

Forschungsbericht FZKA-BWPLUS

**Erfassung der hormonellen Aktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen  
und Umweltkontaminanten mittels funktioneller Reporterassays**

von

Eisenbrand, G., Seng, D., Mußler, B.  
Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie  
Universität Kaiserslautern

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

Förderkennzeichen: PUGU 96017

September 2000

# **Erfassung der hormonellen Aktivität von Lebensmittelinhaltsstoffen und Umweltkontaminanten mittels funktioneller Reporterassays**

Eisenbrand, G., Seng, D., Mußler, B.

Lebensmittelchemie und Umwelttoxikologie

Universität Kaiserslautern, E. Schrödingerstr. 52, 67663 Kaiserslautern

## **1. Einleitung**

### **1.1 Projektziele**

Mittels Literatursichtung und begleitenden molecular modeling Verfahren wurden Vertreter verschiedener Verbindungsklassen aus dem Bereich Lebensmittelinhaltsstoffe und -kontaminanten sowie Stoffe aus Bedarfsgegenständen und kosmetischen Mitteln auf ihre estrogene/antiestrogene Wirkung untersucht.

Für die funktionelle Prüfung des hormonellen Potentials der Testverbindungen wurde eine stabil mit einem steroidhormonrezeptorkontrollierten Reportergensystem transfizierte humane Brustkrebszelllinie (MCF-7) herangezogen. Dieses validierte Testsystem ermöglicht mit der entsprechenden instrumentellen Laborausstattung einen relativ hohen Probendurchsatz. Das Testsystem erlaubt auch eine frühe und weitreichende Charakterisierung des Wirkpotentials der Testverbindungen.

Parallel sollten rezeptornegative Säugerzellen (COS-7; CV-1; CHO; HEK-293) durch transiente Kotransfektion von Expressionsplasmiden für rekombinante Rezeptorproteine (Estrogen- und Androgenrezeptor) zusammen mit hormonrezeptorkontrollierten Reportergenvektoren als Testsystem etabliert und validiert werden. Eine Selektion stabil transfizierter Klone aus solchen transient transfizierten Zelllinien wurde ebenfalls durchgeführt.

Die genannten Testsysteme erlauben die detaillierte Untersuchung von Testverbindungen auf endokrine Wirkungen. Außerdem erlauben diese Systeme die schnelle und kostengünstige Analyse von Kombinationseffekten von Substanzgemischen unter Einschluß eines eventuellen antagonistischen Potentials.

### **1.2. Stand der Wissenschaft**

Endokrine Disruptoren aus Lebensmitteln, kosmetischen Mitteln und Bedarfsgegenständen und möglicherweise aus Trinkwasser (als Kontaminanten) finden seit einiger Zeit als potentielle Ursachen für bestimmte körperliche Fehlfunktionen wie Zyklusverschiebungen, Beeinträchtigung der Fertilität, vermehrte Inzidenz maligner Neoplasien in

hormonabhängigem Gewebe bis hin zu Verhaltensänderungen bei *in utero* exponierten Individuen zunehmende öffentliche und wissenschaftliche Beachtung. Verbindungen mit einem derartigen Wirkspektrum stellen chemisch eine heterogene Gruppe dar, die als Nahrungsmittelinhaltsstoffe (Phytoestrogene) oder als Kontaminanten (z.B. Pestizide und deren Metabolite) auf Mensch und Umwelt Einfluß nehmen können. Neben Einflüssen durch estrogen/antiestrogen aktive Verbindungen ergeben neuere Untersuchungen auch Hinweise auf antiandrogene Effekte, die durch Verbindungen anthropogenen Ursprungs hervorgerufen werden können.

Angesichts der großen strukturellen Heterogenität der im Verdacht stehenden endokrinen Disruptoren läßt sich eine systematische Erfassung und Quantifizierung der Effekte nur mittels funktioneller Testsysteme durchführen. Etabliert sind *in vivo* Ansätze an juvenilen Nagern oder an ovariectomierten Tieren, z.B. in Form des "uterotrophen Assays", deren Durchführung jedoch technisch und finanziell aufwendig ist und hohe Tierzahlen erfordert.

Dagegen erlauben schnelle und kostengünstigere *in vitro* Screeningsysteme die Durchmusterung einer großen Anzahl unterschiedlicher Stoffklassen auf ihr hormonelles/antihormonelles Potential.

Für *in vitro* Testansätze werden hauptsächlich Proliferationsassays hormonabhängig wachsender Zellen tierischen oder menschlichen Ursprungs eingesetzt. Das durch die Testverbindungen induzierte Wachstum von Zellen in Bezug zum physiologischen Agonisten Estradiol dient als Maß für ein eventuell vorhandenes hormonelles/antihormonelles Potential. Daneben werden Zellkulturen eingesetzt, in denen die funktionelle Aktivität der zu untersuchenden Stoffe mittels biochemischer Marker verfolgt wird. Beispiele sind die Expression eines ausschließlich hormoninduzierten physiologischen Proteins wie des Vitellogenins oder des pS2-Proteins oder der Einsatz eines künstlich transfizierten Reportergens, deren Expression mit der hormonellen Potenz der Testverbindung korreliert.

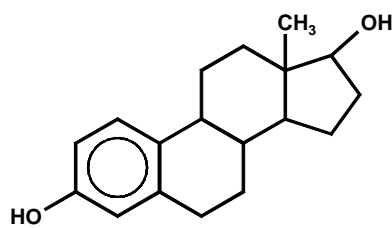
Untersuchungen der direkten Interaktion des Ligand-Rezeptor-Komplexes mit einer spezifischen DNA-Sequenz („Response Element“) erlauben in Einzelfällen mechanistisch vertiefende Einblicke. Hierbei wird die unterschiedliche Wanderungsgeschwindigkeit von Ligand-Rezeptor-DNA Komplexen im Verhältnis zur freien DNA in einem nativen Polyacrylamidgel ausgenutzt („Band-Shift-Assay“). Für einen breiten Einsatz als Screening ist diese Methode jedoch zu aufwendig.

Ansätze, mittels "molecular modeling" eine quantitative Struktur-Aktivitäts-Beziehung (QSAR) bzw. eine Simulation der Rezeptor-Ligand-Bindung (Docking) zu erzielen, wurden ergänzend einbezogen. Innerhalb einzelner Wirkstoffklassen können so potentiell relevante Kandidaten nach Strukturmerkmalen für biologische Wirkprüfungen vorausgewählt werden.

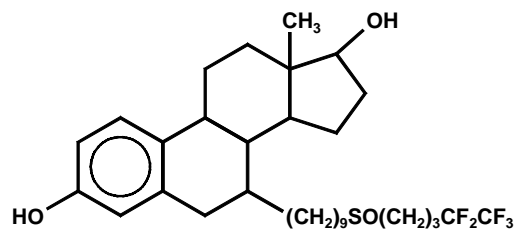
Substanzgruppen, die für die in Frage stehenden Wirkungen relevant sein können, sind in ihren chemischen Eigenschaften äußerst heterogen. Sie weisen unterschiedliche chemische Strukturen und Wirkqualitäten in biologischen Wirkungstests auf. Auf der Basis bislang durchgeführter Untersuchungen bzw. entsprechender Literaturbefunde können u. a. folgende Substanzen bzw. Substanzgruppen als relevant eingestuft werden (Formeln siehe Anhang).

Alkylphenole bzw. Alkylphenoethoxylate wie Nonylphenol, Oktylphenol; Bisphenole wie *Bisphenol A*; *Phthalate* wie Diethylhexylphthalat (*DEHP*), *Benzylbutylphthalat (BBP)*; Pflanzenschutzmittel wie *Endosulfan*, *Dieldrin*, *Chlordan*, *Toxaphen*, *o,p'-DDT*, *p,p'-DDE*; Phytoestrogene wie *Coumestrol*, *Daidzein*, *Genistein*, *Stigmastanol*, *Sitosterol*; Stilbenderivate wie *DES*, *Resveratrol*, *Piceatannol*, natürliche und synthetische weibliche Sexualhormone wie *17 $\beta$ -Estradiol*, *Ethinylestradiol*.

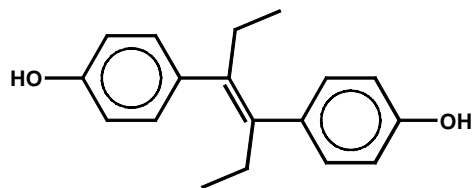
**Abb. 1:** Strukturen ausgewählter endokriner Disruptoren



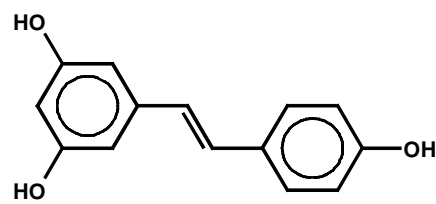
17- $\beta$ -Estradiol



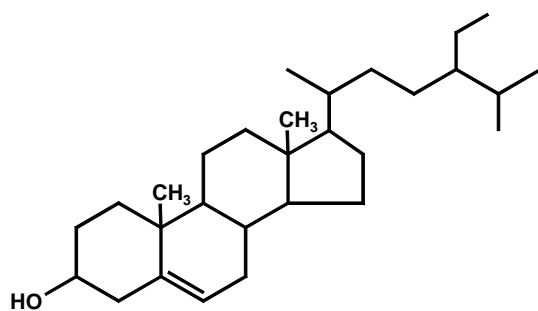
ICI 182,780



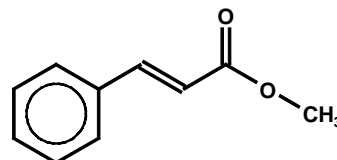
Diethylstilbestrol



Resveratrol



$\beta$ -Sitosterol



Zimtsäuremethylester

## 2. Aufgabenstellung: Methodenentwicklung

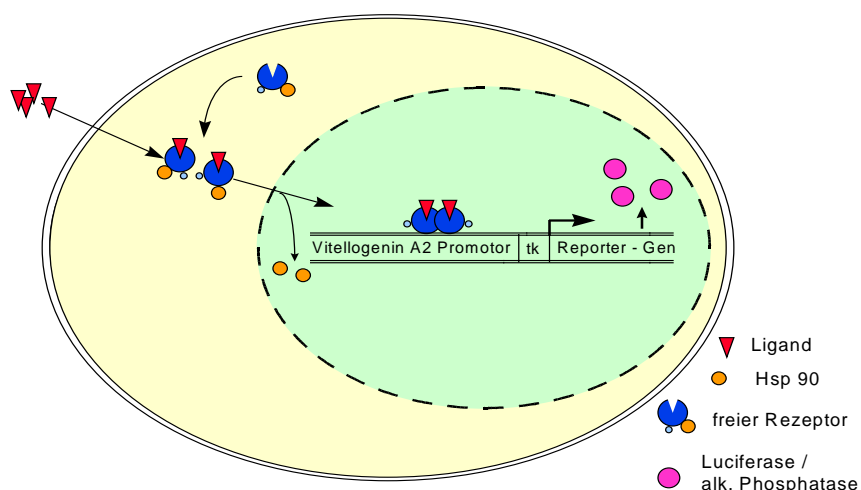
### 2.1. Molecular Modeling

Ergänzend zur sensitiven Erfassung hormoneller/antihormoneller Wirkqualitäten bekannter Vertreter bestimmter Substanzklassen in funktionellen Transaktivierungstestsystemen, sollten Strukturanaloga durch „molecular modeling“, verknüpft durch on-line Datenbanksuche, für eine *in vitro* Evaluierung ausgewählt werden und die Prädiktivität dieser rechnergestützten Struktursuche in unseren biologischen Testmodellen überprüft werden.

### 2.2 Transaktivierungssysteme zur Erfassung eines estrogenen Wirkpotentials

Mittels verschiedener Vektoren wurden spezifische steroidhormonrezeptorabhängige Promotorsequenzen (Vitellogenin A2-tk-; MMTV-tk-) mit jeweils einem der Reportergene Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT), Luciferase oder placentarer alkalischer Phosphatase (SEAP) transfiziert. Ligand-Rezeptor-Interaktion mit nachfolgender Aktivierung und Dimerisierung des Rezeptors führt zur DNA-Interaktion, aufgrund derer die Transkription und Translation des Reportergens erfolgt. (vgl. Abb. 2).

**Abb. 2:** Schematische Darstellung des verwendeten zellulären Systems



**Tab. 1:** Versuchsdurchführung der Transaktivierungstestsysteme und des E-Screen-assays (s.2.3.)

| <b>Transaktivierungsassay<br/>(estrogen aktive Stoffe)</b> | <b>E-Screen-Assay</b>                         |
|--|---|
| Zellen ( $1 \times 10^6$ ) in Petrischalen aussäen         | Zellen (6000/well) in 24-well-Platten aussäen |
| Inkubation der Zellen in serumfreiem Medium (24 h)         | Inkubation der Zellen mit CDFCS-Medium (5 d)  |
| Nachinkubation der Zellen in 10% CDFCS-Medium (18 h)       | Zellyse und Fixierung                         |
| Zellyse  | Färbung mit Sulforhodamin B                   |
| Luminometer/ELISA  | Photometrische Quantifizierung bei 564 nm     |

### 2.3. Proliferationsassays (E-Screen-Assay)

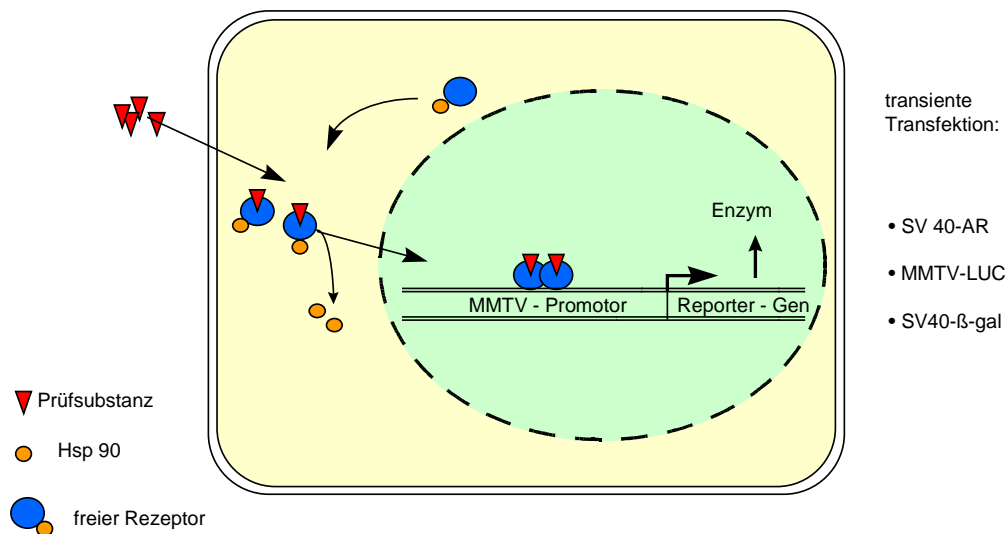
Vergleichend durchgeführte Messungen mit dem als Estrogen-Screening-Assay (E-Screen-Assay) bezeichneten Wachstumstest erlauben den Vergleich mit Literaturbefunden. Als Meßparameter dient hierbei die Proliferation, unter der Annahme, daß diese im wesentlichen Estrogenrezeptor-vermittelt gesteuert wird.

### 2.4. Transaktivierungssysteme zur Erfassung eines androgenen/antiandrogenen Wirkpotentials

Ein mögliches androgenes/antiandrogenes Potential von Fremdstoffen erfordert ein erweitertes Prüfspektrum und die Entwicklung ergänzender Testsysteme.

Zur Etablierung eines transgenen Reportergensystems für die Erfassung androgener Wirkungen wurden CV-1 und COS-7 Zellen mit dem Expressionsplasmid pSG5-AR, dem Reportergenplasmid pMMTV-LUC und dem Kontrollplasmid pSV $\beta$ -Galaktosidase mittels Elektroporation transient transfiziert.

**Abb. 3:** Schematische Darstellung des Reportergensystems zur Identifizierung von androgenen/antiandrogenen Fremdstoffen



Durchführung:

CV-1 oder COS-7 Zellen ( $4 \times 10^6/500 \mu\text{l}$ ) werden auf Eis mit jeweils  $20 \mu\text{l}$  pSG5-AR, pMMTV-LUC und pSVβ-Galaktosidase versetzt. Die Elektroporation erfolgt bei  $1000 \mu\text{F}$  und  $330 \text{V}$ . Nach weiteren 10 Minuten auf Eis werden die Zellen in CDFKS über Nacht ausgesät. Inkubation der Zellen mit Positiv-, Negativkontrollen und den entsprechenden Testverbindungen erfolgt für 48 h in CDFKS, Zellyse mit hypotonischem Lysepuffer und Bestimmung der Luciferase- und β-Galaktosidase-Aktivität in einem Mikroplattenluminometer. Die Normierung der Luciferaseaktivität erfolgt gegen die β-Galaktosidaseaktivität als Maß für die Transfektionseffizienz. Die Luciferaseaktivität korreliert direkt mit der agonistischen bzw. antagonistischen Wirkung der Testverbindungen.

## 2.5. Klonierung weiterer Reporter-genvektoren

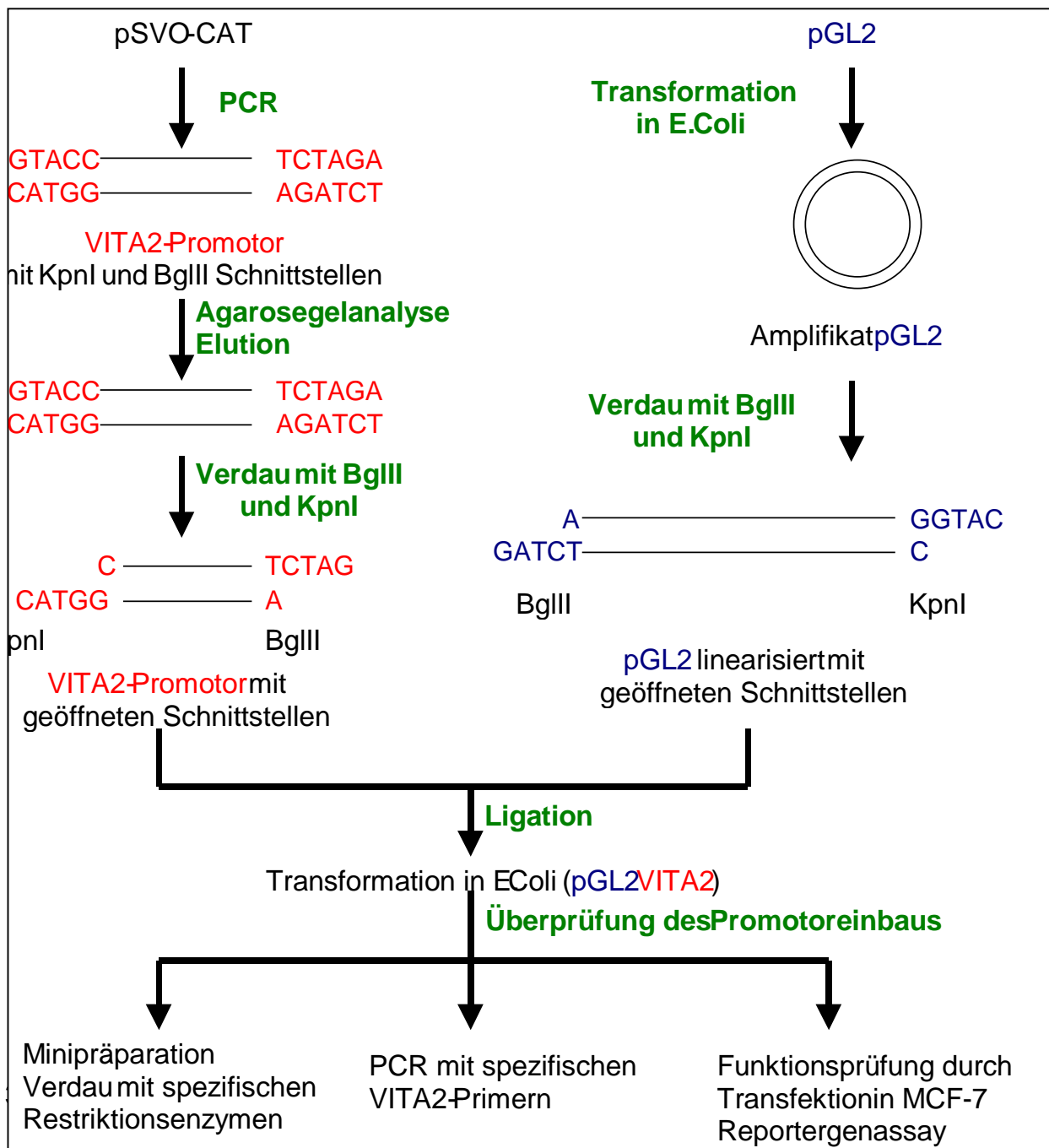
Zur Entwicklung und Etablierung eines spezifischen Reporter-genzellsystems mit erhöhter Sensitivität wurde die steroidhormonabhängige Promotorsequenz Vitellogenin A2, die vier EREs in natürlicher Konformation enthält, in das Reporter-genplasmid pSEAP2 eingebracht. Nach erfolgreicher Konstruktion des entsprechenden Plasmids wurden erste Transfektionsversuche mit der humanen Mammacarcinomzelllinie MCF-7 zur Überprüfung des Promotor-Einbaus durchgeführt. Die stabile Integration in die humane Mammacarcinomzelllinie MCF-7 wird angestrebt.

Die Etablierung weiterer transgener Reporter-gen-systeme diene der Verbreiterung der Testbatterie. In Ergänzung der vorhandenen Luciferase-Reporter-gen-systeme konnte ein

Reportergensystem unter Verwendung der sekretierbaren alkalischen Phosphatase (SEAP) etabliert und validiert werden.

Zur Erweiterung des transgenen Reportergenassayspektrums wurde das pSEAP2-Enhancer Reportergenplasmid (Clontech®) durch Umklonierung des estrogenabhängigen Vitellogenin A2- wild type Promotors konstruiert. Dieses Reportergenkonstrukt erlaubt eine leichtere und schnellere Durchführung der funktionellen Reportergenassays vor allem dadurch, daß das Genprodukt sezerniert wird und so leicht quantifiziert werden kann (Abb. 4).

**Abb. 4:** Konstruktion des Reportergenplasmids pVITA2-SEAP





### 3.1 Molecular Modeling

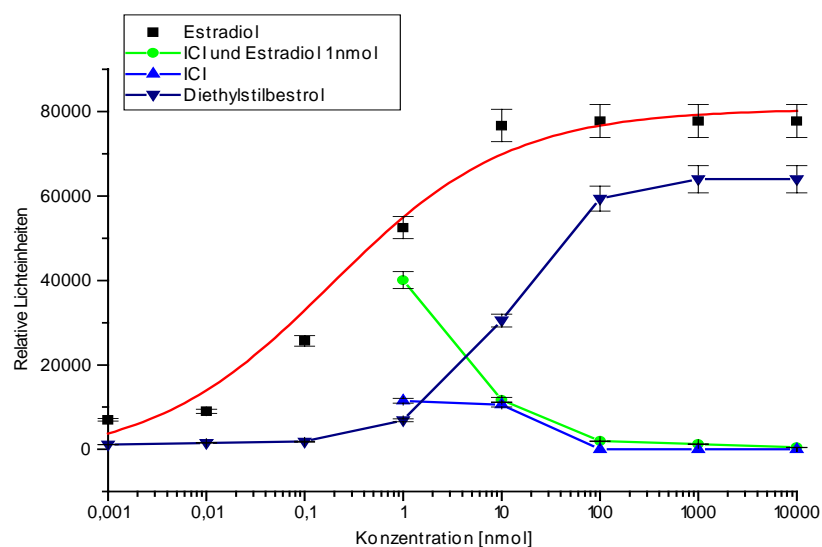
Ausgehend von bekannten Agonisten/Antagonisten wurde in gezielten Strukturelementrecherchen mittels online-Datenbanken (z.B. Crossfire - Beilstein) nach weiteren Verbindungen mit Struktur-/Teilstruktur-Analogie gesucht. Mittels molecular-modeling-Verfahren bzw. vergleichender Molekularfeldanalyse (CoMFA) kann eine gezielte Vorauswahl von Strukturelementen bzw. Strukturen erfolgen. Diese Berechnungen werden mit Hilfe des Programmes SYBYL 6.5 der Fa. Tripos, München, durchgeführt. Auf diese Weise neu identifizierte Verbindungen werden dann im Transaktivierungsassay in Dosis-Wirkungsuntersuchungen hinsichtlich potentieller endokriner Wirksamkeit untersucht.

### 3.2 Darstellung verschiedener Einzelergebnisse

#### 3.2.1. Validierung des stabil transfizierten Reportergensystems MCF-7-VITA2-LUC

Die Validierung des stabil transfizierten MCF-7-VITA2-LUC-Testsystems erfolgte mit dem physiologischen Liganden Estradiol ( $E_2$ ), dem Diethylstilbestrol (DES) als bekannten Agonisten sowie dem in der Literatur beschriebenen reinen Antagonisten ICI 182,780. DES wirkt in diesem Testsystem als Estrogenrezeptor-Agonist mit klassisch dosisabhängigem Effekt. Die Wirkung des physiologischen Liganden Estradiol (1 nM) wird durch steigende ICI 182,780 Konzentrationen praktisch vollständig gehemmt (Abb. 5).

**Abb. 5:** Validierung des Transaktivierungsassays in stabil transfizierten humanen Brustkrebszelllinien MCF-7-VITA2-LUC



### **3.2.2. Beispiele für Stoffe, die nach rechnergestützt erarbeiteten Strukturhomologiekriterien im MCF-7-LUC-System identifiziert und geprüft wurden:**

Abb. 6 und 7 zeigen exemplarisch die Reporter- bzw. Wachstumsinduktion einer nach strukturellen Eigenschaften vergleichend geprüften Stoffklasse von potentiell estrogen aktiven Verbindungen. Ausgehend von dem potenten Estrogen Diethylstilbestrol wurden Verbindungen, die als Kontaminanten oder als pflanzliche Estrogene in Nahrungsmitteln vorkommen können, als Einzelstoffe auf ihr hormonelles Potential untersucht. Im Reporterassay ergab sich für alle Verbindungen eine Wechselwirkung mit dem Estrogenrezeptor-Promotor-Komplex. Estradiol ist im Vergleich der potenteste Agonist, gefolgt von Diethylstilbestrol und einem optischen Aufheller. Die pflanzlichen Stilbene Resveratrol und Piceatannol sowie der komplex substituierte optische Aufheller B zeigen eine deutlich schwächere estrogen Aktivität (vgl. 4.).

Im Wachstumsassay zeigt Diethylstilbestrol eine höhere estrogen Aktivität als Estradiol während Resveratrol erst in der höchsten Konzentration ein nennenswertes estrogenes Potential zeigt. Piceatannol konnte in hoher Konzentration aufgrund starker toxischer Effekte nicht geprüft werden. Angesichts potentiell unspezifischer Effekte auf das Wachstum sind allerdings Ergebnisse aus dem E-Screen-Assays insgesamt kritisch zu bewerten.

Für die rechnergestützte Ermittlung von möglichen Struktur-Wirkungsbeziehungen sind Stoffklassen-spezifische Testreihen essentiell. Dies erlaubt die relative Einordnung einer Testverbindung in Bezug auf das physiologische Hormon. Mittels molecular modeling Verfahren (z.B. CoMFA) kann dann eine prädiktive Consensusstruktur eines strukturell optimierten Liganden erarbeitet werden. Anhand einer so gewonnen „Template“-Struktur können in on line Datenbanken weitere Verbindungen identifiziert werden. Die Überprüfung im biologischen System sollte es erlauben, iterativ die Prädiktivität des molecular modeling Ansatzes zu verbessern

Abb. 6: Ergebnisse des Transaktivierungsassays verschiedener Stilbenderivate in stabil transfizierten humanen Brustkrebszelllinien MCF-7-VITA2-LUC

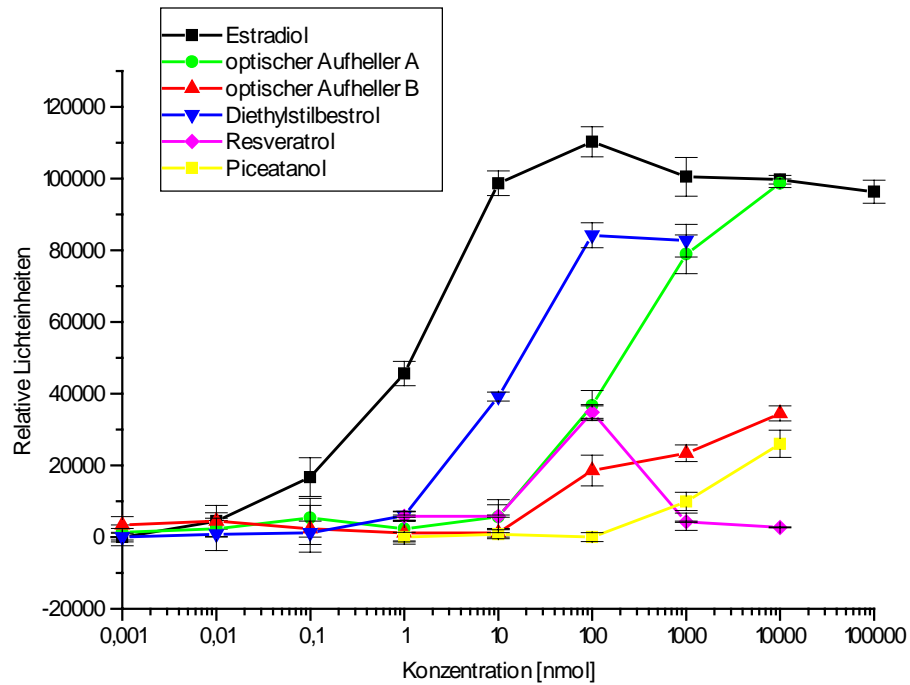
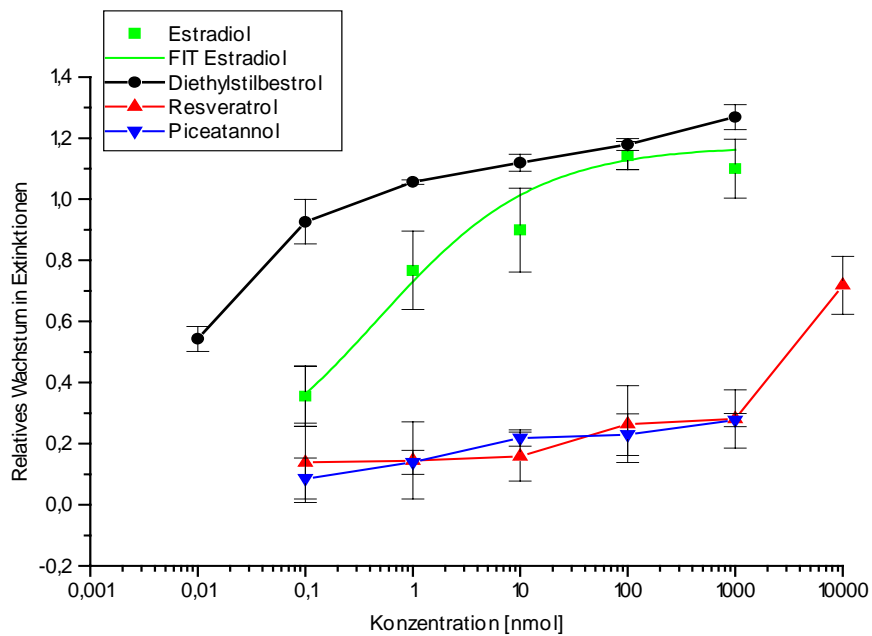


Abb. 7: Aktivität von Stilbenderivaten im E-Screen-Assay in humanen Brustkrebszelllinien MCF-7-VITA2-LUC



### 3.3. Klonierung des Reporter-genvektors pVITA2-SEAP und transiente Transfektion der humanen Mammacarcinomzelllinie MCF-7 mittels Elektroporation

In Ergänzung zu den beschriebenen Reporter-gen-systemen konnte ein Reporter-gen-system unter Verwendung der sekretierbaren alkalischen Phosphatase (SEAP) etabliert und validiert werden. Hierzu wurde das pSEAP2-Enhancer Reporter-gen-plasmid (Clontech®) durch Umklonierung des estrogen-abhängigen Vitellogenin A2- wild type Promotors konstruiert (s. 2.5.).

**Abb. 8:** Validierung des transient mit pVITA2-SEAP transfizierten MCF-7 Reporter-gen-systems mit Estradiol (physiologischer Ligand) und ICI 182 780 (reines Antiestrogen)

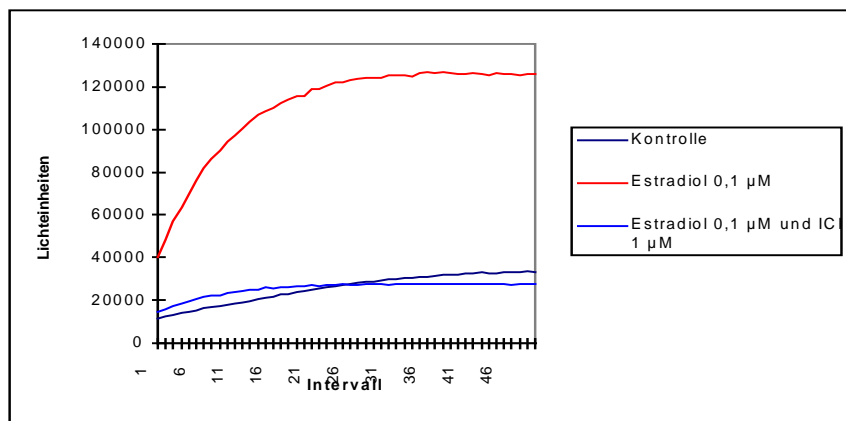


Abbildung 8 zeigt ein typisches Validierungsexperiment mit dem physiologischen Liganden Estradiol und einem reinen Antiestrogen (ICI 182780). Das transient transfizierte Reporter-gen-system pVITA2-SEAP in MCF-7 Zellen zeigt ein gutes Ansprechverhalten bei einer 0,1 µM Estradiolkonzentration, das sich wiederum durch eine 1 µM ICI 182 780 Konzentration antagonisieren lässt.

Inzwischen gelang die Selektion eines semistabilen Klon, der über mehr als ein halbes Jahr eine ausreichende Sensitivität und Spezifität für die Prüfung von endokrinen Disruptoren aufweist.

### 3.4. Etablierung und Validierung eines Reporterensystems zur Prüfung potentiell androgen/antiandrogen aktiver Verbindungen

Für die Entwicklung eines transgenen Reporterensystems zur Erfassung androgener Wirkungen wurden CV-1 und COS-7 Zellen mit dem Expressionsplasmid pSG5-AR, dem Reporterplasmid pMMTV-LUC und dem Kontrollplasmid pSV $\beta$ -Galaktosidase mittels Elektroporation transient transfiziert.

Die Abbildungen 9 und 10 zeigen typische Validierungsexperimente mit dem physiologischen Liganden Dihydrotestosteron (DHT) und beschriebenen Antiandrogenern (Vinclozolinmetabolit 2 und p,p'-DDE). Das transient transfizierte Reporterensystem zeigt ein konzentrationsabhängiges Ansprechverhalten gegenüber DHT, das sich durch entsprechend hohe Antiandrogenkonzentrationen antagonisieren lässt.

Die durch DHT nahe dem Maximalplateau (100 nM) bedingte Reporterinduktion lässt sich durch einen antiandrogen aktiven Vinclozolinmetaboliten (Vinclozolin M2) konzentrationsabhängig antagonisieren. Bei einer Koinkubation von DHT (10 nM) mit steigenden Konzentrationen an Vinclozolinmetabolit 2 ist der Antagonisierungseffekt deutlich schwächer (Abb. 9).

**Abb. 9:** Induktion des Reportersignals durch DHT (physiologischer Ligand) und Hemmung durch Vinclozolinmetabolit 2 (Antiandrogen)

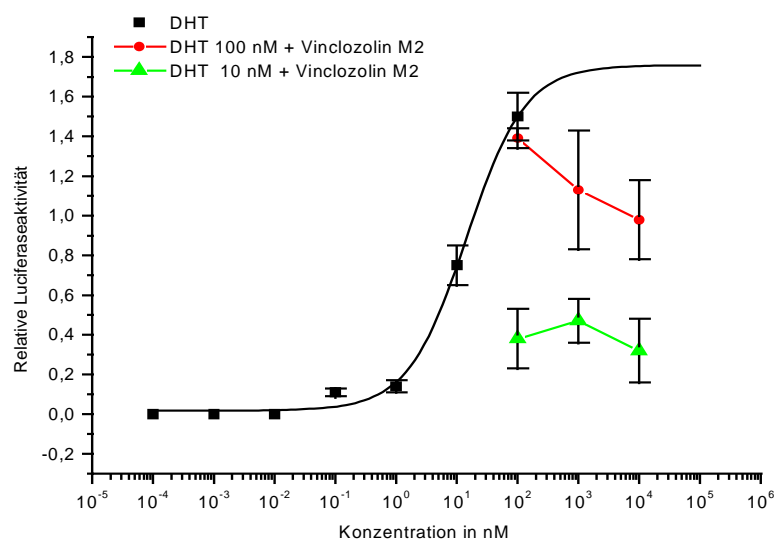
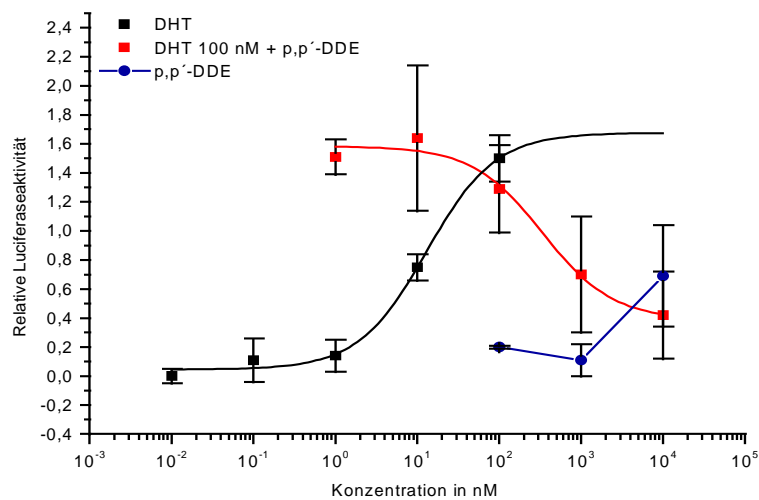


Abbildung 10 zeigt ein typisches Validierungsexperiment des androgen/antiandrogen sensitiven Reporterensystems. Die typische sigmoide Wirkkurve, die durch steigende DHT Konzentrationen hervorgerufen wird, kann durch das etablierte Antiandrogen p,p'-DDE nahezu vollständig antagonisiert werden. Zusätzlich kann in hohen Konzentrationsbereichen eine intrinsische androgene Potenz des p,p'-DDE nachgewiesen werden.

**Abb. 10:** Induktion bzw. Hemmung des Reportersignals durch DHT (physiologischer Ligand) und p,p'-DDE (beschriebenes Antiandrogen)



Auch im Falle der androgen/antiandrogen sensitiven Zellsysteme konnte inzwischen ein Klon selektiert werden, der seit über einem halben Jahr vergleichbares Ansprechverhalten gegenüber androgen/antiandrogen aktiven Verbindungen aufweist. Solche stabil transfizierten Klone erlauben eine deutlich vereinfachte Versuchsdurchführung gegenüber den transient transfizierten Systemen.

#### 4. Diskussion der Ergebnisse, Bewertung und Vergleich mit in der Literatur beschriebener Verfahren.

Die eingesetzten funktionellen Testsysteme bieten die Möglichkeit, Verbindungen schnell und effektiv als hormonell aktiv zu identifizieren und so eine Eingruppierung des *in vitro* Wirkpotentials einzelner Verbindungen relativ zum physiologischen Hormon vorzunehmen. Ein in der Literatur angewandtes Auswerteverfahren (Soto et al. 1995) definiert das Wirkplateau der maximalen intrinsischen Effizienz anhand einer Punktmessung der maximal bestimmbaren Wirkung. Bei diesem Auswerteverfahren wird weder die sigmoidale Funktion der Kurve berücksichtigt, noch die Tatsache, daß im oberen Konzentrationsbereich der Kurve unspezifische Wirkungen wie Cytotoxizität, Löslichkeitsverhalten und andere Störfaktoren häufig eine wesentliche Rolle spielen. Die Festlegung des maximalen Wirkplateaus und des Wendepunktes (EC<sub>50</sub>) der Dosis-Wirkungskurve ist somit mit erheblichen Fehlern behaftet.

Der von uns gewählte Lösungsansatz beruht dagegen auf der Grundannahme, daß die Testverbindungen als vollständige Agonisten wirken. Damit wird grundsätzlich sigmoides Verhalten angenommen. Dies ermöglicht es, mittels iterativer Angleichverfahren einen EC<sub>50</sub>-Wert zu berechnen, der auf einem für alle Testverbindungen vergleichbaren Verfahren basiert. Im Vergleich zu anderen mathematischen Transformationen (z.B. wie nach

Lineweaver-Burke) ist dieses iterative Verfahren unter den erwähnten Grundannahmen mit dem geringsten Fehler behaftet. Daraus ergeben sich im Wesentlichen folgende Vorteile:

- Berechnung der Parameter der Dosis-Wirkungsbeziehungen nach einem einheitlichen mathematischen Standardverfahren durch iterativen Kurvenausgleich.
- Vereinheitlichte Bestimmung der relativen Potenz in Bezug auf den physiologischen Liganden (Estradiol oder Dihydrotestosteron)

Ein weiteres Problem ist die objektive Festlegung, ab welcher Transaktivierungseffizienz *in vitro* ein Fremdstoff als Xenoestrogen zu bewerten ist (Signifikanzschwelle). Aus der Berechnung der sigmoidalen Kurve auf Basis der Meßwerte läßt sich das entsprechende Konfidenzintervall der Estradiolkurve ermitteln. Die obere Grenze des 95. Percentils des Konfidenzintervalls der Estradiolkurve im Abschnitt A1 (Steigung  $\approx 0$ ) wird als Signifikanzschwelle für estrogene Aktivität definiert („Benchmark“). Abbildung 11 zeigt die Kurve (blau) für einen schwachen Agonisten, der erst bei sehr hoher Konzentration gerade die Benchmark erreicht.

Der für Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen typische sigmoidale Kurvenverlauf (Abb. 11) läßt sich mathematisch allgemein beschreiben:

$$Y = \frac{A1 - A2}{1 + (X/X_0)^p} + A2$$

A1: unteres Plateau (nicht aktivierter Rezeptor)

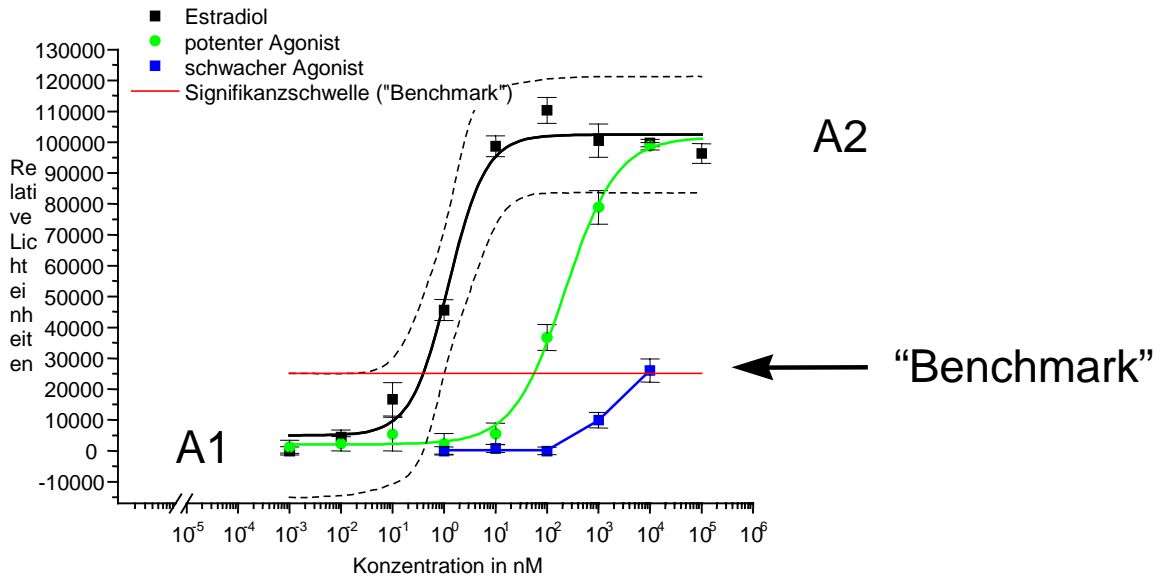
A2: oberes Plateau (Sättigungsbereich des Rezeptors)

p : Power; Übergang zwischen unterem und oberem Plateau

X<sub>0</sub>: x-Wert bei 50 % von y: Wendepunkt der Kurve = EC<sub>50</sub>

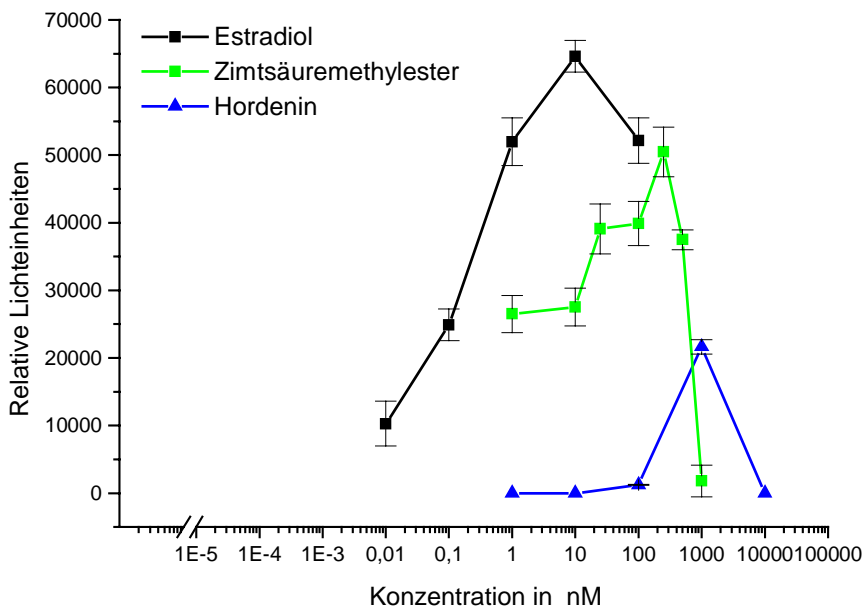
Diese vier Parameter beschreiben die sigmoidalen Kurven.

**Abb. 11:** Beispielhafte Darstellung der logistischen Berechnung der Reporterageninduktion, mit Konfidenzintervall für Estradiol und der daraus resultierenden Festlegung einer Signifikanzschwelle („Benchmark“)



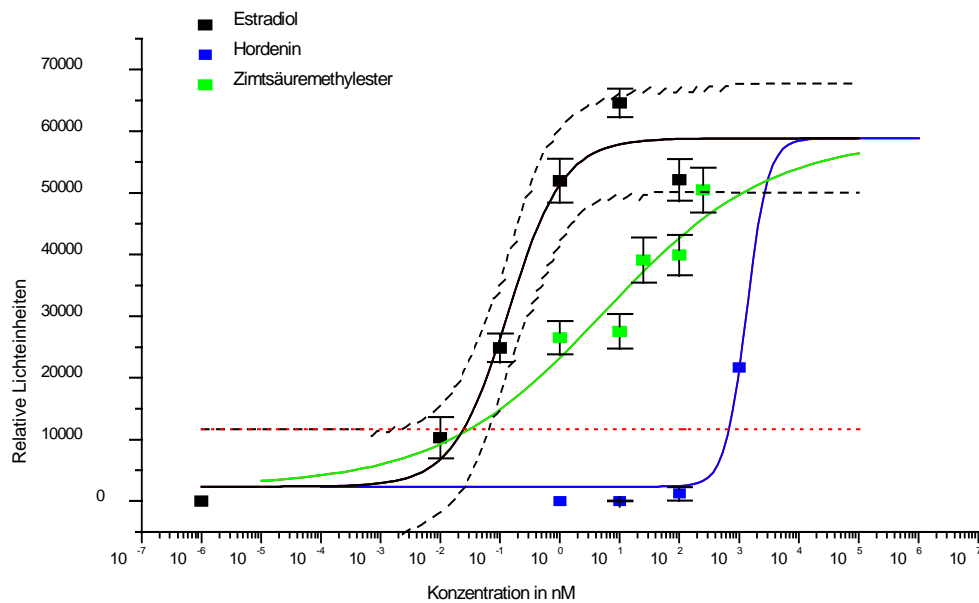
Zur weiteren Veranschaulichung der Auswertemethodik werden Ergebnisse aus dem Projekt nach dem vorgestellten Verfahren analysiert.

**Abb. 12:** Konzentrations-Wirkungskurven im Transaktivierungsassay ohne mathematische Transformation





**Abb. 13:** Ergebnisdarstellung im Transaktivierungsassay nach mathematischer Transformation



Für einen quantitativen Vergleich („Ranking“) der Daten wird die graphische Ergebnisdarstellung auf nur einen Parameter beschränkt: Die relative estrogene Potenz bezogen auf Estradiol (RP), ausgedrückt als Quotient des  $EC_{50}$ -Wertes von Estradiol und des  $EC_{50}$ -Wertes der jeweiligen Testverbindung. Die  $EC_{50}$ -Werte ergeben sich als Abszissenabschnitt des Wendepunktes ( $EC_{50}$ -Wert) der jeweiligen Dosis-Wirkungskurve. Wesentlich ist außerdem die Definition der Signifikanzschwelle („Benchmark“). Darüberhinaus kann in Verbindung mit der Angabe der relativen Potenz einer Testverbindung eine Eingruppierung nach Wirkstärke erfolgen (Tab. 2).

**Tab. 2:** Vergleichende Darstellung der relativen Potenz der untersuchten Verbindungen im stabil transfizierten Reportergensystem in MCF-7-VITA2-LUC-Zellen

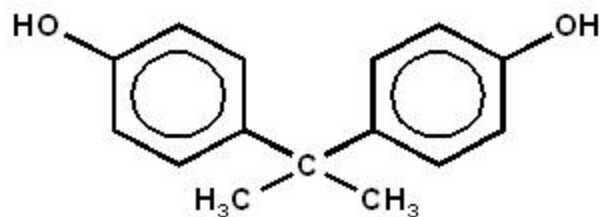
| Verbindung            | RP <sup>1</sup>       |
|-----------------------|-----------------------|
| Estradiol             | 1                     |
| Zimtsäuremethylester  | $2,5 \times 10^{-2}$  |
| Hordenin              | $1 \times 10^{-4}$    |
| Styrol                | --                    |
| Methoxystyrol         | $2,2 \times 10^{-5}$  |
| trans-Stilben         | --                    |
| Diethylstilbestrol    | $5 \times 10^{-2}$    |
| Resveratrol           | $7,7 \times 10^{-3}$  |
| Piceatannol           | $3 \times 10^{-5}$    |
| optischer Aufheller A | $4,4 \times 10^{-3}$  |
| optischer Aufheller B | $1,64 \times 10^{-5}$ |
| Zimtsäure             | --                    |
| Kaffeensäure          | --                    |
| Ferulasäure           | --                    |
| p-Cumarsäure          | --                    |

1) RP; relative Potenz:  $EC_{50}$ -Estradiol/ $EC_{50}$ -Testverbindung  
 --; Meßwerte unterhalb der Benchmark

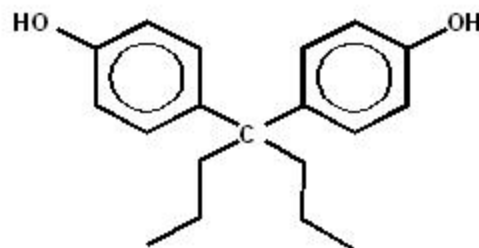
Zusammengefaßt wurden Testsysteme etabliert und validiert, die als effektive Testbatterie zur Prüfung von estrogen-/antiestrogen aktiven bzw. androgenen/antiandrogenen aktiven Verbindungen genutzt werden können. Die bereits erarbeiteten Ergebnisse und die auf Basis des Anschlußprojektes weiterhin zu erwartenden Daten ermöglichen die relative Einordnung des hormonellen Potentials der geprüften Verbindungen in Bezug auf die Wirkstärke der physiologischen Hormone, Estradiol und Dihydrotestosteron. Diese schnelle und zuverlässige *in vitro* Prüfung eines breiten Stoffspektrums ermöglicht eine Einordnung nach Stärke des hormonellen Potentials

Außerdem wurde mit der Kombination aus molecular modeling und on line Datenbankrecherche ein neuer Ansatz zur rechnergestützten Vorselektion bislang nicht beschriebener endokriner Disruptoren erarbeitet. Die etablierten Reportergensysteme ermöglichen eine schnelle Verifizierung (Falsifizierung) der theoretisch erarbeiteten Strukturhomologien.

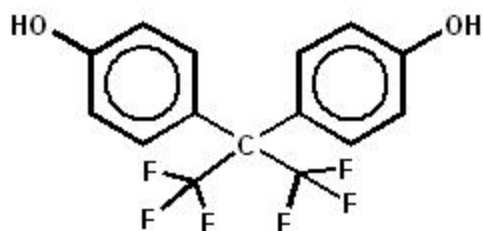
Die erreichten methodischen Entwicklungen dienen sowohl dem wissenschaftlich/technischen als auch dem praktischen Fortschritt auf dem Feld der endokrinen Disruptoren.



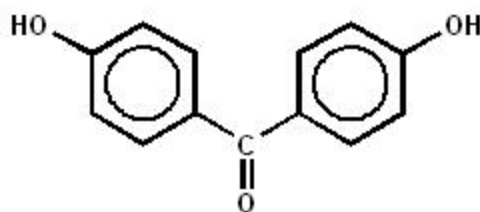
**Bisphenol A**



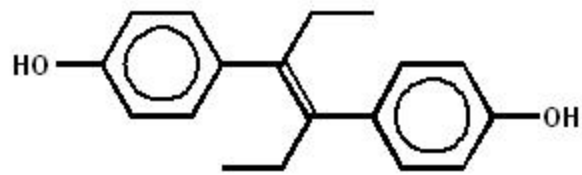
**Bisphenol MM5**



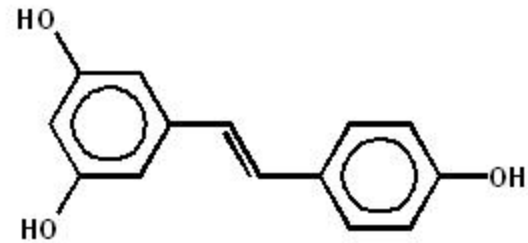
**Bisphenol MM7**



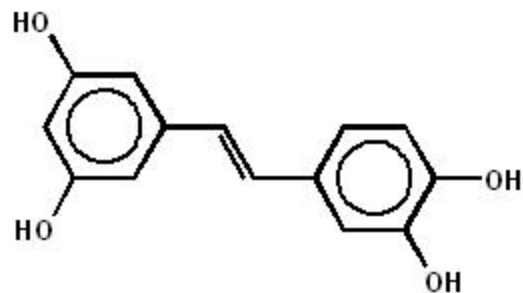
**Bisphenol MM8**



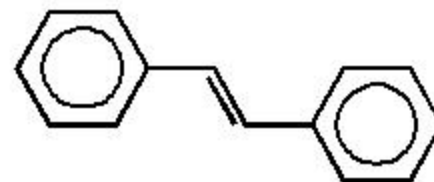
Diethylstilbestrol (DES)



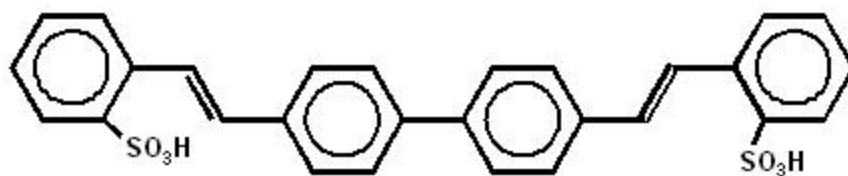
Resveratrol



Piceatannol

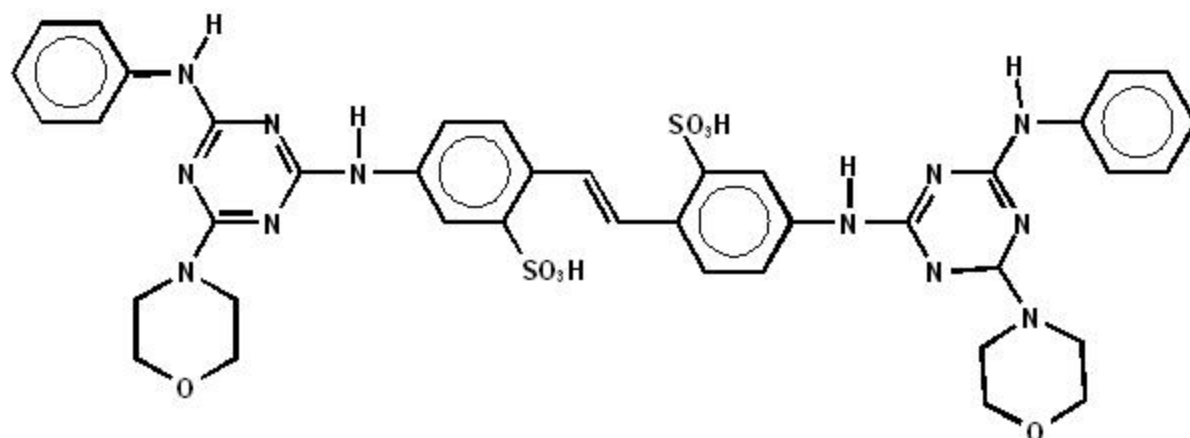


trans-Stilben



4,4'-Bis-(2-sulfostyryl)-biphenyl

Aufheller A



4,4'-Bis-[(4-anilino-morpholino-1,3,5-triazin-2-yl)amino]-stilben-2,2'-disulfonsäure

Aufheller B

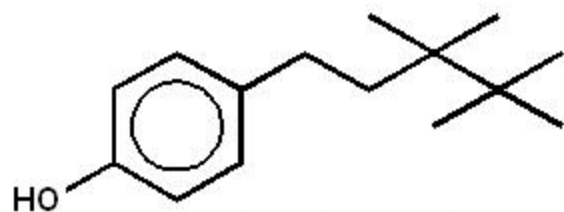


Eisenbrand, G.; Seng, D. und Mußler, B.

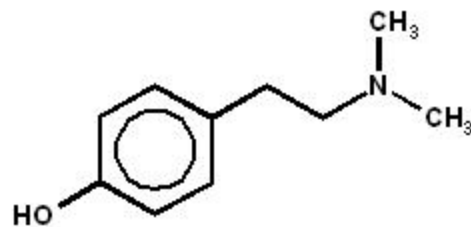
Universität Kaiserslautern

FB Chemie; Fachrichtung Lebensmittelchemie & Umweltoxikologie

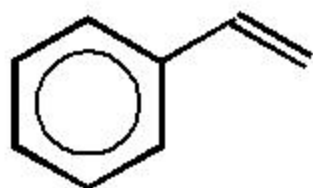
Anhang zum Abschlussbericht PUG 96017



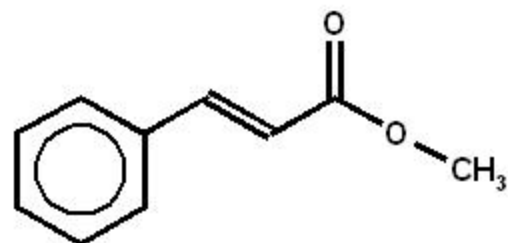
**Nonylphenol**



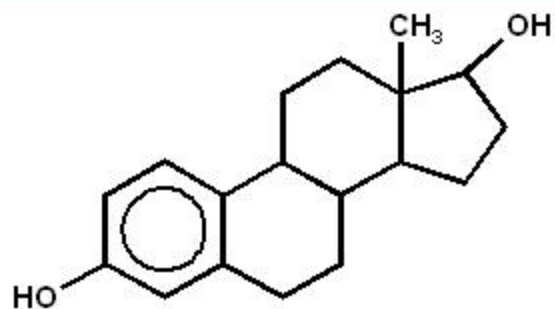
**Hordenin**



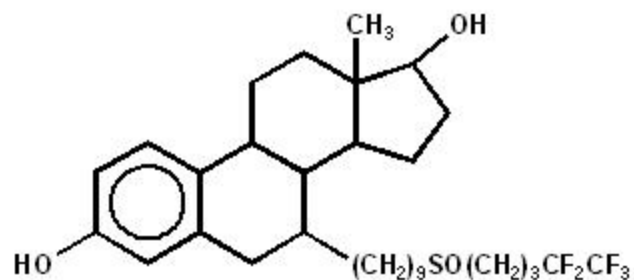
**Styrol**



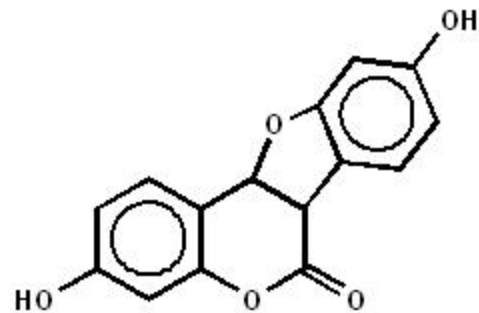
**Zimtsäuremethylester**



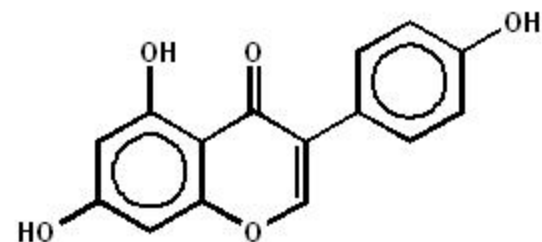
**Estradiol**



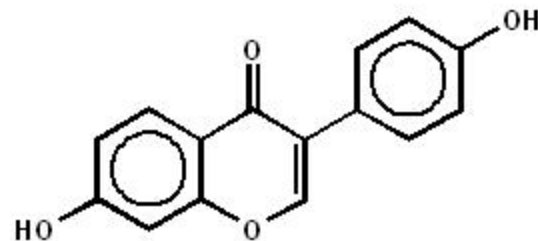
**ICI 182.780**



Coumestrol

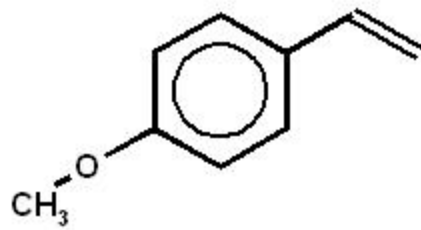


Genistein

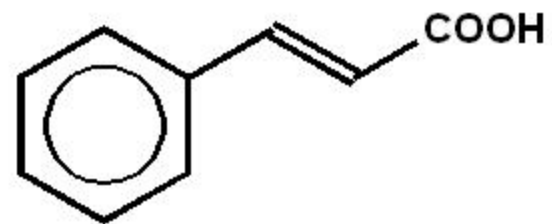


Daidzein

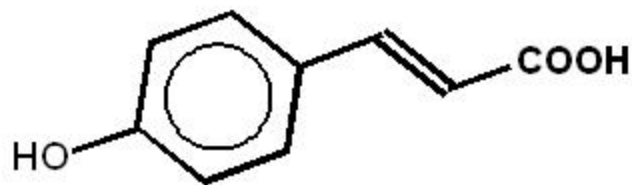




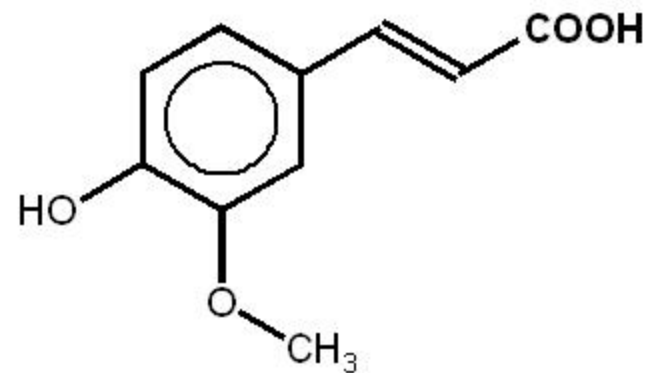
Methoxy-Styrol



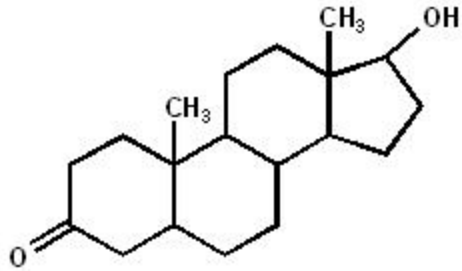
Zimtsäure



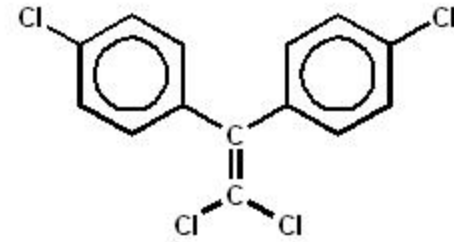
p-Cumarsäure



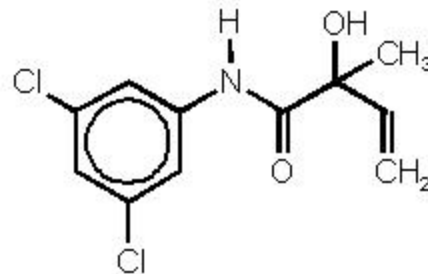
Ferulasäure



Dihydrotestosteron



p,p'-DDE



Vinclozolinmetabolit 2