



universität
wien

MASTERARBEIT

Titel der Masterarbeit

„Thyrogene Disruptoren in Verpackungsmaterialien

Validierung eines in-vitro-Reporterassays zur
Detektion von thyrogenen Disruptoren in
Lebensmittelsimulanzlösungen“

verfasst von

Susanne Melanie Greiner, Bakk. rer. nat.

angestrebter akademischer Grad

Master of Science (MSc)

Wien, 2015

Studienkennzahl lt. Studienblatt:

A 066 838

Studienrichtung lt. Studienblatt:

Ernährungswissenschaften

Betreut von:

Univ.-Doz. Dr. Manfred Tacker

DANKSAGUNG

An dieser Stelle bedanke ich mich herzlich bei allen, die mich bei der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zuerst bedanke ich mich bei Herrn Univ.Doz. Manfred Tacker, der mich durch seine Vorlesung auf den "Geschmack" brachte, mich mit dem Thema Verpackungsmaterialien intensiver auseinander zu setzen. Für die Betreuung und die Begutachtung dieser Masterarbeit bin ich sehr dankbar.

Herrn DI Christian Kirchnawy danke ich für die schnellen Rückmeldungen meiner E-Mails und die wertvollen Beantwortungen meiner Fragen. Die Zusammenarbeit in der Arbeitsgruppe Xenohormone mit DI Johannes Mertl, DI Alexander Richter und DI Angelika Grininger war von großer Hilfsbereitschaft geprägt.

Für die freundliche Zusammenarbeit mit den genannten Personen und dem gesamten Team des OFI bedanke ich mich.

Bei Herrn Univ.Prof. Karl-Heinz Wagner und seinem Team bedanke ich mich herzlich für die Hilfestellung zum Erwerb des Erasmusstipendiums an der ULPGC in Spanien. Ich habe das Auslandsjahr als wegweisend und prägend für meine wissenschaftlichen Interessen erlebt.

Zusammenfassung

In Lebensmittelverpackungen konnten endokrin wirksame Substanzen, sogenannte Xenohormone, nachgewiesen werden. Unter bestimmten Bedingungen (Lagerdauer, Lagertemperatur, Art des Lebensmittels) können diese von der Verpackung ins Lebensmittel migrieren und werden in weiterer Folge vom Konsumenten aufgenommen. Xenohormone sind natürlichen Hormonen in ihrer chemischen Struktur ähnlich und werden weltweit als Störfaktoren der gesunden Hormonhomöostase diskutiert.

Schilddrüsenhormone beeinflussen nahezu alle Stoffwechselprozesse im Körper und steuern die vorgeburtliche Gehirnentwicklung und -reifung. Besonders empfindlich auf Veränderungen der Hormonhomöostase sind neurologische Differenzierungsvorgänge während der Schwangerschaft. Thyroid aktive Substanzen stehen im Verdacht die kognitive Lernfähigkeit von Kindern herab zu setzen.

Das Ziel dieser Masterarbeit war die Detektion von thyroid- bzw antithyroidaktiven Substanzen in Lebensmittelmigraten mittels eines in-vitro-Reporterassays, sowie dessen Validierung für die routinemäßige Untersuchung von Lebensmittelmigraten auf thyroide bzw antithyroide Aktivitäten. Im Zuge von Migrationsversuchen (EU VO 10/2011) wurden Lebensmittelverpackungsmaterialien mit Simulanzlösungen befüllt und vorgegebenen Lagerverhältnissen ausgesetzt. Die Migrante wurden im Anschluss mit einer Festphasenextraktion aufkonzentriert. Diese Extrakte wurden mit dem auf der humanen Zelllinie H2OS basierenden TR-CALUX-Bioassay untersucht.

Das Screening von 29 beispielhaften Proben mit dem Reporterassay TR-CALUX ergab keine positiven Ergebnisse. Die Überprüfung von 12 Reinsubstanzen lieferte ebenso keine Hinweise auf thyroide bzw antithyroide Aktivitäten. Bei zwei Reinsubstanzen kam es zu falsch positiven Ergebnissen, welche nur durch die gleichzeitige Verwendung von Cytotox-Platten als falsch positiv bestätigt werden konnten.

Abstract

Hormone-active substances, also called Xenohormones, were detected in food packages. Under specific conditions (storage period, storage temperature, and type of food) these substances can migrate out of the packaging into the food. That makes food a possible source of Xenohormones for customers.

Xenohormones are similar to endogen hormones in their chemical structure. All over the world Xenohormones are discussed as a disrupting factor for the physiological hormone-homoestasis.

Thyroid hormones regulate almost all metabolic processes in the organism and have an important role in the brain development and brain function. They are a key factor in differentiation processes and are of high importance for the brain development during pregnancy in neonates. Particularly sensitive for changes of the hormone-homoestasis is the neurological development during pregnancy. Xenohormones are suspected to reduce the cognitive learning ability in children.

The aim of this master thesis is to detect thyroid active substances in food simulation solutions using an in-vitro-reporterassay, as well as the validation of the bioassay for routine analyses examining food simulation solutions for their thyroid active potential.

In the course of migration trials (EU VO 10/2011), food packagings were filled with simulation solutions and stored under specific conditions. Those food migrates were concentrated with a solid phase extraction. Subsequently this extracts were tested with the TR-CALUX-Bioassay using the human based cell line H2O2.

The screening of 29 exemplified samples with the TR-CALUX-Bioassay did not show any positive results. The examination of 12 chemical pure substances neither showed thyroid activity. In two of the pure substances the results were false-positive, which could be determined by using Cytotox-plaques.

Inhaltsverzeichnis

ABBILDUNGSVERZEICHNIS.....	IV
TABELLENVERZEICHNIS.....	V
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	VI
1 EINLEITUNG UND FRAGESTELLUNG.....	1
2 LITERATURÜBERSICHT.....	3
2.1 Gesundheitsrisiko.....	3
2.1.1 Die Wirkungsperiode endokriner Disruptoren.....	3
2.2 Kunststoffverpackungen.....	4
2.3 Hormone.....	6
2.3.1 Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel.....	6
2.3.1.1 Synthese von Schilddrüsenhormonen.....	6
2.3.1.2 Blutkreislauf.....	8
2.3.2 Jod.....	9
2.3.3 Wirkungsorte.....	9
2.3.4 Zelluläre Wirkungen.....	11
2.4 Der Regelkreis der Schilddrüsenhormone.....	11
2.4.1 Signaltransduktion.....	13
2.4.2 Schilddrüsenhormon-Rezeptoren.....	13
2.5 Endokrin aktive Substanzen.....	16
2.5.1 Endokrine Disruptoren.....	16
2.6 Wirkungsweise endokriner Disruptoren.....	17
2.6.1 Beispiel PCB.....	17
2.6.2 Verstärkung von Zellsignalen.....	18
2.6.3 Proteosom Modulierung.....	18
2.7 Thyrogene Disruptoren.....	18
2.7.1 Schilddrüsenhormon-Synthese.....	20
2.7.2 Transportproteine.....	20
2.7.3 Mechanismen der zellulären Aufnahme.....	20

2.7.4	Hormonrezeptoren und Genexpression.....	20
2.7.5	Verstoffwechslung der Schilddrüsenhormone.....	21
2.8	Beispiele für thyrogene Disruptoren.....	21
2.8.1	Polychlorierte Biphenyle.....	22
2.8.2	Tetrabromobisphenol A.....	23
2.8.3	Bisphenol A.....	24
2.9	CALUX-Bioassay	25
2.9.1	Response Element.....	25
2.10	Validierung.....	26
2.10.1	Validierungsparameter.....	27
3.	MATERIAL UND METHODEN.....	29
3.1	Materialien und Geräte.....	29
3.2	Chemikalien.....	30
3.3	Medien.....	32
3.3.1	Rotes Medium (mit ungestripptem FCS).....	32
3.3.2	Weißes Medium (mit DCC-FCS).....	32
3.3.3	Dextran coated charcoal behandeltes Fetal Calf Serum (DCC-FCS).....	32
3.4	Standardreihen.....	34
3.4.1	T ₃ -Standardreihe	34
3.4.1.1	EC ₅₀ -Bestimmung.....	34
3.4.2	Herstellung der mit T ₃ dotieren Standards.....	36
3.4.3	Herstellung der Spikelösung für den Test auf antagonistische Effekte.....	36
3.5	Verwendete Proben.....	37
3.6	Reinsubstanzen.....	38
3.7	Durchführung.....	39
3.7.1	Migrationslösungen.....	39
3.7.2	Migrationslagerung.....	40
3.7.3	Aufkonzentrierung.....	41
3.7.3.1	Probenvorbereitung.....	41
3.7.3.2	Vorbereitung der Anlage.....	41

3.7.3.3 Aufkonzentrierung.....	41
3.8 CALUX-Bioassay.....	43
3.8.1 Kultivierung und Passage der Zellen.....	43
3.8.2 Durchführung.....	45
3.8.3 Test auf inhibierende Effekte.....	48
3.9 Validierungsbericht.....	48
3.9.1 Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch.....	49
4. ERGEBNISSE UND DISKUSSION.....	53
4.1 Validierung.....	53
4.1.1 Tests auf Unsicherheit des Analyseresultates.....	53
4.1.1.1 Wiederfindung.....	53
4.1.1.2 Wiederholbarkeit.....	54
4.1.1.3 Reproduzierbarkeit.....	55
4.1.2 Robustheit.....	56
4.1.2.1 Personenbezogener Einfluss.....	56
4.1.2.2 Einfluss der Cryovialcharge.....	57
4.1.2.3 Anwachsdauer der CALUX-Zellen auf der 96-Well-Platte.....	57
4.1.2.4 Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Substanzlösungen.....	58
4.1.2.5 Dauer der Zellen ohne Medium.....	59
4.1.2.6 Dauer der Färbereaktion in der durchsichtigen 96-Well-Platte.....	59
4.1.2.7 Mischen der Zellsuspension mit der Färbelösung.....	60
4.1.2.8 Dauer der Färbereaktion in der weißen 96-Well-Platte.....	61
4.2 Reinsubstanzen.....	61
4.2.1 Negative Ergebnisse.....	61
4.2.2 Falsch positive Ergebnisse.....	62
4.2.3 Kontamination und Zelltoxizität.....	63
4.3 Proben.....	64
5 SCHLUSSBETRACHTUNG.....	65
LITERATURVERZEICHNIS.....	70
LEBENS LAUF.....	76

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Lage der Schilddrüse (Jameda, 2014).....	6
Abbildung 2: Transport von Jod von der Kapillare über die Thyreozyten in die Schilddrüse (Cohen-Lehman et al., 2010).....	7
Abbildung 3: Kopplungsreaktion bei der T ₃ - und T ₄ -Biosynthese (Löffler,2004).....	8
Abbildung 4: Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel (Hagemann 2014).....	9
Abbildung 5: Wirkungsorte (Schmid, 2014).....	11
Abbildung 6: Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone wird über den thyreotropen Regelkreis reguliert (Kluthe,2006).....	12
Abbildung 7: Der Mechanismus der Schilddrüsenhormon-Rezeptorwirkung (Jameson und Weetman, 2012).....	15
Abbildung 8: Mögliche Wirkungsorte thyrogener Disruptoren in der Hypothalamus-Hypophyse-Schilddrüsen-Achse (Boas et al., 2013)....	19
Abbildung 9: Strukturformel PCB (Hopley et al., 2005).....	22
Abbildung 10: Strukturformel TBBA und BPA (adaptiert nach Kitamura et al., 2005).....	24
Abbildung 11: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des TR-CALUX (adaptiert nach BDS Netherlands, 2009).....	26
Abbildung 12: Linearität der Standardreihe der Mikrotiterplatte " TR-CALUX Reinsubstanz ED8" vom 27.9.2013.....	49
Abbildung 13: Bestimmungs- und Nachweisgrenze in Platte "TR-CALUX Reinsubstanz ED8"	50
Abbildung 14: Falsch positive Ergebnisse.....	63
Abbildung 15: Mittelwerte der RLU von TR- und ATR-CALUX der Reinsubstanz tOp.....	64

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Wirkung verschiedener Substanzklassen an unterschiedlichen physiologischen Eckpunkten (adaptiert nach Boas et al., 2013)...	21
Tabelle 2:	Geräte für CALUX-Bioassay.....	29
Tabelle 3:	Geräte für die Probenvorbereitung.....	30
Tabelle 4:	Chemikalien für CALUX-Bioassay.....	30
Tabelle 5:	Chemikalien zur Probenvorbereitung.....	31
Tabelle 6:	Herstellung der Standardlösungen.....	35
Tabelle 7:	Standards B-H mit 0,5% im DMSO.....	35
Tabelle 8:	Herstellung von 1 mL Spikelösung.....	36
Tabelle 9:	Spikemedium im Well.....	36
Tabelle 10:	Proben aus Getränkeverbundkartons.....	37
Tabelle 11:	Verpackungsproben aus PP, PS und PET Materialien.....	37
Tabelle 12:	Dosen und Folie.....	38
Tabelle 13:	Verwendete Reinsubstanzen.....	38
Tabelle 14:	Liste der Lebensmittelsimulanzien und Kontaktbedingungen.....	39
Tabelle 15:	Auftragsschema der Standard- und Probenlösungen auf die Mikrotiterplatte.....	47
Tabelle 16:	8 Reinsubstanzen mit unauffälligen Analyseergebnissen.....	62
Tabelle 17:	Reinsubstanzen, welche die Leuchtreaktion bei der Messung verhinderten.....	62
Tabelle 18:	Reinsubstanzen mit Kontamination/Zelltoxizität.....	63

Abkürzungsverzeichnis

ACN	Acetonitril
BPA	Bisphenol A
CALUX	Chemically Activated LUCiferase eXpression
CoA	Co-Aktivatoren
CoR	Co-Repressor-Proteine
DCC-FCS	Dextran Coated Charcoal Fetal Calf Serum
DJT	Dijotyrosin
DNA	Deoxyribonucleic acid
GVK	Getränkeverbundkarton
IF	Induktionsfaktor
LOQ	Limit of Quantitation
LOD	Limit of Detection
MJT	Monojodtyrosin
MW	Mittelwert
NIS	Natrium-Jodid-Symporter
PCB	Polychlorierte Biphenyle
PET	Polyethylenterephthalat
POP	Persistente organische Schadstoffe
PP	Polypropylen
PS	Polystyrol
RSD	Relative Standardabweichung
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SPE	Solid-Phase-Extraction
STABW	Standardabweichung
TBBPA	Tetrabromobisphenol A
TG	Thyreoglobulin
TPO	Thyreoidale Peroxidase
TR	Thyroidrezeptor
TRE	Trijodthyroinin Responsive Elements

TRH	Thyreotropin Releasing Hormon
TSH	Thyreoidea-stimulierendes Hormon
T ₃	Trijodthyronin
T ₄	Thyroxin
ZNS	Zentrales Nervensystem

1 Einleitung und Fragestellung

Seit mehr als 10 Jahren wird in der Wissenschaft intensiv über chemischen Substanzen diskutiert, welche hormonelle Regelsysteme im menschlichen Körper beeinflussen. Diese sogenannten endokrinen Disruptoren können die biologische Aktivität von endogenen Hormonen imitieren, hemmen oder stimulieren. In den Hormonlinien der Androgene sowie der Östrogene wurden bereits vielzählige Studien durchgeführt und einige Substanzen als androgen- bzw östrogenaktiv detektiert (Ghisari & Bonefeld-Jorgensen 2005).

Weitaus weniger intensiv erforscht wurde die Wirkungsweise endokriner Disruptoren auf das Schilddrüsenhormonsystem. Chemische Substanzen, welche mit den Sexualhormonen interagieren, stehen im Verdacht auch mit dem Schilddrüsenhormonsystem interferieren zu können (Bernal et al., 2003)

Die biologische Wirkung der Schilddrüsenhormone wird hauptsächlich über die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren mediiert. Schilddrüsenhormon-Rezeptoren gehören zu der Gruppe der Zellkernrezeptoren, welche an Schilddrüsenhormon Response Elements in der Promoterregion der Zielgene binden (Zhang & Lazar, 2000).

Unbeantwortet ist, an welchen Wirkungsorten endokrine Disruptoren in den Schilddrüsenregelkreis eingreifen können. Mit dem Reporterassay TR-CALUX wurden im Zuge dieser Masterarbeit unterschiedliche Lebensmittelmigrante sowie Reinstoffe auf thyroide Aktivität getestet.

Schilddrüsenhormone regulieren eine große Anzahl von biologischen Prozessen im Körper und sind essentiell für das neuronale Zellwachstum und die Entwicklung des Gehirns (Porterfield, 2000).

Klinische und experimentelle Studien haben bewiesen, dass die Konzentration der mütterlichen Schilddrüsenhormone essentiell für die Gehirnentwicklung im Fötus ist, besonders bevor dieser seine eigenen Schilddrüsenhormone produziert (Ghisari & Bonefeld-Jorgensen, 2005).

Thyrogene Disruptoren sind potentielle Einflussfaktoren in die physiologische Hormonhomöostase, wodurch die frühgeburtliche Hirnentwicklung gestört wird und in weiterer Folge bei Kindern kognitive Defekte hervorgerufen werden können (Porterfield, 2000; Zoeller et al. 2002).

2 Literaturübersicht

2.1 Gesundheitsrisiko

In den letzten Jahren haben endokrine Krankheiten und Störungen bei Menschen zugenommen. Ob diese Tendenzen alleine auf endokrinen Disruptoren zurück zu führen sind oder ob auch andere Faktoren, wie Änderungen im Lebenswandel oder genetische Hintergründe mit den wachsenden Zahlen an endokrinen Krankheiten Zusammenhang stehen, ist nicht eindeutig. Das Risiko einer schädlichen Wirkung durch die Exposition mit endokrinen Disruptoren ist in verschiedenen Lebensabschnitten unterschiedlich hoch. In Entwicklungsphasen wie Empfängnis, Schwangerschaft, Säuglingsalter, Kindheit und Pubertät reagiert der Körper jedoch empfindsamer auf hormonelle Aktivitäten (EFSA, 2013).

Schilddrüsenhormone spielen eine bedeutende Rolle für die Gehirnentwicklung und Gehirnfunktion. Es wird vermutet, dass von Schilddrüsenhormonen regulierte Gene ebenfalls im Gehirn lokalisiert sind. Diese Gene sind unter anderem für die Bildung der Myelinschicht verantwortlich. Myelin ist eine Biomembran die Nervenzellen umgibt und eine schnelle Erregungsleitung ermöglicht. Weiteres beeinflussen diese Gene auch die Differenzierung, die Signalgebung und die Einbettung der Nervenzellen in Zellverbände. Ein Einfluss von endokrinen Disruptoren auf das Schilddrüsenhormonsystem, vor allem während der Schwangerschaft und der vorgeburtlichen Entwicklung, kann die menschliche Gesundheit gefährden (Bernal, 2005).

2.1.1 Die Wirkungsperiode endokriner Disruptoren

Erst seit den 40er Jahren werden synthetische Chemikalien in großen Mengen eingesetzt und Umweltchemikalien sowie deren Abbauprodukte in die Umwelt abgegeben. Die ersten Generationen, welche während der Embryonalentwicklung

bestimmten Umweltchemikalien ausgesetzt waren, wurden in den 60er und 70er Jahren geboren und erreichten in den 80er bis 90er Jahre das fortpflanzungsfähige Alter. Die Datenlage für die Effekte von endokrinen Disruptoren, insbesondere der thyrogenen Disruptoren, auf den Menschen ist dementsprechend gering. Anfang der 80er Jahre wurde die Auswirkung von polychlorierten Biphenolen (PCBs) auf den Menschen in den USA untersucht. Es konnte erstmals nachgewiesen werden, dass PCBs bei einer Exposition während der vorgeburtlichen Entwicklung einen Langzeit-Effekt auf die intellektuellen Fähigkeiten bei Schulkindern hat. Besonders die mündliche Ausdrucksfähigkeit und die Aufmerksamkeit zeigten bei Schulkindern deutliche Defizite, sodass mit PCBs belastete Schulkinder im Vergleich zu unbelasteten bei einigen Tests zwischen sechs und zwölf Monaten mit ihrer Entwicklung zurücklagen. Verantwortlich für diesen Effekt war die Störwirkung von PCBs auf Schilddrüsenhormone und somit auf die Hirnreifung (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, 2001).

2.2 Kunststoffverpackungen

Lebensmittelverpackungen können ebenfalls, neben der Exposition aus der Umwelt, Quelle für Aufnahme hormonaktiver Substanzen sein. Die Hauptaufnahme von Xenohormonen erfolgt durch Lebensmittel die mit Pestiziden, Dioxinen, Schwermetallen oder migrierten Inhaltsstoffen von Lebensmittelkontaktmaterialien kontaminiert sind. Endokrine Disruptoren kommen vor allem in Verpackungen aus Papier, Kunststoff, Metall und Metallverbunden vor (Tacker, 2011).

Als Xenohormone bezeichnet man Chemikalien die wie Hormone wirken können und dadurch in der Lage sind die natürliche Funktion des Hormonsystems zu beeinträchtigen (Kirchnawy, 2010).

Als besonders problematisch werden die verschiedenen Zusatzstoffe angesehen, die den Kunststoffen zugesetzt werden. Diese Kunststoff-Additive ändern die

Eigenschaften der Kunststoffe und entsprechen somit besser ihren Anforderungen (Bundesinstitut für Risikoforschung, 2013).

Sie dienen unter anderem als Weichmacher, Antioxidantien, UV- und Hitzestabilisatoren, Emulgatoren, Pigmente oder Füllstoffe. All diese Stoffe können aus dem Kunststoff heraus diffundieren und in die Lebensmittel migrieren. Neben bewusst zugesetzten Additiven, gibt es noch eine ganze Reihe anderer Stoffe die aus Kunststoffen in das Lebensmittel gelangen können. Monomere, Katalysatorrückstände, Lösungsmittel sowie Zwischen- und Nebenprodukte der Polymerisationsreaktion können ebenso in den Kunststoffen enthalten sein. Ob und in welchem Maße diese Stoffe auch tatsächlich in das Lebensmittel migrieren ist abhängig von der migrierenden Substanz und den Eigenschaften des Polymers, sowie von den Eigenschaften des betroffenen Lebensmittels. Wobei hydrophobe Additive wie Weichmacher oder Antioxidantien besonders leicht in fettreiche Lebensmittel diffundieren und Schwermetalle, wie zum Beispiel Katalysatorrückstände, vor allem durch saure, wässrige Lebensmittel wie Fruchtsäfte oder Softdrinks aus der Verpackung gelöst werden können. Die Migrationsgeschwindigkeit einer Substanz wird in hohem Maße von der Temperatur beeinflusst. Besonders anfällig für eine Migration sind Lebensmittel die längere Zeit bei höheren Temperaturen gelagert werden (Konkol, 2005; Muncke, 2009).

Verpackungen sind mit Kennzeichnungselementen, Angaben und bunten Bildern bedruckt. Auch wenn nur die Außenseite bedruckt ist, werden immer wieder Druckfarbenbestandteile in Lebensmitteln nachgewiesen. Im Wesentlichen sind es zwei Substanzgruppen: zum einen die Gruppe der Photoinitiatoren, die bei UV-härtenden Druckfarben benötigt werden und zum anderen die Mineralöle, welche auch als Lösungsmittel in Farben verwendet werden. Eine Möglichkeit, neben der Migration, wie Druckerfarben in das Lebensmittel gelangen können ist durch den Abklatsch. Beim Aufrollen oder Stapeln kommt die nicht vollständig ausgehärtete,

bedruckte Außenseite mit der das Lebensmittel kontaktierenden Innenseite in Kontakt (AGES, 2012).

2.3 Hormone

Hormone haben eine große Rolle bei der Steuerung des Organismus. Chemisch betrachtet sind Hormone hochspezialisierte Moleküle, die bereits in sehr geringen Konzentrationen wirksam sind (Schauder & Ollenschläger, 2006).

2.3.1 Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel

Die Schilddrüse (Glandula thyreoidea) ist eine Hormondrüse. Das Organ ist unter dem Kehlkopf und vor der Luftröhre lokalisiert. In ihr befinden sich zahlreiche Hohlräume welche von hormonbildenden Drüsenepithelzellen umgeben sind. Die gebildeten Hormone werden in den Epithelzellen gespeichert (Faller & Schünke, 2008).

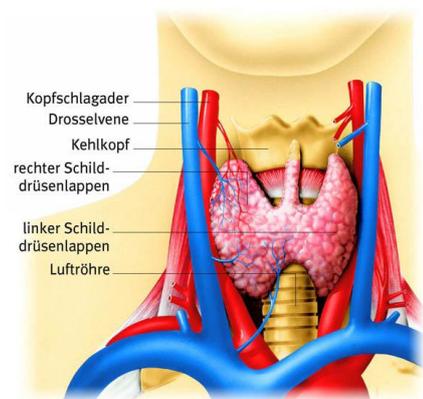


Abbildung 1: Lage der Schilddrüse im Körper (Jameda, 2014)

2.3.1.1 Synthese von Schilddrüsenhormonen

Für die Produktion der Schilddrüsenhormone benötigen die Thyreozyten das Halogen Jod. Die Resorption findet in Form von Jodid im Dünndarm statt. Das Jodid wird aus dem Blut und dem Extrazellulärraum in die Epithelzellen der Schilddrüse aufgenommen. Über eine nur in den Schilddrüsenzellen vorkommende Jodid-ATPase

LITERATURÜBERSICHT

gelangt das Jodid über den "Natrium-Jodid-Symporter" (NIS) in die Zellen (Spitzweg & Heufelder, 1999).

Die Aktivität des NIS wird durch das Thyreoidea-stimulierende Hormon (TSH) hochreguliert und durch hohe Jodidmengen gehemmt. Befinden sich zu wenig Schilddrüsenhormone im Blutplasma wird die Jodidaufnahme in die Schilddrüse gesteigert. Bei einem zu hohen Jodidgehalt, wird die Aktivität NIS gedrosselt (Gärtner, 1995).

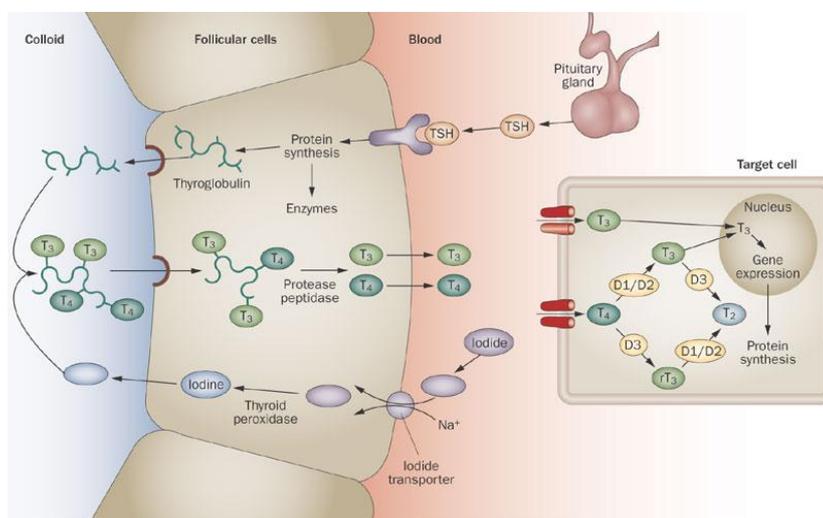


Abbildung 2: Transport von Jod von der Kapillare über die Thyreozyten in die Schilddrüse. Die Jodidperoxidase oxidiert Jodid. Die Hypophyse schüttet TSH aus. TSH aktiviert die Synthese der Schilddrüsenhormone (Cohen-Lehman et al., 2010).

In den Zellen wird Jodid mittels einer Jodidperoxidase wahrscheinlich bis zum Jodoniumion oxidiert. Das Jodoniumion ist extrem reaktionsfreudig und jodiert Tyrosylreste des für die Schilddrüse spezifischen Glycoproteins Thyroglobulin an den Positionen 3 und 5 des aromatischen Ringes. Anschließend wird Monojodtyrosin oder Dijodtyrosin intramolekular auf Dijodtyrosin übertragen. Bei einer Übertragung von Dijodtyrosin auf Monojodtyrosin entsteht inaktives Trijodthyronin (rT₃). Bei einer Übertragung von Monojodtyrosin auf Dijodtyrosin entsteht T₃, bei der Koppelung von 2 Dijodtyrosin entsteht Thyroxin T₄. Dies geschieht mit Hilfe des Enzyms thyreoidale Peroxidase, TPO (Löffler, 2004).

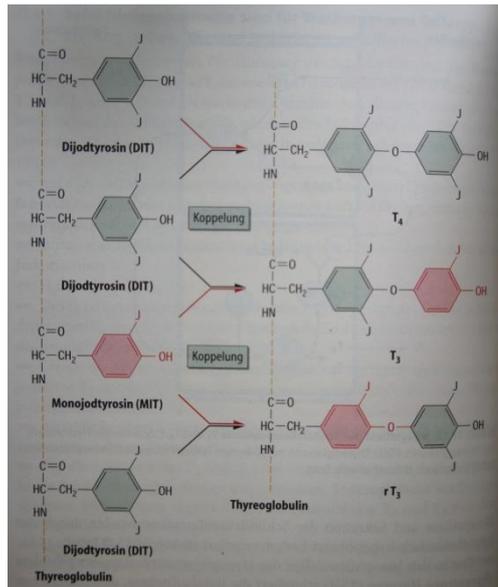


Abbildung 3: Koppelungsreaktion bei der T₃- und T₄-Biosynthese. Einzelne Tyrosylreste des Thyreoglobulins werden jodiert und Monojodtyrosin bzw. Dijodtyrosin auf Dijodtyrosin übertragen (Löffler, 2004).

2.3.1.2 Blutkreislauf

Die Schilddrüsenhormone T₃ und T₄ werden in einem Verhältnis von 1:20 ins Blut abgegeben, wobei T₃ das eigentlich stoffwechselaktive Hormon und T₄ ein Prohormon ist. Schilddrüsenhormone sind hydrophob und müssen für den Transport im Blut an spezifische Trägerproteine gebunden werden, etwa 95% der Schilddrüsenhormone kommen in gebundener Form vor. Sie werden in Bindung an Globulin, Präalbumin (Transthyretin) und an Serumalbumin im Blutplasma transportiert (Kerschek & Kolman, 2011; Löffler, 2004).

LITERATURÜBERSICHT

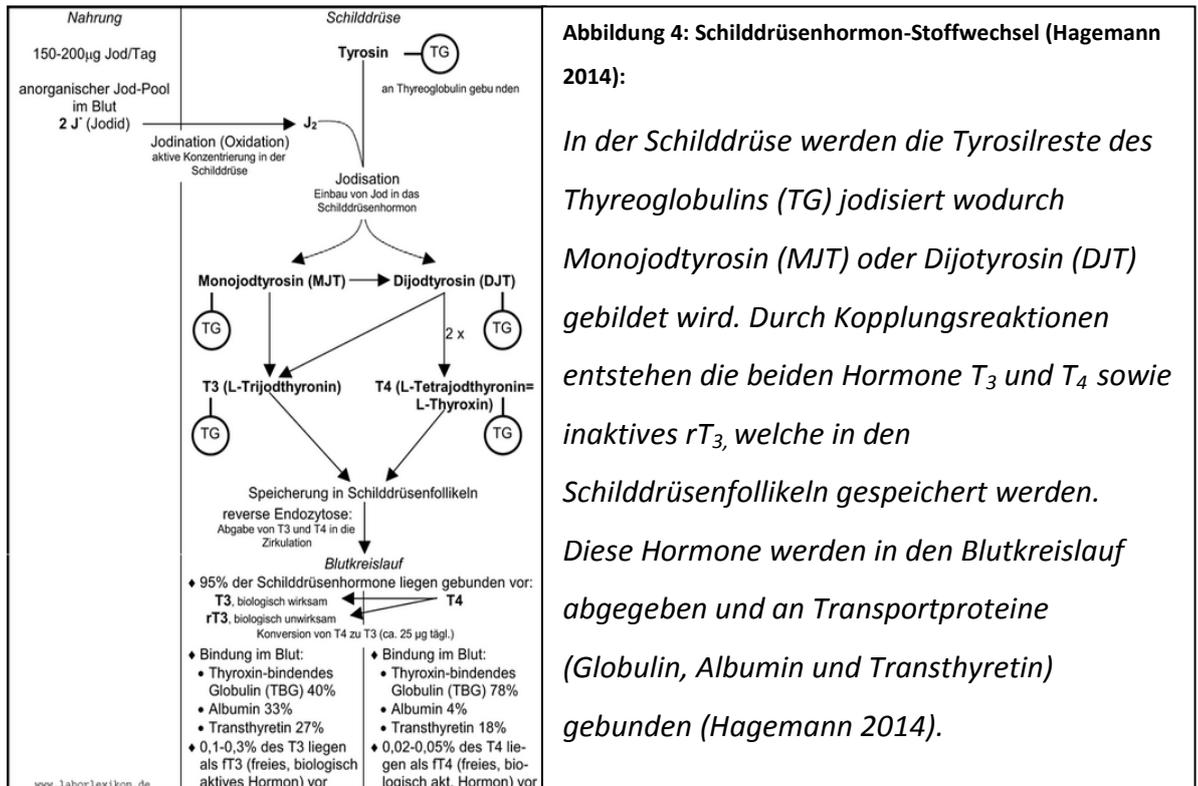


Abbildung 4: Schilddrüsenhormon-Stoffwechsel (Hagemann 2014):

In der Schilddrüse werden die Tyrosilreste des Thyreoglobulins (TG) jodisiert wodurch Monojodtyrosin (MJT) oder Dijodtyrosin (DJT) gebildet wird. Durch Kopplungsreaktionen entstehen die beiden Hormone T₃ und T₄ sowie inaktives rT₃, welche in den Schilddrüsenfollikeln gespeichert werden. Diese Hormone werden in den Blutkreislauf abgegeben und an Transportproteine (Globulin, Albumin und Transthyretin) gebunden (Hagemann 2014).

2.3.2 Jod

Jod ist ein essentieller Nährstoff, der zum Aufbau der Schilddrüsenhormone Trijodthyronin und Thyroxin dient. Bei Jodmangel ist die Schilddrüsenfunktion gestört und es bildet sich ein Kropf, der auch als Struma bezeichnet wird. In Österreich und Deutschland kommt die Kropfbildung gehäuft vor (in Deutschland 30–40 % der Erwachsenen). Jodmangel in der Schwangerschaft kann die Entwicklung und Intelligenz des Kindes stören. Bei einem schweren Jodmangel ist das Risiko für Fehlgeburten und angeborenen Anomalien erhöht. Der Jodbedarf des Menschen wurde in den DACH-Referenzwerten mit 180 - 200 µg am Tag festgelegt (AGES, 2005).

Der minimale Jodbedarf sind 60 - 120 µg/Tag. Die Aufnahme von goitrogenen Substanzen in der Nahrung (z. B. in Kohlarten), die Aufnahme von Thiocyanat, saisonale und regionale Faktoren und Verluste bei der Zubereitung wurden bei der

Erstellung der Referenzwerte berücksichtigt. Im Unterschied zu den DACH-Referenzwerten empfiehlt das "Food and Nutrition Board" in den USA eine tägliche Aufnahme von 50 - 75 µg Jod am Tag. Thiocyanat hemmt die Iodaufnahme in die Schilddrüse und kommt im Zigarettenrauch vor. Es entsteht auch beim Abbau cyanogener Glykoside, die in Kohllarten oder Bohnen enthalten sind. Perchlorat, Nitrate und Cyanate blockieren kompetitiv zum Jodid die Jodidaufnahme (AGES, 2005).

Bei Jodmangel kommt es zur so genannten kompensatorischen T₃-Mehrsekretion und in der Schilddrüse wird mehr Trijodthyronin als Thyroxin gebildet. Der Organismus kann auch auf die gespeicherten Hormone zurückgreifen. Die Speichermenge an Schilddrüsenhormonen reicht aus um den Körper zwei Monate lang ausreichend versorgen zu können (Heseker, 1999).

2.3.3 Wirkungsorte

Die Schilddrüsenhormone beeinflussen nahezu alle Stoffwechselprozesse im Körper. Sie ermöglichen den Stoffwechsel sich dem jeweiligen Bedarf anzupassen und sind dadurch wesentlich für eine ausgeglichene Energiebilanz. Schilddrüsenhormone wirken auch auf andere endokrine Drüsen im Körper. In der Hypophyse fördern sie die Freisetzung des Wachstumshormons Somatotropin und in der Bauchspeicheldrüse die Insulinfreisetzung. Ebenfalls wird die Aktivität der Nebennieren und der Nebennierenrinde anregend. Schilddrüsenhormone haben eine Schlüsselfunktion bei Differenzierungsvorgängen und sind vor allem sind für die Hirnentwicklung bei Neugeborenen wichtig (Heseker, 1999).

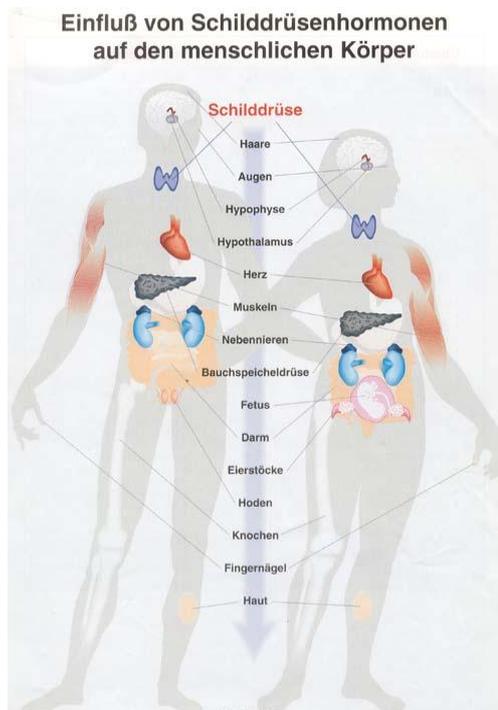


Abbildung 5: Wirkungsorte (Schmid, 2014).

Die Schilddrüsenhormone wirken direkt auf endokrine Drüsen. Indirekt beeinflussen sie aber auch Herzfrequenz und Blutdruck sowie den Zucker- und Fettstoffwechsel. In physiologischen Konzentrationen werden die Aktivitäten von Schweiß- und Talgdrüsen der Haut sowie der Darmmotorik gesteigert. Insgesamt wird durch die Wirkung der Schilddrüsenhormone der Energieverbrauch und der Grundumsatz des Organismus erhöht (Heseker, 1999).

2.3.4 Zelluläre Wirkungen

In physiologischen Konzentrationen haben Schilddrüsenhormone eine stimulierende Wirkung auf den Zellstoffwechsel. Der Sauerstoffverbrauch fast aller Gewebe wird erhöht und mit dem gesteigerten Energieumsatz ist auch die Thermogenese erhöht. Mit Hilfe von Schlüsselenzymen aktivieren Schilddrüsenhormone die Glukonoeogenese, die Glykogenolyse, die Lipogenese und die Cholesterinsynthese. Das Körperwachstum wird durch die Stimulierung der Biosynthese des Wachstumshormons Somatotropin und durch einen direkten Effekt auf die Knochen gefördert (Löffler, 2004).

2.4 Der Regelkreis der Schilddrüsenhormone

Die Herstellung und Abgabe ins Blut beider Hormone wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Achse reguliert (Faller & Schünke, 2008).

LITERATURÜBERSICHT

Ist die Konzentration der beiden Hormone T_3 und T_4 im Blut zu gering werden Hypothalamus und Hypophyse angeregt. Zuerst wird im Hypothalamus das Thyreotropin Releasing Hormon (TRH) gebildet und freigesetzt. Über das hypothalamisch-hypophysäre Pfortadersystem gelangt TRH zur Adenohypophyse. Dort regt es die Bildung und Ausschüttung vom Thyroidea Stimulierenden Hormon (TSH) an, welches

- die Jodidaufnahme aktiviert,
- die Schilddrüse zur Produktion von T_3 und T_4 anregt und
- gleichzeitig deren Abgabe ins Blut fördert.

Der Hypothalamus kann die Reaktion der Adenohypophyse durch die Freisetzung von TRH verstärken oder vermindern. Steigt die Konzentration der Schilddrüsenhormone im Blut über einen bestimmten Wert, wird die Herstellung von T_3 und T_4 durch die verminderte Freisetzung von TRH und TSH gehemmt (Kerschek & Kolman, 2011).

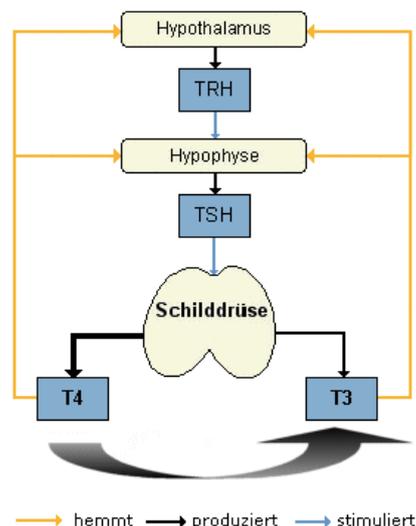


Abbildung 6: Die Biosynthese der Schilddrüsenhormone wird über den thyreotropen Regelkreis reguliert (Kluthe, 2006).

Die Konzentration von T_3 und T_4 im Plasma ist relativ konstant, wobei freies T_3 und T_4 nur in Spuren vorhanden ist. Das Verhältnis von $T_3:T_4$ im Plasma beträgt 1:100. Der Großteil der aktiven Schilddrüsenhormone im Blut ist das Prohormon T_4 (AGES, 2005).

2.4.1 Signaltransduktion

Rezeptoren sind Proteine die durch die Bindung von Liganden spezifische Signale aufnehmen und in die Zelle vermitteln (Deetjen et al., 2005).

Die Bindung eines extrazellulären Botenstoffes an den Rezeptor führt zu dessen Aktivierung und löst eine Kaskade intrazellulärer Ereignisse aus. Diese Kaskade wird auch als Signaltransduktion bezeichnet (Löffler, 2004).

2.4.2 Schilddrüsenhormon-Rezeptoren

Schilddrüsenhormon-Rezeptoren sind spezielle intrazelluläre Rezeptorproteine die im Zellkern lokalisiert sind (Deetjen et al., 2005).

Sie gehören zu der Gruppe der Kernrezeptoren, ebenfalls wie

- Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren,
- Vitamin-D-Rezeptoren und
- Rezeptoren für die Retinsäure.
- Manche „orphan receptors“, dessen endogene Liganden noch nicht identifiziert sind, sind ebenfalls Kernrezeptoren.

Schilddrüsenhormon-Rezeptoren kommen in vielen Geweben vor (ZNS, Hormonsystem, Stoffwechselsystem, Gastrointestinale System, Fortpflanzungssystem und Herz-Kreislaufsystem). In besonders hohen Konzentrationen sind sie im Gehirn, Hypothalamus, Hypophyse, Nieren, braunem Fettgewebe und dem Herzen vorzufinden (Weinberger et al., 1986).

Das Hormon T_3 bindet mit einer 10 Mal höheren Affinität an den Rezeptor des Zellkerns als T_4 (Oettinig & Yen, 2007).

Daher wird im peripheren Gewebe mit Hilfe einer Dejodase ein Jodatom von dem Hormon T_4 abgespalten und in das biologisch aktive T_3 umgewandelt (Kerschek & Kolman, 2011).

Schilddrüsenhormon-Rezeptoren sind auch ohne Ligandenbindung an die hormonempfindlichen Elemente der DNA gebunden. Sie binden dann an Co-Repressoren (CoR) und haben als Transkriptionsrepressoren eine unterdrückende Wirkung auf die Genexpression (Maya et al., 2012).

Lipophiles T_3 diffundiert über die Zellmembran in das Zytosol und weiter in den Zellkern wo es an T_3 -Rezeptoren bindet. Es gibt unterschiedliche Rezeptortypen für Schilddrüsenhormone. $TR\alpha$ und $TR\beta$ haben für T_3 die gleiche Affinität (10^{-9} – 10^{-10} M) (Schmidt, 2007).

Der Rezeptor $TR\beta_2$ kommt nur in spezifischen Organen wie der Hypophyse und dem Hypothalamus vor. Dort spielt er eine Schlüsselrolle bei der Regulierung der TSH-Synthese und -Sekretion. Die Rezeptortypen $TR\alpha_1$, $TR\beta_1$ und $TR\beta_3$ kommen ubiquitär im menschlichen Gewebe vor und vermitteln spezifisch ihre Wirkungen. Die Expression der Schilddrüsenhormon-Rezeptoren beginnt sehr früh in der vorgeburtlichen Entwicklung (Kenji et al., 2013).

Bei Aktivierung des Rezeptors bilden sie mit dem Retinoat-X-Rezeptor Heterodimere. Diese Dimere sind regulierbare ligandenaktivierte Transkriptionsfaktoren. Sie werden Enhancer genannt und bestehen aus drei Domänen:

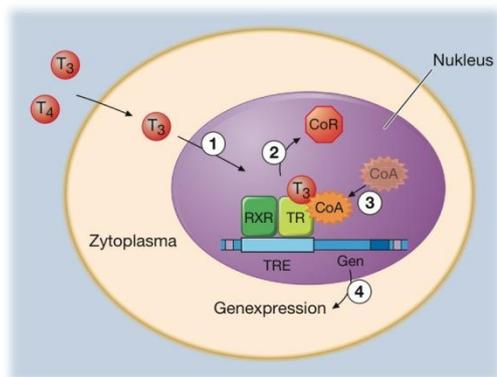
- der DNA-Bindungsdomäne,
- der Liganden-Bindungsdomäne und der
- Trans-Aktivierungsdomäne.

Die DNA-Bindungsdomäne dieser Dimere bindet spezifisch an schilddrüsenhormonreaktive Elemente, den Enhancer-Elementen, der DNA (Löffler, 2004).

LITERATURÜBERSICHT

Um die Wirkung von Schilddrüsenhormonen ausführen zu können benötigen Hormonrezeptoren Co-Aktivator- und Co-Repressor-Proteine. Bindet T_3 an den Rezeptor, werden mit Hilfe von Co-Aktivatoren die entsprechenden Gene exprimiert. Das Zusammenwirken der Co-Regulator-Proteine mit den Rezeptoren funktioniert mittels kurzer Peptidsequenzen (Deetjen et al., 2005).

Die DNA-Bindungsdomäne der Kernrezeptoren hat eine Zinkfingerstruktur, mit der sie an die DNA-Basensequenz AGGTCA bindet. Diese Zinkfingerstruktur besteht aus Cysteinyl- bzw Histidylresten und wird durch ein Zinkatom komplexiert. Die dabei entstehende schleifenförmige Struktur wird als Zinkfinger bezeichnet. Diese Schleifen bilden β -Faltblätter, welche an spezifische DNA-Sequenzen binden (Löffler, 2004).



Aus: Harrison's Innere Medizin, 18. Auflage (Copyright: ABW Wissenschaftsverlag GmbH)

Abbildung 7: Der Mechanismus der Schilddrüsenhormon-Rezeptorwirkung. Die Zahlen gliedern die Abfolge der Reaktionen der Hormonwirkung (Jameson & Weetman, 2012).

(1) T_3 tritt in die Zelle ein und bindet an den Schilddrüsenhormon-Rezeptor (TR). Der TR bildet mit dem Retinoid-X-Rezeptor (RXR) ein Heterodimer. Dieses Dimer ist an spezifische Elemente (TRE - thyroid hormone response element) der Promoterregion der Zielgene gebunden.

(2) Die Co-Repressor-Proteine (CoR) lösen sich vom TR. Die CoR sind beim Fehlen von T_3 an den TR gebunden und unterdrücken so die Genexpression.

(3) Co-Aktivatoren (CoA) werden an dem T_3 -gebundenen Rezeptor bereitgestellt.

(4) Es kommt zur Expression der regulierten Gene (Jameson & Weetman, 2012).

2.5 Endokrin aktive Substanzen

Synthetische Substanzen oder deren Abbauprodukte - aus der Industrie und Landwirtschaft - weisen strukturelle Ähnlichkeiten mit natürlichen Hormonen auf. Dies führt zu der Problematik, dass sie unbeabsichtigter Weise eine Hormonwirkung ausüben können. Diese hormonaktiven Substanzen akkumulieren aus verschiedenen Quellen in der Nahrungskette und werden weltweit in der Wissenschaft untersucht und diskutiert (Bundesamt für Gesundheit, 2012).

In der Medizin werden beabsichtigter Weise endokrine Substanzen eingesetzt. Zur Behandlung einer Unter- oder Überfunktion der Schilddrüse werden Hormonpräparate verwendet, welche die Produktion der Schilddrüsenhormone steigern oder verringern. Schilddrüsenmedikamente, die zur Behandlung von Morbus Basedow eingesetzt werden wirken auf der Transkriptionsebene. Morbus Basedow ist eine Autoimmunerkrankung der Schilddrüse mit äußeren Erscheinungsbildern wie Strumabildung und Schilddrüsenüberfunktion. In vitro wurde nachgewiesen, dass Thyreostatiker die T₃ medierte Antwort auf den Schilddrüsenhormon-Rezeptor hemmen, indem sie die Co-Repressor-Proteine replatzieren und/oder die Coaktivatoren abdissoziieren (Moriyama et al., 2013).

Diese Masterarbeit untersucht ausschließlich synthetisch hergestellte endokrine Substanzen die unbeabsichtigter Weise mit dem Organismus interferieren.

2.5.1 Endokrine Disruptoren

Körperfremde hormonaktive Substanzen die in einem gesunden Organismus eine schädliche Wirkung hervorrufen werden als endokrine Disruptoren bezeichnet. Eine nachteilige Wirkung dieser endokrinen Disruptoren kann auch erst in der Nachkommenschaft auftreten. Der wissenschaftliche Ausschuss der EFSA betont, dass nicht alle endokrin wirksamen Stoffe endokrine Disruptoren sind. Zur genaueren Klassifizierung wurden folgende Grundbedingungen festgelegt:

Der Substanz muss endokrine Aktivität nachgewiesen werden wodurch sie schädliche Effekte in einem intakten Organismus verursacht. Diese endokrine Aktivität und die schädliche Wirkung müssen in einem plausiblen ursächlichen Zusammenhang zueinander stehen (EFSA, 2013).

2.6 Wirkungsweise endokriner Disruptoren

Endokrine Disruptoren können die Hormonwirkung blockieren (antagonistisch) oder verstärken (agonistisch). In beiden Fällen bindet der Stoff an einen Hormonrezeptor. Endokrinen Disruptoren wurde eine ungünstige Regulierung von Östrogen- Androgen- und Schilddrüsenhormon-Rezeptoren nachgewiesen. Da die hormonelle Signalgebung sehr komplex ist bietet sie eine Menge weitere Wirkungsorte für endokrine Disruptoren (Tabb & Blumberg, 2013).

Eine weitere Wirkungsweise endokriner Disruptoren ist die veränderte Verfügbarkeit von körpereigenen Hormonen durch Beeinflussung der Hormonsynthese oder des Hormonabbaus (Bundesamt für Gesundheit, 2012).

Umweltchemikalien, wie PCBs und dessen hydroxylierte Metabolite, BPA und TBBPA, könnten potentielle Liganden für Schilddrüsenhormon-Rezeptoren sein und dadurch Effekte auf die Signalgebung der Schilddrüsenhormon während der Gehirnentwicklung haben (Zoeller, 2007).

2.6.1 Beispiel PCB

Eine viel diskutierte Substanzklasse sind Polychlorierte Biphenole (PCB), eine Gruppe von ubiquitär vorkommenden, akkumulierten und persistenten Umweltkontaminanten. Gesundheitsschädliche Wirkungen einzelner PCB's sind schwer nachzuweisen, da sie in komplexen Mischungen vorkommen. Einige PCB's wirken endokrin, indem sie in der normalen Signalgebung von Schilddrüsenhormon-Rezeptoren interferieren (Tabb & Blumberg, 2013).

2.6.2 Verstärkung von Zellsignalen

Schädliche Wirkungen wurden auch bei xenobiotischen kurzkettigen Fettsäuren (Valproinsäure und Methoxydessigsäure) nachgewiesen. Diese Fettsäuren wirken nicht wie Hormone sondern fördern die Transkription spezifischer Gene indem sie Zellsignale verstärken. Mittels der verstärkten Signale werden Proteinkinasen aktiviert oder Histondeacetylasen gehemmt. Proteinkinasen katalysieren Proteinphosphorylierungen und steigern die Aktivität von Transkriptionsfaktoren. Histondeacetylasen entfernen Acetylgruppen von acetyliertem Lysin, wodurch die DNA für die Transkriptionsfaktoren blockiert wird, was die Transkription verringert. Dadurch kann die Aktivität der Schilddrüsenhormon-Rezeptoren gesteigert werden (Jansen et al., 2006).

2.6.3 Proteosom Modulierung

Das Proteosom ist im Zellkern und im Zytoplasma lokalisiert und baut Proteine ab um die Zelle vor einer Überstimulierung zu schützen. Unter anderem werden Transkriptionsfaktoren, Zellkernrezeptoren und Proteine die den Zellzyklus regulieren abgebaut. Endokrine Disruptoren modulieren den vom Proteosom gesteuerten Abbau von Zellkernrezeptoren und Co-Aktivatoren und haben somit Einfluss auf die Genexpression (Tabb & Blumberg, 2013).

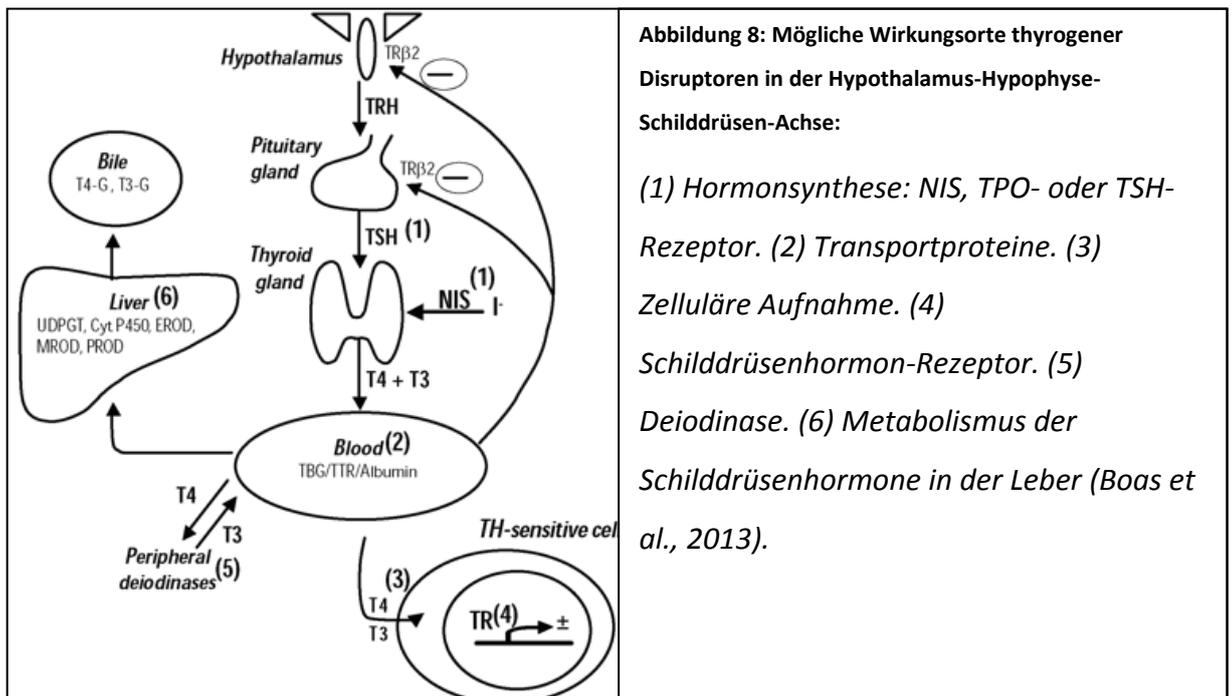
2.7 Thyrogene Disruptoren

In diversen in vivo Studien wurde eine Störung des Schilddrüsenhormon-Regelkreises durch unterschiedliche thyrogene Disruptoren nachgewiesen (Hofmann et al., 2009). PCB, Dioxine und Furane bewirkten Hypothyroidismus in Tieren. Die in der Umwelt vorkommende Dosis der Chemikalien beeinflusst auch die menschliche Schilddrüsenhormon-Homöostase. Verschiedene Chemikalien reagieren bei unterschiedlichen Dosen mit dem Schilddrüsenregelkreis. Die Störung der

LITERATURÜBERSICHT

Schilddrüsenhormon-Homöostase liegt wahrscheinlich mehreren Mechanismen zugrunde, da die Wirkmechanismen an verschiedenen physiologischen Eckpunkten stattfinden können. Bereits kleine Veränderungen im Schilddrüsenhormon-Spiegel haben einen schädigenden Effekt auf den Körper, die frühgeburtliche neurologische Entwicklung reagiert auf diese Veränderungen besonders empfindlich (Boas et al., 2013).

Thyrogene Disruptoren können in geringen Dosen zwar keine offensichtlichen Veränderungen in den Hormonkonzentrationen herbeiführen, jedoch trotzdem in Mensch und Tier die Hormonhomöostase verändern. In die Aufrechterhaltung der Schilddrüsenhormon-Homöostase sind vielzählig komplexe Mechanismen involviert, an deren verschiedenen Eckpunkten endokrine Disruptoren eingreifen können (Boas et al., 2013).



2.7.1 Schilddrüsenhormon-Synthese

Durch Interferenz mit dem NIS, dem Rezeptor für TSH oder der thyreoidalen Peroxidase (TPO), kann die Produktion von Schilddrüsenhormonen gestört werden (Boas et al., 2013).

2.7.2 Transportproteine

Chemische Substanzen binden kompetitiv zu den Schilddrüsenhormonen mit Transthyretin. Die Bindung kann die Bioverfügbarkeit von endogenen Schilddrüsenhormonen erhöhen. Transthyretin ist die Haupttransportsubstanz von Schilddrüsenhormonen im menschlichen Gehirn und vermittelt den Transport von T₄ über die Blut-Hirn-Schranke, sowie den Transport von T₄ auf den Fötus (über die Plazenta). Synthetische Substanzen können, gebunden an Transthyretin, in das fetale Gewebe und das fetale Gehirn transportiert werden und dort die Konzentrationen an T₄ verringern (Boas et al., 2013).

2.7.3 Mechanismen der zellulären Aufnahme

Die Bioverfügbarkeit der Schilddrüsenhormone für den Schilddrüsenhormon-Rezeptor wird gestört, wenn die Aufnahme in die Zelle verhindert wird. Einige synthetische Substanzen können die Aufnahme von Schilddrüsenhormonen in die Körperzellen verringern (Boas et al., 2013).

2.7.4 Hormonrezeptoren und Genexpression

Hormonaktive Substanzen können die von Schilddrüsenhormonen ausgelöste Genexpression beeinflussen, da sie durch ihre strukturelle Ähnlichkeit wie Transkriptionsfaktoren wirken können (Boas et al., 2013).

2.7.5 Verstoffwechslung der Schilddrüsenhormone

Enzyme der Gruppe Iodothyronin-Deiodinasen kontrollieren die Umwandlung von Schilddrüsenhormonen für die Verstoffwechslung in Leber und Galle und sind daher essentiell für die Regulation der Konzentration von Schilddrüsenhormone. Die Aktivität dieser Enzyme kann durch endokrine Disruptoren beeinflusst werden (Boas et al., 2013).

2.8 Beispiele für thyrogene Disruptoren

Einige Umweltchemikalien sind bereits als thyrogene Disruptoren bekannt und werden in bestimmten Populationen im Blut nachgewiesen (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2008). Die Tabelle 1 zeigt chemische Substanzen in Zusammenhang mit ihrem Wirkungsmechanismus.

Tabelle 1: Wirkung verschiedener Substanzklassen an unterschiedlichen physiologischen Eckpunkten (adaptiert nach Boas et al., 2013): (1) Hormonsynthese. (2) Transportproteine. (3) Zelluläre Aufnahme. (4) Schilddrüsenhormon-Rezeptor. (5) Deiodinase. (6) Metabolismus der Schilddrüsenhormone in der Leber (Boas et al., 2013).

Wirkungsmechanismen	Substanzklasse
(1) Hemmung der Iodid Aufnahme	Perchlorate, Phthalate
(1) Hemmung des TSH-Rezeptors	DDT, PCB
(2) Bindung an Transportproteine	PCB, Phthalate, Phenole, Flammschutzmittel, HCB
(3) Zelluläre Aufnahme von Schilddrüsenhormonen	Phthalate, Chlordane
(4) Bindung an den Schilddrüsenhormon-Rezeptor und Genexpression	PCB, Phenole, BPA, Flammschutzmittel, HCB
(5) Deiodinase	Methoxychlor, MBC
(6) Verstoffwechslung von Schilddrüsenhormonen	PCB, Dioxine, Phenole, Flammschutzmittel, HCB, BPA

2.8.1 Polychlorierte Biphenyle

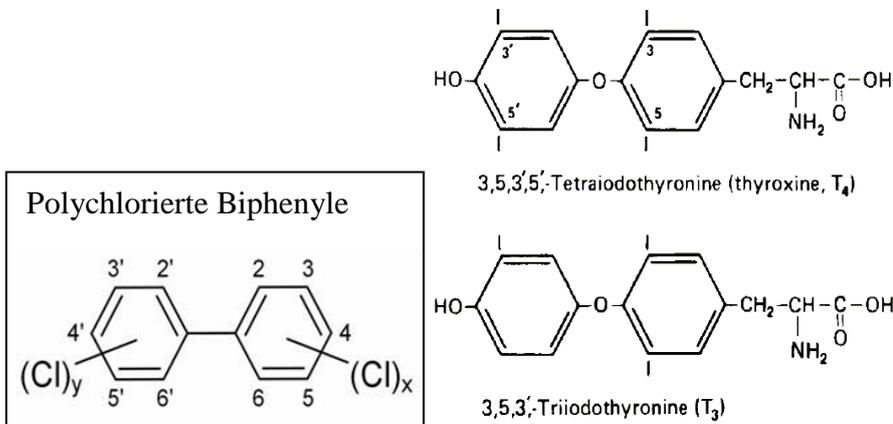


Abbildung 9: Strukturformel PCB (Hopley et al., 2005)

Polychlorierte Biphenyle (PCB) sind chlorierte Kohlenwasserstoffe die auf natürlicherweise nicht in der Natur vorkommen. Sie bestehen aus zwei miteinander verbundenen Benzolringen bei denen bis zu 10 Wasserstoffatome durch Chlor ersetzt wurden. Es gibt 209 mögliche Verbindungen, sie unterscheiden sich durch die Anzahl und Stellung der Chloratome an den beiden Phenolringen. In den meisten Mischungen sind 70 bis 100 Verbindungen enthalten, wobei etwa 10 Kongene die Hauptmenge ausmachen. Sie sind biologisch schwer abbaubar, ihre Halbwertszeit liegt zwischen 10 und 100 Jahren (Bayrisches Landesamt für Umwelt, 2008).

PCBs und die hydroxylierten Metaboliten sind biologisch aktiv und haben eine hohe strukturelle Ähnlichkeit mit Schilddrüsenhormonen (Boas et al., 2013).

Sie gehören der Gruppe der persistenten organischen Schadstoffe (POPs) an und sind mittlerweile ubiquitär in der Umwelt vorhanden. Verwendet wurden PCBs unter anderem in Lacken, Harzen, Kunststoffen, Druckerfarben und Klebstoffen. Sie sind seit 2001 PCB weltweit verboten. Da sie aber sehr lange in der Umwelt (Böden, Sedimente, Gewässer, Atmosphäre) bleiben können, gelangen sie in weiterer Folge in die Futtermittelherstellungskette und in die Lebensmittelkette. Die höchsten Gehalte

finden sich in fettreichen Lebensmitteln wie etwa in Milch- und Milchprodukten, in Fleisch- und Fleischprodukten, in Fischen und Fischereierzeugnissen, Eiern und Eiprodukten. Je weniger Fett, Fleisch oder Wurst enthalten ist, desto geringer ist das Risiko diese Umweltgifte mit der Nahrung aufzunehmen. Pflanzliche Lebensmittel sind hingegen nur schwach kontaminiert. Bei längerfristiger oraler Aufnahme können PCBs gesundheitsschädlich wirken, unter anderem in Form von Hormonstörungen. Einige PCBs interferieren mit Schilddrüsenhormon-Rezeptoren um die Signalgebung. Die Nahrung ist auch heute noch die Hauptquelle von PCBs, sie werden in der Muttermilch nachgewiesen (AGES, 2011).

In einer Studie mit einer Zelllinie aus menschlichen Gehirnzellen konnte abgeleitet werden, dass verschiedene PCBs eine unterdrückende Wirkung auf die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren haben. Diese Wirkung beruht nicht darauf, dass PCBs mit T_3 um den Rezeptor konkurrieren. Vielmehr können geringe Dosen von PCBs mit der von Schilddrüsenhormonen vermittelten Genexpression interferieren, indem der Schilddrüsenhormon-Rezeptor Co-Aktivator Komplex beeinflusst wird (Iwasaki et al., 2002).

2.8.2 Tetrabromobisphenol A

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) ist ein Flammschutzmittel das in Kunststoffen, Gummi, Farben und anderen Materialien eingesetzt wird. Flammschutzmittel kommen in der Umwelt vor und wurden bei Tier und Mensch, unter anderem in der Muttermilch, nachgewiesen. TBBPA hat strukturelle Ähnlichkeiten mit den Schilddrüsenhormonen und interferiert um die Bindung an das Transportprotein Transthyretin. TBBPA bindet auch direkt an die Schilddrüsenhormon-Rezeptoren. In „in vitro“ Studien wirkt es bei Konzentrationen ab $1 \mu\text{M}$ antagonistisch und bei Konzentrationen ab $10\mu\text{M}$ agonistisch auf die Genexpression (Hofmann et al., 2009).

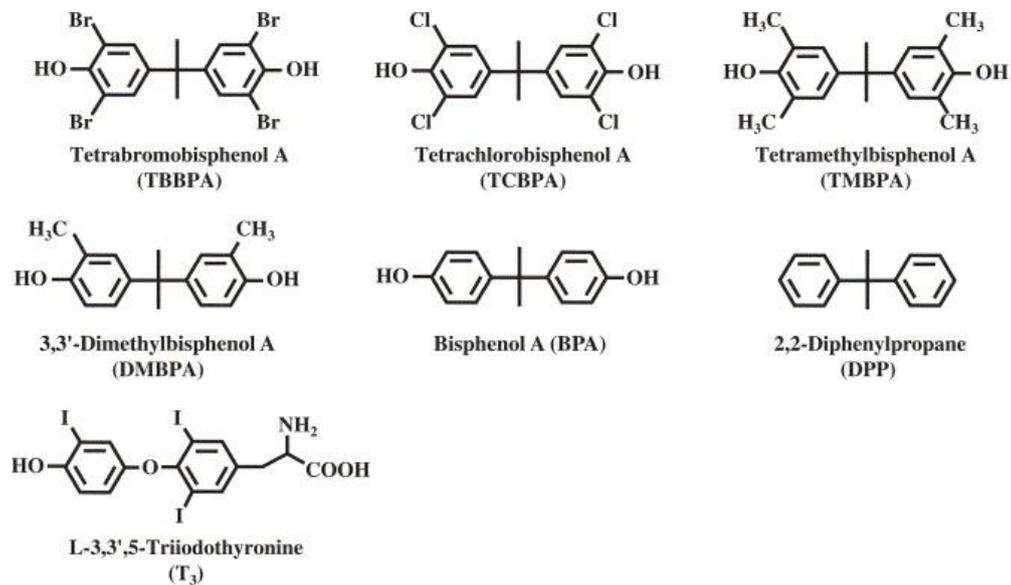


Abbildung 10: Strukturformel TBBA und BPA (adaptiert nach Kitamura et al., 2005)

2.8.3 Bisphenol A

Bisphenol A (BPA) ist ein endokriner Disruptor und wird unter anderem zur Herstellung von Kunststoffen und Epoxidharzen verwendet. Polycarbonat wird für die Herstellung von Flaschen eingesetzt, weil es glasklar ist und amorphe Eigenschaften besitzt. Epoxidharze werden zur Beschichtung von Metalldosen für Getränke und Konserven verwendet. Die Migration von BPA aus beschichteten Metalldosen (bis zu 600 µg/kg Lebensmittel) ist weitaus höher als bei Polycarbonatflaschen (10 µg/L) (Mertl, 2010; Tacker, 2011).

In der Umwelt wurde BPA in der Luft, Erde und aquatischen Ökosystemen detektiert, ebenfalls im menschlichen Plasma und im fetalem Gewebe. Der Schilddrüsenhormon-Rezeptor wird durch BPA gehemmt, was zu einer Verminderung der Genexpression führt (Gentilcore et al., 2013; Moriyama et al., 2013).

In "in vitro" Zellstudien mit tierischen Zellen wurde ebenfalls eine antagonistische Wirkung von BPA auf die transkriptionale Aktivität nachgewiesen. Dabei muss betont werden, dass nur die Effekte von BPA auf den Schilddrüsenhormon-Rezeptoren

festgestellt wurden und der Einfluss von BPA auf das gesamte Schilddrüsenhormon-System noch unbekannt ist (Moriyama et al., 2013).

2.9 CALUX-Bioassay

Der TR-CALUX (Trijodthyroninrezeptor-Chemically Activated LUciferase eXpression) ist ein in-vitro Reporterassay zur Bestimmung der Trijodthyronin- und Antitrijodthyroninaktivität in Lebensmittelsimulanzlösungen. Für diesem Assay wird die humane U2OS Zelllinie verwendet, bei welcher der menschliche Trijodthyronin-Rezeptor und ein Trijodthyronin-Rezeptor Responsive Reporter Gen (Luciferase) ins Genom integriert wurden. Diese Zelllinie verzeichnet eine stabile Expression des Trijodthyronin-Rezeptorproteins sowie eine hohe Selektivität des Responses auch bei geringen Konzentrationen an natürlichen und synthetischen thyrogenen Substanzen. Die Response auf Liganden anderer Hormonrezeptoren wie z.B. Östrogene, Progestine und Glucocorticoide ist vernachlässigbar (Edvin Sonneveld et al., 2004; van der Burg et al., 2013).

2.9.1 Response Element

Der verwendeten humanen Osteoblasten Zelllinie wurden ein Expressionskonstrukt für den humanen Trijodthyronin-Rezeptor und ein Reporterkonstrukt fix ins Genom integriert. Das Reporterkonstrukt beinhaltet Trijodthyronin Responsive Elements, die an ein Minimalpromoterelement gekoppelt sind, der TATA-Box.

Sobald ein Ligand (T_3 bzw. endokrine Disruptoren) an den Rezeptor bindet wird dieser aktiviert. In Folge bindet der Rezeptor im Zellkern an Erkennungssequenzen in der Promotorregion des Zielgens, den Trijodthyronin Responsive Elements (TREs). Der an die DNA gebundene Rezeptor aktiviert nun die Luciferasetranskription. Wenn Luciferin als Substrat zugesetzt wird, erzeugt das Luciferaseprotein Licht welches luminometrisch gemessen wird. Das Signal korreliert direkt mit der Menge an gebundener Liganden.

Durch Messung der Inhibition der Luciferaseaktivität können mittels des TR-CALUX Proben auf antitrijodthyronine Substanzen getestet werden (Edvin Sonneveld et al., 2004; van der Burg et al., 2013).

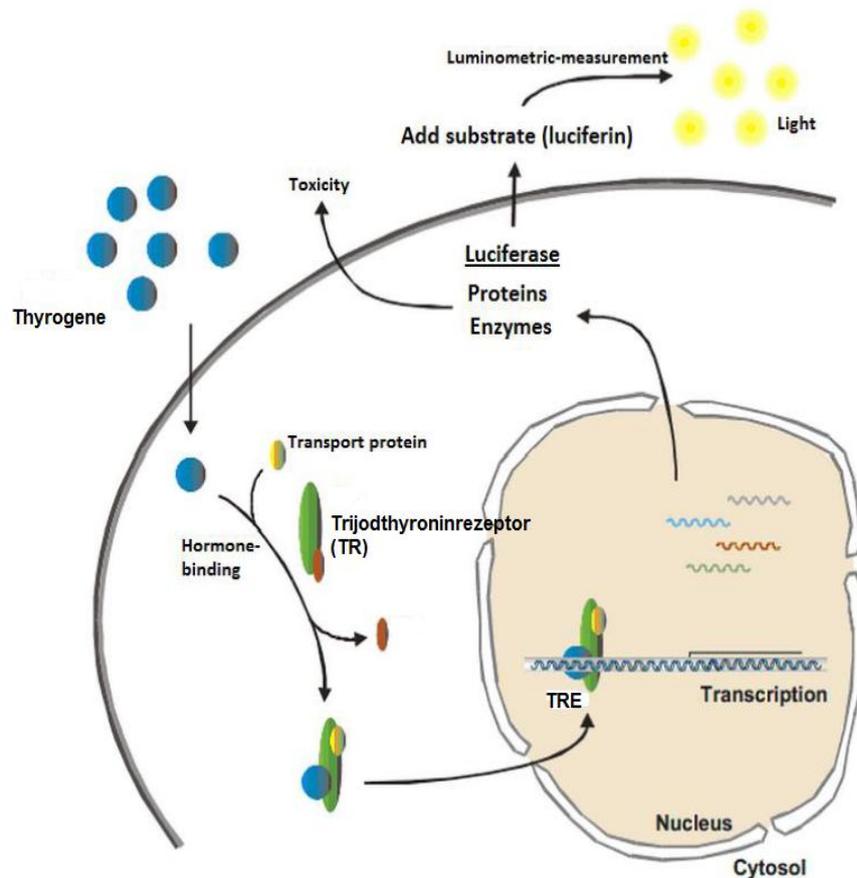


Abbildung 11: Schematische Darstellung der Wirkungsweise des TR-CALUX (adaptiert nach BDS Netherlands, 2009): TR – Trijodthyroninrezeptor; TRE – Trijodthyronin Response Element

2.10 Validierung

Die Validierung dient dazu die Qualität einer Untersuchungsmethode zu erfassen oder zu verbessern. Durch eine präzise Dokumentation wird sichergestellt, dass die erreichte Qualität zu jedem Zeitpunkt der Routineanalytik eingehalten wird und verlässliche Analyseergebnisse gewährleistet sind (Funk et al., 2005).

Die Validierung wurde nach folgenden Richtlinien der ISO 17025:2000 durchgeführt:

"Die Bestätigung durch Untersuchung und Bereitstellung eines Nachweises, dass die besonderen Anforderungen für einen speziellen beabsichtigten Gebrauch erfüllt sind."

"Sie muss sie in dem Umfang durchgeführt werden, der zur Erfüllung der Erfordernisse einer beabsichtigten Anwendung oder eines betreffenden Anwendungsgebietes notwendig ist."

"Das Laboratorium muss die erhaltenen Ergebnisse und das für die Validierung verwendete Verfahren aufzeichnen und festlegen, ob das Verfahren für den beabsichtigten Gebrauch geeignet ist." (Zitz & Strobl, 2006)

2.10.1 Validierungsparameter

Eine Methode wird anhand von Validierungsparameter untersucht. Mittels solcher Parameter kann nachgewiesen werden, ob das Verfahren den Anforderungen entspricht und die Methode für den beabsichtigten Zweck geeignet ist.

ROBUSTHEIT

Eine Methode ist robust, wenn ihre Verfahrenskenndaten unempfindlich gegenüber Veränderungen der Analysebedingungen sind. Es wird zwischen "robustness" und "ruggedness" unterschieden:

- "Robustness" spiegelt die Unempfindlichkeit des Verfahrens gegenüber realistischen und eindeutig definierten Änderungen der Verfahrensparameter (z.B. Inkubationszeit oder Reaktionsdauer) wieder.
- "Ruggedness" zeigt die Reproduzierbarkeit von Ergebnissen bei veränderten Analysebedingungen (z.B. Wechsel des Analytikers oder der Reagenzien) auf.

PRÄZISION

Die Präzision gibt das Maß der Streuung von Analysenergebnissen an.

Die Wiederholpräzision (repeatability) gibt qualitativ die Annäherung von Analysenergebnissen unter Wiederholbedingungen an. Diese Bedingungen werden folgendermaßen definiert:

"Anwendung des festgelegten Analysenverfahrens am identischen Objekt (gleiches Material/gleiche Probe) durch den/die selbe/n Beobachter/in (Analytiker/in) in kurzen Zeitabständen (unmittelbar hintereinander) mit denselben Geräten am selben Ort (im selben Labor)."

Die Vergleichspräzision ist die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse unter Vergleichsbedingungen: "Anwendung des festgelegten Analyseverfahrens am gleichen Material (Probe), aber in unterschiedlichen Labors, von verschiedenen Bearbeiter/Innen und mit verschiedener Geräteausrüstung."

WIEDERFINDUNG

Beim Test auf Wiederfindung wird der mögliche Einfluss einer Verfahrens- oder Probenmodifikation (z.B. Matrixeinfluss auf das Analysenverfahren) auf das Ergebnis ermittelt. Die Wiederfindungsrate gibt das Verhältnis des richtigen Werts des Analysten mit dem gemessenen Mittelwert der Probe (unter Wiederholungsbedingungen) wieder (Funk et al., 2005; Kromidas, 1999).

3 Material und Methoden

3.1 Materialien und Geräte

Die verwendeten Materialien und Geräte für den Reportergenassay (siehe Tabelle 2) und die Probenvorbereitung (siehe Tabelle 3) sind in den untenstehenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 2: Geräte für CALUX-Bioassay

Gerät	Hersteller
Analysenwaage GJ	Kern
Analysenwaage A 200	Sartorius
Autoclave HV-50L	Hirayama
Laminarflowsterilbank Biosafe 7-130	Ehret
96 Well Tissue Culture Plate, flat Bottom with lid, steril	Sarsted
96 Well flat, white, non steril, No. 611F96WT	Sterilin
Deep Well Plates P-2ml-SQ-C-S-C	Axygen
Multichannelpipette 8x 20-300µl	Gilson
Multichannelpipette 8x 1-20µl	Gilson
Multilabel Counter 1420 Victor ³	Perkin Elmer
Pipetman P10, P20, P200, P1000	Gilson
Reinstwasseraufbereitungsanlage Q-Gard 3	Milipore
Rotilabo Spritzenfilter steril, Porengröße 0,22µm	Roth
Centrifuge Tubes 50 ml, steril	Iwaki
Einwegpipetten: 2 ml, 5 ml, 25 ml	Sterilin
Pipetboy acu	IBS
Stickstoff Dewar GT11	Air Liquide
pH-Messgerät Lab 86	Schott Instruments
Zentrifuge 5810R	Eppendorf

Einwegspritzen 25ml	Braun
Tissue Culture Flask	VWR

Tabelle 3: Geräte für die Probenvorbereitung

Gerät	Hersteller
Analysenwaage A 200S	Sartorius
Analysenwaage TE2145 – OCE	Sartorius
Glasspritze 100ml	VWR
HLB 6cc (200mg) Extraction Cartridges	Oasis
Migrationskammern, Aluminium, 100 ml	Eigenanfertigung
Reinstwasseraufbereitungsanlage Q-Gard 3	Millipore
SUPELCO Visiprep™ SPE Vacuum Manifold 24 port	Sigma Aldrich
Glasspritze 100ml	VWR

3.2 Chemikalien

Die benötigten Chemikalien für den CALUX-Bioassay (siehe Tabelle 4) und für die Probenvorbereitung (siehe Tabelle 5) sind in den untenstehenden Tabellen aufgelistet.

Tabelle 4: Chemikalien für CALUX-Bioassay

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Dulbecco's Phosphate buffered saline	Sigma Aldrich	D8537
G418 Sulfate, Cell Culture Tested	Calbiochem	345810
MEM NEAA-Minimum Essential Medium- Non Essential Amino Acids 100x	Gibco	11140-035
Pen-Strep 5000 U Penicillin/ml + 5000 U Streptomycin	Lonza	DE17-603E
FBS Fetal Bovine Serum, South America	Gibco	10270
Trijodtyroxin	Sigma Aldrich	E8875
Steady-Glo Luciferase Assay Substrate	Promega	E253B

Steady-Glo Luciferase Assay Buffer	Promega	E254B
Trypsin - EDTA Solution 0,25%	Sigma Aldrich	T4049-500ML
Dimethylsulfoxid (pro analysi)	Merck	1.02952.1000
DME/F-12 (1x) („weißes Medium“)		
DME/F-12 (1x) + GlutaMax –I („rotes Medium“)		
Dextran from Leuconostoc spp. Mr. 500	Sigma Aldrich	
Activated Charcoal Norit	Sigma Aldrich	
Salzsäure, 1 M	Merck	1.09057.1000
Tris - Puffer (Trometanol)	Merck	1.08382.0100

Tabelle 5: Chemikalien zur Probenvorbereitung

Chemikalie	Hersteller	Artikelnummer
Methanol, Baker HPLC analyzed	J. T. Baker	8002
Ethanol (HPLC Grade)	Merck	1.11727.2500
Dimethylsulfoxid (pro analysi)	Merck	1.02952.1000
Acetonitril (HPLC grade)	J. T. Baker	1104209017

3.3 Medien

Es wurden zwei Kulturmedien unter sterilen Bedingungen hergestellt. Beide wurden im Kühlschrank bei 4°C für die Dauer von maximal einem Monat gelagert.

3.3.1 Rotes Medium (mit ungestripptem FCS)

Für die Herstellung des roten Mediums wurden 500 mL DMEM/F-12 (1:1) (1x) + GlutaMax -I mit 41 mL FCS (ungestrippt), 5,5 mL non-essential amino acids und 1 mL Penicillin/Streptomycin versetzt und geschüttelt.

3.3.2 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.

3.3.3 Dextran coated charcoal behandeltes Fetal Calf Serum (DCC-FCS)

Das fötale Kälberserum enthält natürlicherweise Hormone, welche das Testergebnis verfälschen könnten. Für das weiße Medium wurde deswegen hormonfreies FCS hergestellt:

In 50 mL Reinstwasser wurden 0,6 g Tris gelöst und der pH Wert mittels HCl (1 M) auf 8,0 eingestellt. Eine 1 L Schottflasche wurde mit RO-H₂O vorgespült. Anschließend wurde die Pufferlösung in die vorgespülte Schottflasche überführt und mit RO-H₂O auf 500 mL aufgefüllt.

0,25 g Dextran wurden in einem Becherglas vorgelegt, mit 20 mL der Pufferlösung verrieben und anschließend der Pufferlösung zugegeben.

2,5 g Aktivkohle wurden unter schütteln mit dem Puffer vermischt. Diese Suspension musste auf einem Magnetrührer bei 4 °C über Nacht gerührt (1000 RPM) werden.

MATERIAL UND METHODEN

200 mL FCS wurden unter sterilen Bedingungen in eine Glasflasche überführt und bei 56 °C für 30 Minuten ins Wasserbad gestellt. Das dafür verwendete FCS wurde im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und das restliche FCS wieder eingefroren.

Die dextranbehandelte Aktivkohle wurde auf 12 Zentrifugenröhrchen aufgeteilt und zentrifugiert (20 Minuten; 1000 g). Unter der Laminarflow Werkbank wurde der Überstand abgenommen und verworfen. Dabei wurde darauf geachtet, dass das Pellet ganz bleibt während die Flüssigkeit vollständig entfernt wurde.

Das im Wasserbad (37°C) erwärmte Serum wurde auf 6 Aktivkohlepellets auf optisch gleichen Füllstand aufgeteilt und geschüttelt. Anschließend wurden die 6 Zentrifugenröhrchen bei 45 °C für 45 Minuten im Wasserbad inkubiert, und dabei alle 5 Minuten mit der Hand aufgeschlämmt. Danach wurden sie zentrifugiert (20 Minuten; 1000 g).

Das Serum wurde steril abpipettiert und in die übrigen 6 Zentrifugenröhrchen mit den Aktivkohlepellets überführt und geschüttelt. Erneut wurden diese 6 Zentrifugenröhrchen bei 45 °C für 45 Minuten im Wasserbad inkubiert, wobei sie alle 5 Minuten per Hand aufgeschlämmt wurden.

Anschließend wurde zentrifugiert (20 Minuten; 1000 g). Der Überstand wurde in 6 leere Zentrifugenröhrchen überführt und zur Entfernung aller Aktivkohlereste, erneut zentrifugiert (20 Minuten; 1000 g).

Das Serum wurde in einem Becherglas gepoolt und je 26,4 mL in Zentrifugenröhrchen sterilfiltriert. Die Zentrifugenröhrchen wurden beschriftet, bei -80 °C eingefroren und gelagert. Ein Aliquot von 26,4 mL entspricht der Menge zur Herstellung von einer Flasche weißem Medium.

3.4 Standardreihen

3.4.1 T₃-Standardreihe

Für die Herstellung einer T₃-Stocklösung (1 mmol/mL) wurden 11,3 mg Triiodthyronin in ein Glasprobenröhrchen eingewogen und in 20 mL DMSO gelöst. Danach wurde entsprechend dem Schema in Tabelle 6 eine Verdünnungsreihe in Glasprobenröhrchen erstellt. Im CALUX-Bioassay wurden die Standards B-H mit 0,5% im DMSO verwendet (siehe Tabelle 7).

Die Verdünnungsstufen A - H wurden für eine bessere praktische Anwendung von 0,1 % auf 0,5 % DMSO verdünnt und ebenfalls in Glasprobenröhrchen gelagert. Etwa 100 µL dieser Standards wurde auf Mikrotiterplatten aufgetragen und bei -20°C bis zur Weiterverwendung im CALUX-Bioassay gelagert.

Bei einer Temperatur von – 20 °C kann die Hormonaktivität mit der Zeit abnehmen. Die Glasprobenröhrchen wurden daher bei - 80 °C gelagert.

3.4.1.1 EC₅₀-Bestimmung

Für die Erstellung der Standardgerade wurde die mittlere effektive Konzentration (EC₅₀) ermittelt. Zur Berechnung wurden die Werte des niedrigsten und des höchsten Standards herangezogen, der EC₅₀-Wert der T₃-Standardreihe ist 10nM T₃.

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 6: Herstellung der Standardlösungen

Verdünnung	Konzentration im DMSO [M]	Verdünnungsschritt
S	1E-03	11,3 mg T ₃ + 20 mL DMSO
H	1E-04	500 µL S + 4500 µL DMSO
V	1E-05	500 µL H + 4500 µL DMSO
A	0E-00	Reines DMSO
B	1E-07	50 µL V + 4950 µL DMSO
C	2E-07	100 µL V + 4900 µL DMSO
D	3E-07	150 µL V + 4850 µL DMSO
E	5E-07	250 µL V + 4750 µL DMSO
F	8E-07	400 µL V + 4600 µL DMSO
G	1E-06	500 µL V + 4500 µL DMSO
H	1E-04	500 µL V + 4500 µL DMSO

Tabelle 7: Standards B-H mit 0,5% im DMSO (jeweils 1 mL Standard mit 4 mL DMSP verdünnt)

B – H	0,5 % DMSO
B	1E-10
C	2E-10
D	3E-10
E	5E-10
F	8E-10
G	1E-9
H	1E-7

3.4.2 Herstellung der mit T₃ dotierten Standards

Ein bereits getestetes, negatives DMSO-Extrakt wurde mit einer bestimmten Konzentration T₃ dotiert. Dafür wurden die Verdünnungen E und F der Standardreihe verwendet.

Bezeichnung	Konzentration (M) im Medium	Verdünnungsschritt
Spike E	5E-10	20 µL E + 80 µL Extrakt
Spike F	8E-10	20 µL F + 80 µL Extrakt

3.4.3 Herstellung der Spikelösung für den Test auf antagonistische Effekte

Die Standardlösung S wurde für die Verdünnung mit DMSO vermengt. Die hergestellte Spikelösung wurde in einem Glasvial bei -20°C aufbewahrt (siehe Tabelle 8).

Tabelle 8: Herstellung von 1 mL Spikelösung

Verdünnung	Konzentration (M) im DMSO	Verdünnungsschritt
S	1E-03	11,3 mg T ₃ + 20 mL DMSO
Spikelösung	6E-05	60 µL S + 940 µL DMSO

Am zweiten Untersuchungstag des Bioassays wurde die Spikelösung auf Zimmertemperatur erwärmt und mit dem weißen Medium vermischt (Spikemedium). Das Spikemedium wurde vor der Zugabe der Probenlösung auf die Wells pipettiert (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Spikemedium im Well

Verdünnung	Konzentration (M)	Verdünnungsschritt
Spikemedium	6E-08	1,5 mL weißes Medium + 1,5 µL Spikelösung
Im Well	1E-08	20 µL Spikemedium + 100 µL Probelösung

3.5 Verwendete Proben

Die Lebensmittelkontaktmaterialien (siehe Tabellen 10-12) wurden zur Bestimmung im CALUX-Bioassay mit der entsprechenden Lebensmittelsimulanzlösung befüllt, gelagert (siehe Herstellung) und aufkonzentriert (siehe Aufkonzentrierung).

Tabelle 10: Proben aus Getränkeverbundkartons

#	Verpackung	Verwendungszweck
1	GVK	Orangensaft
2	GVK	Keine Angabe
3	GVK	Orangensaft
4	GVK	Frische Vollmilch
5	GVK	Tetra Brik Aseptic Tetra Pak
6	GVK	Tetra Brik Aseptic Tetra Pak
7	GVK	Tetra Brik Aseptic Tetra Pak
8	GVK	Tetra Brik Aseptic Tetra Pak
9	GVK	Kein Angabe

Tabelle 11: Verpackungsproben aus PP, PS und PET Materialien

#	Verpackung	Verwendungszweck
10	PP	Granulat schwarz
11	PP	Granulat weiß
12	PP	Granulat weiß
13	PP	Tiefziehfolie Lichtschutz weiß
14	PP	Tiefziehfolie transparent
15	PS	Tassen grün
16	PS	Folie transparent
17	PS	Tiefziehfolie weiß
18	PS	Tiefziehfolie weiß

19	PET	Granulat Sample No. 1
20	PET	Granulat Sample No. 5
21	PET	Granulat Sample No. 7

Tabelle 12: Dosen und Folie

#	Verpackung	Verwendungszweck
22	Dose	Rundflasche Metall inkl. Kunststoffdeckel
23	Dose	Pfirsichdose mit Deckel
24	Dose	Sardinendose mit Deckel
25	Dose	Thunfischdose mit Deckel
26	Dose	Raviolidose
27	Dose	Dose mit Deckel für Bonbons
28	Dose	Dose mit Verschlüsse für Olivenöl und andere pflanzliche Öle
29	Folie	Emmentaler

3.6 Reinsubstanzen

Von jeder Reinsubstanz (siehe Tabelle 13) wurde eine Stocklösung mit einer Konzentration von 100 mM/L hergestellt. Dafür wurde von jeder Reinsubstanz die errechnete Menge in ein Glasvial eingewogen, mit der entsprechenden Menge DMSO vereint und gevortext. Folgende Reinsubstanzen wurden mit dem TR-CALUX getestet:

Tabelle 13: Verwendete Reinsubstanzen

#	Reinsubstanz	CAS-#	Mw
R1	Methyl-p-hydroxybenzoate (Methylparaben)	99-76-3	152,15
R2	Ethyl-4-hydroxybenzoate (Ethylparaben)	120-47-8	166,17
R3	Diethylhexyl adipate	103-23-1	375,57
R4	Resorcinol 1,3-dihydroxybenzene	108-46-3	110,11
R5	Bis(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)	117-81-7	390,56
R6	Diisodecyl phtalate (DiDP)	26761-40-4	446,66

R7	Di-n-octylphthalate	117-84-0	390,56
R8	Butyl benzyl phtalate (BBP)	85-68-7	312,36
R9	4-Chloro-3-methyl-phenol	59-50-7	142,58
R10	Dibutylphthalate (DBP)	84-74-2	278,34
R11	n-Propyl-p-hydroxybenzoate (Polyparaben)	94-13-3	180,2
R12	4-Tert-octyl phenol	140-66-9	206,33

3.7 Durchführung

Für die Probenbestimmung im CALUX-Bioassay wurden Migrationslösungen aus Lebensmittelkontaktmaterialien hergestellt. Die dafür verwendeten Verpackungen wurden von Firmen zur Verfügung gestellt und waren zuvor nicht im Kontakt mit dem angegebenen Füllgut. Nach der Lagerung wurden die Migrationslösungen über eine Pumpe aufkonzentriert. Die entstandenen Extrakte wurden mit dem CALUX-Bioassay auf agonistische und antagonistische Hormonaktivität getestet.

3.7.1 Migrationslösungen

Zur Herstellung der Migrationslösungen wurden Lebensmittelsimulanzlösungen je nach Lebensmittelkategorie verwendet (siehe Tabelle 14). Die Verpackungen wurden in Kontakt mit den Simulanzlösungen gebracht und bei 40 °C oder 60 °C für 10 Tage in Klimaschränken gelagert. Die Berührungsdauer und die Berührungstemperatur wurden für extrem ungünstigen Lagerbedingungen gewählt und entsprechen einer Langzeitlagerung bei Raumtemperatur für mehr als sechs Monate.

Tabelle 14: Liste der Lebensmittelsimulanzien und Kontaktbedingungen. Die Tabelle zeigt die probenabhängige Ethanolkonzentration und Migrationsdauer/Temperatur

Lebensmittel - Kategorie	Simulanz	Kontaktbedingungen
Wässrige Lebensmittel ph > 4,5	10%iger EtOH	10 Tage / 60°C
Fettige Lebensmittel	95%iger EtOH	10 Tage / 60°C
Unbekannte Kategorie	95%iger EtOH	10 Tage / 60°C
Milchprodukte	50%iger EtOH	10 Tage / 40°C

3.7.2 Migrationslagerung

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

Bei den Migrationen wurden von jeder Verpackungsprobe zwei unabhängige Migrante angesetzt, zusätzlich wurde mindestens ein Lösungsmittelblindwert mitmigriert. Die Blindwerte wurden wie die Proben gelagert, aufkonzentriert und im CALUX-Bioassay untersucht. Die Blindwerte dienten als Kontrolle von einer eventuellen Kontamination der verwendeten Lösungsmittel im Laufe der Probenvorbereitung und Aufkonzentrierung.

Flaschen, Becher, Plastikbehälter und andere dichte Hohlkörper wurden direkt mit den Lebensmittelsimulanzien befüllt und je nach Fassungsvermögen aufgefüllt. Für die Migration von Getränkeverbundkartons und Folien wurden Migrationskammern verwendet. An die Kammern wurden zweimal $0,5 \text{ dm}^2$ großen Scheiben der Verpackungsproben gespannt (die gesamte Probenkontaktfläche betrug 1 dm^2). Eine weitere Kontaktfläche mit der Simulanzlösung war die Kammer selbst, welche aus Aluminium und Edelstahl bestand. Für die Blindwerte wurden anstelle der Proben zwei Teflonscheiben in die Kammer eingespannt. Die Migrationskammern hatten ein Füllvolumen von 100 mL und wurden zur Gänze mit den Lebensmittelsimulanzien befüllt.

Granulate wurde abgewogen, in eine Glasflasche gefüllt und mit dem Simulanzlösungsmittel befüllt. Tiefziehfolien wurden zurecht geschnitten, abgemessen, in Glasflaschen gefüllt und mit der Simulanzlösung befüllt. Die Glasflaschen wurden jeweils mit 1 Liter Lösungsmittel befüllt. Die genaue Probeneinwaage und das Volumen der Simulanzlösung wurden notiert.

Um Verunreinigungen zu vermeiden wurden alle verwendeten Materialien sowie die Verpackungsproben zuvor dreimal mit Reinstwasser vorgespült. Bei den Glasflaschen

wurde bei allen Flaschenverschlüssen Tefloneinsätze verwendet um eine Kontamination zu verhindern.

Nach Ende der Lagerung wurden die Simulanzlösungen bei 15 °C bis zur weiteren Bearbeitung zwischengelagert.

3.7.3 Aufkonzentrierung

Bevor mit der Aufkonzentrierung mit Hilfe der Festphasenextraktion begonnen werden konnte, mussten sowohl die Proben als auch die SPE-Anlage (SUPELCO Visiprep SPE Vacuum Manifold) vorbereitet werden.

3.7.3.1 Probenvorbereitung

In der SPE-Anlage konnten Lösungen mit maximal 10 % (v/v) Ethanolgehalt verwendet werden. Hierfür wurden gegebenenfalls Migrationslösungen mit Reinstwasser verdünnt. Der pH-Wert wurde mit Phosphatpuffer auf den Wert 3 eingestellt (4 mL/L Migrat). Alle Migrat wurden in Glasflaschen mit dem Füllvolumen von 1,5 L überführt. Die Flaschen wurden zuvor mit Reinstwasser vorgespült und getrocknet.

3.7.3.2 Vorbereitung der Anlage

Die verwendeten Teflonschläuche und die Ventile des Vakuum Manifolds wurden mit 15 mL Methanol und 5 mL Reinstwasser vorgespült. Anschließend wurden die Extraktionssäulen (OASIS HLB 6CC) auf die Ventile gesteckt und mit 15 mL ACN-MetOH Gemisch, 5 mL Methanol und 5 mL Reinstwasser vorgespült. Die Anlage wurde unter Anlegung von Vakuum vorgespült, bei den Säulen wurde nach Befüllung jeder Säule mit einer Lösung ebenfalls ein Vakuum angelegt.

3.7.3.3 Aufkonzentrierung

Die Teflonschläuche wurden in die Glasflasche mit den verdünnten Migrationslösungen bis zum Flaschenboden getaucht, mit unbeschichteter Alufolie abgedeckt und in Position gehalten. Das andere Ende der Teflonschläuche wurde über

MATERIAL UND METHODEN

Adaptoren mit den Säulen möglichst luftdicht verbunden (pro Migrat eine Säule).

Durch Öffnen der Ventile wurden die Migrationslösungen mit einem Unterdruck von -400 bis -600 mbar durch die Säulen gesaugt. Die durchschnittliche Durchflussmenge betrug etwa 5 mL/Minute. Die durchgelaufenen Lösungen wurden aufgefangen und entsorgt. Bei manchen Migrationslösungen kam es auf Grund der Zusammensetzung zu Verstopfungen der Säulen, was die Durchlaufzeit verlängerte. Bei vollständigem Säulenverschluss wurde die Aufkonzentrierung abgebrochen.

Nachdem die Migrationslösungen zur Gänze über die Säulen abgepumpt war, wurden die Schläuche entfernt, die Säulen mit 5 mL Reinstwasser gespült und erneut über 2 bis 4 Stunden an Vakuum (mit -600mbar) angelegt um möglichst das gesamte Restwasser zu entfernen.

In Glasvials mit einem Volumen von 2 mL wurden 200 μ L DMSO vorgelegt. Für jede Migrationslösung wurde ein Glasvial verwendet. Das Glasvial wurde abgewogen und das Gewicht für die spätere Berechnung des DMSO Volumens notiert. Die Vials wurden in das Vakuum Manifold gestellt um das Eluat aus den Säulen aufzufangen. Für die Eluierung wurden insgesamt 4,5 mL ACN-MetOH Gemisch (v/v) pro Säule verwendet. Zuerst wurden 1,5 mL ACN-MetOH auf die Säule aufgetragen und das Eluat wurde durch beibehalten des Vakuums mit leichtem Unterdruck (-50 bis -100 mbar) auf etwa 0,5 mL eingeeengt. Dabei wurde darauf geachtet, dass es nicht zu einem Verspritzen des Elutats kam. Anschließend wurde 1 mL ACN-MetOH eluiert und wieder auf etwa 0,5 mL eingeeengt. Der letzte Schritt wurde noch zweimal wiederholt um das Eluat auf ein Volumen von etwa 200 - 300 μ L einzuengen. Die Glasvials wurden abgewogen, verschlossen, gevortext und bei 4 °C gelagert.

Das Volumen der Konzentrate wurde gravimetrisch bestimmt. Dabei wurde angenommen, dass die Dichte des Konzentrats der Dichte von reinem DMSO entspricht (1,1 g/mL).

Berechnung des Volumens der Konzentrate:

$$V \text{ [ml]} = \frac{\text{Auswaage (Vial inkl. DMSO + Konzentrat)} - \text{Auswaage (Vial inkl. DMSO)}}{1,1 \text{ g/ml}}$$

3.8 CALUX-Bioassay

Der CALUX-Bioassay ist ein In Vitro-Testsystem zur Identifizierung von Rezeptor-gebundenen Wirkungen endokriner Disruptoren. Der TR-CALUX (Trijodthyronin-Response Chemical-Activated Luciferase gene expression) wurde mit menschlichen Knochenmarkszellen durchgeführt. Sämtliche Pipettierschritte wurden unter sterilen Bedingungen in der Laminar Flow Werkbank durchgeführt.

3.8.1 Kultivierung und Passage der Zellen

Für die Handhabung mit humanen Osteoblasten wurden die Bedingungen möglichst an die physiologischen Gegebenheiten im Organismus angepasst. Zur Herstellung der Zellkultur wurde ein hormonhaltiges rotes Medium verwendet. Sämtliche Substanzen wurden im Wasserbad auf 37°C temperiert.

Für das Ansetzen einer Zellkultur wurden 45 mL rotes Medium und 120 µL G418 in eine große Zellkulturflasche (225 cm²) pipettiert. Ein Cryoröhrchen wurde aus dem Stickstoff entnommen und im Wasserbad ohne Verzögerung aufgetaut. Mit einer 2 mL Einwegpipette wurde der gesamte Inhalt des Cryoröhrchens in die Kulturflasche überführt. Die Zellkulturflasche verblieb für 3 Tage im Brutschrank (bei 37 °C; 90 % Luftfeuchte; 5 % CO₂).

Passage

Damit die Zellen nicht durch ausgeschiedene Stoffwechselprodukte und Nährstoffmangel zu Grunde gingen, wurden die Zellen in weitere Kulturflaschen passagiert. Nach etwa zwei bis drei Tagen war unter dem Mikroskop ein Zellrasen zu

MATERIAL UND METHODEN

sehen und die Zellen wurden in drei Kulturflaschen überführt. Dafür wurde aus der Kulturflasche das rote Medium entfernt und verworfen. Der Zellrasen in der Kulturflasche wurde zweimal mit je 6 mL PBS Puffer gespült. Um die Zellen von der Flaschenwand abzulösen wurden 4 mL Trypsin in die Flasche pipettiert, die Flasche geschwenkt und anschließend das Trypsin wieder entfernt um die Zellen nicht durch das Trypsin zu schädigen. Anschließend wurde die Flasche für wenige Minuten mit der bewachsenen Seite nach oben in den Brutschrank gelegt. Es konnte eine Schlierenbildung beobachtet werden. Daraufhin wurden 10 mL rotes Medium in die Kulturflasche pipettiert. Durch mehrmaliges aufziehen und ablassen des Mediums mit der Pipette, wurden die Zellen mit dem Medium suspendiert und anschließend in ein Zentrifugenröhrchen überführt.

In drei Kulturflaschen wurden jeweils 45 mL rotes Medium und 120 μ L G418 vorgelegt. Die Zellsuspension aus dem Zentrifugenröhrchen wurde auf diese Kulturflaschen aufgeteilt. Diese drei Zellkulturflaschen wurden erneut für 3 Tage im Brutschrank (37 °C; 90 % Luftfeuchte; 5 % CO₂) inkubiert. Bei der zweiten Passage wurde der Inhalt aus einer Kulturflasche auf 10 Flaschen aufgesplittet.

Einfrieren der Zellen in Cryovials

Aus den nach der zweiten Passage hergestellten 10 Kulturflaschen wurde das rote Medium entfernt und durch Zugabe von 4 mL Trypsin die Zellen von der Flaschenwand abgelöst (siehe Abschnitt "Passage"). Die Zellsuspension wurde in einem Zentrifugenröhrchen gepoolt und zentrifugiert (5 Minuten; 1200 RPM). Die angestrebte Zellkonzentration in den fertigen Cryovials betrug $4,4 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Suspension wurde in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Um die abgesehene Zelldichte von 880 Zellen/0,1 μ L zu erreichen, musste mit einer errechneten Menge an rotem Medium neu suspendiert werden.

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

Durch zentrifugieren (5 Minuten; 1000G) wurde das rote Medium von den Zellen getrennt und steril entfernt. Die berechnete Menge an rotem Medium wurde auf das Pellet pipettiert und suspendiert.

Für das Einfrieren der Zellsuspensionen wurde ein Freezing Medium hergestellt. Dafür wurden 5 mL DMSO mit 20 mL rotem Medium in einem 50 mL Zentrifugenröhren vereint und auf 4°C abgekühlt.

Jeweils 750 µL Freezing Medium wurde in die gefrorenen Cryovials vorgelegt. Jedes dieser Cryovials wurde mit 750 µL der Zellsuspension versetzt, verschlossen und durch mehrmaliges vorsichtiges schwenken homogenisiert. Die Cryovials wurden zuerst über Nacht in einer Styroporbox bei -80°C eingefroren und am nächsten Tag im flüssigen Stickstoff gelagert.

3.8.2 Durchführung

Vor dem Beginn des Reporterassays wurde ein genaues Pipettierschema für jede Mikrotiterplatte erstellt. Auf jeder Platte wurden die Standards, Spike E und Spike F in den ersten drei Reihen aufgetragen. Die zu messenden Substanzen wurden in den übrigen 3 Reihen ebenfalls im 3-fach-Ansatz aufgetragen. Der CALUX-Bioassay wurde an drei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt. Sämtliche verwendete Medien wurden im Wasserbad auf 37°C erwärmt. Die angeführten Mengenangaben beziehen sich auf die Verwendung von 6 Platten.

Tag 1: Cryokultur in den Platten ansähen

Weißes Medium (40 mL) wurden in ein Zentrifugenröhrchen (50mL) vorgelegt. Ein Cryovial wurde aus der Stickstofflagerung entnommen und ohne Verzögerung im Wasserbad aufgewärmt. Um die Zellsuspension zu homogenisieren wurde das Cryovial etwa zehnmal achtsam geschwenkt. Mit einer 2 mL Einwegpipette wurde vorsichtig 1 mL der Zellsuspension entnommen und langsam in das Zentrifugenröhren pipettiert. Das Zentrifugenröhrchen wurde etwa dreimal geschwenkt und das DMSO mittels

zentrifugieren (5 Minuten; 1200 rpm) entfernt. Im Anschluss wurden 40 mL weißes Medium in das Zentrifugenröhrchen pipettiert. Durch mehrmaliges Aufziehen und Ablassen der Pipette wurde das Pellet resuspendiert.

Um Verdunstungsfehler am Plattenrand zu vermeiden wurden die äußeren Wells mit 100 µL rotem Medium/Well aufgefüllt. Nur die inneren 60 Wells wurden mit 100 µL/Well mit der Zellsuspension befüllt. Zur Inkubation wurden die Platten für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt (37 °C; 90 % Luftfeuchte; 5 % CO₂).

Tag 2: Inkubation mit den Lösungen

Die Standard- und Probelösungen wurden wie in Kapitel 3.4 beschrieben hergestellt. Am zweiten CALUX-Tag wurden die Lösungen aus dem Kühlschrank genommen, desinfiziert und unter der Laminar Flow Werkbank auf Raumtemperatur erwärmt.

Für eine DMSO-Konzentration im Well von 0,5 % wurden die Standard- und Probelösungen folgendermaßen verdünnt: In einer Deep-Well-Platte wurden in jedes Well 1,5 mL weißes Medium vorgelegt und 7,5 µL der entsprechenden Lösung pipettiert. Mittels auf- und ablassen der Pipette (mindestens 20mal mit einem Volumen von 100 µL) wurden die Lösungen mit dem Medium vermischt. Dabei wurde besonders darauf geachtet, dass es zu keinem Verspritzen der Lösungen kam. Um eine Blasenbildung zu vermeiden wurde auf das Ausblasen der Pipetten verzichtet.

Die 96-Well-Platten wurden desinfiziert und in die Werkbank gestellt, das Auftragsschema (siehe Tabelle 15) wurde sichtbar neben dem Arbeitsplatz bereitgestellt. Die Zellen haben sich am Boden der Wells abgesetzt, das weiße Medium konnte mit einer 100 µL Pipette aus den 96-Well-Platten aufgesaugt und verworfen werden. Um die Zellen dabei nicht zu beschädigen wurde die Pipettenspitzen an den Rand der Wells gehalten. Ohne Zeitverzögerung wurden 100 µL der entsprechenden Lösung aus der Deep-Well-Platte auf die Wells der Mikrotiterplatten aufgetragen. Zur Inkubation wurden die Platten für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt (37 °C; 90 % Luftfeuchte; 5 % CO₂).

MATERIAL UND METHODEN

Tabelle 15: Auftragsschema der Standard (Std) - und Probenlösungen (P) auf die Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B		Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Std F	Std G	Std H	Spike E	Spike F	
C		Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Std F	Std G	Std H	Spike E	Spike F	
D		Std A	Std B	Std C	Std D	Std E	Std F	Std G	Std H	Spike E	Spike F	
E		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
F		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
G		P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	
H												

Tag 3: Auswertung

Die 96-Well-Platten wurden unter dem Mikroskop auf zytotoxische Effekte und Kontaminationen untersucht. War ein Zellrasen erkennbar wurde daraus geschlossen, dass die Zellen gut angewachsen sind. Bei der Beobachtung von vielen losen Zellen konnte eine zytotoxische Wirkung der Probe vermutet werden. Die Ergebnisse der mikroskopischen Kontrolle wurden festgehalten und in die Auswertung der Ergebnisse mit einbezogen.

Anschließend wurde ein Färbereagenz hergestellt. Pro Platte wurden

- 18,5 mg Glowmix
- 1,2 mL Steady-Glow Puffer (Raumtemperatur) und
- 1,8 mL Reinstwasser (Raumtemperatur)

verwendet. Die erforderliche Menge für alle Platten wurde errechnet. Das Glowmixpulver wurde in ein 50 mL Zentrifugenröhrchen eingewogen. Die entsprechende Menge Steady-Glow Puffer und Reinstwasser wurde hinzugegeben und das Zentrifugenröhrchen einmal geschwenkt.

In jedes Well wurden 40 μ L des Färbereagenz pipettiert. Für die Messung im Photometer wurden 6 weiße, undurchsichtige 96-Well-Platten vorbereitet.

Nach 10 Minuten wurde mit einer Pipette der gesamte Inhalt jedes Wells in die weiße Platte überführt und photometrisch gemessen.

Die Auswertung erfolgte im Viktor3 mit diesen Programmeinstellungen:

- Luminometrisch
- Emission Filter: no filter
- Emission Aperture: normal
- Counting Time: 1 s

Für die Negativkontrolle wurden migrierte Blindwerte (EtOH oder Reinstwasser) verwendet.

3.8.3 Test auf inhibierende Effekte

Mit dem CALUX-Bioassay wurden, neben der Untersuchung auf Aktivierung der T₃-Rezeptoren, auch antagonistische Effekte von Probenlösungen und Reinsubstanzen auf die Zellen gemessen. Dafür wurden auf die Zellen für die Probelösungen am zweiten Tag der Testreihe nach dem Aufsaugen des Mediums 20 µL des mit 6*10⁻⁸ M T₃ dotieren Spikemediums (siehe Punkt 3.4.3) pipettiert. Die Wells der Standardreihe wurden nicht mit dem Spike-Medium dotiert. Die Konzentration von T₃ im Well betrug 1*10⁻⁸ M, diese Konzentration entspricht dem EC₅₀-Wert der T₃-Standardreihe.

Anschließend wurden, wie in Punkt 3.8.2 Tag 2 erklärt, 100 µL der entsprechenden Lösung aus der Deep-Well-Platte in die Wells pipettiert. Die Platten wurden ebenfalls im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag ausgewertet.

3.9 Validierungsbericht

Wissenschaftliche Methoden erfordern eine Evaluation über ihre Gültigkeit und Qualität. Um die Gebrauchstauglichkeit des CALUX-Reporterassays nachweisbar machen zu können, wurde der Bioassay im Zuge dieser Masterarbeit validiert.

Während der Validierung war zu beobachten, dass die Zellen generell gut angewachsen sind und alle Ansätze gleich gut funktionierten. Grundlegende Akzeptanzkriterien wurden festgelegt.

3.9.1 Grundlegende Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch

Die nachfolgenden Akzeptanzkriterien für einen gültigen Versuch mussten auf jeder Platte eingehalten werden, damit diese in den Validierungsprozess einbezogen werden konnten. Wenn eines der Kriterien nicht erfüllt wurde, so wurde die Platte nicht für die Validierung verwendet.

Linearität der Triiodthyronin-Standardreihe (Bereich 10^{-10} bis 10^{-7} M)

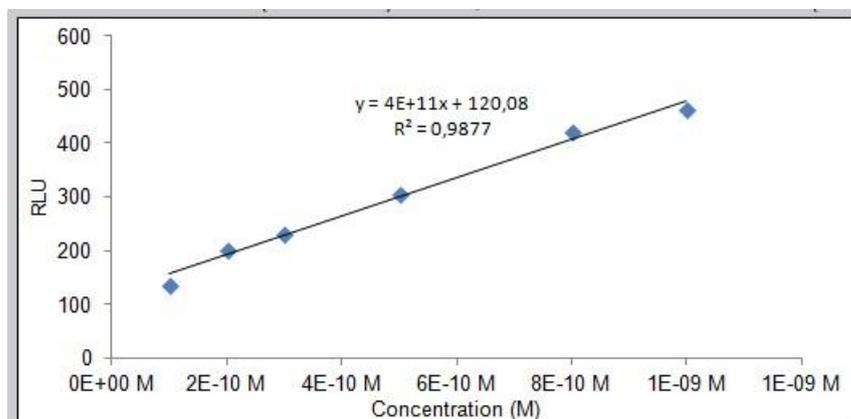
Eine T_3 -Standardreihe wurde auf jeder Platte aufgetragen.

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

Akzeptanzkriterium: Regressionskoeffizient $\geq 0,97$

In der Abbildung 12 ist zu erkennen, dass der Regressionskoeffizient dem Akzeptanzkriterium entspricht.

Abbildung 12: Linearität der Standardreihe der Mikrotiterplatte "TR-CALUX Reinsubstanz ED8" vom 27.9.2013



Erfüllung der Nachweisgrenze

Die Nachweisgrenze (LOD - limit of detection) wurde über den DMSO - Blindwert und die Standardabweichung berechnet.

- Messung des DMSO - Blindwerts in Dreifachbestimmung/Platte
- Messung des T₃ -Standards C (2*10⁻¹⁰ M) in Dreifachbestimmung
- Berechnung der Nachweisgrenze: MW Standard A (DMSO)
+ 3*Standardabweichung Standard A

LOD = MW + 3* STABW

*Akzeptanzkriterium: T₃ -Standard dotiert mit 2*10⁻¹⁰ M (Mittelwert aus Dreifachbestimmung) > Nachweisgrenze*

Die Abbildung 13 zeigt die Erfüllung der Nachweis- und der Bestimmungsgrenze in Platte "TR-CALUX Reinsubstanz ED8".

Abbildung 13: Bestimmungs- und Nachweisgrenze in Platte "TR-CALUX Reinsubstanz ED8"

Standardreihe		
DHT [M]	MW [RLU]	RSD [%]
BW DMSO	82	9%
1E-10 M	137	9%
2E-10	202	6%
3E-10 M	232	5%
5E-10	306	7%
8E-10 M	421	10%
1E-09	463	9%
1E-07 M	753	8%
LOD berechnet [RLU]:	104	
LOQ berechnet [RLU]:	155	
Slope	3,59E+11	Intercept 120,077
R2	0,987717	

Erfüllung der Bestimmungsgrenze

Die Bestimmungsgrenze (LOQ – limit of quantitation) wurde über den Standard A (DMSO) und die Standardabweichung berechnet.

MATERIAL UND METHODEN

- Messung Standard A in Dreifachbestimmung/Platte
- Messung des T₃-Standards E (5*10⁻¹⁰ M) in Dreifachbestimmung
- Berechnung der Bestimmungsgrenze: Mittelwert Standard A + 10*Standardabweichung Standard A

$$\text{LOQ} = \text{MW} + 10 * \text{STABW}$$

*Akzeptanzkriterium: T₃-Standards mit 5*10⁻¹⁰ M (Mittelwert aus Dreifachbestimmung) > Bestimmungsgrenze*

Auf der Platte " TR-CALUX Reinsubstanz ED8" lag die Bestimmungsgrenze innerhalb des Akzeptanzkriteriums (siehe Abbildung 13).

Expositionsdauer

Die Inkubationszeit der Zellen mit den zugesetzten Lösungen musste einer bestimmten Dauer entsprechen.

Akzeptanzkriterium: 20 bis 24 Stunden

Induktionsfaktor der Standardreihe

Der Unterschied zwischen dem niedrigsten und dem höchsten Standard der Standardreihe wurde mit dem Induktionsfaktor festgestellt.

- Messung der T₃-Standards A und H in Dreifachbestimmung/Platte
- Berechnung des Induktionsfaktors (IF)

$$\text{IF} = \text{MWStandard H} / \text{MWStandard A}$$

Akzeptanzkriterium: IF mindestens 5

Zellwachstum

Das Wachstum der Zellen wurde am dritten Versuchstag mikroskopisch beurteilt.

- Optische Begutachtung im Mikroskop: Zellzahl und Zellform mussten mit Standardreihe und Blindwerten übereinstimmen

MATERIAL UND METHODEN

- Alternativ dazu wurde zu jeder CALUX-Testreihe ein Cytotox-CALUX mit gleicher Probe angesetzt. Die verwendeten Zellen enthalten keine Hormonrezeptoren.

Akzeptanzkriterium:

Optische Begutachtung im Mikroskop: Zellen in den Probenwells unterscheiden sich optisch nicht signifikant von den Zellen im DMSO-Blindwert.

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

4 Ergebnisse und Diskussion

Die Ergebnisse der Validierung werden gleichzeitig mit der Durchführung des Validierungsschrittes erklärt. Die Ergebnisse von Proben und Reinsubstanzen werden im Anschluss besprochen.

4.1 Validierung

Bei der Validierung wurden die Unsicherheit des Analyseresultates und die Robustheit der Methode festgestellt.

4.1.1 Tests auf Unsicherheit des Analyseresultates

Die Wiederfindung, die Wiederholbarkeit und die Reproduzierbarkeit der Analyseergebnisse wurden geprüft. Die Auswirkungen der nachfolgenden Parameter auf die Ergebnisse der mit T₃ dotierten Extrakte (Spike E, Spike F) wurden bestimmt.

4.1.1.1 Wiederfindung

Bei der Wiederfindung wurde getestet, ob die Methode für die Quantifizierung von T₃ geeignet ist. Die Wiederfindungsrate entspricht dem Quotienten aus zugegebener, und mittels Analyse wiedergefundener Menge T₃.

Zur Überprüfung der Wiederfindung wurden zwei Probenextrakte, welche keine Triiodthyroninaktivität aufwiesen, mit 0,5 nmol/L (Spike E) und mit 0,8 nmol/L (Spike F) T₃ dotiert und die T₃-aktivität im CALUX-Bioassay nachgewiesen.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Mikrotiterplatte. Es wurden 6 Platten/Spike verwendet.
- Wiederfindung in Prozent= (MWSpoke E, F - MWProbe) / Referenzwert

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse Wiederfindung des 500 pM und des 800 pM Spikes:

	MWSpike - MWProbe	Soll (Referenzwert)	Wiederfindung (Ist/Soll)
Spike E	593,12	500	119%
Spike F	854,40	800	107%

Akzeptanzkriterium: Wiederfindung zwischen 75 und 125%

Die ermittelte Wiederfindung liegt zwischen 107 und 119 % innerhalb des Akzeptanzkriteriums.

4.1.1.2 Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit spiegelt die Genauigkeit der Messwerte von unabhängigen Wiederholungsmessungen unter folgenden Wiederholbarkeitsbedingungen:

- gleiches Labor,
- gleicher Analytiker und
- gleiches Gerät

an einem Tag wieder.

Zur Bestimmung der Wiederholbarkeit wurden die im Punkt Wiederfindung beschriebenen Proben verwendet. Es wurden 8 Platten angesetzt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Mikrotiterplatte

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

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse Test auf Wiederholbarkeit

Probe	Mittelwert [pM]	SD	RSD
Spike E	731,19	48,61	7%
Spike F	902,09	96,45	11%

Wiederholbarkeit: RSD ≤ 20%

Die Wiederholbarkeit der Methode war gegeben, da der Variationskoeffizient bei beiden Proben unter 20 % lag und das Akzeptanzkriterium erfüllt wurde.

4.1.1.3 Reproduzierbarkeit

Die Reproduzierbarkeit ist die Präzision der Messwerte unter den Wiederholungsbedingungen an 5 unterschiedlichen Tagen in einen Zeitraum von 30 Tagen.

Zur Bestimmung der Reproduzierbarkeit wurden die im Punkt Wiederfindung beschriebenen Proben verwendet. Die Anzahl der Platten/Tag variierte zwischen 2 und 8.

- Messung der mit T₃ dotieren Proben in Dreifachbestimmung/Mikrotiterplatte

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

Ergebnisse Tests auf die Reproduzierbarkeit

Probe	Mittelwert/Tag [pM]					Mittelwert [pM]	SD	RSD
Spike E	670,79	634,15	746,24	696,26	731,19	695,72	45,34	7%
Spike F	915,07	934,65	904,29	1001,00	902,09	931,42	40,97	4%

Reproduzierbarkeit: RSD ≤ 20%

Die aufgelisteten Messwerte zeigen, dass das Akzeptanzkriterium für die Reproduzierbarkeit erfüllt wurde, da der Variationskoeffizient beider Proben unter

20% lag. Die relative Standardabweichung bei der Reproduzierbarkeit über einen Zeitraum von einem Monat lag in einem ähnlichen Bereich wie die RSD beim Test auf Wiederholbarkeit an einem Tag. Daraus kann geschlossen werden, dass der TR-CALUX eine gut wiederholbare Methode ist.

4.1.2 Robustheit

Unter Robustheit versteht man die Unempfindlichkeit der Analysemethode gegenüber Veränderungen von Kenndaten. Mögliche kritische Faktoren der Durchführung des Bioassays wurden definiert und ihre Auswirkungen auf das Analyseergebnis bestimmt. Anhand dieser Faktoren wurde im Vorfeld ein Validierungsprogramm erstellt. Die Triiodthyroninaktivität der Spikelösungen E und F aus den Kontrollplatten wurden mit den Mikrotiterplatten des Validierungsschrittes verglichen.

4.1.2.1 Personenbezogener Einfluss

Um die Reproduzierbarkeit der Analysemethode im Realbetrieb festzustellen, wurde der CALUX-Bioassay an einem Tag von zwei verschiedenen Personen angesetzt und durchgeführt. Es wurden pro Analytiker zwei Platten angesetzt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte/Person

Ergebnisse Intermediate Precision

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
Person 1	746,24	13,85	2	904,29	44,17	5
Person 2	757,47	41,78	6	909,86	98,42	11

Akzeptanzkriterium: RSD ≤ 20%

Die Ergebnisse der Intermediate Precision zeigen, dass das Akzeptanzkriterium für beide Proben erfüllt wurde. Die Reproduzierbarkeit im Laborbetrieb ist dadurch gegeben und die durchführende Person hat keinen Einfluss auf das Testergebnis.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.2.2 Einfluss der Cryovialcharge

Der Einfluss des verwendeten Cryovials auf das Testergebnis wurde geprüft. Der Bioassay wurde hierfür am selben Tag von der gleichen Person mit jeweils einem unterschiedlichen Tag hergestelltem Cryovial angesetzt und durchgeführt. Für jedes Cryovial wurden jeweils drei Platten angesetzt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte/Cryovial

Ergebnisse Einfluss der Cryovialcharge auf das Testergebnis

	Spike E (500pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
Cryovial 1	651,59	115,64	18	933,45	89,35	10
Cryovial 2	616,72	59,49	10	935,86	43,36	5

Akzeptanzkriterium: Mittelwert (Cryovial 1) = Mittelwert (Cryovial 2) +/- 20%

Die Analyseergebnisse der beiden Proben lagen innerhalb des Akzeptanzkriteriums.

Die Charge des Cryovials hatte keine Auswirkung auf das Testergebnis.

4.1.2.3 Anwachsdauer der CALUX-Zellen auf der 96-Well-Platte

Am ersten Untersuchungstag wurde die Zellsuspension in die Mikrotiterplatte pipettiert und für 24 Stunden zur Inkubation in den Wärmeschrank gestellt. Bei diesem Test wurde die Anwachsdauer der Zellen auf der Mikrotiterplatte auf 20 Stunden reduziert. Gleichzeitig wurden ebenfalls drei Platten mit 24 Stunden Anwachszeit angesetzt und durchgeführt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte/Anwachsdauer

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse Verkürzte Anwachsdauer am ersten Untersuchungstag

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
20 Stunden	671,61	93,21	14	993,40	62,99	6
24 Stunden	616,71	59,49	10	935,85	43,36	5

Akzeptanzkriterium: Mittelwert (24 Stunden) = Mittelwert (20 Stunden) +/- 20%

Das Akzeptanzkriterium wurde nicht überschritten, eine kürzere Anwachsdauer hatte keinen Einfluss auf das Ergebnis.

4.1.2.4 Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Substanzlösungen

Am zweiten Untersuchungstag wurden die Zellen mit den Standard- und Probenlösungen beimpft und für 24 Stunden in den Brutschrank gestellt. Bei diesem Validierungsschritt wurde die Inkubationsdauer der CALUX-Zellen mit den Substanzlösungen auf 20 Stunden minimiert. Gleichzeitig wurde ebenfalls zwei Platten zur Kontrolle angesetzt, welche für 24 Stunden im Brutschrank zur Inkubation waren.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte/Inkubationsdauer

Ergebnisse Einfluss einer Inkubationszeit von 20 Stunden auf das Testergebnis

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
20 Stunden	786,36	40,67	5	969,68	59,02	6
24 Stunden	746,24	13,85	2	904,29	44,17	5

Akzeptanzkriterium: RSD ≤ 20%

Die RSD bei beiden Proben lag unterhalb des Akzeptanzkriteriums. Die Anwachsdauer kann somit zwischen 20 und 24 Stunden variieren. Das Testergebnis wurde dadurch nicht beeinflusst.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.2.5 Dauer der Zellen ohne Medium

Am zweiten Versuchstag wurde das Zellmedium abgesaugt und sofort die Standard- und Probenmatrizen zugegeben. Im Zuge der Validierung wurden nach dem Absaugen und vor Zugabe der Matrizen die Zellen 5 Minuten "trocken" und mit geschlossenem Deckel in der Sterilwerkbank aufbewahrt. Es wurden 2 Platten angesetzt. Auf jeder Platte befanden sich die Standardreihen in den oberen drei Reihen. Die unteren drei Reihen (10 Wells/Reihe) wurden jeweils zur Hälfte in Kontrolle (sofort) und Validierungsschritt (5 Minuten) aufgeteilt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Dauer

Ergebnisse ermittelter Einfluss auf die Analysenergebnisse durch Austrocknen der Zellen

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
5 Minuten	717,83	49,48	7	1084,22	17,77	2
Sofort	684,12	40,42	6	979,74	85,75	9

Akzeptanzkriterium: RSD ≤ 20%

Beide Ergebnisse liegen innerhalb des Akzeptanzkriteriums. Wenn die Zellen bis zu 5 Minuten ohne der Zugabe der Substanzlösungen sind, wird dadurch das Testergebnis nicht verfälscht.

4.1.2.6 Dauer der Färbereaktion in der durchsichtigen 96-Well-Platte

Auf die Zellen wurde eine bestimmte Menge Färbelösung aufgetragen und nach 10minütiger Reaktionsdauer in eine weiße Mikrotiterplatte überführt. Für die Validierung wurde die Reaktionsdauer auf 30 Minuten erhöht. Für die Durchführung dieses Validierungsschritts wurden zwei Platten angesetzt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Dauer

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Ergebnisse ermittelter Einfluss auf die Analyseergebnisse bei einer verlängerten Reaktionsdauer am dritten Untersuchungstag

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
30 Minuten	748,69	92,42	12	985,76	4,99	1
10 Minuten	731,19	48,61	7	902,09	96,54	11

Akzeptanzkriterium: RSD \leq 20%

Die Analysewerte bei einer Reaktionsdauer der Färbelösung mit den Zellen lagen innerhalb des Akzeptanzkriteriums. Die Dauer der Färbereaktion zwischen 10 und 30 Minuten hatte somit keinen Einfluss auf das Testergebnis.

4.1.2.7 Mischen der Zellsuspension mit der Färbelösung

Die berechnete Menge Färbereagenz wurde auf die Zellsuspension mit einer Pipette aufgetragen, aber nicht vermischt. Bei diesem Test wurde die Intensität der Vermischung von Zellsuspension und Färbelösung untersucht. Es wurden 2 Platten angesetzt die Lösungen mit der Pipette auf- und abgezogen.

- Messung der Standardreihe und der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte

Ergebnisse ermittelter Einfluss auf die Analyseergebnisse mit intensiver Vermischung von Zellsuspension und Färbereagenz

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
Mischen	778,29	72,50	9	1084,22	18,45	2
Kontrolle	734,80	48,55	7	979,74	35,92	3

Akzeptanzkriterium: RSD \leq 20%

Die Ergebnisse befanden sich innerhalb des Akzeptanzkriteriums und ein Einfluss der Intensität der Vermischung mit der Pipette auf das Ergebnis konnte somit ausgeschlossen werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

4.1.2.8 Dauer der Färbereaktion in der weißen 96-Well-Platte

Nach 10minütiger Inkubationsdauer der Zellsuspension mit der Färbelösung wurden die Gesamtvolumina der Substanzgemische in eine weiße 96-well-Platte pipettiert und sofort mit dem Photometer gemessen. Durch eine wiederholte Messung 30 Minuten nach der Erstmessung wurde ein möglicher Einfluss auf die Ergebnisse festgestellt. Es wurden zwei Platten angesetzt.

- Messung der mit T₃ dotierten Proben in Dreifachbestimmung/Platte

Ergebnisse ermittelter Einfluss auf die Analyseergebnisse bei 30minütiger Wartezeit vor der Messung

	Spike E (500 pM)			Spike F (800 pM)		
	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)	Mittelwert [pM]	SD	RSD (%)
30 Minuten	441,72	13,97	3	600,36	57,06	10
Sofort	412,04	9,35	2	640,76	25,60	4

Akzeptanzkriterium: RSD ≤ 20%

Die Ergebnisse für beide Proben liegen innerhalb des Akzeptanzkriteriums. Eine Reaktionsdauer von bis zu 30 Minuten hatte somit keinen Einfluss auf das Testergebnis.

4.2 Reinsubstanzen

Im Zuge dieser Masterarbeit wurden 12, in der Literatur mit thyroider Aktivität erwähnten, Reinsubstanzen mit dem TR-CALUX getestet.

4.2.2 Negative Ergebnisse

Die Reinsubstanzen wurden in DMSO gelöst (siehe Material und Methoden) und mit dem TR-CALUX auf agonistische und antagonistische Aktivität getestet. Eine Stimulierung oder Hemmung der Substanzen auf die T₃-Hormonrezeptoren der Osteoblasten konnte bei 8 Reinsubstanzen (siehe Tabelle 15) nicht festgestellt werden.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 16: 8 Reinsubstanzen mit unauffälligen Analyseergebnissen

Reinsubstanz	CAS-#	[μ M/L]	Verdünnungen
Methyl-p-hydroxybenzoate (Methylparaben)	99-76-3	[0,005 - 500]	7
Ethyl-4-hydroxybenzoate (Ethylparaben)	120-47-8	[0,005 - 500]	7
Diethylhexyl adipate	103-23-1	[0,5 - 500]	7
Resorcinol 1,3-dihydroxybenzene	108-46-3	[0,5 - 500]	7
Bis(2-ethylhexyl)phtalate (DEHP)	117-81-7	[0,5 - 500]	7
Diisodecyl phtalate (DiDP)	26761-40-4	[0,5 - 500]	7
Di-n-octylphtalate	117-84-0	[0,5 - 500]	7
Butyl benzyl phtalate (BBP)	85-68-7	[0,5 - 100]	9

4.2.3 Falsch positive Ergebnisse

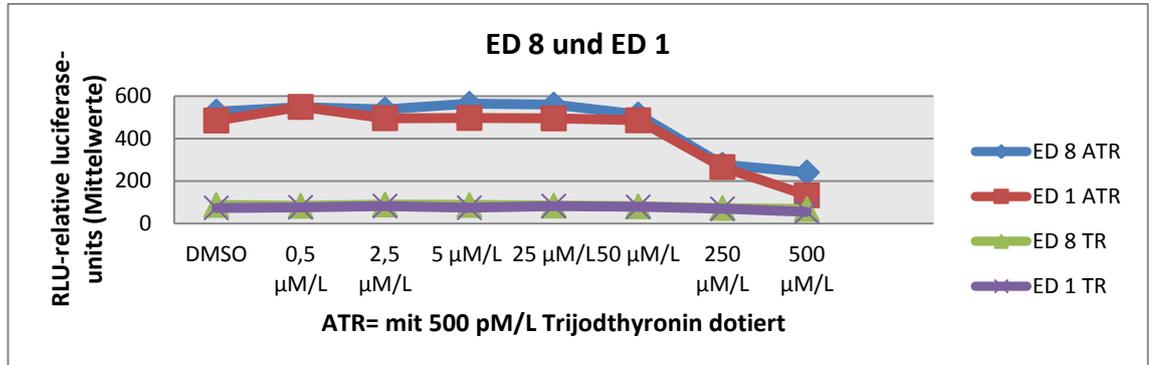
In zwei Fällen (siehe Tabelle 17) kam es zur Inhibierung der Luciferase-Leuchtreaktion durch einen unbekanntem Analyten.

Tabelle 17: Reinsubstanzen, welche die Leuchtreaktion bei der Messung im ATR-CALUX und Cytotox-CALUX verhinderten

Reinsubstanz	CAS-#	[μ M/L]	Verdünnungen
4-Chloro-3-methyl-phenol (CMP)	59-50-7	[0,5 - 500]	7
Dibutylphtalate (DBP)	84-74-2	[0,5 - 500]	7

Bei der Analyse auf antithyroide Aktivität wurden mittels ATR-CALUX vermutlich antagonistische Effekte detektiert (siehe Abbildung 14).

Abbildung 14: Falsch positive Ergebnisse



Diese vermutlich antagonistischen Effekte zeigten sich bei den gleichen Konzentrationen auch im parallel angesetzten Cytotox-CALUX. Dies deutete darauf hin, dass keine receptorspezifische Inhibierung stattgefunden hat, sondern die Leuchtreaktion des Bioassays gestört wurde. Durch welche Substanz die Leuchtreaktion gestört wurde, kann mit dem Bioassay nicht festgestellt werden. Die mikroskopische Kontrolle war negativ, das Zellwachstum war unbeeinflusst.

Dies führt zu der Annahme, dass unbekannte Analyten die Leuchtreaktion inhibierten. Diese beiden Reinsubstanzen inhibierten somit nicht die T₃-Hormonrezeptoren der Osteoblasten und wurden als falsch positive Ergebnisse verzeichnet womit die antithyroide Aktivität relativiert wurde.

4.2.4 Kontamination und Zelltoxizität

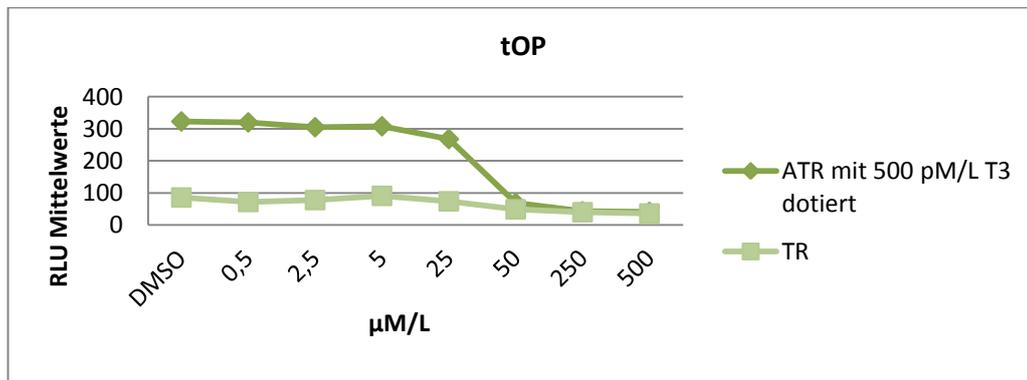
Bei zwei Reinsubstanzen (siehe Tabelle 18) wurden bei der mikroskopischen Untersuchung am dritten CALUX-Tag Kontaminationen oder Zelltoxizität festgestellt.

Tabelle 18: Reinsubstanzen mit Kontamination/Zelltoxizität

Reinsubstanz	CAS-#	[µM/L]	Verdünnungen
n-Propyl-p-hydroxybenzoate (Polyparaben)	94-13-3	[0,005 - 500]	7
4-Tert-octyl phenol (tOP)	140-66-9	[0,5 - 500]	7

Bei der Reinsubstanz tOP wurde ab der Konzentration 50 $\mu\text{M/L}$ eine Zelltoxizität festgestellt. Die Zellen unterschieden sich signifikant von den Zellen der Standardreihe. Die Menge der abgestorbenen Zellen wurde in Prozent angegeben. Auf allen Testplatten wurde die gleiche Zelltoxizität bei den gleichen Konzentrationen [50 - 500 $\mu\text{M/L}$] festgestellt. Die Ergebnisse des CALUX-Assays der Reinsubstanz tOP konnten deswegen nur bis zur Konzentration von 25 $\mu\text{M/L}$ ermittelt werden (siehe Abbildung 15). Die Ergebnisse waren unauffällig, somit konnte bei tOP bis zur beschriebenen Konzentration keine Wirkung auf die T_3 -Hormonrezeptoren der Osteoblasten festgestellt werden. Bei der Reinsubstanz Polyparaben wurde in der höchsten Konzentration (500 $\mu\text{M/L}$) eine Kontamination festgestellt, welche sich bei der mikroskopischen Beurteilung in Form von Kristallen zeigte.

Abbildung 15: Mittelwerte der RLU von TR- und ATR-CALUX der Reinsubstanz tOP



4.3 Proben

Bei den analysierten Proben konnte mittels des CALUX-Reporterassays keine thyrogene Aktivität nachgewiesen werden.

Bei drei Proben (14, 23, 28) wurden bei der mikroskopischen Begutachtung Kontaminationen und zelltoxische Effekte festgestellt. Bei einer wiederholtem Test mit Verdünnungen der Probenlösungen (1:5 und 1:10) fiel die optische Begutachtung negativ aus.

5 Schlussbetrachtung

Die Validierung des Bioassays TR-CALUX sowie die Untersuchung von Probenmaterial auf thyroide Aktivitäten mit dem in-vitro-Reportergenassay TR-CALUX waren die Ziele dieser Masterarbeit. Zusätzlich wurden bereits in der Literatur erwähnte thyrogene Disruptoren (in Reinform) ebenfalls mit dem TR-CALUX getestet. Der Bioassay basiert auf Verwendung der transgenen humanen Osteosarcoma Zelllinie U2OS, welche von BioDetection Systems (Niederlande) zur Verfügung gestellt worden ist. Diese Zellen exprimieren Schilddrüsenhormon-Rezeptoren mit Affinität für Trijodthyronin (T_3). Nach der Zugabe eines Färbereagens (Luciferin) können thyroide und antithyroide Aktivitäten von Probenmatrizen bei der luminometrischen Messung aufgezeigt werden. Der CALUX-Bioassay liefert die Ergebnisse nach 72 Stunden.

Die Validierung wurde durchgeführt um festzustellen, ob der CALUX-Bioassay eine geeignete Methode für den Routinebetrieb ist. Hierfür wurde ein Validierungsprogramm erstellt mit dem die Unsicherheit des Analyseresultates (mittels Wiederfindung, Wiederholbarkeit und Reproduzierbarkeit) und die Robustheit der Methode geprüft wurden. Für die Validierung wurden zwei mit Trijodthyronin dotierte Extrakte verwendet und die Auswirkungen der Validierungsparameter auf die Ergebnisse gemessen.

Die Wiederfindung an einem Tag (Quantifizierung) lag zwischen 75 und 125%. Bei der Wiederholbarkeit an einem Tag (Genauigkeit) und der Reproduzierbarkeit über einen längeren Zeitraum (Präzision) wurden ebenfalls gute Werte erreicht. Die Robustheit wurde mit acht verschiedenen Validierungsschritten getestet. Alle Ergebnisse lagen innerhalb des Akzeptanzkriteriums (20%).

Der lineare Bereich der Trijodthyronin-Standardreihe lag zwischen den Konzentrationen 10^{-10} – 10^{-7} M pro Well der Mikrotiterplatten. Die Nachweisgrenze des TR-CALUX lag bei 200pM/L, die Bestimmungsgrenze bei 500pM/L Trijodthyronin.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Anhand der Validierung wurde bestätigt, dass der TR-CALUX eine robuste und reproduzierbare Methode ist, um Lebensmittelsimulanzien auf thyroide bzw antithyroide Aktivitäten zu testen. Diese Methode erlaubt einen hohen Probendurchsatz.

Insgesamt wurden 29 handelsübliche Lebensmittelkontaktmaterialien auf thyroide und antithyroide Wirkungen getestet. Für die Herstellung der Simulanzlösungen wurden die Verpackungsproben mit den passenden Lebensmittelsimulanzien befüllt. Bei der Lagerung der Lebensmittelkontaktmaterialien mit den Simulanzlösungsmitteln wurde nach dem "worst-case" Prinzip gehandelt mit dem Zweck, eine maximale Migration von Substanzen aus der Verpackung in die Lösungsmittel zu erreichen. Das "worst-case" Prinzip beinhaltet die Simulation von Bedingungen (zB erhöhte Temperatur), denen verpackte Lebensmittel bei der Lagerung im Normalfall nicht ausgesetzt werden.

Getestet wurden 9 Getränkeverbundkartons, 12 Lebensmittelverpackungen aus PP, PS und PET, 7 Dosen und eine Folie. Jedes Migrat wurde im dreifachen Ansatz auf thyroide bzw antithyroide Aktivität getestet. Bei all diesen 29 Proben fielen die Analyseergebnisse negativ aus. Das bedeutet, dass in den im Rahmen der Masterarbeit verwendeten Verpackungen, mit dem TR-CALUX keine endokrine Aktivität nachgewiesen werden konnte. In den Literaturdaten konnten ebenfalls keine Hinweise zu Thyroidaktivitäten von Verpackungen ausfindig gemacht werden.

Zusätzlich wurden 12 Reinsubstanzen mit in der Literatur erwähnter thyroider Aktivität mit dem TR-CALUX getestet. Die in DMSO gelösten Reinsubstanzen wurden in Konzentrationen zwischen 5×10^{-9} bis 5×10^{-4} M (Ethyl-, Methyl- und Polyparaben) und 5×10^{-7} bis 5×10^{-4} M (Diethylhexyl adipate , Resorcionl, DEHP, DiDP, Di-n-octylphthalate, BBP, DBP, CMP, tOP) verwendet. Eine Stimulierung oder Hemmung auf die T_3 -Hormonrezeptoren der Osteoblasten konnte nicht festgestellt werden. Bei zwei dieser Reinsubstanzen (CMP und DBP) kam es am letzten Untersuchungstag zu einer Inhibierung der Leuchtreaktion, was zu falsch positiven Ergebnissen beim ATR-CALUX

SCHLUSSBETRACHTUNG

fürte. Die mikroskopische Kontrolle der Zellen war unauffällig. Bei den parallel angesetzten Cytotox-Platten kam es ebenfalls zu dieser Inhibierung, worauf schließen lässt, dass ein unbekannter Analyt die Leuchtreaktion verhinderte. Für eine ausreichende Interpretation der CALUX-Ergebnisse sind die mikroskopischen Kontrollen sowie die gleichzeitige Verwendung von Cytotox-Platten unerlässlich. Die Reinsubstanz *Polyparaben* war in der höchsten Konzentration (5×10^{-4} M) nicht auswertbar, da in der mikroskopischen Kontrolle Kontaminationen sichtbar waren. Die Reinsubstanz *4-tert-Octyl Phenol* (tOP) wirkte ab einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ M zelltoxisch.

Folgende im Rahmen dieser Masterarbeit verwendeten Reinsubstanzen (BBP, DBP, DIDP, DEHP, tOP, CMP und Resorcinol) wurden in der Studie von Ghisari & Bonefeld-Jorgensen (2009) positiv auf thyroide Aktivitäten getestet. Verwendet wurden Hypophysenzellen der Zelllinie GH3 von Ratten, welche intrazellulär Schilddrüsenhormon-Rezeptoren exprimieren. Die getesteten Reinsubstanzen (10^{-10} bis 5×10^{-5} M) hatten alle einen signifikanten Effekt auf das Zellwachstum. DEHP, DINP und DBP wirkten bei physiologischen T_3 -Konzentrationen inhibierend auf das Zellwachstum, während tOP, BBP, CMP und Resorcinol eine stimulierende Wirkung zeigten (Ghisari & Bonefeld-Jorgensen 2009). Die geringsten gemessenen Konzentrationen (DEHP 5×10^{-6} M; DiDP 5×10^{-5} M; BBP 10^{-6} M; CMP 10^{-6} M, DBP 5×10^{-6} M, Resorcinol 5×10^{-5} M) mit signifikantem Effekt auf das Zellwachstum lagen, mit Ausnahme der Substanz tOP (10^{-8} M), innerhalb der verwendeten Konzentrationen in dieser Masterarbeit.

Weiteres zeigten sich bei der Substanz tOP ab einer Konzentration von $2,5 \times 10^{-5}$ M zelltoxische Effekte auf die CALUX-Zellen. In der Studie von Ghisari & Bonefeld-Jorgensen zeigten sich zelltoxische Effekte ebenfalls bei einer Konzentration von 3×10^{-5} M (tOP). Die bei Ghisari & Bonefeld-Jorgensen verzeichnete Zelltoxizität von BBP und DEHP (5×10^{-5} M) auf die GH3 Zellen (Ghisari & Bonefeld-Jorgensen 2009), konnten im CALUX-Bioassay nicht bestätigt werden.

SCHLUSSBETRACHTUNG

Der TR-CALUX besitzt eine hohe Sensitivität und zeichnet sich als robuste und reproduzierbare Methode aus. Er basiert auf einer humanen Zelllinie und wäre deshalb gut geeignet Substanzen zu testen, die das menschliche Hormonsystem beeinflussen können. In Zusammenhang mit den Ergebnissen dieser Masterarbeit muss in Betracht gezogen werden, dass in einem in-vitro-Assay die Komplexität des menschliche Stoffwechsel nicht berücksichtigt werden kann. Aktivierungen bzw Deaktivierungen durch Stoffwechselprozesse bleiben bei einem in-vitro-Bioassay unbeachtet. Gegebenenfalls entfalten endokrine Substanzen erst in Form ihrer Metabolite (etwa durch Hydroxylierung oder Glucuronisierung) ihr Wirkungspotenzial. Steigernde oder hemmende Aktivitäten von Metaboliten bleiben somit beim TR-CALUX unbemerkt. In der Literatur (Tabb & Blumberg, 2013; Boas et al., 2013) gibt es Hinweise, dass thyrogene Disruptoren auch andere Wirkmechanismen als die Bindung an den Schilddrüsenhormon-Rezeptoren beeinträchtigen.

Die negativen Ergebnisse aller getesteten Proben und Reinsubstanzen deuten darauf hin, dass thyrogene Disruptoren an anderen Wirkorten als an den Schilddrüsenhormon-Rezeptoren eingreifen könnten. Mögliche Wirkungsorte thygener Disruptoren können die Hormonsynthese (NIS, TPO- oder TSH-Rezeptor), die Transportproteine, die zelluläre Aufnahme, die Deiodinase und schließlich der Katabolismus der Schilddrüsenhormone in der Leber sein(Boas et al., 2013). Mit dem CALUX-Bioassay ist nur ein Ausschnitt des gesamten Wirkungspotentiales thyroidaktiver Substanzen messbar: Die Bindung von Substanzen an den Schilddrüsenhormon-Rezeptor sowie die anschließende Genaktivierung.

Für die Untersuchung sämtlicher Wirkungsmechanismen von thyrogenen Disruptoren im Organismus bedarf es weiterer Forschungsmethoden.

Im Gegensatz zu Erwachsenen sind Föten empfindsamer gegenüber hormonellen Veränderungen und haben ein erhöhtes Risiko für die negativen Folgen einer Exposition mit thyrogenen Disruptoren. Schilddrüsenhormone spielen eine bedeutsame Rolle bei der Gehirnentwicklung während der Schwangerschaft, daher

SCHLUSSBETRACHTUNG

können sich eventuelle Schäden bei der Gehirnreifung während dieser Entwicklungsstufe nachteilig auf intellektuelle Fähigkeiten und kognitive Lernfähigkeiten von Kindern auswirken (Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland, 2001). Es gilt die menschliche Gesundheit, besonders der Personen der Risikogruppen, zu schützen und vor der Exposition von thyrogenen Disruptoren zu bewahren.

In Anbetracht der Bedeutung einer funktionierenden Hormonhomöostase für die menschliche Gesundheit und der Quantität an hormonell aktiven Substanzen in der Umwelt, besteht bei der Prüfung der potentiellen Wirkung auf den Menschen, sowie der Wirkungsweise thyrogener Disruptoren auf den menschlichen Organismus weiterer Forschungsbedarf.

In den untersuchten Verpackungen waren mit dem TR-CALUX keine thyroidaktiven Substanzen nachweisbar. Da dieser Nachweis, im Gegensatz zum Nachweis von östrogen- bzw androgen aktiven Substanzen in Lebensmittelverpackungen (Kirchnawy et al., 2013; Mertl et al., 2014) nicht erbracht worden ist, ist diese Problematik im Bezug auf die Schilddrüsenhormone vermutlich von geringerer Bedeutung.

Literaturverzeichnis

AGES (2011) Dioxin und PCB. Internet:

<http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/rueckstaende-kontaminanten/dioxine-und-pcb/faqs-dioxin-und-pcb/> (04.11.2013)

AGES (2012) FAQ zu Schadstoffübergängen in Lebensmitteln verursacht durch Verpackungen. Internet:

<http://www.ages.at/ages/ernaehrungssicherheit/rueckstaende-kontaminanten/schadstoffuebergaenge-in-lebensmitteln-verursacht-durch-verpackungen/> (04.11.2013)

AGES (2005) Jodgehalt in Seetang. Internet:

http://www.ages.at/uploads/media/Jod_in_Seetang_02.pdf (29.10.2013)

Bayrisches Landesamt für Umwelt (2008) Polychlorierte Biphenyle, Augsburg. Internet:

http://www.lfu.bayern.de/umweltwissen/doc/uw_53_polychlorierte_biphenyle_pcb.pdf (4.11.2013)

BDS Netherlands (2009) Reporter gene bioassays for detection of very low levels of compounds. Food for Thought (2).

Bernal J, Guadano-Ferraz A, Morte B (2003) Perspectives in the study of thyroid hormone action on brain development and function. *Thyroid* 13, 1005-1012

Bernal J (2005) Thyroid hormones and brain development in *Vitamins & Hormones*, Madrid, Volume 71, Pages 95–122. Internet:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16112266?dopt=Abstract> (29.10.2013)

Boas M, Feldt-Rasmussen U, Skakkebaek N, Main K (2006) Environmental chemicals and thyroid function, Dänemark, European society of endocrinology. Internet:

<http://www.eje-online.org/content/154/5/599.full> (4.11.2013)

Bund für Umwelt und Naturschutz Deutschland (2001) Hormonaktive Substanzen im Wasser, Berlin. Internet: [http://www.bund-](http://www.bund-lemgo.de/download/umweltschutz/hormonaktive-substanzen-im-wasser.pdf)

[lemgo.de/download/umweltschutz/hormonaktive-substanzen-im-wasser.pdf](http://www.bund-lemgo.de/download/umweltschutz/hormonaktive-substanzen-im-wasser.pdf) (10.9.2014)

Bundesamt für Gesundheit Deutschland (2012) Hormonaktive Chemikalien, Bern.

Internet:

http://www.google.com/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&frm=1&source=web&cd=1&ved=0CCcQFjAA&url=http%3A%2F%2Fwww.bag.admin.ch%2Fthemen%2Fchemikalien%2F00228%2F05072%2Findex.html%3Flang%3Dde%26download%3DNHzLpZeg7t%2Clnp6i0NTU042l2Z6ln1acy4Zn4Z2qZpnO2Yuq2Z6gpJCHdHt7gWym162epYbg2c_JjKbNoKSn6A--&ei=SxVoUrTNNeTF7Aadz4CYAw&usg=AFQjCNFqpX1BBIUBO15fcmgl0o4-0hM2Qw (23.10.2013)

LITERATURVERZEICHNIS

- Bundesinstitut für Risikoforschung Deutschland (2013) Weichmacher DEHP wird hauptsächlich über Lebensmittel aufgenommen. Internet: http://www.bfr.bund.de/de/presseinformation/2013/13/weichmacher_dehp_wird_hauptsächlich_ueber_lebensmittel_aufgenommen-186791.html (04.11.2013)
- Cohen-Lehman J, Dahl P, Danzi S, Klein I (2010) Effects of amiodarone therapy on thyroid function. *Nature Reviews Endocrinology* 6, 34-41. Internet: http://www.nature.com/nrendo/journal/v6/n1/fig_tab/nrendo.2009.225_F2.html (29.10.2013)
- Deetjen P, Speckmann E, Hescheler J (2005) *Physiologie*, München, Urban & Fischer, Seiten 764-794
- DeVito M, Biegel L et al (1999). Screening methods for thyroid hormone disruptors. *Environ Health Perspect. USA.* 107 (5): 407-415
- Dudel J, Jährig W, Zimmermann M, Schmidt R (1987) *Grundriss der Neuropsychologie*, Springer. Internet: <http://www.neurologen-und-psiater-im-netz.org/gehirn-nervensystem/quellen/> (14.12.2014)
- EFSA (2013) Endokrin aktive Substanzen. Internet: <http://www.efsa.europa.eu/de/faqs/faqs.htm> (29.10.2013)
- EFSA (2013) Pressemitteilung, 2013. Internet: <http://www.efsa.europa.eu/de/press/news/130320.htm> (29.10.2013)
- Faller A, Schünke M (2008) *Der Körper des Menschen*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, Seiten 361-362
- Funk W, Dammann V, Donnevert G (2005). *Qualitätssicherung in der Analytischen Chemie* (2 ed.). Weinheim: WILEY-VCH Verlag.
- Gärtner R (1995) Ätiopathogenese und Therapie der Jodmangesstruma, *ärztliche Fortbildung* 89, Seiten 27-31
- Ghisari M, Bonfeld-Jorgensen E (2005). Impact of environmental chemicals on the thyroid hormone function in pituitary rat GH 3 cells. Denmark. *Molecular and Cellular Endocrinology* 244, 31-41
- Ghisari M, Bonfeld-Jorgensen E (2009). Effects of plasticizers and their mixtures on estrogen receptor and thyroid hormone functions. Denmark. *Toxicology Letters* 189, 67-77
- Gentilcore D, Porreca I, Rizzo F, Ganbaatar E, Carchia E, Mallardo M, De Felice M, Ambrosino C (2013) Bisphenol A interferes with thyroid specific gene expression, Italien, *Toxicology*. Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300483X12004209> (29.10.2013)

LITERATURVERZEICHNIS

- Grininger A (2013) Validierung und Vergleich zweier in-vitro Reporterassays zur Bestimmung von Androgenagonisten & Androgenantagonisten in Migraten von Lebensmittelkontaktmaterialien, Wien, Diplomarbeit Universität für Bodenkultur
- Hagemann O (2014) Schilddrüsenhormone, Laborlexikon. Internet: <http://www.laborlexikon.de/index.html> (4.4.2014)
- Heseker K (1999) Jod. Funktionen, Physiologie, Stoffwechsel, Empfehlungen und Versorgung in der Bundesrepublik Deutschland, Ernährungs-Umschau 46, Seiten 55-59
- Hofmann P, Schomburg L, Köhrle J (2009) Interference of Endocrine Disrupters with Thyroid Hormone Receptor–Dependent Transactivation, Berlin, Toxicological sciences. Internet: <http://toxsci.oxfordjournals.org/content/110/1/125.full> (4.11.2013)
- Hopley L, Schalkwyk J (2005) Strukturformel PCB. Internet: <http://www.anaesthetist.com/icu/organs/endocr/thyroid/Findex.htm#thyfx.htm> (4.4.2014)
- Iwasaki T, Wataru Miyazaki W, Akira Takeshita A, Yoichiro Kuroda Y, Noriyuki Koibuchi N (2002) Polychlorinated biphenyls suppress thyroid hormone-induced transactivation, Japan, Biochemical and Biophysical Research Communications. Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006291X02026591> (04.11.2013)
- Jameda (2014) Gesundheitslexikon, Schilddrüse, Deutschland. Internet: <http://www.jameda.de/gesundheits-lexikon/bilder/big/506766.jpg> (4.4.2012)
- Jameson J, Weetman A (2012) Erkrankungen der Schilddrüse. Internet: http://www.eharrison.de/b2b-web/public/images/chapter/cp_H18_16_341 (4.11.2013)
- Kerschek C, Kolman J (2011) Schilddrüse – Erkrankungen wirksam behandeln, München, Medizin heute, Seiten 10 – 13
- Kirchnawy C (2010) Etablierung eines biologischen Testsystems zum Screening von Lebensmittelverpackungen auf östrogenwirksame Bestandteile, Wien, Diplomarbeit Universität für Bodenkultur, Seiten 10, 31
- Kirchnawy C, Mertl J, Osorio V, Hausensteiner H, Washüttl M, Bergmair J, Pyerin M, Tacker M (2014) Detection and Identification of Oestrogen-Active Substances in Plastic Food Packaging Migrates. Vienna. Packaging Technology and Science, Vol 26, Issue 6, pages 267-478
- Kitamura S, Kato T, Jinno N, Suzuki T (2005) Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis, Japan, Life Sciences Volume 76, Issue 14, Pages 1589–1601.

LITERATURVERZEICHNIS

- Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0024320504010148>
(4.4.2014)
- Kluthe B (2006) Schilddrüsenfunktion. Internet: <http://www.dr-kluthe.de/endokrinologie/Schilddruese/sd-funktion/> (22.11.2014)
- Konkol, L. (2005). Contaminant levels in recycled PET plastic, Swinburne University of Technology. Environment and Biotechnology Centre.
- Kromidas, S. (1999). Validierung in der Analytik. Weinheim: WILEY-VCH.
- Lévy-Bimbot M, Major G, Courilleau D, Blondeau J-P, Lévi Y (2012) Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function in vitro: Use of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding. Châtenay-Malabry (Frankreich), Chemosphere, Volume 87, Issue 7, Seiten 782–788. Internet:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045653512000094>
(30.10.2013)
- Löffler G (2004) Basiswissen Biochemie, Regensburg, Springer Verlag, Seiten 390,391, 468-495
- Mertl J (2010) Etablierung eines YES-Assays zum Screening von Lebensmittelverpackungen aus Polypropylen auf endokrine Disruptoren. Wien, Diplomarbeit Universität für Bodenkultur
- Mertl J, Kirchnawy C, Osioro V, Grininger A, Richter A, Bergmair J, Pyerin M, Washüttl M, Tacker M (2014) Characterization of Estrogen and Androgen Activity of Food Contact Materials by Different In Vitro Bioassays (YES, YAS, ER α and AR CALUX) and Chromatographic Analysis (GC-MS, HPLC-MS) Vienna
- Meyer-Lindenberg A, Hasler G (2014) Entwicklung von Gehirn und Nervensystem, Neurologen und Psychiater im Netz, Bern. Internet: <http://www.neurologen-und-psychiater-im-netz.org/gehirn-nervensystem/entwicklung/> (14.12.2014)
- Moriyama K, Tagami T, Akamizu T, Usui T, Saijo M, Kanamoto N, Hataya Y, Shimatsu A, Kuzuya H, Nakao K (2013) Thyroid Hormone Action Is Disrupted by Bisphenol A as an Antagonist, Kyoto, Journal of clinical endocrinology & metabolism. Internet: <http://press.endocrine.org/doi/full/10.1210/jc.2002-020209> (4.11.2013)
- Moriyama K, Tagami T, Usui T, Naruse M, Nambu T, Hataya Y, Kanamoto N, Li Y, Yasoda A, Arai H, Nakao K (2013) Antithyroid Drugs Inhibit Thyroid Hormone Receptor-Mediated Transcription, Kyoto, Journal of clinical endocrinology & metabolism. Internet: <http://jcem.endojournals.org/content/92/3/1066.full#F1> (4.11.2013)
- 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.

LITERATURVERZEICHNIS

- Oettmig A, Yen P (2007) New insights into thyroid hormone action. Baltimore, Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Volume 21, Issue 2, Seiten 193–208. Internet: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521690X07000346> (30.10.2013)
- Porterfield S.P (2000) Thyroidal dysfunction and environmental chemicals - potential impact on brain development. *Environ Health Perspect* 108, 433-438
- Schauder P, Ollenschläger G (2006) *Ernährungsmedizin*, Urban & Fischer, 3. Auflage, Seite 90
- Schmid K (2014) Schilddrüse, Lindau. Internet: <http://www.schilddruese-bodensee.de/schilddruese.html> (4.4.2014)
- Schmidt R, Lang F (2007) *Physiologie des Menschen*. Heidelberg, Springer Medizin Verlag, Seiten 28,29
- Sonneveld E, Jansen H, Riteco 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
- Spitzweg C, Heufelder A (1999) Der Natrium-Jodid-Symporter der Schilddrüse. Entdeckung, Charakterisierung, klinische Relevanz und Perspektiven, *Dtsch med Wschr* 124, Seiten 1077-1084
- Tabb M, Blumberg B (2013) *New Modes of Action for Endocrine-Disrupting Chemicals*, California, Molecular endocrinology. Internet: <http://mend.endojournals.org/content/20/3/475.full> (4.11.2013)
- Tacker M (2011) *Endokrine Disruptoren in Lebensmitteln und Verpackungen*, Ernährung/Nutrition, Volume 35, 7/8
- Van der Burg B, van der Linden S, Man H, 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.
- Weinberger C, Thompson CC, Ong ES, Lebo R, Gruol DJ, Evans RM (1986) The c-erb-A gene encodes a thyroid hormone receptor, *Nature* 324, Seiten 641-646
- Zhang J, Lazar M.A (2000) The mechanism of action of thyroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 62, 439-466
- Zitz U, Strobl M (2006) *Vorlesungsunterlagen - Qualitätsmanagement Übungen*, Validierungs Übersicht VA-Val01, Version 27.09.06. Universität für Bodenkultur, Wien

LITERATURVERZEICHNIS

Zoeller T.R, (2007) Environmental chemicals impacting the thyroid: targets and consequences. USA. *Thyroid* 17, 811-817

Zoeller T.R, Dowling A.L, Herzig C.T, Iannacone E.A, Gauger K.J, Bansal R (2002) Thyroid hormone brain development and the environment. *Environ Health Perspect* 110, 355-361

Lebenslauf

Susanne Melanie Greiner



■ Persönliche Daten

Geburtstag 09.05.1982 in Mürzzuschlag
Anschrift Große Mohrengasse 26/2/28; A – 1020 Wien
Telefon 0043/650/345 55 66
E-Mail susanne.melanie@outlook.com

■ Schulbildung

1992 - 1999 Gymnasium Franklinstraße 26 in Wien
1988 - 1992 Volksschule Dopschstraße in Wien

■ Ausbildung

2010 - Heute **Masterstudium** für Public Health Nutrition an der Universität Wien; Titel der Masterarbeit - Thyrogene Disruptoren in Verpackungsmaterialien

11. 2012 - 7. 2013 Ausbildung zur **Ernährungstrainerin** an der Vitalakademie Wien

2010 - 2011 **Erasmusstipendium** an der ULPGC in Gran Canaria, Spanien

07. 2010 **Bakkalaureat rerum naturalium**; Titel der Bakkalaureatsarbeit - Lebensmittelkennzeichnung: Erklärung der Begriffe "Bio" und "Fairtrade"

2006 – 2010 Bakkalaureatsstudium Ernährungswissenschaften an der Universität Wien

06. 2005 **Berufsreife**

2003 – 2005 Berufsreifeprüfung mit Schwerpunkt Naturwissenschaften, Lehrgang an der Maturaschule Dr. Roland in Wien

04. 2002 **Diplom für den medizinisch technischen Fachdienst**

LEBENS LAUF

1999 – 2002

Schule für den medizinisch technischen Fachdienst am AKH-Wien

■ Praktika

Jänner 2015

SIPCAN - Entwicklung von Lehrmodulen zum Thema Ernährung & Verhalten für die Grundschule, Wien

Juli 2012

Labor für Pestizidrückstände und Umweltgifte in Obst und Gemüse, Gran Canaria

■ Berufsleben

Seit 2013

Workshops zum Thema Ernährung für Schulklassen

7.2013

Kinderbetreuung bei der Fa. AGES

2010 - 2013

Snowboardlehrerin auf Schulschikursen und an der Skischule Heugenhauser (Saalbach)

2008 - 2010

Kinderbetreuung bei The Children's House – internationaler Montessori Kindergarten in Wien

2006 - 2008

Reiseleiterin bei Sportcamps der österreichischen Hochschülerschaft

2006 - 2008

Cafe-**Restaurant** Phönixhof in Wien

2002 - 2006

Ganztagsbeschäftigung als **medizinisch technische Fachkraft** in den Bereichen Röntgen und Labor am AKH in Wien

■ Sonstige Qualifikationen

Sprachkenntnisse

Englisch - in Wort und Schrift

Spanisch - in Wort und Schrift

Führerscheine

A und B (2001)

Interessen

Gesundheitsförderung aller Personengruppen; Nachhaltigkeit und ökologische Ansätze der Lebensmittelproduktion; Lebensstilforschung, insbesondere Ernährungsstile; Wildkräuter; Präsentationen und interaktives Lernen

Sport

Laufen, Klettern in der Halle und am Fels, Skitouren, Yoga, Jonglage und Hula Hoop

Musik

Gitarre und Gesang

Aktivitäten

Foodcoop Möhrengasse - 1020 Wien (Lebensmittelkooperative)

LEBENS LAUF

Schreibmaschinen- und **EDV- Kenntnisse** (MS Word, MS Exel, Powerpoint)

Teilnahme an Seminaren über **gewaltfreie Kommunikation** nach M. Rosenberg

■ Persönliches Profil

"Manche Menschen träumen von großen Taten.

Andere sind wach und führen sie aus."

In meinem bisherigen Berufsleben hat mir selbstständiges Arbeiten viel Freude bereitet. Kollegialität und gegenseitiges Vertrauen sind mir in beruflichen Beziehungen wichtig. Beim Anleiten meines Workshops "Werbung wirkt!" in Schulklassen versuche ich bestmöglich auf die jeweiligen Anforderungen einzugehen.

Beim Arbeiten im Team sind mir eine klare Kommunikation und ein zielorientiertes Arbeiten wichtig. Dabei bestärkt mich die Gruppendynamik bei der Arbeit. Im Arbeitsalltag lege ich viel Wert auf Freundlichkeit und Freude an der Tätigkeit, da beides Hand in Hand geht.