

Diplomarbeit  
zur Erlangung des akademischen Grades Dipl.-Ing.

**Validierung und Vergleich zweier  
in-vitro Reporterassays zur  
Bestimmung von  
Androgenagonisten &  
Androgenantagonisten in  
Migraten von  
Lebensmittelkontaktmaterialien**

eingereicht von  
Angelika Grininger

durchgeführt am  
Österreichischen Forschungsinstitut (OFI),  
Wien

betreut von  
Univ. Doz. Dr. Manfred Tacker  
DI Christian Kirchnawy  
DI Johannes Mertl

Wien, 02. Juni 2013

### **Danksagung**

Ich möchte mich recht herzlich bei allen Personen bedanken die mich während meiner Diplomarbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gebührt meinem Betreuer, Herrn Univ. Doz. Dr. Manfred Tacker, der mir die Arbeit an diesem interessanten und spannenden Themengebiet ermöglichte und mich durch seine fachliche Hilfestellung unterstützte.

Auch möchte ich mich recht herzlich bei DI Christian Kirchnawy und DI Johannes Mertl bedanken. Sie standen mir mit ihrem fachlichen Wissen jederzeit mit Rat und Tat zur Seite.

Bei allen Mitarbeitern des OFI möchte ich mich sowohl für die Unterstützung bei den Laborarbeiten, als auch für die zahlreichen geselligen Stunden bedanken.

Ein Dank gilt auch meinen Freunden die mich durch das Studium begleitet haben.

Schlussendlich möchte ich mich recht herzlich bei meiner Familie bedanken. Sie unterstützten mich während des gesamten Studiums und halfen mir mit ihrer seelischen Unterstützung durch so manch schwierige Situationen des Studienalltags.

### Zusammenfassung

Lebensmittelverpackungen aus Kunststoff können hormonaktive Substanzen, sogenannte Xenohormone, enthalten. Diese Substanzen sind meist dem Herstellungsprozess zugesetzte Additive, wie z.B. Weichmacher oder können durch Abbauprozesse während der Lagerung entstehen. Durch die Migration aus der Verpackung in das Lebensmittel stellen sie eine Gefahrenquelle für den Konsumenten dar. Aufgrund der Strukturähnlichkeit der Xenohormone zu natürlichen Hormonen können diese Substanzen an den Hormonrezeptor binden und somit das Hormonsystem des Menschen beeinflussen. Androgen aktive Substanzen stehen im Verdacht beim Menschen Fortpflanzungs- und Entwicklungsstörungen auszulösen und werden als Ursache für die in letzter Zeit beobachtete Abnahme der Spermienzahl und Zunahme von Hoden- und Prostatakrebs diskutiert.

Das Ziel dieser Diplomarbeit lag daher in der Validierung und dem Vergleich von zwei *in-vitro* Reporterassays für die routinemäßige Untersuchung von Lebensmittelkontaktmaterialien auf androgen- und antiandrogenaktive Substanzen.

In Anlehnung an die VO EU 10/2011 wurden Migrationsversuche mit unterschiedlichen Lebensmittelverpackungen durchgeführt und die Migrate anschließend mittels Festphasenextraktion (SPE) aufkonzentriert. Die Untersuchung der Extrakte auf Androgen- bzw. Antiandrogenaktivität erfolgte mittels dem Yeast Androgen Screen, der auf einem rekombinanten Stamm der Hefe *S.cerevisiae* basiert, und dem AR-CALUX, der die humane Zelllinie U2OS verwendet. Bei einem Screening von 5 beispielhaften Proben konnte in zwei Proben eine antiandrogene Wirkung im YAS detektiert werden. Die Ergebnisse wurden jedoch durch den AR-CALUX nicht bestätigt und sind daher spezifisch für den auf Hefezellen basierenden YAS.

### **Abstract**

Packaging materials like plastic may contain endocrine active substances, so-called Xenohormones. These substances are often additives like plasticizers, which are added in the manufacturing process or they may result from degradation during storage. They can leach from packages into food through migration and provide a safety hazard for humans. Due to structural similarities to natural hormones these substances can bind to the hormone receptor and thereby affect human hormone system. Androgen active substances are suspected to cause human reproductive and developmental disorders and they also link exposure to androgen active substances with reduced sperm counts and increased testicular and prostata cancer.

The aim of this work was to validate and compare two in-vitro reporter gene assays for the routine screening of androgenagonists and –antagonists in food packaging materials. According to the Regulation of the European Commission No 10/2011 food packaging were migrated with food simulants and these migrates were concentrated with Solid Phase Extraction. The Yeast Androgen Screen, based on a genetically modified *S.cerevisiae* strain, and the AR-CALUX, based on human osteoblast cells, were used to screen these migrates for the presence of androgen and antiandrogen activity. In a screening of 5 migrates from different food packages two samples showed an antiandrogen activity in the YAS. However, these results were not confirmed in AR-CALUX. The observed inhibition of hormone activity is specific to the yeast cell based YAS.

## Inhaltsverzeichnis

<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....</b>	<b>VII</b>
<b>1 EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
1.1 HORMONE .....	1
1.1.1 Steroidhormone.....	2
1.1.2 Androgenrezeptor .....	5
1.2 ENDOKRINE DISRUPTOREN.....	8
1.2.1 Allgemeines.....	8
1.2.2 Definition.....	9
1.2.3 Androgen-Antagonisten.....	10
1.2.4 Auswirkung auf den Menschen.....	12
1.2.5 Auswirkungen auf die Umwelt.....	13
1.2.6 Endokrine Disruptoren in Lebensmittelkontaktmaterialien.....	14
1.2.7 Endokrine Disruptoren in Kunststoffen.....	16
1.3 BIOLOGISCHE TESTSYSTEME .....	20
1.3.1 Yeast Androgen Screen.....	21
1.3.2 AR-CALUX .....	22
1.4 VALIDIERUNG .....	25
1.4.1 Definition.....	25
1.4.2 Validierungsparameter.....	26
<b>2 MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>28</b>
2.1 VERWENDETE MATERIALIEN UND GERÄTE.....	28
2.2 VERWENDETE CHEMIKALIEN .....	30
2.3 VERWENDETE MEDIEN UND PUFFERLÖSUNGEN.....	32
2.4 STANDARDREIHEN.....	34
2.4.1 Herstellung der DHT-Standardreihe für CALUX.....	34
2.4.2 Herstellung der DHT-Standardreihe für YAS.....	35
2.4.3 Herstellung der Flutamid-Standardreihe.....	35
2.4.4 Herstellung der Bisphenol A-Standardreihe .....	36
2.4.5 Herstellung der Benzyl-butyl-phthalat-Standardreihe.....	36
2.5 HERSTELLUNG DER DOTIERTEN BLINDWERTE FÜR CALUX .....	37
2.6 HERSTELLUNG DER DOTIERTEN BLINDWERTE FÜR YAS .....	37
2.7 UNTERSUCHTE PROBEN .....	37
<b>3 DURCHFÜHRUNG.....</b>	<b>38</b>

# INHALTSVERZEICHNIS

---

3.1	MIGRATIONSLAGERUNG.....	38
3.2	AUFKONZENTRIERUNG .....	39
3.3	CALUX .....	41
3.3.1	<i>Kultivierung der Zellen.....</i>	<i>41</i>
3.3.2	<i>Durchführung des CALUX - Bioassay.....</i>	<i>42</i>
3.4	YAS.....	45
3.4.1	<i>Kultivierung der Zellen.....</i>	<i>45</i>
3.4.2	<i>Durchführung des YAS-Bioassays.....</i>	<i>45</i>
3.5	TEST AUF INHIBIERENDE EFFEKTE.....	47
3.5.1	CALUX.....	47
3.5.2	YAS.....	47
3.6	VALIDIERUNGSBERICHT.....	48
3.6.1	<i>Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch im CALUX.....</i>	<i>48</i>
3.6.2	<i>Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch im YAS.....</i>	<i>50</i>
<b>4</b>	<b>ERGEBNISSE .....</b>	<b>52</b>
4.1	VALIDIERUNG CALUX .....	52
4.1.1	<i>Wiederfindung.....</i>	<i>52</i>
4.1.2	<i>Wiederholbarkeit.....</i>	<i>53</i>
4.1.3	<i>Reproduzierbarkeit.....</i>	<i>53</i>
4.1.4	<i>Prüfung auf Robustheit.....</i>	<i>54</i>
4.2	VALIDIERUNG YAS .....	62
4.2.1	<i>Wiederholbarkeit.....</i>	<i>62</i>
4.2.2	<i>Reproduzierbarkeit.....</i>	<i>62</i>
4.2.3	<i>Prüfung auf Robustheit.....</i>	<i>63</i>
4.3	UNTERSUCHUNG VON REINSUBSTANZEN .....	67
4.3.1	AR-CALUX.....	67
4.3.2	YAS.....	68
4.4	GETESTETE PROBEN IM YAS UND CALUX .....	70
<b>5</b>	<b>INTERPRETATION.....</b>	<b>72</b>
<b>6</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS.....</b>	<b>76</b>

## Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
ACN-MetOH	Acetonitril-Methanol Gemisch 1:1
AEQ	Androgenäquivalent
AR	Androgenrezeptor
ARE	Androgen Response Element
BBP	Benzylbutylphthalat
BHA	tert-Butylhydroxyanisol
BHT	Butylhydroxytoluol
BPA	Bisphenol A
CALUX	Chemically Activated LUciferase eXpression
CPR	Chlorphenolrot
CPRG	Chlorphenolrot- $\beta$ -galactopyranosid
DBP	Dibutylphthalat
DCC-FCS	dextran-coated charcoal-treated fetal calf serum
DDT	Dichlordiphenyltrichlorethan
DEHP	Di(2-ethylhexyl)phthalat
DHT	Dihydrotestosteron
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleic acid
EDC	Endocrine Disrupting Components
GVK	Getränkeverbundkarton
hAR	human Androgen Receptor
HREs	hormone response elements
HSP	Hitzeschockprotein
IF	Induktionsfaktor
LDL	Low Density Lipoprotein
LDPE	Low Density Polyethylen
LOD	Limit of Detection (Nachweisgrenze)
MW	Mittelwert
NADPH	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
nNP	4-n-nonylphenol
nOP	4-n-octylphenol
p,p'-DDE	Dichlorodiphenyldichloroethylene
PE	Polyethylen

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

---

PET	Polyethylenterephthalat
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
PVC	Polyvinylchlorid
RSD	Relative Standardabweichung
S <sub>D</sub>	Standardabweichung
SHBG	Sexhormon-bindendes Globulin
SPE	Solid-Phase-Extraction
TDS	Testicular Dysgenesis Syndrome
TR	Thyroidrezeptor
YAS	Yeast Androgen Screen
ZNS	Zentralnervensystem

# 1 Einleitung

## 1.1 Hormone

Hormone sind für die Steuerung und Aufrechterhaltung lebensnotwendiger Funktionen im Körper verantwortlich. So werden Vorgänge wie Fortpflanzung, Entwicklung, Wachstum, Regulation des Stoffwechsels und von Verdauungsvorgängen sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase von Ionenkonzentrationen von Hormonen gesteuert. Als hochspezialisierte Moleküle sind sie bereits in sehr niedrigen Konzentrationen biologisch wirksam (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005; Koolman & Röhm, 2003).

Als Hormone bezeichnet man die chemischen Signalstoffe des endokrinen Systems, die in spezialisierten Zellen gebildet werden. Diese Zellen können zu einem eigenständigen Organ, der endokrinen Drüse, zusammengefasst werden, wie im Fall der Schilddrüse. Von dort werden sie ins Blut ausgeschüttet und zu den Erfolgsorganen transportiert, wo sie bestimmte physiologische und biochemische Regulationsfunktionen ausüben. Als Andockstelle dienen Rezeptoren, welche die Hormone mit hoher Spezifität, großer Affinität und geringer Kapazität binden. Hormone werden entweder nach ihrem Bildungsort oder nach ihrer chemischen Struktur (Steroide, Polypeptide) unterschieden (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005; Karlson, 1988; Stryer, 1987).

Das Hormonsystem setzt sich aus dem Zentralnervensystem (ZNS), verschiedenen Körperdrüsen und den Organen, welche der Hormonsteuerung unterliegen, zusammen (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005; Bundesamt für Gesundheit, 2012).

Die Steuerung vieler Hormondrüsen erfolgt über die Hypophysen (Hirnanhangdrüse)-Hypothalamus (Zwischenhirn)-Achse, die vom ZNS kontrolliert wird. Die Nervenzellen im Hypothalamus reagieren auf Reize des ZNS durch Ausschüttung aktivierender oder hemmender Faktoren, welche als Liberine (Releasing Hormone) und Statine (Inhibiting Hormone) bezeichnet werden. Diese Neurohormone gelangen über die Blutbahn in die Adenohypophyse und stimulieren oder hemmen dort die Biosynthese und Ausschüttung glandotroper Hormone, die auch als Tropine bezeichnet werden. Diese wiederum stimulieren peripher gelegene Drüsen zur Biosynthese von glandulären Hormonen, welche schließlich auf ihre Zielzellen im Organismus wirken. Durch Rückkoppelung auf übergeordnete Hormonsysteme stellt sich eine Homöostase ein. Durch negative Rückkoppelung beispielsweise, können Hormone ihre eigene Freisetzung drosseln (Bundesamt für Gesundheit, 2012; Koolman & Röhm, 2003).

Neben den endokrin wirkenden Hormonen gibt es die Gewebshormone. Diese werden nicht in Drüsen, sondern in spezialisierten Einzelzellen gebildet, von wo sie durch Diffusion im Interstitium zu den Erfolgsorganen gelangen. Sie sind meist nur in unmittelbarer Nachbarschaft ihrer sezernierenden Zellen aktiv.

Die Grenze zwischen den Hormonen und anderen Substanzgruppen wie Mediatoren, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren ist fließend. Als Mediatorstoffe (Mediatoren) bezeichnet man Signalsubstanzen. Sie können von vielen Zellen gebildet und abgegeben werden und üben eine hormonähnliche Wirkung auf ihre Umgebung aus. Aufgrund ihres schnellen Abbaus wirken sie nur lokal. Wichtige Beispiele hierfür sind Histamin und Prostaglandin. Als Neurotransmitter bezeichnet man Signalstoffe, die von den Nervenzellen gebildet und sezerniert werden, während Wachstumsfaktoren die Zelldifferenzierung und -proliferation stimulieren (Karlson, 1988; Koolman & Röhm, 2003).

### **1.1.1 Steroidhormone**

Strukturell betrachtet gehören die Androgene der Gruppe der Steroidhormone an. Es handelt sich dabei um lipophile, relativ kleine Moleküle (300 - 800 Da), die eine geringe Löslichkeit in wässrigen Medien besitzen. Sämtliche Steroidhormone werden aus einer gemeinsamen Vorstufe, dem Cholesterol synthetisiert. Neben der genitalen Wirkung der Androgene die für Bildung, Erhalt und Funktion der männlichen Geschlechtsorgane und –merkmale verantwortlich ist, haben die Androgene eine extragenitale Wirkung auf den Stoffwechsel. Dies führt zur Förderung des Proteinaufbaus und Erhöhung der Stickstoff-Retention, was auch als „anabole Wirkung“ bezeichnet wird (Karlson, 1988; Koolman & Röhm, 2003).

Wie bereits erwähnt ist Cholesterol die Vorstufe aller fünf Hauptklassen von Steroidhormonen (Gestagene, Glucocorticoide, Mineralcorticoide, Östrogene sowie Androgene). Der Gonan-Kern (Abbildung 1), der allen Steroiden gemeinsam ist, besteht aus 4 kondensierten Kohlenstoffringen (A-D).

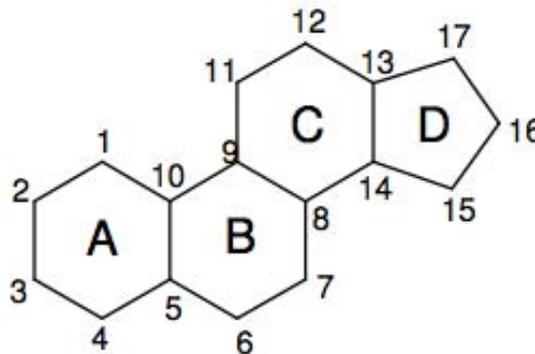
Das zur Biosynthese benötigte Cholesterol wird entweder mit Lipoproteinen des Typs LDL in die hormonbildenden Drüsen aufgenommen oder von diesen aus Acetyl-CoA selbst synthetisiert. Bei einem Überschuss von Cholesterol wird dieses in Form von Fettsäure-Estern in Lipidtröpfchen gespeichert und durch Hydrolyse wieder mobilisiert.

Cholesterol besteht aus drei miteinander verbundenen Sechseringen und einem Fünfering mit Seitenkette. Es besitzt zwei anguläre Methylgruppen an den Kohlenstoffatomen 10 und 13.

## EINLEITUNG

---

Der erste Schritt der Biosynthese von Steroidhormonen die aus 18 - 21 Kohlenstoffatomen bestehen, ist die Entfernung einer C<sub>6</sub>-Einheit aus der Seitenkette des Cholesterols, wodurch Pregnenolon entsteht. Dabei wird die Seitenkette am C-20 und C-22-Atom hydroxyliert und die Bindung zwischen den C-Atomen gespalten. Dieser Schritt wird durch das Enzym Desmolase katalysiert. Für alle Vorgänge werden O<sub>2</sub> und NADPH benötigt (Koolman & Röhm, 2003; Stryer, 1987).



**Abbildung 1: Grundstruktur der Steroidhormone: Gonan-Kern (Beck, 2006)**

Pregnenolon ist der Präkursor für die Synthese der Androgene. Weitere Zwischenprodukte sind Progesteron und das Androgen Androstendion, welches zu Testosteron reduziert wird. Testosteron wiederum kann in das wesentlich schwächer wirkende Androsteron umgewandelt werden. Sowohl Testosteron als auch Androsteron, beides C<sub>19</sub>-Steroide, können zu 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron (DHT) metabolisiert werden, welches eine deutlich höhere Affinität zum Androgenrezeptor aufweist als Testosteron (siehe Abbildung 2). Dieser Schritt wird von dem Enzym 5 $\alpha$ -Reduktase katalysiert (Schleich, 2005).

Einer der wichtigsten Vertreter der Androgene ist das Testosteron sowie die intrazellulär aktive Form DHT. Die Biosynthese beider Androgene erfolgt in den Leydigischen Zwischenzellen des Hodens. Während DHT auf Prostata und Samenblase wirkt, wird die anabole Wirkung durch Testosteron hervorgerufen. Der Transport im Blut erfolgt über das Testosteron-bindende Globulin (SHBG = Sexhormon-bindendes Globulin) und Albumin. Androgene werden nicht ausschließlich im Hoden, sondern in geringem Umfang auch in der Nebennierenrinde produziert, wie beispielsweise die Produktion von Androstendion und 11-Hydroxyandrostendion (Karlson, 1988; Koolman & Röhm, 2003).

## EINLEITUNG

Die Inaktivierung der Steroidhormone erfolgt hauptsächlich in der Leber. Durch mehrere Inaktivierungsreaktionen entstehen zahlreiche Steroidmetaboliten die ihre Wirkung weitgehend verloren haben und mit dem Urin bzw. der Galle ausgeschieden werden (Koolman & Röhm, 2003).

Androstendion sowie Testosteron stellen ebenfalls einen Präkursor für die Synthese der weiblichen Sexualhormone, den Östrogenen dar. Durch Entfernung der C-19 Methylgruppe sowie Aromatisierung des Ringes A von Testosteron entsteht das physiologisch bedeutungsvollste Östrogen, das Östradiol-3,17 $\beta$ . Östron, ebenfalls ein Östrogen, leitet sich von Androstendion ab. Östrogene fördern unter anderem die Entwicklung der Vagina, des Uterus sowie sekundärer weiblicher Geschlechtsmerkmale (Jaussi & Christen, 2005; Stryer, 1987).

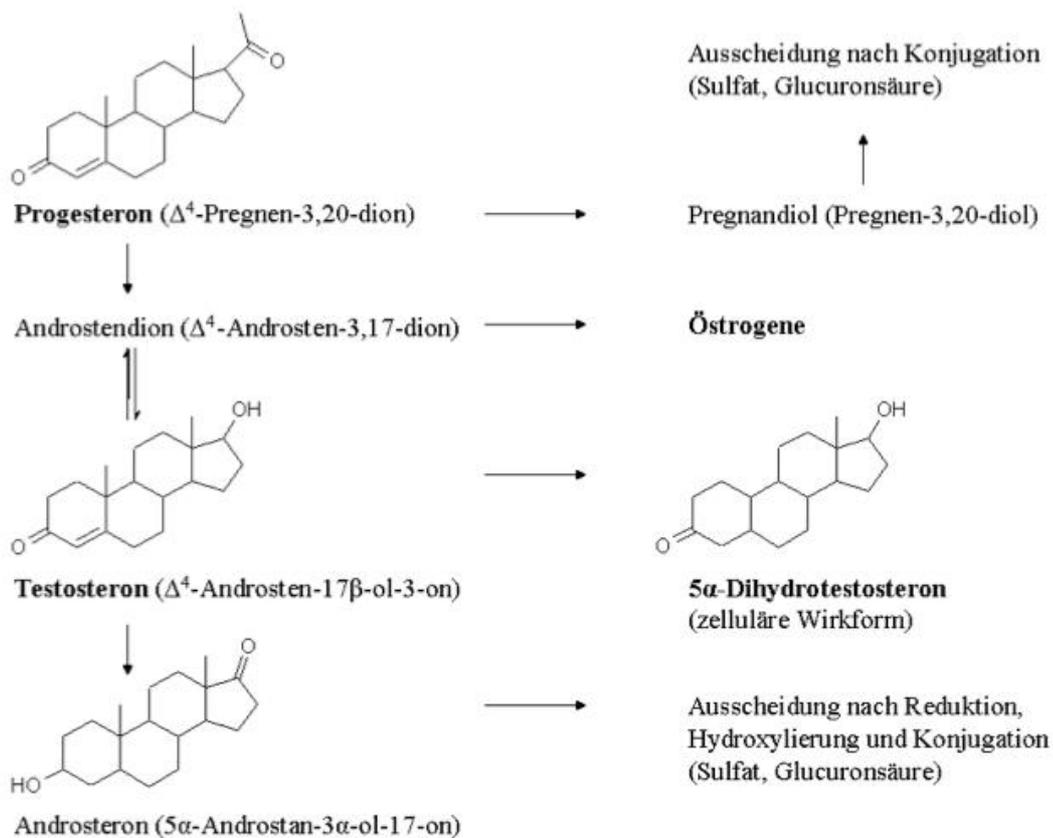


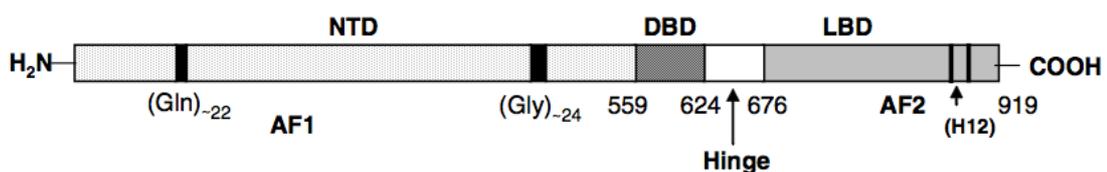
Abbildung 2: Biosynthese der Androgene (Burger & Wachter, 2001)

## 1.1.2 Androgenrezeptor

Androgenrezeptoren (AR) sind wie alle anderen Hormonrezeptoren seltene Proteine, die in geringer Zahl ( $10^3$ - $10^4$  Moleküle pro Zelle) in den Zielzellen der Hormone vorkommen. Sie zeigen eine ausgeprägte Spezifität und hohe Affinität für das bindende Hormon (Karlson, 1988; Koolman & Röhm, 2003).

Die humane AR cDNA wurde erstmals 1988 kloniert und seither in zahlreichen Spezies wie Mäusen, Ratten, Hasen, Affen oder Fischen beschrieben. Das AR-Gen ist auf dem humanen X-Chromosom lokalisiert und besteht aus 8 Exons mit einer Länge von 90 kb. Dieses kodiert für ein 115 - 120 kDa Protein welches aus unterschiedlichen Domänen aufgebaut ist, von denen jede eine autonome Funktion für die Wirkung des AR besitzt (Luccio-Camelo & Prins).

Die Rezeptoren wirken als Transkriptionsfaktoren, d.h. sie binden nach ligandenabhängiger Aktivierung als Homo- oder Heterodimere an Kontrollelemente im Promoter bestimmter Gene und regulieren so die Transkription von Zielgenen. Der AR zählt als NR3C4 zur Superfamilie der Kernrezeptoren, die sich durch ihren gemeinsamen modularen Aufbau bestehend aus drei verschiedenen funktionellen Regionen, den sogenannten Domänen, auszeichnen: amino-N-terminale Transaktivierungsregion (NTD), eine zentral gelegene DNA-bindende Domäne (DBD) und eine carboxy-C-terminale Ligandenbindungsdomäne (LBD). Zusätzlich verbindet eine flexible Schanier- oder Hinge-Region die DBD mit der LBD und kodiert u.a. für die Kernlokalisierungssequenz, welche den Transfer des Rezeptors vom Cytoplasma in den Kern vermittelt (siehe Abbildung 3) (Chatterjee, 2003, Koolman & Röhm, 2003; Matsumoto et al., 2008; Schleich, 2005).



**Abbildung 3: Schematische Darstellung der funktionellen Domänen des Androgenrezeptors (Chatterjee, 2003):** Der humane AR besteht aus ca. 919 Aminosäuren. NTD – Amino-N-terminale Transaktivierungsregion; DBD – DNA-bindende Domäne; LBD – carboxy-C-terminale-Ligandenbindungsdomäne; Hinge – Schanier- oder Hinge-Region zwischen DBD und LBD. Die AF1 Domäne befindet sich in der NTD und die AF2 Domäne in der LBD. Die ungefähre Lage der Helix 12 (H12), sowie die Polyglutamin (Gln)<sub>-22</sub> und die Polyglycin (Gly)<sub>-24</sub> Repeats sind eingezeichnet.

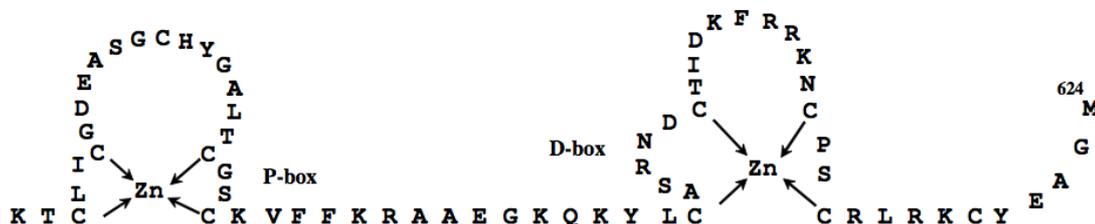
Die Homologie innerhalb der Kernrezeptoren ist im Bereich der DBD besonders groß (die AR DBD ist bei Menschen und Ratten zu 100 % ident). Auch die LBD und Hinge-Region

## EINLEITUNG

---

sind im Gegensatz zur NTD stark konserviert. Die AR NTD enthält die Haupttransaktivierungsfunktion-1 (AF-1). Im Gegensatz zu anderen Steroidhormonrezeptoren bei denen die AF-2 Domäne in der LBD als Haupttransaktivierungsfunktion angesehen wird, zeigt der AR eine nur schwache AF-2 Funktion, die nur in Verbindung mit der N-terminalen AF-1 Domäne aktiviert wird. Durch Deletion der LBD geht der AR in eine konstitutiv aktive Form über (Chatterjee, 2003; Koolman & Röhm, 2003).

Die Erkennung und spezifische Bindung an bestimmte DNA-Sequenzen, die hormone response elements (HREs), wird durch zwei sogenannte „Zink-Finger“ ermöglicht (siehe Abbildung 4). Die 70 Aminosäuren lange AR DBD besitzt hier Cystein-reiche Sequenzen welche  $Zn^{2+}$ -Ionen koordinativ binden. Der Rezeptor bindet an die HREs über zwei Zinkfinger, wobei der erste Zinkfinger (P-Box) vor allem als Erkennungssequenz für den Rezeptor dient. Der zweite Zinkfinger (D-Box) ist für die Stabilisierung des DNA-Rezeptor-Komplexes und die Rezeptordimerisierung zuständig. Dieser trägt auch zur spezifischen Bindung an die DNA bei (Chatterjee, 2003; Koolman & Röhm, 2003).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung der zwei Zinkfinger in der DBD des AR (Chatterjee, 2003):** Die Aminosäuren in der P-Box und D-Box sind für die Erkennung der DNA und die DNA-abhängige Dimerisierung bedeutend. Die komplexierten Zink-Ionen sind schematisch eingezeichnet.

Die AR LBD befindet sich am C-Terminus und ist für die spezifische Bindung der Androgene verantwortlich und ebenfalls Angriffspunkt für Endokrine Disruptoren. Die LBD von Menschen, Ratten und Mäusen ist identisch und bindet die beiden endogenen Androgene Testosteron und DHT mit hoher Affinität. Wobei die intrazellulär aktive Form, 5 $\alpha$ -Dihydrotestosteron, eine deutlich höhere Affinität zum AR aufweist als Testosteron.

Die ca. 250 Aminosäuren der LBD bilden 12  $\alpha$ -Helices, wobei sich in Helix 12 (HF 12) die ligandenabhängige AF2-Domäne befindet. Sie ist für die Wechselwirkung mit Cofaktoren und den Proteinen der basalen Transkriptionsmaschinerie von Bedeutung (Luccio-Camelo & Prins; Schleich, 2005).

## EINLEITUNG

---

Bei Abwesenheit von Liganden liegt der inaktive AR komplexiert mit Hitzeschockproteinen (HSP) im Cytoplasma vor. Die Tertiärstruktur wird von HSP 90, 70 und 56 in einer Konformation stabilisiert, welche Androgenbindung ermöglicht. Nach Androgenbindung an den Rezeptor erfolgt die Dissoziation der Hitzeschockproteine und Rezeptordimerisierung. Im Zellkern bindet der AR an spezifische DNA-Sequenzen, die Androgen Responsive Elements und rekrutiert Coregulatoren welche über Mediatoren die Transkription der Zielgene veranlassen (Chatterjee, 2003; Schleich, 2005).

Laut Chatterjee (2003) ist der Rezeptortransfer in den Zellkern effizienter wenn der AR an DHT gebunden ist (das in der Prostata biologisch aktive Androgen), als an ein Antiandrogen. Ebenso ineffizient, und in einigen Fällen völlig wirkungslos ist der Transport der Rezeptoren vom Cytoplasma in den Zellkern bei Bindung von Endokrinen Disruptoren, welche im Verdacht stehen Fortpflanzungs- und Entwicklungsstörungen bei Männern auszulösen.

### 1.2 Endokrine Disruptoren

#### 1.2.1 Allgemeines

Viele Substanzen, die durch menschliche Aktivität in die Umwelt freigesetzt werden, stehen im Verdacht eine negative Wirkung auf das Hormonsystem von Menschen und Tieren zu haben. Das endokrine System reguliert zahlreiche Abläufe im Körper einschließlich der Reproduktion, Stoffwechsel, Wachstum, Salz- und Wasserhaushalt oder Herzfunktion. Zu diesen sogenannten endokrin aktiven Substanzen zählt eine große Bandbreite an Stoffen wie z.B. Verpackungsmaterialien, Arzneimittel, Pestizide und Herbizide, Kosmetika, Chemikalien, industrielle Nebenprodukte und Schadstoffe, darunter auch einige Metalle (EFSA Scientific Committee, 2013; European Parliament, 2012; Frye et al., 2012).

Die Exposition erfolgt beim Menschen hauptsächlich über die Nahrungskette, die Inhalation von kontaminiertem Hausstaub oder durch eine berufsbedingte Exposition (Frye et al., 2012).

Neben diesen künstlich hergestellten Chemikalien (Xenohormone) gibt es zahlreiche endokrin aktive Substanzen natürlichen Ursprungs. Hierzu zählen Phytoöstrogene, die in höheren Konzentrationen in Hülsenfrüchten, Leinsamen und verschiedenen Kleearten gefunden wurden, Mykotoxine (z.B. Zearalenon) in Getreide oder von Tieren und Menschen über die Ausscheidung in die Umwelt gelangende natürliche Hormone und ihre Abbauprodukte (EFSA Scientific Committee, 2013; Tacker, 2011).

Es gibt zahlreiche Hinweise darauf, dass durch die Exposition mit endokrin aktiven Substanzen die weltweite Anzahl an hormonabhängigen Erkrankungen in den letzten 20 Jahren stark gestiegen ist. Hierzu zählen eine reduzierte Spermienqualität, Entwicklung von Brust- oder Prostatakrebs, früh einsetzende Pubertät und Deformationen der Sexualorgane sowie Adipositas, Diabetes oder Verhaltens- und Lernstörungen (Birnbauer, 2013; European Parliament, 2012).

Laut Kortenkamp (2011) ist der Kontakt mit endokrin aktiven Substanzen besonders kritisch in sensiblen Phasen des Lebens, wie der Embryonalentwicklung oder den ersten Lebensjahren.

Da die Zunahme dieser Erkrankungen nicht durch eine Veränderung der Gene zu erklären ist, muss der Einfluss von externen Faktoren miteinbezogen werden. Der Beitrag dieser Faktoren zu den globalen Krankheitsfällen wird auf ca. 24 – 33 % geschätzt. Zu den externen Faktoren zählen neben der Exposition mit Chemikalien der Lebensstil, Ernährung, Krankheitserreger, Medizin, Drogen, wirtschaftliche Faktoren und soziale Ursachen wie z.B. Stress.

All diese Faktoren können miteinander korrelieren und eine negative Auswirkung auf die Gesundheit der Menschen haben (Birnbaum, 2013; European Parliament, 2012).

Daher stellt die EU Bemühungen an die Exposition des Menschen mit endokrin aktiven Substanzen zu verhindern. Derzeit beschäftigen sich drei verschiedene EU-Verordnungen mit der Thematik der Endokrinen Disruptoren: Verordnung (EG) Nr. 1107/2009 über das Inverkehrbringen von Pflanzenschutzmitteln, Verordnung (EG) Nr. 1907/2006 zur Registrierung, Bewertung, Zulassung und Beschränkung chemischer Stoffe (REACH) und Verordnung (EU) Nr. 528/2012 über die Bereitstellung auf dem Markt und die Verwendung von Biozidprodukten (Kortenkamp, 2011).

### 1.2.2 Definition

Eine endokrin aktive Substanz besitzt eine hormonelle Aktivität aufgrund seiner Strukturähnlichkeit zu natürlichen Hormonen, wie z.B. Androgen oder Östrogen. Diese Definition gibt jedoch keinen Rückschluss über die Wirkungsstärke oder etwaige negative Auswirkungen auf den Organismus. Eine endokrine Aktivität muss nicht zwingend eine negative Auswirkung haben.

Im Gegensatz dazu werden Endokrine Disruptoren als exogene Einflüsse auf einen Organismus bezeichnet, welche das Hormongleichgewicht oder deren Wirkung stören und somit zu negativen Auswirkungen führen (Verband der chemischen Industrie e.V., 2012).

Die WHO/IPCS Definition bezeichnet einen Endokrinen Disruptor als „eine exogene Substanz oder ein Gemisch, die durch die Änderung von Funktionen des endokrinen Systems zu negativen gesundheitlichen Effekten in einem intakten Organismus, oder seinen Nachkommen, oder Teilpopulation führt (WHO IPCS, 2002).

Für die Definition eines Stoffes als Endokrinen Disruptor gibt es zwei Voraussetzungen, nämlich die einer negativen Auswirkung und einer endokrinen Störung. Darüber hinaus impliziert die Definition eine Kausalität zwischen der endokrinen Störung und der negativen Auswirkung (Kortenkamp, 2011).

Endokrine Disruptoren können in das endokrine System eingreifen, indem sie natürliche Hormone nachahmen oder blockieren. Sie können ebenfalls die Produktion, Sekretion oder den Metabolismus von endogenen Hormonen und/oder Kernrezeptoren beeinflussen.

Endokrine Disruptoren werden in Agonisten und Antagonisten eingeteilt. Während Agonisten an den Hormonrezeptor binden und ein natürlich vorkommendes Hormon imitieren, binden Antagonisten und blockieren den Rezeptor für körpereigene Hormone (Luccio-Camelo & Prins; Plotan et al., 2012)

### 1.2.3 Androgen-Antagonisten

Bei den Androgen-Antagonisten, auch als Antiandrogene bezeichnet, handelt es sich um Hormonrezeptorantagonisten. Sie binden an den Hormonrezeptor, blockieren diesen und verhindern dadurch die Bindung von körpereigenen Hormonen. Die antiandrogene Wirkung beruht auf der Bindung dieser Substanzen an den AR und der Veränderung der korrekten Faltung der LBD. Zusätzlich wird die Rekrutierung von Coaktivatoren und dadurch die Initiation der Transkription verhindert. Androgen-Disruptoren wie beispielsweise Vinclozolin, DDT, Procymidone, Linuron, Lindan, Dieldrin/Aldrin, Methoxychlor, Nonylphenol und Bisphenol-A wirken über diesen Mechanismus (Luccio-Camelo & Prins).

Als bekanntester Androgen-Antagonist gilt Flutamid (Abbildung 5). Es handelt sich dabei um ein nicht-steroidales Antiandrogen das zur Behandlung von Prostatakrebs eingesetzt wird. Durch die kompetitive Bindung von Flutamid und dem Metaboliten 2-hydroxyflutamid an den Androgenrezeptor, inhibieren diese die Bindung von DHT an den Rezeptor und dessen Wirkung auf die Zelle.

In-vivo Studien in Ratten haben gezeigt, dass eine prä- und postnatale Exposition mit Flutamid hauptsächlich zu Veränderungen der Fortpflanzungsorgane bzw. Feminisierung der männlichen Geschlechtsorgane führen (Kolle et al., 2011).

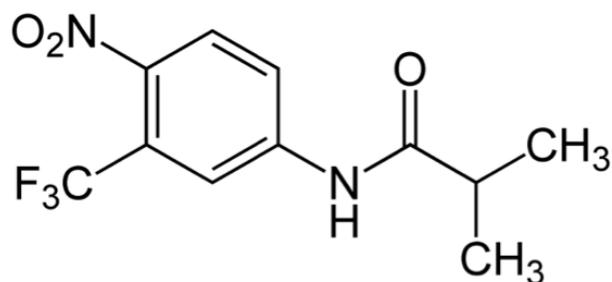


Abbildung 5: Struktur von Flutamid

Auch andere Substanzen wie Dichlorodiphenyltrichloroethan (DDT) und sein persistenter Metabolit p,p'-DDE können als Endokrine Disruptoren agieren. DDT ist ein ehemals häufig eingesetztes Pestizid, das heutzutage aufgrund seiner langen Halbwertszeit in der Umwelt und Bioakkumulation verboten ist. Neben seiner nachweisbaren Östrogenaktivität zeigt p,p'-DDE negative Einflüsse auf die Entwicklung der männlichen Fortpflanzungsorgane. p,p'-DDE ist ebenfalls in der Lage in-vivo die Bindung von DHT an

## EINLEITUNG

---

den AR zu reduzieren und die DHT-induzierte Aktivierung der Transkription in-vitro zu inhibieren. Beide, DDT und p,p'-DDE, können die 5 $\alpha$ -Reduktase, die für die enzymatische Umwandlung von Testosteron zu DHT zuständig ist, inhibieren. Fötale und neonatale Exposition mit beiden Stoffen führte bei Männern häufig zu Läsionen der Hoden und Nebenhoden sowie zu reduziertem Wachstum und Entzündungen der Prostata (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005; Luccio-Camelo & Prins).

Das Insektizid Methoxychlor ist strukturell verwandt mit DDT, hat im Vergleich dazu aber eine geringere Persistenz. Aus diesem Grund wurde es als Ersatz für DDT verwendet, als dieses verboten wurde. Neben seiner Östrogenaktivität zeigt Methoxychlor eine mit DDT vergleichbare Affinität an den AR zu binden.

Auch die Stoffklasse der Phthalate, welche die Salze und Ester der Phthalsäure umfasst, steht unter dem Verdacht als Androgenantagonist zu wirken und somit negative Einflüsse auf Mensch und Tier auszuüben.

Phthalate finden vor allem Anwendung als Weichmacher in Kunststoffen und werden als wichtige Industriechemikalien in großen Mengen produziert. In letzter Zeit versuchte die chemische Industrie, die als fortpflanzungsgefährdend eingestuft Phthalate wie z.B. DEHP (Diethylhexylphthalat) oder BBP (Butylbenzylphthalate) durch DiNP (Diisononylphthalat) und DiDP (Diisodecylphthalat) zu ersetzen. Da diese Substanzen nicht fix an das Polymergerüst gebunden sind, können sie ebenfalls aus der Kunststoffmatrix migrieren und in die Umwelt gelangen (Bundesamt für Gesundheit BAG, 2012; Luccio-Camelo & Prins).

Vinclozolin wird als Fungizid eingesetzt, wirkt ebenfalls als Androgenantagonist und wird vom Menschen hauptsächlich über die Ernährung aufgenommen. Es inhibiert die Transaktivierung des AR und somit die Genexpression (Kelce et al., 1997; Luccio-Camelo & Prins).

Aldrin und sein Metabolit Dieldrin wurden bis in die frühen 1970er Jahre als Insektizid eingesetzt. Während Aldrin kaum in Lebensmitteln gefunden werden kann, ist Dieldrin in der Lage in Säugetierorganismen zu akkumulieren. Aldrin bindet in-vitro an den AR und Dieldrin reduziert die Bindung von DHT an den AR (Luccio-Camelo & Prins; Sonnenschein & Soto, 1998).

### 1.2.4 Auswirkung auf den Menschen

In letzter Zeit gibt es immer mehr Hinweise darauf, dass die zunehmenden Fortpflanzungsstörungen des Menschen auf Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung zurückzuführen sind. Die sexuelle Differenzierung des Mannes wird gänzlich durch Androgene gesteuert und ist deshalb besonders sensibel für den Kontakt mit Androgen-Disruptoren. Die Unterdrückung der Androgenaktivität während der Entwicklung des männlichen Fötus kann im späteren Leben zu Störungen des männlichen Reproduktionssystems führen. Dies kann durch eine Aufnahmestörung von Steroidhormon-Präkursoren in die Leydigischen Zellen des Fötus, durch eine Blockierung des AR oder die Inhibierung spezifischer Enzyme geschehen. Die Folgen sind reduzierte Spermienzahl, erhöhte Infertilität, testikuläres Dysgenese-Syndrom, sowie Hoden- und Prostatakrebs (Kortenkamp, 2011; Luccio-Camelo & Prins; Weybridge, 2012).

Der Einfluss der hormonell wirksamen Umweltchemikalien auf die beobachteten Fortpflanzungsstörungen ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt, da die Konzentrationen in den Umweltmedien meist weit unterhalb der therapeutischen Wirkschwellen liegen. Dennoch diskutieren zahlreiche Studien die Möglichkeit, dass endokrin aktive Umweltchemikalien zu der in den letzten 50 - 60 Jahren beobachteten Reduktion der Spermienanzahl beitragen (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005; Luccio-Camelo & Prins).

Ein Review aus 61 internationalen Studien ermittelte die Spermienqualität und -anzahl im Zeitraum von 1938 - 1992. Die Untersuchung bezog 14.947 Männer mit ein und zeigte, dass die durchschnittliche Spermienanzahl von 113 Millionen/ml im Jahre 1940 auf 66 Millionen/ml im Jahre 1990 sank. Zusätzlich zu der Reduktion der Spermienanzahl wurden auch Veränderungen der Spermabeweglichkeit und -morphologie festgestellt (Carlsen et al., 1992).

Darüber hinaus wird über einen möglichen Zusammenhang zwischen der pränatalen Exposition mit Endokrinen Disruptoren und der in letzter Zeit gehäuft auftretenden Ausbildung des testikulären Dysgenese-Syndroms diskutiert. Dieses Syndrom geht mit erhöhtem Auftreten von Kryptorchismus (Hodenhochstand), Hypospadie (Harnröhrenspaltung), Oligozoospermie und Hodenkrebs einher. Die Tatsache dass das TDS-Syndrom in bestimmten geographischen Zonen gehäuft auftritt unterstützt den Verdacht, dass Umweltfaktoren an der Ausbildung der Krankheit beteiligt sind. Auch andere Abnormalitäten des männlichen Reproduktionssystems werden mit AR-Disruptoren in Verbindung gebracht. Dazu zählen verspätete Pubertät, verminderter Anogenitalabstand bei neugeborenen Jungen sowie die Ausbildung von Hoden- und Prostatakrebs (Luccio-Camelo & Prins; Skakkebak, Rajpert-De Meyts, & Main, 2001).

Die Anzahl an Hodenkrebs ist in den letzten 35 Jahren, speziell in einigen europäischen Bevölkerungen stark gestiegen. Laut Alavanja et al. (2003) besteht für Farmer die gehäuft Pestiziden ausgesetzt sind ein erhöhtes Risiko an Prostatakrebs zu erkranken. Dazu zählen beispielweise chlorhaltige Pestizide wie DDT oder Aldrin und Methylbromid. Einige davon inhibieren die Cytochrome P450 die in den Steroidmetabolismus involviert sind. Da jedoch sehr viele Faktoren zur Krebsbildung beitragen kann der Anstieg dieser Erkrankungen nicht direkt auf hormonell wirksame Substanzen zurückgeführt werden. Missbildungen, Tumore an den Geschlechtsorganen und verminderte Fertilität der Nachkommen können auftreten, wenn Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung während früher Entwicklungsphasen wie z.B. der Embryonalentwicklung eingreifen (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005).

### **1.2.5 Auswirkungen auf die Umwelt**

Die endokrine Aktivität von Xenohormonen ist generell um das 1.000 - 10.000 fache niedriger als bei natürlichen Hormonen. Ihre schlechte Abbaubarkeit und Akkumulation im Organismus können jedoch negative Effekte wie z.B. Fortpflanzungsstörungen bei Mensch und Tier auslösen. Viele dieser sogenannten Umweltchemikalien sind lipophil. Sie werden vom Organismus nur in geringen Mengen ausgeschieden und reichern sich deshalb im Fettgewebe an. Persistente Substanzen können über Jahre im Körper akkumulieren. Besonders in sensiblen Entwicklungsphasen wie der Embryonalentwicklung oder der Pubertät können Xenohormone zum Teil irreversible Schäden hervorrufen (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2005).

Zahlreiche Studien belegen, welche negativen Effekte in die Umwelt freigesetzte Disruptoren auf die Tierwelt haben können.

Suzuki et al. (2011) untersuchten Tran- und Leberextrakte von vier Raubtieren (Baikalrobbe, Kormoran, Marderhund, Glattschweinswal) auf potentielle persistente organische Schadstoffe, die sich nach Freisetzung in die Umwelt vor allem über die Nahrungskette im Gewebe angereichert haben. In den Extrakten der Baikalrobbe konnte antagonistische Aktivität detektiert werden, die auf p,p'-DDE zurückzuführen war. Dabei handelt es sich um den Hauptmetabolit von DDT, ein international verbotenes chlororganisches Pflanzenschutzmittel.

In Großbritannien wurde festgestellt, dass in der Nähe von Kläranlagen vermehrt Regenbogenforellen mit sowohl männlichen, als auch weiblichen Geschlechtsmerkmalen auftraten. Dieses Phänomen wurde jedoch auch in Süßwässern und Meeren der ganzen Welt beobachtet. Die Feminisierung ist auf östrogen- und antiandrogen aktive Substanzen zurückzuführen. Dadurch produzieren männliche Fische Vitellogenin, einen Präkursor für

die Eidotterproduktion, der normalerweise nur von Weibchen produziert wird. Weiters kommt es zu histopathologischen Veränderungen der Fortpflanzungsorgane sowie Reduktion der Spermienanzahl und -beweglichkeit. Durch die Untersuchung der Galle von Regenbogenforellen konnten die Desinfektionsmittel Chlorophen und Triclosan als Hauptverursacher der antiandrogenen Wirkung identifiziert werden (Rostkowski et al., 2011).

### **1.2.6 Endokrine Disruptoren in Lebensmittelkontaktmaterialien**

Unter Lebensmittelkontaktmaterialien versteht man alle Materialien und Gegenstände, die dazu bestimmt sind, mit Lebensmittel in Berührung zu kommen (EFSA, 2013b).

Eine der Hauptaufnahmequellen von Xenohormonen beim Menschen sind Lebensmittel, da diese Pestizide, Dioxine, Schwermetalle, Konservierungsmittel (z.B: Parabene) und aus Verpackungen migrierende Inhaltsstoffe beinhalten können. Lebensmittelkontaktmaterialien wie Kunststoff, Papier, Metall oder Materialverbunde können Endokrine Disruptoren beinhalten, welche als lebensmittelrechtlich zugelassene Inhaltsstoffe oder als Verunreinigungen (NIAS) vorkommen können (Frye et al., 2012; Tacker, 2011).

Tabelle 1 zeigt eine Liste potentieller Endokriner Disruptoren, die in der EU für den Kontakt mit Lebensmittel zugelassen sind.

## EINLEITUNG

**Tabelle 1: Endokrine Disruptoren die in den USA und/oder der EU für den Kontakt mit Lebensmittel zugelassen sind (Muncke, 2009)**

ED	CAS-#	EDC
1	59-50-7	4-Chloro-3-methyl-phenol
2	74-31-7	Diphenyl-p-phenylenediamine
3	77-40-7	2,2-Bis(4-hydroxyphenyl)-n-butan (Bisphenol B)
4	80-05-7	4,4'-dihydroxy-2,2-diphenylpropane (Bisphenol A)
5	80-46-6	p-(tert-pentyl)phenol
6	84-61-7	Dicyclohexyl phthalate
7	84-66-2	Diethyl phthalate
8	84-69-5	Diisobutyl phthalate (DiBP)
9	84-74-2	Dibutyl phthalate (DBP)
10	84-75-3	Di-n-hexylphthalate (DnHP)
11	85-68-7	Butyl benzyl phthalate (BBP)
12	87-18-3	4-tert-Butylphenylsalicylate
13	88-24-4	2,2'-Methylenebis(4-ethyl-6-tert-butylphenol)
14	88-99-3	Phthalic acid
15	90-43-7	2-Phenylphenol
16	92-69-3	4-Phenylphenol
17	92-88-6	4,4'-Biphenol
18	94-13-3	n-Propyl-p-hydroxybenzoate (Propylparaben)
19	96-69-5	4,4'-Thiobis(6-tert-butyl-3-methyl-phenol)
20	99-76-3	Methyl-p-hydroxybenzoate (Methylparaben)
21	99-96-7	p-Hydroxybenzoic acid
22	103-23-1	Diethylhexyl adipate
23	104-40-5	4-Nonylphenol
24	106-44-5	p-Cresol
25	106-46-7	1,4-Dichlorobenzene
26	108-46-3	Resorcinol 1,3-dihydroxybenzene
27	117-81-7	Bis(2-ethylhexyl)phthalate (DEHP)
28	119-47-1	2,2'-Methylene bis(4-methyl-6-tert-butylphenol)
29	119-61-9	Benzophenone
30	120-47-8	Ethyl-4-hydroxy-benzoate (Ethylparaben)
31	121-79-9	Propyl gallate
32	121-91-5	Isophthalic acid
33	131-53-3	2,20-Dihydroxy-4-methoxybenzophenone
34	131-56-6	2,4-Dihydroxybenzophenone
35	131-57-7	2-hydroxy-4-methoxybenzophenone (Oxybenzone)
36	301-02-0	9-octadecenamide (Oleamide)
37	599-64-4	p-Cumyl phenol
38	611-99-4	4,4'-Dihydroxybenzophenone
39	620-92-8	Bis(4-hydroxyphenyl)methane (Bisphenol F)
40	683-18-1	Dibutyltin dichloride
41	1131-60-8	4-Cyclohexylphenol
42	1675-54-3	2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane bis(2,3-epoxypropyl)ether (BADGE)
43	3380-34-5	2,4,4'-Trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether (triclosan)
44	18964-53-9	2,4,6-triphenyl-1-hexene (Styrene trimer 1)
45	25013-16-5	tert.-Butylhydroxy-anisole (BHA)
46	26027-38-3	Nonylphenol ethoxylate
47	26523-78-4	Tris(nonylphenyl)phosphate (TNPP)
48	4809-35-2	2,2-bis[4-(3-chloro-2-hydroxypropoxy)phenyl]propane (BADGE.2HCL)
49	26761-40-0	Diisodecyl phthalate (DiDP)
50	-	1e-phenyl-4a-(1'phenylethyl)tetralin (Styrene trimer 4)

### 1.2.7 Endokrine Disruptoren in Kunststoffen

Heutzutage wird ein großer Teil der Verpackungsmaterialien aus Kunststoff hergestellt bzw. enthalten sie Kunststoff als einen ihrer Bestandteile. Beispielsweise enthalten die meisten Metalldosen eine Polymerbeschichtung, ebenso werden Papier oder Karton mit Kunststoff beschichtet.

Zur Verbesserung der Eigenschaften können dem Kunststoff abhängig vom Einsatzbereich während dem Herstellungsprozess Additive zugesetzt werden. Zu diesen Stoffen gehören Weichmacher, Antioxidantien, UV- und Hitzestabilisatoren, Farbstoffe oder Füllstoffe. Diese Additive sind jedoch nicht fix an das Polymergerüst gebunden, sondern können aus dem Kunststoff diffundieren und dadurch ins Lebensmittel migrieren (Guart et al., 2011; Muncke, 2009; Weybridge, 2012).

Neben den lebensmittelrechtlich zugelassenen Substanzen können in Lebensmittelkontaktmaterialien Verunreinigungen, sogenannte NIAS (= non-intentionally added substances) vorkommen. Sie machen ca. 50 % der in Lebensmittel migrierenden Substanzen aus. Es handelt sich dabei um Nebenprodukte der Polymerisationsreaktion oder um Verunreinigungen der Ausgangsstoffe.

Die Migrationsgeschwindigkeit der Substanzen in das Lebensmittel wird von zahlreichen Faktoren beeinflusst: chemische Eigenschaften des Verpackungsmaterials und des Lebensmittels, Temperatur während der Herstellung, Hitzebehandlung und Lagerung, Aussetzung mit UV-Licht und Dauer der Lagerung (Bach et al., 2012; Muncke 2009, 2011).

### BISPHENOL A

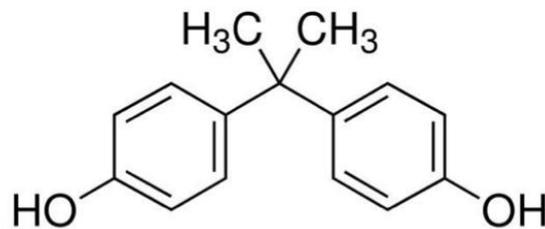
Einer der bekanntesten Vertreter der Endokrinen Disruptoren ist Bisphenol A (BPA). Aufgrund der beiden Phenolgruppen zeigt BPA eine hohe Tendenz an den Östrogenrezeptor zu binden (Abbildung 6) und wirkt ebenfalls als Androgen- und Thyroidrezeptorantagonist. BPA wird für die Synthese von Polycarbonat-Kunststoffen und Epoxidharzen verwendet. Durch unvollständige Polymerisation oder Zerfall des Polymers durch Hitzeeinwirkung während des Autoklavierens, kann BPA aus Polycarbonat-Kunststoffen in Lebensmittel übergehen.

Polycarbonat wird für die Herstellung von Lebensmittelbehältnissen wie z.B. Babyflaschen, Mehrweg-Getränkeflaschen, Essgeschirr sowie Vorratsbehälter verwendet, wohingegen Epoxidharz als Innenbeschichtung von Lebensmittel- und Getränkedosen eingesetzt wird. Besonders bedenklich ist die Anwendung von BPA in wiederbenutzbaren Produkten bzw. Produkten die hohen Temperaturen ausgesetzt werden wie z.B. in der Mikrowelle oder bei der Autoklavierung von Dosen. Erhitzung und auch Änderungen des

pH-Wertes können zu einem starken Anstieg der Migration von BPA in das Lebensmittel führen, aufgrund der verstärkten Hydrolyse der Esterbindungen des Polycarbonats.

Obwohl BPA im Verdacht steht vor allem bei niedrigen Konzentrationen, durch den sogenannten low-dose-effect, Gesundheitsschäden beim Menschen auszulösen, ist es in der EU laut Verordnung (EU) Nr. 10/2011 für den Kontakt mit Lebensmittel zugelassen (EFSA, 2013a).

Die Europäische Kommission erließ jedoch im Januar 2011 eine Richtlinie, derzufolge eine Verwendung von Bisphenol A zur Herstellung von Säuglingsflaschen aus Polycarbonat in der EU verboten ist (EFSA, 2013a; Hausensteiner, 2012; Kortenkamp, 2011; Sonnenschein & Soto, 1998; Talsness et al., 2009).



**Abbildung 6: Struktur von BPA (Bisphenol A)**

### **PHTHALATE**

Als Phthalate werden die Salze und Ester der Phthalsäure bezeichnet. Sie werden hauptsächlich als Weichmacher für hochmolekulare Polymere wie Polyvinylchlorid (PVC) und andere Kunststoffe eingesetzt. Dadurch werden die oft spröden Kunststoffe flexibel, elastisch und dehnbar gemacht. Typischerweise werden sie für die Herstellung von Schläuchen, Kabeln, Folien, Farben, Lacke, Fußbodenbeläge als auch Kosmetikartikel wie Nagellack oder Haarspray eingesetzt.

Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) ist der am häufigsten verwendete Weichmacher für PVC, während andere Phthalate wie Diethylphthalat (DEP) und di-butyl phthalate (DBP) für die magensaftresistente Verkapselung von Wirkstoffen in Arzneimittel verwendet werden. Im Gegensatz zu BPA sind Phthalate in den Kunststoffen nicht chemisch gebunden sondern nur gelöst. Durch Kontakt mit Flüssigkeiten oder Fetten können sie herausgelöst werden oder in die Umgebungsluft entweichen.

Aufgrund der vielseitigen Einsatzmöglichkeiten von Phthalaten sind diese in der Umwelt ubiquitär verbreitet. Als mögliche Expositionsquellen für den Menschen gelten Lebensmittel, Verpackungsmaterialien, Gebrauchsgegenstände sowie die Innenraumluft

## EINLEITUNG

---

durch Ausgasen von Phthalaten aus Fußböden oder kunststoffbeschichteten Einrichtungsgegenständen.

Vor allem Phthalate mit aromatischen Resten wie Benzylbutylphthalat und Diphenylphthalat stehen im Verdacht als Östrogenagonisten zu wirken. Ebenso konnte gezeigt werden, dass viele Phthalate als Androgenantagonisten wirken (Bundesamt für Gesundheit BAG, 2012; Sonnenschein & Soto, 1998; Talsness et al., 2009).

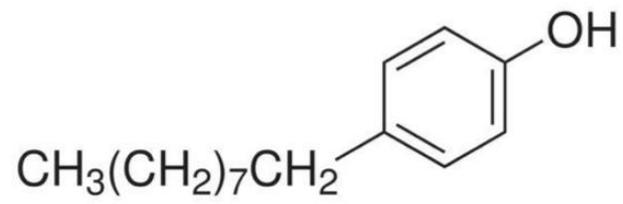
### **ALKYLPHENOLE**

Alkylphenole werden als Antioxidantien sowie für die Synthese von Detergenzien eingesetzt (Alkylphenol Polyethoxylate, APESs). In Kunststoffen werden sie als Stabilisatoren verwendet, um die Oxidation des Kunststoffmaterials zu verhindern bzw. zu reduzieren. APEs werden als industrielle Reinigungsmittel in der Textil- und Papierindustrie, in Hygieneartikel und als Spermizid eingesetzt.

APEs per se sind nicht östrogenaktiv. Sie können jedoch im Zuge der Abwasseraufbereitung abgebaut werden, wodurch freie Alkylphenole als auch Mono- und Diethoxylate entstehen die östrogenaktiv sind. Die Alkylphenole 4-n-nonylphenol (nNP) (Abbildung 7) und 4-n-octylphenol (nOP) zeigen neben ihrer östrogenen, auch eine schwach antiandrogene Aktivität in hefebasierten Reporterassays. Es zeigte sich jedoch, dass nur die Isomere mit para-Stellung eine östrogene Wirkung aufweisen. Laut Luccio-Camelo & Prins hat die neonatale Exposition mit nOP einen Einfluss auf die pubertäre Spermatogenese bei Ratten. In Folge können bei männlichen Nachkommen erhöhte Lumenbildung, gesteigerte Apoptose der Keimzellen und eine reduzierte Konzentration an Testosteron im Plasma auftreten (Bach et al., 2012; Luccio-Camelo & Prins; Sonnenschein & Soto, 1998).

Neben dem Einsatz als Antioxidantien in Kunststoffen werden einige phenolische Antioxidantien wie Butylhydroxytoluol (BHT) and Butylhydroxyanisol (BHA) eingesetzt, um die Lagerungsfähigkeit von Lebensmittel zu erhöhen und den Verlust von Nährstoffen durch oxidative Abbauprozesse zu verhindern.

Auch BHA wirkt als Östrogenantagonist und ist ein sehr häufig eingesetztes Antioxidans zur Verhinderung der Oxidation von kurzkettigen Fettsäuren, wie sie beispielsweise in Kokosnuss- und Palmöl vorkommen (Sonnenschein & Soto, 1998).



**Abbildung 7: Struktur von 4-Nonylphenol**

### 1.3 Biologische Testsysteme

Um die Gesundheit des Menschen und unserer Umwelt zu schützen, ist es unerlässlich eine adäquate Bewertung bzw. Einschätzung der Toxizität neuer Chemikalien und Pharmazeutika durchzuführen, die sowohl alleine, als auch in komplexen Mischungen in unseren Nahrungsmitteln und der Umwelt vorkommen können (van der Burg et al., 2013). Traditionellerweise wurden dafür Tierstudien, sogenannte in-vivo Tests in Ratten, Mäusen und Hasen durchgeführt um die endokrine Aktivität von Substanzen zu bestimmen. Hierzu zählen beispielsweise der Hershberger- und Allen-Doisy Test.

Da Tierexperimente in letzter Zeit immer häufiger ethisch hinterfragt werden und sehr kosten-, ressourcen- und zeit-intensiv sind, ist ihr Einsatz nicht in allen Bereichen realisierbar. Üblicherweise werden für die Bestimmung von endokrin aktiven Substanzen z.B. in Lebens- und Futtermitteln, Umweltproben, der klinischen Praxis oder Dopingkontrollen analytisch-chemische und immunologische Methoden eingesetzt. Diese Methoden haben im Gegensatz zu Bioassays den Nachteil, dass sie nur die gesuchten Substanzen quantifizieren können, jedoch nicht unbekannte Substanzen bzw. deren Metaboliten detektieren können.

Deshalb werden neue quantitative und reproduzierbare in-vitro Bioassays mit hohem Probendurchsatz benötigt (Sonneveld et al., 2005; van der Burg et al., 2013).

Der Einsatz von Bioassays für die Untersuchung der endokrinen Aktivität hat den Vorteil, dass eine integrierte Betrachtung des endokrinen Potentials der gesamten Probe stattfindet, da die biologischen Effekte aller in der Probe vorhandenen Substanzen abgebildet werden. Dies integriert Effekte von nicht identifizierten Komponenten und komplexer Substanzgemische, der Mischtoxizität. Der Einsatz einer Kombination aus Biotests und instrumenteller Analytik stellt dabei ein wirksames Instrument zur Bestimmung von unbekanntem Proben dar (Wagner & Oehlmann, 2011).

In vitro Testsysteme sind ideal für ein erstes Screening unbekannter Proben um eine generelle Aussage über das Vorhandensein endokrin aktiver Substanzen zu erhalten. Es kann jedoch keine Aussage über das Verhalten (Metabolismus, Verteilung) der Substanzen im tierischen Organismus bzw. deren mögliche negative Effekte getroffen werden. Idealerweise sollten in-vitro positiv getestete Proben durch in-vivo Tests bestätigt werden (Sohoni & Sumpter, 1998; Sonneveld et al., 2005).

Laut Wagner and Oehlmann (2011) lassen sich in-vitro Tests in zwei Kategorien einteilen:

- Reporteragen-Assays: Beruhen auf der rezeptorabhängigen Expression eines einfach zu quantifizierenden Reportergens (z.B. Luciferase) nach der Bindung einer endokrin aktiven Substanz an den Hormonrezeptor bzw. deren Aktivierung. Auf diesem Prinzip beruhen der YAS und der CALUX.
- Proliferationsassays: Hierzu zählt beispielsweise der E-Screen, der auf der Zellvermehrung von Brustkrebszellen (MCF7) in Abhängigkeit von östrogenaktiven Substanzen beruht.

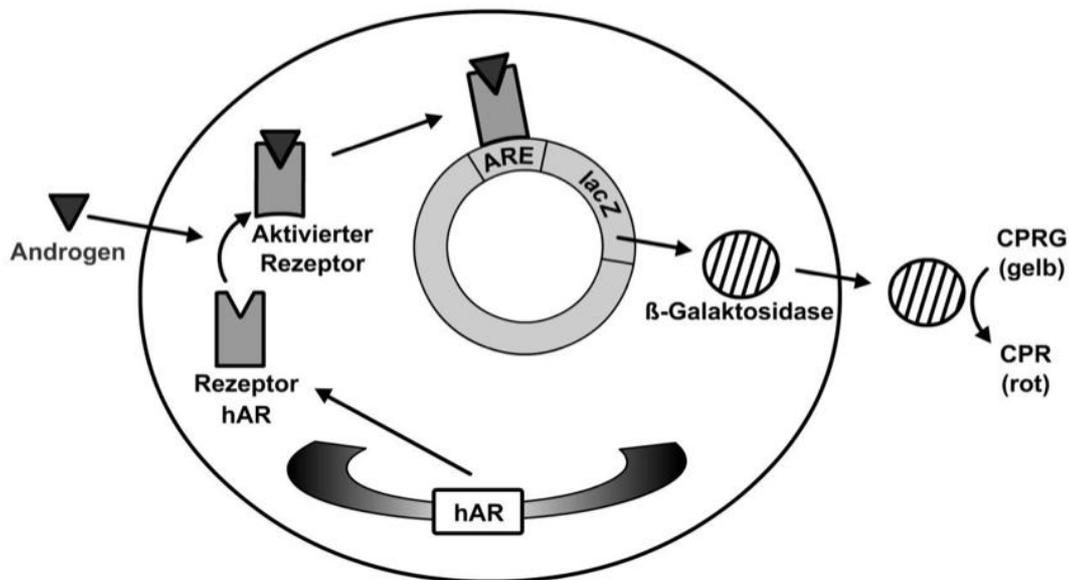
### 1.3.1 Yeast Androgen Screen

Der Yeast Androgen Screen, kurz als YAS bezeichnet, ist ein Reporteragenassay zur Bestimmung von androgen- und antiandrogenaktiven Substanzen, der mit einem rekombinanten Stamm der Hefe *S. cerevisiae* arbeitet.

Da Hefezellen normalerweise keine Androgenrezeptoren beinhalten wird das Gen für den humanen Androgenrezeptor (hAR) fix in das Genom der Hefezelle integriert. Sie beinhalten außerdem Expressionsplasmide auf denen das Reporteragen *lacZ* liegt, welches unter der Kontrolle des Androgen Responsive Elements (ARE) steht und für das Enzym  $\beta$ -Galaktosidase codiert.

In Abbildung 8 ist die schematische Darstellung der Wirkungsweise des YAS dargestellt. Sobald ein Ligand an den Androgenrezeptor bindet wird dieser aktiviert und bindet an das ARE, welches auf dem Expressionsplasmid lokalisiert ist. Dadurch erfolgt die Expression des Reportergens *lacZ*, das Enzym  $\beta$ -Galactosidase wird produziert und ins Medium sekretiert. Das Enzym katalysiert im Medium die Umwandlung des chromogenen Substrates Chlorphenol Rot- $\beta$ -D-galactosid (CPRG) zu Chlorphenol Rot, was einen Farbumschlag von gelb zu rot zur Folge hat. Die Intensität der Rotfärbung kann mit Hilfe eines Photometers bei 550 nm gemessen und dadurch quantifiziert werden. Die Absorption die aus dem Farbumschlag resultiert ist ein direktes Maß für die Androgenkonzentration der Testsubstanz. Das bedeutet, dass die Bildung des Chlorphenol Rot im linearen Zusammenhang mit der Androgenkonzentration steht.

Der resultierende Farbumschlag ist mit freiem Auge sichtbar, wodurch qualitative und quantitative Ergebnisse ermöglicht werden. Die in diesem Bioassay verwendete Bäckerhefe *S.cerevisiae* ist heutzutage einer der bestuntersuchten Organismen und wurde aufgrund schneller Wachstumsraten, Vermehrungsraten und der Verfügbarkeit einer Reihe von Plasmiden und Promotoren ausgewählt.



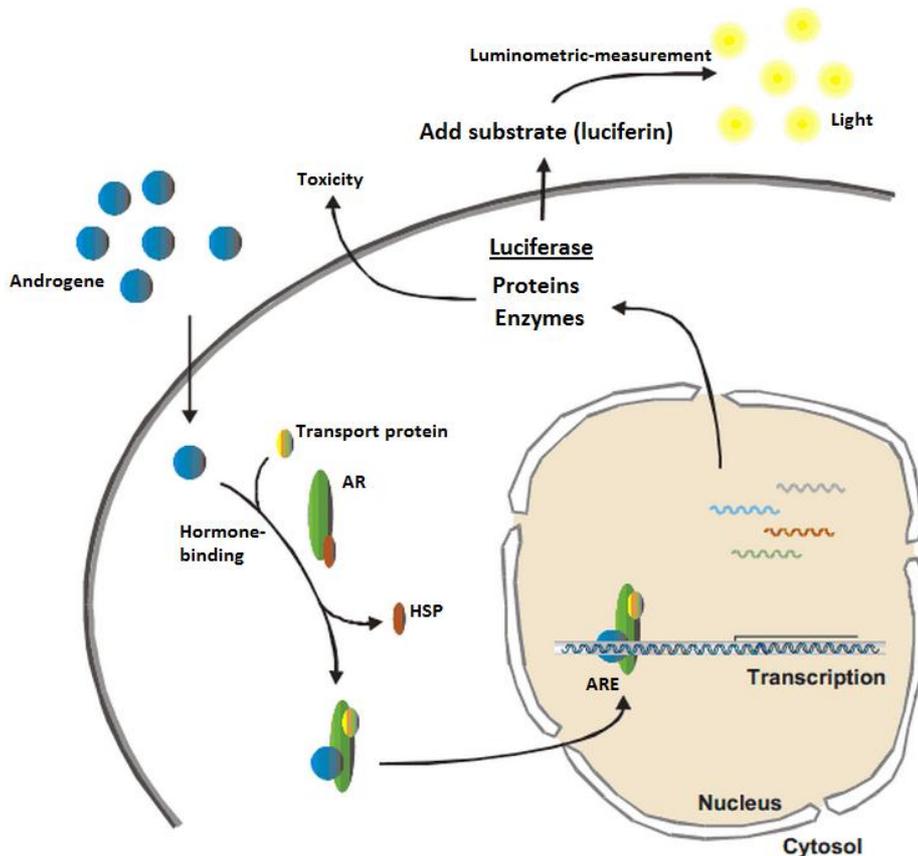
**Abbildung 8: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des Yeast Androgen Screen (Hartl, 2013):** hAR - humaner Androgenrezeptor; ARE – Androgen Responsive Element; lacZ – Reportergen β-Galaktosidase; CPRG - Chlorphenol-rot-β-galactopyranosid; CPR - Chlorphenolrot

Der YAS stellt somit eine spezifische, reproduzierbare, schnelle und vor allem kostengünstige Methode dar, die in der Routineanalytik zum Screening auf androgen aktive Substanzen eingesetzt werden kann. Es kann eine generelle Aussage über die endokrine Aktivität einer Probe getroffen werden. Zur Identifizierung dieser Substanzen muss jedoch auf analytisch-chemische Verfahren zurückgreifen (Routledge & Sumpter, 1996; Schultis & Metzger, 2004; Sohoni & Sumpter, 1998).

### 1.3.2 AR-CALUX

Beim AR-CALUX (Androgenrezeptor-Chemically Activated LUciferase eXpression) handelt es sich, genau wie beim YAS um einen Reportergenassay zur Bestimmung der Androgen- und Antiandrogenaktivität in-vitro. Dieser Assay arbeitet mit der humanen U2OS Zelllinie, bei welcher der humane Androgenrezeptor und ein Androgenrezeptor Responsive Reporter Gen (Luciferase) fix ins Genom integriert wurden. Die Zelllinie zeichnet sich durch die stabile Expression des AR Proteins, hohe Selektivität des Responses auch bei geringen Konzentrationen verschiedener natürlicher und synthetischer Androgene und vernachlässigbaren Response auf Liganden anderer Hormonrezeptoren wie z.B. Östrogene, Progestine und Glucocorticoide aus (Edvin Sonneveld et al., 2004; van der Burg et al., 2010).

In Abbildung 9 ist das Prinzip des AR-CALUX Reporterassays abgebildet.



**Abbildung 9: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des AR-CALUX (BDS Netherlands, 2009):** AR – Androgenrezeptor; HSP – Hitzeschockprotein; ARE – Androgen Responsive Element

Der AR-CALUX arbeitet mit einer humanen Osteosarcoma Zelllinie (U2OS), bei der ein Expressionskonstrukt für den humanen AR (pSG5-neo-hAR) und ein pGL3(Promega)basierendes Reporterkonstrukt fix ins Genom integriert wurden. Das Reporterkonstrukt beinhaltet drei Androgen Responsive Elements gekoppelt an ein Minimalpromoterelement, der sogenannten TATA-Box (pGL3-3xAREtataLuc).

Bindet ein Ligand an den Rezeptor wird dieser aktiviert und bindet im Zellkern an Erkennungssequenzen in der Promotorregion des Zielgens, den sogenannten Androgen Responsive Elements (AREs). Der DNA-gebundene Rezeptor aktiviert die Luciferasetranskription und das Luciferaseprotein erzeugt Licht wenn Luciferin als Substrat zugegeben wird. Das luminometrisch gemessene Signal korreliert direkt mit der Menge an gebundenen Liganden (van der Burg et al., 2013; van der Burg et al., 2010).

Der AR-CALUX ist eine sehr sensitive, selektive und einfach anzuwendende Methode mit hohem Probendurchsatz zur Bestimmung des endokrinen Potenzials unbekannter

## EINLEITUNG

---

Proben. Durch Messung der Inhibition der Luciferaseaktivität kann auf antagonistische Substanzen gescreent werden (Edvin Sonneveld et al., 2004; van der Burg et al., 2010).

### 1.4 Validierung

Heutzutage werden an Lebensmittel und pharmazeutische Produkte hohe Ansprüche gestellt. So erwartet man beispielsweise, dass Lebensmittel nachweisbar schadstofffrei und pharmazeutische Produkte in therapeutisch wirksamen Konzentrationen erzeugt werden. Aus diesem Grund werden in großer Zahl und meist mit erheblichem Aufwand geeignete Analysen durchgeführt, die zuverlässige Analyseergebnisse liefern. Viele Analytikbereiche unterliegen gesetzlichen Auflagen, in denen die Art und Häufigkeit der durchzuführenden Analysen geregelt ist. In der Medizin beispielshalber sind diese Auflagen in den Seuchenkontrollgesetzen geregelt. Das Ziel der analytischen Arbeit besteht darin zuverlässige Analyseergebnisse definierter Qualität zu erhalten. Zu den Aufgaben des Analytikers zählt deshalb auch, die Qualität des von ihm angewendeten Analysenverfahrens zu ermitteln oder zu verbessern sowie sicherzustellen und zu dokumentieren, dass die erreichte Qualität zu jedem Zeitpunkt der Routineanalytik auch eingehalten wird (Funk et al., 2005).

#### 1.4.1 Definition

Unter Validierung versteht man die Überprüfung einer Methode auf ihre Brauchbarkeit. Dabei wird durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises bestätigt, dass das Verfahren die Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt. Für diesen Zweck werden die Validierungsparameter einer Methode ermittelt (Funk et al., 2005; Kromidas, 1999).

Laut ISO 17025:2000 versteht man unter Validierung von Prüfmethoden,

- „die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt sind“.
- „dass sie in dem Umfang durchgeführt werden muss, der zur Erfüllung der Erfordernisse einer beabsichtigten Anwendung oder eines betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist“.
- „dass das Laboratorium die erhaltenen Ergebnisse und das für die Validierung verwendete Verfahren aufzeichnen und festlegen muss, ob das Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet ist“ (Zitz & Strobl, 2006).

### 1.4.2 Validierungsparameter

#### ROBUSTHEIT

Unter Robustheit versteht man die Unempfindlichkeit der Verfahrenskenndaten eines Analysenverfahrens gegenüber Veränderungen in den Analysenbedingungen. Man unterscheidet zwischen:

- „robustness“: bezeichnet die Unempfindlichkeit eines Analysenverfahrens gegenüber realistischen und eindeutig definierten Änderungen der Verfahrensparameter wie z.B. pH-Wert oder Temperatur.
- „ruggedness“: ist der Grad der Reproduzierbarkeit von Analyseergebnissen, wenn Bedingungen variiert werden wie z.B. Wechsel des Labors, des Anwenders, des Gerätes, Reagenzien, etc..

#### PRÄZISION

Als Präzision bezeichnet man das Maß der Übereinstimmung unabhängiger Analyseergebnisse untereinander bzw. das Maß für die Streuung von Analyseergebnissen. Dabei unterscheidet man zwischen nachfolgenden Präzisionsarten.

Wiederholpräzision (repeatability, within-run precision): Ist die qualitative Bezeichnung für das Ausmaß der gegenseitigen Annäherung von Analyseergebnissen unter Wiederholbedingungen. Darunter versteht man Bedingungen, unter denen man voneinander unabhängige Ermittlungsergebnisse in kurzen Zeitabständen erhält: Anwendung des festgelegten Analysenverfahrens am identischen Objekt (gleiches Material/gleiche Probe) durch den selben Beobachter (Analytiker) in kurzen Zeitabständen (unmittelbar hintereinander) mit denselben Geräten am selben Ort (im selben Labor).

Vergleichspräzision (auch Reproduzierbarkeit): Darunter versteht man die Präzision unter Vergleichsbedingungen: Anwendung des festgelegten Analyseverfahrens am identischen Material (Probe), aber in unterschiedlichen Labors, von verschiedenen Bearbeitern und mit verschiedener Geräteausrüstung.

#### WIEDERFINDUNG

Unter der Wiederfindung oder Wiederfindungsrate versteht man das Verhältnis des unter Wiederholbedingungen gemessenen Mittelwertes zum richtigen Wert des Analyten in der Probe. Bei biologischen Proben oder Proben mit einer „schwierigen“ Matrix wie Lebensmittel, wird stets die Wiederfindungsrate überprüft. Ziel des Wiederfindungsexperiments ist es, den Einfluss einer Verfahrens- oder

Probenmodifikation wie z.B. den Matrixeinfluss auf das Analysenverfahren zu ermitteln. Die Matrix ist definiert als Gesamtheit aller Bestandteile des Materials und ihrer chemischen und physikalischen Eigenschaften einschließlich der gegenseitigen Beeinflussung. Wird eine Wiederfindungsrate von 100 % erreicht, so ist das Verfahren frei von konstant- und/oder proportional-systematischen Abweichungen. Beim Auftreten von proportional-systematischen Abweichungen müssen zukünftige Analyseergebnisse über das Verfahren der Standardaddition ermittelt werden, wodurch die Präzision ermittelt und die Richtigkeit der Analyseergebnisse verbessert werden kann. Im Fall von konstant-systematischen Abweichungen muss ein entsprechender Warnvermerk in der Analysenvorschrift angegeben werden (Funk et al., 2005; Kromidas, 1999).

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien und Geräte

In Tabelle 2 sind sämtliche für die Versuchsdurchführung benötigten Materialien und Geräte aufgelistet.

**Tabelle 2: Verwendete Materialien und Geräte**

Gerät	Firma
2 ml Vial Klarglas	Merz
40 ml Probenaufbereitungsvials, Klarglas mit weisser PP-Kappe und eingeklebter PTFE beschichteter Dichteinlage	Infochroma
9 mm Schraubkappen mit 1 mm klarem Silikon/klarem PTFE Septum	Infochroma
96 Well flat, white, non steril, No. 611F96WT	Sterilin
Analysenwaage GJ	Kern
Analysenwaage XS205	Mettler Toledo
Brutschrank BK 3108	Ehret
Centrifuge 5702	Eppendorf
CO <sub>2</sub> -Inkubator Galaxy 170R	New Brunswick
Cryo Tube Vials 1,8 ml	Nunc
Dampfsterilisator 400E	Varioklav
Deep Well Plates P-2ML-SQ-C-S	Axygen
Einwegpipetten: 2 ml, 10 ml, 25 ml	Sterilin
Elektroionisierungssystem ELIX5	Millipore
Falcon Tissue Culture Flasks, Vented Cap	Beckton Dickinson
Klimaschrank Climacell 707	MMM Medcenter
Kryobehälter GT11	Air Liquide
Kühlbrutschrank, Typ 2840	Rumed
Laminar Flow Biosafe 7-130	Ehret
Magnetrührer mit Heizplatte RCT	IKAMAG
Microwell-Platten 96 wells, F96, steril	VWR
Mikroskop Eclipse TS 100	Nikon
Mikrotiterplattenschüttler Titramax 101	Heidolph
Multichannelpipette Xplorer 50-1200 µl	Eppendorf
Multichannelpipette 12x 20-200 µl	Gilson
Multichannelpipette 8x 1-20 µl	Gilson
Multichannelpipette 8x 20-300 µl	Gilson
Multilabel Counter 1420 Victor 3	Perkin Elmer
Oasis HLB6CC (200 mg) Extraction Cartridges	Waters
pH-Messgerät Lab 860	Schott Instruments
Pipetboy acu	IBS
Pipetman P10, 20, 200, 1000	Gilson
Reagent Reservoir (100 ml, PS, pre-sterile)	VWR
Reinstwasseraufbereitungsanlage Milli Q Gradient	Millipore
Rotilabo Spritzenfilter steril, Porengröße 0,22µm	Roth
Schüttelinkubator THL 500	Gerhardt
Schüttelinkubator THL 500	Gerhardt
Sicherheitstrockenschrank FDL115	Binder
Sterilwerkbank Herasafe	Heraeus
SUPELCO Visiprep™ SPE Vacuum Manifold 24 port	Sigma Aldrich
Teflonschläuche	Supelco
Tissue Culture Plate 96-Well Flat Bottom	Sarstedt
Ultratiefkühlschrank Telstar Igloo	Skadi
Vortex Genius 3	IKA
Wasserbad	GFL

## MATERIAL UND METHODEN

---

Wasserbad, 1002	GFL
Zentrifugenröhrchen 50 ml, steril	Sterilin

## 2.2 Verwendete Chemikalien

Die zur Versuchsdurchführung verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tabelle 3: Verwendete Chemikalien**

Chemikalie	Firma	Artikelnummer
2-Mercaptoethanol, 99% p.a.	Sigma Aldrich	M3148
5alpha-Androstan-17 $\beta$ -ol-3-one C-III	Sigma Aldrich	A8380
Acetonitril, ultra gradient HPLC grade	J.T.Baker	9017.2500
Activated Charcoal Norit	Sigma Aldrich	53663
Adenin	Sigma Aldrich	A2786
Ammonsulfat, $\geq 99\%$	Roth	9218.1
Benzyl-Butyl-Phthalat	Sigma Aldrich	39927
Bisphenol A, 99+ %	Sigma Aldrich	239658
Chlorophenol Red- $\beta$ -D-galactoside (CPRG), $\geq 90\%$ , HPLC	Sigma Aldrich	59767
Dextran from Leuconostoc spp. Mr. 500	Sigma Aldrich	31390
Dimethyl sulfoxide for analysis	Merck	1.02952.1000
Dimethyl Sulphoxide Hybri-MAX, steril filtered	Sigma Aldrich	D2650
DMEM/F-12(1:1)(1x)+GlutaMAX	Gibco	10565-018
DMEM/F-12(1x)	Gibco	21041-033
Dulbecco's Phosphat Buffered Saline	Sigma Aldrich	D8537
Ethanol, gradient grade for LC	Merck	1.11727.2500
FCS: Fetal Bovine Serum	Gibco	10106-169
Flutamide	Sigma Aldrich	F9397
G418		
Glycerin $\geq 98\%$ , Ph. EUR, wasserfrei	Roth	7530.1
Kupfer(II)sulfat-5-Hydrat	Riedel-de Haen	31293
L-Histidin	Merck	4351
L-Isoleucin	Sigma Aldrich	I2752
L-Methionin	Sigma Aldrich	M9625
L-Threonin	Sigma Aldrich	T8625
L- $\alpha$ -Phenylalanin	Sigma Aldrich	78019
L(-)-Tyrosin	Sigma Aldrich	T3754
L(+)-Arginin	Sigma Aldrich	A5006
L(+)-Asparaginsäure	Sigma Aldrich	A9256
L(+)-Glutaminsäure	Sigma Aldrich	G1251
L(+)-Leucin	Sigma Aldrich	L8000
L(+)-Lysin Monohydrochlorid	Sigma Aldrich	L5626
L(+)-Serin	Sigma Aldrich	84959
L(+)-Valin	Sigma Aldrich	V0500
Lyticase fr. Arthrobacter luteus, lyophilized powder, 263 U/mg Protein	Sigma Aldrich	L4025
MEM NEAA-Minimum Essential Medium- Non Essential Amino Acids 100x	Gibco	11140-035
Methanol, HPLC gradient grade	J.T.Baker	8402.2500
Natriumdihydrogenphosphat-Dihydrat p.a. Reag. Ph Eur	Merck	1.063.420.250
Natriumdodecylsulfat	Sigma Aldrich	L4390

## MATERIAL UND METHODEN

---

ortho-Phosphorsäure 85%	Merck	1.005.520.250
Pen-Strep 5000 U Penicillin/ml + 5000 U Streptomycin	Lonza	DE17-603E
Salzsäure, 1 M	Merck	1.09057.1000
Steady-Glo Luciferase Assay Buffer	Promega	E2550
Steady-Glo Luciferase Assay Substrate	Promega	E2550
Tris-Puffer (Trometanol)	Merck	
Trypsin – EDTA Solution 0,25%	Sigma Aldrich	T4049
Yeast Nitrogen Base without Ammonium and Aminoacids	Difco	233520
$\alpha$ -D-Glucose Monohydrat $\geq$ 99,5%, Ph. EUR	Roth	6780.1

### 2.3 Verwendete Medien und Pufferlösungen

- **Phosphatpuffer**

156 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  wurden in eine 1 l Schottflasche eingewogen und mit 1000 ml Reinstwasser aufgefüllt. Der Puffer wurde unter Rühren durch Zugabe von  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85 %) auf pH = 3,0 eingestellt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

- **Rotes Medium (mit ungestripptem FCS)**

500 ml DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMax -I wurden mit 41 ml FCS (ungestrippt), 5,5 ml non-essential amino acids und 1 ml Penicillin/Streptomycin versetzt und geschüttelt.

- **Weißes Medium (mit DCC – FCS)**

500 ml DMEM/F-12 (1x) wurden mit 26,4 ml DCC-FCS, 5,3 ml non-essential amino acids und 1 ml Penicillin/Streptomycin versetzt und geschüttelt. Beide Kulturmedien wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

- **DCC – FCS**

Für die Herstellung des weißen Mediums wurde hormonfreies FCS benötigt, um eine Verfälschung der Testergebnisse zu verhindern.

0,6 g Tris wurden in 50 ml Reinstwasser gelöst und der pH Wert mittels 1 M HCl auf 8,0 eingestellt. Die Lösung wurde in eine 1 L Schottflasche überführt und mit Reinstwasser auf 500 ml aufgefüllt. 0,25 g Dextran wurden in diesem Puffer gelöst. Um Klumpenbildung zu vermeiden wurde das Dextran in ein Becherglas vorgelegt und mit 20 ml der Pufferlösung verrieben. Danach wurde die Dextranlösung der Pufferlösung zugegeben. 2,5 g Aktivkohle wurden unter Schütteln mit dem Puffer vermischt. Diese Suspension wurde über Nacht auf einem Magnetrührer bei 4 °C gerührt (1000 RPM).

Eine Flasche FCS wurde im Wasserbad bei 37 C° aufgetaut und 200 ml steril in eine Glasflasche überführt (übriges FCS wurde erneut eingefroren). Das FCS wurde bei 56 °C für 30 min ins Wasserbad gestellt. Währenddessen wurde die dextranbehandelte Aktivkohle vom Tag 1 auf 12 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt. Diese wurde für 20 min bei 1000 g zentrifugiert. Daraufhin wurde der Überstand abpipettiert (in Laminarflow-Werkbank) ohne das Pellet zu zerstören. Es wurde darauf geachtet, möglichst die gesamte Flüssigkeit zu entfernen. Das

hitzebehandelte Serum wurde auf 6 Aktivkohlepellets aufgeteilt (auf optisch gleichen Füllstand) und geschüttelt. Die Zentrifugenröhrchen wurden bei 45 °C für 45 min im Wasserbad inkubiert, wobei alle 5 Minuten mit der Hand aufgeschlämmt wurde. Danach wurden die Zentrifugenröhrchen für 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert. Das Serum wurde steril abpipettiert, in die übrigen 6 Aktivkohlepellet-Zentrifugenröhrchen überführt, geschüttelt und erneut bei 45 °C für 45 Minuten im Wasserbad unter gelegentlichem aufschlämmen (alle 5 Minuten) inkubiert. Daraufhin wurde das Serum für 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert, in 6 leere Zentrifugenröhrchen überführt und erneut 20 Minuten bei 1000 g zentrifugiert um alle Aktivkohlereste zu entfernen. Das Serum wurde in einem Becherglas gepoolt und zu Portionen von je 26,4 ml in Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert. Nach der Beschriftung wurden die Zentrifugenröhrchen bei - 80 °C gelagert.

### – **Freezing Medium**

In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 5 ml hochreines DMSO mit 20 ml rotem Medium gemischt und bei 4 °C gekühlt.

### – **Sumpter Medium**

Zur Herstellung von 1 l Sumpter Medium wurden 100 ml 10xSD-Lösung, 100 ml 10xDO-Lösung und 800 ml steriles Reinstwasser benötigt.

Für die Herstellung der 10xSD-Lösung wurden 3,4 g Difco Yeast Nitrogen Base w/o ammonium and aminoacids, 10 g Ammonsulfat und 40 g D-Glucose Monohydrat eingewogen, in 200 ml Reinstwasser gelöst und in 50 ml Aliquote sterilfiltriert.

Für die 10xDO-Lösung wurden 100 mg Adenin, 100 mg Arginin, 500 mg Asparaginsäure, 500 mg Glutaminsäure, 100 mg Histidin, 150 mg Isoleucin, 500 mg Leucin, 150 mg Lysin, 100 mg Methionin, 250 mg Phenylalanin, 2000 mg Serin, 1000 mg Threonin, 150 mg Tyrosin und 750 mg Valin eingewogen, in 500 ml Reinstwasser gelöst und in 50 ml Aliquote sterilfiltriert.

100 ml 10xSD und 100 ml 10xDO wurden mit sterilem Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

### – **lacZ – Puffer**

8,52 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> und 0,75 g KCl wurden in eine 1 l Schottflasche eingewogen, in 850 ml Reinstwasser gelöst und mit 25 % H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> auf pH 7,0 eingestellt. 0,25 g MgSO<sub>4</sub> wurden in 100 ml Reinstwasser, in einer separaten Flasche gelöst. Beide Lösungen wurden für 15 min bei 121 °C autoklaviert. Unter der Laminar Flow wurde

die beiden Lösungen vermischt, 1 g SDS hinzugefügt und mit sterilem Reinstwasser auf 1 l aufgefüllt. Die Lagerung erfolgte bei Raumtemperatur.

### 2.4 Standardreihen

#### 2.4.1 Herstellung der DHT–Standardreihe für CALUX

Für die Herstellung einer DHT-stocklösung (10 mmol/l) wurden 29,0 mg Dihydrotestosteron in ein Glasprobenröhrchen eingewogen und in 10 ml DMSO gelöst. Entsprechend Tabelle 4 wurde eine Verdünnungsreihe in Glasprobenröhrchen erstellt.

**Tabelle 4: Pipettierschema DHT–Standardreihe für CALUX**

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Verdünnungsschritt
H	20 µmol/L	2 µl Stocklsg. + 998 µl DMSO
V1	1000 nmol/L	50 µl H + 950 µl DMSO
G	80 nmol/L	80 µl V1 + 920 µl DMSO
F	60 nmol/L	60 µl V1 + 940 µl DMSO
E	40 nmol/L	40 µl V1 + 960 µl DMSO
D	20 nmol/L	20 µl V1 + 980 µl DMSO
C	12 nmol/L	12 µl V1 + 988 µl DMSO
B	6 nmol/L	6 µl V1 + 994 µl DMSO
A	0 nmol/L	DMSO

Die Standards A – H und ein Lösungsmittelblindwert wurden in eine 96–well-Platte pipettiert und bei - 20 °C gelagert. Da die Hormonaktivität bei – 20 °C mit der Zeit abnehmen kann, wurden die Glasprobenröhrchen bei - 80 °C gelagert.

### 2.4.2 Herstellung der DHT-Standardreihe für YAS

Ausgehend von der in Kapitel 2.4.1 beschriebenen DHT-Stocklösung (10 mmol/l) wurde laut Tabelle 5 eine Verdünnungsreihe in Glasvials hergestellt und diese bei -20 °C gelagert.

**Tabelle 5: Pipettierschema DHT-Standardreihe für YAS**

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Verdünnungsschritt
V1	100 µmol/L	10 µl Stocklsg. + 990 µl DMSO
V2	1 µmol/L	30 µl V1 + 2970 µl DMSO
DHT 2,7nM	270 nmol/L	270 µl V2 + 730 µl DMSO
DHT 2,4nM	240 nmol/L	240 µl V2 + 760 µl DMSO
DHT 2,1nM	210 nmol/L	210 µl V2 + 790 µl DMSO
DHT 1,8nM	180 nmol/L	180 µl V2 + 820 µl DMSO
DHT 1,5nM	150 nmol/L	150 µl V2 + 850 µl DMSO
DHT 1,2nM	120 nmol/L	120 µl V2 + 880 µl DMSO

### 2.4.3 Herstellung der Flutamid-Standardreihe

Für die Herstellung der Flutamid-Stocklösung F10 (100 mmol/L) wurden 135 mg Flutamid in 5 ml DMSO gelöst und laut Tabelle 6 verdünnt.

**Tabelle 6: Pipettierschema Flutamid-Standardreihe**

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Verdünnungsschritt
F10	100 mmol/L	-
F9	10 mmol/L	500 µl F10 + 4500 µl DMSO
F8	3 mmol/L	150 µl F10 + 4850 µl DMSO
F7	1 mmol/L	50 µl F10 + 4950 µl DMSO
F6	300 µmol/L	150 µl F9 + 4850 µl DMSO
F5	100 µmol/L	50 µl F9 + 4950 µl DMSO
F4	30 µmol/L	15 µl F9 + 4985 µl DMSO
F3	10 µmol/L	500 µl F5 + 4500 µl DMSO
F2	1 µmol/L	50 µl F5 + 4950 µl DMSO
F1	0 µmol/L	5000 µl DMSO

#### 2.4.4 Herstellung der Bisphenol A-Standardreihe

Für die Herstellung der BPA-Stocklösung (10 mmol/L) wurden 16,6 mg BPA in 7,271 ml DMSO gelöst und laut Tabelle 7 verdünnt.

**Tabelle 7: Pipettierschema BPA-Standardreihe**

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Verdünnungsschritt
<b>BPA8</b>	5 mmol/L	500 µL Stocklsg. + 500 µl DMSO
<b>BPA7</b>	2 mmol/L	200 µL Stocklsg. + 800 µl DMSO
<b>BPA6</b>	1 mmol/L	100 µL Stocklsg. + 900 µl DMSO
<b>BPA5</b>	400 µmol/L	40 µl Stock + 960 µl DMSO
<b>BPA4</b>	200 µmol/L	20 µl Stock + 980 µl DMSO
<b>BPA3</b>	100 µmol/L	10 µl Stock + 990 µl DMSO
<b>BPA2</b>	50 µmol/L	5 µL Stock + 995 µl DMSO
<b>BPA1</b>	10 µmol/L	100 µl BPA3 + 900 µl DMSO

#### 2.4.5 Herstellung der Benzyl-butyl-phthalat-Standardreihe

Für die Herstellung der BBP-Stocklösung (20 mmol/L) wurden 15,25 mg BBP in 2,5 ml DMSO gelöst und laut Tabelle 8 verdünnt.

**Tabelle 8: Pipettierschema BBP-Standardreihe**

Bezeichnung	Konzentration im DMSO	Verdünnungsschritt
<b>BBP8</b>	10 mmol/L	500 µl Stocklsg. + 500 µl DMSO
<b>BBP7</b>	5 mmol/L	250 µl Stocklsg. + 750 µl DMSO
<b>BBP6</b>	2 mmol/L	100 µl Stocklsg. + 900 µl DMSO
<b>BBP5</b>	1 mmol/L	50 µl Stocklsg. + 950 µl DMSO
<b>BBP4</b>	800 µmol/L	40 µl Stocklsg. + 960 µl DMSO
<b>BBP3</b>	400 µmol/L	20 µl Stocklsg. + 980 µl DMSO
<b>BBP2</b>	200 µmol/L	10 µl Stocklsg. + 990 µl DMSO
<b>BBP1</b>	100 µmol/L	10 µl BBP8 + 990 µl DMSO

### 2.5 Herstellung der dotierten Blindwerte für CALUX

Hierfür wurde ein migrierter Blindwert der keine Androgen- bzw. Antiandrogenaktivität aufwies mit 100 pM (BW+D) und 400 pM (BW+G) DHT dotiert. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentration im Bioassay.

### 2.6 Herstellung der dotierten Blindwerte für YAS

Ein migrierter Blindwert der keine endokrine Aktivität aufwies wurde mit 1,8 nM und 2,4 nM DHT dotiert. Die Konzentrationsangaben beziehen sich auf die Konzentration im Bioassay.

### 2.7 Untersuchte Proben

Tabelle 9 zeigt 5 beispielhafte Proben die im Rahmen der Diplomarbeit untersucht wurden. Aus Gründen der Vertraulichkeit wurden keine Firmennamen angeführt und die Proben wurden codiert.

**Tabelle 9: Untersuchte Proben**

<b>Probencode</b>	<b>Material</b>	<b>Produktbeschreibung</b>
<b>PET27b</b>	PET	PET food flakes Q1: blau
<b>PP92</b>	PP	Granulat grau
<b>PE96</b>	LDPE	Granulat weiß
<b>PP177</b>	PP/PE	Frischhaltebehälter 1,3 Liter (PP) inkl. Deckel (PE)
<b>GVK174</b>	GVK	GVK für Tomatensaft

### 3 Durchführung

Die Probenvorbereitung und -untersuchung erfolgte im Wesentlichen in 3 Schritten:

- Migrationslagerung
- Aufkonzentrierung
- Untersuchung im Bioassay (CALUX, YAS)

#### 3.1 Migrationslagerung

Die Migrationslagerungen der zu untersuchenden Proben erfolgte anhand der Prüfverfahren für „Werkstoffe und Gegenstände in Kontakt mit Lebensmitteln“ nach ÖN EN 1186 bzw. VO EU 10/2011.

Vorab wurde sichergestellt, dass die Proben nicht in Kontakt mit Lebensmittel gekommen sind, um eine Verfälschung der Testergebnisse im Bioassay zu verhindern. Von jeder Probe wurden zwei unabhängige Migrante angesetzt und im Bioassay analysiert. In Abhängigkeit der Lebensmittelkategorie und der zu erwartenden Lagerungsdauer und -temperatur, wurden die Verpackungen mit den entsprechenden Lebensmittelsimulantien befüllt und für 10 Tage bei 40 oder 60 °C gelagert.

Die Produkte wurden entweder direkt mit den Lebensmittelsimulantien befüllt (beispielsweise bei Flaschen, Bechern, Plastikbehältern) oder in Glasflaschen und Migrationskammern migriert. Im Fall von Granulaten wurde eine definierte Menge in eine Glasflasche eingewogen und mit dem entsprechenden Volumen aufgefüllt. Bei Folien mit einem Durchmesser kleiner als 0,1 mm wurden 0,5 dm<sup>2</sup>, ansonsten 1 dm<sup>2</sup> der Folie ausgeschnitten, mit Reinstwasser gespült, in die Flasche eingebracht und mit Lösungsmittel aufgefüllt. Um Kontaminationen zu verhindern kamen nur Flaschenverschlüsse mit Tefloneinsätzen zum Einsatz. Zur Migration von GVK oder Folien wurden Migrationskammern verwendet. Je 1 dm<sup>2</sup> der Probe wurde in die Kammern eingespannt und mit 100 ml Simulanzlösungsmittel befüllt.

Zusätzlich zu jeder Migration wurde mindestens 1 Lösungsmittelblindwert mitmigriert, um Verunreinigungen der verwendeten Lösungsmitteln und Kontaminationen im Laufe der Probenvorbereitung oder Aufkonzentrierung zu erkennen. Die Blindwerte wurden in Glasflaschen oder Migrationskammern mit Teflonscheiben angesetzt und die Probenvorbereitung sowie -analyse analog zu den Proben durchgeführt.

Alle für die Migrationen verwendeten Materialien wie Flaschen, Migrationskammern, etc. wurden vor der Benützung zweimal mit Reinstwasser gespült um eventuell vorhandene Spülmittelrückstände oder Staub zu entfernen.

Bei unklarer Verwendung der Verpackung wurde die Migration mit 95%igem Ethanol (v/v) für 10 Tage bei 60 °C angesetzt um ein worst-case-scenario zu simulieren. Dies entspricht einer Langzeitlagerung von mehr als 6 Monaten bei Raumtemperatur.

### **3.2 Aufkonzentrierung**

Nach 10-tägiger Migration wurden die Proben mit Hilfe der Festphasenextraktion über OASIS HLB 6CC 200 mg Säulen aufkonzentriert.

#### **Probenvorbereitung**

Gegebenenfalls mussten die Migrante vor der Aufkonzentrierung mit Reinstwasser auf einen Ethanolgehalt von maximal 10% (v/v) verdünnt werden, um das frühzeitige Eluieren von Probenkomponenten zu verhindern. Ebenso wurde der pH-Wert mit Phosphatpuffer (4 ml/l Migrat) auf pH 3 eingestellt.

#### **Vorbereitung der Anlage und Aufkonzentrierung**

Mit Hilfe des Visiprep Vakuum Manifolds wurden die verwendeten Teflonschläuche und Ventile des Vakuum Manifolds mit 15 ml Methanol und 5 ml Reinstwasser gespült.

Die Extraktionssäulen wurden auf die entsprechenden Ventile gesteckt und der Reihe nach mit 15 ml ACN–MetOH Gemisch (v/v), 5 ml Methanol und 5 ml Reinstwasser equilibriert.

Für die Aufkonzentrierung der Migrante wurden die Teflonschläuche an einem Ende über die Adaptern mit der entsprechenden SPE–Säule verbunden und das andere Ende in das Migrat getaucht. Der Schlauch wurde mit Hilfe einer unbeschichteten Alufolie fixiert und die Probe gleichzeitig vor Staub und etwaigen Kontaminationen geschützt. Das Migrat wurde mit einem Unterdruck von - 400 bis - 600 mbar durch die Säulen gezogen, was zu einer durchschnittlichen Durchflussmenge von ca. 5 ml/min führte. Nach der Aufkonzentrierung wurden die Säulen mit 5 ml Reinstwasser gespült und mit einem Unterdruck von max. - 600 mbar das Restwasser entfernt.

In 2 ml Glasvials wurden 200 µl DMSO vorgelegt, gewogen und in das Vakuum Manifold gestellt um das Eluat aufzufangen. Als Elutionsmittel wurden 4,5 ml ACN–MetOH Gemisch (v/v) verwendet. Die Zugabe erfolgte schrittweise: Zuerst wurde mit 1,5 ml AcN–MetOH Gemisch eluiert. Das Eluat wurde mit leichtem Unterdruck (ca. 50 – 100 mbar), um ein Verspritzen der Probe zu verhindern, auf ein Volumen von ca. 0,5 ml eingengt. Anschließend wurde mit 1 ml AcN–MetOH Gemisch eluiert. Dieser Schritt wurde noch zweimal wiederholt. Das Extrakt wurde unter leichtem Unterdruck mit Hilfe des Luftstroms auf ein Volumen von ca. 200 – 300 µl eingengt. Das genaue Volumen wurde

## DURCHFÜHRUNG

---

gravimetrisch bestimmt und das Volumen vom DMSO über die Dichte von reinem DMSO (1,1 g/ml) berechnet.

Anschließend wurden die Vials verschlossen und gevortext um Rückstände an der Glaswand zu lösen. Die Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C.

Berechnung des Volumens vom DMSO:

$$V \text{ ml} = \frac{\text{Auswaage Vial + DMSO + Probe g} - \text{Auswaage leeres Vial g}}{1,1 \text{ g/ml}}$$

### 3.3 CALUX

#### 3.3.1 Kultivierung der Zellen

##### **Anzucht**

Die Zellkulturen wurden in großen Zellkulturflaschen angesetzt. Dafür wurden 45 ml rotes Medium und 120 µl G418 steril in die Kulturflasche pipettiert. Anschließend wurde ein Cryoröhrchen der entsprechenden Zelllinie aus dem Stickstoff genommen und bei 37 °C schnell aufgetaut. Der Cryovialinhalt wurde vorsichtig mit einer 2 ml Einwegpipette in die Kulturflasche überführt.

##### **Passage**

Die Kulturflaschen wurden nach 2 bzw. 3 Tagen mikroskopiert. War ein Zellrasen zu erkennen, wurden die Flaschen passagiert.

Dafür wurde das rote Medium aus den bewachsenen Zellkulturflaschen entfernt und diese zweimal mit 6 ml PBS Puffer gespült. Danach wurden 4 ml Trypsin (37 °C) durch Schwenken am Flaschenboden verteilt und wieder entfernt. Die Flaschen wurden für ca. 2 – 4 Minuten verkehrt im Brutschrank gelagert. Konnte eine Schlierenbildung beobachtet werden, wurden die Zellen mit 10 ml rotem Medium abgespült, suspendiert und möglichst vollständig in ein Zentrifugenröhrchen überführt. Aus diesem Zentrifugenröhrchen wurden die neuen Zellkulturflaschen, in denen 45 ml rotes Medium und 120 µl G418 vorgelegt wurden, beimpft.

Es wurden zwei Passagen durchgeführt, wobei bei der ersten Passage auf 3 Flaschen und bei der 2. Passage auf 10 Flaschen aufgesplittet wurde.

##### **Einfrieren der Zellen (in Cryovials)**

Ziel war die Herstellung von Cryovials mit einer Endkonzentration von  $4,4 \cdot 10^6$  Zellen/ml. Es wurde analog zur Passage der Zellen verfahren. Nach dem Ablösen im Brutschrank wurden die Zellen mit temperiertem rotem Medium abgespült, in ein Zentrifugenröhrchen überführt und zentrifugiert (5 Minuten, 1200 RPM). Durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer wurde das neue Volumen berechnet, indem das Pellet suspendiert werden musste, damit die Suspension eine Zelldichte von 880 Zellen/0,1 µl aufwies.

Berechnung:  $V_{(\text{neu})} = V_{(\text{alt})} \cdot \text{Zellen (ausgezählt)} / 880$

Der Überstand wurde steril vom Pellet entfernt, mit temperiertem rotem Medium auf das berechnete Volumen aufgefüllt und suspendiert. Die Zellsuspension wurde 1:1 mit

## DURCHFÜHRUNG

---

gekühltem Freezing Medium versetzt, aliquotiert ( $\geq 1$  ml) und in Cryovials eingefroren. Dabei wurden die Zellen stufenweise (Übernachtlagerung in Styroporbox bei  $-80$  °C, danach Lagerung im flüssigen Stickstoff) abgekühlt.

### 3.3.2 Durchführung des CALUX - Bioassay

#### **CALUX Tag 1: Platten ansähen aus Cryokultur (für 6 Platten):**

In einem 50 ml Zentrifugenröhrchen wurden 40 ml temperiertes weißes Medium vorgelegt. Anschließend wurde ein Cryovial der entsprechenden Zelllinie aus dem Stickstoff entnommen, bei  $37$  °C schnell aufgetaut und ca. zehnmal vorsichtig geschwenkt. Mit einer 2 ml Einwegpipette wurde 1 ml der Zellsuspension langsam in das Medium überführt. Zur Entfernung des DMSO wurde bei 1200 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das Pellet wurde in 40 ml weißem Medium resuspendiert. Eine sterile 96-Well-Platte wurde beschriftet, die äußeren Wells mit  $100$   $\mu$ l rotem Medium/Well und die inneren 60 Wells mit  $100$   $\mu$ l/Well mit der Zellsuspension befüllt.

Die Inkubation erfolgte bei  $37$  °C und  $5$  %  $\text{CO}_2$  für 20 - 24 Stunden.

#### **CALUX Tag 2: Inkubation mit Standard- und Probelösungen**

Hierfür wurden die in Kapitel 2.4.1, 2.5 und 3.2 erwähnten Standard- und Probelösungen verwendet.

Für die Herstellung der Standard- und Probelösungen mit einer DMSO-Konzentration von  $0,5$  % wurden in einer Deep-Well-Platte pro Well  $1,5$  ml weißes Medium vorgelegt und mit je  $7,5$   $\mu$ l der Standards bzw. Proben versetzt. Vor der Entnahme wurden die Lösungen durch mehrmaliges Auf- und Absaugen vermischt.

Das Medium wurde aus den inneren 60 Wells abgesaugt und durch  $100$   $\mu$ l pro Well der Proben- bzw. Standardlösungen aus der Deep-Well-Platte ersetzt. Die Lösungen wurden laut dem in Abbildung 10 dargestelltem Schema aufgetragen. Die Inkubation erfolgte bei  $37$  °C und  $5$  %  $\text{CO}_2$  für 20 - 24 Stunden.

## DURCHFÜHRUNG

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E	Standard F	Standard G	Standard H		BW+D	BW+G	
C	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E	Standard F	Standard G	Standard H		BW+D	BW+G	
D	Standard A	Standard B	Standard C	Standard D	Standard E	Standard F	Standard G	Standard H		BW+D	BW+G	
E	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10		
F	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10		
G	Probe 1	Probe 2	Probe 3	Probe 4	Probe 5	Probe 6	Probe 7	Probe 8	Probe 9	Probe 10		
H												

Abbildung 10: Pipettierschema CALUX

### CALUX Tag 3: Auswertung

#### Mikroskopische Begutachtung

Die mikroskopische Kontrolle diente zur Erkennung von zytotoxischen Effekten und Kontaminationen. Von jeweils einer Standard- und Probenreihe wurde jedes Well im Mikroskop betrachtet. Es sollte ein Zellrasen erkennbar sein. Viele lose, schwimmende Zellen deuteten auf zytotoxe Proben hin. Die Ergebnisse wurden dokumentiert.

#### Färbung und photometrische Messung

Pro Platte wurden 18,5 mg Glowmix, 1,2 ml Steady-Glow Puffer (Raumtemperatur) und 1,8 ml RO-H<sub>2</sub>O vermengt. Das Volumenverhältnis von Steady-Glow Puffer zu RO-H<sub>2</sub>O betrug 1:1,5. Die entsprechende Menge Glowmixpulver wurde in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen eingewogen, mit dem Steady-Glow Puffer gemischt und mit RO-H<sub>2</sub>O versetzt.

In jedes Well wurden 50 µl dieser Färbelösung pipettiert.

Nach 15 Minuten wurde der gesamte Inhalt jedes Wells der durchsichtigen 96-Well-Platte quantitativ in eine weiße, undurchsichtige Platte überführt um eine sensitivere Auswertung zu ermöglichen.

Die Auswertung erfolgte im Viktor3 mit folgendem Programm:

- Luminometrisch
- Emission Filter: no filter

## DURCHFÜHRUNG

---

- Emission Aperture: normal
- Counting Time: 1 s

### **Negativkontrolle**

Als Negativkontrolle wurden migrierte Blindwerte (EtOH oder RO-H<sub>2</sub>O) verwendet, welche ebenfalls mittels SPE aufkonzentriert wurden.

### 3.4 YAS

#### 3.4.1 Kultivierung der Zellen

##### Herstellung der Übernachtskultur

Ein steriler 100 ml Erlenmeyerkolben wurde mit ca. 25 ml Sumpter Medium befüllt und mit einer Hefekultur beimpft. Die Lagerung der Cryovials erfolgte bei - 80 °C (1:1 mit sterilem Glycerin eingefroren). Nach dem Auftauen wurde die Kultur in das vorgelegte Sumpter Medium überführt. Der Kolben wurde für 24h bei 30 °C und 120 rpm auf einem Schüttler inkubiert. Die anschließende Lagerung erfolgte im Kühlschrank bei 4 °C für maximal 3 Wochen.

#### 3.4.2 Durchführung des YAS–Bioassays

Für die Herstellung der Zellsuspension wurden pro Platte 12 ml Sumpter Medium mit je 480 µl Übernachtskultur und 24 µl CuSO<sub>4</sub> (100 mM) versetzt.

Die standardmäßige Untersuchung der Proben erfolgte in einer 96–well–Platte laut dem in Abbildung 11 dargestelltem Schema:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2,7nM	2,4nM	2,1nM	1,8nM	1,5nM	1,2nM	BW DMSO		BW DMSO			
B	2,7nM	2,4nM	2,1nM	1,8nM	1,5nM	1,2nM			BW Probe (Negativkontrolle)			
C	Probe 1			Probe 2			Probe 3			Probe 4		
D	Probe 1 1:2 Verdünnung			Probe 2 1:2 Verdünnung			Probe 3 1:2 Verdünnung			Probe 4 1:2 Verdünnung		
E	Probe 1 1:4 Verdünnung			Probe 2 1:4 Verdünnung			Probe 3 1:4 Verdünnung			Probe 4 1:4 Verdünnung		
F	Probe 5			Probe 6			Probe 7			Probe 8		
G	Probe 5 1:2 Verdünnung			Probe 6 1:2 Verdünnung			Probe 7 1:2 Verdünnung			Probe 8 1:2 Verdünnung		
H	Probe 5 1:4 Verdünnung			Probe 6 1:4 Verdünnung			Probe 7 1:4 Verdünnung			Probe 8 1:4 Verdünnung		

**Abbildung 11: Pipettierschema YAS**

Für die Quantifizierung der unbekanntes Probe und die Validierung des Bioassays wurde auf jede Mikrotiterplatte eine DHT–Standardreihe aufgetragen. Dafür wurde 1 µl Standard (Standardreihe laut 2.4.2, Konzentrationsbereich: 2,7 nM – 1,2 nM) in die entsprechenden Probewells pipettiert. Als Blindwert wurde sowohl 1 µl reines DMSO, als auch 1 µl eines migrierten Blindwertes aufgetragen. Aufgrund der wachstumsinhibierenden Wirkung von DMSO wurde darauf geachtet in jedem Well dieselbe Konzentration an DMSO zu erreichen. Hierfür wurde in den Reihen D, E, G, H der Probenverdünnungen pro Well 1 µl DMSO vorgelegt. Jeweils 2 µl der zu untersuchenden Proben wurden in Dreifachbestimmung in die Reihen C und F pipettiert. Anschließend wurde mit Hilfe einer

## DURCHFÜHRUNG

---

Multichannelpipette 100 µl der Zellsuspension in jedes Well pipettiert. Um die Verdünnung der Proben zu erreichen, wurden in die Probenreihen C und F zusätzlich 100 µl der Zellsuspension pipettiert. Die Wells dieser Reihe wurden durch mehrmaliges Auf- und Absaugen gut durchmischt und 100 µl der Zellsuspension in die darunterliegenden Reihen der 1:2 Verdünnung (D bzw. G) pipettiert. Hier wurde erneut gründlich gemischt, 100 µl in die Reihe der 1:4 Verdünnung pipettiert, wieder gemischt und die überschüssigen 100 µl verworfen.

Die Mikrotiterplatten wurden mit einer luftdurchlässigen Folie abgeklebt und für 24 h bei 30 °C und 95 % Luftfeuchtigkeit auf einem Schüttler (bei 1200 rpm) inkubiert.

Nach 24 Stunden wurde die Folie abgezogen und die Trübung bei 550 nm mit Hilfe des Multilabel Counter bestimmt um eventuelle Wachstumsinhibierungen zu erkennen. Die Absorption lag im Normalfall bei ca. 0,5. Nach der Trübungsmessung wurden 100 µl der Färbelösung (4 mg CPRG, 2 mg Lytikase, 10 ml *lacZ* – Puffer, 25 µl Mercaptoethanol pro Platte) in jedes Well pipettiert, die Platte mit einer luftundurchlässigen Folie abgeklebt und auf dem Schüttler bei 600 rpm und den vorher genannten Bedingungen inkubiert. Nach deutlicher Rotfärbung der Standardreihe, wobei die Absorption des höchsten Standards zwischen 1,3 und 1,8 lag, wurde die Absorption bei 550 nm bestimmt.

### **3.5 Test auf inhibierende Effekte**

Aufgrund der Vielfältigkeit (Material, Zusammensetzung) der untersuchten Proben konnte durch Matrixeffekte oder der Anwesenheit von Antagonisten der Response auf androgen aktive Substanzen unterdrückt werden. Deshalb musste jede Probe zusätzlich mit DHT dotiert werden um eine Inhibierung auszuschließen. Die dotierten Proben wurden für die Auswertung herangezogen wenn sie eine Wiederfindung von mehr als 60 % aufwiesen.

#### **3.5.1 CALUX**

Jede einzelne Probe wurde zusätzlich zur Bestimmung auf androgen aktive Substanzen mit 500 pM DHT dotiert. Es wurde analog zu Kapitel 3.3.2 verfahren. Für die Herstellung der Spikelösung wurden am zweiten Versuchstag 15 ml temperiertes weißes Medium mit 15 µl Spikelösung ( $3 \cdot 10^{-6}$  M im DMSO) vermischt. Das Medium wurde aus den inneren 60 Wells abgesaugt und nur in den Probewells je 20 µl Spikelösung vorgelegt. Für die Bestimmung der Standardgerade wurden die Wells nicht dotiert. Anschließend wurden wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, je 100 µl Standard- bzw. Probelösung aus der Deep-Well-Platte in die entsprechenden Wells pipettiert, die Platten inkubiert und am dritten Versuchstag ausgewertet.

#### **3.5.2 YAS**

Zur Überprüfung auf inhibierende Matrixeffekte wurden die Proben mit 2,4 nM DHT dotiert.

Es wurde eine Mikrotiterplatte exakt gleich wie die Versuchsplatte pipettiert. Für die Herstellung der Zellsuspension wurde jedoch zusätzlich pro ml Übernachtskultur, 1 µl der Spikelösung (2,4 µM im DMSO) zugesetzt. Die Wells der Standardgerade (A1 – A8, B1 – B8) wurden nicht mit DHT dotiert. Hier wurde die in Kapitel 3.4.2 beschriebene Zellsuspension verwendet.

### 3.6 Validierungsbericht

Im Zuge der Validierung beider Bioassays war zu beobachten, dass trotz der genauen Einhaltung der Durchführungsprotokolle einige der Ansätze aus unerklärlichen Gründen schlechter funktionierten und somit zu einer schlechteren Reproduzierbarkeit der Ergebnisse führten. Deshalb wurden die nachfolgenden Akzeptanzkriterien definiert, die auf jeder AR-CALUX oder YAS Platte eingehalten werden mussten, damit die Mikrotiterplatte zur Auswertung herangezogen werden konnte.

Wurde eines der Kriterien nicht erfüllt, konnte die Platte nicht für die Validierung herangezogen werden und musste wiederholt werden.

Inhibierende oder zytotoxe Effekte der Probenmatrix konnten zu einer Verringerung der Wiederfindung bzw. des Wachstums der Zellen führen. In diesem Fall wurden die Proben ausverdünnt bis die Kriterien für einen gültigen Versuch erfüllt waren. Durch die Verdünnung kam es zu einer Erhöhung der Nachweisgrenze.

#### 3.6.1 Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch im CALUX

##### **Linearität der Dihydrotestosteron-Standardreihe (Bereich $3 \cdot 10^{-11}$ – $4 \cdot 10^{-10}$ M)**

Die DHT-Standardreihe wurde auf jede Platte aufgetragen.

- Messung der Dihydrotestosteronstandards B - G in Dreifachbestimmung
- Erstellung einer Kalibrationsgerade
- Überprüfung der Linearität der Gerade über den Regressionskoeffizienten

**Akzeptanzkriterium:** Regressionskoeffizient  $\geq 0,97$

##### **Erfüllung der Nachweisgrenze**

- Messung des DMSO-Blindwerts in Dreifachbestimmung
- Messung des DHT-Standards ( $1 \cdot 10^{-10}$  M) in Dreifachbestimmung
- Berechnung der Nachweisgrenze (LOD): Mittelwert aus den Blindwerten ( $MW_B$ )+3\*Standardabweichung der Blindwerte ( $3 \cdot STABW_B$ ).

**Akzeptanzkriterium:** Mittelwert aus Dreifachbestimmung des DHT-Standards ( $1 \cdot 10^{-10}$  M) > Nachweisgrenze

##### **Erfüllung der Bestimmungsgrenze**

- Messung des DMSO-Blindwerts in Dreifachbestimmung
- Messung des DHT-Standards ( $2 \cdot 10^{-10}$  M) in Dreifachbestimmung

## DURCHFÜHRUNG

---

- Berechnung der Bestimmungsgrenze (LOQ): Mittelwert aus den Blindwerten ( $MW_B$ ) +  $10 \cdot$  Standardabweichung der Blindwerte ( $10 \cdot STABW_B$ )

**Akzeptanzkriterium:** Mittelwert aus Dreifachbestimmung des DHT-Standards ( $2 \cdot 10^{-10}$  M) > Bestimmungsgrenze

### Induktionsfaktor der Standardreihe

Der Induktionsfaktor entspricht dem Verhältnis des höchsten zum niedrigsten Standards der Standardreihe.

- Messung des DHT-Standards ( $1 \cdot 10^{-7}$  M) und des Lösungsmittelblindwertes in Dreifachbestimmung
- Berechnung des Induktionsfaktors (IF)

$$IF = MW_{Standard\ H} / MW_{Standard\ A}$$

**Akzeptanzkriterium:** IF  $\geq$  6,0 (angelehnt an die niederländischen Qualitätskriterien für ER-Calux-Messungen)

### Zellwachstum

- Mikroskopische Betrachtung am dritten Versuchstag: Zellzahl und -form der Probenwells mussten mit jenen der Standardreihe und Blindwerte übereinstimmen, um mögliche Einflussfaktoren der Probenmatrix sowie zytotoxe Effekte auszuschließen.
- Alternativ: Cytotox-CALUX mit gleicher Probe

### **Akzeptanzkriterium:**

Mikroskopische Betrachtung: Zellzahl und -form in den Probenwells unterschieden sich optisch nicht signifikant von den Zellen im Blindwert und der Standardreihe

Cytotox-CALUX: Luciferase-Aktivität der Probe = Luciferase-Aktivität des DMSO-Blindwerts +/- 20%

### 3.6.2 Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch im YAS

Auch für den YAS wurden Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch festgelegt, die auf jeder Mikrotiterplatte erfüllt sein mussten, damit sie für die Auswertung herangezogen werden konnte. Folgende Kriterien wurden für den YAS festgelegt.

#### **Linearität der Dihydrotestosteron-Standardreihe (Bereich 1,2 – 2,7 nM)**

Die DHT-Standardreihe wurde auf jede Platte aufgetragen.

- Messung der Dihydrotestosteronstandards in Doppelbestimmung
- Erstellung einer Kalibrationsgerade
- Überprüfung der Linearität der Gerade über den Regressionskoeffizienten

**Akzeptanzkriterium:** Regressionskoeffizient  $\geq 0,90$

#### **Erfüllung der Nachweisgrenze**

- Messung des DMSO-Blindwerts in Vierfachbestimmung
- Messung des DHT-Standards (1,2 nM) in Doppelbestimmung
- Berechnung der Nachweisgrenze (LOD): Mittelwert aus den Blindwerten ( $MW_B$ ) + 3\*Standardabweichung der Blindwerte ( $3*STABW_B$ )

**Akzeptanzkriterium:** Mittelwert aus Doppelbestimmung des DHT-Standards (1,2 nM) > Nachweisgrenze

#### **Zellwachstum**

- Photometrische Bestimmung der Trübung jedes Wells bei 550 nm am zweiten Versuchstag vor der Färbung
- Berechnung des Absorptionsmittelwertes der 4 DMSO-Blindwerte

**Akzeptanzkriterium:** Zelldichte der Proben musste im Bereich Mittelwert (BW)  $\pm 20\%$  liegen.

#### **Induktionsfaktor der Standardreihe**

- Messung des DMSO-Blindwerts in Vierfachbestimmung
- Messung des DHT-Standards (2,7 nM) in Doppelbestimmung
- Berechnung des Induktionsfaktors (IF)

## DURCHFÜHRUNG

---

$$IF = MW_{\text{Standard } 2,7 \text{ nM}} / MW_{\text{DMSO - Blindwert}}$$

**Akzeptanzkriterium:**  $IF > 2,5$

Das bedeutet, dass der Absorptionsmittelwert des 2,7 nM DHT–Standards mindestens 2,5 fach höher sein muss, als der des DMSO–Blindwerts.

### **Matrixeffekte**

Um eine Probe auswerten zu können, musste die gemessene Androgenaktivität (Mittelwert einer Dreifachbestimmung) der mit 2,4 nM DHT dotierten Probe mindestens 60 % der gemessenen Androgenaktivität des mit derselben Konzentration dotierten DMSO–Blindwerts betragen. Proben mit einer Wiederfindung unter 60 % wurden nicht, oder in verdünnter Form für die Validierung herangezogen.

## 4 Ergebnisse

Da sich das Validierungsprogramm in den Ergebnissen widerspiegelt, wurde es in der Durchführung nicht explizit dargestellt.

### 4.1 Validierung CALUX

#### 4.1.1 Wiederfindung

Die Wiederfindung ist das Verhältnis der unter Wiederholbedingungen erhaltenen Aktivität im Bioassay zum tatsächlichen Gehalt der Komponente im Blindwert. Im Rahmen der Validierung wurde überprüft ob es durch etwaige inhibierende bzw. cytotoxische Effekte der Probenmatrix zu einer Störung des Bioassays kommen kann.

Zur Bestimmung der Wiederfindung wurden fünf verschiedene Proben, welche keine Androgenaktivität aufwiesen, mit 500 pM DHT dotiert und die Wiederfindung der Androgenaktivität im Vergleich zu dem mit DHT dotierten reinem DMSO bestimmt.

Bei der Probenauswahl wurde darauf geachtet ein möglichst breites Probenspektrum (unterschiedliche Materialien und Formen) zu testen. Ebenso wurden worst-case-Migrate (bspw. Granulate) untersucht, die aufgrund von extremen Migrationsbedingungen und einem hohen A/V-Verhältnis einen hohen Anteil an gelöstem Kunststoff aufweisen.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Mikrotiterplatte

**Tabelle 10: Wiederfindung des 500 pM Spikes im CALUX**

Probe	MW/Tag [pM AEQ]	Sollwert [pM AEQ]	Wiederfindung
<b>GVK</b>	277,94	374,27	74%
<b>PS; Tiefziehfolie</b>	302,39	326,46	93%
<b>PP; Granulat</b>	341,65	374,27	91%
<b>PET flakes</b>	407,50	574,60	71%
<b>PE; Granulat</b>	292,67	281,67	104%

**Akzeptanzkriterium:** Wiederfindung zwischen 70 und 130 %

Tabelle 10 zeigt die ermittelten Wiederfindungen die für die einzelnen Proben zwischen 71 und 104 %, und somit innerhalb des Akzeptanzkriteriums lagen.

#### 4.1.2 Wiederholbarkeit

Die Präzision unabhängiger Messungen unter Wiederholbedingungen (gleiche Probe, gleiches Labor, gleicher Analytiker, gleiches Gerät) an einem Tag.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden die in Kapitel 2.5 beschriebenen Proben verwendet.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Mikrotiterplatte
- Berechnung der relativen Standardabweichung aus 6 Platten

Die Bestimmung der relativen Standardabweichung erfolgte anhand folgender Formel:

$$RSD [\%] = \frac{S_D}{MW} \times 100$$

**Tabelle 11: Wiederholbarkeit der mit DHT dotierten Proben im CALUX**

Probe	MW/Platte [pM AEQ ]						MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>BW+D</b>	166,19	147,58	125,41	156,84	130,48	139,95	144,41	15,58	11%
<b>BW+G</b>	438,33	537,07	462,50	487,07	472,14	457,43	475,76	34,10	7%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

Wie aus Tabelle 11 ersichtlich, ist die Wiederholbarkeit der Methode gegeben, da der Variationskoeffizient bei beiden Proben unter 20 % lag und somit das Akzeptanzkriterium erfüllt wurde.

#### 4.1.3 Reproduzierbarkeit

Im Gegensatz zur Wiederholbarkeit die an einem Tag bestimmt wurde, versteht man unter der Reproduzierbarkeit die Präzision der Messwerte unter Wiederholbedingung über den Zeitraum von 2 Monaten an 6 unterschiedlichen Tagen. Dabei wurden ebenso unterschiedliche Cryovialchargen verwendet.

Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit der unter Punkt 2.5 beschriebenen Proben wurde eine Dreifachbestimmung pro Tag durchgeführt.

- Messung der mit DHT dotieren Proben in Dreifachbestimmung pro Mikrotiterplatte
- Bestimmung der relativen Standardabweichung aus 6 Platten

**Tabelle 12: Reproduzierbarkeit der mit DHT dotierten Proben im CALUX**

Probe	MW/Tag [pM AEQ]						MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>BW+D</b>	158,51	130,92	142,01	117,14	161,03	166,19	145,97	19,32	13%
<b>BW+G</b>	455,58	336,02	349,53	345,13	444,81	438,33	394,90	56,68	14%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

Die Reproduzierbarkeit über einen Zeitraum von zwei Monaten liegt für die mit 100 pM dotierten Proben in einem ähnlichen Rahmen wie die Wiederholbarkeit an einem Tag, was bedeutet, dass der AR-CALUX eine relativ robuste Methode darstellt. Die RSD für die mit 400 pM dotierten Proben liegt bei 14 % und somit etwas höher als die an einem Tag bestimmte RSD, was sich auch in den Ergebnissen der Androgenaktivität zeigt. Die in Tabelle 12 aufgelisteten Messwerte zeigen jedoch, dass das Akzeptanzkriterium für die Reproduzierbarkeit erfüllt wurde, da der Variationskoeffizient beider Proben unter 20 % lag.

#### 4.1.4 Prüfung auf Robustheit

Unter Robustheit versteht man die Unempfindlichkeit der Verfahrenskenndaten gegenüber Veränderungen der Analysenbedingungen. Im Vorhinein wurden mögliche kritische Faktoren identifiziert die im Laufe der Durchführung auftreten und dadurch das Testergebnis beeinflussen können. Es wurde ermittelt ob kleine Änderungen nachfolgender Parameter, die Analyseergebnisse der mit DHT dotierten Proben (BW+D, BW+G) beeinflussen.

##### 4.1.4.1 Intermediate Precision (Inter Analyst/Different Days)

Die Intermediate Precision spiegelt die Reproduzierbarkeit im Realbetrieb. Für die Bestimmung wurde der AR-CALUX durch einen zweiten Analytiker an einem zweiten Tag durchgeführt.

- Berechnung der RSD aus jeweils 1 Platte pro Person (Werte des 1. und 2. Analytikers, n=6)

Analytiker 1: Johannes Mertl – durchgeführt am 14.02.2013

Analytiker 2: Angelika Grininger – durchgeführt am 24.01.2013

## ERGEBNISSE

---

**Tabelle 13: Intermediate Precision im CALUX**

Probe	Analytiker 1 [pM AEQ]			Analytiker 2 [pM AEQ]			MW [pM AEQ]	RSD
<b>BW+D</b>	95,68	130,93	115,13	130,56	145,74	165,47	130,59	18%
<b>BW+G</b>	325,38	348,47	296,21	397,74	381,04	432,66	363,58	14%

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  20% (Werte des 1. und 2. Analytikers, n=6)

Die Ergebnisse der Tabelle 13 zeigen, dass das Akzeptanzkriterium für beide Proben erfüllt wurde. Die Reproduzierbarkeit im Realbetrieb ist somit gegeben und der durchführende Analytiker hat keinen Einfluss auf das Testergebnis.

### 4.1.4.2 Einfluss der Cryovial-Charge

Es wurde der Einfluss der Cryovial-Charge auf das Testergebnis ermittelt. Dafür wurde der Bioassay von derselben Person am selben Tag, mit jeweils zwei unterschiedlichen Cryovialchargen angesetzt und durchgeführt.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Platte
- Pro Cryovialcharge wurden 3 Platten angesetzt
- Berechnung der Mittelwerte und der RSD aus jeweils 3 Platten

**Tabelle 14: Überprüfung des Einflusses der Cryovialcharge auf die Analysenergebnisse im CALUX**

	BW+D			BW+G		
	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>Cryovial v. 09.07.</b>	130,02	12,46	10%	343,56	6,89	2%
<b>Cryovial v. 14.01.</b>	133,92	18,29	14%	384,77	54,14	14%

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Tabelle 14 zeigt, dass die Proben beider Cryovialchargen innerhalb der festgelegten Akzeptanzkriterien liegen und somit die Variation der Cryovialcharge keinen Einfluss auf die Testergebnisse hat.

#### 4.1.4.3 Variation der Zellzahl

Da die Zellkonzentration der Cryovialchargen aufgrund unterschiedlicher Mortalitätsraten variieren kann, wurde getestet ob dies das Testergebnis beeinflusst.

Es wurden jeweils 5 Platten mit einer Konzentration von  $10^4$  Zellen/Well und  $2 \cdot 10^4$  Zellen/Well gemessen und verglichen wie stark die Testergebnisse variierten.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Platte
- Berechnung der Mittelwerte und RSD aus jeweils 5 Platten

**Tabelle 15: Überprüfung des Einflusses der Zellzahl auf die Analysenergebnisse im CALUX**

Zellen/100 $\mu$ l	BW+D			BW+G		
	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
$10^4$	135,93	15,40	11%	372,35	48,78	13%
$2 \cdot 10^4$	145,74	18,48	13%	454,28	53,77	12%

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Wie aus Tabelle 15 ersichtlich, wurden die Akzeptanzkriterien für beide Zellkonzentrationen erfüllt, da der Variationskoeffizient unter 20 % und das Verhältnis der Mittelwerte beider Proben unter 1,25 lag.

#### 4.1.4.4 Anwachsdauer der CALUX-Zellen auf der 96-Well-Platte

Im Routinebetrieb ist nicht immer sichergestellt, dass die Anwachszeit der CALUX-Zellen exakt gleich ist. Vor allem bei der gleichzeitigen Untersuchung mehrerer Platten kann die Anwachszeit von den üblichen 24 Stunden abweichen. Deshalb wurde in diesem Robustheitstest, der im Zuge des „Validierungsberichts TR CALUX“ von Susanne Greiner durchgeführt wurde getestet, ob die Testergebnisse voneinander abweichen wenn die Anwachsdauer auf 20 Stunden reduziert wird. Hierfür wurden jeweils drei unabhängige Mikrotiterplatten für 20 bzw. 24 Stunden angesetzt und mit zwei verschiedenen Konzentrationen von Triiodthyronin dotiert. Es wurden die Konzentrationen und die relative Standardabweichung bestimmt.

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

**Tabelle 16: Überprüfung des Einflusses der Anwachsdauer der CALUX-Zellen auf der 96-Well-Platte auf die Analyseergebnisse im TR-CALUX:** Tabelle übernommen aus „Validierungsbericht TR CALUX“ von Susanne Greiner

	Spike E (500 pM im Bioassay)		Spike F (800 pM) im Bioassay	
	Mittelwert [pM]	RSD	Mittelwert [pM]	RSD
<b>20 Stunden</b>	671,61	14%	993,40	6%
<b>24 Stunden</b>	616,71	10%	935,85	5%

Wie Tabelle 16 zeigt, sind die Akzeptanzkriterien für eine Anwachsdauer von 20 und 24 Stunden erfüllt. Die Reduktion der Zeit auf 20 Stunden hat keinen signifikanten Einfluss auf das Testergebnis. Da es sich hierbei um die selbe Zelllinie (U2OS) wie beim AR-CALUX handelt kann davon ausgegangen werden, dass dieselben Ergebnisse auch für den AR-CALUX zu erwarten sind. Die Anwachsdauer wurde auch für diesen Bioassay auf 20 - 24 Stunden eingegrenzt.

#### 4.1.4.5 Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Substanzlösungen

Am zweiten Versuchstag des AR-CALUX wurde die Zellsuspension aus der 96-Well-Platte abpipettiert und durch Standard- bzw. Probelösung ersetzt. Analog zu Punkt 4.1.4.4 wurde auch hier die Inkubationsdauer auf 20 Stunden verkürzt, um einen Einfluss auf das Testergebnis festzustellen. In diesem Fall erfolgte die Untersuchung mit dem AR-CALUX. Die Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Standard- und Probelösungen variierte zwischen 20 und 24 Stunden.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Platte
- Berechnung der Mittelwerte und RSD aus jeweils 2 Platten pro Uhrzeit

**Tabelle 17: Überprüfung des Einflusses der Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Substanzlösungen auf die Analyseergebnisse im CALUX**

	BW+D			BW+G		
	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>20 Stunden</b>	165,64	10,63	6%	488,38	58,98	12%
<b>24 Stunden</b>	148,52	1,79	1%	414,69	15,39	4%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Laut Tabelle 17 liegen die ermittelten Werte beider Proben innerhalb der festgelegten Akzeptanzkriterien. Somit konnte die Inkubationsdauer innerhalb eines Zeitrahmens von 20 und 24 Stunden variieren.

#### 4.1.4.6 Dauer der Zellen ohne Medium

Am zweiten Versuchstag wurde das Zellmedium abgesaugt und anschließend die Standard- bzw. Probenlösung zupipettiert. Wenn mehrere Platten gleichzeitig pipettiert werden, liegen die Zellen in den Wells im Zuge dieses Arbeitsschrittes für bestimmte Zeit ohne Medium vor. Da das Austrocknen der Zellen zu veränderten Testergebnissen führen kann, wurde dieser Parameter in der TR-Validierung überprüft. Die Zellen wurden 5 Minuten trocken und mit geschlossenem Deckel in der Sterilwerkbank stehen gelassen. Die Thyroninkonzentration und die relative Standardabweichung wurden aus 4 unabhängigen Mikrotiterplatten bestimmt.

**Tabelle 18: Ermittlung des Einflusses auf die Analysenergebnisse durch Austrocknen der Zellen im TR-CALUX:** Tabelle übernommen aus „Validierungsbericht TR CALUX“ von Susanne Greiner

	Spike E (500 pM im Bioassay)		Spike F (800 pM im Bioassay)	
	Mittelwert [pM]	RSD	Mittelwert [pM]	RSD
<b>sofort</b>	684,12	6%	979,74	9%
<b>5 Minuten</b>	717,83	7%	1084,22	2%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Die in der TR-Validierung bestimmten Ergebnisse (Tabelle 18) erfüllten beide Akzeptanzkriterien. Da es sich um dieselbe Zelllinie handelt die beim AR-CALUX verwendet wird, kann angenommen werden ,dass die Ergebnisse auch auf den AR-CALUX zutreffen.

#### 4.1.4.7 Dauer der Färbereaktion in der durchsichtigen 96-Well-Platte

In jedes Well wurde eine bestimmte Menge Färbelösung pipettiert und nach 10-minütiger Reaktionsdauer in eine weiße Mikrotiterplatte überführt. Für die Validierung wurde die Reaktionsdauer auf 30 Minuten erhöht.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Platte
- Berechnung der Mittelwerte und der RSD aus jeweils 2 Platten pro Reaktionsdauer

**Tabelle 19: Überprüfung des Einflusses der Färbereaktion auf die Analysenergebnisse im CALUX**

	BW+D			BW+G		
	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD	MW [pM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>10 Minuten</b>	137,63	12,23	9%	431,06	24,88	6%
<b>30 Minuten</b>	163,05	10,28	6%	435,23	10,28	2%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Tabelle 19 zeigt die Gültigkeit der Akzeptanzkriterien. Die Dauer der Färbereaktion konnte bei der Durchführung der Analysen zwischen 10 und 30 Minuten variieren, ohne einen Einfluss auf die Analysenergebnisse zu haben.

#### 4.1.4.8 Mischen der Zellsuspension mit der Färbelösung

Im Zuge der Färbereaktion wurden 50 µl Färbelösung auf die in den Wells vorhandene Standard- und Probelösung pipettiert und nach 10 - 30 minütiger Reaktionsdauer gemessen. Für die Validierung wurde ermittelt, ob das Testergebnis durch das Vermischen der Färbelösung mit dem Medium beeinflusst wird.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Platte
- Berechnung der Mittelwerte und der RSD aus jeweils 2 Platten. Pro Platte wurden die oberen 3 Reihen nicht vermischt und die unteren Reihen mit Hilfe einer Kolbenhubpipette durch 10maliges Auf- und Absaugen gemischt.

## ERGEBNISSE

---

**Tabelle 20: Ermittlung des Einflusses auf die Analysenergebnisse durch Vermischen der Zellsuspension mit der Färbelösung**

	BW+D		BW+G	
	MW [pM AEQ]	RSD	MW [pM AEQ]	RSD
ohne mischen	159,15	17%	396,54	9%
mischen	169,06	13%	487,65	9%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

Tabelle 20 zeigt, dass beide Akzeptanzkriterien erfüllt wurden. Aufgrund der leichteren Durchführbarkeit wurde in den nachfolgenden Analysen auf das Vermischen mit der Färbelösung verzichtet.

### 4.1.4.9 Dauer der Färbereaktion in der weißen 96-Well-Platte

Nach 10 - 30 minütiger Inkubationsdauer der Färbelösung wurde das gesamte Volumen jedes Wells quantitativ in eine weiße 96-Well-Platte überführt und sofort mit dem Photometer gemessen. Für die Validierung wurde die Platte nach 30 Minuten erneut gemessen und der Einfluss auf die Testergebnisse bestimmt.

Die Thyroninkonzentration sowie die relative Standardabweichung wurden aus zwei unabhängigen Mikrotiterplatten bestimmt.

**Tabelle 21: Überprüfung des Einflusses der Färbereaktion in der weißen 96-Well-Platte auf die Analysenergebnisse im CALUX:** Tabelle übernommen aus „Validierungsbericht TR CALUX“ von Susanne Greiner

	Spike E (500 pM im Bioassay)		Spike F (800 pM im Bioassay)	
	Mittelwert [pM]	RSD	Mittelwert [pM]	RSD
sofort	412,04	2%	640,76	4%
30 Minuten	441,72	3%	600,36	10%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 20 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,25 ; x_1 \geq x_2$$

In Tabelle 21 sind die Ergebnisse des Robustheitstests dargestellt. Die Akzeptanzkriterien wurden sowohl bei sofortiger, als auch nach 30-minütiger Messung der Platten erfüllt. Wie

## ERGEBNISSE

---

bereits in Punkt 4.1.4.4 und 4.1.4.6 erläutert, können die Ergebnisse auch für die Validierung des AR-CALUX angewendet werden, da es sich um dieselbe Zelllinie handelt (U2OS).

## 4.2 Validierung YAS

### 4.2.1 Wiederholbarkeit

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden alle Messungen an demselben Tag, von einem Analytiker und mit denselben Geräten durchgeführt. Die in Kapitel 2.6 genannten, mit zwei unterschiedlichen Konzentrationen an DHT dotierten Proben wurden an einem Tag auf 5 unabhängigen Mikrotiterplatten gemessen. Als Maß für die Wiederholbarkeit wurde die relative Standardabweichung aller 5 Platten berechnet.

- Messung der mit DHT dotierten Proben in Dreifachbestimmung pro Mikrotiterplatte
- Berechnung der relativen Standardabweichung aus 5 Platten

**Tabelle 22: Wiederholbarkeit der mit DHT dotierten Proben im YAS**

Probe	MW/Platte [nM AEQ]					MW [nM AEQ]	S <sub>D</sub>	RSD
<b>BW+1,8</b>	1,80	1,78	1,65	1,99	1,99	1,84	0,15	8%
<b>BW+2,4</b>	2,67	2,74	2,84	2,92	2,96	2,83	0,12	4%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 30 %

Die Ergebnisse für die Bestimmung der Wiederholbarkeit sind in Tabelle 22 aufgelistet. Das Akzeptanzkriterium wurde für beide Proben erfüllt, da der Variationskoeffizient unter 20 % lag.

### 4.2.2 Reproduzierbarkeit

Wie bereits für den AR-CALUX wurde auch für den YAS die Reproduzierbarkeit der Methode über einen längeren Zeitraum bestimmt. Hierfür wurden über einen Zeitraum von zwei Monaten, an 5 unterschiedlichen Tagen die Konzentrationen zweier Proben analysiert die mit einer bestimmten Konzentration an DHT dotiert wurden. Im Zuge der Messungen wurden ebenso unterschiedliche Übernachtskulturen verwendet. Zur Überprüfung der Reproduzierbarkeit wurde die relative Standardabweichung aus den an 5 verschiedenen Tagen erhaltenen Messergebnissen bestimmt.

- Messung der mit DHT dotieren Proben in Dreifachbestimmung pro Mikrotiterplatte
- Bestimmung der relativen Standardabweichung aus 5 Platten

**Tabelle 23: Reproduzierbarkeit der mit DHT dotierten Proben im YAS**

Probe	MW/Platte [nM AEQ]					MW [nM AEQ]	SD	RSD
<b>BW+1,8</b>	1,80	1,93	2,03	2,53	1,76	2,01	0,31	15%
<b>BW+2,4</b>	2,67	2,63	2,88	3,48	2,15	2,76	0,48	17%

**Akzeptanzkriterium:** RSD ≤ 30 %

Tabelle 23 zeigt die Ergebnisse für die beiden Proben, die an 5 unterschiedlichen Tagen bestimmt wurden. Das festgelegte Akzeptanzkriterium wurde von beiden Proben erfüllt. Sowohl die relative Standardabweichung als auch die durchschnittliche Androgenaktivität haben sich, im Vergleich zur Bestimmung an einem Tag nur unwesentlich erhöht. Dies zeigt, dass auch der YAS eine relativ robuste Methode zur Bestimmung der Androgenaktivität von Kunststoffmigraten darstellt.

#### 4.2.3 Prüfung auf Robustheit

Wie schon für den AR-CALUX wurden auch für den YAS kritische Faktoren bestimmt die während der Durchführung auftreten können und getestet, ob diese einen Einfluss auf die Testergebnisse haben.

##### 4.2.3.1 Intermediate Precision (Inter Analyst/Different Days)

Auch für den YAS wurde die Intermediate Precision bestimmt. Der YAS wurde dafür durch einen zweiten Analytiker an einem zweiten Tag durchgeführt.

- Berechnung der RSD aus jeweils 1 Platte pro Person (Werte des 1. und 2. Analytikers, n=6)

Analytiker 1: Johannes Mertl – durchgeführt am 13.03.2013

Analytiker 2: Angelika Grininger – durchgeführt am 22.03.2013

**Tabelle 24: Intermediate Precision im YAS**

Probe	Analytiker 1 [nM]			Analytiker 2 [nM]			MW [nM]	RSD
<b>BW+1,8</b>	1,79	2,41	2,19	1,65	1,83	1,86	1,96	15%
<b>BW+2,4</b>	2,97	3,36	3,32	2,52	2,50	2,39	2,84	15%

## ERGEBNISSE

---

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  30% (Werte des 1. und 2. Analytikers, n=6)

In Tabelle 24 sind die Ergebnisse der Intermediate Precision dargestellt. Da der YAS im Realbetrieb nicht nur von einer Person durchgeführt wird, drückt die Intermediate Precision die Fähigkeit einer Methode aus, im Realbetrieb reproduzierbare Ergebnisse zu liefern. Die RSD beider Proben liegen bei 15 % und somit innerhalb des Akzeptanzkriteriums. Die Methode ist somit geeignet im Realbetrieb, trotz unterschiedlicher Analytiker, reproduzierbare Analyseergebnisse zu liefern.

### 4.2.3.2 Alter der Übernachtkultur

Die für die Versuchsdurchführung verwendete Übernachtkultur des Hefestamms *S.cerevisiae* wird nach der Herstellung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Dies hat einerseits den praktischen Grund, dass nicht für jede YAS-Durchführung eine neue Übernachtkultur angesetzt werden muss und andererseits Material gespart wird. Im Zuge der Validierung wurde getestet, ob das Alter der Übernachtkultur einen Einfluss auf die Analyseergebnisse hat. Dafür wurde der YAS mit einer frischen Übernachtkultur angesetzt (Inkubation über Nacht im Schüttelinkubator und direkt verwendet) und nach 17 Tagen dieselbe Übernachtkultur erneut gemessen und verglichen, ob die Ergebnisse der in Kapitel 2.6 beschriebenen Proben variierten.

- Berechnung der Mittelwerte und RSD aus jeweils 1 Platte pro Alter der Übernachtkultur

**Tabelle 25: Ermittlung des Einflusses des Alters der Übernachtkultur auf die Analyseergebnisse im YAS**

Probe	Übernachtkultur 1 Tag alt					Übernachtkultur 17 Tage alt				
	Einzelmesswerte [nM AEQ]			MW [nM AEQ]	RSD	Einzelmesswerte [nM AEQ]			MW [nM AEQ]	RSD
<b>BW+1,8</b>	1,78	1,77	1,84	1,80	2%	2,02	2,02	2,05	2,03	1%
<b>BW+2,4</b>	2,96	2,60	2,45	2,67	10%	2,91	2,89	2,84	2,88	1%

**Akzeptanzkriterium:** RSD  $\leq$  30 %

$$\frac{x_1}{x_2} < 1,43 ; x_1 \geq x_2$$

Tabelle 25 zeigt, dass die festgelegten Akzeptanzkriterien erfüllt wurden. Sowohl die RSD, als auch der Quotient aus den Mittelwerten der unterschiedlich alten

## ERGEBNISSE

---

Übernachtkulturen, lagen für beide Proben unter 30 %. Die Hefekultur kann somit problemlos für 17 Tage im Kühlschrank bei 4°C gelagert und für den Bioassay verwendet werden, ohne dass eine Beeinflussung der Analysenergebnisse auftritt.

### 4.2.3.3 Dauer der Färbereaktion

Die Dauer der Enzymreaktion die durch  $\beta$ -Galactosidase katalysiert wird und zur Rotfärbung des Mediums führt kann variieren, weshalb keine exakte Inkubationszeit festgelegt werden kann. Normalerweise erfolgt die Messung im Photometer wenn der höchste Standard eine Absorption von ca. 1,5 bei 550 nm aufweist. Im Zuge dieses Testes sollte überprüft werden ob variierende Inkubationszeiten der Färbelösung einen Einfluss auf die Testergebnisse haben können. Dazu wurden die in Kapitel 2.6 beschriebenen Proben untersucht. Die photometrische Messung erfolgte sobald eine deutliche Rotfärbung der Standardreihe erkennbar war. Nach einer Inkubationszeit von 30, 45, 60 und 100 Minuten wurden die Absorptionen der Proben im Photometer bei 550 nm bestimmt.

- Bestimmung der Androgenaktivität und der Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch zu jeder gemessenen Inkubationszeit

**Tabelle 26: Überprüfung des Einflusses der Färbereaktion auf die Analysenergebnisse im YAS:** Messung der Androgenaktivität der mit 1,8 nM und 2,4nM DHT dotierten Proben auf einer Mikrotiterplatte ab Beginn der Färbereaktion. Die rot markierten Werte entsprechen nicht den Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch

Inkubationszeit	BW+1,8 [nM AEQ]	BW+2,4 [nM AEQ]	R <sup>2</sup>	IF	Absorption [Standard:2,7nM]
30	2,36	3,02	0,99	2,1	1,20
45	2,21	2,85	0,95	2,4	1,41
60	2,22	2,83	0,96	3,1	1,75
100	2,24	2,81	0,94	4,1	2,33

**Akzeptanzkriterium:** Erfüllung der grundlegenden Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch zu jeder Inkubationszeit (siehe 3.6.2)

In Tabelle 26 sind die Androgenaktivitäten beider untersuchter Proben, die Kriterien für einen gültigen Versuch sowie die Absorptionen des höchsten Standards (2,7 nM) zusammengefasst. Daraus ist ersichtlich, dass die Kriterien für einen gültigen Versuch nur bei einer Inkubationszeit von 60 Minuten erfüllt waren. Nach 100 Minuten wurden die

## ERGEBNISSE

---

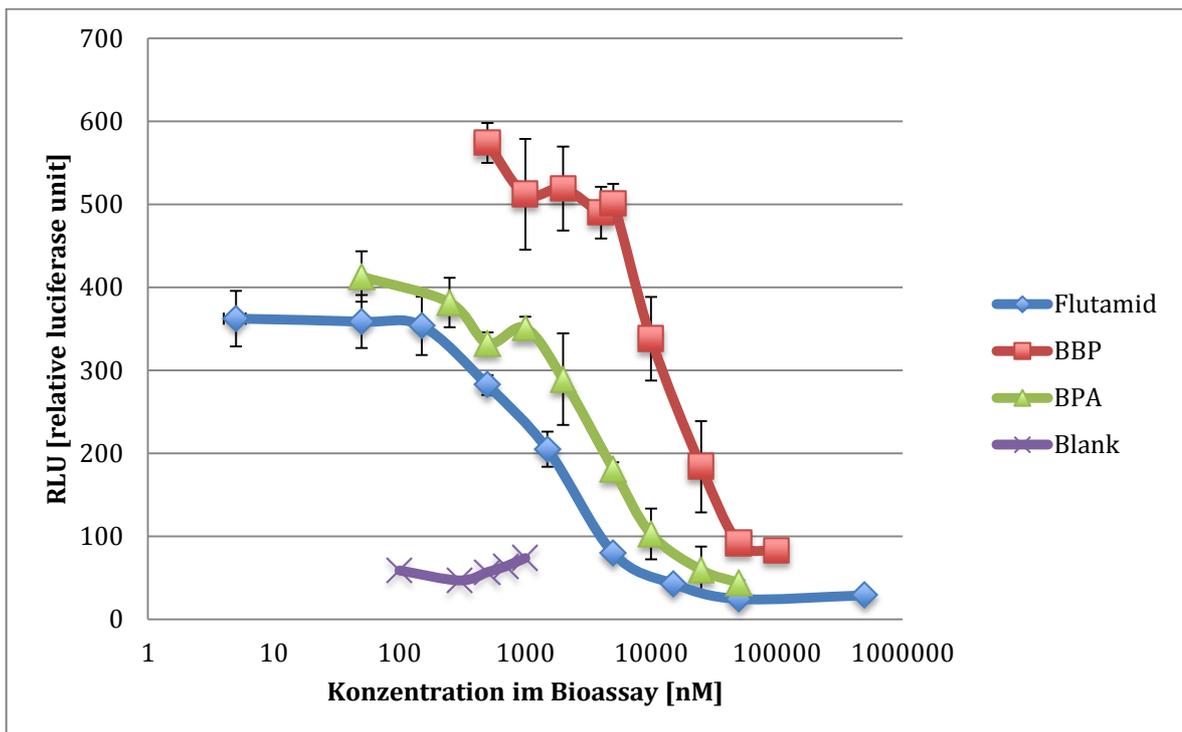
Kriterien zwar erfüllt, die Absorption des höchsten Standards lag aber bei 2,33. Die Absorption nimmt mit der Inkubationszeit stetig zu, dies kann dazu führen, dass man bei längeren Inkubationszeiten nicht mehr im linearen Bereich liegt. Deshalb sollten Platten mit einer Absorption über 2,0 nicht mehr für die Auswertung herangezogen werden. Nach einer Inkubationszeit von 45 Minuten lag der Induktionsfaktor knapp unter dem festgelegten Kriterium. Tabelle 26 zeigt jedoch, dass sich die Konzentrationen der beiden dotierten Proben zwischen 45 und 60 Minuten Inkubationszeit nicht mehr signifikant verändern und die Inkubationszeit deshalb keinen wesentlichen Einfluss auf die Ergebnisse hat.

### 4.3 Untersuchung von Reinsubstanzen

Zwei in Lebensmittelkontaktmaterialien vorkommende Xenohormone, BPA und BBP, die auch imstande sind den Androgenrezeptor zu blockieren und das in der Krebstherapie bei Prostatakarzinomen als Antiandrogen eingesetzte Flutamid, wurden in beiden Bioassays auf Antiandrogenaktivität untersucht. Dazu wurden unterschiedliche Konzentrationen der Reinsubstanzen in DMSO gelöst: BBP zwischen 100  $\mu\text{M}$  und 20 mM, BPA zwischen 10  $\mu\text{M}$  und 10 mM und Flutamid zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 100 mM. Dabei handelt es sich um die Konzentrationen im DMSO.

#### 4.3.1 AR-CALUX

Keine der getesteten Reinsubstanzen zeigte in den untersuchten Konzentrationsbereichen cytotoxische oder inhibierende Effekte. Die unterschiedlichen Verdünnungen jeder Substanz wurden mit je 500 pM DHT dotiert und nach ihrer Fähigkeit bewertet, den Response auf DHT zu inhibieren. Aus Abbildung 12 ist ersichtlich, dass alle drei Substanzen vor allem bei höheren Konzentrationen, den Response auf DHT inhibierten. Das Antiandrogen Flutamid zeigte dabei die stärkste Inhibierung. BPA, deren Kurve parallel zu Flutamid verlief, zeigte eine ähnliche antiandrogene Wirksamkeit wie Flutamid. BBP wies erst ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  im Medium stark inhibierende Effekte auf.

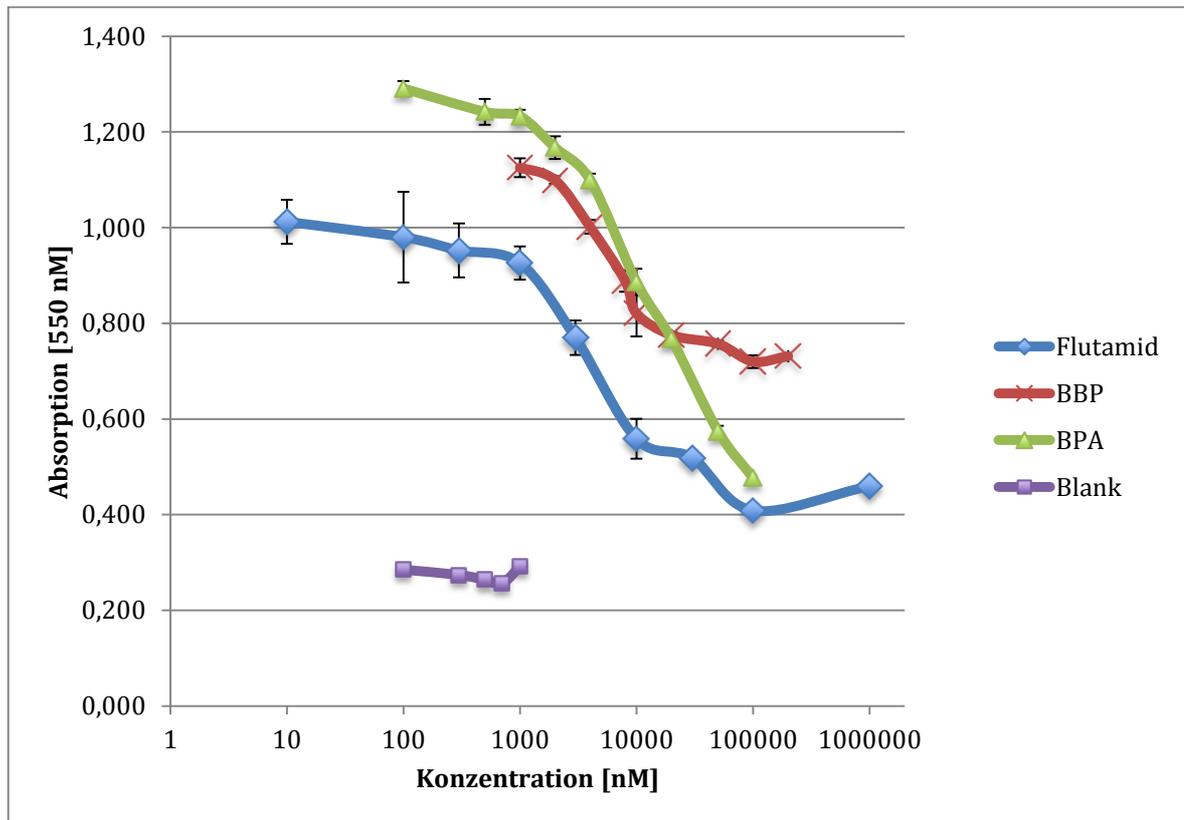


**Abbildung 12: Antiandrogenaktivität der verschiedenen Reinsubstanzen im AR-CALUX:** mit Ausnahme des Blanks (reines DMSO) wurden alle Substanzen mit DHT dotiert (500 pM). Die unterschiedlichen Verdünnungen der Reinsubstanzen wurden nach ihrer Fähigkeit den Response auf DHT zu inhibieren, bewertet. (Mittelwert aus Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken stellen die einfache Standardabweichung dar)

#### 4.3.2 YAS

Abbildung 13 zeigt die relative Enzymaktivität im YAS bei unterschiedlichen Verdünnungsstufen von drei hormonaktiven Substanzen und einem Lösemittelblindwert. Bei dem verwendeten Hefestamm von Routledge & Sumpter kam es auch bei höheren Konzentrationen der drei untersuchten Substanzen nicht zu wachstumsinhibierenden Effekten. Wie in Abbildung 13 ersichtlich, zeigte Flutamid auch im YAS die stärkste Inhibierung. BPA wies in einem Konzentrationsbereich von 1 µM bis 100 µM eine starke antiandrogene Wirkung auf, wohingegen die inhibierende Wirkung von BBP ab einer Konzentration von 20 µM abnahm.

## ERGEBNISSE



**Abbildung 13: Antiandrogenaktivität der verschiedenen Reinsubstanzen im YAS:** mit Ausnahme des Blanks (reines DMSO) wurden alle Substanzen mit DHT dotiert (2,4 nM). Die unterschiedlichen Verdünnungen der Reinsubstanzen wurden nach ihrer Fähigkeit den Response auf DHT zu inhibieren, bewertet. (Mittelwert aus Dreifachbestimmung, die Fehlerbalken stellen die einfache Standardabweichung dar)

#### 4.4 Getestete Proben im YAS und CALUX

Die im Zuge dieser Diplomarbeit validierten Bioassays, YAS und CALUX, wurden dazu verwendet, anhand 5 ausgewählter Proben die Belastung von Verpackungsmaterialien mit androgen- bzw. antiandrogen aktiven Substanzen zu bestimmen. Dazu wurden die DMSO-Extrakte der 5 Proben in beiden Bioassays analysiert und die Ergebnisse in Tabelle 27 dargestellt. Es wurde darauf geachtet, dass die wichtigsten in Lebensmittelverpackungen eingesetzten Materialien sowie unterschiedliche Verpackungstypen untersucht wurden. Bei den Proben 27b, 92 und 96 wurden, wie in Kapitel 3.1 erwähnt, 5 g der jeweiligen Probe eingewogen, mit entsprechendem Lebensmittelsimulant befüllt und migriert. Für die Migration der Probe 174 wurde eine Migrationskammer verwendet und bei Probe 177 wurde der Frischhaltebehälter direkt befüllt und mit dem dazugehörigen Deckel verschlossen. Alle Proben wurden mittels SPE aufkonzentriert und jeweils zwei unabhängige Migrate analysiert. Im Fall von inhibierenden Effekten wurden die Proben verdünnt, was zu einer höheren Nachweisgrenze führte. Für die Quantifizierung wurden die Ergebnisse jeder Probe mit einer DHT-standardgerade verglichen. Die Ergebnisse wurden als Androgenäquivalente angegeben. Für die Kategorisierung der Antiandrogenaktivität wurde die Wiederfindung der mit DHT (YAS: 2,4 nM, CALUX: 500 pM) dotierten Proben verwendet. „+“ wurde für Proben mit einer Wiederfindung von 45 - 60 %, „++“ für 30 - 45 % und „+++“ für eine Wiederfindung von 0 - 30 % verwendet. Bei allen untersuchten Proben konnten Matrix- bzw. inhibierende Effekte ausgeschlossen werden, was im Fall des YAS mittels Trübungsmessung bzw. beim CALUX durch mikroskopische Kontrolle der Zellen sichergestellt wurde.

**Tabelle 27: Androgen- und Antiandrogenaktivität der untersuchten DMSO-Migrate**

Probencode	YAS			CALUX		
	AEQ [ng/l]	LOD [ng AEQ/l]	Antiandrogen-Aktivität	AEQ [ng/l]	LOD [ng AEQ/l]	Antiandrogen-Aktivität
<b>PET27b</b>	<LOD	10	++	<LOD	2	-
<b>PP92</b>	<LOD	10	+++	<LOD	2	-
<b>PE96</b>	<LOD	141	-	<LOD	24	-
<b>PP177</b>	<LOD	144	-	<LOD	24	-
<b>GVK174</b>	<LOD	85	-	<LOD	15	-

In Abhängigkeit des Aufkonzentrierungsfaktors, der ausdrückt wie viel Lösungsmittel bei der SPE tatsächlich durch die Säule gewandert ist, der EtOH-Konzentration und in welche

## ERGEBNISSE

---

Menge DMSO die Probe eluiert wurde, ergaben sich für die Proben unterschiedliche Nachweisgrenzen.

Keine der untersuchten Proben zeigte eine Androgenaktivität im YAS oder AR-CALUX. Bei den Proben PE96, PP177 und GVK174 wurde in beiden Bioassays keine antiandrogene Wirkung analysiert. Für die restlichen zwei Proben wurde eine Antiandrogenaktivität, mit einer Wiederfindung im Bereich von 30 - 45 % für Probe PET27b und einer Wiederfindung von 0 – 30 % für Probe PP92 im YAS detektiert. Die Ergebnisse konnten durch den AR-CALUX nicht bestätigt werden.

### 5 Interpretation

Ziel der Diplomarbeit war die Validierung sowie der Vergleich von zwei in-vitro-Reporterassays, dem Yeast Androgen Screen, ein auf Hefezellen basierender Bioassay und dem AR-CALUX, welcher auf einer humanen Osteosarcoma Zelllinie (U2OS) basiert. Bei beiden Testsystemen handelt es sich um in-vitro Reporterassays. Um die Funktion der beiden Bioassays zu überprüfen wurden Verdünnungsreihen von zwei in Lebensmittelkontaktmaterialien vorkommenden Substanzen (BBP und BPA) und des klinischen Antiandrogens Flutamid untersucht. Zusätzlich wurde ein Screening von fünf beispielhaften Proben durchgeführt um zu testen, ob sich die Bioassays auch zur Untersuchung von unbekanntem Kunststoffproben eignen.

Durch die Validierung sollte überprüft werden, ob die beiden Bioassays dazu geeignet sind Lebensmittelkontaktmaterialien auf androgen aktive Substanzen zu untersuchen.

Für den Yeast Androgen Screen wurde der Stamm von Routledge & Sumpter verwendet, wobei es sich um einen rekombinanten Stamm der Hefe *S. cerevisiae* handelt. Für den AR-CALUX hingegen wurde die humane Knochenmarkzelllinie U2OS verwendet, die von BioDetection Systems (Netherlands) zur Verfügung gestellt wurde.

Da der CALUX, im Gegensatz zum YAS, eine höhere Sensitivität besitzt (Nachweisgrenze CALUX: 100 pM; YAS: 1,2 nM), wurde der Fokus der Validierung auf den CALUX gelegt, für den zahlreiche Robustheitstest durchgeführt wurden. Zur Vergleichbarkeit der beiden Bioassays wurde für den YAS eine Basisvalidierung durchgeführt.

Der AR-CALUX und auch der YAS sind relativ präzise Methoden. Sowohl für die Wiederfindung an einem Tag, als auch für die Reproduzierbarkeit über einen längeren Zeitraum konnten für beide Bioassays gute Werte erreicht werden.

Bei der Bestimmung der Wiederfindung im AR-CALUX zeigte sich, dass die Probenmatrix einen gravierenden Einfluss auf die Testergebnisse haben kann. Im Allgemeinen war zu beobachten, dass die Wiederfindungen einiger Proben im unteren Bereich des Akzeptanzkriteriums und somit nahe der Grenze zur Antiandrogenität lagen. Bei einigen der untersuchten Materialien wurden spezifische Inhibierungen festgestellt. Um einen Rückschluss zu ziehen, ob die Inhibierungen speziell durch die Materialien ausgelöst wurden, müsste eine größere Probenmenge untersucht werden. Mögliche Gründe für die geringe Wiederfindung könnten unter anderem eine Inhibierung der Färbereaktion oder der Reporterproduktion, wachstumsinhibierende oder cytotoxische Effekte der Probenmatrix oder eine Maskierung des Androgens durch Adsorption an Kunststoffpartikel sein.

## INTERPRETATION

---

Ebenso kann eine geringe Wiederfindung durch das Vorhandensein von sogenannten Androgen–Antagonisten erklärt werden. Diese können den Androgenrezeptor blockieren und somit agonistische Effekte maskieren. Diese Antagonisten führen im Laufe der routinemäßigen Untersuchung leicht zu falsch negativen Ergebnissen. Es muss daher zur Bestimmung der Androgenaktivität, jede einzelne Probe mit DHT dotiert werden um zu untersuchen, ob die Probenmatrix den Response auf Androgene unterdrückt.

Prinzipiell kann gesagt werden, dass beide Bioassays eine robuste, reproduzierbare und vergleichbar schnelle Methode darstellen, die einen hohen Probendurchsatz erlauben um Kunststoffmigrate auf androgen aktive Substanzen zu untersuchen.

Eine Liste von 50 potentiellen Endokrinen Disruptoren die für den Kontakt in Lebensmitteln in den USA und /oder der EU zugelassen sind, wurde von Muncke veröffentlicht (Muncke, 2009). Zwei darin enthaltene Substanzen, BPA und BBP, die in zahlreichen Studien auch als Anti-Androgen identifiziert wurden sowie Flutamid, wurden in beiden Bioassays untersucht. Alle drei Substanzen zeigten, vor allem mit zunehmender Konzentration eine antiandrogene Wirkung und unterdrückten den Response auf DHT. Flutamid zeigte in beiden Bioassays die stärkste Inhibierung. Daraus kann geschlossen werden, dass beide Bioassays in der Lage sind Endokrine Disruptoren die in Lebensmittelmigrierten vorkommen können, spezifisch zu detektieren.

Bei einem Screening von 5 ausgewählten Proben wurde die tatsächliche Belastung von Verpackungsmaterialien mit androgen- und antiandrogen aktiven Substanzen erfasst. Es wurden einige der wichtigsten in Lebensmittelverpackungen vorkommenden Materialien (PET, PP, PE, LDPE, und GVK) und unterschiedliche Verpackungstypen untersucht. Dabei ist zu beachten, dass die untersuchten Lebensmittelverpackungen unter „worst-case-Bedingungen“ migriert wurden, das bedeutet unter besonders harten Bedingungen die bei normalen, dem Lebensmittel gerechten Lagerungsbedingungen üblicherweise nicht anzutreffen wären.

Bei der Untersuchung der 5 Proben konnten weder im YAS noch im AR-CALUX Androgenagonisten detektiert werden. Bei zwei der fünf untersuchten Proben wurde im YAS eine antiandrogene Wirkung festgestellt, mit einer Wiederfindung im Bereich von 30 - 45 % für Probe PET27b und einer Wiederfindung von 0 – 30 % für Probe PP92. Bei den antiandrogenen Proben handelte es sich um ein Granulat und PET-flakes. Die Migration dieser Stoffe ist als kritischer Faktor anzusehen, da sie in zerkleinerter Form migriert werden was zu einem höheren Oberflächen/Volums-Verhältnis und somit zu schärferen Migrationsbedingungen führt. Die detektierten Inhibierungen waren jedoch in diesem Fall nicht auf die schärferen Migrationsbedingungen zurückzuführen. Bei der anschließenden Untersuchung der Proben im AR-CALUX zeigte sich, dass signifikante Unterschiede

## INTERPRETATION

---

zwischen den Ergebnissen der auf Hefe- und Humanzellen basierenden Bioassays beobachtet werden konnten. Die im YAS detektierten antagonistischen Effekte wurden durch den AR-CALUX nicht bestätigt. Dieses Resultat zeigt deutlich, dass die beobachtete Inhibierung der Hormonaktivität spezifisch für den auf Hefezellen basierenden YAS ist.

Obwohl beide der Gruppe der Eukaryoten angehören, weisen sie doch zahlreiche Unterschiede auf, welche die voneinander abweichenden Testergebnisse erklären könnten. Im Gegensatz zu den humanen Zellen besitzen Hefezellen eine Zellwand und einen ATP-bindenden Kassetten (ABC)-Transporter, welcher die intrazelluläre Akkumulation spezifischer Steroidhormone und Toxine vermindert. Ebenso bestehen zwischen Hefezellen und humanen Zellen phylogenetische Unterschiede in der Aktivierung des Zielgens und der Metabolisierung von Steroiden. Desweiteren enthalten Hefezellen keine Androgenrezeptoren, weshalb das Gen für den humanen Androgenrezeptor (hAR) fix in das Genom der Hefezelle integriert wird. All diese Unterschiede könnten die im YAS und CALUX variierenden Testergebnisse erklären (European Commission, 1998; Kralli & Yamamoto, 1996; Routledge & Sumpter, 1996).

Der YAS ist eine gute Methode um eine generelle Aussage über die Androgenaktivität einer Probe zu treffen. Seine Vorteile liegen vor allem in der einfachen Anwendbarkeit. Die Hefezellen zeigen eine schnelle Wachstumsrate und sind leicht zu kultivieren. Mit dieser Methode können schnell, in 24 Stunden, Ergebnisse gewonnen werden, während die meisten auf Humanzellen basierenden Bioassays oder in-vivo Studien deutlich mehr Zeit in Anspruch nehmen. Zusätzlich ist der YAS eine robuste Methode die reproduzierbare Ergebnisse liefert. Trotz all dieser Vorteile stellen die hefespezifischen Inhibierungen ein großes Problem bei der Anwendung des YAS dar. Sie können im Laufe der Untersuchungen zu falsch negativen Ergebnissen führen. Diese Inhibierungen sind nicht nur spezifisch für den YAS, sondern konnten auch bei der Untersuchung von östrogenaktiven Substanzen im YES (Yeast Estrogen Screen) beobachtet werden (Kirchnawy - persönliche Mitteilung; noch unpublizierte Ergebnisse). Aufgrund der häufig auftretenden Inhibierungen und um das Risiko von falsch negativen Ergebnissen zu minimieren, ist der YAS nicht für das Screening von Kunststoffproben geeignet.

Im Gegensatz dazu konnten bei der Durchführung des AR-CALUX keine Inhibierungen beobachtet werden. Zusätzlich besitzt der CALUX eine hohe Sensitivität und ist eine robuste und reproduzierbare Methode. Dadurch dass der CALUX auf einer humanen Zelllinie basiert, ist dieser folglich auch besser geeignet um auf Substanzen zu testen, die das menschliche Hormonsystem beeinflussen können.

## INTERPRETATION

---

Der AR-CALUX ist somit die Methode der Wahl für das Screening von Kunststoffproben auf Androgenagonisten und –antagonisten und kann aufgrund seiner einfachen Durchführung auch in der Routineanalytik eingesetzt werden.

## 6 Literaturverzeichnis

- Alavanja, M. C. R., Samanic, C., Dosemeci, M., Lubin, J., Tarone, R., Lynch, C. F., . . . Blair, A. (2003). Use of Agricultural Pesticides and Prostate Cancer Risk in the Agricultural Health Study Cohort. *American Journal of Epidemiology*, 157(9), 800-814. doi: 10.1093/aje/kwg040
- Bach, C., Dauchy, X., Chagnon, M.-C., & Etienne, S. (2012). Chemical compounds and toxicological assessments of drinking water stored in polyethylene terephthalate (PET) bottles: A source of controversy reviewed. *Water Research*, 46(3), 571-583. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2011.11.062>
- Bayrisches Landesamt für Umwelt. (2005). *Umweltchemikalien mit hormoneller Wirkung*. Augsburg: Bayrisches Landesamt für Umwelt.
- BDS Netherlands. (2009). Reporter gene bioassays for detection of very low levels of compounds. *Food for Thought*(2).
- Beck, I.-C. (2006). *Estrogene in Küstengewässern – Untersuchungen in der Ostsee mittels chemischer Analytik und einem in vitro-Biotest*. Universität Lüneburg.
- Birnbaum, L. S. (2013). *State of the Science of Endocrine Disruptors*. Research Triangle Park, North Carolina.
- Bundesamt für Gesundheit. (2012). *Hormonaktive Chemikalien*. Bern.
- Bundesamt für Gesundheit BAG. (2012). *Factsheet Phthalate*. Bern.
- Burger, A., & Wachter, H. (2001). *Hunnius-Pharmazeutisches Wörterbuch* (8Edition ed.). Berlin: Walter de Gruyter.
- Carlsen, E., Giwercman, A., Keiding, N., & Skakkebaek, N. E. (1992). Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. *Brit.Med.J.*, 305(6854), 609-613.
- Chatterjee, B. (2003). The role of the androgen receptor in the development of prostatic hyperplasia and prostate cancer. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253(1-2), 89-101. doi: 10.1023/a:1026057402945
- EFSA. (2013a). Bisphenol A Retrieved 24.05.2013, from <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/bisphenol.htm>
- EFSA. (2013b). Lebensmittelkontaktmaterialien Retrieved 27.05.2013, from <http://www.efsa.europa.eu/de/topics/topic/foodcontactmaterials.htm>
- EFSA Scientific Committee. (2013). *Scientific Opinion on the hazard assessment of endocrine disruptors: Scientific criteria for identification of endocrine disruptors and appropriateness of existing test methods for assessing effects mediated by these substances on human health and the environment*. Parma, Italy: European Food Safety Authority (EFSA).
- European Commission. (1998). Final Report. *Chapter 5: Screening and Testing* Retrieved 21.2, 2013, from <http://www.epa.gov/endo/pubs/edstac/chap5v14.pdf>

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- European Parliament. (2012). *DRAFT REPORT on the protection of public health from endocrine disruptors*: Committee on the Environment, Public Health and Food Safety.
- Frye, C., Bo, E., Calamandrei, G., Calzà, L., Dessì-Fulgheri, F., Fernández, M., . . . Panzica, G. C. (2012). Endocrine Disruptors: A Review of Some Sources, Effects, and Mechanisms of Actions on Behaviour and Neuroendocrine Systems. *Journal of Neuroendocrinology*, 24(1), 144-159. doi: 10.1111/j.1365-2826.2011.02229.x
- Funk, W., Dammann, V., & Donnevert, G. (2005). *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie* (2 ed.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Guart, A., Bono-Blay, F., Borrell, A., & Lacorte, S. (2011). Migration of plasticizersphthalates, bisphenol A and alkylphenols from plastic containers and evaluation of risk. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 28(5), 676-685. doi: 10.1080/19440049.2011.555845
- Hartl, C. (2013). *Etablierung des Yeast Androgen Screens zur Bestimmung endokriner Disruptoren in Lebensmittelkontaktmaterialien*. (Diplomarbeit), Universität der Bodenkultur, Wien.
- Hausensteiner, H. (2012). *Validierung einer Methode zur Bestimmung östrogenaktiver Substanzen in Lebensmittelkontaktmaterialien mittels Yeast Estrogen Screen*. (Diplomarbeit), Universität für Bodenkultur, Wien.
- Jaussi, R., & Christen, P. (2005). *Biochemie*. Berlin Heidelberg: Springer.
- Karlson, P. (1988). *Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Mediziner und Naturwissenschaftler* (13 ed.). Stuttgart: Thieme.
- Kelce, W. R., Lambright, C. R., Gray Jr, L. E., & Roberts, K. P. (1997). Vinclozolin and p,p'-DDE Alter Androgen-Dependent Gene Expression: In Vivo Confirmation of an Androgen Receptor-Mediated Mechanism. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 142(1), 192-200. doi: <http://dx.doi.org/10.1006/taap.1996.7966>
- Kolle, S. N., Melching-Kollmuss, S., Krennrich, G., Landsiedel, R., & van Ravenzwaay, B. (2011). Assessment of combinations of antiandrogenic compounds vinclozolin and flutamide in a yeast based reporter assay. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 60(3), 373-380. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2011.05.005>
- Koolman, J., & Röhm, K.-H. (2003). *Taschenatlas der Biochemie* (3 ed.). Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
- Kortenkamp, A. M., Olweën; Faust, Michael; Evans, Richard; McKinlay, Rebecca; Orton, Frances; Rosivatz, Erika. (2011). State of the art assessment of endocrine disruptors *European Commission*.
- Kralli, A., & Yamamoto, K. R. (1996). An FK506-sensitive Transporter Selectively Decreases Intracellular Levels and Potency of Steroid Hormones. *Journal of Biological Chemistry*, 271(29), 17152-17156. doi: 10.1074/jbc.271.29.17152
- Kromidas, S. (1999). *Validierung in der Analytik*. Weinheim: WILEY-VCH.

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- Luccio-Camelo, D. C., & Prins, G. S. Disruption of androgen receptor signaling in males by environmental chemicals. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, In Press, Corrected Proof*. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.04.004
- Matsumoto, T., Shiina, H., Kawano, H., Sato, T., & Kato, S. (2008). Androgen receptor functions in male and female physiology. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 109(3–5), 236-241. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jsbmb.2008.03.023>
- Muncke, J. (2009). Exposure to endocrine disrupting compounds via the food chain: Is packaging a relevant source? *Science of The Total Environment*, 407(16), 4549-4559. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.05.006
- Muncke, J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and other substances of concern in food contact materials: An updated review of exposure, effect and risk assessment. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 127(1-2), 118-127. doi: 10.1016/j.jsbmb.2010.10.004
- Plotan, M., Frizzell, C., Robinson, V., Elliott, C. T., & Connolly, L. (2012). Endocrine disruptor activity in bottled mineral and flavoured water. *Food Chemistry*, 136(3-4), 1590-1596. doi: 10.1016/j.
- Rostkowski, P., Horwood, J., Shears, J. A., Lange, A., Oladapo, F. O., Besselink, H. T., . . . Hill, E. M. (2011). Bioassay-Directed Identification of Novel Antiandrogenic Compounds in Bile of Fish Exposed to Wastewater Effluents. *Environmental Science & Technology*, 45(24), 10660-10667. doi: 10.1021/es202966c
- Routledge, E. J., & Sumpter, J. P. (1996). Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(3), 241-248. doi: 10.1897/1551-5028(1996)015<0241:EAOSAS>2.3.CO;2
- Schleich, S. (2005). *Nichtsteroidale Antiandrogene natürlichen und synthetischen Ursprungs zur Behandlung des Prostatakarzinoms*. Marburg/Lahn: Dissertation der Universität Marburg.
- Schultis, T., & Metzger, J. W. (2004). Determination of estrogenic activity by LYES-assay (yeast estrogen screen-assay assisted by enzymatic digestion with lyticase). *Chemosphere*, 57(11), 1649-1655.
- Skakkebaek, N. E., Rajpert-De Meyts, E., & Main, K. M. (2001). Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects: Opinion. *Human Reproduction*, 16(5), 972-978. doi: 10.1093/humrep/16.5.972
- Sohoni, P., & Sumpter, J. (1998). Several environmental oestrogens are also anti-androgens. *J Endocrinol*, 158(3), 327-339. doi: 10.1677/joe.0.1580327
- Sonnenschein, C., & Soto, A. M. (1998). An updated review of environmental estrogen and androgen mimics and antagonists. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 65(1-6), 143-150. doi: 10.1016/s0960-0760(98)00027-2
- Sonneveld, E., Jansen, H. J., Man, S., Jonas, A. J. G., Brouwer, A., & van der Burg, B. (2005). Comparison of in vitro and in vivo screening models for androgenic and

## LITERATURVERZEICHNIS

---

- estrogenic activities. *Toxicological Sciences*, 89(1), 173-187. doi: 10.1093/toxsci/kfj009
- Sonneveld, E., Jansen, H. J., Riteco, J. A., Brouwer, A., & van der Burg, B. (2004). Development of androgen- and estrogen-responsive bioassays, members of a panel of human cell line-based highly selective steroid-responsive bioassays. *Toxicol Appl Pharmacol.*, 143(1), 205-212. doi: 10.1093/toxsci/kfi005
- Stryer, L. (1987). *Biochemie* (4 ed.). Braunschweig: Vieweg.
- Suzuki, G., Tue, N. M., van der Linden, S., Brouwer, A., van der Burg, B., van Velzen, M., . . . Tanabe, S. (2011). Identification of Major Dioxin-Like Compounds and Androgen Receptor Antagonist in Acid-Treated Tissue Extracts of High Trophic-Level Animals. *Environmental Science & Technology*, 45(23), 10203-10211. doi: 10.1021/es2024274
- Tacker, M. (2011). Hormonaktive Inhaltsstoffe in Lebensmitteln und Verpackungen.
- Talsness, C. E., Andrade, A. J. M., Kuriyama, S. N., Taylor, J. A., & vom Saal, F. S. (2009). Components of plastic: experimental studies in animals and relevance for human health. *Phil. Trans. R. Soc. B* 364(1526), 2079-2096. doi: 10.1098/rstb.2008.0281
- van der Burg, B., van der Linden, S., Man, H.-y., Winter, R., Jonker, L., van Vugt-Lussenburg, B., & Brouwer, A. (2013). A Panel of Quantitative Calux® Reporter Gene Assays for Reliable High-Throughput Toxicity Screening of Chemicals and Complex Mixtures *High-Throughput Screening Methods in Toxicity Testing* (pp. 519-532): John Wiley & Sons, Inc.
- van der Burg, B., Winter, R., Man, H.-y., Vangenechten, C., Berckmans, P., Weimer, M., . . . van der Linden, S. (2010). Optimization and prevalidation of the in vitro AR CALUX method to test androgenic and antiandrogenic activity of compounds. *Reproductive Toxicology*, 30(1), 18-24. doi: 10.1016/j.reprotox.2010.04.012
- Verband der chemischen Industrie e.V. (2012). *VCI overview on "endocrine active substances"*. Frankfurt.
- Wagner, M., & Oehlmann, J. (2011). Anwendung von Biotests zur Charakterisierung der Expositionspfade für Umwelthormone aus Kunststoffen. *Umweltbundesamt*, 84.
- Weybridge. (2012). The impacts of endocrine disrupters on wildlife, people and their environments.
- WHO IPCS. (2002). *Global Assessment of the State-of-the-Science of Endocrine Disrupters*. Geneva, Switzerland.
- Zitz, U., & Strobl, M. (2006). *Vorlesungsunterlagen – Qualitätsmanagement Übungen, Validierungs Übersicht VA-Val01, Version 27.09.06*. Universität für Bodenkultur, Wien.