschungstätigkeit zu Metabolismus und Zytotoxizität von Zytostatika sowie Kenntnisse über Trinkwasseraufbereitung, Abwasserreinigung, aquatische und terrestrische Ökosysteme.

Die im Rahmen des Projektes bewilligte MTA/BTA-Stelle konnte trotz intensiver Suche erst zum 1.1.1996 mit Dipl.-Biol. W. Schuller besetzt werden.

Am 1.3.1996 wechselte PD Dr. V. Hanf von der Universitäts-Frauenklinik Tübingen zur Universitäts-Frauenklinik Ulm, um dort eine Oberarzt-Stelle anzutreten. Alle Laborarbeiten im Rahmen des Projektes wurden aber wie bisher in Tübingen weitergeführt. Neben täglichen Telefonaten und Online-Netzanbindung kam PD Dr. Hanf regelmäßig zu Arbeitsbesprechungen nach Tübingen.

Vom 1.2.1996 bis 31.7.1997 führte cand. med. Frau S. Poppinga unter Betreuung von PD Dr. Hanf im Rahmen des Forschungsvorhabens die experimentellen Arbeiten für ihre Promotion durch.

2 Räumliche und materielle Ausstattung

Die für die Durchführung des gewählten Screening-Systems erforderlichen kontinuierlichen Zellkulturarbeiten mit humanen Zelllinien wurden zunächst in einem Labor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen durchgeführt (PD Dr. V. Hanf war bis 28.2.1996 dort tätig). Aufgrund des wachsenden Platzbedarfs unserer Arbeitsgruppe wurde bei der Verwaltung der Universität ein Antrag auf Nutzung eines Laborraumes im Medizinisch-Naturwissenschaftlichen Forschungszentrum (MNF) der Universität Tübingen gestellt. Die Laborräume in diesem Gebäude werden für eine begrenzte Zeit Arbeitsgruppen verschiedener Fakultäten zur Verfügung gestellt, die aufgrund von Drittmittelprojekten Raumbedarf haben, der in den jeweiligen Institutsräumen nicht gedeckt werden kann. Ab 1.2.1996 stand dort (für zwei Jahre) ein 30 m²-Labor zur Durchführung der Zellkulturarbeiten zur Verfügung. Die notwendige apparative Ausstattung war teilweise vorhanden, zum anderen Teil konnte sie aus den Projektmitteln (Sterilbank mit Zubehör) beschafft werden. Da aufgrund der 1995 geänderten Förderrichtlinien des Landes Investitionsgüter nur noch anteilig für den Projektzeitraum bezahlt werden, mußte das beantragte und bewilligte, dringend benötigte Mikroplatten-Photometer im Wert von über 12.000 DM letztlich aus eigenen Mitteln finanziert werden.

IV Wissenschaftlicher Kenntnisstand, an den angeknüpft wurde

1 Struktur und Funktion des Estrogenrezeptors

Estrogene beeinflussen im Organismus zahlreiche Wachstums- und Entwicklungsvorgänge. Sie wirken durch die Bindung an den intrazellulären nukleären Estrogenrezeptor (ER), der zur konservierten Familie der Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren gehört. Der humane ER alpha ist ein nukleäres 66 kDa-Protein mit 595 Aminosäuren, das als hormonaktivierter Transkriptionsfaktor fungiert (Abb 1). Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren kommen im gesamten Reich der Wirbeltiere vor. Die DNA-bindende Region (C-Region) des Estrogenrezeptors ist bei den verschiedenen Arten hoch konserviert, während die Länge der N-terminalen Region (A/B-Region) relativ variabel ist. Die aus 39 AS aufgebaute D-Region des Rezeptors, die sich der C-Region anschließt, dient nur als Scharnier zwischen der A/B- und der E-Region und hat für die Funktion des Rezeptors keine Bedeutung (Kumar et al. 1987).

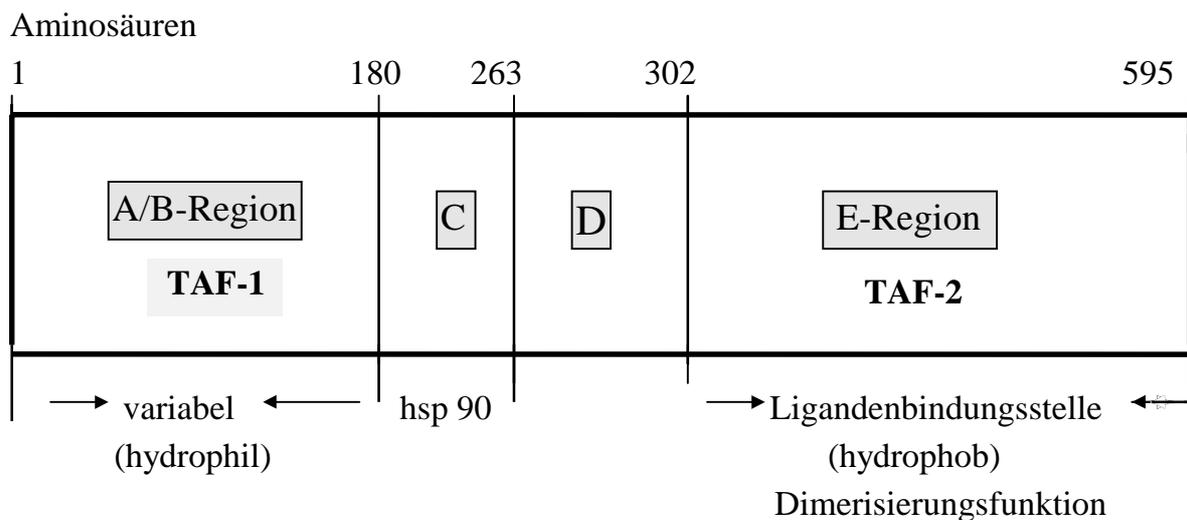


Abb. 1: Schematische Darstellung der Sequenz des humanen Estrogenrezeptors alpha.

Die Aktivierung des Estrogenrezeptors ist nach heutigem Kenntnisstand eine Folge der durch die Ligandenbindung induzierten Änderungen in der Struktur des Rezeptors (Kumar & Chambon 1988; Tsai et al. 1988). Freies, extrazelluläres 17β -Estradiol überwindet aufgrund seiner Lipophilie leicht die Zell- und Kernmembran und führt nach Bindung an den ER und Abspaltung des assoziierten 90 kDa Hitzeschock-Proteins (hsp 90) zur Dimerisierung des Rezeptors. Dieser aktivierte Ligand-Rezeptor-Komplex bindet mit hoher Affinität an eine gut definierte DNA-Sequenz von 13 Basenpaaren, das estrogenresponsive Element (ERE) (Evans 1988; Kumar and Chambon

1988; Beato et al. 1995). Die enhancerähnlichen ERE-Sequenzen sind nahe bei oder innerhalb von estrogenabhängigen Genen lokalisiert (Beato 1991). Nach Bindung an das ERE aktiviert der ER die Transkription der entsprechenden Gene, was nach noch nicht geklärten Mechanismen zur Stimulation der Zellproliferation führt (Dubik and Shiu 1988; Weisz and Bresciani 1988). Ein direkter Zusammenhang von ER-vermittelter Gentranskription und estradiolvermittelter Zellproliferation wird durch *in vivo*- und *in vitro*-Studien mit Antiestrogenen nahegelegt (DeFriend et al. 1994). Antiestrogene unterdrücken die Expression von estrogen-regulierten Genen und reduzieren die Proliferation von ER-positiven Brustzellen, während 17 β -Estradiol ein Mitogen für das Brustepithel ist (Dubik and Shiu 1988; Weisz and Bresciani 1988; DeFriend et al. 1994).

Versuche mit Deletionsmutanten haben gezeigt, daß für eine maximale Stimulierung der Gentranskription alle 595 AS des ER notwendig sind. Das ERE wird vom Rezeptor auch dann erkannt, wenn die E-Region oder ein Teil von dieser fehlt. Der Grund hierfür ist in den zwei unterschiedlichen transkriptionsaktivierenden Funktionsdomänen (TAF = transcriptional activation function) des ER zu sehen.

Nach Parker (1993) liegt die TAF-1-Domäne im N-terminalen Ende des Rezeptors. Diese transkriptionsaktivierende Domäne ist estrogenunabhängig. TAF-2 liegt in der hormonbindenden Domäne und ist nur in Anwesenheit von Estrogenen aktiv (Webster et al. 1988). Beide transkriptionsaktivierenden Domänen können unabhängig voneinander aktiv sein (z.B. wenn eine der beiden durch eine Mutation zerstört wurde). Beim intakten Rezeptor können sie, je nach Ligand, gemeinsam aktiv sein und in ihrer Wirkung synergistisch wirken (Danielian et al. 1992). Bei Ausschaltung von TAF-1 (Deletionsmutanten) hat TAF-2 eine Wirksamkeit, die 20 - 100% gegenüber der Transkriptionsaktivität des gesamten, intakten Rezeptors beträgt (Berry et al. 1990).

Der genaue Mechanismus der Transkriptionsaktivierung ist nicht bekannt. Vermutlich steigern beide TAF-Domänen unabhängig voneinander durch Verstärkung der Polymerase II-Aktivität die RNA-Synthese (Parker 1993). Die TAF-1 und TAF-2 Aktivitäten können je nach untersuchtem Promoter und in Abhängigkeit der untersuchten Zellen variieren. In den Fibroblasten der Hühnerembryonen ist die TAF-1 viel wirksamer als in den Hela-Zellen (Tora et al. 1989). Im Gegensatz zu TAF-1 hat TAF-2 in Hefezellen nur eine sehr geringe transkriptionelle Aktivität (Berry et al. 1990).

2 Estrogenrezeptor-Antagonisten

Kompetitive Antagonisten sind in gleicher Weise wie Agonisten in der Lage, sich an Rezeptoren anzulagern, bewirken allerdings nicht die für die Aktivierung notwendige Änderung der Rezeptorkonformation. **ER-Antagonisten** können somit in MCF-7-Zellen keinen proliferierenden Effekt auslösen. Da Agonist und kompetitiver Antagonist um die Bindung an den Rezeptor kon-

kurrieren, kann jeweils durch die Erhöhung der Konzentration des einen Stoffes der andere vom Rezeptor verdrängt werden.

Tamoxifen ist das zur Behandlung von ER-positiven Brusttumoren am meisten eingesetzte Antiestrogen. Die klinisch relevante Konzentration beträgt 1 μM (Germann 1996). Es wird in der Leber zu 4-Hydroxytamoxifen umgewandelt, welches eine noch höhere Affinität zum ER besitzt (Jordan et al. 1977). Tamoxifen bewirkt zwar die Bindung des aktivierten ER an das ERE in der DNA, es erfolgt jedoch keine Transkriptionsaktivierung (Jordan & Murphy 1990). Tamoxifen bindet am C-terminalen Ende des ER, wo sich die TAF-2 befindet und auch die Bindungsstelle für 17β -Estradiol befindet; somit ist Tamoxifen ein kompetitiver ER-Antagonist (Stover et al. 1987). Tamoxifen und eine Anzahl anderer Antiestrogene wirken in den MCF-7-Zellen auch partiell agonistisch (Berthois et al. 1994). Die hierfür wirksamen Konzentrationen liegen zwei bis vier Zehnerpotenzen niedriger als die antagonistisch wirkenden Konzentrationen.

Die 17β -Estradiolderivate **ICI 182.780** und ICI 164.384 sind reine Antiestrogene, welche nur antagonistisch wirken. Sie verhindern eine Dimerisierung des ER. Zusätzlich wird die Halbwertszeit des Rezeptors herabgesetzt. Der ER kann nach Abspaltung des 90 kDa Hitzeschockproteins (= Aktivierung des ER) nicht an das Chromatin binden. Vermutlich bewirken ICI 182.780 und ICI 164.384, daß der Rezeptor anschließend von Lysosomen aufgenommen wird (Dauvois et al. 1992).

3 Xenoestrogene

Trotz der Intensität und Kontroverse der gegenwärtigen Diskussion handelt es sich bei der estrogenen Wirkung nichtsteroidaler Chemikalien keineswegs um ein neues Phänomen. Bereits 1933 entdeckten Cook et al. durch die Verhornung des Vaginalepithels bei ovariectomierten Ratten die estrogenen Wirkung von 1-Keto-1,2,3,4-tetrahydrophenanthren. Wenig später wurde die estrogenen Aktivität verschiedener 4,4'-Dihydroxydiphenyl- und 4,4'-Dihydroxydiphenyl-methan-Verbindungen (z.B. Bisphenol-A) sowie von Diethylstilbestrol in Mäusen und Ratten nachgewiesen (Dodds & Lawson 1936; Dodds et al. 1938).

1954 entdeckten Bradbury und White, daß das in Leguminosen vorkommende Isoflavonoid Genistein eine estrogenen Aktivität besitzt. In den 60er Jahren wurde für weit verwendete Organochlorinsektizide wie o,p'-DDT, o,p'-DDE und Methoxychlor sowie für einige technische PCB-Mischungen eine estrogenen Wirkung in Tierversuchen nachgewiesen (Tullner 1961; Bitman et al. 1968; Bitman & Cecil 1970). Obwohl bereits 1981 ein Zusammenhang zwischen beobachteten Reproduktionsstörungen bei Seemöwen und ihrer hohen Belastung durch das in Nahrungsketten akkumulierende Insektizid DDT belegt werden konnte (Fry & Tone 1981), dauerte es noch ein Jahrzehnt, bis unerwünschte endokrine Wirkungen von Chemikalien ein allgemeines Interesse in der Forschung und der Öffentlichkeit fanden.

Für Aufsehen über die USA hinaus sorgte die zufällige Entdeckung der estrogenen Wirkung von p-Nonylphenol in der Kultur von estrogensensitiven menschlichen Brustkrebszellen (Soto et al. 1991). Diese Entdeckung hat erhebliche Forschungsaktivitäten zur Etablierung und Anwendung von *in vitro*-Methoden zum Nachweis estrogenen Wirkungen ausgelöst.

Obwohl bislang nur eine begrenzte Anzahl von ca. 150 - 200 Substanzen getestet wurde, ist bis heute sowohl für verschiedene pflanzliche Inhaltsstoffe (Isoflavonoide, Flavone, Chalcone, Lignane u.a.) und zwei Mykotoxine als auch für mehr als 30 nichtsteroidale Chemikalien eine estrogenartige Wirkung *in vitro* und z.T. auch *in vivo* nachgewiesen (Soto et al. 1995; Jobling et al. 1995; Schäfer et al. 1996). Dazu gehören seit Jahrzehnten in großen und z.T. steigenden Mengen verwendete Industriechemikalien sowie verschiedene Organochlorinsektizide (s. Tab. 1 und 2). Chemikalien mit rezeptorvermittelter antiestrogenen Wirkung sind außer einigen therapeutisch angewandten Substanzen wie Tamoxifen bisher nicht bekannt.

Für eine Reihe von nichtsteroidalen Chemikalien sind estrogenähnliche Wirkungen incl. entsprechender Wirkungen auf das Fortpflanzungssystem *in vivo* nachgewiesen, sei es an wildlebenden Tierarten und/oder im Tierversuch. Einen Überblick gibt Tab. 1.

Tab. 1: Chemikalien, für die bis heute eine estrogenartige Wirkung *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen wurde. Die zitierte Literatur bezieht sich auf *in vivo*-Effekte und ist lediglich eine begrenzte Auswahl. Einige der beobachteten Effekte könnten prinzipiell auch auf anderen Wirkungsmechanismen beruhen.

Substanz	Verwendung	Literatur
o,p'-DDT, o,p'-DDE	Insektizid bzw. Metabolit	Bitman et al. 1968; Bitman & Cecil 1970
Methoxychlor	Insektizid	Tullner 1961
Kepone (Chlordecone)	Insektizid	Gellert 1978b
Endosulfan	Insektizid	Gupta & Gupta 1979; Singh & Pandey 1990
β-HCH	Insektizid	Loeber & Van Velsen 1984; Wester et al. 1985
ortho-subst. PCB	versch. techn. Anwendungen	Gellert 1978a; Bitman & Cecil 1970
p-Alkylphenole (C3 - C9)	nichtionische Detergentien, Antioxidantien in Kunststoffen	Purdom et al. 1994; Sharpe et al. 1995; Gimeno et al. 1996
Bisphenol-A	Monomer für Polycarbonate u. Epoxidharze	Dodds & Lawson 1936
Benzyl-n-butylphthalat (BBP)	Weichmacher für Kunststoffe	Sharpe et al. 1995; 1998

Die estrogenen Potenz der in Tab. 1 und 2 aufgeführten Chemikalien ist vier bis sieben Größenordnungen geringer als die von 17β-Estradiol, d.h. es sind 10⁴- bis 10⁷-fach höhere Konzentrationen notwendig, um die gleiche definierte Wirkung auszulösen. 4-t-Octylphenol, 4-t-Nonylphenol und Bisphenol-A zeigen von all diesen Stoffen die stärkste Potenz. Die

Wirkungsstärke kann, wie z.B. bei den drei letztgenannten Substanzen, genauso hoch liegen wie die von E2, oder nur etwa 30 % betragen, wie im Falle des 3-t-Butyl-4-Hydroxyanisol. Aus den Tabellen 1 und 2 ist zu entnehmen, daß sich die bisher bekannten Xenoestrogene in ihren chemischen Strukturen z.T. stark unterscheiden, ein all diesen wirksamen Verbindungen gemeinsames Strukturelement ist nicht zu erkennen. Die Mehrzahl dieser Substanzen enthält zwar einen para-disubstituierten Phenylring, wobei ein Substituent eine Hydroxylgruppe oder ein Chloratom ist und der andere ein Alkylrest; die Phthalate (BBP, DBP), β -HCH, Endosulfan und Dieldrin besitzen diese Substruktur jedoch nicht. β -HCH und Dieldrin besitzen nicht einmal einen Phenylring, sodaß selbst diese strukturelle Minimalforderung nicht von allen Xenoestrogenen erfüllt wird. Mit anderen Worten: eine gemeinsame chemische Substruktur, die für die estrogenere Wirkung verantwortlich ist, wurde bisher nicht entdeckt.

Tab. 2: Chemikalien, für die bis heute eine estrogenartige Wirkung *in vitro* nachgewiesen wurde.

Substanz	Verwendung	Literatur
o,p'-DDD	Insektizid-Metabolit	Klotz et al.1996
Toxaphen	Insektizid	Soto et al. 1994
Dieldrin	Insektizid	Soto et al. 1995
cis-/trans-Nonachlor	Insektizid	Klotz et al. 1996
Alachlor	Herbizid	Klotz et al. 1996
Benzylbutylphthalat, Di-n-butylphthalat, Diiso- butylphthalat, Diethylphthalat, Diisononylphthalat	Weichmacher in Kunststoffen	Jobling et al. 1995; Soto et al. 1995; Harries et al. 1997
BP-A-dimethacrylat	Kunststoffmonomer	Villalobos et al. 1995; Sonnenschein et al. 1995
3-t-Butyl-4-Hydroxyanisol	Antioxidans in Lebensmitteln	Soto et al. 1995
4-Hydroxybiphenyl	Gummizusatz u.a.	Soto et al. 1992; 1995
4-Hydroxy-PCB	Stabile PCB-Metaboliten	Soto et al. 1995; Müller & Kim 1978
Benzophenon	UV-Absorber in Sonnencremes	Jobling et al. 1995
Phenolrot	pH-Indikator	Berthois et al. 1986

Die Erkennung estrogenere Eigenschaften hängt deshalb weitgehend von einer empirischen Testung ab. Da bis heute eine systematische Untersuchung von Substanzen auf estrogenere (und andere hormonartige) Wirkungen nicht durchgeführt wurde, muß davon ausgegangen werden, daß es noch weitere Verbindungen mit bislang unerkannter estrogenere Wirkung gibt.

Folglich sind einfache, sensitive und spezifische Testsysteme notwendig, mit denen eine große Zahl von Einzelverbindungen, Substanzgemischen und Extrakten von Umweltproben auf ihre

mögliche (anti)estrogenartige Wirkung untersucht werden kann. Die Etablierung, Optimierung, Validierung und praktische Anwendung geeigneter Testsysteme war Gegenstand dieses Forschungsprojektes.

4 In vitro-Testsysteme

Zum Nachweis von rezeptorvermittelten estrogenen Wirkungen wurden in den letzten Jahren bereits einige *in vitro*-Testsysteme entwickelt und zur Untersuchung von Einzelsubstanzen angewandt. Einen repräsentativen Überblick, der keinen Anspruch auf Vollständigkeit erhebt, gibt Tab. 3.

Tab. 3: Vergleich von *in vitro*-Assays zum Nachweis rezeptorvermittelter (anti)estrogenen Wirkungen.

System	Endpunkt	EC ₅₀ (mol/L) für E2	EC ₁₀₀ (mol/L)	Relativer Effekt vs. Kontrolle	Bemerkungen
Bindung an rekombinanten ER	³ H-E2-Verdrängung	10 ⁻⁹	10 ⁻⁷		keine Unterscheidung Agonist/Antagonist
E-Screen (ER-positive Brustkrebszellen)	Zellproliferation	0,5 - 1x10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	3-8	Einfach
Transkriptionale Aktivierung des ER in Säugerzelllinien ¹	Aktivität eines Reportergens	5x10 ⁻¹¹	10 ⁻¹⁰	40-50*	stabile Transfektion bisher schwierig
Transkriptionale Aktivierung in Hefe-Zellen	Aktivität eines Reportergens	1E-10 ¹ 7E-11 ²	1E-08 ¹ 4E-10 ²	100	Einfach, schnell
Forellenhepatozythen ³	Induktion der Vitellogeninsynthese	10 ⁻⁸		4-7	hohe metabolische Kapazität

¹ Klotz et al. (1996) ² Routledge & Sumpter (1996)

³ im statischen System schnelle Metabolisierung von 17β-Estradiol, im Durchflußsystem und/oder mit Ethinylestradiol wahrscheinlich empfindlicher (H. Segner, UFZ Leipzig, persönl. Mitteilung 12/1996).

* in 35mm-Schalen; in 96-well-Platten nur 3- bis 4fache Erhöhung

Rekombinante Reporter-gen-Assays, bei denen die transkriptionale Aktivierung eines Reportergens (Luciferase bzw. β-Galaktosidase), das unter der Kontrolle eines estrogenresponsiven Elements (ERE) steht, gemessen wird, zeichnen sich durch eine hohe Spezifität und durch einen ausgeprägten relativen Effekt verglichen mit der estrogenfreien

Kontrolle aus. Allerdings sind Reporter-gen-Assays mit Hefezellen deutlich unempfindlicher als entsprechende Assays mit humanen Zelllinien. Reporter-gen-Assays mit menschlichen Zelllinien erreichen etwa die Empfindlichkeit des Proliferationstests mit humanen MCF-7-Brustkrebszellen (E-Screen-Assay). Den meisten Arbeitsgruppen ist allerdings bisher keine stabile Transfektion des Reporter-gen-Konstruktes in die Zelle gelungen, sodaß der Assay einen relativ hohen experimentellen Aufwand erfordert.

Die empfindlichsten derzeit angewandten *in vitro*-Screeningsysteme zum Nachweis estrogenen Wirkungen sind verglichen mit den physiologischen Serumkonzentrationen von 17 β -Estradiol (E2) bei der Frau sehr empfindlich. So sind mit dem E-Screen-Assay bereits E2-Konzentrationen von 10⁻¹² mol/L (0,27 ng/L) nachweisbar. Je nach Zyklusphase liegen die E2-Serumspiegel bei fortpflanzungsfähigen Frauen zwischen 20 und 200 ng/L. Da die bisher bekannten estrogenartig wirkenden Chemikalien eine um vier bis sechs Größenordnungen geringere Potenz als E2 besitzen, sind in jedem Testsystem entsprechend höhere Konzentrationen zum Nachweis einer Wirkung notwendig. Die Empfindlichkeit des E-Screen-Assays und von Reporter-gen-Assays mit Säugerzellen reicht jedoch aus, um bei solchen Substanzen eine Wirkung in Konzentrationen nachzuweisen, die noch unter der Löslichkeitsgrenze im wäßrigen Medium oder dem Auftreten von Zytotoxizität liegt.

V Methoden

1 Kultivierung der Zellen

Alle Zelllinien wurden in Kulturflaschen mit 25 oder 75 cm² Grundfläche (Sarstedt) bei 37 °C und 5 % CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre im Brutschrank kultiviert. Das Kulturmedium wurde alle 3 bis 4 Tage gewechselt. Nahezu konfluent gewachsene Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (Biochrom) vom Boden der Kulturflasche abgelöst und ein kleiner Teil der Suspension von einzelnen Zellen in einer neuen Kulturflasche mit frischem Medium weiterkultiviert. Definitionsgemäß erhöht sich durch jede Trypsinbehandlung die Passagenzahl der Zellen. Alle verwendeten Zelllinien waren frei von Mykoplasmen (entsprechende Tests wurden mit einem Kit von Boehringer Mannheim in regelmäßigen Abständen durchgeführt).

Estrogenrezeptor(ER)-positive menschliche **MCF-7**-Brustkrebszellen werden in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit Phenolrot (Biochrom Nr. F0415) kultiviert, dem 5 % fötales Kälberserum (FCS, Gibco Nr. 10081 oder Biochrom Nr. S0115), 2 mM L-Glutamin (Biochrom Nr. K0281), und 1 % Penicillin/Streptomycin/Amphotericin-Lösung (Gibco Nr. 15240) zugesetzt wurden. Nach 7 bis 10 Tagen werden die Zellen in neue Kulturflaschen umgepflanzt.

Die ER-positiven humanen **EFM-19**-Mammakarzinomzellen werden in Medium kultiviert, welches 10 % FCS enthält. Stock 1 (von Dr. H. Bartsch, Universitäts-Frauenklinik Tübingen) wächst in DME-Medium, Stock 2 (von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) wird in RPMI 1640-Medium (Biochrom Nr. F1295) kultiviert.

2 E-Screen-Assay

Die Durchführung des Assays ist schematisch in Abb. 3 auf S. 26 dargestellt.

2.1 Start des Assays

Von subkonfluent gewachsenen Zellen, die sich noch in der exponentiellen Wachstumsphase befinden, wird das Kulturmedium aus der Kulturflasche abgesaugt. Anschließend wäscht man die Zellen mit der auf 37 °C vorgewärmten Trypsin/EDTA-Lösung (2,5 ml in 75 cm²-Flaschen und 1,5 ml in 25 cm²-Flaschen) und saugt wiederum ab. 2,5 bzw. 1,5 ml Trypsin/EDTA-Lösung (Biochrom Nr. 2153) läßt man im Inkubator 4 bis 8 min auf die Zellen einwirken. Wenn sich alle Zellen abgerundet haben und einzeln unter dem Mikroskop sichtbar sind, werden sie durch leichtes Klopfen vom Boden der Kulturflasche abgelöst. Nach Zugabe von 10 ml Kulturmedium und guter Durchmischung zentrifugiert man die Zellen 5 Min. bei 1200 U/min.

Nach dem Abdekantieren des Kulturmediums werden die Zellen in 5 ml Experimentalmedium resuspendiert. Danach wird die Zellsuspension mit einer 5 ml Einmalspritze aufgenommen und mehrmals durch eine feine Kanüle (0,9 x 70 mm) gespritzt. Damit kann eine vollständige Vereinzelung der Zellen erreicht werden. Nach Zählung mit der Neubauer-Zählkammer werden die Zellen mit **Experimentalmedium** so verdünnt, daß die Zelldichte 20.000/ml beträgt. Dieses Experimentalmedium besteht aus phenolrotfreiem DME-Medium (Gibco Nr. 11880) mit 2 mM L-Glutamin und 5 % FCS, das mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich 17 β -Estradiol zu entfernen (CD-FCS). Weiterhin wurden dem Medium 1 % eines 1 M HEPES-Puffer (Sigma, 1 M Stammlösung mit 10 N NaOH auf pH=7,6 eingestellt, Endkonzentration 10 mM), 1 % einer Penicillin/Streptomycin/Amphotericin-Lösung (Gibco 15240) sowie 1 % einer Lösung von nicht essentiellen Aminosäuren (Gibco Nr. 11140) zugesetzt.

Beim Aussäen der Zellen in 24-Well-Platten werden pro Well 0,5 ml (= 10.000 Zellen) pipettiert. Bei Verwendung von 96-Well-Platten werden je 1500 Zellen in einem Volumen von 150 μ l pipettiert.

2.2 Substanzzugabe

Nach 24 Stunden sind die Zellen am Boden der Kulturplatten angewachsen (Verlust der kreisrunden Form). Das Medium wird mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die mit Experimentalmedium verdünnten Lösungen der Testsubstanzen werden zugegeben (je 1 ml in 24-Well-Platten

und 150 µl in 96-Well-Platten). Bei Verwendung von 24-Well-Platten werden in jeweils vier Wells die gleichen Konzentration eingesetzt, d.h. in einer 24-Well-Platte können sechs verschiedene Konzentrationen der zu testenden Substanz eingesetzt werden. Bei Verwendung der 96-Well-Platten werden die äußeren Kavitäten der Platte mit jeweils 150 µl Experimentalmedium oder sterilem Wasser gefüllt (Verdunstungsschutz), sodaß pro Platte zehn verschiedene Konzentrationen eingesetzt werden können. Jede Konzentration wird in der 96-Well Platte achtfach getestet.

In 24-Well-Platten bilden vier Wells die Negativkontrolle (in den 96-Well-Platten sind es acht). In diese Wells wird nur Experimentalmedium gegeben. Als Positivkontrolle dienen fünf verschiedene Konzentrationen von 17β-Estradiol (E2) zwischen 10^{-8} M und 10^{-12} M. Die zu testenden Substanzen wurden in Konzentrationen bis zu 10^{-4} M eingesetzt, wobei die Verdünnungen mit Experimentalmedium angesetzt werden. Da die Stammlösungen (10 - 100 mM) der meist lipophilen Testsubstanzen in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol hergestellt werden, darf die Endkonzentration des Lösungsmittels im Experimentalmedium bei der Testung in der Zellkultur nicht über 0,1 % liegen.

Pro Well werden jeweils 1 ml der verdünnten Testsubstanzlösungen bzw. der Positivkontrollen und der Negativkontrolle pipettiert (bei den 96-Well-Platten sind es pro Well jeweils 150 µl).

2.3 EFM-19-Zellen

Um die EFM-19-Brustkrebszellen nach der Einwirkung von Trypsin völlig zu vereinzeln, wird die Zellsuspension mehrmals durch die doppelte Lage eines sterilen Drahtnetzes mit 30 µm Maschenweite gespritzt. Das Drücken durch eine feine Kanüle führt bei den EFM-19-Zellen zur mechanischen Beschädigung der Zellwände.

Nach der Zählung wird die Zellsuspension mit Experimentalmedium mit 10 % CD-FCS so weit verdünnt, daß sich in 1 ml Suspension 40.000 Zellen befinden. In jedes Well werden 0,5 ml (= 20.000 Zellen) pipettiert. Bei Verwendung von 96-Well-Platten gibt man in jedes Well 150 µl Zellsuspension mit 3500 Zellen. Nach 48 Stunden wird das Experimentalmedium mit einer Pasteurpipette abgesaugt und die in Experimentalmedium verdünnten Testsubstanzen werden zugegeben. Fünf Tage nach Substanzzugabe wird das Medium gewechselt. Dazu wird mit einer Pasteurpipette das Medium aus jedem Well abgesaugt und durch frische identische Verdünnungen der zu testenden Substanzen ersetzt. Das fünf Tage alte Experimentalmedium der Negativkontrolle und die Positivkontrollen werden ebenfalls gewechselt. Nach weiteren fünf Tagen (insgesamt zehn Tage Inkubation) wird die Zellzahl bestimmt.

2.4 Bestimmung der Zellzahl

Als Alternative zur Zellzählung wurden einfache und schnell zu bestimmende Endpunkte gewählt, die direkt proportional zur Zellzählung sind.

2.4.1 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung des Gesamtprotein-gehalts einer Zelle. Dieser ist über einen großen Bereich linear zur Zellzahl (Skehan et al. 1990).

Fixierung der Zellen

Nach Ablauf der Inkubationszeit (MCF-7-Zellen: 5 Tage; EFM-19-Zellen: 10 Tage) wurden die Assays, welche aus vier bis acht 24-Well-Platten oder aus drei bis fünf 96-Well-Platten bestanden, gestoppt. Bei Bedarf wurden zunächst Aliquote des Experimentalmediums für die Bestimmung des pS2-Proteins entnommen und in Eppendorf-Gefäßen bei -30 °C eingefroren. Das Medium wird aus den Wells durch Umdrehen der Platten entfernt und bei giftigen Testsubstanzen (z.B. Lindan) für die spätere Entsorgung gesammelt. Danach wird jedes Well mit 0,5 ml (0,15 ml bei 96-Well-Platten) kaltem PBS (phosphate buffered saline, Biochrom Nr. L1825) gewaschen. Anschließend fixiert man die Zellen mit 10%-iger kalter Trichloressigsäure mindestens 30 Min. in der Kälte (Kühlschrank oder Platten auf Eis legen). Hierfür werden in die Kavitäten der 24-Well-Platten 200 µl (100 µl bei den 96-Well-Platten) Trichloressigsäure gegeben. Nach der Fixierung werden die Platten unter einem kleinen Strahl fließendem Wasser viermal gewaschen und anschließend bei max. 40 °C getrocknet.

Anfärben der Zellen

Nachdem die Platten vollständig getrocknet sind, können sie beliebig lang (Skehan et al. 1990) aufbewahrt werden. Zum Anfärben werden in jedes Well 250 µl einer 0,4%-igen Lösung von Sulforhodamin B (Sigma S-1402) in 1%-iger Essigsäure (50 µl bei 96-Well-Platten) gegeben. Nach zehnminütiger Inkubation bei Raumtemperatur werden die Platten mit 1%-iger Essigsäure gewaschen. Das Waschen erfolgt solange, bis die Essigsäure in den Wells farblos ist. Anschließend werden die Platten wiederum bei max. 40 °C getrocknet.

Messung der Extinktion

24-Well-Platten: Die Platten werden auf Eis gelegt. Pro Well werden 500 µl einer kalten 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5) pipettiert. Nach etwa 10 Min. ist der Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Für die Messung am Mikroplatten-Photometer müssen die Inhalte der 24-Well-Platten in die Vertiefungen einer 96-Well Platte transferiert werden. Hierfür werden aus der Kavität der 24-Well-Platte, in welcher 10^{-9} M 17β -Estradiol getestet wurde, 60 bis 80 µl der roten Farblösung in eine Vertiefung einer 96-Well Platte pipettiert, und im Mikroplatten-Photometer bei 550 nm (Referenz 630 nm) vermessen. Wenn der gemessene Wert nicht über 1,8 liegt (bei einer Extinktion die über 1,8 liegt, besteht keine Linearität zu der vorhandenen Zellzahl), können auch die restlichen Vertiefungen der 96-Well-Platte mit dem entsprechenden Volumen pipettiert werden. Bei der Extinktionsmessung werden jeweils Dreifachbestimmungen durchgeführt, d.h. aus jeder Kavität der 24-Well-Platte werden drei gleiche Aliquote in Vertiefungen der 96-Well-Platte

pipettiert. Bei der Auswertung wird dann der Mittelwert dieser drei Messungen gebildet. Da man bei Verwendung von 24-Well-Platten jede Konzentration einer Substanz in vier Wells testet, wird somit jede Konzentration 12 mal gemessen. Der Mittelwert dieser 12 Extinktionsmessungen ist die Grundlage für die quantitative Auswertung des Assays (Berechnung von PE, RPE und EEF).

96-Well-Platten: Die Platten werden auf Eis gelegt. In jede Kavität pipettiert man 100 µl der kalten 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5). Nach 10- bis 15minütiger Inkubation im Kühlschrank ist der Farbstoff aus den Zellen herausgelöst. Der Inhalt der Wells wird gut durchmischt und dann im Mikroplatten-Photometer bei 550 nm (Referenz 630 nm) vermessen. In der Regel liegt in keiner der Vertiefungen die gemessene Extinktion über 1,8. Für die Auswertung wird der Mittelwert aus den 8 Einzelwerten, die für jede Konzentration gemessen werden, gebildet.

2.4.2 MTT-Assay

Beim MTT-Assay nehmen die Zellen das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-di-methyldiazol-2-yl) 2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT, Sigma M-5655) auf, und reduzieren es durch die mitochondriale Succinat-Dehydrogenase zum blauen unlöslichen MTT-Formazan (Mosmann 1983).

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Experimentalmedium mit den getesteten Substanzen aus den Wells durch Umdrehen der Platten entfernt. Anschließend werden die Platten auf einem saugfähigen Papiertuch vorsichtig ausgeklopft. Danach werden in jedes Well 250 µl MTT-Medium pipettiert, welches 2 mg/ml MTT in dem für die entsprechende Zelllinie zugehörigen Experimentalmedium enthält. Die Platten werden anschließend wieder für mindestens 2 Stunden in den Inkubator gelegt. Danach sind die Zellen dunkelblau gefärbt. Das MTT-Medium wird aus den Wells durch Umdrehen der Platten entfernt und für die spätere Entsorgung gesammelt. Nach dem vorsichtigen Ausklopfen der Platten auf einem saugfähigen Papiertuch, werden pro Well 500 µl Dimethylsulfoxid zugegeben (bei 96-Well-Platten nur 100 µl). Nach 15minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT hat sich das blaue Formazan aus den Zellen herausgelöst.

Die Messung der Extinktion entspricht derjenigen für den SRB-Assay. Da die gemessenen Extinktionswerte beim MTT-Assay niedriger liegen als beim SRB, können aus der 24-Well-Platte in der Regel jeweils 100 µl in die 96-Well Mikrotiterplatte pipettiert werden.

2.4.3 Alamar-Blue-Assay

Bei diesem Assay wird die Zahl der lebenden Zellen ähnlich wie beim MTT-Assay indirekt durch die Bestimmung der mitochondrialen metabolischen Aktivität der Zellen gemessen. Hierbei wird ein wasserlöslicher blauer Farbstoff zu einem roten Endprodukt reduziert (Ahmed et al. 1993). Der Alamar-Blue-Assay ist sehr schnell durchführbar, der Farbstoff ungiftig. Er wurde ausschließlich in 96-Well-Platten durchgeführt.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wird das Experimentalmedium mit den gelösten Testsubstanzen aus den Wells durch Umdrehen der Platten und vorsichtiges Ausklopfen auf einem saugfähigen

Papiertuch entfernt. In jede Kavität werden 100 µl der mit Experimentalmedium 1:10 verdünnten blauen Alamar-Blue-Lösung (Laboserv GmbH, Gießen) pipettiert. Nach drei- bis fünfstündiger Inkubation im Brutschrank wurde die 96-Well-Platte im Mikroplatten-Photometer bei 550 nm (Referenz 630 nm) vermessen.

2.4.4 Erstellung der Eichgerade für die Zellzahl

In eine 24-Well-Kulturplatte werden jeweils in vier Wells 50.000, 100.000, 150.000, 200.000 und 250.000 MCF-7-Zellen in Kulturmedium ausgesät. Nach siebenstündiger Inkubation im Brutschrank wird ein SRB- bzw. MTT-Assay durchgeführt. Die Extinktionsmessung in den 96-Well-Platten wird mehrmals mit jeweils unterschiedlichen Volumina durchgeführt. Bei der ersten Messung werden in jedes Well 50 µl aus den entsprechenden Vertiefungen der 24-Well-Platte pipettiert. Für die weiteren Messungen werden jeweils zusätzlich 10 µl zugegeben, bis in der 96-Well-Platte ein Volumen von 100 µl (im Falle des SRB-Assays) bzw. von 130 µl (MTT-Assay) erreicht war. Das Aussäen der Zellen und Vermessen der Extinktionen der 96-Well-Platten wurde in drei unabhängigen Experimenten durchgeführt. Für die Berechnung der Eichgeraden wurde für jede Zellzahl der Mittelwert der Extinktionen aus den drei Einzelexperimenten verwendet.

2.5 Strippen von fötalem Kälberserum

Ziel des Strippens ist es, alle Steroidhormone einschließlich 17β-Estradiol aus dem fötalen Kälberserum (FCS) zu entfernen. Hierfür wurden zwei unterschiedliche Methoden angewandt.

2.5.1 Methode nach Soto et al. (1992)

Nachdem das Serum langsam (im Kühlschrank) aufgetaut ist, versetzt man 40 ml mit 2,2 g säuregewaschener Aktivkohle (Norit A) und 0,22 g Dextran T70 (beides von Sigma). Beim vorherigen Waschen der Aktivkohle werden 2,2 g zweimal mit je 45 ml reinem Wasser (Ampuwa, Fresenius) resuspendiert und abzentrifugiert (5 min bei 1200 rpm). Anschließend wird das Serum zusammen mit der Aktivkohle und dem Dextran 1 Stunde bei 37 °C unter Rühren mit einem Magnetrührer inkubiert. Danach wird die Suspension 40 min bei 3200 U/min zentrifugiert. Mit einer Pipette wird anschließend das gestrippte Serum (CD-FCS) vorsichtig abgenommen und steril filtriert (0,45 und 0,22 µm Einwegfilter, Millipore) und in Aliquote zu je 50 ml in Polypropylen-Röhrchen bei -30 °C eingefroren.

2.5.2 Methode nach Stanley et al. (1977)

100 ml des aufgetauten Serums werden mit 4 N Salzsäure auf pH 4,2 angesäuert und 30 min bei 0°C (auf Eis) gerührt. Danach wird der pH-Wert nochmals auf 4,2 nachgestellt und anschließend 5 ml Dextran-Aktivkohle-Suspension zugefügt. Diese Suspension besteht aus 10 % (w/v) Aktivkohle und 0,05 % (w/v) Dextran T70 in Wasser. Die Mischung wird über Nacht bei 4 °C gerührt

(Kühlraum). Am folgenden Tag wird die Lösung 30 min bei 3200 U/min und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird das Serum abdekantiert und der pH-Wert mit 4 N Natronlauge auf 7,2 eingestellt. Nach dem steril filtrieren (0,45 µm und 0,22 µm Einwegfilter) wird das CD-FCS aliquotiert und bei -30 °C eingefroren.

3 Sekretion von Matrixproteinen (pS2-Messung)

In menschlichen Brustkrebszellen induzieren Estrogene die Produktion und Sekretion bestimmter Proteasen wie z.B. Prokathepsin und Kathepsin D (Krishnan & Safe 1993). In MCF-7-Zellen stimulieren Estrogene spezifisch die Bildung des 7 kDa-Protein pS2, das ins Kulturmedium abgegeben wird und dort akkumuliert (Nunez et al. 1987).

Für die Bestimmung des pS2-Proteins ist ein immunoradiometrischer Assay kommerziell erhältlich (ELSATM-PS2 CIS Diagnostik, Dreieich). Die Messungen wurden im Hormonlabor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen (Dr. M. Zwirner, A. Ribarek) durchgeführt.

Nach der Inkubation der Testsubstanzen in den MCF-7-Zellen wurden pro eingesetzter Konzentration aus je zwei der vier Wells Aliquote zu je 250 µl entnommen. Diese wurden in kleine Eppendorf-Reaktionsgefäße pipettiert und sofort bei -30 °C eingefroren. Vor der immunoradiometrischen Bestimmung des pS2-Proteins wurden die Proben mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt und kurz abzentrifugiert.

4 Bestimmung des Estrogen- und Progesteronrezeptor-Gehaltes

Unter der Einwirkung von 17β-Estradiol und von Xenoestrogenen verringert sich in den MCF-7-Zellen die Zahl der zytosolischen Estrogenrezeptoren (ER). Gleichzeitig wird die Zahl der Progesteronrezeptoren (PGR) stark erhöht (Villalobos et al. 1995). Die Bestimmung der Rezeptorkonzentrationen in den Zellen wird mit Enzymimmunoassays durchgeführt. Hierfür sind kommerzielle Kits erhältlich (Abbott Diagnostics). Die Messungen wurden im Hormonlabor der Universitäts-Frauenklinik Tübingen (Dr. M. Zwirner, A. Ribarek) durchgeführt.

Kultivierung der Zellen für die ER- und PGR- Bestimmung

In mehrere 75 cm² Kulturflaschen wurden jeweils etwa 1 Mio Zellen ausgesät. Nach 24 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt. In je zwei Flaschen wurden jeweils 15 ml Experimentalmedium als Negativkontrolle bzw. 10⁻⁹ M 17β-Estradiol oder eine geeignete Konzentration einer Testsubstanz gegeben. Nach drei Tagen wurde das Medium gewechselt. Am 7. Tag wurde das

Medium abgesaugt, die Zellen nach Waschen mit PBS mit einem sterilen Zellschaber vom Boden der Kulturflaschen abgekratzt, in 1 - 1,5 ml PBS resuspendiert, in Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur Rezeptorbestimmung bei -30 °C eingefroren.

VI Ergebnisse

1 Etablierung, Optimierung und Validierung des E-Screen-Assays

1.1 Auswahlkriterien

Der Primäreffekt eines Estrogens ist die *Stimulation der mitotischen Aktivität in Geweben des weiblichen Genitaltraktes* (Hertz 1985). Für einen Screening-Assay auf estrogene Aktivität ist somit prinzipiell jede estrogen-sensitive Säuger-Zelllinie geeignet. Durch die Verwendung von Zellen **menschlichen** Ursprungs sind Abschätzungen von estrogenen Effekten in humanen Geweben leichter möglich. Die Verwendung der menschlichen Brustkrebszelllinie MCF-7 ist wegen ihrer reproduzierbaren und stabilen Estrogenabhängigkeit empfohlen worden (Soto et al. 1985).

Soto et al. (1992) bestimmen in ihrem als „E-Screen“ bezeichneten *in vitro*-Assay die Proliferation von ER-positiven humanen MCF-7-Brustkrebszellen als Maß einer estrogenen Wirkung. Bei dem gemessenen Endpunkt handelt es sich also um eine funktionelle, rezeptorvermittelte Wirkung; das Testsystem kann somit als ein *in vitro*-Modell der Promotion von Mammatumoren *in vivo* betrachtet werden. Der E-Screen-Assay ist relativ einfach durchzuführen, sehr empfindlich (s. IV 4, Tab. 3) und hatte sich bei einer Reihe von getesteten Chemikalien, von denen estrogenere Effekte am lebenden Tier bekannt sind (verschiedene Organochlorinsektizide, p-Alkylphenole, Bisphenol-A), bereits als spezifisch erwiesen (Soto et al. 1995). Deshalb wurde dieses Testsystem als Ausgangspunkt unseres Forschungsvorhabens gewählt. Zur Erlernung des Assays hospitierte Dr. W. Körner im Oktober 1995 im Labor von Frau Prof. Ana Soto an der Tufts University, Department of Anatomy and Cellular Biology, in Boston, USA.

1.2 Etablierung des E-Screen-Assay mit eigenen MCF-7-Zellen

1.2.1 Charakterisierung der MCF-7-Zelllinie

Seit Anfang der 80er Jahre haben verschiedene Forschungsgruppen an der Universitäts-Frauenklinik Tübingen mit MCF-7-Zellen gearbeitet. Von diesen MCF-7-Zellen erhielten wir im November 1995 die Passage Nr. 145 von Dr. Hella Bartsch, Universitäts-Frauenklinik Tübingen. Die Zellen wurden bislang bis zur Passage Nr. 200 kultiviert, ohne ihre Estrogensensitivität zu verlieren. Die Morphologie der Zellen zeigt im Vergleich zu den Zellen von A. Soto Unterschiede.

Für unsere MCF-7-Zellen betrug bei Zugabe von 10^{-10} M E2 zum Experimentalmedium nach Aussaat von 10.000 bzw. 20.000 Zellen pro Well die Verdopplungszeit t_D in der exponentiellen Wachstumsphase zwischen dem 2. und 5. Tag $21 \pm 2,9$ Stunden ($n = 3$). Dies stimmt gut mit den Angaben von Villalobos et al. (1995) überein.

Abb. 2 zeigt, daß 1 nM 17β -Estradiol im Experimentalmedium in den MCF-7-Zellen zu einer starken Induktion der Progesteronrezeptoren führt. Gleichzeitig wird die Zahl der Estrogenrezeptoren verglichen zur hormonfreien Negativkontrolle herabreguliert. Der Gehalt an Estrogenrezeptoren in unseren MCF-7-Zellen ist mit 21 ± 10 fmol/mg Protein deutlich niedriger als im Zellstamm von Soto et al. (1995) mit 183 ± 59 fmol/mg Protein. Dieser Unterschied könnte aber z.T. auf unterschiedlichen Quantifizierungsmethoden in den beiden Labors beruhen.

Die Messung des Progesteronrezeptor-Gehaltes gilt allgemein als ein empfindlicher Endpunkt für die Testung von Substanzen auf estrogenartige Wirkung (Soto et al. 1992; 1995). Welshons et al. (1990) zeigten allerdings, daß die Messung der Zellproliferation noch etwa 10fach sensitiver ist als die Messung der PGR-Synthese.

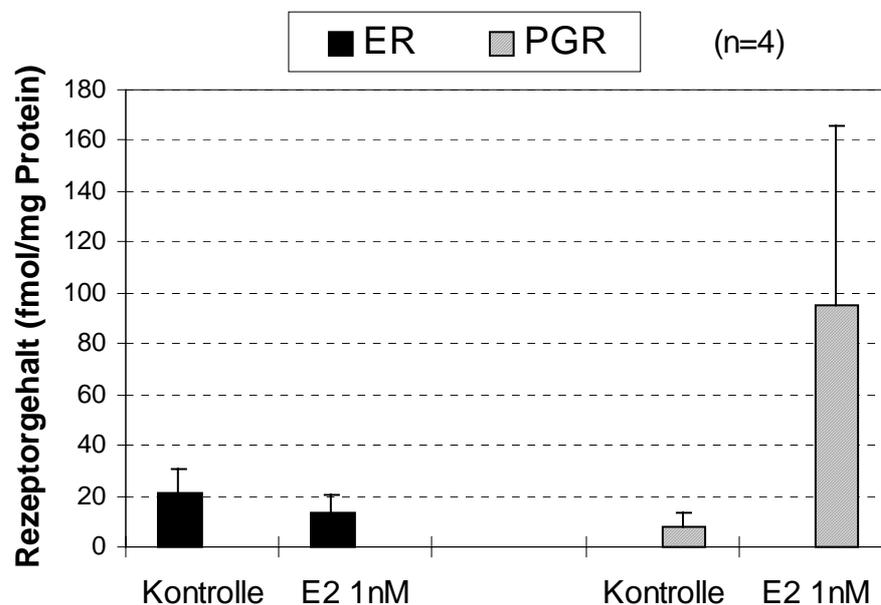


Abb. 2: Inkubation von MCF-7-Zellen über 7 Tage mit 17β -Estradiol (10^{-9} M) führt zur Induktion der Progesteronrezeptoren (PGR). Gleichzeitig wird die Zahl der Estrogenrezeptoren (ER) erniedrigt.

1.2.2 Durchführung und quantitative Auswertung des E-Screen-Assays

Mit unseren MCF-7-Zellen konnten wir in unserem Labor an der Universität Tübingen einen E-Screen-Assay erfolgreich etablieren, der einige Modifikationen und Vereinfachungen gegenüber der von Soto et al. (1992) beschriebenen Original-Methode aufweist.

Im Unterschied zur Originalmethode kommt im modifizierten Ansatz kein Humanserum zur Anwendung, sondern kommerziell erhältliches fötales Kälberserum (FCS). Der Ersatz von Humanserum durch FCS bedeutet eine Vereinfachung und Standardisierung (die Reservierung einer größeren Menge von einer bestimmten Charge ist möglich). Die Empfindlichkeit des Assays wird dadurch nicht beeinträchtigt (s. Abb. 4 und 5).

Die Kultur der MCF-7-Zellen sowie die Durchführung des Proliferations-Assays sind im Methodenteil ausführlich beschrieben. Deshalb seien die wesentlichen Schritte hier nur kurz erläutert. Das Protokoll für den modifizierten und optimierten Test ist in Abb. 3 schematisch dargestellt.

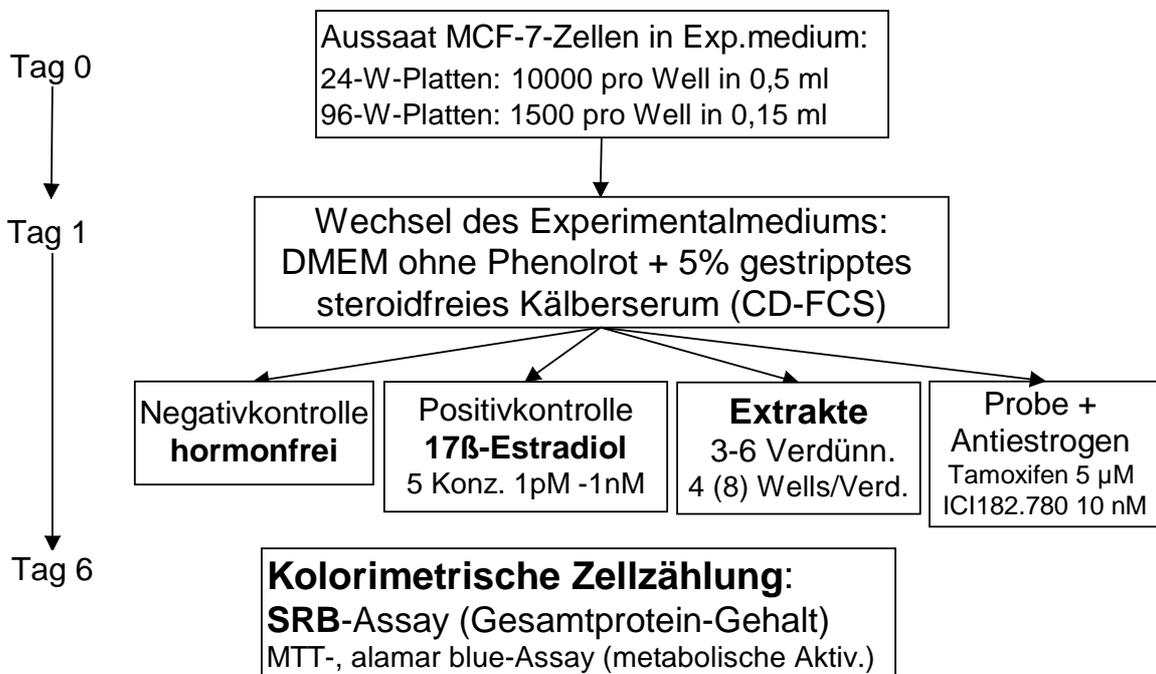


Abb. 3: Schema für die Durchführung des modifizierten E-Screen-Assays mit MCF-7-Zellen. Experimentalmedium = phenolrotfreies DME-Medium mit 5 % CD-FCS. CD-FCS ist fötales Kälberserum, welches nach Stanley et al. (1977) mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich 17 β -Estradiol zu entfernen.

Frisch trypsinierte MCF-7-Zellen werden mit steroid- und phenolrotfreiem DME-Medium (Experimentalmedium) verdünnt und in Platten mit 24 oder 96 Kulturflächen (Wells) ausgesät. Dieses Medium enthält 5 % fötales Kälberserum, welches mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurde, um alle Steroidhormone einschließlich Estradiol zu entfernen (CD-FCS).

Nach 24 Std. wird das Medium abgesaugt und durch Experimentalmedium ersetzt, welches die Testsubstanzen enthält. Vier (acht) Wells pro Assay bilden die Negativkontrolle ohne Hormone.

Die anderen Wells enthalten 17 β -Estradiol (E2) mit Endkonzentrationen zwischen 10⁻¹² M und 10⁻⁹ M als Positivkontrolle, bzw. Testsubstanzen mit Endkonzentrationen bis max. 10⁻⁴ M. Jede Konzentration einer Substanz wird pro Assay in vier (acht) Wells getestet. Die Stammlösungen der Testsubstanzen werden in Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol hergestellt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels im Medium liegt nicht über 0,1 %.

5 Tage nach Zugabe der Testsubstanzen (6. Tag) wird während der exponentiellen Proliferationsphase die Zellzahl in jedem Well bestimmt. Basisendpunkt des Tests ist die Zellzahl relativ zur hormonfreien Kontrolle (vgl. auch Abb. 4).

Als **Proliferationseffekt (PE)** wird das Verhältnis der **höchsten** Zellzahl, die mit E2 bzw. mit der Testsubstanz erreichbar ist, zu derjenigen der Negativkontrolle bezeichnet:

$$\text{PE} = \text{Zellzahl max. (Substanz)} / \text{Zellzahl (Negativkontrolle)}$$

Die estrogenen Aktivität einer Testsubstanz wird quantitativ ermittelt durch die Bestimmung:

a) der **relativen Wirkungsstärke**: der **relative Proliferationseffekt (RPE)**

Der **RPE** vergleicht die maximale durch E2 induzierbare Proliferation mit der maximalen durch die Testsubstanz induzierbare. So werden vollständiger Agonist (RPE = 100 %) von partiellen Agonisten (RPE < 100 %) unterschieden (vgl. Abb. 4: RPE = 103 % für Bisphenol-A).

$$\text{RPE} = [\text{PE-1 (Testsubstanz)} / \text{PE-1 (E2)}] * 100 \%$$

b) der **relativen Potenz**: der **Estradiol-Äquivalenzfaktor (EEF)**

Der Estradiol-Äquivalenzfaktor (EEF) gibt die estrogenen Potenz einer Testsubstanz relativ zu 17 β -Estradiol an. Der EEF ist der Quotient aus den halbmaximal wirksamen Konzentrationen (EC₅₀) von 17 β -Estradiol und der Testsubstanz.

$$\text{EEF} = \text{EC}_{50} (\text{E2}) / \text{EC}_{50} (\text{Substanz})$$

Für E2 ergibt sich somit definitionsgemäß ein EEF von 1. Dieses Vorgehen entspricht dem Konzept der Toxizitätsäquivalenzfaktoren (TEF) bei den Dioxinen und dioxinähnlich wirkenden PCB.

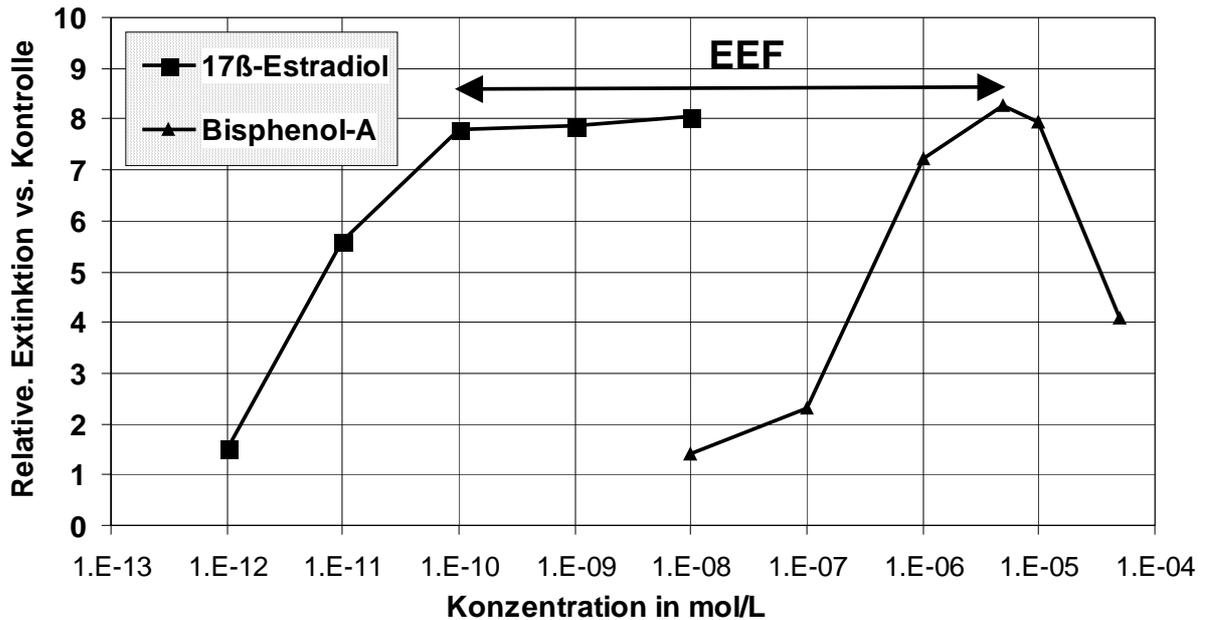


Abb. 4: Proliferation von menschlichen MCF-7 Brustkrebszellen 5 Tage nach Zugabe von Bisphenol-A bzw. 17β-Estradiol im Vergleich zur Negativkontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte aus einem Experiment mit 4 Wells pro Konzentration (SRB-Assay).

Für die Durchführung der Probit-Regression und Berechnung der EC_{50} -Werte wurde ein EXCEL5-Zusatzprogramm verwendet (Herr Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg).

Um einen besseren Vergleich mit den Literaturdaten zu ermöglichen, haben wir zunächst die von Soto et al. (1992) eingeführte Bestimmung des EEF über die EC_{100} -Werte übernommen. Der EEF ist hierbei der Quotient aus den minimal erforderlichen Konzentrationen (EC_{100}) von **E2** und der **Testsubstanz**, die eine maximal erreichbare Proliferation auslösen:

$$EEF = \text{Konz [E2]}_{\min} / \text{Konz [Substanz]}_{\min}$$

(vgl. Abb. 4, Bisphenol-A: $\text{Konz [E2]} / \text{Konz [BP-A]} = 1\text{E-}10 \text{ M} / 5\text{E-}6 \text{ M} = 2\text{E-}5$)

Aus den Abb. 4 und 5 ist zu entnehmen, daß bereits eine 17β-Estradiol-Konzentration von 1 pmol/L (0,27 ng/L) zu einer signifikanten Induktion der Zellproliferation führt. Diese Konzentration liegt noch etwa zwei bis drei Größenordnungen unter den physiologischen Serumspiegeln der reproduktionsfähigen Frau. Die Abb. 4 und 5 zeigen, daß die maximale Zellproliferation im von uns modifizierten E-Screen-Assay schon bei E2-Konzentrationen von 0,1 nmol/L erreicht wird. Somit wird eine ähnlich gute Empfindlichkeit erreicht wie mit der von Soto et al. (1992) beschriebenen Originalmethode. Es gibt derzeit kein empfindlicheres *in vitro*-System zum Nachweis rezeptorvermittelter estrogener Wirkungen.

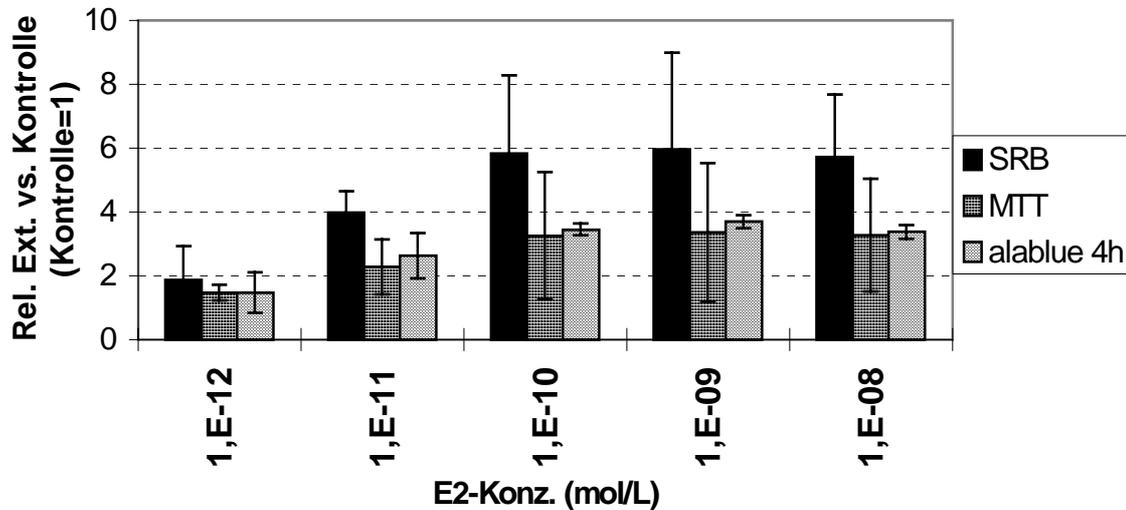


Abb. 5: Vergleich zwischen SRB-, MTT- und Alamar-Blue-Assay bei Testung von verschiedenen Konzentrationen von 17β -Estradiol im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen (n=3).

Als Alternative zur direkten Zellzählung werden Endpunkte gewählt, die einfach und schnell **kolorimetrisch** zu bestimmen sind und innerhalb eines bestimmten Bereiches direkt proportional zur Zellzahl sind. Wie in Abb. 2 beschrieben, kann die Zellzahl indirekt kolorimetrisch mit dem MTT-, SRB- oder dem Alamar-Blue-Assay bestimmt werden. Abb. 5 zeigt den Vergleich zwischen diesen drei Methoden. Hierbei wurde der Proliferationseffekt (PE) von 17β -Estradiol in den MCF-7-Zellen gemessen. Der SRB-Assay ist die am besten geeignete Methode der Proliferationsmessung, da beim SRB-Assay im Vergleich zum MTT- und Alamar-Blue-Assay bei ähnlichem Verlauf der Dosis-Wirkungs-Kurve höhere PE-Werte erzielt werden. Hohe PE-Werte sind für die Erfassung und Quantifizierung der estrogenen Wirkung von schwachen partiellen Agonisten wichtig, da bei einem niedrigen PE der Positivkontrolle der proliferative Effekt eines schwachen partiellen Agonisten nur noch unwesentlich über der Negativkontrolle liegen kann. Dadurch wird es unmöglich, schwache estrogenen Wirkungen zu erkennen.

Abb. 6 zeigt, daß die gemessene Extinktion sowohl im SRB- als auch im MTT-Assay über einen großen Bereich linear zur Zellzahl ist. Die Regressionsgeraden verlaufen annähernd durch den Ursprung. In 1. Näherung kann deshalb die relative Zellzahl (bezogen auf die Negativkontrolle) durch die relative Extinktion bei 550 nm (Referenzwellenlänge: 630 nm) ausgedrückt werden. Durch den negativen Wert des Y-Abschnittes ist die relative Extinktion etwas niedriger als die relative Zellzahl oder relative Zellproliferation. Für die Berechnung von RPE und EEF ist dies völlig belanglos, da es sich um relative Größen handelt.

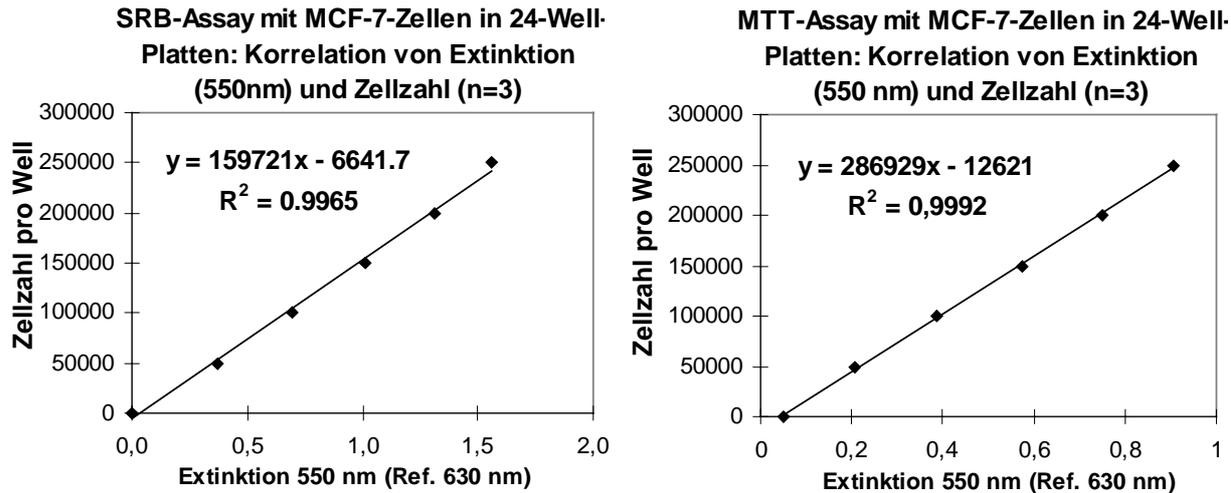


Abb. 6: Korrelation der Zahl an MCF-7-Zellen mit der Extinktion bei 550 nm (Referenz: 630 nm) von SRB- und MTT-Assay. Der Farbstoff wurde aus den in 24-Well-Platten angefärbten Zellen mit je 500 μ l 10 mM Trispuffer (SRB-Assay) bzw. 500 μ l DMSO (MTT-Assay) pro Well gelöst und je dreifach (\times 100 μ l) in 96-Well-Platten am Mikroplatten-Photometer gemessen.

Im Unterschied zur Methode von Soto et al. (1992, 1995) führen wir eine einfache Erweiterung des E-Screen-Assays durch, welche eine erhebliche Erhöhung der Spezifität bewirkt. Von jeder Substanz bzw. Umweltprobe, die eine Proliferation der MCF-7-Zellen auslöst, muß eine wirksame Konzentration zusammen mit einem Estrogenrezeptor-Antagonisten getestet werden (Ko-Inkubation). Wird durch gleichzeitige Gabe von 5 μ mol/L Tamoxifen oder 5 nM ICI 182.780 die induzierte Proliferation vollständig inhibiert, d.h. etwa auf die Zellzahl der Negativkontrolle, kann man tatsächlich davon ausgehen, daß es sich bei der beobachteten Proliferationswirkung um einen ER-vermittelten Effekt handelt.

Diese einfache Erweiterung des E-Screen-Assays liefert einen zusätzlichen relevanten Beweis, daß die beobachtete Zellproliferation durch Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor ausgelöst wird. Die Kobehandlung mit einem Antiestrogen sollte deshalb zum integralen, unverzichtbaren Bestandteil jedes Screening-Systems auf estrogene Wirkung gehören. Bei den bisher in der Literatur beschriebenen und angewandten Testverfahren wird dies in der Regel nicht durchgeführt.

Beispiele für die Hemmung der proliferierenden Wirkung verschiedener phenolischer Substanzen durch Koinkubation mit 5 μ M Tamoxifen werden in Kap. VI 2 gegeben.

1.3 Validierung

1.3.1 Vergleich mit Literaturdaten

Im Unterschied zu der von Soto et al. 1992 beschriebenen Originalmethode wird im hier modifizierten Ansatz kein Humanserum, sondern kommerziell erhältliches fetales Kälberserum (FCS)

verwendet. Diese Vereinfachung beeinträchtigt nicht die Empfindlichkeit des Assays, sondern trägt zur Standardisierung bei. Die Abb. 7 und 8 zeigen, daß das in unserem Labor etablierte Testverfahren bei der Testung von bekannten Xenoestrogenen zu Ergebnissen führt, die gut mit Literaturdaten übereinstimmen, obwohl Reinheit und Herkunft der Testsubstanzen nicht identisch waren. Verglichen wurden jeweils der relative Proliferationseffekt (RPE) und die relative proliferative Potenz (EEF), für deren Berechnung der Quotient der EC_{100} -Werte herangezogen wurden. Die detaillierten Ergebnisse zu den getesteten Einzelsubstanzen sind in Kap. VI.2 zu finden.

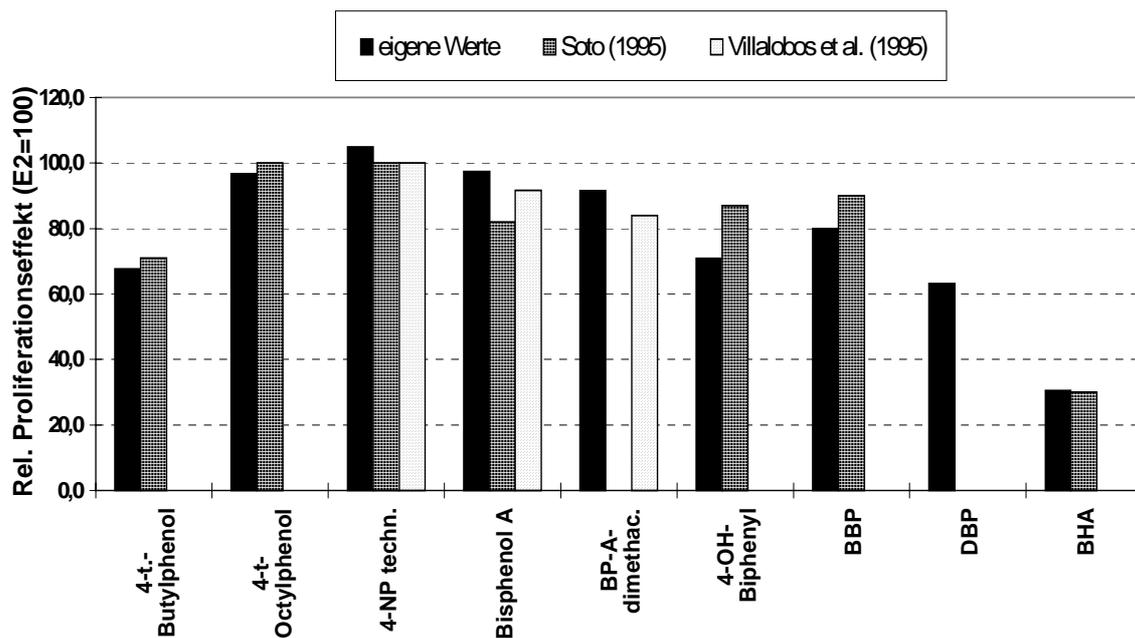


Abb. 7: Vergleich der aus den E-Screen-Experimenten ermittelten RPE-Werte für bekannte Xenoestrogene mit den Ergebnissen anderer Labors.

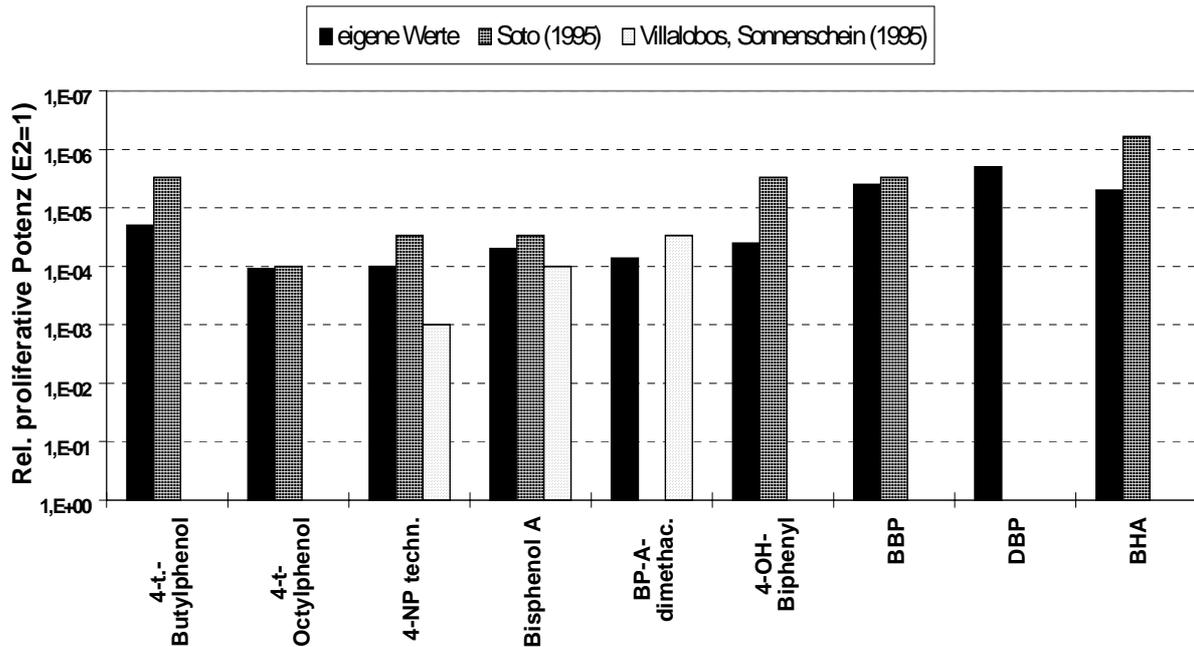


Abb. 8: Vergleich der aus den E-Screen-Experimenten ermittelten relativen estrogenen Potenz (EEF) für bekannte Xenoestrogene mit den Ergebnissen anderer Labors. Für die Berechnung der EEF wurden die EC_{100} -Werte herangezogen.

Der Vergleich der eigenen Ergebnisse mit denen aus anderen Labors zeigt, daß der von uns etablierte Proliferationstest mit MCF-7-Zellen zuverlässige Daten bezüglich der estrogenen Wirksamkeit der zu testenden Substanz liefert. Auch ohne standardisierte Versuchsbedingungen führt der E-Screen-Assay in verschiedenen Labors unterschiedlicher Länder zu gut vergleichbaren Ergebnissen.

1.3.2 Test von Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren

Um die Spezifität des E-Screen-Assays zu überprüfen, wurden verschiedene nicht-estrogene Steroidhormone und Wachstumsfaktoren in den MCF-7-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 4 zusammengefaßt.

Progesteron war bis zur maximal getesteten Konzentration von $1 \mu\text{M}$ nicht wirksam.

Fötales Kälberserum enthält **Hydrocortison** (Lindl & Bauer 1994), welches durch die Behandlung mit Aktivkohle/Dextran entfernt wird. Im E-Screen-Assay wirkten $0,1 \mu\text{M}$ Hydrocortison in den MCF-7-Zellen leicht proliferierend (s. Abb. 9); der RPE lag bei $15,6 \pm 13,2 \%$. Die Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ liegt zwei bis drei Größenordnungen höher als die physiologischen Plasmakonzentrationen. Für diesen geringen proliferativen Effekt sind wahrscheinlich nicht ER-vermittelte Mechanismen verantwortlich.

Auch **Insulin** ist im Kälberserum nachweisbar (Lindl & Bauer 1994). Im E-Screen-Assay bewirkten $14 \mu\text{M}$ einen RPE von 56% . Diese Konzentration liegt um mehrere Größenordnungen höher als die in Kälberseren auftretenden Konzentrationen. Insulin ist kein Xenoestrogen,

sondern ein Hormon, welches aufgrund seiner wachstumsfördernden Wirkung als Serumersatz für die Kultivierung von permanent wachsenden Zelllinien und Primärkulturen verwendet werden kann (Lindl & Bauer 1994).

Tab. 4: Ergebnisse der Testung von Steroidhormonen und Wachstumsfaktoren im E-Screen.

Substanz	n (m)*	RPE ² (E2=100%)	EC ₁₀₀ ² (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
Progesteron	2 (0)	n.n.	n.n. (1E-06) ³	n.n.		n.n.
Hydrocortison	4 (0)	15,6 (13,2)	3E-07 ³	n.n.		n.n.
Testosteron	4 (1)	72,6 (5,4)	6E-06	2,0E-08	1,2E-11	6,1E-03
5 α -DHT	3 (0)	75,3 (7,7)	4E-06	5,3E-08	2,6E-11	4,9E-04
5 α -DHT (<i>EFM-19</i>)	3 (0)	65,4 (7,9)	7E-06	2,3E-07	2,6E-11	1,1E-04
Insulin (vom Rind)	3 (0)	55,9 (23,6)	1,4E-05	2,3E-07	6,1E-12	2,7E-05

* n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

² Mittelwert (Standardabweichung)

³ Höchste getestete Konzentration

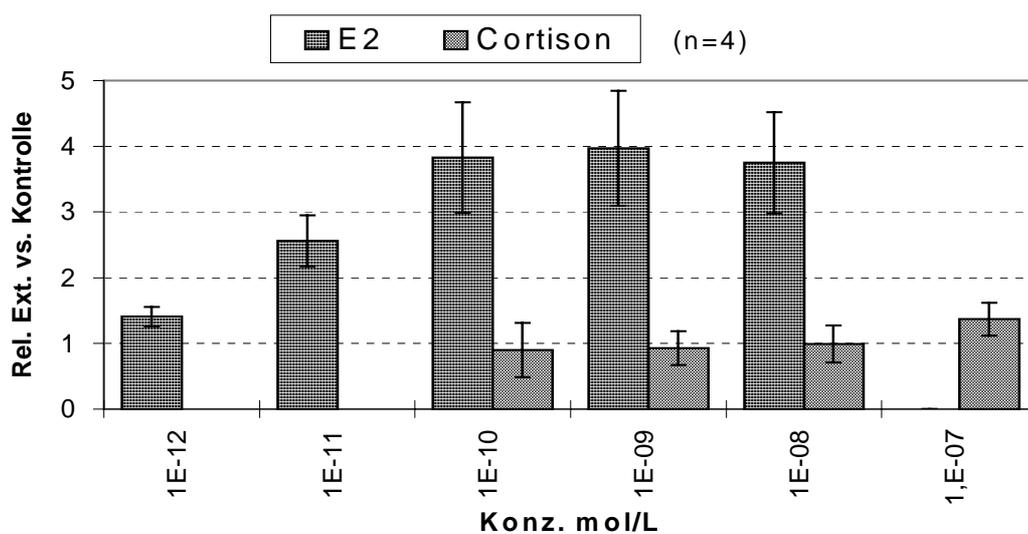


Abb. 9: Dosis-Wirkungs-Kurve für Hydrocortison im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen.

Testosteron ist ein schlecht wasserlösliches Androgen, welches im Blut an Plasmaproteine gebunden ist. Erst in den Zielzellen wird Testosteron in die wirksame Form, das 5α -Dihydrotestosteron (5α -DHT) umgewandelt. Im weiblichen wie im männlichen zentralen Nervensystem gibt es Cytochrom-P450-abhängige Enzyme (Aromatasen), die Testosteron, nicht jedoch 5α -DHT zu Estron oxidieren können, welches auf enzymatischen Weg weiter zu 17β -Estradiol reduziert wird (McEwen et al. 1982). Auch MCF-7-Zellen besitzen die P450-abhängige Aromatase (Killinger et al. 1987; Miller et al. 1987). Nach Umwandlung zum Estron kann Testosteron im E-Screen-Assay zur Proliferation der MCF-7-Zellen führen.

Abb. 10 zeigt, daß die proliferative Wirkung von $1\ \mu\text{M}$ Testosteron im E-Screen-Assay durch die Ko-Inkubation mit $5\ \mu\text{M}$ des Aromataseinhibitors 4-Androsten-4-ol-3,17-dien weitgehend unterdrückt wird. Die Testung von drei verschiedenen Konzentrationen 4-Androsten-4-ol-3,17-dien ($5 \cdot 10^{-6}$, 10^{-6} , 10^{-7} M) zeigte eine Dosisabhängigkeit des inhibierenden Effektes.

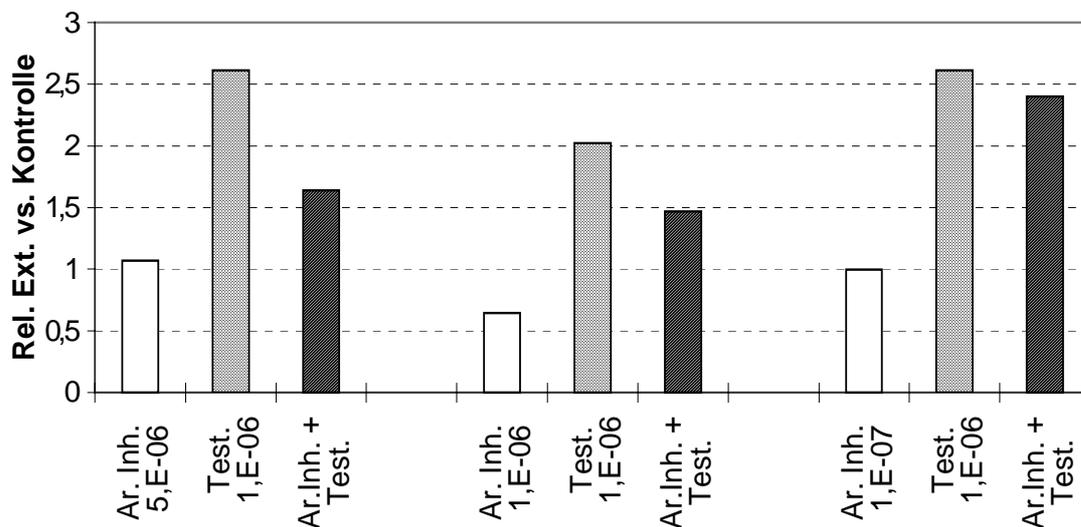
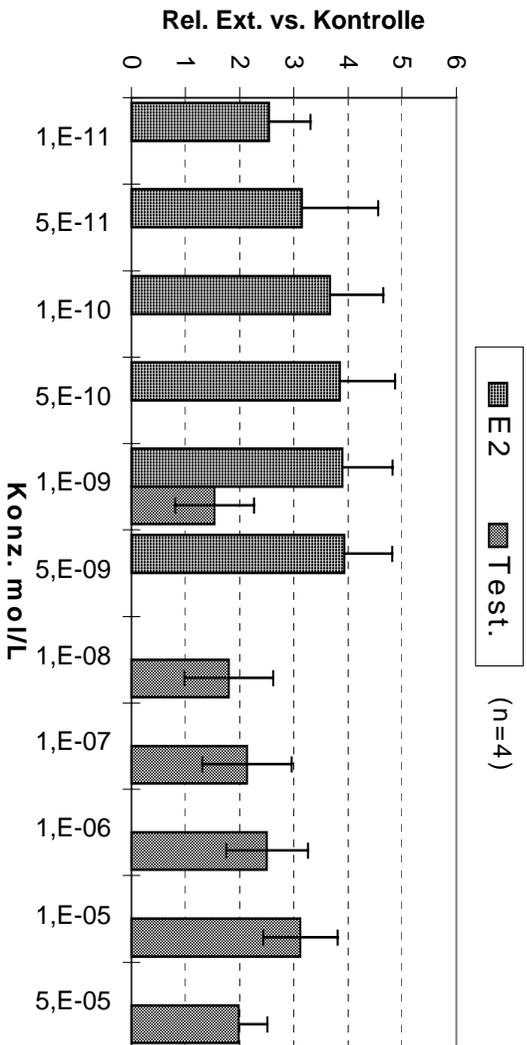


Abb. 10: $5\ \mu\text{M}$ des Aromatase-Inhibitors 4-Androsten-4-ol-3,17-dien (Ar.Inh.) inhibieren weitgehend die proliferative Wirkung von 10^{-6} M Testosteron (Test.) in MCF-7-Zellen, während $0,1\ \mu\text{M}$ nicht wirksam sind (Mittelwerte aus einem Experiment im Vierfachansatz).

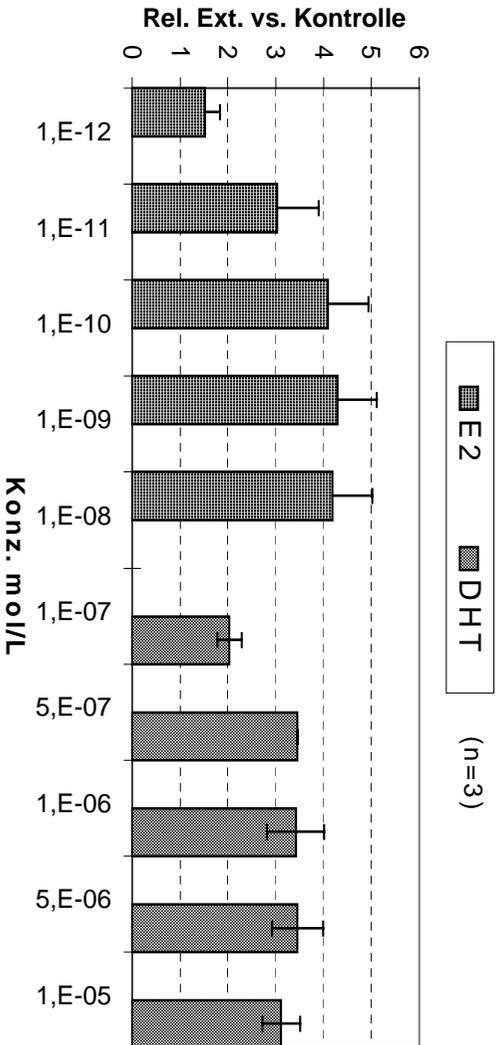
Aus Tab. 4 und Abb. 11 ist ersichtlich, daß auch **5α -Dihydrotestosteron** (5α -DHT) in den ER-positiven Brustkrebszelllinien proliferierend wirkt. Der berechnete RPE betrug für 5α -DHT $75,3 \pm 7,7\%$, und entspricht demjenigen, der mit Testosteron in den MCF-7-Zellen gemessen wurde ($72,6 \pm 5,4\%$). Im E-Screen-Assay mit EFM-19-Zellen (Stock 2) lag der RPE für 5α -DHT etwas niedriger ($65,4 \pm 7,9\%$).

Die estrogenische Potenz (EEF) war für 5α -DHT im Vergleich zu Testosteron um eine halbe Zehnerpotenz kleiner. Dies könnte ein Hinweis dafür sein, daß 5α -DHT schwerer aromatisiert wird als Testosteron.

MCF-7



MCF-7



EFM-19

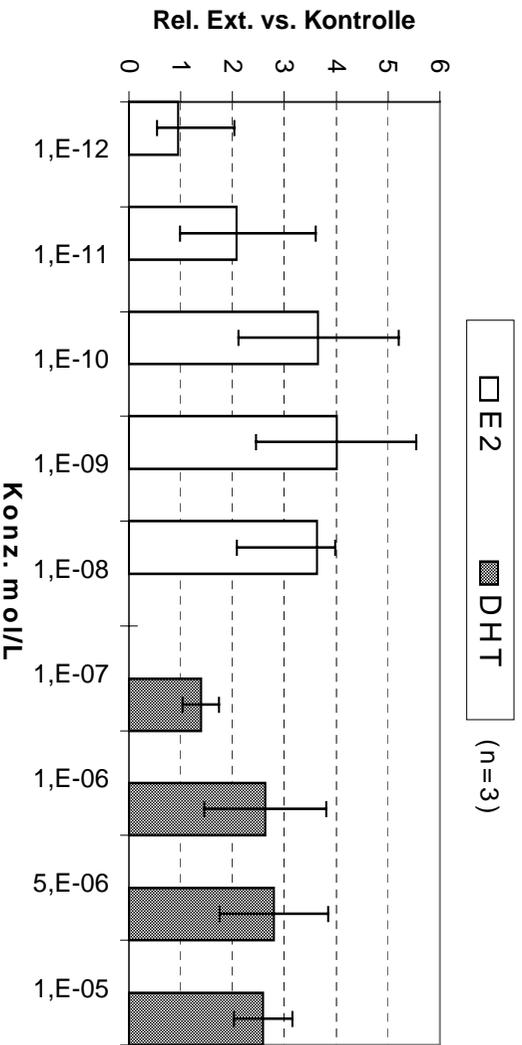


Abb. 11: Dosis-Wirkungs-Kurven für Testosteron (Test.) und 5 α -DHT in MCF-7- und EFM-19-Zellen.

1.4 Miniaturisierung, Vereinfachung und Optimierung

Zur Vereinfachung des E-Screen-Assays wurden zusätzlich zu den von Soto et al. (1995) vorgeschlagenen 24-Well-Kulturplatten auch Zellkulturplatten mit je 96 Kavitäten für die Testung der Substanzen eingesetzt. Durch diese Miniaturisierung des E-Screen-Assays werden Material und Zeit in erheblichem Umfang gespart. Sensitivität und Spezifität werden hierbei nicht wesentlich beeinflusst.

Einen Vergleich zwischen E-Screen-Assays mit 96- und 24-Well-Platten zeigt die Abb. 12. Die Abb. zeigt Dosis-Wirkungs-Kurven für 17β -Estradiol mit einem Maximum der Proliferation bei 10^{-9} M. Die MCF-7-Zellen zeigten in den 96-Well-Platten sogar etwas höhere Proliferationseffekte als in den 24-Well-Platten.

Für den E-Screen-Assay sind also die Multiwell-Zellkulturplatten ebenso gut geeignet wie die von Soto et al. ursprünglich verwendeten 24-Well-Platten.

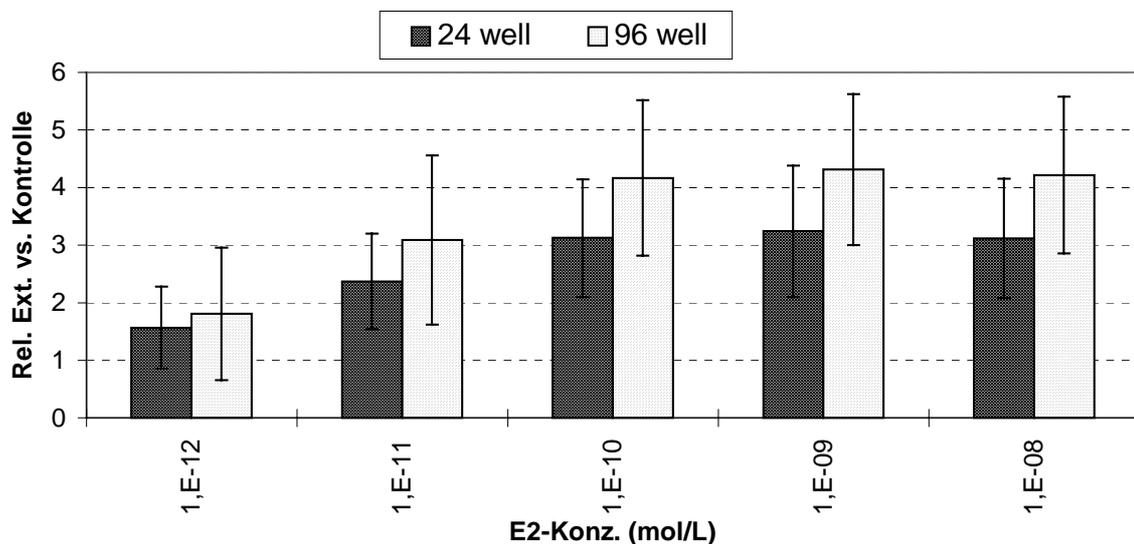


Abb. 12: E-Screen-Assay mit 17β -Estradiol mit MCF-7-Zellen: Vergleich zwischen 24- und 96-Well-Platten (n=7).

Viele der im E-Screen mit MCF-7-Zellen untersuchten Einzelsubstanzen wurden sowohl in 24-Well-Platten als auch in 96-Well-Platten getestet. Dabei war Benzophenon die einzige Substanz, bei welcher die Höhe des berechneten RPE-Wertes (relative estrogene Wirkungsstärke) von den verwendeten Zellkulturplatten abhängig war.

Benzophenon wurde in sechs unabhängigen Tests mit 24-Well-Platten und in vier Experimenten mit 96-Well-Platten getestet. Am 14.03.97 und am 21.03.97 wurden jeweils zwei E-Screen-Assays, in denen Benzophenon eingesetzt wurde, gestartet. Einer der Tests wurde in 24-, der andere in 96-Well-Platten durchgeführt. Passagenzahl der eingesetzten MCF-7-Zellen und Kulturbedingungen waren somit identisch.

Bei Verwendung der 24-Well-Platten betrug der RPE $75,2 \pm 15,3$ %, während bei Benutzung der 96-Multiwell-Kulturplatten der berechnete RPE nur bei $42,3 \pm 9,4$ % lag (Abb. 13). Die EC_{100} und damit der EEF wurden hingegen nicht durch die Kulturplatten beeinflusst. Die EC_{100} lag in beiden Fällen bei jeweils 10^{-4} mol/L, der EEF betrug $6,1E-07$ bzw. $6,0E-07$. Möglicherweise tritt bei hohen Konzentrationen in den 96-Well-Platten aufgrund des größeren Oberflächen/Volumenverhältnisses in den Wells eine nennenswerte adsorptive Wechselwirkung des Benzophenons an die Kunststoffwände auf, sodaß seine Bioverfügbarkeit sinkt.

Jobling et al. (1995) fanden, daß Benzophenon radioaktiv markiertes 17β -Estradiol vom isolierten ER der Regenbogenforelle nahezu vollständig verdrängen kann. Zusammen mit unseren Ergebnissen zeigt dies, daß Benzophenon ein Xenoestrogen ist.

Benzophenon ist ein Zwischenprodukt bei der Synthese von Antihistaminika, Hypnotika und anderen Pharmazeutika. Es wird als Geruchsfixateur für Parfüme und Seifen eingesetzt. Hydroxylierte und methoxylierte Benzophenon-Derivate sind UV-Absorber, die als Licht- und Sonnenschutzmittel in Cremes und Salben Verwendung finden.

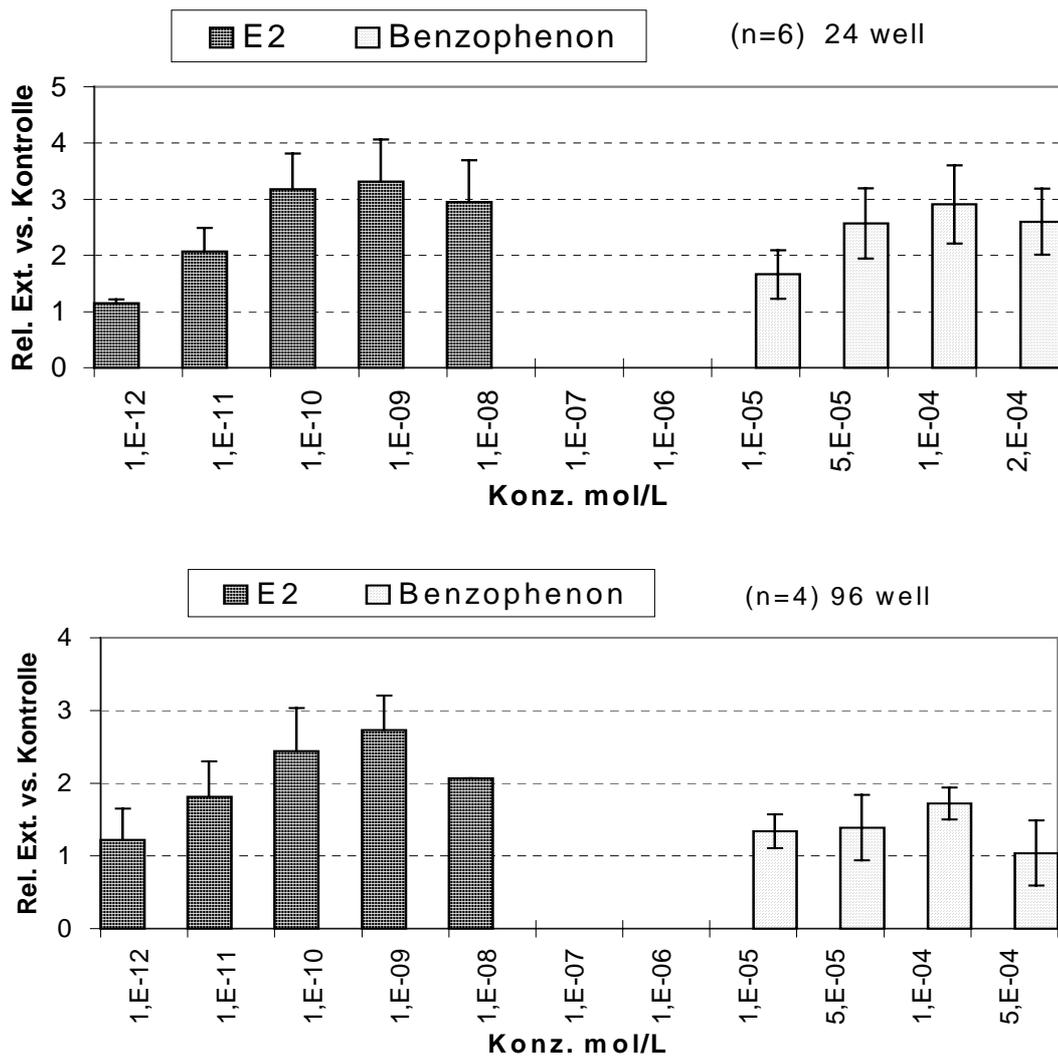


Abb. 13: Dosis-Wirkungs-Kurven für 17β -Estradiol und Benzophenon in MCF-7-Zellen.

1.5 Einfluß möglicher Störfaktoren

1.5.1 Temperatur des Experimentalmediums

Bei der Bestimmung des ER und Progesteronrezeptors (PGR) in Geweben bedient man sich der Kohle-Adsorptionsmethode (DCC: dextrane coated charcoal method). Da der ER und der PGR temperaturlabile Proteine sind (Chone et al. 1991), muß die Kühlkette nach Entnahme des Gewebes bis hin zur biochemischen Analyse aufrechterhalten bleiben (0 - 4°C). Brown und Sharp (1990) haben anhand des Plasmids HEO mit immunocytochemischen Methoden nachgewiesen, daß durch Erhöhung der Reaktionstemperatur von 4 °C auf 20, 30 bzw 37 °C nach 20 Minuten die Bildung des ERE-ER-Komplexes von der Anwesenheit des E2 (17β-Estradiol) abhängig wird. Bei niederen Temperaturen bindet der ER auch in Abwesenheit von E2 spontan an sein ERE, so daß E2 die Bildung des ERE-ER Komplexes nicht beeinflusst. Bei 37 °C gibt es mit E2 stärkere Signale als bei der hormonfreien Kontrolle.

Um zu untersuchen, ob unterschiedliche Temperaturen das Ergebnis des E-Screen-Assays beeinflussen können, wurden den in 24-Well-Platten nach 24 Stunden angehafteten MCF-7-Zellen in zwei Parallelansätzen Experimentalmedium mit E2-Verdünnungen unterschiedlicher Temperatur zugegeben. In eine der beiden Zellkulturplatten wurden die Verdünnungen vor Zugabe zu den Zellen auf 4°C gekühlt. Anschließend wurde die Kulturplatte 30 min auf Eis gelegt und gleich danach in den Brutschrank überführt. Beim zweiten Ansatz wurden die gleichen E2-Verdünnungen vor deren Zugabe zu den Zellen auf 37 °C im Wasserbad erwärmt. Nach dem Pipettieren wurde die Kulturplatte 30 min im 37 °C Wasserbad inkubiert, und anschließend in den Brutschrank überführt.

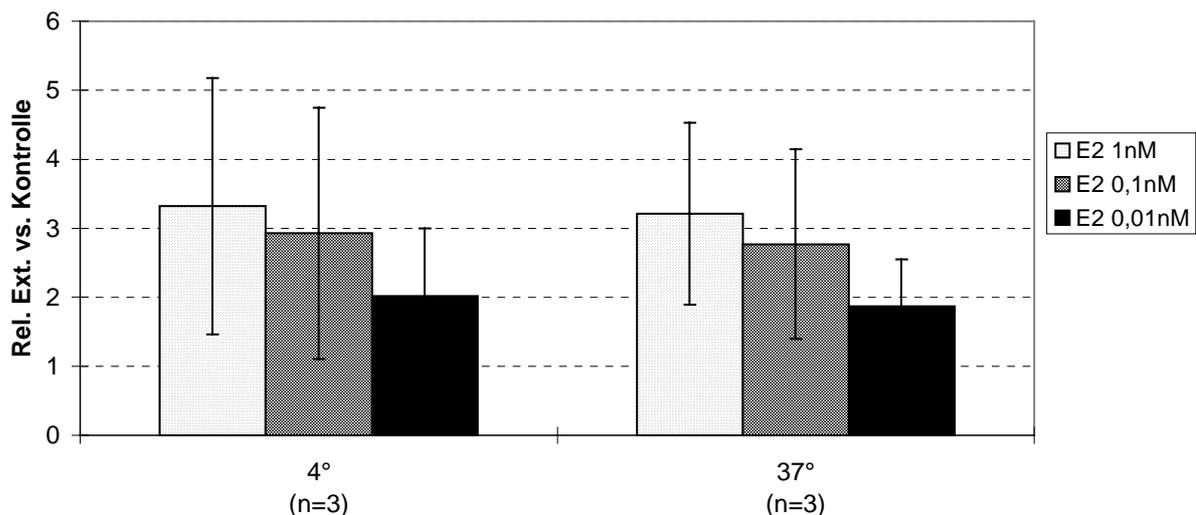


Abb. 14: Einfluß der Temperatur des Experimentalmediums auf das Ergebnis des E-Screen Assays mit MCF-7-Zellen.

Abb.14 zeigt, daß die unterschiedlichen Temperaturen des Experimentalmediums das Ergebnis des E-Screen-Assays nicht beeinflussen. Die nahezu identischen Ergebnisse zeigen, daß die

Transduktionskette (Bindung von E2 an den ER bis zur proliferierenden Wirkung) durch die zu Beginn des E-Screen-Assays vorgenommenen Temperaturunterschiede nicht beeinflusst wird.

Bei allen durchgeführten E-Screen-Experimenten wurden die Verdünnungen der getesteten Einzelsubstanzen und Umweltproben vor Zugabe zu den Zellen auf Raumtemperatur erwärmt.

1.5.2 Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums

Bei der Hitzeinaktivierung wird das Serum (0,5 Liter-Flasche) 30 Minuten auf 56 °C erwärmt. Dabei werden störende Einflüsse verschiedenster Art aus dem Serum beseitigt (Zerstörung des Komplement). Die Vermeidung störender Faktoren kann jedoch mit der Abnahme wachstumsfördernder Eigenschaften einhergehen. Dies kann dazu führen, daß die Seren das Ergebnis des E-Screen-Assays negativ beeinflussen (niedere PE-Werte).

Die in Abb. 15 dargestellten Ergebnisse zeigen, welche Auswirkungen die Hitzeinaktivierung des fötalen Kälberserums haben kann. Zusätzlich wurde untersucht, ob vor dem Aussäen eine zusätzliche mechanische Vereinzelnung der Zellen (s. Abschnitt V 2.1) nach der Trypsinbehandlung das Ergebnis des E-Screen-Assays beeinflussen kann. Abb. 15 zeigt das Ergebnis aus je vier E-Screen-Assays, in denen das Serum Gibco Nr. 10081 verwendet wurde. Als Testsubstanz wurde 0,1 nM 17 β -Estradiol eingesetzt. Außerdem wurde noch ein Serumersatz (BMS; Basal Medium Supplement, Biochrom Nr. S5173) getestet. BMS und Serum wurden zeitgleich nach der Methode von Stanley et al. (1977) gestrippt. Ein Teil des Serums wurde vorher hitzeinaktiviert (h.) bzw. nicht hitzeinaktiviert (n.h.).

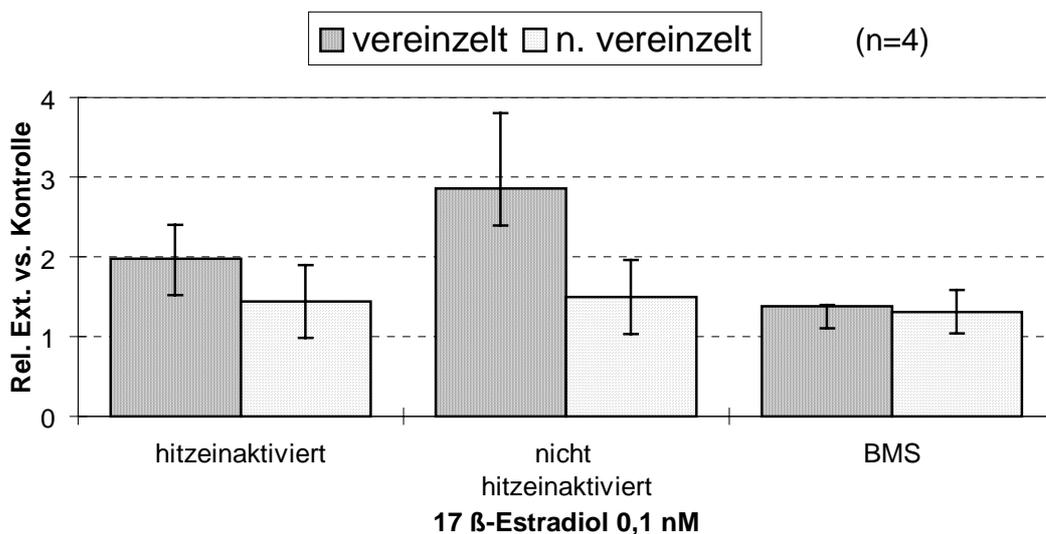


Abb. 15: Proliferationseffekt von 10^{-10} M 17 β -Estradiol in MCF-7-Zellen. Vergleich zwischen hitzeinaktiviertem, nicht hitzeinaktiviertem Serum, und einem Serumersatz (BMS).

Ohne zusätzliche mechanische Vereinzelnung vor dem Aussäen zeigten die verwendeten MCF-7-Zellen mit 0,1 nM 17 β -Estradiol einen niedrigen Proliferationseffekt (etwa 1,5). Ein Unterschied

zwischen hitzeinaktiviertem und nicht hitzeinaktiviertem Serum war in diesem Fall nicht zu sehen.

Es ist jedoch deutlich zu erkennen, daß bei vollständiger Vereinzelung der Zellen vor dem Aussäen das nicht hitzeinaktivierte Serum zu deutlich besseren Ergebnissen führt. Eine Hitzeinaktivierung, welche zur Standardisierung der Seren beitragen soll, hatte also hier einen negativen Effekt.

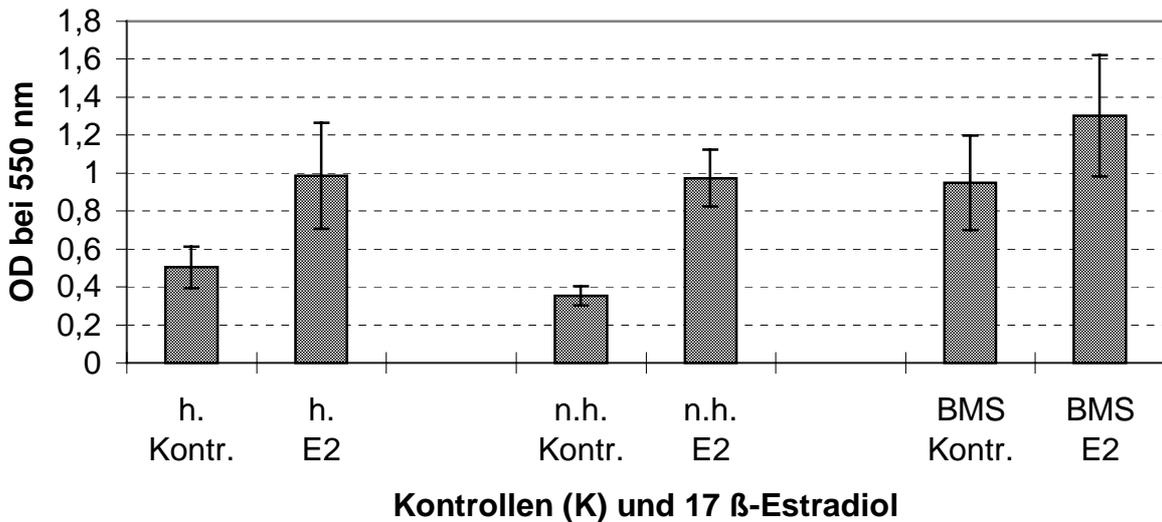


Abb. 16: Auswirkung der Hitzeinaktivierung der Seren auf die Proliferation der MCF-7-Zellen. Es wurden das Serum Gibco Nr. 10081 und ein Serumersatz (BMS) getestet. Alle Zellen wurden vor dem Aussäen vereinzel. Es wurden nur die Negativkontrolle (Kontr.) und 0,1 nM E2 gemessen (n=4).

In Abb. 16 sind für die Experimente mit vereinzelt MCF-7-Zellen aus Abb. 15 auf der Y-Achse die Mittelwerte der gemessenen Extinktionen bei 550 nm (optische Dichte, OD) aufgetragen.

Die Hitzeinaktivierung könnte ein Protein, welches die estrogenabhängige Proliferation der Negativkontrolle inhibiert, zerstören. Möglicherweise ist im Kälberserum ein zum Estrocolyone-I im humanen Serum (Soto et al. 1992b) analoges Protein enthalten, welches weniger hitzestabil ist. Die gemessenen Extinktionswerte der Negativkontrolle waren bei Verwendung von hitzeinaktiviertem Serum höher als bei nicht hitzeinaktiviertem. Die gemessene optische Dichte der Positivkontrolle lag jeweils bei etwa 1. Durch die stärker proliferierende Negativkontrolle wurden also bei Verwendung von hitzeinaktiviertem Serum für die Testsubstanz (E2) geringere Proliferationseffekte gemessen. Bei Verwendung des Serumersatz (BMS) proliferierte die Negativkontrolle sehr stark. Der Unterschied zur Positivkontrolle war nur noch sehr gering.

1.5.3 Strippen des fötalen Kälberserums

Zwei fötale Kälberseren (Gibco Nr. 10081 und Biochrom Nr. S0115) wurden am 14.01.1997 zeitgleich nach zwei unterschiedlichen Methoden mit Aktivkohle-Dextran behandelt („Strippen“) und anschließend einmal im E-Screen-Assay eingesetzt. Die Seren wurden vor dem Strippen nicht hitzeinaktiviert. Abb. 17 zeigt, daß die von Stanley et al. (1997) vorgeschlagene Methode zu besseren Ergebnissen führt. Mittelwerte und Standardabweichungen entsprechen einem Einzelexperiment mit 24-Well-Platten (Vierfachansatz).

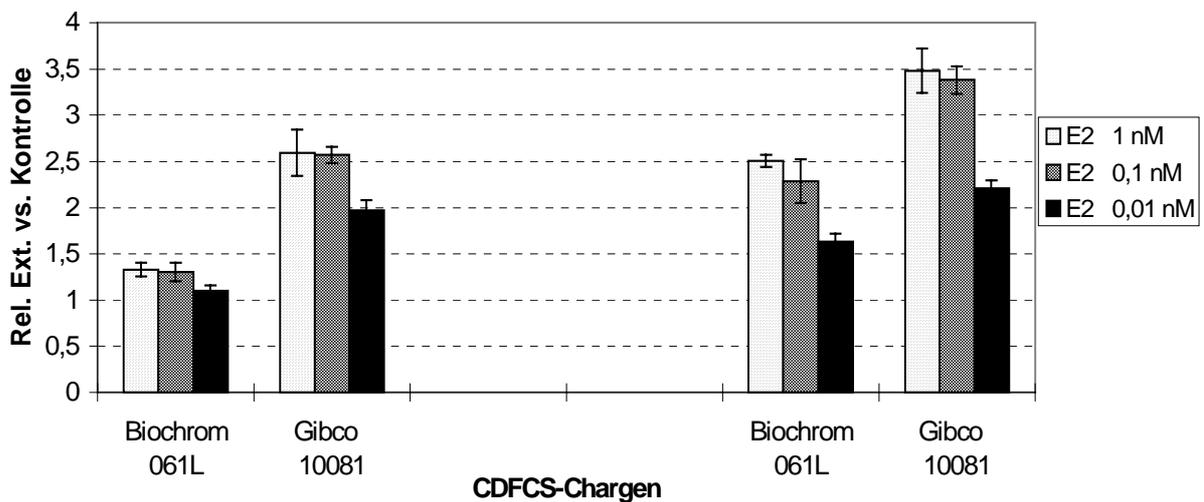


Abb. 17: Vergleich der Proliferationswirkung von E2 in MCF-7-Zellen bei Verwendung von zwei fötalen Kälberseren, welche nach verschiedenen Methoden mit Aktivkohle-Dextran gestrippt wurden. Links zwei Seren, die nach der Methode von Soto et al. (1992) gestrippt wurden. Rechts die gleichen Seren, die zeitgleich nach der Methode von Stanley et al. (1997) gestrippt wurden.

Möglicherweise ist das Erwärmen des Serums auf 37 °C, welches die Strippmethode nach Soto et al. beinhaltet, der Grund dafür, daß dieses CD-FCS für den E-Screen-Assay weniger gut geeignet sein kann. Eine zeitweilige unabsichtliche Erwärmung des Serums auf über 37 °C könnte wichtige wachstumsfördernde Proteine zerstören. Bei der nach Stanley et al. vorgeschlagenen Strippmethode wird das Serum während des Strippens immer gekühlt (0 - 4 °C), dadurch also schonender behandelt.

1.6 Etablierung des E-Screen-Assay mit EFM-Zellen

Der Nachweis der proliferierenden Wirkung einer Testsubstanz in einer zweiten ER-positiven humanen Zelllinie erhöht die Spezifität des Nachweises einer estrogenen Wirkung.

Die estrogensensitive, adhären wachsende Zelllinie EFM-19 stammt aus dem Brusttumor einer 50-jährigen Frau (Simon et al. 1984). Im Gegensatz zu MCF-7- wurden EFM-19-Zellen bisher nur selten zu Forschungszwecken verwendet. Das Wachstum der EFM-19-Zellen ist wesentlich langsamer als das der MCF-7-Zellen. Der ER-Gehalt liegt mit 7 fmol/mg Protein (Hackenberg et

al. 1991 und eigene Messungen) niedriger als in MCF-7-Zellen, die PGR-Gehalte im steroidfreien Medium sind ähnlich.

Wir arbeiten mit zwei verschiedenen Stöcken von EFM-19-Zellen. Stock 1 wurde bei Passage 90 von Dr. H. Bartsch, Universitäts-Frauenklinik Tübingen, erhalten. Die Zellen wachsen wie MCF-7-Zellen in DME-Medium, aber mit 10 % FCS.

Stock 2 stammt von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) in Braunschweig und wird in RPMI 1640-Medium (Biochrom Nr. F1295) mit 10 % FCS kultiviert.

Der Proliferationstest mit EFM-19-Zellen wird ähnlich wie mit MCF-7-Zellen durchgeführt. In 24-Well-Platten wird eine Zellzahl von 20.000 pro Well ausgesät; 48 Stunden später erfolgt Mediumwechsel und Substanzzugabe. Am 7. Tag wird das Experimentalmedium mit der Testsubstanz erneuert, die Zellzählung erfolgt nach 10 Tagen Inkubation am 12. Tag.

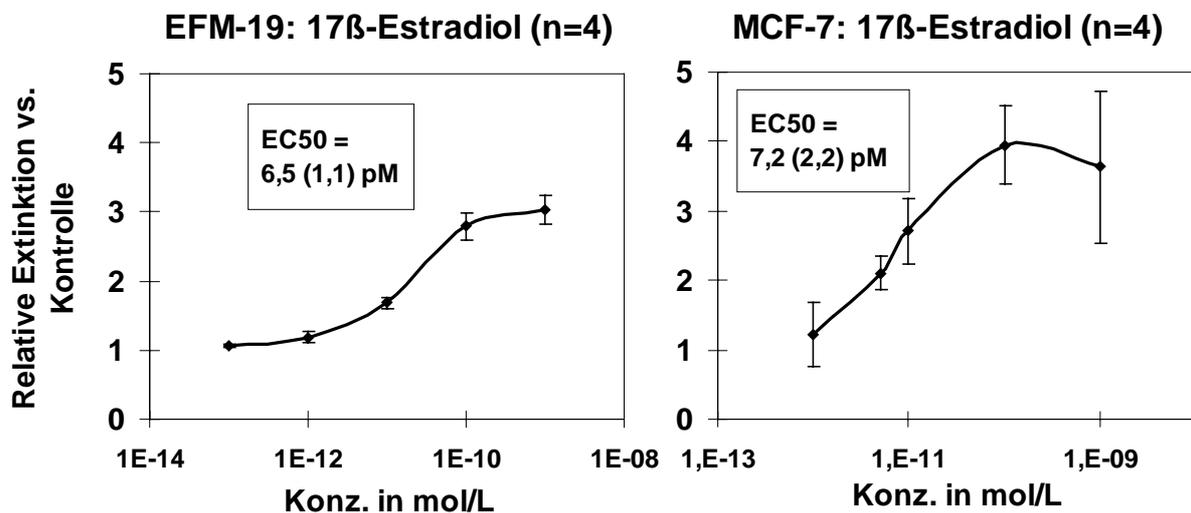


Abb. 18: Vergleich der Dosis-Wirkungs-Kurven von 17β-Estradiol in MCF-7- und EFM-19-Zellen (Stock 1). Die Kurven und die EC₅₀-Werte entsprechen jeweils Mittelwert und Standardabweichung von vier unabhängigen Einzelexperimenten.

Für 17β-Estradiol zeigen die beiden EFM-19-Zellstöcke eine ähnliche Konzentrations-Proliferations-Kurve wie für die MCF-7-Zellen (Abb. 18). Auch die Hemmung der Proliferation mit Tamoxifen gelingt. Für 5α-Dihydrotestosteron verhalten sich die beiden Zelllinien ebenfalls sehr ähnlich (s. Abb. 11). Ein Vergleich der zwei Zelllinien mit weiteren Einzelsubstanzen ist in Kap. VI.2 zu finden. Literaturangaben über das proliferative Verhalten verschiedener Xenoestrogene in den EFM-19-Zellen liegen nicht vor.

2 Untersuchung von Einzelsubstanzen

Tab. 5 zeigt eine Auflistung der im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen getesteten Einzelsubstanzen. Aufgeführt sind neben dem Reinheitsgrad die Firmen, von welchen die Chemikalien bezogen wurden und die Molmasse. Die Substanzen wurden entweder in DMSO oder in Ethanol gelöst und in kleinen Glaskolben im Kühlschrank aufbewahrt. Die letzte Spalte in Tab. 5 zeigt, welche Konzentration (in mol/L) die Stammlösungen jeweils hatten. Die Stammlösungen der Steroide und 17 β -Estradiol-Metabolite wurden bei -20°C gelagert, die Lösungen der übrigen Substanzen bei +4 °C.

Tab. 5: Übersicht über die im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen getesteten Einzelsubstanzen. Ein Teil der Substanzen wurde zusätzlich in EFM-19-Zellen (Stock 2) getestet. Die Stammlösungen wurden in DMSO bzw. Ethanol (*) hergestellt.

	Substanz	Reinheit	Herkunft	Molmasse	Konz. Stammlösung (mol/L)
Phenole	4-Methylphenol	z.Synth.	Univ. Tüb.	180,1	0,1
	4-t-Butylphenol	99 %	Fluka	150,2	0,01
	4-t-Octylphenol	> 90 %	Fluka	206,3	0,01
	4-n-Octylphenol	99 %	Aldrich	206,3	0,01
	4-t-Nonylphenol	techn. (85 %)	Fluka	220,4	0,01
	4-n-Nonylphenol	>98 %	Lancaster	220,4	0,1
	Bisphenol A	97 %	Fluka	228,3	0,01
	BPA-dimethacrylat		Aldrich	364,4	0,1
	4-Hydroxybiphenyl	> 98 %	Fluka	170,2	0,1
	2-Hydroxybiphenyl	> 98 %	Fluka	170,2	0,1
	2-t-Butyl-4-methylphenol	99 %	Aldrich	164,3	0,1
	2,6-di-t-Butyl-4-methylphenol (BHT)		Sigma	220,4	0,1
	3-t-butyl-4-hydroxyanisol (BHA)	> 98%	Fluka	180,3	0,1
	Halogenierte Phenole	Tetrabrombisphenol A	97 %	Aldrich	543,9
4-Chlor-3-methylphenol		99 %	Aldrich	142,6	0,1
4-Chlor-2-methylphenol		97 %	Aldrich	142,6	0,1
2-Chlor-4-methylphenol		97 %	Aldrich	142,6	0,1
4-Chlorphenol		98 %	Supelco	128,6	0,1
2,4-Dichlorphenol		98 %	Supelco	163,0	0,1
2,4,5-Trichlorphenol		98 %	Supelco	197,8	0,1
2,4-D		Quality Grade	Poly Science	221,0	0,1
2,4-Dibromphenol		98 %	Supelco	251,9	0,1
Irgasan DP300	99,3 %	Ciba Geigy	288,4	0,1	
Pestizide	α -HCH	99 %	Riedel	290,3	0,05
	β -HCH	99 %	Riedel	290,3	0,01
	γ -HCH	99 %	Riedel	290,3	0,01
	Dieldrin	>99 %	Riedel	380,9	0,05
	α -Endosulfan	>99 %	Riedel	406,9	0,05
	Atrazin		Poly Science	215,5	0,01
	Simazin		Ciba Geigy	201,7	0,01
	Dimethoat (Roxion)	36,7 %	Celaflor		0,1
	Metiram (Polyram Combi)	80 %	Celamerck	1087	0,01
	Phthalate	Di-n-butylphthalat	99 %	Merck	278,4

	Benzyl-n-butylphthalat	98 %	Merck	312,4	0,1
	Di-(2-ethylhexyl)phthalat			390,6	0,1
	Mono-(2-ethylhexyl)- phthalat (MEHP)		synthetisiert ²	278,6	0,1
div. Stoffe	Phenolrot		Sigma	354,4	0,014
	Tris-(2-chloroethyl)- phosphat	97 %	Aldrich	285,5	0,1
	Benzophenon		Aldrich	182,2	0,1
	p-Nitrotoluol	z. Synth.	Univ. Tüb.	137,1	0,1
	t-Butylbenzol	z. Synth.	Univ. Tüb.	134	0,1
Phytoestrogene	Coumestrol	95 %	Fluka	268,2	0,005*
	Genistein	98 %	Sigma	270,2	0,01
Steroide	17 β -Estradiol		Sigma	272,4	0,001*
	Estron		Sigma	270,4	0,005*
	2-Hydroxyestron		Sigma	286,4	0,001*
	4-Hydroxyestron		Sigma	286,4	0,001*
	2-Methoxyestron		Sigma	300,4	0,0033*
	16 α -Hydroxyestron	95 %	Sigma	286,4	0,0007*
	Estriol	> 99 %	Sigma	288,4	0,005*
	2-Hydroxyestriol	> 90 %	Sigma	304,4	0,001*
	2-Methoxyestriol		Sigma	318,4	0,001*
	2-Hydroxyestradiol		Sigma	288,4	0,001*
	2-Methoxyestradiol		Sigma	302,4	0,0033*
	17 α -Ethinylestradiol	> 98 %	Sigma	296,4	0,01*
	Mestranol		Sigma	310,4	0,001*
	Hydrocortison	98 %	Sigma	362,5	0,001*
	Testosteron		Sigma	286,4	0,01*
	5 α -Dihydrotestosteron		Sigma	290,4	0,005*
	4-Androsten-4-ol-3,17- dien		Sigma	302,4	0,001*
Antiestrogene	Tamoxifen	99 %	Sigma	371,5	0,01*
	ICI 182.780 ³		Zeneca	606,8	0,0001

² im Arbeitskreis von Prof. Rettenmaier, Inst. für Arbeits- und Sozialmedizin der Univ. Tübingen

³ Geschenk der Firma Zeneca, Großbritannien

Nach Verdünnung mit Experimentalmedium wurden die Substanzen im E-Screen-Assay getestet. Nach der indirekten kolorimetrischen Zellzahlbestimmung wurde für jede Substanz der relative Proliferationseffekt (RPE) und die relative Potenz (EEF) berechnet; als Positivkontrolle diente 17 β -Estradiol. Jede estrogen wirksame Substanz wurde mindestens in drei unabhängigen Experimenten getestet. Es wurden nur E-Screen-Assays für die Auswertung berücksichtigt, bei denen der Proliferationseffekt (PE) der Positivkontrolle (bei 10^{-9} M) ≥ 2 war.

Die Ergebnisse sind nach Substanzklassen geordnet in Tabellen zusammengefasst. Die Tests wurden entweder in 24- oder in 96-Well-Platten durchgeführt. In Spalte 2 ist jeweils die Gesamtzahl n der durchgeführten und auswertbaren unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente angegeben. m ist dabei die Zahl der Einzelexperimente, bei denen die Zellzahl durch den MTT-Assay ermittelt wurde. Sofern keine anderen Angaben gemacht sind, wurden die übrigen Einzelexperimente (n - m) mit dem SRB-Assay ausgewertet.

Für die Bewertung der estrogenen Wirkungsstärke einer getesteten Substanz wurde für jeden E-Screen-Assay der relative Proliferationseffekt (RPE) berechnet; Mittelwert und Standardabweichung sind in Spalte 3 angegeben. Ein RPE $\leq 10\%$ wurde als nicht nachweisbar (n.n.) gewertet. In der 5. Spalte (EC_{100}) wird der Mittelwert der kleinsten molaren Konzentration (EC_{100}) der jeweils getesteten Substanz angegeben, die im E-Screen-Assay den höchsten proliferativen Effekt bewirkt hat. Für die nicht proliferierend wirkenden Substanzen wird in dieser Spalte die höchste im E-Screen-Assay getestete Konzentration angegeben.

Für jede proliferierend wirkende Substanz wurde nach Log-Probit-Transformation der mittleren Dosis-Wirkungskurve der EC_{50} -Wert (in mol/L) berechnet und in Spalte 5 angegeben. Dazu wurde für die jeweilige Testsubstanz für jede eingesetzte Konzentration der Mittelwert der relativen Extinktionen aus den einzelnen E-Screen-Assays berechnet. Diese Mittelwerte zeigten in der Regel eine brauchbare Dosis-Wirkungs-Kurve und wurden auch für die Erstellung der dargestellten Balkendiagramme verwendet. Die vorletzte Spalte gibt die EC_{50} (in mol/L) für die jeweils zugehörige Positivkontrolle 17 β -Estradiol an, die bei jedem Assay getestet wurde. In der letzten Spalte ist schließlich die relative Potenz (EEF) der Testsubstanz, bezogen auf die Positivkontrolle 17 β -Estradiol (EEF = 1), als Quotient der EC_{50} -Werte angegeben.

2.1 Alkylphenole, Bisphenole, Hydroxybiphenyle

Tab. 6: Ergebnisse der Testung von alkylierten Phenolen im E-Screen mit MCF-7-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC_{100} (mol/L)	EC_{50} (mol/L)	EC_{50} (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
4-Methylphenol	3 (0)	13,3 (2,9)	n.n. (1E-06)	n.n.		n.n.
4-t-Butylphenol	3 (1)	67,7 (9,9)	1E-05	1,4E-06	1,5E-11	1,0E-05
4-t-Octylphenol	3 ² (1)	96,8 (11,9)	3E-06	n.b.	n.b.	1,1E-04 ³
4-n-Octylphenol	4* (1)	69,0 (10,0)	5E-06	9,1E-07	7,5E-12	8,2E-06
techn. 4-Nonylph.	3 ² (1)	104,8 (9,8)	1E-06	1,4E-07	1,5E-11	1,1E-04
4-n-Nonylphenol	7* (2)	68,2 (11,4)	6E-06	1,3E-06	1,1E-11	8,7E-06
Bisphenol-A	3 (1)	97,4 (4,9)	4E-06	2,6E-07	1,6E-11	6,0E-05
BPA-dimethacr.	4 (1)	91,5 (14,2)	4E-06	3,2E-07	2,1E-12	6,7E-06
4-Hydroxybiphenyl	4 (3)	70,9 (6,6)	8E-06	1,5E-06	1,6E-11	1,1E-05
2-Hydroxybiphenyl	4 (2)	34,7 (8,6)	4E-05	7,8E-06	1,2E-11	1,5E-06

2-t-Butyl-4-methylphenol	3 (1)	28,0 (4,1)	8E-05	4,7E-06	1,4E-11	3,0E-06
2,6-di-t-Butyl-4-methylphenol (BHT)	3 (1)	n.n.	n.n (1E-04)	n.n.		n.n.
3-t-Butyl-4-OH anisol (BHA)	3 (2)	30,6 (6,5)	5E-05	5,3E-06	1,3E-11	2,4E-06

n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* bei 3 Assays wurde die Zellzahl direkt bestimmt (Neubauer-Zählkammer)

² bei 1 Assay wurde die Zellzahl direkt bestimmt (Neubauer-Zählkammer)

³ der EEF wurde über die EC₁₀₀-Werte bestimmt

Um den modifizierten E-Screen-Assay zu validieren und um Informationen über die Strukturabhängigkeit der estrogenen Wirkung von alkylierten Phenolen zu erhalten, wurden verschiedene phenolische Substanzen in MCF-7-Zellen getestet, von denen für viele eine estrogenen Wirkung bereits bekannt war. Die Ergebnisse sind in Tab. 6 zusammengefaßt.

4-t-Octylphenol (4-t-OP) und techn. 4-Nonylphenol (4-t-NP) sind ebenso wie Bisphenol-A und Bisphenol-A-dimethacrylat volle ER-Agonisten; die berechneten RPE-Werte liegen bei etwa 100 %. In den EFM-19-Zellen (Stock 2) wurde nur 4-t-OP getestet (n=2). Der berechnete RPE-Wert lag sogar über 100 % (128 %). Weitere der in Tab. 6 aufgeführten Phenole wurden bisher nicht in den EFM-19-Zellen getestet. Die estrogenen Potenz (EEF) von 4-t-OP und 4-t-NP war jeweils etwa um einen Faktor 1000 geringer als die des natürlichen Estrogens 17 β -Estradiol. Damit sind diese beiden Alkylphenole diejenigen nichtsteroidalen Chemikalien mit der stärksten bisher bekannten estrogenen Potenz. Die eigenen Ergebnisse stimmen gut mit den Daten aus der Literatur überein (vgl. Abb. 7 und 8 in VI 1.3.1).

Im Vergleich zu 4-t-OP und 4-t-NP waren die beiden Isomere mit linearer Alkylkette (4-n-OP, 4-n-NP) in ihrer estrogenen Wirkung im E-Screen-Assay schwächer. Sowohl der RPE- als auch der EEF-Wert lagen jeweils deutlich niedriger; 4-n-OP und 4-n-NP wirkten nur noch als partielle Agonisten (vgl. Abb. 19). Die Ergebnisse stimmen gut mit Messungen der transkriptionalen Aktivierung eines estrogenabhängigen Reportergens in gentechnisch veränderten Hefezellen überein. Routledge et al. (1997) fanden heraus, daß die estrogenen Wirksamkeit der Alkylphenole von der Verzweigung und der Länge der Alkylkette abhängt. Die tertiär verzweigten waren die wirksamsten (tertiär > sekundär > primär).

In Übereinstimmung mit den Daten von Soto et al. (1995) war 4-t-Butylphenol im E-Screen-Assay weniger stark wirksam und weniger potent als 4-t-OP und 4-t-NP, während 4-Methylphenol nahezu unwirksam war. RPE- und EEF-Wert für 4-t-Butylphenol entsprachen in etwa denen von 4-n-OP und 4-n-NP. Diese Befunde zeigen, daß neben der Verzweigung die

Länge der Alkylkette für die estrogenische Wirkung der p-Alkylphenole entscheidend ist. Routledge et al. (1997) stellten fest, daß Alkylphenole die höchste estrogenische Aktivität besitzen, wenn sich die tertiär verzweigte Alkylgruppe in para-Position befindet und 6 bis 8 C-Atome enthält.

Da im Rahmen dieses Projektes nur para-substituierte Alkylphenole im modifizierten E-Screen-Assay getestet wurden, kann aufgrund der vorliegenden Ergebnisse keine unmittelbare Aussage getroffen werden, wie die Stellung der Alkylkette (para, meta, ortho) einen Einfluß auf die estrogenische Wirksamkeit eines Alkylphenols im E-Screen-Assay hat. Soto et al. (1995) konnten im E-Screen nur für das para-substituierte t-Butylphenol eine estrogenische Wirkung nachweisen. Die ortho- und meta-substituierten zeigten keine Wirkung. Routledge et al. (1997) fanden im Hefe-Transkriptionsassay, daß die estrogenische Wirksamkeit am höchsten ist, wenn die Alkylkette in der para-Position ist (para > meta > ortho).

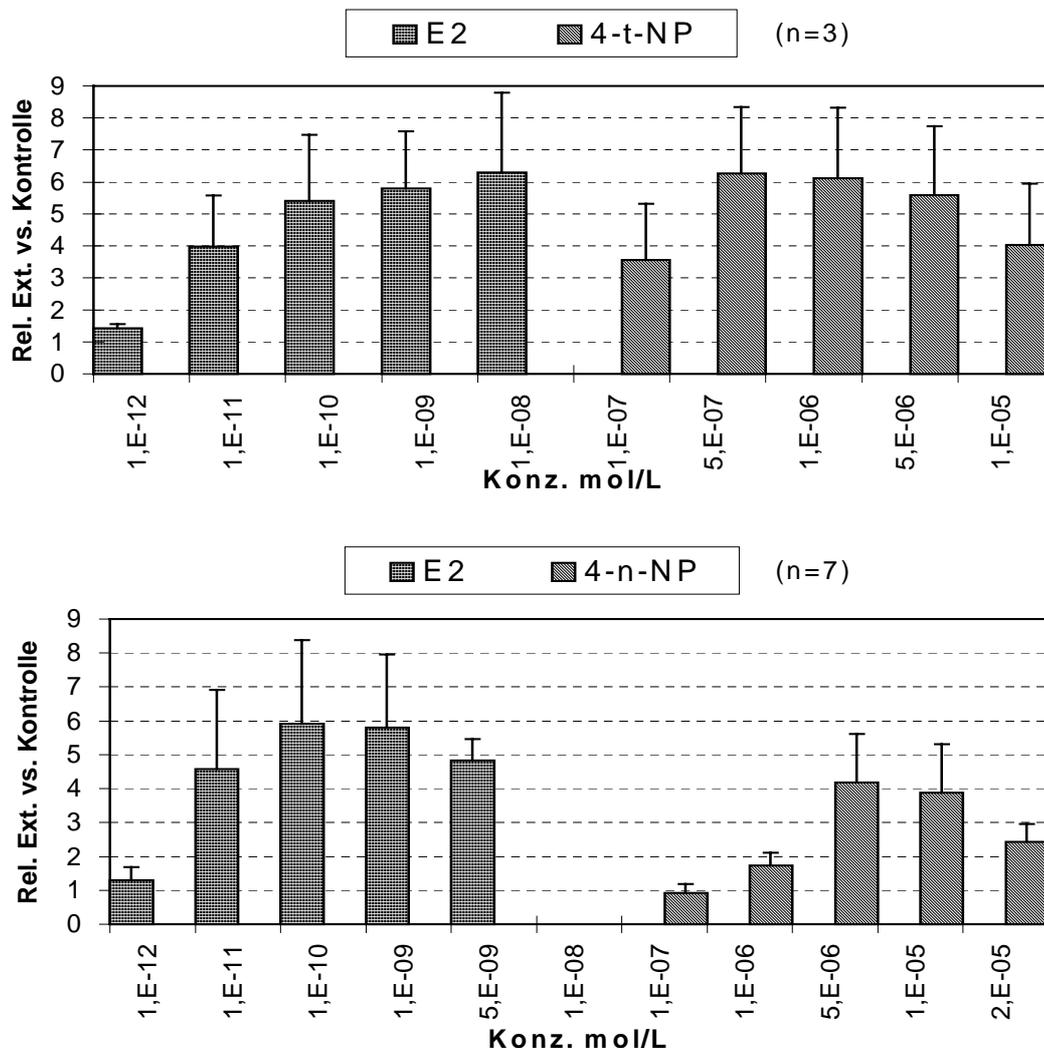


Abb. 19: Dosis-Proliferations-Kurven von 4-n-Nonylphenol und techn. 4-t-NP in MCF-7-Zellen.

In Analogie zu diesen Befunden konnten wir durch Vergleich der estrogenen Wirksamkeit von 4-Hydroxybiphenyl und 2-Hydroxybiphenyl zeigen (Abb. 20), daß die para-Stellung des zweiten Phenylrestes zur OH-Gruppe (4-Hydroxybiphenyl) eine deutlich stärkere estrogenere Aktivität bewirkt (s. auch Abb. 7 und 8 in VI 1.3.1). Für 2-Hydroxybiphenyl ist die estrogenere Potenz um fast einen Faktor 10 niedriger. Aufgrund seiner fungiziden Wirkung wird 2-Hydroxybiphenyl (ortho-Phenylphenol) zur Konservierung von Zitrusfrüchten eingesetzt.

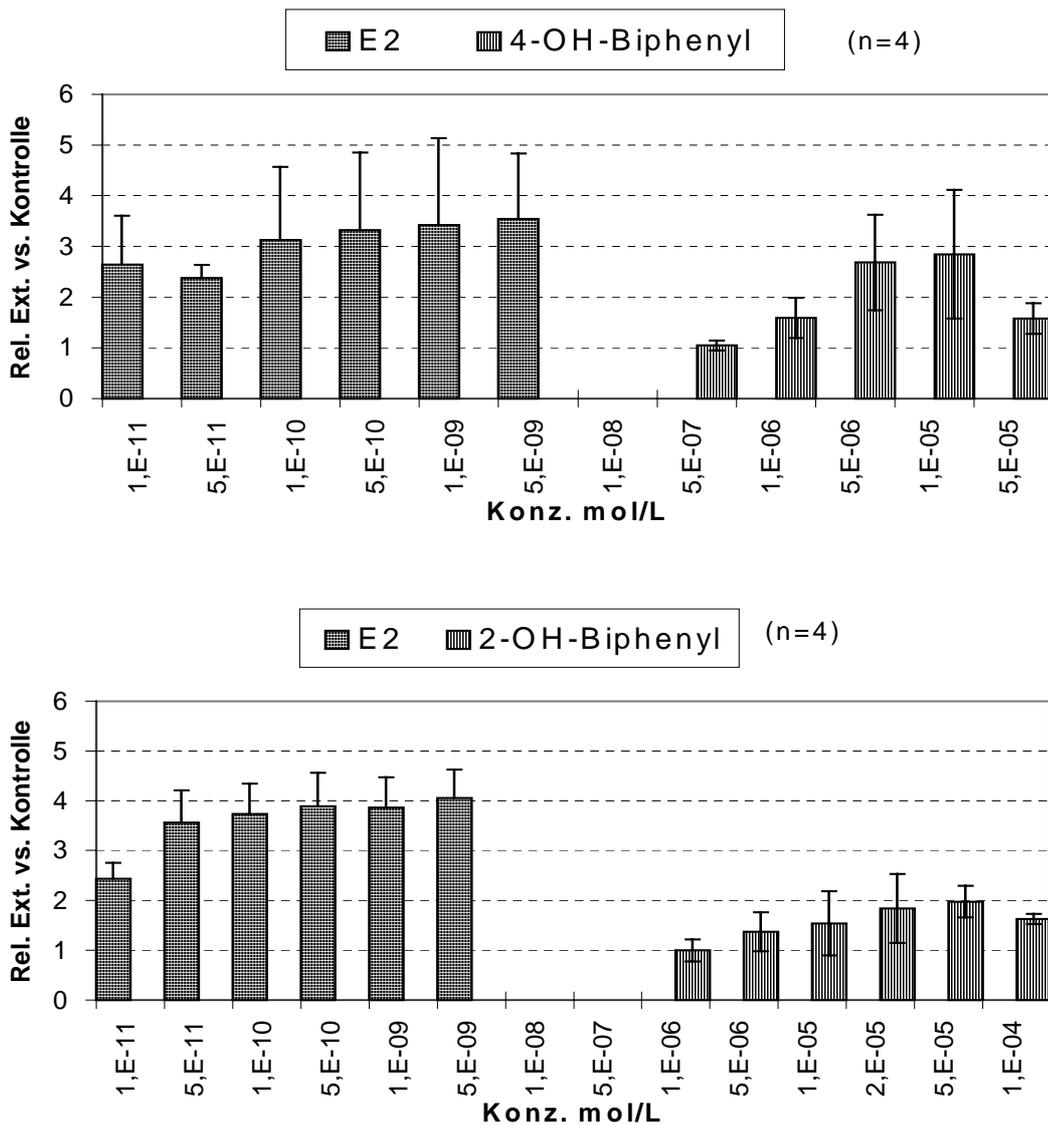


Abb. 20: Dosis-Proliferations-Kurven für 4-Hydroxybiphenyl und 2-Hydroxybiphenyl in MCF-7-Zellen.

3-t-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA) ist als Antioxidans in Lebensmitteln, Kautschuk-Produkten und Seifen weit verbreitet. Es wird vom Menschen gut resorbiert, aber auch schnell wieder eliminiert (Conning et al. 1986).

Die von Soto et al. (1995) gefundene schwache estrogenere Wirkung von BHA konnten wir bestätigen, der RPE-Wert betrug $31 \pm 7 \%$ (s. auch Abb. 7 in VI 1.3.1). Ebenso konnten wir

bestätigen, daß 2,6-di-t-Butyl-4-methylphenol (2,6-di-t-Butyl-4-kresol), welches oft als Butylhydroxytoluol (BHT) bezeichnet wird, im E-Screen-Assay unwirksam ist.

In dem von uns etablierten E-Screen-Assay sind BHA und 2-t-Butyl-4-methylphenol schwache Xenoestrogene. Wie bei Soto et al. (1995) beträgt der RPE für BHA etwa 30 %. 2-t-Butyl-4-methylphenol ist ein etwas schwächeres Estrogen als BHA. Der RPE von 2-t-Butyl-4-methylphenol liegt bei 28 ± 4 %. Beide Substanzen haben den gleichen EEF (etwa $2,5 \cdot 10^{-6}$). Der Grund für die schwache estrogene Wirksamkeit dieser beiden Substanzen liegt vermutlich in der voluminösen t-Butylgruppe, welche eine starke Bindung an den ER verhindert (s. Abb. 21).

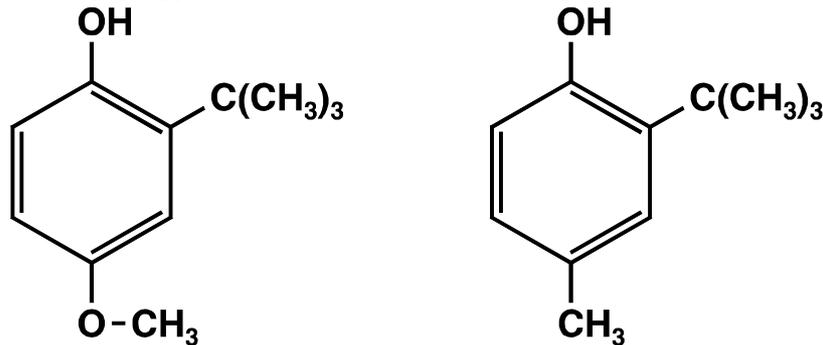


Abb. 21: Strukturen von 3-t-Butyl-4-hydroxyanisol (BHA) und 2-t-Butyl-4-methylphenol.

2.2 Halogenierte Phenole

Tab. 7: Ergebnisse der Testung von halogenierten Phenolen im E-Screen mit MCF-7-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
Tetrabrom-Bisphenol-A	5 (2)	47,5 (10,6)	2E-05	8,5E-06	4,5E-12	1,1E-06
4-Chlor-3-methylphenol	3 (1)	45,8 (4,7)	7E-05	1,8E-05	5,4E-12	3,1E-07
4-Chlor-2-methylphenol	3* (0)	27,9 (7,8)	1E-04	3,5E-05	5,4E-12	1,8E-07
2-Chlor-4-methylphenol	3 (1)	n.n.	n.n. (1E-04)	n.n.		n.n.
4-Chlorphenol	3 ² (0)	n.n.	n.n. (1E-04)	n.n.		n.n.
2,4-Dichlorphenol	3* (0)	n.n.	n.n. (1E-04)	n.n.		n.n.
2,4,5-Trichlorphenol	3 ² (0)	n.n.	n.n. (1E-05)	n.n.		n.n.

2,4-D	5* (1)	15,6 (14,3)	4E-05	n.b.		n.b.
2,4-Dibromphenol	4 (0)	23,7 (7,4)	4E-05	2,9E-06	7,0E-12	2,4E-06
Irgasan DP300	4 (3)	n.n.	1E-05	n.n.	n.n.	n.n.

n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

Die schwache estrogene Wirksamkeit von Tetrabrom-Bisphenol-A, 4-Chlor-3-methylphenol (p-Chlor-m-kresol), 4-Chlor-2-methylphenol (p-Chlor-o-kresol) und von 2,4-Dibromphenol wurde im Rahmen dieses Projektes erstmalig entdeckt (Körner et al. 1998). Die Ergebnisse sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Tetrabrom-Bisphenol-A (Br₄BisA) ist ein Flammschutzmittel, welches als Zusatz für eine Reihe von Kunststoffen in Elektronikinstrumenten (z.B. Computer) benutzt wird. Jährlich werden weltweit etwa 60.000 Tonnen Br₄BisA hergestellt (WHO 1995). Nach Eintritt in die Umwelt wird Tetrabrom-Bisphenol-A durch Methylierung der beiden Phenolgruppen zu Dimethoxy-Tetrabrom-Bisphenol-A umgewandelt. Dieser Metabolit ist noch stärker lipophil und kann sich daher besser im Fettgewebe anreichern. Er ist in Fischen und Muscheln nachgewiesen worden (WHO 1995).

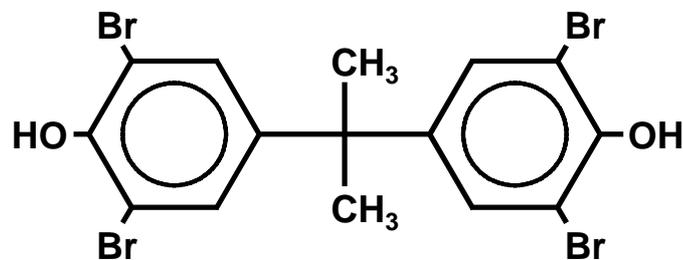


Abb. 22: Struktur von Tetrabrom-Bisphenol-A, 4,4'-Isopropylidenbis-(2,6-dibromphenol)

Br₄BisA ist im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen ein partieller ER-Agonist; der ausgelöste relative proliferative Effekt beträgt $48 \pm 11\%$ (s. Tab. 7 und Abb. 23).

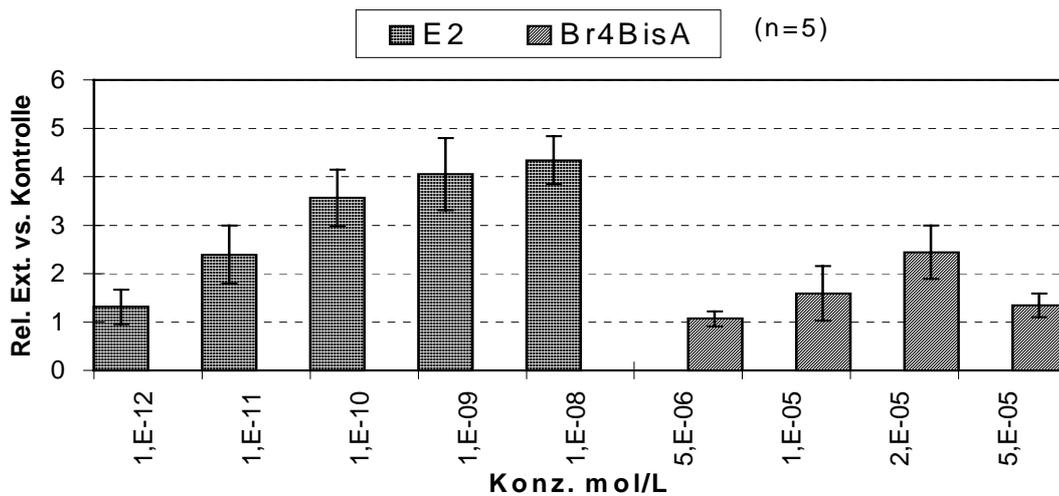


Abb. 23: Dosis-Proliferations-Kurve für Tetrabrom-Bisphenol-A in MCF-7-Zellen.

Die estrogenartige Wirkung einer Substanz ist dann mit Sicherheit nachgewiesen, wenn sie die estrogenabhängige Proliferation von Brustkrebszellen stimulieren kann, und dieser proliferative Effekt durch Ko-Inkubation mit einem Estrogenrezeptor(ER)-Antagonisten (Tamoxifen oder ICI 182.780) inhibiert werden kann. Abb. 24 zeigt, daß der proliferative Effekt von Br₄BisA in den MCF-7-Zellen durch Ko-Inkubation mit $5 \cdot 10^{-6}$ M des ER-Antagonisten Tamoxifen komplett inhibiert wird. Dies ist ein Beweis, daß Br₄BisA an den Estrogenrezeptor bindet. Auch die Erhöhung der Sekretion des pS2-Proteins (siehe VI.2.7) zeigt, daß Br₄BisA estrogenartig wirkt.

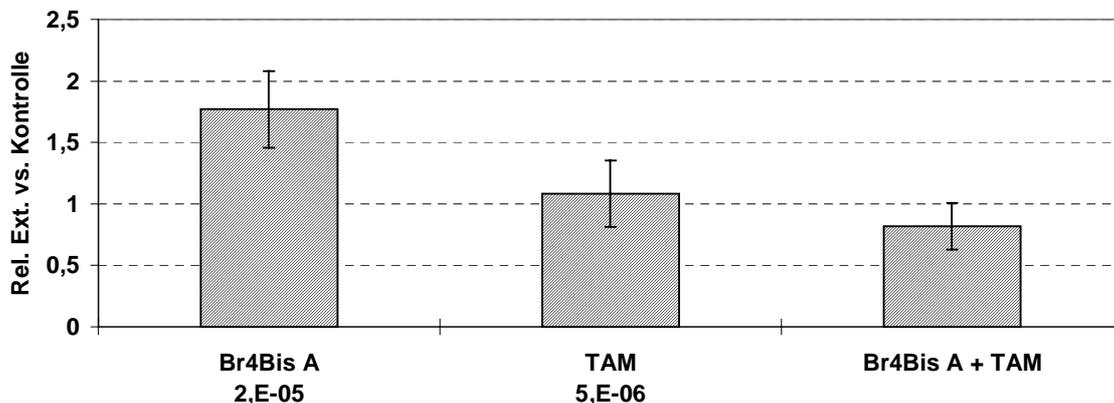


Abb. 24: Ko-Inkubation mit Tamoxifen ($5 \cdot 10^{-6}$ M) bewirkt in MCF-7-Zellen eine komplette Inhibierung der durch Br₄BisA ($2 \cdot 10^{-5}$ M) induzierten Zellproliferation (n=3).

4-Chlor-3-methylphenol (p-Chlor-m-kresol) und sein Natriumsalz wirken bakterizid und fungizid. Ihre Wirkung wird im Gegensatz zu der vieler anderer Mikrobiozide weder von Eiweiß noch durch Schmutz nennenswert beeinflusst. 4-Chlor-3-methylphenol wird von Ratten nach oraler, inhalativer oder dermalen Aufnahme schnell in unveränderter Form überwiegend über den Urin ausgeschieden. Wegen der geringen Warmblüttoxizität, dem schnellen Wirkungseintritt und

der Temperaturstabilität resultiert die Hauptanwendung als Wirkstoff in Desinfektions- und Konservierungsmitteln. 1990 wurden in Westeuropa ca. 2100 t 4-Chlor-3-methylphenol produziert, davon 2000 t in Deutschland. 1600 t der deutschen Produktion wurden in 41 Länder exportiert. Fast 40 % der produzierten Menge dient im klinischen Bereich zur Desinfektion von Instrumenten und Flächen. Als Wirkstoff in Konservierungsmitteln wird 4-Chlor-3-methylphenol in der Lederindustrie eingesetzt. Außerdem wird es für die Konservierung von Leim, Kühlschmiermitteln und Hilfsstoffen für die Textilindustrie verwendet sowie bei der Herstellung von Pappe und Papier eingesetzt (BUA 1994a).

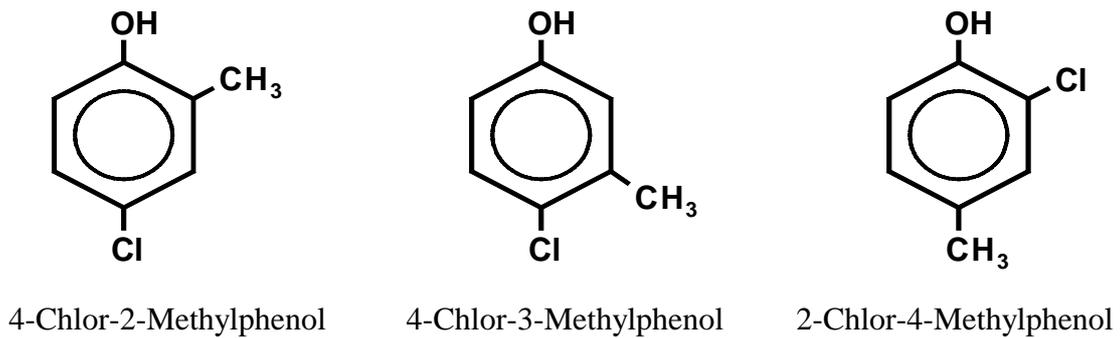
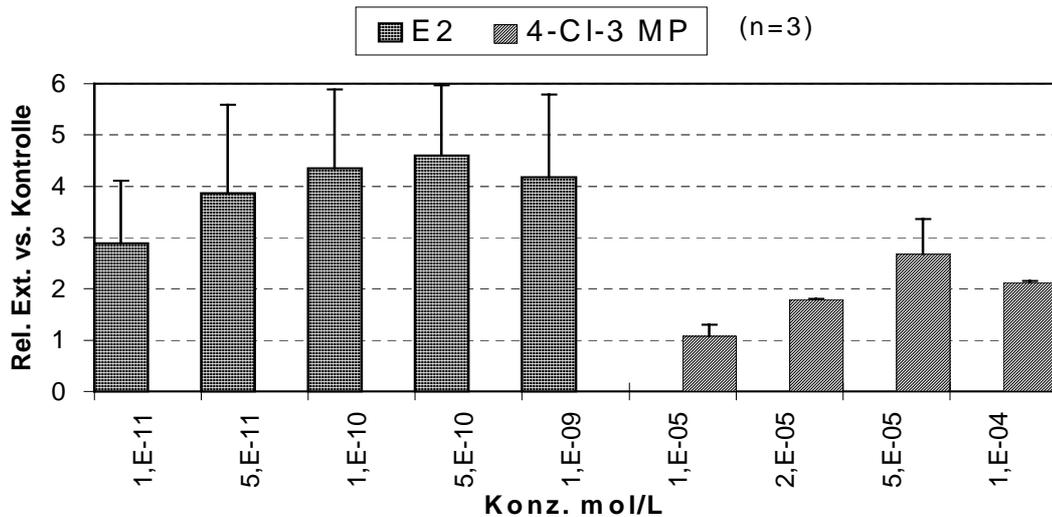


Abb. 25: Strukturen von drei Chlorkresolen.



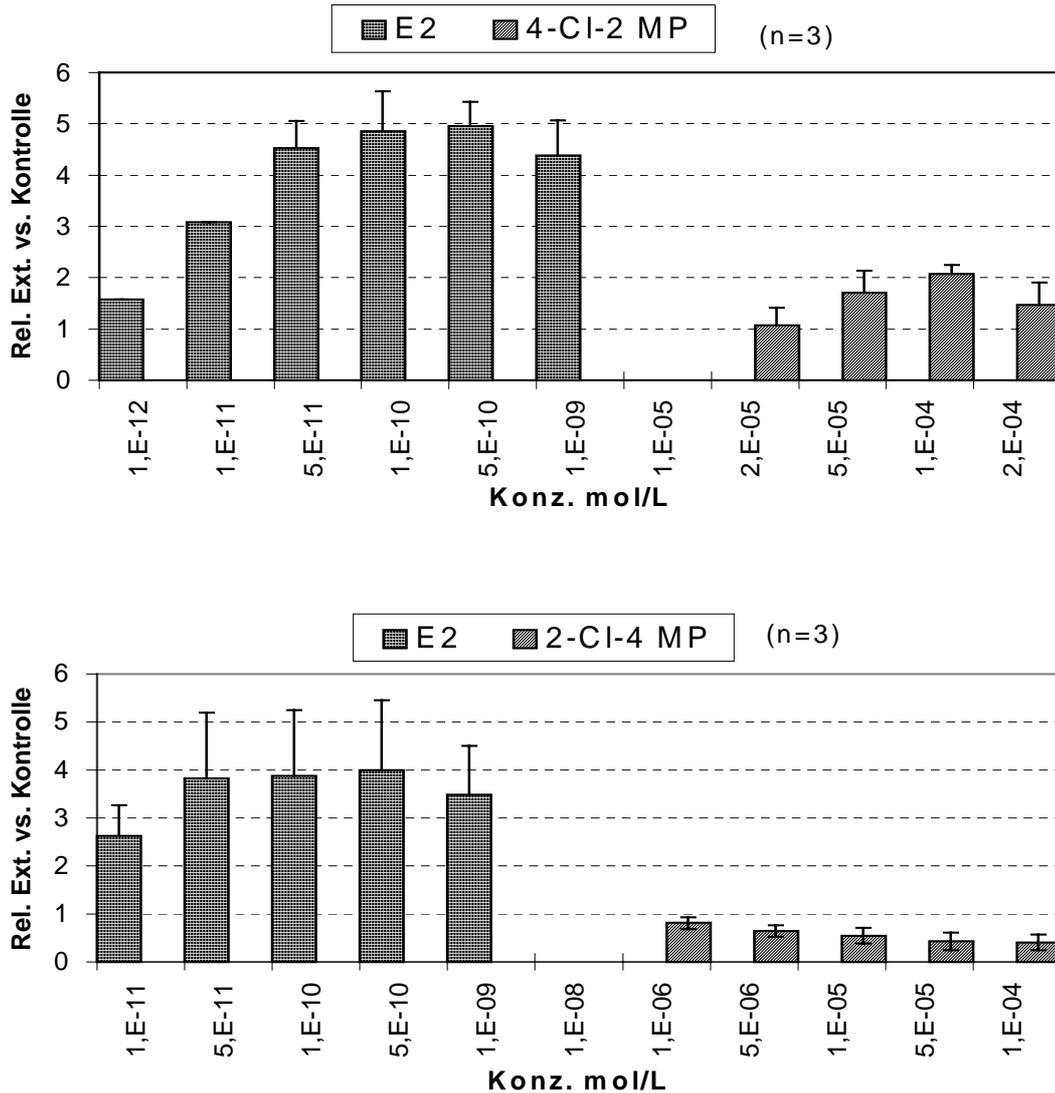


Abb. 26: Dosis-Proliferations-Kurven für drei Chlorkresole in MCF-7-Zellen.

4-Chlor-2-methylphenol (p-Chlor-o-kresol) ist das Edukt für die Produktion von Phenoxyalkansäure-Herbiziden wie MCPA (4-Chlor-2-methylphenoxyessigsäure) und MECOPROP (2-(4-Chlor-2-methylphenoxy)propansäure). Bis 1990 wurden jährlich mehr als 3000 t von MCPA und MECOPROP in Deutschland produziert (BUA 1994b). Die Produktion von 4-Chlor-2-methylphenol wurde in Deutschland 1991 eingestellt.

Drei Chlorkresole und drei Chlorphenole wurden in je drei unabhängigen E-Screen-Assays in den MCF-7-Zellen getestet. 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol zeigten eine schwache estrogenartige Wirkung, während 2-Chlor-4-methylphenol nicht wirksam war (s. Tab. 7 und Abb. 26).

Abb. 27 zeigt, daß der proliferative Effekt von 4-Chlor-3-methylphenol ($5 \cdot 10^{-5}$ M) und 4-Chlor-2-methylphenol (10^{-4} M) auf die MCF-7-Zellen durch Ko-Inkubation mit Tamoxifen ($5 \cdot 10^{-6}$ M) inhibiert wird. Auch 10^{-8} M ICI 182.780 inhibiert die Proliferation der Chlorkresole (ohne Abb.).

Auch die Messung der Sekretion des pS2-Proteins (siehe VI 2.7) zeigt, daß 4-Chlor-3-methylphenol und 4-Chlor-2-methylphenol in den MCF-7-Zellen estrogenartig wirken.

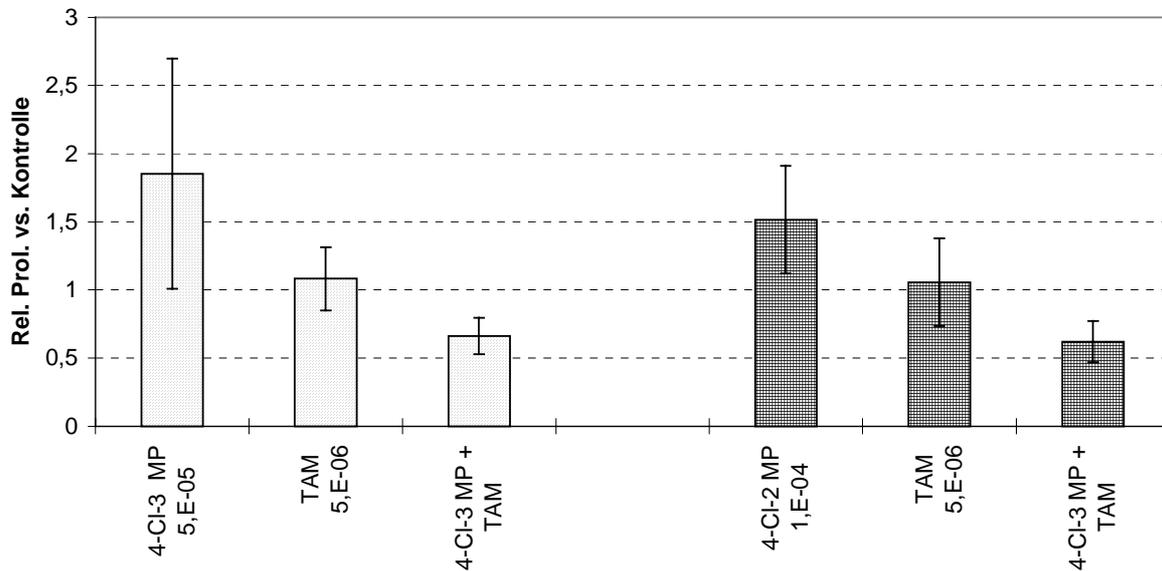


Abb. 27: Inhibierung der von 4-Chlor-3-methylphenol (n=5) und 4-Chlor-2-methylphenol (n=3) induzierten Proliferation von MCF-7-Zellen durch Ko-Inkubation mit $5 \cdot 10^{-6}$ M Tamoxifen (TAM). $5 \cdot 10^{-6}$ M Tamoxifen alleine bewirkt keine Proliferation (PE \approx 1).

4-Chlorphenol, 2,4-Cl₂-Phenol und 2,4,5-Cl₃-Phenol zeigten im E-Screen-Assay keine estrogenische Aktivität (Tab. 7).

Der Austausch der Methylgruppe im 4-Chlor-2-methylphenol durch ein Chloratom (2,4-Cl₂-Phenol) verhindert also eine estrogenische Wirkung, vermutlich weil die Elektronendichte am Aromaten verringert statt erhöht wird. Entsprechend wirkt auch 2,4,5-Cl₃-Phenol nicht estrogenartig. Offensichtlich ist auch im 4-Chlorphenol die Elektronendichte am Aromaten zu gering, d.h. die Anwesenheit eines Substituenten mit +I-Effekt (z.B. Methylgruppe) ist für eine Bindung an den ER und damit für eine estrogenische Wirkung notwendig.

Werden die beiden Chloratome im 2,4-Cl₂-Phenol durch zwei Bromatome ersetzt, entsteht ein schwacher partieller ER-Agonist, welcher im E-Screen-Assay eine schwache estrogenische Aktivität zeigt. Der relative proliferative Effekt von 2,4-Dibromphenol in den MCF-7-Zellen beträgt 24 ± 7 % (Tab. 7 und Abb. 28). Die möglichen Gründe hierfür könnten zum einen in einer besseren Polarisierbarkeit des Moleküls durch den größeren Br-Substituenten und zum anderen in einer höheren Elektronendichte am Aromaten durch die geringere Elektronegativität von Brom liegen.

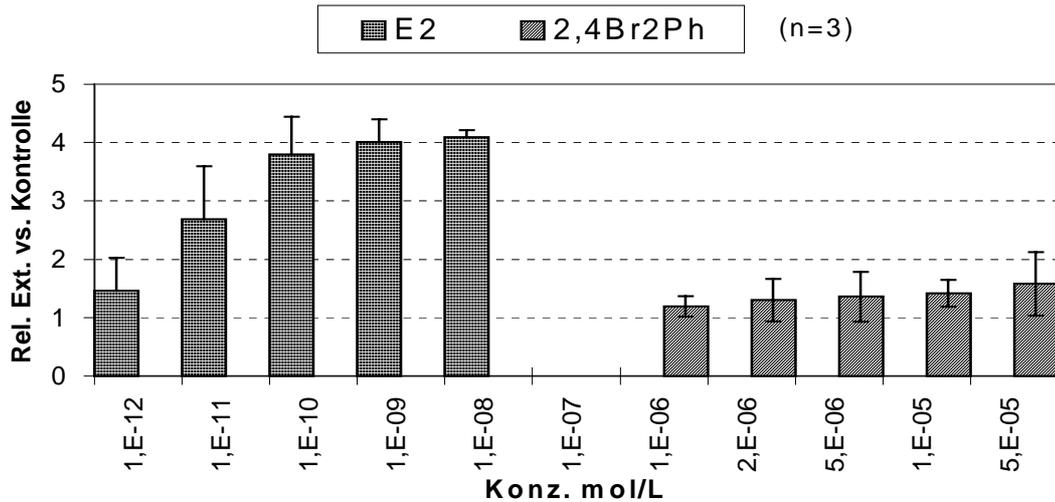


Abb. 28: Dosis-Proliferations-Kurve für 2,4-Dibromphenol in MCF-7-Zellen.

Irgasan DP 300 (Triclosan; 2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenylether) findet als antimikrobielles Agens ähnlich wie 4-Chlor-3-Methylphenol eine breite Anwendung in Kosmetikprodukten und Textilien (Beck et al. 1989). Eine estrogenische Wirkung war im E-Screen-Assay nicht nachweisbar. Allerdings wirkte es bei 10 μ M auf die MCF-7-Zellen stark zytotoxisch.

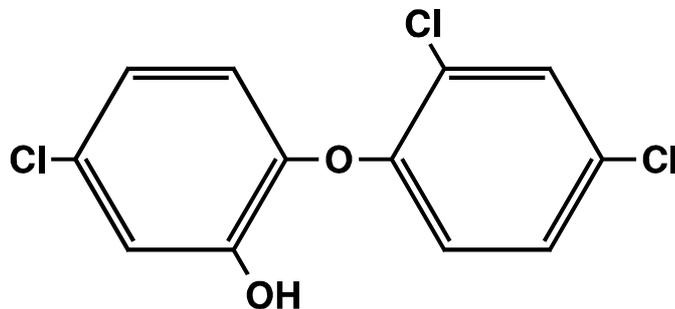


Abb. 29: Struktur von Irgasan DP 300 (Triclosan; 2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenylether)

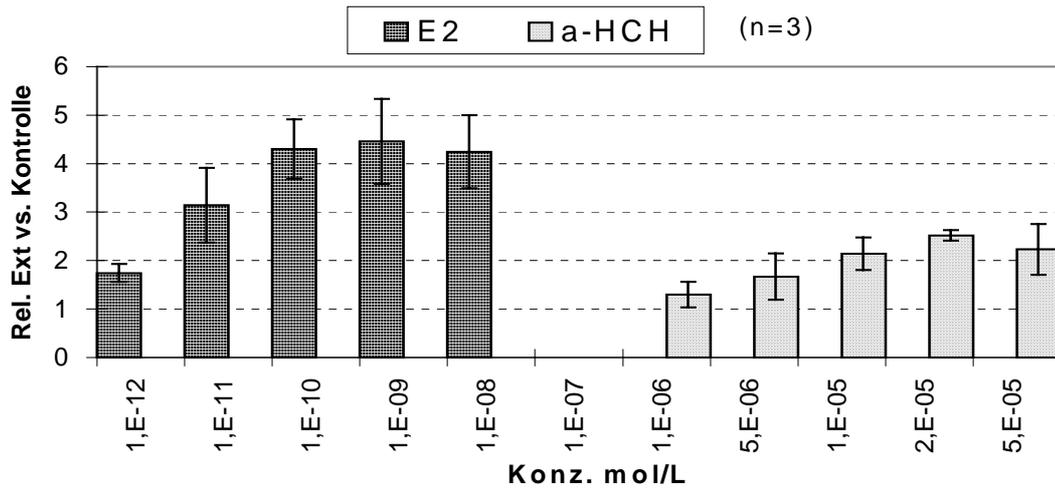
2.3 Pestizide

Von verschiedenen Organochlorinsektiziden (o,p'-DDT, o,p'-DDE, Kepone, Methoxychlor, β -HCH) ist eine estrogenartige Wirkung *in vivo* z.T. schon lange bekannt (vgl. IV). Für weitere Organochlorinsektizide wie Dieldrin, α - und β -Endosulfan, Toxaphen, Alachlor und Nonachlor wurde in den letzten Jahren eine solche Wirkung *in vitro* beschrieben (Soto et al. 1994; 1995; Klotz et al. 1996). Die meisten dieser Pestizide sind in Deutschland nicht zugelassen oder schon lange verboten. Viele der Organochlorinsektizide sind in der Umwelt persistent und bioakkumulieren im menschlichen Organismus.

Im Rahmen dieses Forschungsprojektes sollte die estrogenische Wirkung für einige Organochlorinsektizide verifiziert werden, zum anderen sollten mehrere Pestizide aus anderen Verbindungsklassen getestet werden.

2.3.1 Hexachlorcyclohexan-Isomere

MCF-7



EFM-19

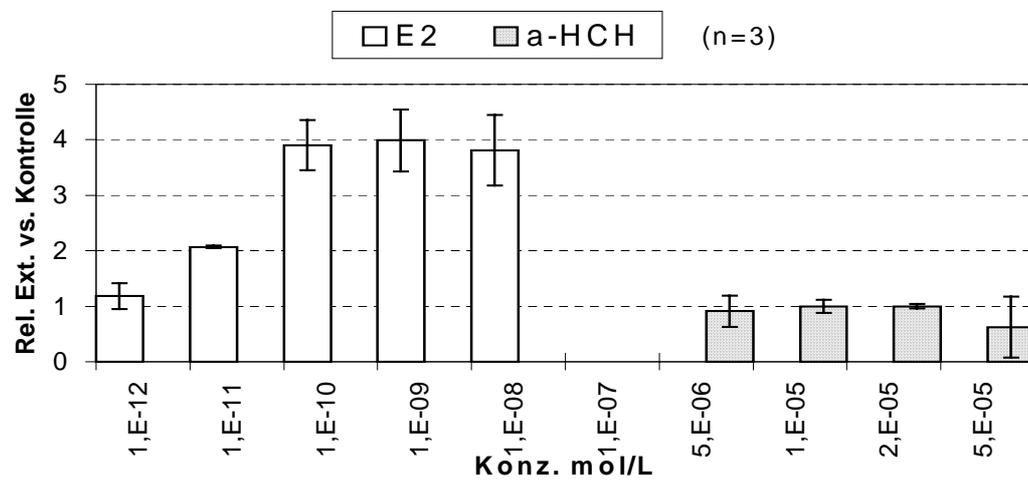
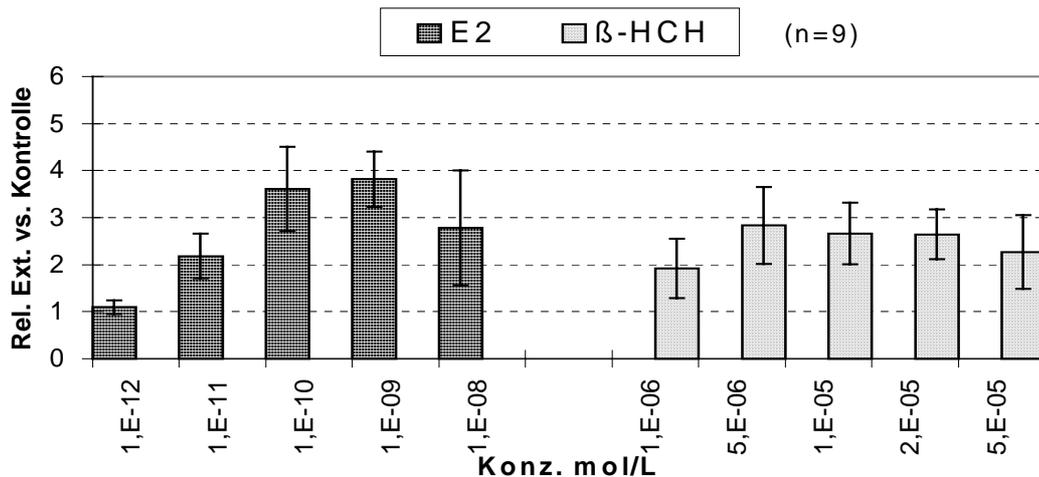


Abb. 30: Dosis-Proliferations-Kurven von α -HCH in MCF-7 und EFM-19-Zellen.

MCF-7



EFM-19

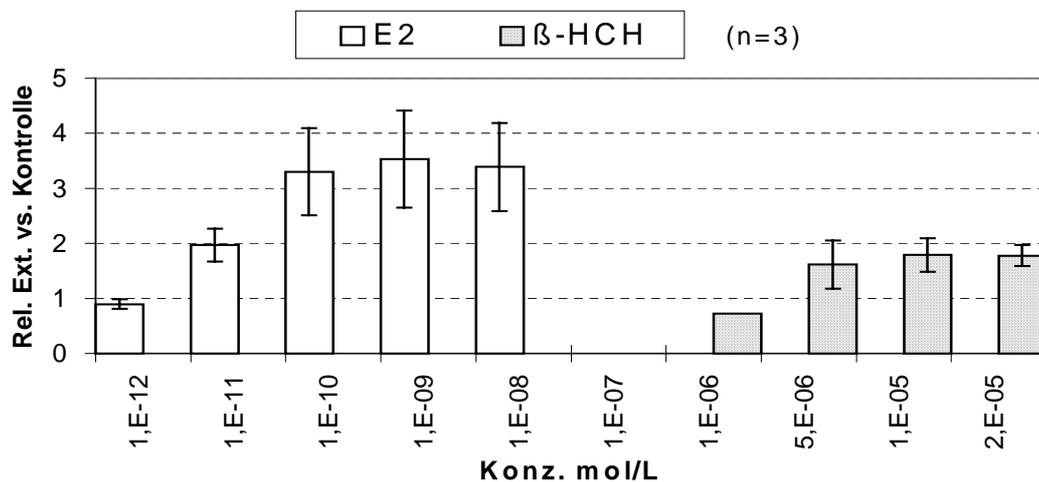


Abb. 31: Dosis-Proliferations-Kurven von β -HCH in MCF-7 und EFM-19-Zellen.

Hexachlorcyclohexan (HCH) nimmt unter den Chlorkohlenwasserstoff-Insektiziden eine Sonderstellung ein, da die insektizide Wirksamkeit von der Molekülgeometrie abhängt. Von allen Isomeren besitzt nur γ -HCH (Lindan) eine insektizide Wirkung. Die technischen HCH-Gemische enthalten neben dem γ -Isomer die insektizid unwirksamen, unter Umweltbedingungen aber sehr stabilen α -, β -, δ - und ϵ -Isomere. Da sie für den Menschen toxisch sind, sind diese technischen HCH-Gemische mittlerweile verboten. Lindan mit einem Reinheitsgrad $>99\%$ wird weiterhin zur Insektenbekämpfung und auch als Bestandteil von Holzschutzmitteln eingesetzt. In der Veterinär- und Humanmedizin findet es Anwendung als Jacutin zur Bekämpfung von Ektoparasiten wie Zecken und Milben.

Coosen & van Velsen (1989) zeigten, daß β -HCH in MCF-7-Zellen bei Konzentrationen $\geq 1\ \mu\text{M}$ die estrogenabhängige Synthese von Progesteronrezeptoren induzieren kann. In der Ratte wurden

für γ -HCH sowohl estrogene als auch antiestrogene Effekte beschrieben (Cooper et al. 1989). Faria et al. (1984) konnten eine Bindung an den ER nicht nachweisen.

Tab. 8: Ergebnisse der Testung von Pestiziden im E-Screen mit MCF-7- und EFM-19-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
α -HCH	3* (0)	34,9 (6,7)	4E-05	3,0E-06	4,7E-12	1,6E-06
α -HCH (EFM-19)	3 (0)	n.n.	n.n. (2E-05)	n.n.		n.n.
β -HCH	10 ⁴ (3)	66,1 (13,9)	1E-05	3,7E-07	1,2E-11	3,2E-05
β -HCH (EFM-19)	3 (0)	34,4 (12,6)	2E-05	4,2E-06	2,5E-11	5,9E-06
γ -HCH	7 ² (1)	35,0 (13,4)	2E-05	1,4E-06	4,7E-12	3,6E-06
γ -HCH (EFM-19)	4 (0)	n.n.	n.n. (4E-05)	n.n.		n.n.
Dieldrin	4 ² (0)	56,0 (3,4)	4E-06	6,7E-07	1,6E-12	2,4E-06
Dieldrin (EFM-19)	4* (0)	27,0 (19,6)	1E-05	1,7E-06	1,4E-11	7,9E-06
α -Endosulfan	4 ² (0)	67,5 (7,3)	4E-06	1,7E-07	1,6E-12	9,5E-06
α -Endosulfan (EFM-19)	4* (0)	27,7 (17,7)	5E-06	(4,1E-08)	1,3E-11	(3,1E-04)
Atrazin	2 (0)	n.n.	n.n. (1E-05)	n.n.		n.n.
Simazin	2 (0)	n.n.	n.n. (1E-05)	n.n.		n.n.
Dimethoat (Roxion)	2* (0)	n.n.	n.n. (1E-04)	n.n.		n.n.
Metiram (Polyram Combi)	2* (0)	n.n.	n.n. (1E-06)	n.n.		n.n.

[#] n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

⁴ 4 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

Im E-Screen-Assay wurden die α -, β -, und γ -HCH-Isomere in MCF-7-Zellen und EFM-19-Zellen getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 8 zusammengefasst. In den Abb. 30 und 31 sind die Dosis-Proliferations-Kurven von α - und β -HCH in MCF-7- und EFM-19-Zellen dargestellt.

β -HCH erwies sich in den MCF-7-Zellen als das wirksamste Isomer (RPE= 66 \pm 14 %). Die estrogene Wirksamkeit der beiden anderen Isomere lag um etwa 50 % niedriger (α -HCH: 35 \pm

7%; γ -HCH: 35 ± 13 %). Auch die Messung der Sekretion des pS2-Proteins (siehe VI 2.7) zeigte, daß β -HCH estrogenartig wirkt. Für β -HCH beträgt der EEF $3,1 \cdot 10^{-5}$, für die beiden anderen Isomere liegt der EEF etwa eine Zehnerpotenz niedriger (α -HCH: $1,6 \cdot 10^{-6}$; γ -HCH: $3,5 \cdot 10^{-6}$).

Verglichen mit den MCF-7-Zellen war die estrogenische Aktivität der drei HCH-Isomere in den EFM-19-Zellen wesentlich geringer oder gar nicht meßbar. β -HCH wirkte in den EFM-19-Zellen als schwacher partieller Agonist (RPE= 34 ± 13 %), α - und γ -HCH-Isomere zeigten keine estrogenische Wirkung.

Die Balkendiagramme zeigen, daß die E-Screen-Assays mit den EFM-19-Zellen für die Positivkontrolle (17 β -Estradiol) eine gute Dosis-Wirkungs-Beziehung zeigen, und daß die Zellen estrogenempfindlich sind (der PE für 17 β -Estradiol liegt zwischen 3 und 4). Der Grund für die nicht meßbare estrogenische Wirkung der HCH-Isomere α und γ liegt vermutlich in den unterschiedlichen Eigenschaften der beiden angewandten Zelllinien. Die Zahl der AR und ER ist bei den EFM-19-Zellen und den MCF-7-Zellen unterschiedlich (siehe Einleitung und Diskussion).

2.3.2 Dieldrin und Endosulfan

Dieldrin ist ein insektizides Kontakt- und Fraßgift mit großer Wirkungsbreite. In den Tropen wird es zur Bekämpfung der Anopheles-Mücke und der Tse-Tse-Fliege verwendet. Aufgrund seiner Persistenz ist Dieldrin in der Umwelt global verbreitet und akkumuliert in Nahrungsketten (WHO 1984). In der Bundesrepublik Deutschland sind Dieldrin-haltige Insektizide seit 1971 verboten.

Endosulfan wird gegen beißende und saugende Insekten eingesetzt. In Deutschland wurde es bis 1997 im Ackerbau, Wein- und Obstbau und Weinbau sowie in der Forstwirtschaft eingesetzt. Technisches Endosulfan besteht aus zwei Stereoisomeren (α - und β -Isomer im Verhältnis 7:3). Im Säugerorganismus wird Endosulfan schnell resorbiert, aber auch schnell wieder eliminiert. Endosulfan akkumuliert in marinen Tieren (Naqvi et al. 1993). Bei männlichen Ratten, welchen mit der Nahrung Endosulfan zugeführt wurde, konnte eine Atrophie der Testes beobachtet werden (Gupta & Gupta 1979). Auch eine Abnahme des Gonadotropin- und Testosteronspiegels im Plasma wurde festgestellt (Singh & Pandey 1990).

Die estrogenische Wirkung von Endosulfan und Dieldrin wurde von Soto et al. (1994) im E-Screen-Assay erkannt. Die RPE-Werte bei jeweils 10 μ M betragen für Dieldrin 55 % und für das technische Endosulfan 81 %. Beide Substanzen stimulierten bei 10 μ M die Induktion des pS2-Proteins signifikant.

Simons (1996) wies mit Bindungsassays bei Verwendung von transfektierten Hefen nach, daß Dieldrin und Endosulfan 17 β -Estradiol nur zu 60 % vom ER verdrängen können. Simons geht davon aus, daß 17 β -Estradiol an zwei Bindungsstellen des ER bindet, und daß die beiden Insekti-

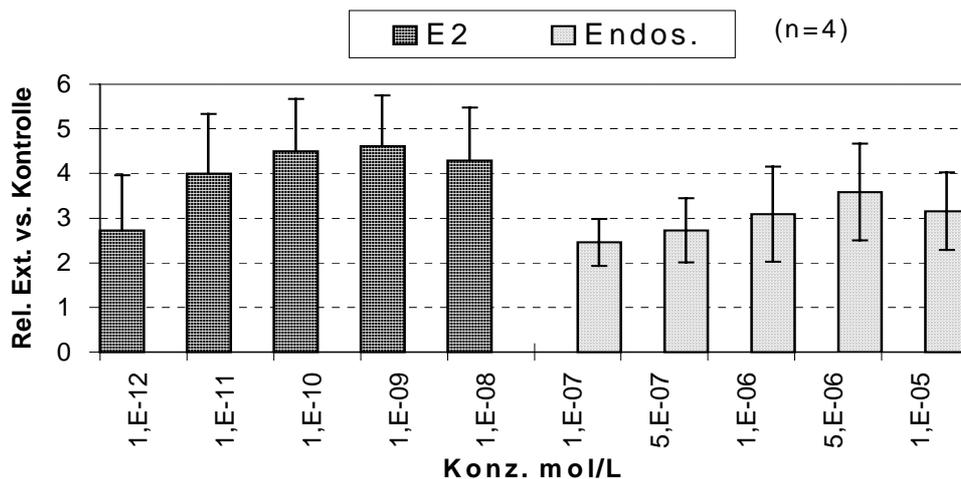
zide nur eine Bindungsstelle haben, und somit nur einen Teil (etwa die Hälfte) des natürlichen Liganden vom ER kompetitiv verdrängen können.

Auch in den von uns durchgeführten E-Screen-Tests mit MCF-7-Zellen war α -Endosulfan ein wirksameres Xenoestrogen als Dieldrin (s. Tab. 8). Die RPE-Werte betragen für α -Endosulfan $68 \pm 7 \%$ und für Dieldrin $56 \pm 3 \%$ (bei einer EC_{100} von jeweils $4 \cdot 10^{-6}$ M). Der EEF-Wert für α -Endosulfan lag bei $9,5 \cdot 10^{-6}$ und für Dieldrin bei $2,4 \cdot 10^{-6}$.

Wie bei den HCH-Isomeren wurden auch für α -Endosulfan und Dieldrin in den EFM-19-Zellen deutlich niedrigere estrogene Aktivitäten gemessen als in den MCF-7-Zellen. Die RPE-Werte lagen etwa 50 % unter denjenigen, die mit den MCF-7-Zellen gemessen wurden.

Aufgrund der hohen Standardabweichungen bei der Berechnung der Proliferations-Mittelwerte für die verschiedenen Konzentrationen war die Berechnung von EEF-Werten in den EFM-19-Zellen sehr ungenau.

MCF-7



EFM-19

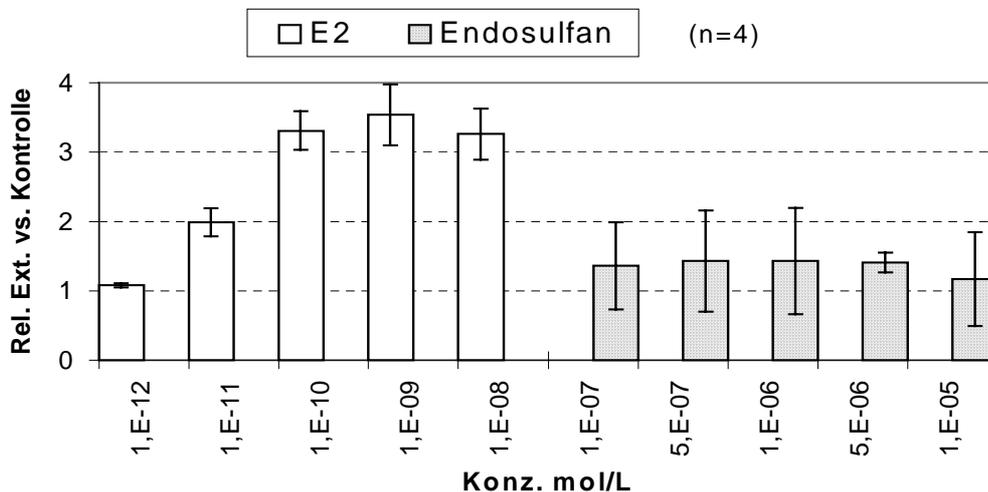


Abb. 32: Dosis-Proliferations-Kurven von α -Endosulfan in MCF-7 und EFM-19-Zellen.

Die Ergebnisse der E-Screen-Experimente mit MCF-7- und EFM-19-Brustkrebszellen deuten darauf hin, daß es bei partiell agonistisch wirkenden Substanzen Unterschiede zwischen beiden Zelllinien gibt. Offensichtlich zeigen partielle ER-Agonisten in MCF-7-Zellen eine stärkere Proliferationswirkung als in EFM-19-Zellen, während volle ER-Agonisten wie 17β -Estradiol (s. VI 1.6), 17α -Ethinylestradiol (VI 2.7) sowie die Phytoestrogene Coumestrol und Genistein (VI 2.6) in beiden Zelllinien bei ähnlichen Konzentrationen die maximal mögliche Zellproliferation induzieren.

Bei gegenwärtigem Kenntnisstand läßt sich für diese Unterschiede noch keine schlüssige Erklärung geben. Der niedrigere ER-Gehalt der EFM-19-Zellen scheint nicht die Ursache zu sein, denn für volle Agonisten ist der Proliferationseffekt in beiden Zelllinien annähernd gleich hoch (vgl. Abb. 18, VI 1.6). Da im E-Screen-Assay die Zellproliferation, d.h. die letztlich resultierende Reaktion der gesamten Zelle auf die Anwesenheit einer Testsubstanz gemessen wird und nicht das Primärereignis, die Bindung an den Estrogenrezeptor, können verschiedene, derzeit noch unbekannte Faktoren in der Signaltransduktionskette der beiden Zelllinien die unterschiedliche estrogene Aktivität der untersuchten Pestizide bewirken.

2.3.3 Atrazin, Simazin, Dimethoat und Metiram

Die Triazin-Herbizide Atrazin und Simazin, das Organophosphat-Insektizid Roxion (Wirkstoff: 36,7 % Dimethoat) sowie das Fungizid Polyram Combi (Wirkstoff: 80 % Metiram) wurden in je zwei unabhängigen Assays in den MCF-7-Zellen getestet. Keine der Substanzen zeigte eine estrogene Wirkung.

Für die Herbizide Atrazin und Simazin wurde eine estrogenartige Wirkung *in vivo* beschrieben (Eldridge et al. 1994). Balaguer et al. (1995) konnten für diese beiden Herbizide bei deren Testung in transfektierten HeLa-Zellen keine transkriptionale Aktivierung des ERE-kontrollierten Reportergens messen. Soto et al. (1995) fanden für die Herbizide Atrazin, Simazin und Propazin bei Testung im E-Screen-Assay ebenfalls keine estrogenartige Wirkung.

Vermutlich wird die estrogenartige Wirkung von Atrazin und Simazin nicht über eine Bindung an den ER bewirkt, sondern auf indirekte Weise über eine Beeinflussung von Biosynthese und/oder Metabolismus des endogenen 17β -Estradiols.

2.4 Phthalate und andere Chemikalien

Phthalsäureester (Di-2-ethylhexylphthalat, DEHP; Di-n-butylphthalat, DBP; Benzyl-n-butylphthalat, BBP) werden in großen Mengen als Weichmacher in PVC und anderen Kunststoffen, u.a. auch in Lebensmittelverpackungen verwendet. Phthalate werden sehr gut inhalativ, oral und dermal resorbiert (EPA 1987). Aufgrund des relativ hohen Dampfdrucks der Phthalate darf deren

inhalative Exposition, z. B. in Autos, nicht vernachlässigt werden (Schäfer et al. 1996). Phthalate können die Plazentaschranke in Säugern passieren (Koch 1989; Sharpe et al. 1995).

BBP wird bei der Herstellung von Vinyl-Bodenbelägen (Linoleum), synthetischem Leder und Lebensmittelverpackungen eingesetzt. DBP wird vorwiegend bei der Herstellung von PVC verwendet (IARC 1982, Autian 1973). In einer englischen Studie wurde 1987 herausgefunden, daß durch den Verzehr von Gemüse, welches in Zellulosefolie verpackt war, täglich 230 µg DBP aufgenommen werden (Ministry of Agriculture 1987). In einer Schokolade, welche in einer Polypropylen-Folie verpackt war, wurden 14 mg/kg DBP gemessen (Ministry of Agriculture 1990).

Nach Soto et al. (1995) wirkt nur BBP estrogenartig. Für DBP und dem am meisten eingesetzten Phthalat DEHP konnte im E-Screen-Assay keine estrogen Wirkung gemessen werden. Durch Messung der Luciferase- und β -Galaktosidase-Aktivität in transfektierten MCF-7-Zellen konnten Jobling et al. (1995) eine estrogen Aktivität für DBP bei 10^{-4} M messen. DEHP aktivierte die transkriptionelle Aktivität nicht. Der bisher einzige positive *in vivo*-Befund zur estrogenartigen Wirkung von Phthalaten hat eine kontroverse Diskussion ausgelöst: Nachdem trächtigen Ratten 1000 µg/L BBP mit dem Trinkwasser verabreicht wurden, zeigten die männlichen Nachkommen eine gerade signifikante Reduktion der Spermienproduktion um 10 - 21% (Sharpe et al. 1995).

Tab. 9: Ergebnisse der Testung von Phthalaten und anderen Chemikalien im E-Screen mit MCF-7-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
DBP	4* (2)	63,1 (10,9)	9E-05	2,4E-05	1,6E-11	6,8E-07
BBP	4 (2)	80,0 (9,4)	3E-05	3,1E-06	1,4E-11	4,5E-06
DEHP	3 (0)	n.n.	n.n. (4E-05)	n.n.		n.n.
MEHP	3 (1)	n.n.	n.n. (1E-05)	n.n.		n.n.
Phenolrot	6 ² (0)	73,9 (13,0)	1E-04	4,4E-06	1,5E-11	3,3E-06
Phenolrot (EFM-19)	3 (0)	112,5 (44,9)	1E-04	1,9E-05	9,4E-12	4,9E-07
Tris-(2-chloroethyl)- phosphat	3 (1)	n.n.	n.n. (1E-05)	n.n.		n.n.
p-Nitrotoluol	4 (0)	n.n.	n.n. (4E-05)	n.n.		n.n.
t-Butylbenzol	2 (0)	n.n.	n.n. (5E-06)	n.n.		n.n.

n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

Für die Testung der Phthalate wurden im E-Screen-Assay nur MCF-7-Zellen eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Tab. 9 zusammengefasst. DEHP und sein primärer Metabolit Mono-2-ethylhexylphthalat (MEHP) sind keine Xenoestrogene (s. auch Abb. 33).

Der von uns für BBP ermittelte relative Proliferationseffekt (RPE) liegt mit 80% nur geringfügig niedriger als der von Soto et al. (1995) erhaltene RPE-Wert 90%. Die EC_{100} beträgt $3 \cdot 10^{-5}$ M oder 8,6 mg/L. Die von Page et al. (1992) gemessenen BBP-Gehalte in der folienverpackten Butter (47,8 mg/kg) liegen somit höher. Auch DBP wirkt in dem von uns etablierten Assay estrogenartig. Bei $9 \cdot 10^{-5}$ M (24,4 mg/L) beträgt der RPE 63%.

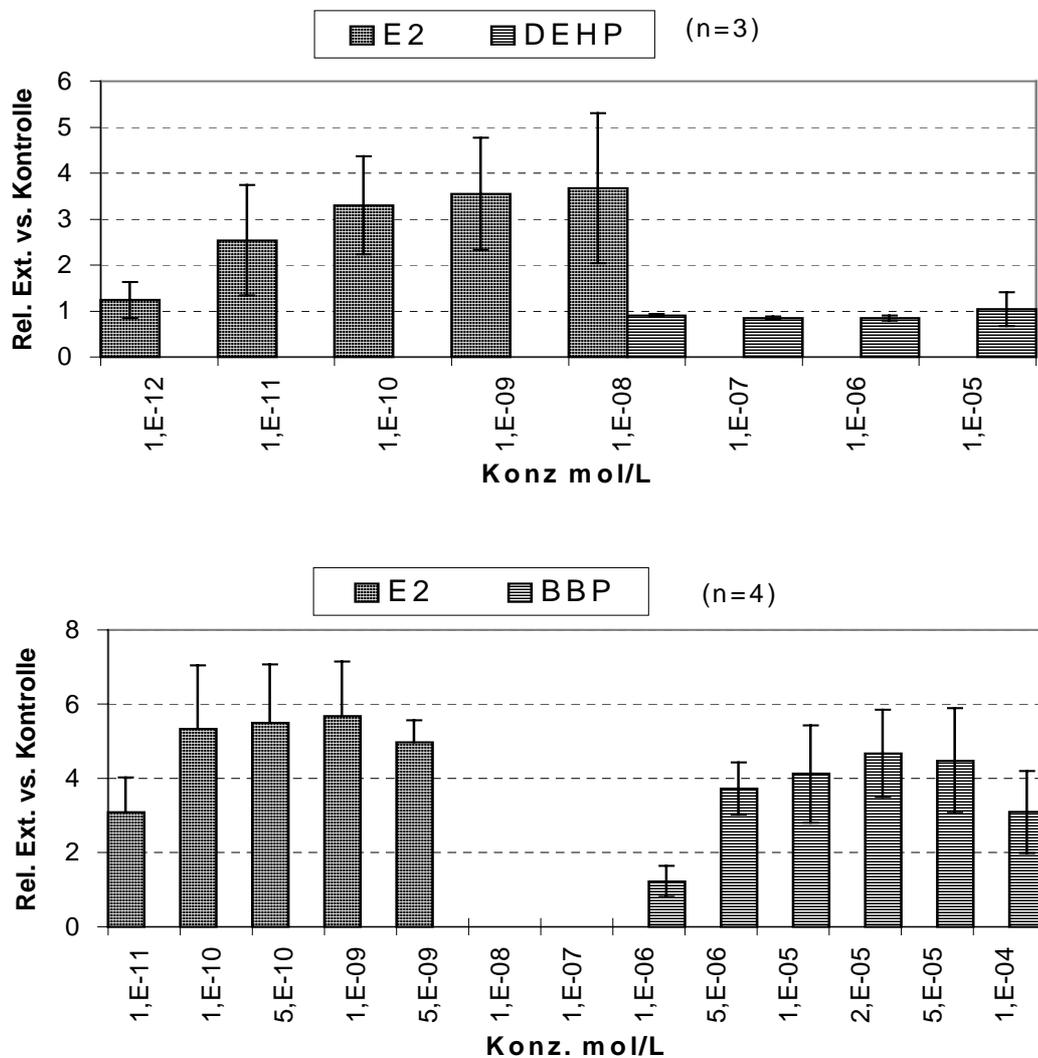


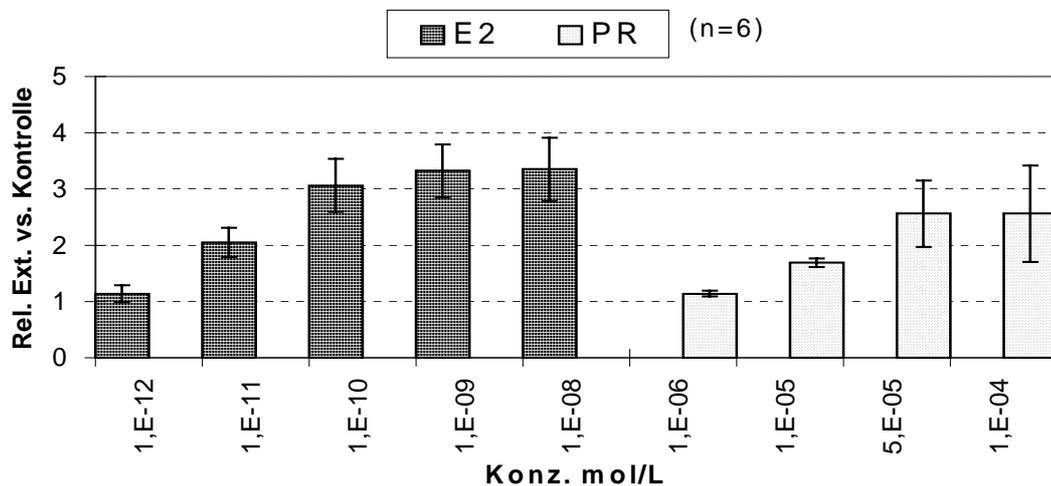
Abb. 33: Dosis-Proliferations-Kurven von DEHP und BBP in MCF-7-Zellen.

Phenolrot, welches als pH-Indikator in fast allen Zellkulturmedien in einer Konzentration zwischen 15 und 45 μM enthalten ist, wirkt estrogenartig (Berthois et al. 1986). Die Autoren zeigten, daß phenolrothaltiges Experimentalmedium (mit CDFCS) die Induktion der Progesteronrezeptoren bewirken kann. Mit Tamoxifen kann der proliferative Effekt von Phenolrot auf die MCF-7-Zellen inhibiert werden.

Um eine Internalisierung der ER (Down-Regulierung) zu vermeiden, sollten die Zellen vor der Zugabe von Testsubstanzen im E-Screen-Assay in einem Medium wachsen, welches keine ER-Agonisten enthält. Dadurch sollten hohe PE-Werte gewährleistet sein. Aus diesem Grund werden in dem von uns etablierten E-Screen-Assay die Zellen in phenolrotfreiem Medium (Experimentalmedium) ausgesät. Nach den 24 Stunden (bzw. 48 Stunden bei den EFM-19-Zellen), die man bis zur Anhaftung der Zellen wartet, ist gewährleistet, daß der größte Teil der ER frei von Liganden ist. Soto (1992) und andere Arbeitsgruppen, welche den E-Screen-Assay anwenden, verwenden für das Aussäen der Zellen Kulturmedium, welches FCS und Phenolrot enthält.

In unserem E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen zeigt Phenolrot (PR) einen RPE von $74 \pm 13 \%$. In den EFM-19-Zellen liegt der RPE-Wert höher. Er beträgt $113 \pm 45 \%$ (vgl. Tab. 9 und Abb. 34). Aufgrund der hohen Standardabweichung ist der Unterschied jedoch schwer zu interpretieren. Die maximale Proliferationswirkung (EC_{100}) wird in beiden Zelllinien bei etwa 10^{-4} mol/L erreicht.

MCF-7



EFM-19

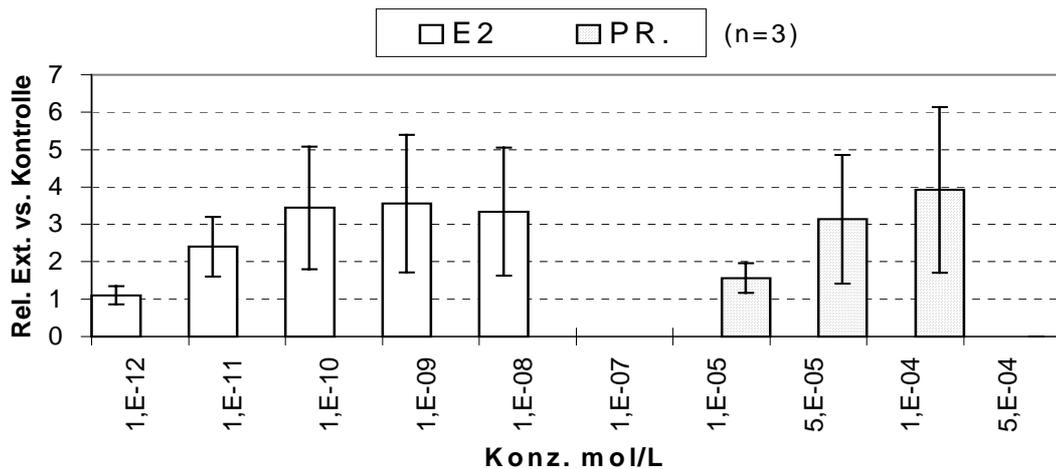


Abb. 34: Dosis-Proliferations-Kurven für Phenolrot (PR) in MCF-7- und EFM-19-Zellen.

Tris-(2-chloroethyl)-phosphat, das als Flammschutzmittel in Matratzen und anderen Textilien breite Verwendung findet, zeigte keinen Effekt im E-Screen. Ebenso wenig waren 4-Nitrotoluol und t-Butylbenzol wirksam.

2.5 Phytoestrogene

Epidemiologische Untersuchungen haben ergeben, daß in Ländern, in denen mit pflanzlichen Lebensmitteln vermehrt sogenannte Phytoestrogene aufgenommen werden, weniger Krebserkrankungen auftreten. Phytoestrogene lassen sich in zwei Hauptgruppen einteilen: Isoflavonoide, die u.a. in Sojaprodukten und anderen Leguminosen vorkommen, und Lignane, welche in Samen, Vollkornprodukten, Gemüse (Kreuzblütler) und in Nüssen vorhanden sind.

Seit 1931 ist bekannt, daß Sojabohnen bis zu 300 mg/100g der Isoflavonoide Diadzein und Genistein enthalten (Walz et al. 1931). Außerdem findet man geringe Mengen Coumestrol (5 µg/100g) (Lookhart et al. 1978). Coumestrol kommt vor allem in Klee und Alfalfa vor.

Untersuchungen mit Mäusen ergaben, daß Coumestrol die Expression des estrogenresponsiblen c-fos-Gens, welches als eines der ersten bei der Mitose exprimiert wird, induziert. Dies ist ein Hinweis dafür, daß Coumestrol estrogenartig wirkt (Mäkelä et al. 1995). Bei weiblichen Schafen in Neuseeland und Australien, die einen hohen Anteil von rotem Klee im Futter hatten, wurden Anovulationen und andere Reproduktionsstörungen beobachtet (Lundh 1995).

Tab. 10: Ergebnisse der Testung von Genistein und Coumestrol im E-Screen mit MCF-7- und EFM-19-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)

Genistein	3 (0)	123 (17,7)	8E-07	1,8E-08	5,1E-12	2,9E-04
Genistein (EFM-19)	3 ² (0)	101 (19,2)	1E-06	3,1E-08	1,7E-11	5,5E-04
Coumestrol	3 (0)	106 (13,7)	5E-07	2,8E-09	4,8E-12	1,7E-03
Coumestrol (EFM-19)	4* (0)	96,6 (8,9)	3E-07	1,0E-08	1,3E-11	1,2E-03

n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

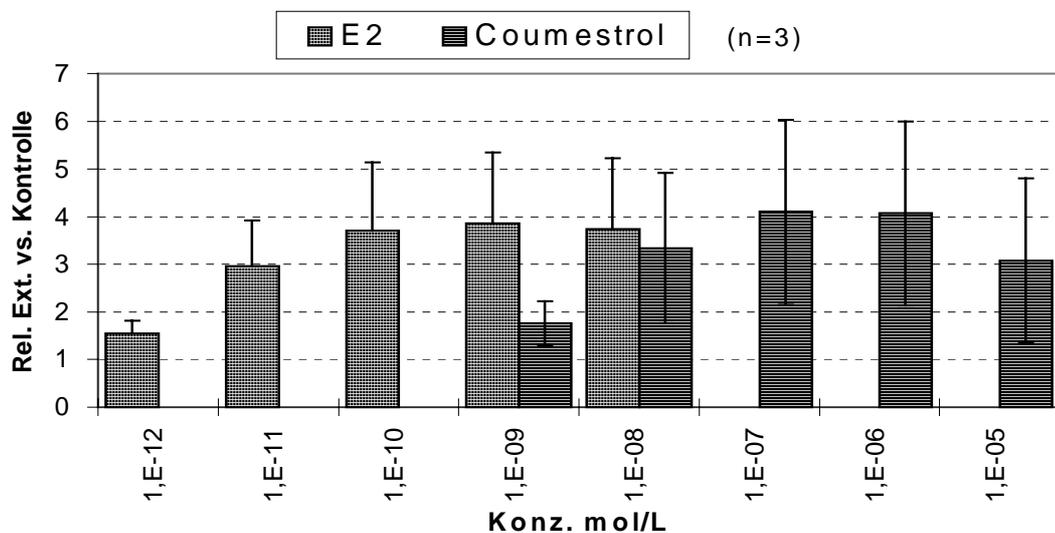
* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

Im Vergleich zu Coumestrol sind die estrogenen Effekte von Genistein spezifischer und weniger umfassend. Neben estrogenen Effekten ist bekannt, daß Genistein auch das Wachstum verschiedener Tumorarten hemmen kann. So wurde durch eine Behandlung neugeborener Mäuse mit Genistein das Ansprechen auf eine chemische Induktion von Mammakarzinomen verzögert (Lamartinière et al. 1995). Hierfür werden verschiedene Mechanismen verantwortlich gemacht, darunter auch eine antiestrogene Wirkung. Genistein inhibiert die Tyrosin-Kinase, welche eine wichtige Rolle bei der Proliferation und Transformation der Zellen spielt (Adlercreutz 1995), und die Expression von Brustkrebsonkogenen bewirkt (Le Cam et al. 1991).

In Hepatozythen-Primärkulturen stimulierten sowohl Genistein als auch Coumestrol die estrogenabhängige Synthese des Vitellogenins. Dieser Effekt konnte durch Tamoxifen wieder inhibiert werden. Die Potenz dieser Phytoestrogene war um drei Größenordnungen kleiner verglichen mit E2 (Pelissero et al. 1993).

MCF-7



EFM-19

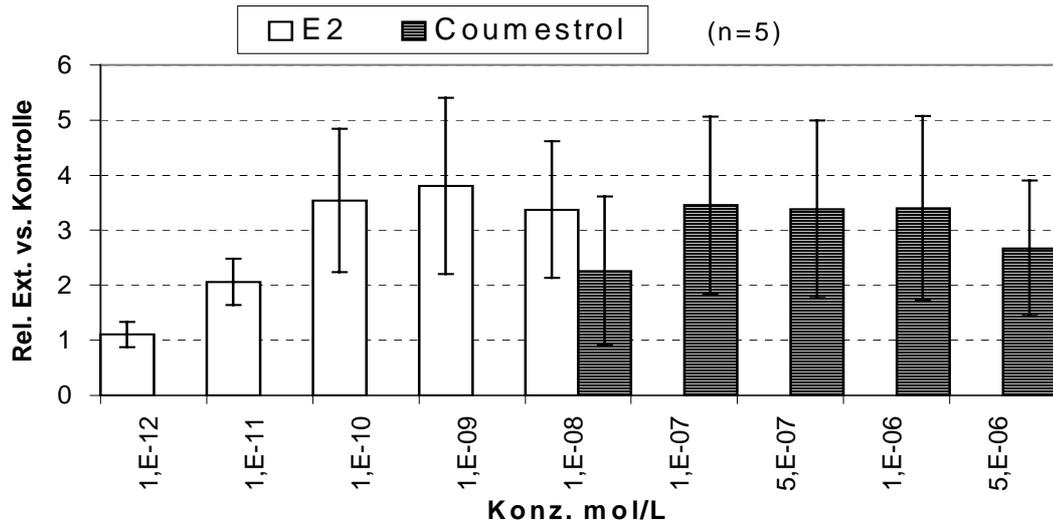
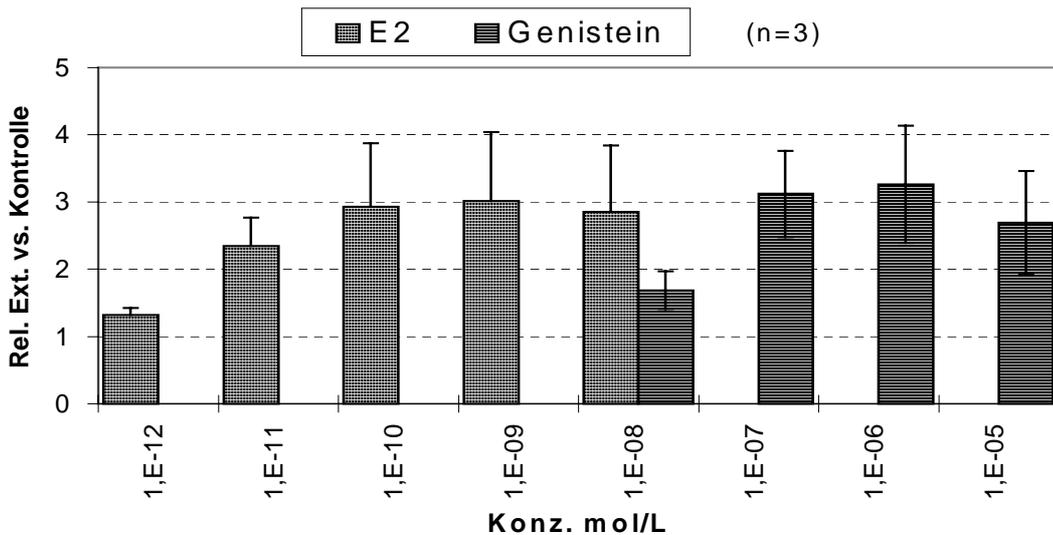


Abb. 35: Dosis-Proliferations-Kurven für Coumestrol in MCF-7- und EFM-19-Zellen.

Coumestrol und Genistein sind sowohl in MCF-7 als auch in EFM-19-Zellen volle ER-Agonisten (vgl. Tab. 10, Abb. 35 und 36). Auch die relative estrogene Potenz (EEF) ist für die zwei Phytoestrogene in beiden Zelllinien sehr ähnlich. Die estrogene Potenz von Coumestrol ist nur drei Größenordnungen schwächer als die von 17β -Estradiol und liegt somit noch um einen Faktor 10 höher als die der stärksten bisher bekannten Xenoestrogene 4-t-Nonylphenol und 4-t-Octylphenol. Die Ergebnisse für Coumestrol entsprechen denjenigen von Soto et al. (1992). Die estrogene Potenz von Genistein war etwas kleiner als die von Coumestrol.

MCF-7



EFM-19

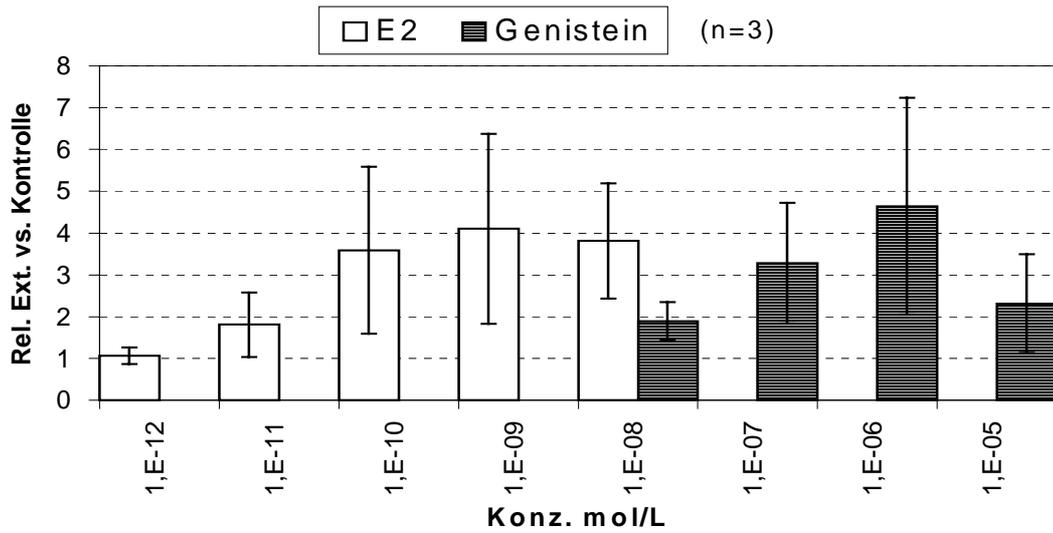
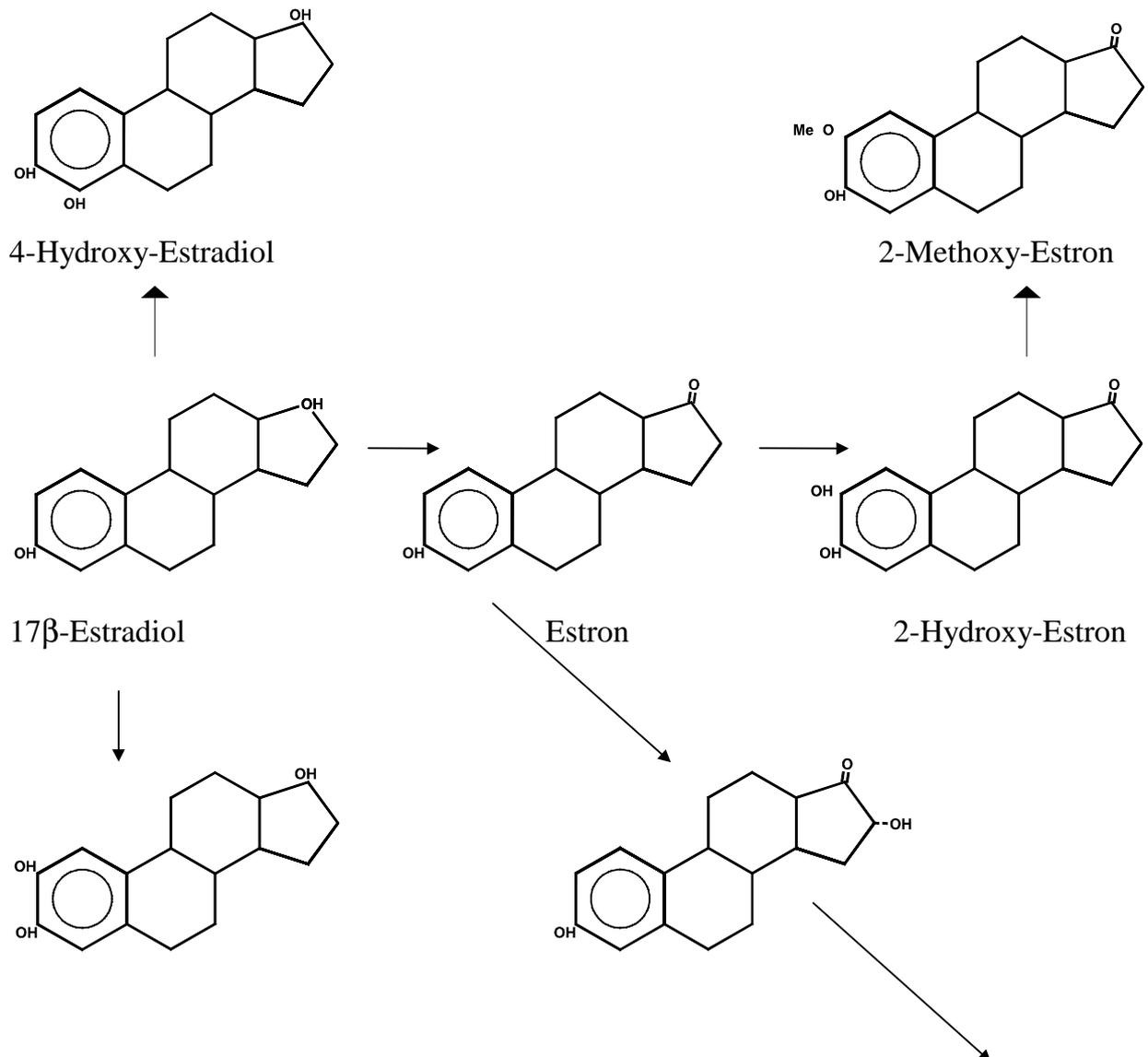
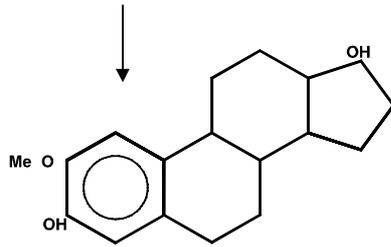
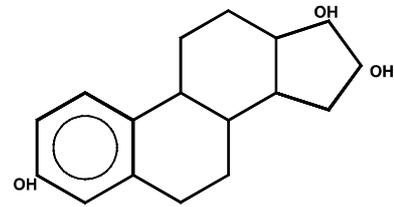


Abb. 36: Dosis-Proliferations-Kurven für Genistein in MCF-7- und EFM-19-Zellen.

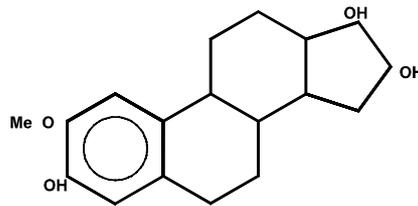
2.6 Metabolite des 17 β -Estradiols



2-Hydroxy-Estradiol

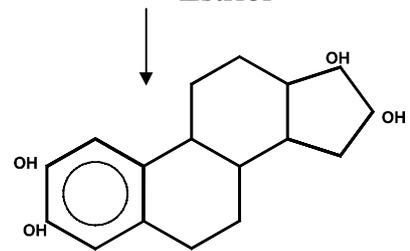
16 α -Hydroxy-Estron

2-Methoxy-Estradiol



2-Methoxyestriol

Estriol



2-Hydroxy-Estriol

Abb. 37: Metabolismus des 17 β -Estradiol.

Das natürliche Estrogen 17 β -Estradiol wird hauptsächlich im Ovar und während der Schwangerschaft in der Plazenta gebildet, außerdem in geringen Mengen in den Nebennieren und beim Mann in den Hoden. 17 β -Estradiol ist für die Ausprägung der weiblichen sekundären Geschlechtsmerkmale verantwortlich und reguliert zusammen mit den Gestagenen fast alle Vorgänge der Reproduktion bei der Frau. Die tägliche Produktion an 17 β -Estradiol beträgt bei der Frau je nach Zyklusphase 24 - 100 μ g. Gegen Ende der Schwangerschaft kann diese Menge auf bis zu 30 mg/Tag ansteigen. Trächtige Stuten scheiden bis zu 100 mg/Tag aus (Turan et al. 1995).

Die Abb. 37 zeigt den Metabolismus des 17 β -Estradiol (E2). Es wird zuerst zu Estron (E1) oxidiert, welches für den weiteren Ablauf eine Schlüsselrolle spielt. Estron kann zu drei weiteren Metaboliten umgewandelt werden, welche sich nur durch die Position der Hydroxylgruppe unterscheiden: zum Catecholestrogen 2-Hydroxyestron (2-OH-E1), zu 16 α -Hydroxyestron (16 α -OH-E1) oder zu 4-Hydroxyestron (4-OH-E1).

Brustkrebsgewebe enthält mehr 16 α -OH-E1 als normales Brustgewebe und nur wenig 2-OH-E1 (Bradlow et al. 1995). In der asiatischen Bevölkerung gibt es weit weniger Brustkrebskrankungen als in den USA und anderen westlichen Industrieländern. Frauen, die aus Asien in die USA eingewandert sind, und sich vorwiegend von Gemüse und Obst ernähren, metabolisieren 17 β -Estradiol zum größten Teil zum 2-Hydroxy-Estron. Der Anteil an gebildetem 16 α -Hydroxyestron ist gering. Demgegenüber zeigen asiatische Frauen, welche sich den amerikanischen Eßgewohnheiten angepaßt haben, viel höhere Plasmaspiegel an 16 α -OH-E1. Da für das 16 α -Hydroxyestron auch genotoxische Wirkungen nachgewiesen wurden (Telang et al.

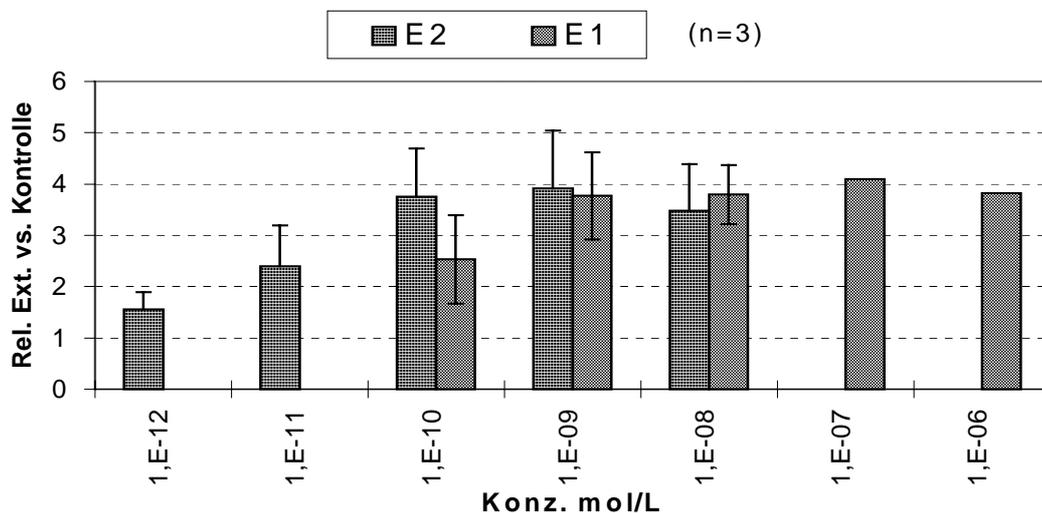
1992) wird dieser E2-Metabolit mit der Entstehung von Brustkrebs in Zusammenhang gebracht (Bradlow et al. 1995).

Die Hydroxylierung des Estron zum 2-Hydroxyestron erfolgt durch Cytochrom P-450-abhängige Monooxygenasen, welche auch alle weiteren Catecholestrogene synthetisiert. Die instabilen Catecholestrogene werden von der Catechol-O-Methyltransferase (COMT) methoxyliert; aus 2-Hydroxyestron wird das stabile 2-Methoxyestron (2-MeO-E1) gebildet. Die COMT ist in jedem gesunden Brustgewebe vorhanden.

Die Ergebnisse aller im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen getesteten Estradiol-Metabolite sind in Tab. 11 zusammengefaßt. Estron (E1) und 16α -Hydroxyestron sind volle ER-Agonisten (s. Abb. 38). Die estrogene Potenz (EEF) ist jedoch im Vergleich zu 17β -Estradiol niedriger. Estron erreicht erst bei einer 60-fach höheren Konzentration den gleichen agonistischen Effekt ($EEF = 1,7 \cdot 10^{-2}$). 16α -OH-E1 ist nochmals um einen Faktor von 10 weniger potent ($EEF = 1,7 \cdot 10^{-3}$). Diese Ergebnisse stimmen mit denjenigen von Soto et al. (1995) überein.

Entsprechend den Ergebnissen von Vandewalle & Lefebvre (1989) zeigte 2-Hydroxyestron im E-Screen-Assay keine Proliferationswirkung (s. Abb. 38).

Das stabile 2-Methoxyestron (2-MeO-E1) hat nach Martucci und Fishman (1979) keine Affinität zum ER und stimuliert nach Vandewalle (1988) die Proliferation der MCF-7-Zellen nicht. Allerdings erwies es sich in unseren E-Screen-Experimenten als schwach potentes Estrogen ($EEF = 1,9 \cdot 10^{-5}$) mit einer partiell agonistischen Wirkung. Der RPE lag bei $53 \pm 9 \%$.



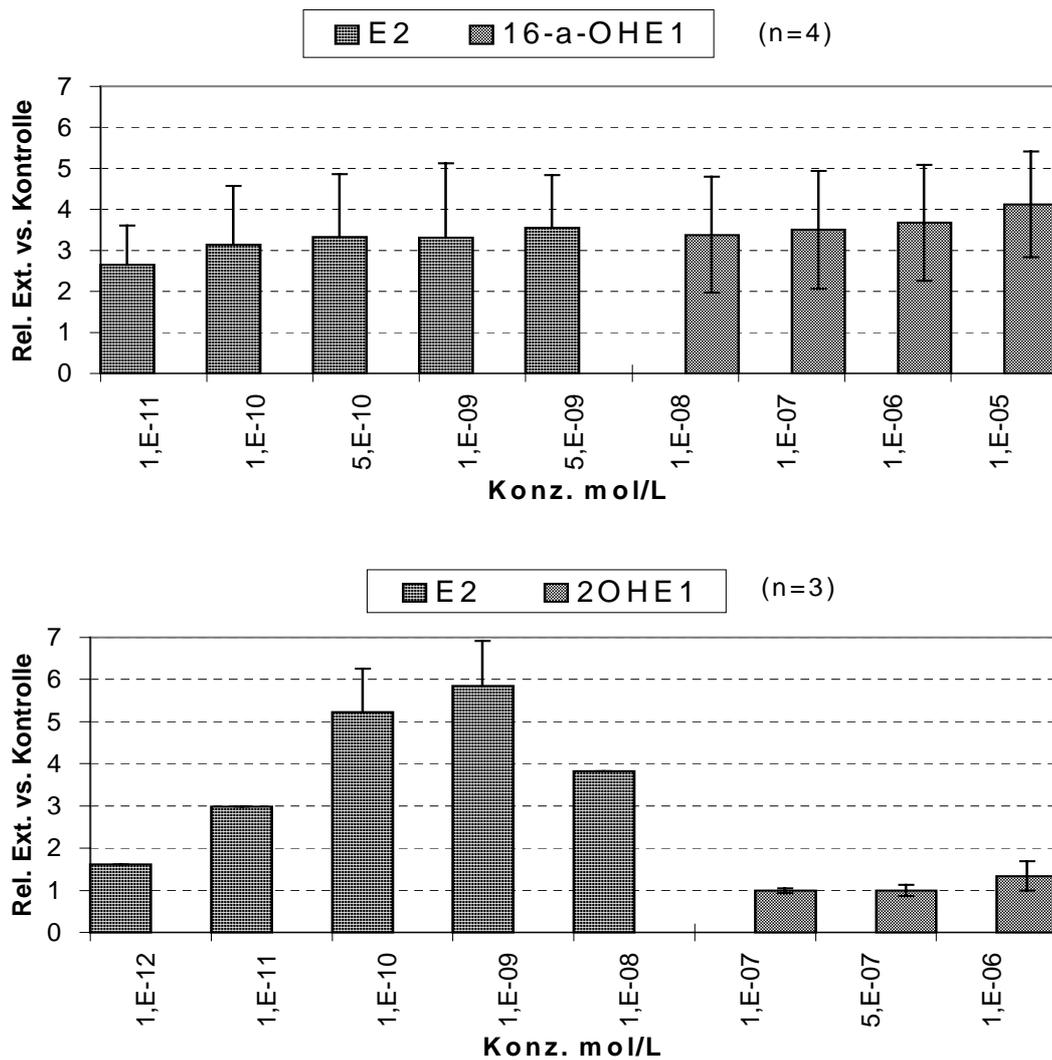


Abb. 38: Dosis-Proliferations-Kurven für Estron (E1), 16 α -OH-E1 und 2-OH-E1 in MCF-7-Zellen.

Aus den Ergebnissen läßt sich folgern, daß das instabile Catecholestrogen 2-Hydroxyestron während der Testung in MCF-7-Zellen nicht methoxyliert wird. Untersuchungen von Ball et al. (1972) zeigten, daß 2-Hydroxyestron die COMT-Aktivität blockieren kann.

4-Hydroxyestron wirkt im E-Screen-Assay als voller ER-Agonist (RPE = 99 \pm 20 %). Die estrogene Potenz liegt mit einem EEF von $1,7 \cdot 10^{-4}$ nahezu 4 Größenordnungen niedriger ist als die von 17 β -Estradiol und um einen Faktor von 10 niedriger als diejenige des 16 α -Hydroxyestron.

Tab. 11: Ergebnisse der Testung von Metaboliten des 17 β -Estradiols im E-Screen mit MCF-7-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
Estron (E1)	3* (0)	111 (16,8)	1E-08	2,9E-10	4,9E-12	0,017
16 α -OH-Estron	4 (3)	105 (10,3)	2E-08	6,0E-09	1,0E-11	0,0017

2-Hydroxyestron	3* (0)	n.n.	n.n. (1E-06)	n.n.		n.n.
2-Methoxyestron	3 ² (0)	52,7 (9,0)	4E-06	3,8E-07	7,3E-12	1,9E-05
4-Hydroxyestron	3* (0)	98,5 (19,5)	7E-07	2,2E-08	3,8E-12	1,7E-04
2-Hydroxyestradiol	3 ² (1)	94,9 (12,9)	4E-07	1,2E-08	3,9E-12	3,2E-04
2-Methoxyestradiol	4 (1)	92,6 (12,1)	4E-07	7,6E-09	6,9E-12	9,1E-04
Estriol (E3)	3* (0)	91,4 (28,6)	7E-09	3,2E-11	6,8E-12	0,21
2-Hydroxyestriol	3 (1)	71,0 (4,2)	7E-06	7,2E-07	8,4E-12	1,2E-05
2-Methoxyestriol	4 (0)	81,6 (29,6)	4E-06	4,4E-07	1,5E-11	3,5E-05

n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

Die Hydroxylierung von 17β -Estradiol führt zur Bildung von 2-Hydroxyestradiol (2-OH-E2) oder 4-Hydroxyestradiol (4-OH-E2). Schütze et al. (1993) zeigten, daß beide Metabolite in MCF-7-Zellen die Proliferation induzieren; der proliferative Effekt relativ zu 17β -Estradiol betrug für 2-OH-E2 36 % und für 4-OH-E2 76 %. Durch Methoxylierung entsteht aus dem 2-OH-E2 das 2-Methoxyestradiol (2-MeO-E2). Dieser stabile Metabolit inhibiert *in vitro* die Angiogenese und verhindert die Proliferation von Endothelzellen. Oral appliziert kann 2-MeO-E2 bei Mäusen das Tumorstadium inhibieren (Fotsis et al. 1994).

In unserem E-Screen-Assay wurden 2-Hydroxyestradiol und 2-Methoxyestradiol getestet. Beide Estradiol-Metabolite wirkten als volle ER-Agonisten (Tab. 11). Die estrogenische Potenz war 3 - 4 Größenordnungen schwächer als die von 17β -Estradiol; 2-MeO-E2 war etwas stärker potent als 2-OH-E2.

Aufgrund der Untersuchungen von Schütze et al. (1993) sollte 2-OH-E2 nur als schwacher partieller Agonist wirken. Möglicherweise wurde 2-OH-E2 nach Zugabe zu den MCF-7-Zellen von der COMT zu 2-MeO-E2 methoxyliert. Eine andere Erklärung wäre, daß das von Schütze et al. selbst hergestellte 2-OH-E2 einen anderen Reinheitsgrad aufwies als das von der Firma Sigma hergestellte, welches in unseren Experimenten eingesetzt wurde.

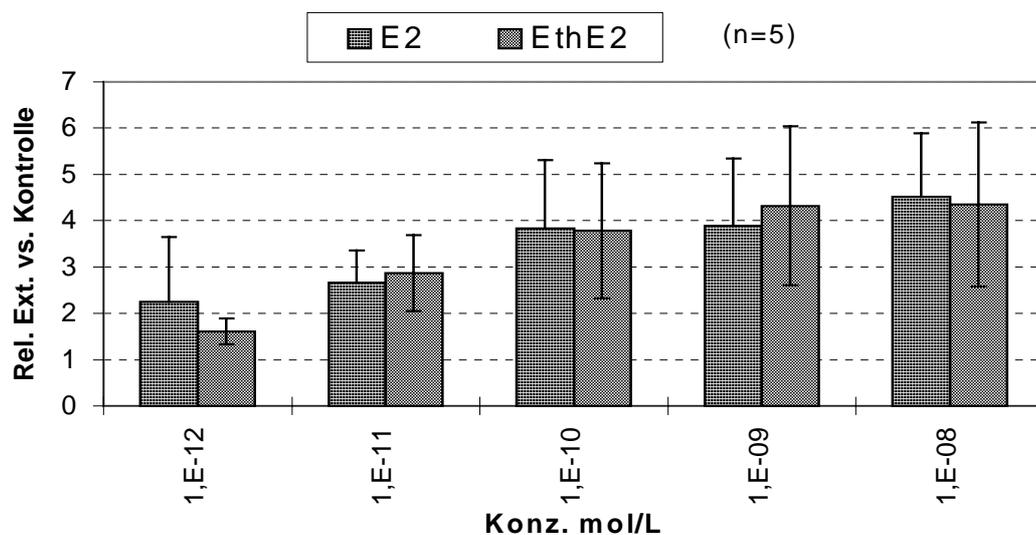
16α -Hydroxyestron wird im Organismus zu Estriol (E3) metabolisiert (s. Abb. 37). Während der Schwangerschaft scheidet eine Frau täglich über den Urin etwa 20 mg Estriol aus, gleichzeitig werden vom 17β -Estradiol täglich nur 260 μ g ausgeschieden (Fotsis et al. 1980, 1987). Bei wiederholter Applikation wirkt Estriol im Tiermodell als voller ER-Agonist (Martin et al. 1976).

In unserem E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen wirkt Estriol als voller ER-Agonist (s. Tab. 11). Die estrogenere Potenz ist nur etwa einen Faktor 5 niedriger als die von 17β -Estradiol (EEF = 0,21). Soto et al. (1995) erhielten in ihrem E-Screen-Test für Estriol einen EEF von 0,1. Somit zeigt Estriol von allen getesteten Estradiol-Metaboliten die stärkste estrogenere Potenz im E-Screen-Assay.

Durch Hydroxylierung entsteht aus Estriol das 2-Hydroxyestriol (2-OH-E3), welches weiter zu 2-Methoxyestriol (2-MeO-E3) methoxyliert werden kann. Im E-Screen wirkten beide Metabolite als starke partielle Agonisten; die RPE-Werte lagen bei $71 \pm 4 \%$ bzw. $82 \pm 30 \%$. Die estrogenere Potenz (EEF) war jeweils fast 5 Größenordnungen geringer als die vom 17β -Estradiol.

2.7 Synthetische Estrogene

Weil das natürliche 17β -Estradiol im Organismus schnell metabolisiert wird, ist es nach oraler Applikation nur schwach wirksam. Viel stabilere und damit biologisch aktivere Verbindungen wurden durch die Einführung einer Ethinylgruppe in Position 17α des Estradiolmoleküls hergestellt. 17α -Ethinylestradiol (EE2) und 17α -Ethinylestradiol-3-Methylether (Mestranol) sind die synthetischen Estrogenkomponenten der oralen Kontrazeptiva, die am meisten verwendet werden. Durch die Einführung der Ethinylgruppe wird der D-Ring gegen Oxidation stabilisiert. Estron kann hier nicht gebildet werden. Als Folge davon wird Ethinylestradiol bis zu 80 % unverändert in konjugierter Form mit dem Urin ausgeschieden (Ranney 1977) und gelangt in dieser Form über das Abwasser in die Kläranlagen. Mestranol selbst ist nicht estrogen wirksam. Durch O-Demethylierung am C3-Atom wird im Organismus jedoch das 17α -Ethinylestradiol gebildet.



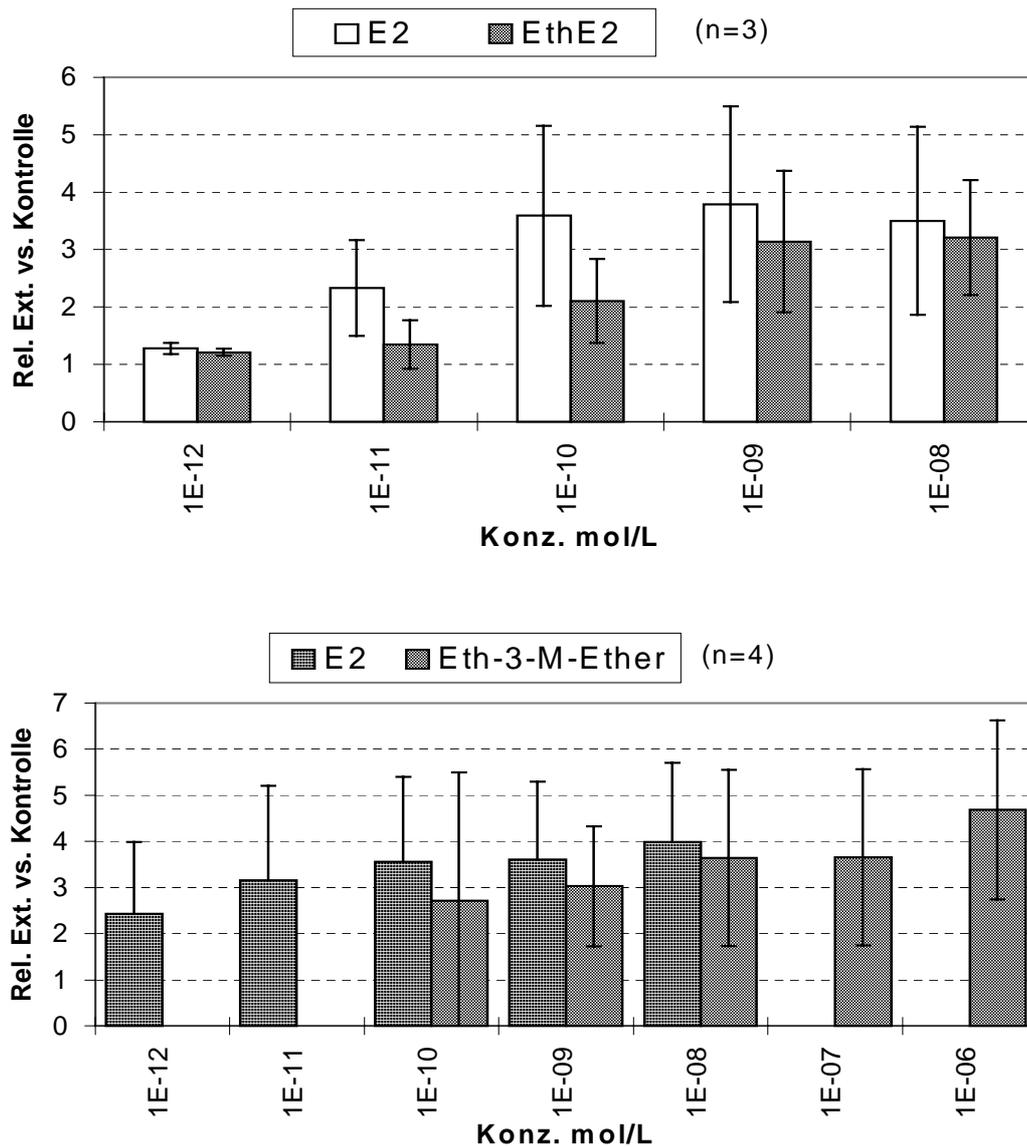


Abb. 39: Dosis-Proliferations-Kurven für 17α -Ethinylestradiol und Ethinylestradiol-3-Methylether in MCF-7 und EFM-19-Zellen.

Sowohl 17α -Ethinylestradiol als auch Mestranol wirken in den MCF-7-Zellen als volle ER-Agonisten (s. Tab. 12 und Abb. 39). Dies ist ein Beweis, daß die MCF-7-Zellen in der Lage sind, eine O-Demethylierung des 17α -Ethinylestradiol-3-Methylethers zu katalysieren. Die estrogenere Potenz von 17α -Ethinylestradiol ist etwa gleich der von 17β -Estradiol, was dem von Soto et al. (1995) publizierten Ergebnis entspricht. Mestranol (Eth-E2-3-Met.-Ether) hat eine fast 100mal geringere estrogenere Potenz als 17β -Estradiol (EEF = 0,014).

In den EFM-19-Zellen zeigt 17α -Ethinylestradiol einen etwas geringeren proliferativen Effekt und eine etwas schwächere estrogenere Potenz (Tab. 12). Die großen Standardabweichungen erschweren jedoch die Interpretation der Ergebnisse.

Tab. 12: Ergebnisse der Testung von synthetischen Estrogenen im E-Screen mit MCF-7- und EFM-19-Zellen.

Substanz	n (m) [#]	RPE (E2=100%)	EC ₁₀₀ (mol/L)	EC ₅₀ (mol/L)	EC ₅₀ (E2) (mol/L)	EEF (E2 = 1)
17 α -Ethinylestradiol	5* (1)	102 (13,7)	1E-09	8,1E-12	7,9E-12	0,98
EE2 (EFM-19)	3 (0)	83,8 (37,6)	1E-09	3,1E-11	8,3E-12	0,27
Mestranol	4 ² (0)	99,8 (13,9)	2E-07	6,1E-10	8,2E-12	0,014

[#] n = Gesamtzahl der unabhängigen E-Screen-Einzelexperimente, m = Zahl der Einzelexperimente mit Auswertung durch MTT-Assay

* 1 E-Screen-Assay wurde in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

² 2 E-Screen-Assays wurden in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt

2.8 Induktion der estrogenabhängigen Sekretion des pS2-Proteins

Zusätzlich zur Messung der Zellproliferation kann als spezifischer Endpunkt für die estrogenen Wirkung einer Substanz im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen die Synthese und Sekretion der 34 kDa und 52 kDa Proteine Kathepsin D und Prokathesin D sowie des 7 kDa Proteins pS2 bestimmt werden (Mayer et al. 1992; Krishnan et al. 1993). Diese Proteine werden von den MCF-7-Zellen in das Kulturmedium abgegeben und können mit kommerziellen radioimmunometrischen Assays detektiert werden. 17 β -Estradiol und Xenöestrogene bewirken in MCF-7-Zellen einen signifikanten Anstieg der Sekretion des pS2-Proteins in das Kulturmedium (Soto et al. 1995; Villalobos et al. 1995). Die auf Zellzahl normierte pS2-Menge ist somit ein empfindlicher und spezifischer Endpunkt einer estrogenen Wirkung.

Aufgrund der hohen Kosten der Kits zur pS2-Bestimmung konnte nur eine begrenzte Zahl von Kulturmedien-Proben aus den E-Screen-Assays für ausgewählte Testsubstanzen analysiert werden. Anhand der aus den gemessenen Extinktionen berechneten Zellzahlen des E-Screen-Assays wird die gemessene pS2-Menge auf die Zellzahl normiert und in ng/1 Mio. Zellen ausgedrückt.

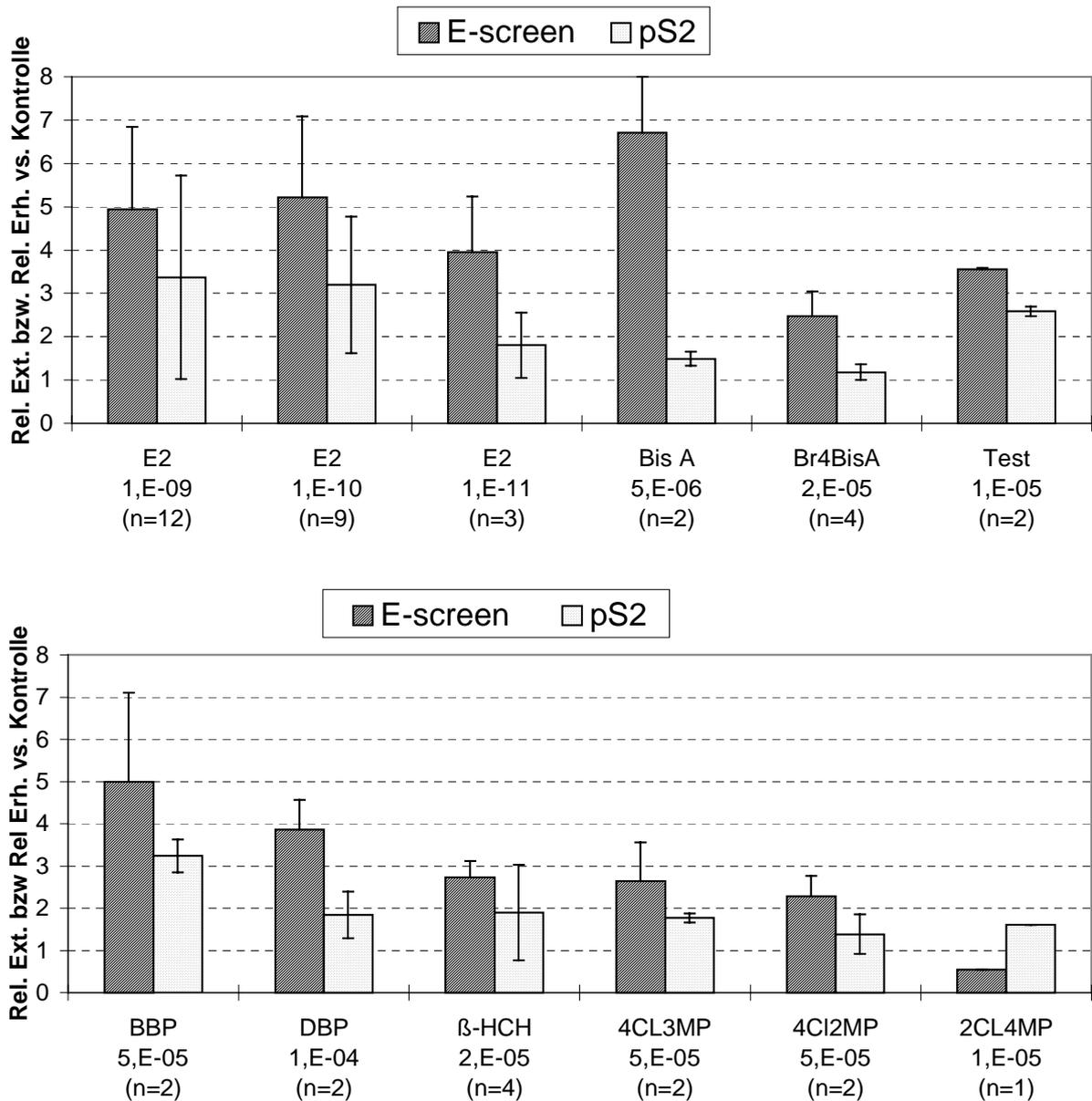


Abb. 40: Vergleich der im E-Screen-Assay gemessenen Proliferationseffekte mit der auf die Zellzahl normierten pS2-Menge, jeweils bezogen auf die hormonfreie Negativkontrolle.

Abb. 40 zeigt die relative Erhöhung der pS2-Menge für E2 bzw. für die untersuchten Xenöstrogene gegenüber den pS2-Mengen, welche in den entsprechenden Negativkontrollen gemessen wurden. Für jede Konzentration einer Testsubstanz wurde das pS2-Protein im Kulturmedium in zwei von vier Wells eines E-Screen-Assays gemessen. Angegeben sind jeweils Mittelwert und Standardabweichung der pS2-Mengen aus n unabhängigen E-Screen-Experimenten. Zum Vergleich ist für jede Substanz die in den zugehörigen E-Screen-Assays gemessene relative Proliferation angegeben.

Bei allen acht untersuchten Substanzen, die im E-Screen-Assay als volle oder partielle Agonisten die Zellproliferation stimulierten, war die Proliferationserhöhung der MCF-7-Zellen von einer erhöhten Sekretion des pS2-Proteins begleitet. Auch für Br4BisA und die beiden 4-Chlorkresole war die normierte pS2-Menge signifikant erhöht. Dies ist ein weiterer Beweis dafür, daß die

untersuchten Substanzen mit dem Estrogenrezeptor in Wechselwirkung treten und über eine Aktivierung des ER die Zellvermehrung auslösen.

Allerdings war der im E-Screen erzielte Proliferationseffekt stets größer als die von der gleichen Konzentration ausgelöste relative Erhöhung der pS2-Menge. 17 β -Estradiol zeigte bei den drei gemessenen Konzentrationen (10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} M) eine Dosisabhängigkeit der pS2-Menge.

Die für 10 μ M Testosteron (Test) gemessene deutliche Erhöhung der pS2-Menge sind ein Beweis, daß die proliferierende Wirkung ER-vermittelt ist und deshalb nur durch metabolische Konversion zu einem Estrogen (Aromatisierung durch die Cytochrom P-450 abhängige Monooxygenase zum Estron) zustande kommen kann.

3 Testung von Substanzgemischen

Ein zentrales Ziel dieses Forschungsprojektes war es, ein Screening-System zu etablieren, mit dem estrogenartige Aktivitäten in Umweltproben **quantitativ** bestimmt werden können. Um das Konzept der Estradiol-Äquivalenzfaktoren anwenden zu können, d.h. die gemessene estrogen Aktivität im Probenextrakt quantitativ auf die estrogen Wirkung einer Referenzsubstanz (17 β -Estradiol) beziehen zu können, muß die Bedingung erfüllt sein, daß sich in Gemischen die estrogen Wirkung der einzelnen Stoffe **additiv** verhält.

Um dies für unseren modifizierten E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen zu verifizieren, führten wir Experimente mit zwei verschiedenen Gemischen von jeweils drei estrogen wirksamen Substanzen durch.

Gemisch 1 enthielt äquimolare Konzentrationen (50 nM) der drei vollständigen ER-Agonisten 4-t-Octylphenol, 4-t-Nonylphenol (techn.) und Bisphenol-A. Die gewählte Konzentration lag für die Einzelsubstanzen an oder wenig über der Wirkungsschwelle (s. Abb. 41a). Im Gemisch wirkten die drei Stoffe additiv; der ausgelöste Proliferationseffekt (Mittelwert aus vier unabhängigen Einzelexperimenten) entsprach nahezu dem rechnerisch erwarteten (Addition der PE-Werte der Einzelsubstanzen).

Im zweiten Ansatz wurden zwei partielle ER-Agonisten (2 μ M Benzyl-n-butylphthalat und 1 μ M 4-Hydroxybiphenyl) zusammen mit 50 nM Bisphenol A getestet. Gemisch 2 enthielt also die beiden partiellen Agonisten insgesamt im 60-fachen molaren Überschuß im Vergleich zum vollen Agonisten. In diesem Gemisch wirkten die drei estrogenen Stoffe annähernd additiv; der ausgelöste PE blieb etwas unter dem theoretisch zu erwartenden Wert (s. Abb. 41b).

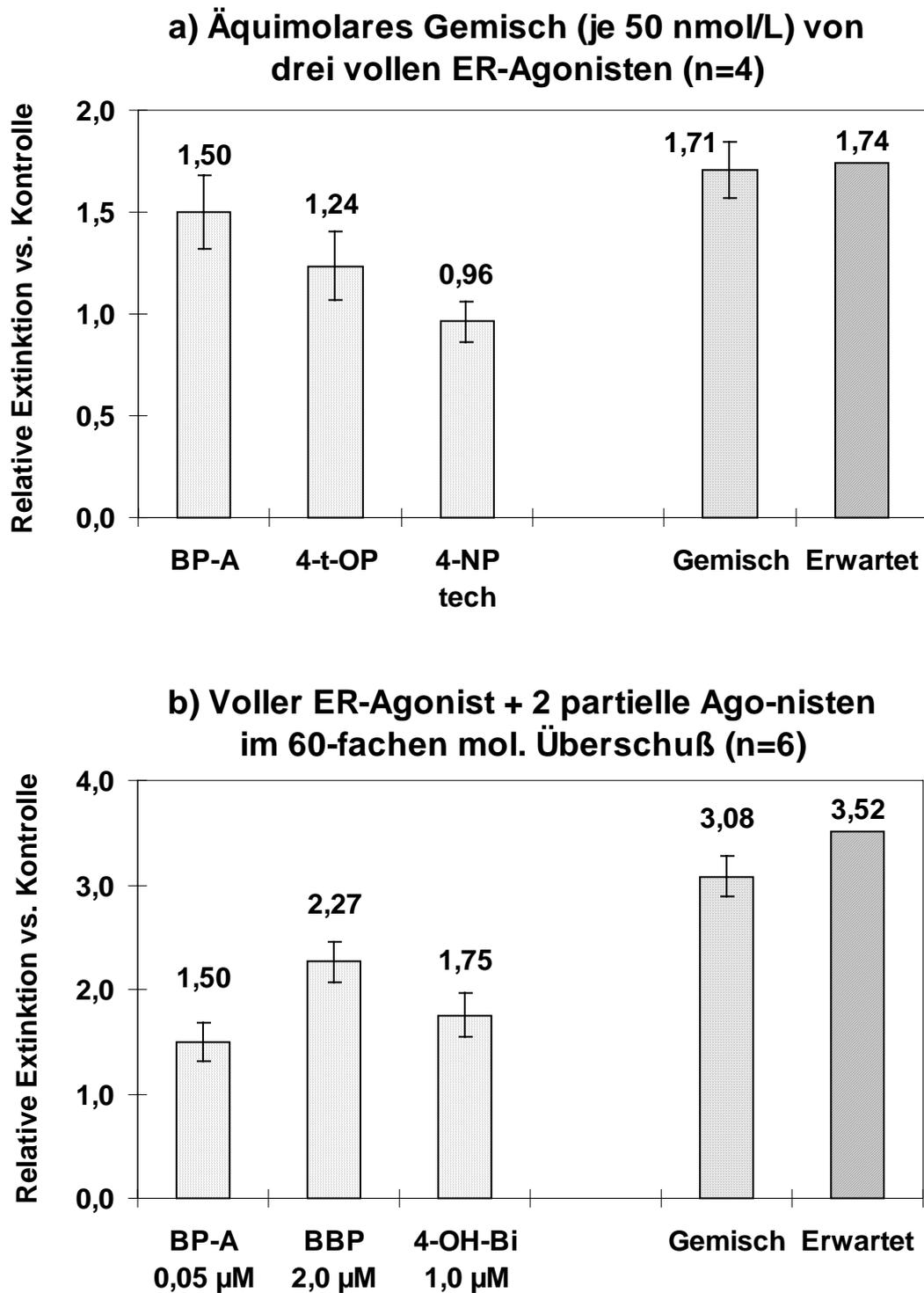


Abb. 41: Estrogene Aktivität von zwei ternären Gemischen im Vergleich zur Wirkung der Einzelsubstanzen im modifizierten E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus vier bzw. sechs unabhängigen Experimenten. Gemessen wurde die Extinktion bei 550 nm (Referenz 630 nm) nach SRB-Färbung der Zellen.

Die Ergebnisse der E-Screen-Experimente mit zwei ternären Gemischen belegen also das **additive** Verhalten der estrogenen Wirkung von Einzelsubstanzen im Gemisch. Der beobachtete schwache Antagonismus in Gemisch 2 steht im Einklang mit der rezeptorvermittelten Wirkung,

denn grundsätzlich sind bei allen Wirkungen von mehreren Stoffen am gleichen Rezeptor bei ausreichend hohen Konzentrationen auch antagonistische Effekte zu erwarten. So ist von verschiedenen Ah-Rezeptor-vermittelten Wirkungen der polychlorierten Dibenzo-p-dioxine bekannt, daß in einem Gemisch, das neben vollständigen Agonisten einen großen Überschuß des partiellen Agonisten Octachlordibenzo-p-dioxin enthält, schwache antagonistische Effekte des partiellen Agonisten zu beobachten sind (Schrenk et al. 1991).

Mit dem E-Screen-Assay testeten Soto et al. (1994; 1995) ein Gemisch von zehn Xenoestrogenen (Pestizide und Biphenyle), welche einzeln partiell agonistisch wirken, in MCF-7-Zellen. Die eingesetzten Konzentrationen (1 μM) waren jeweils um den Faktor 10 kleiner als die minimale Konzentration mit maximaler Wirkung. Im Gemisch zeigten die Substanzen bezüglich des proliferativen Effektes ein additives Verhalten. Die Ergebnisse zeigten aber auch, daß ein Gemisch mit einer größeren Zahl von estrogenartigen Substanzen eine estrogenische Wirkung auslösen kann, selbst wenn die Konzentrationen der einzelnen Substanzen unterhalb oder an der Wirkungsschwelle liegen.

Überadditive (synergistische) Wirkungen von Xenoestrogenen konnten bisher nicht belegt werden. Arnold et al. berichteten 1996 über einen starken Synergismus von binären Gemischen der estrogen wirksamen Organochlorinsektizide Dieldrin, Endosulfan, Toxaphen und Chlordan auf die transkriptionale Aktivierung eines ERE-kontrollierten Reportergens in transfektierten Hefezellen. Da diese Ergebnisse von den Autoren und anderen Arbeitsgruppen nicht reproduzierbar waren, wurde die Veröffentlichung zurückgezogen (McLachlan 1997).

Die eigenen Ergebnisse stellen somit zusammen mit den Literaturdaten eine ausreichende Datenbasis dar, um den E-Screen-Assay mit brauchbarer Genauigkeit zur quantitativen Bestimmung der estrogenen Aktivität in Extrakten diverser Umweltproben anwenden zu können. Das Konzept der Estradiol-Äquivalenzfaktoren (EEF) läßt sich auf Umweltproben übertragen und der Gesamtgehalt an estrogenartig wirkenden Stoffen in einem Extrakt als 17 β -Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ) ausdrücken.

4 Untersuchung von aquatischen Umweltproben

Um flüssige oder feste Proben mit Hilfe eines Biotests auf bestimmte organische Stoffen zu untersuchen, muß ebenso wie bei jedem Verfahren der chemischen Spurenanalytik zunächst deren Extraktion erfolgen. Bei der Extraktion sollen die interessierenden Verbindungen möglichst quantitativ aus der Probenmatrix herausgelöst und im Extrakt angereichert werden. Für die Extraktion von un- bis semipolaren Substanzen sind organische Lösungsmittel notwendig. Aufgrund der Zytotoxizität der Lösungsmittel können die Extrakte aber nicht direkt in die Zellkultur gegeben werden. Im allgemeinen gilt für Kulturen von Säugerzellen, daß die Lösungsmittelkonzentrationen im Zellkulturmedium nicht über 0,1 % liegen sollen. Folglich müssen vor der

Testung die Extrakte mit Kulturmedium mindestens 1000-fach verdünnt werden. Damit aber die interessierenden Substanzen dennoch in ausreichend hohen Konzentrationen vorliegen, müssen die Extrakte zunächst auf ein sehr kleines Volumen (50 - 100 µl) eingeeengt werden (Abblasen im Stickstoffstrom oder Vakuumkonzentrator). Ein vollständiges Entfernen des Lösungsmittels sollte vermieden werden, da sonst Verluste von Substanzen durch Verflüchtigung nicht auszuschließen sind. Um dies mit Sicherheit zu verhindern, setzen wir dem Extrakt vor dem Entfernen des Lösungsmittels eine kleine Menge (50 µl) eines hochsiedenden Solvens zu (Dimethylsulfoxid oder n-Tetradecan), welches die im Extrakt enthaltenen Substanzen zurückhält.

Außerdem sollte das zurückbleibende Solvens neben einem guten Lösungsvermögen für lipophile Substanzen auch im wäßrigen Kulturmedium löslich sein. Hierzu bieten sich Dimethylsulfoxid (DMSO) oder Ethanol an, die sich als Lösungsmittel für die Testung von Einzelsubstanzen bewährt haben.

Verwendet man als Verdunstungsschutz n-Tetradecan, so ist nach dem Einengen ein Zusatz von 50 µl Ethanol als Lösungsvermittler notwendig; bei Benutzung von DMSO kann direkt mit Kulturmedium verdünnt werden.

4.1 Quantifizierung und Nachweisgrenzen

Zur Quantifizierung des Gesamtgehaltes an estrogenartig wirkenden Substanzen in einem Extrakt nimmt man an, daß sich die estrogene Wirkung der einzelnen Stoffe in der Probe additiv verhält (s. VI 3). Aus den EC_{50} -Werten der Probe und der Positivkontrolle 17 β -Estradiol läßt sich dann die **Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ)** direkt berechnen:

- Bei **festen** Proben (z.B. Sediment) ist die Estradiol-Äquivalentkonzentration (EEQ) der Quotient aus den EC_{50} -Werten von E2 und dem Extrakt der Probe:

$$EEQ = EC_{50} (E2) / EC_{50} (Probe) \quad [pmol/g \text{ TS oder } ng/g \text{ TS}]$$

Die EC_{50} von Estradiol hat die Einheit pmol/L oder ng/L Kulturmedium, die EC_{50} einer festen Probe die Einheit g TS/L Medium, sodaß sich für die EEQ die Einheit pmol/g TS bzw. ng/g TS ergibt.

- Bei Extrakten von **flüssigen** Proben stellt der EC_{50} -Wert keine Konzentration dar, sondern entspricht dem Verdünnungsvolumen, bei dem 50 % des Proliferationseffekts erreicht werden. Das Produkt aus dem entsprechenden Verdünnungsfaktor (dimensionslos) und der EC_{50} der Positivkontrolle ergibt dann die E2-Äquivalente (EEQ) in der Probe in pmol EEQ/L oder ng EEQ/L.

$$EEQ = EC_{50} (E2) * EC_{50} (Probe) \quad [pmol/L \text{ oder } ng/L]$$

Am Beispiel einer Wasserprobe der Körsch soll dies veranschaulicht werden (s. Abb. 42). Die Log-Probit-Transformation der Konzentrations-Proliferations-Kurve des E-Screen-Assays vom 30.9.1997 ergab für die Körschwasserprobe für die EC_{50} ein Verdünnungsvolumen von 2,59 L. Die Division durch das Probevolumen (1,5 L) ergab den zugehörigen Verdünnungsfaktor von 1,73. Die EC_{50} für die Positivkontrolle 17β -Estradiol betrug $6,32E-12$ mol/L. Daraus errechnet sich durch Produktbildung ein **EEQ-Wert** von $1,1E-11$ mol/L bzw., nach Multiplikation mit dem Molekulargewicht von 17β -Estradiol, von **3,0 ng/L**.

Der relative Proliferationseffekt (RPE) der Körschwasserprobe errechnet in diesem Fall nach der Formel

$$\text{RPE} = [\text{PE-1 (Testsubstanz)} / \text{PE-1 (E2)}] * 100 \%$$

$$\text{RPE} = (4,25-1) / (5,85-1) = 3,25 / 4,85 = 0,67 = 67 \%$$

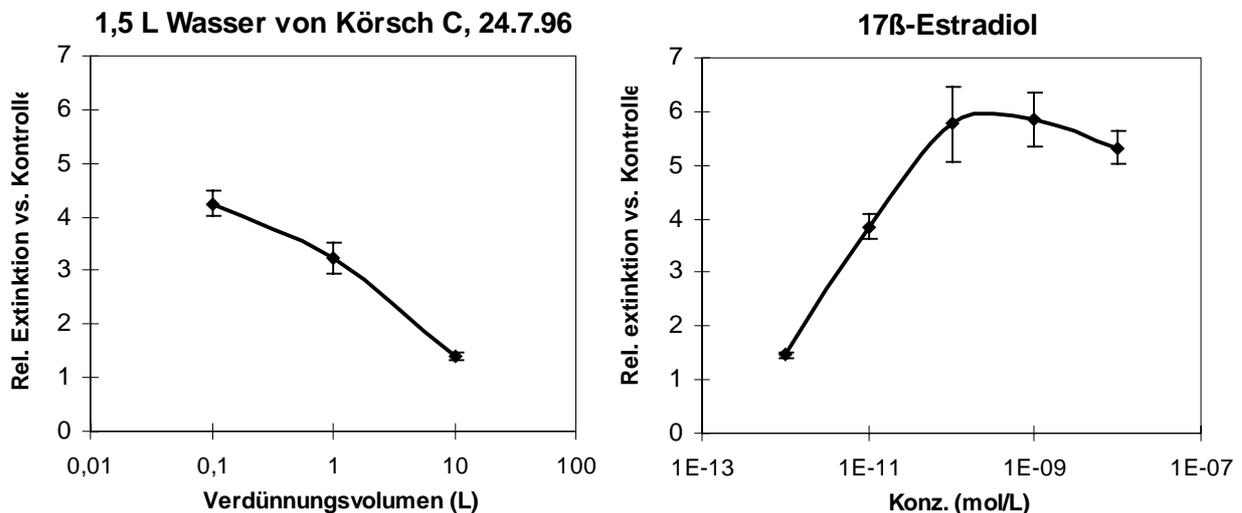


Abb. 42: Konzentrations-Proliferations-Kurven des Toluol-Extraktes von 1,5 L Wasser der Körsch (Probenahmestelle C) vom 24.7.1996 und der Positivkontrolle 17β -Estradiol eines E-Screen-Einzelexperimentes vom 30.9.1997 im Achtfachansatz.

Durch den Zusatz von $50 \mu\text{l}$ des schwer flüchtigen Dimethylsulfoxid (DMSO) muß mit steroidfreiem Kulturmedium (Experimentalmedium) mindestens auf 50 ml (1:1000) verdünnt werden, damit die DMSO-Endkonzentration im Medium nicht über 0,1 % liegt. Bei Extraktion von 1 L einer Wasserprobe ergibt sich somit ein Anreicherungsfaktor von 20. Ausgehend von der Nachweisgrenze des für eine Einzelsubstanz von 1 pmol EEQ/L (z.B. 1 pmol/L E2) liegt die **Nachweisgrenze** des E-Screen-Assays dann bei **0,05 pmol EEQ/L** oder **0,014 ng EEQ/L**.

Z.T. haben wir bei den getesteten Proben (Flußwasser, Kläranlagenabläufe) bei der höchsten Konzentration des Extraktes zytotoxische Effekte beobachtet. Bei einer fünf- oder zehnfach höheren Verdünnung war jedoch keine Zelltoxizität mehr erkennbar. Die **Bestimmungsgrenze** liegt somit bei **0,25 - 0,5 pmol EEQ/L** oder **0,07 - 0,14 ng EEQ/L**.

Der E-Screen-Assay ist damit sehr empfindlich. Die Bestimmungsgrenze liegt etwa eine Größenordnung niedriger als mit den derzeitigen Methoden der chemischen Spurenanalytik für die Bestimmung von steroidalen Estrogenen erreichbar ist.

4.2 Beschreibung der Proben, Probenahme und -vorbereitung

4.2.1 Kläranlagenabläufe

Kläranlage Nellingen

Die Kläranlage Nellingen leitet ihr gereinigtes Abwasser unterhalb der Probenahmestelle Körsch C in die Körsch. Vom 18. bis 26.3.1997 wurde von den Mitarbeitern des Klärwerks eine Sammelprobe genommen und bis zur Extraktion in einer braunen Glasflasche bei Raumtemperatur aufbewahrt. 1 L Ablauf wurde analog den Flußwasserproben mit Toluol extrahiert und für den Zellkulturtest vorbereitet.

Kläranlage Stuttgart-Büsnau

Von der Kläranlage Stuttgart-Büsnau am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart wurden Extrakte von zwei Ablaufproben erhalten (Prof. Dr. J. Metzger, Dr. C. Kempter) und im E-Screen-Assay getestet.

Probe 1: Stichprobe vom Januar 1997. 1 L Ablauf wurde durch einen 100 µm Glasfaserfilter filtriert, auf pH 2 angesäuert, eine Festphasenextraktion mit 1 g RP-C18-Material durchgeführt und mit 6 ml Methanol eluiert. Nach dem Verdünnen mit Wasser und Extraktion mit Dichlormethan wurde der Extrakt in einem kleinen Reagenzglas im Stickstoffstrom zur Trockne abgeblasen und die Probe bei 4 °C aufbewahrt.

Probe 2: 24 Stunden-Mischprobe vom 3.6.1997. 1 L Ablauf wurde wie Probe 1 filtriert, angesäuert und extrahiert, wobei die C18-Säule mit 6 ml Aceton eluiert wurde. Der Extrakt wurde säulenchromatographisch mit 1 g Kieselgel, deaktiviert mit 5 % Wasser (Chromabond SiOH), gereinigt; die Elution erfolgte mit 6 ml Hexan/Aceton-(65:35).

Analog der Vorschrift von Sonnenschein et al. (1995) wurden zu den trockenen Extrakten 50 µl Ethanol und 4,95 ml Experimentalmedium gegeben, ca. 30 Sek. an einer Vortex-Apparatur gemischt, die klare Lösung steril filtriert und in einem sterilen Polypropylen(PP)-Röhrchen bzw. in einem sterilen Glaskolben mit Glasstopfen bei 4 °C aufbewahrt. Von dieser Stammlösung, die 1 % Ethanol enthält, wurden vor jedem Test mit Experimentalmedium Verdünnungen von 1:10 (0,1 % Ethanol) und höher hergestellt und mit den MCF-7-Zellen auf estrogenartige Wirkung getestet.

4.2.2 Flußwasserproben

Am 24.7.1996 wurden drei kleine Fließgewässer im Großraum Stuttgart beprobt, deren anthropogene Belastung und Wasserqualität sehr unterschiedlich ist: zwei Stellen der Körsch, die

Mündung des Sulzbaches in die Körsch sowie der Krähenbach kurz vor der Einmündung in die Aich. Die Probenahmestellen entsprechen denen, die im Rahmen des seit 1995 laufenden BMBF-Verbundprojektes VALIMAR (Nr. 07OTX214) ausgewählt wurden (Koordination: Dr. habil. Rita Triebkorn, Zoologisches Institut der Universität Tübingen). Die Flüsse führten nach starken Regenfällen mit Gewittern in der Nacht zuvor noch beträchtliches Hochwasser. Das Wasser wurde mit braunen Glasflaschen dicht unter der Wasseroberfläche aufgefangen.

Körsch und Sulzbach

Die Körsch entspringt westlich von Rohr bei Stuttgart und mündet nach einer Fließstrecke von ca. 25 km unterhalb von Deizisau in den Neckar. Ihr Einzugsgebiet umfaßt ca. 127 km², ihre Zuflüsse sind insgesamt etwa 95 km lang. Die Entwässerung umfaßt den gesamten, dicht besiedelten und landwirtschaftlich intensiv genutzten Filderraum, den südlichen Stadtbereich Stuttgarts bis hin zu den Ausläufern des Schönbuchs. Ein bedeutender Zufluß der Körsch ist der Sulzbach, dessen Mündung in die Körsch bei Denkendorf liegt, und der Schadstofffrachten aus Landwirtschaft und Flughafen transportiert.

An die Körsch sind sechs Kläranlagen mit einem Ausbauwert von insgesamt über 339.000 Einwohnergleichwerten (EWG) angeschlossen. Die Körsch führt somit als relativ kleiner Vorfluter mit einer Jahreswassermenge von 57 Mio. m³ eine verhältnismäßig große Fracht an geklärtem Abwasser von ca. 20 Mio m³/Jahr. Mit anderen Worten: im Mittel wird das gereinigte Abwasser durch das Körsch-Wasser nur knapp dreifach verdünnt. In Trockenperioden besteht der Wasserkörper der Körsch sogar nahezu vollständig aus geklärtem Abwasser. Bei Starkregen entlasten die am Oberlauf der Körsch angeschlossenen ca. 40 Regenüberläufe bzw. Regenüberlaufbecken (Auffangbecken von Schmutzstößen bei Sturzregen) die Klärwerke, belasten aber zusätzlich das Gewässer.

Die Gütekarte der Fließgewässer in Baden-Württemberg (Ministerium für Umwelt, 1991) weist die Körsch als ein stark verschmutztes Gewässer aus (Güteklasse III). Der oberhalb von Denkendorf einmündende Sulzbach ist noch stärker belastet, ihm wird die Güteklasse III-IV (sehr stark verschmutzt) zugeordnet.

Krähenbach

Der Krähenbach entspringt bei Holzgerlingen in einem Waldgebiet und mündet nach ca. 3 km kurz unterhalb der Probenahmestelle „Aich B“ bei Schönaich in die Aich. Das Wassereinzugsgebiet umfaßt ca. 10 km². Der Krähenbach fließt durch eine dünn besiedelte Landschaft mit hauptsächlich Waldbeständen und nur wenigen landwirtschaftlich genutzten Flächen. In den Krähenbach leiten keine Kläranlagen ein.

Der Krähenbach ist in der Gütekarte der Fließgewässer in Baden-Württemberg nicht erfaßt. Untersuchungen aus dem seit 1995 laufenden BMBF-Verbundprojektes VALIMAR weisen auf eine Einstufung in eine Gewässergüte zwischen I und II hin.

Extraktion und Vorbereitung für Zellkulturtest

1,5 L der Wasserprobe wurden in einem 2 L-Schütteltrichter sukzessive mit 100, 70 und 50 ml Toluol p.a. ausgeschüttelt. Die vereinigten Toluolfractionen wurden in einem Glaskolben bis zur weiteren Aufarbeitung im Dunkeln aufbewahrt. Zur Trocknung sowie zum Abtrennen von festen

Partikeln wurden die Extrakte in einen mit wasserfreiem Natriumsulfat gefüllten Glastrichter gegeben. Kolben und Trichter wurden mit 10 ml Toluol nachgespült. Die Extrakte wurden am Rotationsverdampfer auf 1 - 2 ml eingengt und in 5 ml Probengläschen mit Teflondichtung transferiert. Nach Zugabe von jeweils 50 µl Tetradecan (mind. 99,9 %) wurde das restliche Toluol im Stickstoffstrom abgeblasen. Anschließend wurden je 50 µl Ethanol p.a. zugegeben und die Proben im Kühlschrank aufbewahrt.

Zum eingengten Extrakt mit je 50 µl Tetradecan und Ethanol wurden 4,95 ml Experimentalmedium (phenolrotfreies DME-Medium mit 5 % CD-FCS) gegeben, ca. 30 Sek. homogenisiert und die Lösung in ein PP-Röhrchen überführt. Dieser Vorgang wurde einmal wiederholt. Anschließend wurde die gesamte klare Lösung (10 ml) steril filtriert und in einem sterilen Glaskolben mit Glasstopfen aufbewahrt. Von dieser Stammlösung, welche Ethanol und Tetradecan in einer Gesamtkonzentration von 1 % enthält, wurden vor jedem Test mit Experimentalmedium Verdünnungen von 1:10 (0,1 % Lösungsmittelgehalt) und höher hergestellt und nach den üblichen Protokollen mit MCF-7- und EFM-19-Zellen auf estrogenartige Wirkung getestet.

4.2.3 Bodensee-Sedimente

Probenahme und Extraktion

Am 15.4.1996 wurden an der tiefsten Stelle des Bodensees (252 m) 5 Sedimentkerne entnommen. Die Kerne wurden sofort, entsprechend der Schichtabfolge in Scheiben von 1,5 bis 2 cm geschnitten und die Scheiben durch Prof. Dr. G. Müller, Universität Heidelberg, aufgrund bestimmter Merkmale visuell datiert. Die Proben wurden gefriergetrocknet und homogenisiert.

Die gesamte 30 ml Soxhlet-Apparatur mit 100 ml Rundkolben und Extraktionshülse (25 x 80 mm) wurde zunächst zur Reinigung ca. 3 Stunden mit Aceton vorextrahiert. Jeweils 1 g Trockensubstanz der Mischproben aus den Schichten 2-4 cm (Jahre 1985/90), 15-17 cm (1945/55) und 22,5-24 cm (1900/15) wurden in die Hülsen gefüllt, mit ca. 1 cm wasserfreiem Natriumsulfat überschichtet und mit 85 ml Aceton/n-Hexan-(1:1) 20 bis 24 Stunden lang extrahiert. Anschließend erfolgte eine zweite Extraktion mit 85 ml Ethanol für 20 - 24 Stunden.

Erst- und Zweitextrakte wurden am Rotationsverdampfer jeweils auf 1 - 2 ml eingengt, in 5 ml Probengläschen überführt, mit 12,5 µl Tetradecan versetzt, im Stickstoffstrom das restliche Lösungsmittel abgeblasen und nach Zugabe von 12,5 µl Ethanol im Kühlschrank aufbewahrt.

Vorbereitung für den Zellkulturtest

Zum eingengten Extrakt wurden 2,5 ml Experimentalmedium gegeben, ca. 30 Sek. homogenisiert, die Suspension steril filtriert und die nun klare Lösung in einem sterilen PP-Röhrchen bei 4 °C aufbewahrt. Von dieser Stammlösung mit einer Ethanol- und Tetradecan-Konzentration von insgesamt 1 % wurden vor jedem Test mit Experimentalmedium folgende Verdünnungen hergestellt und mit den MCF-7-Zellen auf estrogenartige Wirkung getestet.

Verdünnung	1:10	1:100	1:1000
Gesamtvolumen (ml)	25	250	2500

Sedimentkonz. (g TS/L)	40	4	0,4
Lösungsmittelkonz. (%)	0,1	0,01	0,001

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Blindwerte

Von den drei beprobten kleinen Fließgewässern wurden auch Sedimentproben genommen und analog wie die Bodensee-Sedimente extrahiert und für den Zellkulturtest vorbereitet. Die Ergebnisse der einzelnen E-Screen-Experimente zeigten große Streuungen, die eine eindeutige Bewertung der Proben hinsichtlich ihrer estrogene Aktivität kaum zuließen. Die großen Schwankungen konnten ein Hinweis dafür sein, daß aus den Polypropylen-Röhrchen, in welchen die mit Experimentalmedium verdünnten und steril filtrierte Stammlösungen der Extrakte (Lösungsmittelgehalt 1 % Tetradecan/Ethanol) aufbewahrt wurden, estrogen wirksame Substanzen herausgelöst wurden, zumal die einzelnen E-Screen-Tests über einen Zeitraum von 3 - 15 Wochen durchgeführt wurden.

Aufgrund dieses Verdachts wurden zwei Serien von Blindproben im E-Screen-Assay getestet.

Die erste Blindprobenserie entsprach einer Blindprobe zu den Sedimentextrakten: eine vorgereinigte 250 ml Soxhlet-Apparatur mit leerer Extraktionshülse (35 x 150 mm) wurde 24 Stunden mit Aceton extrahiert. Das Aceton wurde am Rotationsverdampfer auf 1 - 2 ml eingengt, in 5 ml Probengläschen überführt, mit 50 µl Tetradecan versetzt, im Stickstoffstrom das restliche Aceton abgeblasen und 50 µl Ethanol zugegeben. Die steril filtrierte Stammlösung in 9,90 ml Experimentalmedium (1 % Lösungsmittelgehalt) wurde jeweils zur Hälfte in einem Polypropylen-Röhrchen (P1) bzw. in einem 25 ml Pyrex-Glas mit Schraubverschluß (P2) bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt.

Bei der 2. Serie von Blindproben wurden jeweils 10 ml Experimentalmedium, versetzt mit 50 µl Ethanol, in ein steriles Polypropylen- (PP) bzw. in ein Polystyrolröhrchen (PS) sowie in ein sterilisiertes (2 Stunden bei 200° C) Glasröhrchen mit Kunststoff-Schraubverschluß (Glas) gegeben und bei 4 °C mehrere Wochen aufbewahrt.

Abb. 43 zeigt, daß die Blindprobe mit einem Tetradecan/Ethanol-Gehalt von 1 %, welche im PP-Röhrchen (P1) aufbewahrt wurde, verdünnungsabhängig einen deutlichen Proliferationseffekt im E-Screen-Assay auslöste, während die im Glasröhrchen (P2) aufbewahrte Blindprobe nicht wirksam war. Dies ist ein Hinweis dafür, daß Xenoestrogene aus den Kunststoffröhrchen entweichen, und das Ergebnis des E-Screen-Assays beeinflussen.

Abb. 43 zeigt ferner, daß Experimentalmedium, welches in PS- oder PP-Röhrchen aufbewahrt wurde, eine leichte estrogene Aktivität im E-Screen-Assay auslöste. Obwohl das Experimentalmedium keine organischen Lösungsmittel enthält, können offensichtlich bei längerer Lagerung in Kunststoffröhrchen (zwei Wochen und mehr) estrogen wirkende Substanzen freigesetzt werden.

Auch das im Glasröhrchen (Glas) aufbewahrte Experimentalmedium war im E-Screen-Assay leicht aktiv. Eine mögliche Erklärung hierfür ist der Kunststoff-Schraubverschluß, welcher eine Gummidichtung hat, mit der das Medium zumindest über den Luftraum in Kontakt kommt. Aus dieser Dichtung könnten Xenöestrogene freigesetzt worden sein.

Als wichtige Konsequenz aus diesen Ergebnissen ergibt sich, daß Stammlösungen von zu testenden Umweltproben wie die getesteten Einzelsubstanzen in (sterilen) Glaskolben mit Glasstopfen aufbewahrt werden sollten. Für die Flußwasserproben und z.T. für die Kläranlagenabläufe wurde dies im Rahmen des Projektes bereits praktiziert. Bei den Bodensee-Sedimenten wurde mit Rückstellproben der gleichen Extrakte eine 2. Serie von E-Screen-Experimenten durchgeführt. Die Proliferationseffekte der Extrakte waren in dieser 2. Serie niedriger als in der ersten Testserie. Nur die Ergebnisse der 2. Serie sind in Abschnitt VI 4.3.4 dargestellt.

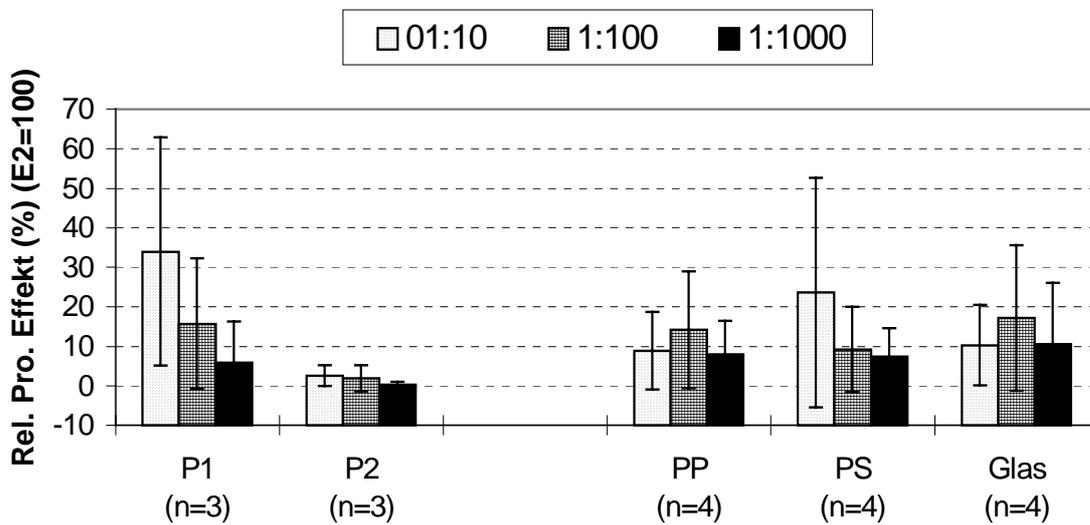


Abb. 43: Estrogene Aktivität von Experimentalmedium mit 1% Tetradecan/Ethanol (P1, P2) bzw. ohne Lösungsmittel (PP, PS, Glas) im E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen, nach Aufbewahrung in sterilen Gefäßen aus verschiedenen Materialien über 2 Wochen und länger bei 4 °C.

4.3.2 Kläranlagenabläufe

Tab. 13: Estrogene Aktivität von drei Ablaufextrakten kommunaler Kläranlagen in MCF-7-Zellen. Die E-Screen-Tests wurden z.T. in 24-Well und z.T. in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt. Die E2-Äquivalente (EEQ) wurden aus den EC₅₀-Werten berechnet.

	St.-Büsnau (Jan. 1997) (n=2)	Stichprobe (n=2)	Büsnau 24 Std. 3.6.1997 (n=3)	Nellingen 18.- 26.3.1997 (n=5)
Zelllinie	EFM-19	MCF-7	MCF-7	MCF-7
Proliferationseffekt Probe	5,25 / 2,46	2,97 / 2,11	2,27 ± 0,33	2,53 ± 0,56
Proliferationseffekt E2	5,04 / 3,57	2,85 / 2,25	2,74 ± 0,63	3,25 ± 0,99

RPE in % (E2=100%)	105 / 56,7	106 / 89,0	75,6 ± 12,9	70,4 ± 9,9
EC ₅₀ Probe*	4,22**	8,56 / 8,59	2,15 / 0,47**	1,25 ± 0,86
EC ₅₀ E2 (pmol/L)	31,5	13,2 / 2,32	7,82 / 8,52	3,53 ± 1,10
E2-Äquivalente (ng/L)	36	31 / 5,4	4,6 / 1,1	1,2 ± 1,1

* = Verdünnungsfaktor: Quotient aus dem Verdünnungsvolumen im Experimentalmedium und dem ursprünglichen Probevolumen von 1 L.

** bei einem Assay nicht genügend Datenpunkte für ausreichend genaue EC₅₀-Bestimmung.

Die Ergebnisse der drei im E-Screen-Assay getesteten Kläranlagenabläufe sind in Tab. 13 zusammengefaßt, zusätzlich ist in Abb. 44 für die Probe Stuttgart-Büsnau 3.6.1997 die Dosis-Wirkungs-Kurve der estrogenen Aktivität dargestellt.

In allen drei Ablaufextrakten wurde eine konzentrationsabhängige estrogenen Aktivität gefunden, deren Stärke nahezu der von E2 entsprach (RPE > 70 %). Die induzierte Zellproliferation wurde durch Ko-Inkubation mit 5 µmol/L des Antiestrogens Tamoxifen komplett gehemmt (s. Abb. 45). Da es sich bei der Probe Stuttgart-Büsnau 1/97 um eine Stichprobe handelt, ist der gefundene hohe EEQ-Wert nicht unbedingt als repräsentativ anzusehen. Andererseits muß man davon ausgehen, daß der im Ablauf der Kläranlage Nellingen gefundene EEQ-Gehalt zu niedrig liegt, da die Probe bis zur Extraktion mehrere Monate bei Raumtemperatur gelagert wurde. Ein Teil der estrogenartig wirkenden Substanzen könnte in dieser Zeit durch die in der Probe vorhandenen Mikroorganismen bereits abgebaut worden sein.

Aufgrund dieser ersten Ergebnisse muß man davon ausgehen, daß über kommunale Kläranlagen ein nicht zu vernachlässigender kontinuierlicher Eintrag von estrogenartig wirkenden Substanzen in Fließgewässer erfolgt.

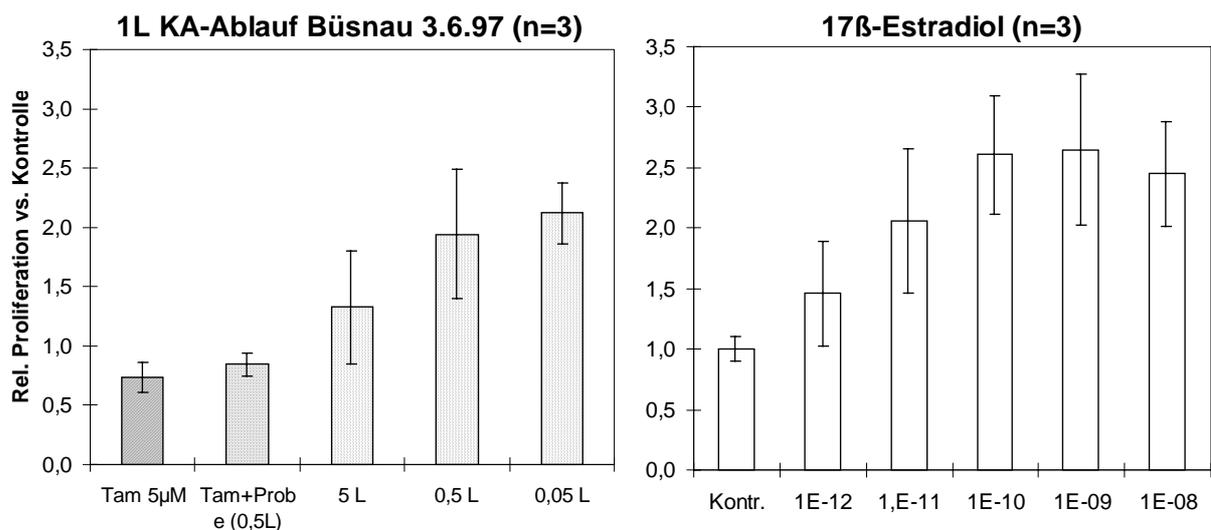


Abb. 44: Estrogene Aktivität im Extrakt von 1 L Ablauf der Kläranlage Stuttgart-Büsnau (24 Std.-Sammelprobe vom 3.6.1997) in MCF-7-Zellen im Vergleich zu 17β-Estradiol (E2). Die E2-Konzentrationen sind in mol/L; die Volumenangaben der Probe entsprechen dem Endvolumen nach Verdünnung mit Experimentalmedium. Tam = Tamoxifen.

Am Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft der Universität Stuttgart wurde ein Aliquot der 24 Std.-Sammelprobe vom 3.6.1997 mit HRGC/LRMS auf verschiedene Steroide und einige andere Xenoestrogene analysiert, sodaß ein Vergleich mit dem Ergebnis aus dem Zellkulturtest möglich war (s. Tab. 14). Neben den in Tab. 14 aufgeführten Substanzen wurde auch eine halbquantitative Bestimmung von Di-n-butylphthalat (DBP) durchgeführt. Die Konzentration lag ähnlich wie die von Bisphenol-A im oberen ng/L-Bereich.

Tab. 14: Konzentrationen natürlicher und synthetischer Estrogene im Ablaufextrakt der Kläranlage St.-Büsnau vom 3.6.1997, sowie Berechnung der Estradiol-Äquivalentkonzentration aus den relativen estrogenen Potenzen (EEF) der Einzelsubstanzen im E-Screen-Test.

Substanz	Konzentration		Rel. Potenz (E2=1)	E2-Äquivalente (EEQ)	
	ng/L	mol/L		ng/L	%
Bisphenol-A	400	1,8E-09	6,0E-05	0,03	0,83
Estron	7	2,6E-11	0,017	0,12	3,48
Ethinylestradiol	3,1	1,0E-11	0,98	2,79	81,2
17β-Estradiol	0,5*	1,8E-12	1,0	0,50	14,5
Gesamt				3,44	100

* Hälfte der Bestimmungsgrenze

17 α -Ethinylestradiol hatte von den untersuchten Substanzen den größten Beitrag zu den E2-Äquivalenten (EEQ). Der aus den Ergebnissen der chemischen Spurenanalytik errechnete EEQ-Wert ist mit dem aus den E-Screen-Tests vergleichbar (3,4 vs. 2,9 ng EEQ/L). Von den steroidal Substanzen besitzt 17 α -Ethinylestradiol in Kläranlagenabläufen aufgrund seiner starken estrogenen Potenz offensichtlich eine allgemeine große Relevanz, da auch Ternes et al. (1997) durchschnittliche Gehalte von 2 ng/L in 14 verschiedenen Kläranlagenabläufen fanden. In Laboruntersuchungen mit männlichen Regenbogenforellen rief 17 α -Ethinylestradiol bereits unter 1 ng/L nach 3 Wochen Exposition eindeutige estrogenen Wirkungen hervor (Purdom et al. 1994). Die deutlich höheren Konzentrationen für Bisphenol-A und DBP lassen darauf schließen, daß auch nichtsteroidale Chemikalien mit estrogenen Wirkung in relativ hohen Mengen über Kläranlagenabläufe in die aquatische Umwelt eingetragen werden, die bisher in Gewässermonitoring-Programmen nicht erfaßt wurden. Hierzu halten wir ausführliche Untersuchungen für dringend erforderlich.

4.3.3 Flußwasser

Von den am 24.7.1996 an Körsch und Sulzbach entnommenen Wasserproben sind die Ergebnisse der bis Ende des Projektes im E-Screen untersuchten Proben in Tab. 15 dargestellt. In den zwei Wasserproben der Körsch wurde eine hohe dosisabhängige estrogenen Aktivität gefunden. Sowohl die relative Wirkungsstärke (RPE) als auch die E2-Äquivalente lagen ähnlich

hoch wie in den untersuchten Kläranlagenabläufen. Die Probenahmestelle Körsch C befindet sich oberhalb der Kläranlage Nellingen, Körsch B weiter flußabwärts bei Denkendorf kurz vor der Einmündung des Sulzbaches. Auffällig ist, daß die estrogene Aktivität in der Körsch weiter flußabwärts deutlich höher war. Der Sulzbach war geringer belastet als die Körsch. Im naturbelassenen Krähenbach war mit beiden Zelllinien keine estrogene Aktivität meßbar.

Tab. 15: Estrogene Aktivität der Toluol-Extrakte von drei Flußwasserproben in MCF-7- und EFM-19-Zellen. Die E-Screen-Tests wurden in 24- bzw. in 96-Well-Kulturplatten durchgeführt.

	1,5 L Körsch B (n=4)	1,5 L Körsch C (n=5)	1,5 L Sulzbach (n=5)
Zelllinie	EFM-19	MCF-7	MCF-7
Proliferationseffekt Probe	2,85 ± 0,16	3,19 ± 0,87	2,50 ± 0,81
Proliferationseffekt E2	3,04 ± 0,21	3,99 ± 1,35	4,15 ± 1,36
RPE in % (E2=100%)	91,1 ± 9,8	74,8 ± 9,4	45,8 ± 8,4
EC ₅₀ Probe *	5,87 ± 1,45	2,67 ± 1,13	0,63 ± 0,30
EC ₅₀ E2 (pmol/L)	6,48 ± 1,14	4,86 ± 1,61	5,12 ± 1,20
E2-Äquivalente (ng/L)	10,5 ± 4,0	3,3 ± 1,3	0,92 ± 0,62

* = Verdünnungsfaktor im Experimentalmedium

Im laufenden BMBF-Verbundprojekt Nr. 07OTX214 (Koordination: Dr. habil. Rita Triebkorn, Zoologisches Institut der Universität Tübingen, Abt. Physiologische Ökologie) wurden in Körsch, Sulzbach und Krähenbach in den letzten beiden Jahren regelmäßig verschiedene Klassen von Pestiziden, Chlorphenole, Chlorbenzole, PCB, PAK sowie Schwermetalle analysiert. Folgende Chemikalien mit bekannter oder wahrscheinlicher estrogener bzw. anderer endokriner Wirkung wurden dabei in der Körsch und den angeschlossenen Kläranlagenabläufen nachgewiesen:

DDT und Metabolite, Endosulfan, γ HCH, Atrazin, Trifluralin, PCB, PCP, Cadmium

Ein Teil der Stoffe wurde auch in den Sedimenten und in Fischen gefunden. Der Krähenbach ist im Gegensatz zur Körsch kaum mit Pestiziden belastet.

Diese Substanzen können jedoch nicht die beobachtete estrogene Wirkung erklären, da eine aus diesen Stoffen hergestellte Mischung selbst bei Konzentrationen, die 100fach über den durchschnittlich in der Körsch gemessenen Gehalten lagen, im E-Screen-Test keine Wirkung zeigte. Synthetische und natürliche Steroide bzw. andere nichtsteroidale Xenoestrogene müssen also die Ursache sein.

Blindproben

Die zu den Kläranlagenabläufen Bösau sowie zu den Flußwasserproben gehörenden beiden Blindproben wurden erst nach dem Ende des Projektes im E-Screen getestet. Eine geringe estrogene Aktivität war lediglich beim kleinsten Verdünnungsvolumen (50 bzw. 100 ml) meßbar, die aber für die Quantifizierung der estrogenen Aktivität in den Proben vernachlässigbar war (Körner et al. 1999).

4.3.4 Bodensee-Sedimente

Jeder Rohextrakt der Sedimentproben wurde ohne vorherige Aufreinigung mit MCF-7-Zellen in drei unabhängigen E-Screen-Experimenten in 24-Well-Platten auf estrogene Gesamtaktivität getestet. Die Ergebnisse sind in Tab. 16 und Abb. 45 dargestellt. Zusammenfassend läßt sich feststellen:

- ◆ Die Aceton/Hexan-Erstextrakte von allen 3 Sedimentschichten zeigten im E-Screen-Test eine partielle, konzentrationsabhängige estrogene Aktivität.
- ◆ Der Effekt war bei der 1:10-Verdünnung maximal, welche einer Sedimentkonzentration von 40 g TS/L Medium entspricht.
- ◆ In den beiden getesteten Ethanol-Zweitextrakten war noch eine schwache estrogene Aktivität nachweisbar, die deutlich niedriger lag als im Erstextrakt.

Tab. 16: Estrogene Gesamtaktivität von Extrakten aus drei Schichten eines Bodensee-Sedimentkernes im E-Screen-Test mit MCF-7-Brustkrebszellen (n = 3).

Schichttiefe (cm) Zeitraum	2 - 4 1985/90	15 - 17 1945/50	22,5 - 24 1900/15	17 β -Estradiol
PE Erstextrakt (Aceton/Hexan)	2,32 \pm 0,33	2,28 \pm 0,67	2,16 \pm 0,34	4,42 \pm 0,75
PE Zweitextrakt (Ethanol)	n.b.	1,89 \pm 0,43	1,42 \pm 0,36	
RPE in % (E2 = 100%)				
Erstextrakt (Aceton/Hexan)	39,1 \pm 1,0	40,0 \pm 22,0	35,8 \pm 12,4	100
Zweitextrakt (Ethanol)	n.b.	25,9 \pm 8,4	11,9 \pm 8,6	
EC₅₀ (g TS/L)				
Erstextrakt (Aceton/Hexan)	2,71 \pm 2,17	1,60 \pm 0,88	1,68 \pm 0,94	6,20 \pm 1,48 pM
Zweitextrakt (Ethanol)	n.b.	2,23 \pm 1,09	n.n.	
E2-Äquivalente (pmol/g TS)				
Erstextrakt (Aceton/Hexan)	3,2 \pm 1,7	4,7 \pm 2,3	4,3 \pm 1,8	
Zweitextrakt (Ethanol)	n.b.	3,1 \pm 1,1	n.n.	

Die aus den EC₅₀-Werten berechneten Estradiol-Äquivalente sind sehr ähnlich mit denen, die Legler et al. (1996) mit Reporteragen-Assays in Aceton-Extrakten von Sedimenten aus dem Rotterdamer Hafen und dem Nordsee-Kanal bestimmten. Die gemessene maximale estrogene Wirkung entsprach etwa 30 % der von 17 β -Estradiol, was in Korrespondenz mit unseren Daten

steht. In den Hexan-Extrakten der gleichen (und weiterer) Proben fanden die Autoren hingegen nur geringe estrogene Aktivität.

Welche Substanzen für die gefundene estrogenartige Aktivität in den Extrakten der Bodensee-Sedimente verantwortlich sind, wird noch untersucht. Für die beiden oberen Schichten könnten estrogenartig wirkende Insektizide wie o,p'-DDT, o,p'-DDE und HCH-Isomere sowie Industriechemikalien wie Phthalate (DBP, BBP), deren Präsenz in Bodenseesedimenten im unteren bzw. oberen ppb-Bereich (ng/g) seit langem bekannt ist (Hagenmaier et al. 1986), eine Rolle spielen.

Für die Schicht aus dem Zeitraum 1900 - 1915 könnte die Wirkung lediglich durch die Präsenz von Naturstoffen (z.B. Phytoestrogene) erklärt werden. Da bekannt ist, daß verschiedene Naturstoffe im anaeroben Milieu eines Sedimentes stabil sind (Müller 1997), kann die Präsenz von Phytoestrogenen im Bodensee-Sediment nicht ausgeschlossen werden.

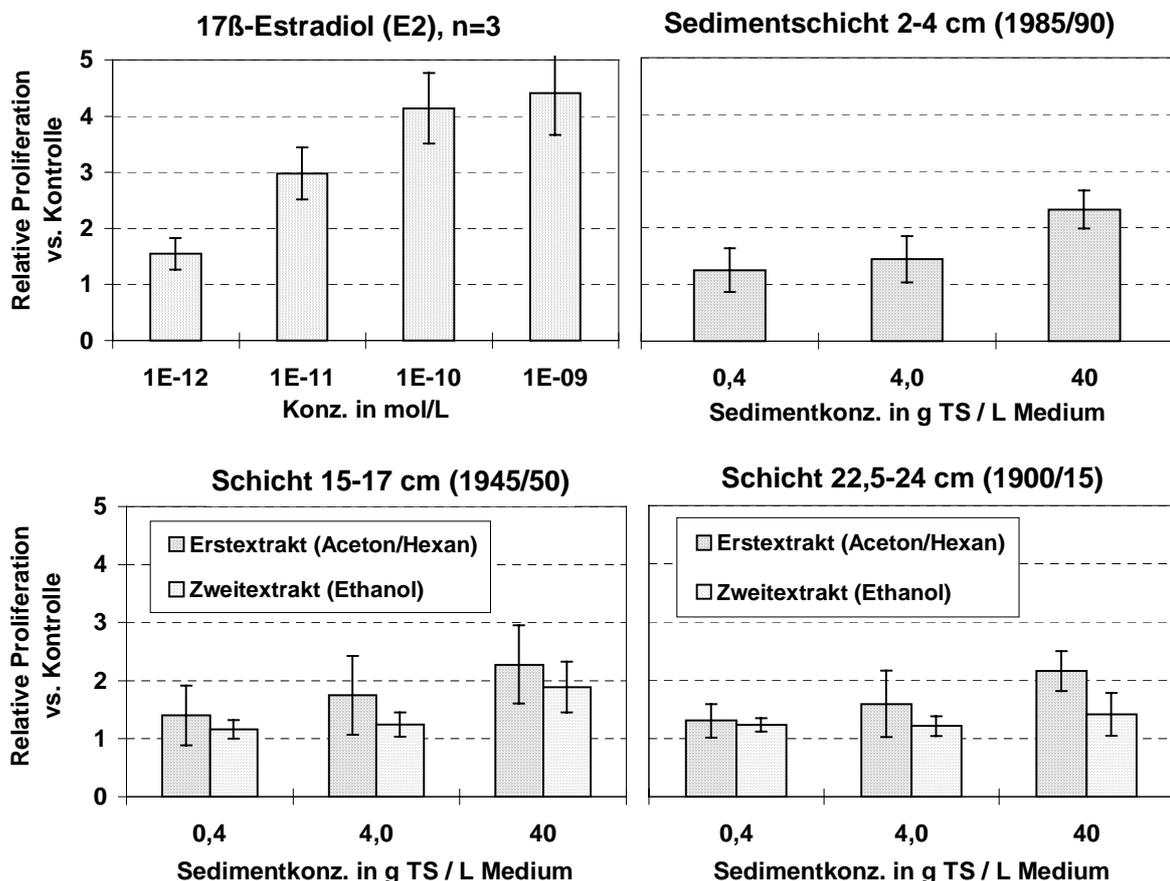


Abb. 45: Estrogene Gesamtaktivität von Extrakten aus drei Schichten eines Bodensee-Sedimentkernes im E-Screen-Test mit MCF-7-Brustkrebszellen (n = 3).

VII Fortschritte bei anderen Stellen

Daß die bisher bekannten Xenoestrogene kein gemeinsames Strukturelement besitzen, war bis vor kurzem nicht zu erklären. Das Rätsel wurde mit der Aufklärung der Kristallstruktur der Ligandenbindungsdomäne des humanen Estrogenrezeptors alpha (hER α) gelöst (Brzozowski et al. 1997). Die dreidimensionale Struktur ergab, daß die Tasche der Ligandenbindungsdomäne mit 45 statt 25 nm weitaus größer ist als die Bindung des natürlichen 17 β -Estradiols erfordert. Folglich ist für viele andere, nichtsteroidale Substanzen die Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor prinzipiell möglich. Man muß daher davon ausgehen, daß es weitere Stoffe in der Umwelt gibt, deren estrogenartige Wirkung bislang unerkannt ist. Dieser Befund setzt der Anwendung von theoretischen Struktur-Wirkungs-Beziehungen Grenzen und unterstreicht die Notwendigkeit der experimentellen Testung von Einzelsubstanzen wie von Umweltproben auf estrogen Wirkung.

Vor einiger Zeit wurde bei Mensch und Ratte eine zweite Form des ER entdeckt, die als beta-Form bezeichnet wird (Kuiper et al. 1996). Der ER β ist mit 55 kDa kleiner als der ursprünglich entdeckte Estrogenrezeptor ER alpha und hat eine völlig andere N-terminale Domäne. Während im humanen Brust- und Endometriumsgewebe kein ER β gefunden wurde, kommt in den Granulosazellen ausschließlich die beta-Form vor. In den Ovarien und der Lunge kommen alpha- und beta-Form in etwa gleicher Menge vor. Die effiziente Bildung von Heterodimeren aus alpha- und beta-Form wurde nachgewiesen und könnte mit der unterschiedlichen Wirkung des Estrogen-Antagonisten Tamoxifen im Brustgewebe im Vergleich zu anderen Zielgeweben im Zusammenhang stehen (Gustafsson 1996). Nach ersten Untersuchungen ist die Affinität von Phyto- und Xenoestrogenen zu beiden ER-Formen unterschiedlich. So binden Genistein, Coumestrol, Bisphenol-A und Methoxychlor mit etwa zehnfach höherer Affinität an den ER β im Vergleich zur alpha-Form.

In den letzten beiden Jahren sind in Europa Anstrengungen unternommen worden, rekombinante Reporter-gen-Assays mit menschlichen Zelllinien zum Nachweis Estrogenrezeptor-vermittelter Wirkungen zu verbessern. Die stabile Transfektion des Reporter-gen-Konstruktes in die menschliche Brustkrebszelllinie T47-D wurde vor kurzem von einer niederländischen Arbeitsgruppe beschrieben (Legler et al. 1998). Dieser als ER-CALUX-Assay bezeichnete Test ist mit einer EC₅₀ für 17 β -Estradiol von 6 pmol/L bei weitem empfindlicher als entsprechende Reporter-gen-Assays mit Hefen und sogar noch etwas sensitiver als der E-Screen-Assay.

Auch im Rahmen eines derzeit laufenden PUG-Projektes (U 96 017; Eisenbrand, Seng, Mussler) wird mit einem rekombinanten Reporter-gen-Assay mit transfizierten MCF-7-Brustkrebszellen zum Nachweis estrogenen Wirkungen von Einzelsubstanzen gearbeitet. Der E-Screen-Assay mit MCF-7-Zellen dient dabei als Vergleichsmethode. Im Rahmen dieses Projektes konnte von weiteren Chemikalien (z.B. ein optischer Aufheller) und Naturstoffen eine bislang unerkannte estrogen Wirkung nachgewiesen werden, was die im 1. Abschnitt dieses Kapitels genannte Einschätzung bereits unterstreicht.

VIII Bewertung und Nutzen der Ergebnisse

Fortschritte

Die Proliferation estrogenrezeptor(ER)-positiver menschlicher MCF-7-Brustkrebszellen im Vergleich zu Kontrollen mit und ohne 17β -Estradiol (E2) konnte als ein einfach durchzuführendes Screening-System zum quantitativen Nachweis estrogenartiger Wirkungen erfolgreich etabliert werden. Bei einer Nachweisgrenze für E2 von 1 pmol/L (0,27 ng/L) und einer EC_{50} von 4 - 9 pmol/L gibt es derzeit kein empfindlicheres Testsystem. Gegenüber der von A. Soto 1992 beschriebenen Originalmethode wurden einige wesentliche Vereinfachungen eingeführt, welche insgesamt zu einer Standardisierung beitragen und die Empfindlichkeit dieses als „E-Screen“ bezeichneten Assays nicht beeinträchtigen.

Die mit dem E-Screen-Test mögliche quantitative Bestimmung der estrogenen Wirkung ist reproduzierbar: Für neun Substanzen mit bekannter estrogenen Aktivität wurden die quantitativen Ergebnisse mit Literaturdaten verglichen. Obwohl die Stoffe hinsichtlich Hersteller und Charge unterschiedlich waren, zeigte sich eine gute Übereinstimmung der Daten.

Mit dem „E-Screen“-Assay konnten wir zeigen, daß es mit einem einfachen *in vitro*-System möglich ist, mit begrenztem Aufwand die Gesamtheit an estrogenartig wirksamen Substanzen in Extrakten von aquatischen Umweltproben quantitativ zu bestimmen.

Bei einer Reihe von verschiedenen Umweltproben (Kläranlagenabläufe, Flußwasser, Sedimente) hat sich der E-Screen-Test als zuverlässig und robust erwiesen. In jedem Falle konnten die Rohextrakte ohne einen zeitraubenden Reinigungsschritt (clean up) direkt in den Zellkulturen getestet werden. Zelltoxizität war nicht oder nur bei der höchsten Konzentration zu beobachten. Der E-Screen-Assay ist sehr empfindlich. Die Nachweisgrenze von 0,014 ng EEQ/L für 1 L einer wäßrigen Probe liegt 1 - 2 Größenordnungen niedriger als mit den derzeitigen Methoden der chemischen Spurenanalytik für die Bestimmung von steroidalen Estrogenen erreichbar ist.

Der E-Screen-Test ist in jedem Labor, in der die Basisausstattung für das Arbeiten mit Zellkulturen vorhanden ist, durchführbar. Es ist keine spezielle apparative Ausstattung notwendig, besondere Sicherheitsvorschriften müssen nicht beachtet werden. Der Test kann von jedem Laborpersonal, welches Grunderfahrung mit sauberem, sterilem Arbeiten hat, problemlos durchgeführt werden. Der Assay hat sich während des zweijährigen Projektes als robust erwiesen. Die MCF-7-Zellen haben während dieser Zeit ihre Estrogensensitivität über mehr als 40 Zellkulturpassagen bewahrt. Vergleichbare quantitative Ergebnisse mit einer anderen ER-

positiven humanen Brustkrebszelllinie (EFM-19) zeigen, daß für den E-Screen prinzipiell jede estrogensensitive Brustkrebszelllinie geeignet ist.

Mit unserer aktiven Unterstützung wurde der E-Screen-Assay mittlerweile an folgenden Instituten erfolgreich etabliert und wird dort routinemäßig angewandt:

TNO Toxicology, Zeist, Niederlande

Kaneka Corp., Kobe, Japan

Staatl. Medizinal-, Lebensmittel- und Veterinäruntersuchungsamt Mittelhessen, Gießen

Ein entscheidender Faktor für die erfolgreiche Durchführung des E-Screen-Assays ist, daß das im Zellkulturmedium verwendete fötale Kälberserum vor Benutzung langsam und schonend aufgetaut wird. Die bei Zellkulturarbeiten meist routinemäßig durchgeführte Hitzeinaktivierung des Serums ist nicht notwendig.

Aufgrund seiner Sensitivität, Spezifität, Robustheit und einfachen Durchführung ist der E-Screen-Test hervorragend geeignet, um den Gesamtgehalt an estrogenartig wirksamen Substanzen in festen wie flüssigen Umweltproben quantitativ zu bestimmen. Der Test kann ohne Probleme als Routinemethode für Überwachungs- und Monitoringzwecke, z.B. von Kläranlagenabläufen, Fluß- und Trinkwasser, von den entsprechenden Untersuchungsämtern bzw. Anlagenbetreibern eingesetzt werden. In gezielter Kombination mit der instrumentellen Spurenanalytik ist der E-Screen-Assay ein leistungsfähiges Werkzeug, um den Eintrag und Verbleib von natürlichen und anthropogenen Substanzen mit rezeptorvermittelter estrogener Wirkung in Fließgewässer und Seen untersuchen zu können.

Empfehlungen

Die Ergebnisse der in der Endphase des Projektes durchgeführten ersten Analysen von Ablaufextrakten von kommunalen Kläranlagen konnten von uns in der Zwischenzeit durch Folgeuntersuchungen bestätigt werden (Körner et al. 1999). Nach derzeitigem Kenntnisstand muß man davon ausgehen, daß über kommunale Kläranlagen in Baden-Württemberg (und ebenso in den anderen Bundesländern) ein kontinuierlicher Eintrag von estrogenartig wirkenden Substanzen in Fließgewässer erfolgt. Ausgedrückt in 17β -Estradiol-Äquivalentkonzentrationen (EEQ) liegen die Gehalte zwischen 1 und > 20 ng EEQ/L. In einem Fluß, dessen Wasser zu einem großen Teil aus Kläranlagenabläufen besteht, wurden nahezu ähnlich hohe Werte gemessen. In England durchgeführte Laboruntersuchungen mit männlichen Regenbogenforellen zeigten, daß 17α -Ethinylestradiol bzw. 17β -Estradiol im Bereich von <1 bzw. 1 - 10 ng/L bereits deutliche estrogene Wirkungen hervorriefen (Purdom et al. 1994; Routledge et al. 1998). Die von uns gemessenen estrogenen Aktivitäten in Kläranlagenabläufen könnten also durchaus ein Risiko für die Reproduktion von Fischen und anderen aquatischen Organismen bedeuten. Hierzu halten wir entsprechende Labor- und Freilanduntersuchungen an geeigneten Spezies, auch an Wirbellosen, für dringend erforderlich.

Welche Substanzen für die gemessene estrogene Aktivität verantwortlich sind, kann gegenwärtig erst ansatzweise beantwortet werden. Das synthetische Estrogen 17α -Ethinylestradiol und das natürliche 17β -Estradiol wurde von einigen deutschen Arbeitsgruppen in Kläranlagenabläufen nachgewiesen (Ternes 1997). Allerdings könnten auch nichtsteroidale Substanzen mit estrogenen Aktivität eine nennenswerte Rolle spielen. So wurde an der Universität Stuttgart, Institut für Siedlungswasserbau, Wassergüte und Abfallwirtschaft, im Ablauf von zwei Kläranlagen Bisphenol A im oberen ng/L-Bereich gefunden. Diese Ergebnisse konnten von uns inzwischen an einer anderen Anlage bestätigt werden. Die im Oktober 1997 veröffentlichte Kristallstruktur des menschlichen Estrogenrezeptors alpha mit einer wenig stringenten Ligandenbindungstasche (Brzozowski et al. 1997) läßt es als wahrscheinlich erscheinen, daß in der Umwelt noch weitere Substanzen anzutreffen sind, deren (anti-)estrogene Wirkung bislang unerkannt ist. Deshalb versprechen systematische Untersuchungen mit einer Kombination von biologischer (E-Screen-Assay) und chemischer Spurenanalytik an einer größeren Zahl von Kläranlagen wesentliche neue Erkenntnisse über Art und Menge des Eintrages von Substanzen mit estrogenartiger Wirkung in die aquatische Umwelt. Folgerichtig fördert das Ministerium für Umwelt und Verkehr seit dem 1.4.1998 im Rahmen eines Werkvertrages eine entsprechende Untersuchung in diesem Bereich.

Unabhängig von der chemischen Natur der estrogenen Substanzen in Kläranlagenabläufen sind Untersuchungen erforderlich, inwieweit durch neue Techniken der Abwasserreinigung künftig der Eintrag solcher Stoffe mit einem vertretbaren Aufwand vermindert werden kann. Im Rahmen eines von der Deutschen Bundesstiftung Umwelt finanzierten Habilitationsstipendiums laufen hierzu bereits entsprechende Forschungen an der Universität Tübingen.

X Literatur

- Adlercreutz H. (1995): Estrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environ. Health Perspect.* **103** (Suppl. 7), 103 - 112.
- Ahmed S.A., Gogal R.M., Walsh J.E. (1993). A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes: an alternative to ³H thymidine incorporation assay. *J. Immun. Meth.* **70**, 211 - 224.
- Arnold S.F., Klotz D.M., Collins B.M., Vonier P.M., Guillette L.J., McLachlan J.A. (1996): Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals. *Science* **272**, 1489 - 1492.
- Autian J. (1973): Toxicity and health threats of phthalate esters: Review of the literature. *Environ. Health Perspect.* **4**, 3 - 26.
- Balaguer P., Denison M., Zacharewski T. (1995): *In vitro* recombinant receptor/reporter gene assays for assessing the estrogenic and dioxin-like activity of compounds and complex mixtures. *Organohalogen Compounds* **23**, 215 - 220 (DIOXIN 94).
- Ball P., Knuppen R., Haupt M., Breuer H. (1972): Interactions between estrogens and catechol amines III. Studies on the methylation of catechol estrogens, catechol amines and other catechols by the catechol-O-methyltransferase of human liver. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **34**, 736 - 742.
- Beato M. (1991): Transcriptional control by nuclear receptors. [review]. *FASEB J.* **5**, 2044 - 2051.
- Beato M., Herrlich P., Schuetz G. (1995): Steroid hormone receptors: many actors in search of a plot. *Cell* **83**, 851 - 857.
- Beck H., Droß A., Eckart K., Mathar W. und Wittkowski R. (1989). Determination of PCDDs and PCDFs in Irgasan DP 300. *Chemosphere* **19**, 167-170.
- Berry M., Metzger D., Chambon P. (1990): Role of the two activating domains of the oestrogen receptor in the cell-type and promoter-concept dependent agonistic activity of the antioestrogen 4-hydroxytamoxifen. *EMBO J.* **9**, 2811 - 2818.
- Berthois Y., Katzenellenbogen J.A., Katzenellenbogen B.S. (1986): Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: Implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 2496 - 2500.
- Berthois Y., Pons M., Dussert C., de Paulet A.C., Martin P.M. (1994): Agonist-antagonist activity of anti-estrogens in the human breast cancer cell line MCF-7: an hypothesis for the interaction with a site distinct from the estrogen binding site. *Molec. Cell. Endocrin.* **99**, 259 -265.
- Bitman J. & Cecil H.C. (1970): Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agr. Food Chem.* **18**, 1108 - 1112.
- Bitman J., Cecil H.C., Harris S.J., Fries G.F. (1968): Estrogenic activity of o,p'-DDT in mammalian uterus and avian oviduct. *Science* **162**, 371 - 372.
- Bradbury R.B. & White D.E. (1954): Estrogens and elated substances in plants. *Vit. Horm.* **12**, 207 - 233.

- Bradlow H.L., Davis D.W., Gong L., Sepkovic D., Tiwari R. (1995): Effects of pesticides on the ratio of 16 α /2-Hydroxyestrone: a biologic marker of breast cancer risk. *Environ. Health Perspect.* **103**, Suppl. 7, 147 - 150.
- Brown M. & Sharp P.A. (1990): Human estrogen receptor forms multiple protein-DNA complexes. *J. Biol. Chem.* **265**, 11238 - 11243.
- Brzozowski A.M., Pike A.C.W., Dauter Z., Hubbard R.E., Bonn T., Engström O., Öhman L., Greene G.L., Gustafsson J.-Å., Carlquist M. (1997): Molecular basis of agonism and antagonism in the oestrogen receptor, *Nature* **389**, 753 - 758.
- BUA (1988): BUA-Stoffbericht 13, Nonylphenol. Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker.
- BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (1994a): 4-Chlor-3-methylphenol, BUA-Stoffbericht 135. Hirzel, Stuttgart.
- BUA, Beratergremium für umweltrelevante Altstoffe der Gesellschaft Deutscher Chemiker (1994b): 4-Chlor-2-methylphenol, BUA-Stoffbericht 134. Hirzel, Stuttgart.
- Chone K., Roos W., Schmidt-Kayk H. (1991): Prognosefaktoren des Mammakarzinoms. *mta* **6**, 220 - 228.
- Colborn T., vom Saal F.S., Soto A. (1993): Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspect.* **101**, 378 - 384.
- Conning D.M. & Phillips J.C. (1986): Comparative metabolism of BHA, BHT and other phenolic antioxidants and its toxicological relevance. *Food & Chem. Toxicol.* **24**, 1145 - 1148.
- Cooper R.L., Chadwick R.W., Rehnberg G.L. (1989): Effect of lindane on hormonal control of reproductive function in the female rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **99**, 384 - 394.
- Coosen R. & van Velsen F.L. (1989): Effects of the β -Isomer of hexachlorocyclohexane on estrogen-sensitive human mammary tumor cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **101**, 310 - 318.
- Cook J.W., Dodds E.C., Hewett C.L. (1933): A synthetic oestrus-exciting compound. *Nature* **131**, 56.
- Danielian P.S., White R., Hoare S.R., Fawell S.E., Parker M.G. (1993): Identification of residues in the estrogen receptor that confer differential sensitivity to estrogen and hydroxytamoxifen. *Molec. Endocrin.* **7**, 232 - 240.
- Dauvois S., Danielian P.S., White R., Parker M.G. (1992): Antiestrogen ICI 164.384 reduces cellular estrogen receptor content by increasing its turnover. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 4037 - 4041.
- Davis D.L., Bradlow H.L., Wolff M., Woodruff T., Hoel D.G., Anton-Culver H. (1993): Medical hypothesis: xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. *Environ. Health Perspect.* **101**, 372 - 377.
- DeFriend D.J., Howell A., Nicholson R.I., Anderson E., Dowsett M., Mansel R.E., Blamey R.W., Bundred N.J., Robertson J.F., Saunders C., et al. (1994): Investigation of a pure new antiestrogen (ICI 182780) in women with primary breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 408 - 414.
- Dewailly E., Dodin S., Verreault R., Ayotte P., Sauvé L., Morin J., Brisson J. (1994): High organochlorine body burden in women with estrogen receptor-positive breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 232 - 234.
- Dodds E.C. & Lawson W. (1936): Synthetic estrogenic agents without the phenanthrene nucleus. *Nature* **137**, 996.
- Dodds E.C., Golberg L. Lawson W., Robinson R. (1938): Oestrogenic activity of certain synthetic compounds. *Nature* **141**, 247 - 248.
- Dubik D. & Shiu R.P. (1988): Transcriptional regulation of c-myc oncogene expression by estrogen in hormone-responsive human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **263**, 12705 - 12708.

- Eldridge J.C., Fleenor-Heysen D.G., Extrom P.C., Wetzel L.T., Breckenridge C. B., Gillis J.H., Luempert L.G., Stevens J.T. (1994): Short-term effects of chlorotriazines on estrus in female Sprague-Dawley and Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Environ. Health* **43**, 155 - 167.
- EPA, Environmental Protection Agency (1987): Health effects assessment for selected phthalic acid esters. U.S. Environ. Protection Agency, Cincinnati OH.
- Evans R.M. (1988): The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. [review]. *Science* **240**, 889 - 895.
- Falck F., Ricci A., Wolff M.S., Godbold J., Deckers P. (1992): Pesticides and polychlorinated biphenyl residues in human breast lipids and their relation to breast cancer. *Arch. Environ. Health*. **47**, 143 - 146.
- Faria T.N., Matos M., Tavares M.C.F., Carvalho A.P. (1984): Study of the effects of some neuroleptics and insecticides on estrogen-receptor binding of estrogen. *Molec. Cell. Biol.* **9**, 233 - 243.
- Flesch-Janys D., Berger J., Manz A., Nagel S., Ollroge I. (1993): Exposure to polychlorinated dibenzo-p-dioxins and -furans and breast cancer mortality in a cohort of female workers of a herbicide producing plant in Hamburg, FRG. *Organohalogen Compounds* **13**, 381 - 384 (DIOXIN 93).
- Folmar L.C., Denslow N.D., Rao V., Chow M., Crain D.A., Enblom J., Marcino J. and Guilette L.J. (1996): Vitellogenin induction and reduced serum testosterone concentrations in feral male carp (*Cyprinus carpio*) captured near a major metropolitan sewage treatment plant. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1096 - 1101.
- Fotsis T. & Adlercreutz H. (1987): The multicomponent analysis of estrogens in urine by ion exchange chromatography and GC-MS-I. Quantitation of estrogens after initial hydrolysis of conjugates. *J. Steroid Biochem.* **28**, 203 - 213.
- Fotsis T., Järvenpää P., Adlercreutz H. (1980): Purification of urine for quantification on the complete estrogen profile. *J. Steroid Biochem.* **12**, 503 - 508.
- Fotsis F., Zhang Y., Pepper M.S. Adlercreutz H., Montesano R., Nawroth P.P., Schweigerer L. (1994): The endogenous oestrogen metabolite 2-metoxyo-Estradiol inhibits angiogenesis and suppresis tumor growth. *Nature* **368**, 237 - 239.
- Fry D.M. & Toone C.K. (1981). DDT-induced feminization of gull embryos. *Science* **213**, 922 - 924.
- Gellert R.J. (1978a): Uterotrophic activity of polychlorinated biphenyls (PCB) and induction of precocious reproductive aging in neonatally treated female rats. *Environ. Res.* **16**, 123 - 130.
- Gellert R.J. (1978b): Kepone, Mirex, dieldrin, and aldrin: estrogenic activity and the induction of persistent vaginal estrus and anovulation in rats following neonatal treatment. *Environ. Res.* **16**, 131 - 138.
- Gelmann E.P. (1996): Tamoxifen Induction of apoptosis in estrogen receptor-negative cancers: new tricks for an old dog? *J. Nat. Cancer Inst.* **88**, 224 - 226.
- Gilbertson M., Kubiak T., Ludwig J., Fox G. (1991): Great Lakes embryo mortality, edema and deformities syndrome (GLE-MEDS) in colonial fish-eating birds: Similarity to chick edema disease. *J. Toxicol. Environ. Health* **33**, 455 - 520.
- Gimeno S., Gerritsen A., Bowmer T., Komen H. (1996): Feminization of male carp. *Nature* **384**, 221 - 222.
- Glass A.G. & Hoover R.N. (1990): Rising incidence of breast cancer: relationship to stage and receptor status. *J. Natl. Cancer. Inst.* **82**, 693 - 696.
- Guillette L.J., Gross T.S., Masson G.R., Matter M.M., Percival H.F., Woodward A.R. (1994): Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated and control lakes in Florida. *Environ. Health Perspect.* **102**, 680 - 688.
- Gupta P.K. & Gupta R.C. (1979): Pharmacology, toxicology and degradation of endosulfan. A review. *Toxicol.* **13**, 115 - 130.

- Gustafsson J.-A. (1998). Nuclear receptors and their interactions with hormonally active agents in food. In: *Hormonally active agents in food. symposium / Deutsche Forschungsgemeinschaft* (Eisenbrand G. et al., eds). Weinheim: Wiley-VCH, 53 - 61.
- Güttes S., Failing K., Neumann K., Kleinstein J., Georgii S., Brunn H. (1998): Chlororganic pesticides and polychlorinated biphenyls in breast tissue of women with benign and malignant breast disease. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **35**, 140 - 147.
- Hackenberg R., Lüttchens S., Hofmann J., Kunzmann R., Hölzel F., Schulz K.D. (1991): Androgen Sensitivity of the new human breast cancer cell line MFM-223. *Cancer Res.* **51**, 5722 - 5727.
- Hagenmaier H., Brunner H., Haag R., Berchtold A. (1986): PCDDs and PCDFs in sewage sludge, river and lake sediments from South West Germany. *Chemosphere* **15**, 1421 - 1428.
- Harries J.E., Sheahan D.A., Jobling S., Matthiessen P., Neall P., Routledge E.J., Rycroft R., Sumpter J.P., Taylor T. (1996): A survey of estrogenic activity in United Kingdom inland waters. *Environ. Toxicol. Chem.* **15**, 1993 - 2002.
- Harries C.A., Henttu P., Parker M.G., Sumpter J.P. (1997): The estrogenic activity of phthalate esters in vitro. *Environ. Health Perspect.* **105**, 802 - 811.
- Harris J.R., Lippman M.E., Veronesi U., Willett W. (1992): Breast cancer (first of three parts). *N. Engl. J. Med.* **327**, 319 - 328.
- Hertz R. (1985): The estrogen problem retrospect and prospect. In: *Estrogens in the Environment II - Influences on Development* (McLachlan J.A., ed). New York: Elsevier, 1 - 11.
- Hoyer A.P., Grandjean P., Jorgensen T., Brock J.W., Hartvig H.B. (1998): Organochlorine exposure and risk of breast cancer. *Lancet* **352**, 1816 - 1820.
- Hunter D.J., Hankinson S.E., Laden F., Colditz G.A., Manson J.A.E., Willett W.C., Speizer F.E., Wolff M.S. (1997): Plasma organochlorine levels and the risk of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **337**, 1253 - 1258.
- IARC, International Agency of Research on Cancer (1982): Butylbenzylphthalate. In: *Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans, Vol. 29. Some industrial chemicals and dyestuffs*. Lyon, 193 - 202.
- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M.G., Sumpter J.P. (1995): A variety of environmentally persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Health Perspect.* **103**, 582 - 587.
- Jordan V.C., Collins M.M., Rowsby L., Prestwich G. (1977): A monohydroxylated metabolite of tamoxifen with potent antioestrogenic activity. *J. Endocrinol.* **75**, 305 - 316.
- Jordan V.C. & Murphy C.S. (1990): Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents. *Endocrine Rev.* **11**, 578 - 610.
- Kavlock R.J., et al. (1996): Research needs for risk assessment of health and environmental effects of endocrine disruptors: A report of the U.S. EPA-sponsored workshop. *Environ. Health Perspect.* **104**, 715 - 740.
- Killinger D., Perel E., Daiilescu D., Kharlip L., Blackstein M.E. (1987): Aromatase activity in the breast and other peripheral tissues and its therapeutic regulation. *Steroids* **50**, 523- 535.
- Klotz D.M., Beckman B.S., Hill S.M., McLachlan J.A., Walters M. R., Arnold S.F. (1996): Identification of environmental chemicals with estrogenic activity using a combination of in vitro assays. *Environ. Health Perspect.* **104**, 1084 - 1089.
- Koch R. (1989): *Umweltchemikalien, Physikalisch-chemische Daten, Toxizitäten, Grenz- und Richtwerte, Umweltverhalten*. VCH, Weinheim.
- Körner W., Hanf V., Schuller W., Bartsch H., Zwirner M., Hagenmaier H. (1998): Validation and application of a rapid *in vitro* assay for assessing the estrogenic potency of halogenated phenolic

chemicals. *Chemosphere* **37**, 2395-2407.

Körner W., Hanf V., Schuller W., Kempfer C., Metzger J., Hagenmaier H. (1999): Development of a sensitive E-screen assay for quantitative analysis of estrogenic activity in municipal sewage plant effluents, *Sci Tot Environ*, im Druck.

Krieger N., Wolff M.S., Hiatt R.A., Rivera M., Vogelmann J., Orentreich N. (1994): Breast cancer and serum organochlorines: a prospective study among white, black, and Asian women. *J. Natl. Cancer Inst.* **86**, 589 - 599.

Krishnan V. & Safe S. (1993): Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxins (PCDDs), and dibenzofurans as antiestrogens in MCF-7 human breast cancer cells: Quantitative structure-activity relationships. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **120**, 55 - 61.

Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L., Feldman D. (1993): Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* **132**, 2278 - 2286.

Kuiper G.G.J.M, Enmark E., Peltö-Huikko M., Nilsson S., Gustafsson J.-A (1996): Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 5925.

Kumar V. & Chambon P. (1988): The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* **55**, 145 - 156.

Kumar V., Green S., Stack G., Berry M., Jin J.R., Chambon P. (1987): Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* **51**, 941 - 951.

Lamartinière C.A., Moore J., Holland M., Barnes S. (1995): Neonatal genistein chemoprevents mammary cancer. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 120 - 123.

Le Cam (1991): Natural tyrosine-kinase inhibitors. *Pathol. Biol.* **39**, 796 - 800.

Legler J., Bouwman L., Murk A.J., Brouwer A. (1996): Determination of dioxin- and estrogen-like activity in sediment extracts using *in vitro* CALUX assays. *Organohalogen Compounds* **29**, 347 - 352.

Legler J., Van der Brink C., Brouwer A., Vethaak A.D., Van der Saag P., Murk A.J., Van der Burg B. (1998): Assessment of (anti-)estrogenic compounds using a stably transfected luciferase reporter gene assay in the human T47-D breast cancer cell line. *Organohalogen Compounds* **37**, 265 - 268.

Lindl T. & Bauer A. (1994): Zell- und Gewebekultur. 3. Auflage. Verlag G. Fischer, Stuttgart.

Loeber J.G. & Van Velsen F.L. (1984): Uterotropic effect of β -HCH, a food chain contaminant. *Food Addit. Contam.* **1**, 63-66.

Lookhart G.L., Jones B.L., Finney K.F. (1978): Determination of coumestrol in soybeans by high-performance liquid and thin-layer chromatography. *Cereal Chem.* **55**, 967 - 972.

López-Carillo L., Blair A., López-Cervantes M., Cebrián M., Rueda C., Reyes R., Mohar A., Bravo J. (1997): Dichlorodiphenyltrichloroethane serum levels and breast cancer risk: a case control study from Mexico. *Cancer Res.* **57**, 3728 - 3732.

Lundh T. (1995): Metabolism of estrogenic isoflavone in domestic animals. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**, 33 - 39.

Mäkelä S., Pylkkänen L., Santti R., Adlercreutz H. (1995): Dietary soybean may be antiestrogenic in male mouse. *J. Nutr.* **125**, 437 - 445.

Martin L., Pollard J.W., Fagg B. (1976): Oestriol, oestradiol-17 β and the proliferation and death of uterine cells. *J. Endocrinol.* **69**, 103 - 115.

Mayer U., Butsch A., Schneider S. (1992). Validation of two *in vitro* test systems for estrogenic activities with zearalenone phytoestrogens and cereal extracts. *Toxicology* **74**, 135 - 149.

McEwen B.S., Biegon A., Davis P.G., Krey L.C., Luine V.N., McGinnis M.Y., Paden C.M., Parsons B., Rainbow T.C. (1982): Steroid hormones: Humoral signals which alter brain cell properties and functions. *Rec. Progr. Horm. Res.* **38**, 41 - 49.

- McLachlan J.A. (1997): Synergistic effect of environmental estrogens: Report withdrawn. *Science* **25**, 459 - 460.
- Miller W.R. & O'Neil J. (1987): The importance of local synthesis of estrogen within breast. *Steroids* **50**, 537 - 548.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1987): Survey of plasticisers levels in food contact materials and in foods. Food surveillance paper no. 21. London. Her Majesty's Stationery Office.
- Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (1990): Plasticisers: continuing surveillance. Food surveillance paper no. 30. London: Her Majesty's Stationery Office.
- Mosmann T. (1983): Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth.* **65**, 55 - 63.
- Müller G. & Kim U.H. (1978): Displacement of estradiol from estrogen receptors by simple alkylphenols. *Endocrinol.* **102**, 1429 - 1435.
- Müller H. (1997): Persönliche Mitteilung, Meersburg, 10.12.1997.
- Mussalo-Rauhamaa H., Häsänen E., Pyysalo H., Antervo K., Kauppila R., Pantzar P. (1990): Occurrence of beta-hexachlorocyclohexane in breast cancer patients. *Cancer* **66**, 2124 - 2128.
- Naqvi S.M. & Vaishnavi C. (1993): Bioaccumulative potential and toxicity of endosulfan insecticide to non-target animals. *Comp. Biochem. Physiol.* 105C, 347 - 361.
- Parker M.G. (1993): Structure and function of the oestrogen receptor. *J. Endocrinol.* **5**, 223 - 228.
- Pelissero C., Flouriot G., Foucher J.L., Bennetau B., Dunogues J., Le Ga F., Sumpter J.P. (1993): Vitellogenin synthesis in cultured hepatocytes; an *in vitro* test for the estrogenic potency of chemicals. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **44**, 263 - 272.
- Purdom C.E., Hardiman P.A., Bye V.J., Eno N.C., Tyler C.R., Sumpter J.P. (1994): Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* **8**, 275 - 285.
- Ranney R.E. (1977): Comparative metabolism of 17 α -ethinylsteroids used in oral contraceptives. *J. Toxicol. Environ. Health* **3**, 139 - 166.
- Routledge E.J. & Sumpter J.P. (1997): Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.* **6**, 3280 - 3288.
- Routledge E.J., Sheahan D., Desbrow C., Brighty G.C., Waldock M., Sumpter J.P. (1998): Identification of estrogenic chemicals in STW effluent. 2. In vivo responses in trout and roach, *Environ Sci Tech* **32**, 1559 - 1565.
- Schäfer W.R., Zahradnik H.P., Frijus-Plessen N., Schneider K. (1996): Anthropogene Substanzen mit unerwünschter Östrogenwirkung: Auswahl von expositionsrelevanten Stoffen. *Umweltmed. Forsch. Prax.* **1**, 35 - 42.
- Schrenk D., Lipp H.P., Wiesmüller T., Hagenmaier H., Bock K.W. (1991): Assessment of biological activities of mixtures of polychlorinated dibenzo-p-dioxins: comparison between defined mixtures and their constituents. *Arch. Toxicol.* **65**, 114 - 118.
- Schütze N., Vollmer G., Tiemann I., Geiger M., Knuppen P. (1993): Catecholestrogens are MCF-7 cell estrogen receptor agonists. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **46**, 781 - 789.
- Sharpe R.M., Fisher J.S., Millar M.M., Jobling S., Sumpter J.P. (1995): Gestational and lactational exposure of rats to xenoestrogens results in reduced testicular size and sperm production. *Environ Health Persp.* **103**, 1136 - 1143.
- Sharpe R.M., Turner K.T., Sumpter J.P. (1998): Endocrine disruptors and testis development. *Environ Health Persp.* **106**, A220 - A221.

- Simon W.E., Albrecht M., Trams G., Dietel M., Hölzel F. (1984): *In vitro* growth promotion of human mammary carcinoma cells by steroid hormones, tamoxifen and prolactin. *J. Nat. Cancer Inst.* **73**, 313 - 321.
- Singh S.K. & Pandey R.S. (1990): Effect of sub-chronic endosulfan exposures on plasma gonadotropins, testosterone, testicular testosterone and enzymes of androgen biosynthesis in rat. *Ind. J. Exp. Biol.* **28**, 953-956.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren J.T., Bokesch H., Kenney S., Boyd M.R. (1990): New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- Sonnenschein C., Soto A., Fernandez M.F., Olea N., Olea-Serrano M.F., Ruiz-Lopez M.D. (1995): Development of a marker of estrogenic exposure in human serum, *Clin. Chem.* **41**, 1888 - 1895.
- Soto A.M., Justicia H., Wray J.W., Sonnenschein C. (1991): p-nonyl-phenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect.* **92**, 167 - 173.
- Soto A.M., Lin T.-M., Justicia H., Silvia R.M., Sonnenschein C. (1992): An "in culture" bioassay to assess the estrogenicity of xenobiotics (E-screen). In: Chemically-induced alterations in sexual and functional development: the wildlife/human connection (T. Colborn, C. Clement, eds.). Princeton NJ: Princeton Scientific Publishing, 295 - 309.
- Soto A.M., Silvia R.M., Sonnenschein C. (1992b): A plasma-borne specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive breast tumor cells (estrocolyone-I). *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **43**, 703 - 712.
- Soto A.M., Chung K.L., Sonnenschein C. (1994): The pesticides endosulfan, toxaphene, and dieldrin have estrogenic effects on human estrogen-sensitive cells. *Environ. Health Perspect.* **102**, 380 - 383.
- Soto A.M., Sonnenschein C., Chung K.L., Fernandez M.F., Olea N., Olea-Serrano M.F. (1995): The E-Screen assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* **103** Suppl. 7, 113 - 122.
- Stanley E.R., Palmer R.E., Sohn U. (1977): Development of methods for the quantitative in vitro analysis of androgen-dependent and autonomous Shionogi carcinoma 115 cells. *Cell* **10**, 35 - 44.
- Stover E.P., Krishnan A.V., Feldman D. (1987): Estrogen down-regulation of androgen receptors in cultured human mammary cancer cells (MCF-7). *Endocrinol.* **120**, 2597 - 2603.
- Telang N.T., Suto A., Wong G.Y., Osborne M.P., Bradlow H.L. (1992): Induction by estrogen metabolite 16 α -hydroxyestrone of genotoxic damage and aberrant proliferation in mouse mammary epithelial cells. *J. Natl. Cancer Inst.* **84**, 634 - 638.
- Ternes T.A. (1997): Pharmaka-Rückstände - Neue Umweltchemikalien? Vortrag auf dem 2. Statuskolloquium „Ökotoxikologische Forschung in der Euregio Bodensee“. Meersburg, 10./11.12.1997
- Tora L., Mullick A., Metzger D., Ponglikitmongkol M., Park I., Chambon P. (1989): The cloned human estrogen receptor contains a mutation which alters its hormone binding properties. *EMBO J.* **8**, 1981 - 1986.
- Tora L., White J., Brou C., Tasset D., Webster N., Scheer E., Chambon P. (1989b): The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell* **59**, 477 - 487.
- Tsai S.Y., Carlstedt-Duke J., Weigel N.L., Dahlman K., Gustafsson J.A., Tsai M.J., O'Malley B.W. (1988): Molecular interactions of steroid hormone receptor with its enhancer element: evidence for receptor dimer formation. *Cell* **55**, 361 - 369.
- Tullner W.W. (1961): Uterotrophic action of the insecticide methoxychlor. *Science* **133**, 647 - 648.
- Turan, A. (1995): Exkretion natürlicher und synthetischer Östrogene und ihrer Metabolite: Vorkommen und Verhalten im Wasser. Texte des Umweltbundesamtes **65**, 16 - 21.

- Vandewalle B. & Lefebvre J. (1989): Opposite effects of estrogen and catechol-estrogen on hormone-sensitive breast cancer cell growth and differentiation. *Molec. Cell. Endocrinol.* **61**, 239 - 246.
- Villalobos M., Olea N., Brotons J.A., Olea-Serrano M.F., Ruiz de Almodovar J.M., Pedraza V. (1995): The E-Screen assay: a comparison of different MCF7 cell stocks. *Environ. Health Perspect.* **103**, 844 - 850.
- Walz E. (1931): Isoflavon- and saponin-glycoside in Soja hispida. *Liebigs Ann. Chem.* **498**, 118 - 155.
- Webster N.J.G., Green S., Jia Rui J., Chambon P. (1988): The hormone-binding domains of the estrogen and glucocorticoid receptors contain an inducible transcription activating function. *Cell* **54**, 199 - 207.
- Weisz A. & Bresciani F. (1988): Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. *Mol. Endocrinol.* **2**, 816 - 824.
- Welshons W.V., Rottinghaus G.E., Nonnemann D.J., Dolan-Timpe M., Ross P.F. (1990): A sensitive bioassay for detection of dietary estrogens in feeds. *J. Veter.. Diagn. Inv.* **2**, 268 - 273.
- Wester P.J., Canton J.H., Bisschop A. (1985): Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term β -hexachlorocyclohexane exposure. *Aquat. Toxicol.* **6**, 271-296.
- WHO, World Health Organization (1995): Tetrabromobisphenol A and Derivatives. Environmental Health Criteria 172.
- Wine R.N. Li L.-H., Hommel Barnes L., Gulati D.K., Chapin R.E. (1997): The reproductive toxicity of di-n-butylphthalate in a continuous breeding protocol in Sprague-Dawley rats. *Environ. Health Perspect.* **105**, 102-107.
- Wolff M.S., Toniolo P.G., Lee E.W., Rivera M., Dubin N. (1993): Blood levels of organochlorine residues and risk of breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.* **85**, 648 - 652.

Danksagungen

Den folgenden Personen und Institutionen sei an dieser Stelle sehr herzlich gedankt:

Frau Dr. Rita Tribskorn, Zoologisches Institut, Abt. Physiologische Ökologie, Universität Tübingen, für die Kooperation bei der Untersuchung von Fließgewässern, sowie für wertvolle Anregungen und Diskussionen.

Herrn Dipl.-Chem. Martin Walczok, Institut für Organische Chemie der Universität Tübingen, den Mitarbeitern des Seenforschungsinstitutes Langenargen, insbesondere Herrn Dr. Schröder sowie Prof. Dr. German Müller, Institut für Umwelt-/ Geochemie, Universität Heidelberg für die Entnahme, Datierung und Vorbereitung der Sedimentproben vom Bodensee.

Herrn Josef Greve, Fraunhofer-Institut für Umweltchemie und Ökotoxikologie, Schmallenberg, für das EXCEL5-Zusatzprogramm zur Durchführung der Probit-Regression und Berechnung der EC₅₀-Werte.

Dem Land Baden-Württemberg für die Finanzierung dieses Forschungsprojektes.